

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

59  
24j

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA

"CARACTERIZACION DE MUTANTES EN EL SITIO DE RECONOCIMIENTO  
DE LA ENDONUCLEASA EcoRI"

TESIS PROFESIONAL  
PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO  
PRESENTA:

HUMBERTO FLORES SOTO

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Ingeniería de proteínas.   | 1      |
| 1.1. Ingeniería de proteínas.   | 2      |
| 1.2. Criterios que se usan para modificar una proteína mediante técnicas genéticas. | 5      |
| 1.2.1. Modificación al azar buscando una propiedad definida.                        | 5      |
| 1.2.2. Modificación dirigida conociendo la estructura tridimensional.               | 7      |
| 1.2.3. Modificaciones dirigidas sin conocimiento de la estructura tridimensional.   | 9      |
| 1.2.4. Mutagénesis combinatoria.  | 10     |
| 2. Proteínas que interactúan con DNA.   | 11     |
| 2.1. Funciones de las proteínas que interactúan con DNA.                            | 11     |
| 2.2. Información que para su reconocimiento aporta el DNA.                          | 12     |
| 2.3. Temas estructurales de proteínas que interactúan con DNA.                      | 14     |
| 3. Enzimas de restricción.  | 21     |
| 3.1. Función <i>in vivo</i> .   | 21     |
| 3.2. Tipos de enzimas de restricción que existen.                                   | 22     |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 3.3. | Enzimas de restricción del tipo II y su uso en biología molecular.     | 22 |
| 4.   | El sistema de restricción-modificación EcoRI y su isozquisómero RsrI.  | 23 |
| 4.1. | Características de la EcoRI (endo y meti).                             | 23 |
| 4.2. | Modo de catálisis.   | 29 |
| 4.3. | Estructura cristalográfica.  | 29 |
| 4.4. | Características de RsrI (endo y meti).                                 | 38 |
| 4.5. | Mutaciones reportadas en la EcoRI.                                     | 40 |
| 5.   | La endonucleasa EcoRI como modelo en la ingeniería de proteínas.       | 41 |
| 5.1. | Características que la hacen buen modelo.                              | 41 |
| 6.   | Objetivos.   | 42 |
| 7.   | Antecedentes.  | 44 |
| 8.   | Material y métodos.  | 47 |
| 8.1. | Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .                 | 47 |
| 8.2. | Transformación de células <i>E coli</i> con plásmido.                  | 48 |
| 8.3. | Cotransformación de células <i>E coli</i> con plásmido.                | 48 |
| 8.4. | Transformación de células <i>E coli</i> con el fago M13 mp19.          | 49 |
| 8.5. | Purificación de plásmido por lisis alcalina.                           | 49 |
| 8.6. | Purificación de DNA cadena doble del fago M13 mp19 por lisis alcalina. | 51 |
| 8.7. | Digestiones de DNA.  | 51 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 8.8.  | Purificación de fragmentos de DNA de gel de agarosa.                           | 52 |
| 8.9.  | Purificación de fragmentos de DNA de gel de acrilamida.                        | 53 |
| 8.10. | Clonación.   | 54 |
| 8.11. | Secuencia de DNA por el método de Sanger.                                      | 54 |
| 8.12. | Preparación de extractos crudos para ensayo de actividad de la EcoRI.          | 57 |
| 8.13. | Purificación parcial de la endonucleasa.                                       | 58 |
| 8.14. | Determinación de la pureza de la enzima por el método de Laemmli.              | 59 |
| 8.15. | Verificación de que el genotipo determinado corresponde al fenotipo observado. | 60 |
| 8.16. | Actividad <i>in vitro</i> de la endonucleasa.                                  | 61 |
| 9.    | Resultados.  | 62 |
| 9.1.  | Caracterización genotípica de enzimas mutantes.                                | 62 |
| 9.2.  | Actividad <i>in vitro</i> detectada en extractos crudos.                       | 65 |
| 9.3.  | Purificación parcial de las enzimas.   | 68 |
| 10.   | Discusión.   | 72 |
| 11.   | Conclusiones.  | 85 |
| 12.   | Bibliografía.  | 86 |

# 1. INGENIERIA DE PROTEINAS.

## 1. 1. Ingeniería de proteínas.

La ingeniería de proteínas es la modificación estructural de las proteínas a través de la modificación del DNA que las codifica. Esta técnica se basa en la amplia capacidad que se tiene de manipular los genes. En la actualidad los trabajos que se realizan en este campo se enfocan principalmente en la modificación de proteínas ya existentes, aunque algo se ha hecho en el diseño de proteínas *de novo* (1,100).

La ingeniería de proteínas es un enfoque metodológico que se encamina a comprender las relaciones que se establecen entre la estructura primaria, el plegamiento final de una cadena polipeptídica y su función (3). Los conocimientos que se generen de estas investigaciones básicas nos permitirán diseñar estrategias de modificación más racionales, que den las propiedades buscadas en una proteína de manera complementaria a la estrategia que se usa en la actualidad de buscar una enzima con una propiedad deseada en la naturaleza (3).

El desarrollo de nuevas técnicas para poder conocer la estructura tridimensional de proteínas, la posibilidad de introducir los cambios deseados en forma específica y los conocimientos acumulados indican que este campo está en una fase de importante crecimiento (4).

Son varios los objetivos que se persiguen en este campo, tanto básicos como aplicados. Por un lado, es importante determinar qué reglas son las que guían que

una cadena polipeptídica alcance el estado estructural nativo. Además se deben entender qué interacciones se dan para que se obtenga una estructura con una función determinada; por otro lado, la aplicación biotecnológica de los conocimientos que se generen parecen tener amplias perspectivas (3).

Son varios los avances que han contribuido al desarrollo de la ingeniería de proteínas: podemos dividirlos en conceptuales y metodológicos. Entre los avances conceptuales podemos citar: 1) la idea de cómo la estructura tridimensional de una proteína se puede deducir de su estructura primaria ha cambiado; se ha observado que la conformación nativa de un polipéptido es determinada por muchas variables (5). 2) Otra idea es que hay familias de temas estructurales que se repiten en proteínas con diferentes funciones; es decir la evolución ha seleccionado los temas estructurales que son más útiles y los usa como base para construir proteínas con diferentes funciones (5). 3) Otro concepto es que una proteína tiene una gran capacidad para aceptar cambios directos, incluso permutaciones circulares sin por ello perder su estructura fundamental (2). En el plano metodológico podemos mencionar que se cuenta con métodos más eficientes para predecir la estructura de una proteína, así como técnicas más eficientes para hacer mutagénesis dirigida, clonación en vehículos de alta expresión, detección de actividad enzimática, etc. lo cual facilita la obtención de información (86).

La importancia del estudio sobre estructura y función en proteínas es alta, ya que tiene implicaciones biológicas en muchos procesos. Además, el entendimiento de la biología en términos moleculares requiere la comprensión de los papeles que juegan aminoácidos específicos en la estructura y función de una proteína. Las

reglas que se generen de las investigaciones básicas se pueden aplicar para modificar propiedades específicas de una proteína en su uso como producto o proceso (86).

Hay, hoy en día, muchos ejemplos en los que se han modificado proteínas con diversos métodos y fines. Mencionaré aquellos que constituyen ejemplos claros de lo que se busca hacer:

**Subtilisinas:** Son serín proteasas que tienen la función de hidrolizar los enlaces amídicos de polipéptidos. Su centro activo está formado por una triada (Asp, His y Ser). A esta familia de proteínas se le ha modificado para incrementar su termoestabilidad, perfil de pH, especificidad y capacidad de renaturalización (6,7,8,9).

**Triosa fosfato isomerasa:** Esta enzima de la glucólisis es muy eficiente en su actividad. Por medio de mutagénesis dirigida se ha podido estudiar el mecanismo de acción sobre el sustrato y refinar el concepto de cómo intervienen las cadenas laterales de los aminoácidos en la isomerización (3).

**Anticuerpos catalíticos:** Se han creado anticuerpos contra análogos de sustratos en el estado de transición, y así estos anticuerpos pueden funcionar como enzimas. La actividad catalítica es pobre y se ha podido aumentar la eficiencia de catálisis por medio de mutaciones dirigidas hacia los residuos de aminoácidos que contactan con el sustrato (10, 105).



**Lisozima del fago T4:** En esta enzima se pudo estudiar y aumentar la termoestabilidad modificando los residuos que se encuentran en los extremos de las  $\alpha$ -hélices. También se ha incrementado su estabilidad modificando los residuos de glicina por otro residuo de aminoácido o colocando prolina por otro aminoácido. Estas modificaciones afectan la energía de la proteína nativa, reflejándose en una mayor estabilidad de la proteína. Se han cambiado otros aminoácidos que estabilizan a la proteína a través de puentes de hidrógeno más fuertes. Por último se ha creado un puente disulfuro que permite apagar y prender la actividad de la enzima modificando el pH del medio de reacción (11,12,13,14).

**Prolactina humana:** Se modificaron los residuos de aminoácidos que contactan con el receptor de prolactina y se logró que adquiriera una alta afinidad por el receptor de la hormona del crecimiento (15).

**Tirosil-tRNA sintetasa:** Se ha modificado su estructura primaria para ver cuáles son los residuos de aminoácidos que determinan su catálisis y especificidad. Estos trabajos son muy elegantes y bien planificados (3).

**Proteasa  $\alpha$  lítica:** Esta es una serin proteasa extracelular estructuralmente homóloga a proteasas de mamíferos; cataliza la hidrólisis de enlaces amídicos. Esta enzima es específica para sustratos que tienen alanina en la primera posición. Se ha ampliado su especificidad modificando los residuos de aminoácidos que se encuentran cerca del sitio activo. Estos trabajos son muy completos ya que se estudian las estructuras tridimensionales de los mutantes y de la proteína nativa. Con esto se logró saber que la proteína tiene una plasticidad que le permite reconocer otros sustratos (87).

**L-lactato deshidrogenasa:** Se usó la homología que presenta con la malato deshidrogenasa en el sitio catalítico para modificar los residuos que podían dar el cambio de especificidad. Esto fue logrado cuando se cambió una glutamina por arginina. Esto demuestra cómo la especificidad se puede alterar modificando los residuos que se encuentran en el sitio catalítico (85).

**Glutation reductasa:** Esta enzima juega un importante papel en el mantenimiento del potencial redox de la célula y presenta un dominio estructural ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ ) común a otras proteínas que unen dinucleótidos. Por una serie de cambios se logró que uniera con una mayor afinidad  $\text{NAD}^+$ , a diferencia de la enzima nativa, que presenta afinidad por  $\text{NADP}^+$ . Estos cambios se eligieron usando criterios basados en modelamiento molecular de las estructuras tridimensionales que se tienen de varias enzimas homólogas (89).

## **1. 2. Criterios que se usan para modificar una proteína mediante técnicas genéticas.**

### **1.2.1. Modificación al azar buscando una propiedad definida.**

En el enfoque genético clásico esta técnica se utiliza mucho. Un agente mutagénico (químico o físico) que produce cambios en el DNA es utilizado. Esto da como resultado que todo el genoma del organismo se modifique (mute). Contando con un método de selección que nos muestre qué organismo de la población de mutantes porta el cambio deseado, se puede lograr el objetivo. Este método

presenta varias desventajas, tales como son, que el agente mutagénico no actúa por igual sobre todas las bases del DNA, (luz UV daña preferencialmente a las timinas juntas, agentes desaminantes a la citosina, etc.), dando como resultado que no se generen todas las variaciones posibles. Por otro lado está la desventaja de que el agente mutagénico daña por igual a todas las regiones susceptibles del DNA, lo que ocasiona que otros genes del organismo se dañen (3). En el procedimiento de mutagénesis regional, se logra tener el gen en forma de cadena sencilla en un plásmido de cadena doble, y así al usar un agente mutagénico que ataca sólo cadena sencilla se logra mutar únicamente el gen de interés (86).

Otra estrategia utiliza DNA polimerasa, que bajo ciertas condiciones de reacción puede incorporar nucleótidos de manera incorrecta. Se manejan diversas condiciones, una para cada tipo de error que se desee. Todos estos métodos aún presentan la desventaja de que no se logra muestrear una proporción significativa de los cambios en cada posición (86).

Los métodos químicos constituyen una opción cuando no se conoce la enzima que limita una vía metabólica, ya que daña muchos genes y así se puede lograr el objetivo buscado. También constituye una ventaja para mapear las zonas importantes en la función de una proteína, ya que se pueden seleccionar aquellas que no presenten actividad y así poder limitar estas zonas. En condiciones especiales se puede utilizar enzimas para alterar de manera general un gen.

### 1.2.2. Modificación dirigida conociendo la estructura tridimensional.

Esta técnica es más fina, ya que se puede intentar predecir cuáles cambios darán como resultado la propiedad deseada. El método depende de la síntesis de oligonucleótidos que son semicomplementarios a las regiones que se desean alterar y que portan los cambios deseados a nivel de DNA, lo cuál le confiere una alta especificidad de mutagénesis. Es necesario un oligonucleótido para mutar cada región de interés si se encuentran muy separadas. En la figura 1 se muestra este concepto utilizando la técnica de PCR.

El método más utilizado para introducir las mutaciones se basa en la capacidad que se tiene para sintetizar DNA *in vitro* eficientemente (86). Esto fue aprovechado por Sanger para secuenciar DNA y en esta metodología se basa la introducción de las mutaciones en el gen de interés. El oligonucleótido que porta los cambios funciona como primer para extender el gen a mutar. El oligonucleótido (15 a 20 pb en promedio) es complementario al gen a mutar y porta una región que no es complementaria (cambios deseados). El gen a mutar se debe clonar en un vector de cadena sencilla (fago M13), así con ayuda de una DNA polimerasa se complementa la cadena doble usando el oligonucleótido mutante como primer. El producto se trata con ligasa para que se pueda introducir en una bacteria, generándose así clonas que portan el gen mutante y otras el silvestre (3).

Para lograr introducir múltiples cambios que se encuentran separados, es necesario hacer varias mutagénesis o introducir todos los oligonucleótidos a usar en un solo experimento. En esta técnica la proporción de clonas que llevan todos los cambios

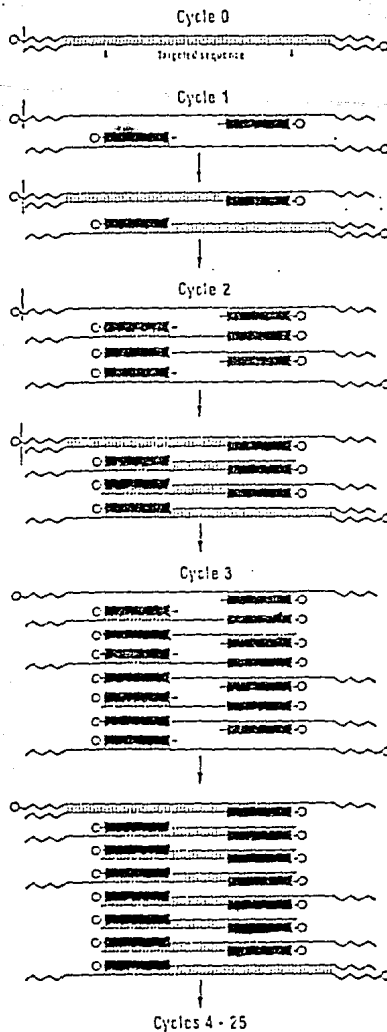


FIGURA 1. Técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) aplicada a la introducción de mutaciones puntuales. Los primeros portan los cambios deseados.

es en general muy reducida (3).

Se han creado muchas variantes de este método que permiten aumentar la eficiencia de la mutagénesis, como es el usar un segundo primer, usar como templado DNA que tiene incorporado uracilo (Kunkel 1985), o crear casetes de mutagénesis (Wells 1985), etc. Ejemplos de qué tan poderosa es la técnica (conociendo la estructura tridimensional) es la creación de enzimas con una especificidad nueva, proteasas más estables, ampliación de especificidad etc (14).

### **1.2.3. Modificaciones dirigidas sin conocimiento de la estructura tridimensional.**

Cuando no se conoce la estructura tridimensional de una proteína a la cual se le desea modificar una característica y sólo se conoce su secuencia de aminoácidos la tarea es más difícil; como primer paso, se puede intentar predecir su estructura secundaria. Para predecir la estructura secundaria hay que usar varios métodos de predicción y a partir de los datos que se generen hacer un modelo que correlacione mejor con los datos experimentales. Se han desarrollado muchos métodos para conocer la estructura secundaria de un polipéptido, entre ellos podemos mencionar los de Beghin, Fasman, Garnier que toman en cuenta las frecuencias con las cuales aparece un aminoácido en una estructura secundaria en proteínas de estructura tridimensional conocida. Otros métodos han tomado más variables, pero no han logrado un avance considerable. Los fisicoquímicos han abordado el problema por el lado teórico, calculan la energía libre de Gibbs de la

molécula, esto es tardado y problemático (16, 17, 18, 5).

Otros métodos tratan de predecir cuáles regiones de la proteína se encuentran expuestas al solvente; esto es de gran importancia para cuando se quieren modificar algunas características como son pH óptimo (17).

Cuando se logra obtener una estructura secundaria que correlacione con los datos experimentales (por ejem. dicroísmo circular), se modifican aquellas posiciones que se encuentren en elementos estructurales que se ha observado alteran la propiedad a modificar (16).

Otra estrategia consiste en usar mutagénesis generalizada (química o enzimática) para mapear las zonas importantes para la actividad que se desee alterar. Después esta zona se puede mutar a saturación de manera dirigida, para observar cuál cambio es el más adecuado para lograr la actividad deseada (3). También se puede usar criterios de homología, para esto se compara con otras proteínas homólogas cuyas estructuras tridimensionales se conozcan. Con estos datos se puede elegir las zonas a mutar.

#### **1.2.4. Mutagénesis combinatoria.**

Se propone que generalmente cuando se quiere modificar una propiedad de una proteína puede ser necesario alterar varios residuos de aminoácidos que se encuentran cercanos en la estructura tridimensional, pero lejanos en la estructura primaria. Si los residuos a modificar no están muy alejados en la secuencia primaria se puede usar un solo oligonucleótido para lograr los cambios deseados

(3): Pero si están muy alejados en la estructura primaria, es necesario diseñar un oligonucleótido para cada cambio. Se puede hacer una sola mutagénesis usando los oligos necesarios, pero la proporción de mutantes que portan todos los cambios necesarios es muy baja, sin embargo, se puede aumentar la eficiencia realizando una mutagénesis para cada posición. Esto es lo que se hace cuando sólo se desea introducir un residuo de aminoácido en cada posición; pero existe un problema cuando se quiere probar el efecto de los 19 restantes aminoácidos en esa posición. Tal problema consiste en que para obtener todas las combinaciones posibles es necesario buscar en una gran población, siendo muy pequeña la aparición de mutantes sencillas. Por ello, la creación de una metodología que permita la obtención de mutaciones en varias posiciones de manera combinatoria en una población manejable, es muy necesaria. En el laboratorio se ha diseñado una técnica que permite obtener la combinación de varios residuos a mutar. En parte, esta tesis busca estimar la eficiencia de esta metodología.

## **2. PROTEINAS QUE INTERACTUAN CON DNA**

### **2.1. Funciones de las proteínas que interactúan con DNA.**

Las funciones que realizan las proteínas que interactúan con DNA son muy diversas y de gran importancia para el funcionamiento de la célula: llevan a cabo la replicación, transcripción, modificación y reparación del DNA, intervienen en la regulación de la expresión génica; fenómeno que le permite a la célula responder a



los cambios de su medio ambiente; así como en su diferenciación cuando forma parte de un organismo multicelular (88).

## **2.2. Información que para su reconocimiento aporta el DNA.**

La información que aporta el DNA a las proteínas que interactúan con él puede ser de varios tipos: La carga negativa neta de la molécula permite que las proteínas básicas se unan al DNA; estas interacciones son del tipo inespecíficas y un ejemplo son las histonas, pero aún en ellas se observa una preferencia por ciertas secuencias (27). Cuando las proteínas que interactúan con DNA tienen una función más específica, la información que aporta el DNA se basa en la presencia de las bases y la conformación que tiene el DNA. Un mecanismo por el cual las proteínas pueden reconocer la secuencia fue propuesto por Rich y colaboradores. Ellos propusieron que la formación de interacciones directas entre los grupos de las bases del surco mayor del DNA y las cadenas laterales de los aminoácidos que se encuentran cerca, pueden ser el fundamento de la especificidad (25).

Para la regulación de transcripción se ha postulado que en algunos casos, el DNA puede adoptar estructuras que se apartan de la conformación B y que es importante en el proceso de reconocimiento. Se propone que el DNA toma estructuras como hélice hacia la izquierda, heteromorfa, anisomorfa, asas y cruciforme. Se ha demostrado *in vitro* que un promotor modificado para que adquiriera una estructura cruciforme cuando se encuentra superenrollado no fuese transcrito, pero *in vivo* se transcribía el gen bajo este promotor en una cepa

deficiente en la enzima girasa (está enzima induce el superenrollamiento) (19). También se ha demostrado que el DNA puede presentar una curvatura que es dependiente de la secuencia, su presencia se detecta cuando se ve que el DNA que porta la secuencia migra de manera anómala en un gel nativo (21, 22, 24). Un ejemplo de cómo afecta la estructura del DNA la interacción con una proteína, lo podemos ver cuando se cambia una base de la región operadora a la cual se une el represor del fago 434 que no interactúa directamente con la proteína, pero que baja la afinidad del represor hacia esta secuencia (20). Toda esta evidencia demuestra que la estructura del DNA juega un papel importante en el proceso de interacción específica DNA-proteína.

El reconocimiento directo involucra la formación de puentes de hidrógeno entre las bases y las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, además la interacción se fortalece por contactos con los grupos fosfatos del esqueleto del DNA. La especificidad estaría dada por la compatibilidad con las cadenas laterales de los aminoácidos para formar un patrón de puentes de hidrógeno (25).

Hay muchos ejemplos donde se observa que la formación de los puentes de hidrógeno es determinante de la especificidad, de tal forma que al alterar el patrón de puentes de hidrógeno se observa que la proteína pierde afinidad hacia su región de reconocimiento. Con los represores de los fagos p22 y 434 se observa que cuando se intercambian sus dominios que interactúan con el DNA, los represores híbridos reconocen la secuencia que está determinada por los dominios, aunque no con la alta afinidad de la proteína nativa (24). Un caso especial de reconocimiento indirecto lo constituye el represor de Trp (se habla de redes de reconocimiento), su

estructura tridimensional en complejo con su operador mostró que los contactos directos con las bases son pocos y que no correlacionan con las bases cuyas modificaciones afectan la unión del represor. Sin embargo se observan múltiples contactos con los grupos fosfatos del operador, se propone que estas interacciones son las que determinan la especificidad (26). En recientes reportes se ha cuestionado esta estructura, ya que parece ser que la secuencia del operador que se usó en el estudio, no es la canónica, así estas interacciones observadas son las que se establecen de manera inespecífica (26).

### **2.3. Temas estructurales de proteínas que interactúan con DNA.**

Estos temas estructurales se observan en proteínas cuya unión al DNA es específica y dependiente de la secuencia. Una proteína que reconoce DNA tiene una complementaridad estructural con su secuencia blanco. Esto da como resultado que se formen interacciones específicas entre la proteína y el DNA. El concepto de tema estructural se genera de observar dominios que contactan DNA en diversas proteínas y que tienen características estructurales parecidas.

**HELICE VUELTA HELICE (HVH):** Este tema estructural se observó primero en el represor Cro del fago lambda, posteriormente se ha observado en otros represores y en base a homología de secuencia, hay indicios de su existencia en proteínas regulatorias de procariotes (28).

El tema estructural consta de dos  $\alpha$ -hélices conectadas por una pequeña vuelta  $\beta$  (generalmente 4 residuos). Las  $\alpha$ -hélices poseen regiones que se conservan en los temas estructurales, como son las cargas netas (hay varias regiones con residuos de aminoácidos hidrofóbicos) y en algunos casos residuos altamente conservados, que son importantes para la formación y estabilidad de la  $\alpha$ -hélice. Estos últimos forman puentes de hidrógeno con los oxígenos de los grupos fosfatos, así como contactos entre las hélices. Se postula que su función es ayudar a las  $\alpha$ -hélices a posicionarse en el DNA para que se formen los contactos específicos (Figura 2).

El patrón que se ha observado para que se den las interacciones consiste en que una  $\alpha$ -hélice contacte con el esqueleto del DNA ( $\alpha$ -Hélice amino-terminal) y que la segunda (COOH-terminal) se introduzca en el surco mayor, lo que permite que se formen los contactos específicos (28,29). Así la segunda  $\alpha$ -Hélice es la que determina la especificidad.

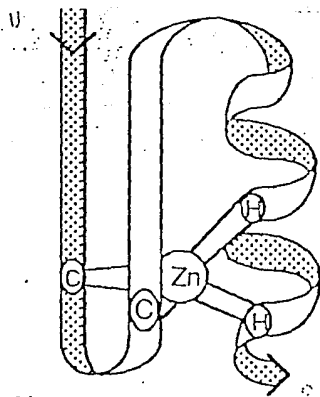
La estructura tridimensional de un homeodominio, en complejo con su secuencia blanco mostró que ésta proteína presenta este tema estructural, pero las hélices de reconocimiento son mayores y además la forma de interacción es diferente (106).

**DEDOS DE ZINC:** Se observó por primera vez en el factor de transcripción TFIIIA que regula la expresión de los genes rRNA 5S. La actividad de la proteína es dependiente de la presencia de zinc. Por analogía con otras proteínas que también contienen zinc y cuyas estructuras tridimensionales se conocen, se estableció que el zinc forma enlaces de coordinación con dos residuos de Cisteína y dos residuos de Histidina (34, 90). Por ello esta estructura fué definida como dedo de zinc. El

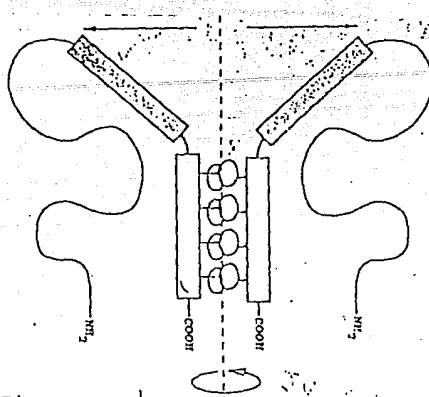
análisis del gen reveló que existían 9 regiones repetidas de 30 aminoácidos y se ha postulado que cada región forma un dedo de zinc. El análisis por Resonancia Magnética Nuclear (MNR) de un dominio del factor TFIIIA (un oligopéptido sintético de 25 aminoácidos) reveló que la estructura es globular y que consta de una horquilla formada por dos láminas-  $\beta$  y una hélice  $3_{10}$ . Cada  $\beta$ -plegada contiene una Cisteína y la  $\alpha$ -hélice dos Histidinas que forman los contactos de coordinación tetrahédrica con el zinc (28,31).

El análisis de las secuencias de la base de datos ha revelado que existen muchas proteínas que pueden contener dedos de zinc. Las proteínas que los presentan se ubican en levaduras, mamíferos y plantas; a muchas se les señala como elementos activadores de transcripción (Figura 2) (32, 33, 91).

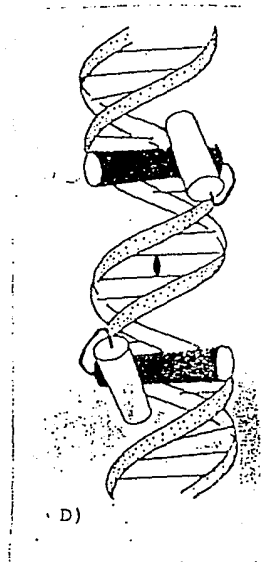
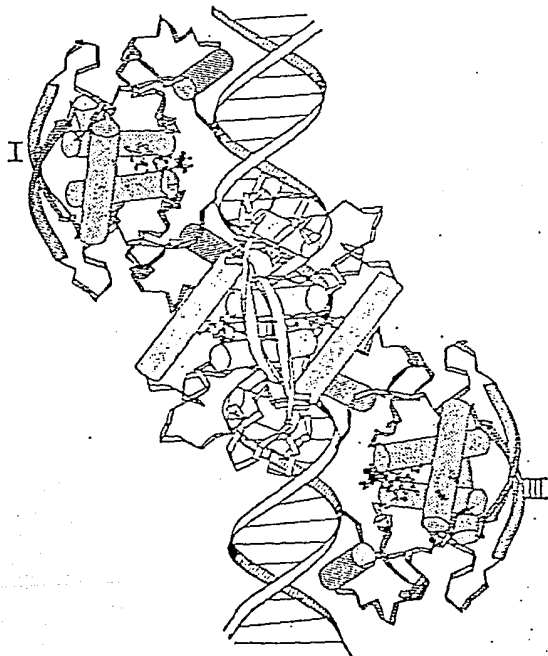
El papel del zinc puede ser estructural, ya que en experimentos donde se intercambian los dedos de zinc de proteínas diferentes, las proteínas híbridas resultantes reconocen la secuencia original y éstas no se ven afectadas por el dedo de zinc introducido. El dedo de zinc se une de manera inespecífica al DNA, pero su unión es dependiente del zinc (28,32). Lo anterior confirma que el papel del zinc es el de dar una estructura al dominio que interactúa con el DNA. Se ha observado que existen proteínas que presentan dedos de zinc donde sólo son Cisteínas las que interactúan con el zinc, estas proteínas presentan una menor cantidad de dedos de zinc (32).



A)



B)



D)

FIGURA 2. Motivos estructurales de proteínas que contactan con DNA. A) Dedo de zinc. B) Cierre de leucina. C) Lámina beta. D) Hélice vuelta hélice.

**CIERRE DE LEUCINA:** Esta estructura fue propuesta por Landschulz para C/EBP (proteína que se une a un potenciador), una proteína dimérica que se une al núcleo de un potenciador de la transcripción y al sitio **CCAAT** del promotor (34). Al parecer existen dos subfamilias de proteínas que presentan esta estructura. Una subfamilia presenta en el amino terminal un dominio básico y en el carboxilo terminal leucinas. Se propone que la otra subfamilia presenta un dominio básico y dos hélices conectadas por una asa en el extremo carboxilo terminal. En cuanto a la primera subfamilia, se ha observado que actúa como dímero (cFos, cJun, etc.), donde las regiones con leucina presentan una separación de 7 aminoácidos entre cada leucina. Se postula que éstas confieren a la región una estructura de  $\alpha$ -hélice anfipática, donde las leucinas presentes se exponen para poder contactar con la otra subunidad (37). Las  $\alpha$ -hélices son paralelas (28). Por homología de secuencia se observó que están presentes en muchas proteínas que actúan como elementos reguladores de la transcripción (32, 34, 35, 36, 38, 39). Un modelo más reciente propone que la parte amino básica forma  $\alpha$ -hélices y que éstas contactan con el surco mayor del DNA blanco. Así, la estructura del dímero es como una **Y**, donde los brazos son los dominios básicos y el tallo el cierre de leucina. El cierre de leucina actúa como elemento de ensamblaje para que se den los contactos de especificidad (en particular, esto se propone para la proteína C/EBA) (38). Para la otra subfamilia aún no se propone una estructura para su actividad. El cierre de leucina permite que las proteínas actúen como dímero (Figura 2).

**LAMINA BETA:** Este dominio estructural se ha observado en el represor Arc (lisis/lisogénia) del fago P22 de *Salmonella* y en el represor Met de *E. coli*. Para el represor de Met se ha postulado que la proteína interactúa con su DNA blanco por medio de dos láminas- $\beta$  antiparalelas. El represor Met actúa como homodímero y su unión al operador es cooperativa. En un cristal del complejo del represor Met con un oligonucleótido de 19 pb se vió que una lámina- $\beta$  de cada monómero se introduce al surco mayor del DNA (80,81).

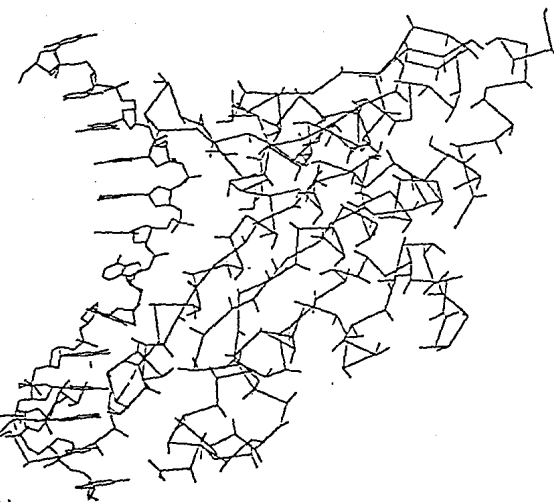
En el represor Arc se observó que el dominio que une al DNA se encuentra en la parte amino terminal. Los residuos 8-14 de cada monómero forman una lámina- $\beta$  antiparalela que se introduce al surco mayor (Figura 2) (82).

**MODO DE RECONOCIMIENTO DE LA EcoRI:** Este modelo se explicará más ampliamente en un apartado posterior. Consta de dos  $\alpha$ -hélices y dos segmentos estructurados por dímero; estos elementos se introducen en el surco mayor para formar contactos con las bases del sitio canónico (Figura 3) (99).

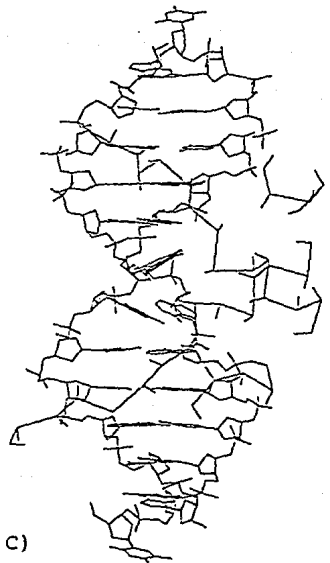




A)



B)



C)

FIGURA 3. Interacción de la endonucleasa **EcoRI** con el DNA. A) Dímero de la endonucleasa con su DNA canónico. B) Monómero de la endonucleasa. C) Elementos estructurales de la endonucleasa que interactúan directamente con el DNA.

### 3. ENZIMAS DE RESTRICCION

#### 3.1. Función *In vivo*

La primera observación de la existencia de las enzimas de restricción fue hecha por Luria en los años 50'. El observó que existía un comportamiento diferencial en la infección de un fago sobre diferentes cepas bacterianas: el fago crecía mejor en unas cepas, mientras que en otras no crecía mucho. Esto indicaba la existencia de un sistema de restricción en su entrada a la cepa. Además, los pocos fagos que lograban crecer en la cepa resistente eran capaces de infectar a la misma cepa con alta eficiencia. A este fenómeno lo llamó variación e implicaba un sistema que restringía la entrada o que modificaba al fago.

En los años 60' Werner Alber demostró que la modificación y la restricción se daba a nivel del DNA. Posteriormente Alber postuló la existencia de enzimas específicas que restringían la entrada y modificaban el DNA (40).

Es hasta 1968 cuando Linn y Alber lograron obtener un extracto celular que presentaba dicha actividad. De esta manera quedó demostrado que las bacterias poseen un sistema que restringe la entrada del DNA y que además modifica su DNA para reconocerlo y no degradarlo (41).

### **3.2. Tipos de enzimas de restricción que existen.**

En 1971 Boyer propuso la existencia de dos tipos de enzimas de restricción: I y II, de acuerdo a los cofactores que requieren, posteriormente a la clase I se le dividió en dos, dando origen a los 3 tipos que se conocen actualmente:

**Tipo I :** Tienen la actividad de restricción y modificación en la misma molécula, requieren ATP,  $Mg^{++}$  y S-adenosil metionina. Estas enzimas reconocen una secuencia pero el corte lo realizan al azar.

**Tipo II :** Tienen la actividad de restricción y modificación separadas en dos moléculas. Para la restricción sólo necesitan  $Mg^{++}$  y para la modificación S-adenosil metionina. Estas realizan un corte específico.

**Tipo III :** Estas enzimas son como las del tipo I, sólo que sí cortan en un sitio preciso (44).

### **3. 3. Enzimas de restricción del tipo II y su uso en biología molecular.**

Estas enzimas han sido encontradas en muchos procariones formando parte de sistemas de restricción y modificación (Roberts, 1982).

Las enzimas de restricción del tipo II realizan un corte específico y reconocen una secuencia de 4, 5, o 6 pares de bases que generalmente es palíndromica (Linn y Roberts, 1982). Smith y Wilcox en 1969 lograron aislar una enzima de este tipo

de la bacteria *Haemophilus influenza* (44).

La nomenclatura que se usa para nombrar a las enzimas de restricción fue propuesto por Nathans y Smith en 1973. Para nombrar una enzima se pone la primera letra del género de la bacteria, luego se ponen las dos primeras letras de la especie (cuando se trata de una cepa se menciona); y por último se pone un número que indica qué posición ocupa cuando se han logrado purificar más enzimas de restricción de la misma bacteria. Cuando se encuentran enzimas de diferentes bacterias pero que reconocen la misma secuencia se les llaman isozquisómeros.

Su importancia para la biología molecular es muy grande ya que su descubrimiento abrió la posibilidad de manipular el DNA de manera eficiente.

#### 4. EL SISTEMA DE RESTRICCIÓN-MODIFICACIÓN EcoRI Y SU ISOZQUISÓMERO RsrI.

##### 4.1. Características de la EcoRI (endo y meti).

La enzima de restricción **EcoRI (R-EcoRI)** es la endonucleasa que ha sido más caracterizada bioquímicamente, genéticamente y molecularmente. En solución la endonucleasa tiende a formar agregados (homodímeros y homotetrámeros) con una constante de equilibrio entre estos dos estados de  $1 \times 10^{-7}M$  (47). Por filtración en gel del complejo con DNA se observó que la forma activa es el homodímero, siendo estable y activo a una concentración de  $1 \times 10^{-10}M$ . Se ha logrado purificarla con un

alto grado de pureza (58, 94). La endonucleasa en ausencia de la metilasa es deletérea para la célula (54). La secuencia que reconoce es: 5'-GAATTC-3' que es palindrómica. En presencia de  $Mg^{++}$  y DNA no modificado, cataliza el corte del enlace fosfodiéster entre la guanina y la adenina, generando extremos cohesivos (47). En ausencia de magnesio no se da el corte, pero la enzima es capaz de unirse a la secuencia blanco con una alta afinidad. El peso molecular de la endonucleasa calculado de su secuencia nucleotídica es de 31,065 Da y la proteína madura consta de 277 aminoácidos (42). El punto isoeléctrico de la enzima en condiciones nativas es de  $5.8 \pm 0.05$  y en condiciones desnaturizantes de  $7.1 \pm 0.05$  (57).

La endonucleasa se mueve a lo largo del DNA por difusión facilitada. En condiciones óptimas el dímero recorre unas 1300 pares de bases, de no existir en esta región un sitio de restricción la endonucleasa se disocia del DNA (46). Las condiciones óptimas *in vitro* para la catálisis son las siguientes: 5-7 mM de magnesio, 100 mM de NaCl, pH de 7.5 y una temperatura de 37°C. Cuando se alteran estos parámetros la especificidad y actividad de la enzima se modifican. A una temperatura de 0°C el producto mayoritario de la reacción es DNA con sólo una hebra cortada (93). Variando la fuerza iónica (25 mM de Tris-HCl, 2mM MgCl) y el pH (8.5) se observa una actividad que se llama estrella; en estas condiciones la especificidad se altera, la endonucleasa puede reconocer solo 4 pb (NAATTN) (48). Los productos que se generan en estas condiciones se pueden ligar entre ellos.

La actividad de la endonucleasa se ve influida por las regiones que rodean al sitio de reconocimiento; se ha visto que con DNA de ColEI (plásmido multicopia de *E. coli*) el corte de ambas hebras se realiza en un solo evento de unión. En el DNA del virus SV40 se observa que un 75% de las veces el doble corte se realiza en un solo evento de unión. No se conoce cuál es la razón para que se de este comportamiento (93).

Se ha observado que el paso limitante de la catálisis es el corte de la segunda hebra (47).

Usando oligonucleótidos con variaciones en la secuencia blanco, ya sea cambios de una sola base o un par de bases, se observó que los substratos que varían en una base son más fácilmente cortados que los que varían en un par de bases. Además la afinidad es mayor para los que varían en una sola base; esto es indicativo de la alta especificidad de la endonucleasa. Se propone que el substrato ayuda a guiar el cambio conformacional de la endonucleasa para que se de la catálisis. Se ha estudiado la importancia que tiene cada base en el proceso de reconocimiento; así se observó que la adenina externa y la timina externa son las bases que cuando se modifican alteran más la afinidad de la endonucleasa hacia el sitio canónico. En experimentos donde se ha modificado sólo una base del sitio canónico se ha observado que el corte se realiza primero en la hebra que no está modificada y luego en la hebra que presenta la modificación (50, 52). Por tratamiento del DNA con luz UV en ausencia y presencia de la endonucleasa se observó que existe una zona que se protege y otra que aumenta su fotoreactividad. Así el surco mayor es protegido, mientras que el surco menor aumentaba su

fotoreactividad. Las purinas y pirimidinas del sitio canónico son protegidas de la luz UV. Por experimentos de interferencia por etilación se demostró que la endonucleasa hace contactos con los siguientes grupos fosfatos: el de la base anterior al sitio de reconocimiento, el de la primera base del sitio y el de la timina central (55).

La metilasa ha sido menos caracterizada, su peso molecular deducido de su secuencia nucleotídica es de 38,000 Da y consta de 325 residuos de aminoácido. Su presencia es necesaria para que la célula pueda portar el gen de la endonucleasa (42). Esta actúa como monómero y metila el grupo exocíclico amino N<sup>6</sup> de la adenina central. La metilación de una sola hebra es suficiente para proteger al DNA de la acción de la endonucleasa. Para su actividad sólo necesita S-adenosil metionina como donador de grupos metilo y un substrato con el sitio canónico. El pI de la metilasa es 8.7. Se ha observado que tiene un grupo tiol que es necesario para la actividad (54). El mecanismo de acción no se conoce bien, sin embargo, usando análogos del donador de grupos metilo se ha propuesto que el sitio de unión de la S-adenosil metionina se encuentra entre los residuos de aminoácidos 206-221. Al parecer, la transferencia del grupo metil es directo al DNA (60). Su cinética es del tipo de Michaelis-Menten. Su número de recambio es lento, de 3 grupos metilo por minuto a 37°C. En cada evento de unión sólo transfiere un grupo metil y no tiene mayor afinidad sobre DNA hemimetilado que sobre no metilado, su actividad es dependiente de DNA de doble cadena (49). El sistema de restricción-modificación se halla en el mismo operón, encontrándose primero la endonucleasa y luego la metilasa, con 29 pb entre los dos genes.

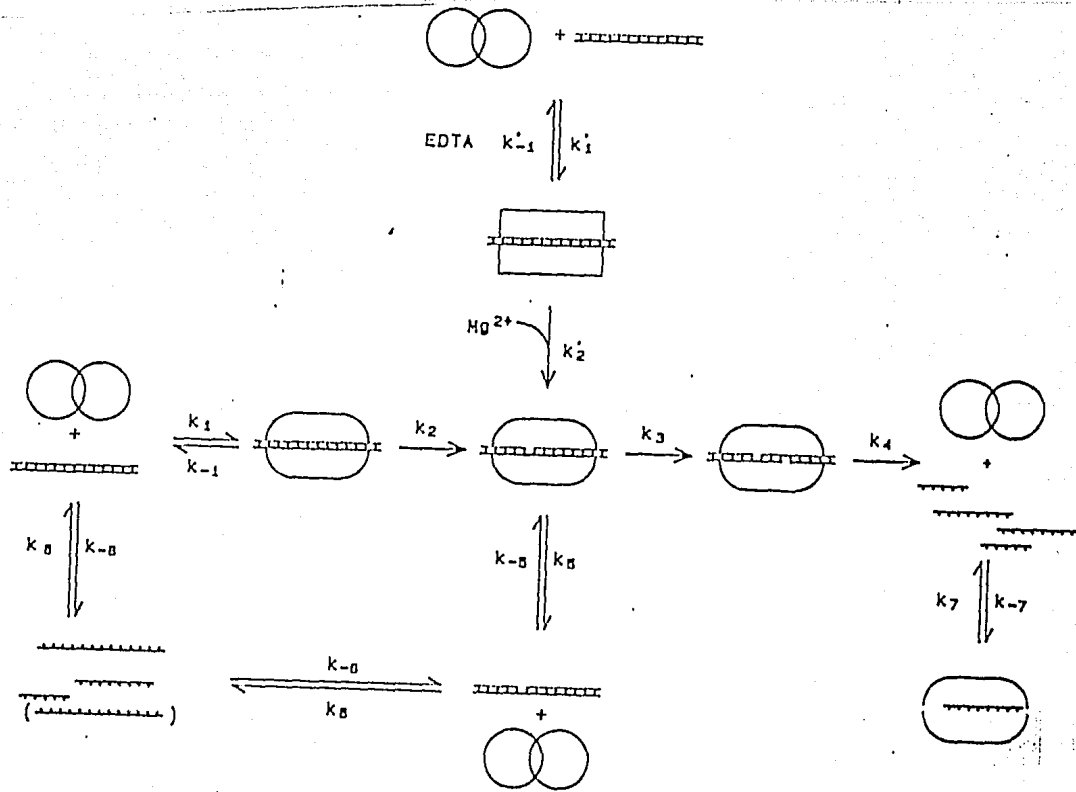


FIGURA 4. Modelo cinético de la interacción de la endonucleasa con un oligonucleótido que porta el sitio canónico. La enzima se representa como dos círculos. Cuando existe magnesio la enzima se une al DNA, pero no sufre un cambio estructural adecuado. El DNA se representa como una doble hebra.



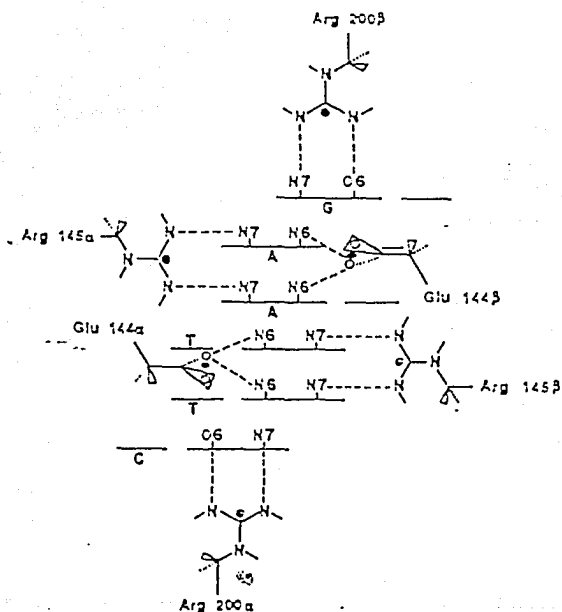
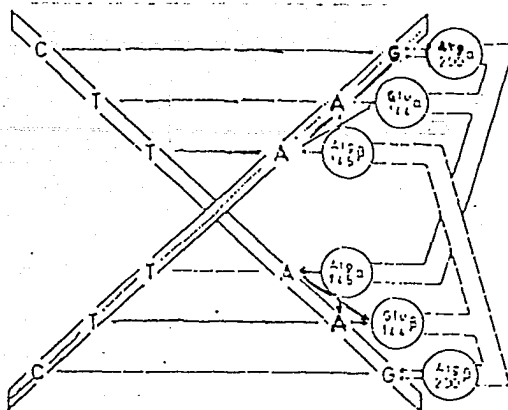


FIGURA 5. Contactos directos entre los residuos de la endonucleasa y las bases del sitio canónico. Estos contactos se proponen en el primer modelo y en la estructura nueva no se han descartado.

#### 4.2. Modo de catálisis.

En la figura 4 se muestra un modelo cinético de cómo interacciona la endonucleasa con un oligonucleótido que presenta el sitio de reconocimiento. En el esquema se observa que la endonucleasa libre presenta una estructura diferente a cuando se encuentra en complejo con el DNA. Es interesante observar que la enzima realiza primero un corte y luego el de la segunda hebra. El paso limitante de la reacción es el corte de la segunda hebra. En el modelo no se muestra la interacción inespecífica que se da con el DNA sin el sitio de reconocimiento. Cuando se da este tipo de interacción la enzima se libera sin realizar la hidrólisis del enlace fosfodiéster (61, 43). La reacción de catálisis se da con inversión de la configuración en el fosfato reactivo. No se observa una unión covalente de un intermediario de la reacción.

#### 4.3. Estructura cristalográfica.

La endonucleasa **EcoRI** es una proteína del tipo  $\alpha/\beta$ . La estructura que reportaron McClarin y colaboradores en 1986 (62) a una resolución de 3 Å mostró que existían 3 residuos de aminoácidos por subunidad que hacían contacto directo

con las bases de sitio canónico. En la figura 5 se muestra que la Arginina 200 forma puentes de hidrógeno con el nitrógeno 7 y el oxígeno 6 de la guanina. La Arginina 145 forma dos puentes de hidrógeno con los nitrógenos 7 de las dos adeninas y por último Glutámico 144 forma dos puentes de hidrógeno con los nitrógenos 6 de las adeninas (62). En su momento se pensó que estos contactos eran los que determinaban la especificidad de la endonucleasa **EcoRI**, ya que la evidencia bioquímica proponía la existencia de 12 puentes de hidrógeno que determinaban la especificidad hacia el sitio canónico (107). Adicionalmente, existía evidencia de mutantes de la endonucleasa en estos aminoácidos que perdían actividad (Ver tabla 1).

Estos datos llevaron a nuestro laboratorio a diseñar la estrategia de mutar en forma combinatoria estas tres posiciones (ver antecedentes para el diseño de la estrategia de mutagénesis).

Reportes posteriores de mutantes en estas posiciones y nuestros propios resultados, demostraron que estos residuos son importantes en la actividad, pero que la alteración de los mismos no modifica la especificidad. El reporte de una nueva estructura del complejo de la endonucleasa con un oligonucleótido de 15 pares de bases de longitud (5'-TCGTGGAATTCACG-3') a una resolución de 2.8 Å, demostró que la primera estructura reportada mostraba errores (99). Los residuos que contactaban en el primer modelo se conservan, pero existen contactos adicionales que pueden ser importantes en la especificidad hacia el sitio canónico.

Tabla 1  
Mutantes reportados de la endonucleasa EcoRI

| MUTACION                | METODO DE GENERACION         | ACTIVIDAD | ENSAYO                            | OTRAS CARACTERISTICAS   |
|-------------------------|------------------------------|-----------|-----------------------------------|---|
| Thr <sub>111</sub> -Ile | Química con nitrosoguanidina | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | Termosensible, a 30°C es letal para la célula y va perdiendo actividad al aumentar la temperatura. (65)   |
| Leu <sub>111</sub> -Phe | Igual al anterior            | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | Termosensible, a 30°C es un poco activa. (65)   |
| Arg <sub>111</sub> -Gln | Igual                        | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | Termosensible, a 30°C es letal y a 42°C es inactiva. (65)   |
| Met <sub>111</sub> -Ile | Igual                        | Inactiva  | <u>in vivo</u>                    | Termosensible, se observa una actividad baja a 30°C.  |
| Arg <sub>110</sub> -Leu | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | Se uso el fago H13 como vector y da placas turbias. (66)  |
| Arg <sub>110</sub> -Trp | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | El ensayo es igual al anterior. (66)  |
| Arg <sub>110</sub> -Ser | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | El ensayo es igual al anterior. (66)  |
| Arg <sub>110</sub> -Met | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | El ensayo es igual al anterior. (66)  |
| Glu <sub>111</sub> -Asp | Dirigida                     | Letal     | <u>in vivo</u>                    | La mutacion se genero por el método de Kunkel. (67)   |
| Glu <sub>111</sub> -Cys | Dirigida                     | Letal     | <u>in vivo</u>                    |   |
| Glu <sub>111</sub> -Ser | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | Induce una fuerte respuesta SOS. (67)   |
| Glu <sub>111</sub> -Gly | Dirigida                     | Débil     | <u>in vivo</u>                    | Se observa una respuesta débil de SOS. (67)   |
| Arg <sub>111</sub> -Lys | Dirigida                     | Débil     | <u>in vivo</u>                    | Se observa una débil respuesta SOS. (67)  |
| Arg <sub>111</sub> -Cys | Dirigida                     | Débil     | <u>in vivo</u>                    | Se observa una respuesta baja de SOS. (67)  |
| Arg <sub>110</sub> -Lys | Dirigida                     | Letal     | <u>in vivo</u>                    | Se observa una actividad alta de SOS. (67)  |
| Arg <sub>110</sub> -Cys | Dirigida                     | Fuerte    | <u>in vivo</u>                    | Induce una fuerte respuesta SOS. (67)   |
| Arg <sub>110</sub> -Val | Dirigida                     | Mediana   | <u>in vivo</u>                    | Induce una respuesta SOS moderada. (67)   |
| Arg <sub>110</sub> -Ser | Dirigida                     | Débil     | <u>in vivo</u>                    | Induce una respuesta SOS débil. (67)  |
| Glu <sub>111</sub> -Gln | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Actividad reducida en dos ordenes de magnitud, Km aumentada (68)  |
| Glu <sub>111</sub> -Gln | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | No se afecta la dimerizacion, Actividad reducida en dos ordenes de magnitud y Km aumentada. (68)  |
| Arg <sub>111</sub> -Lys | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Dímero, actividad reducida dos ordenes de magnitud y con la misma especificidad. (68)   |
| Arg <sub>110</sub> -Lys | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Es termosensible, su actividad es sensible a la metilacion del sitio canónico, en ausencia de la metilasa es letal para la célula y su actividad se reduce 200 veces <u>in vitro</u> pero su actividad estrella se ve aumentada 15 veces. (69)                |
| Arg <sub>110</sub> -Cys | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Actividad sensible a la metilasa, es termosensible siendo más activa a 30°C. Su actividad <u>in vitro</u> se ve reducida 300 veces y no se ve aumentada su actividad estrella. (69)   |
| Arg <sub>110</sub> -Val | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | Termosensible, siendo letal a 30°C, sensible a la metilasa. (69)  |
| Arg <sub>110</sub> -Ser | Dirigida                     | Pobre     | <u>in vivo</u>                    | No se detecta actividad en inducción y en ausencia de la metilasa. (69)   |
| Arg <sub>110</sub> -Pro | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Esta mutante muestra actividad en presencia de la metilasa pero, está actividad no es porque corte otro sitio, si no por otro efecto. Es letal a 37°C en inducción en ausencia de la metilasa. Es letal en inducción a 37°C en presencia de la metilasa. (69) |
| Arg <sub>110</sub> -Trp | Dirigida                     | Reducida  | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | No es letal en inducción, pero presenta actividad en presencia de la metilasa. Esta actividad no es por que corte otro sitio. (69)  |
| Arg <sub>110</sub> -X   | Dirigida                     | Nula      | <u>in vivo</u>                    | Los mutantes con otro cambio en la posición 200 aparte de los ya descritos presentan una actividad nula. (69)   |
| Leu <sub>111</sub> -Phe | Química con Hidróxilamina    | Reducida  | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Actividad letal en inducción, sensible a la metilasa, forma dímeros. (70)   |
| Arg <sub>111</sub> -Gln | Química con hidróxilamina    | Reducida  | <u>in vivo</u>                    | Letal en inducción. (70)  |

|                         |                           |          |                 |   |
|-------------------------|---------------------------|----------|-----------------|---|
| Gly <sup>111</sup> -Glu | Química con hidroxilamina | Reducida | <u>in vivo</u>  | Letal en inducción sin la metilasa. Fenotipo nulo en represión. (70)  |
| Glu <sup>111</sup> -Lys | Química con hidroxilamina | Reducida | <u>in vivo</u>  | Letal en inducción, sensible a la metilasa. (70)  |
| Gly <sup>111</sup> -Glu | Química con hidroxilamina | Reducida | <u>in vivo</u>  | Letal en inducción. (70)  |
| Ala <sup>111</sup> -Val | Química con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción. (70)   |
| Ala <sup>111</sup> -Thr | Química con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | No letal, dímero. (70)  |
| Gly <sup>111</sup> -Ser | Químico con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción, dímero. (70)   |
| Ala <sup>111</sup> -Thr | Química con hidroxilamina | Reducida | <u>in vivo</u>  | Letal en inducción. (70)  |
| Glu <sup>111</sup> -Lys | Química con hidroxilamina | Reducida | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción, monómero. (70)   |
| Glu <sup>111</sup> -Lys | Química con hidroxilamina |          | <u>in vitro</u> |   |
| Glu <sup>111</sup> -Lys | Química con hidroxilamina |          | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción, monómero. (70)   |
| Glu <sup>111</sup> -Asp | Química con hidroxilamina | Reducida | <u>in vivo</u>  | Letal en inducción, forma dímero. (70)  |
|                         |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Pro <sup>111</sup> -Ser | Química con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción. (70)   |
| Gly <sup>111</sup> -Glu | Química con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción. (70)   |
| Gly <sup>111</sup> -Glu | Química con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción. (70)   |
| Arg <sup>101</sup> -Gln | Química con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | Nula en inducción, Forma dímero. (70)   |
|                         |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Gly <sup>111</sup> -Glu | Química con hidroxilamina | Reducida | <u>in vivo</u>  | Letal en inducción. (70)  |
| Gly <sup>111</sup> -Arg | Química con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción, monómero. (70)   |
|                         |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Ser <sup>111</sup> -Leu | Química con hidroxilamina | Reducida | <u>in vivo</u>  | Letal en inducción. (70)  |
| Ser <sup>111</sup> -Leu | Química con hidroxilamina | Nula     | <u>in vivo</u>  | No letal en inducción. (70)   |
| Glu <sup>111</sup> -Gln | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | Da patrón de corte sobre lambda. Su actividad reducida dos ordenes de magnitud. (59)  |
|                         |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Glu <sup>111</sup> -Arg | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad reducida tres ordenes de magnitud. (59)  |
| Arg <sup>111</sup> -Glu |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Glu <sup>111</sup> -Lys | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad se reduce tres ordenes de magnitud. (59)   |
| Arg <sup>111</sup> -Glu |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Glu <sup>111</sup> -Lys | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad esta reducida tres veces. (59)   |
| Arg <sup>111</sup> -Asp |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Glu <sup>111</sup> -Gln | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad se ve reducida dos ordenes de magnitud. (59)   |
| Arg <sup>111</sup> -Lys |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Glu <sup>111</sup> -Gln | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad se ve reducida dos ordenes de magnitud. (59)   |
| Arg <sup>100</sup> -Lys |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| His <sup>111</sup> -Asn | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | Su actividad baja 1 orden de magnitud, no da patrón de corte sobre lambda. (59)   |
|                         |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Arg <sup>111</sup> -Lys | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | Su actividad se reduce dos ordenes de magnitud, no da patrón de corte sobre lambda. (59)  |
|                         |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Asn <sup>111</sup> -Asp | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | La actividad de la endonucleasa baja cinco ordenes de magnitud, no da patrón de corte sobre lambda y la actividad en presencia de la metilasa no se ve muy afectada. (59) |
|                         |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Asn <sup>111</sup> -Lys | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad se ve reducida 5 ordenes de magnitud. (59)   |
| Asn <sup>111</sup> -Arg | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad reducida cinco ordenes de magnitud. (59)   |
|                         |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Asn <sup>111</sup> -Arg | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | La actividad baja dos ordenes de magnitud, No da patrón de corte sobre lambda. (59)   |
| Arg <sup>100</sup> -Lys |                           |          | <u>in vitro</u> |   |
| Asn <sup>111</sup> -Lys | Dirigida                  | Reducida | <u>in vivo</u>  | La actividad baja dos ordenes de magnitud y no da patrón de corte sobre lambda. (59)  |
| Arg <sup>100</sup> -Lys |                           |          | <u>in vitro</u> |   |

|                         |                              |          |                                   |   |
|-------------------------|------------------------------|----------|-----------------------------------|---|
| Arg <sub>100</sub> -Lys | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Da patrón de corte sobre lambda y la actividad baja un orden de magnitud. (59)  |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | La actividad de la enzima baja 5 ordenes de magnitud, sin embargo en presencia de la metilasa se observa una actividad deletérea para la célula. Se supone que este comportamiento es por acumulación de proteína y no por su actividad. No da patrón de corte sobre lambda. (59) |
| Arg <sub>100</sub> -Glu | Dirigida                     | Nula     | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | No se observa actividad, pero en presencia de la metilasa se da un efecto deletéreo para la célula. Se ve una disminución del crecimiento de la célula como el que se da cuando esta presencia de la enzima silvestre. (59)   |
| Arg <sub>100</sub> -Gly | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Su actividad se encuentra reducida cinco ordenes de magnitud, no da patrón de restricción sobre lambda. (59)  |
| Arg <sub>100</sub> -Lys | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Da patrón de corte sobre lambda, la actividad se ve reducida tres ordenes de magnitud. (59)   |
| Arg <sub>100</sub> -Lys | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | No da patrón de corte sobre lambda, la actividad baja cuatro ordenes de magnitud. (59)  |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | La actividad baja tres ordenes de magnitud, da patrón de corte sobre lambda. (59)   |
| Arg <sub>100</sub> -Lys | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Da patrón de corte sobre lambda, su actividad se encuentra reducida dos ordenes de magnitud. (59)   |
| Arg <sub>100</sub> -Glu | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad esta reducida cuatro ordenes de magnitud. (59)   |
| Arg <sub>100</sub> -Lys | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | No da patrón de corte sobre lambda, su actividad baja cuatro ordenes de magnitud. (59)  |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Dirigida                     | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | La actividad es alta a 30°C y se hace nula a 37°C. Altera la actividad de las mutantes en la posición 200: K, C y S. (xx)   |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Química con nitrosoguanidina | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Su actividad se ve reducida pero su actividad estrella se aumenta. Esto le permite cortar en los sitios estrella en presencia de la metilasa. (xxx)   |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Química con nitrosoguanidina | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Su actividad estrella se ve muy aumentada. Esto da como resultado que genere una respuesta SOS mediana. Es menos activa ha 42°C. Aumenta la actividad de la mutante Val200. También de varias mutantes en 200. (xxx)  |
| Ala <sub>100</sub> -Val |                              |          |                                   | Su actividad estrella se aumenta mucho, así en presencia de la metilasa es letal a 30°C. Se va haciendo menos letal al aumentar la temperatura. (xx)  |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Química con nitrosoguanidina | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Es termosensible, su actividad estrella se ve moderadamente aumentada por lo que genera una respuesta SOS en presencia de la metilasa. Aumenta la actividad de varias mutantes en la posición 200, sobre todo de Val y Cys. (xxx)   |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Química con nitrosoguanidina | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Esta mutante tiene muy aumentada la actividad estrella y mata a la célula en presencia de la metilasa a 30°C. Su actividad va decreciendo al aumentar la temperatura. (xxx)   |
| Glu <sub>100</sub> -Lys | Química con nitrosoguanidina | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> | Su actividad estrella se ve aumentada, mata a la célula en presencia de la metilasa a 30°C. Es termosensible. Afecta a varias mutantes de la posición 200. (xxx)  |
| His <sub>100</sub> -Tyr |                              |          |                                   |   |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Química con nitrosoguanidina | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> |   |
| Glu <sub>100</sub> -Lys |                              |          |                                   |   |
| Hy <sub>100</sub> -Tyr  |                              |          |                                   |   |
| Arg <sub>100</sub> -Gln | Química con nitrosoguanidina | Reducida | <u>in vivo</u><br><u>in vitro</u> |   |
| Ala <sub>100</sub> -Thr |                              |          |                                   |   |

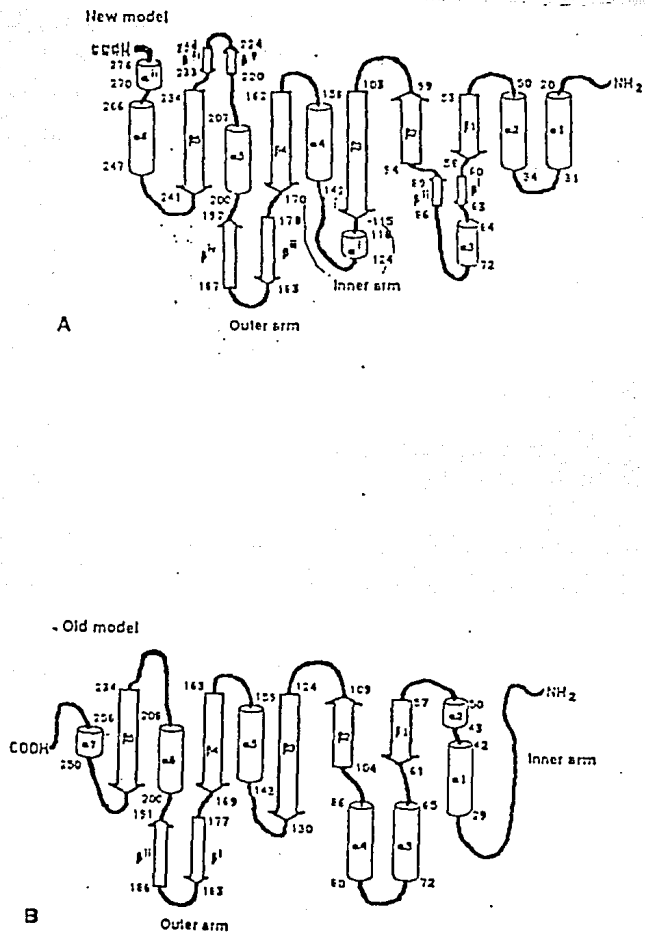


FIGURA 6. Diagrama de la estructura nueva y vieja de la endonucleasa EcoRI (A y B respectivamente). Los cilindros representan  $\alpha$ -hélices y las flechas láminas- $\beta$ .

En la figura 6 se muestra un diagrama de las estructuras nueva y la vieja. La nueva estructura presenta un segmento (Metionina<sub>137</sub> a Alanina<sub>142</sub>) que no se observó en la estructura vieja y que corre a lo largo del surco mayor que puede estar formando contactos directos o indirectos con el DNA. Esta región de la proteína se encuentra antes de la hélice de reconocimiento interna que se observó en la estructura vieja. La hélice de reconocimiento externa de la estructura vieja no se modifica y en ella se encuentra la Arginina 200 que contacta de forma directa con el DNA. Cerca de la zona donde se realiza el corte del enlace fosfodiéster del DNA se encuentra el aminoácido Glutámico 111 que por medio de mutantes se ha observado es importante en la catálisis (63, 102).

En la figura 7 se muestra la estructura de la endonucleasa en complejo con el DNA y la misma estructura en ausencia del DNA. En el complejo se observa que el DNA se encuentra distorsionado, este cambio no es dependiente de la unión de la proteína. El oligonucleótidos con el sitio de reconocimiento al ser analizado por NMR bidimensional presentan esta distorsión; esto contrasta con la estructura cristalográfica del DNA solo (23). El DNA presenta tres zonas donde se modifica su estructura, sin embargo, por razones históricas se les siguen llamando neotorceduras (62, 92). En la figura 8 se muestra dónde se encuentran estas zonas. La importancia de estas distorsiones se cree que radica en que exponen las bases del surco mayor para que las dos hélices de reconocimiento puedan interactuar con las bases. Otro importante factor que se propone es que favorecen un cambio conformacional de la endonucleasa que le permite realizar la hidrólisis del enlace fosfodiéster.



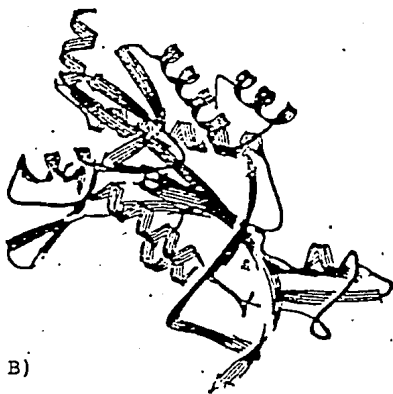
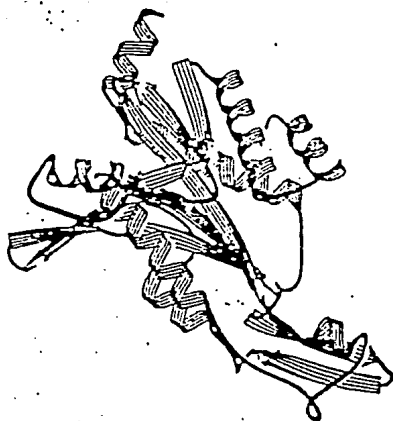
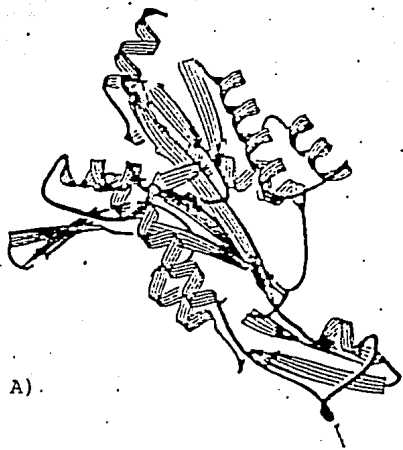
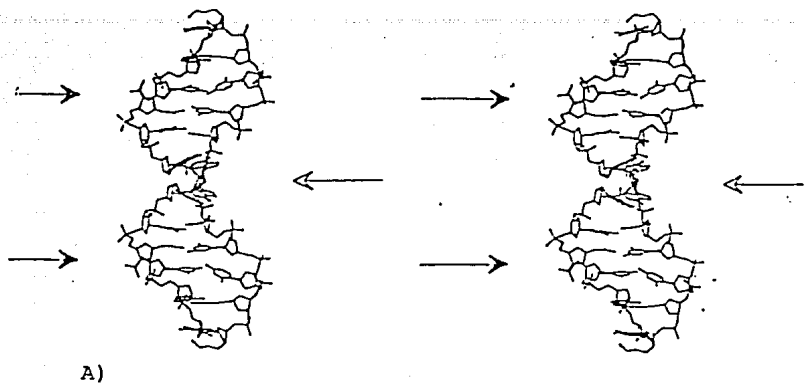


FIGURA 7. Modelo en listón de la endonucleasa. A) Sin DNA. B) Con DNA. Los modelos se muestran como pares estereoscópicos.



0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
 T pC pG pC pG pA pA pT pT pC pG pC pG  
 | | | | | | | | | | | | |  
 Type II Type I Type II  
 neokink neokink neokink

B)

FIGURA 8. Neotorceduras que presenta el DNA con el sitio canónico de la EcoRI. En A se muestra el DNA (par estereoscópico) y las flechas indican dónde se encuentran las torceduras. En B se muestra la secuencia del DNA y dónde se encuentran las torsiones.

En forma simplificada la estructura tridimensional de la endonucleasa se puede visualizar como una lámina  $\beta$  que consta de dos zonas, una paralela y otra antiparalela. De esta lámina parten las hélices que contactan con el DNA, así como los elementos estructurales que forman el sitio activo. Por último, cabe mencionar que la zona paralela de la lámina soporta los elementos de reconocimiento, y la antiparalela los elementos de catálisis (63, 56, 102).

Se ha reportado que la región amino-terminal es importante en la actividad de la endonucleasa, ya que cuando se deleta, la actividad de la enzima se ve afectada (53). En la estructura nueva no se observa esta región (99). Así, no existe una explicación de como afecta esta región la afinidad de la enzima hacia el sitio canónico. Esta región en la estructura vieja se encuentra lejos del DNA.

#### 4.4. Características de RsrI (endo y meti).

La bacteria *Rhodobacter sphaeroides* presenta un sistema de restricción-modificación que es un isozquisómero de **EcoRI**, es decir reconocen la misma secuencia, pero son sistemas de diferentes organismos. La endonucleasa **RsrI** presenta diferentes requerimientos para su actividad con respecto a la **EcoRI**. En la siguiente tabla se presentan sus diferencias:

|              | Mg <sup>++</sup> mM | pH  | Tem.°C | NaCl mM |
|--------------|---------------------|-----|--------|---------|
| <b>RsrI</b>  | 5-7                 | 8.0 | 19     | 10      |
| <b>EcoRI</b> | 5-7                 | 7.5 | 37     | 100     |

Las diferencias que se observan se pueden explicar por las condiciones en los medios naturales de cada organismo. El corte se realiza en el mismo enlace fosfodiéster y la **RsrI** no presenta actividad estrella. Las metilasas de cada sistema protegen al DNA de la acción de ambas endonucleasa y además, anticuerpos producidos contra la endonucleasa **EcoRI** presentan cruza inmunológica contra la de **RsrI** (14%-20%), lo que indica que presentan una homología estructural (45, 51). Este sistema se encuentra codificado por el cromosoma a diferencia del **EcoRI** que está en un plásmido. La secuencia de aminoácidos (276 residuos de aminoácidos.) revela que existe una homología del 50%. Hay zonas a nivel de proteína que se encuentran conservadas entre un 75% a un 100%. Hay una alta proporción de A-T en el gen con respecto al genoma del organismo, y esto mismo se observa en la **EcoRI** (47). Las zonas conservadas son las siguientes:

85% En la región cerca del sitio de corte y de unión del Mg<sup>++</sup>.

Residuo 87-99.

77% La región donde se realiza el corte. Residuo 104-116.

88% Región de interfase proteína-proteína. Residuo 133-149.

85% Región que mantienen en posición a la hélice interna.

Residuo 162-174.

100% Región que forma la horquilla  $\beta$  del brazo. Residuo 182-189.

75% Región donde se encuentra la hélice externa. Residuo 195-205.

De los datos anteriores se deduce que se conservan los contactos específicos e inespecíficos con el DNA, así como los contactos proteína-proteína.

La secuencia de la metilasa ya se conoce (64) y presenta una pobre homología con respecto a la metilasa de la **EcoRI**. Esto hace suponer que existen varios mecanismo para reconocer una misma secuencia nucleotídica. Una última diferencia se encuentra en la región que separa al gen de la endonucleasa del de la metilasa; en **EcoRI** hay 29 pares de bases y en el de **RsrI** 83 pares de bases.

#### **4.5. Mutaciones reportadas en la EcoRI.**

Ver la tabla 1.

## 5. LA ENDONUCLEASA EcoRI COMO MODELO EN LA INGENIERIA DE PROTEINAS.

### 5.1. Características que la hacen buen modelo.

Son varios los rasgos de esta proteína que la hacen un buen modelo para su estudio. 1) Es una proteína de un tamaño no muy grande. 2) Su mecanismo de acción es muy estudiado. 3) Se tiene clonada y secuenciada. 4) Su actividad *in vivo* es fácilmente detectada. 5) Se conoce su estructura tridimensional en complejo con su DNA blanco, donde se observa qué residuos contactan de manera específica con las bases. 6) Relevancia a un problema central (proteína-DNA).

## 6. OBJETIVOS.

**GENERAL:** Caracterización de mutantes de la endonucleasa **EcoRI** en los residuos que contactan de manera directa con las bases del sitio canónico.

**PARTICULARES:**

-Caracterización de la mutagénesis combinatoria desarrollada en el laboratorio sobre la endonucleasa **EcoRI**.

-Desarrollo de una estrategia de detección de la actividad *in vitro* de las enzimas mutantes.

-Caracterización de enzimas mutantes con actividad detectable *in vivo*.

-Búsqueda de enzimas mutantes con cambio de especificidad.

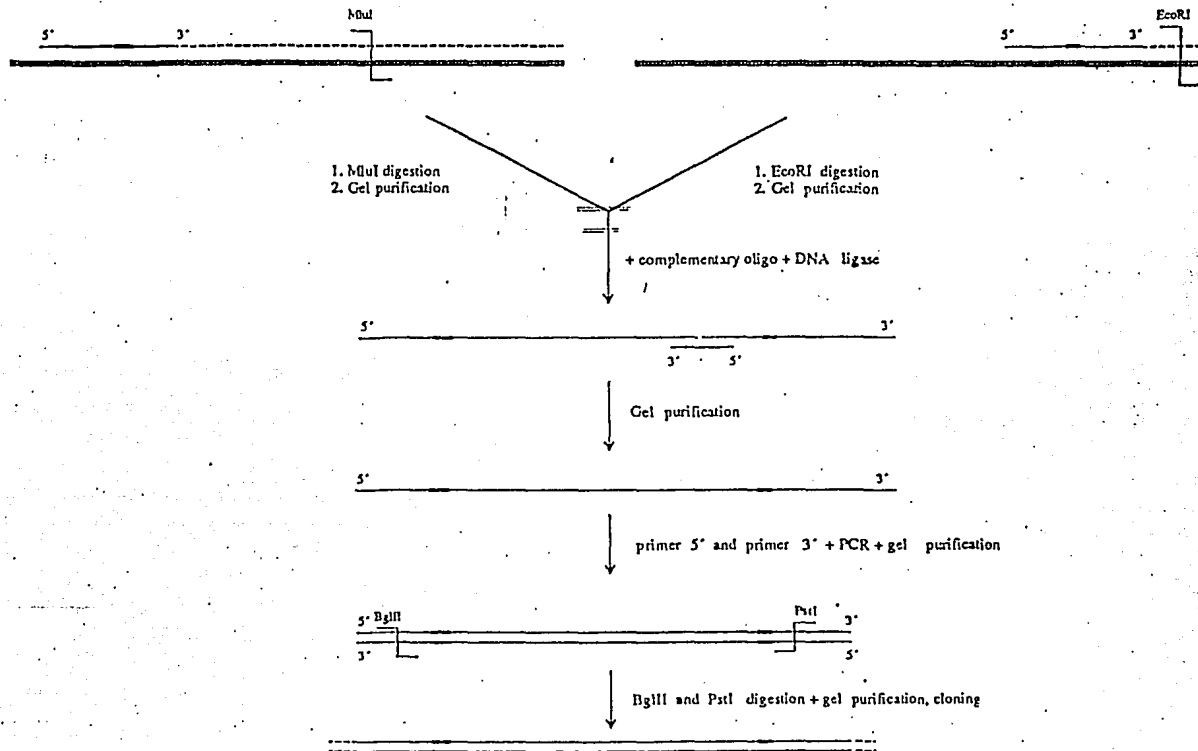


FIGURA 9. Estrategia de mutagénesis combinatoria de los 3 residuos de la endonucleasa EcoRI que contactan de manera directa con el DNA.



## 7. ANTECEDENTES.

En la figura 9 se muestra la estrategia que se desarrolló en el laboratorio para mutagenizar de manera combinatoria los residuos que contactan con el DNA de manera directa. Se había observado que los genes mutantes producían tres tipos de fenotipos bien definidos en las bacterias que no portaban el gen de la metilasa: 1) Translúcido plano, que indica una alta actividad de la endonucleasa y en inducción de la expresión del gen la célula no crecía; 2) Semitranslúcido redondo, una actividad intermedia, que permitían un crecimiento pobre de la colonia cuando se induce la expresión del gen y 3) apariencia parecida al de colonias que no portan el gen de la endonucleasa (colonia densa y redonda), que corresponde a una actividad nula de la enzima, sólo algunas mostraban efecto deletéreo para la célula cuando se inducía (la inducción se logró con IPTG, (Isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido).

De esta colección se había secuenciado una de aspecto nulo que correspondía a glicina en la posición 144 (Tabla 2).

En nuestras condiciones experimentales, las células con el gen silvestre de la endonucleasa pueden sobrevivir en ausencia de la metilasa. Este comportamiento se debe a que en la creación del vector que porta el gen de la endonucleasa, se generó una mutación espontánea (97). Esta mutación cambia el codón de la posición 160 (Glu) por Asp. El efecto de esta mutación no se ha caracterizado, pero permite que las células que portan el gen de manera reprimida, sobreviva, aunque de manera pobre. El gen silvestre no permite que la célula sobreviva (69).

En el laboratorio se usó un modelo *in vivo* para medir la actividad ya que se ha observado que el comportamiento *in vitro* es diferente al *in vivo* (59).

TABLA 2. Fenotipos de las colonias.

| ENZIMA               | E144 | R145 | R200 | FENOTIPO,<br>(SIN METILASA) <sub>2</sub> |       |
|----------------------|------|------|------|--|-------|
|                      |      |      |      | -IPTG                                    | +IPTG |
| W.T.                 | -    | -    | -    | +  | -     |
| E144C                | C    | -    | -    | ++                                       | -     |
| E144T                | T    | -    | -    | +++++                                    | +     |
| E144G                | G    | -    | -    | +++++                                    | +++++ |
| ER-VT <sub>3</sub>   | V    | T    | -    | +++++                                    | +     |
| R145K                | -    | K    | -    | +++++                                    | +++   |
| R200C                | -    | -    | C    | +++                                      | +     |
| R200K                | -    | -    | K    | +++++                                    | +++++ |
| R200N                | -    | -    | N    | +++++                                    | +++++ |
| ER-KY                | K    | Y    | -    | +++++                                    | +++++ |
| ER-YW <sub>4</sub>   | Y    | W    | -    | ND                                       | ND    |
| ER-DE <sub>4</sub>   | D    | -    | E    | ND                                       | ND    |
| ERR-VTG              | V    | T    | G    | +++++                                    | +++++ |
| ERR-DIH <sub>4</sub> | D    | I    | H    | ND                                       | ND    |

1) El fenotipo de las colonias se ensayó visualmente. Las colonias de JM101 se plataron en cajas con kamicina (50 µg/ml). Donde se indica se les añadió IPTG (1 mM).

++++ colonias con fenotipo normal, ++++ colonias de baja densidad pero de igual tamaño que las normales, +++ y ++ colonias de tamaño reducido y baja densidad celular, + colonias planas, translúcidas y pequeñas; - no hubo crecimiento; ND no determinado.

2) Cuando los genes mutantes se expresaron en el contexto de la metilasa, todas las mutantes presentaron un fenotipo normal, incluyendo las que portaban el gen silvestre. Bajo condiciones de inducción sólo el gen silvestre presentaba una actividad letal (ver figura 2).

3) En el caso de la metilasa se complementó en *trans* en un plásmido compatible y en *cis* en el mismo plásmido que porta el gen de la endonucleasa. En los dos casos la metilasa protegió a la célula de la actividad de la endonucleasa cuando se inducía su expresión.

4) Datos obtenidos de clonación directa del fragmento BgIII-PstI en el fago M13mp19.

## 8. MATERIAL Y METODOS.

### 8.1. Preparación de células competentes de *E. coli*.

Este método consiste en el uso de dimetil sulfoxido, polietilenglicol (PM de 8000) y magnesio.

-Se inoculan 30 ml de medio Luria-Bertani (L-B) líquido (10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl) con 30  $\mu$ l de un cultivo saturado fresco de célula *E. coli* cepa JM101.

-Se coloca el matraz a 37°C en agitación continua (200 rpm).

-Cuando las células han alcanzado una D.O.<sub>600nm</sub>  $\approx$  0.4 se colectan las células en un tubo estéril de polipropileno por centrifugación durante 8 minutos a 5000 (rpm) en un rotor JA20 (Beckman) a 4°C.

-Todos los siguientes pasos se realizan a 4°C.

-Se desecha el sobrenadante y el patilla celular se resuspende en 3 ml de solución TSS (10% v/p de PEG 800, 5% v/v de dimetil sulfoxido y 50 mM MgCl<sub>2</sub> en L-B pH 6.5).

-Se forman alícuotas de 400  $\mu$ l de las células, se congelan en hielo seco con etanol y se guardan a -70°C.

Las células se pueden almacenar en estas condiciones durante varios meses sin que pierdan la eficiencia de transformación, la cual es de  $1 \times 10^8$  células transformadas por  $\mu$ g de DNA (95).

## 8.2. Transformación de células *E. coli* con plásmido.

- Para esto se deja descongelar una alícuota de las células competentes en hielo.
- Se toman 200  $\mu\text{l}$  de las células y se les añade el plásmido que va a transformarlas en un volumen máximo de 5 $\mu\text{l}$ .
- Se dejan en hielo durante 30 minutos.
- Después se pasan a un tubo de vidrio con 800  $\mu\text{l}$  de L-B líquido y se ponen a incubar a 37°C en agitación continua (200 rpm) durante 1 hora.
- Se toma al cultivo y se platean en cajas de L-B sólido (L-B líquido con agar al 1.5%) que contenga el antibiótico apropiado.
- Se dejan crecer a 37°C durante  $\approx$  8 hrs. (95).

## 8.3. Cotransformación de células *E. coli* con plásmido.

La cotransformación es la transformación de células que ya portan un plásmido; para lograr esto se preparan células competentes de un cultivo saturado fresco que ya portan un plásmido. La metodología que se usa es la misma que la ya mencionada. Los plásmidos que se usen deben de ser compatibles.

Cuando se tienen las células competentes se transforman como se mencionó en el apartado anterior, pero se platean en cajas que tengan los marcadores de selección para cada plásmido (95).

#### **8.4. Transformación de células *E. coli* con el fago M13 mp19.**

- Se toma una alícuota de 200  $\mu$ l de células competentes y se deja descongelar en hielo.
- Se coloca el DNA del fago en un tubo de polipropileno de 0.5 ml y se le agregan 200  $\mu$ l de las células competentes.
- Se dejan 30 minutos a 4°C.
- Se agregan las células a 3 ml de medio L-B suave (L-B con 0.6% de agar) que esté fundido. Se le agregan 15  $\mu$ l de IPTG (100 mM), 25  $\mu$ l de X-Gal ( 20 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indoli- $\beta$ -D-galactosido en dimetil formamida) y 200  $\mu$ l de un cultivo saturado fresco de la misma cepa que se transforma.
- Se vierte el medio en una caja de L-B sólido.
- Se deja que enfríe el medio y se coloca la caja a 37°C durante aproximadamente 8 hrs. (95).

#### **8.5. Purificación de plásmido por lisis alcalina.**

- Se inoculan 30 ml de L-B líquido (con el antibiótico al cual da resistencia el plásmido ) con una colonia transformante y se deja crecer el cultivo a 37°C en agitación continua (200 rpm) durante toda la noche.
- Se colectan las células por centrifugación como ya se mencionó.
- Se resuspenden en 1.5 ml de solución SET (20% de sacarosa, 50 mM de tris-HCl pH 7.6 y 50 mM de EDTA) y se les agregan 100  $\mu$ l de RNasa (10 mg/ml).

- Se agregan 3.5 ml de solución de lisis (1 volumen de NaOH 0.4 N y 1 volumen de SDS al 2%). Dejar 15 minutos en hielo.
- Agregar 2.5 ml de acetato de sodio (3 M, pH 4.8) y mezclar por inversión del tubo. Dejar 20 minutos en hielo.
- Se centrifuga en un rotor JA20 a 15000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
- Se toma el sobrenadante y se mezcla por inversión con 1 volumen de isopropanol.
- Se centrifuga durante 20 minutos a 12000 rpm.
- Se desecha el sobrenadante y se deja secar la pastilla por decantación a temperatura ambiente.
- Se resuspende el botón en 900 µl de agua destilada y se forman alícuotas de 300 µl.
- En tres tubos de polipropileno de 1.5 ml se colocan las alícuotas, se les agrega un volumen de fenol (Tris-HCl pH 8, fenol a saturación y 0.2% de 2-β-mercaptoetanol) y se agitan vigorosamente. Se centrifugan a 12000 rpm en una microfuga (Beckman) durante 4 min..
- Se toma la fase acuosa que es la superior y se desecha la fase orgánica. A la fase acuosa se le agrega un volumen de fenol y un volumen de cloroformo, se agita vigorosamente y se centrifuga como en el paso anterior.
- Se toma la fase acuosa y se le agrega 10% del volumen de acetato de Sodio (3M, pH 4.8) y dos volúmenes de etanol absoluto. Se congela la mezcla en hielo seco con etanol durante 15 minutos y se centrifuga durante 15 minutos en las mismas condiciones anteriores.

-Se tira el sobrenadante y se seca el botón por decantación a temperatura ambiente. Se resuspende en 50  $\mu$ l de buffer TE (10 mM de tris-HCl pH 7.6 y 1 mM de EDTA pH 8).

-Se cuantifica el DNA en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (10 mg/ ml) (83).

### **8.6. Purificación de DNA cadena doble del fago M13 mp19 por lisis alcalina.**

-Para purificar DNA de fago de doble cadena (forma replicativa), se inoculan 30 ml de LB líquido con 150  $\mu$ l de un cultivo de células JM101 saturado fresco, se le añade una placa de infección y se deja a 37°C durante 8 horas en agitación continua (200 rpm).

-Se sigue todos los pasos ya descritos para purificar plásmido (83).

### **8.7. Digestiones de DNA.**

-Para digerir se toman aproximadamente 3  $\mu$ g del DNA en un volumen máximo de 25  $\mu$ l.

-Se le adiciona el buffer (generalmente está a una concentración 10 veces mayor), espermidina (5 mM) y 0.25  $\mu$ l de la enzima de restricción.

-Se deja la reacción a 30°C durante 8 horas aproximadamente.

-Se toma una alícuota de la reacción para observar si la reacción es completa. (generalmente se toma el volumen que corresponde a 100 ng de DNA).



-Si la digestión es casi completa se para, añadiendo 4  $\mu$ l de la solución de término (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% de xilen cianol FF).

-Se purifica el fragmento de interés, ya sea de gel de agarosa o de acrilamida.

-Las condiciones de la reacción son las siguientes:

-HindIII/PstI 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM  $MgCl_2$  y 1 mM de ditiotretol.

7-BglII/PstI 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM  $MgCl_2$  y 10 mM 2-mercaptoetanol.

-MluI/PstI 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM  $MgCl_2$  y 1 mM de ditiotretol.

-EcoRI 6 mM Tris-HCl, pH 7.4; 6 mM de  $MgCl_2$ , 6 mM de 2-mercaptoetanol y 110 de NaCl.

-BamHI 10 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM de  $MgCl_2$ , 6 mM de 1-mercaptoetanol y 100 de NaCl.

-Estas digestiones no producen extremos compatibles, por lo que no es necesario desfosfilar al vector.

## **8.8. Purificación de fragmentos de DNA de gel de agarosa.**

-Se hace un gel preparativo de agarosa a la concentración que se recomienda para observar el tamaño del DNA a purificar (90 mM Tris-HCl pH 8.2, 2.5 mM EDTA, 89mM ácido bórico y agarosa a la concentración deseada), y se carga el DNA en el

gel. Se corre la muestra a 100 V durante 40 minutos y se tiñe con bromuro de etidio durante 30 segundos. Se corre de nuevo la muestra durante 10 minutos y se observa en un transiluminador de UV. Con una navaja se corta la banda que corresponda al tamaño del DNA que se desea purificar.

-Para purificar el DNA de la agarosa, se pasa la banda cortada de agarosa por una jeringa de 3 ml y se coloca en un tubo de polipropileno de 1.5 ml.

-La agarosa se mezcla con un volumen de fenol y se agita vigorosamente.

-Se congela en hielo seco durante 15 minutos.

-Se centrifuga a 12000 rpm durante 10 minutos a 2°C y se toma la fase acuosa.

-Se realiza una extracción con fenol/cloroformo y se toma la fase acuosa.

-Se precipita el DNA con un décimo de volumen de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol absoluto. Se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en 20 µl de buffer TE.

-Se cuantifica el DNA recuperado en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

### **8.9. Purificación de fragmentos de DNA de gel de acrilamida.**

-Para purificar se corre la digestión en un gel acrilamida al 7%.

-Se tiñe con bromuro de etidio el gel y se observa en un transiluminador de UV.

-Se corta la banda de DNA que corresponde al tamaño esperado.

-Se sumerge la banda en 500 µl de buffer de elución (0.3 M acetato de sodio pH, 4 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8 y 0.2% de SDS) por aproximadamente 12 horas a 37°C.

-Se toma el buffer y se coloca en un tubo de polipropileno de 1.5 ml, se le añade 1 ml de etanol absoluto.

-Se congela en hielo seco con etanol y se centrifuga en una microfuga durante 15 minutos, se tira el sobrenadante. Se seca el botón y se resuspende en buffer TE. Se cuantifica el DNA por del de acrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio.

### **8.10. Clonación.**

-Para esto se toma 0.1 picomolas de vector y 1 picomolas del fragmento.

-Las condiciones de ligación son las siguientes: 100 unidades de ligasa en 15  $\mu$ l de reacción (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM  $MgCl_2$ , 20 mM de ditriotretitol, 1 mM ATP y 50  $\mu$ g SBA).

-Se deja la reacción a 4°C durante toda la noche.

-Se inactiva la enzima colocando la reacción a 70°C durante 15 minutos.

-Se toman 5  $\mu$ l de la mezcla de ligación y se usan para transformar células competentes.

### **8.11. Secuencia de DNA por el método de Sanger.**

La metodología se basa en la capacidad que se tiene de sintetizar dideoxinucleótidos, que al incorporarse en la cadena que se está polimerizando, inhiben el crecimiento de la misma. Esto se debe a que la polimerasa necesita un radical OH en la posición 3' del nucleótido para incorporar la siguiente base.

-Para usar este método el fragmento del gen de la endonucleasa que porta las regiones mutagenizadas (PstI\BgIII o PstI\HindIII) se clona en el fago filamentoso M13mp18 y M13mp19. Se toma una alícuota de la reacción de ligación ( $\approx 30$  ng de DNA) y se usa para transformar células JM101.

-Las placas de lisis que presentan el inserto (placas blancas) se toman con una punta estéril y se colocan en 1.5 ml de medio L-B líquido. Se le añade 15  $\mu$ l de un cultivo saturado de células JM101 y se deja crecer toda la noche a 37°C en agitación continua (200 rpm).

-Se toman 1200  $\mu$ l del cultivo y se colocan en un tubo de polipropileno de 1.5 ml, se centrifugan a 12000 rpm durante 1 minuto y se toma el sobrenadante.

-El sobrenadante se coloca en otro tubo y se le añaden 300  $\mu$ l de una solución de precipitado (2.5 M NaCl y 20% de PEG 8000).

-Se agita por inversión y se deja 15 minutos a temperatura ambiente.

-Se centrifuga a 12000 rpm durante 8 minutos, se aspira el sobrenadante con una pipeta Pasteur (Se forma un precipitado blanco, de no formarse hacer de nuevo todos los pasos anteriores).

-Se deja secar a temperatura ambiente y después se resuspende en 300  $\mu$ l de agua estéril.

-Se realizan 2 extracciones con fenol\cloroformo y se precipita el DNA con 1 décimo de acetato de sodio (la concentración es la misma que se usó en la purificación de plásmido) y dos volúmenes de etanol absoluto.

-Se resuspende el DNA en 30  $\mu$ l de buffer TE y se cuantifica por gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

-Se toma el volumen que corresponda a 1  $\mu\text{g}$  de DNA y se evapora en un desecador, se resuspende en 6  $\mu\text{l}$  de agua estéril en un tubo de polipropileno de 0.5 ml.

-Se le añaden 2  $\mu\text{l}$  de buffer 5X de reacción (200 mM Tris-HCl pH 7.5; 100 mM  $\text{MgCl}_2$  y 250 mM NaCl ) y 2  $\mu\text{l}$  de primero (1 pmol , 5' GTTTTCCCAGTCACGAC3').

-Se coloca a 65°C durante 2 minutos y se deja bajar la temperatura a 30°C. Se le añade 1  $\mu\text{l}$  de ditiotreitol (0.1 M), 2  $\mu\text{l}$  de mezcla de marca (1.5  $\mu\text{M}$  dGTP, 1.5  $\mu\text{M}$  dCTP y 1.5  $\mu\text{l}$  dTTP), 0.5  $\mu\text{l}$  de [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP (5  $\mu\text{Ci}$ ) y 2  $\mu\text{l}$  de enzima (3.25 unidades en 10 mM tris-HCl pH 7.5, 5 mM DTT y 0.5 mg/ml BAS).

-Se deja la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos.

-En tubos separados se colocan 2.5  $\mu\text{l}$  de cada mezcla de terminación (ddG, 80  $\mu\text{M}$  dGTP, 80  $\mu\text{M}$  dATP, 80  $\mu\text{M}$  dCTP, 80  $\mu\text{M}$  dTTP, 8  $\mu\text{M}$  ddGTP y 50 mM NaCl. Para cada mezcla de término ddA, ddC y ddT lo que varía es el ddnt usado). Se dejan 2 minutos a 37°C.

-Se toman 3.5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción y se añaden a cada terminador. Se deja la reacción a 37°C durante 5 minutos.

-Se detiene la reacción añadiendo 4  $\mu\text{l}$  de la solución de término ( 95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% azul de bromofenol y 0.05% de xilen cianol FF).

-Se calientan las muestra a 95°C durante 2 minutos y se colocan 5  $\mu\text{l}$  de cada reacción de término en un gel de acrilamida al 7.5%-8 M de urea precalentado durante 30 minutos. El gel mide 80 cm de largo por 20 cm de ancho.

-Se dejan correr las muestras durante 4 horas a 40 watts. El buffer de las cámaras es TEB (90 mM Tris-HCl pH 8.2, 2.5 mM EDTA y 89 mM de ácido bórico).

- Se desmonta el gel y se trata con 1 litro de solución fijadora (10% de ácido acético y 12% de metanol).
- Se transfiere el gel a un papel filtro y se deja secando a 80°C durante 1 hora en un secador de geles.
- Con ayuda de un contador geiger se determina que exista incorporación de marca en el gel.
- Se expone durante 24 hrs con una película de autoradiografía.
- Se revela la película y se determina la secuencia nucleotídica. Para determinar la secuencia, se observa el orden de aparición de las bandas en los cuatro carriles de los terminadores (84).

## **8.12. Preparación de extractos crudos para ensayo de actividad de la EcoRI.**

Para determinar la actividad *in vitro* de la endonucleasa se prepararon extractos crudos de la siguiente manera:

- Se inoculan 6 ml de L-B líquido (10 µg de kanamicina/ml) con una colonia transformante, se incuban a 37°C, en agitación continua (2000 rpm) hasta que alcance una  $DO_{600nm} \approx 0.6$ .
- Se induce la expresión del gen de la endonucleasa en el cultivo con IPTG (0.5 mM) durante 30 minutos en las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente.
- Se colectan las células que correspondan a  $\approx 0.5$  de  $DO_{600nm}/ml$ , por centrifugación (1 minuto) en una microfuga a 12000 rpm.

- Se dejan secar a temperatura ambiente y se guardan a  $-70^{\circ}\text{C}$  (en estas condiciones las células pueden almacenarse hasta 1 año).
- Las células se resuspenden por vortex en 400  $\mu\text{l}$  buffer de extracción (10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 7 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM EDTA 1 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro y 1 mM  $\text{NaN}_3$ ) con 0.2 M de NaCl.
- Se sonican con pulsos de 30 segundos (tres veces) y se centrifugan en una microfuga (12000 rpm) a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.
- Se toman 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se mezclan con 200  $\mu\text{l}$  de glicerol puro (estéril). Se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  para luego determinar su actividad (65, 58).

### **8.13. Purificación parcial de la endonucleasa.**

Para purificar parcialmente la endonucleasa se siguen los pasos que se usan para el extracto crudo; sólo que después de la centrifugación del sonificado, no se mezcla con glicerol.

- Se toma el sobrenadante con una punta estéril y se coloca en una minicolumna de fosfocelulosa a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Para preparar la columna se toma un tubo de polipropileno de 1.5 ml spun-column, se le realiza un orificio en la base. Se coloca una base de fibra de vidrio ( $\approx 0.3$  cm) y se añade 1 ml de fosfocelulosa (0.5 g de fosfocelulosa activada y resuspendida en buffer de extracción).
- Para activar la fosfocelulosa, se expone a una solución ácida y luego a una básica.

- Se centrifuga en una centrifuga clínica ( $\approx 300$  rpm) durante 30 segundos y se desecha el líquido de elución.
- Se le agregan 0.5 ml de buffer de extracción y se centrifuga como en el paso anterior. Se repite este paso dos veces.
- Se le añade el sobrenadante del sonicado y se centrifuga en las mismas condiciones descritas. Se desecha el líquido de elución.
- Se le añaden 0.5 ml de buffer de elución con 0.2 M de NaCl y se centrifuga, se colecta la fracción que eluye.
- Se repite este paso varias veces, pero al buffer de extracción se le añaden 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8 M de NaCl.
- Se toman 200  $\mu$ l de cada fracción de elución y se mezclan con 200  $\mu$ l de glicerol estéril puro.
- Se guardan a  $-20^{\circ}\text{C}$  (58).

#### **8.14. Determinación de la pureza de la enzima por el método de Laemmli.**

Para determinar la pureza de la enzima se toman 20  $\mu$ l de la fracción de elución sin glicerol y se mezclan con 20  $\mu$ l de buffer de muestra SDS (20% p/v glicerol, 10% p/v 2-mercaptoetanol, 4.6% p/v SDS, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8 y 0.1% azul de bromofenol).

-Se cargan en un gel de acrilamida, donde el gel de resolución es al 10% y el de agrupamiento al 4%.



- El buffer de corrida (0.025 M Trizma base, 0.192 M glicina y 0.1% p/v SDS) es el mismo para ambas cámaras.
- Se corre a 5 mA hasta que el colorante entre al gel de resolución y luego a 15 mA.
- Cuando el colorante llegue al fondo del gel éste se retira y se coloca en la solución de tinte (1% de azul brillante de coomassie en agua) durante 15 minutos en agitación continua ( $\approx$  50 rpm).
- Se toma el gel y se coloca en solución de destintado (7% v/v ácido acético y 40% v/v de metanol) durante 10 minutos en agitación continua. Se cambia la solución varias veces hasta que el gel se destinta (Laemmli, 1971).

### **8.15. Verificación de que el genotipo determinado corresponde al fenotipo observado.**

Para esto se toma la clona del fago que porta el fragmento HindIII-PstI ó BglII-PstI que se usó para secuenciar, se infectan células JM101.

- Se purifica cadena doble y se digiere (3  $\mu$ g de DNA en un volumen de 20  $\mu$ l de reacción) con HindIII-PstI, ó con MluI-PstI (esto es ya que el sitio BglII se pierde al ligarlo a los extremos generados por BamHI).
- Se purifica el fragmento que corresponde al tamaño esperado de gel de acrilamida (MluI/PstI) o de agarosa (HindIII/PstI).
- Por otra parte se digiere 2  $\mu$ g del plásmido pKGS con HindIII-PstI ó MluI-PstI dependiendo del fragmento que se quiera clonar.

-Se purifica el fragmento mayor del plásmido de gel de agarosa al 0.8% y se cuantifica por bromuro de etidio.

-Se toman 0.1 pmola de plásmido digerido y 1 pmola de inserto y se ligan.

-Se toma una alícuota de la ligación ( $\approx$  30 ng de DNA ) y se usa para transformar células JM101.

-En algunos casos se pudo determinar el fenotipo que producía un determinado mutante secuenciado de manera directa. Esto es posible cuando se trata de una mutación en la posición 200; para poder clonar la mutación deseada, se digiere la clona del fago M13 mp19 con las enzimas MluI/PstI. La digestión produce un fragmento de 60 pares de bases, que se purifica para sustituirlo por el fragmento silvestre en el gen de la endonucleasa.

#### **8.16. Actividad *in vitro* de la endonucleasa.**

-Para determinar la actividad de la endonucleasa, se tomó 1  $\mu$ l del extracto crudo o de la fracción de elución de la endonucleasa.

-Se le añade como sustrato el plásmido pCU 13 normal o metilado, las condiciones de reacción se describen en un apartado anterior.

-Se colocan las reacciones a 37°C.

-El tiempo de la reacción de digestión fue variable y se indican en cada experimento.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Caracterización genotípica de enzimas mutantes.

La transformación de células *E. coli* (cepa JM101) con el plásmido pKGS, que porta el gen de la endonucleasa **EcoRI** mutado (a saturación) en los tres residuos que contactan con el DNA de manera directa, genera tres fenotipos bien definidos.

1) Colonias planas translúcidas, 2) colonias semitranslúcidas y 3) colonias de crecimiento parecido al de colonias que no portan el gen de la endonucleasa.

Se secuenciaron los genes de las endonucleasas que conferían los fenotipos mencionados y se obtuvieron los siguientes genotipos:

1) Las colonias con un aspecto translúcido (parecido al de colonias con el gen de la endonucleasa silvestre) eran pseudosilvestres, es decir, los aminoácidos eran los mismos que en la proteína silvestre, pero los codones que los codificaban eran distintos (datos no mostrados).

2) De las colonias que presentaban aspecto semitranslúcido, se encontraron dos genotipos que se podían distinguir por la densidad celular que presentaban las colonias:

a) Semitranslúcido que tiene Cisteína en la posición 200 y que crecía pobremente en inducción con IPTG (tabla 2 y figura 10).

b) Traslúcido que posee cisteína en la posición 144 y que no crecía en inducción con IPTG (tabla 2 y figura 10).

3) De las colonias que presentaban un aspecto normal en represión del gen de la endonucleasa se obtuvieron 8 genotipos diferentes. Se pueden dividir en dos grupos por el aspecto que toma la colonia cuando se induce la expresión del gen de la endonucleasa. Así, un grupo tiene las endonucleasas que son deletéreas a la célula en inducción y el otro las que no muestran una actividad deletérea para la célula en inducción. Dentro del **primer grupo** se encuentran tres mutantes, los cuales se mencionarán en orden creciente con respecto a su actividad deletérea para la célula:

- a) Lisina 145 que le da a la célula un aspecto semi translúcido (Tabla 2 y figura 10).
- b) Treonina 144 que casi no permite el crecimiento de la célula (Tabla 2 y figura 10).
- c) Doble mutante Valina 144 Treonina 145 que casi no permite el crecimiento de la célula, su actividad es parecida a la anterior (Tabla 2 y figura 10).

En el **segundo grupo** se encuentran aquéllas que no presentan actividad en inducción. Son 5 mutantes:

- a) Lisina 200
- b) Glicina 144.
- c) Asparagina 200.
- d) Doble mutante Lisina 144 y Tirosina 145.
- e) Triple mutante Valina 144, Treonina 145 y Glicina 200 (Tabla 2 y figura 10).

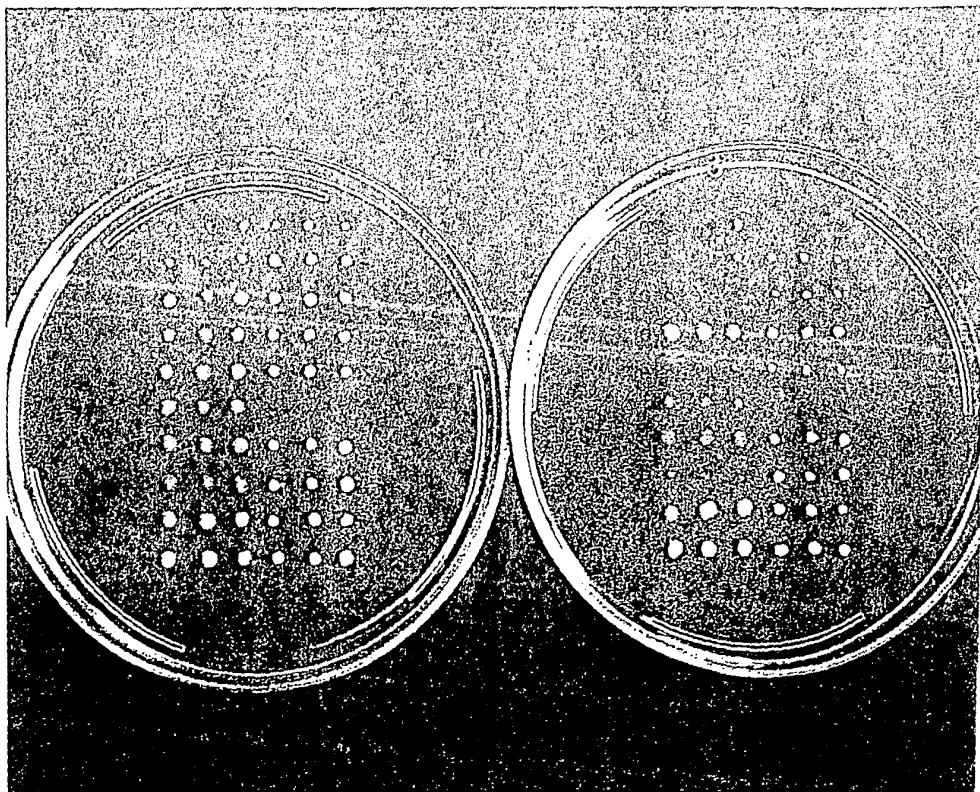


FIGURA 10. Fenotipos de colonias con endonucleasas mutantes. Las colonias que expresan mutantes de la endonucleasa están colocadas de la siguiente manera: a, silvestre; b, E144C; c, E144T; d, E144G; e, E144R145-VT; f, ER-VT metilasa (presente en *cis*); g, R145K; h, R200C; i, R200K y j, R200N. El panel izquierdo sin IPTG y el derecho con IPTG (1 mM). Cada panel está dividido en dos columnas que tienen 3 colonias aisladas independientemente de una transformación fresca. La primera columna no porta la metilasa y la segunda sí.

Por último se obtuvieron 3 genotipos diferentes por clonación directa en el fago M13mp18, es decir, sin selección por fenotipo:

I. Tirosina 144 y Triptófano 145.

II. Aspártico 144 y Glutámico 200.

III. Aspártico 144, Isoleucina 145 e Histidina 200. (Tabla 2 y figura 10).

La mutante Lys 200 se obtuvo por clonación directa en el fago M13; y para ver el fenotipo que le confiere a la colonia que lo porta, se sustituyó el fragmento M1ul-PstI en el gen de la endonucleasa.

Los experimentos para demostrar que el genotipo que se observaba correspondía al fenotipo observado, mostraron que los fragmentos que portan los cambios sí podían restaurar el fenotipo original cuando se introducía el mismo en un gen silvestre (Datos no mostrados).

## **9.2. Actividad *in vitro* detectada en extractos crudos.**

La actividad *in vitro* de la enzima silvestre es mayor que la de las mutantes. La enzima silvestre lineariza 400 ng del plásmido pCU 13 en 25 minutos (carril 5 del gel superior de la figura 11), mientras que las mutantes muestran sólo una digestión parcial en el mismo lapso de tiempo (carriles 2-4 y 7-13 de la figura 11).

En todas las digestiones con extractos se observa un barrido de DNA que comienza a partir de la banda del plásmido lineal, lo que sugiere la existencia de una degradación inespecífica del DNA en los extractos crudos. Este barrido se observa en las digestiones de todos los extractos. En experimentos no mostrados

se observó que esta degradación se mantenía en el tiempo; así, a las 12 horas de digestión no se observaba plásmido lineal, sino un barrido total. Además, se observa la aparición de la forma lineal del plásmido en el extracto de la cepa sin el gen de la endonucleasa, pero en un menor grado que las que portan el gen de la endonucleasa (figura 11).

Cuando se uso plásmido metilado como sustrato, el extracto de la cepa sin el gen de la endonucleasa no mostró actividad de corte, pero todos los extractos de cepas que portan el gen de la endonucleasa lo mostraron en una mayor proporción que cuando se trata de DNA no metilado (Figura 11 gel inferior). Es interesante observar que el extracto de la enzima silvestre muestra también actividad sobre DNA metilado (carril 5 del gel inferior de la figura 11). Así, el corte observado es un artefacto que se debe restar.

Los extractos crudos de los mutantes que mostraron actividad de corte sobre DNA normal son los siguientes: Cisteína 200, carril 1; Cisteína 144, carril 2; Lisina 200, carril 3; Histidina 200, carril 4; Valina 144, Treonina 145, carril 7; Treonina 144, carril 8; Glicina 144, carril 10 y Lisina 145 carril 12 (figura 11). Estas mismas mutantes mostraron corte sobre el DNA metilado, pero con una menor actividad que sobre el DNA no metilado (figura 11 gel inferior). Es interesante observar que la mutante lisina 200 tiene una alta actividad de corte sobre DNA normal (carril 3 de la figura 11). Esta mutante termina con el DNA super-enrollado, aumentando la forma relajada (corte en una sola hebra) y lineal (corte en las dos hebras). Los otros extractos no terminaron con la forma super-enrollada.

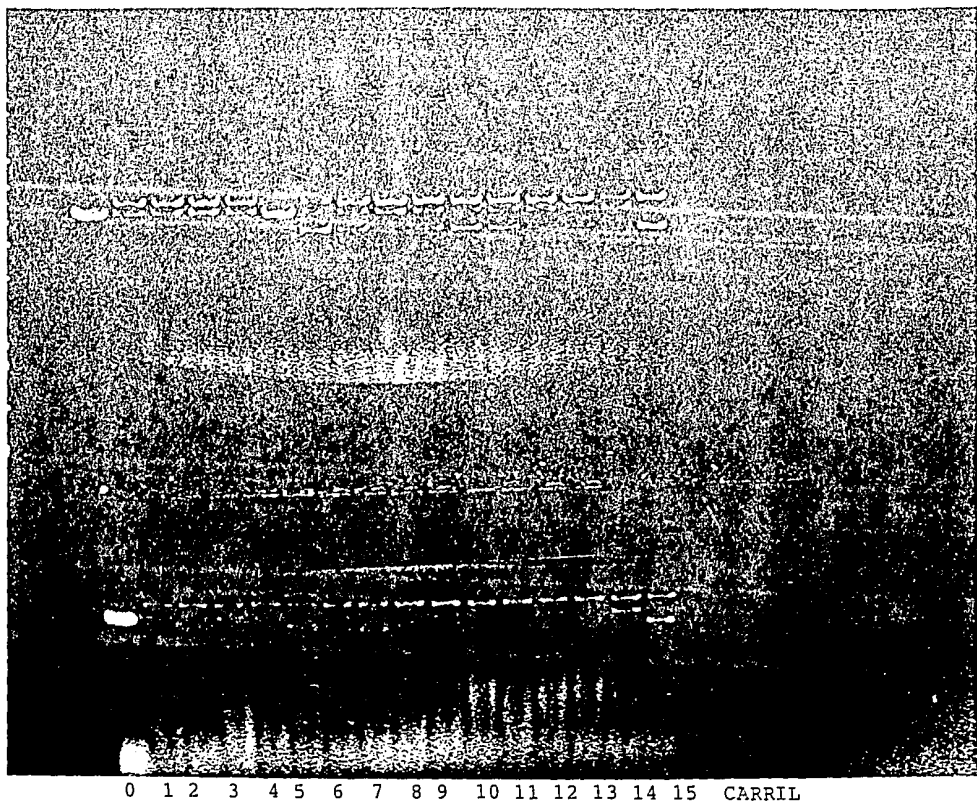


FIGURA 11. Digestiones de plásmido (pUC13) con extractos crudos de las endonucleasas mutantes. Carril 0 plásmido lineal; 1, Cisteína 200; 2, Cisteína 144; 3, Lisina 200; 4, Histidina 200; 5, silvestre; 6, cepa; 7; Valina 144-Treonina 145; 8, Treonina 144; 10, Glicina 144 y 12 lisina 145. En el gel (agarosa al 0.8%) superior el DNA no se encuentra metilado, en el inferior el DNA se encuentra metilado. La reacción se dejó durante 25 minutos, en un volumen de 10  $\mu$ l. Las condiciones de reacción se dan en material y métodos.



### 9.3. Purificación parcial de las enzimas.

Como control de la eficiencia del método para purificar se usó la enzima silvestre. Se conoce que la endonucleasa silvestre eluye de la columna de fosfocelulosa cuando el buffer de elución tiene una fuerza iónica de 0.6 M de NaCl. En nuestras condiciones de purificación, la fracción de elución ya mencionada presenta la enzima. Esto se determinó por dos criterios: el **primero** se basa en el hecho de que esta fracción es rica en una proteína que corresponde al peso molecular de endonucleasa y casi no presenta otras proteínas (Figura 12 Carril 2 y 4). El **segundo** criterio se basa en la actividad de corte específico que presenta esta fracción. La fracción de 0.6 M de NaCl mostró una digestión total en 1 hora y no se observó degradación, lo que indica su pureza (datos no mostrados). Además, digestiones de toda la noche no mostrarán degradación del plásmido y no cortaban el DNA metilado (datos no mostrados).

La purificación parcial de las endonucleasas mutantes presentó dificultades, la fracción de 0.6 M de NaCl no presentaba la máxima actividad de corte, las fracciones con una menor fuerza iónica presentan una actividad de corte mayor, pero no se usaron ya que los extractos de la cepa sin el plásmido presentaban una actividad de corte en esta fracción. Las fracciones con una fuerza iónica de 0.6 y 0.7 M de NaCl de la cepa no muestran actividad de corte (figura 13, carril 2-5 cepa sin el gen de la endonucleasa 0.2, 0.4, 0.6 y 0.7 M de NaCl respectivamente). La mutante Cys 144 mostró actividad de corte en la fracción de 0.6 M de NaCl, pero las fracciones de una fuerza iónica menor presentaron una actividad de corte

mayor, pero con un mayor barrido (figura 13, carriles 6-9). La mutante Cys 200 también mostró un comportamiento parecido al anterior (figura 13 carriles 14-17). Las demás mutantes presentaron el mismo comportamiento, por lo que no se muestran datos de ellas.

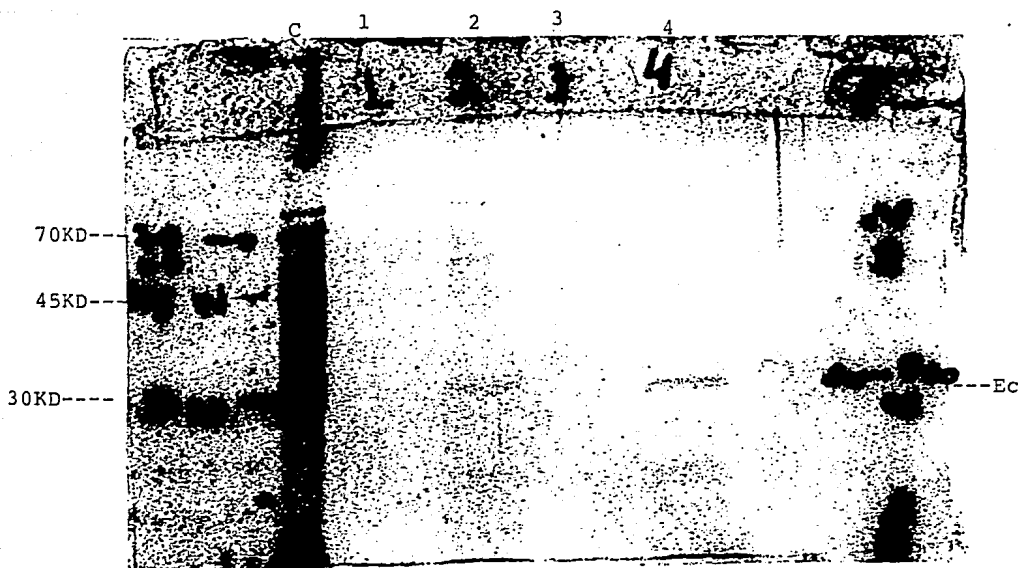
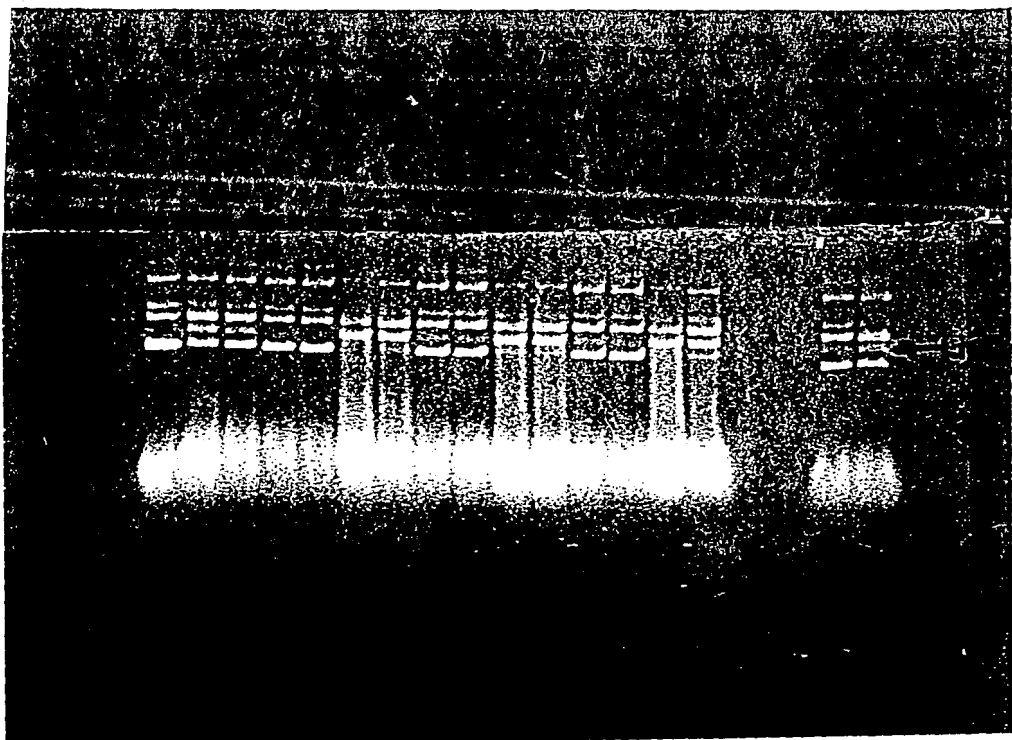


FIGURA 12. Gel de proteínas de las fracciones de la columna de fosfocelulosa. El carril c corresponde a marcadores de peso molecular. Los carriles 2 y 4 corresponden a las fracciones de elución de una fuerza iónica de 0.6 M de NaCl. La endonucleasa migra como una molécula de 30 Kd, su peso molecular deducido de su secuencia nucleotídica es de 31065 d. El gel es desnaturizante de acrilamida al 10%. En material y métodos se dan las condiciones de corrida.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 14 15 16 17

FIGURA 13. Digestiones de plásmido (pUC13) con las fracciones de elución de la columna de fosfocelulosa. Carril 1, control sin digerir; 2-5 fracciones de la cepa sin plásmido (0.2, 0.4, 0.6 y 0.7 de NaCl M). Carriles 6-9 mutante Cisteína 144 y carriles 14-17 mutante Cisteína 200. Las fracciones de elución son las mismas que la cepa. El tiempo de digestión fue de 8 horas.

## 10. DISCUSION

La mutagénesis dirigida convencional cuando se aplica para mutar varios residuos que se encuentran lejanos en la secuencia polipeptídica, genera una población que presenta una preferencia particular hacia cierto tipo de mutaciones. En la población predominan las mutaciones sencillas o dobles, pero no las múltiples. Esto se debe a que en la mutagénesis el oligo que porta una mutación es eficiente para introducirla, pero no podemos hacer que se combine de manera eficiente con otras posiciones a mutar cuando se modifican regiones alejadas en la estructura primaria de la proteína (3).

La mutagénesis desarrollada en el laboratorio usa el codón como unidad de mutagénesis y no la base nucleotídica; esto permite que sólo existan 20 posibles cambios en cada sitio (uno para cada aminoácido) y no los 64 posibles cambios que se generan cuando la unidad mutagénica es el nucleótido (son 64 posibles codones, tres de los cuales son de término) (3). Así la población de secuencias mutantes que se genera es de  $20^3$  (8000) y no de  $4^9$  (262144), como cuando se usa el segundo método. Los dos métodos generan las mismas combinaciones de aminoácidos (8000), pero cuando se usa el codón como unidad de mutagénesis la población que contiene todas las combinaciones es menor que cuando el nucleótido es la unidad mutagénica. La ventaja de usar el codón como unidad mutagénica es más patente cuando la población de residuos a mutar es grande. En la actualidad se puede reducir la población generada cuando se usa el nucleótido como unidad de mutagénesis. El principio en el que se basa es el siguiente: durante la síntesis

del oligonucleótido se usa una mezcla con las cuatro bases en las dos primeras posiciones del codón a modificar, en la tercera posición se usa una mezcla que contiene sólo dos bases (Guanina y Citocina). Esta combinación genera 32 codones que codifican para los 20 aminoácidos y dos de término. Así la población de secuencias que se genera es menor y por lo tanto los mutantes se encuentran en una menor población. Los dos métodos tienen sus pros y contras y dependiendo del objetivo de la mutagénesis se hace la elección (3, 107).

Nosotros afirmamos que la mutagénesis es funcional ya que a pesar de que la cantidad de mutantes secuenciadas no es alta (13 en total, tabla 2), no muestra un sesgo para un tipo determinado de mutantes (simples, dobles o triples). La cantidad que se espera de forma teórica (suponiendo que la eficiencia de acoplamiento sea igual para todas las bases, así, como que no existan artefactos durante la manipulación enzimática) es de 12.5% de fenotipos silvestres, 37.5% de mutantes sencillas, 37.5% de mutantes dobles y 12.5% de mutantes triples. La transformación con la mezcla de genes mutantes de la endonucleasa genera tres fenotipos, y se observó que la cantidad de colonias transformantes con un fenotipo transparente (alta actividad de la endonucleasa) correspondían aproximadamente al 10% del total de mutantes. El genotipo de estos mutantes mostró que se trataban de genes pseudosilvestres (Pseudosilvestre se refiere a que el codón que porta es distinto al silvestre, pero codifica para el mismo aminoácido), por lo que se puede inferir que este fenotipo corresponde al de genes pseudosilvestres, siendo la proporción observada bastante cercana a la esperada (Datos no mostrados).

La cantidad de mutantes sencillas, dobles y triples no se puede determinar directamente por fenotipo, ya que la mayoría de los fenotipos que generan son parecidos (colonia de crecimiento normal, una baja actividad de la endonucleasa). La baja cantidad de mutantes secuenciadas no permite afirmar que se da la distribución esperada, pero sí que la mutagénesis da variedad. En los mutantes secuenciados de acuerdo a los fenotipos no se observó la presencia de todos los aminoácidos usados en la mutagénesis (Tabla 2). Cuando se secuenciaron de manera directa los fragmentos mutantes, se encontraron aminoácidos no observados en el caso anterior (Tritofano, Aspártico, Histidina e Isoleucina; tabla 2). Este fenómeno se puede explicar por el siguiente argumento: la selección por fenotipo genera un sesgo incierto. Cuando se seleccionaron mutantes que tenían un fenotipo que indicaba una menor actividad de la enzima, la variedad de mutantes era mayor. La secuencia directa de los fragmentos producidos no crea un sesgo, por lo cual aparecen mutantes no observados en el otro caso.

La purificación parcial de la endonucleasa mutante mostró dificultades, sin embargo, en el caso de la enzima silvestre, no se observaron estas dificultades (Figura 12). La enzima silvestre eluye de la columna de fosfocelulosa cuando la fuerza iónica del amortiguador es de 0.6 M de NaCl (Figura 12). En las mutantes la máxima actividad de corte se observa en otras fracciones, ésta muestra corte inespecífico y por ello no se pueden tomar como un dato fuerte en favor de una mayor actividad. En la literatura se ha reportado que algunas mutantes muestran problemas para su purificación a homogeneidad. Ciertos autores reportan que la endonucleasa mutante Glutámico<sup>144</sup>-Glutamina se pierde en el paso de la columna

de fosfocelulosa. La pérdida la estiman en un 90% de la proteína presente (103). También se ha reportado que algunas mutaciones (ejem. Lys 144) alteran la capacidad de la enzima para dimerizar (70). Todos estos datos nos permiten explicar los problemas que se observaron. En primer lugar, cuando se le modifica un aminoácido la carga neta de la enzima se altera, el principio en que se basa la unión de una proteína a esta resina reside en su carga neta; así al alterar su carga neta la unión de la enzima a la resina se hace más lábil y una menor fuerza iónica hace que la enzima eluya. La mutante que mostró alterada su capacidad de dimerización tenía una substitución no conservativa y se purificó a homogeneidad. Las mutaciones alteran las propiedades de elución de la enzima (103), pero no podemos asegurar que se deba a que se altere su carga neta de la enzima. Una mejor explicación debe tomar en cuenta la carga neta y la conformación de la proteína mutante.

El método de detección *in vivo* mostró ser bastante eficiente para detectar la actividad de las mutantes generadas. La mutante Cys 144 que en el ensayo mostró ser de las más activas también lo fue *in vitro* (Tabla 2 y Figura 10). Estos resultados concuerdan con datos similares reportados en la literatura (67). Se ha reportado que el comportamiento *in vivo* es distinto al *in vitro*. En algunos casos se puede detectar actividad *in vivo* pero no *in vitro*, por ello el ensayo del fenotipo que presenta la colonia es un mejor indicativo de la actividad de la mutante.

Entre las mutantes caracterizadas en esta tesis varias son relevantes por mostrar actividad y retener su especificidad a pesar de presentar cambios no conservativos en los residuos que establecen los contactos que se proponen median la



especificidad. Estas mutantes son las siguientes: Cys144, Thr144, Val144-Thr145, Lys145 y Cys200 (figura 10 y 11).

Los criterios que permiten afirmar su actividad se basan en observaciones tanto *in vivo* como *in vitro*. Las mutantes más activas son dos: Cys144 y Cys200. En el ensayo *in vivo* la célula que porta el gen mutante Cys144 crece pobremente en represión del gen y muere cuando se induce la expresión del mismo. La mutante Cys200 en represión muestra un efecto menos deletéreo hacia la célula, el cual se hace más patente cuando se induce. Las otras tres mutante no muestran un efecto deletéreo cuando se encuentran reprimida su expresión, pero cuando se induce la expresión, dos de ellas (Thr144 y Val144-Thr145) apenas permiten el crecimiento de la célula. La otra mutante presenta un efecto deletéreo menor en inducción (tabla 2).

En el ensayo *in vitro* se observó que las mutantes presentaban una actividad de corte menor que la enzima silvestre (Figura 11).

Se ha reportado que la mutante Cys144 es de las que genera una mayor actividad *in vivo*, siendo letal para la célula que la expresa. En ese reporte, la actividad se midió por el ensayo de respuesta SOS (65, 67), esto es indicativo de que la mutante realiza corte al menos de una hebra del DNA cromosomal y por lo tanto, el efecto deletéreo que observamos es por la actividad de la endonucleasa y no debido a un efecto tóxico por la acumulación de la enzima como se ha reportado para algunas otras mutantes (69).

La mutante Cys200 es la que presenta una actividad menor, pero se ha reportado que esta mutante genera una fuerte actividad *in vivo*, al ser también medida por el

ensayo de respuesta SOS. Esta mutante no es letal para la célula que la porta, pero apenas permite el crecimiento de la célula.

Las mutantes Thr144 y Val144-Thr145 no muestran una actividad deletérea para la célula cuando la expresión del gen no está inducida, pero cuando se induce, apenas permiten el crecimiento de la célula en ausencia de la metilasa.

La mutante Lys145 es la que presenta la menor actividad *in vivo*, mostrando un efecto deletéreo pequeño hacia la célula que porta el gen inducido (tabla 2 y Figura 10).

Esta colección de mutantes muestra cambios no conservativos en las tres posiciones que se han propuesto son mediadores de la especificidad de la endonucleasa hacia su sitio de reconocimiento, sin embargo, la actividad de las mismas es sensible a la presencia de la metilasa **EcoRI** (figura 10).

Su actividad *in vitro* medida a partir de los extractos crudos muestra que cortan el substrato no metilado con una menor eficiencia que la enzima silvestre. Cuando se usa como substrato DNA metilado se observa que existe un corte del substrato, pero este corte no es producido por la endonucleasa ya que *in vivo* la metilasa protege a la célula de la acción de la endonucleasa. Este corte se observa en el extracto de la enzima silvestre; así, el corte que observamos del plásmido se puede deber a la actividad de nucleasas inespecíficas presentes en la célula y no a la **EcoRI**.

La actividad *in vitro* de las mutantes, medida de la enzima purificada parcialmente, mostró que varias mutantes presentaban una actividad de corte inespecífico; esta actividad no se observaba en la preparación de la enzima silvestre. Una posible

explicación de este fenómeno es la siguiente: la endonucleasa silvestre corta las dos hebras por evento de unión y las mutantes tienen alterados sus parámetros enzimáticos. Las mutantes se unen muy poco tiempo (65, 67) al sitio de reconocimiento, esto ocasiona que sólo corten una hebra del DNA. Cuando se encuentra una hebra rota, se desencadena la activación del operón del sistema SOS, con lo que se induce la expresión de varias nucleasas. Este estado fisiológico puede desencadenar otras respuestas que produzcan nucleasa aparte de las del sistema SOS. En la literatura existe el reporte concerniente a la preparación de extractos crudos de diversas mutantes que no muestran una actividad de corte específico (50). Así, de 20 mutantes que se ensayaron sólo 4 generan un patrón de corte específico sobre el DNA de lambda. Algunas de las mutantes ensayadas se han purificado a homogeneidad y no muestran el corte inespecífico observado en el extracto crudo (69, 70). Esto demuestra que las mutaciones no modifican la especificidad de la endonucleasa, ya que se podría pensar que las mutaciones relajan la especificidad de la enzima y pueda éstas entonces cortar en otros sitios diferentes al canónico.

Como ya se mencionó, varias de nuestras mutantes pierden residuos de aminoácidos que son responsables de la especificidad hacia su sitio de reconocimiento. La base teórica que soporta que la especificidad está determinada por la formación de puentes de hidrógeno fue desarrollada por Rich y col. a mediados de los años 70. Ellos postularon que para la identificación de una base por una proteína deberían formarse dos puentes de hidrógeno entre ellos (25). En la actualidad con el mejoramiento de la cristalografía de rayos X se ha determinado

la estructura tridimensional de varias enzimas que interactúan de manera específica con DNA, en ellas se han observado contactos directos con las bases, mediados por puentes de hidrógeno. No se ha observado la existencia de un código único de reconocimiento, es decir, una base puede ser contactada por diferentes aminoácidos y no sólo por uno (30). Los experimentos donde se han modificado los residuos que contactan con las bases del sitio de reconocimiento de los represores, han demostrado que son importantes para la especificidad del mismo (30). En otros experimentos donde se han intercambiado los dominios que interactúan con DNA se ha observado que la especificidad reside en estos dominios (24).

Los cambios en cada posición afectan los patrones de formación de puentes de hidrógeno que se pueden establecer con las bases del DNA del sitio canónico. La sustitución de Glu144 por Cys, Thr ó Val destruye la capacidad de la formación de los puentes de hidrógeno con los grupos 6 amino exocíclicos de las adeninas. La sustitución de Arg145 por Lys puede generar la pérdida de puente de hidrógeno, así no se pierden totalmente los contactos con los grupos 7 aminos exocíclicos de las adeninas del sitio canónico ya que la distancia no sufre un cambio drástico. La sustitución con Thr sí rompe los posibles puentes de hidrógeno con las bases. Por último, la sustitución de Arg 200 por Cys también rompe la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno con el nitrógeno de la guanina, pero puede conservar el puente que se forma con el oxígeno 6 de la guanina (62, 96, 98). Además las mutaciones pueden crear impedimentos estéricos que alteren su capacidad para contactar con las bases.

Las mutaciones que se han reportado, así como las que se encontraron en el presente trabajo muestran que probablemente no es posible modificar la especificidad de la endonucleasa cuando se alteran estos residuos (ver tablas 1 y 2).

En el momento de haber terminado el trabajo experimental apareció un artículo donde se menciona que la estructura determinada por McClarin *et al* en 1986 (62) presenta varios errores. La nueva estructura (99) muestra que la posición 144 podría estar más alejada de las bases que se proponía contactaba, pero no lo suficiente para descartarlo (Figura 3). Las otras dos posiciones implicadas en los contactos directos no sufren cambios drásticos; así, es interesante notar que en nuestra colección no se detectaron mutaciones dobles que afectaran las posiciones 145 y 200. Tampoco en la literatura se reportan este tipo de mutaciones (ver tablas 1 y 2). Por otro lado se observó que la transformación con mezcla de ligación del pKGS con el inserto mutante en la cepa que portaba el gen de la metilasa no mostraba la presencia de mutantes con cambio de especificidad. Así, la falta de este tipo de mutantes se puede tratar de explicar de dos maneras. La primera es que la mutagénesis presente una falla en la generación de este tipo de mutantes (por ejemplo, que durante la síntesis la proporción de trímeros adicionados se haya alterado). Este punto se puede descartar por el hecho de que por selección directa (clonación el fago M13 mp19) no se encontró este tipo de mutación, pero esto no es concluyente ya que la cantidad de mutantes estudiada por este método es pequeña. Lo cual no es un indicativo de la validez de esta explicación. Otra posible explicación es que estas dos posiciones sean importantes en la determinación de la especificidad y por ello no se encuentren este tipo de mutantes. En la selección por

fenotipo se eligieron en la mayoría de los casos, aquellas que presentaban un aspecto nulo, lo que podría explicar la falta de estas mutantes. En conclusión, no podemos afirmar cualquiera de las dos explicaciones por la pequeña proporción de mutantes secuenciadas.

Otro aspecto que se muestra en la estructura nueva es la existencia de un segmento estructurado de la endonucleasa que se encuentra muy cercano al DNA, este fregmento va del residuo 137 al 143 (**Met-Ala-Ala-Gly-Asn-Ala-Ile**). Esto puede indicar la existencia de contactos adicionales que pueden determinar la especificidad. Estos contacto pueden ser puentes de hidrógeno de la asparagina 141 con los grupos aminos exocíclicos de las adeninas que le quedan cerca en la nueva estructura. Además esta región es rica en aminoácidos no polares que pueden estar interaccionando con las bases y así determinar la especificidad. Con respecto a esta zona se ha reportado que el residuo 138 (Ala) altera la actividad de la endonucleasa. La alteración consiste en que la enzima aumenta la actividad estrella en condiciones de reacción normales (101). Esto puede indicar que este residuo es importante en el reconocimiento del sitio canónico por la endonucleasa. Los residuos hidrofóbicos son importantes ya que estos pueden interaccionar a través de contactos hidrofóbicos con los grupos metilos de las timinas del sitio canónico. Así se ha reportado que en un homeodominio existe una Ile que interacciona con las timinas de su DNA blanco (106). Se ha observado que cuando se modifican las timinas del sitio canónico se afecta la actividad de la endonucleasa (67). Por otro lado se ha observado que la citocina del sitio canónico cuando se encuentra metilada inhibe la actividad de corte de la endonucleasa sobre el DNA de

un fago. Cuando este mismo DNA no se encuentra metilado no se observa esta inhibición (67).

No se puede asegurar que estos residuos estén contactando de la manera descrita ya que como menciona Matthews (30), no se ha encontrado un código que permita saber qué aminoácido va a contactar una base; lo que podemos inferir es que un aminoácido puede contactar una base, pero esto no es totalmente seguro que se dé en nuestra proteína. Así él encontró que una base puede ser reconocida por varios aminoácidos así como que varios aminoácidos pueden contactar con una sola base (30).

La explicación alternativa para la ausencia de cambios de especificidad es que exista un aporte informacional por parte del sitio canónico. El sitio de reconocimiento muestra una estructura que se aparta de la forma B del DNA (61). Esta conformación que es dependiente de la secuencia puede jugar un papel importante en el mecanismo de reconocimiento del sitio canónico. Un mecanismo propuesto es que la interacción entre la endonucleasa y el sitio de reconocimiento ocasiona que la misma sufra un cambio conformacional por el cual se activa (92). El modelo propone que la conformación de DNA guía a la enzima para alcanzar su estado funcional. Existe evidencia de que cuando se altera la conformación del DNA sin alterar drásticamente el patrón de formación de puentes de hidrógeno, los parámetros de unión de la enzima hacia el DNA se alteran drásticamente. Así, se observa que la unión de la enzima hacia su blanco es dependiente de la conformación del sitio de reconocimiento. Se ha reportado que la secuencia de reconocimiento del represor de lambda presenta una base que no es contactada

directamente por la proteína, y que su sustitución por otra base altera la unión del represor por su secuencia blanco (20). Esto se puede interpretar como una prueba de que el DNA aporta información a la proteína que interactúa con él. Si la endonucleasa muestra esta dependencia de la conformación, para lograr modificar la especificidad de la endonucleasa es necesario alterar otros residuos que no contactan con las bases del DNA, pero que influyen en el reconocimiento de la estructura del DNA.

Un último punto a tratar es el hecho de que una mutante que en nuestras manos es activa (Thr144) se ha reportado como inactiva (67). Así también se han reportado que algunas mutantes son activas y en muestras manos son inactivas (Gly144 y Lys200) (Tablas 1 y 2). Las diferencias observadas se pueden explicar por dos hechos: el primero se refiere a que el gen que usamos porta una mutación adicional (Asp160). Esta mutación se encuentra cercana a la hélice que porta los residuos 144 y 145 (99). No se conoce bien cual es el efecto de esta mutación, pero se ha observado que altera el comportamiento de la enzima *in vivo*. Así una posible explicación es que esta mutación sea la responsable del comportamiento observado. Se ha reportado la existencia de mutaciones que modifican la actividad de algunas mutantes. Así algunas mutaciones que no tenían actividad, la adquieren cuando se mutan en otras posiciones (101).

La explicación de que la mutación en la posición 160 altera el comportamiento de nuestras mutantes es bastante posible. Se está cambiando esta mutación en los genes que muestran discrepancias con los resultados reportados en la literatura.



La segunda explicación se basa en el hecho de que las capas bacterianas no son las mismas en los distintos trabajos. Se ha observado que existe una tolerancia a la presencia del gen dependiendo de la cepa utilizada. La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  no tolera la presencia del gen silvestre, mientras que la cepa JM101 sí lo tolera. Esto puede explicar las discrepancias observadas.

## 11. CONCLUSIONES

En resumen, se validó la eficiencia del método de mutagénesis desarrollado en el laboratorio. Este método es eficiente para mutar de manera combinatoria residuos que se encuentran alejados de la estructura primaria de la proteína.

Se desarrolló un método para la purificación de la endonucleasa **EcoRI** de manera económica. La técnica permite purificar la endonucleasa libre de actividad inespecífica y la enzima purificada se puede usar para fines de laboratorio, pero no es eficiente para la purificación de mutantes.

La colección de mutantes que se caracterizó presenta mutantes simples, dobles y triples. En ella se observan mutantes que retienen actividad a pesar de presentar cambios que destruyen la formación de puentes de hidrógeno entre la proteína (residuos Glutámico 144, Arginina 145 y Arginina 200) y las bases del DNA.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wetzerl, R.. What is protein engineering?. *Protein Engineering* 1 # 1, (1986) pp 3-5.
- 2.- Goldenberg, David P.. Circularly permuted proteins. *Protein Engineering* 2 # 7, (1989) pp 493-495.
- 3.- Leatherbarrow, Robin J. y Fersht, Alan R.. Protein engineering. *Protein Engineering* 1 # 1, (1986) pp 7-9.
- 4.- Ulmer, Kevin M.. Protein engineering. *Science* 219, (1983) pp 666- 673.
- 5.- Sali, A.; Overing, J. P.; Johnson, M. S. y Blundell, T. L.. From comparisons of protein sequences and structures to protein modelling and design. *TIBS* 15, (1990) pp 235-240.
- 6.- Wells, James A. y Estell, David A.. Subtilisin-an enzyme designed to be engineered. *TIBS* 13, (1988) pp 291-297.
- 7.- Brady, Leo; Brzozowki, Andrzej M.; Derewenda, Zygmunt S.; Dodson, Eleanor; Dodson, Guy; Tolley, Shirley; Tukenburg, Johan P.; Christiansen, Lars; Huges-Jensen, Birgitte; Norskov, Leif; Thim, Lars y Mengen, Ulrich. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343, (1990) pp 767-770.
- 8.- Takagi, Hiroshi; Takahashi, Takako; Momose, Haruo; Inouye, Masayori; Maeda, Yoshimi; Matsuzawa, Hiroshi y Ohta, Takahisa. Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease. *J. Biol. Chem.* 265 # 12, (1990) pp 6874-6878.

- 9.- Imanaka, Tadayuki; Shibazaki, Mitsuyoshi y Takagi, Masahiro. A new way of enhancing the thermostability of proteases. *Nature* 234, (1986) pp 695-697.
- 10.- Baldwin, Enoch y Schultz, Peter G.. Generation of catalytic antibody by site-directed mutagenesis. *Science* 245, (1989) pp 1104-1107
- 11.- Nicholson, H.; Becktel, W. J. y Matthews, B. W.. Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with  $\alpha$ -helix dipoles. *Nature* 336, (1988) pp 651- 656.
- 12.- Matthews, B. W.; Nicholson, H. y Becktel, W.j.. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, (1987) pp 6663-6667.
- 13.- Alber, Tom; Dao-pin, Sun; Wilson, Keith; Wozniak, Joan A.; Cook, Sean P. y Matthews, Brian W.. Contributions of hydrogen bonds of Thr 157 to the thermodynamic stability of phage T4 lysozyme. *Nature* 330, (1987) pp 41-46.
- 14.- Matsumura, Masazumi y Matthews, Brian W.. Control of enzyme activity by an engineered disulfide bond. *Science* 243, (1989) pp 792-796.
- 15.- Cunningham, Brian C.; Henner, Dennis J. y Wells, James A.. Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor. *Science* 247, (1990) pp 1461-1465.
- 16.- Crawford, Irving P.; Niermann, Thomas y Kirschner, Kasper. Prediction of secondary structure by etionary comparison: application to the  $\alpha$  subunit of tryptophan synthase. *Proteins*, (1987) pp 118-129.
- 17.- Schulz, Georg. A critical evaluation of methods for prediction of protein secondary structures. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, (1988) pp 1-21.

- 18.- Taylor, William R.. Protein structure prediction. en: *Nucleic acid and protein sequence analysis*. (ed) Bishop, M. J. y Rawlings, C.J.. IRL Press, USA. (1987) pp 285-322.
- 19.- Horowitz, Marshall S. Z. y Loeb, Lawrence A.. An *E coli* promoter that regulates transcription by DNA superhelix-induced cruciform extrusion. *Science* 241, (1988) pp 703-705.
- 20.- Fujimoto, Bryant S. y Schurr, J. Michael. Dependence of the torsional of DNA on base composition. *Nature* 344, (1990) pp 175-178.
- 21.- Hagerman, Paul J.. Pyrimidine 5-methyl groups influence the magnitude of DNA curvature. *Biochemistry* 29, (1990) pp 1980-1983.
- 22.- Diekmann, Stephan y Mclaughlin, Larry W.. DNA curvature in native and modified EcoRI recognition sites and possible influence upon the endonuclease cleavage reaction. *J. Mol. Biol.* 202, (1988) pp 823-834.
- 23.- Nerdal, Willy; Hare, Dennis R. y Reid, Brian R.. Solution structure of the EcoRI DNA sequence: refinement of NMR-derived distance geometry structures by NOESy spectrum back-calculations. *Biochemistry* 28, (1989) pp 10008-10021.
- 24.- Travers, Andrew A.. DNA conformation and protein binding. *Annu. Rev. Biochem.* 58, (1989) pp 427-452.
- 25.- Seeman, Nadrian C.; Rosenberg, John M. y Rich, Alexander. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 # 3, (1976) pp 804-808.
- 26.- Otwinowski, Z.; Schevitz, R. W.; Zhang, R. G.; Lawson, C. L.; Joachimiak, A.; Marmorstein, R. Q.; Luisi, B. F. y Sigler, P. B.. Crystal structure of trp

- repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature* 335, (1988) pp 321-329.
- 27.- Richmond, Timothy J. *Yakul International Symposium*, 1988. pp 25-38.
- 28.- Johnson, Peter F. y McKnight, Steven L.. Eukaryotic Transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, (1989) pp 799-839.
- 29.- Pabo, Carl O.; Aggarwal, Aneel K.; Jordan, Steven R.; Beamer, Lesa J.; Obeysekare, Upul R. y Harrison, Stephen C.. Conserved residues make similar contacts in two repressor-operator complexes. *Science* 247, (1990) pp 1210-1213.
- 30.- Matthews, Brian W.. No code for recognition. *Nature* vol 335, (1988) pp 294-295.
- 31.- Lee, Min S.; Gippert, Garry P.; Soman, Kizhake V.; Case, David A. y Wright, Peter E.. Three-dimensional solution structure of single zinc finger DNA-binding domain. *Science* 245, (1989) pp 635-637.
- 32.- Struhl, Kelvin. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *TIBS* 14, (1989) pp 137-140.
- 33.- Rajavashisth, Tripathi B.; Taylor, Annette K.; Andalibi, Ali; Svenson, Karel L. y Lysis, Aldons J.. Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element. *Science* 245, (1989) pp 640-643.
- 34.- Busch, Steven J. y Sassone-Corsi, Paolo. Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *TBG* 6 # 2, (1990) pp 36-40.
- 35.- Gentz, Reiner; Rauscher III, Frank J.; Abate, Cory y Curran, Tom. Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science* 243, (1989) pp 1695-1699.

- 36.- Turner, Richard y Tjian, Robert. Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* 243, (1989) pp 1689-1694.
- 37.- Landschulz, William H.; Johnson, Peter F. y McKnight, Steven L.. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, (1988) pp 1759-1764.
- 38.- Vinson, Charles R.; Sigler, Paul B. y McKnight, Steven. Scissors-Grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246, pp 911-916.
- 39.- Tabata, Tetsuya; Takase, Hisabimi; Takayama, Shinobu; Mikami, Koji; Nakatsura, Atsunori; Kawata, Takefumi; Nakayama, Takuya y Iwabuchi, Masaki. A protein that binds to a *cis*-acting element of wheat histone genes has a leucine zipper motif. *Science* 245, (1989) pp 965-971.
- 40.- Smith, Hamilton O.. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science* 205, (1979) pp 455-462.
- 41.- Arber, Werner. Promotion and limitation of exchange. *Science vol 205*, (1979) pp 361-365.
- 42.- Greene, Patricia; Gupta, Madhu y Boyer, Helbert W.. Sequence analysis of the DNA EcoRI endonuclease and methylase. *J. Biol. Chem.* 256 # 5, (1981) pp 2143-2153.
- 43.- Terry, Brian J.; Jack, William E.; Rubin, Robert A. y Modrich, Paul. Thermodynamic parameters governing interaction of EcoRI endonuclease with specific and nonspecific DNA Sequences. *J. Biol. Chem.* 258 # 15, (1983) pp 9820-9825.

- 44.- Modrich, Paul y Roberts, Richard J.. *Nucleases* (ed. Roberts; Linn); (1982); Cold Spring Harbor Laboratory. USA. pp 109-154.
- 45.- Stephenson, Frank H.; Ballard, Barry T.; Boyer, Herbert W.; Rosenberg, John M. y Greene, Patricia J.. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the RsrI and EcoRI restriction endonucleases. *Gene* 85, pp 1-13.
- 46.- Terry, Brian J.; Jack, William E. y Modrich, Paul. Facilitated diffusion during catalysis by EcoRI endonuclease. *J. Biol. Chem.* 260 # 24, (1985) pp 13130-13137.
- 47.- Modrich, Paul y Zabel, Donna. EcoRI endonuclease. *J. Biol. Chem.* 251 # 19, (1976) pp 5866-5874.
- 48.- Polisky, Barry; Greene, Patricia; Garfin, David E.; McCarthy, Goodman, Howaed M. y Boyer, Herbert W.. Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 # 9, (1975) pp 3310-3314.
- 49.- Jean-Jacobson, Linda; Kurpiewski, Michael; Lesser, David; Grable, John; Boyer, Herbert W.; Rosenberg, John M. y Greene, Patricia J.. Coordinate ion pair formation between EcoRI endonuclease and DNA. *J. Biol. Chem.* 258 # 23, (1983) pp 14638-14646.
- 50.- Thielking, Vera; Alves, Jurgen; Fliess, Anja; Maass, Gunter y Pingoud, Alfred. Accuracy of the EcoRI restriction endonuclease: binding and cleavage studies with oligodeoxynucleotide substrates containing degenerate recognition sequences. *Biochemistry* 29, (1990) pp 4682-4691.
- 51.- Greene, Patricia J.; Ballard, Barry T.; Stephenson, Frank; Kohr, William J.; Rodriguez, Henry; Rosenberg, John M. y Boyer, Herbert W.. Purification and characterization of the restriction endonuclease RsrI, an isoschizomer of EcoRI.



*Gene* 68, (1988) pp 43-52.

52.- McLaughlin, Larry W.; Benseler, Fritz; Graeser, Erika; Piel, Norbert y Scholtisserk, Stephan. Effects of functional group changes in the EcoRI recognition site on the cleavage reaction catalyzed by the endonuclease. *Biochemistry* 26, (1987) pp 7238-7245.

53.- Jen-Jacobson, Linda y Lesser, David. The enfolding arms of EcoRI endonuclease: role in DNA binding and cleavage. *Cell* 45, (1986) pp 619-629.

54.- Kaszbska, Wiweka; Aiken, Christopher; O' Connor, David y Gumpert, Richard I.. Purification, cloning and sequence of analysis of RsrI DNA methyltransferase: lack of homology between two enzymes, RsrI and EcoRI, that methylate the same nucleotide in identical recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* 17 # 24, (1989) pp 10403-10425.

55.- Becker, Michael M.; Lesser, David; Kurpiewski, Michael; Baranger, Anne y Jen-Jacobson, Linda. "Ultraviolet footprinting" accurately maps sequence-specific contacts and DNA kinking in de EcoRI endonuclease-DNA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, (1988) pp 6247-6251.

56.- Scholtissek, Stephan; Pingoud, Alfred; Maass, Gunter y Zabeau, Marc. Polypeptide sequencesa ined in the cleavage of DNA by the restriction endonuclease EcoRI. *J. Biol. Chem.* vol 261 # 5, (1986) pp 2228-2234.

57.- Geiger, Robert; Ruter, Thomas; Alves, Junger; Fliess, Anja; Wolfes, Heiner ; Pingoud, Vera; Ulbanke, Claus; Maass, Gunter; Pingoud, Alfred; Dusterhoft, Andreas y Kroger, Manfred. Genetic engineering of EcoRI mutants with altered amino acid residues in the DNA binding site: physicochemical investigations give evidence for

an altered monomer/dimer equilibrium for the Gln 144 Lys145 and Gln144 Lys145 Lys200 mutants. *Biochemistry* 28, (1989) pp 2667-2677.

58.- Greene, Patricia J.; Heyneker, Herbert L.; Bolivar, Francisco; Rodriguez, Raymond L.; Betlach, Mary C.; Covarrubias, Alejandra A.; Beckman, Keith; Russel, David J.; Tait, Robert y Boyer Herbert W.. A general method the purification of restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 5 # 7, (1978) pp 2373-2380.

59.- Oelgeschlager, Thomas; Geiger, Robert; Ruter, Thomas; Alves, Jurgen; Fliess, Anja y Pingoud, Alfred. Probing the function of individual amino acid residues in the DNA binding of the EcoRI restriction endonuclease by analysing the toxicity of genetically engineered mutants. *Gene* 89, (1990) pp 19-27.

60.- Reich, Norbert O. y Everett, Elizabeth A.. Identification of peptides in S-adenosylmethionine binding in the EcoRI DNA methylase. *J. Biol. Chem.* 265 # 15, (1990) pp 8929-8934.

61.- Alves, Jurgen; Ulbanke, Claus; Fliess, Anja; Maass, Gunter y Pingoud, Alfred. Fluorescence stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the EcoRI restriction endonuclease. *Biochemistry* 28, (1989) pp 7879-7888.

62.- McClarin, Judith A.; Frederick, Christin A. Wang, Bi-Cheng; Greene, Patricia; Boyer, Herbert W.; Glable, John y Rosenberg, John M.. Structure of the DNA-EcoRI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* 243, (1986) pp 1526-1541.

63.- King, Klim; Benkovic, Stephen J. y Modrich, Paul. Glu-111 is required for activation of the DNA cleavage center of EcoRI endonuclease. *J. Biol. Chem.* 264 #

20, (1989) pp 11807-11815.

64.- Stephenson, Frank H. y Greene, Patricia J.. Nucleotide sequence of the gene encoding the RsrI methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 17 # 24, (1989) p 10503.

65.- Heitman, Joseph; Zilder, Norton D. y Model, Peter. Repair of the *Escherichia coli* chromosome after *in vivo* scission by the EcoRI endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, (1989) pp 2281-2285.

66.- Heitman, Joseph; Fulford, Wilder y Model, Peter. Phage trojan horses: a conditional expression system for lethal genes. *Gene* 85, (1989) pp 193-197.

67.- Heitman, Joseph y Model, Peter. Substrate recognition by the EcoRI endonuclease. *Proteins* 7, (1990) pp 185- 197.

68.- Wolfes, Heiner; Alves, Jurgen; Fliess, Anja; Geiger, Robert y Pingoud, Alfred. Site directed mutagenesis experiments suggest Glu111, Glu144 y Arg145 are essential for endonucleolytic activity of EcoRI. *Nucleic Acids Res.* 14, (1986) pp 9063-9080.

69.- Needels, M. C.; Fried, S. R.; Love, R.; Rosenberg, J. M.; Boyer, H. W. y Greene, P. J.. Determinants of EcoRI endonuclease sequence discrimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, (1989) pp 3579-3583.

70.- Yanofsky, Stephen; Love, Robert; McClarin, Judith A.; Rosenberg, John y Boyer, Herbert W.. Clustering of null mutations in the EcoRI endonuclease. *Proteins* 2, (1987) pp 273-282.

80.- Rafferty, John B.; Somers, William S.; Sint-Girons, Isabelle. Three-dimensional crystal structure of *Escherichia coli* met repressor with and without corepressor. *Nature* 341, pp 705-710.

- 81.- Phillips, Simon E.; Manfield, Iain; Parsons, Isobel; Davidson, Barrie E.; Rafferty, John B.; Somers, William S.; Margarita, Danielle; Cohen, Georges N.; Saint-Girons, Isabelle y Stockley, Peter G. Cooperative tandem binding of met repressor of *Escherichia coli*. *Nature* 341, (1989) pp 711-715.
- 82.- Breg, Jan N.; Opheusden, J. H. J. O; Burgering, M. J. M.; Boelens, R. y Kaptein, R.. Structure of Arc repressor in solution: evidence for a family of  $\beta$ -sheet DNA-binding proteins. *Nature* 346, (1990) pp 586-589.
- 83.- Birnboim, H. C. y Doly, J.. A rapid alkaline extraction procedure for recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, (1979) pp 1513-1525.
- 84.- Sanger, F. Miklen y Coulson, A. R.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, (1977) pp 4767-4771.
- 85.- Wilks, Helen M.; Hart, Keith W.; Feeney, Raymond; Dunn, Cameron R.; Muirhead, Hilary; Chia, William N.; Barstow, David A.; Atkinson, Tony; Anthony, Clarke y Holbrook, J. John. A specific, highly active malate dehydrogenase by redesigning of a lactate dehydrogenase framework. *Science* 242, (1988) pp 1541-1544.
- 86.- Smith, Michael. Site-directed mutagenesis and protein engineering. en: *Proteins: From y function*. (ed) Bradshaw, Ralph A. y Purton, Mary. Elsevier trends book (1990) pp 21-28.
- 87.- Bone, Roger; Silen, Joy L. y Agard, David A.. Structural plasticity broadens the specificity of an engineered protease. *Nature* 339, (1989) pp 191-195.
- 88.- Mitchell, Pamela J. y Tjian. Transcriptional regulation in mammalian cell by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, (1989) pp 372-378

- 89.- Scrutton, Nigel S.; Berry, Alan y Perham, Richard N... Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343, (1990) pp 38-43.
- 90.- Vallee, Bert I. y Auld, David. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29 # 24, (1990) pp 5647-5659.
- 91.- Berg, Jeremy M.. Zinc fingers and other metal-binding domains. *J. Biol. Chem.* 265 # 12, (1990) pp 6513-6516.
- 92.- Lesser, David R.; Kurpiewski, Michael R. y Jen-Jacobson. The energetic basis of specificity in the EcoRI endonuclease-DNA interaction. *Science* 250, (1990) pp 776-786.
- 93.- Rubin, Robert A. y Modrich, Paul. Substrate dependence of the mechanism of EcoRI endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 5 # 8, (1978) pp 2991- 2997.
- 94.- Cheng, Soo-Chen; Kim, Rosalind; King, Klim; Kim, Sung-Hou y Modrich, Paul. Isolation of gram quantities of EcoRI restriction and modification enzymes an overproducing strain. *J. Biol. Chem.* 259 # 18, (1984) pp 11571-11575.
- 95.- Chung, C. T.; Niemela, Suzanne L. y Miller, Roger H.. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, (1989) pp 2172-2175.
- 96.- Richmond, Timothy. Another folding problem?. *Nature* 326, (1987) pp 18-19.
- 97.- Kuhn, Irene; Stephenson, Frank H.; Boyer, Helbert W. y Greene, Patricia J.. Positive-selection vector utilizing lethality of the EcoRI endonuclease. *Gene* 44. pp 253-263.

- 98.- Berman, Helen M.. How EcoRI recognizes and cuts DNA. *Science* 234, (1986) pp 1482-1483.
- 99.- Kim, youngchang; Grable, Jonh C.; Love, Robert; Greene, Patricia J. y Rosenberg, John M.. Refinement of EcoRI endonuclease Crystal structure: A revised protein chain Tracing. *Science* 249, (1990) pp 1307-1309.
- 100.- Hecht, Michael H.; Richardson, Jane S.; Richardson, David C. y Ogden, Richard C.. De novo desing, expression, and characterization of felix: a four-helix bundle protein of native-like sequence. *Science* 249, (1990) pp 884-191.
- 101.- Heitman, Joseph y Model, Peter. *The EMBO Journal* vol 9 pp 3369-3378.
- 102.- Wright, David J.; King, Klim y Modrich, Paul. The negative charge of Glu-111 is required to activate cleavage center of EcoRI endonuclease. *J. Biol. Chem.* 264 # 20, (1990) pp 11816-11821.
- 103.-Hager, Paul W.; Reich, Norbet O.; Day, Joseph P.; Coche, Thierry G.; Boyer, Herbert W.; Rosenberg, John M. y Greene, Patricia J.. Probing the role of glutamic acid 144 in the EcoRI endonuclease usig aspartic and glutamine replacements. *J. Biol. Chem.* 263 # 35, (1990) pp 21520-21526.
- 104.- Alves, Jurgen; Ruter, Thomas; Geiger, Robert; Fliess, Anja; Maass, Gunger y Pingoud, Alfred. Changing the hydrogen-bonding potential in the DNA binding site of EcoRI by site-directed mutagenesis drastically reduces the enzymatic activity, not, however, The preference of this restriction endonuclease for cleavage within the site-GAATTC- *Biochemistry* 28 # 24, (1989) pp 2678-2684.
- 105.- Benkovic, Srephen, J.; Adams, Joseph A.; Borders, C. L.; Kim D. Janda, Jr. y Lerner, Richard. The enzymatic nature of antibody catalys: development of multistep

kinetic processing. *Science* 250, (1990) pp 1135-1139.

106.- Kissinger, Charles R.; Llu, Belshan; Martin-Blanco, Enrique; Kornberg, Thomas B. y Pabo, Carl O.. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a Framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 53, (1990) pp 579-590.

107.- Rosenberg, John M. y Greene, Patricia. EcoRI specificity and hydrogen bonding. *DNA* 1 # 2, (1982) pp 117-124.