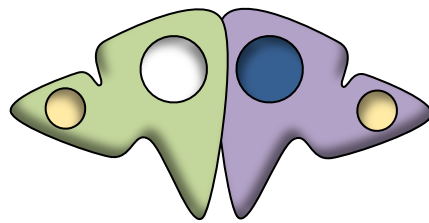


**2015**

**La adaptación a la deficiencia de zinc en cianobacterias. Papel de treonil-tRNA sintetasas duplicadas**



**TESIS DOCTORAL**

Miguel Ángel Rubio Gómez

Sevilla, 2015





# La adaptación a la deficiencia de zinc en cianobacterias. Papel de treonil-tRNA sintetetasas duplicadas

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Biología por el licenciado Miguel Ángel Rubio Gómez

Sevilla,.....

Director

Tutor

Dr. Ignacio Luque Romero

Dr. Agustín Vioque Peña



<b>1.-INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1.-La traducción en procariontes.....	2
1.1.1.-El RNA de transferencia.....	2
1.1.2.-El ribosoma bacteriano.....	4
1.2.-Las etapas de la traducción.....	5
1.3.-Las aminoacil-tRNA sintetetas.....	7
1.3.1.-Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetetas.....	8
1.3.2.-Composición de dominios de las aminoacil-tRNA sintetetas.....	11
1.3.3.-La reacción de aminoacilación.....	12
1.3.4.-La corrección de errores en las aaRSs y el mantenimiento de la fidelidad.....	14
1.3.4.1.-La edición <i>pre-transfer</i> .....	16
1.3.4.2.-La edición <i>post-transfer</i> .....	17
1.3.4.3.-La traducción ambigua.....	19
1.3.5.-Funciones no canónicas de las aaRSs.....	20
1.3.5.1.-Funciones alternativas de los aminoacil-tRNA.....	20
1.3.5.2.-Funciones alternativas de las aminoacil-tRNA sintetetas.....	21
1.4.- La treonil tRNA sintetasa.....	22
1.4.1.- Estructura y dominios.....	22
1.4.2.- Descripción del sitio activo de la ThrRS y mecanismo de catálisis.....	23
1.4.2.1.-Reconocimiento del tRNA <sup>Thr</sup> .....	24
1.4.3.- Edición del Ser-tRNA <sup>Thr</sup> .....	25
1.5.-Las cianobacterias.....	28
1.5.1.-Características generales.....	28
1.5.2.-Origen, evolución y diversificación de las cianobacterias.....	28
1.5.3.-Metabolismo energético.....	30
1.5.4.-Fijación de nitrógeno y diferenciación celular.....	30
1.6.-Rasgos particulares de las aminoacil-tRNA sintetetas en cianobacterias.....	31
1.6.1.- La síntesis de aminoacil-tRNA asociada a membranas.....	31
1.6.2.- Duplicación de genes <i>thrS</i> .....	31
1.7.-La Biología de los metales.....	33
1.7.1.-Sensores de la concentración de metales.....	34
1.7.1.1.-Familia FUR de reguladores.....	34
1.7.2.-Transportadores.....	35

1.7.3.-Metalotioneínas.....	36
1.7.4.-Mecanismos para la correcta metalación de las proteínas.....	36
1.7.4.1.-Separación topológica.....	36
1.7.4.2.-Metalochaperonas.....	36
1.7.4.3.-Proteínas promiscuas.....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>2.-MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
2.1.-Organismos y condiciones de cultivo.....	42
2.1.1.-Cianobacterias.....	42
2.1.1.1.-Estirpes de cianobacterias empleadas.....	42
2.1.1.2.-Medios y condiciones de cultivo.....	42
2.1.2.- <i>Escherichia coli</i> .....	46
2.1.2.1.-Estirpes de <i>E. coli</i> empleadas.....	43
2.1.2.2.-Medios y condiciones de cultivo.....	44
2.2.-Manipulación y análisis del DNA.....	44
2.2.1.-Plásmidos utilizados .....	44
2.2.2.-Aislamiento de DNA .....	44
2.2.3.-Tratamientos enzimáticos de DNA.....	44
2.2.4.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	48
2.2.5.- Construcción de fragmentos de DNA mutantes mediante técnicas basadas en la PCR.....	48
2.2.5.1.- Delección de secuencias.....	48
2.2.5.2.- Mutaciones puntuales.....	48
2.2.6.- Transferencia de DNA a bacterias.....	51
2.2.6.1.-Tranformación de <i>E. coli</i> .....	51
2.2.6.2.- Trasferencia de DNA a <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 mediante conjugación.....	52
2.3.- Manipulación y análisis de RNA.....	53
2.3.1.- Purificación de RNA total de cianobacterias.....	53
2.3.2.-Purificación de tRNA total de <i>E. coli</i> .....	54
2.3.3.-Electroforesis de RNA en geles ácidos de poliacrilamida-urea.....	55
2.3.4.-Análisis de regiones promotoras mediante transcripción <i>in vitro</i> (IVT).....	57
2.3.5.- Análisis del nivel de expresión mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) .....	59
2.4.-Métodos de sobreexpresión, purificación y análisis de proteínas.....	60
2.4.1.-Sobreexpresión de proteínas en <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) .....	60
2.4.2.-Purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de estreptavidina.....	62
2.4.3.-Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	63
2.4.4.-Cromatografía de exclusión molecular.....	63
2.4.5.- Inmunodetección de proteínas (Western Blot) .....	63
2.4.6.-Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) .....	65

2.5.-Análisis de la constante de afinidad de la proteína por metales.....	66
2.5.1.-Análisis del contenido de metales mediante ICP-MS.....	66
2.5.2.-Preparación de proteínas libres de metales.....	66
2.5.3.-Ensayos de competición por metales entre proteína y quelantes.....	68
2.6.-Ensayos enzimáticos.....	69
2.6.1.-Ensayos de aminoacilación.....	69
2.6.1.1.-Ensayos de carga de aminoácido ilegítimo.....	69
2.6.2.-Ensayos de la actividad de edición <i>post-transfer</i> .....	70
2.6.3.- Cálculo de los parámetros de cinética enzimática.....	71
2.6.3.1.-Cálculo de las concentraciones citoplasmáticas de aminoácidos.....	73
2.7.-Análisis bioinformático.....	74
<b>3.RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
3.1.- Identificación del regulador del operón <i>all4725-all4721</i> .....	78
3.2.- Regulación de los promotores internos del operón <i>all4725-all4721</i> .....	80
3.3.- Búsqueda bioinformática de posibles sitios de unión de Zur .....	82
3.4.-Análisis de la expresión de genes potencialmente regulados por Zur mediante PCR cuantitativa.....	82
3.5.-Análisis de la regulación de genes adyacentes.....	84
3.6.- Análisis de los niveles de expresión de <i>thrS1</i> y <i>thrS2</i> .....	87
3.7.-Sustitución de T1 por T2.....	88
3.8.-Papel de T2 en el crecimiento en condiciones de deficiencia de zinc.....	89
3.9.-Estudio del cofactor metálico de T1 y T2.....	91
3.9.1.-Análisis de la capacidad de remetalación de T1 y T2.....	91
3.9.2.-Cálculo de la afinidad de T1 y T2 por el zinc.....	93
3.9.2.1.-Competición con Mag-Fura2.....	93
3.9.2.2.-Competición con los quelantes NTA y HEDTA.....	95
3.9.3.-Análisis de cofactores alternativos para T2.....	97
3.10.-Análisis de la estructura cuaternaria de T1 y T2.....	98
3.10.1.-Impacto de la pérdida del cofactor en la estructura cuaternaria de T1 y T2.....	99
3.10.2.-Análisis de la estructura cuaternaria en mutantes de los residuos de coordinación del zinc.....	100
3.10.3.- Reconstitución de la estructura cuaternaria de T1.....	102
3.10.4.-Análisis de la base estructural de la disociación de T1 .....	103
3.11.-Análisis de la fidelidad de la carga del tRNA en T2.....	107
3.11.1.- Impacto de la inserción a sobre la actividad de edición de T2.....	107
3.11.2.- Parámetros de cinética enzimática y coeficiente de selectividad de T1 y T2.....	108
3.11.3.-Estudio de mecanismos adicionales de edición.....	111

3.12.-Análisis de la capacidad de heterodimerización de T1 y T2 en condiciones de deficiencia de zinc.....	113
3.13.-Análisis filogenético de genes de <i>thrS</i> duplicados en cianobacterias.....	114
<b>4.-DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
4.1.- La homeostasis del zinc en <i>Anabaena</i> .....	118
4.1.1.- Identificación del regulador del operón <i>all4725-all4721</i> .....	118
4.1.2.- El regulón Zur.....	119
4.1.3.- Modelo de adaptación a la deficiencia de zinc en <i>Anabaena</i> .....	123
4.2.- El sistema de T1-T2 en <i>Anabaena</i> .....	125
4.2.1.- Origen y evolución de <i>thrS1</i> y <i>thrS2</i> .....	125
4.2.2.- Modelo de funcionamiento del sistema T1-T2.....	126
4.2.3.- Control alostérico de la oligomerización de T1.....	127
4.2.4.- La fidelidad de la enzima T2.....	128
4.2.5.- Cambios funcionales de T1 asociados a su estado de oligomerización.....	130
4.2.6.- La oligomerización controlada de subunidades de ThrRSs duplicadas como mecanismo adaptativo.....	131
4.3.- La oligomerización controlada de subunidades de aaRSs duplicadas como mecanismo general de generación de variabilidad.....	132
<b>5.-CONCLUSIONES.....</b>	<b>135</b>
<b>6.-BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>
<b>7.-ARTÍCULOS.....</b>	<b>153</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.-El RNA de transferencia.....	2
Figura 1.2.-Modificaciones del tRNA.....	3
Figura 1.3.-El ribosoma bacteriano.....	4
Figura 1.4.-El ciclo de traducción.....	6
Figura 1.5.-La reacción de aminoacilación.....	7
Figura 1.6.-Arquitectura del sitio activo de las aaRS de clase I y II.....	9
Figura 1.7.-Dominios presentes en las aaRS.....	12
Figura 1.8.- Mecanismos de edición.....	16
Figura 1.9.- Translocación del extremo 3' del tRNA durante la edición.....	18
Figura 1.10.-La treonil-tRNA sintetasa.....	23
Figura 1.11.-Comparación entre los tRNAs de <i>T. thermophilus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	24
Figura 1.12.-La edición en la ThrRS.....	25
Figura 1.13.-Evolución del dominio N-terminal en la ThrRS.....	27
Figura 1.14.-Clasificación filogenética de las cianobacterias.....	29
Figura 1.15.-El operón <i>all4725-all4721</i> .....	32
Figura 1.16.-Serie de Irving-Williams.....	33
Figura 2.1.-Esquema de la estrategia utilizada para introducir mutaciones puntuales.....	51
Figura 2.2.-Titulación de sitio activo.....	72
Figura 3.1.- El operón <i>all4725-all4721</i> de <i>Anabaena</i> .....	78
Figura 3.2.-Alineamiento de las secuencias de unión de Fur y las regiones promotoras P5 y P3.....	79
Figura 3.3.-Unión de las proteínas de la familia FUR a la región promotora de <i>all4725</i> .....	79
Figura 3.4.-Análisis de los promotores del operón <i>all4725-all4721</i> .....	80
Figura 3.5.-Impacto de Zur en la transcripción de los promotores del operón.....	81
Figura 3.6.-Identificación del regulón Zur.....	85
Figura 3.7.- Expresión de los genes <i>thrS1</i> y <i>thrS2</i> tras inducción con TPEN.....	88
Figura 3.8.-Crecimiento en placa de los mutantes <i>thrS2</i> .....	89
Figura 3.9.-Efecto de la delección de <i>thrS2</i> en la carga del tRNA <sup>Thr</sup> .....	90
Figura 3.10.-Ensayos de remetalación de las proteínas T1 y T2.....	92
Figura 3.11.-Ensayo de competición de MA2 con T1 y T2.....	94
Figura 3.12.-Equilibrio de MA2 con T1 y T2.....	95
Figura 3.13.-Competición T1 y T2 con los quelantes NTA y HEDTA.....	96
Figura 3.14.-Sustitución de T2 con metales alternativos.....	98
Figura 3.15.-Estructura cuaternaria de T1 y T2.....	99
Figura 3.16.-Análisis de la estructura cuaternaria de los mutantes de los residuos de coordinación de T1.....	101
Figura 3.17.-Sustitución de T1 con metales alternativos.....	103
Figura 3.18.-Comparativa de secuencia de T1 y T2.....	104-105
Figura 3.19.-Papel de las inserciones <i>b</i> y <i>c</i> en la dinámica de oligomerización de T1.....	106
Figura 3.20.-Actividad de carga de tRNA <sup>Thr</sup> con serina de T1 y T2.....	107
Figura 3.21.-Impacto del indel <i>a</i> sobre la actividad de edición de T2.....	108
Figura 3.22.-Titulación del sitio activo de T1 y T2.....	109
Figura 3.23.-Constantes cinéticas de T1 y T2.....	110
Figura 3.24.-Actividad de edición del mutante T1-SYY.....	112
Figura 3.25.-Copurificación de T1 y T2 de células de <i>E. coli</i> .....	114
Figura 3.26.-Árbol filogenético de las <i>thrS</i> cianobacterianas.....	115
Figura 4.1.-Aclimatación a la deficiencia de zinc en <i>Anabaena</i> PCC7120.....	124
Figura 4.2.-Modelo de funcionamiento del sistema T1-T2.....	127
Figura 4.3.-Localización de las inserciones <i>b</i> y <i>c</i> en T1.....	128
Figura 4.4.-Generación de variabilidad mediante la oligomerización controlada de subunidades.....	134

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.-Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetasas.....	10
Tabla 2.1.-Lista de estirpes de cianobacterias.....	42
Tabla 2.2.-Lista de estirpes de <i>E. coli</i> .....	43
Tabla 2.3.-Lista de plásmidos de la colección del laboratorio.....	45
Tabla 2.4.-Lista de plásmidos generados durante este trabajo.....	46
Tabla 2.5.-Lista de cebadores.....	49-50
Tabla 2.6.-Lista de cebadores utilizados en los experimentos de Q-PCR.....	61
Tabla 3.1.-Genes analizados mediante Q-PCR.....	83
Tabla 3.2.-Análisis de la expresión de genes potencialmente regulados por Zur.....	84
Tabla 3.3.-Resumen de los genes analizados mediante Q-PCR.....	86
Tabla 4.1.-Secuencia consenso de unión de Zur.....	119
Tabla 4.2.-Secuencias de unión del regulador Zur de distintos organismos.....	119
Tabla 4.3.-Genes de aaRSS duplicados.....	133

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
$\mu$ E	microEinstein
5' RACE	Rapid Amplification of 5' cDNA Ends
A	Absorbancia
aa	aminoácido
aaRS	Aminoacil-tRNA sintetasa
AMP	Adenosina Monofosfato
Ap	Ampicilina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo ( <i>American Type Culture Collection</i> )
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	par de bases (base pair)
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
Cm	Cloramfenicol
ddNTPs	didesoxirribonucleósidos trifosfato (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética ( <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> )
HEDTA	Ácido hidroxietilendiaminotriacético
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HGT	Trasferencia horizontal de genes
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> (espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente)
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
IVT	<i>In vitro transcription</i> (transcripción <i>in vitro</i> )
Kb	Kilobase
$k_{cat}$	Constante catalítica de la reacción enzimática
$K_d$	Constante de disociación
$K_D$	Constante de afinidad
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
L-Ser	L-Serina
L-Thr	L-Treonina
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Nm	Neomicina
NTA	Ácido trinitroacético
ORF	Pauta de lectura abierta ( <i>Open Reading Frame</i> )
p/v	Reacción peso-volumen
PAGE	Electroforésis en geles de poliacrilamida
PCC	Colección de Cultivos Tipo del Instituto Pasteur ( <i>Pasteur Culture Collection</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNK	Polinucleótido quinasa
PPi	Pirofosfato
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico

<b>SAP</b>	Fosfatasa alcalina de camarón ( <i>Shrimp alkaline phospharase</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>Sep</b>	O-fosfoserina
<b>Spec</b>	Espectinomicina
<b>Strep</b>	Estreptomina
<b>TBE</b>	Tampón Tris-Borato-EDTA
<b>Tc</b>	Tetraciclina
<b>TCA</b>	Ácido Tricloroacético
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetra-metilendiamina
<b>TES</b>	Ácido N' tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
<b>TES</b>	Ácido N' tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
<b>TPEN</b>	N, N, N', N'-tetra(piridimetil)etilendiamina
<b>Tris</b>	Tris-(hidroxilmetil)aminometano
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>tsp</b>	Sitio de inicio de la transcripción
<b>U</b>	Unidad de Actividad Enzimática
<b>v/v</b>	Reacción volumen-volumen
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidad máxima de la reacción enzimática
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
<b>Zn</b>	Zinc

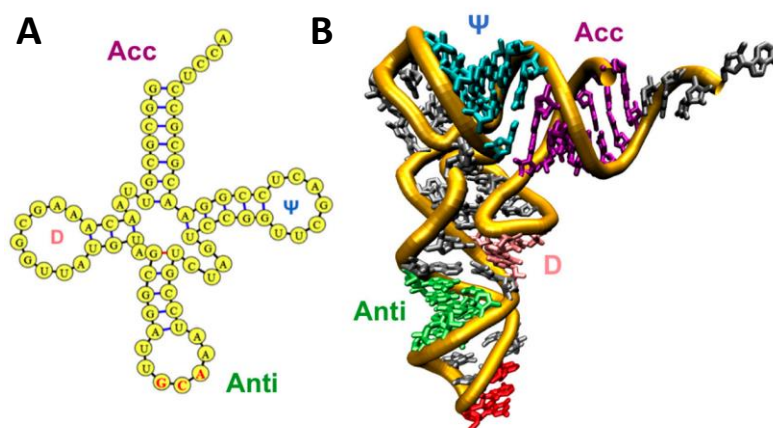
# **1** **I**NTRODUCCIÓN

## 1.1.-La traducción en procariontas

La traducción del mensaje genético ocurre en el ribosoma, una riboproteína compleja capaz de interpretar la información contenida en la secuencia nucleotídica del mRNA, que determina la identidad y el orden en la que deben polimerizar los aminoácidos. El descubrimiento de los mecanismos moleculares de la traducción se inicia en las décadas de los 50 y 60 y se considera uno de los hitos de la Biología Molecular. En estos años se realizaron tres descubrimientos clave: la necesaria activación de los aminoácidos para participar en la síntesis de proteínas seguida de la identificación de las enzimas responsables de esta activación, las aminoacil-tRNA sintetasas (aaRSs) (Hoagland, 1955); la demostración de que la síntesis proteica tiene lugar en los ribosomas (Zamecnik *et al.*, 1958) y el descubrimiento de la molécula de tRNA, que funciona como puente entre el mRNA y el aminoácido (Berg, 1958; Hoagland *et al.*, 1958), cuya existencia había sido postulada por F. Crick en su célebre hipótesis del adaptador (Crick, 1956). Los estudios posteriores encaminados a investigar las reglas de correspondencia de secuencias nucleotídicas y peptídicas culminaron con el descubrimiento del código genético (Nirenberg & Matthaei, 1961; Ochoa *et al.*, 1961).

### 1.1.1.-El RNA de transferencia

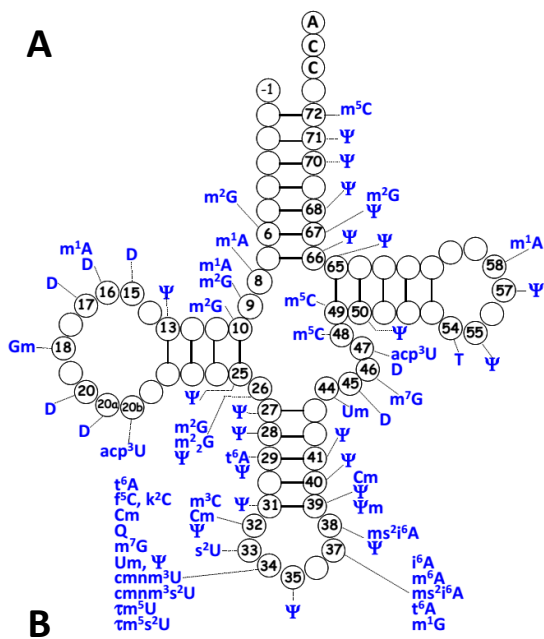
Los RNA de transferencia (tRNA) son moléculas de RNA no codificantes de pequeño tamaño (70-93 nucleótidos) ubicuas en todos los dominios de la vida. Su función principal es participar en la traducción, aportando los aminoácidos al ribosoma. Los tRNAs presentan secuencias complementarias y que establecen uniones de Watson y Crick, de manera que forman regiones de doble cadena conectadas por lazos monocatenarios. La representación de la



**Figura 1.1.-El RNA de transferencia.** A) Representación de la estructura secundaria del tRNA donde se aprecia la estructura en forma de "hoja de trébol". B) Representación tridimensional de la estructura del tRNA.  $\Psi$ : brazo  $\Psi$ ; Anti: brazo del anticodón (el triplete del anticodón aparece en rojo); D: brazo D (dehidrouridina); Acc: Brazo aceptor, donde se aprecia la secuencia CCA terminal (gris en la figura B). Reproducción de una figura de Li *et al.*, 2015.

estructura secundaria del tRNA presenta una característica forma de trébol (Figura 1.1.A.), donde se pueden identificar los elementos estructurales comunes a todos los tRNAs. Estos elementos son el brazo D (denominado así por contener la base modificada dehidrouridina), el brazo del anticodón, el brazo T $\Psi$ C

(también llamado simplemente  $\Psi$  por contener la base modificada pseudouridina) y el brazo aceptor. El brazo del anticodón contiene el triplete de nucleótidos que confiere la identidad del tRNA, mientras que el brazo aceptor contiene la secuencia 3' terminal CCA, siendo esta última base la que establece el enlace con el aminoácido. En la estructura tridimensional del tRNA, el brazo aceptor y el brazo  $\Psi$  se apilan, formando un bucle de 12 pb denominado "minihélice" (Francklyn & Schimmel, 1989). Asimismo, los brazos del anticodón y D se apilan y como resultado la molécula de tRNA adopta forma de "L", con el brazo aceptor y el brazo del anticodón en extremos opuestos (Shepherd & Ibba, 2015) (Figura 1.1.B).



Position	Modification	Enzyme
8	S <sup>4</sup> U	IscS, Thil
13	$\Psi$	TruD
16	D	Dus A, B, C
17	D	Dus A, B, C
18	Gm	TrmH
20	D	Dus A, B, C
20a	D	Dus A, B, C
32	S <sup>2</sup> C Cm, Um $\Psi$	IscS, TtcA TrmI RluA
34	I k <sup>2</sup> C ac <sup>4</sup> C Um, Cm Q, GluQ mnm <sup>5</sup> U cmnm <sup>5</sup> Um cmnm <sup>5</sup> U mnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U cmnm <sup>5</sup> s <sup>2</sup> U mnm <sup>5</sup> se <sup>2</sup> U mcmo <sup>5</sup> U cmo <sup>5</sup> U	TadA TilS TrmC TrmL FolE, QueDCEF, Tgt, QueA and G+YadB MnmC1 and C2+TrmL MnmE, GidA ? ? ? CmoA and B AroBDEKLAC
37	m <sup>1</sup> G m <sup>6</sup> A m <sup>2</sup> A i <sup>6</sup> A ms <sup>2</sup> i <sup>6</sup> A t <sup>6</sup> A m <sup>6</sup> t <sup>6</sup> A	TrmD TrmN6? MiaA MiaB, IscS, IscU TsaC, D, B and E TsaA
38	$\Psi$	TruA
39	$\Psi$	TruA
40	$\Psi$	TruA
46	m <sup>7</sup> G	TrmB
47	acp <sup>3</sup> U	?
54	rT	TrmA
55	$\Psi$	TruB
65	$\Psi$	TruC
67	$\Psi$	TruC

**Figura 1.2.-Modificaciones del tRNA.** A) Modificaciones de los tRNAs mitocondriales. Reproducción de una figura de Salinas-Giegé *et al.*, 2015 B) Listado con las modificaciones de los tRNAs de *E. coli*. Reproducción de una figura de Shepherd & Ibba, 2015, basada en resultados de El Yacubi, 2012.

Una de las características más notables de los tRNAs es el elevado número de bases modificadas que presentan. Se han identificado más de 100 modificaciones diferentes, la mayoría de las cuales se concentran en las posiciones 34 y 37 del lazo del anticodón (Grosjean *et al.*, 2010; Shepherd & Ibba, 2015) (Figura 1.2). Durante la decodificación del mRNA, los tripletes de éste establecen interacciones con las bases 34, 35 y 36 del anticodón del tRNA. Sin embargo, solo las bases 35 y 36 forman enlaces de Watson y Crick, mientras que la base 34 establece uniones más inespecíficas, lo que permite a una misma molécula de tRNA aparearse a varios codones sinónimos, un fenómeno que se conoce como *tambaleo* (*wobbling* en inglés). La modificación de la base 34 permite un reconocimiento suficientemente relajado para aparear varios codones sinónimos pero a su vez suficientemente restrictivo para discriminar codones de identidad distinta (Giegé *et al.*, 2012). El brazo del anticodón también presenta bases modificadas que funcionan generalmente como determinantes de identidad (ver sección 1.3.3), que participan en el reconocimiento del tRNA por las aaRSs (Giegé & Lapointe, 2009). Los tRNAs pueden presentar bases modificadas en otras

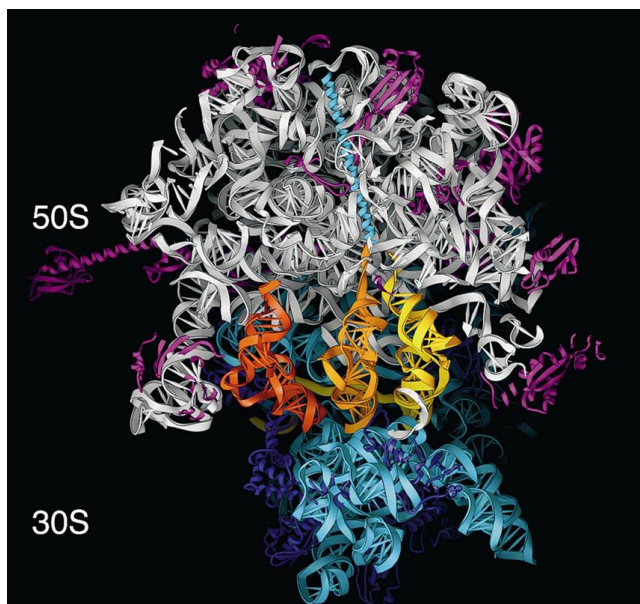
partes de su secuencia, donde cumplen funciones relacionadas con el correcto plegamiento y la estabilización del tRNA o el reconocimiento del tRNA por el factor de elongación EF-Tu (Eargle *et al.*, 2008). Una indicación de la importancia de las modificaciones de los tRNAs en el funcionamiento de las células es el hecho de que éstas dedican entre el 1% y el 10% de sus genes a codificar proteínas involucradas en esta función (El Yacoubi *et al.*, 2012).

### 1.1.2.-El ribosoma bacteriano

El ribosoma bacteriano es una riboproteína compleja formada por dos subunidades. La subunidad pequeña posee un coeficiente de sedimentación de 30 unidades Svederg (30S) y está formada por 21 proteínas (denominadas S1-S21) y un RNA ribosómico (rRNA) de 16S. La subunidad grande (50S) contiene 36 proteínas (L1-L36) y dos rRNAs de 5S y 23S. Combinadas presentan un coeficiente de sedimentación de 70S. La molécula responsable de la actividad catalítica del ribosoma es el rRNA, lo que convierte al ribosoma en una ribozima, mientras que las proteínas tienen un papel fundamentalmente estructural. Los rRNAs contribuyen además en gran medida a la estructura tridimensional del ribosoma (Simonetti *et al.*, 2009).

La subunidad 30S contiene un dominio denominado *plataforma*, involucrado en la interacción con el mRNA, así como el llamado *centro de decodificación* (DC) donde se produce la interacción codón-anticodón (Dunkle *et al.*, 2011) y que contiene los extremos 3' y 5' del 16S RNA. La subunidad 50S contiene el *centro peptidil-transferasa* (PTC) encargado de catalizar la formación del enlace peptídico. Cuando ambas subunidades se ensamblan para formar el ribosoma completo, se forman los tres sitios del ribosoma:

el sitio A, que incorpora los aminoacil-tRNA entrantes, el sitio P, donde se cataliza la formación del enlace peptídico, y el sitio E, donde se encuentran los tRNA deacilados (Figura 1.3.). Durante la traducción, el ribosoma se desplaza por el mRNA en dirección 5'-3' y los tripletes del mRNA se van leyendo secuencialmente hasta que se alcanza un codón de parada, momento en el cual la maquinaria de traducción se desensambla.



**Figura 1.3.-El ribosoma bacteriano.** Representación tridimensional del ribosoma de *Thermus thermophilus*, donde se aprecian los componentes fundamentales: proteínas de la subunidad 30S (azul oscuro) y el rRNA 16S (azul claro); proteínas de la subunidad 50S (morado) y rRNA 23S (blanco), el rRNA 5S no aparece en la imagen. Se muestran los tRNAs en los tres sitios del ribosoma: A (amarillo), P (naranja claro) y E (naranja oscuro) y la cadena polipeptídica creciente (celeste). Reproducción de una figura de Noller *et al.*, 2002.

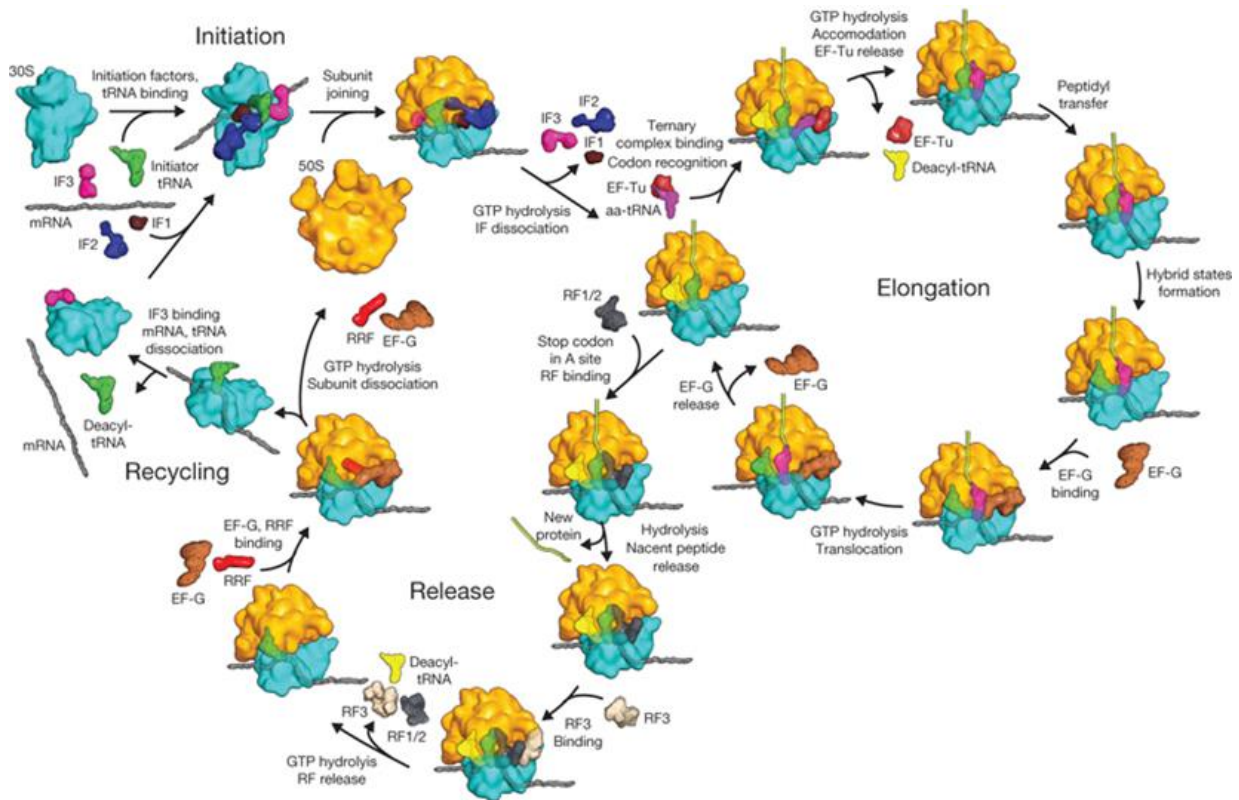


## 1.2. -Las etapas de la traducción

El inicio de la traducción es uno de los pasos más críticos del proceso y el principal factor limitante de la velocidad de traducción (Lovmar & Eherenberg, 2006). Requiere la formación de un complejo productivo entre las subunidades del ribosoma, el mRNA y un tRNA especial para el codón de metionina inicial que está cargado con formil-metionina (fMet-tRNA<sup>Met</sup>). El proceso comienza con la unión de los factores de iniciación IF-1, IF-2 e IF-3 a la subunidad 30S y el anclaje del mRNA a la plataforma de esta misma subunidad. Para la correcta selección del codón de inicio y el marco abierto de lectura durante la traducción, se requiere la formación de un dúplex entre la secuencia Shine-Dalgarno, SD (GGAGG) de la zona 5' UTR del mRNA y una secuencia complementaria (aSD) conservada en el extremo 3' del rRNA 16S. Tras este paso, el mRNA se despliega y se extiende sobre la superficie de unión de la subunidad, de manera que el codón de inicio queda alineado en el DC. El tRNA iniciador fMet-tRNA<sup>Met</sup> ocupa entonces el sitio P de la subunidad, asistido por los factores IF-1 e IF-3. Por último, la subunidad 50S se une al complejo, promoviendo la hidrólisis de la molécula de GTP unida al factor IF-2 y la eyección de los tres factores, con lo que se forma el complejo de iniciación maduro (Simonetti *et al.*, 2009).

Durante la fase de elongación, los aminoacil-tRNAs se incorporan al sitio A del ribosoma y se produce la transferencia del aminoácido a la cadena polipeptídica creciente. Para la participación de los aminoacil-tRNAs en la traducción se requiere la formación de un complejo entre éstos y el factor de elongación EF-Tu unido a GTP. El complejo se une al sitio A del ribosoma y se produce el apareamiento de bases entre el codón del mRNA y el anticodón del tRNA. Estas interacciones ocurren en el centro de decodificación de la subunidad 30S (Lovmar & Eherenberg, 2006). Si existe complementariedad entre el codón que ocupa el sitio A y el anticodón del aminoacil-tRNA entrante, éste permanece en esta localización el tiempo suficiente para que tenga lugar la hidrólisis de GTP unido al factor EF-Tu, que abandona el ribosoma (Voorhees & Ramakrishnan, 2013). Inmediatamente después se produce la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos unidos a los tRNAs de los sitios P y A. La formación del enlace ocurre en el PTC de la subunidad 50S, que facilita el ataque nucleofílico del aminoácido del sitio A sobre el enlace éster que une el tRNA en el sitio P con su aminoácido, con lo que se obtiene un peptidil-tRNA en el sitio A y un tRNA desacilado en el sitio P (Simonović & Steitz, 2009).

Formado el enlace peptídico, el ribosoma recorre la distancia de un codón hacia el extremo 3' del mRNA. Durante el desplazamiento, los componentes de la maquinaria de traducción sufren importantes cambios conformacionales. En ello interviene el factor EF-G unido a GTP, también llamado *translocasa*, cuya estructura mimetiza la de un aminoacil-tRNA unido al EF-Tu y se introduce en el sitio A, provocando la rotación de la subunidad 30S. Los tRNAs pasan a



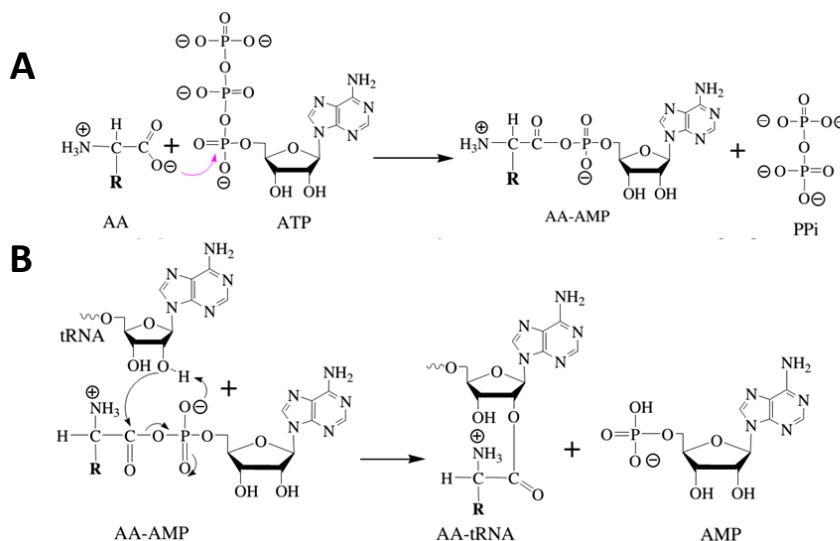
**Figura 1.4.-El ciclo del ribosoma.** Representación esquemática ciclo del ribosoma. Reproducción de una figura de Schmeing & Ramakrishnan, 2009 (detalles en el texto).

un estado transitorio en el que el tRNA desacilado está en un estado E/P (en el sitio E de la subunidad 30S y el sitio P de la 50S) y el peptidil-tRNA en un estado P/A. La hidrólisis de GTP provoca que ambas subunidades vuelvan al estado canónico, donde el peptidil-tRNA se ha desplazado al sitio P, el tRNA desacilado al sitio E, desde donde se libera, y el sitio A queda libre (Noller *et al.*, 2002; Voorhees & Ramakrishnan, 2013). El ribosoma comienza entonces otra ronda de polimerización, uniendo un nuevo aa-tRNA en el sitio A y repitiendo el proceso hasta la aparición de un codón de terminación. Cuando ello ocurre intervienen los factores de terminación RF-1 y RF-2. Estos factores poseen una estructura tridimensional que mimetiza la del aa-tRNA. Tras la aparición de un codón de terminación en el sitio A, el factor RF-1 (en el caso los codones de parada UAG y UAA) o el factor RF-2 (UGA o UAA), se unen al sitio A y promueven la transferencia del polipéptido unido al extremo aceptor del tRNA a una molécula de agua, lo que libera la cadena polipeptídica. La unión del factor EF-G y el factor de reciclaje del ribosoma (RRF) estimulan la disociación de las subunidades 30S y 50S. La posterior unión del factor IF-3 a la subunidad 30S libera el tRNA y el mRNA, que aún permanecen unidos a ésta, con lo que todos los componentes vuelven al estado inicial. (Korostelev, 2011) (Figura 1.4.).

### 1.3.-Las aminoacil-tRNA sintetetas

Las aminoacil-tRNA sintetetas (aaRSs) son enzimas de distribución universal que catalizan la esterificación del tRNA con el aminoácido correspondiente a su anticodón. El producto de esta reacción es el tRNA cargado o aminoacil-tRNA (aa-tRNA) que será utilizado como sustrato en el ribosoma durante la síntesis proteica. El funcionamiento de las aaRSs establece las reglas del código genético y su papel es central en el proceso de traducción (Woese *et al.*, 2000). La aaRSs reciben su nombre según el tRNA que cargan, así la aaRS que carga el tRNA de alanina se llama alanil-tRNA sintetasa y se abrevia "AlaRS", la que carga el tRNA de treonina se llama treonil-tRNA sintetasa y se abrevia "ThrRS". Se han descrito 23 aaRS diferentes, una para cada uno de los 20 aminoácidos proteínogénicos excepto la lisina, para la cual existen 2 aaRSs distintas y otras dos aaRS de distribución restringida, la pirrolisil-tRNA sintetasa (PylRS) y la fosfoseril-tRNA sintetasa (SepRS) (Ibba & Söll, 2004).

La reacción de aminoacilación ocurre en dos pasos consecutivos. En la primera semireacción, conocida como *activación del aminoácido*, la enzima une el aminoácido y el ATP y se produce un ataque nucleofílico del oxígeno del  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido al  $\alpha$ -fosfato del ATP, formándose un aminoacil-adenilato (aa-AMP) que permanece unido a la enzima y liberando pirofosfato. En esta etapa no interviene el tRNA, y la mayoría de las aaRS pueden llevar a cabo este paso en su ausencia, salvo la GlnRS, GluRS, ArgRS y la LysRS de clase I. Durante la segunda semireacción, el aminoácido se transfiere al grupo 2' ó 3'-hidroxilo de la ribosa del nucleótido A76 del extremo 3' del tRNA, formándose el aa-tRNA y liberándose AMP. La energía liberada por la hidrólisis del enlace fosfato de alta energía del ATP provee el empuje termodinámico necesario para llevar a cabo la reacción de aminoacilación (First, 2005; Perona & Gruic-Sovulj, 2014) ( Figura 1.5.).



**Figura 1.5.-La reacción de aminoacilación. A)** Semireacción de activación del aminoácido. **B)** Semireacción de transferencia al tRNA. Reproducción de una figura de Banik & Nandi, 2012.

Debido a que en el ribosoma solamente se asegura el apareamiento correcto del codón del mRNA con el anticodón del tRNA, sin atender a la identidad del aminoácido que éste porta, las aaRS son las responsables de asegurar que el tRNA se cargue con el aminoácido “legítimo”, esto es, aquel que corresponde a su anticodón (Woese *et al.*, 2000). La precisión en el funcionamiento de las aaRS es, por tanto, fundamental para que el mensaje genético se traduzca con fidelidad. Para asegurar el correcto apareamiento del tRNA con su aminoácido legítimo, las aaRS en su evolución han desarrollado una alta especificidad por sus sustratos, así como mecanismos de corrección de errores (Yadavalli & Ibba, 2012a; Ling *et al.*, 2009a; Reynolds *et al.*, 2010a).

Puesto que las proteínas están compuestas en su mayoría por los 20 L-aminoácidos proteinogénicos, es razonable esperar que toda célula tenga una dotación de al menos 20 aaRS, una para cada aminoácido. Sin embargo, muchos organismos carecen de una o varias aaRS. En muchas bacterias y arqueas se encuentran ausentes las AsnRs y la GlnRS y en estos organismos la síntesis del asparriginil- y el glutaminil-tRNA se realiza mediante la denominada ruta indirecta. En esta ruta, una GlnRS o AsnRS de especificidad relajada carga el tRNA<sup>Gln</sup> o el tRNA<sup>Asn</sup> con Glu o Asp, que una vez cargados en el tRNA son subsecuentemente transformados en Gln y Asn, respectivamente por una amidotransferasa (AdT) que utiliza ATP y un donador de grupos amino (Ibba *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2004; Raina & Ibba, 2014). Algunas arqueas metanogénicas no poseen el gen de la CysRS y la carga del tRNA<sup>Cys</sup> la realiza una aaRS no canónica, denominada O-fosfoseril-tRNA sintetasa (SepRS), una sintetasa de la clase II que carga el tRNA con O-fosfoserina (Sep). El Sep-tRNA<sup>Cys</sup> resultante es sustrato de la Sep-tRNA:Cys-tRNA sintetasa (SepCysS) que transforma el Sep en Cys (Labunskyy *et al.*, 2014).

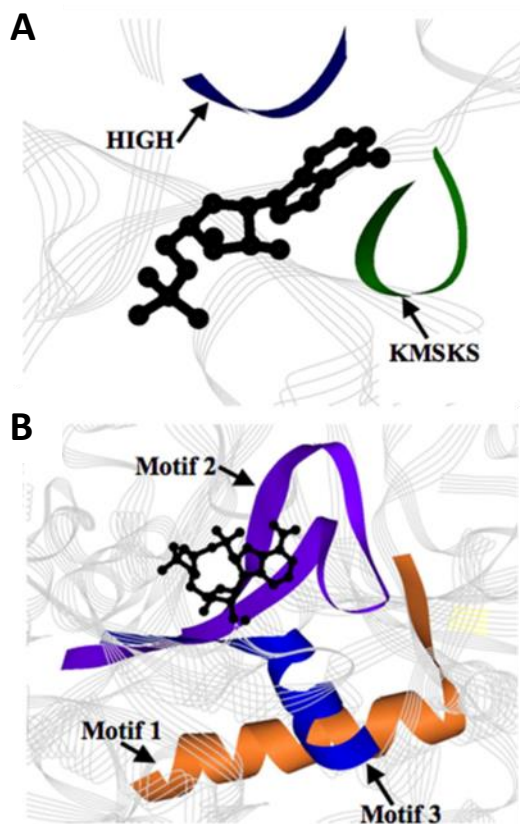
Un rasgo frecuente en las aaRS es que aparte de su función canónica de aminoacilación, común a todas las células, en algunos organismos participan en funciones no relacionadas con la síntesis proteica, como algunas rutas biosintéticas, la regulación transcripcional y traduccional o la señalización celular (Sang *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2010).

### 1.3.1.-Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetasas

Teniendo en cuenta varias características funcionales y estructurales, las aaRSs se dividen en dos clases, denominadas clases I y II, cada una de las cuales agrupa aproximadamente la mitad de las aaRSs (Cusack *et al.*, 1990; Eriani *et al.*, 1990). Ambas clases se diferencian fundamentalmente en la estructura del dominio catalítico, que en las aaRSs de clase I presenta un plegamiento de unión a nucleótidos o plegamiento de Rossmann (*Rossmann Fold*, RF) que se localiza cerca del extremo N-terminal de la proteína y está constituido por 5 láminas  $\beta$  paralelas conectadas por  $\alpha$ -hélices. El RF contiene los motivos conservados HIGH y KMSKS (Schmidt &

Schimmel, 1995) (Figura 1.6.A) y se encuentra dividido en dos mitades por la inserción de un dominio denominado péptido conector 1 (CP1). Esta arquitectura contrasta con la del dominio catalítico de las aaRSs de clase II, que presenta 7 láminas- $\beta$  antiparalelas flanqueadas por  $\alpha$ -hélices (Ruff *et al.*, 1991) y que contiene tres motivos de secuencia degenerados, denominados motivos 1, 2 y 3, de los que los dos últimos están implicados en la catálisis (Perona & Gruic-Sovulj, 2014) (Figura 1.6B).

La diferencia en los dominios catalíticos se corresponde asimismo con diferencias en el mecanismo de aminoacilación de las enzimas de cada clase. Mientras que las aaRSs de la clase I (a excepción de la TrpRS y TyrRS) se aproximan al tRNA por el surco menor del brazo aceptor, de modo que el lazo variable queda expuesto al solvente, y esterifican el aminoácido en el grupo 2'-OH de la ribosa de la adenosina terminal (A76) del tRNA (que será posteriormente transferido al grupo 3' OH), las aaRSs de clase II se aproximan al brazo aceptor del tRNA por el surco mayor y catalizan la transferencia del aminoácido directamente al grupo 3'-OH (Schimmel & Söll, 1979; Sprinzl & Cramer, 1975), con la notable excepción de la PheRS que transfiere el aminoácido al grupo 2'-OH (Ibba & Soll, 2000). También existen diferencias en el modo de unión del ATP entre las aaRSs de clase I, que unen la molécula en una configuración extendida, y las de clase II, que la



**Figura 1.6.-Arquitectura del sitio activo de las aaRS de clase I y II.** A) Sitio activo de la LeuRS (Clase I) y B) de la GlyRS (Clase II), con los motivos aminoacídicos característicos de cada clase. En negro aparece la molécula de ATP, donde se aprecia la conformación extendida y doblada característica de ambas clases. Reproducción de una figura de Pang *et al.*

unen en una configuración doblada (Arnez & Moras, 1997a) (Figura 1.6). Además, la cinética de la reacción es diferente para los dos grupos: mientras que en general para las aaRSs de clase I el paso limitante es la liberación del aminoacil-tRNA (a excepción de la IleRS y algunas GluRS), en las de clase II el paso limitante es la activación del aminoácido (Zhang *et al.*, 2006). Atendiendo a la estructura cuaternaria, la mayoría de las aaRSs de la clase I son monoméricas, salvo TrpRS y TyrRS y en algunos organismos MetRS y CysRS (Crepin *et al.*, 2002; Motorin *et al.*, 1997). Por el contrario, todas las enzimas de clase II forman dímeros (generalmente, homodímeros) o tetrámeros (Perona & Hadd, 2012).

Las similitudes a nivel de secuencia, estructura y funcionamiento han llevado a proponer que las enzimas de cada clase derivarían evolutivamente de una proteína ancestral común

(Woese *et al.*, 2000; O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003). Las dos clases de aaRSs se dividen a su vez en varios subgrupos, en base a análisis filogenéticos, características estructurales y mecánicas y la organización de los diferentes dominios (Cusack, 1995; Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001a). Aunque existe consenso en la subdivisión de las aaRS de clase II en tres subgrupos (*a*, *b* y *c*), la subclasificación de las aaRS de clase I es más compleja y muestra ligeras diferencias según el autor (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001b; Perona & Hadd, 2012), aunque en este trabajo utilizaremos la propuesta por Schimmel. (Tabla 1.1) La agrupación en subclases pone de manifiesto algunas correlaciones entre las aaRSs de cada subclase y las características químicas de sus aminoácidos sustrato. Los miembros de la subclase *Ia* reconocen los aminoácidos azufrados Met y Cys y alifáticos como Leu, Ile y Val. Los miembros de la subclase *Ib* reconocen aminoácidos cargados como Lys, Glu y su derivado Gln, mientras que las enzimas de clase *Ic* reconocen aminoácidos aromáticos como Tyr y Trp. Un aspecto muy interesante es que esta correlación se extiende también a las aaRSs del mismo subgrupo de la otra clase. Así, los miembros de la subclase *IIb* reconocen aminoácidos cargados como Lys, Asp y su derivado Asn, similares a los aminoácidos cargados reconocidos por las aaRSs de la subclase *Ib*, mientras que los miembros de la subclase *IIc* reconocen, al igual que los de la subclase *Ic*, aminoácidos aromáticos (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001c).

Clase I	Estructura cuaternaria	Función de edición	Clase II	Estructura cuaternaria	Función de edición
<i>Subclase Ia</i>			<i>Subclase IIa</i>		
<b>MetRS</b>	$\alpha_2$	Si	<b>SerRS</b>	$\alpha_2$	Si (Thr, Cys)
<b>ValRS</b>	$\alpha$	Si (Thr)	<b>ThrRS</b>	$\alpha_2$	Si (Ser)
<b>LeuRS</b>	$\alpha$	Si (Ile, Met)	<b>AlaRS</b>	$\alpha_2$	Si (Ser, Gly)
<b>IleRS</b>	$\alpha$	Si (Val, Cys)	<b>GlyRS</b>	$\alpha_2, (\alpha\beta)_2$	No
<b>CysRS</b>	$\alpha, \alpha_2$	No	<b>ProRS</b>	$\alpha_2$	Si (Ala, Cys)
<b>ArgRS</b>	$\alpha_2$	No	<b>HisRS</b>	$\alpha_2$	No
<i>Subclase Ib</i>			<i>Subclase IIb</i>		
<b>GluRS</b>	$\alpha$	No	<b>AspRS</b>	$\alpha_2$	No
<b>GlnRS</b>	$\alpha$	No	<b>AsnRS</b>	$\alpha_2$	No
<b>LysRS-I</b>	$\alpha$	No	<b>LysRS-II</b>	$\alpha_2$	Si
<i>Subclase Ic</i>			<i>Subclase IIc</i>		
<b>TyrRS</b>	$\alpha$	No	<b>PheRS</b>	$(\alpha\beta)_2, \alpha$	Si (Tyr, Ile)
<b>TrpRS</b>	$\alpha_2$	No	<b>PylRS</b>	$\alpha_2$	No
			<b>SepRS</b>	$\alpha_4$	No

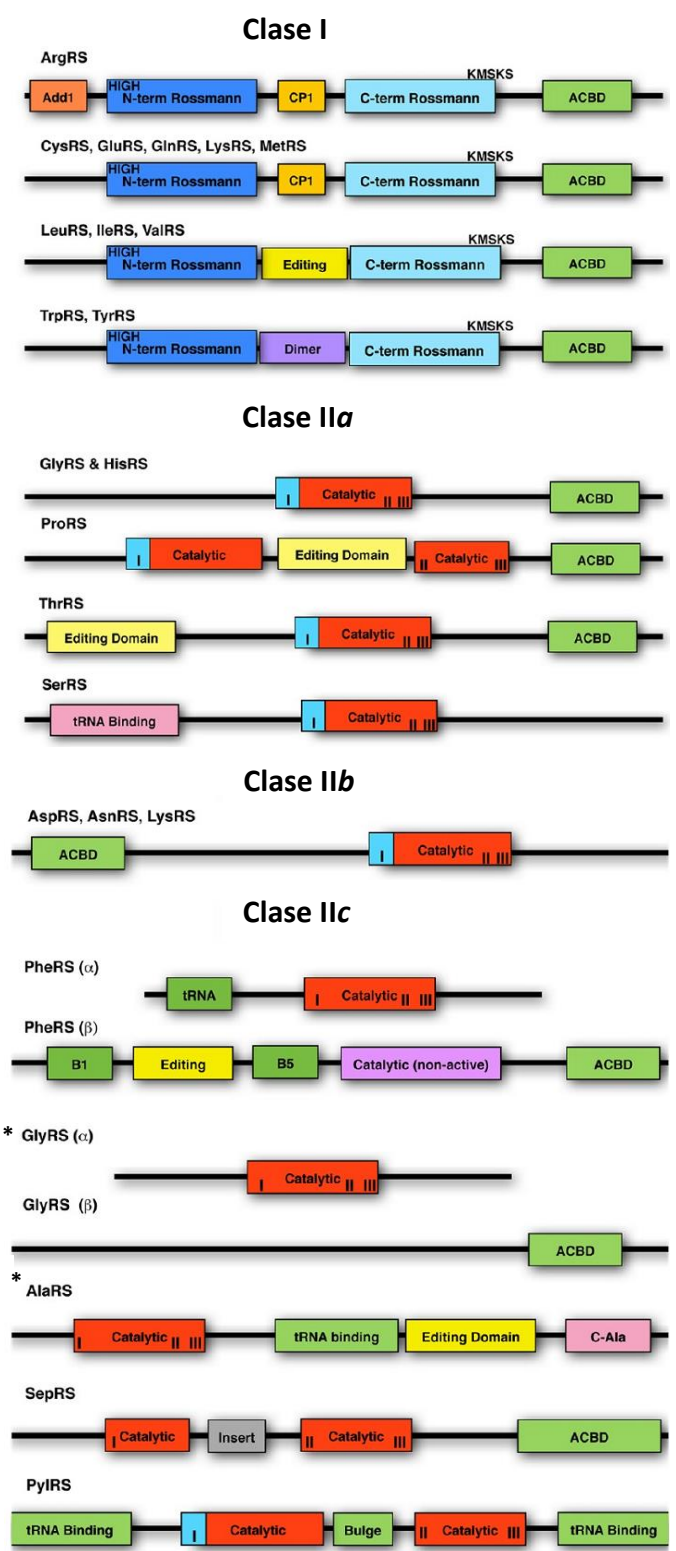
**Tabla 1.1.-Clasificación de las aminoacil-tRNA sintetetasas.** Las aaRS aparecen agrupadas según la subclase a la que pertenecen. En la tabla se recogen algunas propiedades de las aaRSs como su estructura cuaternaria o si presentan o no actividad de edición (entre paréntesis se indican los aminoácidos que editan). Adaptado de Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001 y Perona & Gruic-Sovulj, 2014.

Debido a que ambas clases de aaRSs se aproximan al brazo aceptor del tRNA por lados opuestos, es posible simular la interacción simultánea de dos aaRSs de clases distintas sobre una misma molécula de tRNA sin que aparezcan grandes impedimentos estéricos, lo que permite establecer relaciones entre parejas de aaRSs de cada clase (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001a). Aunque estas simetrías no son perfectas y existen numerosas excepciones, han inspirado algunas hipótesis sobre el origen y la evolución de las aaRSs según las cuales primitivamente, aaRS de distinta clase podrían reconocer un mismo tRNA y cargarlo con aminoácidos de carácter similar (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001b).

La única excepción conocida a la regla de las dos clases de aaRSs es la LysRS. La mayoría de los organismos presentan una LysRS de clase II. En cambio, algunas arqueas, como por ejemplo *Methanococcus maripaludis*, poseen una LysRS con las características de la clase I. Esta enzima tiene un origen filogenético independiente a la LysRS de clase II y es el resultado de la convergencia evolutiva de dos aaRSs ancestrales para la lisinización del tRNA (Ibba *et al.*, 1997). En algunas bacterias también se encuentra una LysRS de clase I adquirida por transferencia horizontal. En las arqueas del género *Methanosarcineae* coexisten además ambas enzimas, que colaboran durante la aminoacilación del aminoácido no canónico pirrolisina (Korencic *et al.*, 2004b). El análisis filogenético de la GlyRS también revela que existen dos isoformas de origen distinto, si bien ambas se clasifican dentro de la clase II. Perona & Hald encuadran la forma homodimérica ( $\alpha_2$ ) en la subclase IIa y la forma tetramérica ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> en la clase IIc (Freist *et al.*, 1996; O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003; Perona & Hadd, 2012).

### 1.3.2-Composición de dominios de las aminoacil-tRNA sintetasas

Las aaRSs son enzimas modulares constituidas por múltiples dominios (Figura 1.7.). Se ha propuesto que las dos enzimas ancestrales de las que derivan las aaRS de las clases I y II estarían constituidas exclusivamente por el dominio catalítico y habrían sido enzimas altamente promiscuas, siendo capaces de reconocer varios tRNAs y aminoácidos (Woese *et al.*, 2000). La expansión evolutiva de estas enzimas habría ocurrido por múltiples eventos de duplicación génica y divergencia que habría ido acompañada de una adquisición progresiva de especificidad por los sustratos (Woese *et al.*, 2000). La divergencia evolutiva de las aaRSs habría llevado consigo también la adición al dominio catalítico de los diversos dominios que se observan en las aaRSs actuales. Algunos de éstos aportan una cierta funcionalidad relacionada con la función canónica de aminoacilación. Por ejemplo, varias aaRSs han adquirido dominios involucrados en el reconocimiento del tRNA (Delarue & Moras, 1993; Guo *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2014) o dominios de edición, implicados en la corrección de errores (Yadavalli & Ibba, 2012a).



**Figura 1.7.-Dominios de las aaRSs.** En la figura se representa la composición y el orden de los dominios principales de las aaRS. En las aaRSs de clase 1 se aprecia las dos partes del dominio RF y el CP1. En las aaRSs de clase II aparece el dominio catalítico en rojo y, marcado en números romanos, la posición de los motivos 1, 2 y 3. Se representan asimismo los dominios de edición, unión al tRNA (en la SerRS) y de unión al anticodón (ACBD). Add1 es un dominio exclusivo de la ArgRS implicado en el reconocimiento del brazo D del tRNA que promueve la unión y edición eficiente en la ArgRS. Reproducción de una figura de Perona & Hadd, 2012. Nótese que la clasificación de J. Perona difiere ligeramente de la presentada en la Tabla 1.1 y la AlaRS y la GlyRS tetramérica (marcadas con un asterisco) aparecen en la clase IIc (en lugar de en la IIa).

Otros dominios, de adquisición generalmente más reciente y distribución más restringida en el árbol de las especies, aportan en cambio una funcionalidad no relacionada con la función canónica de aminoacilación (Guo *et al.*, 2010). Algunos ejemplos son el dominio N-terminal de la TyrRS mitocondrial de *Neurospora crassa*, que participa en el procesamiento de intrones del grupo I (Mohr *et al.*, 2001; Paukstelis *et al.*, 2005); el dominio CAAD, presente en distintas aaRSs de cianobacterias, que ancla aaRSs de clase I a la membrana tilacoidal (Olmedo-Verd *et al.*, 2011); dominios WHEP, involucrados en la regulación de la traducción (Jia *et al.*, 2008) o EMAP II, involucrados en señalización celular en eucariotas (Quevillon *et al.*, 1997).

**1.3.3.-La reacción de aminoacilación**

Las aaRSs tienen que reconocer y seleccionar la pareja correcta de tRNA y aminoácido entre la mezcla heterogénea del citosol que contiene otros tRNAs, aminoácidos y metabolitos de naturaleza similar. El reconocimiento del tRNA tiene lugar en dos fases. La primera fase es relativamente inespecífica y se basa en las interacciones electrostáticas entre los fosfatos cargados negativamente



del tRNA y regiones de aminoácidos no conservados en la aaRS que forman parches cargados positivamente. Tras estas interacciones inespecíficas a larga distancia tienen lugar interacciones más próximas y específicas entre el tRNA y los aminoácidos del sitio activo (Bullwinkle *et al.*, 2014).

Los tRNA isoaceptores (aquellos que portan anticodones para un mismo aminoácido) comparten una serie de nucleótidos denominados *determinantes de identidad* que permiten el reconocimiento específico por la aaRS adecuada y que en muchos casos corresponden a bases modificadas. En general éstos se localizan en el lazo D y especialmente, en el lazo del anticodón y el brazo aceptor (Giegé *et al.*, 1998). Los nucleótidos del anticodón no siempre participan en el reconocimiento por la aaRS, por ejemplo, el reconocimiento del tRNA<sup>Ala</sup> de *E. coli* por la AlaRS depende únicamente del par de bases G3:U70 del brazo aceptor (Gabriel *et al.*, 1996; Banerjee *et al.*, 2010; Naganuma *et al.*, 2014). El trasplante de este par de bases a un tRNA<sup>Phe</sup> permite su aminoacilación por la AlaRS aún cuando porta un anticodón de fenilalanina (Hou *et al.*, 1989). Los tRNAs de arginina, leucina y serina poseen brazos variables extensos. Los nucleótidos del anticodón de estos tRNAs no participan en el reconocimiento por la aaRS, lo que resulta consistente con el hecho de que para estos tres aminoácidos existen más de cuatro anticodones distintos, por lo que hay por ejemplo tRNAs isoaceptores de serina que no comparten ningún nucleótido del anticodón. En estos casos, nucleótidos de otras zonas del tRNA y la forma global de éste juegan un papel importante en el reconocimiento (Giegé *et al.*, 1998). Algunos nucleótidos funcionan como elementos que previenen la interacción del tRNA con una aaRS inadecuada y se denominan *antideterminantes*. El primer antideterminante descrito se identificó en la posición 34 del tRNA<sup>Ile</sup> de *E. coli*, que contiene una lisidina que impide la aminoacilación por parte de la MetRS. Otros ejemplos son la base modificada m1G37 del tRNA<sup>Asp</sup> de levadura, que impide la aminoacilación por la ArgRS o la base A73 en el tRNA<sup>Leu</sup>, que previene del reconocimiento por la SerRS (Giegé *et al.*, 1998).

El reconocimiento del aminoácido en el centro catalítico es el primer paso de la reacción de aminoacilación y es diferente para las dos subclases. En las enzimas de clase I, el motivo conservado KMSKS se encuentra en una posición abierta que le permite unir el aminoácido. La unión de éste y del ATP provoca un cambio estructural y el bolsillo adopta una conformación cerrada, que generalmente solo es productiva si se encuentra unido el aminoácido legítimo. En las aaRSs de clase II, por el contrario, la selectividad viene determinada por los residuos que conforman el bolsillo de unión. Algunos aminoácidos poseen grupos químicos en sus cadenas laterales que facilitan su reconocimiento por las aaRSs. La CysRS, por ejemplo, presenta en su sitio

activo cinco residuos de histidina conservados que coordinan un átomo de zinc. El cofactor metálico es capaz de interactuar con el grupo tiol cargado negativamente de la cisteína y excluir la activación del aminoácido serina (Newberry *et al.*, 2002). La ThrRS también utiliza un ión de zinc como cofactor para distinguir entre la treonina y la valina (Sankaranarayanan *et al.*, 1999).

## I

El elevado número de contactos que establecen de las aaRSs con los tRNAs hace que la interacción sea altamente específica. En cambio, el reconocimiento del aminoácido sustrato supone un problema mayor ya que los aminoácidos son moléculas pequeñas y en muchos casos de tamaño y naturaleza química similar entre sí y similar a la de otras moléculas del citoplasma. Por ello, aunque la evolución ha modelado el sitio activo de las aaRSs para el reconocimiento del aminoácido legítimo con alta afinidad, algunas aaRSs pueden llegar a activar aminoácidos isostéricos, esto es, de tamaño y naturaleza química parecida a la del aminoácido legítimo. Algunas aaRSs en las que la discriminación en el sitio activo es imperfecta presentan mecanismos de discriminación basados en la cinética de la reacción, que no inciden tanto en el incremento de la especificidad (que se traduciría en un descenso de la  $K_M$ ) sino en el incremento de la velocidad de transferencia (esto es, la  $K_{cat}$ ) que es favorable al aminoácido legítimo (Ebel *et al.*, 1973).

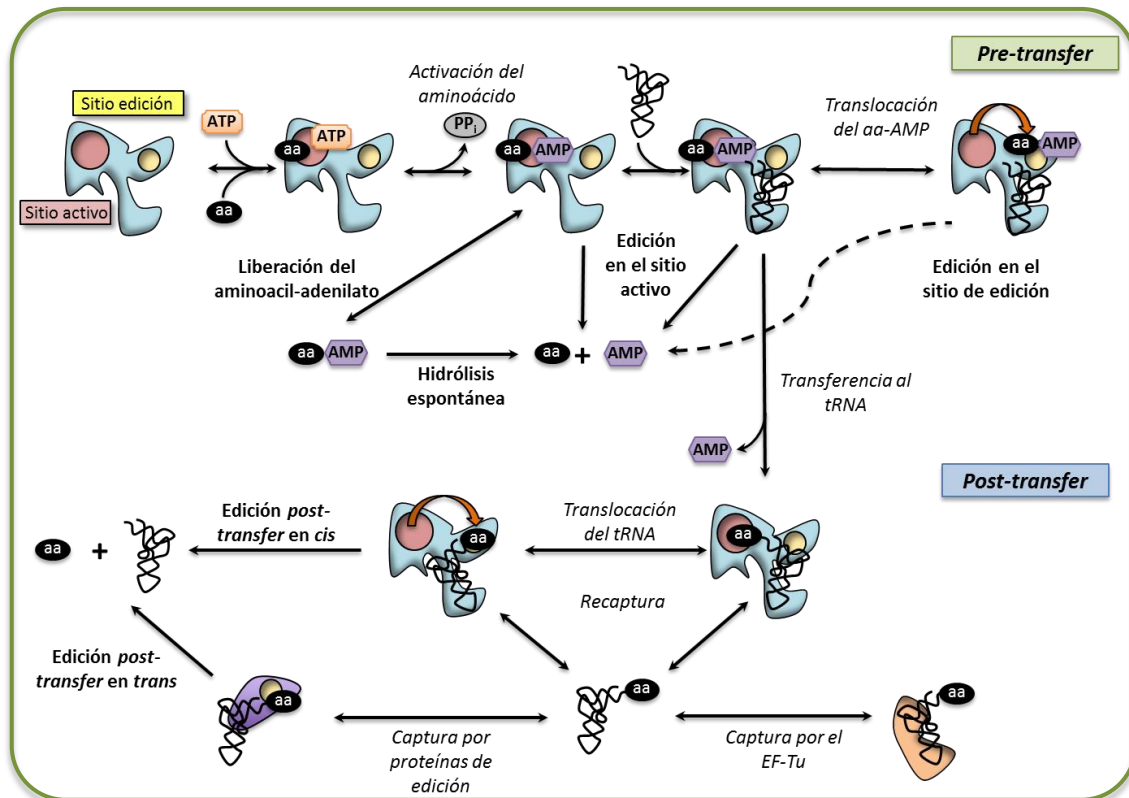
### 1.3.4.-La corrección de errores en las aaRSs y el mantenimiento de la fidelidad

A pesar de la elevada afinidad por sus sustratos y del mecanismo de discriminación cinética, algunas aaRSs pueden con cierta frecuencia activar aminoácidos ilegítimos y cargarlos en el tRNA, generando aa-tRNAs mal-acilados (en adelante se utilizará el término mal-acilado\* para hacer referencia a aquellos tRNAs cargados con aminoácidos ilegítimos), que de ser utilizados por el ribosoma introducirían mutaciones en las proteínas. En 1957, Linus Pauling estimó la capacidad teórica de las aaRS para distinguir entre aminoácidos isostéricos que difieren en un grupo metilo, de lo que dedujo una tasa de error en la activación en el sitio activo de 1 entre 20 (Pauling, 1958). Los estudios posteriores de Loftfield (Loftfield & Vanderjagt, 1972) determinaron que estas predicciones de la tasa de error en la traducción que podían hacerse de acuerdo a estos cálculos constituían una sobreestimación, ya que la tasa, *in vivo*, de incorporación de valina en codones de isoleucina en ovoalbumina era de 1 entre 3000. En base a estos resultados, Fersht propuso la existencia en las aaRSs de un sitio adicional de edición encargado de asegurar la fidelidad de la carga, que junto con el sitio activo formarían un sistema de "doble filtro". En este modelo, el sitio activo funciona como un primer filtro "grosso", cuya elevada especificidad por el aminoácido legítimo permite discriminar otros sustratos, aunque con cierta frecuencia permite la activación de aminoácidos parecidos al legítimo. El segundo filtro lo constituiría un sitio de edición

hidrolítico, que actúa como filtro "fino", eliminando productos ilegítimos que escapan del primer filtro (Fersht, 1977).

La presencia de un sitio separado de edición fue descrita por primera vez por el grupo de P. Schimmel en la IleRS y la ValRS (Starzyk *et al.*, 1987). En ambas enzimas el sitio de edición se localiza en el dominio CP1. IleRS y ValRS activan respectivamente los aminoácidos ilegítimos valina y treonina. El sitio de edición de IleRS hidroliza Val-tRNA<sup>Ile</sup> y el de ValRS Thr-tRNA<sup>Val</sup>. De las 20 aaRS canónicas existentes, se ha descrito actividad de edición en 10 de ellas, con representantes de ambas clases. El dominio CP1 es un dominio muy conservado presente en todas las aaRS de clase I con actividad de edición. En las aaRS de clase II, los dominios de edición y los mecanismos por los que operan son idiosincráticos. La MetRS y la LysRS de clase II no presentan un dominio separado de edición y llevan a cabo la corrección de errores en el centro catalítico de la enzima (Mascarenhas *et al.*, 2008). Es importante destacar que la necesidad de mecanismos de edición depende de la afinidad relativa de la aaRS por el sustrato legítimo e ilegítimo. Un parámetro que da información sobre la potencial necesidad de edición por parte de una aaRS es el *coeficiente de especificidad* que se define como el cociente de la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) por el aminoácido legítimo respecto del ilegítimo. Se puede comprobar que las aaRSs para las que este parámetro es inferior a 3000 cuentan con mecanismos de edición. La carga de aminoácidos ilegítimos por parte de aaRSs con valor superior a éste ocurre a una tasa muy baja sin apenas impacto en el funcionamiento celular (Mascarenhas *et al.*, 2008).

Los mecanismos de edición se dividen en dos categorías: los que se denominan de edición *pre-transfer*, que tienen lugar antes de la transferencia del aminoácido al tRNA, y los de edición *post-transfer*, que tienen lugar después de dicho evento (Figura 1.8.). Algunas aaRS cuentan con mecanismos de edición *pre-transfer* y *post-transfer*, pero uno de ellos suele ser predominante. La utilización y el significado biológico de uno u otro depende fundamentalmente de la tasa de transferencia del aminoácido al extremo aceptor del tRNA (Minajigi & Francklyn, 2010; Dulic *et al.*, 2010). Así, mientras que la ValRS utiliza principalmente edición *post-transfer*, en la IleRS el mecanismo preferente es la edición *pre-transfer*. También se han descrito diferencias en el uso de una u otra vía para una misma aaRS en función del organismo. Por ejemplo, la LeuRS de *E. coli* depende exclusivamente de la vía *post-transfer* mientras que la LeuRS de *S. cerevisiae* utiliza preferentemente la edición *pre-transfer* (Mascarenhas *et al.*, 2008).



**Figura 1.8: Mecanismos de edición.** Representación de los mecanismos de edición de las aaRSs (negrita) y de los pasos más relevantes de la reacción de aminoacilación (cursiva). Adaptado de Shepherd & Ibba, 2015.

#### 1.3.4.1.-La edición *pre-transfer*

Los mecanismos de edición *pre-transfer* actúan tras la activación del aminoácido pero antes de su transferencia al tRNA y se han descrito tanto en aaRS de clase I como de clase II. Si bien en esta etapa no interviene el tRNA, su unión estimula los mecanismos de edición en varias aaRSs, y es un requerimiento en IleRS y ValRS. La edición *pre-transfer* ocurre mediante dos vías principales. La primera de ellas es la liberación selectiva del aminoacil-adenilato ilegítimo al citoplasma (Hati *et al.*, 2006), donde el lábil enlace fosfoéster es hidrolizado espontáneamente. La segunda vía consiste en la hidrólisis enzimática del aminoacil-adenilato, bien en el mismo sitio activo (Gruic-Sovulj *et al.*, 2005) o mediante la traslocación a un sitio de edición separado del sitio activo (Hendrickson *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2002, 2003).

La MetRS y la LysRS realizan la edición en el sitio activo. En el caso de la MetRS la edición se basa en un mecanismo de ciclación intramolecular. Además de su sustrato legítimo, metionina, esta enzima puede activar homocisteína (que difiere de la metionina en un grupo metilo). La formación de homocisteinil-adenilato en el sitio activo induce la transformación enzimática de éste en homocisteína lactona, que es expulsada del sitio activo (Fersht & Dingwall, 1979). Este mecanismo es similar al utilizado por la LysRS de clase II para editar homocisteína, homoserina y ornitina transformándolas en tiolactona, lactona y lactama respectivamente (Jakubowski, 1997,

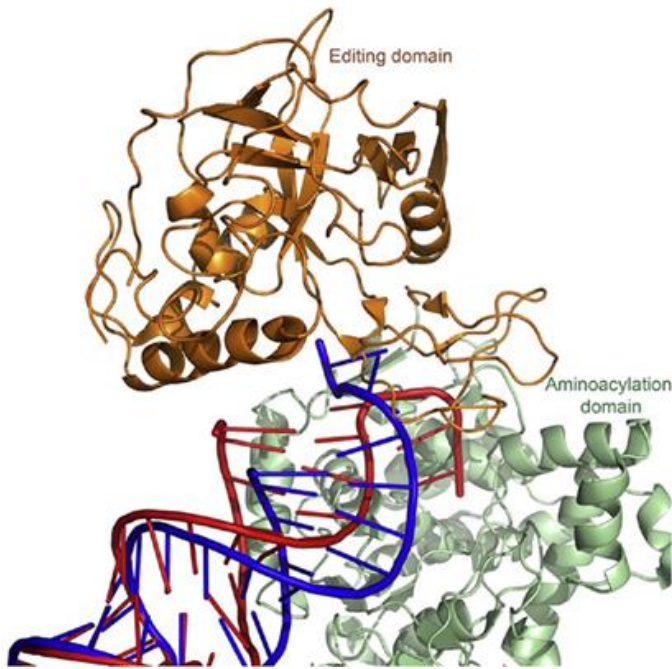
1999). SerRS y ProRS editan respectivamente Thr-AMP y Ala-AMP en el sitio activo a través de un mecanismo distinto al anterior que en ensayos *in vitro* en ausencia de tRNA se detecta por la elevada tasa de producción de AMP, muy superior a la tasa de hidrólisis espontánea del aminoacil adenilato (Gruic-Sovulj *et al.*, 2007; Splan *et al.*, 2008a).

La edición de aa-AMP mediante translocación a un sitio de edición se ha estudiado fundamentalmente en la IleRS. El mecanismo mediante el cual el aminoacil-adenilato se transloca al sitio de edición para su hidrólisis no está aún establecido pero aparentemente depende de cambios conformacionales inducidos por la unión del tRNA (Bishop *et al.*, 2003; Nordin & Schimmel, 2003). En las aaRSs de clase I IleRS y ValRS la presencia del tRNA parece ser un estímulo necesario para desencadenar la translocación del sustrato. En estos sistemas, además, se requiere de una primera ronda de edición *post-transfer* para que la enzima y el tRNA adopten una conformación productiva que permita la edición *pre-transfer* (Bishop *et al.*, 2003; Nordin & Schimmel, 2003).

#### **1.3.4.2.-La edición *post-transfer***

La edición *post-transfer* consiste en la hidrólisis del enlace éster entre el aminoácido y el tRNA. En las tres aaRSs de clase I que realizan edición *post-transfer*, LeuRS, IleRS y ValRS, el sitio de edición se encuentra en el dominio CP1 (Larkin *et al.*, 2002; Nureki *et al.*, 1998) (Figura 1.9.). Las aaRSs de clase II presentan dominios de edición idiosincráticos. En la ThrRS, la edición ocurre en el dominio N2 situado en la zona N-terminal de la proteína (Dock-Bregeon *et al.*, 2000) que es homólogo al dominio de edición de la AlaRS, si bien en esta enzima ocupa una posición C-terminal (Schimmel, 2011). La ProRS de algunos organismos posee un dominio de edición denominado INS cercano al sitio activo (Bartholow *et al.*, 2014). En la PheRS el dominio de edición se localiza en la subunidad  $\beta$  (Roy *et al.*, 2004).

En algunas aaRSs, el sitio de edición se encuentra a unos 30-40 angstroms del sitio activo. Se han obtenido estructuras de aaRSs unidas al tRNA en las que el extremo aceptor se encuentra alternativamente en el sitio activo o en el sitio de edición lo que ha permitido proponer que una vez aminoacilado y antes de liberarse el tRNA, su extremo aceptor se translocaría desde el sitio activo al sitio de edición donde tendría lugar la hidrólisis del enlace éster entre el tRNA y el aminoácido ilegítimo (Palencia *et al.*, 2012; Silvan *et al.*, 1999; Tukalo *et al.*, 2005; Fukai *et al.*, 2000; Dock-Bregeon *et al.*, 2000, 2004). Sin embargo esta dinámica parece improbable en la AlaRS ya que dominios distales de la enzima reconocen un mismo par de bases del tRNA durante las reacciones de aminoacilación y edición, de lo que cabe deducir que puede ocurrir una



**Figura 1.9 Translocación del extremo 3' del tRNA durante la edición.** Estructura de le LeuRS de *T. thermophilus* donde se aprecia el dominio catalítico (verde) y el dominio de edición CP1 (naranja). En rojo se muestra el tRNA con el extremo aceptor en el sitio sintético en la conformación que adopta durante la aminoacilación. La representación en azul corresponde a la conformación de edición. Reproducción de una figura de Yadavalli & Ibba, 2012 basada en los resultados de Palencia et al, 2012.

reorganización de mayor amplitud (Beebe *et al.*, 2008). La discriminación del aminoácido legítimo en el sitio de edición puede depender del tamaño del aminoácido. Por ejemplo, el sitio de edición de la IleRS puede acomodar al extremo del tRNA si está cargado con valina pero no si lo está con el aminoácido legítimo isoleucina, de mayor tamaño (Muramatsu *et al.*, 1990). Sin embargo, si artificialmente se ensancha el sitio de edición mediante ingeniería genética, éste hidroliza también Ile-tRNA<sup>Ile</sup> (Hendrickson *et al.*, 2002). En otros casos, la discriminación puede

ocurrir por interacciones específicas del aminoácido ilegítimo con el sitio de edición. Este es el caso de la PheRS, en la que el sitio de edición de la subunidad  $\beta$  interacciona específicamente con el grupo hidroxilo del aminoácido ilegítimo tirosina (Kotik-Kogan *et al.*, 2005).

La liberación del producto es el paso limitante de la reacción de aminoacilación para las aaRSs de clase I, lo que puede contribuir a que el aminoacil-tRNA permanezca unido a la enzima el tiempo suficiente para que la edición *post-transfer* pueda ocurrir. En cambio, las aaRSs de clase II liberan rápidamente el producto, de modo que aa-tRNAs mal-acilados, esto es, tRNAs cargados con aminoácidos ilegítimos, pueden liberarse. Se ha descrito que PheRS y ProRS pueden recapturar aa-tRNAs mal-acilados liberados previamente e hidrolizar el enlace éster que une al tRNA con el aminoácido. Se ha demostrado que para ello, la PheRS es capaz de competir con el factor de elongación Tu y recapturar Tyr-tRNA<sup>Phe</sup> (Ling *et al.*, 2009a, 2009b). Este mecanismo, en el que el aa-tRNA mal-acilado se libera de la enzima antes de ser editado se denomina “edición *post-transfer en trans*” (frente al anterior en el que la edición ocurre mientras el aa-tRNA permanece unido a la enzima, al que se denomina “edición *post-transfer en cis*”) e implica la recaptura (*resampling*) del aa-tRNA.

La edición *post-transfer* en *trans* puede estar mediada por factores de edición que no son aaRSs pero que pueden ser homólogos a los dominios de edición de las aaRSs y en algunos casos suponen un “tercer filtro”. Por ejemplo, el dominio INS de la ProRS edita Ala-tRNA<sup>Pro</sup> en *cis*, y existe un conjunto de proteínas de dominio único, homólogas al dominio INS, a las que se conoce en su conjunto con el nombre de "superfamilia INS" (Liu *et al.*, 2015). Esta superfamilia incluye las proteínas YbaK, ProXp-ala (o PrdX), ProXp-ST1 y ProXp-ST2. ProXp-ala e YbaK editan respectivamente Ala-tRNA<sup>Pro</sup> y Cys-tRNA<sup>Pro</sup> producidos por la ProRS (An & Musier-Forsyth, 2004). ProXp-ala puede suplir la ausencia de dominio INS en la AlaRS de algunos organismos (Vargas-Rodriguez & Musier-Forsyth, 2013) y reconoce el tRNA<sup>Pro</sup> por los mismos determinantes de identidad del brazo aceptor que la ProRS, mientras que YbaK adquiere su especificidad al interactuar con ProRS (An & Musier-Forsyth, 2004). ProXp-ST1 y ProXp-ST2 editan diversos tRNAs cargados ilegítimamente con Ser o Thr por distintas aaRS, incluyendo la ThrRS, AlaRS, IleRS, LysRS y ValRS (Liu *et al.*, 2015).

Las proteínas AlaX son homólogas al dominio de edición de AlaRS y se encuentran conservadas en los tres dominios de la vida. Debido a la particular estructura de su sitio catalítico, AlaRS no es capaz de discriminar glicina ni serina. El dominio de edición de la enzima y las proteínas AlaX se encargan de editar las moléculas de Gly-tRNA<sup>Ala</sup> y Ser-tRNA<sup>Ala</sup> producidas (Schimmel, 2011). En arqueas existe la proteína homóloga AlaXS que es un factor de edición promiscuo capaz de editar distintos tRNAs cargados ilegítimamente con serina, como Ser-tRNA<sup>Ala</sup>, Ser-tRNA<sup>Thr</sup> y Ser-tRNA<sup>Pro</sup>. Puesto que los dominios de edición de AlaRS y ThrRS son homólogos a AlaXS, se ha propuesto que AlaXS podría derivar de la proteína ancestral que originó el dominio de edición de estas aaRSs (Novoa *et al.*, 2015). En algunas arqueas existe la proteína ThrRS-ed que edita tRNA<sup>Thr</sup> mal-acilados con serina. Esta proteína, que presenta homología estructural con D-Tyr deacilasas (Dwivedi *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2009), es homóloga al dominio de edición de arqueas, que es distinto al de bacterias y eucariotas (Korencic *et al.*, 2004a; Beebe *et al.*, 2004).

#### 1.3.4.3.-La traducción ambigua

La presencia de todos estos mecanismos de edición da idea de la importancia que tiene la carga fidedigna del tRNA en la traducción. Se ha estimado que una célula puede tolerar un máximo de un error por cada  $3 \cdot 10^3 \cdot 10^4$  aminoácidos incorporados sin que ello afecte sustancialmente a su supervivencia (Kramer & Farabaugh, 2007; Yu *et al.*, 2009). Sin embargo, algunas células son capaces de soportar elevados niveles de incorporación de aminoácidos ilegítimos en sus proteínas sin sufrir un impacto considerable en su viabilidad celular. Por ejemplo, las bacterias del género *Mycoplasma* portan deleciones en los dominios de edición de la ThrRS,

PheRS y LeuRS y su proteoma contiene frecuentes desviaciones respecto a la secuencia especificada en el mensaje genético (Li *et al.*, 2011; Yadavalli & Ibba, 2012b). Las levaduras del género *Candida* decodifican el codón CUG (Leu) a veces como Ser (Gomes *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007). La incorporación de aminoácidos ilegítimos genera mutaciones en el proteoma sin comprometer el material genético. En el caso de estos organismos, que llevan a cabo un modo de vida parásito, se ha propuesto que la variabilidad fenotípica que provocan tales variaciones del proteoma les permitiría escapar a la detección del sistema inmune (Li *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2007).

Salvo estos casos que acabamos de comentar, el incremento de la tasa de error en la traducción va acompañado generalmente de efectos nocivos para la célula. Las mutaciones en dominios de edición de aaRSs provocan, por ejemplo, la parada del crecimiento, apoptosis, defectos en el desarrollo o enfermedades neurodegenerativas (Karkhanis *et al.*, 2006; Nangle *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Reverendo *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2014). No obstante, en condiciones particulares de estrés, la incorporación de aminoácidos ilegítimos inducida artificialmente mediante ingeniería genética puede tener efectos beneficiosos (Pezo *et al.*, 2004; Bezerra *et al.*, 2013; Javid *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015), lo que sugiere que un cierto grado de imprecisión en la traducción puede suponer una ventaja en ciertas condiciones (Pan, 2013; Ribas de Pouplana *et al.*, 2014). Un ejemplo a destacar es el de la incorporación de metionina a tRNAs ilegítimos, un fenómeno que ocurre tanto en procariontes como eucariotes en condiciones de estrés oxidativo (Netzer *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2011; Wiltout *et al.*, 2012). Se ha propuesto que la sustitución de algunos aminoácidos superficiales o del sitio activo de las proteínas por metionina podría suponer una cierta protección frente a la oxidación (Pan, 2013).

### 1.3.5.-Funciones no canónicas de las aaRSs

Si bien su papel principal es sintetizar aa-tRNAs para la síntesis proteica, la función de las aaRSs en la célula es mucho más amplia por un doble motivo: en primer lugar los aa-tRNAs participan como donadores de aminoácidos activados en múltiples procesos y, por otro lado, algunas aaRS realizan funciones muy diversas en las que no interviene su actividad catalítica, lo que las convierte en proteínas bifuncionales.

#### 1.3.5.1.-Funciones alternativas de los aminoacil-tRNA

Los aa-tRNAs están implicados en numerosos procesos biológicos, donde funcionan como donadores de aminoácidos activados. Por ejemplo, participan en la síntesis de la pared celular de bacterias como donadores de L-aminoácidos para la formación de los puentes peptídicos que unen las unidades de ácido N-acetilmurámico de la pared (Barreteau *et al.*, 2008; Fonvielle *et al.*,



2009). En bacterias también participan como donadores de L-aminoácidos, principalmente L-lisina y L-alanina, a los fosfolípidos de la membrana plasmática, lo que contribuye a introducir cargas positivas que incrementan la resistencia frente a los CAMPs (péptidos catiónicos antimicrobianos), compuestos bactericidas que interactúan con la carga negativa de los fosfolípidos (Roy *et al.*, 2009; Raina & Ibba, 2014). Los aa-tRNA también participan en procesos de síntesis no ribosómica de proteínas (NRPS) durante la síntesis de ciclodipéptidos, metabolitos secundarios con actividades biológicas muy diversas (Gondry *et al.*, 2009; Sauguet *et al.*, 2011; Belin *et al.*, 2012). La síntesis de ciclodipéptidos utiliza como sustrato dos aa-tRNA que transfieren secuencialmente los aminoácidos al sitio activo de la ciclodipeptido sintasa y es independiente de ATP (Raina & Ibba, 2014; Giessen & Marahiel, 2014). Un aspecto muy interesante encontrado en las tres ciclodipeptido sintasas cristalizadas hasta la fecha es la presencia en su estructura de un dominio catalítico muy similar al sitio activo de las aaRS de clase I (especialmente a la TyrRS y TrpRS) (Sauguet *et al.*, 2011; Moutiez *et al.*, 2014). En plantas, algas y algunas bacterias, la síntesis de tetrapirroles (hemo, clorofila, bilinas o vitamina B<sub>12</sub>) comienza con reducción del Glu-tRNA<sup>Glu</sup> a glutamato 1-semialdehído (GSA), que es convertido en ácido δ-amino levulínico (Schön *et al.*). En organismos de los tres dominios de la vida, los aa-tRNAs son donadores de aminoácidos para el etiquetado de proteínas en su extremo N-terminal, lo que las marca para su degradación, un fenómeno que se conoce como “ruta de la regla N” (*N-end rule pathway*) (Sriram *et al.*, 2011; Tasaki *et al.*, 2012). Otra actividad fundamental en la que están implicados los aa-tRNA es en la síntesis de aminoácidos mediante la ruta indirecta de carga del tRNA. Varias bacterias, como *T. thermophilus* o *D. radiodurans*, utilizan una AsnRS para la síntesis de Asn-tRNA<sup>Asn</sup> pero poseen también una AspRS no discriminatoria y una transaminasa dedicadas exclusivamente a la biosíntesis de la asparragina. Algunas arqueas sintetizan el precursor ortofosfoserina y la cargan en el tRNA<sup>Cys</sup> mediante la SepRS como paso previo a la síntesis de cisteína, ya carecen los genes de biosíntesis de dicho aminoácido (Sauerwald *et al.*, 2005; Sheppard *et al.*, 2008).

### 1.3.5.2.-Funciones alternativas de las aminoacil-tRNA sintetasas

Algunas aaRSs son proteínas bifuncionales y realizan acciones en las que no interviene su actividad catalítica. Un ejemplo son las AlaRs y ThrRS de *E. coli* que regulan negativamente la expresión de su propio gen, interactuando con la región promotora o con la zona líder del mRNA, respectivamente (Putney & Schimmel, 1981; Torres-Larios *et al.*, 2002). Las TyrRS y LeuRS de la mitocondria de hongos participan en la maduración de intrones mediante la interacción con motivos estructuralmente similares a los tRNA (Mohr *et al.*, 2001). En eucariotas, LeuRS participa en la regulación de la traducción interactuando con el complejo TORC1 (Bonfils *et al.*, 2012). La estimulación con interferón γ de células humanas hace que GluRS-ProRS (en vertebrados estas

dos aaRSs están fusionadas a través de unos dominios intermedios llamados WHEP) se una a otras proteínas formando el complejo GAIT que inhibe la traducción de proteínas de la respuesta inflamatoria mediante la unión a la zona 3' de su mRNA (Arif *et al.*, 2009). La LysRS participa en la regulación de la transcripción en mastocitos (Yannay-Cohen *et al.*, 2009) y, en *Sacharomyces cerevisiae*, la MetRS induce la expresión de genes nucleares de la ATP sintasa en condiciones de respiración (Frechin *et al.*, 2014). En mamíferos, la TrpRS, TyrRS y ThrRS se excretan al exterior celular donde funcionan como citoquinas regulando la angiogénesis (Yang *et al.*, 2004; Mirando *et al.*, 2015). Todo ello da una idea de la versatilidad y la plasticidad funcional de las aaRSs, que en su conjunto se podrían considerar armazones moleculares que la evolución ha adaptado para múltiples funciones.

#### 1.4.- La treonil tRNA sintetasa

##### 1.4.1.- Estructura y dominios

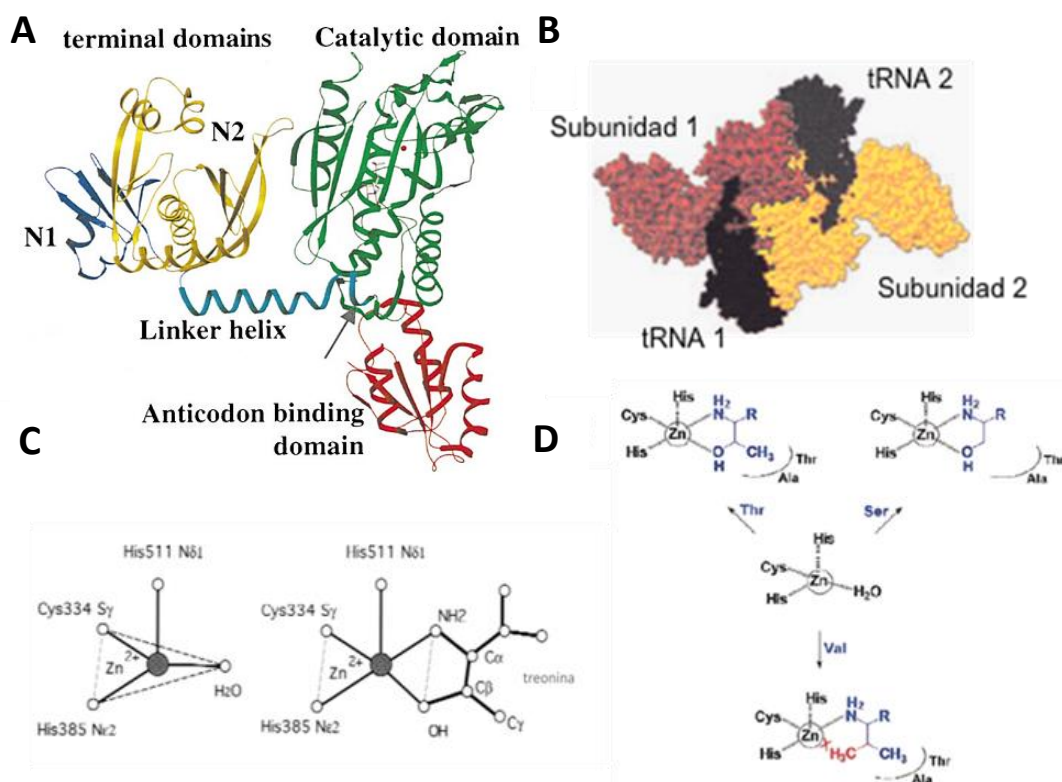
La ThrRS de bacterias es un homodímero en el que pueden distinguirse tres dominios en cada subunidad: un dominio N-terminal involucrado en la edición, que se divide en los subdominios N1 y N2, enlazado por una hélice conectora al dominio catalítico típico de las enzimas de clase II en el que se encuentran los tres motivos conservados y un dominio C-terminal de unión al anticodón (Figura 1.0.A). La superficie de dimerización es de reducido tamaño (representa un 6,2% de la superficie de cada monómero en la enzima de *E. coli*) e involucra al motivo 1 y dos láminas- $\beta$  flanqueantes en ambas subunidades (Sankaranarayanan *et al.*, 1999; Torres-Larios *et al.*, 2003).

Cada dímero de ThrRS une dos moléculas de tRNA, cada una de las cuales establece una compleja red de interacciones con ambas subunidades (Figura 1.0.B). El dominio catalítico de la ThrRS interactúa con el brazo aceptor del tRNA por el surco mayor, como corresponde a las aaRSs de clase II, sin embargo, un aspecto particular de la ThrRS es que el dominio de edición N2 establece interacciones por el surco menor con los dos primeros pares de bases del tRNA, que queda atrapado en una pinza formada por el dominio catalítico y el dominio N2 (Sankaranarayanan *et al.*, 1999). Ello puede ser causa de la elevada afinidad de la ThrRS por sus tRNAs ( $\sim 10^{-8}$  M) en comparación a otras aaRSs (Romby *et al.*, 1996). La mutación de estas bases, consecuentemente, provoca un descenso en la eficiencia de aminoacilación de tres órdenes de magnitud (Hasegawa *et al.*, 1992).

### 1.4.2.- Descripción del sitio activo de la ThrRS y mecanismo de catálisis

La ThrRS presenta el dominio característico de las sintetetas de clase II, con 7 láminas  $\beta$  antiparalelas rodeada de  $\alpha$  hélices y contiene los tres motivos característicos de las aaRSs de clase II. Conserva los residuos canónicos para la interacción con el ATP y la catálisis descritos para otras aaRSs de su clase, como las argininas presentes en los motivos 2 y 3 involucradas en la estabilización del ATP y el residuo ácido que establece puentes de hidrógeno con el grupo amino del aminoácido (Arnez & Moras, 1997b).

Una característica importante de la ThrRS es la presencia de un átomo de zinc en el sitio activo, que funciona como cofactor (Nureki *et al.*, 1998; Sankaranarayanan *et al.*, 1999; Arnez *et al.*, 2000). Éste se encuentra coordinado con los residuos Cys<sub>334</sub>, His<sub>385</sub> que flanquean el motivo 2 y la His<sub>511</sub> del motivo 3 y con una molécula de agua (la numeración corresponde a la proteína de *E. coli*). El cofactor de zinc participa directamente en el reconocimiento del aminoácido sustrato pero no juega un papel catalítico. La entrada de la treonina en el sitio activo desplaza la molécula de agua y sus grupos  $\alpha$ -amino y  $\beta$ -hidroxilo establecen enlaces de coordinación con el metal, lo que determina un cambio en la geometría de coordinación, que pasa de ser tetraédrica a pentaédrica (bipiramidal de base cuadrada) (Arnez *et al.*, 2000) (Figura 1.10.C). La interacción con



**Figura 1.10.-La treonil-tRNA sintetasa. A)** Representación de la estructura de un monómero de ThrRS de *E. coli* en el que aparecen los distintos dominios y el átomo de zinc en rojo. Reproducción de una figura de Sankaranarayanan *et al.*, 2000. **B)** Representación del dímero unido a dos moléculas de tRNA. Reproducción de una figura de Sankaranarayanan *et al.*, 1999. **C)** Representación esquemática de la geometría de coordinación del cofactor de zinc antes de la unión del sustrato (geometría tetraédrica) y tras la unión de la treonina (geometría pentaédrica). Nótese los residuos de cisteína e histidina implicados en la coordinación del metal. . Reproducción de una figura de Sankaranarayanan *et al.*, 2000. **D)** El cofactor de zinc participa en la selección del sustrato, ya que interacciona con los grupos NH<sub>2</sub> y OH de la treonina y serina pero discrimina la valina al no interaccionar con el grupo CH<sub>3</sub> de su cadena lateral. . Reproducción de una figura de Musier-Forsyth & Beuning, 2000.

el cofactor es esencial en el reconocimiento del sustrato y permite además la discriminación del aminoácido isostérico L-Val, cuyo grupo metilo de la cadena lateral no puede interactuar con el metal (Figura 1.10.D).

Las regiones que flanquean el sitio activo de la ThrRS sufren importantes cambios conformacionales tras la unión de los sustratos. Tales cambios funcionan de una manera sinérgica mas que secuencial, de manera que la unión de cualquiera de los dos sustratos, ATP o Thr, facilita la unión del otro. Estos cambios facilitan además la interacción con el tRNA debido a la reorientación de varios residuos que pasan de una configuración "de unión al ATP" a una "de unión al tRNA", lo que estabiliza el extremo 3' y lo coloca en una disposición que facilita la carga del aminoácido (Torres-Larios *et al.*, 2003).

#### 1.4.2.1.- Reconocimiento del tRNA<sup>Thr</sup>

El tRNA interactúa con cada monómero de la ThrRS en tres regiones distintas: el centro catalítico, el dominio N y el dominio de unión al anticodón (ABD), lo que permite un reconocimiento específico. Mientras que el centro catalítico y el dominio N establecen interacciones con el brazo aceptor, el ABD lo hace con el brazo del anticodón, por lo que no resulta sorprendente que sean éstas las posiciones en las que se concentran los determinantes de identidad del tRNA. Hasta ahora se han descrito los determinantes de identidad del tRNA<sup>Thr</sup> en *E. coli* (Hasegawa *et al.*, 1992), *Thermus thermophilus* (Nameki *et al.*, 1996) y *Haloferax volcanii* (Ishikura *et al.*, 2000) y *S. cerevisiae* (Nameki, 1995). Los principales determinantes de identidad son las bases del anticodón G35 y U36, universalmente conservadas, y el nucleótido 37 del lazo del anticodón que contiene la base mt6A, una adenina modificada por un residuo de treonina. El dominio N establece interacciones con pares de bases situadas en el brazo aceptor del tRNA. El par de bases (G1 – C72) es un determinante de identidad común a las especies

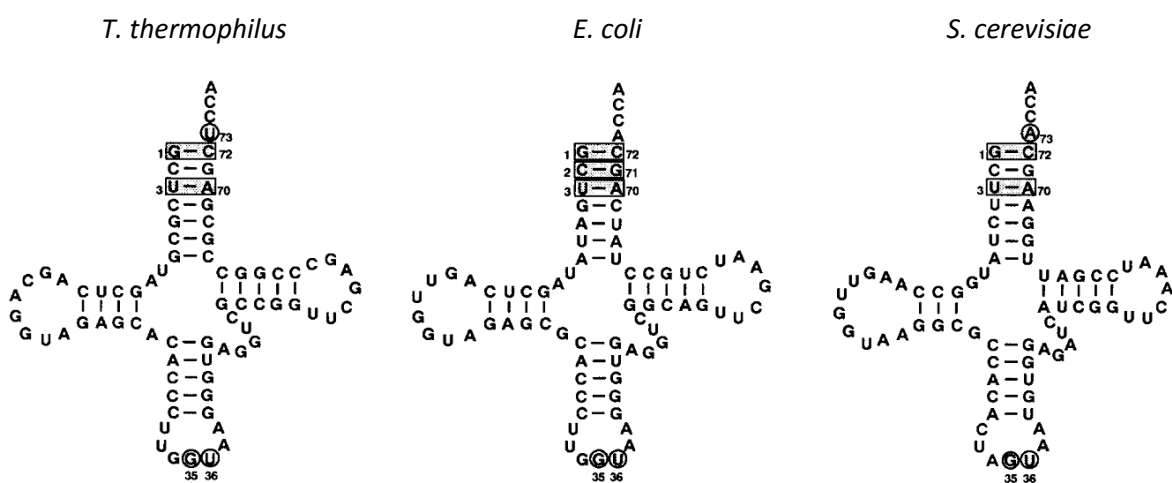


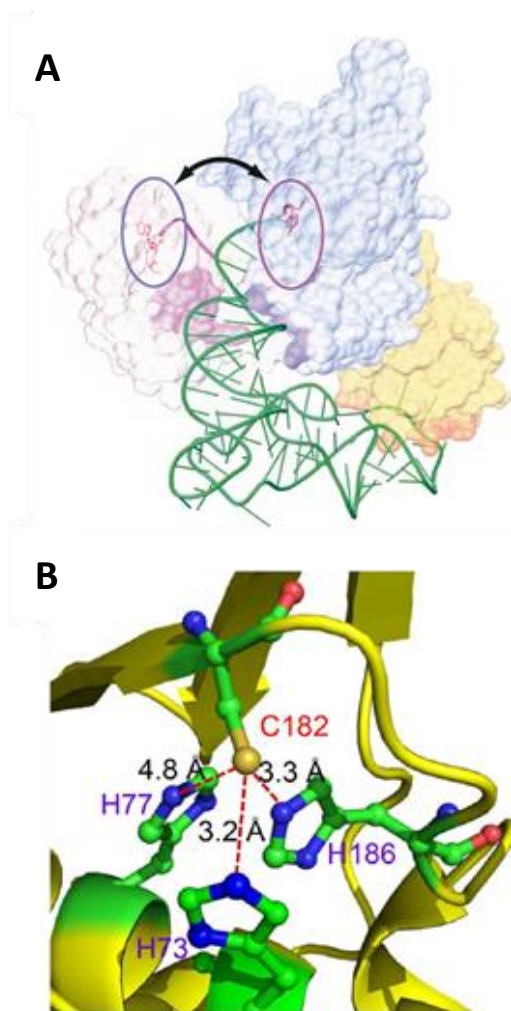
Figura 1.11.-Comparación entre los tRNAs de *T. thermophilus*, *E. coli* y *S. cerevisiae*. Los determinantes de identidad están señalados con círculos (nucleótidos), o rectángulos (par de nucleótidos). Reproducción de una figura de Nameki *et al.*, 1996.

estudiadas hasta ahora, mientras que el segundo par de bases C2 – G71 sólo funciona como determinante en la arquea y la levadura. Curiosamente, la base de la posición 73, que en *E. coli* no participa en el reconocimiento, sí funciona como determinante de identidad en las otras tres especies (Nameki, 1995; Nameki *et al.*, 1996) ((Figura 1.11.).

### 1.4.3.- Edición del Ser-tRNA<sup>Thr</sup>

I

El ión de zinc presente en el sitio activo es capaz de discriminar el aminoácido valina en base a la naturaleza química de su cadena lateral. Sin embargo, no es capaz de discriminar serina, de menor tamaño que la treonina y que también presenta un grupo hidroxilo en su cadena lateral (Sankaranarayanan *et al.*, 1999; Arnez *et al.*, 2000; Musier-Forsyth & Beuning, 2000). La ThrRS presenta actividad de edición dirigida a prevenir la producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup>.



**Figura 1.12.-La edición en la ThrRS.** A) Modelo propuesto por Dock-Bregeon del movimiento de translocación del extremo 3' del tRNA desde el sitio catalítico (azul) al dominio de edición (rosa). B) Representación detallada de los residuos que conforman el sitio de edición, aparecen destacados tres residuos de histidina y uno de cisteína involucrados en la hidrólisis. Nótese que estos residuos, a diferencia de los presentes en el sitio activo, no coordinan ningún catión metálico. Reproducción de figuras de Dock-Bregeon *et al.*, 2004.

La ruta de edición predominante en las ThrRS es la *post-transfer*, que, en bacterias y eucariotas, se lleva a cabo en el dominio N-terminal. Este dominio está compuesto por dos subdominios, N1 y N2, unidos por una hélice conectora. El dominio N1 está compuesto de 5 láminas- $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélices, mientras que el dominio N2 posee dos láminas- $\beta$  dispuestas perpendicularmente a una  $\alpha$ -hélice, y muestra similitud en términos de secuencia y estructura con el dominio C-terminal de la AlaRS. Tras la carga del tRNA con el aminoácido, el extremo 3' del tRNA sufre un cambio conformacional que lo traslada desde el sitio catalítico al sitio de edición (Figura 1.12.A). Los residuos conservados His<sub>77</sub>, Tyr<sub>104</sub> y Asp<sub>180</sub> bloquean la entrada de treonina, impidiendo la hidrólisis del aminoácido legítimo. El sitio edición contiene un motivo HXXXH donde las histidinas His<sub>73</sub> y His<sub>77</sub> juegan un papel fundamental (Figura 1.12.B). En la hidrólisis del Ser-tRNA<sup>Thr</sup> intervienen dos moléculas de agua. La primera (W1) de ellas se encuentra coordinada por la His<sub>73</sub>, mientras que la segunda (W2) lo está por la Met<sub>181</sub> y la Lys<sub>156</sub>. W1 inicia el ataque

nucleofílico sobre el grupo carboxilo de la serina, mientras que W2 dona un protón al oxígeno O3 del seril-tRNA, rompiendo el enlace C-O que une el aminoácido al tRNA (Dock-Bregeon *et al.*, 2000, 2004). La cisteína 182 del dominio de edición es esencial para la reacción. En condiciones de estrés oxidativo este residuo se oxida, lo que inactiva la función de edición y permite la producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> (Ling *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014).

La ThrRS mitocondrial carece del dominio de edición y por lo que la fidelidad depende de la edición de Ser-AMP mediante un mecanismo *pre-transfer* (Zhou *et al.*, 2014; Ling *et al.*, 2012). La ThrRS de *E. coli* también puede editar Ser-AMP mediante un mecanismo *pre-transfer*, pero la elevada tasa de transferencia del aminoácido al tRNA hace que probablemente esta actividad sea irrelevante *in vivo* (Minajigi & Francklyn, 2010).

La ThrRS de arqueas carece del dominio de edición que se observa en la zona N-terminal de la proteína de bacterias y eucariotas. En algunas arqueas del *phylum Chrenarchaeota*, la ThrRS presenta un dominio de edición que ocupa la misma posición N-terminal pero que es distinto al de bacterias y eucariotas, mientras que en otras especies como *Sulfolobus solfataricus* la enzima carece del dominio y existe la proteína independiente homóloga ThrRS-ed que cataliza la edición de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> en *trans* (Korencic *et al.*, 2004a; Beebe *et al.*, 2004).

Como puede deducirse de los ejemplos expuestos anteriormente, el dominio de edición de la ThrRS presenta una enorme variabilidad. La comparación de los dominios de las ThrRS de organismos pertenecientes a los tres Reinos de la vida pone de manifiesto la compleja historia evolutiva de este dominio. Como se observa en la Figura 1.13, los dominios catalíticos y de unión al anticodón se encuentran conservados en todas las ThrRS. En bacterias y eucariotas se encuentran los dominios de edición N1 y N2. En eucariotas existen dominios N-terminales adicionales. Las ThrRS eucariotas citoplasmáticas poseen un dominio que precede al dominio N1 y que es importante para la catálisis, ya que su eliminación tiene un importante impacto en la  $K_M$  y  $k_{cat}$  de la reacción de aminoacilación (Zhou *et al.*, 2013b). En humanos existe un segundo gen de *thrS* que cifra una proteína (denominada ThrRS-L) que contiene un dominio adicional situado en el extremo N-terminal y, si bien su función es por el momento desconocida, muestra similitud con un dominio de la ArgRS humana implicado en la interacción con la LeuRS (Zhou *et al.*, 2013a). Por último, la ThrRS mitocondrial carece de dominio de edición (Ling *et al.*, 2012). Algunas arqueas presentan un dominio N-terminal diferente al bacteriano y eucariota (Korencic *et al.*, 2004a; Beebe *et al.*, 2004), que, en las arqueas del género *Crenarqueota* se codifica por separado de la ThrRS (Korencic *et al.*, 2004a; Hussain *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2009).

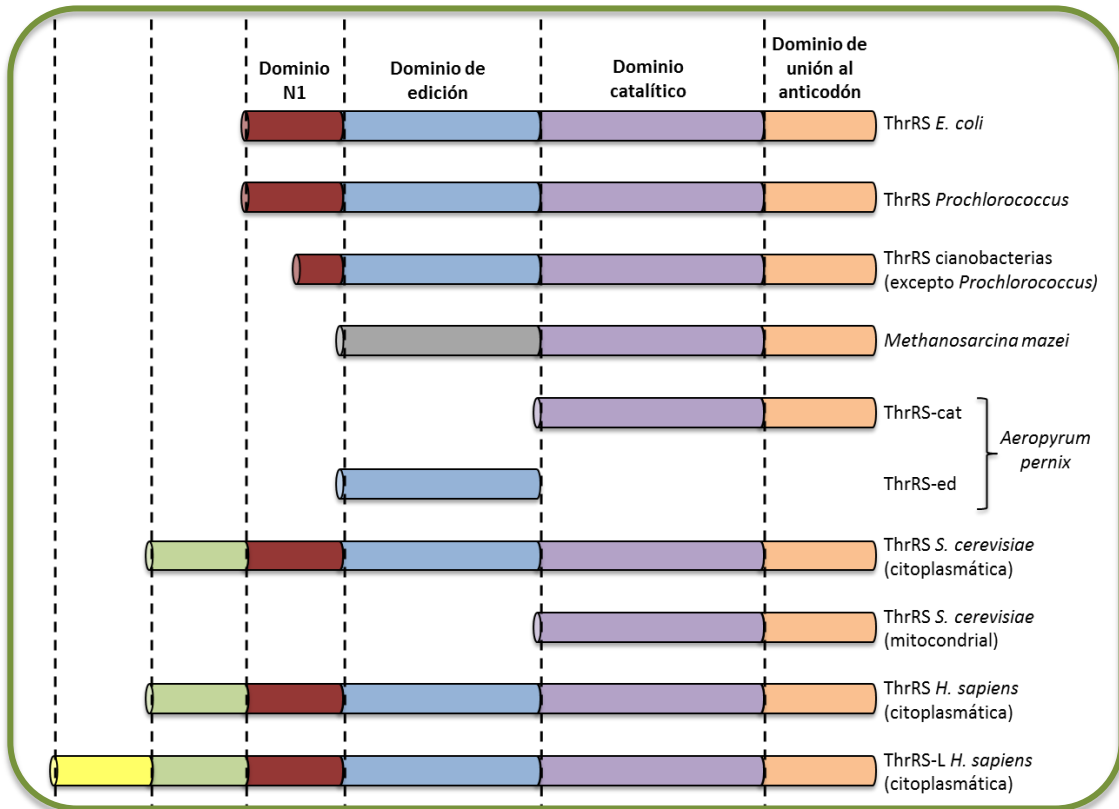


Figura 1.13.-Evolución dominio N-terminal en la ThrRS. Comparación de la composición de dominios de ThrRSs de organismos de los tres Reinos de la vida (detalles en el texto).



## 1.5.-Las cianobacterias

### 1.5.1.-Características generales

Las cianobacterias constituyen un grupo monofilético de bacterias Gram negativas, que se define por un rasgo metabólico único entre las bacterias, su capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica. Su pared celular presenta las características típicas de las bacterias Gram negativas, con una membrana externa que rodea una envuelta de peptidoglicano y define un espacio periplásmico entre ésta y la membrana plasmática. Sin embargo, también presenta algunos rasgos peculiares, como un mayor espesor de la capa de peptidoglicano y la presencia de carotenoides y ácidos grasos que son característicos de las Gram positivas (Stanier & Cohen-Bazire, 1977; Resch & Gibson, 1983). El origen del *phylum* se estima hace unos 2.700 millones de años (Giovannoni *et al.*, 1988; Knoll, 2008). Durante la Era Proterozoica se produce la radiación del *phylum* cianobacteriano y su expansión ecológica, que ha llevado a que hoy día ocupan ambientes iluminados de todas las latitudes, tanto acuáticos como terrestres incluyendo ambientes extremos como los casquetes polares y los desiertos. En el medio oceánico, su contribución a la producción primaria es significativa (algunas estimaciones sugieren una contribución del 40%) y uno de sus géneros, *Prochlorococcus*, se considera el organismo más abundante del planeta (Goericke & Welshmeyer, 1993; Capone, 1997; Liu *et al.*, 1997). Está ampliamente aceptado que los cloroplastos de plantas y algas derivan de cianobacterias ancestrales que establecieron una relación de endosimbiosis con otra célula (Margulis, 1971).

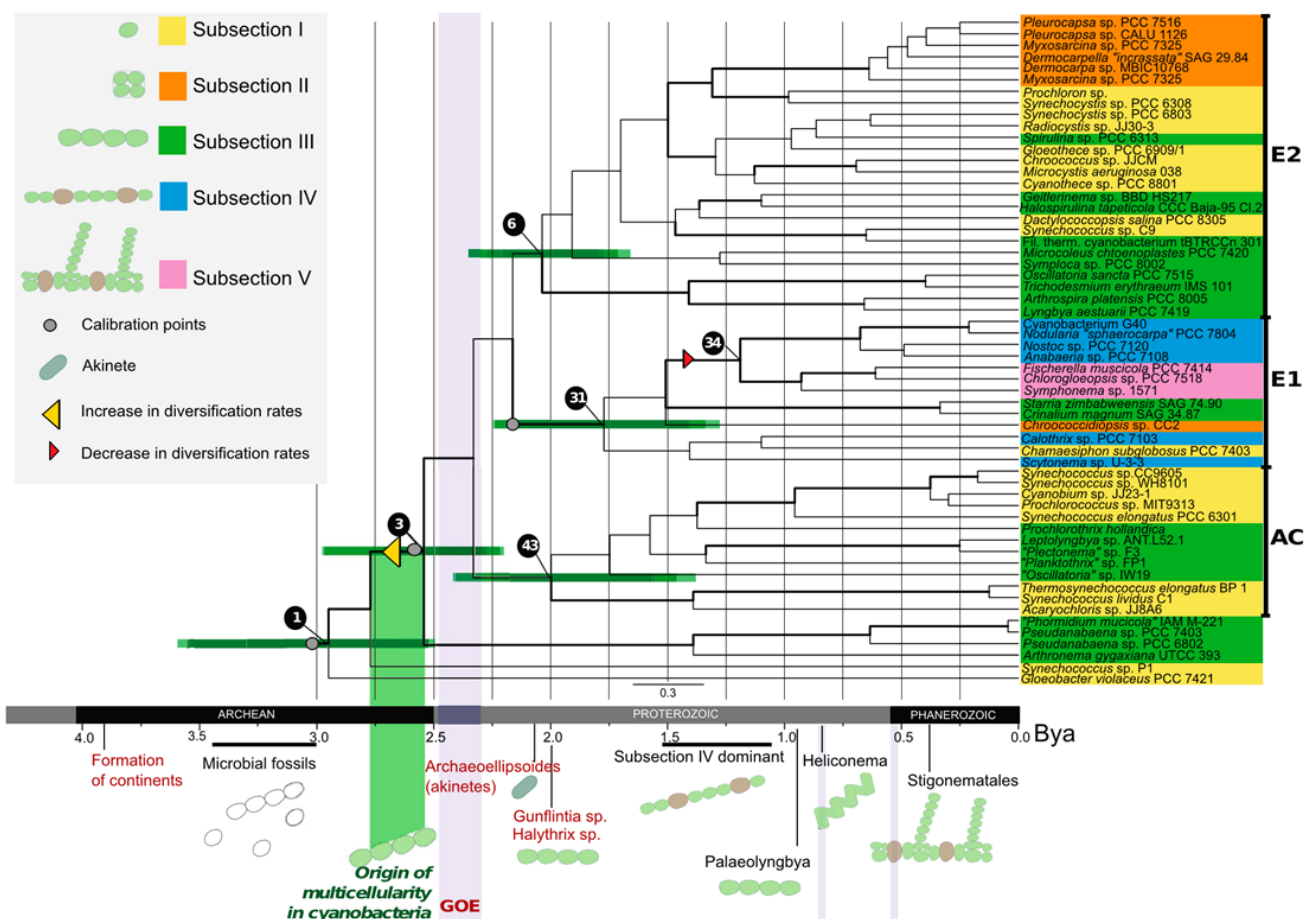
Las características peculiares de las cianobacterias, su papel en la evolución, su importancia ecológica a nivel planetario, así como la existencia de un amplio abanico de técnicas de manipulación genética han convertido a estos organismos en modelo para el estudio de procesos como la diferenciación celular, la fotosíntesis, el control de la transcripción o el ritmo circadiano.

### 1.5.2.- Origen, evolución y diversificación de las cianobacterias

Las investigaciones de filogenia recientes confirman que las cianobacterias constituyen un grupo evolutivamente coherente, que irradia de la parte basal del árbol del Reino Bacteria, lo que sugiere una divergencia temprana del *phylum*. Recientemente, el grupo de B. Schirmer (Schirmer *et al.*, 2013) ha propuesto que el *phylum* cianobacteriano habría surgido unos 200-300 millones de años antes del fenómeno conocido como "El Gran Evento de Oxidación" (GOE, ocurrido hace 2,45-2,3x10<sup>9</sup> años), que determinó que la atmósfera terrestre pasara de ser reductora a oxidante, como resultado de un incremento sustancial de la cantidad de oxígeno. Durante este periodo habría surgido la multicelularidad en cianobacterias, que habrían cosechado



un enorme éxito evolutivo y diversificado muy rápidamente, probablemente por las mejoras adaptativas que supondría esta nueva organización celular (Kaiser, 2001; Tannenbaum, 2006) y como resultado de su actividad metabólica la cantidad de oxígeno en la atmósfera se habría incrementado sustancialmente. Según este estudio, la mayoría de las cianobacterias actuales provienen de una especie ancestral multicelular. Múltiples eventos de pérdida de multicelularidad habrían generado la mayoría de las especies unicelulares actuales y al menos en un género, *Spirulina*, se habría recuperado el carácter multicelular tras haberlo perdido (Schirmermeister *et al.*, 2011) (Figura 1.14). Los análisis filogenéticos han demostrado que la clasificación taxonómica basada en la morfología de Rippka, que ha sido extensamente utilizada en las últimas décadas, no es fiel a la filogenia, si bien los grupos I y 4 y 5 sí forman grupos filogenéticamente coherentes (Rippka *et al.*, 1979). En cualquier caso esta clasificación ilustra la amplia diversidad morfológica de las cianobacterias.



**Figura 1.14.-Clasificación filogenética de las cianobacterias.** Clasificación de las cianobacterias según los estudios filogenéticos elaborados por Schirmermeister *et al.* Las especies aparecen coloreadas en función del grupo al que pertenecen según la clasificación clásica basada en la morfología de Rippka. En la parte inferior del gráfico aparece un cronograma con los eventos más importantes acontecidos a lo largo de la evolución de las cianobacterias. Reproducción de una figura de Schirmermeister *et al.*, 2013

### 1.5.3.-Metabolismo energético

La diversidad de las cianobacterias también se observa en sus capacidades metabólicas. El rasgo metabólico más relevante de estos organismos es la fotosíntesis oxigénica. Algunas cianobacterias son capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica utilizando H<sub>2</sub>S como donador de electrones (Klatt *et al.*, 2015) mientras que otras pueden activar un metabolismo fermentativo o respiratorio en condiciones de oscuridad y utilizar compuestos orgánicos como fuentes de energía, de poder reductor y de carbono (Zuckermann *et al.*, 1997; Hiraide *et al.*, 2015). Las cianobacterias también destacan por su plasticidad adaptativa y su capacidad para cambiar rápidamente a diferentes tipos de metabolismo.

A nivel de ultraestructura, un rasgo excepcional entre los procariontes es la existencia de un sistema intracitoplásmico de membranas llamadas tilacoides en las que se aloja el aparato fotosintético de las cianobacterias. Estas membranas definen un espacio topológicamente distinto al citoplasma conocido como lumen tilacoidal (Liberton & Himadri, 2008). La única excepción conocida se encuentra en el género *Gloeobacter*, que no posee estas membranas y presenta el aparato fotosintético alojado en la membrana plasmática (Rexroth *et al.*, 2011).

### 1.5.4.-Fijación de nitrógeno y diferenciación celular

Algunas cianobacterias pueden fijar el nitrógeno atmosférico, reduciéndolo a amonio con un elevado gasto energético. La enzima encargada de este proceso es la nitrogenasa, cuya extrema sensibilidad al oxígeno supone un problema en organismos que producen este gas intracelularmente (Hoffman *et al.*, 2009). Ello exige la separación de ambos procesos, bien temporalmente, como ocurre en algunas cianobacterias unicelulares, o espacialmente, mediante su confinamiento en células distintas. Algunas cianobacterias filamentosas diferencian células especializadas en la fijación de N<sub>2</sub> que se denominan heterocistos. Estas células no producen oxígeno por fotosíntesis y muestran una morfología y metabolismo adaptados a la creación de un ambiente microaeróbico (Staal *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2004; Flores & Herrero, 2010). El proceso de diferenciación implica numerosos señalizadores y un complejo programa genético que se activa como respuesta a la deficiencia de fuentes de nitrógeno combinado. En *Anabaena*, los heterocistos se distribuyen en el filamento siguiendo un patrón semirregular intercalándose entre cada 10-15 células vegetativas (Herrero *et al.*, 2004; Flores & Herrero, 2010). Otros dos tipos celulares que diferencian algunas cianobacterias son los acinetos, formas celulares de resistencia relacionados con la respuesta a la limitación energética y el estrés (Leganés *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1999) y los hormogonios, formas filamentosas cortas y móviles implicadas en la dispersión, infección y el establecimiento de asociaciones simbióticas con plantas (Damerval *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1998).

## 1.6.- Rasgos particulares de las aminoacil-tRNA sintetetasas en cianobacterias

### 1.6.1.- La síntesis de aminoacil-tRNA asociada a membranas

Un rasgo único de algunas aaRSs de clase I de cianobacterias es su localización subcelular en la membrana tilacoidal (Olmedo-Verd *et al.*, 2011). Estas aaRSS son catalíticamente activas y presentan un dominio de anclaje denominado CAAD, que suele encontrarse en la zona C-terminal de la proteína. CAAD tiene una longitud de entre 100 y 220 aminoácidos que incluye dos segmentos transmembrana separados por un péptido conector de unos 6-8 aminoácidos y una hélice *coiled-coil* en el extremo C-terminal. Este dominio se ha descrito en la GluRS, LeuRs, IleRS y ValRS (Olmedo-Verd *et al.*, 2011) y se ha encontrado más recientemente en la ArgRS, MetRS y CysRS (Santamaría *et al.*, manuscrito en preparación). En un tercio de los genomas cianobacterianos se encuentran genes que codifican aaRSs portadoras del dominio CAAD, pero en ningún caso aparecen más de dos genes de aaRSs con este dominio en el mismo genoma.

Los análisis de secuencia muestran que el dominio CAAD es homólogo a las proteínas de la familia CURT1 (Luque & Ochoa de Alda, 2014) de la membrana tilacoidal de cloroplastos, que están implicadas en el mantenimiento de la curvatura de la membrana en la zona externa de los discos de los grana (Armbruster *et al.*, 2013). Estas proteínas presentan también dos hélices transmembrana y se concentran en los bordes de los grana, donde la curvatura es más pronunciada.

La presencia de aaRSs catalíticamente activas ancladas a membranas es un rasgo exclusivo de cianobacterias no observado en aaRSs de ningún otro organismo. La recurrente adquisición del dominio CAAD en la evolución de las aaRSs cianobacterianas es sorprendente y sugiere que el anclaje de aaRSs a la membrana aporta alguna ventaja selectiva. Resultados recientes de nuestro laboratorio indican que las aaRSs de membrana forman complejos con otras proteínas (Santamaría *et al.*, manuscrito en preparación).

### 1.6.2.- Duplicación de genes *thrS*

Un gran número de especies cianobacterianas portan genes *thrS* duplicados que codifican posibles ThrRSs. Se ha propuesto que estos genes podrían provenir de una duplicación génica ancestral y que las especies actuales con un único gen habrían perdido uno de los dos en su evolución (Luque *et al.*, 2008).

En el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 (en adelante *Anabaena*) se pueden encontrar dos genes anotados como *thrS*: *alr0335 (thrS1)* y *all4723 (thrS2)*. Ambos genes codifican proteínas con actividad ThrRS *in vitro* y son capaces de complementar un mutante *thrS* condicional de *E. coli* (Napolitano, 2013). Sin embargo, mientras que el gen *thrS2* se puede mutar en *Anabaena* por delección o inserción, el gen *thrS1* es esencial. El patrón de expresión de ambos genes es muy



ORF	Producto	Cofactor metálico	Homólogos
<i>all4729</i>	Posible metaloproteína	Sí	<i>all0232, alr4839</i>
<i>asl4728</i>	Péptido de 55 aminoácidos sin función asignada		
<i>all4727</i>	Regulador de respuesta de un sistema de dos componentes		
<i>all4726</i>	Histidina quinasa anclada a la membrana		
<i>all4725 (hemE)</i>	Porfobilicógeno sintasa	Sí (Mg o K)	<i>alr4380</i>
<i>all4724</i>	Posible oxidoreductasa dependiente de FAD	?	
<i>all4723 (thrS2)</i>	Treonil-tRNA sintetasa	Sí (Zn)	<i>alr0335</i>
<i>all4722</i>	GTPasa de la familia COG0523	Probable (desconocido)	<i>alr1093, all1751, all3392</i>
<i>all4721 (folE)</i>	GTP ciclohrolasa	Sí (Zn)	<i>alr5287</i>

**Figura 1.15.-El operón *all4725-all4721*.** Representación del contexto genómico en el que encuentra *thrS2* (*all4723*). Aparecen subrayados en rojo los genes que forman el operón. Debajo aparece un listado de las ORFs, su posible producto proteico, cofactor metálico y homólogos en el genoma. Adaptación de una figura de Napolitano et al, 2012.

distinto. En condiciones estándar de cultivo, la expresión de *thrS1* es constante mientras que la de *thrS2* es prácticamente indetectable y solamente se induce tras la adición al cultivo de TPEN, un quelante de cationes divalentes (Napolitano *et al.*, 2012).

*thrS2* se expresa en un operón (*all4725-all4721*) con otros genes con los que no guarda una aparente relación funcional: *all4725* codifica una porfobilinógeno sintasa, *all4724* una posible óxido-reductasa dependiente de FAD, *all4723* (*thrS2*) una ThrRS, *all4722* una posible metalochaperona y *all4721* una GTP ciclohrolasa-I. Es importante destacar que todos los genes del operón codifican posibles proteínas que utilizan cofactores metálicos, si bien esto es más difícil de predecir para *all4724* (Napolitano *et al.*, 2013). De manera similar a *thrS2*, existen uno o varios homólogos a *all4725*, *all4724*, *all4722* y *all4721* en el genoma de *Anabaena* (Figura 1.15). Debido a estas características, y a que la expresión de estos genes solo se inducía tras la adición del quelante TPEN, se ha propuesto que el operón *all4725-all4721* podría codificar proteínas alternativas que sólo se requerirían en condiciones deficiencia de metales en *Anabaena* (Napolitano, 2013).

## 1.7.-La Biología de los metales

Los iones metálicos están presentes en más de un tercio de las proteínas de los organismos (Cvetkovic *et al.*, 2010) donde cumplen una gran amplitud de funciones, participando en reacciones ácido-base, en las cadenas de transporte de electrones o como elementos estructurales (Lane & Morel, 2000). Los principales cofactores metálicos utilizados por los seres vivos son el zinc, manganeso, magnesio, cobre y hierro y, en menor medida, níquel y cobalto (Merchant & Helmann, 2012).

Uno de los problemas fundamentales de la biología de los metales consiste en el desconocimiento sobre los mecanismos por los que las metaloproteínas seleccionan el metal correcto. Una explicación simplista actualmente descartada asumía que las proteínas, de alguna manera, seleccionan el metal correcto entre una mezcla de metales libres en el citosol. Sin embargo, la realidad es que los metales presentan un orden universal de afinidad por la materia orgánica que se recoge en la llamada “serie de Irving-Williams” (Foster & Robinson, 2011) (Figura 1.16) según la cual, metales situados en la cima de la escala, como el cobre o el zinc, se unen con mayor afinidad que otros metales como el manganeso o el hierro. En un escenario como el descrito anteriormente, con una mezcla de metales libres en el citosol, las proteínas rápidamente se poblarían con los metales más afines. De hecho, la toxicidad de los metales pesados deriva de su capacidad de desplazar a otros cofactores (Huertas *et al.*, 2014).



Figura 1.16.-Serie de Irving-Williams

Por esta razón, los niveles intracelulares de metales con una alta afinidad como el zinc o el cobre deben ser estrictamente controlados mediante sensores que monitorizan su concentración y activan importadores cuando son escasos o bombas exportadoras y proteínas secuestradoras (metalotioneínas) cuando están en exceso (Waldron *et al.*, 2009). La afinidad de algunos de estos sensores se estima en el rango de femtomolar a zeptomolar, lo que implica que no existen átomos de cobre o zinc libres en el citoplasma (Outten & O’Halloran, 2001; Changela & O’Halloran, 2003). Dentro de la célula, las concentraciones de metales libres son mínimas (generalmente inferiores a  $10^{-12}$  M). La mayor parte de éstos se encuentra unido a las proteínas que conforman el metaloproteoma y sólo una mínima parte queda disponible para su incorporación en proteínas de nueva síntesis (Robinson & Winge, 2010).

### 1.7.1.-Sensores de la concentración de metales

Algunos sensores actúan como efectores regulando la transcripción de genes diana en respuesta a la concentración de metales. Estos reguladores de la transcripción contienen sitios de coordinación del metal que les permiten reconocer el ligando adecuado mediante la adopción de geometrías específicas de coordinación. La afinidad de los sitios de coordinación por el ligando determina la ocupación o no de éstos en función de la concentración del metal diana en el medio. La presencia del metal correcto provoca cambios estructurales que favorecen la unión o la disociación de la proteína del DNA mientras que otros metales inducen cambios no productivos (Giedroc & Arunkumar, 2007).

Los sensores conocidos se agrupan en nueve grandes familias que detectan la presencia de los 6 metales de transición, Fe, Zn, Cu, Ni, Mn y Co (Waldron *et al.*, 2009) así como metales pesados tóxicos, como Cd, As, Hg o Pb (Silver & Phung, 1996; Huertas *et al.*, 2014). Las grandes nueve familias, que reciben el nombre del primer sensor de cada una de ellas que se caracterizó, son Fur, DtxR, NikR, ZitR, AsrR/SmtB, CsoR, CopY y TetR.

El mecanismo de activación de los sensores está íntimamente relacionado con su papel fisiológico. Muchos de estos sensores actúan como represores de la transcripción, uniéndose a la región promotora de los genes que regulan e impidiendo el inicio de la transcripción. En muchos casos, el ligando funciona como co-represor, y es su unión al regulador la que le confiere a éste la capacidad de reprimir la transcripción, como es el caso de los reguladores de las familias Fur, DtxR, NikR y ZitR (Hantke, 2005; Waldron *et al.*, 2009; Braz *et al.*, 2010; Osman & Cavet, 2010; Lull *et al.*, 2011). Estos reguladores sensan la carencia de metales y la pérdida del cofactor activa la expresión de genes que codifican mecanismos de importación, por lo que requieren de una elevada especificidad.

Los sensores de la familia ArsR, CsoR, CopY y TetR actúan de una manera opuesta y en muchos organismos la presencia de sensores de esta familia está relacionada con la detoxificación. En estos casos, la unión del metal estimula que la proteína se separe del DNA y permita la transcripción de los genes diana, que suelen codificar sistemas de exportación. Por ejemplo, los sensores de la familia ArsR son capaces de detectar arsénico, plomo, bismuto y cadmio (Busenlehner *et al.*, 2003).

#### 1.7.1.1.-Familia Fur de reguladores

La familia Fur, que debe su nombre a la proteína Fur (*Ferric uptake regulator*), está compuesta por reguladores de la transcripción dependientes de metales y han sido intensamente estudiados. En bases de datos como Pfam se encuentran depositadas casi 10000 secuencias pertenecientes a más de 4000 genomas de bacterias y arqueas, lo que da idea de su amplia

distribución en procariontes. Los miembros de la superfamilia FUR se catalogan en 6 subfamilias, cada una de las cuales responde a un estímulo distinto. Éstas son: Fur, que responde a hierro; Zur, un sensor específico de zinc; Nur (níquel) y Mur (manganeso); un sensor del nivel de estrés oxidativo (PerR) y un sensor de grupos hemo (Irr) (Lee & Helmann, 2007; Fillat, 2014).

En general, los miembros de la familia FUR funcionan como homodímeros que reconocen secuencias palindrómicas específicas de DNA que se caracterizan por su elevado contenido en A/T (Fillat, 2014). La unión del cofactor actúa como co-represor, promoviendo un cambio conformacional en el regulador que promueve y estabiliza la unión al DNA. Las proteínas de la familia FUR son de pequeño tamaño (~120 aminoácidos), y se componen de un dominio N-terminal que contiene el motivo *winged-helix* de unión al DNA mientras que el extremo C-terminal que contiene los ligandos específicos de unión al metal y la región de dimerización. Ambos dominios se encuentran conectados por una secuencia flexible que funciona como bisagra (Escolar *et al.*, 1999; Sheikh & Taylor, 2009; Bai *et al.*, 2006). Los mecanismos de unión del ligando son idiosincráticos de cada miembro de la familia, aunque en todos ellos el sitio sensor involucra residuos de la región bisagra, de manera que la unión afecta a la disposición relativa de los dominios N y C-terminal (Fillat, 2014). Los miembros de la familia FUR contienen un motivo característico rico en histidinas HHHXHXXCXXC localizado al comienzo del dominio de dimerización y algunos presentan un segundo motivo CXXC cerca del extremo C-terminal. En algunos organismos se ha descrito que estos motivos funcionan como sitios de coordinación adicionales que no corresponden al metal específico del regulador y que frecuentemente coordinan átomos de zinc estructurales no relacionados con la función sensora (Zheleznova *et al.*, 2000; D'Autréaux *et al.*, 2007).

### 1.7.2.-Transportadores

Las modificaciones de las concentraciones citoplasmáticas de metales son el resultado neto de la acción de importadores y exportadores. Debido a su pequeño tamaño, el trasiego de cationes a través de la membrana externa de bacterias Gram-negativas ocurre mediante difusión pasiva a través de porinas como OmpF. Para la captura de metales acomplejados con elementos de mayor tamaño (p. ej. sideróforos), la entrada ocurre a través de transportadores dependientes de TonB (TBDTs) que son complejos compuestos de una estructura en barril- $\beta$  embebido en la membrana externa que transporta sideróforos, cobalamina o complejos de níquel gracias a la energía de hidrólisis del ATP intracelular que les transmite la proteína de la membrana plasmática TonB a través de su dominio periplásmico (Noinaj *et al.*, 2010).

En cuanto a los transportadores presentes en la membrana plasmática, se han descrito una gran cantidad de elementos. Algunos de los mejor conocidos son los transportadores de tipo

ABC (*ATP Binding Cassette*) y las ATPasas de tipo PI. Otros transportadores conocidos son los transportadores de tipo CDF (*Cation Diffusion Facilitator*), RND (*Resistance and Nodulation*), NiCoT (transportadores de Ni y Co), CorA (implicada en la resistencia a Cobalto), NRAMP (*natural resistance associated with a macrophage protein*) y transportadores de la familia ZIP (Waldron *et al.*, 2009). La expresión de los transportadores de metales suele estar controlada por los sensores de metales descritos en el apartado anterior.

### 1.7.3.-Metalotioneínas

Las metalotioneínas son proteínas ricas en cisteína e histidina que secuestran metales y contribuyen a mantener concentraciones mínimas de estos iones en el citoplasma, evitando que los metales situados en la parte alta de la serie de Irving-Williams ocupen los sitios de coordinación de proteínas específicas de otros metales menos competitivos. En eucariotas, la metalotioneínas son ubicuas y unen diferentes metales, mientras que en procariontes parecen estar implicadas en la resistencia a zinc (Blindauer *et al.*, 2002).

### 1.7.4-Mecanismos para la correcta metalación de las proteínas

#### 1.7.4.1-Separación topológica

El confinamiento de metales de alta afinidad en determinadas regiones subcelulares previene que éstos se unan a proteínas específicas de un metal de menor de afinidad. Éste es el caso de las cupinas (proteínas compuestas predominantemente por láminas  $\beta$ ) MncA y CucA de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Ambas proteínas coexisten en el periplasma y utilizan los mismos residuos para unir el metal (cobre para CucA y manganeso para MncA), aún cuando sus cofactores ocupan extremos opuestos de la Serie de Irving-Williams. MncA captura el manganeso y se pliega en el citoplasma (donde no existen prácticamente iones libres de cobre) y se exporta una vez plegada al periplasma mediante el sistema Tat (*twin-arginine translocase*). Por el contrario, CucA se exporta al periplasma desplegada mediante el sistema Sec, y una vez allí une el cofactor de cobre, muy abundante en este compartimento, y se pliega. Una vez plegadas, el cofactor metálico queda enterrado en la estructura de ambas proteínas y no es intercambiable (Cavet *et al.*, 2003; Tottey *et al.*, 2005, 2012).

#### 1.7.4.2.-Metalochaperonas

La especificidad entre metal y proteína se consigue también mediante la interacción con proteínas accesorias, las metalochaperonas. Estas proteínas capturan un determinado metal y lo insertan, a expensas de energía (normalmente GTP) en las proteínas que usan dicho metal como cofactor. Se han descrito metalochaperonas de cobre como CopZ de *Enterococcus hirae* y *Bacillus*



*subtilis* que cede el metal al regulador transcripcional CopY o lo transporta a un exportador de tipo PI-ATPasa situado en la membrana plasmática (Cobine *et al.*, 1999; Radford *et al.*, 2003). En *Synechocystis* PCC 6803, Atx1, un homólogo de CopZ, participa en el tráfico de iones de cobre desde la membrana plasmática a la membrana tilacoidal, donde es incorporado a la plastocianina. Atx1 adquiere el cobre por interacción con el importador Cta, una P1-ATPasa de la membrana plasmática. La interacción entre proteínas es específica y asegura a su vez la especificidad del metal que Atx1 incorpora (Harrison *et al.*, 2000). La metalochaperona viaja en el citoplasma e interacciona después con otra P1-ATPasa, PacS, situada en la membrana tilacoidal, que recibe el cobre y lo introduce en el lumen tilacoidal. Las ATPasas Cta y PacS, junto con la metalochaperona Atx1 forman una cadena de transporte que asegura que no existan iones de cobre libres en el citoplasma (Robinson & Winge, 2010). Otra metalochaperona de cobre es CCS, que interviene en la transferencia de cobre a las superóxido dismutasas dependientes de cobre y zinc, CuZnSOD (Culotta *et al.*, 2006). Por último, se han descrito metalochaperonas de níquel como HypA e HypB de *E. coli* que participan en la maduración de la hidrogenasa (Leach & Zamble, 2007) o UreE de *Helicobacter pylori* que proporciona el metal a la ureasa (Maier *et al.*, 2007).

#### 1.7.4.3.-Proteínas promiscuas

Si bien una amplia mayoría de metaloproteínas requieren la coordinación de un metal específico para su correcto funcionamiento, se ha descrito un reducido grupo de metaloproteínas cuya especificidad es más laxa y pueden coordinar varios metales alternativos conservando su actividad. Estas metaloproteínas se denominan promiscuas o cambialísticas, y la mayor parte de las investigaciones al respecto se han centrado en la superóxido dismutasa (SOD), una enzima ubicua en los seres vivos que cataliza la reducción del  $O_2^-$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$ , cumpliendo un importante papel en la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Existen cuatro tipos de SODs en función de su cofactor metálico (Fe, Mn, Ni y Cu-Zn) (Abreu & Cabelli, 2010). Se ha descrito la presencia de SOD cambialísticas que pueden utilizar alternativamente Fe o Mn en *Aeropyrum pernix* (Yamano *et al.*, 1999), *Porphyromonas gingivalis* (Hiraoka *et al.*, 2000) y *Propionibacterium shermanii* (Scherk *et al.*, 1996). En la diatomea marina *Thalassiosira weissflogii*, se ha descrito una anhidrasa carbónica cambialística, CDCA, que utiliza Cd como cofactor metálico, pero puede sustituirlo por zinc y mantener su actividad (Alterio *et al.*, 2015).



# Objetivos

- 1.-Determinar el regulador que controla la expresión del gen *thrS2*.
- 2.-Analizar el conjunto de genes controlados por dicho regulador.
- 3.-Deducir el funcionamiento del sistema compuesto por las proteínas T1 y T2 y su papel en la aclimatación a la deficiencia de zinc

Algunos de los resultados que se presentan en esta tesis han sido publicados en los artículos que se citan a continuación. Estos artículos se reproducen en el Apartado 7.

- **Rubio MÁ**, Napolitano M, Ochoa de Alda JAG, Patterson CJ, Foster AW, Bru-Martínez R, Santamaria J, Robinson NJ & Luque I (2015) *Trans-oligomerization of duplicated aminoacyl-tRNA synthetases maintains genetic code fidelity under stress*. Nucleic Acids Res.: 1-13
- Napolitano M, **Rubio MÁ**, Camargo S & Luque I (2013) *Regulation of internal promoters in a zinc-responsive operon is influenced by transcription from upstream promoters*. J. Bacteriol. 195: 1285-93
- Napolitano M, **Rubio MÁ**, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ & Luque I (2012) *Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120*. J. Bacteriol. 194: 2426-2436

Ver también comentarios publicados sobre este artículo:

- Nies DH (2012) *Zinc Starvation Response in a Cyanobacterium Revealed*. J. Bacteriol. 194: 2407-2412
- Journal Highlights. Microbe 2012 Vol. 7, Nº 6: 278



# **2 M**ATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1.-Organismos y condiciones de cultivo

### 2.1.1.-Cianobacterias

#### 2.1.1.1.-Estirpes de cianobacterias empleadas

El organismo en el que se ha centrado este trabajo es *Anabaena* sp. PCC 7120 (que también recibe el nombre de *Nostoc* sp. PCC 7120), al que en adelante se hará referencia como *Anabaena*. La Tabla 2.1 recoge las estirpes mutantes de *Anabaena* utilizadas en este trabajo y que se hallaban presentes en la colección del laboratorio, así como la estirpe MA1, generada durante el transcurso de esta tesis.

M

Estirpe	Descripción	Origen
MN8	Estirpe en la que la ORF del gen <i>all4723</i> ( <i>thrS2</i> ) ha sido inactivada mediante la inserción de la <i>cassette</i> C.S3 que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina.	Napolitano <i>et al.</i> , 2012
MN38	Estirpe en la que la ORF del gen <i>all2473</i> ( <i>zur</i> ) ha sido sustituida por una <i>cassette</i> C.S3 que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina.	Napolitano <i>et al.</i> , 2012
MN42	Estirpe en la que la ORF del gen <i>all4723</i> ( <i>thrS2</i> ) ha sido delecionada.	Napolitano <i>et al.</i> , 2012
MA1	Estirpe en la que la ORF del gen <i>all0335</i> ( <i>thrS1</i> ) ha sido sustituida por la de <i>all4723</i> ( <i>thrS2</i> ). Esta estirpe no se ha conseguido segregar.	Este trabajo

Tabla 2.1.-Lista de estirpes de cianobacterias

#### 2.1.1.2.-Medios y condiciones de cultivo

Las cianobacterias se cultivaban en medio BG11 (Rippka *et al.*, 1979) compuesto por 17,5 mM NaNO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno; 0,2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,3 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,24 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 28,5 μM ácido cítrico; 6 mg/mL citrato férrico hidratado (III) (19% Fe), 2,4 μM Na<sub>2</sub>-EDTA y los siguientes micronutrientes: 46 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 9,1 μM MnCl<sub>2</sub>; 1,6 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,8 μM ZnSO<sub>4</sub>; 0,3 μM CuSO<sub>4</sub> y 0,2 μM CoCl<sub>2</sub>. El medio se preparaba a partir de un concentrado 100X que carecía de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y un concentrado 1000X que contenía los micronutrientes. Posteriormente se añadía el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y se esterilizaba en el autoclave.

Los cultivos se incubaban en condiciones axénicas en matraces Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 50 mL de cultivo en una cámara termostaticada a 30°C de temperatura, con agitación (100 rpm) e iluminación continua de intensidad 75 μE/(m<sup>2</sup>·s). Para volúmenes de cultivo superiores (o si el experimento así lo requería) se utilizaban tubos de 100 mL (conteniendo 80 mL de cultivo) o botellas de 900 mL (conteniendo 700 mL de cultivo). En estos casos los cultivos se gaseaban con una mezcla de aire y CO<sub>2</sub> (1% v/v) y se suplementaban con 10 mM NaHCO<sub>3</sub>. En caso necesario, se añadían antibióticos al medio a las siguientes concentraciones finales: 2 μg/mL estreptavidina, 2 μg/mL espectinomicina y 40 μg/mL neomicina.

Para la elaboración de BG11 sólido, el medio se suplementaba con Bacto-Agar (*Difco*) a una concentración final del 1% p/v. El volumen total de agua utilizado para elaborar el medio se dividía a partes iguales en dos matraces, uno de los cuales se suplementaba con los nutrientes y el otro con agar. Ambos se autoclavaban por separado y se mezclaban antes de verterlos en las placas de Petri. Tras la mezcla se añadían, en caso de necesitarlo, los antibióticos adecuados a una concentración final de 5 µg/mL estreptomina, 5 µg/mL espectinomicina y 25-100 µg/mL neomicina. Los cultivos sobre medio sólido se incubaban en una cámara termostatzada a 30°C iluminados por su parte superior con luz blanca (25-50 µE/(m<sup>2</sup>·seg)).

Para el cultivo del mutante MN38 ( $\Delta zur$ ), que presenta un fenotipo de sensibilidad al zinc, se utilizaba una versión modificada del medio de cultivo denominada BG11-Zn<sup>++</sup>, preparada con agua ultrapura y en la que se omitía este metal al preparar el medio. Además, las soluciones *stock* de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaHCO<sub>3</sub> se trataban previamente con resina Chelex-100 (Bio-Rad) para retirar los cationes divalentes (y particularmente el zinc) que pudiesen contener. Asimismo, los matraces y tubos de cultivo se lavaban con 10 mM EDTA, pH 8 y se aclaraban con abundante agua desionizada antes de iniciar los cultivos.

Los cultivos de un volumen máximo de 50 mL se recogían por centrifugación utilizando una centrífuga modelo *Centrifuge 5804-R (Eppendorf)* a 5000 x *g* durante 5 minutos, a temperatura ambiente. El precipitado se lavaba posteriormente con tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8) y se procesaba inmediatamente o bien se congelaba en nitrógeno líquido y se almacenaba a -20°C. Para volúmenes de cultivo más grandes, se utilizaba un sistema de filtración por vacío a través de filtros *Millipore HA* de 0,45 µm de diámetro de poro. Las células se lavaban con tampón TE sobre el filtro y se resuspendían en un volumen apropiado de tampón. Posteriormente se procesaban o bien se congelaban en nitrógeno líquido y se almacenaban a -20°C.

## 2.1.2.-*Escherichia coli*

### 2.1.2.1.-Estirpes de *E. coli* empleadas

Las estirpes de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se exponen en la Tabla 2.2.

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5α	F' <i>supE44 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> -m <sub>k</sub> +) <i> recA1 girA96</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>endA1 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF) (Δ80lacZΔM15)</i> U169	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3)	F' <i>ompT gal [dcm][lon] hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -, una <i>E. coli</i> B) con DE3 (profago λ portador del gen de la RNA polimerasa T7)	(Studier <i>et al.</i> , 1990)
HB101	F' <i>hsdS20</i> (r <sub>B</sub> -m <sub>B</sub> -) <i>leu supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xy-5mtl-1 recA13 mcrB</i>	(Boyer & Roulland-Dussoix, 1969)
ED8654	<i>lac-3 o lacY1 supE44 supF58 hsdR514</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) <i>recA56 mcrA1 metB1 lacY galk2 galT22 trp55</i>	(Murray <i>et al.</i> , 1977)

Tabla 2.2.-Lista de estirpes de *E. coli*. Estirpes utilizadas en este trabajo y sus características más relevantes.

### 2.1.2.2.-Medios y condiciones de cultivo

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó el medio rico Luria-Bertani (LB), que contiene 10 g/L NaCl; 10 g/L bacto triptona y 5 g/L de extracto de levadura (Sambrook & Russell, 2001), así como agar a una concentración del 1,5 % p/v cuando se preparaba para cultivos sólidos. Los cultivos líquidos se hacían crecer en incubadores a una temperatura de 37°C y con agitación orbital a una velocidad de 200 rpm. Los cultivos en medio sólido se realizaban en cajas de Petri y se incubaban a 37°C. Cuando era necesario, los cultivos se suplementaban con antibióticos a las concentraciones finales siguientes: 50 µg/mL ampicilina, 25 µg/mL kanamicina, 30 µg/mL cloramfenicol, 25 µg/mL estreptomina y 100 µg/mL espectinomicina.

Los cultivos de un volumen máximo de 50 mL se recogían por centrifugación a 5000 x g durante 5 minutos, a temperatura ambiente, en una centrífuga modelo *Centrifuge 5804-R* (*Eppendorf*). El precipitado de células se lavaba posteriormente con tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8) y se procesaba inmediatamente o bien se congelaba y se almacenaba a -20°C. En el caso de volúmenes de cultivo más grandes, las células se recogían utilizando una centrífuga *Beckman Coulter Avanti J-25* con el rotor JLA 8.1 (12300 x g, 10 minutos).

## 2.2.-Manipulación y análisis del DNA

### 2.2.1.-Plásmidos utilizados

En la Tabla 2.3 se recogen los plásmidos utilizados en este trabajo que no fueron generados durante la realización del mismo y en la Tabla 2.4 aparecen los plásmidos generados durante el transcurso de este trabajo.

### 2.2.2.-Aislamiento de DNA

El DNA plasmídico se aislaba partiendo de cultivos de *E. coli* de un volumen comprendido entre 3-5 mL de cultivo utilizando el sistema comercial *NucleoSpin Plasmid* (*Macherey Nagel*) o *AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit* (*Bioneer*), atendiendo a las instrucciones del fabricante y se cuantificaba espectrofotométricamente utilizando un equipo *NanoDrop ND-1000*. La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se realizaba utilizando el juego de reactivos *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.2.3.-Tratamientos enzimáticos de DNA

Para el tratamiento enzimático del DNA con endonucleasas de restricción se utilizaban las





Plásmido y resistencia		Descripción	Origen
<b>pCI20</b>	Km	Plásmido derivado del pCMA54 que contiene un fragmento de PCR (BglII/AvrII) de 2,1 Kb correspondiente a la secuencia de <i>his-thrS2</i> , clonado entre los sitios BglII-XbaI.	Colección del laboratorio
<b>pCJS18</b>	Km	Plásmido que contiene un fragmento de DNA con la ORF del gen <i>all1691 (furA)</i> clonado entre los sitios NdeI/XhoI de pCMN28b	Colección del laboratorio
<b>pCJS19</b>	Km	Plásmido que contiene un fragmento de DNA con la ORF del gen <i>all2473 (furB)</i> clonado entre los sitios NdeI/XhoI de pCMN28b	Colección del laboratorio
<b>pCJS20</b>	Km	Plásmido que contiene un fragmento de DNA con la ORF del gen <i>alr0957 (furC)</i> clonado entre los sitios NdeI/XhoI de pCMN28b	Colección del laboratorio
<b>pCMN11</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA BamHI/HindIII que contiene el gen <i>trnT</i> -CGU (tRNA <sup>Thr</sup> <sub>CGT</sub> ) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el vector pPROEX digerido con BamHI y Hind III.	(Napolitano, 2013)
<b>pCMN12</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA BamHI/HindIII que contiene el gen <i>trnT</i> -GGU (tRNA <sup>Thr</sup> <sub>GGT</sub> ) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el vector pPROEX digerido con BamHI y Hind III	(Napolitano, 2013)
<b>pCMN13</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA BamHI/HindIII que contiene el gen <i>trnT</i> -UGU1 (tRNA <sup>Thr</sup> <sub>TGT1</sub> ) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el vector pPROEX digerido con BamHI y Hind III	(Napolitano, 2013)
<b>pCMN14</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA BamHI/HindIII que contiene el gen <i>trnT</i> -UGU2 (tRNA <sup>Thr</sup> <sub>TGT2</sub> ) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el vector pPROEX digerido con BamHI y Hind III	(Napolitano, 2013)
<b>pCMN20</b>	Km	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 1,8 Kb que comprende la ORF del gen <i>all4723 (thrS2)</i> clonado entre los sitios NdeI y XhoI del vector pCMN28b	(Napolitano, 2013)
<b>pCMN21</b>	Km	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 1,8 Kb que comprende la ORF del gen <i>alr0335 (thrS1)</i> clonado entre los sitios NdeI y XhoI del vector pCMN28b	(Napolitano, 2013)
<b>pCMN28b</b>	Km	Plásmido derivado del vector comercial pET28b (Novagen) en el que la secuencia que cifra una cola N-terminal de hexa-histidina ha sido sustituida por una secuencia que cifra una cola StrepTag II.	(Napolitano, 2013)
<b>pCMN30</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN21 que contiene un fragmento de PCR (BglII/AvrII) de 2,1 Kb correspondiente a la secuencia de <i>his-thrS2</i> , clonado entre los sitios BglII-XbaI.	(Napolitano, 2013)
<b>pCMN50</b>	Km	Plásmido que contiene el fragmento BamHI/HindIII del pCMN11 ( <i>trnT</i> -CGU) clonado en el vector pCMN28b	(Napolitano, 2013)
<b>pRL278</b>	Km	Vector movilizable por conjugación.	(Black <i>et al.</i> , 1993)
<b>pRL443</b>	Ap Tc	Plásmido conjugativo de amplio espectro, derivado de RP4, capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1.	(Elhai & Wolk, 1988)
<b>pRL453</b>	Ap Sm Sp	Vector para la selección positiva con sitios de clonación simétricos.	(Elhai & Wolk, 1988)
<b>pRL623</b>	Cm	Vector derivado de ColK, portador de los genes <i>mob</i> y los genes de las metilasas de sitios <i>AvaI</i> , <i>AvaII</i> y <i>AvaIII</i> .	(Elhai <i>et al.</i> , 1997)
<b>pSpark</b>	Ap	Vector comercial de clonación de fragmentos de PCR	Canvax

**Tabla 2.3.-Lista de plásmidos de la colección del laboratorio.** En la parte superior se indica el nombre, la resistencia, la descripción y el origen de los plásmidos utilizados pero no generados durante esta tesis (Abreviaturas: Ap, ampicilina; Km, kanamicina; Tc, tetraciclina; Sm espectinomycinina; Sp, estreptomycinina).

Plásmido y resistencia		Descripción
<b>pCMA9</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la región -100/+350 respecto al <i>tsp</i> de <i>all4721</i> , clonado en el vector comercial pSpark
<b>pCMA10</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la región -100/+350 respecto al <i>tsp</i> de <i>all4722</i> , clonado en el vector comercial pSpark
<b>pCMA11</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la región -100/+350 respecto al <i>tsp</i> de <i>all4723</i> , clonado en el vector comercial pSpark
<b>pCMA12</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la región -100/+350 respecto al <i>tsp</i> de <i>all4724</i> , clonado en el vector comercial pSpark
<b>pCMA13</b>	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de PCR que comprende la región -100/+350 respecto al <i>tsp</i> de <i>all4725</i> , clonado en el vector comercial pSpark
<b>pCMA23</b>	Km	Plásmido que contiene el fragmento BamHI/HindIII del pCMN13 ( <i>trnT-CGT</i> ) clonado en el vector pCMN28b
<b>pCMA24</b>	Km	Plásmido que contiene el fragmento BamHI/HindIII del pCMN14 ( <i>trnT-TGT-1</i> ) clonado en el vector pCMN28b
<b>pCMA25</b>	Km	Plásmido que contiene el fragmento BamHI/HindIII del pCMN15 ( <i>trnT-TGT-2</i> ) clonado en el vector pCMN28b
<b>pCMA47</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN21, que contiene la ORF de <i>thrS1</i> en la que se ha delecionado el <i>indel b</i> . Sobreexpresa la proteína T1- $\Delta b$
<b>pCMA48</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN21, que contiene la ORF de <i>thrS1</i> en la que se ha delecionado el <i>indel c</i> . Sobreexpresa la proteína T1- $\Delta c$
<b>pCMA53</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN21, que contiene la ORF de <i>thrS1</i> en la se han introducido las mutaciones Cys308Ser y His359Tyr . Sobreexpresa la proteína T1-SY
<b>pCMA54</b>	Km	Plásmido derivado del pCMA53, que contiene la ORF de <i>thrS1</i> en la se han introducido las mutaciones His488Tyr . Sobreexpresa la proteína T1-SYY
<b>pCMA56</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN20, que contiene la ORF de <i>thrS2</i> en la se han introducido las mutaciones Cys308Ser y His359Tyr . Sobreexpresa la proteína T2-SY
<b>pCMA57</b>	Km	Plásmido derivado del pCMA56, que contiene la ORF <i>thrS2-SY</i> en la se han introducido la mutación adicional His488Tyr. Sobreexpresa la proteína T2-SYY
<b>pCMA59</b>	Km Sm Sp	Plásmido pRL278 que contiene un fragmento StuI/XhoI con la ORF de <i>thrS2</i> flanqueada por 800 pb aguas arriba y aguas abajo de <i>thrS1</i> . Contiene además la casete C.S3 clonada en Sall, inmediatamente después de <i>thrS2</i>
<b>pCMA60</b>	Km	Plásmido derivado del pCMA47, que contiene la ORF de <i>thrS1</i> en la que se ha delecionado el <i>indel c</i> . Sobreexpresa la proteína T1- $\Delta b,c$
<b>pCMA61</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN20, que contiene la ORF de <i>thrS2</i> en la que se ha introducido el <i>indel b</i> . Sobreexpresa la proteína T2+b
<b>pCMA62</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN20, que contiene la ORF de <i>thrS2</i> en la que se ha delecionado el <i>indel c</i> . Sobreexpresa la proteína T2+c
<b>pCMA63</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN61, que contiene la ORF de <i>thrS2</i> en la que se han introducido los <i>indels b y c</i> . Sobreexpresa la proteína T2+b,c
<b>pCMA67</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN20, que contiene la ORF de <i>thrS2</i> en la que se ha delecionado el <i>indel a</i> . Sobreexpresa la proteína T2-a
<b>pCMA68</b>	Km	Plásmido derivado del pCMN21, que contiene la ORF de <i>thrS2</i> en la que se ha delecionado el dominio de edición N1-N2. Sobreexpresa la proteína T1- $\Delta N$

**Tabla 2.4.-Lista de plásmidos generados durante este trabajo.** En la parte superior se indica el nombre, la resistencia y la descripción de los plásmidos generados durante esta tesis (Abreviaturas: Ap, ampicilina; Km, kanamicina; Sm, espectinomicina; Sp, estreptomicina).

enzimas de la línea *Fast-Digest* de *Fermentas*, atendiendo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaban a cabo en un volumen de entre 15-25  $\mu\text{L}$ , conteniendo entre 20-100 ng de sustrato (DNA plasmídico o productos de amplificación de PCR) e incubando a 37°C durante media hora. Tras la incubación las enzimas se inactivaban incubando a 80°C durante 5 minutos o se eliminaban purificando el producto de la digestión tras su separación en un gel de agarosa. En los casos en los que se utilizaron enzimas de restricción de la línea regular de la marca *Fermentas* o de la marca *New England Biolabs* las digestiones se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Para la construcción de algunos plásmidos se procedía a la eliminación del grupo fosfato de los extremos 5' del vector, mediante un tratamiento con la fosfatasa alcalina de camarón ártico (SAP) (*Roche*). Se añadía 1 unidad de SAP a preparaciones que contenían a 0,5-1  $\mu\text{g}$  de DNA digerido en el tampón suministrado por el fabricante y se incubaba a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual se añadía otra unidad de SAP y se incubaba la mezcla otros 30 minutos. Cuando por el contrario se necesitaba incorporar el grupo fosfato a los extremos 5' de fragmentos de DNA, se incubaban preparaciones que contenían 0,5-1  $\mu\text{g}$  de DNA lineal con 1 unidad de la enzima polinucleótido quinasa (PNK) (*Roche*) usando el tampón suministrado por el fabricante que se suplementaba con ATP a concentración final 1 mM. La reacción se incubaba una hora a 37°C. En ambos casos, una vez terminado el tiempo de incubación, la enzimas se inactivaban por incubación a 75°C durante 15 minutos.

Para rellenar extremos 5' protuberantes y obtener extremos romos, preparaciones que contenían 0,2-0,5  $\mu\text{g}$  de DNA lineal se incubaban con 2 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (*Fermentas*). La reacción se llevaba a cabo en el tampón provisto por el fabricante (50 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM DTT; 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA) suplementado con dNTPs a una concentración final de 0,05 mM. La reacción se incubaba a 37°C durante 1 h y se detenía mediante incubación a 65°C durante 10 min.

La ligación de fragmentos de DNA se llevaba a cabo en un volumen final de 10-15  $\mu\text{L}$  utilizando la ligasa del bacteriófago T4 (*Dominion MLB*). Las reacciones contenían 20 ng de vector y una cantidad de DNA del inserto tal que en la mezcla, la relación molar inserto:vector fuera de 3:1 (cuando los fragmentos tenían extremos cohesivos) o de 5:1 (cuando éstos eran romos). Las reacciones contenían asimismo 1  $\mu\text{L}$  de ligasa (1U/  $\mu\text{L}$ ) y el tampón suplementado por el fabricante, se incubaban de 2 a 16 h a 22°C y posteriormente se inactivaba la enzima incubando a 65°C durante 15 minutos. Para la clonación de productos de PCR se utilizó el vector comercial pSpark-I (*Canvax*), atendiendo a las instrucciones del fabricante.

#### 2.2.4.-Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la reacción de amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se utilizaba regularmente la polimerasa comercial *BioTaq (Bioline)* o, cuando era necesario una polimerasa de alta fidelidad, las enzimas *iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad)* o *Q5 High-Fidelity Polymerase (New England Biolabs)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. En la Tabla 2.5 se describen los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (a excepción de los utilizados para la PCR cuantitativa en tiempo real, que aparecen en la sección 2.3.5).

## M

#### 2.2.5.- Construcción de fragmentos de DNA mutantes mediante técnicas basadas en la PCR

##### 2.2.5.1.- Delección de secuencias

Para la construcción de versiones de plásmidos en los que se deleccionaba parte del inserto, se utilizó una técnica de PCR en la que se utilizaba como molde un plásmido circular en el que los cebadores alineaban con orientación divergente en los extremos de la región que se iba a deleccionar, de manera que se amplificaba un fragmento de DNA lineal que correspondía al plásmido completo salvo la región a eliminar comprendida entre los extremos 5' de los cebadores. Para esta técnica se utilizaban las polimerasas de alta procesividad *iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad)* o *Q5 High-Fidelity Polymerase (New England Biolabs)* y los tiempos de extensión se ajustaban en función del tamaño del producto de amplificación. El producto lineal de la amplificación se purificaba y los extremos se fosforilaban y ligaban como se describe en la sección 2.2.3. En los clones seleccionados, las regiones flanqueantes a la delección se secuenciaban para comprobar que no se habían introducido mutaciones indeseadas durante el procedimiento.

##### 2.2.5.2.- Mutaciones puntuales

Para la construcción de versiones de plásmidos en los que se introducían mutaciones puntuales, se utilizó un método derivado de la técnica del “megacebador” (Vander Kooi, 2013). Se diseñaban dos parejas de cebadores: la primera pareja amplificaba desde el extremo 5' de la región de interés hasta la zona donde se quería introducir la mutación, mientras que la segunda pareja amplificaba desde la zona a mutar hasta el extremo 3' de la región de interés. La secuencia de los cebadores que alineaban en la zona a mutar contenían la secuencia que se deseaba introducir y se diseñaban de manera que solapaban en unos 10-15 nucleótidos. Ambas parejas se utilizaban en reacciones de amplificación independientes y los dos productos de amplificación resultantes se purificaban y se mezclaban. La mezcla se utilizaba como sustrato de una reacción de amplificación por PCR a la que no se le añadían cebadores, ya que las regiones en las que solapaban ambos productos de amplificación funcionaban como cebador. Tras 8-10 ciclos de

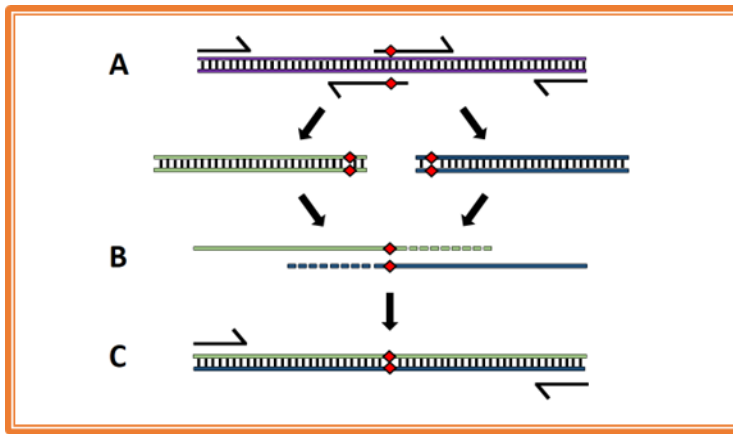


Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
all4725_3F	GATAGTGAGCTCGGTATTGGC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 500 pb que contiene la región -100/+350 a partir del <i>tsp</i> de <i>all4725</i> , donde está contenida la región promotora. Utilizados para generar el fragmento de DNA sustrato para los experimentos de IVT.
all4725_6R	CGGGATCCCTAGCTATGATAC	
all4725_box35_F	CGTTCCTACCCTGAGAAATG	
all4725_box35_R	CATTTCTCAGGGTAGGAACG	
all4725_box10_F	TTCCATGCGCGCAATGGTTA	
all4725_box10_R	TAACCATTGCGCGCATGGAA	
all4723_3F	AAACCAAGCAGAGCTCTTTCCC	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 500 pb que contiene la región -100/+350 a partir del <i>tsp</i> de <i>all4723</i> , donde está contenida la región promotora. Utilizados para generar el fragmento de DNA sustrato para los experimentos de IVT.
all4723_10R	GTGCGGATCCCTTATCGTTG	
all4723_box35_F	ATAGTCATCCTGAGTCCGCC	
all4723_box35_R	GGCGGACTCAGGATGACTAT	
all4723_box10_F	TTTTTGCGCGCGCGGATAA	
all4723_box10_R	TTATCGCGCGCGCAAAAA	
all4722_6F	GAAATAGAGCTCAGTGGCGAG	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 500 pb que contiene la región -100/+350 a partir del <i>tsp</i> de <i>all4722</i> , donde está contenida la región promotora. Utilizados para generar el fragmento de DNA sustrato para los experimentos de IVT.
all4722_11R	GAACAGGATCCTTTTAATCATGC	
all4722_box35_F	AATGATCCTGAGAATCACTTAC	
all4722_box35_R	GTAAGTGATTCTCAGGATCATT	
all4722_box10_F	GAGAAACGCGCGCTGCCAAG	
all4722_box10_R	CTTGGCAGCGCGGTTTCTC	
all4721_4F	GTGATAGTGAGCTCCGCCAT	Pareja de cebadores que amplifican un fragmento de 500 pb que contiene la región -100/+350 a partir del <i>tsp</i> de <i>all4721</i> , donde está contenida la región promotora. Utilizados para generar el fragmento de DNA sustrato para los experimentos de IVT.
all4721_5R	CATCCAAGGATCCATCTATCC	

Tabla 2.5.-Lista de cebadores. Nombre, secuencia nucleotídica y propósito de los cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
all4721_box35_F	CAAATTTACCTGAGACTTAAC	Pareja de cebadores utilizados para generar versiones mutantes de las cajas -35 y -10 del promotor de <i>all4721</i> . Se utilizaron para generar un fragmento de DNA sustrato de los experimentos de IVT.
all4721_box35_R	GTTAAGTCTCAGGTAAATTTG	
all4721_box10_F	TGTTTGGGCGCGCTAAGAAG	
all4721_box10_R	CTTCTTAGCGCGCCCAAACA	
RS1_ser_FW	CAATGAATAGCCCCTTCCAC	Pareja de cebadores que introducen la mutación Cys308Ser en la ORF de <i>thrS1</i> .
RS1_ser_RV	GTGGAAGGGGCTATTCATTG	
A7120-Thrs1-3F	ATGATTCTTACTTATTCGTGACCCCA	Pareja de cebadores que introducen la mutación His359Tyr en la ORF de <i>thrS1</i> .
A7120-Thrs1-3R	CACGAATAAGTAAGAATCATCAACAG	
A7120-Thrs1-4F	TGATGATTTACCGTGCGCCTTTC	Pareja de cebadores que introducen la mutación His488Tyr en la ORF de <i>thrS1</i> .
A7120-Thrs1-4R	CGCACGGTAAATCATCACGGGAC	
thrRS1_4F	CTTGACACAATTGAAGTGCAT	Conjunto de cebadores utilizados para la construcción del plásmido pCMA59, donde la ORF de <i>thrS2</i> y la casete de resistencia C.S3 están flanqueadas por 800 pb aguas arriba y aguas debajo de la ORF de <i>thrS1</i> .
thrRS1_4R	GGATTTAGTGGTTGACACGC	
thrRS1_5F	TAATTACTTAGCTGGGTATGAC	
thrRS1_5R	TAGCGAAGTGACTGCAAGAG	
thrRS2_8F	ATGGTCAGTTCCTTAACCCAGT	
thrRS1_indel2_FW	CAAGGCTTTGTCTCAAGC	Pareja de cebadores utilizados para delecionar el indel <i>b</i> de la ORF de <i>thrS1</i> mediante PCR divergente. Utilizados para generar el plásmido pCMA47
thrRS1_indel2_RV	TTCATCCTCAGCCATCAGG	
thrRS1_indel3_FW	AAGTACATCGGTTCTGATGAAG	Pareja de cebadores utilizados para delecionar el indel <i>c</i> de la ORF de <i>thrS1</i> mediante PCR divergente. Utilizados para generar el plásmido pCMA48
thrRS1_indel3_RV	TGGGTACGGAAGTACTGAGT	
RS2_deltaindel1_FW	AACTATTGGTGGGACTTGTGC	Pareja de cebadores utilizados para delecionar el indel <i>a</i> de la ORF de <i>thrS2</i> mediante PCR divergente. Utilizados para generar el plásmido pCMA67
RS2_deltaindel1_RV	ACCAATAAAGTAGCGGGTGAT	
RS2_domN2_FW	CACAGCTCATATGACAAAGGCAG	Pareja de cebadores utilizados para delecionar el dominio N1-N2 de la ORF de <i>thrS2</i> mediante PCR divergente. Utilizados para generar el plásmido pCMA68
RS2_domN2_RV	GGAAGTACCATATGAATAAAT	

Tabla 2.5.-Lista de cebadores (continuación). Nombre, secuencia nucleotídica y propósito de los cebadores utilizados en este trabajo.



**Figura 2.1.-Esquema de la estrategia utilizada para introducir mutaciones puntuales. (A)** La secuencia de DNA se amplifica con dos parejas de cebadores, cada una de las cuales amplifica desde un extremo de la ORF hasta la región a mutar (la mutación se representa en la imagen como un rombo rojo). **(B)** Los dos productos de amplificación obtenidos en el paso anterior, que solapan parcialmente, se mezclan y se someten a varios ciclos de PCR. **(C)** El fragmento de DNA obtenido en el paso anterior se utiliza como sustrato para la amplificación por PCR usando los cebadores de los extremos.

amplificación, se añadían los cebadores que alineaban en los extremos y se sometía la mezcla a unos 20-25 ciclos de amplificación adicionales (Figura 2.1). El producto de PCR se purificaba, se clonaba en el vector apropiado y se secuenciaba.

**M**

## 2.2.6.- Transferencia de DNA a bacterias

### 2.2.6.1.-Transformación de *E. coli*

Las células transformables de las estirpes DH5 $\alpha$  y HB101 eran proporcionadas por el Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja) que las preparaba según el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1983). Las células se transformaban mediante choque térmico. En las células de la estirpe BL21(DE3) también disponibles en el citado servicio el DNA se introducía mediante electroporación .

Para la transformación mediante choque térmico, las células se descongelaban en hielo, se mezclaban con 10-15 ng del vector obtenido en la ligación (en los casos en los que se transformaba usando un plásmido purificado se usaban 0,5  $\mu$ L de la minipreparación de DNA) y se incubaba la mezcla durante 15 minutos en hielo, a 42 $^{\circ}$ C durante 90 segundos y finalmente durante 5 minutos en hielo. Para la introducción de DNA mediante electroporación, las células se descongelaban en hielo y se transferían a cubetas de electroporación de 2 mm de separación entre electrodos (*Cell Projects*) previamente enfriadas en hielo, tras lo cual se añadía el DNA (0,5  $\mu$ L de una minipreparación de DNA) y se incubaba 15 minutos. La electroporación se realizaba utilizando un electroporador *Easyject Optima (EquiBio)* con las siguientes condiciones: 2500 V, 15  $\mu$ F y 335  $\Omega$ . Tras el choque térmico o la electroporación, se añadía 1 mL de medio LB a la mezcla de células y DNA y se incubaba 1 hora a 37 $^{\circ}$ C en un agitador orbital (200 rpm). Transcurrido este tiempo, la mezcla se sembraba en placas de LB sólido suplementadas con los antibióticos pertinentes.

### 2.2.6.2.- Transferencia de DNA a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación

La transferencia de DNA a *Anabaena* se llevaba a cabo utilizando el método de la conjugación triparental (Elhai & Wolk, 1988). En este proceso participan la cianobacteria *Anabaena* y dos estirpes de *E. coli*. La primera estirpe es HB101, que contiene dos plásmidos, denominados “lanzadera” (*donor*) y “auxiliar” (*helper*). En este trabajo el plásmido “lanzadera” es generalmente un plásmido derivado del pRL278 que contiene el fragmento de DNA que se quiere introducir en la cianobacteria. Posee, asimismo, un origen de replicación en *E. coli*, un sitio *bom* de movilización, un gen de resistencia a antibiótico (kanamicina) y el gen de contraselección *sacB* de *Bacillus subtilis*. El plásmido “auxiliar”, pRL623, porta los genes de las metilasas de los sitios de restricción *Ava* I, *Ava* II y *Ava* III (enzimas de restricción endógenas de *Anabaena*) de modo que el DNA que se va a transferir se protege al ser metilado de la potencial degradación por las endonucleasas de la cianobacteria (Elhai *et al.*, 1997). La segunda estirpe de *E. coli* se denomina ED8654 y contiene el plásmido conjugativo pRL443 que porta los genes necesarios para movilizar el DNA.

Para realizar la conjugación, se inoculaban cultivos independientes de 10 mL de medio LB suplementado con antibióticos con 250  $\mu$ L de cultivos en estado estacionario de las estirpes HB101 conteniendo el plásmido que se desea introducir y ED8654. Ambos inóculos se incubaban durante 2 horas y media a 37°C en agitación (200 rpm), tras lo cual se lavaban dos veces mediante centrifugación y resuspensión en 10 mL de LB para retirar los antibióticos. El precipitado se resuspendía suavemente en el medio residual que quedaba tras la última centrifugación (aproximadamente 150-200  $\mu$ L) y se mezclaban ambas estirpes. La mezcla se incubaba a 30°C durante dos horas, tras lo cual se añadían 200-400  $\mu$ L de una suspensión celular de *Anabaena* que contenía 10  $\mu$ g de clorofila. La mezcla se sembraba sobre unos filtros de nitrocelulosa (*Immobilon-NC*, *Millipore*) colocados en placas de Petri de BG11 suplementado con medio LB a concentración 5% (v/v) sin antibióticos.

Las placas se incubaban en la cámara termostatazadas a 30°C iluminadas por luz blanca de una intensidad de 75  $\mu$ E/(m<sup>2</sup>· s) durante todo el proceso de conjugación. Tras 24 horas, el filtro se transfería a una placa de Petri de BG11 (sin antibióticos) y se incubaba en las mismas condiciones durante otras 24 horas. Posteriormente, los filtros se transferían a una placa de BG11 con los antibióticos adecuados. Cada 48 horas, los filtros se transferían a placas con medio fresco suplementado con antibióticos hasta que tras aproximadamente 10-15 días aparecían colonias resistentes.

Para la selección de clones que hubiesen integrado el inserto de plásmidos derivados de pRL278 mediante doble recombinación, las colonias resistentes se cultivaban en medio sólido durante varias generaciones y posteriormente en medio líquido durante al menos una semana.



Alícuotas del cultivo se sometían a ciclos de sonicación de 10-15 segundos en un baño de ultrasonidos para fragmentar los filamentos hasta obtener filamentos cortos de entre 3 y 5 células. Posteriormente se sembraban diluciones seriadas de las suspensiones sonicadas en placas de BG11 suplementadas con sacarosa al 5% y en su caso, con el antibiótico correspondiente al marcador que se intentaba integrar en el cromosoma. El gen *sacB* presente en el plásmido “lanzadera” resulta letal en presencia de sacarosa, por lo que puede utilizarse para contraseleccionar los recombinantes simples (aquellos en los que el plásmido se integra en el cromosoma tras un evento de recombinación) y seleccionar dobles recombinantes (en los que la parte correspondiente al vector se escinde tras un segundo evento de recombinación). Para distinguir los dobles recombinantes de aquellos clones en los que la resistencia a sacarosa deriva de la inactivación por mutación del gen *sacB*, las colonias resistentes se sometían a una prueba de crecimiento en placas con el antibiótico correspondiente al gen de resistencia residente en la porción del vector (neomicina, en el caso de los plásmidos derivados de pRL278) y se seleccionaban los clones sensibles al antibiótico.

### **2.3.- Manipulación y análisis de RNA**

#### **2.3.1.- Purificación de RNA total de cianobacterias**

Para la extracción de RNA total de cianobacterias se utilizaba una versión modificada del protocolo descrito por Mohamed y Jansson (Mohamed & Jansson, 1989) que se describe a continuación. Las células de 40 mL de cultivo de *Anabaena* se recogían por filtración, se lavaban dos veces sobre el filtro con tampón T<sub>50</sub>E<sub>100</sub> (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM EDTA, pH 8) y se resuspendían en un volumen de 2 mL del mismo tampón y se transferían a un tubo de microcentrífuga. Tras centrifugar a 16000 x *g* durante dos minutos y descartar el sobrenadante el tubo conteniendo el precipitado se congelaba en nitrógeno líquido.

El precipitado de células se resuspendía en 300 µL de tampón de resuspensión (0,3 M sacarosa; 10 mM acetato sódico, pH 4,5), 400 µL tampón de lisis (2% SDS; 10 mM acetato sódico, pH 4,5), 100 µL de 250 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8 y 1 ml de fenol ácido (pH 4,5) (*Amresco*) previamente calentado a 65°C. La mezcla se agitaba en el vórtex vigorosamente y se incubaba durante 5 minutos a 65°C, agitando la mezcla en el vórtex a la mitad y al final del tiempo de incubación. Tras centrifugar a 16000 x *g* durante 5 minutos, la fase acuosa se transfería a un tubo nuevo donde se añadía 1 mL de fenol ácido a 65°C. La fase acuosa se sometía posteriormente a una extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y otra con cloroformo. La fase acuosa de la extracción con cloroformo se mezclaba con un volumen de isopropanol, se congelaba en nitrógeno líquido y se centrifugaba a 16000 x *g* durante 30 minutos a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, se lavaba el pellet con

etanol al 70% y se dejaba secar. El pellet se resuspendía en 180  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  tratada previamente con dietilpicrocarbonato (DEPC) (0.1% v/v) y se añadían 10-20 U de DNasa I (libre de RNasas) (*Roche*) y 20  $\mu\text{L}$  tampón comercial de la DNasa I. La reacción se incubaba una hora a 37°C, para digerir el DNA. Tras la digestión, se realizaba una extracción con fenol y otra con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). La fase acuosa de la última extracción se precipitaba añadiendo 0,2 volúmenes de 10 M LiCl y 2 volúmenes de etanol. Los tubos se congelaban en nitrógeno líquido y se centrifugaban 30 minutos a 16000 x *g*, a 4°C. El precipitado de RNA se lavaba con etanol 70%, se dejaba secar y se resuspendía en un volumen de 30-50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC.

La cuantificación de la concentración del RNA se realizaba espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 260 nm y utilizando un coeficiente de extinción de  $\epsilon = 0,02 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Para verificar la cuantificación, así como comprobar la integridad del RNA, se resolvían 0,5 – 1  $\mu\text{g}$  de RNA mediante electroforesis en un gel de agarosa.

### 2.3.2.-Purificación de tRNA total de *E. coli*

*Anabaena* presenta cuatro genes que codifican para tRNA<sup>Thr</sup>, los genes *trnT-CGU*, *trnT-GGU*, *trnT-UGU(1)* y *trnT-UGU(2)*. En la colección del laboratorio (Tabla 2.3) se disponía de los plásmidos pCMN11, pCMN12 y pCMN13, derivados del vector de sobreexpresión ProEX-HTb que contenían respectivamente versiones modificadas de los genes *trnT-GGU*, *trnT-UGU(1)* y *trnT-UGU(2)* en los que se había introducido la secuencia CCA en el extremo 3' del gen. Los insertos de estos plásmidos se extrajeron digiriendo con BamHI y HindIII y se clonaron entre los sitios BamHI y HindIII del vector de expresión pCMN28b (Napolitano *et al.*, 2013), una versión modificada del vector comercial pET28b, que porta un promotor inducible por IPTG (*Invitrogen*, ver sección 2.4.1). Las construcciones resultantes (Tabla 2.4) se introdujeron mediante electroporación en la estirpe BL21(DE3). La clonación del gen *trnT-CGU* en el plásmido pCMN28b fue realizada por otros miembros del laboratorio.

Para la sobreexpresión y preparación del tRNA en *E. coli* se utilizó una versión modificada del protocolo descrito por Racznik (Racznik *et al.*, 2001). Las estirpes que sobreexpresaban los tRNAs se inoculaban en 15 mL de medio LB suplementado con el antibiótico kanamicina y 2% glucosa (p/v) y se incubaba toda la noche a 30°C en agitación (180 rpm). Este cultivo se utilizaba para inocular 500 mL de LB (asimismo suplementado con el antibiótico y el azúcar), que se incubaba durante 4-5 horas a 30°C. Cuando la  $\text{DO}_{600}$  alcanzaba un valor de 0,5 unidades de absorbancia (tras unas 4-5 horas) se añadía IPTG a una concentración final de 1 mM y se cultivaba durante 16 horas a 30°C. El cultivo se recogía mediante centrifugación a 6500 x *g* durante 10 minutos en una centrifuga *Beckman Avanti J-25* y las células se lavaban con 50 mM Tris-HCl pH 7,5. El precipitado se resuspendía en 12,5 mL de buffer TL (0,3 M acetato sódico; 10 mM EDTA pH

4,3) y se transfería a un tubo de fondo cónico de 50 mL, donde se añadían 12,5 mL de fenol ácido, equilibrado con tampón acetato a pH 4,5 (*Amresco*). La mezcla se mezclaba por vaivén sobre una plataforma basculante durante 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaba a 5000 x *g* durante 10 minutos. La fase acuosa se transfería a un tubo nuevo y se conservaba en hielo, mientras que a la fase orgánica se le añadía otros 12,5 mL de buffer TL y se agitaba por vaivén otros 20 minutos. Tras centrifugar a 5000 x *g* durante 10 minutos, la fase acuosa se combinaba con la obtenida anteriormente (alcanzando un volumen final de 25 mL) y se dividía en 3 tubos de vidrio *Corex* (8,3 ml por tubo). Los ácidos nucleicos se precipitaban añadiendo 2 volúmenes de etanol a cada tubo y centrifugando a 8000 x *g* durante 30 minutos, a 4°C. El sobrenadante se descartaba y el precipitado se resuspendía en 5 mL totales de 200 mM Tris-acetato, pH 8,5, que se alicuoteaba en diez tubos de microcentrífuga y se incubaban a 37°C durante una hora. La adición de Tris-acetato a pH 8,5 genera un ambiente básico que promueve la destrucción espontánea del enlace éster entre el tRNA y el aminoácido, obteniéndose tRNA desacilado. Tras la incubación, se precipitaba los ácidos nucleicos de elevado peso molecular añadiendo isopropanol a una concentración final de 30% (v/v) y centrifugando a 4500 x *g* durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfería a un tubo nuevo, donde se precipitaban los ácidos nucleicos de bajo peso molecular añadiendo isopropanol a una concentración de 60% (v/v) y se centrifugaba a 4500 x *g* durante 25 minutos a temperatura ambiente. Los pellets se lavaban con etanol al 70%, se resuspendían en H<sub>2</sub>O-DEPC y se combinaban en un solo tubo. Los tRNAs resuspendidos se sometían a un tratamiento térmico para plegarlos. Las preparaciones se calentaban a 75°C durante 3 minutos y luego se dejaban enfriar hasta que alcanzaban los 65°C, momento en el que se añadía MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 2 mM y se incubaban otros diez minutos a temperatura ambiente.

El tRNA total se cuantificaba mediante espectrofotometría, utilizando un coeficiente de extinción de  $\epsilon = 0,02 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$  a una longitud de onda de 260 nm. Para calcular la concentración del tRNA aminoacilable, se utilizaba tRNA total como sustrato en una reacción de aminoacilación con [<sup>14</sup>C]-Thr (ver sección 2.6.1) con elevadas concentraciones de enzima (hasta 400 nM) y largos tiempos de incubación (30 minutos) hasta conseguir su completa aminoacilación. Puesto que la reacción de aminoacilación ocurre con una estequiometría 1:1 (tRNA:aminoácido), la concentración de tRNA aminoacilable se deducía mediante la cuantificación de la radiactividad incorporada en las reacciones.

### 2.3.3.-Electroforesis de RNA en geles ácidos de poliacrilamida-urea

La técnica de los geles ácidos de poliacrilamida y urea es una técnica que permite resolver las especies aminociladas y desaciladas del tRNA por su diferencia de movilidad electroforética

(Köhler & RajBhandary, 2008). Una vez resueltos, los tRNAs se visualizan mediante *Northern* utilizando una sonda de DNA marcada radioactivamente complementaria al tRNA.

Para la purificación del tRNA total de *Anabaena* se utilizó un protocolo diferente al utilizado para la extracción del tRNA de *E. coli*, cuyas modificaciones estaban dirigidas a disminuir el tiempo total de la purificación del ácido nucleico y conservar la integridad del tRNA aminoacilado, extremadamente lábil y susceptible de desacilación espontánea. Un volumen de 40 mL de cultivo de *Anabaena* se recogía mediante centrifugación y se lavaba con 1 mL de tampón TL (0,3 M acetato sódico; 10 mM EDTA pH 4,3) tras lo cual se resuspendía en 500 µL de tampón TL. Se añadía entonces 1 mL de reactivo TriSure (*Life Technologies*) y se mezclaba vigorosamente con la ayuda de un vórtex. La mezcla se incubaba a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras lo cual se añadía 200 µL de cloroformo y se incubaba tres minutos más. La mezcla se centrifugaba a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C y la fase acuosa se transfería a un tubo nuevo, donde se añadían 0,85 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. La muestra se incubaba 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugaba a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C, se lavaba el pellet con etanol al 70% y se resuspendía en 50 µL de 10 mM acetato sódico, pH 4,5; 1 mM EDTA. La concentración de RNA se cuantificaba mediante espectrofotometría y una cantidad de entre 0,5-1 µg de RNA se resolvía mediante electroforesis para comprobar la integridad del RNA y descartar contaminaciones por DNA.

Para la electroforesis de los tRNA se preparaban geles de poliacrilamida de gran tamaño (20 x 45 cm) que contenían 6,5% acrilamida:bisacrilamida (19:1); 8 M urea; 0,1 M acetato sódico pH 5; 0,07% APS (p/v) y 0,15% TEMED (p/v). Antes de cargar las muestras, los geles se sometían a un campo eléctrico de voltaje constante de 500 V durante una hora a 4°C en un tampón 0,1 M acetato sódico, pH 5. Para preparar las muestras, 1 µg de RNA total se preparaba en un volumen final de 2 µL, al que se añadían 2 µL de tampón de carga (0,1 M acetato sódico, 8 M urea, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xilenocianol FF) y se cargaban directamente en el gel, sin hervir. En los geles se introducía además una muestra control de tRNA deacilado. Para preparar este control, una muestra de tRNA se resuspendía en 0,5 mL de 200 mM Tris-acetato pH 8,5 y se incubaban a 37°C durante una hora para deacilar los tRNAs. Tras la incubación, se precipitaban los ácidos nucleicos añadiendo isopropanol a una concentración de 60% v/v y se centrifugaba a 4.500 x g durante 25 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en H<sub>2</sub>O-DEPC.

Los geles se sometían a un voltaje constante de 500 V durante 22 horas a 4°C colocando una placa metálica tras el cristal, para ayudar a disipar el calor. Tras la electroforesis, el tRNA se transfería una membrana de nylon *Genescreen Plus* (*Perkin-Elmer*). La membrana se recortaba de un tamaño adecuado (sólo es necesario transferir la región del gel situado entre los dos frentes,

que es donde se encuentran los ácidos nucleicos de pequeño tamaño) y se hidrataba brevemente en agua. La membrana se situaba sobre dos papeles Whatman 3MM y se colocaba el gel encima. La transferencia se realizaba en un secador de geles Bio-Rad, modelo 385, a una temperatura de 80°C durante 2 horas.

Tras la transferencia se procedía al marcaje de la sonda con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP. Como sonda se utilizaba de un fragmento de PCR de una región interna al gen *trnT*-CGU y se marcaba utilizando el kit comercial *Ready to go DNA Labelling Beads (GE Healthcare)*. La mezcla de reacción comercial se proporciona liofilizada y contiene dATP, dGTP, dTTP, 4-8 U de enzima Klenow y una mezcla de cebadores de secuencia aleatoria. La mezcla de reacción se rehidratava en un volumen menor a 50  $\mu$ L de agua, tras lo cual se añadía 50 ng del fragmento de DNA que se quería marcar y 25  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol) (*Perkin-Elmer*) de modo que el volumen final de la reacción fuera 50  $\mu$ L. La reacción se incubaba durante una hora a 37°C, tras lo cual se filtraba por una columna de 1 mL de resina Sephadex G-25 para retirar los nucleótidos radioactivos no incorporados y se cuantificaba su radioactividad en un contador de centelleo *Beckman LS 6000<sub>IC</sub>*.

La membrana con el tRNA se incubaba en un horno de hibridación a 65°C durante 2 horas en 5-10 mL de solución de hibridación (1 M tampón fosfato pH 6,8; 7% SDS; 1 mM EDTA, pH 8). Posteriormente se añadía la sonda radiactiva previamente desnaturalizada mediante incubación a 100°C durante 3 minutos. La membrana se incubaba en la solución de hibridación en el horno a 65°C durante 12 horas, tras lo que se lavaba dos veces con 2X SSC (300 mM NaCl, 30 mM citrato sódico, pH 7); 0,1% SDS y una vez con 1X SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico, pH 7); 0,1% SDS. La radioactividad de la membrana se revelaba utilizando el sistema *Cyclone storage phosphor system* y el programa de análisis de imágenes *Optiquant (Packard)*.

### 2.3.4.-Análisis de regiones promotoras mediante transcripción *in vitro* (IVT)

La transcripción *in vitro* es una técnica utilizada para identificar regiones promotoras en fragmentos de DNA. Un fragmento lineal de DNA que contiene la posible secuencia promotora se incubaba en presencia de la RNA-polimerasa y una mezcla de NTPs entre los que se incluye un nucleótido marcado radioactivamente. La RNA-polimerasa inicia rondas de transcripción a partir de la región promotora, generando un fragmento de RNA en el que se ha incorporado el nucleótido marcado radioactivamente, lo que permite visualizar dicho producto.

Los fragmentos que contenían las regiones promotoras de los genes del operón *all4725-all4721* se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores específicos. Los cebadores se diseñaron de manera que el producto de amplificación comprendía una región entre las posiciones -100/+350 pb respecto al punto de inicio de transcripción (*tsp*) (Napolitano *et al.*, 2013). Los productos de amplificación se clonaron en el vector comercial pSpark-I, generando los

plásmidos pCMA9, pCMA10, pCMA11, pCMA12 y pCMA13, que portaban las regiones promotoras de los genes *all4721*, *all4722*, *all4723*, *all4724* y *all4725*, respectivamente.

Estos plásmidos se utilizaron a su vez como sustrato para la generación de fragmentos de las regiones promotoras mutadas en las cajas -10 y -35. Estos fragmentos mutantes se construían mediante PCR solapantes (tal y como se describe en el apartado 2.2.5.2) con cebadores que sustituían la secuencia de la caja -10 por GCGCGC y la de la caja -35 por CCTGAG. Los productos de amplificación de las secuencias silvestres y las versiones mutantes se purificaron utilizando el juego de reactivos *Illustra (Bioline)* y se secuenciaron antes de utilizarlos en los experimentos

M

Las reacciones de transcripción se realizaban siguiendo el protocolo descrito por Camargo (Camargo *et al.*, 2012). Las reacciones se llevaban a cabo en un volumen final de 16,5  $\mu\text{L}$ , en la que los distintos componentes se añadían secuencialmente. Cada reacción se realizaba en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que se mantenía a una temperatura constante de 37°C durante todo el proceso. En cada tubo se añadía 1  $\mu\text{L}$  de RNA-polimerasa de *Anabaena* reconstituida a partir de subunidades purificadas expresadas en *E. coli* (Valladares *et al.*, 2008), donada generosamente por el laboratorio de la Dra. Antonia Herrero, 1  $\mu\text{L}$  del factor  $\sigma^{70}$  purificado y 3  $\mu\text{L}$  de 40 mM Tris-HCl, pH 7. La mezcla se incubaba durante 10 minutos a 37°C para favorecer la reconstitución de la polimerasa con el factor  $\sigma^{70}$ . Posteriormente se añadía a cada tubo 10  $\mu\text{L}$  de una mezcla compuesta por 3  $\mu\text{L}$  de tampón IVT 5X (200 mM Tris-HCl, pH 7; 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 mg/mL BSA; 25% glicerol (v/v); 0,5 mM EDTA, pH 8; 250 mM KCl); 0,15  $\mu\text{L}$  de 100 mM DTT; 50 femtomoles del fragmento de PCR que contenía la secuencia promotora y agua desionizada hasta alcanzar un volumen de 10  $\mu\text{L}$ . La mezcla se incubaba durante 15 minutos a 37°C. Para iniciar la reacción se añadían 1,5  $\mu\text{L}$  de una mezcla de NTPs (1,5 mM UTP, GTP y ATP; 0,2 mM CTP) y 30  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-CTP, y se incubaba la reacción 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se detenía la reacción añadiendo 1  $\mu\text{L}$  de 0,5 M EDTA, pH 8; 1,5  $\mu\text{L}$  de glucógeno; 6  $\mu\text{L}$  fenol ácido, pH 4,5 y 800  $\mu\text{L}$  etanol absoluto. El tubo se mezclaba por inversión, se congelaba en nitrógeno líquido y se centrifugaba a 20000 x *g* durante 15 minutos. El sobrenadante se descartaba y el pellet se lavaba con etanol al 70%, tras lo cual se secaba en la estufa a 85°C durante 5 minutos. El pellet se resuspendía en 5  $\mu\text{L}$  de un tampón que contenía 97,5% (v/v) de formamida; 10 mM EDTA, pH 8; 0,3% (p/v) xilenocianol FF; 0,3% (p/v) azul de bromofenol (Sambrook *et al.*, 1989).

Para poder determinar el tamaño de los productos de transcripción, se procedió a marcar radioactivamente el marcador de peso molecular *20 pb Molecular Ruler DNA Size Standart (Bio-Rad)*. Se incubaban 25 picomoles del marcador en presencia de 20 U de la enzima polinucleótido kinasa del fago T4 (Roche) y 30  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP (*Perkin-Elmer*) en un tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 5 mM DTT y 0,1 mM EDTA, a 37°C durante una hora. El DNA se precipitaba con 2,5 M acetato amónico, pH 7,5; 0,016  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  glucógeno y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. El

pellet se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en agua desionizada. La eficiencia del marcaje se estimaba midiendo la radioactividad de 1  $\mu$ L de la muestra con un contador de centelleo *Beckman*, modelo *LS 6500* IC.

Los geles de electroforesis se preparaban al 4% de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) en tampón TBE conteniendo 4,7 M urea y se polimerizaban con 0,08% (p/v) de persulfato amónico y 0,1% (v/v) TEMED. Una vez solidificados, los geles se sometían 30 minutos a 4°C a un campo eléctrico de un voltaje constante de 100 V utilizando un sistema de electroforesis vertical *OWL ADJ1 (Thermo-Scientific)* en tampón TBE. Las muestras se cargaban y se hacían migrar durante una hora una potencia constante de 20 W, tras lo cual los geles se transferían a papel Whatman 3MM y se secaban al vacío durante una hora a 80°C en un secador de geles Bio-Rad, modelo 385. Los geles se revelaban mediante autoradiografía utilizando el sistema *Cyclone Storage Phosphor System*.



### 2.3.5.- Análisis del nivel de expresión mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR)

Para los experimentos de Q-PCR, las estirpes silvestre de *Anabaena* y la estirpe mutante MN38 ( $\Delta$ zur) se cultivaron en medio estándar BG11 y BG11-Zn<sup>++</sup> respectivamente y se extrajo el RNA total correspondiente a 40 mL de cultivo de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.3.1. Para excluir la posible contaminación con DNA de la muestra, se realizaba una reacción control de PCR con los cebadores del gen *rnpB*, utilizando como molde una dilución 1:800 del *stock* de las preparaciones de RNA. En caso de obtener producto de amplificación en la reacción control, se sometía la preparación de RNA a un tratamiento adicional con DNAsa I. Se utilizaron 5  $\mu$ g de las preparaciones de RNA del silvestre y del mutante MN38 ( $\Delta$ zur) para preparar cDNA utilizando el juego de reactivos comercial *Superscript First Strand cDNA synthesis kit (Invitrogen)* siguiendo las instrucciones del fabricante y usando hexanucleótidos de secuencia aleatoria como cebadores para la síntesis. Para las reacciones de Q-PCR se utilizó una dilución 1:100 de la reacción de retrotranscripción (correspondiente a 6,25 ng de RNA retrotranscrito) y el kit comercial *SensiMix SYBR (Bioline)* en un detector *iQ5 multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad)*.

Para cada gen, se calculó la diferencia en su nivel de expresión en el mutante MN38 ( $\Delta$ zur) respecto al silvestre utilizando el parámetro  $\Delta\Delta$ CT y el gen *rnpB* como gen normalizador (Livak & Schmittgen, 2001). El valor CT (de *threshold cycle*) se define como el ciclo en el que la fluorescencia del producto de amplificación supera el umbral del ruido de fondo. La sustracción del CT del gen normalizador (que debe ser un gen cuyo nivel de expresión sea constante y no se vea alterado en las distintas condiciones ensayadas) a los valores de CT de cada uno de los genes analizados permite obtener el parámetro  $\Delta$ CT. Para realizar la comparación relativa de los niveles de

expresión de un mismo gen entre las dos estirpes, se definió el parámetro “nivel de inducción” que corresponde al valor de  $\Delta\Delta CT$  para tal gen, como se expone a continuación:

$$\text{Nivel de inducción} = 2^{\Delta ct(zur) - \Delta ct(WT)}$$

Para diseñar parejas de oligonucleótidos específicos complementarios a las regiones internas de cada uno de los genes a analizar se utilizó el software *GenScript Real-Time PCR Primer Design* (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>). Este software genera, tras introducir la ORF del gen, una serie de secuencias candidatas para ser utilizadas como cebadores. Con el fin de optimizar y homogeneizar los oligonucleótidos utilizados en la Q-PCR, se restringió la búsqueda que realiza en programa de acuerdo a los siguientes parámetros: a) que las parejas de cebadores generasen un único producto de amplificación, b) que la temperatura de alineamiento se encontrase en torno a los 55°C y c) que el producto de amplificación fuera de una longitud ente las 120 y 150 pb. En la Tabla 2.6 aparece la lista de oligonucleótidos utilizados en los experimentos de Q-PCR.

## **2.4.-Métodos de sobreexpresión, purificación y análisis de proteínas**

### **2.4.1.-Sobreexpresión de proteínas en *Escherichia coli* BL21(DE3)**

La mayoría de los plásmidos para la sobreexpresión de proteínas utilizadas en este trabajo son derivados del vector de expresión pCMN28b (Napolitano *et al.*, 2012) que porta una secuencia que codifica para una etiqueta Strep-Tag II bajo el promotor del fago T7. Las ORFs que codificaban las proteínas de interés se clonaban en dicho plásmido en fase con la secuencia codificante de la etiqueta Strep-Tag II, de manera que se generaba una ORF quimérica que al expresarse produciría la proteína de interés con la etiqueta Strep-Tag II en el extremo N-terminal. Estos plásmidos se transformaban en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3) que tiene integrado en el genoma una copia del gen que cifra la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG.

Para la sobreexpresión de proteínas a pequeña escala, 3 mL de cultivos estacionarios en medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y 2% (p/v) de glucosa se inoculaban en 50 mL de medio fresco de la misma composición y se incubaban a 37°C con agitación durante unos 90 minutos, hasta que la  $DO_{600}$  alcanzaba un valor de en torno a 0,7 unidades de absorbancia. En este momento se añadía IPTG a una concentración final de 1 mM y el cultivo se incubaba entre 3 y 5 horas a 37°C en agitación. Las células se recogían por centrifugación en una centrifuga *Centrifuge 5804-R (Eppendorf)* (5000 x g, 5 minutos) y se lavaban con 50 mM Tris-HCl pH 7,5. El pellet se



Nombre	Secuencia (5'-3')
rnpB_1F	AGGGAGAGAGTAGGCGTTG
rnpB_1R	TGGGTATGGGGATTAGG
1198_1F	CCCAATGCTGTAGTTACCCA
1198_1R	GTGTCCATTTCGTGAGCAAGT
1199_1F	CTAGTGCAGTATGGCGGAGA
1199_1R	CGGGAGTTAATGCTTCATCA
1474_1F	ATCCTCAAGCTGAACAAGGG
1474_1R	GCATCTTCAATGCGGAAAC
1640_1F	AGCCGGAGCGGTAGATTAT
1640_1R	GCTGCTTGTTCACGGATT
1748_1F	TGCTGTGAGTCAAATTGCAG
1748_1R	GGCATTACTGGGTTCACACT
1749_1F	GTAGCTAACCCAGCAAAGGC
1749_1R	TGTAGAGTGGTCGATTGGGA
1750_1F	CACCTGCATGGGTAGACAAG
1750_1R	GCCAATCAATACTCAATGCG
1789_1F	TGTTGGGTTACTCTACGAGAAGG
1789_1R	ACCACTCTTCTATGGCTCTCG
1790_1F	TCATTAATGGTAGCAGCAGTCTT
1790_1R	CCTCTCTTGCTAGGAGACGATT
232_1F	CTGGTGGTCTCGATTGTTG
232_1R	TGCACCAAACTTTAGCAATG
2866_1F	TTCAACCTCCACCATTCAAA
2866_1R	AATCGGGTGAATAAATTCG
3086_1F	CGTGGTATTCCTCTGGATGAT
3086_1R	AGGCAGAACAGGCTAAGAC
3241_1F	GTGCGAATGGTTCTGGTAAA
3241_1R	TGACTGTAAACCTGGAGGA
3243_1F	TGACACCGTTAGGTGCAGAT
3243_1R	CAATTCTCGGTAATTGAGCAAA
3388_1F	TGTCGCTGAACAGTTATATCCC
3388_1R	CCTGACATTGCAGTGGTAATAAG
3650_1F	GTTGTTTGGGCTAGCAATGA
3650_1R	GCCTTTCATTCTCATTCCC
4027_1F	AAGCACTTGACAAACTTGG
4027_1R	CAACTGCTAAATTGCCGAAA
4028_1F	TGTTGAACCACCTCTGGTA
4028_1R	TCTTATTGGATGGCAGACCA
4030_1F	GCACCACAAAGCTGTGTAT
4030_1R	GTTGCTTCTCACTTCCACA
4031_1F	CAGAGGTTTGGCGGTAGAAT
4031_1R	GCCTGCTTAAATCCTTGGG
4032_1F	CTCAAAGAACGCATTCAAA
4032_1R	TCTCCCAATAACAGCGCAT
4033_1F	GCGTCAATTAGCACGAGAAA
4033_1R	CTGCGGAAAGTATCAGCAAA
5231_1F	TGGAGCAGGGATTGGTAACT
5231_1R	TGAATCATTGAGATCCCAGGT
7109_1F	GCTAAGTATTCCTCATAATAATG
7109_1R	CTGCATCAAATACTATTATTGG
7226_1F	TCGCCCTTAGTGTACCAACA
7226_1R	TGATTATTCCTATGTGTGCAA
all1751_1F	CCTGCACCAGTGATTTCAGAC
all1751_1R	TCAGCAAAGGCAATCTGTTC

Nombre	Secuencia (5'-3')
all3016_1F	GCAGTGGCTTGTGGTCTATC
all3016_1R	TGTAACCCAGACTGCTGGAC
all3465_1F	AAGGTTTCAGATTGCCAAGG
all3465_1R	TTGTGGTTATCCTCCTGCAC
all3515_1F	ACCCATGCTGATGAAACTGA
all3515_1R	AAATCTTCTTCCCGATGTGC
all4723_1F	CGAAATCGCTCAGTTAAACG
all4723_1R	CAAGGAAGATTCTGGTGTGC
all4725_1F	CAACGCCAGAGAAGCAATTA
all4725_1R	ATTTCGCCACTGACGTTGTAG
all5003_1F	CATCAGCCAAACATTGGTTC
all5003_1R	TAACCTACCGCCAAGGTAGC
all7021_1F	TATTGCCAAGCTGTGACTT
all7021_1R	ATCACCTTCTCGCCAATCTT
alr0223_1F	GGTATTCTGGGTGGAACAT
alr0223_1R	CTGAGGTAGAACAGCGCAAA
alr1197_1F	TGATGTGTCTGATGGTAGGTC
alr1197_1R	CTGTCTCATTGCCGACTCAT
alr1752_1F	CAGCCGAGAAATTACGATA
alr1752_1R	GGAGATCCAAGGTAGAGCCA
alr2726_1F	ACAAAATCCAGCAACAGCAAG
alr2726_1R	AGCAAAGCATTTCAGATTATCG
alr2831_1F	AAGATGCCACAATCATCTGC
alr2831_1R	TCAAGTTCGGCATTTCATCAT
alr3017_1F	TAGCCAGGGATGTCAAACAA
alr3017_1R	TGACGGTAAGCATTACCCAA
alr3240_1F	GTAGCGATCGCCATGTTTAG
alr3240_1R	CACTTACCGCCACACCAC
alr3242_1F	TTCCGGGAATCAATTCTCTC
alr3242_1R	GTGGGTATGACACTCAACGC
alr3495_1F	TGTAGAGCCGGAACAACAAC
alr3495_1R	TCCGTGCATATCGTATAGCC
alr3496_1F	GGTCATCCAAAAGACCTATG
alr3496_1R	CCTAATTCCTGACCAATTTCA
alr5231_1F	GCCTTAGCCAGTGGTGGTAT
alr5231_1R	AGGCTCCATGATGTCAACAG
alr7190_1F	CGATGAAATTAGCGCAAAGA
alr7190_1R	ACCGCCGACTATCTAAATG
aztA_1F	CCAGTTTCCATTGTCTAGTGC
aztA_1R	TTGTGTAAATTGTGCCGGTTT
aztR_1F	TCAGCTGCGGTTATTGAAAG
aztR_1R	TGCCAGTTGCGTAAGTATTGT
bmtA_1F	CGTAACTCAAATGAAATGTG
bmtA_1R	CCACAGCCATTATGGTTAC
murC_1F	TCTGAGTCTTTCAGCCATGC
murC_1R	TGTGGGTGTTCTTGAGCAAT
nadD_1F	TCGCTCAGGAGTTTCTTACG
nadD_1R	TGCGATTAACCAATCACACA
znuA_1F	AGCCTTGCTAATGTTGTCCA
znuA_1R	GCTGCACTGACGGACTAGAG
ZNUB_1F	CCGGAGCTTTCCTATCTCTG
ZNUB_1R	TAGCTTGATTTTCGAGATGG
ZNUC_1F	ATCGACCAGACGGATTTAGG
ZNUC_1R	CGCTAGAATATCGCCAAACA



Tabla 2.6. Lista de cebadores utilizados en los experimentos de Q-PCR

resuspendía en 5 mL de tampón W (150 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM DTT) suplementado con 1 mM PMSF y se lisaba mediante sonicación con un sonicador *Branson*, modelo *Digital Sonifier 250*, sometiendo el cultivo a tres sesiones de sonicación de 2 minutos, utilizando ciclos de 0,5 segundos de sonicación y 0,5 segundos de descanso a una amplitud del 15%.

El lisado celular se alicuoteaba en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y se centrifugaba (30 minutos, 16000 x g, 4°C) en una centrifuga *Hitachi* modelo *Himac CT15RE* para separar la fracción particulada de la fracción no particulada. La presencia de la proteína de interés en cada una de estas fracciones se comprobaba mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. La sobreexpresión de proteínas a gran escala se realizaba de manera similar utilizando volúmenes 10 veces superiores a los que se indican arriba y manteniendo las proporciones. Las células se recogían utilizando una centrifuga *Beckman Coulter Avanti J-25* con el rotor JLA 8.1 (8000 rpm, 10 minutos), se lavaban con 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 y se resuspendían en 8-10 mL de tampón W suplementado con 1mM PMSF. La suspensión celular se sometía a dos ciclos de rotura (20000 *psi*) en una prensa de French (*SML-AMINCO*) y el lisado celular se procesaba como se ha descrito anteriormente.

#### **2.4.2.-Purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de estreptavidina**

Los extractos lisados que contenían la fracción soluble se purificaban mediante cromatografía de afinidad en columnas *StrepTrap HP* (GE Healthcare) de 1mL de volumen de matriz, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, las columnas se equilibraban con dos volúmenes de tampón W (150 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM DTT) y tras lo que se hacía pasar la muestras filtradas previamente por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Posteriormente, la columna se lavaba con 5 mL de tampón W durante lo cual se recogían 5 alícuotas del eluato de 1 mL cada una. Para la elución de la proteína, se hacían pasar por la columna 3 mL de tampón W suplementado con 2,5 mM destiobiotina y 10% glicerol (v/v), durante lo cual se recogían 6 fracciones de elución de 0,5 mL cada una. La destiobiotina posee una mayor afinidad por el ligando *StrepTactin* de la columna que la *Strep-Tag II*, por lo que desplaza a la proteína unida a la resina. Las fracciones de elución se visualizaban mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para cuantificar la concentración de proteína de las muestras se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976). Para ello, un volumen de entre 1 y 20  $\mu\text{L}$  de muestra se diluía en reactivo de Bradford comercial (*Bio-Rad Protein Assay*) diluido en agua (1:4, v/v). Tras 5 minutos de incubación se medía la absorbancia a 595 nm y se calculaba la cantidad de proteína utilizando el coeficiente de extinción molar en base a una curva patrón de BSA.

### 2.4.3.-Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de proteínas se llevaba a cabo según el procedimiento de Laemmli (Laemmli, 1970) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las muestras de proteínas se preparaban en un volumen máximo de 20  $\mu$ L, que contenía el tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% glicerol (v/v), 2,5% SDS (p/v), 5% 2-mercaptoetanol (v/v) y 0,0025% de azul de bromofenol (p/v)) y se hervían a 100°C durante 3 minutos antes de cargar. Como patrón de tamaño se utilizaba el marcador de peso molecular *Page Ruler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas)*. Para la electroforesis se utilizaban aparatos *Miniprotean II* o *Miniprotean III (Bio-Rad)*, con tampón 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1% SDS (p/v), con un pH de 8,3. El gel se resolvía a un voltaje constante de 200 V durante 50 minutos. Posteriormente, el gel se visualizaba utilizando una solución que contenía 0,5% de azul de Coomassie R-250 (*Sigma*), 10% ácido acético (v/v) y 40% metanol (v/v).



### 2.4.4.-Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular permite separar una mezcla compleja de biomoléculas en función del radio hidrodinámico de éstas. Para estos experimentos se utilizaba una columna *Superdex 200 (S200) Tricorn (GE Healthcare)* de 30 cm, con un rango de separación de 10-600 kDa, y un equipo de cromatografía FPLC tipo *ÅKTA (Amersham Pharmacia)*. La relación del volumen de elución ( $V_e$ ) de cada proteína con su peso molecular se establecía de acuerdo a una recta patrón elaborada previamente con proteínas de peso molecular conocido (Napolitano, 2013).

Previamente a la inyección de la muestra, la columna se equilibraba con dos volúmenes de columna (aproximadamente, 50 mL) de tampón W (100 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM DTT) y la muestra, de un volumen de 100  $\mu$ L, se cargaba se inyectaba automáticamente en la columna. Durante la operación se mantenía un flujo de 0,3-0,5 mL/minuto de tampón W y se recogían fracciones de 0,5 mL. El equipo llevaba acoplado, asimismo, un espectrofotómetro que medía la absorbancia a 280 nm, que se utilizaba para detectar y cuantificar las proteínas. A las fracciones recogidas se añadía glicerol a una concentración final de 10% y se utilizaban inmediatamente en ensayos de aminoacilación o bien se congelaban a -20°C.

### 2.4.5.- Inmunodetección de proteínas (Western Blot)

Las proteínas se sometían a electroforesis en geles de acrilamida tal y como se ha descrito en el apartado 2.4.3, utilizando como patrón de peso molecular el marcador preteñido *PageRuler Prestained Protein Marker (Thermo Scientific)*. Los geles se transferían a membranas de PVDF

(polifluoruro de divinileno) *Hybond P (GE Healthcare)* utilizando el sistema de transferencia “*TE77 Semi-Dry Transfer Unit*” (*GE Healthcare*). Para realizar la transferencia se preparaban para cada gel 6 piezas de papel Whatman 3MM y una membrana de PVDF de las mismas dimensiones del gel a transferir. Para preparar la membrana para la transferencia, ésta se sumergía algunos segundos en metanol y luego 15 minutos en agua desionizada.

Los distintos componentes se colocaban en el aparato de transferencia en el siguiente orden:

- Dos hojas de papel Whatman empapadas en tampón Ánodo 1 (Tris 75 mM, metanol 20%, pH 10,4).
- Una hoja de papel Whatman empapada en tampón Ánodo 2 (Tris 6.32 mM, metanol 20%, pH 10,4).
- La membrana PVDF empapada en tampón Ánodo 2.
- El gel de poliacrilamida
- Tres hojas de papel Whatman empapadas en tampón Cátodo (SDS 3,46 mM, Tris 6,23 mM, 20% metanol, pH 9,4).

La transferencia se realizaba durante 1 hora a una intensidad de corriente constante que se calculaba multiplicando la superficie del gel (en cm<sup>2</sup>) por un factor de 0,8. El gel de poliacrilamida se teñía posteriormente con azul de Coomassie para comprobar que toda la proteína se había transferido.

Las membranas se lavaban brevemente en agua desionizada y se incubaban en solución de bloqueo (50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl, 10 % leche en polvo desnatada, 0,05% Igepal (Nonidet P40)) durante una hora a 37°C en una plataforma basculante. Alternativamente, se incubaban a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las membranas se incubaban en una solución que contenía 50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl, 2 % leche en polvo desnatada y 0,25 % Tritón X-100 y anticuerpo *Penta-His HRP-conjugate (Qiagen)* en una proporción entre 1:5000 y 1:10000. Las membranas se incubaban en esta solución durante una hora a 37°C en una plataforma basculante. Alternativamente, se incubaban a 4°C durante toda la noche. Las membranas se lavaban durante cinco minutos en agitación con 20 mL de TBS suplementado con 0,05% Tween-20. Este proceso se repetía cuatro veces y por último se lavaban con agua desionizada durante 15 minutos. Para la visualización se empleaba el juego de reactivos comercial *WesternBrigh ECL Western blotting detection kit (Advansta)*. Se añadían 0,5 mL de la solución de revelado sobre la membrana y se incubaba 2 minutos, tras lo que la membrana se exponía en un aparato de captación de imágenes ChemiDoc XRS+ (*Bio-Rad*) o se ponía en contacto con una película de autoradiografía *Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare)* en oscuridad durante un tiempo variable de entre 1-5 minutos, tras lo que se revelaba.

#### 2.4.6.-Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Para los ensayos EMSA se utilizó un fragmento que contenía la región promotora de *all4725*, donde estaba contenido el posible sitio de unión de Zur. El fragmento se obtuvo mediante digestión del plásmido pCMA13 con las enzimas de restricción NcoI/XhoI. Estas enzimas dejan extremos 3' protuberantes que contienen un nucleótido guanina. Los fragmentos se purificaban y se marcaban radioactivamente rellenando los extremos protuberantes con la enzima Klenow añadiendo en la mezcla de reacción [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP. Para marcar el DNA, se incubaban 10-20 ng del fragmento digerido con 1 U de la enzima Klenow en tampón suministrado por el fabricante suplementado con 30  $\mu$ M de dATP, dGTP y dTTP, así como 30  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP, en un volumen final de 50  $\mu$ L. La reacción se incubaba 30 minutos a 37°C, tras lo cual se añadía a la mezcla de reacción 50  $\mu$ M de dCTP frío y se incubaba 5 minutos más a 37°C. La enzima se inactivaba incubando a 65°C durante 15 minutos y la reacción se filtraba por una columna de 1 mL de resina G-25 para eliminar el tampón y los nucleótidos. La eficacia del marcaje se estimaba midiendo la radioactividad de 1  $\mu$ L de la reacción en un contador de centelleo *Beckman*, modelo *LS 6500* <sub>IC</sub>.


Las proteínas recombinantes FurA, FurB y FurC se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columnas de estreptavidina (*IBA*) a partir de las estirpes sobreexpresoras pCJS18, pCJS19 y pCJS20. Para sustituir el tampón de elución en el que se encontraban las proteínas (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; 2,5 mM destiobiotina) por el tampón que se utiliza en las reacciones de EMSA (20 mM Tris-HCl pH8; 50 mM KCl; 1 mM DTT, 10% glicerol) las muestras se filtraron por una columna PD-10 de resina Sephadex-G25 (*GE Healthcare*). La columna se equilibraba con 20 mL de tampón de EMSA antes de cargar 2,5 mL de muestra (correspondientes a las cinco primeras fracciones de elución de la purificación en columna de estreptavidina combinadas) y se eluía con 3,5 mL de tampón de EMSA. Se recogieron fracciones de 0,5 mL que se cuantificaron por el método de Bradford.

La mezcla de reacción de los ensayos EMSA contenía 20 femtomoles de DNA marcado y entre 2,5-10 picomoles de proteína en un volumen final de 15  $\mu$ L que contenía asimismo 1,5  $\mu$ L de tampón de reacción 10 X (200 mM Tris-HCl pH 7,8; 500 mM KCl; 10 mM DTT; 50% glicerol, 1  $\mu$ g/ $\mu$ L BSA; 0,05  $\mu$ g/mL DNA de esperma de arenque). La mezcla se incubaba a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras lo cual se añadía 1,5  $\mu$ L de tampón de carga de DNA y se cargaba en geles de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida en estos experimentos tenían la siguiente composición: 4% acrilamida:bis-acrilamida (30:0,38); 400 mM Tris-acetato, pH 8; 2,5 % (v/v) de glicerol; 0,13% (p/v) persulfato amónico y 0,08% (v/v) de TEMED. Una vez solidificados, los geles se sometían una hora a 4°C a un voltaje constante de 100 V en aparatos *Miniprotean II* (*Bio-Rad*), en un tampón 100 mM Tris-acetato, pH 8, antes de cargar las muestras. Tras la carga, la corriente

se ajustaba a una intensidad constante de 18 mA durante 30-40 minutos. Terminada la electroforesis, los geles se colocaban sobre papel Whatman 3MM y las bandas de DNA radiactivo se visualizaban mediante autoradiografía utilizando el sistema *Cyclone storage phosphor system* y el programa de análisis de imágenes *Optiquant (Packard)*.

## **2.5.-Análisis de la constante de afinidad de la proteína por metales**

### **2.5.1.-Análisis del contenido de metales mediante ICP-MS**

 El análisis del contenido en metales de las proteínas se realizó mediante la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (*inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS*) en un espectrómetro modelo 7500ce (*Agilent*). Para preparar las muestras, éstas se diluían en cuatro partes de ácido nítrico al 2% y se mezclaban con la pipeta antes de medir el contenido en metales. Antes de cada medida se preparaba una curva patrón para calibrar la sensibilidad del aparato. Para preparar la curva de calibrado se preparaban diluciones seriadas de una solución patrón de concentración conocida. Alternativamente, se enviaron las muestras a analizar al Servicio de Radioisótopos de los Servicios Generales de Investigación (CITIUS) de la Universidad de Sevilla.

### **2.5.2.-Preparación de proteínas libres de metales**

Los experimentos de análisis de la constante de afinidad requieren de proteínas a las que se les ha retirado el cofactor metálico (*apo*-proteínas). Los residuos de coordinación de los metales, especialmente las cisteínas, son sensibles a la oxidación, por lo que los experimentos de re-metalación y competición por quelantes se realizaron en una cámara anaeróbica, con una atmosfera de nitrógeno libre de oxígeno.

Durante la preparación de las proteínas libres de metales, así como en la realización de los experimentos, se utilizaron en todo momento tampones libres de metales. Para asegurar que las soluciones estaban exentas de contaminaciones con metales, se filtraban a través de una columna empaquetada con resina *Chelex-100 (Bio-Rad)*, un co-polímero de estireno-divinilbenzeno que contiene grupos de ácido iminodiacético con una elevada afinidad por metales de transición y que se utiliza habitualmente para retirar los cationes de muestras de interés. Es importante destacar que las soluciones no se esterilizaban en el autoclave puesto que ello generalmente llevaba consigo la contaminación de aquellas con metales. Las soluciones se hacían pasar tres veces por la columna de *Chelex-100* y se recogían en tubos de fondo cónico de 50 mL estériles. Para poder utilizar las soluciones en la cámara anaeróbica, se retiraba el oxígeno de los tampones introduciéndolas en el compartimento de entrada de la cámara anaeróbica, donde se purgaban

con un flujo de nitrógeno durante 1-2 horas. El contenido en metales de las soluciones se determinaba mediante ICP-MS antes de utilizarlos en los experimentos.

Para purificar las proteínas en su forma libre de metales, se utilizó un protocolo derivado de la purificación por cromatografía de afinidad por estreptavidina descrita en el apartado 2.4.2. Las proteínas T1 y T2 se sobreexpresaron en un volumen de 0,5 L de cultivo de las estirpes de *Escherichia coli* BL21 (DE3, pCMN20) y BL21 (DE3, pCMN21). Las soluciones utilizadas en este procedimiento se suplementaban con 5 mM EDTA, pH 8 y 5 mM DTT. La adición de estos compuestos perseguía un doble objetivo: el quelante retiraba e inmovilizaba los iones de metales, mientras que el DTT mantenía el estado reducido en los residuos de coordinación, que tras la pérdida del metal eran susceptibles de oxidación. Las dos fracciones de elución con mayor contenido en proteína (típicamente las dos primeras) se combinaban en un solo tubo y se incubaban a 4°C durante 16 horas.

Debido a que varios de los componentes del tampón en el que se encontraba la proteína presentan propiedades quelantes (el tampón Tris-HCl, el DTT y por supuesto el EDTA) que podían interferir en los experimentos, las proteínas se sometían a un proceso de sustitución de tampón mediante una cromatografía en columnas de heparina de 1 mL de volumen de columna *Heparin Hitrap HP (Sigma)*. La heparina es una resina que presenta una afinidad inespecífica por proteínas que se unen a los ácidos nucleicos. Las proteínas se cargaban en la columna de heparina y ésta se introducía en la cámara anaeróbica. Una vez dentro, la columna se lavaba con 20 mL de tampón 10 mM, HEPES pH 7,5; 50 mM NaCl y se eluían con un tampón 10 mM HEPES, pH 7,5; 500 mM NaCl (ambos tampones preparados tal y como se ha descrito al comienzo de esta sección). El contenido en proteína se cuantificaba mediante ensayos de Bradford (apartado 2.4.6). Para comprobar que se había obtenido la forma *apo* de la proteína, el contenido en metales se cuantificaba mediante ICP-MS.

Para comprobar que los residuos de cisteína de las proteínas purificadas se mantenían en estado reducido, se realizaba tras la purificación un ensayo con 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoato) (DNTB) o reactivo de Ellman. El DNTB reacciona con los grupos sulfidrilo de las cisteínas, dando lugar a aniones de 2-nitro-5-tiobenzoato, que presentan una intensa absorbancia a 412 nm. Los grupos disulfuro oxidados, por el contrario, no presentan esta propiedad, por lo que el incremento de la absorbancia a 412 nm de una muestra puede relacionarse con la concentración de cisteínas reducidas de la proteína. Para estos ensayos, se preparaba 1 mL de muestra a una concentración de 5  $\mu$ M para T1 o 1,4  $\mu$ M para T2 (la razón de esta disparidad estriba en que T1 tiene 2 residuos de cisteína por molécula, mientras que T2 tiene 7, por lo que la concentración final de residuos de cisteína para ambas proteínas en el ensayo es de 10  $\mu$ M) a la que se añadía 10  $\mu$ M de DNTB. La muestra se incubaba en la cámara anaeróbica a temperatura ambiente durante

15 minutos, tras lo cual se transfería a una cubeta de cuarzo lavada con ácido nítrico al 4% y se medía la absorbancia a 412 nm. En paralelo se procesaba una muestra que carecía de proteína para utilizarla como blanco. Para determinar la concentración de cisteínas reducidas en la muestra, se utilizaba un coeficiente de extinción molar de  $\epsilon=14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 2.5.3.-Ensayos de competición por metales entre proteína y quelantes

En los ensayos de competición por metales, la proteína problema y un quelante con una constante de afinidad conocida se ponen en contacto con una cantidad conocida de metal y se observa la proporción de éste que se une a la proteína o al quelante. Estos ensayos se utilizan para calcular la constante de afinidad de la proteína problema por el metal presente en el ensayo. Se utilizaron dos métodos distintos para determinar el reparto del metal entre proteína y quelante cuya aplicación dependía de si el quelante presentaba o no propiedades espectrofotométricas.

En los ensayos de competición en los que se utilizó el quelante Mag-Fura2, el reparto de metal entre proteína y quelante se midió espectrofotométricamente. El Mag-Fura2 (en adelante, MA2) es un quelante con una constante de afinidad por zinc de  $2,04 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  que presenta un pico de absorción a una longitud de onda de 369 nm, que se pierde cuando lleva unido un metal, de manera que existe una correlación entre el descenso en la absorbancia y la cantidad de metal unido al quelante. Para los experimentos de competición, se preparaba en el interior de la cámara anaeróbica, en una cubeta de cuarzo previamente lavada con ácido nítrico al 4% y agua, una mezcla de 1 mL con 5  $\mu\text{M}$  del quelante y una cantidad equimolar de la proteína problema. A la cubeta se añadían 0,2 equivalentes de metal, se mezclaba pipeteando y se incubaba 3 minutos a temperatura ambiente antes de medir el espectro de absorbancia en un rango de 250-800 nm. Durante este tiempo de incubación, la cubeta se cerraba herméticamente y se extraía de la cámara anaeróbica. Tras la medición, la cubeta se introducía de nuevo en la cámara y se añadían otros 0,2 equivalentes y se repetía el proceso hasta que no se observaba variación en la absorbancia a 369 nm.

En los ensayos de competición en los que se utilizaron quelantes que no presentaban propiedades espectrofotométricas, el experimento se realizaba mediante filtración en resina G-25 utilizando una columna *PD-10 Desalting Column (GE Healthcare)* de las muestras, que permite separar las proteínas del quelante presente en una mezcla. Para preparar la columna, ésta se lavaba primero con 5 mL de agua y luego se añadía 0,5 mL de 0,5 M EDTA, pH 8. La columna se introducía entonces en la cámara anaeróbica y se lavaba con 25 mL de tampón 10 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM NaCl. La muestra se cargaba y se eluía con 15 mL de tampón. Se recogían fracciones de 0,5 mL durante todo el proceso, cuyo contenido en proteína se analizaba mediante ensayo de Bradford y el contenido de metales mediante ICP-MS.



## 2.6.-Ensayos enzimáticos

### 2.6.1.-Ensayos de aminoacilación

Los ensayos *in vitro* para medir la actividad de aminoacilación de la treonil-tRNA sintetasa se realizaban tal como describe Francklyn (Francklyn *et al.*, 2008). Los ensayos se realizaban a una temperatura de 30°C y con una agitación de 300 rpm en un agitador termostatzado *TermoShacker TS-100C (bioSan)*. La mezcla de reacción contenía 50 mM Hepes pH 7,5; 25 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 5 mM ATP, 20 μM [<sup>14</sup>C]-L-treonina (*American Radiolabeled Chemicals*) y 5 μM tRNA<sup>Thr</sup>. La mezcla se calentaba a 30°C algunos segundos y la reacción se iniciaba añadiendo la enzima, a una concentración final entre 50-250 nM (o añadiendo 2,5–5 μL de las fracciones de elución de la columna S-200).

Se tomaban alícuotas de 22 μL a distintos tiempos del ensayo (típicamente 2, 4 y 8 minutos) y la reacción se detenía depositando la alícuota sobre filtros Whatman de celulosa de 0,11 μm (*GE Healthcare*) previamente sumergidos en ácido tricloroacético (TCA) al 5% (v/v) y secados. El ácido tricloroacético provoca que las moléculas de aminoacil-tRNA, de gran tamaño, precipiten y queden fijadas al filtro. Una vez terminado el ensayo, los filtros se secaban bajo una lámpara incandescente y se lavaban con 5% TCA durante 5 minutos en agitación (60 rpm). Tras tres pasos de lavado, se sumergían en etanol absoluto y se secaban bajo una lámpara incandescente. Una vez secos, los filtros se sumergían en 5 ml de líquido de centelleo *EcoLite+* (*MP Biomedicals*) y su radiactividad se cuantificaba en un contador de centelleo *Beckman*, modelo *LS 6500 IC*, donde se determinaban las desintegraciones por minuto (DPM) del isótopo <sup>14</sup>C.

Los ensayos de aminoacilación se complementaban con una reacción control que contenía todos los componentes a excepción del tRNA y que se procesaban igual que las muestras del ensayo. Dos alícuotas de 22 μL (*washed*) se sometían al mismo proceso de lavado con TCA al 5% que las muestras del experimento y determinaban el valor de radiactividad basal, que se sustraía al valor de DPM de las muestras. Otras dos alícuotas de 22 μL (*unwashed*) se medían directamente en el contador sin ningún paso de lavado, para poder relacionar el valor en DPM del contador con la cantidad de treonina.

#### 2.6.1.1.-Ensayos de carga de aminoácido ilegítimo

Para los ensayos de carga de tRNA<sup>Thr</sup> con serina, se realizaba una versión modificada de los ensayos de aminoacilación descritos en el apartado anterior en la que se sustituía el aminoácido por [<sup>14</sup>C]-L-serina (*American Radiolabeled Chemicals*). Debido a la especificidad que las aminoacil-tRNA sintetisas presentan por el aminoácido legítimo, es previsible que la activación del aminoácido ilegítimo serina ocurra a una tasa más baja que la de treonina. A fin de compensar



este efecto y obtener unos niveles de actividad detectables, en los ensayos de ensayos de carga de tRNA con el aminoácido ilegítimo (*misacylation assays*) se usaban concentraciones de enzima superiores (0,25-1,5  $\mu\text{M}$ ), así como una concentración de [ $^{14}\text{C}$ ]-L-serina de 120  $\mu\text{M}$ .

### 2.6.2.-Ensayos de la actividad de edición *post-transfer*

Los ensayos para medir la actividad de edición *post-transfer*, o ensayos de desacilación, son ensayos donde la enzima se incuba con el tRNA cargado con el aminoácido ilegítimo, marcado radioactivamente ([ $^{14}\text{C}$ ]-Ser-tRNA<sup>Thr</sup>). Durante el ensayo se monitoriza la destrucción del enlace entre el tRNA y el aminoácido, de donde se deduce la actividad de edición.

Para producir el Ser-tRNA<sup>Thr</sup>, se realizó un ensayo de aminoacilación similar al descrito en el apartado 2.6.1.1, con algunas modificaciones, adaptado del descrito por S. Martinis (Splan *et al.*, 2008b). El volumen de ensayo se incrementó a 200  $\mu\text{L}$ , la concentración de tRNA<sup>Thr</sup> a 10  $\mu\text{M}$  y como aminoácido se utilizó [ $^{14}\text{C}$ ]-serina a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . También se añadía a la mezcla de reacción pirofosfatasa de levadura (4 U/mL). La reacción se iniciaba añadiendo 300 nM de la enzima T2- $\Delta\text{N}$ , defectiva en la edición y se incubaba hasta que la reacción llegaba a término a las 2 horas. Transcurrido este tiempo, la reacción se detenía añadiendo 4  $\mu\text{L}$  de ácido acético al 10%. La reacción se sometía a dos extracciones con un volumen de fenol ácido pH 4,5 (*Amresco*) para eliminar la enzima y el tRNA se precipitaba añadiendo 0,1 volúmenes de 7,5 M acetato amónico, pH 5 y tres volúmenes de etanol puro frío y se incubaba 16 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se lavaba el precipitado con etanol al 70%, se secaba y se resuspendía en 50  $\mu\text{L}$  de 50 mM fosfato potásico, pH 5. Una alícuota de 1  $\mu\text{L}$  del tRNA se cuantificaba en el contador de centelleo y la radioactividad se comparaba con la radioactividad específica de la serina para calcular la concentración de tRNA.

Los ensayos de deacilación miden la hidrólisis del Ser-tRNA<sup>Thr</sup> catalizada por los dominios de edición de la enzima. Estos ensayos se basan, al igual que los ensayos de aminoacilación, en la precipitación del aminoacil-tRNA con TCA, aunque lo que se monitoriza es la disminución de la radiactividad precipitable a lo largo del tiempo. Estos ensayos se realizaban en un volumen final de 60  $\mu\text{L}$  que contenía: 150 nM [ $^{14}\text{C}$ ]-Ser-tRNA<sup>Thr</sup>; 150 mM fosfato potásico, pH 7; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 4 U/mL pirofosfatasa; 0,1 mg/mL BSA. Antes de comenzar se tomaba una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  y la reacción se iniciaba añadiendo la enzima a concentración final de 50 nM. Se tomaban alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  a distintos tiempos de ensayo (típicamente 2, 4, 8 y 16 minutos) que se depositaban sobre filtros de 0,11  $\mu\text{m}$  (*Millipore*) previamente sumergidos en ácido tricloroacético al 5% (v/v) y secados. Una vez depositadas las muestras, los filtros se dejaban secar al aire y se lavaban sumergiéndolos en un volumen suficiente de 5% TCA. Los filtros se lavaban tres veces durante cinco minutos con 5% TCA y posteriormente se sumergían brevemente en etanol puro antes de

secarlos bajo una lámpara incandescente. Una vez secos, los filtros se sumergían en 5 ml de líquido de centelleo EcoLite + (MP Biomedicals) y su radiactividad se cuantificaba en un contador de centelleo *Beckman*, modelo *LS 6000 IC*. A fin de monitorizar la desacilación espontánea del tRNA, en los ensayos se incluía asimismo una reacción control sin enzima.

### 2.6.3.- Cálculo de los parámetros de cinética enzimática

Para el cálculo de los parámetros de cinética enzimática ( $K_M$ ,  $V_{max}$  y  $k_{cat}$ ) de las proteínas T1 y T2 se realizaron ensayos de activación del aminoácido mediante la técnica del intercambio ATP-PP<sub>i</sub>. Debido a que el cálculo del parámetro  $k_{cat}$  requiere conocer la concentración real de proteína activa ( $k_{cat} = V_{max} / [E]$ ), antes de realizar los experimentos se procedió a titular los sitios activos de las preparaciones de T1 y T2. La titulación de sitio activo permite conocer con precisión la concentración de centros catalíticamente activos de una preparación de proteína, a diferencia de la cuantificación Bradford, que detecta la cantidad de proteína total, incluyendo proteínas inespecíficas y proteína no activa.

La titulación de sitio activo (Francklyn *et al.*, 2008) se basa en la capacidad de las aaRS de condensar el aminoácido y el ATP para formar el aminoaciladenilato, liberando pirofosfato (PP<sub>i</sub>). El ensayo se fundamenta en la propiedad del carbón activo de unir el ATP pero no el PP<sub>i</sub>. En el ensayo se emplea  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP, lo cual permite monitorizar la destrucción del ATP midiendo el descenso de la radioactividad que queda unida al carbón activo a lo largo del tiempo. Los ensayos no contienen el tRNA sustrato en la mezcla de reacción, por lo que una vez activado el aminoácido no se transfiere al tRNA y la reacción no procede a término. La destrucción de ATP puede correlacionarse con la cantidad de enzima unida a aminoacil-adenilato, y, por tanto, a la cantidad de sitio activo. En un perfil típico (Figura 2.2) pueden observarse varias fases en la cinética de destrucción del ATP: la primera es una fase muy rápida (*initial burst*), que corresponde a la primera ronda de activación del aminoácido y es proporcional a la cantidad de sitio activo, la segunda fase presenta una pendiente mucho menos pronunciada y corresponde a ciclos sucesivos de activación del aminoácido cuya tasa está determinada por la tasa de liberación espontánea del aminoacil-adenilato del sitio activo de la enzima. Por último, se observa una última fase lineal asintótica con el cero que indica el agotamiento del ATP en la reacción. La concentración de sitio activo corresponde a la destrucción de ATP en la primera fase y se calcula mediante la extrapolación de la recta de la segunda fase al eje de ordenadas.

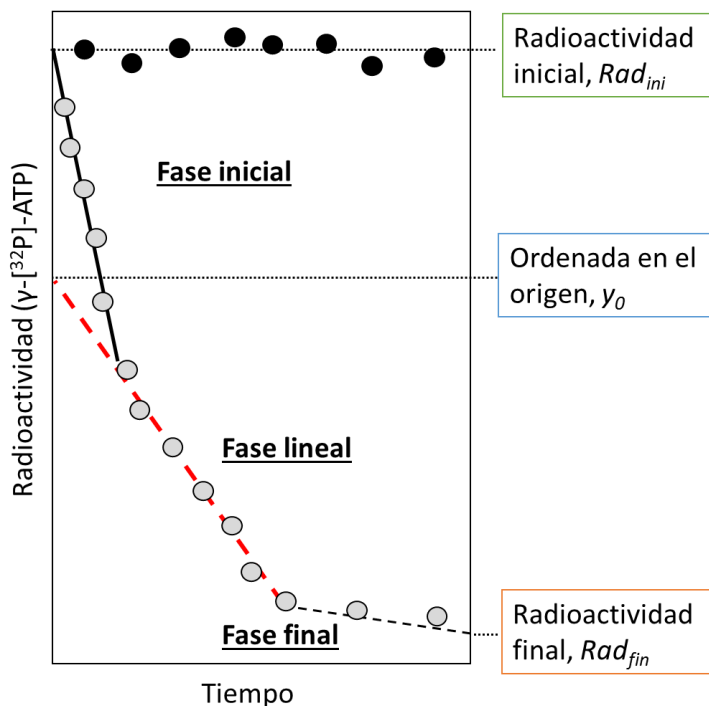
En los experimentos de titulación de sitio activo, se realizaba una reacción por cada una de las preparaciones de enzimas a analizar, más una reacción control que no contenía enzima. La reacción se preparaba en un volumen final de 300  $\mu$ L de una mezcla que contenía 144 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10000 cpm  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP; 10  $\mu$ M ATP frío, 1 mM L-treonina y 0,002 U

pirofosfatasa inorgánica. La mezcla se incubaba a una temperatura de 30°C y con una agitación de 300 rpm en un agitador termostatzado *TermoShacker TS-100C (bioSan)*

La reacción se iniciaba añadiendo la enzima a una concentración de entre 1-2,5 µM (según la cuantificación por el método de Bradford) y se tomaban alícuotas de 20 µL a distintos tiempos de ensayo (típicamente, una por minuto durante los primeros diez minutos, más otras tres a los 15, 20 y 30 minutos). Para detener la reacción, la alícuota se pipeteaba sobre 200 µL de una solución de 7% ácido perclórico (p/v) y 2% carbón activo (p/v) y agitando en el vórtex. Posteriormente, la suspensión de carbón activo se filtraba por un sistema de vacío a través de un filtro de 0,11 µm (Whatman), que se lavaba dos veces con 5 mL de una solución de 3,5% ácido perclórico (p/v) y una vez con 5 mL de etanol absoluto. Los filtros se introducían en tubos de 5 mL, se dejaban secar y se añadía 5 mL de líquido de centelleo.

Cada experimento contenía, asimismo, tres reacciones control que se realizaban en un volumen de 23 µL: una reacción que no contenía enzima ni se filtraba ni lavaba y determinaba la cantidad total de radioactividad por reacción; y dos reacciones a las que se añadía la enzima en exceso (hasta 10 µM) y que se dejaban incubar más tiempo (aproximadamente una hora y media) hasta llegar a término y que se utilizaba para determinar la radioactividad residual.

Como se indica al comienzo de este apartado, los parámetros de cinética enzimática de velocidad máxima y constante de Michaelis-Menten de las enzimas T1 y T2 se calcularon



**Figura 2.2.-Titulación de sitio activo.** Curva de destrucción de ATP en la que se observan las distintas fases de la curva a lo largo del experimento. Para calcular la concentración de sitio activo (en µM) se utiliza la ecuación que aparece en la imagen, donde  $Rad_{ini}$ ,  $Rad_{fin}$  e  $y_0$  se deducen de la gráfica de titulación,  $[ATP]$  es la concentración (en µM) de ATP del ensayo y  $n$  representa el número de sitios catalíticos por molécula de proteína (que suele ser 1).

$$[E_{real}] = \frac{(Rad_{ini} - y_0)}{(Rad_{ini} - Rad_{fin})} \cdot \frac{[ATP]}{n}$$

mediante ensayos de intercambio ATP-PP<sub>i</sub>. Estos ensayos se basan, al igual que la titulación de sitio activo descrita en el epígrafe anterior, en la propiedad del carbón activo de unir ATP, pero no PP<sub>i</sub>. En los ensayos de intercambio no se añade tRNA a la mezcla de reacción y se monitoriza la tasa de activación de aminoácido de manera indirecta a partir de la la tasa de intercambio isotópico del fósforo marcado desde el <sup>32</sup>PP<sub>i</sub> a ATP.

Cada reacción se realizaba en 75 µL de tampón 50 mM HEPES, pH 7,6; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 2,7 µCi [<sup>32</sup>P]-PP<sub>i</sub> y hasta 2 mM con PP<sub>i</sub> frío. Se añadía el aminoácido a una concentración variable entre los 50 µM-1mM y se iniciaba la reacción añadiendo enzima a concentración final 12,5-50 nM. La reacción se incubaba a 30°C con una agitación de 300 rpm en un agitador termostatzado *TermoShacker TS-100C (bioSan)* y a determinados tiempos se tomaban alícuotas de 20 µL y se pipeteaban sobre 200 µL de una solución de 100 mM pirofosfato sódico; 3,5% ácido perclórico (p/v) y 2% carbón activo (p/v) y agitando en el vórtex. Posteriormente, la suspensión de carbón activo se filtraba por un sistema de vacío a través de un filtro de 0,11 µm (Whatman), que se lavaba dos veces con 5 mL de una solución de 3,5% ácido perclórico (p/v) y una vez con 5 mL de etanol absoluto. Los filtros se introducían en tubos de 5 mL, se dejaban secar y se les añadía 5 mL de líquido de centelleo *EcoLite+ (MP Biomedicals)*.

Cada experimento contenía, asimismo, cuatro reacciones de 23 µL a los que no se añadía enzima y que funcionaban como controles: el control *washed* se procesaba como los demás, y determinaba la radiactividad residual que se unía al carbón activo y que era sustraído de los valores de DPM de todas las muestras, y el control *unwashed*, que se contaba directamente sin los pasos de lavado y se utilizaba para calcular la radioactividad específica. Cada reacción se repitió por triplicado.

### 2.6.3.1- Cálculo de la concentración citoplasmática de aminoácidos

La determinación de la concentración celular de aminoácidos se realizó mediante derivatización química (Burnat *et al.*, 2014). Cultivos de 50 mL se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 1 mL de 0,1N de HCl. Tras una hora de incubación en hielo, se centrifugaba 10 minutos a 12000 *g* y se transferían 60 µL del sobrenadante a un tubo nuevo, donde se derivatizaban los aminoácidos mezclándolos con un volumen de etanol:agua:trietanolaminda:fenilisotiocianato en proporción 7:1:1:1. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se secaba en una corriente de N<sub>2</sub> y el pellet se resuspendía en 60 µL de 4 mM fosfato sódico, pH 7,4; 2% acetonitrilo (v/v). La mezcla se resolvía mediante HPLC en fase reversa en una columna LiChrospher 100 RP-18 (4 mm x 125 mm) (*Merck*) utilizando un aparato Elite LaChrom (Hitachi). La cromatografía se realizó a 46°C, utilizando un flujo de 1,5 mL/min de un tampón 70 mM fosfato sódico con un gradiente progresivo desde 2% acetonitrilo

(v/v) a 50% (v/v). Como patrón interno de aminoácidos se utilizó AA-S-18 (Sigma). Para el cálculo del volumen celular se asumió un volumen citoplasmático de 125  $\mu$ L por mg de clorofila (Montesinos *et al.*, 1998).

## **2.7.-Análisis bioinformático**

La secuencia del genoma completo de *Anabaena* (Kaneko *et al.*, 2001) se encuentra en la base de datos *Cyanobase* (<http://bacteria.kazusa.org.jp/cyanobase/>), que se utilizó para consultar la secuencia de las ORF y de las regiones promotoras. Para el manejo rutinario de secuencias de DNA (búsqueda de pautas de lectura abiertas, localización de sitios de restricción, la traducción de secuencias nucleotídicas a secuencias aminoácidas, etc...) se utilizaba el programa *DNA Strider* diseñado por C. Mark (*Service de Biochimie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, Francia*).

Para la búsqueda de posibles dianas de unión de Zur se utilizó el software Genolist Web del Instituto Pasteur (<http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList.woa/>) utilizando como secuencia patrón la secuencia de unión de Zur del gen *all4725*, permitiéndose un máximo de dos cambios respecto a la secuencia patrón y se acotó la búsqueda a regiones comprendidas entre las posiciones -400 y +30 respecto al punto de inicio de la traducción de la ORF más cercana.

Para el diseño de cebadores para las reacciones de PCR se utilizó la herramienta de diseño *Oligo Evaluator* (<http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/biology/oligo-evaluator.html>), del *Web Toolbox (Sigma)*, mientras que para el diseño de los cebadores utilizados en los experimentos de Q-PCR se utilizó el software *GenScript Real-Time PCR Primer Design* (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>).

Para el alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoácidas se empleó el programa CLUSTALW2 (Chenna *et al.*, 2003) proporcionado por el *European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)*. Para el alineamiento de secuencias y deducción de sitio consenso del sitio de unión de Zur se utilizó el software *WebLogo 3* (<http://weblogo.threeplusone.com/>).

Para la visualización de la estructura tridimensional de las proteínas se utilizó el software *PyMol*. Para la representación gráfica de los resultados (así como los cálculos de los valores de cinética enzimática) se utilizó el *software Prism 6* (<http://graphpad.com>)

Los genomas con genes de aaRSs duplicadas se obtuvieron interrogando la base de datos del JGI (<https://img.jgi.doe.gov/>) (a 5 de Julio de 2015).

Para la elaboración del árbol filogenético de las treonil-tRNA sintetasas, se utilizó la secuencia de la ThrRS de *Anabaena* PCC7120 (gi 637230694) como patrón en una búsqueda DELTA-BLAST (Ochoa de Alda *et al.*, 2014), obteniéndose un total de 9629 secuencias de ThrRS.

Estas secuencias se alinearon utilizando MAFFT (Katoh & Standley, 2014) y se utilizó el software JalView (Waterhouse *et al.*, 2009) para eliminar las secuencias incompletas o redundantes. Se realizó un alineamiento múltiple utilizando condiciones astringentes que arrojó un total de 2654 secuencias, que se usaron para elaborar el árbol filogenético utilizando el software RAxML (Stamatakis, 2014).



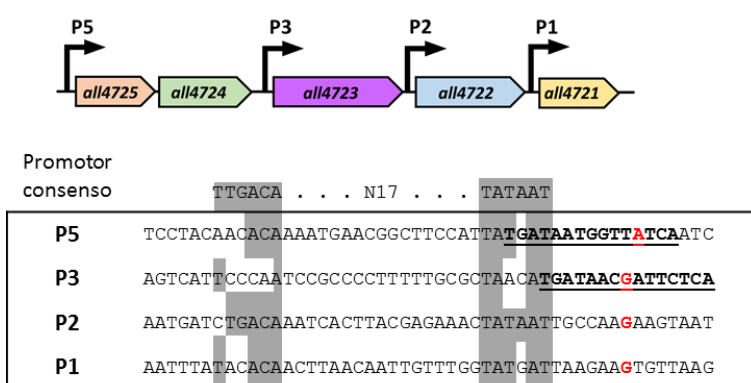




# **3** RESULTADOS

### 3.1.- Identificación del regulador del operón *all4725-all4721*

Estudios previos del grupo (Napolitano *et al.*, 2012, 2013) habían contribuido a la caracterización de un operón de *Anabaena* compuesto por los genes *all4725-all4721*. El operón comprende cinco genes entre los que se encuentra el gen *all4723* que codifica una treonil-tRNA sintetasa. Los niveles de expresión del operón son prácticamente indetectables en condiciones estándar de cultivo y solo se observan niveles elevados de expresión tras la adición al cultivo de TPEN, un quelante de iones divalentes, a concentraciones superiores a 5-10  $\mu\text{M}$  (Napolitano *et al.*, 2012). En ensayos de Northern la transcripción del operón se detecta como una señal en forma de barrido que es compatible con su expresión en un transcrito policistrónico inestable. Se han identificado cuatro promotores en el operón, de los cuales uno se sitúa inmediatamente aguas arriba del primer gen del operón y otros tres promotores son promotores internos cuya localización se muestra en la Figura 3.1.A (Napolitano *et al.*, 2013).



**Figura 3.1.- El operón *all4725-all4721* de *Anabaena*.** Representación gráfica del operón en la que se muestra la localización de los promotores (parte superior). Alineamiento de las secuencias de los promotores del operón con la secuencia del promotor consenso de la RNA polimerasa con el factor  $\sigma^{70}$ . Se muestran sombreados los nucleótidos conservados y en color rojo el sitio de inicio de la transcripción. En las secuencias de P5 y P3, las regiones subrayadas corresponden a las secuencias palindrómicas propuestas como dianas de regulación (inferior).

Un análisis de la secuencia de las regiones promotoras reveló un alto grado de similitud con el promotor consenso de la RNA polimerasa con el factor  $\sigma^{70}$ , por lo que cabría esperar un alto nivel de expresión en condiciones estándar de cultivo. Además, en el caso de las regiones promotoras de *all4725* y *all4723* se observó una secuencia

palindrómica de tipo 7-1-7 que podría funcionar como la secuencia diana de un regulador. (Figura 3.1.B)

Las secuencias palindrómicas en torno a la caja -10 de los promotores P5 y P3 muestran una alta similitud con las dianas de unión de proteínas de la familia FUR descritas en otras bacterias (Figura 3.2) (Gaballa & Helmann, 1998; Lee & Helmann, 2007; Lucarelli *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2011). Los reguladores de la familia FUR responden generalmente a la concentración de un metal y funcionan como represores de la transcripción uniéndose a las regiones promotoras de los genes que controlan. La similitud de las secuencias palindrómicas observadas en los promotores P5 y P3 con las secuencias de unión de proteínas de la familia FUR sugería que el control de la expresión de estos promotores podría llevarlo a cabo alguna proteína de dicha

Organismo	Secuencia
<i>Anabaena Pall4725</i>	-----TGATAATGGTTATCA--
<i>Anabaena Pall4723</i>	-----TGATAACGATTCTCA--
<i>E. coli</i>	GATAATGATAATCATTATC---
<i>B. subtilis</i>	---AATCATAATNATTATCATT
<i>S. aureus</i>	GATAATGATTATCATTATC---
<i>V. colerae</i>	GATAATGATAATNATTATC---
<i>Y. pestis</i>	---AATGATAATNATTATCATT
	**** * ** **

Figura 3.2.-Alineamiento de secuencias de unión de Fur descritas en otros organismos y las regiones promotoras P5 y P3.

FurB una función protectora contra el estrés oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2007, 2009).

Se utilizaron tres estirpes de *E. coli* disponibles en la colección de nuestro laboratorio derivadas de BL21(DE3), portadoras de los plásmidos pCJS18, pCJS19 y pCJS20 que expresan respectivamente las proteínas FurA, FurB y FurC fusionadas a una etiqueta StrepTag-II en posición N-terminal. Se indujo la expresión de estas proteínas en cultivos incubados a 37°C como se detalla en el apartado 2.4.1. y se observó que si bien las proteínas FurB y FurC se encontraban en buena parte en la fracción soluble, FurA precipitaba junto con otros elementos celulares insolubles. Estos resultados nos llevaron a modificar el protocolo incrementando el volumen de cultivo, bajando la temperatura de incubación a 16°C y extendiendo a 16 horas el tiempo de cultivo tras la inducción. Con estas modificaciones aumentó la cantidad de FurA en la fracción soluble de los extractos, lo que nos permitió purificar esta proteína, al igual que FurB y FurC, mediante cromatografía de afinidad en columnas de estreptavidina, en cantidad suficiente para realizar los experimentos posteriores.

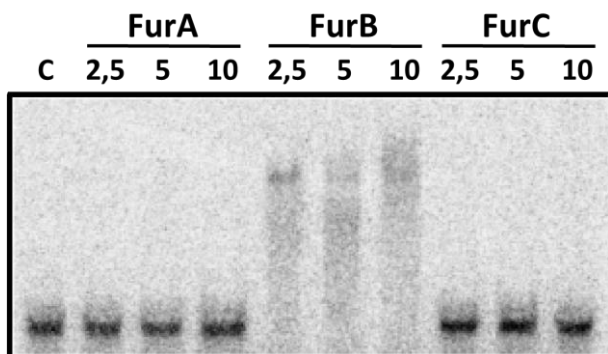


Figura 3.3.-Unión de las proteínas de la familia FUR a la región promotora de *all4725* (P5). La figura muestra un experimento EMSA con las proteínas FurA, FurB y FurC utilizando 20 femtomoles de un fragmento que contiene la región promotora de *all4725* marcado con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP. Sobre cada calle se indica la cantidad (en picomoles) de proteína añadida al ensayo de 15  $\mu$ L. "C" indica el control negativo, donde no se añadía proteína.

familia. En el genoma de *Anabaena* existen tres genes que cifran proteínas de la familia FUR: *all1691* (anotado como *furA*), *all2473* (*furB*) y *alr0957* (*furC*). La proteína FurA ha sido descrita como un regulador de la homeostasis del hierro en *Anabena* (Hernández *et al.*, 2004), pero la función de FurB y FurC no se había caracterizado en profundidad, si bien se había propuesto para

Para determinar cuál de las tres proteínas FUR de *Anabaena* podría ser el regulador del operón se realizaron experimentos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) usando un fragmento marcado de 255 pb correspondiente a la región promotora de *all4725* que contenía la región palindrómica mencionada anteriormente. Como se observa en la Figura 3.3, de las tres proteínas ensayadas, solamente *all2473* (FurB) provocaba un retraso en la

migración del fragmento de DNA. Estos resultados nos permitieron proponer a FurB como el regulador que controla la expresión del promotor P5.

Estudios realizados por otros miembros de nuestro grupo lograron demostrar que FurB se unía específicamente también al promotor P3 y que la unión a ambos respondía específicamente a la concentración de zinc, lo que permitió identificar a FurB como el regulador Zur de *Anabaena*

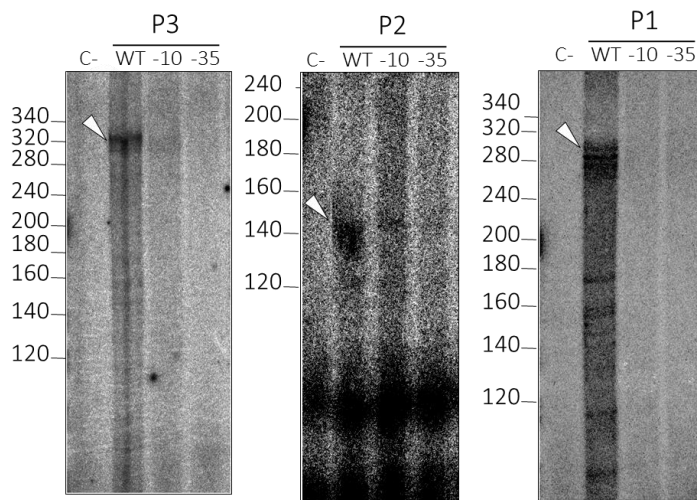
### 3.2.- Regulación de los promotores internos del operón *all4725-all4721*

Una vez identificado el regulador que se unía a la región líder de *all4725*, se decidió comprobar si estaba también implicado en la regulación del resto de los promotores del operón. Para ello se construyeron plásmidos (pCMA9, pCMA10, pCMA11 y pCMA13) que contenían fragmentos de DNA correspondientes a las regiones promotoras P1, P2, P3 y P5, respectivamente. Estos plásmidos se utilizaron como molde para amplificar por PCR versiones mutantes de los promotores en las que las regiones correspondientes a las cajas -10 y -35 se modificaron mediante un procedimiento de PCR que se describe en el apartado 2.2.5.2.

La versión silvestre de los promotores P5, P3, P2 y P1 y los productos de amplificación que contenían las versiones mutantes se utilizaron como sustrato para experimentos de transcripción *in vitro* (IVT) usando preparaciones de RNA polimerasa vegetativa de *Anabaena* (portadora del factor  $\sigma^{70}$ ) reconstituida a partir de subunidades recombinantes purificadas (generosamente

proporcionada por el grupo de la Dra. Antonia Herrero). Estos experimentos se realizaron con un doble objetivo: en primer lugar corroborar la existencia de los promotores internos del operón y en segundo lugar poner a punto un ensayo *in vitro* que nos permitiera analizar la posible acción de Zur sobre la transcripción de los promotores internos del operón.

Como se muestra en la Figura 3.4, se observó transcripción *in vitro* a partir de los promotores P3, P2 y P1, que

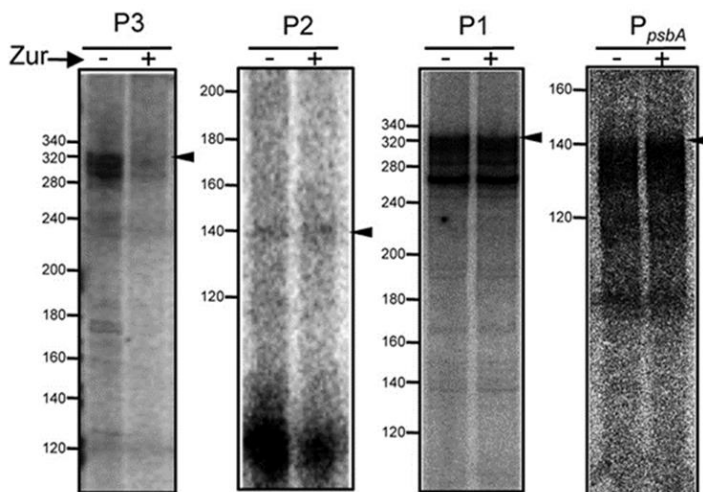


**Figura 3.4.-Análisis de los promotores del operón *all4725-all4721*.** Los paneles muestran experimentos de IVT en los que se utilizaron fragmentos de DNA que contienen las secuencias de los promotores P3, P2 y P1. En cada experimento se utilizaron como molde tres versiones distintas del promotor: la versión silvestre (que se indica como "WT" sobre cada panel) o versiones mutadas (señaladas sobre cada panel como "-10" o "-35") en las que la secuencia de la caja -10 se había sustituido por CCTGAG o la de la caja -35 por GCGCGC, respectivamente. En los ensayos, 50 femtomoles de DNA se incubaron con la RNA polimerasa de *Anabaena* a concentración 150 nM en presencia de NTPS y [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-CTP en un volumen final de 15  $\mu$ L. Se incluye además un control negativo (C-) utilizando como molde los fragmentos silvestres pero sin añadir la enzima. Se señalan con flechas los tamaños esperados de los transcritos.

daban bandas del tamaño esperado. Además, en los tres casos se observaba que el transcrito no se producía al utilizar como molde los fragmentos que contenían versiones mutadas en las cajas -10 y -35. Estos resultados nos permiten concluir que P1, P2 y P3 son genuinamente regiones promotoras. Cabe destacar que no se observó transcrito alguno cuando se utilizó la región de P5, lo cual podría indicar la existencia de algún otro elemento necesario para el inicio de la transcripción que no se hallaba presente en la mezcla de reacción. Por otra parte, estos resultados indican que el ensayo de IVT puede ser adecuado para estudiar el posible papel de Zur sobre estos promotores.

Para analizar el posible papel del regulador Zur en la transcripción desde estos promotores se realizaron ensayos de IVT con las regiones promotoras P3, P2 y P1 en las que el fragmento de DNA se incubaba con la proteína Zur antes de proceder a la adición de la RNA polimerasa. En caso de funcionar Zur como represor, la unión a su diana obstaculizaría la interacción de la RNA polimerasa con el promotor, disminuyendo o eliminando la producción de transcrito en ensayos *in vitro* (Teixidó *et al.*, 2011). Se observó que la adición de Zur impedía la producción del transcrito al utilizar como molde la región del P3, pero no se observaba ningún efecto sobre el transcrito de los promotores P2 y P1 (Figura 3.5). Como control negativo se utilizó un fragmento que contenía la región promotora del gen *psbA* cuyo transcrito no se veía afectado por la adición de Zur al ensayo.

Estos resultados, junto con los experimentos del apartado anterior, permiten establecer la



**Figura 3.5.-Impacto de Zur en la transcripción de los promotores del operón.** 25 femtomoles de fragmentos de DNA que contenían las secuencias de los promotores P3, P2 y P1 se incubaron con RNA polimerasa de *Anabaena* a concentración 150 nM, NTPs y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP en presencia (+) o ausencia (-) de 5 picomoles de proteína Zur purificada en un volumen final de 15  $\mu$ L. Se señalan con flechas los tamaños esperados del transcrito. Se incluyó también un fragmento del promotor del gen *psbA* como control de promotor no regulado por Zur.

implicación de la proteína Zur en la regulación de la transcripción de los promotores P5 y P3 y la independencia de los promotores P2 y P1 respecto a este regulador. Ello sugiere a su vez la existencia de otro(s) regulador(es) desconocidos que controlan la expresión de estos últimos promotores.



### 3.3.- Búsqueda bioinformática de posibles sitios de unión de Zur

Una vez determinado que las regiones palindrómicas presentes en las regiones promotoras de P5 y P3 del operón funcionaban como dianas de Zur, se decidió abordar la identificación de genes del regulón Zur en el genoma de *Anabaena*, es decir, el conjunto de genes que se encuentran bajo la acción de este regulador. Hasta el momento, el regulón Zur no se había caracterizado en ninguna cianobacteria. Para identificar genes potencialmente regulados por Zur, se efectuó una búsqueda mediante procedimientos bioinformáticos de regiones promotoras que contuviesen una secuencia similar a la secuencia palindrómica TGATAATGGTTATCA del promotor de *all4725* utilizando el software Genolist Web del Instituto Pasteur (<http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList.woa/>). Con el objetivo de reducir al máximo los posibles falsos positivos, se utilizaron condiciones muy restrictivas en los parámetros de búsqueda: se permitió un máximo de dos cambios respecto a la secuencia patrón y se acotó la búsqueda a regiones comprendidas entre las posiciones -400 y +30 respecto al punto de inicio de la traducción de la ORF más cercana.

La búsqueda dio como resultado 33 posibles sitios de unión de Zur. Las ORFs cercanas se seleccionaron como genes potencialmente regulados por Zur. En los casos en los que la posible diana se encontraba entre dos ORFs divergentes, ambos genes se seleccionaron. Además, se incluyó en la lista de candidatos los genes *aztA*, *aztR*, *znuA* y *bmtA* que, si bien no se detectaron en nuestra búsqueda, se habían descrito como genes relacionados con la homeostasis de zinc en cianobacterias (Blindauer, 2008; Barnett *et al.*, 2012) (Tabla 3.1).

### 3.4.-Análisis de la expresión de genes potencialmente regulados por Zur mediante PCR cuantitativa.

De forma similar a los estudios realizados en otros organismos, se comprobó la posible implicación de Zur en la regulación de los 38 genes candidatos mediante el análisis de su expresión usando la técnica de PCR cuantitativa (apartado 2.3.5) (Schröder *et al.*, 2010; Pawlik *et al.*, 2012). Como molde se utilizó cDNA generado a partir de RNA de la estirpe silvestre de *Anabaena* y de un mutante disponible en el laboratorio en el que la ORF del gen *zur* (*all2473*) se había sustituido por una cassette (C.S3) de resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina (en adelante, se hará referencia a esta estirpe como  $\Delta zur$ ). En caso de estar reprimidos por Zur, los genes analizados deberían mostrar un mayor nivel de expresión en el mutante  $\Delta zur$ . Cada reacción de PCR se realizó por triplicado y se utilizó el gen *rnpB* como gen normalizador. El experimento fue repetido tres veces a partir de RNA de cultivos independientes.

Para la comparación relativa de los niveles de expresión de un mismo gen entre las dos estirpes analizadas, se utilizó el parámetro *nivel de inducción* (Livak & Schmittgen, 2001) calculado

Gen	Producto
alr0223	NdhA, NADH dehydrogenase subunit 1
all0232	hypothetical protein
alr1197	CobW-C superfamily
all1474	CRISPR-associated RAMP protein
all1640	two-component response regulator
all1751	putative metallochaperone
all1752	hypothetical protein
asl1789	unknown protein
alr1790	unknown protein
alr2726	two-component response regulator
alr2831	probable NAD(P)-dependent oxidoreductase
alr2866	glycosyl transferase
all3016	hypothetical protein
alr3017	hypothetical protein
alr3086	gluconokinase
alr3240	ferrichrome ABC transporter, permease protein
alr3242	heme transport protein
alr3388	hypothetical protein
all3465	unknown protein
alr3495	hypothetical protein
alr3496	unknown protein
all3515	putative outer membrane protein
all3650	hypothetical protein
alr4028/4029	similar to vitamin B12 transport protein
all4723	threonyl-tRNA synthetase
all4725	HemE, porphobilinogen synthase
all5003	peptide ABC transporter, permease protein
asl5064	unknown protein
alr5065	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase
alr5231	unknown protein
all7021	unknown protein
all7109	hypothetical protein
alr7190	WD-repeat protein
all7226	unknown protein
bmtA	metallothionein
all0833/znuA	ZnuA, periplasmic solute binding protein
alr7622/aztA	zinc-specific exporter AztA
all7621/aztR	ArsR/SmtB-family transcriptional regulator

de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Nivel de inducción} = 2^{\frac{\Delta Ct(\Delta zur) - \Delta Ct(WT)}{1}}$$

Para determinar si un gen concreto se encontraba bajo la regulación de Zur, se adoptó como criterio arbitrario un valor en el nivel de inducción superior a 2 (esto es, que los niveles de expresión en el mutante  $\Delta zur$  fuesen, al menos, el doble que en silvestre).

De los genes analizados, se encontraron 11 que cumplían esta condición (Tabla 3.2), aunque se observaban amplias diferencias en cuanto al nivel de inducción de los distintos genes, de modo que algunos presentaban niveles de inducción en torno a 2 y otros en torno a 300. Los 27 genes restantes presentaban unos niveles de inducción nulos o inferiores a 2 y se consideraron como no regulados por Zur. Es importante destacar que en ningún caso se detectó una disminución de los niveles de expresión en el mutante respecto al silvestre.

R

**Tabla 3.1.-Genes analizados mediante Q-PCR.** Lista de los genes de *Anabaena* que contienen una posible diana de Zur entre las posiciones -400 y +30 respecto al sitio de inicio de la traducción. En la columna contigua al nombre del gen aparece el posible producto de éste de acuerdo a su anotación en la base de datos Cyanobase del Kazusa DNA Research Institute (<http://genome.microbedb.jp/CyanoBase>)

### 3.5.-Análisis de la regulación de genes adyacentes.

Dos de los genes regulados por Zur (*all4725* y *all4723*) se encontraban formando parte del operón *all4725-all4721* mencionado anteriormente, sugiriendo que otros genes situados en dicho operón podrían estar igualmente regulados por Zur, lo que fue demostrado experimentalmente otros miembros del grupo (Napolitano *et al.*, 2013). Se analizó el contexto genómico de los otros genes regulados por Zur identificados en el análisis anterior y se detectó la presencia de ORFs adyacentes y con la misma orientación a cinco de ellos, separadas por distancias intergénicas cortas, lo que planteaba la posibilidad de que se cotranscribiesen. Los genes seleccionados se analizaron mediante Q-PCR como se ha descrito en el apartado anterior, lo que permitió la identificación de seis nuevos genes cuyo nivel de inducción es superior a 2 y que por tanto están desreprimidos en el mutante  $\Delta$ *zur*. Estos resultados nos permiten definir la existencia de 6 posibles operones cuya expresión está controlada por Zur. En resumen, nuestros análisis han identificado 23 genes regulados por Zur, 18 organizados en 6 operones y otros 5 en unidades transcripcionales individuales. (Figura 3.6 y Tabla 3.3).

R

Gen	Réplicas			Media	Desv. Est.
<i>alr1197</i>	10,48	5,28	21,86	<b>12,54</b>	6,92
<i>all1474</i>	2,64	2,55	1,21	<b>2,13</b>	0,65
<i>all1751</i>	4,38	2,16	2,66	<b>3,06</b>	0,95
<i>alr2866</i>	1,91	6,28	1	<b>3,06</b>	2,3
<i>alr3242</i>	109,14	84,45	159,33	<b>117,64</b>	31,16
<i>alr3495</i>	4,66	2,46	1,19	<b>2,77</b>	1,43
<i>all3515</i>	265,03	306,55	216,47	<b>262,68</b>	36,82
<i>alr4028/4029</i>	15,03	10,59	5,44	<b>10,35</b>	3,92
<i>all4723</i>	31,34	16,56	54,49	<b>34,13</b>	15,61
<i>all4725</i>	261,38	144,01	71,51	<b>158,96</b>	78,23
<i>all0833/znuA</i>	48,84	62,68	41,46	<b>50,99</b>	8,8
<i>all7621/aztR</i>	3,78	2,25	2,95	<b>2,99</b>	0,63

**Tabla 3.2.-Análisis de la expresión de genes potencialmente regulados por Zur.** En la tabla se muestran los valores del parámetro *nivel de inducción* de los genes que se indican en la columna de la izquierda. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes, su la media y desviación estándar. De los genes analizados sólo se muestran aquellos con un nivel de inducción  $\geq 2$ .



Operón	Gen	Descripción	Nivel de inducción
<b>Operón 1</b> 	<i>alr1194</i> <i>alr1195</i> <i>alr1196</i>	<i>Two component regulator winged helix</i> <i>HP 90 Aas</i> <i>MscS mechanosensitive channel COG3264</i>	
	<i>alr1197</i> <i>alr1198</i> <i>alr1199</i>	<i>Putative metallochaperone COG0523</i> <i>Metallophosphoesterase COG0622</i> <i>Metallo-dependent phosphatase</i>	12,5±6,9 14,6±4,2 6,2±4,5
<b>Operón 2</b> 	<i>all1751</i> <i>all1750</i>	<i>Putative metallochaperone COG0523</i> <i>WD40 repeat-containing protein</i>	2,9±0,4 3,1±1,0
	<i>asl1749</i> <i>all1748</i> <i>all1747</i>	<i>HP 90 Aas</i> <i>Periplasmic protein of ABC-type transporter</i> <i>HP 116 Aas</i>	
<b>Operón 3</b> 	<i>alr3240</i> <i>alr3241</i>	<i>ABC-transporter, permease protein COG0609</i> <i>ABC-transporter, ATP binding protein COG1120</i>	
	<i>alr3242</i> <i>alr3243</i>	<i>TonB-dependent receptor (outer membrane)</i> <i>ABC transporter, periplasmic-binding protein</i>	117,6±31,2 16,96±17,6
<b>Operón 4</b> 	<i>alr_R0066</i> <i>alr4027</i>	<i>Cobalamin riboswitch</i> <i>Predicted metal binding protein COG5469</i> <i>(thioredoxin fold)</i>	
	<i>alr4028-29</i> <i>alr4030</i> <i>alr4031</i>	<i>TonB-dependent receptor (outer membrane)</i> <i>Putative ferredoxin (thioredoxin fold) COG 3411</i> <i>ABC transporter, periplasmic-binding protein COG0614</i>	10,4±3,9 7,2±0,4 9,0±0,6
	<i>alr4032</i> <i>alr4033</i>	<i>ABC-transporter, permease protein COG0609</i> <i>ABC-transporter, ATP binding protein COG1120</i>	
<b>Operón 5</b> 	<i>all0833</i> <i>all0832</i>	<i>Periplasmic solute binding protein (ZnuA)</i> <i>ABC-transporter, ATP binding protein (ZnuB)</i>	51,0±8,8 45,8±17,3
	<i>alr0831</i>	<i>ArsR/SmtB regulator</i>	
	<i>all0830</i>	<i>ABC-transporter, permease protein (ZnuC)</i>	5,3±1,9
<b>Operón 6</b> 	<i>all4725</i> <i>all4724</i> <i>all4723</i> <i>all4722</i> <i>all4721</i>	<i>Phorphobilinogen synthase</i> <i>Putative FAD-dependent oxidoreductase</i> <i>Threonyl-tRNA synthetase</i> <i>P-loop GTPase (COG0523 family)</i> <i>GTP-cyclohidrolase</i>	158,96±15,61 <i>inducido*</i> 34,13±15,61 <i>inducido*</i> <i>inducido*</i>
<b>Unidades transcripcionales simples</b>	<i>all1474</i> <i>alr2866</i> <i>alr3495</i> <i>all3515</i> <i>all7261</i>	<i>Putative phosphatase</i> <i>Glycosyltransferase</i> <i>Hypothetical protein</i> <i>Unknown protein</i> <i>ArsR/SmtB-family transcriptional regulator</i>	2,13±0,65 3,06±2,3 2,77±1,43 262,68±36,83 2,99±0,63

**Figura 3.6.-El regulón Zur.** En la parte izquierda de la imagen aparece el contexto genómico de los genes directamente regulados por Zur identificados en el apartado 3.4. Las flechas indican los sitios de unión de Zur y aparecen en color los genes inducidos en el mutante  $\Delta zur$ . A la derecha de la imagen aparecen los nombres de los genes y el nivel de inducción. Los genes inducidos aparecen sombreados en azul. En la parte inferior aparecen los genes que se expresan como unidades transcripcionales simples. Marcados con asterisco se encuentran los genes del operon *all4725-all4721* cuya co-transcripción con los genes *all4725* y *all4723* había sido previamente descrita por nuestro laboratorio (Napolitano *et al.*, 2013) y que no se han incluido en este análisis.

GEN	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	MEDIA	DESV. ESTAN.
<i>alr0223</i>	1,84	1,00	0,70	<b>1,18</b>	0,48
<i>all0232</i>	1,18	0,87	1,32	<b>1,12</b>	0,19
<i>alr1197</i>	10,48	5,28	21,86	<b>12,54</b>	6,92
<i>alr1198</i>	13,59	10,02	20,11	<b>14,58</b>	4,18
<i>alr1199</i>	1,99	4,16	12,38	<b>6,18</b>	4,47
<i>all1474</i>	2,64	2,55	1,21	<b>2,13</b>	0,65
<i>all1640</i>	0,89	0,98	0,57	<b>0,81</b>	0,18
<i>all1748</i>	1,04	1,57	1,11	<b>1,24</b>	0,24
<i>asl1749</i>	1,56	1,23	0,77	<b>1,19</b>	0,32
<i>all1750</i>	3,23	3,14	2,29	<b>2,88</b>	0,42
<i>all1751</i>	4,38	2,16	2,66	<b>3,06</b>	0,95
<i>all1752</i>	1,64	0,65	1,19	<b>1,16</b>	0,40
<i>asl1789</i>	1,14	1,16	0,93	<b>1,08</b>	0,10
<i>alr1790</i>	1,12	0,56	0,72	<b>0,80</b>	0,24
<i>alr2726</i>	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>alr2831</i>	1,91	0,70	1,11	<b>1,24</b>	0,50
<i>alr2866</i>	1,91	6,28	1,00	<b>3,06</b>	2,30
<i>all3016</i>	2,28	1,17	0,95	<b>1,47</b>	0,58
<i>alr3017</i>	1,45	2,36	1,36	<b>1,72</b>	0,45
<i>alr3086</i>	1,53	0,75	0,82	<b>1,03</b>	0,35
<i>alr3240</i>	2,27	1,20	0,84	<b>1,43</b>	0,61
<i>alr3241</i>	1,08	1,02	0,89	<b>1,00</b>	0,08
<i>alr3242</i>	109,14	84,45	159,33	<b>117,64</b>	31,16
<i>alr3243</i>	3,03	6,06	41,79	<b>16,96</b>	17,60
<i>alr3388</i>	0,81	0,82	2,56	<b>1,40</b>	0,82
<i>all3465</i>	1,25	0,29	0,71	<b>0,75</b>	0,39
<i>alr3495</i>	4,66	2,46	1,19	<b>2,77</b>	1,43
<i>alr3496</i>	0,54	3,32	0,50	<b>1,45</b>	1,32
<i>all3515</i>	265,03	306,55	216,47	<b>262,68</b>	36,82
<i>all3650</i>	1,08	1,08	0,83	<b>1,00</b>	0,12
<i>alr4027</i>	1,24	3,38	0,59	<b>1,74</b>	1,19
<i>alr4028/4029</i>	15,03	10,59	5,44	<b>10,35</b>	3,92
<i>alr4030</i>	7,01	7,81	6,80	<b>7,21</b>	0,43
<i>alr4031</i>	8,69	9,75	8,49	<b>8,98</b>	0,55
<i>alr4032</i>	1,25	1,27	1,11	<b>1,21</b>	0,07
<i>alr4033</i>	1,21	1,55	0,71	<b>1,16</b>	0,35
<i>all4723</i>	31,34	16,56	54,49	<b>34,13</b>	15,61
<i>all4725</i>	261,38	144,01	71,51	<b>158,96</b>	78,23
<i>all5003</i>	1,16	0,92	0,61	<b>0,90</b>	0,22
<i>asl5064</i>	0,75	0,81	0,70	<b>0,75</b>	0,05
<i>alr5065</i>	0,86	0,46	0,57	<b>0,63</b>	0,17
<i>alr5231</i>	0,89	0,52	0,76	<b>0,73</b>	0,15
<i>all7021</i>	1,51	1,11	1,70	<b>1,44</b>	0,25
<i>all7109</i>	1,33	0,48	2,50	<b>1,44</b>	0,83
<i>alr7190</i>	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>all7226</i>	2,49	0,63	0,74	<b>1,29</b>	0,85
<i>bmtA</i>	n.d.	n.d.	n.d.		
<i>all0833/znuA</i>	48,84	62,68	41,46	<b>50,99</b>	8,80
<i>all0832/znuB</i>	33,47	33,71	70,28	<b>45,82</b>	17,29
<i>all0830/znuC</i>	3,19	4,82	7,84	<b>5,28</b>	1,92
<i>alr7622/aztA</i>	0,92	0,83	1,30	<b>1,02</b>	0,21
<i>all7621/aztR</i>	3,78	2,25	2,95	<b>2,99</b>	0,63

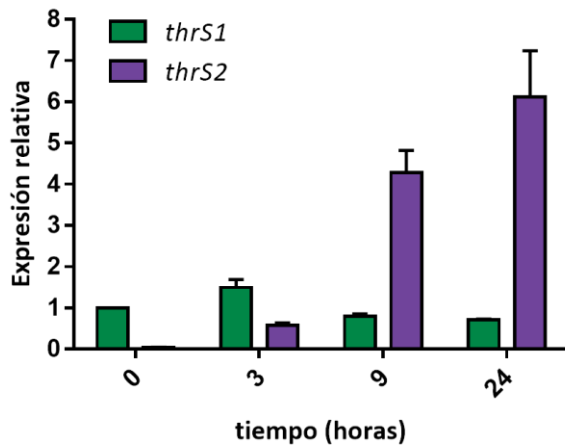
**Tabla 3.3.-Resumen de los genes analizados mediante Q-PCR.** Lista con los niveles de inducción de todos los genes analizados por Q-PCR. En la tabla aparecen los valores de  $2^{\Delta\Delta CT}$  de tres réplicas independientes, así como la media y la desviación estándar. Aparecen sombreados los genes desreprimidos en el mutante *Δzur* indicando con sombreado azul los genes que se expresan como operones.

### 3.6.- Análisis de los niveles de expresión de *thrS1* y *thrS2*

Uno de los genes regulados por Zur detectados en el análisis anterior es *all4723*, una treonil-tRNA sintetasa. *Anabaena* presenta en su genoma dos treonil-tRNA sintetetas, T1 (codificada por la ORF *alr0335*, *thrS1*) y T2 (codificada por la ORF *all4723*, *thrS2*). Ambos genes son funcionales, esto es, ambos cifran proteínas con actividad enzimática, capaces de cargar el tRNA<sup>Thr</sup> con treonina. Sin embargo, ambos genes tienen patrones de expresión muy diferentes. El gen *thrS1* es un gen esencial que se expresa a niveles prácticamente constantes en diversas condiciones de cultivo. Sin embargo, el gen *thrS2* es prescindible y presenta niveles de expresión indetectables en condiciones de cultivo estándar. Como se ha expuesto anteriormente, este gen se localiza en el operón *all4725-all4721* y se encuentra reprimido por el regulador Zur, que sólo permite su expresión en condiciones de deficiencia de zinc. Dada la dificultad para alcanzar condiciones de deficiencia de zinc en cultivos de cianobacterias por la presencia de cantidades traza de dicho metal en los reactivos comerciales (incluso en los de alto grado de pureza), para los experimentos de este trabajo se utilizaron condiciones establecidas previamente en nuestro laboratorio para mimetizar la deficiencia de zinc en el medio natural, consistentes en la adición del quelante de iones divalentes TPEN a cultivos de *Anabaena* a concentración 20 µM. Previamente se había comprobado que en estas condiciones se estimula la expresión de los genes reprimidos por Zur. El análisis mediante *Northern blot* del RNA de cultivos *Anabaena* suplementados con TPEN realizado por otros investigadores de nuestro laboratorio había permitido comprobar que los niveles del mRNA de *thrS2* aumentan considerablemente a partir de las 3 horas de cultivo en presencia del quelante, pasando de ser casi indetectables en su ausencia a producir una señal muy intensa tras 24 horas de cultivo. La señal observada en experimentos de *Northern* corresponde a un barrido y múltiples bandas, algunas de mayor tamaño que el gen *thrS2*, que corresponderían a transcritos policistrónicos del operón *all4725-all4721* (Napolitano *et al.*, 2012, 2013).

Aunque los estudios realizados anteriormente en el laboratorio describían de manera exhaustiva la expresión de *thrS1* y *thrS2*, las técnicas empleadas no permitían una comparación cuantitativa de sus respectivos niveles de expresión. Por ello, se decidió analizar la expresión de estos genes mediante PCR cuantitativa (apartado 2.3.5), que permite una comparación relativa de los niveles de transcrito de ambos genes. Se cultivaron células de *Anabaena* en presencia o ausencia de TPEN a concentración final de 20 µM y se extrajo el RNA total de células recogidas a distintos tiempos durante el experimento, que se utilizó como molde para sintetizar cDNA usando hexanucleótidos de secuencia al azar como cebadores. El cDNA se utilizó para experimentos de Q-PCR con parejas de oligonucleótidos específicos de los genes *thrS1* y *thrS2* (A7120-THRS1-2F/A7120THRS1-2R y A7120-THRS2-2F/A7120-THRS2-3R, respectivamente). Como gen





**Figura 3.7.- Expresión de los genes *thrS1* y *thrS2* durante el crecimiento en presencia de TPEN.** La gráfica muestra el nivel de expresión de los genes *thrS1* (verde) y *thrS2* (morado) en células cultivadas con TPEN durante el tiempo que se indica en el eje de abscisas. "0" corresponde a células sin tratar. El nivel de expresión se calculó utilizando el parámetro  $2^{\Delta CT}$  y los valores obtenidos se normalizaron respecto al nivel de expresión del gen *thrS1* en células sin tratar ("0"), al que se le asignó el valor arbitrario de 1. Las barras de error representan el error promedio estándar de tres réplicas independientes.

normalizador se utilizó el gen *rnpB*.

Como se observa en la Figura 3.7, la expresión del gen *thrS1* permanece relativamente constante a lo largo de todo el tiempo de incubación. Se observa, sin embargo, en los tiempos de incubación más prolongados (9 y 24 horas) una disminución de los niveles del mRNA de en torno al 50%. Los niveles de *thrS2*, por el contrario, experimentan un incremento notable, alcanzando, tras 24 horas de incubación con TPEN, unos niveles 200 veces superiores a los presentes al comienzo del experimento, donde son prácticamente indetectables. Merece la

pena destacar que, tras 24 horas de cultivo con TPEN, los niveles de mRNA de *thrS2* son superiores en un orden de magnitud respecto a los de *thrS1*, por lo que podemos concluir que en condiciones de deficiencia prolongada de zinc, el mRNA de *thrS2* es mayoritario en *Anabaena*.

### 3.7.-Sustitución del gen *thrS1* por *thrS2* en *Anabaena*

Resultados obtenidos al inicio de las investigaciones sobre los genes *thrS1* y *thrS2* en nuestro laboratorio habían demostrado que el *thrS1* era un gen esencial, cuya delección es letal para *Anabaena*, mientras que *thrS2* es un gen prescindible que se puede inactivar por delección o inserción de una cassette de resistencia (Napolitano *et al.*, 2012). Al disponer de información sobre la regulación de ambos genes, resultaba razonable la imposibilidad de eliminar *thrS1* dado que en condiciones normales de cultivo *thrS2* se encuentra reprimido.

Para determinar si *thrS1* y *thrS2* tienen las mismas capacidades funcionales, se ensayó la sustitución de la ORF de *thrS1* por la de *thrS2* basándonos en la propiedad de *Anabaena* de integrar DNA foráneo mediante recombinación homóloga. Para ello se construyó el plásmido pCMA58 que contenía la ORF del gen *thrS2* y la cassette C.S3 (Elhai & Wolk, 1988) de resistencia de estreptomycin y espectinomycin, flanqueadas por 700-800 bp de las regiones inmediatamente aguas arriba y aguas abajo de *thrS1*, de manera que estas regiones puedan funcionar como dianas para la recombinación. Esta construcción se clonó en el vector conjugativo pRL278 que porta un gen de resistencia a neomicina y el gen *sacB*. El plásmido derivado, pCMA59 se transfirió a *Anabaena* mediante conjugación triparental (apartado 2.2.6.2) y se seleccionaron

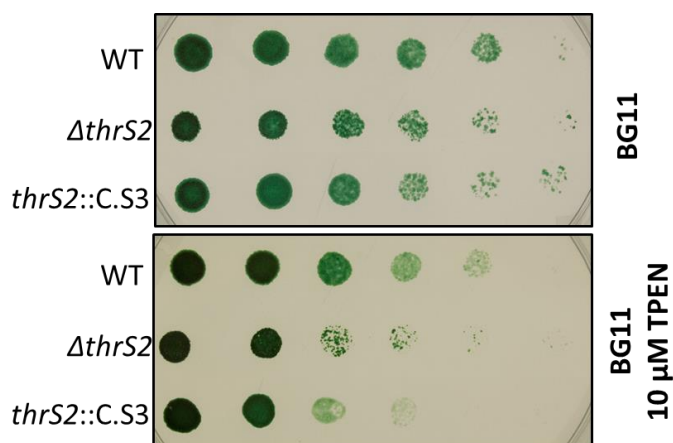
exconjugantes en medio sólido BG11 suplementado con neomicina.

Puesto que *Anabaena* es una cianobacteria filamentosa cuyas células contienen varias copias del cromosoma (Hess, 2011), para inactivar un gen es necesario que todas las células del filamento contengan únicamente cromosomas con alelos mutantes. Con este fin se realizaron ciclos sucesivos de fragmentación de los filamentos por sonicación y posterior selección de los mutantes en medio suplementado con antibióticos estreptomycinina y espectinomycinina, correspondientes al marcador que se quiere integrar, y sacarosa que permite contraseleccionar el gen *sacB* presente en el plásmido, de modo que sólo los dobles recombinantes pueden sobrevivir. Los mutantes segregados deberían mostrar resistencia a estreptomycinina y espectinomycinina, resistencia a sacarosa y sensibilidad a neomicina. Tras analizar de esta manera más de 200 colonias, no se obtuvo ningún clon resistente a sacarosa y sensible a neomicina. Estos resultados sugieren que la sustitución de *thrS1* por *thrS2* produce efectos deletéreos y que las capacidades funcionales de sus productos no son plenamente redundantes.



### 3.8.-Papel de T2 en el crecimiento en condiciones de deficiencia de zinc

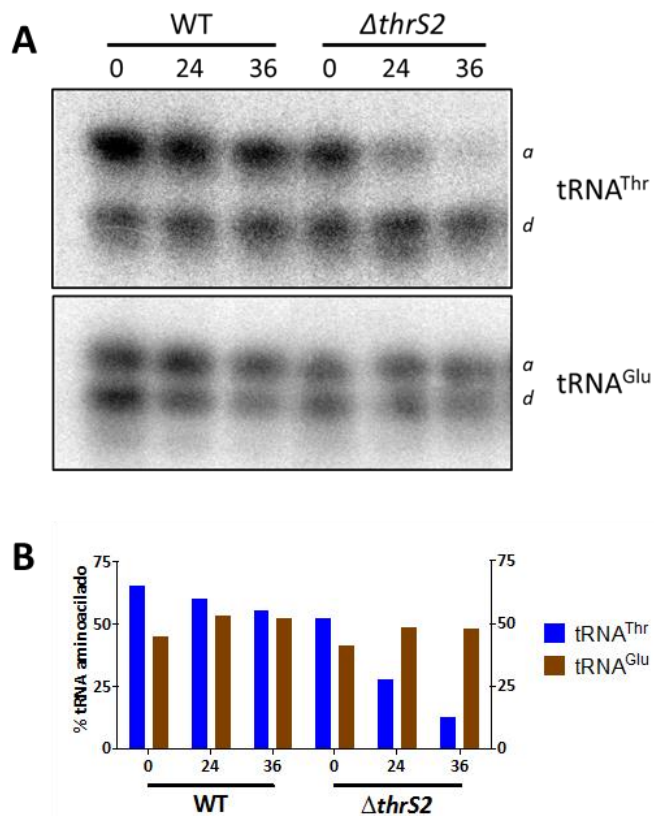
Aunque los resultados de los experimentos de Q-PCR demuestran un alto nivel de expresión de *thrS2* en deficiencia de zinc, su papel en dichas condiciones es desconocido. Para indagar en este aspecto se realizaron ensayos de crecimiento en placa con dos estirpes mutantes del gen *thrS2* de *Anabaena* disponibles en el laboratorio: la estirpe  $\Delta thrS2$ , que porta una delección de dicho gen, y la estirpe MN8 (*thrS2*::C.S3), en la que el gen se encuentra interrumpido por la cassette (C.S3) que confiere a estreptomycinina y espectinomycinina (Napolitano *et al.*, 2012, 2013). Ambas estirpes, junto con la estirpe silvestre de *Anabaena*, se cultivaron en medio líquido BG11 y



**Figura 3.8.- Crecimiento en medio sólido de los mutantes *thrS2*.** Diluciones seriadas de cultivos de la estirpe silvestre de *Anabaena* (WT) y de los mutantes de delección ( $\Delta thrS2$ ) e inserción (*thrS2*::C.S3) de *thrS2*, se sembraron en placas de BG11 y BG11 suplementado con 10  $\mu$ M de TPEN que se incubaron durante 15 días a 30°C bajo iluminación continua.

se sembraron diluciones seriadas en placas de BG11 y en placas de BG11 suplementado con 10  $\mu$ M de TPEN. (Figura 3.8).

Se observó que las tres estirpes ensayadas crecían del mismo modo en placas de BG11 sin embargo, en placas suplementadas con TPEN las estirpes mutantes de *thrS2* mostraban un retraso en el crecimiento respecto al silvestre. Estos resultados sugieren que la



**Figura 3.9.- Efecto de la delección de *thrS2* en la carga del tRNA<sup>Thr</sup>.** (A) Los paneles superiores muestran geles ácidos de poliacrilamida-urea hibridados con las sondas que se indican a la derecha. Cada calle contiene 1 µg de RNA de células de la estirpe silvestre (WT) o el mutante *ΔthrS2* cultivadas en ausencia de TPEN (0) o en presencia de éste a concentración 20 µM durante el tiempo que se indica en la parte superior (en horas). *a* indica la posición de la especie aminoacilada del tRNA, *d* indica la posición de la especie desacilada. (B) Representación gráfica de la cuantificación de los geles. Estos experimentos se repitieron 2 veces con resultados similares.

tRNA<sup>Thr</sup> o tRNA<sup>Glu</sup> marcadas radioactivamente.

En las muestras correspondientes a la estirpe silvestre de *Anabaena* (Figura 3.9.A) se observa que la intensidad de la señal correspondiente al tRNA<sup>Thr</sup> cargado se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo, si bien se aprecia una ligera disminución de la intensidad en la muestra correspondiente a las 48h. Por el contrario, se observa un descenso considerable en la señal de hibridación correspondiente al tRNA<sup>Thr</sup> cargado en el mutante *ΔthrS2* a partir de las 24 horas del comienzo del experimento. Por el contrario, la señal de hibridación correspondiente al tRNA<sup>Glu</sup> permanece constante en ambas estirpes. La radiactividad de las bandas de la Figura 3.9.A se cuantificó y se representa en la Figura 3.9.B como el porcentaje de la banda que corresponde a la forma aminoacilada frente al total de la señal en esa calle. Estos resultados indican que en el mutante el porcentaje de tRNA aminoacilado desciende desde el 50% al inicio del experimento hasta el 10% a las 36 horas de tratamiento, lo que indica que T2 juega un papel importante en la aminoacilación de tRNA<sup>Thr</sup> en condiciones de deficiencia de zinc.

proteína T2 juega un papel importante en el crecimiento en condiciones de deficiencia de zinc.

Con el objetivo de determinar con mayor precisión el papel de *thrS2* en condiciones de deficiencia de zinc se determinó la proporción de tRNA<sup>Thr</sup> cargado mediante la técnica de electroforesis en geles ácidos de poliacrilamida-urea (apartado 2.3.3) (Köhler & RajBhandary, 2008). Dicho procedimiento permite distinguir, en una población heterogénea de tRNAs, las moléculas de tRNA<sup>Thr</sup> aminoaciladas de las que no lo están, basándose en su distinta movilidad electroforética. Para ello se resolvió RNA extraído de cultivos de *Anabaena* y del mutante *ΔthrS2* suplementados o no con 20 µM TPEN en geles de urea-poliacrilamida que se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con sondas específicas de

### **3.9.-Estudio del cofactor metálico de T1 y T2**

Los resultados anteriores sugieren que las enzimas T1 y T2 juegan papeles distintos y que T2 es la enzima preponderante en condiciones de limitación de zinc. Este resultado era inesperado, pues todas las ThrRSs caracterizadas hasta la fecha poseen un átomo de zinc en el sitio activo (Sankaranarayanan *et al.*, 1999; Dock-Bregeon *et al.*, 2000; Torres-Larios *et al.*, 2003; Dwivedi *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2012). Esto además parecía ser un carácter universal, ya que dicho metal se encuentra en ThrRSs de los tres dominios de la vida. En los casos en los que esta enzima se ha caracterizado empíricamente, se ha demostrado que aunque no puede atribuírsele un papel catalítico, el zinc juega un papel esencial en la reacción ya que participa directamente en el reconocimiento del aminoácido sustrato (Sankaranarayanan *et al.*, 1999; Dock-Bregeon *et al.*, 2000). Por ello, resultaba sorprendente la inducción y el funcionamiento de T2 en condiciones de deficiencia de dicho metal. Para entender con mayor profundidad el funcionamiento de T2 en deficiencia de zinc se decidió analizar la naturaleza de su cofactor.

#### **3.9.1.-Análisis de la capacidad de remetalación de T1 y T2**

En primer lugar se decidió probar la hipótesis de que T2 podría unir zinc con mayor afinidad que T1. Para comprobar esto era necesario estimar las constantes de afinidad de ambas proteínas por el zinc lo que generalmente suele llevarse a cabo mediante experimentos de competición con agentes quelantes de afinidad conocida. Este tipo de determinaciones no siempre es posible pues requiere que la proteína pueda metalarse y desmetalarse de forma independiente. Algunas proteínas adquieren el metal durante su plegamiento, por lo que la metalación/desmetalación va asociada al plegamiento y no son apropiadas para este tipo de acercamiento. Otras proteínas requieren factores accesorios para la adquisición del metal por lo que tampoco son susceptibles de ser analizadas por este procedimiento.

Por tanto antes de proceder a la estimación de la afinidad de T1 y T2 por el zinc, se llevaron a cabo experimentos previos para dilucidar si estas proteínas poseían la capacidad de recuperar el cofactor metálico tras un tratamiento con quelantes. Para ello, proteínas T1 y T2 portadoras de una etiqueta StrepTag-II en el extremo amino, se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columnas de estreptavidina, tal y como se describe en el apartado 2.4.1 a partir de extractos de las estirpes de *Escherichia coli* BL21(DE3, pCMN20) y BL21(DE3, pCMN21) disponibles en la colección del laboratorio. Todas las soluciones utilizadas en la purificación se suplementaron con EDTA a concentración 5 mM con la intención de sustraer el cofactor metálico de las proteínas y crear un ambiente libre de metales. Es importante mencionar (ver apartado 3.11.2 y Figura 3.18) que ambas enzimas contienen una cisteína en el sitio activo que funciona como residuo de coordinación del metal. A fin de proteger este residuo de la

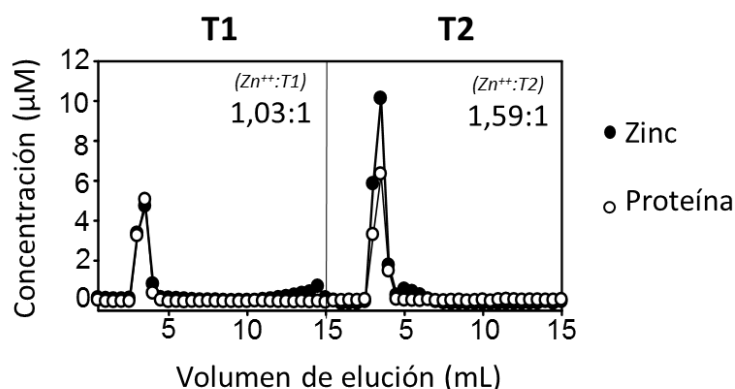


oxidación, se añadió el agente reductor DTT a concentración 5 mM a todas las soluciones utilizadas.

Debido a que el tampón Tris en el que se encontraban las proteínas tras la purificación presenta una débil capacidad quelante, se combinaron las fracciones de elución con mayor contenido en proteína y se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna de heparina en el interior de una cámara anaeróbica, que permite trabajar en un ambiente libre de oxígeno y proteger a los residuos de coordinación de metal de la oxidación. En la cromatografía en columna de heparina se sustituyó el tampón por tampón HEPES libre de EDTA y DTT (ver apartado 2.5.2) con objeto de eliminar todas las posibles interferencias que puedan influir en la unión de la proteína y el metal (Xiao & Wedd, 2010). En las fracciones de elución se cuantificó el contenido en proteína por el método de Bradford, se comprobó el estado de reducción de las cisteínas mediante análisis de DNTB (apartado 2.5.2) y se analizó el contenido en metales mediante ICP-MS (apartado 2.5.1). Estos análisis nos permitieron comprobar que la proteínas purificadas T1 y T2 se habían obtenido en su forma *apo* sin alterar el estado de reducción de las cisteínas. Estos pasos de preparación se llevaron a cabo rutinariamente tras cada nueva purificación de proteína.

Las proteínas *apo*-T1 y *apo*-T2, preparadas tal como se ha descrito, se incubaron durante 30 minutos con dos equivalentes de zinc tras lo que se sometieron a cromatografía de filtración en gel en una columna de Sephadex G-25, que permite separar la proteína del metal libre, que eluiría en las últimas fracciones de acuerdo a su bajo peso molecular. El contenido en proteínas y metales de las fracciones de elución se cuantificó por el método de Bradford y por ICP-MS, respectivamente. Como se muestra en la Figura 3.10, el zinc co-eluía con T1 y T2 lo que indicaba que se encontraba unido a ellas y por consiguiente que ambas *apo*-proteínas eran capaces de remetalarse con zinc.

Estos ensayos demostraron la capacidad de T1 y T2 para desmetalarse y remetalarse *in vitro* e indicaban que ambas proteínas se podían utilizar en ensayos de competición para estimar su constante de afinidad por zinc.



**Figura 3.10. Ensayos de remetalación de las proteínas T1 y T2.** Preparaciones de la forma *apo* de T1 (panel izquierdo) y T2 (panel derecho) a concentración 10 µM se incubaron con dos equivalentes de zinc durante 30 minutos antes de someterlas a filtración en columnas Sephadex G-25. El contenido en metal de las fracciones de análisis mediante ICP-MS (puntos negros) y el contenido en proteínas mediante ensayos Bradford (puntos blancos). En cada panel se indica la ratio Zn<sup>++</sup>:proteína de la fracción del pico de elución.



Merece la pena destacar algunas diferencias en cuanto a la estequiometría metal:proteína observadas. En la proteína T1 este valor era aproximadamente igual a 1:1, lo que indica la unión estequiométrica de un átomo de zinc por monómero, que coincide con lo descrito en *E. coli* (Sankaranarayanan *et al.*, 1999). Por el contrario, en el caso de T2 observamos un ratio de 1,59:1, lo que indica la unión de tres átomos de zinc por dímero de proteína. La unión de metales a sitios adventicios es un fenómeno relativamente común como consecuencia de la afinidad general de los cationes divalentes por las proteínas, que puede provocar que a altas concentraciones se unan a sitios eventuales de baja afinidad, sin función biológica alguna. Merece la pena destacar, sin embargo, que la unión de un tercer átomo de zinc ha sido también descrito en la ThrRS de *Staphylococcus aureus* (Dock-Bregeon *et al.*, 2004).

### 3.9.2.-Cálculo de la afinidad de T1 y T2 por el zinc

Si definimos la unión del metal (M) a la proteína (P) para formar el complejo proteína:metal (M·P) como el siguiente equilibrio:



Es posible definir la constante de disociación de la proteína por el metal ( $k_d$ ) como el siguiente cociente:

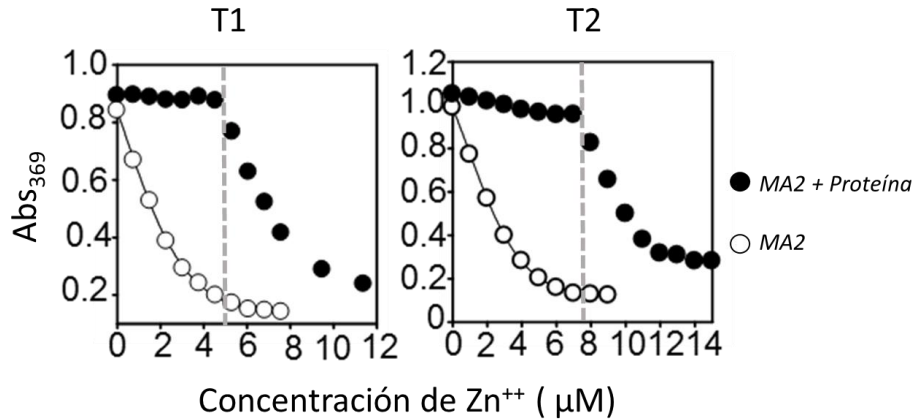
$$K_D = \frac{[M][P]}{[MP]}$$

La constante de disociación es un parámetro que informa sobre la afinidad de una proteína por el metal. Se han calculado las constantes de disociación para varios complejos proteína-metal y presentan valores que cubren una escala muy amplia, variando desde  $10^{-7}$  a  $10^{-19}$  (Xiao & Wedd, 2010). En los experimentos de competición entre la proteína y quelantes con una constante de afinidad conocida se monitoriza el reparto del metal entre la proteína y el quelante en el equilibrio, lo cual permite, tras un tratamiento matemático, deducir la constante  $k_D$  de la proteína.

#### 3.9.2.1.-Competición con Mag-Fura2

El Mag-Fura2 (de aquí en adelante, MA2) es un quelante con una constante de afinidad por zinc de  $2,04 \cdot 10^{-8}$  M (Simons, 1993). El quelante en estado libre presenta un pico de absorción a una longitud de onda de 369 nm, que se extingue por la unión de un metal, de manera que existe una correlación entre el descenso en la absorbancia y la cantidad de metal unido al quelante. Para estimar la afinidad de las proteínas T1 y T2 por el zinc, se realizaron experimentos de competición en los que a una mezcla equimolar de proteína y quelante se añadían cantidades





**Figura 3.11. Ensayo de competición de MA2 con T1 y T2.** Preparaciones de proteína T1 (panel izquierdo, puntos negros) o T2 (panel derecho, puntos negros) a concentración 5  $\mu\text{M}$  se mezclaron de forma independiente con MA2 a la misma concentración y cada mezcla se suplementó con cantidades crecientes de  $\text{Zn}^{++}$ . Durante el ensayo se monitorizó la absorbancia a 369 nm. Se incluyó en cada caso un control sin proteína (puntos blancos, ambos paneles). La línea puntuada indica la concentración de zinc a la que comienza a observarse un descenso en la absorbancia a 369 nm.

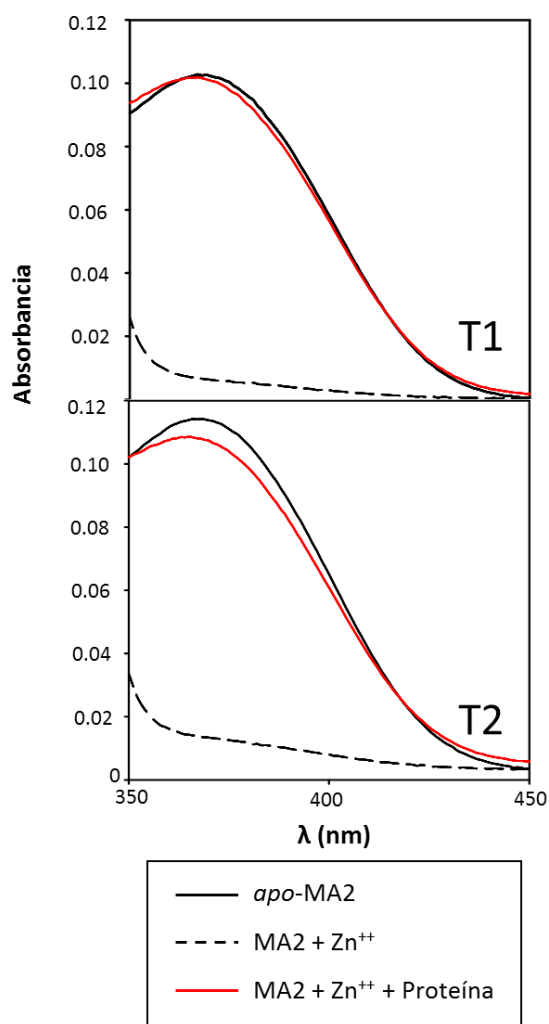
R

crecientes de zinc y se monitorizaba el descenso de la absorbancia a 369 nm, permitiendo deducir el reparto del metal entre la proteína y el quelante (apartado 2.5.3).

Como se puede observar en la Figura 3.11, la adición de zinc a las mezclas de MA2 y las proteínas T1 o T2 no produce un descenso en la absorbancia del MA2 hasta que la concentración de metal supera la concentración de proteína, lo que indica que no existe reparto del metal entre el quelante y la proteína, sino que el zinc está siendo capturado en exclusiva por la esta última. Una vez que la proteína se encuentra saturada con el metal empieza a observarse un descenso en la absorbancia del MA2. La concentración de zinc a la que comienza a observarse un descenso en la absorbancia de MA2 es distinta para T1 y T2 y coincide con los ratios metal:proteína de 1:1 (para T1) y 1,5:1 (para T2) detectados en los experimentos del apartado anterior.

Estos resultados implican que la constante de afinidad por el zinc tanto de T1 como de T2 es considerablemente mayor que la de MA2, lo que nos permite acotar las  $K_D$  de T1 y T2 a valores inferiores a  $2,04 \cdot 10^{-8}$  M.

Se realizó un experimento control para corroborar que el tiempo de incubación (3 minutos, ver apartado 2.5.3) utilizado en el experimento de competición anterior eran suficientes para alcanzar el equilibrio de reparto de metal. Para ello, se incubaron durante tres minutos las proteínas T1 y T2 junto a una preparación de MA2 previamente saturada con zinc (Figura 3.12). La adición tanto de T1 como de T2 se traducía en un incremento en la absorbancia a 369 nm hasta los mismos niveles observados en la forma MA2 libre de metales, lo que demostraba que el zinc unido al quelante era secuestrado por estas proteínas. Estos resultados corroboraron que T1 y T2 poseen una afinidad por el zinc considerablemente superior a la del MA2 y que los tiempos de incubación empleados en el experimento anterior son suficientes para alcanzar el equilibrio.



**Figura 3.12. Equilibrio de MA2 con T1 y T2.** Una preparación de MA2 a concentración 5  $\mu\text{M}$  (línea negra) se incubó con un equivalente de zinc tras lo que se incubó en ausencia de proteína (línea discontinua) o en presencia de T1 (línea roja, panel superior) o T2 (línea roja, panel inferior) a concentración 5  $\mu\text{M}$ . En cada caso se monitorizó el espectro de absorbancia en el rango de 350 a 450 nm.

### 3.9.2.2.-Competición con los quelantes NTA y HEDTA

Puesto que la afinidad de T1 y T2 por el zinc es mayor que la de MA2, no podemos usar este quelante para estimar la constante de disociación. Si bien existe un amplio espectro de quelantes que podrían usarse en ensayos de competición, podemos acotar el rango de candidatos a aquellos que poseen una constante de disociación por el zinc con valores situados entre el MA2 y el EDTA (utilizado para conseguir la forma de *apo*-proteína y que por tanto es capaz de retirar el metal por completo). Los quelantes seleccionados fueron el ácido nitrilotriacético (NTA) y el ácido hidroxietilendiaminotriacético (HEDTA) cuyas respectivas  $K_D$  por el zinc son  $3,74 \cdot 10^{-9}$  M y  $5,96 \cdot 10^{-13}$  M. El hecho de que carezcan de las propiedades espectrofotométricas del MA2 nos obligó a cambiar el diseño experimental (apartado 2.5.3.2), de modo que en vez de monitorizar el reparto del zinc entre la proteína y el quelante cuando se añade el metal a una mezcla de ambos, se analizaba la sustracción del metal por parte del quelante de una

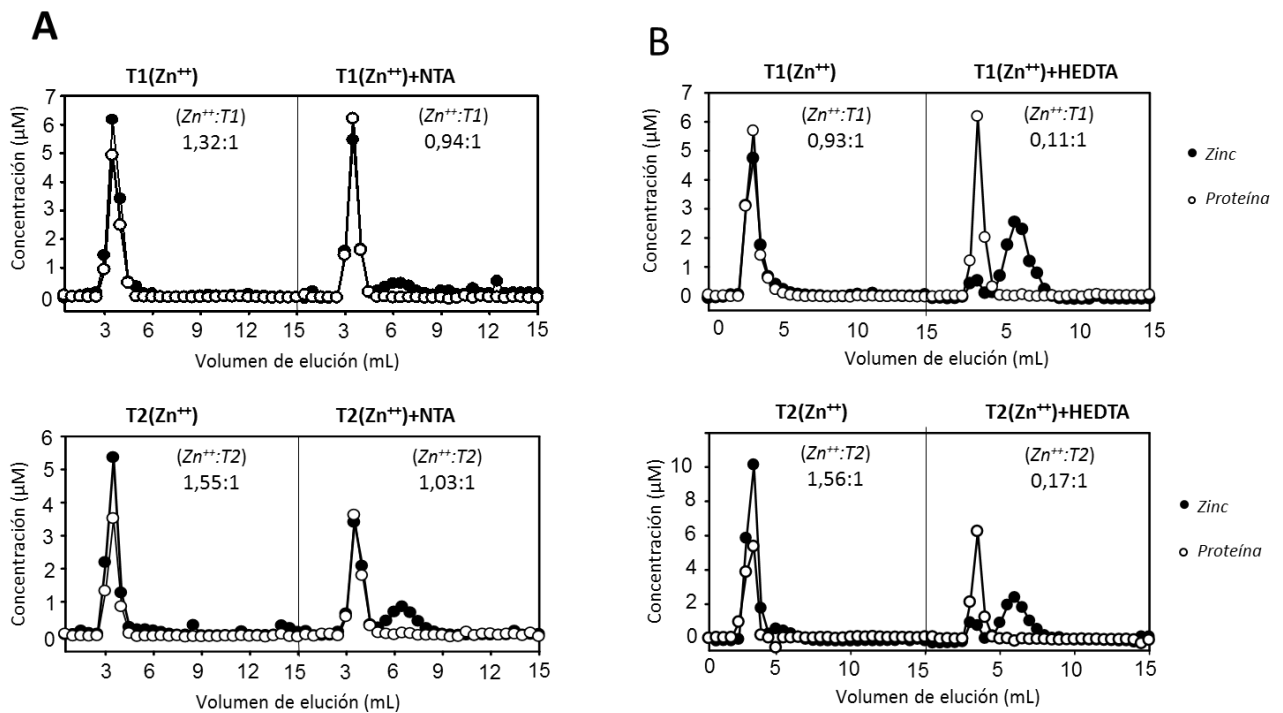
preparación de proteína previamente cargada con zinc. En estos experimentos, se incubaron las proteínas T1 y T2 cargadas con zinc con NTA o HEDTA. Una vez alcanzado el equilibrio se sometieron a cromatografía de filtración en gel en columnas de Sephadex G-25 en las que las proteínas y los quelantes eluyen en picos separados por su diferencia de tamaño y se analizó el contenido en proteína y zinc de las fracciones de elución.

Como se observa en la figura 3.13.A., tras la incubación con NTA, el metal co-eluye con la proteína en cantidades estequiométricas lo que indica que el quelante no consigue retirar el metal de T1 y T2 previamente cargadas con zinc. Por el contrario, el quelante HEDTA (3.13.B) retira completamente el metal de las dos proteínas, lo que provoca que el zinc eluya en un pico correspondiente a moléculas de menor peso molecular que no coincide con las fracciones que contienen proteína. No se observa, por tanto, reparto de metal usando ninguno de estos dos



quelantes, por lo que no son indicados para el cálculo de la constante de disociación. Los resultados obtenidos, sin embargo, implican que la afinidad de T1 y T2 se encuentra en un rango comprendido entre las de NTA y HEDTA. Estos resultados nos permiten acotar, por tanto, los valores en el que se encuentra la  $K_D$  de ambas proteínas por el zinc a un rango comprendido entre  $3,74 \cdot 10^{-9}$  M (NTA) y  $5,96 \cdot 10^{-13}$  M (HEDTA). Este rango puede restringirse aún más si se tiene en cuenta el efecto del pH sobre la constante de afinidad por el zinc de los quelantes. Para ello, se calcularon las constantes de afinidad del HEDTA y NTA dependiente del pH utilizando el método de los coeficientes  $\alpha$  de Schwarzenbach (A. Foster, comunicación personal; Xiao & Wedd, 2010), resultando en un rango de la  $K_D$  por el zinc de entre  $10^{-10}$  –  $10^{-12}$  M, lo que no sugiere que existan grandes diferencias entre la afinidad por el cofactor metálico de ambas proteínas.

Resulta interesante destacar que cuando se incubaba la proteína T2 con NTA se puede observar como el ratio de 1,5:1 zinc:proteína, que indicaba un tercer átomo de zinc por dímero, se reduce a 1:1. Este resultado indica que se trata de un sitio de baja afinidad por zinc y refuerza la idea de que se trate de un sitio adventicio sin función biológica.



**Figura 3.13. Competición T1 y T2 con los quelantes NTA y HEDTA.** A) Preparaciones de T1 (panel superior izquierdo) o T2 (panel inferior izquierdo) a concentración 10  $\mu$ M se incubaron durante 10 minutos en presencia de 0,9 equivalentes de zinc antes de someterlas a filtración en columnas de Sephadex G-25 para determinar la co-elución del metal (puntos negros) y la proteína (puntos blancos). Alternativamente, preparaciones similares se incubaron durante 24 horas en presencia de 20 equivalentes del quelante NTA y se procesaron de la misma forma (paneles derechos). B) Repetición del experimento descrito anteriormente usando el quelante HEDTA. En cada panel se indica el ratio Zn<sup>++</sup>:proteína de la fracción correspondiente al pico de elución

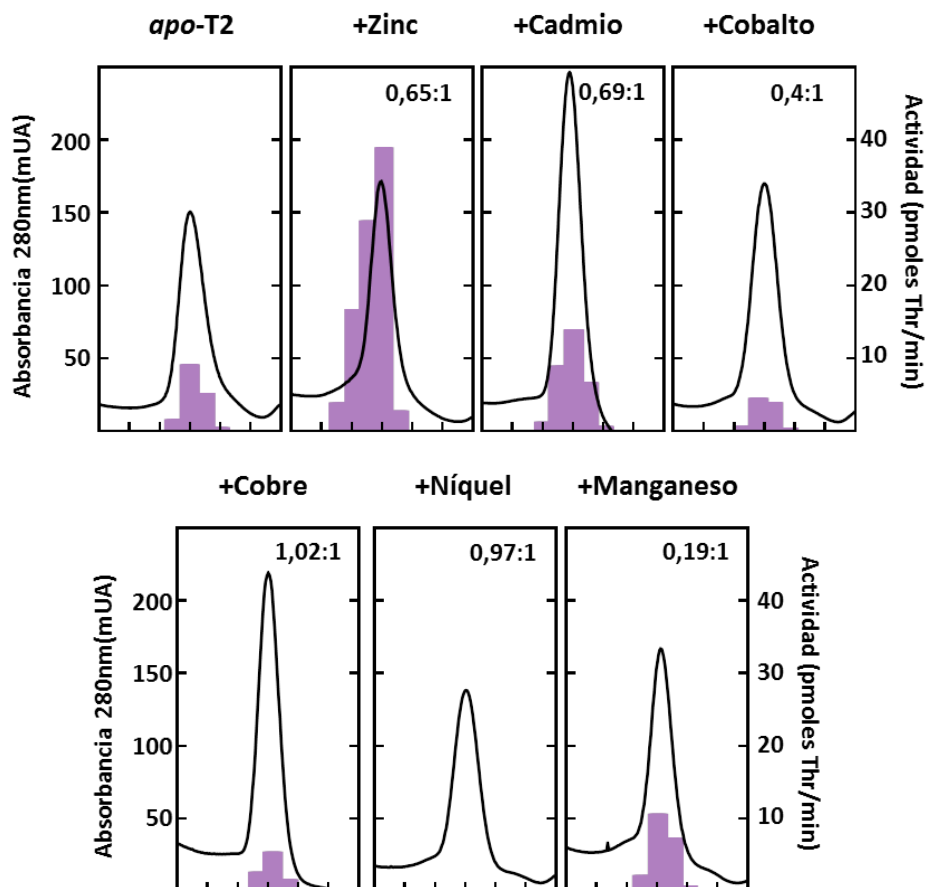
### 3.9.3.-Análisis de cofactores alternativos para T2

Los resultados del experimento anterior no reflejan grandes diferencias en la afinidad de T1 y T2 por el zinc por lo que el papel preponderante de T2 en la aminoacilación del tRNA<sup>Thr</sup> en deficiencia de zinc no parece sustentarse únicamente en una mayor afinidad de esta enzima con el metal. Una estrategia de adaptación bien documentada en la literatura es la sustitución de una metaloproteína por una isoforma que utiliza un metal alternativo (Waldron & Robinson, 2009; Choi & Bird, 2014) por lo que se decidió probar la hipótesis de que T2 pudiera funcionar con un metal distinto al zinc como cofactor. Para analizar esta posibilidad, se realizaron experimentos de sustitución *in vitro*, en los que la proteína *apo*-T2 se sometía a condiciones que propiciaban la ocupación del bolsillo de coordinación por distintos metales catiónicos divalentes, tras lo que se analizaba su contenido en metales y su actividad catalítica. Debido al diseño experimental, realizado en condiciones aeróbicas, no pudieron incluirse en este experimento metales como el Fe(II) o Cu(I).

La sustitución de metales se realizaba de forma cuidadosa mediante cromatografía de filtración en gel (apartado 2.4.4) en una columna de Sephadex S-200 de 30 cm de longitud equilibrada previamente con un tampón suplementado con el metal divalente a ensayar. La proteína T2 se preparaba en su forma *apo* mediante incubación prolongada en un tampón que contenía 5 mM EDTA. Debido al principio de exclusión molecular las moléculas de EDTA, de menor radio hidrodinámico, migraban más lentamente por la matriz, separándose en los primeros milímetros de columna de la *apo*-proteína, que quedaba expuesta al metal presente en el tampón. La actividad de las fracciones de elución se cuantificó mediante ensayos de aminoacilación. Las fracciones correspondientes al pico de elución se filtraron por una columna de Sephadex G-25 PD-10 (*GE Healthcare*) para sustituir el tampón por un tampón libre de metales y se analizó el contenido en metales por ICP-MS y el contenido en proteínas mediante ensayos Bradford.

Como se aprecia en la Figura 3.14, en la mayor parte de los casos se consiguió la sustitución de la proteína T2 con distintos metales en proporciones casi estequiométricas (entre 0,7:1 y 1:1), si bien en el ensayo de sustitución con cobalto el contenido en metal fue más pobre y no se consiguió la sustitución con manganeso. Los ensayos de aminoacilación mostraron que sólo la proteína sustituida con zinc mostraba niveles de actividad superiores a los del control negativo de la *apo*-enzima. Cabe destacar los casos en los que T2 se suplementó con cadmio o níquel, donde se observa un ratio metal:proteína 1:1 y sin embargo los niveles de actividad son inferiores a los del control negativo de la *apo*-enzima. La explicación más plausible es que los iones de cadmio o níquel hayan conseguido desplazar por completo a los átomos de zinc residuales de la





**Figura 3.14. Sustitución de T2 con metales alternativos:** 100  $\mu$ l de una preparación de *apo*-proteína T2 a concentración 20  $\mu$ M se cargaron en una columna Sephadex S-200 previamente equilibrada con tampón suplementado con el metal indicado en la parte superior de cada panel a concentración 10  $\mu$ M y se resolvieron usando el mismo tampón. Se monitorizó la absorbancia a 280 nm y se recogieron las fracciones que contenían proteína. Se incluyó también un control donde no se añadía ningún metal al tampón (*apo*-T2, panel izquierdo). Posteriormente se midió la actividad enzimática de las fracciones con contenido en proteína en ensayos de aminoacilación (5  $\mu$ L de fracción en ensayos de 25  $\mu$ L). La actividad de las fracciones aparece representada como barras moradas. Las dos fracciones correspondientes al pico de actividad se combinaron y se filtraron por una columna Sephadex G-25 para sustituir el tampón por otro libre de cationes divalentes antes de analizar el contenido en metales mediante ICP-MS. El ratio metal:proteína de estas fracciones aparece en la esquina superior derecha de cada panel.

preparación de *apo*-T2 que probablemente eran responsables de la actividad basal de la *apo*-enzima. Estos resultados nos permiten concluir que de los metales ensayados, solamente el zinc sustenta la actividad de T2 y sugieren que ésta no es una enzima promiscua que pueda usar metales alternativos como cofactor. No obstante, no podemos descartar que T2 pueda usar algún cofactor alternativo no ensayado en nuestros experimentos *in vitro*.

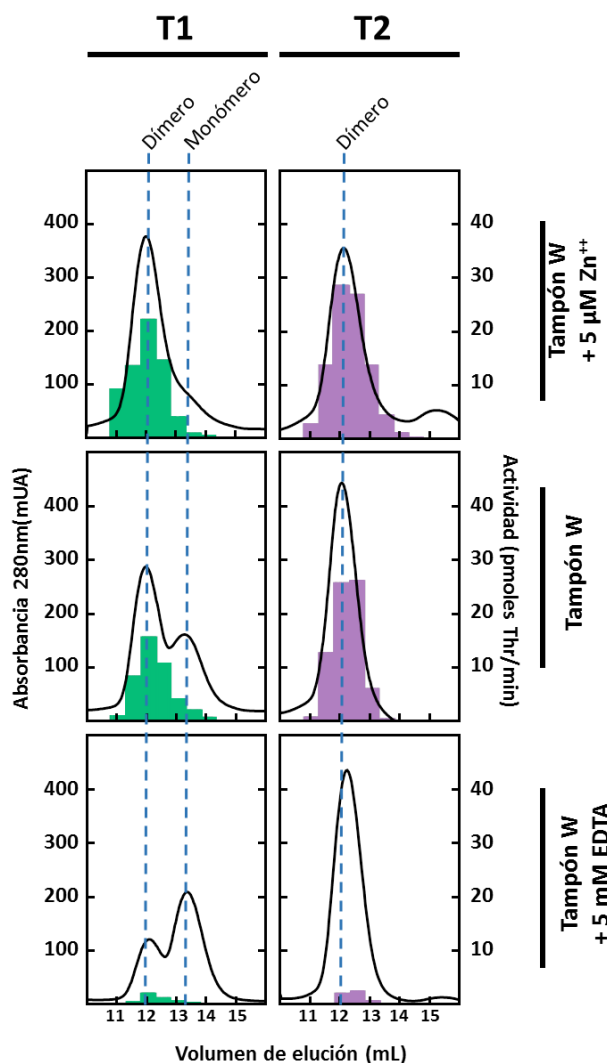
### [3.10.-Análisis de la estructura cuaternaria de T1 y T2](#)

Para explorar las causas del aparente funcionamiento diferencial de T1 y T2 se investigaron algunas propiedades fisico-químicas de estas proteínas. Se analizó la estructura cuaternaria de T1 y T2 en condiciones que mimetizasen distintos estados de la adaptación a condiciones de deficiencia de zinc. Es importante destacar que todas las ThrRSs caracterizadas hasta la fecha, incluidas T1 y T2 de *Anabaena*, son enzimas homodiméricas (Sankaranarayanan

*et al.*, 1999; Dock-Bregeon *et al.*, 2000; Torres-Larios *et al.*, 2002; Dwivedi *et al.*, 2004). Este carácter oligomérico lo comparten con las otras aaRS de clase II y algunas de clase I, aunque en el caso de las ThrRSs, el carácter dimérico parece especialmente importante ya que ambas subunidades establecen múltiples interacciones con cada molécula de tRNA (Sankaranarayanan *et al.*, 1999).

### 3.10.1.-Impacto de la pérdida del cofactor en la estructura cuaternaria de T1 y T2

El análisis de la estructura cuaternaria se abordó mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex S-200 (tal y como se detalla en el apartado



**Figura 3.15.- Estructura cuaternaria de T1 y T2:** Preparaciones de las proteínas T1 (paneles izquierda) o de T2 (paneles derecha) a concentración 20  $\mu\text{M}$  se resolvieron en una columna S-200 usando los tampones señalados en la parte derecha de cada panel. Las líneas discontinuas señalan el volumen de elución esperado para las especies monoméricas y dimericas. Las fracciones que contenían proteína se sometieron a un ensayo de actividad de aminoacilación (5  $\mu\text{L}$  de fracción en ensayos de 25  $\mu\text{L}$ ) y aparecen representadas como barras verdes (en el caso de T1) o moradas (en el caso de T2).

2.4.5). Para esto experimentos se utilizaron preparaciones de proteínas T1 y T2 purificadas como se describe en el apartado 2.4.2 en tampón W suplementado con zinc.

Al realizar la cromatografía usando este mismo tampón (Figura 3.15, paneles superiores), se observó que T1 y T2 eluían en un pico único que correspondía a moléculas un peso molecular aproximado de 150 KDa, similar al peso molecular teórico de la forma dimérica de estas proteínas. En este pico se concentraba la actividad de aminoacilación del perfil de elución. Sorprendentemente, si se repetía el experimento usando tampón de cromatografía no suplementado con zinc (Figura 3.15, paneles intermedios), se observaba en el perfil cromatográfico de la proteína T1 un segundo pico de proteína exento de actividad de aminoacilación, correspondiente a un peso molecular de 75 KDa, compatible con un estado monomérico.

El perfil cromatográfico de la proteína T2, por el contrario, no se veía alterado en estas condiciones. La adición de EDTA a concentración 5 mM al tampón magnificaba el efecto anterior, provocando que en la



cromatografía de T1 (Figura 3.15, paneles inferiores) el pico de menor peso molecular y exento de actividad se hiciera el mayoritario. En cambio, la presencia de EDTA no provocaba ningún efecto en el perfil de elución de T2.

Es importante destacar que en estos experimentos se observaba que la actividad enzimática se encontraba restringida a las fracciones correspondientes al dímero, indicando que la población monómerica de T1 no poseía actividad. Por otra parte, la pérdida de actividad era total para ambas proteínas cuando se añadía EDTA al tampón. Esto último era indicativo de que el quelante lograba retirar el cofactor metálico de zinc de ambas proteínas y excluía la posibilidad de que la elución de T2 en forma de dímero se debiera a la retención del metal aún en presencia del quelante.

Estos resultados mostraban una correlación entre la presencia del cofactor metálico y la estructura cuaternaria en T1 y sugerían que la pérdida del zinc provocaba la disociación del dímero. Además estos resultados pusieron de manifiesto una diferencia drástica respecto al comportamiento de ambas proteínas, lo que podría suponer la base de su funcionamiento diferencial en *Anabaena*.

### 3.10.2.-Análisis de la estructura cuaternaria en mutantes alterados en los residuos de coordinación del zinc.

Los análisis de secuencia revelaron que los residuos de coordinación del zinc identificados en la ThrRS de *E. coli* y otros organismos (una cisteína y dos histidinas) (Sankaranarayanan *et al.*, 1999; Dock-Bregeon *et al.*, 2000; Torres-Larios *et al.*, 2002; Dwivedi *et al.*, 2004) se encuentran conservados en las dos ThrRSs de *Anabaena* (Figura 3.16). Para confirmar que la pérdida del cofactor metálico actúa como el estímulo que provoca la disociación de T1, se construyeron mutantes en los que se sustituyeron dos o los tres aminoácidos implicados en la coordinación del metal.

Para el diseño de las mutaciones se siguió el criterio de intentar conservar en lo posible la estructura del bolsillo. Para ello, la cisteína se sustituyó por serina (ambos aminoácidos son estructuralmente idénticos, salvo que el grupo sulfidrilo de la cisteína es un grupo hidroxilo en la serina) y las histidinas por tirosina (de los aminoácidos aromáticos, la tirosina tiene no sólo un tamaño similar sino que el grupo hidroxilo del anillo confiere carácter polar que emula en cierto modo el grupo imidazol de la histidina).

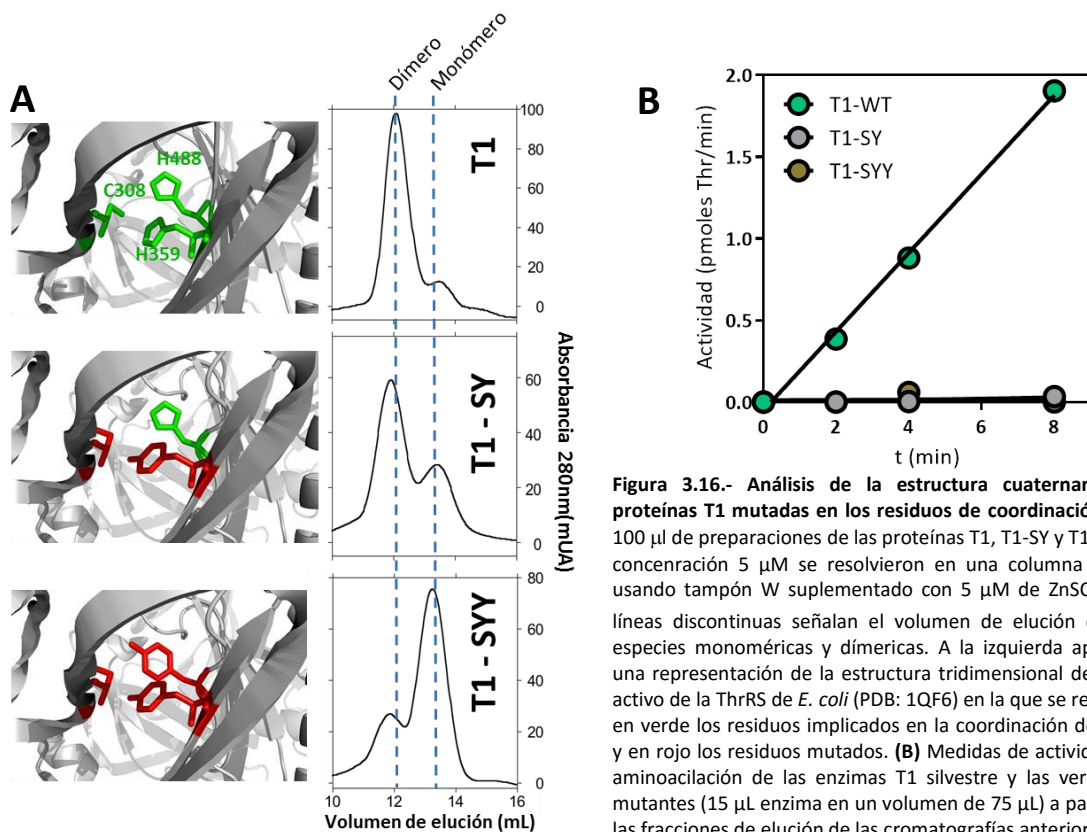
Se construyeron dos plásmidos derivados de pCMN21 (que expresa la versión silvestre de T1): pCMA53, que expresa una versión con las sustituciones Cys334Ser y His385Tyr (a la que en adelante nos referiremos como T1-SY) y pCMA54, que expresa una versión que contiene el cambio adicional His<sub>511</sub>Tyr (a la que nos referiremos como T1-SYY). Estos plásmidos se



introdujeron en *Escherichia coli* BL21(DE3). Los plásmidos mencionados introducen una etiqueta StrepTag-II en las proteínas T1, T1-SY y T1-SYY lo que nos permitió purificarlas en columnas de estreptavidina (apartado 2.4.2). Para estas purificaciones todos los tampones de cromatografía se suplementaron con  $ZnSO_4$  a concentración final de  $5 \mu M$ , con el objetivo de asegurar la ocupación del sitio activo con zinc. Las proteínas purificadas se sometieron a cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex S-200 de 30 cm, usando como tampón de cromatografía tampón W suplementado con  $ZnSO_4$  a concentración  $5 \mu M$ .

En los perfiles de elución mostrados en la Figura 3.17.A se puede observar que, a diferencia de la proteína silvestre, la proteína T1-SY (mutada en dos residuos de coordinación) eluía en gran parte en forma monomérica, aun encontrándose en un tampón con zinc. Este efecto es aún más drástico en el mutante triple T1-SYY que eluye mayoritariamente como monómero, mostrando un perfil de elución similar al observado al incubar la proteína T1 en presencia del quelante EDTA. La mutación de los residuos de coordinación provocaba, asimismo, la pérdida total de la actividad de aminoacilación de las proteínas T1-SY y T1-SYY (Figura 3.17.B). Estos resultados establecen una relación directa entre la presencia del cofactor metálico y la estructura cuaternaria en la proteína T1, de modo que la ocupación del bolsillo de coordinación se corresponde con el estado dimerico y su desalojo con la disociación de la proteína.

Para comprobar qué efectos produciría la mutación de los residuos de coordinación en la proteína T2 se construyeron los mutantes T2-SY y T2-SYY a partir del plásmido pCMN20, de



**Figura 3.16.- Análisis de la estructura cuaternaria de proteínas T1 mutadas en los residuos de coordinación. (A)** 100  $\mu l$  de preparaciones de las proteínas T1, T1-SY y T1-SYY a concentración  $5 \mu M$  se resolvieron en una columna S-200 usando tampón W suplementado con  $5 \mu M$  de  $ZnSO_4$ . Las líneas discontinuas señalan el volumen de elución de las especies monoméricas y dimericas. A la izquierda aparece una representación de la estructura tridimensional del sitio activo de la ThrRS de *E. coli* (PDB: 1QF6) en la que se resaltan en verde los residuos implicados en la coordinación del zinc y en rojo los residuos mutados. **(B)** Medidas de actividad de aminoacilación de las enzimas T1 silvestre y las versiones mutantes (15  $\mu l$  enzima en un volumen de 75  $\mu l$ ) a partir de las fracciones de elución de las cromatografías anteriores.

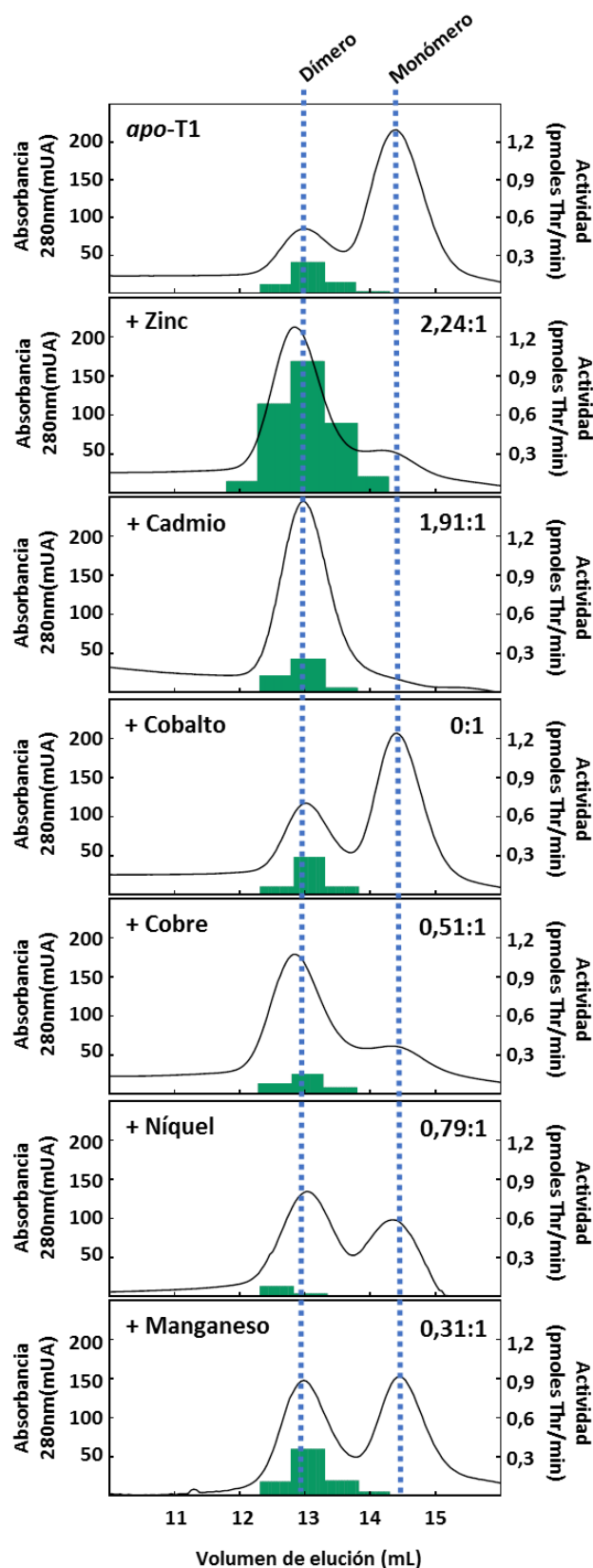
manera análoga a la que se siguió para la construcción de los mutantes de T1. Los mutantes T2-SY y T2-SYY mostraban un perfil cromatográfico aberrante, eluyendo en un pico muy ancho y poco definido, lo que es característico de proteínas mal plegadas o en múltiples estados de plegamiento.

### 3.10.3.- Reconstitución de la estructura cuaternaria de T1

Los resultados anteriores indican claramente que la pérdida del zinc provoca la disociación de los dímeros de T1, pero desconocíamos si tal cambio era permanente o reversible. Los resultados que se presentan en el apartado 3.9.1. habían mostrado que *apo*-T1 une zinc cuando se incubaba en presencia de sales de este metal, quedaba por establecer si la remetalación de T1 estaba asociada a la recuperación de la estructura dimérica y la actividad de la proteína. Para ello, se utilizó una aproximación experimental similar a la descrita anteriormente para el estudio de cofactores alternativos en T2 (apartado 3.9.3). Se prepararon alícuotas de *apo*-T1 en tampón suplementado con 5 mM EDTA y se sometieron a cromatografía en columnas de Sephadex S-200 usando un tampón de cromatografía suplementado con 5  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>. Como control se hizo un experimento en paralelo en el que la *apo*-proteína se sometió a filtración en gel usando un tampón libre de metales. Las fracciones de elución se sometieron a ensayos de aminoacilación y el contenido metálico se analizó por ICP-MS (Figura 3.17, paneles superiores). Se observó que la incubación de *apo*-T1 con zinc provocaba la remetalación de la proteína, su dimerización y la recuperación de su actividad, de lo que se pudo deducir que la disociación de T1 es reversible y que la dinámica de dimerización-disociación de T1 está determinada alostéricamente por la ocupación del bolsillo de coordinación del metal.

Para indagar con mayor profundidad en este aspecto se llevaron a cabo experimentos similares al anterior suplementando el tampón de cromatografía con metales distintos al zinc (Figura 3.17). Los análisis de contenido de metal por ICP-MS muestran unos resultados más heterogéneos en cuanto al nivel de sustitución de metales que los obtenidos para T2. En los experimentos en los que se suplementaba con cobre o manganeso la ratio metal:proteína es de en torno a 0.5:1, mientras que en los que se suplementó con zinc o cadmio se alcanzan valores de en torno a 2:1, lo que sugiere la unión *in vitro* a sitios adventicios. Por razones que desconocemos no se consiguió sustituir la proteína con cobalto.

Fue interesante comprobar que la metalación de T1 con metales distintos al zinc promovía en mayor o menor grado la dimerización de la proteína, lo cual sugiere que estos metales son capaces de introducirse en el bolsillo de coordinación e inducir la dimerización, pero ello no iba acompañado de la recuperación de la actividad enzimática. Estos resultados refuerzan la idea de que la dinámica de dimerización/disociación de T1 está determinada alostéricamente



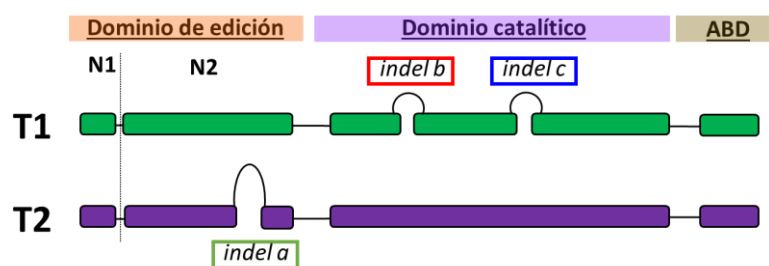
**Figura 3.17.- Sustitución de T1 con metales alternativos.** 100  $\mu$ l de preparaciones de de *apo*-proteína T1 a concentración 20  $\mu$ M se cargaron en una columna S-200 previamente equilibrada con tampón suplementado con 10  $\mu$ M del metal indicado en la parte superior de cada panel y se resolvieron usando el mismo tampón. Se monitorizó la absorbancia a 280 nm y se recogieron las fracciones que contenían proteína. Se incluyó también un control donde no se añadía ningún metal al tampón (*apo*-T1, panel superior). Posteriormente se midió la actividad enzimática de las fracciones con contenido en proteína en ensayos de aminoacilación (5  $\mu$ l de fracción en ensayos de 25  $\mu$ l). La actividad de las fracciones aparece representada como barras verdes. Las dos fracciones correspondientes al pico de actividad se filtraron en una columna Sephadex G-25 para retirar los cationes divalentes antes de analizar el contenido en metales mediante ICP-MS. El ratio metal:proteína de estas fracciones aparece en la esquina superior derecha de cada panel.

por la ocupación del bolsillo de coordinación. Por otra parte ponen en evidencia que si bien el bolsillo puede ser ocupado por distintos metales (al menos *in vitro*), sólo el zinc parece sostener la actividad.

Estos resultados junto con los que se muestran en el apartado 3.9.3 permiten concluir que las proteínas T1 y T2 de *Anabaena* requieren zinc para llevar a cabo la aminoacilación del tRNA y que ninguno de los metales ensayados es capaz de reemplazar al zinc como cofactor.

### 3.10.4.-Análisis de la base estructural de la disociación de T1

La diferencia radical en los perfiles cromatográficos de las proteínas T1 y T2 en los experimentos de filtración en gel (Figura 3.15) resultaba sorprendente dado que ambas proteínas son homólogas y presentan un 50% de residuos idénticos. Por ello, se analizaron las secuencias de ambas proteínas en busca de rasgos que pudieran explicar su diferente comportamiento. La diferencia más notable entre T1 y T2 consiste en la existencia de dos inserciones en el



**Figura 3.18.- Comparación de las secuencias de T1 y T2.** Representación esquemática de las secuencias de T1 y T2, donde se indican los dominios y las posiciones de los indels *a*, *b* y *c*. (Página siguiente) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de T1, T2 y la ThrRS de *E. coli*. Se indican marcados con flechas negras los residuos implicados en la coordinación del zinc.

dominio catalítico de T1, ausentes en T2, y una inserción en el dominio de edición exclusiva de T2 (Figura 3.18). Las inserciones *b* y *c* de T1 son secuencias de 3 y 6 aminoácidos, respectivamente. La inserción *b* se localiza entre los motivos conservados 1 y 2 de las aaRSs de clase II y la *c* entre los motivos conservados 2 y 3. Se decidió analizar si estas secuencias exclusivas de T1 pudieran jugar algún papel en la disociación provocada por la pérdida del cofactor. Para ello, se construyeron tres plásmidos derivados del pCMN20 que sobreexpresaban versiones mutantes de T1 en las que se había delecionado una o las dos inserciones utilizando técnicas basadas en la PCR descritas en el apartado 2.2.5.1. Los plásmidos pCMA47, pCMA48 y pCMA60 portaban respectivamente ORFs codificantes de una versión carente de *b* (a la que se hará referencia como T1- $\Delta b$ ), otra carente de *c* (T1- $\Delta c$ ) y una última carente de ambas secuencias (T1- $\Delta b,c$ ). Las proteínas recombinantes se sobreexpresaron y purificaron utilizando columnas de estreptavidina (apartado 2.4.2). De las preparaciones de proteínas purificadas se separó una alícuota, que se incubó a 4°C en presencia de 5 mM de EDTA durante 16 horas, con el objetivo de retirar el zinc del sitio activo de la enzima, antes de resolverlas mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando asimismo un tampón suplementado con el quelante (Figura 3.19.A). Se observó que a diferencia de la proteína silvestre, que en presencia de EDTA eluía mayoritariamente como monómero, las proteínas T1- $\Delta b$  y T1- $\Delta c$  eluían mayoritariamente como dímeros. Este efecto parecía aún más acusado en el mutante doble. Parece por tanto, que la deleción de *b* o *c* conlleva un desplazamiento en el estado de oligomerización de la proteína que tiende a permanecer en estado dimérico incluso en presencia de EDTA. De estos resultados se dedujo que las secuencias *b* y *c* estarían involucradas en la dinámica de cambios estructurales que se inician con la pérdida del zinc y de algún modo se propagan a la interfase de dimerización.

El impacto de la deleción de *b* y/o *c* sobre la actividad de T1 se analizó en ensayos de aminoacilación utilizando alícuotas de las preparaciones que no se habían incubado con el quelante. Se observó que las proteínas T1- $\Delta b$ , T1- $\Delta c$  y T1- $\Delta b,c$  mostraban respectivamente niveles de actividad correspondientes al 120±18, 60±9 and 37±6% (media± desv. est.) respecto al nivel de la enzima silvestre (Figura 3.19.B). Con el objetivo de investigar cómo se comportaría la enzima T2 si portase las secuencias *b* y/o *c*, se construyeron versiones del plásmido pCMN20 (que porta la

```

T1_Anabena -----MVQQLMSPNQDPNNQPEQPEKIYLP 25
T2_Anabaena -----MVSSLTQSQRDLQHN----- 16
ThrS_Ecoli  MPVITLPDGSORHYDHAVSPMDVALDIGPLAKACIAGRVNGELVDACDLIENDAQLSII 60
                .. : * :

T1_Anabena  RTSESETLKKIRHTASHVMAMAVQKLFPKAQVTIGPWIENGFYDFDSEPFPTDKDLKAI 85
T2_Anabaena ----SEQLVIRHTCAHIMAMAVQKLF LGTKVATGPVTDNGFYDFDCPISITPDDLGI 72
ThrS_Ecoli  TAKDEEGLEIIRHSCAHL LGHAIKQLWPHTKMAIGPVIDNGFYDVLDRTLTQEDVEAL 120
                * * **::*: : *::*: : : : * * :*****.* :.*.*: :

T1_Anabena  QKEMVKIINRKL PVVREEVSR EEAERRIQEIKEPYKLEILAD- IKSE-PIT IYHLG---- 139
T2_Anabaena AAEMRRIIKANLPIIREEVQREEIRTEIAQLNEPYKLEILDR-IPPEETITRYFIGEPDT 131
ThrS_Ecoli  EKRMEHLAEK NYDVIKKKVS WHEARETFANRGESYKVSILDENIAHDDKPGLYFH---- 175
                .* : : : : : : : * . * . : : * . * . * * * * * * * : * .

T1_Anabena  -----NEWWDL CAGPHVENTKDLNPKAIELESVAGAYWRGDETKAQLQR 183
T2_Anabaena STPESSLFVADV KPASNYW WDL CAGPHINFTGEIDPNSFQLLN IAGAYWQGD SKPQLQR 191
ThrS_Ecoli  -----EEYVDMCRGPHV PNMRFCH--HFKLMKTAGAYWRGDSNNKMLQR 217
                : : * * * * : . : : * . * * * * * * * * * * * * * *

T1_Anabena  IYATAWE TPEQLAEYKRRKEEALRR DHRKLGKELGLFIFSEQVGPGLPLWTPKGTLLRST 243
T2_Anabaena IYGTAWKTKAELEAYLKQREEALRR DHRKLGQELNLF SIQEEAGGGLVFWHPKGASIRYI 251
ThrS_Ecoli  IYGTAWADKKALNAYLQRL EEAAKR DHRKIGKQLDLYHMQEEA-PGMVFWHNDGWTIFRE 276
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

T1_Anabena  LEQFLQQEQLKRGYLPVVTPHIARVDL FKTSGHWQKYKEDMFLMAEDE AAAAIE QGFVL 303
T2_Anabaena IEDYWRKCHLESYQLLYTPHVNLDLWKTSGHFDYQENMFDSMEVEN-----QAYQI 305
ThrS_Ecoli  LEVFVRSKLKEYQYQEVKGPFMMDRVLWEKTGHWDNYKDAMFTTSSENR-----EYCI 329
                : * : : . : * : * : * : * : : * * * * * * * * * * * * * * * * * *

T1_Anabena  KPMNCPFH I QIYKSELRSYRELPMRLAEFGTVYRYEQSGELGGLTRVRGFTVDDSHLFVT 363
T2_Anabaena KPMNCPFHVLT YKHQLHSYRELPLRWAE LGTVYRYERSGALHGLMRVRGFTQDDAHIFCL 365
ThrS_Ecoli  KPMNCPGHVQIFNQGLKSYRDLPLRMAEFGSCHRNEPSGSLHGLMRVRGFTQDDAHIFCT 389
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

T1_Anabena  PEQLDNEFLNVVDLILSVFKSLQLKNFKARLSFRDP ASDKYIGSDEVWKAEGAIRRAVE 423
T2_Anabaena PHQIADEILGVLNLT EHLSDFGFKNYEVLNSTRP---DKSVGNNEVWELATSALRQALD 422
ThrS_Ecoli  EEQIRDEVNGCIRLVYDMYSTFGFEKIVVKLSTRP---EKRIGSDEMWDRAEADLAVAL 446
                .* : * . . : * : . : : : . * * * * * * * * * * * * * * * * *

T1_Anabena  QLGMEHFEGIGEA AFYGP KLD FIFSDALEREWQLGT VQVDY NLPERFDLEYVAEDGTRKR 483
T2_Anabaena AKGWN YIVDEGGGAFYGP KIDIKIQDAIGRLWQCSTIQVDFNLPERFDMEYIATDGSRQR 482
ThrS_Ecoli  ENNIPFEYQLGEGAFYGP KIEFTLYDCLDRAWQC GTVQLDFSLPSRLSASYVGEDNERKV 506
                * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

T1_Anabena  PVMIHRA PFGSLERLIGILIEEYAGDFPLV LAPVQARLLPVGEAQLDFTKDVVAKLRSLG 543
T2_Anabaena PIMIHRAIFGSLERFFGIL IENYAGDFPLV LAPVQIRLLPVSDDRGYTESVAIALQKDG 542
ThrS_Ecoli  PVMIHRAILGSMERFIGILTEEFAGFFPTV LAPVQVIMNITDSQSEYVNELTQKLSNAG 566
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

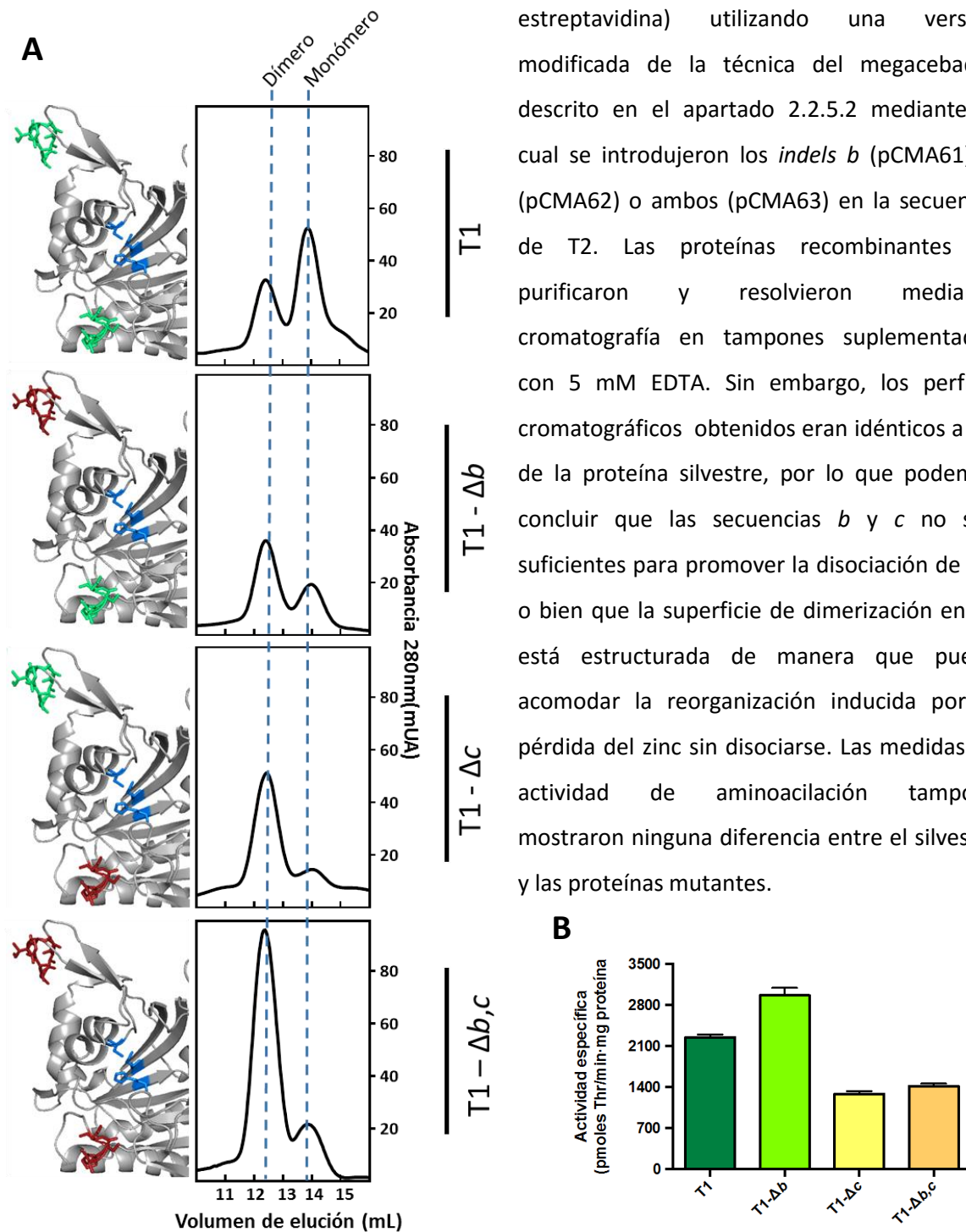
T1_Anabena  IRAEVDTS GDR LGLIRNAEKD KIPVM AVVGAKEVETNSLSIRTRASGELGAI PVDEVVQ 603
T2_Anabaena FRVEIDISGERLGKQIRTAELEKIPVGVVGVKKEVENQNL SVRTRANGDLGAINLNDLTN 602
ThrS_Ecoli  IRVKADLRNEKIGFKIREHTLRRV P YMLVCGDKEVESGKVAVRTRRGKDLGSM DVNEVIE 626
                : * : * . : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

T1_Anabena  KMKDAIANYENF---- 615
T2_Anabaena  HLRETIIAKK----- 612
ThrS_Ecoli  KLOOEIRSRS LKOLEE 642
                : : : * .

```



Figura 3.18. Comparación de las secuencias de T1 y T2 (Continuación) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de T1, T2 y la ThrRS de *E. coli*. Se indican marcados con flechas negras los residuos implicados en la coordinación del zinc. Recuadrados en colores se indican los tres dominios de las proteínas: el dominio de edición N1-N2 (naranja), el dominio catalítico (morado) y el dominio de unión al anticodón (marrón). Aparecen sombreadas las tres secuencias correspondientes a las inserciones a (verde), b (rojo) y c (azul)



**Figura 3.19.-** Papel de las inserciones *b* y *c* en la dinámica de oligomerización de T1. **(A)** 100  $\mu$ l de preparaciones de las proteínas T1, T1- $\Delta$ b, T1- $\Delta$ c y T1- $\Delta$ b,c a concentración 5  $\mu$ M se resolvieron en una columna S-200 usando tampón W suplementado con 5 mM de EDTA. Las líneas discontinuas señalan el volumen de elución de las especies monomérica y dímérica. A la izquierda aparece una representación parcial de la estructura tridimensional de la ThrRS de *E. coli* (PDB: 1QF6) en la que se resaltan en azul los residuos implicados en la coordinación del zinc, en verde las inserciones *b* y *c* y en rojo los residuos delecionados en los mutantes **(B)** Medidas de actividad de aminoacilación de las proteínas que se indican en el eje de abscisas. Para estos ensayos se utilizó una concentración de 50 nM de proteína.

ORF de T2 fusionada a una cola de estreptavidina) utilizando una versión modificada de la técnica del megacebador descrito en el apartado 2.2.5.2 mediante la cual se introdujeron los *indels b* (pCMA61), *c* (pCMA62) o ambos (pCMA63) en la secuencia de T2. Las proteínas recombinantes se purificaron y resolvieron mediante cromatografía en tampones suplementados con 5 mM EDTA. Sin embargo, los perfiles cromatográficos obtenidos eran idénticos a los de la proteína silvestre, por lo que podemos concluir que las secuencias *b* y *c* no son suficientes para promover la disociación de T2, o bien que la superficie de dimerización en T2 está estructurada de manera que puede acomodar la reorganización inducida por la pérdida del zinc sin disociarse. Las medidas de actividad de aminoacilación tampoco mostraron ninguna diferencia entre el silvestre y las proteínas mutantes.

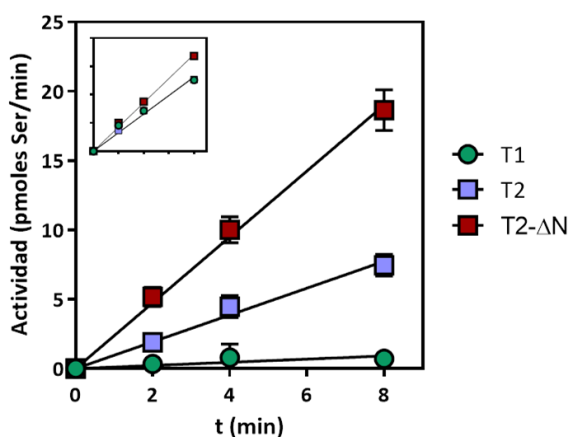
### 3.11.-Análisis de la fidelidad de la carga del tRNA en T2

Dada la similitud de secuencia de T1 y T2 (50% de identidad) y la elevada estabilidad de la proteína T2, resultaba sorprendente su incapacidad para sustituir a T1 (apartado 3.8). Para investigar si la inserción  $\alpha$  del dominio de edición de T2 afectaba a su capacidad correctora para lo que se realizaron ensayos de aminoacilación de tRNA<sup>Thr</sup> con el aminoácido ilegítimo serina (apartado 2.6.1). Con el objetivo de contar con un control positivo para estos experimentos, se construyó el plásmido pCMA68, que expresa una versión truncada de T2 carente de los dominios N1 y N2 (a la que se hará referencia como T2- $\Delta$ N). Esta versión mutante, muestra una actividad de edición nula y produce, por tanto, tRNA<sup>Thr</sup> cargado con serina (Ser-tRNA<sup>Thr</sup>) a una elevada tasa (Dock-Bregeon *et al.*, 2000).

Los ensayos de aminoacilación (Figura 3.20) revelaron una notable producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> por parte de T2, mientras que la producción por parte de T1 era prácticamente inexistente. La versión truncada de T2, T2- $\Delta$ N, presentaba unos valores de carga muy altos, como cabría esperar de una proteína completamente carente de edición. Estos resultados muestran que la proteína T2 presenta una actividad de edición reducida que provoca la liberación de tRNA<sup>Thr</sup> cargado con el aminoácido ilegítimo serina. La comparación de la actividad de carga ilegítima de T2- $\Delta$ N y T2 nos permite deducir, no obstante, que la forma silvestre de T2 es deficiente pero no totalmente exenta de actividad edición.

#### 3.11.1.- Impacto de la inserción $\alpha$ sobre la actividad de edición de T2

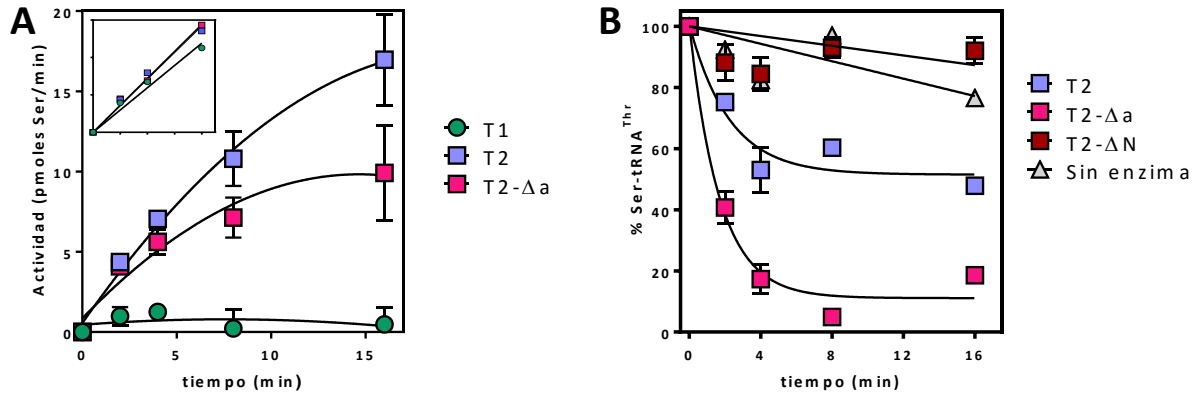
La diferencia en la producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> entre las enzimas T1 y T2 sugiere que la inserción  $\alpha$  podría ser responsable de la aparente discapacidad de T2 para editar este producto ilegítimo. Para analizar este aspecto se construyó el plásmido pCMA67 que expresa la proteína T2- $\Delta\alpha$ , en la que se ha eliminado la inserción  $\alpha$ .



**Figura 3.20. Actividad de aminoacilación de tRNA<sup>Thr</sup> con serina:** Ensayos de aminoacilación utilizando 120  $\mu$ M de L-Serina en un volumen final de 75  $\mu$ L. Las concentraciones de proteína usadas fueron 250 nM (T1), 50 nM (T2) y 75 nM (T2- $\Delta$ N) y fueron ajustadas previamente para conseguir niveles similares de carga de treonina (*inset*)

En los ensayos de aminoacilación con serina de la Figura 3.21.A puede observarse una reducción considerable de producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> por parte de T2- $\Delta\alpha$  respecto a T2 silvestre, obteniéndose una actividad de carga de serina de en torno a la mitad.

Es importante destacar que, si bien los ensayos de aminoacilación son una técnica utilizada rutinariamente para medir la carga de aminoácidos ilegítimos, en los resultados obtenidos usando este tipo de



**Figura 3.21. Impacto del indel  $\alpha$  sobre la actividad de edición de T2:** (A) Ensayos de aminoacilación de tRNA<sup>Thr</sup> con serina utilizando 120  $\mu$ M de L-Serina en un volumen final de 75  $\mu$ L. Las concentraciones de proteínas usadas fueron 250 nM (T1), 50 nM (T2) y 70 nM (T2- $\Delta\alpha$ ) y fueron ajustadas previamente para conseguir niveles similares de carga de treonina (*inset*). (B) Ensayos de edición utilizando 1,2  $\mu$ M de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> y 20 nM de cada una de las proteínas indicadas en la leyenda. Se incluye además un control negativo sin enzima.

experimentos se observan los efectos superpuestos de dos fenómenos diferentes: por un lado, la activación del aminoácido ilegítimo y su carga en el tRNA y por otro, la edición del aminoacil-tRNA cargado incorrectamente.

Para determinar el impacto de la delección de  $\alpha$  sobre la actividad de edición exclusivamente, se realizaron experimentos de desacilación del tRNA (apartado 2.6.2). En estos ensayos el sustrato de la reacción es Ser-tRNA<sup>Thr</sup> en el que el aminoácido está marcado radiactivamente con <sup>14</sup>C, lo que permite monitorizar la destrucción del aminoacil-tRNA como efecto de la actividad de edición. Los ensayos de desacilación de las distintas versiones de T2 aparecen en la Figura 3.21.B. La versión carente del dominio de edición no presenta actividad de corrección por lo que su curva solapa con la del control negativo sin enzima. Es importante destacar que la versión T2- $\Delta\alpha$  presenta una mayor actividad de edición que la proteína T2. Estos resultados sugieren que la delección de  $\alpha$  restituye la capacidad correctora de T2 e indican que es esta inserción la responsable de la reducida capacidad de edición de T2.

### 3.11.2.- Parámetros de cinética enzimática y coeficiente de selectividad de T1 y T2

En toda célula es necesario asegurar la carga del tRNA con su aminoácido legítimo para mantener la fidelidad de la traducción del mensaje genético. Por ello, la deficiente capacidad de edición de T2 y su elevada producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> parecía compatible con sus incapacidad para sustituir a T1 mediante ingeniería genética (apartado 3.8). Sin embargo, nuestros resultados habían demostrado un papel preponderante de T2 en la aminoacilación de tRNA<sup>Thr</sup> en deficiencia de zinc (apartado 3.9), lo que nos llevó a explorar la posibilidad de que esta enzima presentase otro tipo de mecanismo para mantener la fidelidad en la carga del tRNA.

En algunas aaRSs mitocondriales, como la PheRS y la LeuRS, se ha demostrado que la degeneración del dominio de edición y la consiguiente pérdida de su actividad se compensa con

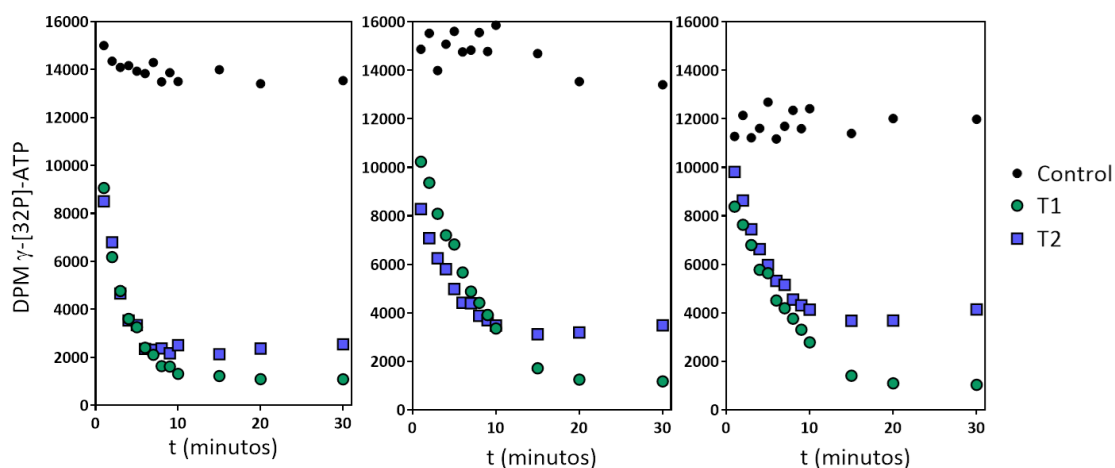


un aumento de la selectividad del sitio catalítico (Lue & Kelley, 2005; Karkhanis *et al.*, 2006) que presenta una afinidad por el aminoácido legítimo varios órdenes de magnitud superior a la de aminoácidos ilegítimos. Esta diferencia de afinidad conlleva la producción predominante de la especie legítimamente cargada del tRNA  $\gamma$ , y, por tanto, el mantenimiento de la fidelidad en la carga del aminoácido sin que medien mecanismos de edición (Reynolds *et al.*, 2010a). Esto indica que una deficiente actividad de edición no necesariamente implica la producción de aminoacil-tRNA cargado ilegítimamente.

Para analizar si éste podría ser también el caso de T2, se calcularon los parámetros cinéticos de las enzimas T1 y T2 mediante ensayos de intercambio ATP-PP<sub>i</sub>, que miden la activación del aminoácido con ATP, esto es, la primera parte de la reacción de aminoacilación.

Para el cálculo de las constantes cinéticas de T1 y T2, ambas se purificaron en columnas de estreptavidina a partir de cultivos de 500 mL de las estirpes sobreexpresoras. Durante la purificación se utilizó en todo momento tampón suplementado con 5  $\mu\text{M}$  de ZnSO<sub>4</sub> y las preparaciones de proteínas se resolvieron en geles de SDS-PAGE para comprobar su pureza. Para la cuantificación precisa de la concentración de proteína bioquímicamente activa en las preparaciones, se realizaron ensayos de titulación de sitio activo (descritos en el apartado 2.6.3) cuyos resultados se muestran en la Figura 3.22.

Para el cálculo de la  $K_M$  por los aminoácidos treonina y serina se realizaron los ensayos de intercambio ATP-PPi descritos en el apartado 2.6.3. En cada ensayo se probaban ocho concentraciones de aminoácido y se repitieron tres veces. En la Figura 3.23.A se presentan los resultados obtenidos.



	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Media
<b>T1</b>	1,53 $\mu\text{M}$	1,55 $\mu\text{M}$	1,44 $\mu\text{M}$	<b>1,51 <math>\mu\text{M}</math></b>
<b>T2</b>	1,74 $\mu\text{M}$	1,73 $\mu\text{M}$	1,65 $\mu\text{M}$	<b>1,7 <math>\mu\text{M}</math></b>

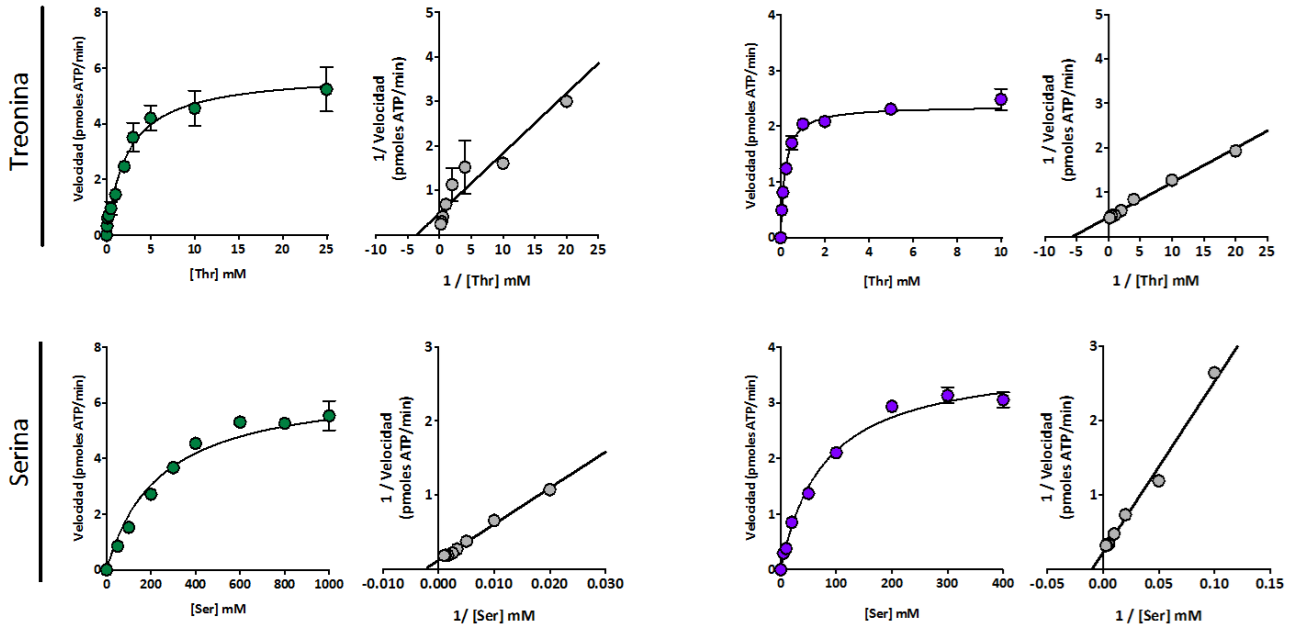
**Figura 3.22.** Titulación del sitio activo de preparaciones de T1 y T2. Réplicas de los ensayos de titulación de sitio activo utilizando 2  $\mu\text{M}$  de T1 y T2. En la tabla inferior aparecen los valores de concentración de enzima activa calculados, así como la media de las tres repeticiones.



**A**

**Treonil-tRNA sintetasa 1**

**Treonil-tRNA sintetasa 2**



**B**

	Treonina			Serina			Coeficiente de especificidad Thr/Ser
	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (pmol <sub>ATP</sub> · s <sup>-1</sup> )	$K_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (pmol <sub>ATP</sub> · s <sup>-1</sup> )	$K_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	
<b>T1</b>	3,05 ± 0,56	6,78 ± 1,9	12,32 ± 3,45	338,6 ± 104,17	7,73 ± 1,29	3,51 ± 0,58	<b>388,69</b>
<b>T2</b>	0,22 ± 0,03	2,44 ± 0,09	4,43 ± 0,17	80,68 ± 12,63	3,87 ± 0,35	3,52 ± 0,31	<b>459,31</b>

**C**

	<u>[Thr] (mM)</u>	<u>[Ser] (mM)</u>	<u>[Thr]/[Ser]</u>	Coeficiente de selectividad Thr/Ser
	<b>-TPEN</b>	1,91±0,03	0,810±0,024	
<b>+TPEN</b>	4,1±0,3	3,5±0,09	1,17±0,08	<b>T2</b> 511

**Figura 3.23. Constantes de cinética enzimática de T1 y T2. (A)** Representación de la velocidad de T1 y T2 frente a la concentración de aminoácido treonina o serina. En cada panel aparece la representación de Michaelis-Menten y la de Lineweaver-Burk. **(B)** Parámetros enzimáticos de las enzimas T1 y T2. El coeficiente de especificidad se calculó como se indica en el texto. **(C)** Concentración de los aminoácidos serina y treonina en presencia o ausencia de TPEN. El coeficiente de selectividad Thr/Ser para las enzimas T1 y T2 se calculó como se indica en el texto.

El valor de la  $K_M$  de T2 para la treonina (220  $\mu\text{M}$ ) se encuentra en el orden del valor descrito para la ThrRS de *E. coli*. Sin embargo el valor obtenido para T1, del orden de 3 mM, resultaba sorprendentemente alto. Estos resultados indican que T1 presenta una afinidad por la treonina casi un orden de magnitud por encima de T2. La velocidad máxima de T1 es, sin embargo, en torno al doble que la de T2. Para la serina se determinó una  $K_M$  de 340 mM para T1 y de 80 mM para T2, dos órdenes de magnitud superiores a la del aminoácido legítimo.

Estos valores nos permiten calcular el *Coficiente de Especificidad* de T1 y de T2 por los aminoácidos treonina y serina. Este coeficiente sirve para estimar la afinidad relativa de las enzimas por el aminoácido legítimo e ilegítimo y evaluar si la enzima presenta una selectividad suficiente como para discriminar entre ambos y mantener la fidelidad en la carga del tRNA o si por el contrario la tasa de incorporación errónea es lo suficientemente alta como para requerir de actividad de edición. El coeficiente de especificidad Thr/Ser se calculó como el cociente entre la eficiencia catalítica (que se define como  $k_{cat}/K_M$ ) de los dos aminoácidos (Figura 3.23.B). *In vivo*, la discriminación entre aminoácidos similares depende también de la concentración relativa de los mismos. Para indagar si las concentraciones de los aminoácidos treonina y serina se veían modificadas condiciones de deficiencia de zinc se calculó la concentración de ambos en presencia y ausencia de 20  $\mu\text{M}$  de TPEN y se calculó el coeficiente de selectividad, que se define como el coeficiente de especificidad multiplicado por el ratio Thr/Ser. Para T1 se utilizó el ratio Thr/Ser en ausencia del quelante, mientras que para T2 se utilizó el ratio Thr/Ser tras la adición de TPEN, a fin de reflejar mas fielmente la situación en la que ambas enzimas actúan (Figura 3.23.C).

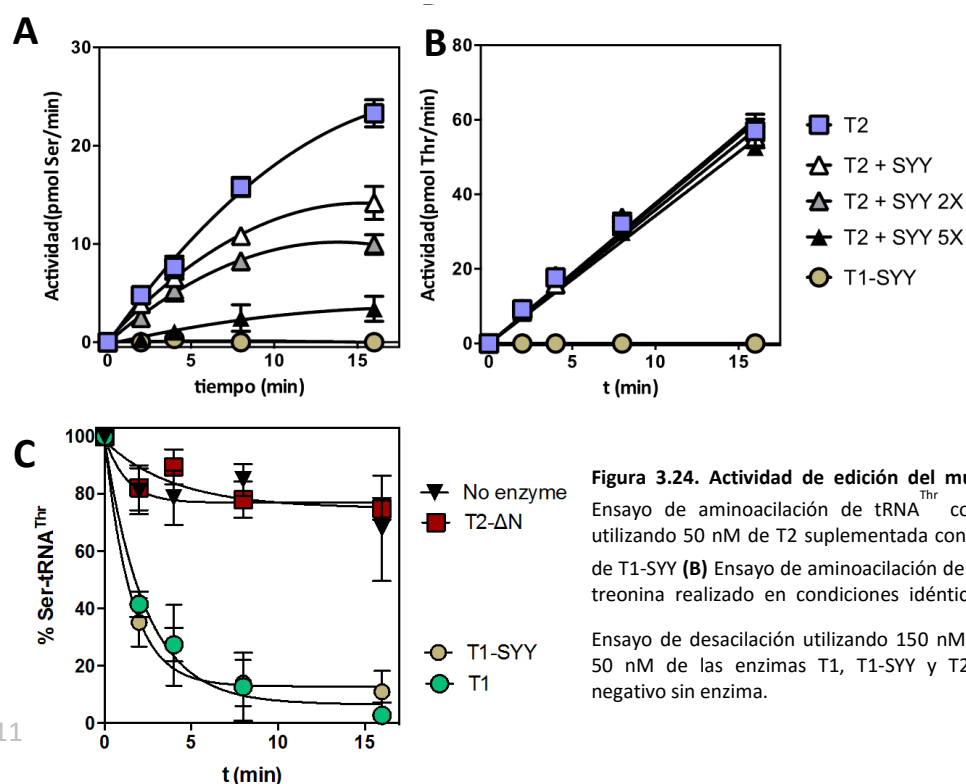
Los coeficientes de selectividad obtenidos para T1 y T2 indican que estas enzimas activan una molécula de serina por cada 400 o 500 moléculas de aminoácido que entran en el sitio activo, lo que refleja una baja especificidad para ambas enzimas, muy alejada de la que se espera de una enzima de alta especificidad que no necesita de mecanismos de corrección, cuyo coeficiente de especificidad debe ser como mínimo  $3 \cdot 10^3$  para mantener la tasa de fidelidad de la traducción a niveles aceptables para la vida (Fersht, 1977). Estos resultados justifican, por tanto, la necesidad de actividad correctora en T1 e indican que en la evolución de T2 la degeneración del dominio de edición de T2 no se ha visto compensada con el desarrollo posterior de una alta especificidad del sitio activo, como se ha propuesto para la PheRS y LeuRS mitocondriales.

### 3.11.3.-Estudio de mecanismos adicionales de edición

La reducida actividad de edición de T2, junto la baja selectividad de su sitio activo sugería que en condiciones de baja disponibilidad de zinc, en las que esta enzima es la ThrRS preponderante, debería existir algún mecanismo de corrección para mantener la fidelidad del proceso de traducción. En la literatura se han descrito varios sistemas de corrección que

funcionan a través de proteínas independientes a la aaRSs que hidrolizan tRNAs cargados con aminoácidos ilegítimos en *trans*, esto es, una vez que el aminoacil-tRNA ha sido liberado por la aaRS. Debido a que la expresión de T1 no es nula en condiciones de bajo zinc, es esperable que T2 coexista en el citoplasma con algunas subunidades de T1, lo que nos llevó a probar si T1 podría ejercer el papel de factor de corrección en *trans*. Para un acercamiento *in vitro* se consideró que la versión mutante T1-SYY era la más apropiada para tales experimentos ya que es incapaz de unir el cofactor metálico y carece de actividad de aminoacilación, por lo que mimetiza la forma en que se encuentra la proteína T1 *in vivo* en deficiencia de zinc. Se realizaron ensayos de aminoacilación ilegítima de tRNA<sup>Thr</sup> con serina catalizados por la proteína T2 en presencia de distintas cantidades de T1-SYY. Como se observa en la Figura 3.24.A, T1-SYY no produce Ser-tRNA<sup>Thr</sup> mientras T2 muestra una actividad elevada. Por otro lado, se observó que la producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> por parte de T2 disminuía de forma proporcional a la concentración de T1-SYY en el ensayo. Para descartar que ello se debiera a una posible inhibición de la actividad catalítica de T2 por parte de T1-SYY se realizó un ensayo paralelo de aminoacilación de tRNA<sup>Thr</sup> con treonina (Figura 3.24.B) en el que se observó que la actividad de T2 no se ve afectada por la presencia de T1-SYY.

Estos resultados sugerían que T1-SYY podría estar hidrolizando Ser-tRNA<sup>Thr</sup> producido por T2. Para comprobar esto de forma directa se realizaron ensayos de desacilación de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> catalizada por T1 o el mutante T1-SYY. Como se observa en la Figura 3.24.C, la proteína T1-SYY conserva intacta su actividad de edición respecto a la proteína silvestre T1, a pesar de que su actividad sintética es inerte. Estos resultados apoyan la hipótesis de que *apo*-T1 podría funcionar *in vivo* en deficiencia de zinc como un factor de edición en *trans* corrigiendo los tRNA<sup>Thr</sup> ilegítimamente cargados con serina que produce T2.



**Figura 3.24. Actividad de edición del mutante T1-SYY.** (A) Ensayo de aminoacilación de tRNA<sup>Thr</sup> con 120 μM serina utilizando 50 nM de T2 suplementada con 50, 100 o 250 nM de T1-SYY (B) Ensayo de aminoacilación de tRNA<sup>Thr</sup> con 20 μM treonina realizado en condiciones idénticas al anterior. (C) Ensayo de desacilación utilizando 150 nM [<sup>14</sup>C]-Ser-tRNA<sup>Thr</sup> y 50 nM de las enzimas T1, T1-SYY y T2-ΔN y un control negativo sin enzima.

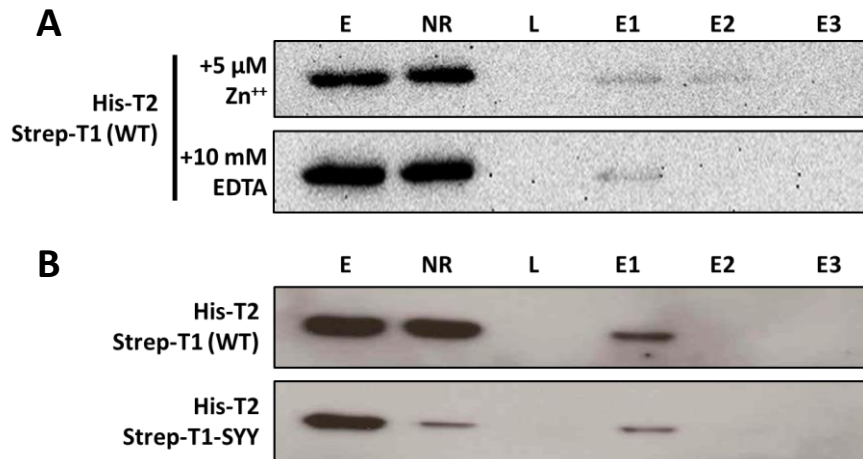
### 3.12.-Análisis de la capacidad de heterodimerización de T1 y T2 en condiciones de deficiencia de zinc

Estudios previos de nuestro grupo habían puesto de manifiesto la capacidad de T1 y T2 de formar heterodímeros cuando se expresan en un sistema heterólogo (*E. coli*). También se había demostrado la existencia de heterodímeros en *Anabaena* mediante su purificación a partir de células tratadas con TPEN (Napolitano, 2013). Si bien estos experimentos demuestran la existencia de heterodímeros T1-T2 en *Anabaena* en deficiencia de zinc, no estaba claro si en éstos T1 estaba en su forma *apo*. Por ello, se decidió estudiar si las subunidades de T1 requieren del cofactor metálico para heterodimerizar o si por el contrario pueden asociarse con T2 en su forma *apo*.

Para ello se utilizó una estirpe de *E. coli* BL21(DE3) portadora del plásmido pCMN30, que porta bajo un promotor inducible por IPTG, las ORFs de T2 y T1 en tándem, fusionadas a etiquetas de hexahistidina y Strep-Tag-II, respectivamente. Tras la inducción con IPTG, la fracción soluble del lisado celular se dividió en dos alícuotas: una de ellas se suplementó con 5  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, mientras que la otra se suplementó con 10 mM EDTA. Tras 16 horas de incubación a 4°C, ambas preparaciones se purificaron utilizando columnas de estreptavidina (es importante destacar que para la preparación suplementada con 5 mM EDTA, este quelante se añadió asimismo a todos los tampones) y las fracciones de elución se analizaron mediante inmunodetección por *Western Blot* (apartado 2.4.6) utilizando anticuerpos dirigidos específicamente contra la etiqueta de hexahistidina. En la Figura 3.25.A. se detecta la presencia de His-T2 tanto en las fracciones de la purificación suplementada con zinc como en la suplementada con EDTA, lo que indica que la formación de heterodímeros no depende del estado de metalación de ambas enzimas.

Para corroborar estos resultados, se utilizó la estirpe de *E. coli* BL21(DE3) portadora del plásmido pCi20, idéntica a la estirpe pCMN30, pero que porta la ORF de la versión mutante T1-SYY. Ambas estirpes se indujeron con IPTG y, tras la lisis celular, la fracción soluble se purificó utilizando columnas de estreptavidina y las fracciones de la purificación se sometieron a *Western blot* con anticuerpos específicos anti-hexahistidina. Tal y como se muestra en la Figura 3.25.B, se detecta señal tanto en las fracciones de la purificación de pCMN30 como de pCi20. Estos resultados sugieren que la modificación alostérica producida por la pérdida del cofactor metálico en T1 no impide la formación de heterodímeros.





**Figura 3.25. Copurificación de T1 y T2 de células de *E. coli*.** (A) 1,5 mL del extracto clarificado de la estirpe BL21 (DE3, pCMN30) que sobreexpresa Strep-T1 e His-T2 se incubaron con en tampón W suplementado con 5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  o 10 mM EDTA durante 16 horas, y se purificaron en columnas de estreptavidina usando en la cromatografía los respectivos tampones indicados anteriormente. Los paneles muestran las imágenes del análisis mediante *Western Blot* de las fracciones de la cromatografía usando un anticuerpo contra la etiqueta de hexahistidina. (B) 1,5 mL del extracto clarificado de la estirpe BL21 (DE3, pCMN30) o la estirpe BL21 (DE3, pCi20) que sobreexpresa Strep-T1-SYY e His-T2 se purificaron en columnas de estreptavidina y las fracciones se analizaron mediante *Western Blot* usando un anticuerpo contra la cola de hexahistidina como se indica arriba. E: Extracto clarificado, NR: Fracción no retenida, L: Fracción de lavado, E1-E2: Fracciones de elución.

### 3.13.-Análisis filogenético de los genes de *thrS* duplicados en cianobacterias

Desde la publicación del estudio filogenético que motivó esta investigación (Luque *et al.*, 2008) se ha incrementado sustancialmente el número de genomas cianobacteriados secuenciados. Con el objetivo de obtener una visión más actualizada y fidedigna de la distribución filogenética de las *thrS* duplicadas en genomas cianobacterianos, se realizó un árbol filogenético con todos los genomas de cianobacterias depositados en la base de datos JGI. (Figura 3.26).

El árbol filogenético muestra una distribución variable de ambas enzimas. Los únicos grupos que contienen exclusivamente una versión de tipo T1 son los géneros *Gloebacter* y los *Synechococcus* de Yellowstone, consideradas las especies cianobacterianas que primero diversificaron. Los géneros *Pseudonanabaena*, los *Synechococcus* marinos, los cloroplastos de plantas y algas y el *phylum* de las Melainabacterias contienen exclusivamente una versión de tipo T2, que presenta una inserción a de menor tamaño (1-5 aminoácidos) o ausente. En el resto de grupos de cianobacterias se encuentran de manera dispersa géneros que contienen T1 en exclusiva o géneros que contienen ambas. Por último, destaca la presencia de una ThrRS en el género *Prochlorococcus* con un origen filogenético diferente emparentada con genes *thrS* de proteobacterias.

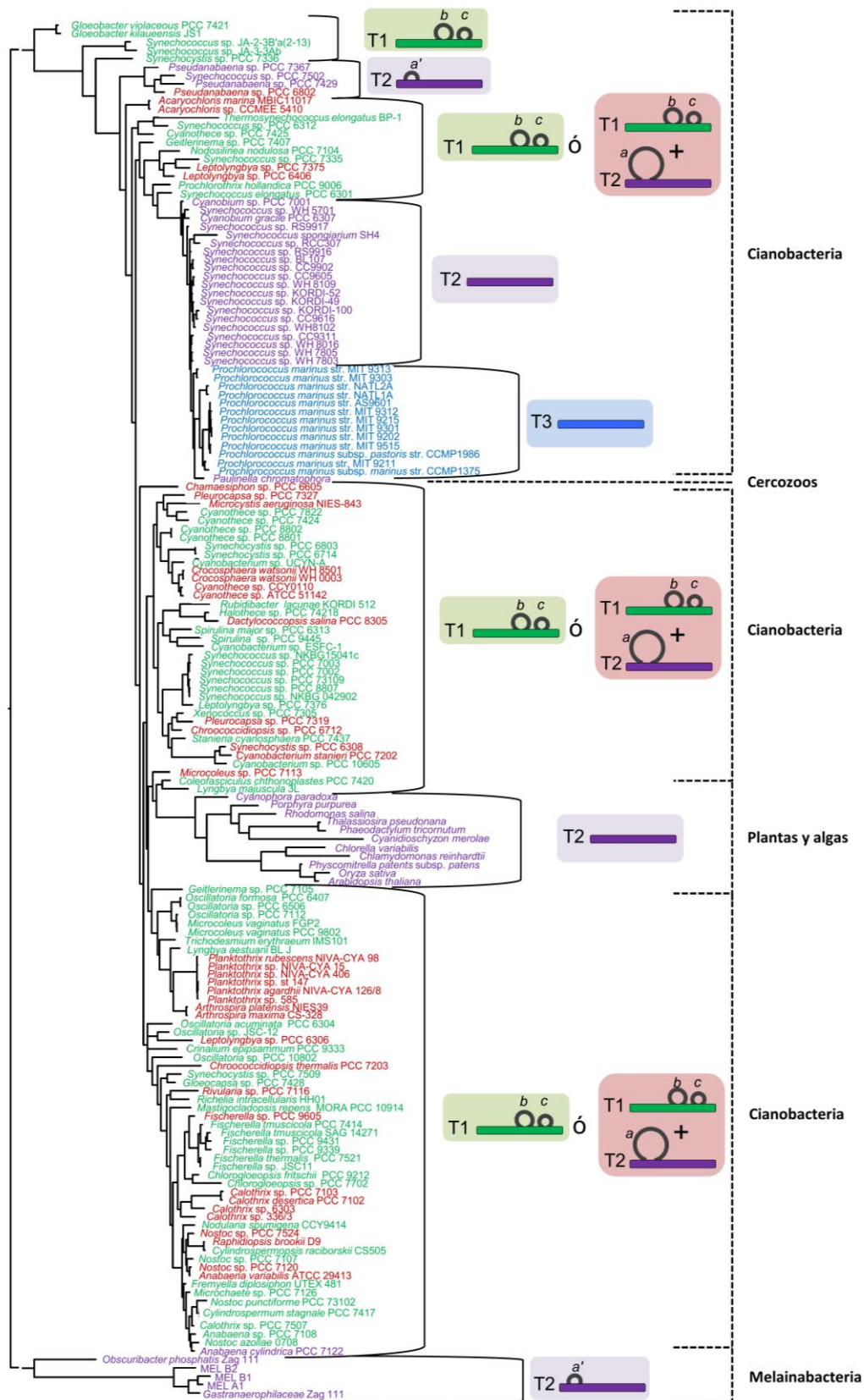


Figura 3.26. Árbol filogenético de los genes *thrS* de cianobacterias y melainabacteria basado en el rRNA 16S. Aparece en verde las especies que contienen exclusivamente T1 y en morado las que contienen solo T2. En rojo se marcan aquellas especies que contienen una copia de cada gen. La presencia de la inserción en el dominio de edición de T2 aparece marcada con un círculo y anotada como *a* cuando es de gran tamaño (20-22 aminoácidos) o *a'* cuando es pequeña (1-5 aminoácidos). En azul aparece el gen *thrS* de tipo proteobacteriano adquirido por transferencia horizontal (T3).





## **4 D**ISCUSIÓN

## 4.1.- La homeostasis del zinc en *Anabaena*

### 4.1.1- Identificación del regulador del operón *all4725-all4721*

En este trabajo hemos identificado la proteína All2473 como el regulador del operón *all4725-all4721*. De las tres proteínas de la familia FUR codificadas en el genoma de *Anabaena*, solo All2473 (FurB) demostró ser capaz de unirse al promotor de *all4725* en experimentos *in vitro* (Figura 3.3). Estudios realizados por otros miembros del grupo (Napolitano, 2013) determinaron que la unión de este regulador al DNA depende específicamente de un cofactor de zinc, lo que permitió identificar la proteína FurB como el regulador Zur (*zinc uptake regulator*) de *Anabaena*. Las proteínas Zur son dímeros de pequeño tamaño que funcionan como represores transcripcionales dependientes de zinc (Gaballa & Helmann, 1998; Moore & Helmann, 2005; Barnett *et al.*, 2012; Choi & Bird, 2014).

En el operón *all4725-all4721*, además del promotor situado inmediatamente aguas arriba de *all4725* al que se une Zur, se habían identificado tres promotores internos mediante experimentos de 5' RACE (Napolitano *et al.*, 2013). En este trabajo se muestran experimentos de transcripción *in vitro* (IVT) que corroboran que tales secuencias en presencia de la RNA polimerasa de *Anabaena* tienen actividad promotora (Figura 3.4), la cual desaparece al mutar uno de los dos hexámeros de reconocimiento de la polimerasa.

Se había comprobado que de los cuatro promotores del operón *all4725-all4721*, Zur se unía *in vitro* a dos de ellos, P5, que precede a *all4725* y P3, que precede a *all4723*. Asimismo se había observado que los cuatro promotores del operón respondían *in vivo* a la concentración de zinc mostrando el mismo patrón de regulación. Sin embargo, *in vitro* Zur no se unía o lo hacía muy débilmente a los promotores P2, que precede a *all4722* y P1, que precede a *all4721* (Napolitano *et al.*, 2013). Ello planteaba la incógnita del papel de Zur en la regulación de estos dos promotores. En este trabajo se ha demostrado mediante experimentos de IVT que Zur regula el promotor P3 pero no el P2 ni el P1 (Figura 3.5). Otros acercamientos de nuestro grupo *in vivo* e *in vitro* han permitido corroborar estos resultados y plantear un modelo según el cual la transcripción desde los promotores P2 y P1 depende de la llegada de complejos de elongación procedentes de promotores situados aguas arriba, lo que hace que *in vivo* el patrón de expresión de P2 y P1 mimetice el de P5 y P3 (Napolitano *et al.*, 2013).

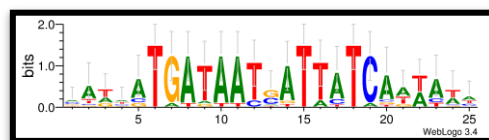
D

#### 4.1.2- El regulón Zur

La unión directa de Zur a las secuencias promotoras de P5 y P3 observada en los experimentos de EMSA e IVT demostraba que estos genes formaban parte del regulón Zur. La búsqueda en el genoma de *Anabaena* de secuencias similares a la secuencia diana del promotor P5 mediante procedimientos bioinformáticos permitió la identificación de 33 posibles dianas de Zur. Los análisis mediante Q-PCR demostraron que 11 de esas dianas funcionaban *in vivo* como sitios de unión de Zur, ya que el gen inmediato aguas abajo se encontraba permanentemente desreprimido en el mutante de delección  $\Delta zur$  (Tabla 3.2). La identificación de éstos genes ha permitido deducir la secuencia consenso de unión del regulador (TGATAATnATTATCA) mediante el alineamiento de los sitios de unión de Zur detectados en su zona promotora (Tabla 4.1). Esta secuencia posee una estructura palindrómica de tipo 7-1-7, coherente con la secuencia de unión de Zur descrita en otros organismos (Tabla 4.2) y es idéntica a la secuencia óptima de unión

Gen	Producto	Nivel de	Possible diana de Zur
<i>alr1197</i>	<i>CobW-C superfamily</i>	12,5±6,9	ctgcaTGAAAATGATTATCAtttaa
<i>all1474</i>	<i>CRISPR-associated RAMP protein, SSO1426</i>	2,1±0,7	tcttcTGATATTGATTCTCAatcctt
<i>all1751</i>	<i>Putative metallochaperone</i>	3,1±1,0	ataggTGATAATGATTATCcgatg
<i>alr2866</i>	<i>Glycosyl transferase, family 2</i>	3,1±2,3	agaaaTGTTAATCATTTCAAAAA
<i>alr3242</i>	<i>TonB-dependent transporter (outer)</i>	117,6±31,2	aaacaTGATAATCATTATCAAAAA
<i>alr3495</i>	<i>Uncharacterized conserved protein</i>	2,8±1,4	aataaTGATAACCTTTATCAaaaac
<i>all3515</i>	<i>Putative outer membrane protein</i>	262,7±36,8	gattaTGATAATCATTATCGgaagt cttgcTGATTATGATAATCAttatc
<i>alr4028-4029</i>	<i>TonB-dependent transporter (outer membrane)</i>	10,4±3,9	cagtgTGATAATAATAATCAttatc gataaTAATAATCATTATCTaaaca
<i>all4723</i>	<i>Threonyl-tRNA synthetase</i>	34,1±15,6	taacaTGATAACGATTCTCAttatt
<i>all4725</i>	<i>Porphobilinogen synthase</i>	159,8±38,2	cattaTGATAATGGTTATCAatcctt
<i>all0833</i>	<i>Periplasmic solute binding protein</i>	51,0±8,8	gagaaTGAGAATTATTATAAtataa

**Tabla 4.1.-Secuencia consenso de unión de Zur.** Listado con los genes desreprimidos en el mutante  $\Delta zur$ , los niveles de inducción respecto al silvestre y la(s) posible(s) secuencia(s) de unión de Zur. En la parte inferior de la tabla aparece la secuencia consenso generada con el software WebLogo.



Organismo	Secuencia	Referencia
<i>Anabaena_7120</i>	----TGATAATGGTTATCA----	(Napolitano <i>et al.</i> , 2012)
<i>B_subtilis</i>	TAAATCGTAAT-ATTACGATTTA	(Gabriel <i>et al.</i> , 2008)
<i>S_aureus</i>	TAAATCGTAATNATTACGATTTA	(Panina <i>et al.</i> , 2003)
<i>L_monocytogenes</i>	TAAATCGTAATNATTACGATTTA	(Panina <i>et al.</i> , 2003)
<i>N_meningitidis</i>	----TGTATDNHATAACA----	(Pawlik <i>et al.</i> , 2012)
<i>Y_Pestis</i>	--AATGTTATAATATAACA----	(Li <i>et al.</i> , 2009)
<i>E_coli</i>	GAAATCTTATAWTATAACATTTTC	(Patzner & Hantke, 2000)
<i>V_colerae</i>	GAAATCTTATAWTATAACATTTTC	(Panina <i>et al.</i> , 2003)
	* ** * ** *	

**Tabla 4.2.-Secuencias de unión del regulador Zur de distintos organismos.** Aparecen resaltados en color verde los residuos conservados y de color amarillo los nucleótidos en los que se conserva la naturaleza de la base (púrica o piridimínica).

(aquella a la que Zur se une con mayor afinidad) identificada por otros miembros del laboratorio mediante métodos empíricos (Napolitano *et al.*, 2013).

El estudio de los genes adyacentes a los directamente regulados por Zur nos ha permitido detectar algunos genes que se cotranscriben con alguno de los 11 genes que cuentan con un promotor regulado por Zur y que por consiguiente forman también parte del regulón Zur. En total, este trabajo ha desvelado la existencia de 23 genes regulados por Zur, 18 de ellos organizados en 6 operones y otros 5 formando unidades transcripcionales aisladas (Figura 3.6 y Tabla 3.4). El tamaño del regulón Zur en *Anabaena* está en el orden de los regulones Zur descritos en otros organismos, como *M. tuberculosis* (32 genes) (Maciąg *et al.*, 2007), *N. meningitidis* ( 17 genes ) (Pawlik *et al.*, 2012) o *C. glutamicum* ( 9 genes) (Schröder *et al.*, 2010). Se ha descrito que en *Yersinia pestis* (Li *et al.*, 2009) y *Streptococcus suis* (Feng *et al.*, 2008), el regulón Zur comprende 154 y 121 genes, respectivamente, pero es necesario resaltar que no se ha demostrado que todos estos genes sean diana del regulador y por tanto algunos autores consideran que estas cifras suponen una sobreestimación del tamaño del regulón. Hasta la fecha, el regulador Zur de *Anabaena* es el único regulador de esta familia cuyo regulón y modo de acción han sido caracterizados empíricamente en cianobacterias.

El análisis del regulón Zur de *Anabaena* permite clasificar los genes que lo componen en cuatro categorías atendiendo a la posible función y localización subcelular de sus productos:

**Categoría I: Genes que codifican parálogos de metaloproteínas de zinc:** Entre los genes regulados por Zur en el genoma de *Anabaena* existen varios, como *all4725*, *all4723* o *all4721* del operón 1, para los que se encuentra en el genoma un homólogo que se expresa constitutivamente a alto nivel (Napolitano, 2013) y codifica una proteína estrictamente dependiente de zinc (*alr4380*, *alr0315* y *all5287*, respectivamente). Ello sugiere que estos últimos podrían ser los genes de mantenimiento (*housekeeping genes*) que mantienen la función en condiciones de suficiencia de zinc mientras sus respectivos homólogos regulados por Zur podrían actuar solo en condiciones de deficiencia. Este modelo de funcionamiento ha sido bien documentado en otras bacterias, en las que se ha demostrado la sustitución de proteínas dependientes de zinc por otras independientes de este metal en condiciones de deficiencia (Jaffe, 2000; Panina *et al.*, 2003; Blatzer *et al.*, 2011). Hemos podido determinar que en *Anabaena* un caso similar es el del gen *all4725* (*hemE*) regulado por Zur que codifica una porfobilinógeno sintasa independiente de zinc que une potasio o magnesio. En cambio, su homólogo no regulado (*all4380*) codifica una porfobilinógeno sintasa estrictamente dependiente de zinc (Jaffe, 2003). Sorprendentemente, algunas proteínas reguladas por Zur como T2 (All4723) o FoIE2 (All4721)

conservan los residuos de coordinación de zinc, al igual que sus homólogos no regulados. En estos casos no es tan intuitivo cómo contribuyen estas proteínas a la adaptación a la deficiencia y es necesaria una caracterización empírica. En este trabajo se ha dilucidado el modo de funcionamiento de la pareja de homólogos T1-T2 y se ha comprobado que no sólo la proteína regulada por Zur (T2), sino también su homólogo T1, cooperan para la adaptación a la deficiencia de zinc.

**Categoría II: Genes que codifican posibles metalochaperonas:** Las metalochaperonas son proteínas que se encargan, bien de asegurar que las metaloproteínas adquirieran el metal adecuado (Okamoto *et al.*, 2010), o de evitar que determinados metales ocupen inespecíficamente sitios destinados a otros (Totter *et al.*, 2012). En un ambiente empobrecido en zinc, es necesario evitar que proteínas que utilicen zinc capturen en su lugar otro metal. Dos de los genes regulados por Zur (*all4722* y *all1751*) codifican proteínas de la familia COG0523 (Gabriel *et al.*, 2008; Haas *et al.*, 2009), algunas de las cuales funcionan como metalochaperonas-insertasas dependientes de GTP como UreG e HypB, que insertan de níquel en la maduración de la ureasa y la hidrogenasa, respectivamente (Haas *et al.*, 2009). Un aspecto particular de algunos miembros de la familia COG0523, compartido por *all4722* y *all1751*, es la existencia de una secuencia de alto contenido en residuos de histidina (19 residuos en el caso de *all4722*) que podría estar involucrada en la unión de metales.

**Categoría III: Genes que codifican componentes de sistemas de transporte de tipo ABC de la membrana plasmática:** Los transportadores de tipo ABC constan generalmente de cinco subunidades: una subunidad homodimérica anclada a la membrana, una subunidad homodimérica citoplasmática, con función ATPasa y una subunidad periplásmica encargada de la unión al sustrato (Dassa *et al.*, 1999). Un ejemplo es el transportador de zinc ZnuABC, que se ha detectado en este trabajo. Un resultado muy llamativo es que los genes *znuBC* presentan un nivel de inducción similar, mientras que *znuA* (que cifra el componente periplásmico) se induce considerablemente menos. Al analizar los valores absolutos de inducción (es decir, los valores de  $\Delta CT$  en vez del  $\Delta\Delta CT$ ) se observó que esta diferencia obedecía al elevado nivel de expresión basal de *znuA* en el silvestre, mientras que en el mutante  $\Delta zur$  los tres genes mostraban un nivel de expresión similar.

Los genes que codifican las subunidades de los transportadores ABC suelen aparecer en tándem en el genoma lo que obedece a la necesidad de una expresión coordinada. Esta es la disposición de los genes que codifican los sistemas de transporte *alr3240-alr3243* (operón 4) y

*alr4031-alr4033* (operón 5). Llama la atención, sin embargo, que en el mutante  $\Delta$ *zur* solamente se observa inducción de la subunidad periplásmica de éstos, pero no del resto de los componentes. La contribución de estas subunidades a la aclimatación a la deficiencia de zinc deberá ser evaluada mediante métodos empíricos.

**Categoría IV: Genes que codifican posibles proteínas extracitoplasmáticas:** Las proteínas ancladas en la membrana externa tienen contacto directo con el exterior celular, y podrían estar implicadas en la captación de trazas de zinc remanentes en el medio. Hemos encontrado dos genes, *all3242* y *alr4028-4029* (éste último aparece anotado incorrectamente como dos ORF distintas), que codifican transportadores de la membrana externa dependientes de TonB (TBDT, *TonB-dependent transporters*). Estas proteínas tienen estructuras tipo barril- $\beta$  y funcionan como transportadores específicos dependientes de energía implicados en la importación de moléculas de cierto tamaño, como los sideróforos y la cobalamina. La energía necesaria para la importación es transmitida al transportador por TonB, una proteína que está situada en la membrana plasmática formando un complejo con las proteínas ExbB y ExbD y que posee un dominio que atraviesa el periplasma (Noinaj *et al.*, 2010). Nuestro trabajo ha puesto de manifiesto la posible implicación de TBDTs en el transporte de zinc, algo que sólo se ha descrito recientemente en un patógeno de humanos (Stork *et al.*, 2010).

De los genes del regulón Zur, *all3515* es el que presenta un mayor nivel de inducción (~300) (Figura 3.6). Este gen cifra una proteína hipotética sin función conocida y posee un dominio PEP-CTERM cuya función no ha sido caracterizada empíricamente, pero se ha propuesto que podría funcionar de forma análoga al dominio LPXTG de bacterias Gram-positivas (Haft *et al.*, 2006). En éstas, una proteína llamada exosortasa situada en la membrana plasmática reconoce e hidroliza el péptido LPXTG y media la exportación del resto de la proteína al exterior (Craig *et al.*, 2011; Haft *et al.*, 2011).

Resultados recientes de nuestro grupo demuestran que All3515 está implicada en la homeostasis de zinc en *Anabaena*, ya que un mutante de delección presenta un fenotipo de sensibilidad a agentes quelantes y una mayor resistencia a concentraciones elevadas de zinc, pero no de otros metales (Rubio, Santamaría-Gómez & Luque manuscrito en preparación). En base a estas observaciones y a su posible localización extracitoplásmica, proponemos que All3515 podría actuar secuestrando iones de zinc extracitoplásmicos. Actualmente se trabaja en la determinación de su localización subcelular. Hay que destacar que All3515 es la primera proteína de este tipo para la que se demuestra un papel en la adaptación a la deficiencia de zinc.

#### 4.1.3.- Modelo de adaptación a la deficiencia de zinc en *Anabaena*

El análisis de los genes del regulón Zur y de sus productos proteicos permite delinear la estrategia general de adaptación a la deficiencia de zinc en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Figura 4.1.). Cuando el metal empieza a ser limitante, el regulador Zur se despega del ADN, permitiendo la expresión de genes involucrados en la importación de zinc. Estos genes cifran transportadores tipo ABC de la membrana plasmática, como el importador ZnuABC, transportadores de la membrana externa dependientes de TonB (TBDT) y la proteína extracitoplásmica All3515. Estos sistemas tienen la función de capturar e importar las trazas de zinc del exterior. El agrupamiento de genes de TBDTs en operones con genes que cifran componentes de transportadores tipo ABC sugiere la necesidad de la actuación coordinada de sistemas de importación de la membrana externa y de la membrana plasmática para el trasiego de zinc desde el medio extracelular hasta el citoplasma. La acción coordinada de transportadores en ambas membranas para la importación de metales han sido previamente observadas y descritas en otras bacterias Gram-negativas (Ferguson & Deisenhofer, 2004). En el citoplasma de *Anabaena*, la respuesta a la deficiencia implica la expresión de proteínas que usan cofactores alternativos al zinc, como la profobilínogeno sintasa All4725 dependiente de Mn o K, lo que contribuye a reducir la demanda celular de zinc. También se inducen proteínas como T2 (All4723) cuya función en la adaptación se ha puesto de manifiesto en este trabajo o FoIE (All4721) cuyo papel está por determinar. Se expresan, asimismo, posibles metalochaperonas que probablemente median el tránsito de zinc en el citoplasma y aseguran su inserción en las proteínas adecuadas. A pesar de que la identidad de los genes regulados por Zur nos permite delinear la respuesta global de *Anabaena* a la deficiencia de zinc, no se descarta la participación de elementos no identificados en este análisis.

Aparte de los genes regulados por Zur identificados en este trabajo se han descrito recientemente otros genes de *Anabaena* que se encuentran inducidos en un mutante  $\Delta zur$  (Sein-Echaluze *et al.*, 2015). Estos genes codifican proteínas implicadas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y se ha propuesto que son dianas directas de Zur aunque no se ha caracterizado la secuencia de unión de Zur en sus promotores. Previamente se había descrito que en determinadas condiciones, la proteína Zur de *Anabaena* se une inespecíficamente al DNA y se ha propuesto que ello podría ser parte de un mecanismo de defensa del material genético frente al daño inducido por estrés oxidativo (López-Gomollón *et al.*, 2009). Ello indica que en *Anabaena* Zur podría ser una proteína multifuncional que regula específicamente los genes de la homeostasis del zinc, induce genes de protección frente al daño oxidativo y protege físicamente al DNA.

D

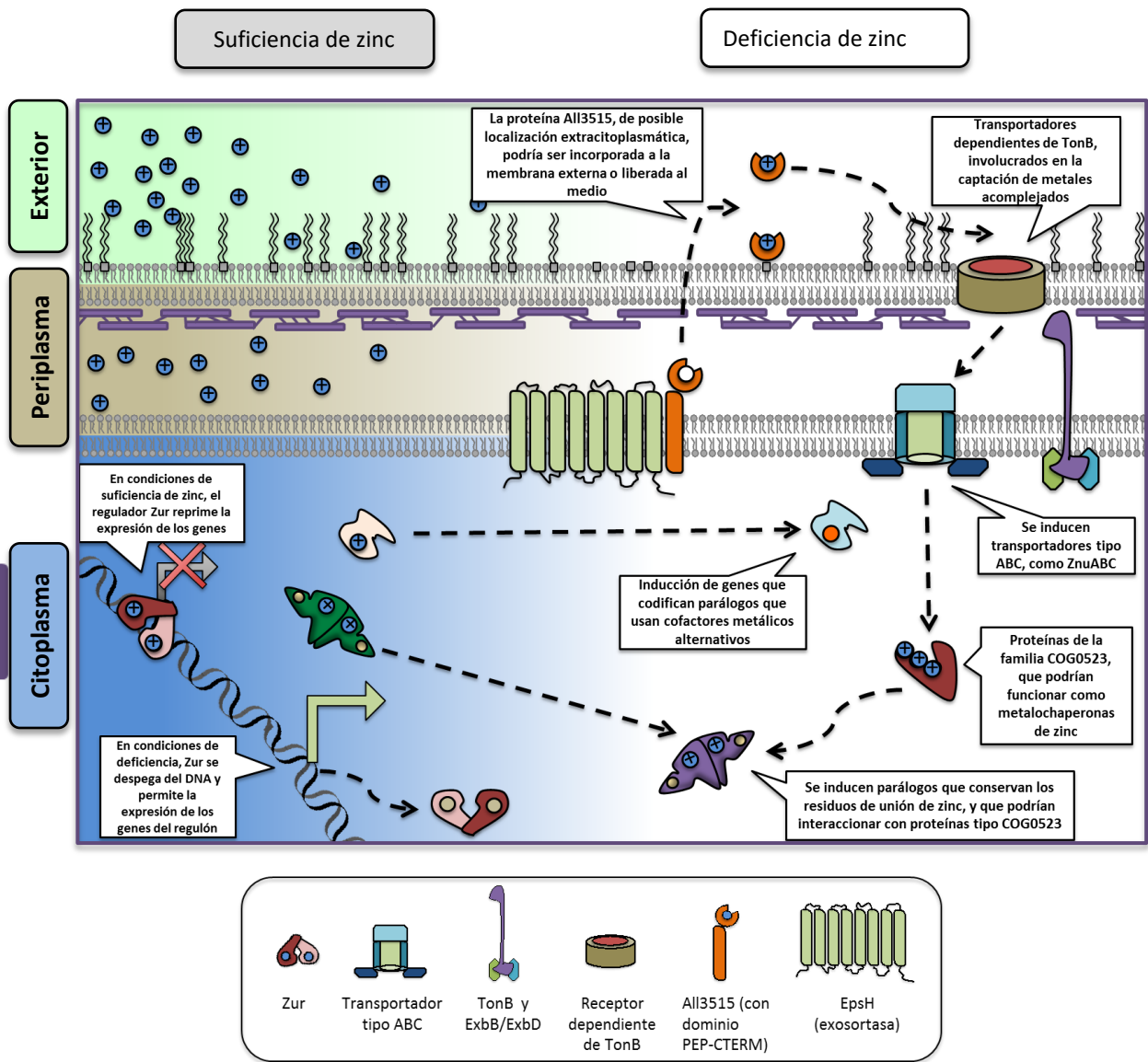


Figura 4.1.-Aclimatación a la deficiencia de zinc en *Anabaena* PCC7120: Modelo del proceso de adaptación a la deficiencia de zinc mediado por los genes regulados por Zur (detalles en el texto principal).



### 4.2.1- Origen y evolución de *thrS1* y *thrS2*

La duplicación génica es uno de los motores de la evolución (Innan & Kondrashov 2010). En este proceso, una parte o la totalidad del genoma se duplica y esta duplicación se fija en la población. A pesar de que estos fenómenos puedan tener un coste selectivo, ya que un incremento en el material genético aumenta el gasto energético de la replicación, la duplicación de genes puede ofrecer dos grandes ventajas: por una parte puede suponer un beneficio a corto plazo por del incremento de dosis génica (Conant & Wolfe, 2008; Innan & Kondrashov, 2010) y por otra parte, puede propiciar a largo plazo un incremento de la variabilidad a través de la divergencia de los genes duplicados, que en determinados casos puede culminar con la adquisición de nuevas funciones (Sikosek *et al.*, 2012). La mayoría de los modelos recientes de evolución de genes duplicados considera las duplicaciones neutrales, al menos *ab initio*, y como consecuencia la mayor parte de ellas se pierden por acumulación de mutaciones e inactivación de uno de los genes (Conant & Wolfe, 2008). La duplicación génica es un fenómeno frecuente en la evolución de las aminoacil-tRNA sintetasas, y ha jugado un importante papel en su generación y diversificación (Ribas de Pouplana & Schimmel 2000, 2001; Woese 2000) (apartado 1.3.1). El análisis filogenético de los genes *thrS* en cianobacterias determinó la división de éstos en dos grupos, *thrS1* y *thrS2* (Luque 2008). Una diferencia clave entre ambos es la presencia de tres secuencias características, la inserción *a* en *thrS2* y las inserciones *b* y *c* en *thrS1* (Figura 3.18). El grado de similitud y la presencia o ausencia de estas inserciones permite la clasificación inequívoca de un gen en una u otra categoría, lo que facilita su análisis evolutivo. La presencia de un gen de tipo *thrS1* en *Gloebacter violaceus* y los *Synechococcus* de Yellowstone, consideradas las especies cianobacterianas que diversificaron de manera más temprana, sugiere que éste era el gen original. Sin embargo, las *Melainobacteria*, un *phylum* hermano de las cianobacterias, poseen un gen de tipo *thrS2* (Figura 3.26). Esta observación sugiere que la duplicación ocurrió antes de la diversificación de cianobacterias y melainobacterias hace unos  $2,45-2,3 \times 10^9$  años (Ochoa de Alda, comunicación personal; Schirmermeister *et al.*, 2011, 2013), aunque esta hipótesis requiere de un análisis evolutivo en profundidad. Es necesario destacar que *Prochlorococcus*, un género de cianobacterias marinas extremadamente abundante en los océanos, posee un único gen *thrS* similar al de proteobacterias, probablemente adquirido por transferencia horizontal y que presumiblemente desplazó los genes *thrS* cianobacterianos (Zhaxybayeva *et al.*, 2006; Luque *et al.*, 2008). De las especies de cianobacterias con genoma secuenciado, un 40% conserva sólo el gen *thrS1*, un 20% sólo *thrS2* y en torno a un 30% conserva ambos (Figura 1.14). El mantenimiento

de ambos genes en el genoma de estas especies a lo largo de miles de millones de años evidencia el éxito evolutivo de la duplicación.

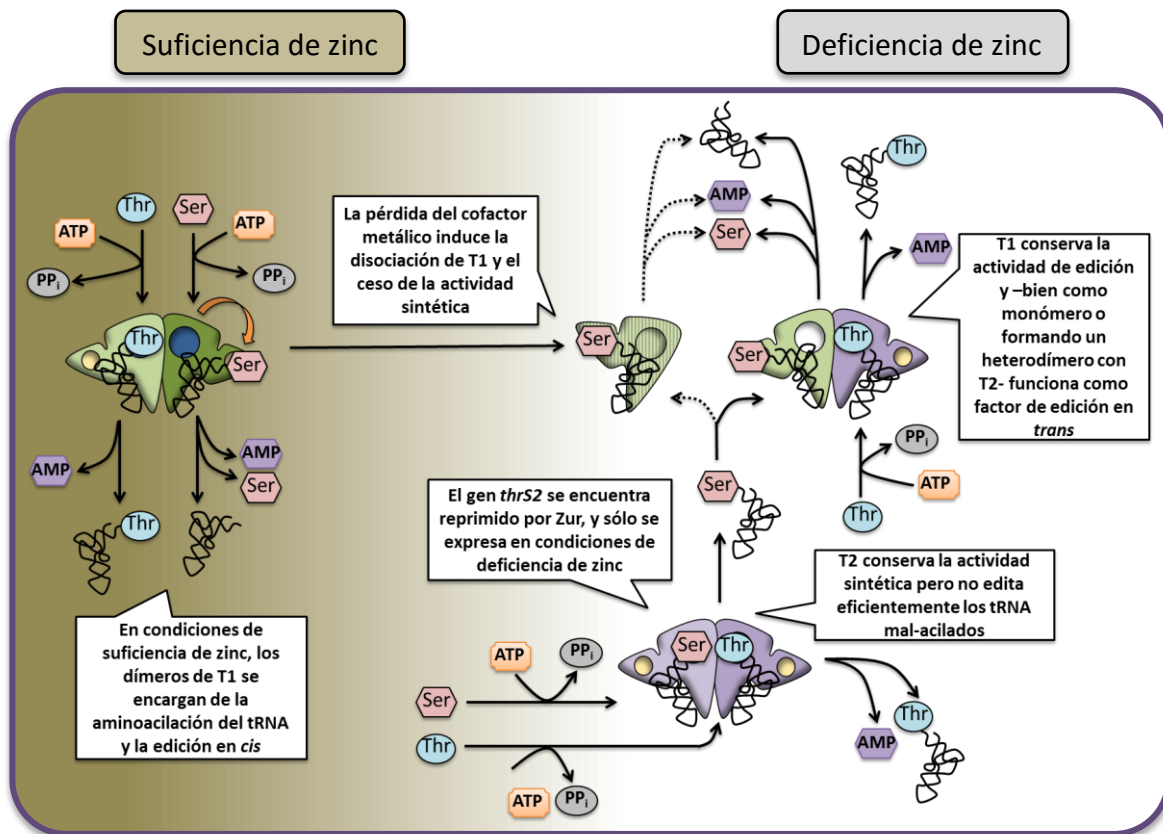
#### 4.2.2.- Modelo de funcionamiento del sistema T1-T2

Tras la duplicación, los genes *thrS* de cianobacterias han evolucionado de forma divergente adquiriendo rasgos diferenciales. El patrón de expresión observado junto a la imposibilidad de generar estirpes de *Anabaena* mutantes de *thrS1*, sugiere que *thrS1* es el gen principal encargado de aminoacilar el tRNA en condiciones normales (*housekeeping gene*) mientras que *thrS2* restringe su función a las condiciones de deficiencia de zinc (Figura 3.8). Ello también es consistente con los resultados de experimentos de geles ácidos de poli(acrilamida-urea) y de crecimiento en medio sólido suplementado con TPEN, que demuestran que T2 es la enzima encargada de la aminoacilación del tRNA<sup>Thr</sup> en condiciones de deficiencia de este metal (Figura 3.9). Los resultados obtenidos permiten proponer un modelo de funcionamiento del sistema T1-T2 durante la aclimatación a las condiciones de deficiencia de zinc que se expone a continuación.

En condiciones de suficiencia de zinc, la actividad de aminoacilación es responsabilidad exclusiva de T1, ya que el gen *thrS2* se encuentra reprimido por Zur. T1 concentra las actividades de aminoacilación del tRNA y de edición en *cis* de Ser-tRNA<sup>Thr</sup>. La disminución en la disponibilidad de zinc induce la separación de Zur de la región promotora de *thrS2*, lo que permite su expresión. En estas condiciones, T1 pierde el cofactor metálico lo que provoca su disociación y la pérdida de su actividad sintética. Las subunidades de *apo*-T1 forman heterodímeros con subunidades de T2. Puesto que el nivel de expresión de T2 es mayor al de T1, en deficiencia de zinc el citoplasma probablemente cuenta con una población de homodímeros de T2 y heterodímeros *apo*-T1-T2. Ello es consistente con la estequiometría de las subunidades observada al purificar T2 de células de *Anabaena* en deficiencia de zinc (Napolitano, 2013). Las subunidades de T2 son las responsables de la carga del tRNA<sup>Thr</sup> en condiciones de deficiencia de zinc pero tienen una actividad de edición defectiva, por lo que producen Ser-tRNA<sup>Thr</sup> a una tasa relativamente elevada. Las subunidades de *apo*-T1 recapturan estos tRNAs mal-acilados y los editan en *trans*, siendo responsables de la fidelidad en la carga del tRNA en estas condiciones. (Figura 4.2)

No se ha identificado el mecanismo que permite a T2 conservar el cofactor metálico en condiciones de deficiencia de zinc. Los experimentos de competición con quelantes revelan que T1 y T2 presentan una afinidad similar por el zinc (Figura 3.11 y 13) y ambas son capaces de remetalarse tras cinco minutos de incubación, lo que descarta diferencias en cuanto a velocidad de captura del cofactor (Figura 3.12). Nuestros experimentos *in vitro* no favorecen la idea de que T2 sea capaz de utilizar un metal alternativo, aunque no se puede descartar que use otro cofactor no probado en nuestro ensayo (Figura 3.14). Una hipótesis muy atractiva es que T2 podría

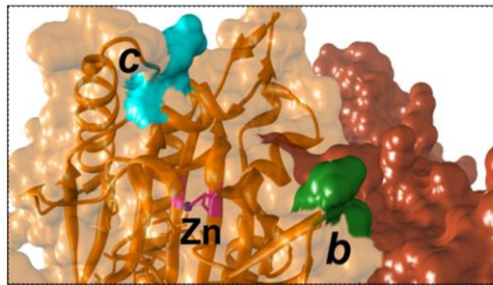
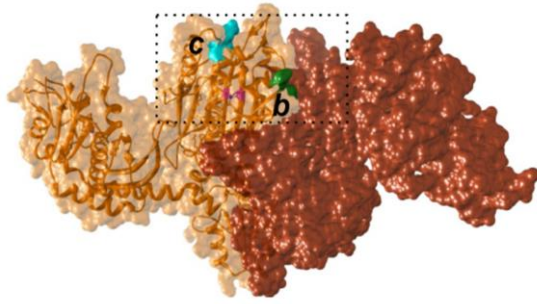
interaccionar con alguna metalochaperona para la inserción de zinc. Un posible candidato es All4722, cuyo gen es vecino y se cotranscribe con *thrS2*. Resultados no publicados de nuestro grupo demuestran que un mutante del gen *all4722* está afectado en su crecimiento en medio suplementado con TPEN, un fenotipo similar al de los mutantes *thrS2*.



**Figura 4.2.-Modelo de funcionamiento del sistema T1-T2:** Esquema del funcionamiento concertado de las enzimas T1 y T2 de *Anabaena* durante la aclimatación a la deficiencia de zinc (detalles en el texto principal). En línea discontinua aparece la ruta de edición del monómero apo-T1, cuya presencia no ha sido confirmada empíricamente, pero que podría existir de forma transitoria.

#### 4.2.3- Control alostérico de la oligomerización de T1

A diferencia de T2 y de las otras ThrRSs descritas hasta la fecha (Sankaranarayanan *et al.*, 1999; Arnez *et al.*, 2000; Torres-Larios *et al.*, 2002; Dwivedi *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2012) (Figura 3.15) que sólo existen en estado dimérico, T1 oscila entre dos estados según la ocupación del sitio de coordinación metálico del centro activo (Figura 3.15 y 3.16). El fenómeno es reversible y no es específico de zinc ya que metales como cadmio o cobre son capaces de inducir la dimerización de T1, aunque ello no va acompañado de la recuperación de la actividad enzimática (Figura 3.17). La disociación de T1 por la pérdida del zinc no ocurre como en otras metaloproteínas en las que el metal actúa como una grapa molecular uniendo monómeros adyacentes, pues en T1 la distancia entre el sitio de coordinación del metal y la superficie de dimerización es de unos 15 Å, lo que descarta una interacción directa entre el cofactor metálico y la superficie de dimerización (Sankaranarayanan *et al.*, 1999). Por tanto, la regulación por zinc del



**Figura 4.3.-Localización de las inserciones *b* y *c* en T1.** Representación tridimensional de la ThrRS de *S. aureus* (PDB: 1NYR) en la que se resalta en verde los residuos que flanquean la posición que ocupa la inserción *b* en *Anabaena* y en azul los residuos que conforman la inserción *c*. En magenta se resaltan los residuos de coordinación del zinc.

estado oligomérico de T1 constituye genuinamente un fenómeno alostérico. Plausiblemente, la pérdida del zinc induce un cambio conformacional que se inicia localmente en el bolsillo de coordinación y se propaga hacia la superficie de dimerización promoviendo la disociación.

La estructura cuaternaria de T2 es por el contrario independiente del estado de ocupación del sitio de coordinación. La comparación de las secuencias de ambas proteínas puso de manifiesto la existencia de dos inserciones, *b* y *c*, presentes en T1 y ausentes en T2. La eliminación de una de ellas o ambas provoca que T1 permanezca en forma dimérica incluso en ausencia del cofactor metálico (Figura 3.19), lo

que sugiere que dichas inserciones participan en la propagación del cambio conformacional desde el bolsillo de coordinación hacia la superficie de dimerización, de modo que su eliminación en los mutantes T1- $\Delta b$ , T1- $\Delta c$  o T1- $\Delta b,c$  cortocircuita la propagación. Es muy interesante la localización de las inserciones *b* y *c* en la estructura tridimensional. Mientras que *b* está próxima a la superficie de dimerización, *c* se encuentra en la zona exterior de la entrada del sitio activo y no ocupa una posición intermedia entre el bolsillo de zinc y la superficie de dimerización, por lo que su papel en la transmisión del cambio conformacional es poco intuitivo (Figura 4.3). No obstante, estudios sistemáticos globales han determinado que frecuentemente, residuos alejados a la superficie de oligomerización juegan un papel importante en la dinámica de la estructura cuaternaria de numerosas proteínas (Perica *et al.*, 2014).

Es muy importante destacar que *apo*-T1 puede dimerizar con una subunidad de T2, lo que implica que la superficie de dimerización de T2 es capaz de acomodar los cambios conformacionales que la pérdida del cofactor de zinc induce sobre la superficie de dimerización de T1.

#### 4.2.4- La fidelidad de la enzima T2

Aunque ambas enzimas T1 y T2 son capaces de realizar la aminoacilación del tRNA<sup>Thr</sup>, el gen *thrS2* es incapaz de sustituir a *thrS1* en *Anabaena*. Esto evidencia que ambas enzimas poseen

capacidades funcionales ligeramente diferentes y no redundantes. El análisis detallado de las constantes cinéticas de T1 y T2 pone de manifiesto diferencias importantes entre ambas enzimas (Figura 3.23). Llama la atención la elevada  $K_M$  de T1 para la treonina (aprox 3 mM), mientras que el valor de  $K_M$  de T2 para este aminoácido está en el orden del descrito para la enzima de *E. coli* (aprox. 0,2 mM). A pesar de que T1 muestra una constante catalítica ( $k_{cat}$ ) doble a la de T2, la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de T2 es cinco veces mayor que la de T1. Ello induce a especular que es posible que la población de T2 sea parciamente inactiva en deficiencia de zinc, quizá porque sólo una parte de la población porta zinc en el sitio activo, por lo que se necesita que la subpoblación de enzima activa tenga una alta eficiencia catalítica. Es importante destacar que la elevada  $K_M$  de T1 para la treonina está en el orden de la concentración de dicho aminoácido en el citoplasma de células en suficiencia o deficiencia de zinc (1-4 mM). Ninguna de estas diferencias explica la incapacidad de T2 de sustituir a T1, que realmente deriva de la reducida fidelidad de T2. Esta enzima porta una inserción de 20 aminoácidos en el dominio N2 (Figura 3.18) próxima a los motivos HxxxH y DxCRGPH importantes para la actividad de edición (Dock-Bregeon *et al.*, 2004). Los ensayos de carga de tRNA<sup>Thr</sup> con el aminoácido ilegítimo serina demuestran que T2 produce tRNA mal-acilado (Ser-tRNA<sup>Thr</sup>) a una tasa considerablemente superior a su homólogo T1 (Figura 3.20) y los ensayos de desacilación de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> indican que ello se debe a la presencia de  $\alpha$ , ya que su delección mejora la actividad de edición de T2 (Figura 3.21). Este experimento constituye lo que en Biología evolutiva se denomina una *resurrección artificial de un dominio extinto*, que regenera la hipotética actividad de edición de la enzima ancestral T2.

T2 es por tanto una enzima de baja fidelidad, propensa a cometer errores. Algunas especies de cianobacterias, como los *Synechococcus* marinos o el género *Pseudoanabaena* poseen solamente una ThrRS de tipo T2 (Figura 1.14). Es interesante destacar que en estas especies T2 no presenta la inserción  $\alpha$  o ésta es de reducido tamaño (6-7 aminoácidos) y probablemente la enzima conserva intacta la actividad de edición. La ThrRS presente en los cloroplastos de algas y plantas es, asimismo, de tipo T2 y carece de la inserción  $\alpha$ . Esta observación sugiere que la actividad de edición de T2 es un rasgo sometido a una fuerte presión selectiva cuando T2 es la única ThrRS presente.

La incapacidad de T2 de editar puede conllevar importantes efectos adversos si el tRNA mal-acilado se incorpora a la síntesis proteínas. Se ha descrito que algunas aaRSs mitocondriales, como la PheRS y la LeuRS, que en su evolución han perdido su actividad de edición *post-transfer* por la degeneración del dominio de edición, compensan dicha pérdida con un aumento de la selectividad del sitio catalítico por el aminoácido legítimo (Reynolds *et al.*, 2010b; Lue & Kelley, 2005; Karkhanis *et al.*, 2006). Estas enzimas muestran un coeficiente de selectividad de 4000

(LeuRS) o 7000 (PheRS), lo que está en consonancia con la tasa global de error en la traducción (Kramer & Farabaugh, 2007), por lo que no requieren de mecanismos de edición adicionales. T1 y T2 presentan sin embargo un coeficiente de selectividad de en torno a 400 (Figura 3.23), lo que demuestra que estas enzimas no han evolucionado de la misma forma que las enzimas mitocondriales y evidencia la necesidad de mecanismos de edición para evitar la producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup>.

Otras aaRSs defectivas en edición *post-transfer*, como la PheRS de *Mycoplasma* limitan la producción de tRNAs mal-acilados mediante mecanismos de discriminación basados en el incremento de la velocidad de transferencia del aminoácido legítimo al tRNA (Ebel *et al.*, 1973; Yadavalli & Ibba, 2012b). También se ha descrito que aaRSs defectivas de edición *post-transfer*, como la ThrRS mitocondrial, mantienen baja su tasa de error mediante edición *pre-transfer* (Ling *et al.*, 2012). En este trabajo no se han analizado estos mecanismos que, de existir en T2, no parecen ser capaces de evitar la producción de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> *in vitro* (Figuras 3.20 y 3.21) y posiblemente tampoco *in vivo* dada la incapacidad de T2 para suplantar a T1, lo que sugiere que tales mecanismos están ausentes en T2 o no son suficientemente eficaces para mantener la fidelidad en la carga del tRNA<sup>Thr</sup>.

#### 4.2.5.- Cambios funcionales asociados al estado de oligomerización de T1

La pérdida del cofactor metálico conlleva la disociación de los dímeros de T1 y la pérdida de su actividad sintética (Figuras 3.15 y 3.16). Para mimetizar el estado *apo* de T1, en este trabajo se ha utilizado la proteína T1-SYY, mutante en los residuos de coordinación e incapaz de unir zinc. T1-SYY no forma homodímeros y carece de actividad sintética, pero conserva su actividad de edición intacta y puede hidrolizar Ser-tRNA<sup>Thr</sup> producido por T2 en experimentos *in vitro* (Figura 3.24A-C). Nuestros resultados indican que las subunidades de *apo*-T1 realizan esta misma función *in vivo* en el contexto de los heterodímeros *apo*-T1-T2. En éstos, la edición de Ser-tRNA<sup>Thr</sup> producido por T2 sólo puede ocurrir en *trans* puesto que la elevada distancia entre el sitio activo de la subunidad T2 y el sitio de edición de *apo*-T1 no permite la translocación del brazo aceptor. Por tanto, el Ser-tRNA<sup>Thr</sup> producido por T2 tiene que ser liberado y recapturado por *apo*-T1 que lo hidroliza de modo similar a lo descrito para la PheRS de *E. coli* (Ling *et al.*, 2009). *Apo*-T1 estaría funcionando por tanto como un factor de edición en *trans* de modo similar a los factores de la superfamilia INS, AlaX, o ThrRS-ed o a las aaRSs de clase II PheRS y ProRS (An & Musier-Forsyth, 2004; Ling *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Novoa *et al.*, 2015).

Se puede decir pues que los heterodímeros *apo*-T1-T2 muestran asimetría estructural, al estar compuestos por subunidades distintas, y funcional, dado que una subunidad (T2) realiza la función de aminoacilación y la otra (*apo*-T1) la de edición. En este trabajo no hemos podido

detectar la existencia de *apo*-T1 en forma monomérica pero no se puede descartar su existencia, al menos de forma transitoria, tras la disociación de T1. Estas subunidades *apo*-T1 en forma monomérica también podrían funcionar potencialmente como factores de edición en *trans*.

De lo expuesto anteriormente se puede deducir que la proteína T1 se encuentra en dos estados funcionales dependiendo de la disponibilidad de zinc. En suficiencia de zinc T1 se encuentra en un estado metalado dimérico (*holo*-T1) en el que funciona como una ThrRS dotada de actividad sintética y de edición (en *cis*), mientras que en deficiencia de zinc se encuentra en un estado desmetalado (*apo*-T1) desprovisto de actividad sintética en el que actúa como un factor de edición en *trans*. Por tanto, la ocupación reversible del sitio de coordinación metálico de T1 funciona no sólo como un regulador alostérico de la estructura cuaternaria, sino también como conmutador funcional (*functional switch*). Los cambios funcionales son un fenómeno frecuente entre las aaRSs, algunas de las cuales alternan su función canónica de aminoacilación con funciones diversas (Guo & Schimmel, 2013). Dichos cambios funcionales se desencadenan generalmente por proteólisis de la aaRS, por su modificación post-traducciona, por la producción de una isoforma mediante *splicing* alternativo o por la liberación de la aaRS de algún complejo (Sang *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2010; Ofir-Birin *et al.*, 2013; Frechin *et al.*, 2014). En el caso que se describe aquí, el cambio de función de T1 está controlado por la ocupación del bolsillo de coordinación que determina su estado de oligomerización. Por tanto, el funcionamiento de T1 como aaRSs sintética o como factor de edición está determinado en último término por la disponibilidad de zinc.

#### 4.2.6.- La oligomerización controlada de subunidades de ThrRS duplicadas como mecanismo adaptativo

Los resultados de este trabajo muestran que la combinación de subunidades de ThrRS duplicadas generan dímeros con propiedades fisicoquímicas y funcionales diferentes: homodímeros (T1)<sub>2</sub>, homodímeros (T2)<sub>2</sub> y heterodímeros *apo*-T1-T2. La distribución de las subunidades entre las tres sub-poblaciones está determinada por los niveles de cada una de las dos proteínas, estrechamente controlados por la célula mediante la regulación de su expresión (en el caso de T2, por el regulador Zur). Se puede decir por tanto que en cada situación, la célula controla la composición, abundancia y proporción de los dímeros. Por otra parte, se observa que los dímeros que se encuentran en cada situación son aquellos que mejor se ajustan a las necesidades fisiológicas de la célula en esas condiciones. Por ejemplo, los heterodímeros, específicos de condiciones de deficiencia de zinc, muestran actividad de aminoacilación resistente a las bajas concentraciones de zinc y actividad de edición en *trans*. Se puede decir en suma que la

célula regula en cada situación el ensamblaje de los oligómeros más adecuados a su estado fisiológico, lo que nos permite proponer que el fenómeno de *oligomerización controlada de subunidades de ThrRS duplicadas* que se presenta en este trabajo constituye un verdadero mecanismo de adaptación. Este mecanismo no ha sido descrito en aaRSs de ningún organismo.

La extensa distribución de genes *thrS* duplicados en cianobacterias hace pensar que éste puede ser un fenómeno extendido este *phylum*, aunque en cada sistema puede haber aspectos particulares cuya caracterización requiere de una aproximación experimental.

#### 4.3.- La oligomerización controlada de subunidades de aaRSs duplicadas como mecanismo general de generación de variabilidad.

Las cianobacterias no son, sin embargo los únicos organismos en los que se encuentran treonil-tRNA sintetasas duplicadas. Un análisis de las bases de datos ha mostrado la existencia de mas de mil genomas que contienen genes *thrS* duplicados. Intrigados por esta abundancia y por la posibilidad de que el mecanismo de oligomerización controlada pudiese ocurrir con otras aaRS, se realizó un rastreo global de genes de aaRSs duplicados en todos los genomas de la base de datos del Joint Genome Institute a fecha de 6 de mayo de 2015 (AspRS, AsnRs, GluRS y GlnRS se excluyeron del análisis por los frecuentes errores de anotación observados y la LysRS de clase I, PylRS y SepRS por estar restringidas a un reducido grupo de arqueas y bacterias). Sorprendentemente, en 26.837 genomas analizados se detectaron 25.913 casos de genes de aaRSs duplicados o triplicados (Anexo I en la versión digital). En la Tabla 4.3 se resumen los resultados de este análisis. Dado que todas las aaRSs de clase II y algunas de clase I son oligoméricas, el mecanismo de oligomerización controlada que se describe en este trabajo podría ocurrir potencialmente en los numerosos organismos que contienen aaRSs oligoméricas duplicadas o triplicadas. En estos casos, el estímulo y la forma de regulación de la oligomerización es probablemente particular de cada sistema y no tiene por qué estar relacionado con la disponibilidad de zinc.

A pesar del elevado número de aaRSs duplicadas, sólo unos pocos casos se han caracterizado empíricamente (Saluta & Hirshfield, 1995; Becker & Kern, 1998; Jarvest *et al.*, 2002; Kitabatake *et al.*, 2002; Gentry *et al.*, 2003; Skouloubris *et al.*, 2003; Salazar *et al.*, 2003; Vecchione & Sello, 2009; Zeng *et al.*, 2009; Ataide *et al.*, 2009; Rudolph *et al.*, 2010; Chen & Herrup, 2012; Williams-Wagner *et al.*, 2015). En general en todos estos trabajos se observa una tendencia a la especialización de las enzimas duplicadas, de modo que éstas muestran distinto perfil de expresión, especificidad de sustrato, resistencia a inhibidores o resistencia a temperaturas elevadas.



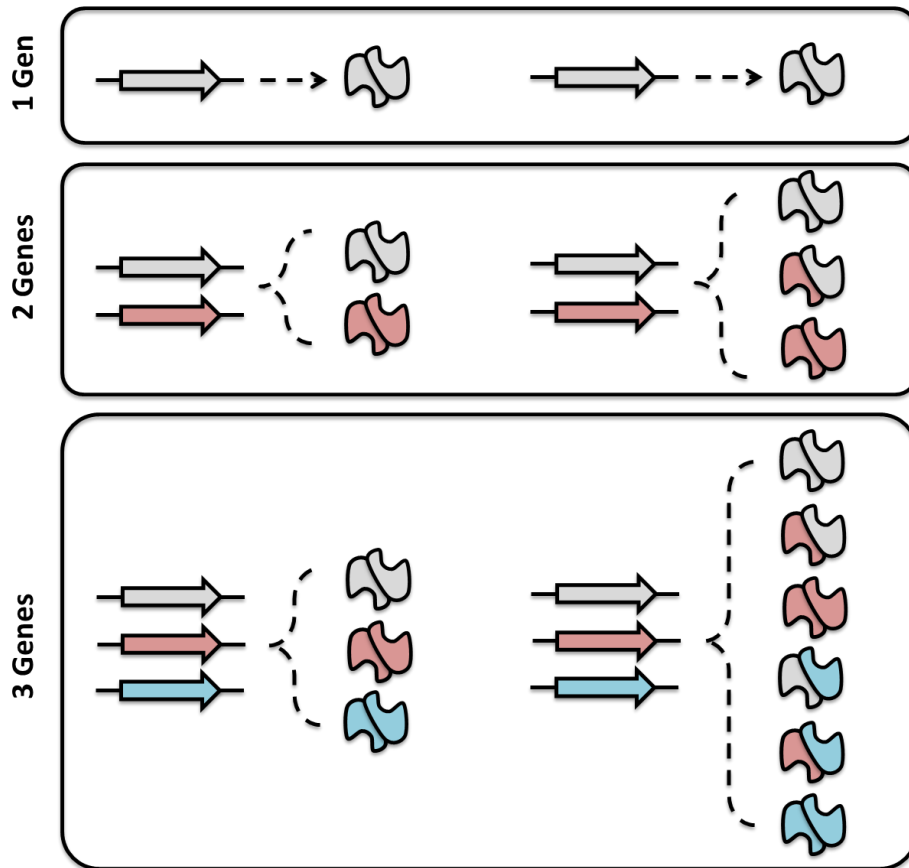
aaRS	Clase	Est. 4º	Bacterias	Arqueas	Eucariotas
ArgRS	1a	M	790	1	78
CysRS	1a	M/D ( $\alpha 2$ )	2778	14	68
IleRS	1a	M	705	2	147
LeuRS	1a	M	199	84	129
MetRS	1a	M/D ( $\alpha 2$ )	925	2	138
ValRS	1a	M	281	2	86
TrpRS	1c	D ( $\alpha 2$ )	2889	10	159
TyrRS	1c	D ( $\alpha 2$ )	1808	17	150
AlaRS	2a	M/D ( $\alpha 2$ )	4172	0	116
GlyRS(sub. $\alpha$ )	2a	D ( $\alpha 2$ )/T ( $(\alpha\beta) 2$ )	50	0	1
GlyRS(sub. $\beta$ )	2a	D ( $\alpha 2$ )/T ( $(\alpha\beta) 2$ )	32	0	5
GlyRS	2a	D ( $\alpha 2$ )/T ( $(\alpha\beta) 2$ )	20	4	39
HisRS	2a	D ( $\alpha 2$ )	1027	2	109
ProRS	2a	D ( $\alpha 2$ )	1132	15	100
SerRS	2a	D ( $\alpha 2$ )	1098	7	137
ThrRS	2a	D ( $\alpha 2$ )	880	36	55
LysRS-II	2b	D ( $\alpha 2$ )	4173	0	116
PheRS (sub. $\alpha$ )	2c	T ( $(\alpha\beta) 2$ )	67	7	81
PheRS (sub. $\beta$ )	2c	T ( $(\alpha\beta) 2$ )	51	4	18
<b>Total:</b>			<b>23077</b>	<b>207</b>	<b>1732</b>

**Tabla 4.3.-Genes de aaRSs duplicados.** Listado del número de genomas que contienen genes de aaRS duplicados en los tres Reinos de la vida.

Es importante destacar que un aspecto hasta ahora ignorado en la literatura y que se ha puesto de manifiesto en este trabajo es que las aaRSs duplicadas pueden interactuar formando heterodímeros con propiedades diferentes a las de los homodímeros de cada proteína. Ello constituye un mecanismo para generar variabilidad más allá de lo dispuesto en el repertorio genético. Por ejemplo, las células de *Anabaena* no sólo se benefician de la variabilidad que supone poseer dos enzimas para la misma función sino también de la posibilidad de combinar sus productos por oligomerización. Así, de genes duplicados o triplicados se generan respectivamente tres o seis dímeros diferentes (Figura 4.4).

El elevado número de genomas que contienen genes de aaRSs duplicados o triplicados nos permite proponer que el mecanismo de oligomerización controlada que se describe en esta tesis doctoral utilizando como modelo el sistema de ThrRS duplicadas en *Anabaena*, podría ser un mecanismo ampliamente extendido entre las numerosas aaRSs oligoméricas duplicadas de organismos de los tres reinos de la vida y, en términos generales, entre otras proteínas oligoméricas duplicadas. Este mecanismo puede permitir que la célula determine de forma dinámica la composición, abundancia y proporción de los oligómeros más adecuados a sus necesidades en cada situación contribuyendo a aclimatar su funcionamiento a tales condiciones.





**Figura 4.4.-Generación de variabilidad mediante la oligomerización controlada de subunidades.** Esquema que representa el número de oligómeros a partir de uno, dos o tres genes en una situación donde actúe el mecanismo de heterodimerización (derecha) o no (izquierda). Mientras que en el caso en que sólo se puedan formar enzimas homooligoméricas el número de proteínas diferentes es igual al número de genes, en el caso de que se puedan formar heterodímeros el número de combinaciones de oligómeros excede el del número de genes.

# 5 CONCLUSIONES

- i. La proteína AII2743 (FurB) es el regulador Zur en *Anabaena* PCC7120 y su diana consenso es la secuencia TGATAATnATTATCA.
- ii. El regulador Zur controla la transcripción de 23 genes, agrupados en 6 operones y 5 unidades transcripcionales simples que codifican importadores de la membrana externa y la membrana plasmática, metalochaperonas y parálogos de proteínas dependientes de zinc.
- iii. Los genes *thrS1* y *thrS2* derivan de una duplicación génica ancestral y codifican treonil-tRNA sintetetas con perfiles de expresión y propiedades fisicoquímicas y enzimáticas diferenciales.
- iv. En las células de *Anabaena* en suficiencia de zinc, T1 realiza la aminoacilación del tRNA<sup>Thr</sup> y evita la producción de tRNA mal-acilado mediante su actividad de edición en *cis*.
- v. En condiciones de deficiencia, la pérdida del cofactor metálico induce de forma alostérica la disociación de T1.
- vi. T2 se expresa en deficiencia de zinc y conserva la actividad de aminoacilación, pero es una enzima parcialmente defectiva en la edición.
- vii. Las subunidades de apo-T1 forman heterodímeros con subunidades de T2.
- viii. Las subunidades de apo-T1 conservan la actividad de edición, funcionando como factores de edición en *trans*.
- ix. La dinámica de oligomerización de T1 y T2 es un fenómeno controlado por la célula y constituye un mecanismo adaptativo.
- x. El mecanismo de oligomerización controlada es un fenómeno potencialmente extendido entre las numerosas aaRSs duplicadas de organismos de los tres reinos de la vida.



## **6** **B**IBLIOGRAFÍA

- Abreu IA & Cabelli DE (2010) Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim. Biophys. Acta* **1804**: 263-74
- Adams DG, Ashworth D & Nelmes B (1999) Fibrillar array in the cell wall of a gliding filamentous cyanobacterium. *J. Bacteriol.* **181**: 884-92
- Alterio V, Langella E, De Simone G & Monti SM (2015) Cadmium-containing carbonic anhydrase CDCA1 in marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Mar. Drugs* **13**: 1688-97
- An S & Musier-Forsyth K (2004) Trans-editing of Cys-tRNA<sup>Pro</sup> by *Haemophilus influenzae* YbaK protein. *J. Biol. Chem.* **279**: 42359-62
- Arif A, Jia J, Mukhopadhyay R, Willard B, Kinter M & Fox PL (2009) Two-Site Phosphorylation of EPRS Coordinates Multimodal Regulation of Noncanonical Translational Control Activity. *Mol. Cell* **35**: 164-180
- Armbruster U, Labs M, Pribil M, Viola S, Xu W, Scharfenberg M, Hertle AP, Rojahn U, Jensen PE, Rappaport F, Joliot P, Dörmann P, Wanner G & Leister D (2013) Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature. *Plant Cell* **25**: 2661-78
- Arnez JG & Moras D (1997a) Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 211-6
- Arnez JG & Moras D (1997b) Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 211-6
- Arnez JG, Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon A-C, Francklyn CS & Moras D (2000) Aminoacylation at the Atomic Level in Class IIa Aminoacyl-tRNA Synthetases. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **17**: 23-27
- Ataide SF, Rogers TE & Ibba M (2009) The CCA anticodon specifies separate functions inside and outside translation in *Bacillus cereus*. *RNA Biol.* **6**: 479-87
- Bai E, Rosell FI, Lige B, Mauk MR, Lelj-Garolla B, Moore GR & Mauk a G (2006) Functional characterization of the dimerization domain of the ferric uptake regulator (Fur) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **400**: 385-392
- Banerjee R, Chen S, Dare K, Gilreath M, Praetorius-Ibba M, Raina M, Reynolds NM, Rogers T, Roy H, Yadavalli SS & Ibba M (2010) tRNAs: Cellular barcodes for amino acids. *FEBS Lett.* **584**: 387-395
- Banik SD & Nandi N (2012) Mechanism of the activation step of the aminoacylation reaction: a significant difference between class I and class II synthetases. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **30**: 701-715
- Barnett JP, Millard A, Ksibe AZ, Scanlan DJ, Schmid R & Blindauer CA (2012) Mining genomes of marine cyanobacteria for elements of zinc homeostasis. *Front. Microbiol.* **3**: 142
- Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S & Blanot D (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 168-207
- Bartholow TG, Sanford BL, Cao B, Schmit HL, Johnson JM, Meitzner J, Bhattacharyya S, Musier-Forsyth K & Hati S (2014) Strictly conserved lysine of prolyl-tRNA synthetase editing domain facilitates binding and positioning of misacylated tRNA<sup>Pro</sup>. *Biochemistry* **53**: 1059-68
- Becker HD & Kern D (1998) *Thermus thermophilus*: a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 12832-7
- Beebe K, Merriman E, Ribas De Pouplana L & Schimmel P (2004) A domain for editing by an archaeobacterial tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 5958-63
- Beebe K, Mock M, Merriman E & Schimmel P (2008) Distinct domains of tRNA synthetase recognize the same base pair. *Nature* **451**: 90-3
- Belin P, Moutiez M, Lautru S, Seguin J, Pernodet J-L & Gondry M (2012) The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Nat. Prod. Rep.* **29**: 961-79
- Berg P (1958) The chemical synthesis of amino acyladenylates. *J. Biol. Chem.* **233**: 608-11
- Bezerra AR, Simões J, Lee W, Rung J, Weil T, Gut IG, Gut M, Bayés M, Rizzetto L, Cavalieri D, Giovannini G, Bozza S, Romani L, Kapushesky M, Moura GR & Santos MAS (2013) Reversion of a fungal genetic code alteration links proteome instability with genomic and phenotypic diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 11079-84
- Bishop AC, Beebe K & Schimmel PR (2003) Interstice mutations that block site-to-site translocation of a misactivated amino acid bound to a class I tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 490-4
- Bishop AC, Nomanbhoy TK & Schimmel P (2002) Blocking site-to-site translocation of a misactivated amino acid by mutation of a class I

- tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 585-90
- Black TA, Cai Y & Wolk CP (1993) Spatial expression and autoregulation of hetR, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol. Microbiol.* **9**: 77-84
- Blatzer M, Binder U & Haas H (2011) The metalloredoxase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation. *Fungal Genet. Biol.* **48**: 1027-1033
- Blindauer C a. (2008) Zinc-handling in cyanobacteria: An update. *Chem. Biodivers.* **5**: 1990-2013
- Blindauer CA, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness PW, Sadler PJ & Robinson NJ (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* **45**: 1421-32
- Bonfils G, Jaquenoud M, Bontron S, Ostrowicz C, Ungermann C & De Virgilio C (2012) Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol. Cell* **46**: 105-110
- Boyer HW & Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-54
- Braz VS, da Silva Neto JF, Italiani VCS & Marques M V (2010) CztR, a LysR-type transcriptional regulator involved in zinc homeostasis and oxidative stress defense in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **192**: 5480-8
- Bullwinkle T, Lazazzera B & Ibba M (2014) Quality Control and Infiltration of Translation by Amino Acids Outside the Genetic Code. *Annu. Rev. Genet.*
- Burnat M, Herrero A & Flores E (2014) Compartmentalized cyanophycin metabolism in the diazotrophic filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 3823-8
- Busenlehner LS, Pennella MA & Giedroc DP (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 131-43
- Camargo S, Valladares A, Flores E & Herrero A (2012) Transcription Activation by NtcA in the Absence of Consensus NtcA-Binding Sites in an *Anabaena* Heterocyst Differentiation Gene Promoter. *J. Bacteriol.* **194**: 2939-2948
- Campbell EL, Brahmasha B & Meeks JC (1998) Mutation of an alternative sigma factor in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* results in increased infection of its symbiotic plant partner, *Anthoceros punctatus*. *J. Bacteriol.* **180**: 4938-41
- Capone DG (1997) *Trichodesmium*, a Globally Significant Marine Cyanobacterium. *Science (80-. )*. **276**: 1221-1229
- Cavet JS, Borrelly GPMM & Robinson NJ (2003) Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 165-181
- Changela A & O'Halloran T V (2003) Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR. *Science (80-. )*. **301**: 1383-1387
- Chen J & Herrup K (2012) Glutamine acts as a neuroprotectant against DNA damage, beta-amyloid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress. *PLoS One* **7**: e33177
- Choi S & Bird AJ (2014) Zinc'ing sensibly: controlling zinc homeostasis at the transcriptional level. *Metallomics* **6**: 1198-215
- Cobine P, Wickramasinghe WA, Harrison MD, Weber T, Solioz M & Dameron CT (1999) The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Lett.* **445**: 27-30
- Conant GC & Wolfe KH (2008) Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 938-50
- Craig JW, Cherry MA & Brady SF (2011) Long-Chain N-Acyl Amino Acid Synthases Are Linked to the Putative PEP-CTERM/Exosortase Protein-Sorting System in Gram-Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* **193**: 5707-5715
- Crepin T, Schmitt E, Blanquet S & Mechulam Y (2002) Structure and function of the C-terminal domain of methionyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **41**: 13003-11
- Crick FH (1956) On degenerate template and the adaptor hypothesis: a note for the RNA tie club.
- Culotta VC, Yang M & O'Halloran T V (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 747-58

- Cusack S (1995) Eleven down and nine to go. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 824-31
- Cusack S, Berthet-Colominas C, Härtlein M, Nassar N & Leberman R (1990) A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* **347**: 249-55
- Cvetkovic A, Menon AL, Thorgersen MP, Scott JW, Poole FL, Jenney FE, Lancaster WA, Praissman JL, Shanmukh S, Vaccaro BJ, Trauger SA, Kalisiak E, Apon J V, Siuzdak G, Yannone SM, Tainer JA & Adams MWW (2010) Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized. *Nature* **466**: 779-82
- D'Autréaux B, Pecqueur L, De Peredo AG, Diederix REM, Caux-Thang C, Tabet L, Bersch B, Forest E & Michaud-Soret I (2007) Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* **46**: 1329-1342
- Damerval T, Guglielmi G, Houmard J & De Marsac NT (1991) Hormogonium Differentiation in the Cyanobacterium *Calothrix*: A Photoregulated Developmental Process. *Plant Cell* **3**: 191-201
- Dassa E, Hofnung M, Paulsen IT & Saier MH (1999) The *Escherichia coli* ABC transporters: an update. *Mol. Microbiol.* **32**: 887-9
- Delarue M & Moras D (1993) The aminoacyl-tRNA synthetase family: modules at work. *Bioessays* **15**: 675-77
- Dock-Bregeon a, Sankaranarayanan R, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, Francklyn CS, Ehresmann C & Moras D (2000) Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase. The class II solution to the double discrimination problem. *Cell* **103**: 877-884
- Dock-Bregeon A-CC, Rees B, Torres-Larios A, Bey G, Caillet J & Moras D (2004) Achieving error-free translation: The mechanism of proofreading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution. *Mol. Cell* **16**: 375-386
- Dulic M, Cveticic N, Perona JJ & Gruic-Sovulj I (2010) Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* **285**: 23799-809
- Dunkle JA, Wang L, Feldman MB, Pulk A, Chen VB, Kapral GJ, Noeske J, Richardson JS, Blanchard SC & Cate JHD (2011) Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. *Science* **332**: 981-4
- Dwivedi S, Kruparani SP & Sankaranarayanan R (2004) Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic investigations of a unique editing domain from archaeobacteria. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**: 1662-4
- Dwivedi S, Kruparani SP & Sankaranarayanan R (2005) A D-amino acid editing module coupled to the translational apparatus in archaea. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 556-7
- Eargle J, Black AA, Sethi A, Trabuco LG & Luthey-Schulten Z (2008) Dynamics of Recognition between tRNA and elongation factor Tu. *J. Mol. Biol.* **377**: 1382-405
- Ebel JP, Giegé R, Bonnet J, Kern D, Befort N, Bollack C, Fasiolo F, Gangloff J & Dirheimer G (1973) Factors determining the specificity of the tRNA aminoacylation reaction. Non-absolute specificity of tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase recognition and particular importance of the maximal velocity. *Biochimie* **55**: 547-57
- Elhai J, Vepriksiy A, Muro-Pastor AM, Flores E & Wolk CP (1997) Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **179**: 1998-2005
- Elhai J & Wolk CP (1988) Cyanobacteria
- Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J & Moras D (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**: 203-206
- Escolar L, Pérez-Martín J & de Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**: 6223-9
- Fan C, Xiong H, Reynolds NM & Söll D (2015) Rationally evolving tRNA<sup>Pyl</sup> for efficient incorporation of noncanonical amino acids. *Nucleic Acids Res.*: gkv800
- Feng L, Sheppard K, Namgoong S, Ambrogelly A, Polycarpo C, Randau L, Tumbula-Hansen D & Söll D (2004) Aminoacyl-tRNA synthesis by pre-translational amino acid modification. *RNA Biol.* **1**: 16-20
- Feng Y, Li M, Zhang H, Zheng B, Han H, Wang C, Yan J, Tang J & Gao GF (2008) Functional definition and global regulation of Zur, a zinc uptake regulator in a *Streptococcus suis* serotype 2 strain causing streptococcal toxic shock syndrome. *J. Bacteriol.* **190**: 7567-78
- Ferguson AD & Deisenhofer J (2004) Metal import through microbial membranes. *Cell* **116**: 15-24
- Fersht AR (1977) Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **16**: 1025-



- Fersht AR & Dingwall C (1979) An editing mechanism for the methionyl-tRNA synthetase in the selection of amino acids in protein synthesis. *Biochemistry* **18**: 1250-6
- Fillat MF (2014) The fur (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch. Biochem. Biophys.* **546**: 41-52
- First EA (2005) Catalysis of the tRNA aminoacylation reaction. En *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Ibba M Francklyn CS & Cusack S (eds) pp 328-352. Landes Bioscience
- Flores E & Herrero A (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 39-50
- Fonvielle M, Chemama M, Villet R, Lecerf M, Bouhss A, Valery J-M, Etheve-Quellejeu M & Arthur M (2009) Aminoacyl-tRNA recognition by the FemXWv transferase for bacterial cell wall synthesis. *Nucleic Acids Res.* **37**: 1589-1601
- Foster AW & Robinson NJ (2011) Promiscuity and preferences of metallothioneins: the cell rules. *BMC Biol.* **9**: 25
- Francklyn C & Schimmel P (1989) Aminoacylation of RNA minihelices with alanine. *Nature* **337**: 478-81
- Francklyn CS, First EA, Perona JJ & Hou Y-M (2008) Methods for kinetic and thermodynamic analysis of aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods* **44**: 100-118
- Frechin M, Enkler L, Tetaud E, Laporte D, Senger B, Blancard C, Hammann P, Bader G, Clauder-Münster S, Steinmetz LM, Martin RP, di Rago J-P & Becker HD (2014) Expression of Nuclear and Mitochondrial Genes Encoding ATP Synthase Is Synchronized by Disassembly of a Multisynthetase Complex. *Mol. Cell* **56**: 763-776
- Freist W, Logan DT & Gauss DH (1996) Glycyl-tRNA synthetase. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **377**: 343-56
- Fukai S, Nureki O, Sekine S, Shimada A, Tao J, Vassilyev DG & Yokoyama S (2000) Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-isoleucine and L-threonine by the complex of tRNA(Val) and valyl-tRNA synthetase. *Cell* **103**: 793-803
- Gaballa A & Helmann JD (1998) Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**: 5815-21
- Gabriel K, Schneider J & McClain WH (1996) Functional evidence for indirect recognition of G.U in tRNA(Ala) by alanyl-tRNA synthetase. *Science* **271**: 195-7
- Gabriel SE, Miyagi F, Gaballa A & Helmann JD (2008) Regulation of the *Bacillus subtilis* yciC Gene and Insights into the DNA-Binding Specificity of the Zinc-Sensing Metalloregulator Zur. *J. Bacteriol.* **190**: 3482-3488
- Gentry DR, Ingraham KA, Stanhope MJ, Rittenhouse S, Jarvest RL, O'Hanlon PJ, Brown JR & Holmes DJ (2003) Variable sensitivity to bacterial methionyl-tRNA synthetase inhibitors reveals subpopulations of *Streptococcus pneumoniae* with two distinct methionyl-tRNA synthetase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 1784-9
- Giedroc DP & Arunkumar AI (2007) Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Trans.*: 3107-20
- Giegé R, Jühling F, Pütz J, Stadler P, Sauter C & Florentz C (2012) Structure of transfer RNAs: Similarity and variability. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **3**: 37-61
- Giegé R & Lapointe J (2009) Transfer RNA aminoacylation and modified nucleosides Grosjean H (ed) Landes Biosciences
- Giegé R, Sissler M & Florentz C (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* **26**: 5017-5035
- Giessen TW & Marahiel MA (2014) The tRNA-dependent biosynthesis of modified cyclic dipeptides. *Int. J. Mol. Sci.* **15**: 14610-31
- Giovannoni SJ, Turner S, Olsen GJ, Barns S, Lane DJ & Pace NR (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**: 3584-92
- Goericke R & Welshmeyer N (1993) The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso sea. *Deep Sea Res.* **40**: 2283-2294
- Gomes AC, Miranda I, Silva RM, Moura GR, Thomas B, Akoulitchev A & Santos MAS (2007) A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biol.* **8**: R206
- Gondry M, Sauguet L, Belin P, Thai R, Amouroux R, Tellier C, Tiphile K, Jacquet M, Braud S, Courçon M, Masson C, Dubois S, Lautru S, Lecoq A, Hashimoto S, Genet R & Pernodet J-L (2009) Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 414-420

- Grosjean H, de Crécy-Lagard V & Marck C (2010) Deciphering synonymous codons in the three domains of life: Co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Lett.* **584**: 252-264
- Gruic-Sovulj I, Rokov-Plavec J & Weygand-Durasevic I (2007) Hydrolysis of non-cognate aminoacyl-adenylates by a class II aminoacyl-tRNA synthetase lacking an editing domain. *FEBS Lett.* **581**: 5110-4
- Gruic-Sovulj I, Uter N, Bullock T & Perona JJ (2005) tRNA-dependent aminoacyl-adenylate hydrolysis by a nonediting class I aminoacyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* **280**: 23978-86
- Guo M & Schimmel P (2013) Essential non-translational functions of tRNA Synthetases. *Nat. Chem. Biol.* **9**: 145-153
- Guo M, Schimmel P & Yang XL (2010) Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions. *FEBS Lett.* **584**: 434-442
- Haas CE, Rodionov DA, Kropat J, Malasarn D, Merchant SS & de Crécy-Lagard V (2009) A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics* **10**: 470
- Haft DH, Paulsen IT, Ward N & Selengut JD (2006) Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: the PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. *BMC Biol.* **4**: 29
- Haft DH, Payne SH & Selengut JD (2011) Archaeosortases and Exosortases Are Widely Distributed Systems Linking Membrane Transit with Posttranslational Modification. *J. Bacteriol.* **194**: 36-48
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hantke K (2005) Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 196-202
- Harrison MD, Jones CE, Solioz M & Dameron CT (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 29-32
- Hasegawa T, Miyano M, Himeno H, Sano Y, Kimura K & Shimizu M (1992) Identity determinants of *E. coli* threonine tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 478-84
- Hati S, Ziervogel B, SternJohn J, Wong F-C, Nagan MC, Rosen AE, Siliciano PG, Chihade JW & Musier-Forsyth K (2006) Pre-transfer Editing by Class II Prolyl-tRNA Synthetase: ROLE OF AMINOACYLATION ACTIVE SITE IN «SELECTIVE RELEASE» OF NONCOGNATE AMINO ACIDS. *J. Biol. Chem.* **281**: 27862-27872
- Hendrickson TL, Nomanbhoy TK, de Crécy-Lagard V, Fukai S, Nureki O, Yokoyama S & Schimmel P (2002) Mutational separation of two pathways for editing by a class I tRNA synthetase. *Mol. Cell* **9**: 353-62
- Hendrickson TL, Nomanbhoy TK & Schimmel P (2000) Errors from selective disruption of the editing center in a tRNA synthetase. *Biochemistry* **39**: 8180-6
- Hernández JA, López-Gomollón S, Bes MT, Fillat MF & Peleato ML (2004) Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**: 275-82
- Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A & Flores E (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 469-487
- Hess WR (2011) Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 608-14
- Hiraide Y, Oshima K, Fujisawa T, Uesaka K, Hirose Y, Tsujimoto R, Yamamoto H, Okamoto S, Nakamura Y, Terauchi K, Omata T, Ihara K, Hattori M & Fujita Y (2015) Loss of cytochrome cM stimulates cyanobacterial heterotrophic growth in the dark. *Plant Cell Physiol.* **56**: 334-45
- Hiraoka BY, Yamakura F, Sugio S & Nakayama K (2000) A change of the metal-specific activity of a cambialistic superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by a double mutation of Gln-70 to Gly and Ala-142 to Gln. *Biochem. J.* **345 Pt 2**: 345-50
- Hoagland MB (1955) An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **16**: 288-9
- Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI & Zamecnik PC (1958) A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **231**: 241-57
- Hoffman BM, Dean DR & Seefeldt LC (2009) Climbing nitrogenase: toward a mechanism of enzymatic nitrogen fixation. *Acc. Chem. Res.* **42**: 609-19
- Hou YM, Francklyn C & Schimmel P (1989) Molecular dissection of a transfer RNA and the basis for its identity. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 233-7

- Huertas MJ, López-Maury L, Giner-Lamia J, Sánchez-Riego AM & Florencio FJ (2014) Metals in cyanobacteria: analysis of the copper, nickel, cobalt and arsenic homeostasis mechanisms. *Life (Basel, Switzerland)* **4**: 865-86
- Hussain T, Kruparani SP, Pal B, Dock-Bregeon A-C, Dwivedi S, Shekar MR, Sureshbabu K & Sankaranarayanan R (2006) Post-transfer editing mechanism of a D-aminoacyl-tRNA deacylase-like domain in threonyl-tRNA synthetase from archaea. *EMBO J.* **25**: 4152-62
- Ibba M, Curnow AW & Söll D (1997) Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 39-42
- Ibba M & Soll D (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 617-50
- Ibba M & Söll D (2004) Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes Dev.* **18**: 731-8
- Innan H & Kondrashov F (2010) The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 4
- Ishikura H, Nagaoka Y, Yokozawa J, Umehara T, Kuno a & Hasegawa T (2000) Threonyl-tRNA synthetase of archaea: importance of the discriminator base in the aminoacylation of threonine tRNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.:* 83-84
- Jaffe EK (2000) The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **56**: 115-28
- Jaffe EK (2003) An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chem. Biol.* **10**: 25-34
- Jakubowski H (1997) Aminoacyl thioester chemistry of class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* **36**: 11077-85
- Jakubowski H (1999) Misacylation of tRNA Lys with Noncognate Amino Acids by Lysyl-tRNA Synthetase †. *Biochemistry* **38**: 8088-8093
- Jarvest RL, Berge JM, Berry V, Boyd HF, Brown MJ, Elder JS, Forrest AK, Fosberry AP, Gentry DR, Hibbs MJ, Jaworski DD, O'Hanlon PJ, Pope AJ, Rittenhouse S, Sheppard RJ, Slater-Radosti C & Worby A (2002) Nanomolar inhibitors of *Staphylococcus aureus* methionyl tRNA synthetase with potent antibacterial activity against gram-positive pathogens. *J. Med. Chem.* **45**: 1959-62
- Javid B, Sorrentino F, Toosky M, Zheng W, Pinkham JT, Jain N, Pan M, Deighan P & Rubin EJ (2014) Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 1132-7
- Jia J, Arif A, Ray PS & Fox PL (2008) WHEP domains direct noncanonical function of glutamyl-Prolyl tRNA synthetase in translational control of gene expression. *Mol. Cell* **29**: 679-90
- Jones TE, Alexander RW & Pan T (2011) Misacylation of specific nonmethionyl tRNAs by a bacterial methionyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 6933-8
- Kaiser D (2001) Building a multicellular organism. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 103-23
- Karkhanis VA, Boniecki MT, Poruri K & Martinis SA (2006) A viable amino acid editing activity in the leucyl-tRNA synthetase CP1-splicing domain is not required in the yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**: 33217-25
- Katoh K & Standley DM (2014) MAFFT: iterative refinement and additional methods. *Methods Mol. Biol.* **1079**: 131-46
- Kitabatake M, Ali K, Demain A, Sakamoto K, Yokoyama S & Söll D (2002) Indolmycin resistance of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by induced expression of one of its two tryptophanyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* **277**: 23882-7
- Klatt JM, Haas S, Yilmaz P, de Beer D & Polerecky L (2015) Hydrogen sulfide can inhibit and enhance oxygenic photosynthesis in a cyanobacterium from sulfidic springs. *Environ. Microbiol.* **17**: 3301-3313
- Knoll AH (2008) Cyanobacteria and Earth History. En *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Herrero A & Flores E (eds) pp 1-20. Caister Academic Press
- Köhler C & RajBhandary UL (2008) The many applications of acid urea polyacrylamide gel electrophoresis to studies of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods* **44**: 129-138
- Vander Kooi CW (2013) Megaprimer method for mutagenesis of DNA. *Methods Enzymol.* **529**: 259-69
- Korencic D, Ahel I, Schelert J, Sacher M, Ruan B, Stathopoulos C, Blum P, Ibba M & Söll D (2004a) A freestanding proofreading domain is required for protein synthesis quality control in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 10260-5
- Korencic D, Polcarpo C, Weygand-Durasevic I & Söll D (2004b) Differential modes of transfer RNAs<sup>er</sup> recognition in *Methanosarcina barkeri*. *J. Biol. Chem.* **279**: 48780-6
- Korostelev AA (2011) Structural aspects of translation termination on the ribosome. *RNA* **17**: 1409-21
- Kotik-Kogan O, Moor N, Tworowski D & Safro M (2005) Structural basis for discrimination of L-phenylalanine from L-tyrosine by

phenylalanyl-tRNA synthetase. *Structure* **13**: 1799-807

Kramer EB & Farabaugh PJ (2007) The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA* **13**: 87-96

Kumar P, Sannigrahi S & Tzeng YL (2012) The *Neisseria meningitidis* ZnuD Zinc Receptor Contributes to Interactions with Epithelial Cells and Supports Heme Utilization when Expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **80**: 657-667

Labunskyy VM, Hatfield DL & Gladyshev VN (2014) Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol. Rev.* **94**: 739-77

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lane TW & Morel FM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 4627-4631

Larkin DC, Williams AM, Martinis SA & Fox GE (2002) Identification of essential domains for *Escherichia coli* tRNA(Leu) aminoacylation and amino acid editing using minimalist RNA molecules. *Nucleic Acids Res.* **30**: 2103-13

Leach MR & Zamble DB (2007) Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**: 159-65

Lee JW, Beebe K, Nangle LA, Jang J, Longo-Guess CM, Cook SA, Davisson MT, Sundberg JP, Schimmel P & Ackerman SL (2006) Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* **443**: 50-55

Lee J-WW & Helmann JD (2007) Functional specialization within the fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**: 485-499

Leganés F, Fernández-Piñas F & Wolk CP (1994) Two mutations that block heterocyst differentiation have different effects on akinete differentiation in *Nostoc ellipsosporum*. *Mol. Microbiol.* **12**: 679-84

Li L, Boniecki MT, Jaffe JD, Imai BS, Yau PM, Luthey-Schulten ZA & Martinis SA (2011) Naturally occurring aminoacyl-tRNA synthetases editing-domain mutations that cause mistranslation in *Mycoplasma* parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 9378-9383

Li R, Macnamara LM, Leuchter JD, Alexander RW & Cho SS (2015) MD Simulations of tRNA and Aminoacyl-tRNA Synthetases: Dynamics, Folding, Binding, and Allostery. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 15872-902

Li Y, Qiu Y, Gao H, Guo Z, Han Y, Song Y, Du Z, Wang X, Zhou D & Yang R (2009) Characterization of Zur-dependent genes and direct Zur targets in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* **9**: 128

Liberton M & Himadri B (2008) Membrane Systems in Cyanobacteria. En *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Herrero A & Flores E (eds) pp 271-288. Caister Academic Press

Ling J, Peterson KM, Simonovic I, Cho C, Soll D & Simonovic M (2012) Yeast mitochondrial threonyl-tRNA synthetase recognizes tRNA isoacceptors by distinct mechanisms and promotes CUN codon reassignment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 3281-3286

Ling J, Reynolds N & Ibba M (2009a) Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**: 61-78

Ling J, So BR, Yadavalli SS, Roy H, Shoji S, Fredrick K, Musier-Forsyth K & Ibba M (2009b) Resampling and Editing of Mischarged tRNA Prior to Translation Elongation. *Mol. Cell* **33**: 654-660

Ling J, Soll D & Söll D (2010) Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 4028-4033

Liu H, Nolla H & Campbell L (1997) *Prochlorococcus* growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* **63**: 61-78

Liu Z, Vargas-Rodriguez O, Goto Y, Novoa EM, Ribas de Pouplana L, Suga H & Musier-Forsyth K (2015) Homologous trans -editing factors with broad tRNA specificity prevent mistranslation caused by serine/threonine misactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 6027-32

Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods* **25**: 402-8

Llull D, Son O, Blanié S, Briffotiaux J, Morello E, Rogniaux H, Danot O & Poquet I (2011) *Lactococcus lactis* ZitR is a zinc-responsive repressor active in the presence of low, nontoxic zinc concentrations in vivo. *J. Bacteriol.* **193**: 1919-29

Loftfield RB & Vanderjagt D (1972) The frequency of errors in protein biosynthesis. *Biochem. J.* **128**: 1353-6

López-Gomollón S, Hernández JA, Pellicer S, Angarica VE, Peleato ML & Fillat MF (2007) Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120: identification of overlapping genes in *FurA* and *NtcA* regulons. *J. Mol. Biol.* **374**: 267-81

- López-Gomollón S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML & Fillat MF (2009) New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem. J.* **418**: 201-207
- Lovmar M & Eherenberg M (2006) Rate, accuracy and cost of ribosomes in bacterial cells. *Biochimie* **88**: 951-961
- Lu J, Bergert M, Walther A & Suter B (2014) Double-sieving-defective aminoacyl-tRNA synthetase causes protein mistranslation and affects cellular physiology and development. *Nat. Commun.* **5**: 5650
- Lucarelli D, Russo S, Garman E, Milano A, Meyer-Klaucke W & Pohl E (2007) Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **282**: 9914-9922
- Lue SW & Kelley SO (2005) An aminoacyl-tRNA synthetase with a defunct editing site. *Biochemistry* **44**: 3010-6
- Luque I & Ochoa de Alda J a G (2014) CURT1,CAAD-containing aaRSs, thylakoid curvature and gene translation. *Trends Plant Sci.* **19**: 63-66
- Luque I, Riera-Alberola ML, Andújar A & Ochoa De Alda J a G (2008) Intrapylum diversity and complex evolution of cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 2369-2389
- Ma Z, Gabriel SE & Helmann JD (2011) Sequential binding and sensing of Zn(II) by *Bacillus subtilis* Zur. *Nucleic Acids Res.* **39**: 9130-8
- Maciğ A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palù G, Riccardi G & Manganello R (2007) Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J. Bacteriol.* **189**: 730-740
- Maier RJ, Benoit SL & Seshadri S (2007) Nickel-binding and accessory proteins facilitating Ni-enzyme maturation in *Helicobacter pylori*. *Biomaterials* **20**: 655-64
- Margulis L (1971) The origin of plant and animal cells. *Am. Sci.* **59**: 230-5
- Mascarenhas a, An S, Rosen a, Martinis S & Musier-Forsyth K (2008) Fidelity Mechanisms of the Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Protein Eng.* **22**: 155-203
- Merchant SS & Helmann JD (2012) Elemental economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. *Adv. Microb. Physiol.* **60**: 91-210
- Minajigi A & Francklyn CS (2010) Aminoacyl transfer rate dictates choice of editing pathway in threonyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* **285**: 23810-23817
- Mirando AC, Fang P, Williams TF, Baldor LC, Howe AK, Ebert AM, Wilkinson B, Lounsbury KM, Guo M & Francklyn CS (2015) Aminoacyl-tRNA synthetase dependent angiogenesis revealed by a bioengineered macrolide inhibitor. *Sci. Rep.* **5**: 13160
- Mohamed A & Jansson C (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **13**: 693-700
- Mohr G, Rennard R, Chorniack AD, Stryker J & Lambowitz AM (2001) Function of the *Neurospora crassa* mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing. Role of the idiosyncratic N-terminal extension and different modes of interaction with different group I introns. *J. Mol. Biol.* **307**: 75-92
- Montesinos ML, Muro-Pastor AM, Herrero A & Flores E (1998) Ammonium/methylammonium permeases of a Cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated amt genes in *synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **273**: 31463-70
- Moore CM & Helmann JD (2005) Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 188-195
- Motorin Y, Le Caer JP & Waller JP (1997) Cysteinyl-tRNA synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, characterization and assignment to the genomic sequence YNL247w. *Biochimie* **79**: 731-40
- Moutiez M, Seguin J, Fonvielle M, Belin P, Jacques IB, Favry E, Arthur M & Gondry M (2014) Specificity determinants for the two tRNA substrates of the cyclodipeptide synthase AlbC from *Streptomyces noursei*. *Nucleic Acids Res.* **42**: 7247-58
- Muramatsu T, Nureki O, Kanno H, Niimi T, Tateno M, Kohno T, Kawai G, Miyazawa T, Muto Y & Yokoyama S (1990) Recognition of tRNA identity determinants by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Symp. Ser.*: 119-20
- Murray NE, Brammar WJ & Murray K (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *MGG Mol. Gen. Genet.* **150**: 53-61
- Musier-Forsyth K & Beuning PJ (2000) Role of zinc ion in translational accuracy becomes crystal clear. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 435-6
- Naganuma M, Sekine S, Chong YE, Guo M, Yang X-L, Gamper H, Hou Y-M, Schimmel P & Yokoyama S (2014) The selective tRNA aminoacylation mechanism based on a single G•U pair. *Nature* **510**: 507-11

- Nameki N (1995) Identity elements of tRNA(Thr) towards *Saccharomyces cerevisiae* threonyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.* **23**: 2831-6
- Nameki N, Asahara H & Hasegawa T (1996) Identity elements of *Thermus thermophilus* tRNA(Thr). *FEBS Lett.* **396**: 201-7
- Nangle LA, Motta CM & Schimmel P (2006) Global Effects of Mistranslation from an Editing Defect in Mammalian Cells. *Chem. Biol.* **13**: 1091-1100
- Napolitano M (2013) Tesis doctoral: «Caracterización de genes duplicados de treonil tRNA sintetasa en la cianobacteria filamentosa sp. PCC 7120».
- Napolitano M, Rubio MÁ, Camargo S & Luque I (2013) Regulation of internal promoters in a zinc-responsive operon is influenced by transcription from upstream promoters. *J. Bacteriol.* **195**: 1285-93
- Napolitano M, Rubio MÁ, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ & Luque I (2012) Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **194**: 2426-2436
- Netzer N, Goodenbour JM, David A, Dittmar KA, Jones RB, Schneider JR, Boone D, Eves EM, Rosner MR, Gibbs JS, Embry A, Dolan B, Das S, Hickman HD, Berglund P, Bennink JR, Yewdell JW & Pan T (2009) Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. *Nature* **462**: 522-6
- Newberry KJ, Hou Y-M & Perona JJ (2002) Structural origins of amino acid selection without editing by cysteinyl-tRNA synthetase. *EMBO J.* **21**: 2778-87
- Nirenberg MW & Matthaei JH (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**: 1588-602
- Noiraj N, Guillier M, Barnard TJ & Buchanan SK (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 43-60
- Noller HF, Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A & Cate JHD (2002) Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett.* **514**: 11-16
- Nordin BE & Schimmel P (2003) Transiently misacylated tRNA is a primer for editing of misactivated adenylates by class I aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochemistry* **42**: 12989-97
- Novoa EM, Vargas-Rodríguez O, Lange S, Goto Y, Suga H, Musier-Forsyth K & Ribas de Pouplana LL (2015) Ancestral AlaX Editing Enzymes for Control of Genetic Code Fidelity are not tRNA Specific. *J. Biol. Chem.* **290**: 10495-503
- Nureki O, Vassilyev DG, Tateno M, Shimada A, Nakama T, Fukai S, Konno M, Hendrickson TL, Schimmel P & Yokoyama S (1998) Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* **280**: 578-82
- O'Donoghue P & Luthey-Schulten Z (2003) On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 550-73
- Ochoa de Alda JAG, Esteban R, Diago ML & Houmard J (2014) The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nat. Commun.* **5**: 4937
- Ochoa S, Burma DP, Kroger H & Weill JD (1961) Deoxyribonucleic acid-dependent incorporation of nucleotides from nucleoside triphosphates into ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**: 670-9
- Ofir-Birin Y, Fang P, Bennett SPP, Zhang H-MM, Wang J, Rachmin I, Shapiro R, Song J, Dagan A, Pozo J, Kim S, Marshall AGG, Schimmel P, Yang X-LL, Nechushtan H, Razin E & Guo M (2013) Structural Switch of Lysyl-tRNA Synthetase between Translation and Transcription. *Mol. Cell* **49**: 30-42
- Okamoto S, Van Petegem F, Patrauchan M a. & Eltis LD (2010) AnhE, a metallochaperone involved in the maturation of a cobalt-dependent nitrile hydratase. *J. Biol. Chem.* **285**: 25126-25133
- Olmedo-Verd E, Santamaría-Gómez J, Ochoa de Alda JAG, Ribas de Pouplana L & Luque I (2011) Membrane anchoring of aminoacyl-tRNA synthetases by convergent acquisition of a novel protein domain. *J. Biol. Chem.* **286**: 41057-68
- Osman D & Cavet JS (2010) Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 668-80
- Outten CE & O'Halloran T V (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**: 2488-2492
- Palencia A, Crépin T, Vu MT, Lincecum TL, Martinis SA & Cusack S (2012) Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**: 677-84

- Pan T (2013) Adaptive Translation as a Mechanism of Stress Response and Adaptation. *Annu. Rev. Genet.* **47**: 121-137
- Pang YLJ, Poruri K & Martinis SA (2014) tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **5**: 461-80
- Panina EM, Mironov AA & Gelfand MS (2003) Comparative genomics of bacterial zinc regulons: Enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 9912-9917
- Patzer SI & Hantke K (2000) The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 24321-32
- Paukstelis PJ, Coon R, Madabusi L, Nowakowski J, Monzingo A, Robertus J & Lambowitz AM (2005) A Tyrosyl-tRNA Synthetase Adapted to Function in Group I Intron Splicing by Acquiring a New RNA Binding Surface. *Mol. Cell* **17**: 417-428
- Pauling L (1958) THE NATURE OF BOND ORBITALS AND THE ORIGIN OF POTENTIAL BARRIERS TO INTERNAL ROTATION IN MOLECULES. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**: 211-6
- Pawlik M-C, Hubert K, Joseph B, Claus H, Schoen C & Vogel U (2012) The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. *J. Bacteriol.* **194**: 6594-603
- Perica T, Kondo Y, Tiwari SP, McLaughlin SH, Kemplen KR, Zhang X, Steward A, Reuter N, Clarke J & Teichmann SA (2014) Evolution of oligomeric state through allosteric pathways that mimic ligand binding. *Science (80-. )*. **346**: 1254346-1254346
- Perona JJ & Gruic-Sovulj I (2014) Synthetic and Editing Mechanisms of Aminoacyl-tRNA Synthetases. En *Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and Medicine*, Kim S (ed) pp 1-42. Springer
- Perona JJ & Hadd A (2012) Structural Diversity and Protein Engineering of the Aminoacyl-tRNA Synthetases. *Biochemistry* **51**: 8705-29
- Pezo V, Metzgar D, Hendrickson TL, Waas WF, Hazebrouck S, Döring V, Marlière P, Schimmel P & De Crécy-Lagard V (2004) Artificially ambiguous genetic code confers growth yield advantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 8593-7
- Putney SD & Schimmel P (1981) An aminoacyl tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. *Nature* **291**: 632-5
- Quevillon S, Agou F, Robinson JC & Mirande M (1997) The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine. *J. Biol. Chem.* **272**: 32573-9
- Racznik G, Becker HD, Min B & Söll D (2001) A Single Amidotransferase Forms Asparaginyl-tRNA and Glutaminyl-tRNA in *Chlamydia trachomatis*. *J. Biol. Chem.* **276**: 45862-45867
- Radford DS, Kihlken MA, Borrelly GPM, Harwood CR, Le Brun NE & Cavet JS (2003) CopZ from *Bacillus subtilis* interacts in vivo with a copper exporting CPx-type ATPase CopA. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**: 105-12
- Raina M & Ibba M (2014) tRNAs as regulators of biological processes. *Front. Genet.* **5**: 171
- Resch CM & Gibson J (1983) Isolation of the carotenoid-containing cell wall of three unicellular cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **155**: 345-50
- Reverendo M, Soares AR, Pereira PM, Carreto L, Ferreira V, Gatti E, Pierre P, Moura GR & Santos MA (2014) tRNA mutations that affect decoding fidelity deregulate development and the proteostasis network in zebrafish. *RNA Biol.* **11**: 1199-1213
- Rexroth S, Mullineaux CW, Ellinger D, Sendtko E, Rogner M & Koenig F (2011) The Plasma Membrane of the Cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* Contains Segregated Bioenergetic Domains. *Plant Cell* **23**: 2379-2390
- Reynolds NM, Lazizzera B a & Ibba M (2010a) Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 849-856
- Reynolds NM, Ling J, Roy H, Banerjee R, Repasky SE, Hamel P & Ibba M (2010b) Cell-specific differences in the requirements for translation quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 4063-8
- Ribas de Pouplana L, Santos MAS, Zhu J-HH, Farabaugh PJ & Javid B (2014) Protein mistranslation: Friend or foe? *Trends Biochem. Sci.* **39**: 355-62
- Ribas de Pouplana L & Schimmel P (2001a) Two classes of tRNA synthetases suggested by sterically compatible dockings on tRNA acceptor stem. *Cell* **104**: 191-193
- Ribas de Pouplana L & Schimmel P (2001b) Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 591-596
- Ribas de Pouplana L & Schimmel P (2001c) Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 591-596

- Ribas de Pouplana L & Schimmel P (2001d) Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 591-6
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M & Stanier RY (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61
- Robinson NJ & Winge DR (2010) Copper metallochaperones. *Annu. Rev. Biochem.* **79**: 537-562
- Romby P, Caillet J, Ebel C, Sacerdot C, Graffe M, Eyermann F, Brunel C, Moine H, Ehresmann C, Ehresmann B & Springer M (1996) The expression of E.coli threonyl-tRNA synthetase is regulated at the translational level by symmetrical operator-repressor interactions. *EMBO J.* **15**: 5976-87
- Roy H, Dare K & Ibba M (2009) Adaptation of the bacterial membrane to changing environments using aminoacylated phospholipids. *Mol. Microbiol.* **71**: 547-50
- Roy H, Ling J, Irnov M & Ibba M (2004) Post-transfer editing in vitro and in vivo by the beta subunit of phenylalanyl-tRNA synthetase. *EMBO J.* **23**: 4639-48
- Rudolph B, Gebendorfer KM, Buchner J & Winter J (2010) Evolution of Escherichia coli for growth at high temperatures. *J. Biol. Chem.* **285**: 19029-34
- Ruff M, Krishnaswamy S, Boeglin M, Poterszman A, Mitschler A, Podjarny A, Rees B, Thierry JC & Moras D (1991) Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science* **252**: 1682-9
- Salazar JC, Ahel I, Orellana O, Tumbula-Hansen D, Krieger R, Daniels L & Söll D (2003) Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 13863-8
- Salinas-Giegé T, Giegé R & Giegé P (2015) tRNA biology in mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* **16**: 4518-59
- Saluta M V & Hirshfield IN (1995) The occurrence of duplicate lysyl-tRNA synthetase gene homologs in Escherichia coli and other prokaryotes. *J. Bacteriol.* **177**: 1872-8
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
- Sambrook J & Russell DW (2001) Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3.pd. *Hum. Mutat.* **18**: 1-2231
- Sang GP, Ewalt KL & Kim S (2005) Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: New perspectives on housekeepers. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 569-574
- Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon a. C, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, Ehresmann C, Ehresmann B & Moras D (1999) The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell* **97**: 371-381
- Sauerwald A, Zhu W, Major TA, Roy H, Palioura S, Jahn D, Whitman WB, Yates JR, Ibba M & Söll D (2005) RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* **307**: 1969-72
- Sauguet L, Moutiez M, Li Y, Belin P, Seguin J, Le Du M-H, Thai R, Masson C, Fonvielle M, Pernodet J-L, Charbonnier J-B & Gondry M (2011) Cyclodipeptide synthases, a family of class-I aminoacyl-tRNA synthetase-like enzymes involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Nucleic Acids Res.* **39**: 4475-4489
- Scherk C, Schmidt M, Nolting HF, Meier B & Parak F (1996) EXAFS investigation of the active site of iron superoxide dismutase of Escherichia coli and Propionibacterium shermanii. *Eur. Biophys. J.* **24**: 243-50
- Schimmel P (2011) Mistranslation and its control by tRNA synthetases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **366**: 2965-71
- Schimmel PR & Söll D (1979) Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **48**: 601-48
- Schirrmeyer BE, Antonelli A & Bagheri HC (2011) The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evol. Biol.* **11**: 45
- Schirrmeyer BE, Vos JM De, Antonelli A & Bagheri HC (2013) Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**:
- Schmeing TM & Ramakrishnan V (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**: 1234-42
- Schmidt E & Schimmel P (1995) Residues in a class I tRNA synthetase which determine selectivity of amino acid recognition in the context of tRNA. *Biochemistry* **34**: 11204-10



- Schön A, Krupp G, Gough S, Berry-Lowe S, Kannangara CG & Söll D (2005) The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* **322**: 281-4
- Schröder J, Jochmann N, Rodionov DA & Tauch A (2010) The Zur regulon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC Genomics* **11**: 12
- Sein-Echaluce VC, González A, Napolitano M, Luque I, Barja F, Peleato ML & Fillat MF (2015) Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *A. nabaena* sp. PCC 7120. *Environ. Microbiol.* **17**: 2006-2017
- Sheikh MA & Taylor GL (2009) Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal coordination. *Mol. Microbiol.* **72**: 1208-1220
- Shepherd J & Ibba M (2015) Bacterial transfer RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.*: 280-300
- Sheppard K, Yuan J, Hohn MJ, Jester B, Devine KM & Söll D (2008) From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* **36**: 1813-1825
- Shimizu S, Juan ECM, Sato Y, Miyashita YI, Hoque MM, Suzuki K, Sagara T, Tsunoda M, Sekiguchi T, Dock-Bregeon A-C, Moras D & Takénaka A (2009) Two Complementary Enzymes for Threonylation of tRNA in Crenarchaeota: Crystal Structure of *Aeropyrum pernix* Threonyl-tRNA Synthetase Lacking a cis-Editing Domain. *J. Mol. Biol.* **394**: 286-296
- Sikosek T, Chan HS & Bornberg-Bauer E (2012) Escape from Adaptive Conflict follows from weak functional trade-offs and mutational robustness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 14888-14893
- Silva RM, Paredes JA, Moura GR, Manadas B, Lima-Costa T, Rocha R, Miranda I, Gomes AC, Koerkamp MJG, Perrot M, Holstege FCP, Boucherie H & Santos MAS (2007) Critical roles for a genetic code alteration in the evolution of the genus *Candida*. *EMBO J.* **26**: 4555-65
- Silver S & Phung LT (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 753-89
- Silvian LF, Wang J & Steitz TA (1999) Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA<sup>ile</sup> and mupirocin. *Science* **285**: 1074-7
- Simonetti A, Marzi S, Jenner L, Myasnikov A, Romby P, Yusupova G, Klaholz BP & Yusupov M (2009) A structural view of translation initiation in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 423-36
- Simonović M & Steitz TA (2009) A structural view on the mechanism of the ribosome-catalyzed peptide bond formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**: 612-23
- Simons TJ (1993) Measurement of free Zn<sup>2+</sup> ion concentration with the fluorescent probe mag-fura-2 (fura-2). *J. Biochem. Biophys. Methods* **27**: 25-37
- Skouloubris S, Ribas de Pouplana L, De Reuse H & Hendrickson TL (2003) A noncognate aminoacyl-tRNA synthetase that may resolve a missing link in protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 11297-302
- Splan KE, Ignatov ME & Musier-Forsyth K (2008a) Transfer RNA Modulates the Editing Mechanism Used by Class II Prolyl-tRNA Synthetase. *J. Biol. Chem.* **283**: 7128-7134
- Splan KE, Musier-Forsyth K, Boniecki MT & Martinis S a. (2008b) In vitro assays for the determination of aminoacyl-tRNA synthetase editing activity. *Methods* **44**: 119-128
- Sprinzl M & Cramer F (1975) Site of aminoacylation of tRNAs from *Escherichia coli* with respect to the 2'- or 3'-hydroxyl group of the terminal adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**: 3049-53
- Sriram SM, Kim BY & Kwon YT (2011) The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 735-47
- Staal M, Meysman FJR & Stal LJ (2003) Temperature excludes N<sub>2</sub>-fixing heterocystous cyanobacteria in the tropical oceans. *Nature* **425**: 504-507
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**: 1312-3
- Stanier RY & Cohen-Bazire G (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 225-74
- Starzyk RM, Webster TA & Schimmel P (1987) Evidence for dispensable sequences inserted into a nucleotide fold. *Science* **237**: 1614-8
- Stork M, Bos MP, Jongerijs I, de Kok N, Schilders I, Weynants VE, Poolman JT & Tommassen J (2010) An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential. *PLoS Pathog.* **6**: e1000969

- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ & Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89
- Tannenbaum E (2006) Selective advantage for multicellular replicative strategies: a two-cell example. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **73**: 010904
- Tasaki T, Sriram SM, Park KS & Kwon YT (2012) The N-end rule pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **81**: 261-89
- Teixidó L, Carrasco B, Alonso JC, Barbé J & Campoy S (2011) Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator in vivo and in vitro. *PLoS One* **6**: e19711
- Torres-Larios A, Dock-Bregeon A-C, Romby P, Rees B, Sankaranarayanan R, Caillet J, Springer M, Ehresmann C, Ehresmann B & Moras D (2002) Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 343-347
- Torres-Larios A, Sankaranarayanan R, Rees B, Dock-Bregeon A-CC & Moras D (2003) Conformational movements and cooperativity upon amino acid, ATP and tRNA binding in threonyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.* **331**: 201-211
- Totter S, Harvie DR & Robinson NJ (2005) Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones. *Acc. Chem. Res.* **38**: 775-783
- Totter S, Patterson CJ, Banci L, Bertini I, Felli IC, Pavelkova a., Dainty SJ, Pernil R, Waldron KJ, Foster a. W & Robinson NJ (2012) Cyanobacterial metallochaperone inhibits deleterious side reactions of copper. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: 95-100
- Tukalo M, Yaremchuk A, Fukunaga R, Yokoyama S & Cusack S (2005) The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA<sup>Leu</sup> in the post-transfer-editing conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 923-30
- Valladares A, Flores E & Herrero A (2008) Transcription activation by NtcA and 2-oxoglutarate of three genes involved in heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **190**: 6126-33
- Vargas-Rodriguez O & Musier-Forsyth K (2013) Exclusive Use of trans-Editing Domains Prevents Proline Mistranslation. *J. Biol. Chem.* **288**: 14391-14399
- Vecchione JJ & Sello JK (2009) A novel tryptophanyl-tRNA synthetase gene confers high-level resistance to indolmycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 3972-80
- Voorhees RM & Ramakrishnan V (2013) Structural basis of the translational elongation cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **82**: 203-36
- Waldron KJ & Robinson NJ (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 25-35
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D & Robinson NJ (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**: 823-830
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M & Barton GJ (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189-91
- Williams-Wagner RN, Grundy FJ, Raina M, Ibba M & Henkin TM (2015) The *Bacillus subtilis* *tyrZ* Gene Encodes a Highly Selective Tyrosyl-tRNA Synthetase and Is Regulated by a MarR Regulator and T Box Riboswitch. *J. Bacteriol.* **197**: 1624-1631
- Wiltrout E, Goodenbour JM, Fréchin M & Pan T (2012) Misacylation of tRNA with methionine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **40**: 10494-506
- Woese CR, Olsen GJ, Ibba M & Söll D (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 202-36
- Wu J, Fan Y & Ling J (2014) Mechanism of oxidant-induced mistranslation by threonyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res.* **42**: 6523-31
- Xiao Z & Wedd AG (2010) The challenges of determining metal-protein affinities. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 768-89
- El Yacoubi B, Bailly M & de Crécy-Lagard V (2012) Biosynthesis and Function of Posttranscriptional Modifications of Transfer RNAs. *Annu. Rev. Genet.* **46**: 69-95
- Yadavalli SS & Ibba M (2012a) Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis: Its role in translational fidelity 1.<sup>a</sup> ed. Elsevier Inc.
- Yadavalli SS & Ibba M (2012b) Selection of tRNA charging quality control mechanisms that increase mistranslation of the genetic code. *Nucleic Acids Res.* **41**: 1104-1112
- Yamano S, Sako Y, Nomura N & Maruyama T (1999) A cambialistic SOD in a strictly aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*. *J. Biochem.* **126**: 218-25

- Yang X-L, Schimmel P & Ewalt KL (2004) Relationship of two human tRNA synthetases used in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 250-6
- Yannay-Cohen N, Carmi-Levy I, Kay G, Yang CM, Han JM, Kemeny DM, Kim S, Nechushtan H & Razin E (2009) LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Mol. Cell* **34**: 603-11
- Yu XC, Borisov O V., Alvarez M, Michels DA, Wang YJ & Ling V (2009) Identification of Codon-Specific Serine to Asparagine Mistranslation in Recombinant Monoclonal Antibodies by High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **81**: 9282-9290
- Zamecnik PC, Stephenson ML & Hecht LI (1958) Intermediate Reactions in Amino Acid Incorporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **44**: 73-8
- Zeng Y, Roy H, Patil PB, Ibba M & Chen S (2009) Characterization of two seryl-tRNA synthetases in albomycin-producing *Streptomyces* sp. strain ATCC 700974. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 4619-27
- Zhang C-M, Perona JJ, Ryu K, Francklyn C & Hou Y-M (2006) Distinct kinetic mechanisms of the two classes of Aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol.* **361**: 300-11
- Zhaxybayeva O, Gogarten JP, Charlebois RL, Doolittle WF & Papke RT (2006) Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Res.* **16**: 1099-108
- Zheleznova EE, Crosa JH & Brennan RG (2000) Characterization of the DNA- and metal-binding properties of *Vibrio anguillarum* fur reveals conservation of a structural Zn(2+) ion. *J. Bacteriol.* **182**: 6264-7
- Zhou XL, Fang ZP, Ruan ZR, Wang M, Liu RJ, Tan M, Anella FM & Wang ED (2013a) Aminoacylation and translational quality control strategy employed by leucyl-tRNA synthetase from a human pathogen with genetic code ambiguity. *Nucleic Acids Res.* **41**: 9825-9838
- Zhou X-L, Ruan Z-R, Wang M, Fang Z-P, Wang Y, Chen Y, Liu R-J, Eriani G & Wang E-D (2014) A minimalist mitochondrial threonyl-tRNA synthetase exhibits tRNA-isoacceptor specificity during proofreading. *Nucleic Acids Res.* **42**: 13873-13886
- Zhou X-LL, Ruan Z-RR, Huang Q, Tan M & Wang E-DD (2013b) Translational fidelity maintenance preventing ser mis-incorporation at Thr codon in protein from eukaryote. *Nucleic Acids Res.* **41**: 302-14
- Zuckermann H, Staal M, Stal LJ, Reuss J, Te Lintel HS, Harren F & Parker D (1997) On-line monitoring of nitrogenase activity in cyanobacteria by sensitive laser photoacoustic detection of ethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4243-51



# **7** **A**RTÍCULOS



# Trans-oligomerization of duplicated aminoacyl-tRNA synthetases maintains genetic code fidelity under stress

Miguel Ángel Rubio<sup>1</sup>, Mauro Napolitano<sup>1</sup>, Jesús A. G. Ochoa de Alda<sup>2</sup>,  
Javier Santamaría-Gómez<sup>1</sup>, Carl J. Patterson<sup>3</sup>, Andrew W. Foster<sup>3</sup>, Roque Bru-Martínez<sup>4</sup>,  
Nigel J. Robinson<sup>3</sup> and Ignacio Luque<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, C.S.I.C. and Universidad de Sevilla, Avda Américo Vespucio 49, E-41092 Seville, Spain, <sup>2</sup>Facultad de Formación del Profesorado. Universidad de Extremadura, Avda de la Universidad s/n. E-10003, Cáceres, Spain, <sup>3</sup>SBBS and Chemistry, Durham University, Durham DH1 1LE, UK and <sup>4</sup>Department of Agrochemistry and Biochemistry, Faculty of Science, University of Alicante, E-03080, Spain

Received August 13, 2015; Revised September 15, 2015; Accepted September 28, 2015

## ABSTRACT

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) play a key role in deciphering the genetic message by producing charged tRNAs and are equipped with proofreading mechanisms to ensure correct pairing of tRNAs with their cognate amino acid. Duplicated aaRSs are very frequent in Nature, with 25,913 cases observed in 26,837 genomes. The oligomeric nature of many aaRSs raises the question of how the functioning and oligomerization of duplicated enzymes is organized. We characterized this issue in a model prokaryotic organism that expresses two different threonyl-tRNA synthetases, responsible for Thr-tRNA<sup>Thr</sup> synthesis: one accurate and constitutively expressed (T1) and another (T2) with impaired proofreading activity that also generates mischarged Ser-tRNA<sup>Thr</sup>. Low zinc promotes dissociation of dimeric T1 into monomers deprived of aminoacylation activity and simultaneous induction of T2, which is active for aminoacylation under low zinc. T2 either forms homodimers or heterodimerizes with T1 subunits that provide essential proofreading activity *in trans*. These findings evidence that in organisms with duplicated genes, cells can orchestrate the assemblage of aaRSs oligomers that meet the necessities of the cell in each situation. We propose that controlled oligomerization of duplicated aaRSs is an adaptive mechanism that can potentially be expanded to the plethora of organisms with duplicated oligomeric aaRSs.

## INTRODUCTION

Functional innovation rarely occurs by the *de novo* tailoring of sequences but most frequently by co-option of pre-existing functional domains or full-length polypeptides. Divergence of duplicated genes is thought to be a major force in evolution (1). Though in most cases, one of the gene copies degenerates and disappears, it may happen that both copies are fixed in the population by positive natural selection or genetic drift. Once fixed, genes can evolve in distinct ways that may lead to the adoption of novel functions. Duplicated essential genes may also evolve asymmetrically provided that the original function is maintained, either by one of the copies or by the joint action of both genes (2). The latter case often requires the parallel involvement of regulatory systems to coordinate the action of the two copies. For genes encoding modular proteins, evolution may operate distinctly on the different domains. Therefore, the evolution of duplicated genes encoding modular proteins may be complex, with domains evolving with relative independence to other domains *in cis* and *in trans* (1). Deciphering the functional role of duplicated genes after divergence is rarely straightforward and often requires dedicated experimental approaches.

Gene duplication is thought to have played a major role in the evolution of aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs), a family of essential enzymes that provide the aminoacyl-tRNAs substrates for protein synthesis at the ribosome. Contemporary aaRSs are partitioned in two classes called class I and class II (3). Enzymes of each class have evolved from two unrelated ancestral proteins that arose previous to the last universal common ancestor (LUCA) and are thought to have had a broad specificity for tRNAs and amino acids (4,5). Generation of the current aaRSs was proposed to have occurred by multiple successive events of

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 954489521; Fax: +34 954460165; Email: ignacio.luque@ibvf.csic.es

gene duplication and diversification, paralleled by a progressive narrowing of specificity for tRNAs and amino acids by the newly arising enzymes (4,6). Whereas these events are ancient, predating the apparition of the LUCA, other more recent events have sprinkled genomes of the three domains of life with duplicated aaRSs genes of which only a few have been empirically characterized (7–9). These duplicated aaRSs were observed to have diverged evolving distinct features. In some other cases, divergence has originated truncated aaRS paralogs that do not conserve the original aminoacylation function and have adopted new roles (10–12).

AaRSs are modular proteins. The catalytic domain of class I and class II enzymes catalyzes the aminoacylation reaction in two steps: the activation of the amino acid by ATP and the subsequent transfer of the amino acid moiety to the acceptor end of the tRNA (13). During the evolutive diversification of aaRSs other domains have been appended to this catalytic module. Some of the appended domains play accessory roles assisting the canonical aminoacylation reaction (i.e. by interacting with tRNA), whereas others perform a variety of functions in many cases not related to translation (14). Some aaRSs contain editing domains appended to the catalytic domain that provide a proofreading step to the aminoacylation reaction, thus contributing to the correct pairing of tRNAs with their cognate amino acid and to the overall fidelity of translation. The necessity for proofreading comes from the insufficient discrimination capacity of the active site of these aaRSs which, with a certain rate activates near-cognate amino acids and misacylates cognate tRNAs with them (15). Misacylated tRNAs are thus carriers of non-cognate amino acids and need to be hydrolyzed (edited) to prevent mistranslation (i.e. the misincorporation of amino acids to nascent polypeptides at the ribosome), which in general provoke detrimental effects (15). Crucial to translational fidelity, proofreading either occurs after the first step of the aminoacylation reaction (pre-transfer editing) or once the amino acid is bound to the acceptor end of the tRNA (post-transfer editing). The latter typically occurs at specific editing domains and requires the translocation of the acceptor end of the misacylated tRNA from the synthetic active site in the catalytic domain to a hydrolytic editing site located 30–40 Å away (16,17). Released aminoacyl-tRNAs may also be edited *in trans* most commonly by stand-alone proteins often homologous to editing domains of aaRSs (18–21).

Threonyl-tRNA synthetase (ThrRS) is a dimeric class II aaRS with proofreading activity. Specific recognition of the amino acid substrate at the catalytic site of ThrRS is based on the interaction of the hydroxyl group in the side chain of threonine with a zinc atom universally present in the active site of these enzymes (22,23). This permits the discrimination of isosteric valine, with a methyl group in the side chain that does not interact with zinc, but not of serine which, similar to threonine, contains a hydroxyl group in the side chain (22). Thus, with a certain frequency, ThrRS activates Ser and charges tRNA<sup>Thr</sup> with Ser. Bacterial and eukaryotic cytoplasmic ThrRSs contain an N-terminal editing domain that hydrolyzes Ser-tRNA<sup>Thr</sup> (16,24), whereas in some archaea, editing of this misacylated intermediate is mediated by trans-acting factors (19,25).

We observed that in organisms of the three domains of life, genes encoding aaRSs are very frequently duplicated and in some cases triplicated. In this work we have investigated how duplicated ThrRSs have evolved post-duplication, focusing on the asymmetric acquisition or degeneration of functional abilities, their correlation with some sequence features and how the function is partitioned between these divergent enzymes. Using the model cyanobacterium *Anabaena* we show that duplicated ThrRSs, named T1 and T2, have evolved distinct expression profiles and functional features, some of which correlate to specific sequence insertions/deletions. Evidence demonstrate that T1 is constitutively expressed, it is equipped with aminoacylation and editing activities and that T1 homodimers are responsible for Thr-tRNA<sup>Thr</sup> production in zinc sufficiency, yet in low zinc T1 dimers dissociate into monomers with no aminoacylation activity. T2 expression is induced by low zinc and it is active for aminoacylation in these conditions though it is editing-defective and produces mischarged Ser-tRNA<sup>Thr</sup> at a high rate. We present *in vivo* and *in vitro* evidence showing that T2 forms homodimers and also heterodimers with subunits of apo-T1 that provide editing activity *in trans*. Thus, three dimeric ThrRS isoforms, (T1)<sub>2</sub>, (T2)<sub>2</sub> and apo-T1-T2, with distinct functional properties are assembled according to metabolic conditions. We propose that this mechanism for generating oligomeric aaRSs variants that best fit with the cell status is extensive to other organisms with duplicated oligomeric aaRSs.

## MATERIALS AND METHODS

### Organisms and growth conditions

*Anabaena* sp. PCC 7120 (also known as *Nostoc* sp. PCC 7120) was routinely grown at 30°C and 75 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> in BG-11 medium (26). When needed antibiotics were supplemented at the following concentrations: 5 μg ml<sup>-1</sup> streptomycin, 5 μg ml<sup>-1</sup> spectinomycin, 25–50 μg ml<sup>-1</sup> neomycin. When indicated, TPEN (*N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine) was added to liquid cultures at a final concentration of 20 μM. The complementation assay described in Figure 1A was carried out using the *E. coli* conditional mutant IBPC6881(pSGUB4), whose chromosomal *thrS* gene is disrupted and relies on a *thrS* gene resident in plasmid pSGUB4 for survival (27). pSGUB4 carries a *sacB* gene, which is lethal in the presence of sucrose. Plasmids used for complementation (pCMN15, pCMN16, pCMN17, pCMN18 and pCMN19) are derivatives of pTrc99A. Plasmids and oligonucleotides used in this work are listed in Supplementary Tables S1 and S2, respectively.

*E. coli* DH5α was routinely used for cloning purposes and BL21(DE3) for overexpression of proteins.

### Acid urea polyacrylamide gel electrophoresis

tRNA was purified in acidic conditions from 40 ml cultures of *Anabaena*. Cell pellets were resuspended in TL buffer (0.3 M sodium acetate, 10 mM EDTA pH 4.3), incubated with TRIsure (Bioline) and chloroform, nucleic acids in the aqueous phase were recovered by precipitation with 65% isopropanol and resuspended in 10 mM sodium acetate pH



4.5, 1 mM EDTA. RNA was loaded on 8 M urea, 6.5% acrylamide gels, electrophoresed as described (28), transferred to Genescreen Plus membranes (Dupont) and hybridized to ( $^{32}\text{P}$ )-labeled probes.

#### Purification of recombinant proteins by affinity chromatography and Western blot

Genes *thrS1* and *thrS2* from *Anabaena* were cloned in the pCMN28b vector (29) in frame with the sequence encoding a Strep-TagII and introduced in *E. coli* BL21(DE3). For overexpression, cells were cultured at 37°C to an OD (600 nm) of 0.5–0.7, supplemented with 1 mM IPTG and incubated for 3–5 h at 37°C. After harvesting by centrifugation cells were resuspended in 100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10% glycerol and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), extracts were prepared by lysis using a French Press and subjected to purification in StrepTrap HP columns (GE Healthcare) following the instructions of the manufacturer.

For purification of His-tagged proteins by Ni-NTA chromatography, cell extracts were prepared in 100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10% glycerol or 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 500 mM NaCl and applied to His-Trap columns (GE Healthcare). Chromatography was performed following the indications of the manufacturer.

Western blots were performed by resolving proteins by SDS-PAGE and transferring them to Hybond-P PVDF membranes (GE Healthcare) that were incubated with anti-His antibodies (Qiagen) or anti-StrepTag-II antibodies (IBA).

#### tRNA preparation and aminoacylation assays

Gene encoding *Anabaena* tRNA<sup>UGU(1)</sup> was modified to introduce a CCA sequence in the 3'-end upon cloning in pCMN28b and the resulting plasmid introduced in *E. coli* BL21(DE3). For overexpression, cells were cultured in LB supplemented with 2% glucose at 30°C to an OD (600 nm) of 0.5, washed and re-inoculated in LB with no glucose, supplemented with 1 mM IPTG and further incubated at 30°C for 16 h. After harvesting by centrifugation, cells were resuspended in TL buffer (0.3 M sodium acetate pH 4.3, 10 mM EDTA), extracted twice with phenol pH 4.5 (Amresco) and nucleic acids were recovered by precipitation with 2 volumes of absolute ethanol. One sample was resuspended in 200 mM Tris-acetate pH 8.5 and incubated 1 h at 37°C to be used as a control of deacylated tRNA. The rest of the samples was resuspended in DEPC-H<sub>2</sub>O and subjected to sequential precipitation with isopropanol. First, high molecular weight nucleic acids were eliminated by precipitation with 30% isopropanol and total tRNA was subsequently recovered by precipitation with 60% isopropanol. Pellets were resuspended in RNase-free water, heated at 70°C for 3 min and cooled slowly for refolding. The concentration of *Anabaena* tRNA<sup>Thr</sup> in our preparations was determined by plateau aminoacylation assays (see below). Aminoacylation assays were carried out as described (30). Briefly, 22  $\mu\text{l}$  reactions containing 100 mM HEPES pH 7.2, 20 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 0.1 mg ml<sup>-1</sup> BSA, 0.5 mM di-thiotreitol (DTT), 5  $\mu\text{M}$  tRNA, 50–250 nM enzyme and 120  $\mu\text{M}$  ( $^{14}\text{C}$ )-L-Ser or 20  $\mu\text{M}$  ( $^{14}\text{C}$ )-L-Thr were

incubated at 30°C and stopped on filters soaked with 5% trichloroacetic acid. For plateau aminoacylation assays the enzyme concentration used was 400 nM.

#### Deacylation assays

Ser-tRNA<sup>Thr</sup> was produced in plateau aminoacylation assays using editing-defective T2 $\Delta\text{N}$  enzyme. 22  $\mu\text{l}$  assays contained 10  $\mu\text{M}$  tRNA, 5  $\mu\text{M}$  enzyme, 20  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -L-Ser and 4 U ml<sup>-1</sup> yeast inorganic pyrophosphatase. Reactions were incubated for 2 h at 30°C and stopped upon addition of 2% acetic acid. tRNA was extracted twice with phenol pH 4.5 and precipitated with 2 volumes of ethanol and incubation for 12 h at -80°C. Pellets were resuspended in 50 mM phosphate buffer pH 5.0 and Ser-tRNA<sup>Thr</sup> was quantitated using a scintillation counter. Deacylation reactions contained 150 nM Ser-tRNA<sup>Thr</sup>, 50 nM enzyme, 150 mM KHPO<sub>4</sub> pH 7.5, MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg ml<sup>-1</sup> BSA, 1 mM DTT and 4 U ml<sup>-1</sup> inorganic pyrophosphatase.

#### Gel filtration chromatography and metal substitution

Chromatographies were performed using 100 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT as chromatography buffer supplemented as indicated in each experiment in a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare). Aliquots of 0.5 ml were collected and assayed for tRNA<sup>Thr</sup> aminoacylation. For metal substitution assays, preparations of T2 containing 25  $\mu\text{M}$  protein were incubated with 5 mM EDTA for 12 h at 4°C. 100  $\mu\text{l}$  were applied to a Superdex 200 column equilibrated with Chelex 100-treated chromatography buffer containing the indicated metal salt at 10  $\mu\text{M}$  final concentration. Aminoacylation activity was determined in fractions corresponding to the peak that were subsequently subjected to buffer exchange in PD-10 columns equilibrated with 10 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl previously depleted of metals by filtration through Chelex-100 resin twice. Metal content in the eluted fractions was determined by ICP-MS at the CITIUS facility (Universidad de Sevilla).

#### Zinc chelator competition assays

To produce the *apo*-form of Strep Tag-II tagged T1 or T2 proteins purified in streptavidine columns as described above were further purified by HiTrap Heparin HP columns (GE Healthcare) using 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 mM NaCl, 5 mM DTT and 5 mM EDTA as a chromatography buffer. Protein charged columns were transferred into an anaerobic chamber and fractions were eluted using a buffer containing 10 mM Hepes pH 7 and 500 mM NaCl. Protein content was measured by measuring the absorbance at 280 nM and a 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) assay was performed to confirm the reduced state of the protein. Zn(II) was added incrementally to a mix containing the protein and Mag-Fura-2 and the decrease in the absorbance at 366 nm was monitored subsequent to each Zn(II) addition.

Proteins were supplemented with two equivalents of Zn(II) and 20 equivalents of NTA or HEDTA as indicated and incubated at 4°C. After 24 h, proteins were resolved on

a Sephadex G-25 matrix previously equilibrated with metal-depleted buffer (all performed under anaerobic conditions). Fractions were analyzed by ICP-MS and the protein content was measured using a Bradford assay. The pH dependent zinc binding constants of NTA and HEDTA were calculated using Schwarzenbach's  $\alpha$ -coefficient method (Equations 1 and 2) (31).

$$K'_A = K_A \alpha_{H-L} \quad (1)$$

$$\alpha_{H-L} = (1 + \beta_{H,1}[H] + \beta_{H,2}[H]^2 + \dots + \beta_{H,n}[H]^n)^{-1} \quad (2)$$

where  $K'_A$  is the pH dependent zinc affinity constant,  $K_A$  the absolute zinc affinity constant,  $\alpha_{H-L}$  is Schwarzenbach's  $\alpha$ -coefficient,  $\beta_{H,1} = 10^{pKa1}$ ,  $\beta_{H,2} = 10^{pKa1 + pKa2}$  etc.,  $[H] = 10^{-pH}$ . NTA has an absolute affinity constant for zinc of  $10^{10.66} \text{ M}^{-1}$  and sequential acid dissociation constants  $pKa1 = 9.73$ ,  $pKa2 = 2.49$ ,  $pKa3 = 1.89$  (31). HEDTA has an absolute affinity constant for zinc of  $10^{14.6} \text{ M}^{-1}$  and sequential acid dissociation constants  $pKa1 = 9.87$ ,  $pKa2 = 5.38$ ,  $pKa3 = 2.62$  (31).

### Amino acid analysis

Amino acid determination was performed after derivatization as described in (32). Briefly, pellets from 50 ml cultures were collected by centrifugation, resuspended and incubated for 1 h in 1 ml 0.1 N HCl on ice and further centrifuged at 12,000  $\times g$  for 10 min at 4°C. A volume of 60  $\mu\text{l}$  of the supernatant was derivatized by mixing with an equal volume of ethanol:H<sub>2</sub>O:triethanolamine:phenylisothiocyanate 7:1:1:1, incubated at room temperature for 30 min, and dried under flowing N<sub>2</sub>. The pellet was resuspended in 60  $\mu\text{l}$  of 4 mM sodium phosphate (pH 7.4), 2% (vol/vol) acetonitrile and resolved by reverse phase HPLC using a LiChrospher 100 RP-18 (4 mm  $\times$  125 mm) column (Merck). Chromatography was performed at 1.5 ml min<sup>-1</sup>, 46°C in an Elite LaChrom (Hitachi) system by a step-wise gradient of solvent A, containing 70 mM sodium phosphate (pH 6.55) and 2% acetonitrile (vol/vol) and solvent B, containing 50% (vol/vol) acetonitrile. AA-S-18 (Sigma) was used as internal standard. A cytoplasmic volume of 125  $\mu\text{l}$  per mg chlorophyll (33) was considered for calculations of intracellular concentration of amino acids.

### Bioinformatics and phylogenetic methods

Genomes with redundant aaRS genes were extracted by interrogating the JGI database (<https://img.jgi.doe.gov/>) as of 06.05.2015.

For the phylogeny of ThrRSs, all 9629 ThrRS sequences available at Refseq-NCBI (as of October, 2014) were retrieved using a copy of *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120 (gi 637230694) as query for a DELTA-BLAST search (34). Sequences were MAFFT aligned (35) and Jalview (36) was used to remove incomplete sequences and to reduce redundancy (99% threshold). Multiple alignment was then trimmed under stringent conditions to remove saturated positions, gaps and constant sites resulting in 2654 sequences and 151 variable positions (34). Phylogenetic tree was reconstructed using RAxML (37).

## RESULTS

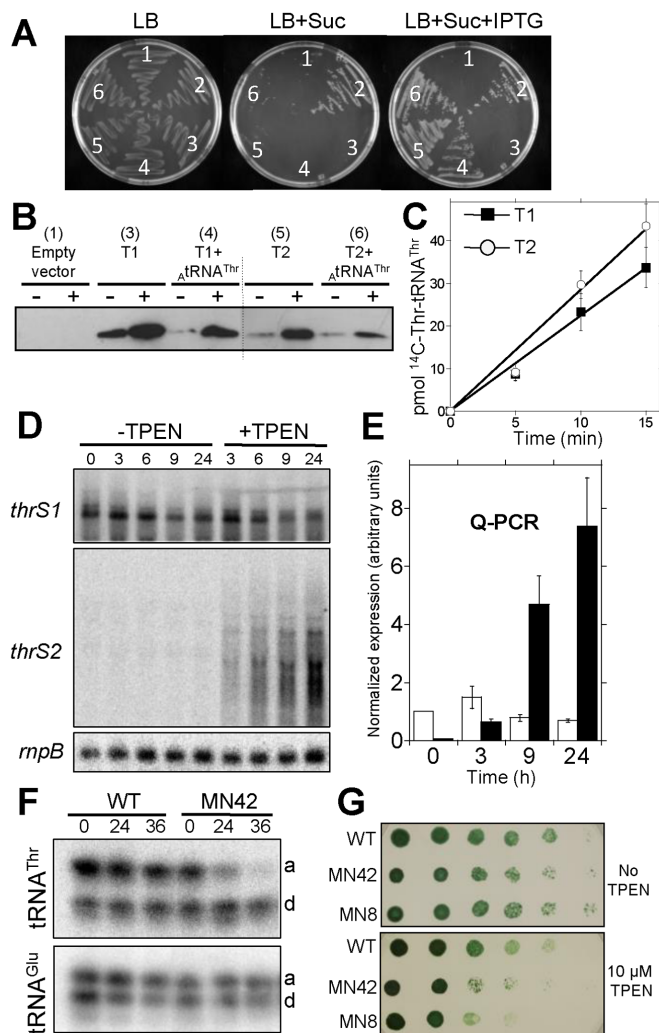
### Duplicated genes encoding aaRSs are common in the three domains of life

26,837 genomes from organisms of the three domains of life were surveyed for duplicated or triplicated genes encoding aaRSs and ca. 25,913 cases were observed (Data set S1). Genes encoding ThrRS were found duplicated or triplicated in more than 1,000 genomes, of which about 900 were bacteria including one third of cyanobacterial species and a variety of Gram-negative and Gram-positive bacteria. Such duplications were the result of multiple evolutionary events that, in many cases, preceded the diversification of phyla (Supplementary Figure S1). To investigate the role of duplicated *thrS* genes, the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 (hereafter *Anabaena*) was chosen as a model. *Anabaena* genes *thrS1* and *thrS2* encoding enzymes T1 and T2, respectively, were both shown to be functional by complementation of an *E. coli* conditional mutant (27) (Figure 1A), and by *in vitro* aminoacylation assays of tRNA<sup>Thr</sup> (Figure 1C). Interestingly, T1 only complemented the *E. coli* mutant when co-expressed with a tRNA<sup>Thr</sup> from *Anabaena* (Figure 1A, compare sectors 3 and 4 and Figure 1B), evidencing a distinct ability of the two enzymes to charge tRNA<sup>Thr</sup> from distinct sources and pointing to the existence of critical structural differences between both proteins. Functional redundancy of *thrS1* and *thrS2* was investigated by construction and analysis of *Anabaena* mutants. Knock-out mutants of *thrS2* gene were readily obtained and have been reported (29,38). By contrast, no *thrS1* mutants could be obtained despite repeated efforts, implying that *thrS1* is essential. Repeated attempts to replace *thrS1* by *thrS2* were also unsuccessful, indicating that these genes are not exchangeable and not functionally redundant.

### Differential expression of *thrS* genes in *Anabaena*

Gene *thrS2* forms an operon with four flanking genes, which are repressed under standard growth conditions and induced by zinc limitation. This response is controlled by Zur, a zinc-sensing regulator of the FUR family that represses two promoters of the operon, one just upstream of *thrS2* (29,38). Here, the expression of *thrS1* was analyzed in cells cultured under standard growth conditions or subjected to zinc limitation (29,38). Unlike *thrS2*, *thrS1* showed a moderate decay of expression as zinc limitation advanced, to reach a level of about half the initial one (Figure 1D,E). Quantitative assessment of the expression of both genes by real-time Q-PCR (Figure 1E) showed that under standard growth conditions *thrS2* expression was almost undetectable, and *thrS1* transcript was about 20-fold more abundant. By contrast, 24 h after the onset of zinc deficiency, *thrS2* transcript abundance increased 200-fold to become 10-fold more abundant than the *thrS1* transcript.

Differential expression profiles suggested distinct tasks for T1 and T2, prompting us to investigate the role of each enzyme in *Anabaena* cells during the course of zinc deficiency. The proportion of charged versus uncharged tRNA<sup>Thr</sup> was assessed in time-course experiments using acid urea polyacrylamide gel electrophoresis. Whereas in WT-*Anabaena* the level of aminoacylated tRNA<sup>Thr</sup> only



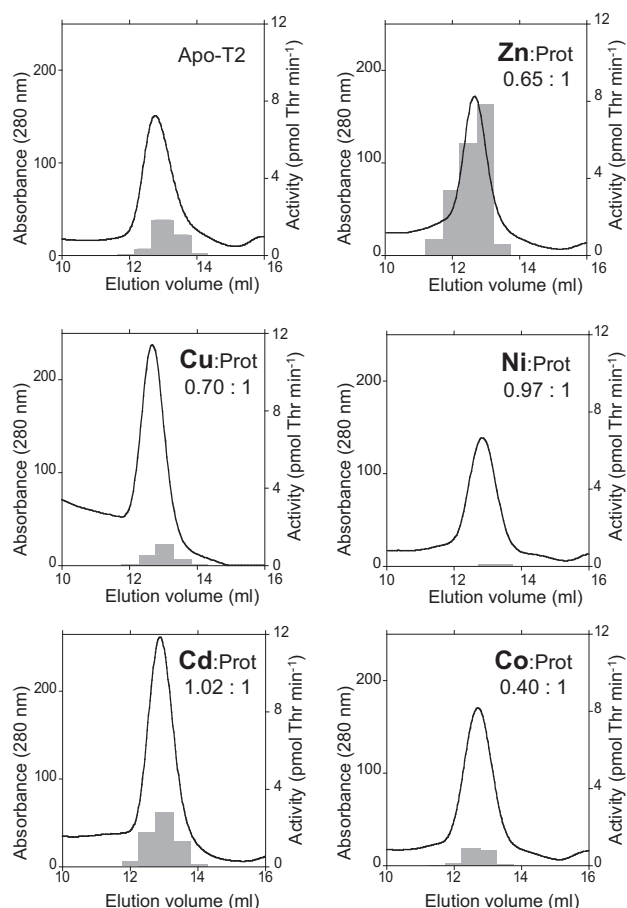
**Figure 1.** Functional characterization of T1 and T2. (A) Complementation assay of the *E. coli* conditional mutant IBPC6881 (pSGUB4). Derived strains containing the empty vector pTrc99A (sector 1) or derived plasmids expressing the *E. coli* ThrRS (sector 2), T1 (sector 3), T1 and *Anabaena* tRNA<sup>Thr</sup>(CGU) (sector 4), T2 (sector 5), T2 and *Anabaena* tRNA<sup>Thr</sup>(CGU) (sector 6) were streaked on the indicated media. (B) Lack of complementation is not due to a deficient expression of T1 in *E. coli*. Western blot of extracts were carried out using 10  $\mu$ g protein extracts from the strains used in the complementation assay that express the indicated products, cultured (+) or not (-) with 1 mM IPTG and incubating with anti-hexahistidine antibodies. Numbers indicate the corresponding sector for each strain in the complementation assay. (C) Aminoacylation assay with recombinant T1 or T2 proteins. Assays were carried out in a volume of 22  $\mu$ l and contained 50 nmol of T1 or T2 and 5  $\mu$ M *Anabaena* tRNA<sup>Thr</sup>(CGU). Average values  $\pm$  s.d. of three independent experiments are represented. (D) Northern blot with RNA from *Anabaena* cells subjected or not to incubation in the presence of chelating agent TPEN for the indicated period of time (in hours). Genes used as probes are indicated. (Northern assays of *thrS2* in these conditions have been published elsewhere (38), and it is only shown here for the sake of comparison). (E) Quantitative Real-Time PCR analysis of transcripts of *thrS1* and *thrS2* from cells incubated or not with 20  $\mu$ M TPEN for the time indicated in hours in the horizontal axis. Levels of the *thrS1* gene in cells not incubated with TPEN ( $t = 0$ ) were assigned the arbitrary value of 1 and all other measures were expressed in proportion to this value. Empty and solid bars correspond to *thrS1* and *thrS2*, respectively. Average values  $\pm$  SE of three independent biological replicas are represented. (F) Total tRNA (2  $\mu$ g) from WT *Anabaena* cells or the deletion mutant MN42 ( $\Delta$ *thrS2*) cultured for the indicated time (in hours) in the presence of 20  $\mu$ M TPEN were re-

solved in denaturing urea-acrylamide acid gels, transferred to nylon membranes and hybridized with the indicated probes. Positions of aminoacylated tRNA and deacylated tRNA are labeled 'a' and 'd', respectively. (G) Serial dilutions of cell suspensions of WT *Anabaena*, the deletion mutant MN42 ( $\Delta$ *thrS2*) or the insertion mutant MN8 (*thrS2::C.S3*) were spotted onto BG-11 solid medium supplemented or not with 10  $\mu$ M TPEN as indicated. All experiments were repeated at least three times with identical results.

### T1 and T2 use zinc as cofactor

All ThrRSs characterized to date are reported to be metalloenzymes with a zinc cofactor in the catalytic site essential for activity (23,39–41). Thus, the observation that T2 was predominantly active *in vivo* under low zinc was unexpected and pointed at the existence of mechanisms to maintain its activity despite the low concentration of zinc. Sequence comparisons showed that residues identified as zinc-ligands in other ThrRSs (23,39,40) are conserved in T1 and T2 (Supplementary Figure S2), and metal analyses by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) revealed that heterologously expressed T1 and T2 contained approximately two atoms of zinc per dimer, rising to approximately three atoms per dimer for T2 following incubation with zinc (see Supplementary Figure S3). Based on this, the hypothesis that T2 could bind zinc with higher affinity than T1 was tested. However, competition experiments with chelating agents did not reveal large differences in the affinity of T1 and T2 for zinc, which was in the range of  $10^{-10}$ – $10^{-12}$  M for both proteins (Supplementary Figure S3B–D). A well-documented alternative strategy for acclimation to low-zinc environments consists of replacing zinc metalloproteins by isoforms that use an alternative metal cofactor (42). This prompted us to check whether T2 would be active using another metal. To test this, T2 was prepared in the *apo* form by prolonged incubation with EDTA and it was re-metallated with a variety of divalent metals by buffer exchange in gel filtration. As shown in Figure 2, these *in vitro* treatments allowed metallation of T2 with Zn, Ni, Cu or Cd in proportions close to one atom per monomer, or somewhat less efficiently with Co. However, except for the zinc-containing enzyme, all other metal-substituted preparations showed a tRNA charging activity similar to the residual activity of the *apo*-protein (Figure 2) indicating that T2 is not functional with an alternative metal cofactor.

solved in denaturing urea-acrylamide acid gels, transferred to nylon membranes and hybridized with the indicated probes. Positions of aminoacylated tRNA and deacylated tRNA are labeled 'a' and 'd', respectively. (G) Serial dilutions of cell suspensions of WT *Anabaena*, the deletion mutant MN42 ( $\Delta$ *thrS2*) or the insertion mutant MN8 (*thrS2::C.S3*) were spotted onto BG-11 solid medium supplemented or not with 10  $\mu$ M TPEN as indicated. All experiments were repeated at least three times with identical results.



**Figure 2.** *In vitro* replacement of the metal cofactor of T2. Pure preparations of recombinant T2 protein at concentration 25  $\mu$ M were incubated with 5 mM EDTA and subsequently subjected to gel filtration in a Sephadex S-200 column equilibrated with Chelex 100-treated buffer containing 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, supplemented with the metal indicated in each panel at a concentration of 5  $\mu$ M. Aminoacylation activity was determined in fractions that contained protein and it is represented as gray bars. Fractions corresponding to the peak were subjected to buffer exchange to eliminate metals from the buffer and analyzed by ICP-MS. Numbers indicate the metal:protein ratio of the peak fractions.

### T1 dissociates upon cofactor loss

To better understand the traits that make enzymes T1 and T2 best suited for functioning under zinc sufficiency and deficiency, respectively, their physico-chemical properties were analyzed. The quaternary states of T1 and T2 were analyzed by gel filtration chromatography (Figure 3A). When 5  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> was present in the chromatography buffer, both proteins eluted with an estimated molecular weight of ca. 150 kDa, consistent with the expected MW of dimeric ThrRSs (Figure 3A). Omission of zinc or addition of EDTA to the buffer in chromatographies of the T1 protein generated a novel peak, devoid of aminoacylation activity, corresponding to the size of a monomer (Figure 3A). By contrast, T2 eluted as a dimer in all conditions. These results indicated that T1 dissociated upon removal of the zinc cofactor, which is in sharp contrast to the stability of T2 dimers. To confirm this, T1-derived mutant proteins carrying sub-

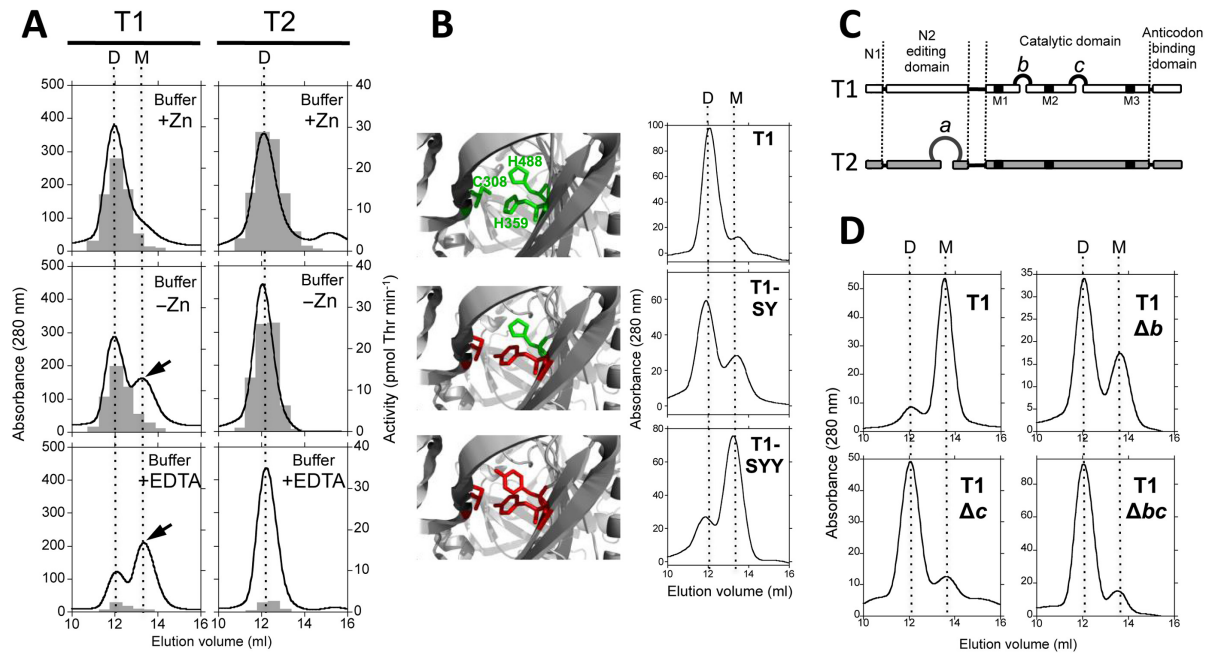
stitutions in the coordination residues for zinc were generated and tested. By contrast to wild-type T1, which elutes as a dimer when zinc is present in the buffer, double mutant T1-SY (containing mutations Cys308Ser and His359Tyr) and triple mutant T1-SYY (containing the additional mutation His488Tyr) eluted partly or mostly as monomers in gel filtration, respectively (Figure 3B), confirming a role for zinc in the preservation of the dimeric state of T1. To check whether dissociation of T1 is reversible, *apo*-T1 was prepared by prolonged incubation with EDTA and subjected to gel filtration using a buffer supplemented with 5  $\mu$ M zinc. As shown in Supplementary Figure S4A, re-metallation promoted dimerization of T1. Combined, these results indicate that the oligomeric state of T1 is governed by the allosteric occupancy of the zinc pocket.

T1 and T2 sequences were compared in search for features that could correlate to the distinct stability of their dimers. The catalytic domain of T1 contains two short insertions of 6 and 3 amino acids, named *b* and *c*, which are absent in T2 (Figure 3C and Supplementary Figure S2). Individual or simultaneous deletion of *b* or *c* generated mutant proteins T1 $\Delta$ *b*, T1 $\Delta$ *c* and T1 $\Delta$ *bc*, which unlike wild-type T1, eluted mostly as dimers in gel filtration in the presence of EDTA (Figure 3D). These T1-derived mutant proteins were in this respect similar to T2. T1 $\Delta$ *b*, T1 $\Delta$ *c* and T1 $\Delta$ *bc* were active, showing respectively 120  $\pm$  18, 60  $\pm$  9 and 37  $\pm$  6% (average  $\pm$  s.d.) of the aminoacylation activity of wild-type T1. These results provide a structural basis for the dissociation of T1 and indicate that insertions *b* and *c* are somehow involved in the dynamic events linking cofactor loss to the dissociation of T1.

### T2 is impaired in editing activity

Given the stability of T2, its inability to replace T1 was intriguing. T2 contains an extra 20 amino acid sequence (insert *a*, residues 128–147) in the N2 editing domain, close to residues C154 and H158 (C182 and H186, respectively in the *E. coli* enzyme), important for editing (Figure 3C and Supplementary Figure S2) (16). Potential effects of this insertion on editing were tested by monitoring the production of tRNA<sup>Thr</sup> aminoacylated with near-cognate L-Ser. As shown in Figure 4A, T2 produced Ser-tRNA<sup>Thr</sup> at a measurably higher rate than T1 suggesting that T2 is impaired in post-transfer editing activity and pointing to insert *a* as the possible cause. To test this, we deleted insert *a* from T2. The mutant protein T2 $\Delta$ *a* showed intact aminoacylation activity as it charged tRNA<sup>Thr</sup> with Thr at a similar rate than T2 (see inset in Figure 4A) but produced misacylated Ser-tRNA<sup>Thr</sup> at a lower rate (Figure 4A), indicating an improved editing activity for T2 $\Delta$ *a*. Further support for this was obtained by direct assessment of editing activity measuring deacylation of purified Ser-tRNA<sup>Thr</sup> (Figure 4B). These results implied that the evolutive acquisition of insert *a* has impaired the ancestral editing activity of T2. It is worth noting that although impaired, T2 is not totally devoid of editing activity (compare the deacylation curve of T2 with that of T2 $\Delta$ N mutant, which lacks subdomains N1 and N2 and has null editing activity) (Figure 4B).

Some mitochondrial enzymes like PheRS and LeuRS have been shown to compensate the evolutive loss of post-



**Figure 3.** Cofactor loss promotes dissociation of T1. (A) Gel filtration assays of recombinant T1 and T2 proteins in buffer containing 150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM DTT, supplemented with 5  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> (top panels) or 5 mM EDTA (bottom panels). 'D' and 'M' indicate the elution volume corresponding to the size of a dimer (150 kDa) or a monomer (75 kDa), respectively (B) Gel filtration assays in buffer supplemented with 5  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub> of WT, double mutant T1-SY (Cys308Ser and His359Tyr) and triple mutant T1-SYY (containing the additional mutation His488Tyr). Pictures on the left are based on the *E. coli* ThrRS structure (PDB code 1QF6) and represent the zinc-binding pocket showing in green the zinc coordination residues and in red residues mutated in the SY and SYY proteins. (C) Diagram showing the position of insertions *b* and *c* of T1 and insertion *a* of T2. "M1-3" indicate the conserved motifs of the catalytic domain of class II aaRSs. (D) Gel filtration of wild-type T1 or mutant proteins containing the indicated mutations using chromatography buffer supplemented with 5 mM EDTA.

transfer editing activity by increased discrimination at their active site (43–45). To check whether T2 has evolved similarly, activation of Thr and Ser by T1 and T2 was analyzed by means of ATP-PP<sub>i</sub> exchange assays. As shown in Table 1, T2 revealed 5- and 4-fold more efficient than T1 for activation of Thr and Ser, respectively (catalytic efficiency is defined as  $k_{cat}/K_M$ ). However the specificity factor for Thr over Ser (defined as the ratio of catalytic efficiencies for Thr and Ser) was in the same range for T1 and T2 (300 versus 400, respectively) and far from the value expected for a highly specific enzyme that should be at least  $3 \times 10^3$  (46). Therefore, in the case of T2, impairment of post-transfer editing was not associated to an enhancement of discrimination by the active site, as described for some mitochondrial aaRSs.

*In vivo*, accurate discrimination of cognate versus near-cognate amino acid is also influenced by their relative abundance in the cytoplasm. For instance, discrimination by T2 could be favored if under zinc deficiency the concentration of Ser was several-fold lower than that of cognate Thr. To test this the concentrations of Thr and Ser in the cytoplasm of *Anabaena* cells were determined and the specificity factor (defined as selectivity factor  $\times$  [Thr]/[Ser]) was calculated for T1 and T2 (using for the latter the values measured in cells treated with TPEN). As shown in Table 2, the selectivity factor was very similar for T1 and T2.

### Trans-editing of Ser-tRNA<sup>Thr</sup> by T1 subunits

The inability to replace T1 by T2 through genetic manipulation was consistent with the observed impairment of T2 editing activity and the low discrimination capacity of its active site. However, mutants expressing T2 at relatively high levels were easily obtained suggesting the existence of proof-reading mechanisms. It was then considered whether T1 subunits could act as a *trans*-editing factor of Ser-tRNA<sup>Thr</sup> produced by T2. This may also happen in the wild type in zinc deficiency as T1 expression is not null (Figure 1D,E) and T2 dimers would be expected to co-exist with some T1 subunits. For experimental approaches directed to ascertain this role for T1, we reasoned that mutant protein T1-SYY was best suited as it does not harbor zinc in the active site and it is devoid of synthetic activity, best resembling T1 subunits in low zinc (Figure 3B). As shown in Figure 4C, the production of Ser-tRNA<sup>Thr</sup> by T2 decreased when T1-SYY was included in the assay, showing an inverse correlation with the concentration of T1-SYY. By contrast, the presence of T1-SYY had no effect on the aminoacylation of tRNA<sup>Thr</sup> with cognate Thr catalyzed by T2 (Figure 4D). In deacylation assays of Ser-tRNA<sup>Thr</sup>, T1-SYY showed intact editing activity similar to that of wild-type T1 (Figure 4E). These results indicated that *in vivo* T1 subunits could act under zinc deficiency as a *trans*-editing factor of misacylated tRNAs produced by T2.

To get a deeper insight on the context where *trans*-editing occurs, we tested whether dissociated T1 subunits may het-

**Table 1.** Steady-state kinetic constants for ATP-[<sup>32</sup>P]PPi exchange by T1 and T2 enzymes

	Thr			Ser			Specificity factor ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}\text{Thr}/(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}\text{Ser})$ )
	$K_{\text{M}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_{\text{M}}$ (mM)	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
T1	2.6 ± 0.3	10.0 ± 1.5	3.8 ± 0.7	274 ± 4	3.290 ± 0.014	0.0120 ± 0.0002	314
T2	0.22 ± 0.03	4.42 ± 0.13	20.1 ± 2.6	77 ± 14	3.6 ± 0.4	0.046 ± 0.010	436

Numbers indicate average ± standard deviation (n = 3).

**Table 2.** Concentrations of threonine and serine in cells subjected or not to zinc deficiency

	[Thr] (mM)	[Ser] (mM)	[Thr]/[Ser]		Selectivity factor (Specificity Factor $\times[\text{Thr}]/[\text{Ser}]$ )
-TPEN	1.19 ± 0.03	0.810 ± 0.024	1.56 ± 0.06	<b>T1</b>	490
+TPEN	4.1 ± 0.3	3.50 ± 0.09	1.17 ± 0.08	<b>T2</b>	511

Numbers indicate average ± standard deviation (n = 3).

erodimerize with T2. A first approach demonstrated that when co-expressed in *E. coli*, distinctly tagged T1 and T2 co-purified (Figure 5A top panel and Supplementary Figure S4B), strongly indicating that they can form heterodimers. Control experiments ruled out cross-reaction of the antibodies or unspecific affinity of the purification resin (Figure 5A middle and bottom panels and Supplementary Figure S4C,D). In those experiments *E. coli* was cultured in rich medium and T1 was most probably metallated, retaining full dimerization potential. To test whether *apo*-T1, which does not form homodimers, was able to dimerize with T2, we conducted similar experiments that included an extensive incubation of the cell extracts with 5 mM EDTA, supplementation of all buffers used for purification with EDTA, and an extended chromatography washing step. In such stringent conditions T1 co-purified with T2 (Figure 5B). Furthermore, T1-SYY mutant protein, which does not form homodimers, also co-purified with T2 from *E. coli* cells expressing both proteins (Figure 5C). These experiments strongly indicated that T1 can form heterodimers in its *apo*-form, a condition in which it does not form homodimers.

To further corroborate these data we sought for *in vivo* evidence of the existence of T1-T2 heterodimers in *Anabaena*. For this, a strain expressing T2 fused to a StrepTag-II in its N-terminus was generated. Cells were incubated with TPEN for 24 h to induce expression and extracts were purified by affinity chromatography. Eluted fractions from the chromatography contained two closely migrating bands of ca. 75 kDa that were identified as T1 (upper band) and T2 (bottom band) by mass spectrometry (Figure 5D), corroborating the existence of T1-T2 heterodimers in zinc-deficiency *in vivo*.

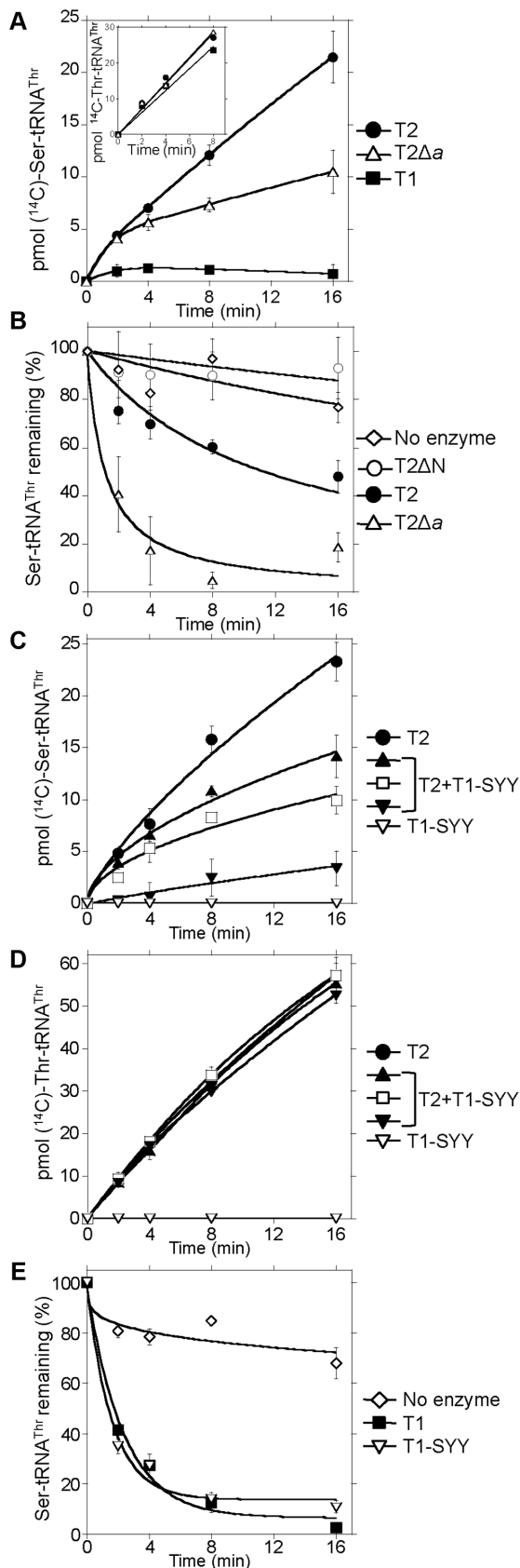
## DISCUSSION

### A model for the concerted function of duplicated ThrRSs

Diversification of duplicated genes is one of the leading forces in evolution and has been the subject of intense investigation and modeling (1). In this article we describe how the divergent evolution of two ThrRSs have resulted in differential expression profiles, enzymatic properties, physicochemical features and functional roles and we identify se-

quence features that correlate to them. Phylogenetic analyses indicate that duplicated *thrS* genes have arisen by an early event previous to the diversification of the cyanobacterial phylum (Supplementary Figure S1). Billion years divergence has led to the accumulation of sequence differences, including three idiosyncratic insertions (47). Results presented in this work indicate specific non-redundant roles for duplicated ThrRSs. A model for the functioning of T1 and T2 based on our data is proposed in a diagram representing different stages of the cell according to zinc availability (Figure 6). This model proposes that under zinc sufficiency the cytoplasm would be populated only by T1 homodimers, as Zur represses T2 expression. T1 is equipped with aminoacylation and editing activities and it would produce only Thr-tRNA<sup>Thr</sup>. As zinc becomes scarce, release of the zinc cofactor from T1 would promote dissociation and loss of its synthetic activity. Low zinc would also determine liberation from Zur repression and expression of T2, which would be dimeric and active under these conditions. Dissociated *apo*-T1 has the capacity of associating with T2 subunits to form heterodimers. Thus, under low zinc the cytoplasm would be populated by an equilibrium of T2 dimers, *apo*-T1-T2 heterodimers and perhaps, some *apo*-T1 monomers. T2 is impaired in post-transfer editing activity, so a fraction of the aminoacyl-tRNAs released would be Ser-tRNA<sup>Thr</sup>. *Apo*-T1 subunits would bind and edit released Ser-tRNA<sup>Thr</sup> *in trans*, preventing or limiting mistranslation under low zinc. Therefore, heterodimers formed *in vivo* under low zinc would show structural and functional asymmetry, being composed of a subunit (T2) with synthetic activity (and some residual editing activity) and a subunit (*apo*-T1) only devoted to mischarged tRNA edition.

Our results show that *in vivo*, T2 conserves aminoacylation activity under low zinc but it is not clear how (Figure 1F,G) as it does not show a comparatively high affinity for zinc (Supplementary Figure S3). This suggests the existence of unknown mechanisms for the preservation of its activity. A survey for other divalent metals that could replace zinc as cofactor indicated that only zinc supported T2 aminoacylation activity (Figure 2). However, it cannot be ruled out that alternative cofactor(s) not tested in our *in vitro* assays may replace zinc and support activity *in vivo*. Alternatively, T2 could be assisted by accessory proteins (i.e.



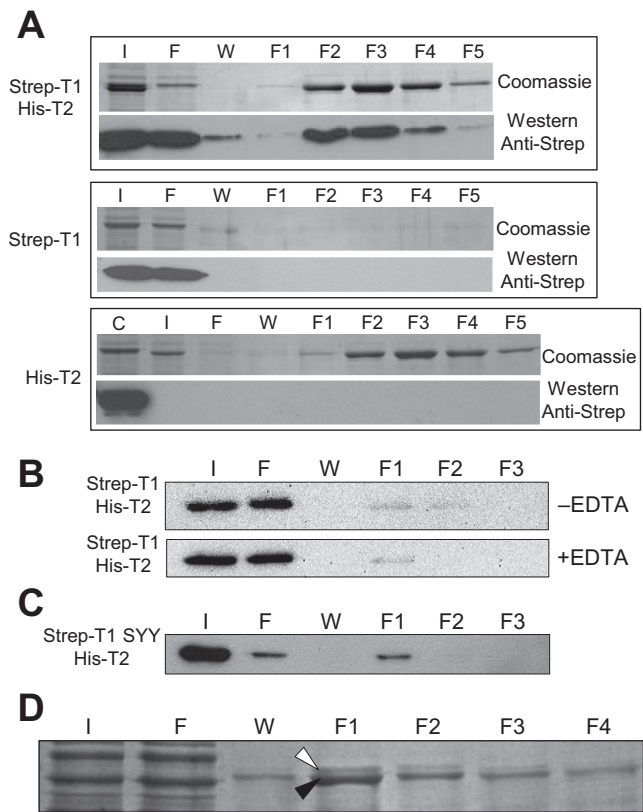
**Figure 4.** T2 misacylates tRNA<sup>Thr</sup> with L-Ser. (A) Aminoacylation assays were carried out in a volume of 22  $\mu\text{l}$  containing 5  $\mu\text{M}$  *Anabaena* tRNA<sup>Thr</sup>

metallochaperones) for capture and retention of zinc in the active site. Interestingly, gene *all4722*, adjacent to and co-transcribed with *thrS2*, encodes a putative metallochaperone of the COG0523 family (48). However, all attempts to demonstrate interaction between both proteins failed. The higher zinc load of T2 observed in some experiments could also be helpful for recruiting zinc to its active site when the metal is scarce (Supplementary Figure S3).

### Degeneration of the editing domain of T2

Post-transfer editing by T2 is impaired but not null (Figure 4B). The residual editing activity is consistent with the conservation of motifs HxxxH and DxCRGPH important for activity (16,24). In turn, reduced editing activity correlates with the presence of insertion *a*, a 20-amino acids long insertion in the close vicinity of motif DxCRGPH, which probably disrupts the geometry of the editing pocket. Consistent with this, the editing activity of T2 is improved by deletion of insert *a* (Figure 4A,B). From an evolutionary point of view, this constitutes an empirical resurrection of the editing function of ancestral T2. An interesting observation is that, within the cyanobacterial phylum not all organisms have conserved both ThrRSs and in species where T2 is the only enzyme, this insertion is either missing or short (6–7 amino acids) (Supplementary Figure S2). This suggests that T2 is most likely not impaired in editing in those species, suggesting in turn that a misacylating ThrRS is negatively selected as a housekeeping enzyme. Other aaRSs with degenerated post-transfer editing domains have been shown to rely on alternative proofreading mechanisms including increased discrimination at the active site (43–45), kinetic proofreading (49) or pre-transfer editing (50). Our results ruled out active site discrimination as an effective fidelity mechanism for T2 (Tables 1 and 2) but do not dismiss the operation of other mechanisms. However, these do not seem to be effective to prevent the production of Ser-tRNA<sup>Thr</sup> *in vitro* (Figure 4) and also probably *in vivo*, given the repeatedly observed inability of T2 to replace T1 by genetic engineering. In the system described here, the mechanism selected to compensate the evolutive degeneration of the editing domain of T2 is post-transfer *trans*-editing by *apo*-T1 subunits.

and 120  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -radiolabeled L-Ser and 200 nM of enzymes T1 (solid squares), T2 (solid circles) or T2Δa (triangles). A similar assay using 20  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -radiolabeled L-Thr is represented in the inset. (B) 150 nM purified Ser-tRNA<sup>Thr</sup> was incubated in deacylation assays with 50 nM T2 (solid circles), T2ΔN (empty circles), T2Δa (triangles) or no enzyme (diamonds). (C) Aminoacylation assays of tRNA<sup>Thr</sup> with L-Ser were performed like in (A) and contained 200 nM T2 (monomer concentration, solid circles), 200 nM T1-SYY (empty inverted triangles) or mixtures of T2 (200 nM monomer) and T1-SYY in proportions 1:1 (solid triangles), 1:2 (empty squares) or 1:5 (solid inverted triangles). (D) Aminoacylation assays of *Anabaena* tRNA<sup>Thr</sup> with 20  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -radiolabeled L-Thr and 20 nM T2 (monomer concentration, solid circles), 20 nM T1-SYY (empty inverted triangles) or mixtures of T2 (20 nM monomer) and T1-SYY in proportions 1:1 (solid triangles), 1:2 (empty squares) or 1:5 (solid inverted triangles) were carried out as in (A). (E) Purified Ser-tRNA<sup>Thr</sup> was incubated in deacylation assays with 100 nM T1 (monomer concentration, solid squares), 100 nM T1-SYY (inverted empty triangles) or no enzyme (diamonds). Average values  $\pm$  s.d. of three independent experiments are represented.



**Figure 5.** T1 and T2 form heterodimers. (A) Extracts from *E. coli* expressing the proteins indicated at the left were subjected to Ni-NTA affinity chromatography, and fractions were resolved by SDS-PAGE and stained with coomassie or transferred to membranes and incubated with anti-StrepTag-II antibodies, as indicated at the right. Letters 'I, F, W and F1-F5' indicated respectively input, flow through, wash and elution fractions 1–5. Letter 'C' on top of the bottom panel indicate a positive control for the western. (B) Panels show western blots with anti StrepTag-II antibodies. Labels and details are like in (A) but the chromatography was performed in the presence or absence of 5 mM EDTA (as indicated on the right) and the washing step was increased to 20 column volumes. (C) Labels and details are like in (A). (D) Extracts were prepared from *Anabaena* cells expressing Strep-T2 and purified through streptavidine columns. White and black arrowpoints indicate respectively T1 and Strep-T2 proteins.

ThrRSs sequences containing insertions at the same position as the insert *a* of T2 are also particularly frequent in *Mycoplasma* and Gram-positives of the high G+C group. Based on our data, these ThrRSs would be expected to be impaired for editing, as proposed for *Mycoplasma* ThrRS (51), implying that either these organisms have a higher tolerance for translational errors, which seem to be the case of *Mycoplasma* (49,51) or that they rely on alternative proofreading mechanisms.

### Allosteric control of T1 oligomeric state

Data presented indicate that dissociation of T1 is a reversible process controlled by zinc. Counter to other oligomeric metalloprotein complexes where a metal functions as a molecular staple by coordinating residues of distinct subunits (52), in ThrRS zinc is buried in the structure at about 15 Å off the interface, making impossible its interaction with the two subunits (22). Therefore, the regulation

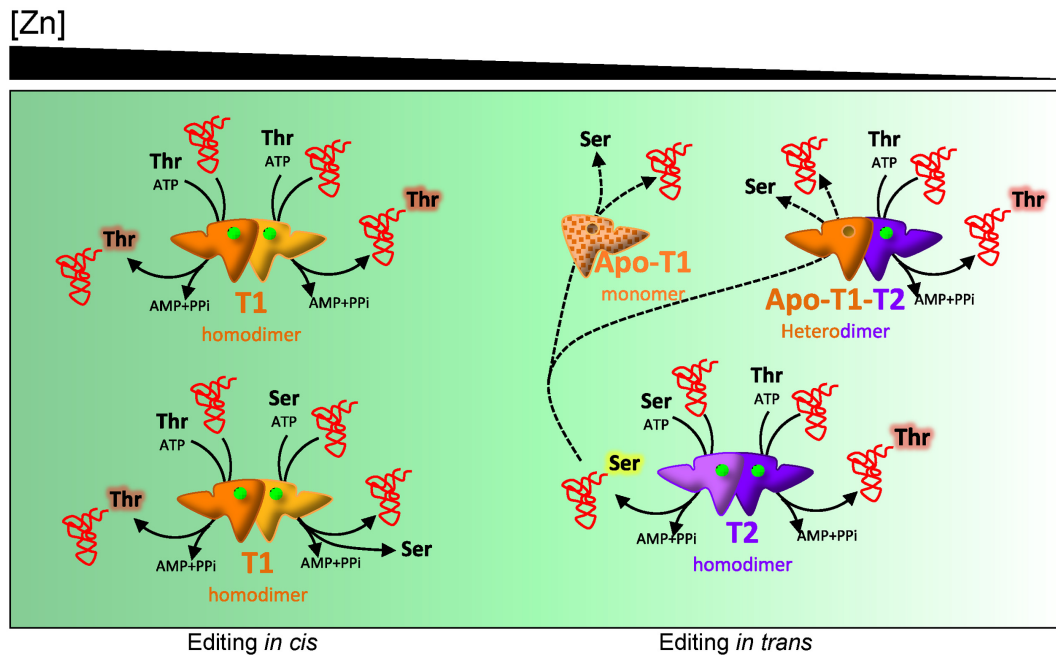
exerted by zinc on the oligomerization of T1 is a *bona fide* allosteric effect. Capture/release of zinc probably induces a conformational rearrangement that initiates at the zinc-binding pocket and propagates toward the interface promoting dimerization or dissociation, respectively. Our data indicate that inserts *b* and *c* are involved in the propagation of the rearrangement, so that their deletion precludes dissociation by shortcutting transmission toward the interface (Figure 3D). It must be noted that propagation of the structural change does not necessarily follow the shortest distance between the zinc-binding pocket and the dimerization interface, as insertion *c* is not located between them in the three dimensional structure (Supplementary Figure S5). Though this may appear counter-intuitive, systematic studies have demonstrated that residues far from the dimerization interface are common key players for changes in the oligomeric state of protein complexes (53). Quite interestingly, *apo*-T1 still heterodimerize with T2, implying that the T2 interface is able to accommodate the structural changes induced at the T1 interface by cofactor loss. These results provide a first insight on the structural basis for the allosteric control of the oligomeric state of T1 and its evolution. Further structural and molecular dynamics analyses could help to elucidate the sequence of events and the structural elements involved.

### Functional switch by T1

Our results indicate alternating roles for T1 *in vivo* depending on the provision of zinc. Reversible transitions in its oligomeric state promote a functional switch for T1, which oscillates from a zinc-containing homodimeric state (*holo*-T1) where it is a fully functional ThrRS equipped with synthetic and editing activities, to another state (*apo*-T1) where it is devoid of synthetic aminoacylation activity and functions exclusively as a *trans*-editing factor. This alternation is facilitated by the modularity of ThrRSs and the relative independence of the aminoacylation and editing domains (16,22,23). According to these results, *apo*-T1 could be added to an increasing list of *trans*-editing factors that include stand-alone proteins like AlaX, YbaK, ProXP or archaeal ThrRS-ed (18–20,54) and complete aaRSs like PheRS and ProRS, which are able to compete with elongation factor Tu for binding misacylated tRNAs and rapidly hydrolyze them (55).

It has been shown that distinct proofreading mechanism may be used to prevent the production of a particular misacylated tRNA in different cell types (49) or cell compartments (45,50). In this work we show that in the same cell alternative proofreading mechanisms are used depending on the cell status. In zinc sufficiency, when T1 is in the *holo* state, Ser-tRNA<sup>Thr</sup> produced by T1 could be edited *in cis* before being released (16). By contrast in zinc deficiency, when T1 is in the *apo* state, Ser-tRNA<sup>Thr</sup> molecules produced by T2 would be captured by T1 and edited *in trans*. Also in the context of heterodimers, editing by *apo*-T1 would be exerted *in trans* as the distance between the active site of T2 and the editing site of *apo*-T1 is too long to permit translocation of the tRNA acceptor arm. It is also probable that *holo*-T1 edit released Ser-tRNA<sup>Thr</sup> *in trans*, as shown for other class II aaRSs like PheRS or ProRS (55). The *in vivo* relative con-





**Figure 6.** Model for the concerted action of T1 and T2. The diagram represents distinct states of the cell according to zinc availability as indicated on top of the panel. T1 is depicted in yellow-orange and T2 in purple-magenta. Green dots represent zinc atoms. Amino acids bound to the tRNA are highlighted. The *apo*-T1 monomer is colored with a dotted pattern to indicate that it may exist transiently upon dissociation of dimeric T1.

tribution of *cis*- and *trans*-editing of Ser-tRNA<sup>Thr</sup> remains to be determined but it could be anticipated that in zinc deficiency the contribution of *trans*-editing is likely essential given the low *cis*-editing activity of T2.

Functional switches are a common theme for aaRSs, especially in complex organisms. Some aaRSs alternate the aminoacylation function with a variety of roles that may be totally unrelated to their canonical function. Function alternation may occur with no enzyme modifications but in general it follows proteolytic processing, post-translational modifications, dissociation from a complex, alternative splicing or combinations of these (14). In the case described here the functional switch of T1 is determined by a change in its oligomeric state caused by allosteric interaction with zinc.

#### Oligomerization plasticity as a means to generate aaRS variability beyond the genetic repertoire

Trans-oligomerization of duplicated aaRSs is a possibility thus far ignored in the literature of these enzymes and to our knowledge, *apo*-T1-T2 is the only heterodimeric ThrRS characterized to date. However, the existence of duplicated genes encoding ThrRS in many organisms, including the cytoplasm of human cells (7), raises the possibility of the operation in other species of heterodimeric ThrRSs.

Out of ca. 26,000 cases of duplicated aaRS in organisms of the three domains of life only a handful have been empirically characterized. In these few cases, duplicated aaRSs were shown to have evolved distinct expression profiles (8,56,57) substrate specificity (58–63) susceptibility to antibiotics (9,64,65) or thermal stability (66). In general, it is proposed that the asymmetric properties of duplicated

proteins provide a selective advantage, a better fitness or a higher robustness to the host organism (67). In our system, the cell not only benefits from possessing two ThrRSs with dissimilar properties but also from the possibility of generating combinations of these by oligomerization. Thus, this oligomerization plasticity of duplicated aaRSs is a means to generate aaRS variants exceeding the genetic repertoire, i.e. three or six dimeric variants can be assembled out of duplicated or triplicated aaRSs, respectively. Most importantly, we observe that the composition of dimeric ThrRSs best fits the requirements of the cell in each situation. For instance, we observe that the heterodimers that are formed *in vivo* under zinc deficiency are composed of T2 subunits that provide low-zinc-resistant synthetic activity and *apo*-T1 subunits that provide editing activity *in trans*. Therefore, dynamic trans-oligomerization of duplicated aaRSs is a *bona fide* adaptive mechanism operating through the assemblage of the oligomers that best fit the physiologic status of the cell.

Since many aaRSs are oligomeric, including all class II and some class I aaRSs, we propose that the controlled oligomerization of duplicated aaRSs is an adaptive mechanism potentially widespread among the plethora of duplicated or triplicated oligomeric aaRSs in Nature, and possibly among other duplicated oligomeric proteins. Oligomers would have the combined functional capabilities of the subunits, as observed for T1-T2, or would display novel functionality emerging from the interaction of distinct subunits. While in our system the control of oligomerization is exerted by allosteric interaction with zinc, in other systems it could be mediated by other allosteric effectors, by the control of gene expression or by post-translational modifications.

We speculate that heterooligomerization could also occur in eukaryotes with no duplicated aaRSs given the possibility of generating multiple polypeptides by alternative splicing. That would be an extraordinary means to create aaRSs variability that may be tuned to the cell status, including the cell cycle phase or the differentiation stage of the cell.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

## ACKNOWLEDGEMENT

We are indebted to Dr Mathias Springer (IBPC, Paris, France), for the generous gift of strain IBPC6881(pSGUB4) and to Dr J.M. García-Fernández (University of Córdoba, Spain), Hubert Becker (Université de Strasbourg, France) Michael Ibba (Ohio State University, USA) and Daniel Metzger (IGBMC, Strasbourg, France) for insightful discussions and a critical reading of the manuscript.

## FUNDING

Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and FEDER [BFU2010–19544, BFU2013–44686-P to I.L.]. M.N. was a recipient of a pre-doctoral fellowship from Junta de Andalucía and FEDER. Funding for open access charge: Ministry of Economy and Competitiveness of Spain and FEDER [BFU2013–44686P].

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Innan, H. and Kondrashov, F. (2010) The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 97–108.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L. and Postlethwait, J. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, **151**, 1531–1545.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. and Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347**, 203–206.
- Ribas de Pouplana, L. and Schimmel, P. (2000) A view into the origin of life: aminoacyl-tRNA synthetases. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **57**, 865–870.
- Woese, C.R., Olsen, G.J., Ibba, M. and Soll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 202–236.
- Ribas de Pouplana, L. and Schimmel, P. (2001) Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 591–596.
- Zhou, X.L., Ruan, Z.R., Huang, Q., Tan, M. and Wang, E.D. (2013) Translational fidelity maintenance preventing Ser mis-incorporation at Thr codon in protein from eukaryote. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 302–314.
- Chen, S.J., Wu, Y.H., Huang, H.Y. and Wang, C.C. (2012) *Saccharomyces cerevisiae* possesses a stress-inducible glycyl-tRNA synthetase gene. *PLoS One*, **7**, e33363.
- Zeng, Y., Roy, H., Patil, P.B., Ibba, M. and Chen, S. (2009) Characterization of two seryl-tRNA synthetases in albomycin-producing *Streptomyces* sp. strain ATCC 700974. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 4619–4627.
- Roy, H., Becker, H.D., Reinbolt, J. and Kern, D. (2003) When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 9837–9842.
- Dubois, D.Y., Blaise, M., Becker, H.D., Campanacci, V., Keith, G., Giege, R., Cambillau, C., Lapointe, J. and Kern, D. (2004) An aminoacyl-tRNA synthetase-like protein encoded by the *Escherichia coli yadB* gene glutamylates specifically tRNA<sup>ASP</sup>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 7530–7535.
- Lo, W.S., Gardiner, E., Xu, Z., Lau, C.F., Wang, F., Zhou, J.J., Mendlein, J.D., Nangle, L.A., Chiang, K.P., Yang, X.L. *et al.* (2014) Human tRNA synthetase catalytic nulls with diverse functions. *Science*, **345**, 328–332.
- Ibba, M. and Soll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 617–650.
- Guo, M., Yang, X.L. and Schimmel, P. (2010) New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 668–674.
- Reynolds, N.M., Lazazzera, B.A. and Ibba, M. (2010) Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 849–856.
- Dock-Bregeon, A.C., Rees, B., Torres-Larios, A., Bey, G., Caillet, J. and Moras, D. (2004) Achieving error-free translation; the mechanism of proofreading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution. *Mol. Cell*, **16**, 375–386.
- Palencia, A., Crepin, T., Vu, M.T., Lincecum, T.L. Jr, Martinis, S.A. and Cusack, S. (2012) Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 677–684.
- Ahel, I., Korencic, D., Ibba, M. and Soll, D. (2003) Trans-editing of mischarged tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 15422–15427.
- Korencic, D., Ahel, I., Schelet, J., Sacher, M., Ruan, B., Stathopoulos, C., Blum, P., Ibba, M. and Soll, D. (2004) A freestanding proofreading domain is required for protein synthesis quality control in Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 10260–10265.
- Wong, F.C., Beuning, P.J., Silvers, C. and Musier-Forsyth, K. (2003) An isolated class II aminoacyl-tRNA synthetase insertion domain is functional in amino acid editing. *J. Biol. Chem.*, **278**, 52857–52864.
- An, S. and Musier-Forsyth, K. (2004) Trans-editing of Cys-tRNA<sup>Pro</sup> by *Haemophilus influenzae* YbaK protein. *J. Biol. Chem.*, **279**, 42359–42362.
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A.C., Rees, B., Bovee, M., Caillet, J., Romby, P., Francklyn, C.S. and Moras, D. (2000) Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 461–465.
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A.C., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Ehresmann, C., Ehresmann, B. and Moras, D. (1999) The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell*, **97**, 371–381.
- Dock-Bregeon, A., Sankaranarayanan, R., Romby, P., Caillet, J., Springer, M., Rees, B., Francklyn, C.S., Ehresmann, C. and Moras, D. (2000) Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase. The class II solution to the double discrimination problem. *Cell*, **103**, 877–884.
- Novoa, E.M., Vargas-Rodriguez, O., Lange, S., Goto, Y., Suga, H., Musier-Forsyth, K. and Ribas de Pouplana, L. (2015) Ancestral AlaX Editing Enzymes for Control of Genetic Code Fidelity Are Not tRNA-specific. *J. Biol. Chem.*, **290**, 10495–10503.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M. and Stanier, R. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 1–61.
- Caillet, J., Nogueira, T., Masquida, B., Winter, F., Graffe, M., Dock-Bregeon, A.C., Torres-Larios, A., Sankaranarayanan, R., Westhof, E., Ehresmann, B. *et al.* (2003) The modular structure of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase as both an enzyme and a regulator of gene expression. *Mol. Microbiol.*, **47**, 961–974.
- Kohrer, C. and Rajbhandary, U.L. (2008) The many applications of acid urea polyacrylamide gel electrophoresis to studies of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods*, **44**, 129–138.
- Napolitano, M., Rubio, M.A., Camargo, S. and Luque, I. (2013) Regulation of internal promoters in a zinc-responsive operon is influenced by transcription from upstream promoters. *J. Bacteriol.*, **195**, 1285–1293.
- Francklyn, C.S., First, E.A., Perona, J.J. and Hou, Y.M. (2008) Methods for kinetic and thermodynamic analysis of aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods*, **44**, 100–118.

31. Xiao,Z. and Wedd,A.G. (2010) The challenges of determining metal-protein affinities. *Nat. Prod. Rep.*, **27**, 768–789.
32. Burnat,M., Herrero,A. and Flores,E. (2014) Compartmentalized cyanophycin metabolism in the diazotrophic filaments of a heterocyst-forming cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 3823–3828.
33. Montesinos,M.L., Muro-Pastor,A.M., Herrero,A. and Flores,E. (1998) Ammonium/methylammonium permeases of a Cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated amt genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, **273**, 31463–31470.
34. Ochoa de Alda,J.A., Esteban,R., Diago,M.L. and Houmar,J. (2014) The plastid ancestor originated among one of the major cyanobacterial lineages. *Nat. Commun.*, **5**, 4937–4946.
35. Katoh,K. and Standley,D.M. (2014) MAFFT: iterative refinement and additional methods. *Methods Mol. Biol.*, **1079**, 131–146.
36. Waterhouse,A.M., Procter,J.B., Martin,D.M., Clamp,M. and Barton,G.J. (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, **25**, 1189–1191.
37. Stamatakis,A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, **30**, 1312–1313.
38. Napolitano,M., Rubio,M.A., Santamaria-Gomez,J., Olmedo-Verd,E., Robinson,N.J. and Luque,I. (2012) Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, **194**, 2426–2436.
39. Ling,J., Peterson,K.M., Simonovic,I., Cho,C., Soll,D. and Simonovic,M. (2012) Yeast mitochondrial threonyl-tRNA synthetase recognizes tRNA isoacceptors by distinct mechanisms and promotes CUN codon reassignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**, 3281–3286.
40. Torres-Larios,A., Sankaranarayanan,R., Rees,B., Dock-Bregeon,A.C. and Moras,D. (2003) Conformational movements and cooperativity upon amino acid, ATP and tRNA binding in threonyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.*, **331**, 201–211.
41. Shimizu,S., Juan,E.C., Sato,Y., Miyashita,Y., Hoque,M.M., Suzuki,K., Sagara,T., Tsunoda,M., Sekiguchi,T., Dock-Bregeon,A.C. et al. (2009) Two complementary enzymes for threonylation of tRNA in crenarchaeota: crystal structure of *Aeropyrum pernix* threonyl-tRNA synthetase lacking a cis-editing domain. *J. Mol. Biol.*, **394**, 286–296.
42. Choi,S. and Bird,A.J. (2014) Zinc'ing sensibly: controlling zinc homeostasis at the transcriptional level. *Metallomics*, **6**, 1198–1215.
43. Lue,S.W. and Kelley,S.O. (2005) An aminoacyl-tRNA synthetase with a defunct editing site. *Biochemistry*, **44**, 3010–3016.
44. Karkhanis,V.A., Boniecki,M.T., Poruri,K. and Martinis,S.A. (2006) A viable amino acid editing activity in the leucyl-tRNA synthetase CPI-splicing domain is not required in the yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **281**, 33217–33225.
45. Reynolds,N.M., Ling,J., Roy,H., Banerjee,R., Repasky,S.E., Hamel,P. and Ibba,M. (2010) Cell-specific differences in the requirements for translation quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 4063–4068.
46. Fersht,A.R. (1981) Enzymic editing mechanisms and the genetic code. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **212**, 351–379.
47. Luque,I., Riera-Alberola,M.L., Andújar,A. and Ochoa de Alda,J.A. (2008) Intra-phyllum diversity and complex evolution of cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 2369–2389.
48. Haas,C.E., Rodionov,D.A., Kropat,J., Malasarn,D., Merchant,S.S. and de Crecy-Lagard,V. (2009) A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics*, **10**, 470–490.
49. Yadavalli,S.S. and Ibba,M. (2013) Selection of tRNA charging quality control mechanisms that increase mistranslation of the genetic code. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 1104–1112.
50. Ling,J., Peterson,K.M., Simonovic,I., Soll,D. and Simonovic,M. (2012) The mechanism of pre-transfer editing in yeast mitochondrial threonyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.*, **287**, 28518–28525.
51. Li,L., Boniecki,M.T., Jaffe,J.D., Imai,B.S., Yau,P.M., Luthey-Schulten,Z.A. and Martinis,S.A. (2011) Naturally occurring aminoacyl-tRNA synthetases editing-domain mutations that cause mistranslation in *Mycoplasma* parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 9378–9383.
52. Marianayagam,N.J., Sunde,M. and Matthews,J.M. (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 618–625.
53. Perica,T., Kondo,Y., Tiwari,S.P., McLaughlin,S.H., Kempen,K.R., Zhang,X., Steward,A., Reuter,N., Clarke,J. and Teichmann,S.A. (2014) Evolution of oligomeric state through allosteric pathways that mimic ligand binding. *Science*, **346**, 1254346.
54. Liu,Z., Vargas-Rodriguez,O., Goto,Y., Novoa,E.M., Ribas de Pouplana,L., Suga,H. and Musier-Forsyth,K. (2015) Homologous trans-editing factors with broad tRNA specificity prevent mistranslation caused by serine/threonine misactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 6027–6032.
55. Ling,J., So,B.R., Yadavalli,S.S., Roy,H., Shoji,S., Fredrick,K., Musier-Forsyth,K. and Ibba,M. (2009) Resampling and editing of mischarged tRNA prior to translation elongation. *Mol. Cell*, **33**, 654–660.
56. Putzer,H., Gendron,N. and Grunberg-Manago,M. (1992) Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J.*, **11**, 3117–3127.
57. Vecchione,J.J. and Sello,J.K. (2010) Regulation of an auxiliary, antibiotic-resistant tryptophanyl-tRNA synthetase gene via ribosome-mediated transcriptional attenuation. *J. Bacteriol.*, **192**, 3565–3573.
58. Min,B., Pelaschier,J.T., Graham,D.E., Tumbula-Hansen,D. and Soll,D. (2002) Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: an essential route to asparagine formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 2678–2683.
59. Becker,H.D. and Kern,D. (1998) *Thermus thermophilus*: a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12832–12837.
60. Curnow,A.W., Tumbula,D.L., Pelaschier,J.T., Min,B. and Soll,D. (1998) Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12838–12843.
61. Becker,H.D., Roy,H., Moulinier,L., Mazauric,M.H., Keith,G. and Kern,D. (2000) *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **39**, 3216–3230.
62. Skouloubri,S., Ribas de Pouplana,L., De Reuse,H. and Hendrickson,T.L. (2003) A noncognate aminoacyl-tRNA synthetase that may resolve a missing link in protein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 11297–11302.
63. Salazar,J.C., Ahel,I., Orellana,O., Tumbula-Hansen,D., Krieger,R., Daniels,L. and Soll,D. (2003) Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 13863–13868.
64. Gentry,D.R., Ingraham,K.A., Stanhope,M.J., Rittenhouse,S., Jarvest,R.L., O'Hanlon,P.J., Brown,J.R. and Holmes,D.J. (2003) Variable sensitivity to bacterial methionyl-tRNA synthetase inhibitors reveals subpopulations of *Streptococcus pneumoniae* with two distinct methionyl-tRNA synthetase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 1784–1789.
65. Kitabatake,M., Ali,K., Demain,A., Sakamoto,K., Yokoyama,S. and Soll,D. (2002) Indolmycin resistance of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by induced expression of one of its two tryptophanyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.*, **277**, 23882–23887.
66. Rudolph,B., Gebendorfer,K.M., Buchner,J. and Winter,J. (2010) Evolution of *Escherichia coli* for growth at high temperatures. *J. Biol. Chem.*, **285**, 19029–19034.
67. Wagner,A. (2008) Gene duplications, robustness and evolutionary innovations. *Bioessays*, **30**, 367–373.



# Regulation of Internal Promoters in a Zinc-Responsive Operon Is Influenced by Transcription from Upstream Promoters

Mauro Napolitano, Miguel Ángel Rubio, Sergio Camargo, Ignacio Luque

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC and Universidad de Sevilla, Seville, Spain

In the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 (also known as *Nostoc* sp. strain PCC 7120), a zinc-responsive operon (*all4725-all4721*) has been described, which contains 4 distinct promoters. The two most upstream ones bind Zur with high affinity, whereas the other two do not or do so with a very low affinity. In this paper, a detailed characterization of the four promoters is presented, showing that all four were induced by metal depletion, and they were constitutively derepressed in a *zur* mutant, despite the two downstream promoters not being direct targets for this regulator. Crucially, induction by metal depletion of the two downstream promoters was abrogated when transcription initiated at the upstream promoters was interrupted by a polar insertion midway in the operon. In contrast, insertion of a nitrogen-responsive promoter at a roughly similar position provoked the two downstream promoters to adopt a regulatory pattern mimicking that of the inserted promoter. Thus, regulation of the two downstream promoters is apparently influenced by transcription from promoters upstream. Evidence is presented indicating that the activity of the two downstream promoters is kept basal in *Anabaena* by repression. A regulatory model compatible with these results is proposed, where promoters controlled by repression in bacterial operons may be subjected to a hierarchical regulation depending on their position in the operon. According to this model, internal promoters may respond to stimuli governing the activity of promoters upstream by an indirect regulation and to specific stimuli by a direct regulation.

Gene operons are transcriptional units existing in prokaryotes and eukaryotes that gather genes, which are often functionally related and require a common expression pattern (1–3). In the simplest instance of a bacterial operon, coordinated expression of the genes is achieved by their transcription in a single polycistronic mRNA initiated at a promoter located upstream of the first gene. Control of the unique promoter allows a coordinated regulation of all genes. However, in many cases, the architecture and regulation of bacterial operons are rather more complex, involving many regulatory elements and multiple internal promoters that may be distinctly regulated. Sophisticated regulatory mechanisms have evolved to ensure that the relative expression level of each individual gene meets the necessities of the cell, which may vary under different conditions (4–6).

In the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 (here *Anabaena*), a zinc-responsive operon (*all4725-all4721*) was recently described (7). The five genes in the operon do not show an obvious functional relationship: *all4725* encodes a putative porphobilinogen synthase, *all4724* encodes a putative flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent oxidoreductase, *all4723* encodes a threonyl-tRNA synthetase, *all4722* encodes a putative metallochaperone, and *all4721* encodes a putative GTP cyclohydrolase. This operon is part of the *Anabaena* *Zur* regulon, controlled by *Zur*, a regulator of the *Fur* family that senses the availability of zinc (8). *Zur* functions mostly as a repressor, binding to DNA when the concentration of zinc is high and its regulatory metal coordination sites are occupied (9, 10). Conversely, a decrease in the concentration of zinc determines that *Zur* detaches from DNA, releasing its target genes from repression. Four promoters were mapped in the *all4725-all4721* operon by a 5' rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) procedure suitable for the distinction of true 5' mRNA ends with a triphosphate group from other 5' ends carrying a monophosphate group which result from processing of a longer transcript (7, 11). One promoter mapped just upstream of the first gene in the operon, and three internal ones were localized up-

stream of *all4723*, *all4722*, and *all4721*, respectively. *Anabaena* *Zur* was demonstrated to bind with high affinity and in a zinc-dependent manner to DNA fragments of the two most upstream promoters, containing sequences that were identified as target sequences for *Anabaena* *Zur*. All five genes showed a similar regulatory profile, with their expression levels being basal under standard growth conditions and very high when the culture was depleted of zinc. Real-time PCR assays demonstrated that the level of induction provoked by zinc limitation was 50- to 100-fold, and Northern assays showed that all five genes produced a smeared hybridization signal, interpreted as hybridization with long polycistronic transcripts, superposed to discrete bands, which may result from processing of transcripts or initiation at internal promoters (7). Although the overall regulation of this operon has been well characterized, the particular contribution of individual promoters to the expression of the operon has not been analyzed in detail, and the possibility of the promoters being distinctly regulated has not been investigated.

We present evidence here showing that all four promoters of the *Anabaena* *all4725-all4721* operon respond to metal deficiency and are regulated by *Zur*. Whereas the two most upstream promoters are direct targets for repression by *Zur*, the two most downstream ones are regulated by *Zur* through an indirect mechanism, perhaps involving the removal of an unknown repressor(s) from DNA. This mode of regulation would resemble a domino

Received 16 August 2012 Accepted 6 January 2013

Published ahead of print 11 January 2013

Address correspondence to Ignacio Luque, ignacio.luque@ibvf.csic.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01488-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.01488-12

effect, where transcription initiated at a particular promoter in the operon would induce the activity of promoters located downstream.

## MATERIALS AND METHODS

**Organisms and growth conditions.** Wild-type (WT) *Anabaena* and derivative strains were cultured under standard growth conditions in BG11 medium (12) at 30°C under illumination with a light intensity of 75 microwatts  $m^{-2} s^{-1}$  and aerated with CO<sub>2</sub>-enriched air (1% [vol/vol] CO<sub>2</sub>) buffered with 10 mM NaHCO<sub>3</sub>. In experiments where ammonium was used as a nitrogen source, cells were cultured in BG11<sub>0</sub> medium, which lacks nitrate, supplemented with 5 to 10 mM ammonium chloride, and buffered with 10 mM TES [N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid]-NaOH (pH 7.5). Difco agar (1%) was added for solid media. When needed, the medium was supplemented with antibiotics at the following concentrations: streptomycin at 2 to 5  $\mu g ml^{-1}$ , spectinomycin at 2 to 5  $\mu g ml^{-1}$ , and neomycin at 50 to 70  $\mu g ml^{-1}$ . The nonspecific divalent metal chelator TPEN [N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine] was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the cultures where indicated, at a final concentration of 20  $\mu M$ . Whenever a culture was treated with TPEN, all other cultures of the experiment were supplemented with DMSO to a similar final concentration (0.1%).

*Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$  or XL1-Blue was routinely used for cloning and plasmid constructions and was grown in Luria-Bertani medium (13) supplemented with antibiotics, when required, at the following concentrations: ampicillin at 50  $\mu g ml^{-1}$ , kanamycin at 25  $\mu g ml^{-1}$ , streptomycin at 25  $\mu g ml^{-1}$ , spectinomycin at 100  $\mu g ml^{-1}$ , and chloramphenicol at 30  $\mu g ml^{-1}$ .

**Construction of *Anabaena*-derived strains.** Plasmid construction is described in Fig. S2 in the supplemental material. Insertional inactivation of *all4723* was carried out by construction of a plasmid (pCMN4) where the C.S3 gene cassette, conferring resistance to streptomycin and spectinomycin (14), was inserted at the internal HindIII site of *all4723* in the same orientation as the open reading frame (ORF). The insert of this plasmid was transferred into the conjugation-mobilizable vector pRL278, yielding plasmid pCMN8, which was introduced into *Anabaena* by triparental mating conjugation (15). Integration of the plasmid was selected in solid BG11 medium supplemented with streptomycin and spectinomycin. Double recombinants were selected by sonication of single recombinants to obtain short filaments that were grown in solid BG11 medium supplemented with streptomycin, spectinomycin, and sucrose to counterselect the *sacB* marker gene present in the vector portion of pCMN8. Colonies were analyzed by PCR for segregation of the mutation (i.e., all chromosomes in all cells of all filaments would contain the mutation), and a segregated strain, named MN8, was selected for further studies.

*all4723* deletion strain MN42 was constructed as follows. First, a 3.5-kb DNA fragment containing the 3' region of *all4724*, the entire *all4723* ORF, and the 5' region of *all4722* was amplified by PCR using primers 24STREP-1F and 22DEL-1R and cloned into the pBluescriptSK+ vector (Novagen), yielding plasmid pCMN32. Plasmid pCMN41 was constructed by deleting *all4723* by PCR amplification of pCMN32 with divergent primers 22DEL-1F and 24DEL-1R, flanking the *all4723* ORF, and religation of the PCR product. The insert of pCMN41 was transferred into the conjugative vector pRL278, yielding plasmid pCMN42, which was transferred into *Anabaena* by conjugation. Double recombinants were selected as described above, except that antibiotics were omitted in the last selection step in the presence of sucrose.

Strain MN52 was obtained as follows. Plasmid pCMN20 was constructed by cloning a DNA fragment containing the *all4723* ORF amplified with primers THRS2-1F and THRS2-1R in the NdeI and XhoI sites of the pCMN28b expression vector. pCMN28b is a derivative of pET28b (Novagen) constructed by replacing the hexahistidine-encoding NcoI-NdeI fragment of pET28b with a 67-bp linker encoding a StrepTag II sequence. The linker was obtained by annealing oligonucleotides STREP-

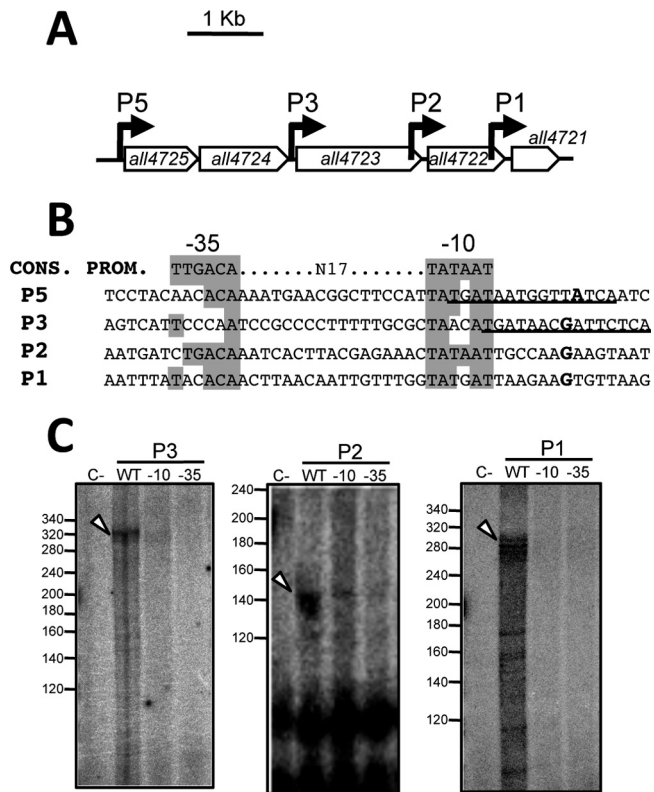
TAG-1F and STREP-TAG-1R. Fusion proteins expressed in this vector contain the N-terminal sequence MASTSHPQFEKGALEVLFGQPH. A PCR fragment amplified from *Anabaena* genomic DNA with primers NIR-2F and NIR-1R was cloned into the BglII and NcoI sites of the pCNM20 plasmid, producing the new plasmid pCNM49, whose insert was transferred into the pRL278 conjugal vector, yielding plasmid pCMN52, which was transferred into *Anabaena* by conjugation. Further steps were performed as described above.

**Northern assays.** RNA was extracted from 40- to 50-ml cultures in the exponential phase by use of a procedure described previously (16). For each sample, 10  $\mu g$  RNA was resolved in a formaldehyde-containing agarose gel, transferred onto Genescreen Plus (PerkinElmer) nylon membranes, and hybridized to radioactive DNA probes labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP by using the Ready-To-Go labeling kit (GE Healthcare). Images of hybridized membranes were obtained with a Cyclone Storage Phosphor system (PerkinElmer).

**Primer extension.** Twenty micrograms of RNA was denatured for 10 min by heating at 85°C; annealed to 2 pmol <sup>32</sup>P-labeled primer 25R, 23R, or 22R during 1 h at 55°C; and extended with Superscript III enzyme (Invitrogen) in the presence of deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) for 1 h at 55°C. When primer 21R was used, the annealing step was carried out at 50°C, and the extension step was carried out at 47°C. Extension products were resolved in 6% urea-containing acrylamide gels next to a sequencing ladder as a size marker.

**In vitro transcription.** Runoff transcription assays were performed by using recombinant *Anabaena* RNA polymerase (RNAP), reconstituted and purified as previously described (17). Reactions were set up in a total volume of 15  $\mu l$  containing 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.5 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 5% glycerol, 30 to 60 fmol DNA fragment, and 150 nM *Anabaena* RNA polymerase. Complexes were allowed to form by incubation for 5 min at 30°C or 37°C, and transcription was started by the addition of 1.5  $\mu l$  of a solution containing 0.15 mM (each) ATP, GTP, and UTP; 20  $\mu M$  CTP; and 3  $\mu Ci$  [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP and was allowed to proceed for 30 min at 30°C or 37°C. After incubation, reactions were stopped by the addition of 6  $\mu l$  phenol, 10 mM EDTA, and 1.5  $\mu l$  of 200 ng/ $\mu l$  glycogen in 3 M sodium acetate (pH 5.2). After ethanol precipitation, the products were separated by electrophoresis on 6% acrylamide gels containing 8 M urea. Linear DNA templates with wild-type sequences of promoters P5, P3, P2, and P1 were generated by PCR with primer pairs ALL4725\_3F and ALL4725\_3R, ALL4723\_3F and ALL4723\_10R, ALL4722\_6F and ALL4722\_8R, and ALL4721\_4F and ALL4721\_5R, respectively. The fragment containing the sequence of the *PpsbA* promoter from *Amaranthus hybridus*, used as a control, was generated by using primers CK3-1 and CK3-2 and plasmid pRL278 as a PCR template (14). Mutant DNA templates with altered sequences of the -10 or -35 boxes were obtained by generating two overlapping PCR fragments, each amplified with one terminal primer and a mutagenic primer. The terminal primers were those used to amplify the wild-type fragments (see above), and the mutagenic primers were complementary and contained the sequence to be introduced. In a second round of PCR, the products of the first round were mixed in equimolar amounts and subjected to PCR with the terminal primers. Mutagenic primers used to mutate the -10 or the -35 sequences were ALL4725\_BOX35\_F, ALL4725\_BOX35\_R, ALL4725\_BOX10\_F, and ALL4725\_BOX10\_R for P5; ALL4723\_BOX35\_F, ALL4723\_BOX35\_R, ALL4723\_BOX10\_F, and ALL4723\_BOX10\_R for P3; ALL4722\_BOX35\_F, ALL4722\_BOX35\_R, ALL4722\_BOX10\_F, and ALL4722\_BOX10\_R for P2; and ALL4721\_BOX35\_F, ALL4721\_BOX35\_R, ALL4721\_BOX10\_F, and ALL4721\_BOX10\_R for P1.

**Luminescence detection.** DNA fragments containing P2 or P1 were amplified by PCR using primers pair 4722LUX-1F and 4722LUX-1R or ALL4721\_3F and ALL4721\_4R, respectively, and cloned into the XhoI and BamHI sites of plasmid pSB377\_1 (18) containing the *luxCDABE* genes from *Photorehabdus luminescens* in tandem. The orientation of P2 and P1 was the same as that of the *lux* genes in both constructions. Re-

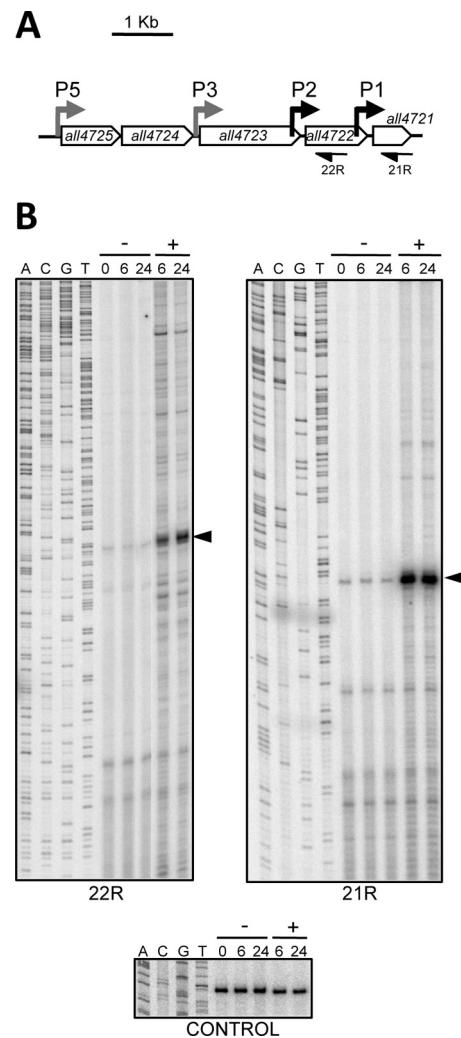


**FIG 1** Promoters of the *all4725*-*all4721* operon. (A) The positions of the P5, P3, P2, and P1 promoters, depicted as bent arrows, are indicated. (B) Sequence features of P5, P3, P2, and P1 promoters. The sequence of a consensus promoter (Cons. Prom.) is shown at the top. Conserved nucleotides of putative  $-10$  and  $-35$  boxes of the P5 to P1 promoters are shadowed. The nucleotide corresponding to the transcriptional start site is shown in boldface type. Zur binding sequences are underlined. (C) *In vitro* transcription of wild-type and mutant promoters. A total of 50 fmol linear DNA templates containing the sequences of the P3, P2, and P1 promoters or mutant versions where the  $-35$  box was changed into CCTGAG or the  $-10$  box was changed into GCGGCG was incubated with 150 nM recombinant *Anabaena* RNAP in the presence of dNTPs and [ $\alpha$ - $^{32}$ P]CTP. A control reaction mixture (C-) containing a wild-type DNA template and all components except RNAP is shown in the left lane of each panel. The expected position for runoff transcripts is indicated with an arrowhead.

combinant plasmids were transferred into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  by transformation, and bacterial luminescence was detected by using a Chemi Doc XRS imaging system (Bio-Rad).

## RESULTS

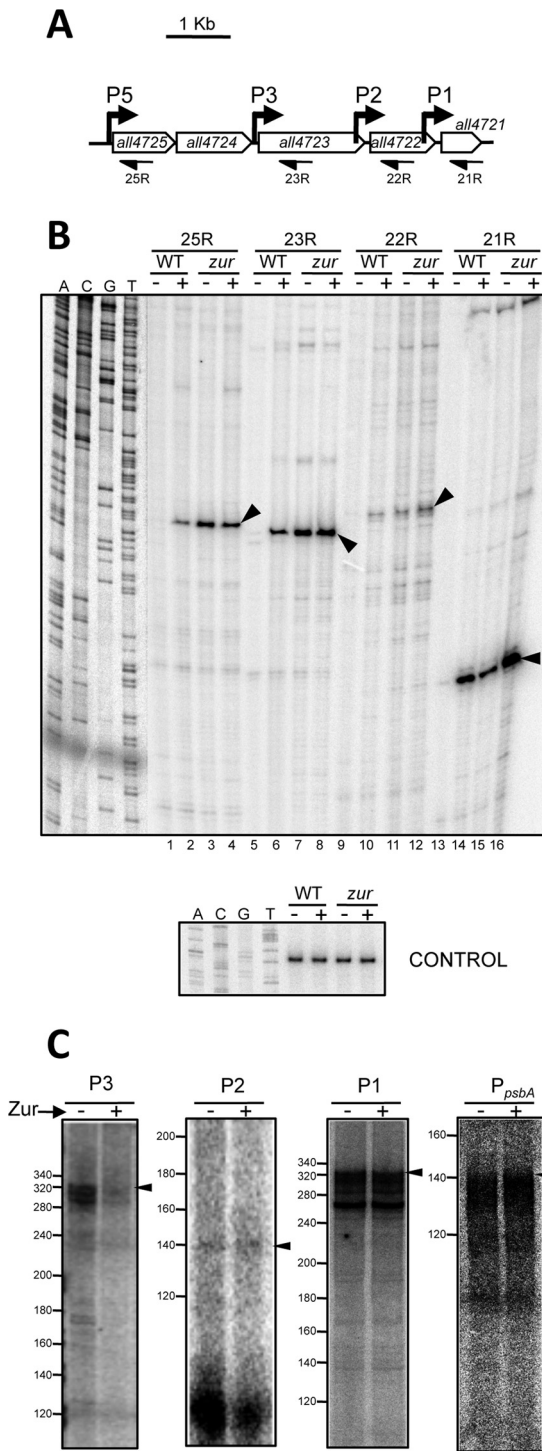
**Internal promoters of the *all4725*-*all4721* operon are transcribed by the *Anabaena* RNAP *in vitro*.** In the *all4725*-*all4721* operon of *Anabaena*, promoters were mapped upstream of *all4725*, *all4723*, *all4722*, and *all4721*, which are here named P5, P3, P2, and P1, respectively (Fig. 1A and B) (7). To corroborate the existence of these promoters, PCR fragments encompassing each promoter were tested by *in vitro* transcription assays with purified recombinant *Anabaena* RNAP. Despite repeated efforts, no runoff product was obtained when a fragment containing the P5 promoter was used as the template, suggesting that an element required for transcription of this promoter was probably missing in our assay. In contrast, bands with the size expected for the runoff products were observed with templates of P3, P2, and P1 (Fig. 1C).



**FIG 2** P2 and P1 are induced by metal deficiency. (A) Schematic representation of the *all4725*-*all4721* operon. The localization of the promoters is indicated by bent arrows, with those that were analyzed by primer extension in panel B shown in black. Primers used for primer extension in panel B are also depicted. (B) RNA from cells not treated (-) or treated (+) with 20  $\mu$ M TPEN for the period of time indicated at the top (in hours) was subjected to primer extension analysis with primer 22R (left) or 21R (right). A sequencing reaction generated with the same oligonucleotide used for primer extension is shown at the left of each panel for sizing. Arrowheads point to extension products at the expected positions of transcripts initiating at P2 (left) and P1 (right). The bottom panel corresponds to a primer extension control experiment performed with the same RNA preparations and primer ALL4727\_2R.

Mutation of the putative  $-10$  or  $-35$  boxes of these three promoters had a strong negative impact on transcription assays *in vitro*, further confirming the localization of P3, P2, and P1 at the positions previously mapped by 5'-RACE.

**The two downstream promoters of the *all4725*-*all4721* operon are regulated by metal availability.** P5 and P3 contain binding sequences for Zur and bind this regulator with high affinity in a zinc-dependent manner (7). However, it is not known whether the P2 and P1 promoters are regulated. The *all4725*-*all4721* operon was shown previously to be highly induced by treatment with TPEN, a membrane-permeable metal chelator that induces Zn, Fe, and Cu deficiency in *Anabaena* cells (7). To ana-



**FIG 3** The four promoters of the *all4725-all4721* operon are constitutively transcribed in a *zur* mutant. (A) Schematic representation of the *all4725-all4721* operon showing the primers used for primer extension in panel B. (B) RNA from WT cells or the *zur* mutant not treated (-) or treated (+) with 20  $\mu$ M TPEN for 24 h was subjected to primer extension with the primers indicated at the top. A sequencing reaction mixture generated with the P1 primer is shown at the left for sizing. Arrowheads point to extension products at the expected positions for transcripts initiating at P5, P3, P2, and P1. The bottom panel corresponds to a primer extension control experiment performed with the same RNA preparations and primer ALL4727\_2R. (C) Impact of Zur on transcription of P3, P2, and P1 *in vitro*. A total of 25 fmol linear DNA templates containing the sequences of the P3, P2, and P1 promoters was incubated with

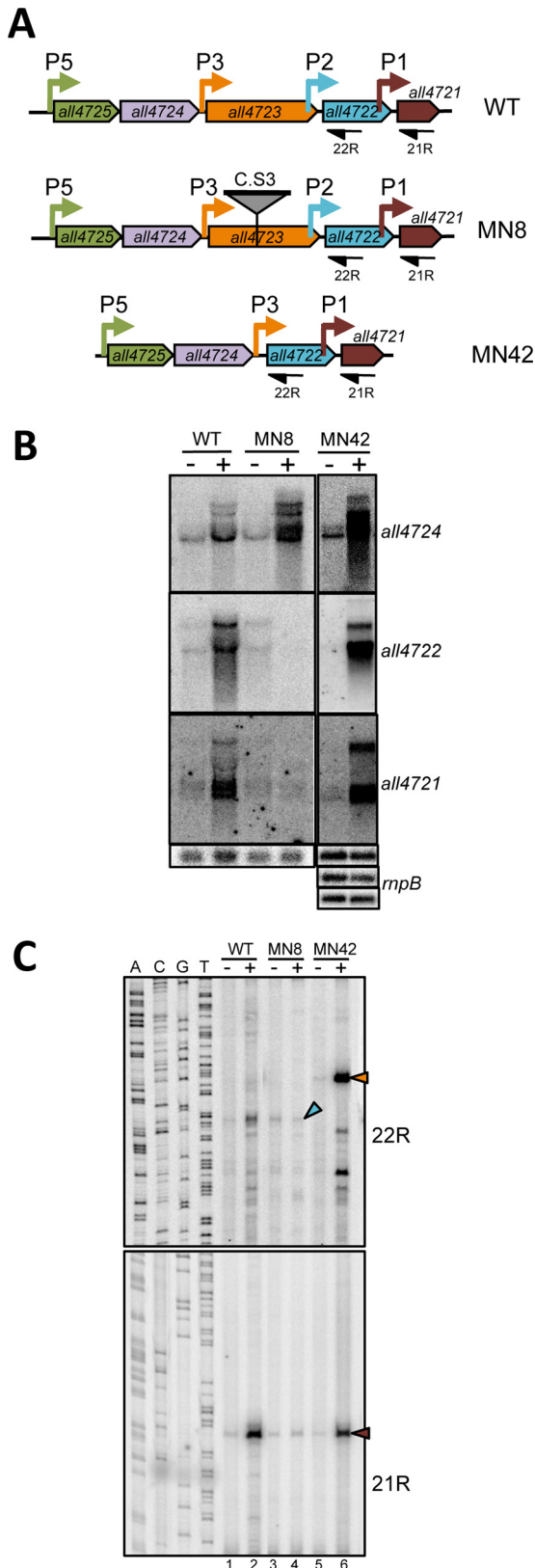
lyze the possible responsiveness of P2 and P1 to metal deficiency induced by TPEN, we carried out primer extension experiments using RNA from cells cultured under standard conditions or incubated with TPEN for 6 or 24 h. When primers 22R and 21R, annealing with the 5' region of *all4722* and *all4721*, respectively (Fig. 2A and B), were used, extension products were observed at the exact positions of the transcription start sites previously mapped by 5'-RACE (7). The abundance of the extension products was low under standard growth conditions and increased 20- to 30-fold (Fig. 2B, left) or 20- to 50-fold (right) after treatment of the culture for six or more hours with the TPEN chelator, providing evidence that P2 and P1 are induced by metal deficiency and suggesting regulation by Zur or another metal-sensing regulator. A primer extension experiment performed with the same RNA preparations and a primer annealing to the 5' region of the *all4722* gene, used as a control (Fig. 2, bottom), demonstrated that TPEN does not provoke a general effect on transcription.

**P2 and P1 promoters are constitutively induced in a *zur* mutant, but they are not direct targets for Zur.** Primer extension results in Fig. 3B show that P5 and P3 are derepressed in a *zur* mutant under noninducing conditions (i.e., cells not treated with TPEN) (Fig. 3B, lanes 3 and 7), providing further evidence for a direct repression of these promoters by Zur. Interestingly, P2 and P1 were also derepressed in cells of the *zur* mutant under noninducing conditions (Fig. 3B, lanes 11 and 15), closely resembling the regulatory pattern of P5 and P3. Direct repression of these promoters by Zur was tested by supplementing *in vitro* transcription assay mixtures with preparations of recombinant *Anabaena* Zur protein. The presence of Zur in the reaction mixtures did not alter the abundance of runoff products when templates of P2 and P1 or a Zur-independent control promoter were used (Fig. 3C). However, Zur provoked a 4-fold decrease in the abundance of runoff products with the P3 template (Fig. 3C), consistent with the previously reported interaction of Zur with sequences of this promoter located at positions compatible with repression (Fig. 1B) (7). Therefore, the control exerted by Zur on P2 and P1 deduced from their constitutive induction in a *zur* mutant (Fig. 3B) must occur by an indirect mechanism and not by a direct interaction of the regulator with these promoters.

**A polar insertion in *all4723* eliminates induction of P2 and P1.** To further characterize the regulation of P2 and P1, a mutant strain (MN8) was constructed, where the C.S3 cassette (14), containing genes conferring resistance to streptomycin and spectinomycin and a transcriptional terminator, was inserted within the *all4723* gene (Fig. 4A). Interestingly, strain MN8 showed low levels of transcripts hybridizing with *all4722* and *all4721* under induction or noninduction conditions (i.e., cells treated or not with TPEN) (Fig. 4B). Consistent with this, in mutant strain MN8, the abundance of transcripts initiated at P2 and P1 was basal under both conditions (Fig. 4C, compare lanes 1 and 2 with 3 and 4). Thus, the low levels of transcripts hybridizing with *all4722* and *all4721* (Fig. 4B) are due to the combined effect of the interruption of transcription initiated at promoters upstream of the insertion (P5 and P3) and the elimination of the induction of the promoters located downstream (P2 and P1). A possibility to be tested was

150 nM recombinant *Anabaena* RNAP, dNTPs, and [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP in the absence (-) or presence (+) of 5 pmol recombinant Zur protein. The expected position for runoff transcripts is indicated with an arrowhead.





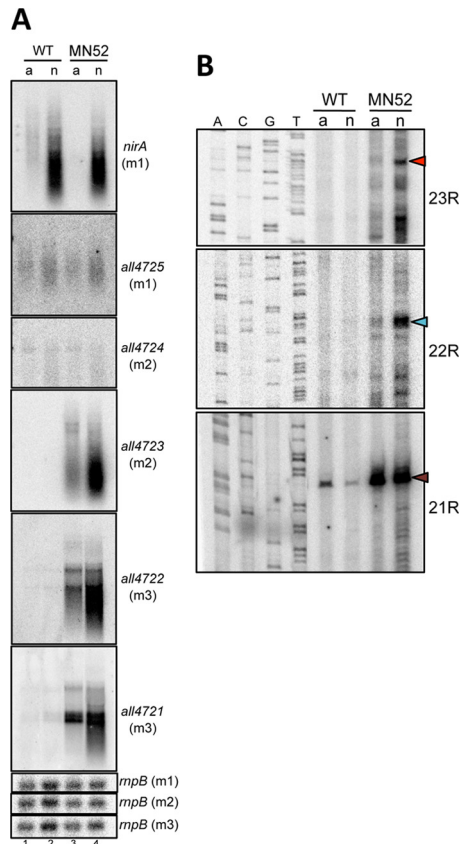
**FIG 4** Regulation of P2 and P1 in *all4723* mutants. (A) Schematic representation of the *all4725*-*all4721* operon showing the structure of mutant strains MN8 and MN42 and the primers used for primer extension in panel C. (B) RNA from cells of the WT or mutant strain MN8 or MN42 cultured in the

whether the product of the *all4723* gene disrupted by the insertion in mutant strain MN8 could be required for activation of P2 and P1. *all4723* encodes a threonyl-tRNA synthetase. Many aminoacyl-tRNA synthetases are moonlighting proteins, which, besides to their canonical role in aminoacyl-tRNA production, fulfill other functions, including transcriptional activation (19). To check this hypothesis, a deletion mutant lacking the *all4723* ORF was constructed (strain MN42) (Fig. 4A). In sharp contrast to what was observed for the insertional mutant strain MN8, in the deletion strain MN42, transcripts hybridizing with *all4722* or *all4721* showed induction by TPEN treatment similar to that in the wild type (Fig. 4B). The P2 promoter could not be analyzed in mutant strain MN42 since it was deleted as part of the *all4723* ORF. Primer extension with oligonucleotide 22R corroborated that in MN42, P2 is missing and P3 is placed immediately upstream of *all4722* (Fig. 4C, top, lanes 5 and 6). Most importantly, in this mutant, P1 exhibited a regulation very similar to that in the wild type (Fig. 4C, bottom, compare lanes 1, 2, 5, and 6). Therefore, the lack of induction of P1 in mutant strain MN8 cannot be attributed to a requirement of All4723 for activation (Fig. 4C, compare lanes 2, 4, and 6).

**P2 and P1 adopt the regulatory pattern of a promoter inserted upstream.** Results presented above suggest that regulation of P2 and P1 is influenced by transcription from promoters upstream. To test this hypothesis, strain MN52 was constructed, where the *P<sub>nir</sub>* promoter from the *nirA-nrtABCD-narB* operon of *Anabaena* was inserted upstream of *all4723*. *P<sub>nir</sub>* was described previously to be responsive to nitrogen stimuli, showing higher transcriptional activity in nitrate- than in ammonium-containing medium (20). In strain MN52, transcripts hybridizing with genes downstream of the inserted *P<sub>nir</sub>* promoter (*all4723*, *all4722*, and *all4721*) showed a 2.5-fold-higher level in nitrate than in ammonium, resembling the regulation of the *nirA* gene, in contrast to genes upstream of *P<sub>nir</sub>* (*all4724* and *all4725*), which showed basal levels under both conditions (Fig. 5A). P2, P1, and the *P<sub>nir</sub>* promoter inserted upstream of *all4723* were analyzed by primer extension using RNA from WT or MN52 cells cultured in ammonium- or nitrate-containing medium. The abundance of transcripts initiated at P2, which was low in the WT irrespective of the nitrogen source and in strain MN52 in ammonium, increased 4-fold in the latter strain grown in nitrate (Fig. 5B, blue arrowhead), closely resembling the regulation of *P<sub>nir</sub>* (transcripts 3.6-fold more abundant in nitrate than in ammonium) (Fig. 5B, red arrowhead). The insertion of *P<sub>nir</sub>* also had an effect on P1. In strain MN52, the abundance of transcripts initiated at this promoter was much higher in nitrate or ammonium than in the wild type (Fig. 5B, brown arrowhead). Although the regulation of P1 in strain MN52 does not fully match that of *P<sub>nir</sub>*, such behavior was repeatedly observed in experiments using RNA extracted from independent cultures.

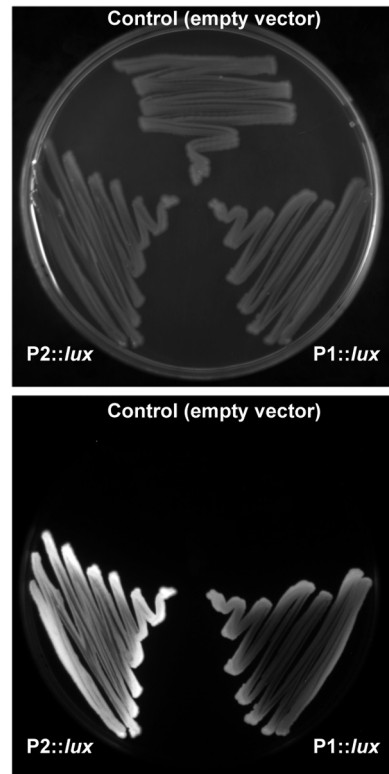
**Evidence for control of P2 and P1 activity by repression.** Results presented above indicate that the transcription level from P2

absence (-) or presence (+) of 20  $\mu$ M TPEN for 24 h was subjected to a Northern assay with internal probes for the genes indicated at the right of each panel. Hybridization with the *rnpB* probe was used as a loading control. (C) RNA from cells of the WT or strain MN8 or MN42, not treated (-) or treated (+) with 20  $\mu$ M TPEN for 24 h, was subjected to primer extension with the primers indicated at the right. Arrowheads point to extension products at the expected positions for transcripts initiating at P3 (orange), P2 (blue), or P1 (brown).



**FIG 5** Regulation of P2 and P1 in mutant strain MN52. (A) Membranes m1, m2, and m3, containing RNA from cells of the WT or mutant strain MN52 cultured in medium containing ammonium (a) or nitrate (n) as a nitrogen source, as indicated, were hybridized with internal probes of the genes indicated at the right of each panel. Hybridization with *mnpB* was used as a control for RNA loading. (B) RNA from cells of the WT and strain MN52 cultured with ammonium or nitrate as a nitrogen source was subjected to primer extension with the primers indicated at the right. Arrowheads point to extension products at the expected positions for transcripts initiating at *Pnir* (red), P2 (blue), or P1 (brown).

and P1 is very low in cultures under standard growth conditions. Several features suggested that these promoters could be controlled in *Anabaena* by repression. For instance, P2 contained  $-10$  and  $-35$  sequences closely matching the signature sequences of sigma 70-dependent promoters, with only one mismatch in the  $-35$  box and an optimal spacing (17 nucleotides) between the two boxes (Fig. 1B). Promoters adjusting to the consensus have been shown to be very efficiently transcribed in cyanobacteria (21–23). P1 does not so closely resemble the consensus promoter (with two mismatches in the  $-35$  box and one in the  $-10$  box), but it is very efficiently transcribed by the *Anabaena* RNAP *in vitro*. DNA fragments containing P2 or P1 were cloned into the pSB377\_1 vector (18) upstream of the *luxCDABE* genes from *Photorehabdus luminescens*, so that transcription of the *lux* genes would be governed by the inserted promoters, and the resulting plasmids were introduced into *E. coli* by transformation. Compared to cells containing the empty vector, cells containing either construct showed elevated bioluminescence, indicative of high promoter activity (Fig. 6), which is in contrast to the low basal activity observed in *Anabaena*, suggesting that the putative repressor(s) that controls these promoters in *Anabaena* is absent in *E. coli*.



**FIG 6** Promoter assay of P2 and P1 in *E. coli* by luminescence. A petri dish with *E. coli* cells containing the empty pSB377\_1 vector or the vector containing DNA fragments of the P2 and P1 promoters upstream of the *luxCDABE* genes, as indicated, was photographed under white-light illumination (top) or in the dark (bottom).

## DISCUSSION

In this work, the regulation of promoters in the *all4725-all4721* operon of *Anabaena* is characterized in detail. The presence of three internal promoters previously mapped by 5'-RACE was corroborated here by *in vitro* transcription assays with wild-type and mutant DNA templates with altered  $-10$  or  $-35$  sequences. The P5 promoter, located at the 5' end of the operon, and the three internal promoters P3, P2, and P1 are all induced by metal deficiency and derepressed in a *zur* mutant (Fig. 2 and 3). We previously reported that Zur binds *in vitro* with a very high affinity to DNA fragments of P5 and P3 and with a very low affinity to a DNA fragment of P1, and it did not interact with a DNA fragment of P2 (7). We show here that *in vitro*, Zur represses transcription of P3 but not of P2 and P1. It is also shown that *in vivo*, P1 is not responsive to metal deficiency induced by TPEN in insertional mutant strain MN8, indicating that it is not directly repressed by Zur. Thus, the previously reported weak *in vitro* interaction of Zur with P1 likely resulted from the high concentrations of protein used in those assays (10-fold higher than those used for P5 or P3) (7), probably exceeding the physiological concentrations of the regulator. Therefore, out of the four promoters mapped in the *all4725-all4723* operon, the two upstream ones (P5 and P3) are directly repressed by Zur, and the two downstream ones (P2 and P1) are not directly repressed by Zur. This raises the question of how P2 and P1 are controlled with Zur excluded as a direct regulator. The involvement of a metal-sensing regulator other than

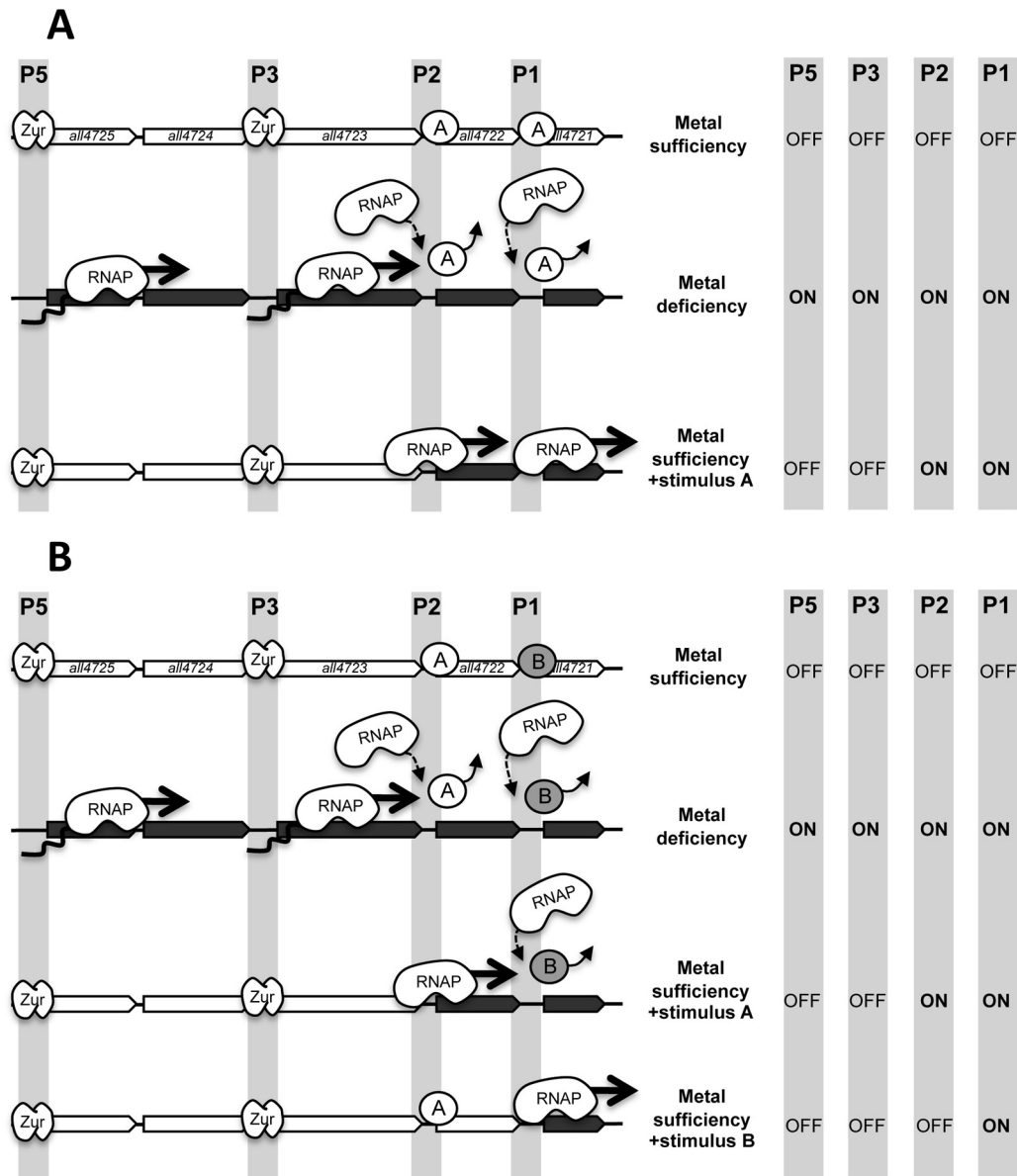


FIG 7 Model for the regulation of promoters in the *all4725-all4721* operon. (A) The *all4725-all4721* operon is depicted, showing as empty arrows the genes that are repressed and as dark-gray arrows those that are induced in each situation. The positions of promoters P5 to P1 are shadowed. Three different conditions, indicated in the center, are depicted. The status (on or off) of the four promoters under each of these conditions is indicated at the right. (B) Model for the regulation of promoters in the *all4725-all4721* operon, including two distinct repressors for the regulation of P2 and P1.

Zur seems a remote possibility, because induction of P2 and P1 by TPEN would have been expected in mutant strain MN8. The possibility that the lack of induction of P2 and P1 in the MN8 mutant strain was due to the requirement of the disrupted *all4723* gene does not seem plausible, as its deletion (strain MN42) had no effect on P1 (Fig. 4). In the MN42 deletion mutant strain, transcription initiated at the upstream promoters, P5 and P3, is not interrupted, which is in contrast with the MN8 insertional mutant strain. It appears that as long as transcription from the upstream promoters is allowed to proceed through the operon, regulation of P2 and P1 would imitate that of the upstream promoters. Indeed, an insertion midway in the operon of a *Pnir* promoter, which responds to nitrogen stimuli, has a strong impact on the regula-

tory profile of P2 and P1. Therefore, regulation of P2 and P1 seems to be influenced by transcription elongation complexes approaching from upstream, a phenomenon known as transcriptional interference of tandem promoters (24). The molecular mechanism underlying this type of regulation may be diverse, and in some cases, it may occur by the effect that RNAP transcribing from one promoter may have on the supercoiling state of neighbor promoters (25, 26). Advancement of RNAP during transcription produces the accumulation of positive supercoiling ahead of the elongation complex and negative supercoiling behind it (27, 28), and supercoiling-sensitive promoters whose activity is modulated in response to changes in the torsion level of DNA have been described (25, 29–31). Whether P2 and P1 are sensitive to the alter-

ations in DNA topology that may provoke the advancement of RNAP from upstream promoters needs to be investigated further.

In other cases, transcriptional interference of tandem promoters may occur through transcription factor dislodgement by advancing RNAP (32–34). This may also be the case for P2 and P1. Some evidences suggest that transcription from P2 and P1 may be controlled by repression. We find it plausible that induction of P2 and P1 may occur through dislodgement of a repressor sitting on these promoters by RNAP molecules proceeding from upstream promoters. Previous reports of RNAP colliding into a protein bound to a downstream position on DNA showed that in some cases, RNAP may be halted by the bound protein through a roadblock mechanism (35–38), whereas in others, the elongating complexes are able to bypass the roadblock, probably by dislodgement of the blocking protein (39–42). Two factors contribute to readthrough by the RNAP: (i) when multiple RNAP complexes transcribe in tandem, trailing elongation complexes cooperate with the leading complex to bypass the block (39, 43), and (ii) nascent RNA-translating ribosomes, which closely follow transcribing RNAP, provide a supplemental impelling force that facilitates readthrough of roadblocks *in vivo* (44, 45). In *Anabaena*, both factors may contribute to dislodgement of a putative repressor from P2 and P1 because, on the one hand, tandem arrays of RNAP engaged at P5 and P3 upon induction are expected to arrive at P2 and P1 and, on the other hand, the sequences of P2 and P1 overlap (although partially in the case of P1) with the translated region of the gene located upstream. Dislodgement of a putative repressor from P2 and P1 could allow the engagement of new RNAP molecules and the initiation of transcription at these promoters. The consequence of this would be that the regulation of P2 and P1 would imitate the regulation of upstream promoters, which is consistent with the observations presented here.

A plausible model for the regulation of promoters in the *all4725-all4721* operon is presented in Fig. 7A. Under conditions of metal sufficiency, all four promoters would be off, P5 and P3 would be repressed by Zur, and P2 and P1 would be repressed by an unknown repressor. Under these conditions, no gene would be expressed (Fig. 7, empty arrows). Metal deficiency would induce all four promoters: P5 and P3 by Zur release and P2 and P1 through repressor dislodgement by advancing RNAP. Under these conditions, all genes of the operons would be expressed (Fig. 7, dark arrows).

Despite the consistency of this model, the existence of multiple promoters showing a similar regulatory pattern is intriguing. A putative role for the internal promoters could be to counteract the natural polarity of the operon, helping to maintain the expression level that the cell requires for each individual gene. Alternatively, this mode of regulation may help to specifically induce different regions of the operon in response to specific stimuli, as explained below. Regulation of P2 and P1 by a repressor responsive to a specific stimulus (“stimulus A” in Fig. 7) may allow independent induction of *all4722* and *all4721*. For instance, if stimulus A is concomitant to metal sufficiency, P5 and P3 would be repressed by Zur, whereas P2 and P1 would be derepressed. Furthermore, since there is no reason to assume that P2 and P1 are controlled by the same repressor, there is still the possibility that *all4721* could be independently induced if P1 was controlled by a distinct repressor responding to a specific stimulus (“stimulus B” in Fig. 7B). This mode of regulation would resemble a domino effect, where induction of one promoter in the operon would determine induc-

tion of promoters downstream. According to this model, genes in bacterial operons could be subjected to a hierarchical regulation dictated by their position and the localization and features of internal promoters, so that genes at the 5′ region would be induced together with all genes located downstream, whereas those at the 3′ region may also be induced by specific conditions. Thus, the more toward the 3′ region a gene is located, the more distinct stimuli it could be responsive to.

Multiple efforts are being made at present in synthetic biology to engineer, by the use of molecular toolkits, systems where genes need to be precisely controlled (46, 47). The regulatory model unveiled in this work may be helpful for engineering arrays of genes with a nested regulation by properly distributing internal promoters controlled by repression.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed with grants BFU2010-19544 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), cofinanced by the European Social Fund, and CVI2007-03167 from the Junta de Andalucía and FEDER. M.N. is a recipient of a predoctoral fellowship from the Junta de Andalucía.

## REFERENCES

- Osbourn AE, Field B. 2009. Operons. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:3755–3775.
- Blumenthal T. 2004. Operons in eukaryotes. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 3:199–211.
- Fondi M, Emiliani G, Fani R. 2009. Origin and evolution of operons and metabolic pathways. *Res. Microbiol.* 160:502–512.
- Medina-Aparicio L, Rebollar-Flores JE, Gallego-Hernandez AL, Vazquez A, Olvera L, Gutierrez-Rios RM, Calva E, Hernandez-Lucas I. 2011. The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Bacteriol.* 193:2396–2407.
- Shin JH, Price CW. 2007. The SsrA-SmpB ribosome rescue system is important for growth of *Bacillus subtilis* at low and high temperatures. *J. Bacteriol.* 189:3729–3737.
- Ishihama A. 2010. Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:628–645.
- Napolitano M, Rubio MA, Santamaría-Gómez J, Olmedo-Verd E, Robinson NJ, Luque I. 2012. Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 194:2426–2436.
- Lee JW, Helmann JD. 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biomaterials* 20:485–499.
- Ma Z, Gabriel SE, Helmann JD. 2011. Sequential binding and sensing of Zn(II) by *Bacillus subtilis* Zur. *Nucleic Acids Res.* 39:9130–9138.
- Shin JH, Jung HJ, An YJ, Cho YB, Cha SS, Roe JH. 2011. Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in Zur. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:5045–5050.
- Bensing BA, Meyer BJ, Dunny GM. 1996. Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:7794–7799.
- Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:3–27.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (ed). 2010. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York, NY.
- Elhai J, Wolk CP. 1988. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 68:119–138.
- Elhai J, Wolk CP. 1988. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:747–754.
- Luque I, Contreras A, Zabulon G, Herrero A, Houmard J. 2002. Expression of the glutamyl-tRNA synthetase gene from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 depends on nitrogen availability and the global regulator NtcA. *Mol. Microbiol.* 46:1157–1167.

17. Camargo S, Valladares A, Flores E, Herrero A. 2012. Transcription activation by NtcA in the absence of consensus NtcA-binding sites in an *Anabaena* heterocyst differentiation gene promoter. *J. Bacteriol.* **194**:2939–2948.
18. Winson MK, Swift S, Hill PJ, Sims CM, Griesmayr G, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS. 1998. Engineering the luxCDABE genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:193–202.
19. Guo M, Yang XL, Schimmel P. 2010. New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:668–674.
20. Frias JE, Flores E, Herrero A. 2000. Activation of the *Anabaena* nir operon promoter requires both NtcA (CAP family) and NtcB (LysR family) transcription factors. *Mol. Microbiol.* **38**:613–625.
21. Elhai J. 1993. Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**:179–184.
22. Huang HH, Camsund D, Lindblad P, Heidorn T. 2010. Design and characterization of molecular tools for a synthetic biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res.* **38**:2577–2593.
23. Ferino F, Chauvat F. 1989. A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Gene* **84**:257–266.
24. Palmer AC, Egan JB, Shearwin KE. 2011. Transcriptional interference by RNA polymerase pausing and dislodgement of transcription factors. *Transcription* **2**:9–14.
25. Rhee KY, Opel M, Ito E, Hung S, Arfin SM, Hatfield GW. 1999. Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:14294–14299.
26. Fang M, Wu HY. 1998. A promoter relay mechanism for sequential gene activation. *J. Bacteriol.* **180**:626–633.
27. Liu LF, Wang JC. 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**:7024–7027.
28. Leng F, McMacken R. 2002. Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:9139–9144.
29. Peter BJ, Arsuaga J, Breier AM, Khodursky AB, Brown PO, Cozzarelli NR. 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* **5**:R87. doi:10.1186/gb-2004-5-11-r87.
30. Niehus E, Cheng E, Tan M. 2008. DNA supercoiling-dependent gene regulation in *Chlamydia*. *J. Bacteriol.* **190**:6419–6427.
31. Lim HM, Lewis DE, Lee HJ, Liu M, Adhya S. 2003. Effect of varying the supercoiling of DNA on transcription and its regulation. *Biochemistry* **42**:10718–10725.
32. Bird AJ, Gordon M, Eide DJ, Winge DR. 2006. Repression of ADH1 and ADH3 during zinc deficiency by Zap1-induced intergenic RNA transcripts. *EMBO J.* **25**:5726–5734.
33. Martens JA, Wu PY, Winstone F. 2005. Regulation of an intergenic transcript controls adjacent gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **19**:2695–2704.
34. Petruk S, Sedkov Y, Riley KM, Hodgson J, Schweisguth F, Hirose S, Jaynes JB, Brock HW, Mazo A. 2006. Transcription of *bxd* noncoding RNAs promoted by trithorax represses *Ubx* in cis by transcriptional interference. *Cell* **127**:1209–1221.
35. Deuschle U, Gentz R, Bujard H. 1986. lac repressor blocks transcribing RNA polymerase and terminates transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:4134–4137.
36. Belitsky BR, Sonenshein AL. 2011. Roadblock repression of transcription by *Bacillus subtilis* CodY. *J. Mol. Biol.* **411**:729–743.
37. Dole S, Nagarajavel V, Schnetz K. 2004. The histone-like nucleoid structuring protein H-NS represses the *Escherichia coli* *bgl* operon downstream of the promoter. *Mol. Microbiol.* **52**:589–600.
38. Choi SK, Saier MH, Jr. 2005. Regulation of sigL expression by the catabolite control protein CcpA involves a roadblock mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon and nitrogen metabolism. *J. Bacteriol.* **187**:6856–6861.
39. Epshtein V, Toulme F, Rahmouni AR, Borukhov S, Nudler E. 2003. Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *EMBO J.* **22**:4719–4727.
40. Horowitz H, Platt T. 1982. Regulation of transcription from tandem and convergent promoters. *Nucleic Acids Res.* **10**:5447–5465.
41. Lopez PJ, Guillerez J, Sousa R, Dreyfus M. 1998. On the mechanism of inhibition of phage T7 RNA polymerase by lac repressor. *J. Mol. Biol.* **276**:861–875.
42. Perez-Roger I, Macian F, Armengod ME. 1995. Transcription termination in the *Escherichia coli* *dnaA* gene is not mediated by the internal DnaA box. *J. Bacteriol.* **177**:1896–1899.
43. Epshtein V, Nudler E. 2003. Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation. *Science* **300**:801–805.
44. Proshkin S, Rahmouni AR, Mironov A, Nudler E. 2010. Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science* **328**:504–508.
45. Burmann BM, Schweimer K, Luo X, Wahl MC, Stitt BL, Gottesman ME, Rosch P. 2010. A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* **328**:501–504.
46. Rothschild LJ. 2010. A powerful toolkit for synthetic biology: over 3.8 billion years of evolution. *Bioessays* **32**:304–313.
47. Fischbach M, Voigt CA. 2010. Prokaryotic gene clusters: a rich toolbox for synthetic biology. *Biotechnol. J.* **5**:1277–1296.



# Characterization of the Response to Zinc Deficiency in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120

Mauro Napolitano,<sup>a</sup> Miguel Ángel Rubio,<sup>a</sup> Javier Santamaría-Gómez,<sup>a</sup> Elvira Olmedo-Verd,<sup>a\*</sup> Nigel J. Robinson,<sup>b</sup> and Ignacio Luque<sup>a</sup>

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC, and Universidad de Sevilla, Seville, Spain,<sup>a</sup> and Biophysical Sciences Institute, Durham University, Durham, United Kingdom<sup>b</sup>

**Zur regulators control zinc homeostasis by repressing target genes under zinc-sufficient conditions in a wide variety of bacteria. This paper describes how part of a survey of duplicated genes led to the identification of the open reading frame *all2473* as the gene encoding the Zur regulator of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. All2473 binds to DNA in a zinc-dependent manner, and its DNA-binding sequence was characterized, which allowed us to determine the relative contribution of particular nucleotides to Zur binding. A *zur* mutant was found to be impaired in the regulation of zinc homeostasis, showing sensitivity to elevated concentrations of zinc but not other metals. In an effort to characterize the Zur regulon in *Anabaena*, 23 genes containing upstream putative Zur-binding sequences were identified and found to be regulated by Zur. These genes are organized in six single transcriptional units and six operons, some of them containing multiple Zur-regulated promoters. The identities of genes of the Zur regulon indicate that *Anabaena* adapts to conditions of zinc deficiency by replacing zinc metalloproteins with paralogues that fulfill the same function but presumably with a lower zinc demand, and with inducing putative metallochaperones and membrane transport systems likely being involved in the scavenging of extracellular zinc, including plasma membrane ABC transport systems and outer membrane TonB-dependent receptors. Among the Zur-regulated genes, the ones showing the highest induction level encode proteins of the outer membrane, suggesting a primary role for components of this cell compartment in the capture of zinc cations from the extracellular medium.**

In a changing environment, bacterial cells are continuously challenged by either insufficient, elevated, or even toxic concentrations of metals. However, both excess and deficiency of a particular metal in the cytoplasm are detrimental for cell growth. The maintenance of the cytoplasmic concentrations of metals within certain levels needs to be tightly controlled to avoid misincorporation of particular metals into noncognate proteins, and this is achieved primarily by regulating their flow into and out of the cell through the control of specific import systems or efflux pumps (61). Adaptation to the availability of metals in the environment may involve complex signaling systems and vast metabolic rearrangements (61).

Zinc is one of the most important divalent metals in biology. It may act as a structural element, helping to maintain the conformation of particular protein domains, or as a catalytic cofactor in the active site of a variety of enzymes (13). Zinc sensing in bacteria is carried out by regulators of different families, including SmtB/ArsR, MerR, TetR, MarR, and the Fur family (10, 26, 32, 37, 54). Zur (zinc uptake regulator) proteins belong to the Fur family. These proteins function as dimeric transcription factors that bind to palindromic DNA sequences in the promoters of regulated genes (33). In general, proteins of the Fur family work as repressors by binding to DNA targets that overlap promoter sequences, thus blocking the access of the RNA polymerase (17, 33). The Fur family includes proteins that, despite showing broad sequence similarity and a similar composition of structural domains, are diverse enough to respond to distinct stimuli. Thus, this family includes members like Zur, Fur, Nur, and Mur, which sense distinct divalent metals (Zn, Fe, Ni, and Mn, respectively), and PerR and Irr, which sense cytoplasmic peroxides and heme, respectively (33). Like other members of the Fur family, Zur proteins have two structural domains connected by a mobile hinge, an N-terminal winged-helix DNA-binding domain and a C-terminal dimeriza-

tion domain (39, 55). Zur contains several coordination sites for zinc (39, 41, 55) and senses the cytoplasmic concentration of exchangeable zinc by binding to this metal, which in turn allows Zur binding to DNA (33). Effective sensing of zinc is presumed to require the concentration of the metal in the cytoplasm to approach the affinity of the regulatory coordination site(s) (41, 55), and zinc has been estimated to be present in subpicomolar concentrations in *Escherichia coli* (45). Occupancy of the regulatory site probably induces a conformational reorientation of the two domains so that, in the dimer, the DNA-binding domains adopt an optimal orientation for binding to DNA (39, 41, 55).

Cyanobacteria are oxygenic photosynthetic prokaryotes, distributed throughout a wide variety of environments ranging from oceanic and fresh waters to continental habitats at all latitudes (62). Although some may form symbiotic associations with fungi and plants, most species are free-living organisms. Their capacity to fix atmospheric CO<sub>2</sub> and release O<sub>2</sub> by photosynthesis together with their abundance on Earth make these organisms quantitatively important in some biogeochemical cycles. For instance, it is estimated that oceanic cyanobacteria account for a significant portion of global primary production (11, 23, 35, 47). Cyanobacteria have a strong dependency on zinc, since one of the most

Received 19 January 2012 Accepted 24 February 2012

Published ahead of print 2 March 2012

Address correspondence to Ignacio Luque, ignacio.luque@ibvf.csic.es.

\* Present address: Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle University, Newcastle, United Kingdom.

Supplemental material for this article may be found at <http://jb.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.00090-12

important and abundant enzymes for CO<sub>2</sub> fixation in these organisms, carbonic anhydrase, is most commonly a zinc metalloenzyme which generates a substrate for this reaction from bicarbonate (57). Although several aspects of detoxification of excess zinc have been exhaustively analyzed in cyanobacteria (7–9, 12, 30, 36, 49), the response of these organisms to zinc deficiency remains poorly investigated. Indeed, the Zur regulator has scarcely been characterized in this phylum (7, 12, 59).

In this study, the response of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 (also known as *Nostoc* sp. strain PCC 7120) to zinc deficiency was analyzed. The Zur regulator was identified with *in vitro* and *in vivo* evidence of the specificity of this factor for zinc. An empirical characterization of the Zur-binding sequence is provided, and components of the Zur regulon are identified.

## MATERIALS AND METHODS

**Organisms and growth conditions.** *Anabaena* sp. strain PCC 7120 was routinely grown in BG11 medium (48) at 30°C, illuminated with white fluorescent lamps at 75 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, in Erlenmeyer flasks that were shaken or aerated by bubbling with a mixture of air enriched with 1% CO<sub>2</sub>. Bubbled cultures were buffered with 10 mM NaHCO<sub>3</sub>. Solid medium was prepared by the addition of 1% agar to BG11. The *zur* mutant was cultured in medium containing 2 to 5 μg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 2 to 5 μg ml<sup>-1</sup> spectinomycin. When indicated, *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) was added to the cultures at a final concentration of 20 μM. TPEN was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 20 mM. In experiments using TPEN, DMSO was added to control cultures not containing TPEN at the same final concentration as those containing it.

*Escherichia coli* was grown in Luria-Bertani (1) medium with antibiotics, when needed, at the following concentrations: ampicillin, 50 μg ml<sup>-1</sup>; kanamycin, 25 μg ml<sup>-1</sup>; chloramphenicol, 30 μg ml<sup>-1</sup>; streptomycin, 25 μg ml<sup>-1</sup>; spectinomycin, 100 μg ml<sup>-1</sup>. *Escherichia coli* DH5α was used for routine cloning. XL1-Blue and BL21(DE3) were used for overexpression of genes under the control of the *trc* promoter and the T7 promoter, respectively.

**Generation of an *Anabaena zur* mutant.** A deletion-insertion mutant of the *all2473* gene (*furB/zur*) was generated as follows. A DNA fragment containing the *all2473* gene and flanking sequences was amplified by PCR using *Anabaena* genomic DNA as a template and primers 2473\_DEL-1F and 2473\_DEL\_1R. The PCR product was cloned in plasmid pBluescript SK+ (Novagen). The resulting plasmid, pCMN34, was PCR amplified with divergent primers 2473\_DEL-2F and 2473\_DEL\_2R and ligated to the C.S3 cassette (15) conferring resistance to streptomycin and spectinomycin. The insert was cloned into the pRL278 vector and transferred by triparental conjugation to *Anabaena* (14).

**Overexpression and purification of proteins.** *all1691* (*furA*), *all2473* (*furB* or *zur*), and *alr0957* (*furC*) were PCR amplified from *Anabaena* genomic DNA using the primer pairs *furA*-1F–*furA*-1R, 2473-CLN-1F–2473-CLN-1R, and 0957-CLN-1F–0957-CLN-1R, respectively, cloned in the pCMN28b expression vector (M. Napolitano and I. Luque, unpublished data) in frame with the N-terminal Strep-Tag II sequence tag, and introduced into BL21(DE3). Cells were incubated for 16 h at 16°C after the addition of 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cell extracts were prepared, and proteins were purified through 1-ml Strep-Tactin Superflow columns (IBA) by following the instructions of the manufacturer.

**RNA extraction and Northern blotting.** RNA preparation from cyanobacterial cells and Northern assays were carried out as described in reference 40.

**5'-RACE.** Promoter mapping by 5' rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) was carried out as described in reference 4, with some modifications. Briefly, 50 μg of RNA from *Anabaena* cells was incubated with 20 U of tobacco alkaline phosphatase (TAP) (1) for 2 h at 37°C. A control

reaction mixture was incubated in parallel without enzyme. Both reaction mixtures were ligated to 15 pmol of an RNA oligonucleotide named Bensing RNA (see Table S2 in the supplemental material) with T4 RNA ligase. Aliquots (5 to 7 μg of RNA) of both reaction mixtures were annealed to specific primers for each of the genes in the *all4729*–*all4721* cluster and subjected to retrotranscription with 100 U of Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) at 47°C. cDNAs were amplified by using a forward primer named Bensing DNA (see Table S2) partially overlapping the sequence of the RNA oligonucleotide mentioned above and reverse primers *all4727* 4R, *all4727* 5R, *all4726* 1R, *all4726* 3R, *all4725* 3R, *all4725* 4R, *all4724\_1R*, *all4724* 2R, *all4724* 3R, *all4724* 4R, *thrS2* 5R, *thrS2* 6R, *thrS2* 7R, *thrS2* 8R, *all4722\_2R*, *all4722* 3R, *all4722* 4R, *all4722* 5R, *all4722* 6R, *all4722* 7R, and *all4721* 1R annealing with the 5' region of the corresponding open reading frames (ORFs) (see Table S2). The PCR products were resolved on agarose gels, and bands found exclusively in the lanes corresponding to TAP-treated samples were sequenced.

**Electrophoresis mobility shift assay (EMSA).** Unless otherwise stated, radioactive DNA fragments to be used in EMSAs were generated by annealing partially overlapping oligonucleotides (*all4725*-GS-1F and *all4725*-GS-1R for *all4725*, *all4723*-GS-1F and *all4723*-GS-1R for *all4723*, *all4722*-GS-1F and *all4722*-GS-1R for *all4722*, *all4721*-GS-1F and *all4721*-GS-1R for *all4721*; see Table S2 in the supplemental material) and filling in with Klenow DNA polymerase in the presence of [<sup>32</sup>P]dCTP. Forward primer *all4725*-GS-1F and reverse primers *all4725*-GS-2R to *all4725*-GS-14R (see Table S2) were used to generate DNA fragments with mutated versions of the Zur-binding site at the *all4725* promoter. DNA was used at 0.1 to 0.5 fmol per reaction, incubated in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), and 20% glycerol for 15 min at room temperature in the absence or presence of 0.01 to 20 pmol of protein, and resolved on 4 to 5% acrylamide gels. For the determination of the *K<sub>d</sub>*, retarded and nonretarded bands were quantified in a Cyclone Plus storage phosphor system (Perkin Elmer), and the percentage of retarded bands was plotted against the concentration of protein in the assay and fitted to a simplified version of the Hill equation (53).

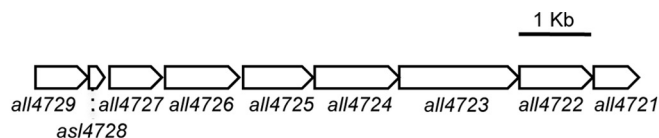
**Real-time PCR.** RNAs from wild-type (WT) *Anabaena* and the *zur* mutant were treated with DNase and inspected for DNA contamination by conventional PCR. DNA-free RNA (5 μg) was used for cDNA synthesis with a Superscript First Strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) using random hexamers as primers. cDNAs were used as templates to set up PCRs with the SensiMix SYBR kit (Bioline) in an iQ5 multicolor real-time PCR detection system (Bio-Rad). The *rnpB* gene (60) was used as a standard gene for normalization.

## RESULTS

**Description of a gene cluster encoding several metalloproteins in *Anabaena*.** In a survey of duplicated genes in the genome of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 (referred to here as *Anabaena*), a cluster of 9 genes (*all4729* to *all4721*), of which 7 had homologues at different locations in the genome, was observed (Fig. 1). Features of the genes in the cluster are as follows: (i) they appear to be not functionally related; (ii) 6 of their putative products are predicted to contain metal binding sites; (iii) their expression is very low or silent under standard laboratory growth conditions; and (iv) some genes (*all4725*, *all4723*, and *all4721*) encode proteins with putative essential housekeeping functions. In contrast, the respective paralogues (*alr4380*, *alr0335*, and *alr5287*) of the latter genes were highly expressed under standard growth conditions (data not shown).

**Characterization of the expression profile of the cluster.** The RNA level of some genes in the cluster was analyzed under several conditions, including diazotrophy, anaerobiosis, nitrogen stress, and high light, and very low mRNA levels were observed under all conditions. Given the presence of putative metal-binding sites in





Gene	Synonym	Putative product	Predicted metal cofactor	Homologous genes in the <i>Anabaena</i> genome
<i>all4729</i>		Putative metalloprotein	+	<i>all0232</i> , <i>alr4839</i>
<i>asl4728</i>		Non-conserved 55 amino acid peptide		-
<i>all4727</i>		Two-component response regulator		*
<i>all4726</i>		Membrane-anchored histidine kinase		*
<i>all4725</i>	<i>hemE</i>	Phorphobilinogen synthase	+(Mg or K)	<i>alr4380</i>
<i>all4724</i>		Putative FAD-dependent oxidoreductase		-
<i>all4723</i>	<i>thrS</i>	Threonyl-tRNA synthetase	+(Zn)	<i>alr0335</i>
<i>all4722</i>		P-loop GTPase (COG0523-family)	+	<i>alr1093</i> , <i>all1751</i> , <i>all3392</i>
<i>all4721</i>	<i>folE</i>	GTP-cyclohydrolase	+(Zn)	<i>alr5287</i>

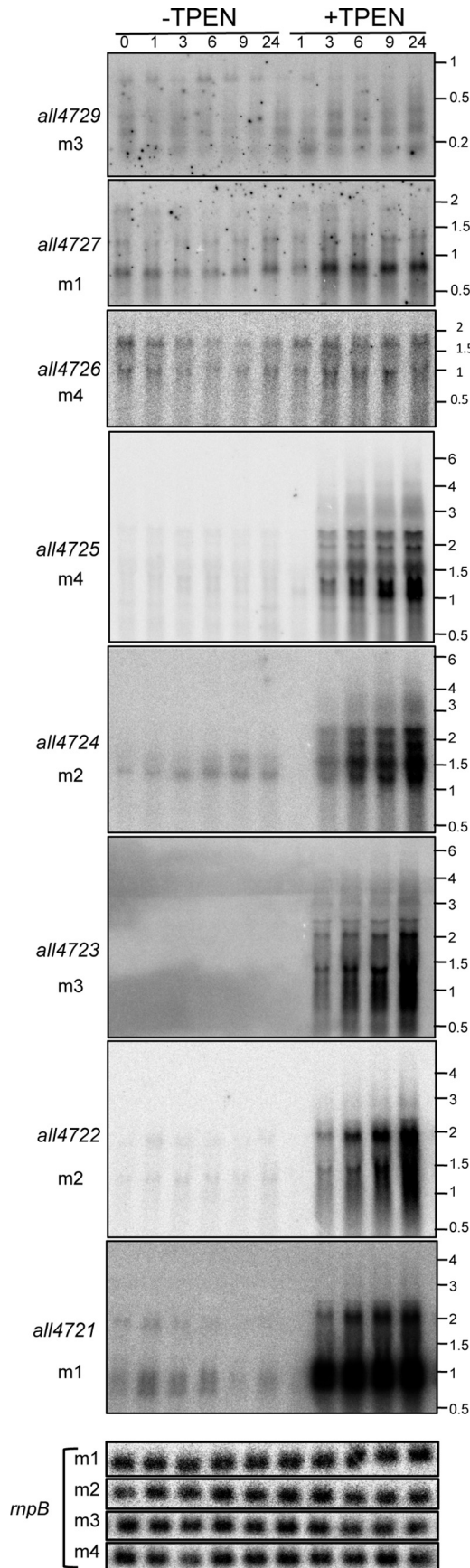
FIG 1 Structure of a divalent metal-responsive gene cluster of *Anabaena*. A diagram of the gene cluster is at the top. +, presence of a putative metal cofactor (specified in parentheses in cases where it is predictable). *Anabaena* genes homologous to those in the cluster are indicated with their locus tags or with an asterisk when many paralogues are present in the genome.

several proteins encoded in the cluster, its expression was analyzed in cells grown for a 24-hour period in the absence or presence of TPEN, a divalent metal chelator. In time course experiments two different profiles were observed; on one side, *all4729*, *all4727*, and *all4726*, in the 5' region of the cluster, showed discrete hybridization bands that slightly increased their intensity (around 2-fold) upon treatment with TPEN, whereas *all4725* to *all4721*, in the 3' half of the cluster, showed wide-range (from 0.5 to 7-kb upon overexposure) smeared hybridization signals with some prominent discrete bands that, when quantified as a whole, dramatically increased in intensity (almost 100-fold) a few hours after the addition of TPEN to the cultures (Fig. 2). This indicated cotranscription of genes *all4725* to *all4721* in long unstable polycistronic transcripts. To check this possibility, the existence of transcripts overlapping contiguous ORFs in the cluster was analyzed by reverse transcription-PCR (RT-PCR). As shown in Fig. 3A, transcripts overlapping contiguous ORFs existed from *all4727* to *all4721*; however, no transcript overlapping *asl4728* and *all4727* could be observed. Therefore, *all4729* and *asl4728* are transcribed independently of the remainder of the cluster.

**Promoter mapping.** Transcription start points in the cluster were mapped by the 5'-RACE procedure described by Bensing et al. (4), suitable for the distinction of 5' ends with a triphosphate group, corresponding to true transcription initiation sites, from those with a monophosphate group resulting from the processing of a longer transcript. Transcription start points were mapped upstream of *all4727*, *all4725*, *all4723*, *all4722*, and *all4721* at positions -68, -19, -20, -118, and -90 from their respective ATG codons (Fig. 3B and C). A single transcription start point upstream of *all4727* was detected when primers annealing with either *all4727* or *all4726* were used, indicating that these two ORFs cotranscribe from a single promoter. It is worth noting that the 5'-RACE products obtained with primers for *all4725*, *all4723*, *all4722*, and *all4721* correlated in intensity with the signals observed by Northern blotting for samples that were not treated or

treated with TPEN, suggesting that they correspond to regulated promoters (Fig. 3C).

**Identification of regulatory factors.** In the *Anabaena* genome, 3 ORFs (*all1691*, *all2473*, and *alr0957*, also known as *furA*, *furB*, and *furC*) encode proteins of the Fur family (27). To test the possible involvement of any of these three factors in the regulation of the operon, the binding of recombinant purified proteins to a DNA fragment from the promoter region of *all4725* was assayed by electrophoresis mobility shift assays (EMSA) (Fig. 4). Only FurB was able to produce a retarded band (Fig. 4A). Binding of FurB to this DNA fragment was demonstrated to be specific in competition assays: an excess of the unlabeled *all4725* promoter fragment but not an equivalent amount of an unrelated DNA fragment was able to abolish binding (Fig. 4B). Binding of FurB to other promoter regions in the *all4725*-*all4721* operon was also tested. FurB was able to bind in EMSAs to the promoter regions of *all4723* and *all4721* but not to that of *all4722* (Fig. 4C). To confirm regulation of the operon by FurB, an insertion-deletion mutant was generated by gene replacement. A segregated mutant (i.e., a strain carrying the mutated version in all chromosomes copies) was selected for further studies. In this mutant, expression of the genes in the operon was found to be high under noninducing conditions (e.g., in the absence of TPEN) (Fig. 5A), consistent with a repressor role for FurB in these genes. *all4727* was not upregulated in the *furB* mutant, suggesting that it does not belong to the same transcriptional unit as *all4725*-*all4721*. Maximal non-inhibitory concentrations of several divalent metals (Cu, Zn, Ni, and Co) for WT *Anabaena* were determined, and growth of the WT and the *furB* mutant were tested under these conditions (Fig. 5B). Growth of the *furB* mutant was severely affected by the presence of zinc but not other metals (Fig. 5B), indicating a major role for FurB in the regulation of zinc homeostasis in *Anabaena*. To corroborate the specificity of FurB for zinc, EMSA reaction mixtures containing FurB were treated with increasing concentrations of the TPEN chelator, and it was observed that concentrations

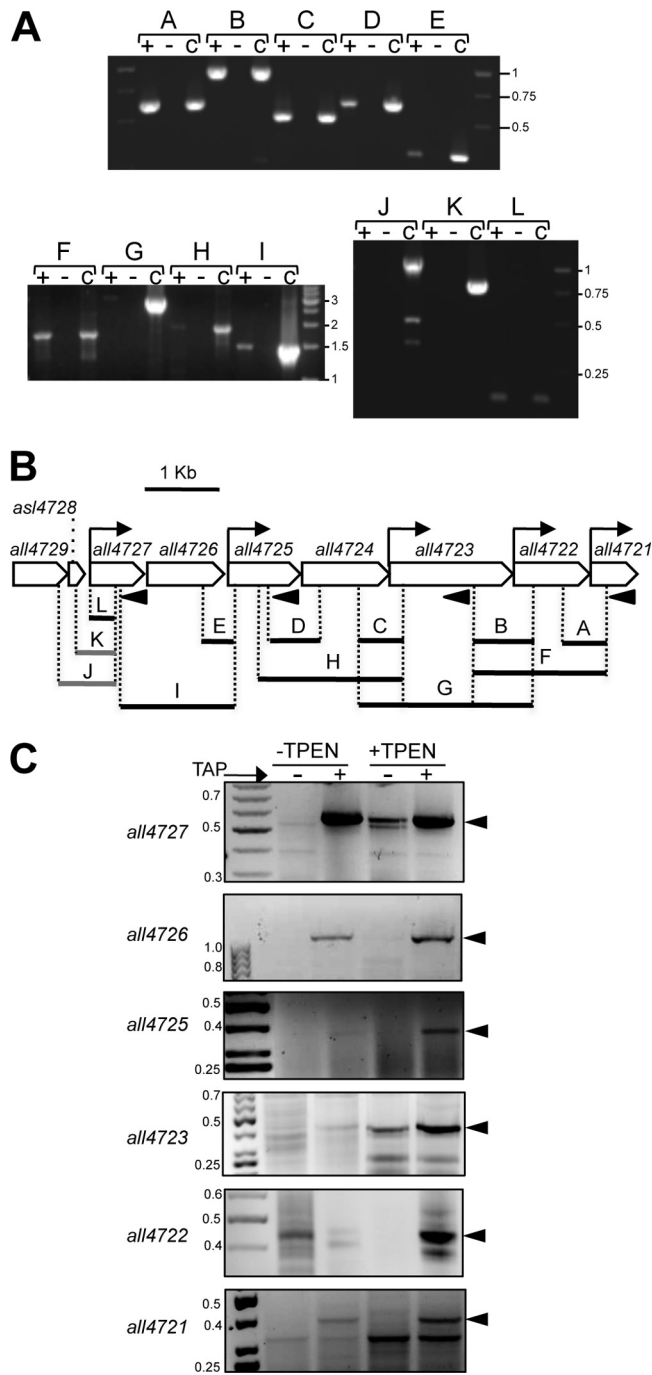


above 500  $\mu\text{M}$  mostly inhibited the binding of FurB to DNA (Fig. 5C, lane 3). DNA binding was restored when reaction mixtures were later supplemented with zinc (Fig. 5C). These results identified FurB as Zur, the zinc uptake regulator of *Anabaena* (referred to here as Zur).

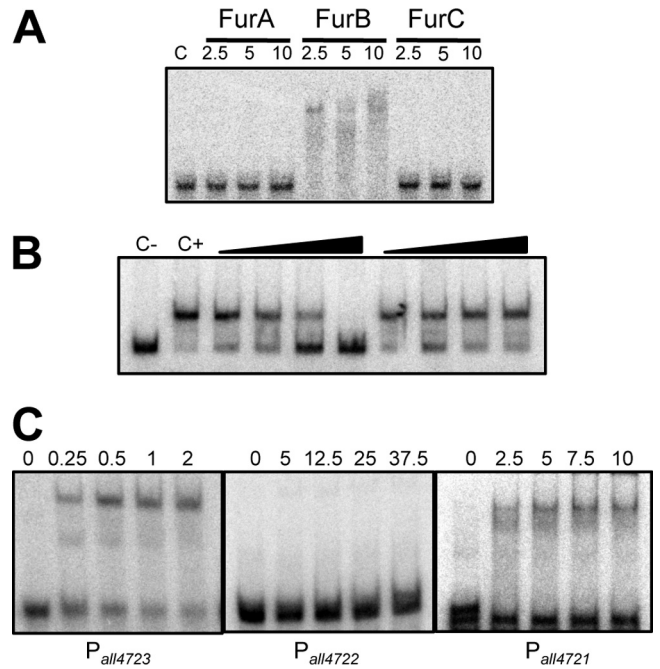
**Characterization of the Zur-binding sequence.** The promoter sequences of *all4725*, *all4723*, and *all4721* were compared searching for the putative binding sequence for Zur. Sequences with a dyad symmetry axis with some similarity to 7-1-7 sequences reported as targets for proteins of the Fur family (33) were observed in the promoters of *all4725* and *all4723*. In the promoter of *all4721*, two overlapping imperfect sequences were observed (Fig. 6A). The affinity constant ( $K_d$ ) of Zur calculated by EMSAs was estimated to be  $2.5 \times 10^{-9}$  and  $7 \times 10^{-9}$  M for the target sequences at *all4725* and *all4723*, respectively (the affinity for the sequences at the *all4721* promoter was very low, and the  $K_d$  could not be calculated). The affinity of Zur for the sequence at the *all4725* promoter was on the same order of magnitude as that of other Fur family factors for their consensus binding sequences (22, 33). To determine the relative contribution of the DNA nucleotides to the interaction with Zur, the effect of mutations in the sequence at the *all4725* promoter on the affinity for Zur was analyzed. Except for the mutation at position 1R (Fig. 6B), which makes the sequence perfectly symmetric and does not significantly alter the  $K_d$ , any other of the introduced changes had a severe effect on the  $K_d$ , indicating that Zur binding to DNA is highly sequence specific. It is noticed, however, that not all changes had a similar effect, with the mutation of nucleotides 2 and 3 and nucleotides 4 and 5 giving a greater effect than the mutation of nucleotides 6 and 7. Changes at symmetric positions had additive effects in the case of nucleotides 2-3 and 4-5 but not in the case of 6-7. Sequences flanking the symmetric 7-1-7 motif also contribute to Zur binding, since their mutation decreases the affinity for Zur (Fig. 6B).

**Insight into the Zur regulon in *Anabaena*.** As a first approach to identify genes in the Zur regulon in *Anabaena*, the two sequences with lower  $K_d$ s in our affinity analyses (Fig. 6B) were used as a seed to search for similar sequences in the *Anabaena* genome using the Genolist Web server at the Pasteur Institute (<http://genodb.pasteur.fr/cgi-bin/WebObjects/GenoList.woa/>) allowing a maximum of 2 mismatches. Since only sequences properly located in the promoter (i.e., those overlapping the RNA polymerase binding region) are expected to affect transcription, the search was restricted to sequences located between positions -400 and +30 with respect to the translational start codon. Thirty-three putative Zur-binding sites were retrieved from this search. Downstream adjacent genes were tested for expression in the WT and the *zur* mutant by quantitative real-time PCR (Q-PCR) (*all4723* and *all4725* were retrieved and included in the analysis as controls). When one site was between two divergent ORFs, both were

**FIG 2** Transcriptional response of the genes in the *all4729-all4721* cluster to the chelation of divalent metals. *Anabaena* cells growing in BG11 medium were split into two cultures; one of them was supplemented with TPEN at a final concentration of 20  $\mu\text{M}$ , and both were further cultured for 24 h. Aliquots were extracted at the times indicated at the top of the panels; RNA was extracted and subjected to Northern hybridization with probes for the genes indicated at the left. m1, m2, m3, and m4 refer to the membranes used for the hybridization. Numbers on the right indicate the positions of RNA molecular weight markers. Hybridization of the four membranes (m1, m2, m3, and m4) with the *mpB* probe, used as a control for RNA loading, is shown at the bottom.



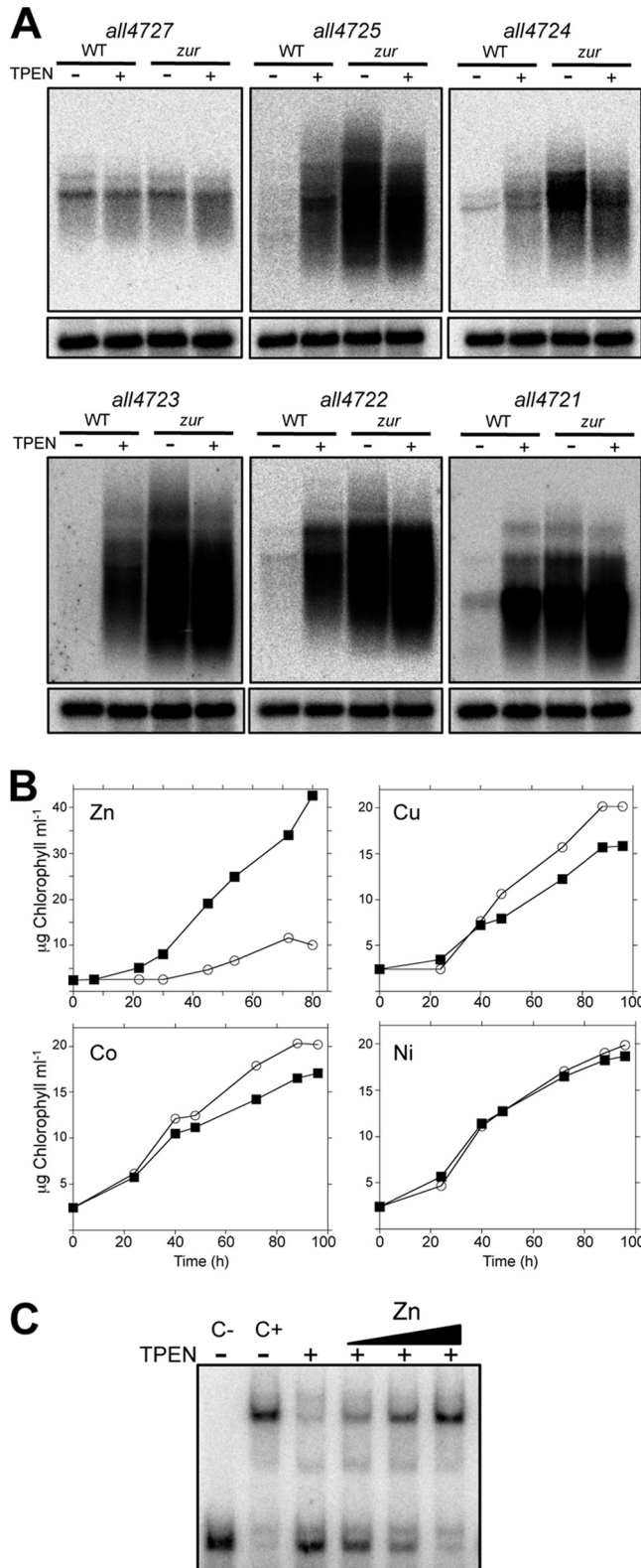
**FIG 3** Determination of the limits of the operon by RT-PCR and promoter mapping. (A) Products of RT-PCRs. + and –, reactions in which retrotranscriptase was added or omitted, respectively. C, control PCRs using genomic DNA as the template. The letters A to L identify the fragments on the electrophoresis and correspond to the fragments in panel B. (B) Fragments that were amplified by RT-PCR are depicted with solid lines, and those that failed to be amplified are depicted with gray lines. The primers used for retrotranscription are indicated by arrowheads. Bent arrows indicate the position of transcription start points, mapped by 5'-RACE. (C) Promoter mapping by 5'-RACE. RNA samples from *Anabaena* cells cultured for 24 h in the presence or absence of TPEN were treated with TAP or left untreated and subjected to 5'-RACE as described in Materials and Methods. The reverse oligonucleotides used in the PCR step annealed with the 5' region of the ORF indicated to the left of each panel. Numbers indicate the positions of DNA size markers. Arrowheads indicate the positions of major differential bands.



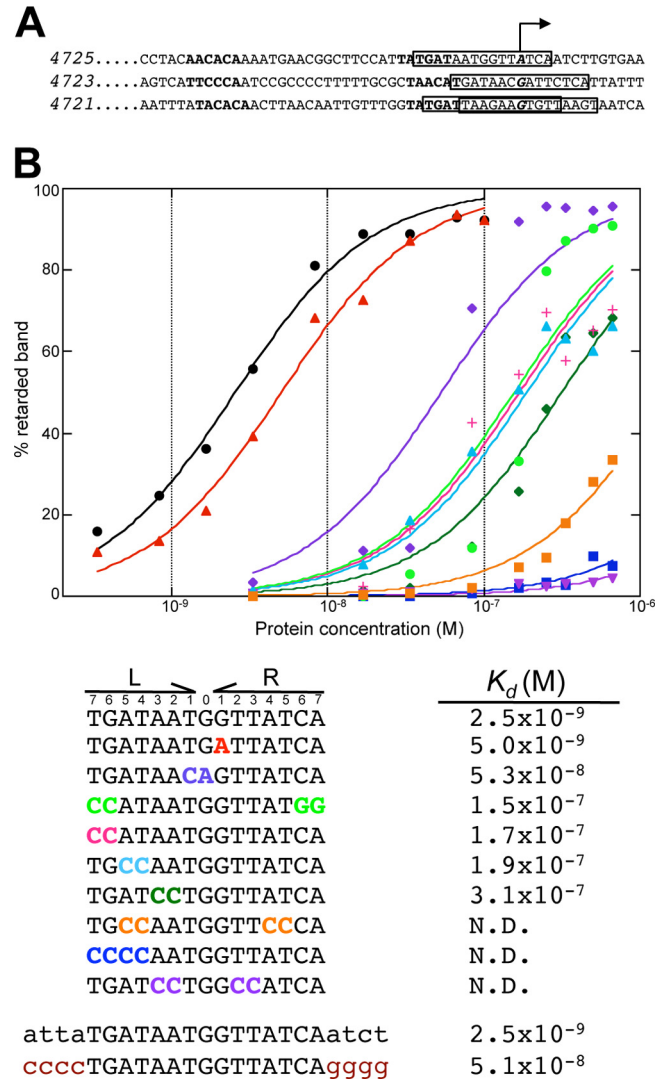
**FIG 4** Binding of Fur proteins to the promoter regions of genes in the *all4725*-*all4721* operon. (A) EMSA of FurA, FurB, and FurC with a DNA fragment from the promoter region of *all4725*. C, control assay in which no protein was added to the reaction mixture. The amounts (pmol) of dimer protein in 15- $\mu$ l assay mixtures are indicated at the top. (B) Binding to 0.25 fmol of a labeled fragment of the promoter region of *all4725* generated with primers *all4725\_2F* and *all4725\_2R* was assayed with no protein in the reaction mixture (C–) or with 0.1 pmol FurB, in the absence (C+) or presence (C+) of a 10-, 50-, 100-, or 200-fold excess of cold *all4725* promoter fragment (left) or cold unrelated competitor DNA (right) generated by PCR with primers *all4726\_2F* and *all4726\_1R*. (C) EMSA of FurB with DNA fragments of the promoter regions of *all4723*, *all4722*, and *all4721*. The amount (pmol) of FurB dimer in each reaction is indicated on top of each lane.

tested. The expression of genes not retrieved in our search but previously reported to be involved in zinc homeostasis in *Anabaena*, including *aztA*, *aztR*, *znuABC*, and *bmtA*, was also analyzed (8, 36). Of the 41 genes analyzed (see Table S1 in the supplemental material), 14 showed a higher level of expression in the *zur* mutant than in the WT, suggesting a direct regulation by Zur (Table 1; a 2-fold difference was established as the minimal threshold). No gene showed a higher level in the WT than in the mutant, and 27 had no change or showed a barely detectable expression level (see Table S1). Comparison using the WebLogo program of the putative Zur-binding sequences upstream of the regulated genes allowed the definition of a consensus binding sequence (TGATAATNATTATCA) for the *Anabaena* Zur protein (Table 1). Sequences flanking this 7-1-7 palindrome are not highly conserved, but there seems to be some preference for A or T.

The gene context of the Zur-regulated genes was analyzed, and 7 genes were found clustered with neighbor genes that could potentially be cotranscribed (Table 2). The expression of 15 additional genes clustered with Zur-regulated genes was analyzed by Q-PCR (see Table S1 in the supplemental material). Six were up-regulated in the *zur* mutant, indicating that they likely form transcriptional units with Zur-regulated genes. Thus, in addition to the *all4725*-*all4721* operon (named operon 1), five new Zur-reg-



**FIG 5** Phenotype of the *zur* mutant. (A) Northern hybridizations of RNA from cells of the WT or the *zur* mutant treated with TPEN for 24 h or left untreated. Probes used for hybridization are shown above the panels. Hybridizations of the membranes with the *rnpB* gene used as a RNA loading control are shown at the bottom of each panel. (B) Growth curves of the WT (squares) and the *zur* mutant (circles) in the presence of 25  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 25  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ ,



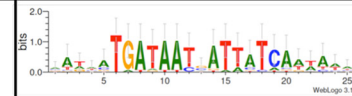
**FIG 6** Mapping and characterization of Zur-binding sequences. (A) The sequences of the promoter regions of *all4725*, *all4723*, and *all4721* are depicted. The bent arrow indicates the position of the transcription start point, bold indicates putative  $-35$  and  $-10$  sequences, and putative Zur-binding sequences are boxed. (B) The binding of FurB to different DNA sequences was assayed by EMSA. The plot shows the curves resulting from the adjustment of the percentage of retarded band to a simplified version of the Hill equation. The colors correspond to the sequences at the bottom. The top sequence is that of the *all4725* promoter. Mutations introduced to generate the other DNA fragments are indicated by colors corresponding to the graph. The  $K_d$  of Zur for each fragment is indicated. The curve for the sequence at the very bottom is not shown.

ulated operons (named operons 2 to 6 [Table 2]) have been uncovered. In summary, our analyses have revealed 23 genes regulated by Zur, 17 organized in 6 operons and 6 in single transcriptional units.

25  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ , or 25  $\mu\text{M}$   $\text{NiSO}_4$ . The data are representative of three independent repeats. (C) EMSA reaction mixtures (15  $\mu\text{l}$ ) containing 0.1 pmol of FurB dimer were incubated in the presence (+) or absence (-) of 500  $\mu\text{M}$  TPEN for 1 h at 25°C and subsequently supplemented with increasing concentrations (100, 250, or 500  $\mu\text{M}$ ) of  $\text{ZnSO}_4$ , incubated 30 min at 25°C, and resolved in a native acrylamide gel.

TABLE 1 Genes derepressed in the *zur* mutant

Gene	Synonym	Fold induction <sup>a</sup>	Description	Putative Zur binding sequence <sup>b</sup>
<i>alr1197</i>		12.5±6.9	CobW-C superfamily	ctgcaTGAAAATGATTATCatttaa
<i>all1474</i>		2.1±0.7	CRISPR-associated RAMP protein, SSO1426 family COG1337	tcttcTGATATTGATTCTCAatcctt
<i>all1751</i>		3.1±1.0	Putative metallochaperone COG0523	ataggTGATAATGATTATCcgatg
<i>alr2866</i>		3.1±2.3	Glycosyl transferase, family 2	agaaaTGTTAATCATTTCaaaaaa
<i>alr3242</i>		117.6±31.2	TonB-dependent transporter (outer membrane)	aaacaTGATAATCATTATCAaaaaaa
<i>alr3495</i>		2.8±1.4	Uncharacterized conserved protein COG1262	aataaTGATAACCTTTATCAaaaac
<i>all3515</i>		262.7±36.8	Putative outer membrane protein	gattaTGATAATCATTATCGgaagt ctgcTGATTATGATAATCAttatc
<i>alr4028-4029</i>		10.4±3.9	TonB-dependent transporter (outer membrane)	cagtgTGATAATAATAATCAttatc gataaTAATAATCATTATCTaaaca
<i>all4723</i>	<i>thrS2</i>	34.1±15.6	Threonyl-tRNA synthetase	taacaTGATAACGATTCTCattatt
<i>all4725</i>	<i>hemE</i>	159.8±38.2	Porphobilinogen synthase	cattaTGATAATGGTTATCAatcctt
<i>all0833</i>	<i>znuA</i>	51.0±8.8	Periplasmic solute binding protein	gagaaTGAGAATTATTATAataataa
<i>all0832</i>	<i>znuB</i>	45.8±17.3	ABC-transporter, ATP binding protein	
<i>all0830</i>	<i>znuC</i>	5.3±1.9	ABC-transporter permease protein	aattcTGATAATAAAAAATAaacacg
<i>all7621</i>	<i>aztR</i>	3.0±0.6	ArsR/SmtB-family transcriptional regulator	gagatTGATAACTATTGCTAagtaa



<sup>a</sup> Expressed as the ratio of the expression level in the *zur* mutant to that in the WT in Q-PCR experiments. Data are means ± standard deviations from three independent experiments.

<sup>b</sup> Putative Zur-binding sites on a gray background were not detected in our search at GenoList. A WebLogo sequence built with the sequences in the table is shown at the bottom.

## DISCUSSION

**Regulation of the *all4725-all4721* operon.** Results obtained by RT-PCR (Fig. 3A) showed that transcripts encompassing two or three contiguous ORFs from *all4727* to *all4721* were detected; however, *all4727* and *all4726* seemed to be mostly transcribed independently, as deduced from their expression pattern, which is very different from downstream genes (Fig. 2). Indeed, *all4727* does not seem to be under the control of *zur* (Fig. 5A), unlike genes in the *all4725-all4721* operon. Four promoters were mapped in the operon, and three were shown to be controlled by *zur*. It is difficult to determine whether prominent bands hybridizing with probes of the operon in Fig. 2 were due to transcription initiation from internal promoters, to premature termination, or both. However, for some transcripts, the promoter from which they originate could have been ascertained with some precision. For instance, the 1-kb and 2-kb bands hybridizing with probes of *all4721* or *all4721* and *all4722*, respectively (Fig. 2), were still visible in a mutant with a polar insertion in *all4723* (M. Napolitano,

unpublished observations), indicating that the corresponding transcripts originate from promoters located downstream of the insertion. The 2-kb band hybridizes with *all4722* (1,062 bp) and *all4721* (651 bp) and probably corresponds to a dicistronic transcript originating at P<sub>*all4722*</sub>, and the 1-kb band probably corresponds to a monocistronic transcript originating at P<sub>*all4721*</sub>. The size of the 2-kb band hybridizing to *all4723* is similar to the distance between the promoter of this gene and a transcriptional terminator located at the 5' end of *all4722*, suggesting that it may correspond to a monocistronic transcript originating at P<sub>*all4723*</sub>.

Although TPEN is often referred to as a zinc-specific chelator, it has been reported to bind other metals (6), and in *E. coli* it has been shown to alter the expression of genes responding not only to zinc but also to a variety of other divalent metals (56). In our experiments, TPEN altered the expression of the *isiA* and the *petE* genes of *Anabaena* that respond to iron and copper, respectively (see Fig. S2 in the supplemental material). Therefore, in

TABLE 2 Zur-regulated operons<sup>a</sup>

Operon	Gene	Description	Fold-induction
<p>Operon 2</p>	<p><i>alr1194</i> <i>alr1195</i> <i>alr1196</i></p> <p>[<i>alr1197</i> <i>alr1198</i> <i>alr1199</i>]</p>	<p>Two component regulator winged helix HP 90 Aas MscS mechanosensitive channel COG3264</p> <p>Putative metallochaperone COG0523 Metallophosphoesterase COG0622 Metallo-dependent phosphatase</p>	<p></p> <p>12.5±6.9 14.6±4.2 6.2±4.5</p>
<p>Operon 3</p>	<p>[<i>all1751</i> <i>all1750</i>]</p> <p><i>asl1749</i> <i>all1748</i> <i>all1747</i></p>	<p>Putative metallochaperone COG0523 WD40 repeat-containing protein</p> <p>HP 90 Aas Periplasmic protein of ABC-type metal ion transporter (COG0803) HP 116 Aas</p>	<p>2.9±0.4 3.1±1.0</p>
<p>Operon 4</p>	<p><i>alr3240</i> <i>alr3241</i></p> <p>[<i>alr3242</i> <i>alr3243</i>]</p>	<p>ABC-transporter, permease protein COG0609 ABC-transporter, ATP binding protein COG1120</p> <p>TonB-dependent receptor (outer membrane) (COG1629) ABC transporter, periplasmic-binding protein COG0614</p>	<p>117.6±31.2</p> <p>induced*</p>
<p>Operon 5</p>	<p><i>alr_R0066</i> <i>alr4027</i></p> <p>[<i>alr4028-29</i> <i>alr4030</i> <i>alr4031</i>]</p> <p><i>alr4032</i> <i>alr4033</i></p>	<p>Cobalamin riboswitch Predicted metal binding protein COG5469 (thioredoxin fold)</p> <p>TonB-dependent receptor (outer membrane) Putative ferredoxin (thioredoxin fold) COG 3411 ABC transporter, periplasmic-binding protein COG0614</p> <p>ABC-transporter, permease protein COG0609 ABC-transporter, ATP binding protein COG1120</p>	<p>10.4±3.9 7.2±0.4 9.0±0.6</p>
<p>Operon 6</p>	<p>[<i>all0833</i> <i>all0832</i> <i>all0830</i>]</p> <p><i>alr0831</i> <i>alr0831</i></p>	<p>Periplasmic solute binding protein (ZnuA) ABC-transporter, ATP binding protein (ZnuB) ArsR/SmtB regulator ABC-transporter, permease protein (ZnuC)</p>	<p>51.0±8.8 45.8±17.3 5.3±1.9</p>

<sup>a</sup> Zur-regulated genes are depicted in arbitrary colors and indicated by a bracket. Other neighboring genes and genetic elements that encode putative metalloproteins or that may be functionally related to genes in the operon are in white. Other details are as in Table 1. An asterisk indicates that the induction of *alr3243* could not be calculated since its expression was not detected in the WT.

*Anabaena*, TPEN seems to induce a general divalent metal deficiency, which is consistent with the observations in *E. coli* (56).

**The Zur regulator and the Zur-binding sequence in *Anabaena*.** Zur is a major regulator of zinc homeostasis, which although well characterized in a variety of bacteria has received little attention in cyanobacteria. The high degree of conservation between different members of the Fur family and the presence of multiple homologues per genome hinders the determination of the metal specificity of these proteins from sequence data alone. Moreover, overall sequence similarity does not always correlate

with metal specificity. In this study, *all2473* (also named *furB*) has been identified as the *zur* gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 based on experimental data. All2473/FurB was previously proposed to be a protein that binds unspecifically to DNA and protects it from oxidative damage (38). In contrast to this, results presented in this study show that All2473/FurB binds specifically, with high affinity ( $\sim 2.5 \times 10^{-9}$  M) and in a zinc-dependent manner, to palindromic sequences in the promoter of regulated genes. Furthermore, a deletion mutant is shown to be impaired in the regulation of zinc homeostasis, and the genes under its regulation

appear to be involved in the adaptation of *Anabaena* to zinc deficiency (see below). Altogether, these results strongly indicate that All2473/FurB is the Zur regulator that controls zinc homeostasis in *Anabaena*. If under particular circumstances *in vivo* this protein binds unspecifically to DNA, as proposed by López-Gomollón et al. (38), All4723/FurB/Zur would be a “moonlighting” protein with a dual role in the physiology of *Anabaena*.

Binding to 7-1-7 palindromic sequences has been previously reported for other Fur-family proteins from a variety of bacteria (2, 3, 33, 59). Nucleotides flanking the 7-1-7 sequences also contribute to the interaction with *Anabaena* Zur (Fig. 6B), and this is consistent with what has been reported for the Zur protein of *Bacillus subtilis* (22). Zur binding and dissociation from DNA are governed by the occupancy of a regulatory coordination site. Recent crystal structures have revealed three potential metal-coordinating sites in Zur from distinct bacteria (39, 55). The role of site 3 is controversial (41, 55), and it has been proposed that *in vivo*, zinc never binds to this site (41). Site 1 is a structural site, whereas site 2 is postulated to be the regulatory on-off switch (39, 41, 55). Consistently, the affinity of zinc for this site is in the predicted range of the buffered concentration of zinc in the cytoplasm (pico- to femtomolar) (41, 45). Importantly, regulatory site 2 is missing in the protein identified as the *Anabaena* Zur; only one (His78) of the four coordinating residues is conserved. In contrast, structural site 1 and site 3 are conserved (see Fig. S1 in the supplemental material), although amino acids at positions 75 and 96 of site 3 are permuted with respect to other Zur proteins (see Fig. S1). The absence of the regulatory site 2 in *Anabaena* Zur raises the question of which site functions as the on-off switch. Further work is required to elucidate the structural basis for the responsiveness of *Anabaena* Zur to zinc.

**The Zur regulon.** These data have revealed 23 genes regulated by Zur, organized in 6 operons and single transcriptional units. The presence of internal promoters in operon 1 indicates that distinct genes may require some degree of independent regulation. Distinct Zur-regulated promoters have also been observed in the *yciABC* operon of *Bacillus subtilis*, correlating with different expression levels of the genes (20). Most proteins upregulated in the *zur* mutant of *Anabaena* can be classified into 4 categories, described below, that outline the strategy of this cyanobacterium for adaptation to zinc limitation.

**Category 1: paralogues of zinc metalloproteins.** It has been shown that three genes in operon 1 encode proteins with essential housekeeping functions (All4725/HemE, All4723/ThrS and All4721/FolE). Their paralogues Alr4380/HemE, Alr0335/ThrS, and Alr5287/FolE, which are highly expressed under standard growth conditions, are all putative zinc metalloproteins based on the conservation of essential liganding residues. Very importantly, All4725/HemE is a porphobilinogen synthase with an aspartate-rich active site (DvALDpFtthGHDG) that fits the consensus sequence DxALDx(Y/F)xxxG(H/Q)DG for Mg- or K-dependent enzymes. In contrast, the active site of the paralogous Alr4380/HemE protein conforms to the consensus sequence of zinc-dependent enzymes [DxCxCx(Y/F)x3G(H/Q)CG] (31). Thus, the derepression of *all4725* under zinc limitation would probably lead to the replacement of a zinc-dependent porphobilinogen synthase (All4380) by a zinc-independent one (All4725), under conditions in which the former is most probably inactive. Replacement of zinc-dependent proteins by zinc-independent isoforms seems to be a common strategy in a variety of prokaryotes (5, 16, 21, 31, 50).

Less intuitive is the model for All4723/ThrS and All4721/FolE, both of which do conserve the deduced coordination residues for zinc. Adaptation to zinc limitation via the replacement of a zinc-dependent enzyme by another which is also zinc dependent does not appear to be an effective strategy, unless the alternative enzyme is somehow more efficient at the recruitment of zinc cations. Another possibility is that All4723/ThrS and All4721/FolE could be functional with a metal cofactor other than zinc. In any case, All4723/ThrS (and probably All4721/FolE) must somehow better fulfill the housekeeping function under zinc-limiting conditions and is essential for survival under these conditions (Napolitano et al., unpublished).

**Category 2: genes encoding putative metallochaperones.** *all4722* and *all1751* encode G3E P-loop GTPases of the COG0523 family. Like other members of the family, they show a GTPase motif in the N terminus, a conserved putative metal-binding CXXC motif, and a C-terminal domain with a His-rich stretch. However, All4722 contains 19 His residues, whereas All1751 contains only 2. *all1197* is also in this category although its product has a deletion in the N-terminal domain and a single histidine in the C-terminal domain. A recent exhaustive bioinformatic analysis classified members of the COG0523 family into 15 subfamilies (24). That study proposed that several of these subfamilies have a role in survival under conditions of deficient zinc nutrition and are frequently associated with Zur-binding sites in diverse bacteria (24). Consistent with this, *Bacillus subtilis* mutants defective in a protein of the COG0523 family exhibit a growth defect in low-zinc medium (19). Although the exact role of All4722 is still to be determined, it seems important for the survival of *Anabaena* under metal limitation (Napolitano et al., unpublished). Thus, our results further support a role for proteins of the COG0523 family in the adaptation to zinc limitation.

**Category 3: genes encoding components of plasma membrane ABC transport systems.** Several genes regulated by Zur encode subunits of ABC transport systems of the plasma membrane. In general, these transporters are constituted by a substrate-binding periplasmic protein, an intrinsic membrane component, and an ATPase subunit in the cytoplasmic site (28). *all0833*, *all0832*, and *all0830* in operon 6 were previously identified as the genes encoding the ZnuABC zinc uptake system of *Anabaena* based on sequence similarity (36). Two other genes, *alr3243* in operon 4 and *alr4031* in operon 5, encode the periplasmic protein of ABC transporters. In both cases, neighboring genes not regulated by Zur (*alr3240* and *alr3241* in operon 4 and *alr4032* and *alr4033* in operon 5) encode the membrane-intrinsic and the ATPase subunits, suggesting that each cluster may encode an individual ABC transport system (Table 2). The substrate specificity of these transport systems will need to be determined by specific approaches.

**Category 4: genes encoding proteins of the outer membrane.** TonB-dependent receptors (TBDRs) are integral proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria which function as energy-dependent importers of extracellular molecules (44). Transport by TBDRs of iron complexes (siderophores, heme, and ferritin) and vitamin B<sub>12</sub> (cobalamin) is well characterized (44). However, the involvement of the TBDR in the import of divalent metals other than iron was not reported until very recently (29, 51, 58). Twenty-two genes in the *Anabaena* genome encode putative TBDRs (43), suggesting that some of them may be involved in the transport of molecules other than iron complexes or vitamin B<sub>12</sub>.

Genes encoding TBDRs have not been found in previous analyses of Zur regulons in Gram-negative bacteria (34, 46). Two genes, *alr3242* and *alr4028-4029* (the latter is a single ORF mistakenly annotated as two independent genes [43]), encoding putative TBDRs regulated by Zur in *Anabaena* are described here. *alr3242* is highly induced (~100-fold) and reaches a high level of expression in the *zur* mutant, suggesting that Alr3242 is probably a TBDR specific for the import of zinc complexes from the outer medium, which hitherto has been described only for human pathogens (58). The *alr4028-4029* gene is also induced in the *zur* mutant but to a lower extent (~10-fold) (Table 2). Interestingly, the two genes encoding TBDRs cotranscribe with genes for periplasmic proteins of ABC transporters (Table 2), suggesting the necessity of a coordinated regulation of transporters of the outer membrane and the plasma membrane.

The protein encoded by the *all3515* gene is predicted by the PSORT.3b program (63) to be located in the outer membrane. This gene shows the highest induction level of the Zur regulon (more than 250 times) and reaches a very high level of expression in the *zur* mutant. All3515 contains a putative signal peptide in the N terminus, a PEP-CTERM domain in the C terminus, which is proposed to mediate secretion through the plasma membrane (25), and two conserved His-rich regions in the N-terminal part that may be involved in metal coordination. Although the exact role of the All3515 protein is unknown, its regulation by Zur, its peripheral localization in the cell, and its expected abundance suggest a role in scavenging zinc or zinc complexes under limiting conditions.

Other global analyses of the Zur regulon performed in Gram-positive and Gram-negative bacteria have unveiled a variety of genes directly or indirectly regulated by Zur (18, 20, 34, 42, 46, 52). Although our analysis of the Zur regulon of *Anabaena* would need to be completed with further studies, genes uncovered in our work outline how *Anabaena* rearranges its physiology to adapt to zinc limitation: transporters of the outer membrane and plasma membrane are induced for scavenging extracellular zinc or zinc complexes; putative metallochaperones, which may mediate the delivery of zinc or alternative metals to target proteins, are expressed in the cytoplasm; and some zinc-specific metalloproteins are replaced by paralogues able to fulfill essential functions during zinc limitation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Antonia Herrero for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants BFU2007-66589/BMC and BFU2010-19544 (Ministerio de Ciencia e Innovación & Fondo Social Europeo) and P07-CVI-03167 (Proyectos de Excelencia, Junta de Andalucía y FEDER).

## REFERENCES

- Ausubel FM, et al. 2010. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York, NY.
- Baichoo N, Helmann JD. 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* 184:5826–5832.
- Baichoo N, Wang T, Ye R, Helmann JD. 2002. Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol. Microbiol.* 45:1613–1629.
- Bensing BA, Meyer BJ, Dunny GM. 1996. Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:7794–7799.
- Blaby-Haas CE, Furman R, Rodionov DA, Artsimovitch I, de Crecy-Lagard V. 2011. Role of a Zn-independent DksA in Zn homeostasis and stringent response. *Mol. Microbiol.* 79:700–715.
- Blindauer CA, Razi MT, Parsons S, Sadler PJ. 2006. Metal complexes of *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN): variable coordination numbers and geometries. *Polyhedron* 25:513–520.
- Blindauer CA. 2008. Zinc-handling in cyanobacteria: an update. *Chem. Biodivers.* 5:1990–2013.
- Blindauer CA, et al. 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.* 45:1421–1432.
- Borrelly GP, Rondet SA, Tottey S, Robinson NJ. 2004. Chimeras of P-type ATPases and their transcriptional regulators: contributions of a cytosolic amino-terminal domain to metal specificity. *Mol. Microbiol.* 53:217–227.
- Brocklehurst KR, et al. 1999. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31:893–902.
- Capone DG, Zehr J, Paerl HW, Bergman B, Carpenter EJ. 1997. Trichodesmium, a globally significant marine cyanobacterium. *Science* 276:1221–1229.
- Cavet JS, Borrelly GP, Robinson NJ. 2003. Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:165–181.
- Coleman JE. 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 61:897–946.
- Elhai J, Wolk CP. 1988. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:747–754.
- Elhai J, Wolk CP. 1988. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 68:119–138.
- El Yacoubi B, et al. 2006. Discovery of a new prokaryotic type I GTP cyclohydrolase family. *J. Biol. Chem.* 281:37586–37593.
- Escobar L, Perez-Martin J, de Lorenzo V. 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181:6223–6229.
- Feng Y, et al. 2008. Functional definition and global regulation of Zur, a zinc uptake regulator in a *Streptococcus suis* serotype 2 strain causing streptococcal toxic shock syndrome. *J. Bacteriol.* 190:7567–7578.
- Gaballa A, Helmann JD. 1998. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180:5815–5821.
- Gaballa A, Wang T, Ye RW, Helmann JD. 2002. Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *J. Bacteriol.* 184:6508–6514.
- Gabriel SE, Helmann JD. 2009. Contributions of Zur-controlled ribosomal proteins to growth under zinc starvation conditions. *J. Bacteriol.* 191:6116–6122.
- Gabriel SE, Miyagi F, Gaballa A, Helmann JD. 2008. Regulation of the *Bacillus subtilis* *yciC* gene and insights into the DNA-binding specificity of the zinc-sensing metalloregulator Zur. *J. Bacteriol.* 190:3482–3488.
- Goericke R, Welshmeyer NA. 1993. The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep Sea Res.* 40:2283–2294.
- Haas CE, et al. 2009. A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics* 10:470.
- Haft DH, Paulsen IT, Ward N, Selengut JD. 2006. Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: the PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. *BMC Biol.* 4:29.
- Hantke K. 2005. Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:196–202.
- Hernández JA, López-Gomollón S, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML. 2004. Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol. Lett.* 236:275–282.
- Higgins CF. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Res. Microbiol.* 152:205–210.
- Hohle TH, Franck WL, Stacey G, O'Brian MR. 2011. Bacterial outer membrane channel for divalent metal ion acquisition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:15390–15395.
- Hudek L, et al. 2009. Bioinformatic and expression analyses of genes mediating zinc homeostasis in *Nostoc punctiforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:784–791.



31. Jaffe EK. 2003. An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chem. Biol.* 10:25–34.
32. Kloosterman TG, van der Kooi-Pol MM, Bijlsma JJ, Kuipers OP. 2007. The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn<sup>2+</sup> stress by activation of the Zn<sup>2+</sup>-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 65:1049–1063.
33. Lee JW, Helmann JD. 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* 20:485–499.
34. Li Y, et al. 2009. Characterization of Zur-dependent genes and direct Zur targets in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* 9:128.
35. Liu HB, Nolla HA, Campbell L. 1997. *Prochlorococcus* growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquatic Microb. Ecol.* 12:39–47.
36. Liu T, Golden JW, Giedroc DP. 2005. A zinc(II)/lead(II)/cadmium(II)-inducible operon from the cyanobacterium *Anabaena* is regulated by *AztR*, an alpha3N ArsR/SmtB metalloregulator. *Biochemistry* 44:8673–8683.
37. Llull D, et al. 2011. *Lactococcus lactis* Zitr is a zinc-responsive repressor active in the presence of low, nontoxic zinc concentrations in vivo. *J. Bacteriol.* 193:1919–1929.
38. López-Gomollón S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. 2009. New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem. J.* 418:201–207.
39. Lucarelli D, et al. 2007. Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 282:9914–9922.
40. Luque I, Contreras A, Zabulon G, Herrero A, Houmard J. 2002. Expression of the glutamyl-tRNA synthetase gene from the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7942 depends on nitrogen availability and the global regulator NtcA. *Mol. Microbiol.* 46:1157–1167.
41. Ma Z, Gabriel SE, Helmann JD. 2011. Sequential binding and sensing of Zn(II) by *Bacillus subtilis* Zur. *Nucleic Acids Res.* 39:9130–9138.
42. Maciag A, et al. 2007. Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J. Bacteriol.* 189:730–740.
43. Mirus O, Strauss S, Nicolaisen K, von Haeseler A, Schleiff E. 2009. TonB-dependent transporters and their occurrence in cyanobacteria. *BMC Biol.* 7:68.
44. Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK. 2010. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:43–60.
45. Outten CE, O'Halloran TV. 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292:2488–2492.
46. Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS. 2003. Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:9912–9917.
47. Partensky F, Hess WR, Vaulot D. 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:106–127.
48. Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:3–27.
49. Robinson NJ, et al. 1990. Prokaryotic metallothionein gene characterization and expression: chromosome crawling by ligation-mediated PCR. *Proc. Biol. Sci.* 242:241–247.
50. Sankaran B, et al. 2009. Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB. *J. Bacteriol.* 191:6936–6949.
51. Schauer K, Gouget B, Carriere M, Labigne A, de Reuse H. 2007. Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol. Microbiol.* 63:1054–1068.
52. Schroder J, Jochmann N, Rodionov DA, Tauch A. 2010. The Zur regulon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC Genomics* 11:12.
53. Segel IH. 1976. *Biochemical calculations*, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc, New York, NY.
54. Shafeeq S, Kloosterman TG, Kuipers OP. 2011. Transcriptional response of *Streptococcus pneumoniae* to Zn<sup>2+</sup> limitation and the repressor/activator function of AdcR. *Metallomics* 3:609–618.
55. Shin JH, et al. 2011. Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in Zur. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:5045–5050.
56. Sigdel TK, Easton JA, Crowder MW. 2006. Transcriptional response of *Escherichia coli* to TPEN. *J. Bacteriol.* 188:6709–6713.
57. Smith KS, Ferry JG. 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:335–366.
58. Stork M, et al. 2010. An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential. *PLoS Pathog.* 6:e1000969.
59. Tottey S, et al. 2012. Cyanobacterial metallochaperone inhibits deleterious side reactions of copper. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:95–100.
60. Vioque A. 1992. Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* 20:6331–6337.
61. Waldron KJ, Robinson NJ. 2009. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 7:25–35.
62. Whitton BA, Potts M. 2002. Introduction to the cyanobacteria, p 1–10. *In* Whitton BA, Potts M (ed), *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publisher, New York, NY.
63. Yu NY, et al. 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26:1608–1615.

