



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

03072
27
285

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

FALLA DE ORIGEN
ANÁLISIS FUNCIONAL DEL MOTIVO C
DE LA
TRANSCRIPTASA REVERSA DE HIV-1:
Mutagénesis e interacción con cationes divalentes

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología
Presenta la Bióloga
Bertha Verónica Valverde Garduño

Cuernavaca, Morelos.
MÉXICO

1995



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.

A JOEL POR ESTOS AÑOS DE AGRADABLE COMPAÑÍA

**A MI HERMANA MARCELA Y A MIS HERMANOS POR SU APOYO
CONSTANTE**

**A LA MEMORIA DE MI MADRE
SRA. VENANCIA GARDUÑO GONZÁLEZ
POR DEJARME COMO HERENCIA SU VALEROSO EJEMPLO
Y LA COMPAÑÍA DE MIS HERMANOS**

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Lourdes Gutiérrez por su apoyo para la realización de este proyecto. Por brindarme su amistad y su confianza.
- A los integrantes del comité tutorial por brindarme orientación y apoyo.
- A los miembros del jurado por la revisión crítica del trabajo escrito.
- A los integrantes del laboratorio de Virus y Cáncer que dirige la Dra. Lourdes Gutiérrez: Lilia Juárez Palma y Adolfo Pedroza Saavedra por su apoyo técnico. Por la amistad que hemos empezado a cultivar.
- A Socorro Gama Castro que dió apoyo técnico al proyecto como parte de su Servicio Social.
- A la Dra. Yolanda Fuchs y a los integrantes de su laboratorio: Lilia Chihu Amparán, Victor González y Fernando Reyna por su apoyo.
- A Ma. Elena Munguía por su asesoría técnica en secuenciación. A Gabriel Moreno por su asesoría en el manejo del programa Insight II, utilizado para la elaboración de las Figuras 2 y 15.
- A Joel por su paciencia para esperar junto conmigo la conclusión de algunos experimentos en noches que se hacían largas.
- A mis amigos, que a pesar de la distancia me acompañaron en mi período de vida Cuernavacuense y contribuyeron a que éste fuera agradable.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virus y Cáncer, del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, como parte del proyecto "Efecto de mutaciones puntuales en un dominio conservado de la transcriptasa reversa de HIV-1". Dicho proyecto fué aprobado por la Comisión de Investigación y Docencia de Instituto Nacional de Salud Pública y se me autorizó para realizarlo de 1992 a 1995.

Verónica Valverde Garduño

INDICE

Lista de abreviaturas utilizadas	ii
Resumen	1
Introducción	3
Cationes divalentes y especificidad	4
Secuencias conservadas en polimerasas	5
Estructura: subdominios y motivos funcionales en polimerasas	10
Origen y evolución de polimerasas	13
Objetivos	15
Material y Métodos	16
Resultados	20
Purificación de la Transcriptasa reversa	20
Actividad de DNA polimerasa	21
Actividad de RNA replicasa	21
Efecto del manganeso sobre la actividad de DNA polimerasa	23
Procesividad de la actividad de RNA replicasa	26
Construcción de la mutante D186H	28
Purificación y análisis de la mutante D186H	29
Actividades de polimerasa de la mutante D186H	32
Discusión	33
I. Actividad de RNA replicasa y especificidad de sustrato	33
II. Inhibición de la transcriptasa reversa por manganeso	34
III. La mutante D186H	35
IV. Implicaciones evolutivas	39
Conclusiones	43
Perspectivas	44
Referencias	45

Lista de abreviaturas utilizadas

Aminoácidos:

Se utiliza el código de aminoácidos de una sola letra: A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptofano; Y, tirosina.

ASV	Virus del sarcoma de aves.
ddCTP	didesoxicitidina.
ddNTP	didesoxirribonucleótido.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DNA polimerasa	actividad de DNA polimerasa RNA dependiente (en este trabajo).
DNA Pol β	DNA polimerasa β de rata.
DNA Pol I	DNA polimerasa I de <i>Escherichia coli</i> .
dNTP	desoxirribonucleótido.
DTT	Dithiotreitol.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
HIV-1	virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.
HIV-2	virus de inmunodeficiencia humana tipo 2.
IPTG	isopropil- β -D-galactopiranosido.
Kda	kilodaltones.
KF	fragmento Klenow de la DNA polimerasa de <i>Escherichia coli</i> .
Mg	catión divalente magnesio.
MMLV	virus de la leucemia de murinos.
MMTV	virus de los tumores mamarios de murinos.
Mn	catión divalente manganeso.
nt	nucleótidos.
PNPasa	polinucleótido fosforilasa.
poliC	ácido policitidílico.
poliU	ácido poliuridílico.
PPi	pirofosfato.
RNA	ácido ribonucleico.
RNA Pol	RNA polimerasa de <i>Escherichia coli</i> .
RNA replicasa	actividad de RNA polimerasa RNA dependiente.
rNTP	ribonucleótido.
RT	transcriptasa reversa.
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida.
Th DNA Pol	DNA polimerasa de <i>Thermus thermophilus</i> .
T7RNAP	RNA polimerasa del fago T7.
xNTP	nucleótido.

RESUMEN

Las polimerasas son proteínas cuya actividad enzimática consiste en la polimerización de ribonucleótidos (rNTP's) o desoxirribonucleótidos (dNTP's) para formar ácidos nucleicos. Las RNA polimerasas utilizan como sustrato rNTP's formando RNA y las DNA polimerasas utilizan como sustrato dNTP's para formar DNA. Algunas usan como molde RNA (RNA dependientes) y otras DNA (DNA dependientes), las transcriptasas reversas pueden utilizar ambos tipos de ácidos nucleico como molde. Requieren un catión divalente como cofactor para su actividad enzimática; en todas las polimerasas celulares conocidas es el magnesio y sólo dos de las virales utilizan manganeso preferencialmente. Se ha encontrado que en presencia de manganeso se altera la especificidad de sustrato de varias polimerasas, que incorporan así sustratos no específicos. A pesar de que la similitud en la estructura primaria entre las polimerasas es muy baja, se han encontrado al menos dos motivos conservados en todas las polimerasas (motivos A y C). Aunque la similitud en estos dos motivos también es limitada se ha propuesto que las polimerasas tienen un origen común. El motivo C consta de 14 residuos de aminoácidos, centrado en dos residuos de ácido aspártico (D) contiguos, flanqueados por residuos principalmente hidrofóbicos; en algunos casos se presenta un sólo residuo D y en otros hay un residuo adicional entre los dos residuos D. Debido a su ubicuidad entre las polimerasas se ha propuesto que es un sitio funcional y se sugirió desde 1984 que posiblemente era el sitio activo ó bien el sitio de unión al cofactor esencial para catálisis. Se han realizado diversos estudios de mutagénesis en el motivo C de varias polimerasas y se ha encontrado que mutaciones en los residuos D afectan la actividad catalítica, sin embargo no se sabe si las mismas mutaciones afectan la incorporación de sustratos no específicos. Por otro lado, en la estructura tridimensional de la DNA polimerasa β de rata, se ha observado que efectivamente los residuos D del motivo C son capaces de unir tanto magnesio como manganeso, aunque la configuración de los residuos que participan en la unión es diferente en cada caso. Si en otras polimerasas la unión fuera similar, es posible que la diferencia en la configuración de los residuos del motivo C provoque la alteración de la especificidad de sustrato arriba mencionada. Hasta ahora no se ha demostrado que el sitio activo específico de las polimerasas estudiadas en presencia de manganeso sea el mismo sitio catalítico que permite la incorporación del sustrato no específico.

En este trabajo se propuso estudiar el problema de la participación del motivo C en la actividad catalítica de las polimerasas y su posible implicación en la alteración de la especificidad de sustrato, utilizando como modelo la transcriptasa reversa (RT) de HIV-1. Se plantearon los

siguientes objetivos específicos: 1) Estudiar el efecto del manganeso sobre la especificidad de sustrato de la RT de HIV-1 y sobre su actividad de DNA polimerasa RNA dependiente; 2) Introducir mutaciones el motivo C de la RT y analizar su efecto sobre: a) La actividad de DNA polimerasa RNA dependiente b) La interacción con cationes divalentes, c) La especificidad de sustrato.

Se encontró que la RT de HIV-1 es capaz de incorporar rNTP's sobre un molde de RNA, hasta 300u/mg en presencia de magnesio. Sin embargo en presencia de manganeso esta actividad de RNA replicasa se eleva hasta casi 4,000u/mg y llega a representar el 7% de la actividad natural de incorporación de dNTP's. Es decir, el manganeso eleva en un orden de magnitud la incorporación del sustrato no específico. Además, el manganeso inhibió la actividad de DNA polimerasa RNA dependiente de la RT en presencia de magnesio 8mM. Se generó una mutación en el residuo aspártico 186 a histidina (D186H) y se confirmó por secuencia. La enzima mutante se purificó y se identificó por métodos inmunológicos (western blot). Se encontró que la mutación afecta drásticamente la actividad de DNA polimerasa RNA dependiente, que baja hasta un nivel del 0.5% (250u/mg) de la actividad de la enzima silvestre. Por otro lado se encontró que el manganeso es capaz de activar a la enzima mutante mejor que el magnesio; la actividad de DNA polimerasa RNA dependiente en presencia de manganeso representa el 1.6% (780u/mg) de la actividad de la enzima silvestre. Esta mutante no registró actividad detectable de RNA replicasa, ninguno de los dos cationes logró inducirla.

En conclusión: 1) El manganeso altera la especificidad de sustrato de la RT de HIV-1 (permitiendo la incorporación de rNTP's) y es capaz de inhibir su actividad de DNA polimerasa RNA dependiente. 2) La mutación D186H en el motivo C de la RT de HIV-1 disminuye drásticamente su actividad de DNA polimerasa RNA dependiente. En la misma mutante la actividad de RNA replicasa, inducida por manganeso, es indetectable. Es decir, el residuo mutado es importante para mantener la integridad de ambos sitios: el responsable de la actividad normal y el responsable de la incorporación de sustratos no específicos. Esto sugiere que ambas actividades, la específica y la no específica, podrían residir en el mismo sitio. 3) La mutante presenta una activación de DNA polimerasa RNA dependiente limitada, utilizando preferencialmente manganeso. Este cambio en la preferencia de cofactor metálico para la actividad natural de la enzima, a consecuencia de la mutación, sugiere que posiblemente el residuo mutado forma parte de un sitio de unión a metal.

INTRODUCCION

El descubrimiento de actividad catalítica en algunas moléculas de RNA (Kruger, *et al.*, 1982; Guerrier-Takada, *et al.*, 1983) modificó radicalmente las teorías existentes sobre la evolución temprana de la vida. Esto permitió proponer que el RNA podría haber jugado el papel de molécula catalítica y a la vez almacén de la información genética (Alberts, 1986; Gilbert, 1986; Lazcano, 1986). Aunque se ha propuesto que el RNA, a su vez, pudo haber sido precedido por moléculas informacionales y replicables diferentes a los ácidos nucleicos, se reconoce que el RNA habría sido el antecesor inmediato del DNA como material genético y de las proteínas como catalizadores (Joyce, *et al.*, 1987; Orgel, 1992; Conn y Rebek Jr., 1994). Así, desde la aparición de los ácidos nucleicos en las células, la polimerización de nucleótidos para formar ácidos nucleicos ha sido fundamental, en un principio para formar moléculas catalíticas y almacenadoras de la información genética y más tarde para cumplir esta última función esencialmente. En todas las células actuales la polimerización de nucleótidos para la formación de un ácido nucleico es una reacción esencial en la replicación y expresión de la información genética, procesos de los que depende la continuidad y el mantenimiento de la vida. Dicha polimerización consiste en el acoplamiento de un nucleótido 5'-trifosfato (rNTP o dNTP) al extremo 3'OH libre de un iniciador para alargar el iniciador en un nucleótido y eliminar una molécula de pirofosfato inorgánico: $\text{iniciador}_n + \text{xNTP} \rightarrow \text{iniciador}_{n+1} + \text{PPi}$ (Pelletier, *et al.*, 1994).

Esta reacción fundamental en todos los sistemas vivos se lleva a cabo por un conjunto de enzimas denominadas polimerasas que son capaces de producir DNA o RNA utilizando como molde RNA (RNA dependientes) o DNA (DNA dependientes); la combinación particular de estas capacidades es específica para cada clase de polimerasas. La mayoría de las DNA polimerasas requieren un oligonucleótido iniciador con el extremo 3'OH libre; sin embargo algunas pueden utilizar una proteína y las RNA polimerasas no lo requieren, pueden iniciar la síntesis de una cadena de novo, aunque no se conoce el mecanismo. Se ha propuesto que este tipo de enzimas habrían estado entre las primeras proteínas en surgir durante la evolución, particularmente las RNA replicasas para hacer más eficiente la replicación del RNA, sustituyendo en esta función a las ribozimas (Lazcano, *et al.*, 1988). En este contexto se ha sugerido que durante la transición de RNA a DNA como material genético en las células, debieron surgir nuevas polimerasas a partir de una proteína RNA replicasa ancestral. Esto implica que debieron surgir nuevas especificidades de sustrato y de molde que habrían originado inicialmente a las transcriptasas reversas y, posteriormente, a las DNA polimerasas DNA dependientes y a las RNA polimerasas DNA dependientes. Posiblemente estas nuevas especificidades surgieron por duplicación génica y mutación, a partir de una replicasa ancestral (Lazcano, *et al.*, 1992). Entre las líneas de evidencia que apoyan la hipótesis de un origen común para las polimerasas, están la similitud en algunas regiones de la estructura primaria de las polimerasas, la posibilidad de modificar la especificidad de sustrato o de molde bajo ciertas condiciones y la similitud en la estructura terciaria entre las polimerasas para las que se ha resuelto la estructura tridimensional. A continuación se describe este conjunto de evidencias.

CATIONES DIVALENTES Y ESPECIFICIDAD

Alteraciones pequeñas, como el cambio de catión e incluso mutaciones puntuales provocan un cambio en la especificidad de sustrato o de molde (ver Cuadro 1). Para llevar a cabo su actividad enzimática, todas las polimerasas requieren un catión divalente activador. Se sabe que la mayoría de las polimerasas celulares tienen como catión activador al magnesio. No obstante se ha encontrado que el manganeso es capaz de activar varias polimerasas a un nivel mucho menor que el magnesio, provocando un aumento en la tasa de error, a través de la alteración de las constantes bioquímicas (El Deiry, *et al.*, 1988). Estos cambios podrían estar relacionados con cambios conformacionales en las

POLIMERASA	MOLDE	SUSTRATO	ALTERACION	MOLDE	SUSTRATO	REFERENCIA
HIV-1 RT	RNA/DNA	dNTP	Mg → Mn	RNA	rNTP	Este trabajo
AMVRT	RNA/DNA	dNTP	Mg → Mn	RNA	rNTP	Lazcano <i>et al.</i> , 1992.
PNPase*	-----	rNTP	Mg → Mn	-----	dNTP	Hsieh, 1978, Gilam, <i>et al.</i> , 1978.
DNA primasa*	DNA	rNTP	-----	DNA	dNTP	Rowen y Komberg, 1978.
DNA Pol I*	DNA	dNTP	Mg → Mn	DNA	rNTP	Berg, <i>et al.</i> , 1963.
DNA Pol I*	DNA	dNTP	Mg → Mn	RNA	dNTP	Richetti y Buc, 1993.
T ₇ DNA Pol**	DNA	dNTP	Mg → Mn	RNA	dNTP	Myers y Gelfand, 1991.
RNA Pol*	DNA	rNTP	Mg → Mn	RNA	rNTP	Biebricher y Orgel, 1973; Laca <i>et al.</i> , 1987.
T7 RNA Pol	DNA	rNTP	RNA-X	RNA	rNTP	Konarska y Sharp, 1989.
T7 RNA Pol	DNA	rNTP	K174L	RNA	rNTP	Lyakhov, <i>et al.</i> , 1992.

*Proteínas de *E. coli*. **Proteína de *Thermus thermophilus*.

Cuadro 1. Especificidad de polimerasas: Modificación de la especificidad de sustrato o de molde provocado por diversas alteraciones en las enzimas o en las condiciones de reacción de varias RNA polimerasas y DNA polimerasas.

enzimas, ya que se ha encontrado que la unión de cationes puede inducir cambios conformacionales en otras proteínas (Chakrabarti, 1994; Bellsoel, *et al.*, 1994). Además el manganeso es capaz de inducir una alteración de la especificidad de sustrato y/o molde en varias polimerasas (Cuadro 1).

Existe evidencia de que, incluso *in vivo*, algunas polimerasas podrían estar incorporando sustratos no específicos: se han detectado ribonucleótidos en DNA mitocondrial (Grossman, *et al.*, 1973); ciertos DNA's virales producidos intracelularmente contienen algunos nucleótidos unidos covalentemente en sus cadenas (Speyer, *et al.*, 1972; Rosenkranz, *et al.*, 1973; Babiuk y Rouse, 1976); se han encontrado cadenas de RNA negativo complementario al genoma viral (RNA positivo) de los retrovirus MMLV (virus de leucemia de murinos), MMTV (virus de tumor mamario de murinos) y ASV (virus del sarcoma de aves) (Biswal y Benyesh-Melnik, 1969; Stavenzer, *et al.*, 1976), lo que sugiere que sus DNA polimerasas podrían estar incorporando ribonucleótidos. Por otro lado, se ha encontrado que una mutación en el residuo K 174 a L en la RNA polimerasa del fago T7 provoca que esta enzima, normalmente DNA dependiente, sea capaz de utilizar RNA (poliC o poliU) como molde (Lyakhov, *et al.*, 1992). Este conjunto de observaciones se ha considerado como evidencia de que las

polimerasas tienen un origen común, debido a la facilidad con la que se logra un cambio en la especificidad de sustrato o de molde (Lazcano, *et al.*, 1992), es decir que una polimerasa es capaz de realizar las funciones de otra clase de polimerasas, teniendo así funciones intercambiables bajo condiciones especiales. Si el mismo sitio es responsable tanto de la actividad específica, como de la inespecífica, esta capacidad de interconversión podría apoyar la existencia de un mecanismo de reacción común, e incluso una estructura terciaria y un origen común para todas las polimerasas. Es decir que durante la evolución, habrían bastado algunas mutaciones para lograr un cambio en la especificidad de sustrato o de molde para el surgimiento de las diferentes clases de polimerasas. Además se ha encontrado que las mutaciones A114S/V118S provocan que la RT ya no pueda utilizar DNA como molde (Boyer, *et al.*, 1994). Mutaciones en el sentido inverso habrían ampliado la especificidad de molde de polimerasas ancestrales.

SECUENCIAS CONSERVADAS EN POLIMERASAS

La disponibilidad de secuencias permitió realizar un análisis de similitud entre polimerasas RNA dependientes que reveló la presencia de un motivo de 14 residuos, común a las polimerasas analizadas y que consta de 2 residuos D flanqueados por residuos hidrofóbicos (Toh y Miyata, 1983; Kamer y Argos, 1984). Un análisis posterior incluyendo polimerasas de 3 clases (a excepción de las RNA polimerasas DNA dependientes) confirmó la presencia del mismo motivo en todas ellas (Argos, 1988). Esto sugirió un papel funcional fundamental para el motivo y un origen común para todas las polimerasas (Lazcano, *et al.*, 1990). El incremento en el número de secuencias de polimerasas depositadas en los bancos de datos ha facilitado un análisis más amplio, esto ha permitido agrupar a las polimerasas conocidas de acuerdo al grado de similitud que presentan entre ellas. Así, se han formado varias familias: la familia Pol I que contiene a las DNA polimerasas que tienen una alta similitud con la DNA polimerasa I de *E. coli*; la familia Pol α , que consta de las DNA polimerasas con alta similitud con la DNA polimerasa α humana; la familia Pol β , constituida por las polimerasas similares a la DNA polimerasa β de rata; la familia de las transcriptasas reversas, la de las RNA replicasas y la de la RNA polimerasas DNA dependientes. Al hacer un alineamiento de todos los tipos de polimerasas, se encontraron 5 regiones altamente conservadas, también llamadas motivos (Delarue, *et al.*, 1990). En la Figura 1 se muestra el alineamiento de estos motivos conservados entre las familias de polimerasas.

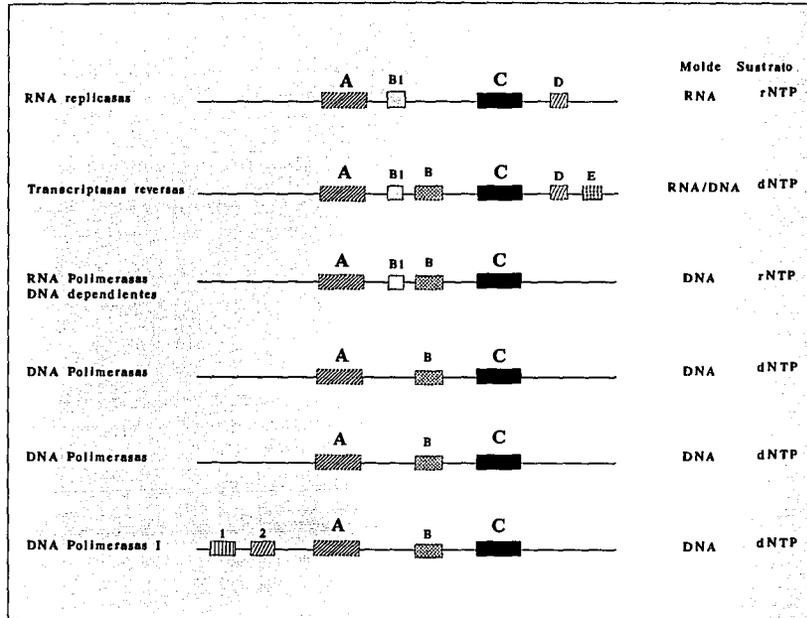


Figura 1. Alineamiento de los motivos conservados en las familias de polimerasas. Los datos para elaborar esta figura se tomaron de Joyce y Steitz, 1994 y de Delarue, *et al.*, 1990. Se indica el tipo de polimerasa, los motivos que presentan, el o los moldes que requiere cada tipo de polimerasa y el sustrato para el cual es específica.

Como puede apreciarse en la Figura 1, solo dos de ellos, los motivos A y C, se encuentran en todas las polimerasas, incluyendo a la políA polimerasa (Lingnier, *et al.*, 1991; Raabe, *et al.*, 1991) y a la telomerasa (Lundbald y Blackburn, 1990); el motivo C corresponde al detectado por Kamer y Argos (1984). El motivo B se encuentra en las familias Pol α , Pol I y en las RNA polimerasas DNA dependientes de una subunidad; es decir en polimerasas DNA dependientes. El motivo B₁ se encuentra en polimerasas que utilizan ribonucleótidos como sustratos (Poch, *et al.*, 1989). La región D se encuentra solamente en polimerasas RNA dependientes. El motivo E parece ser común a

transcriptasas reversas y polimerasas de virus de RNA de cadena positiva y negativa. Finalmente las otras dos regiones (1 y 2) se encuentran solamente en la familia Pol I.

Una posible interpretación de la distribución de los motivos entre las diversas polimerasas es que algunos de ellos cumplen funciones específicas, comunes a las polimerasas que los presentan y que se han conservado en ellas a través de la evolución por su importancia funcional. La mayoría de las polimerasas requieren un molde y algunas un iniciador; la distribución de algunos motivos podría estar relacionada con la necesidad o no de un molde, un iniciador y si son de RNA o DNA.

En la Figura 1, del alineamiento de los motivos, resalta el hecho de que todas las familias de polimerasas presentan los motivos A y C, lo cual sugiere que éstos motivos son los necesarios, y tal vez suficientes, para la reacción de polimerización nucleotídica. Podrían constituir la unidad "polimerasa mínima" de mayor antigüedad y que habría originado a todas las polimerasas. Además, como se verá más adelante, estos motivos están cercanos en la estructura terciaria constituyendo una estructura funcional llamada "palma". En cuanto a los otros motivos, el B podría estar implicado en la discriminación de molde, específicamente en el uso de DNA como molde, esta idea se ve apoyada por el hayazgo de que mutaciones en el motivo B de la RNA polimerasa de fago T7 retienen la actividad pero les es difícil abrir el molde de DNA de doble cadena (McAllister y Raskin, 1993). El motivo D en la misma función de discriminación del molde, pero para utilizar RNA como molde específico y el motivo B1 podría estar implicado en el uso de ribonucleótidos como sustratos. Para los motivos E, 1 y 2, es difícil dar una interpretación que pudiera ser consistente desde el punto de vista funcional y evolutivo relacionado directamente con la función de polimerasa; es posible que su presencia se deba a la interacción con otros elementos celulares o bien a la corta distancia evolutiva entre las polimerasas que los presentan.

En cuanto a las RT's, por los motivos que presentan parecen polimerasas quiméricas, con motivos comunes a varios tipos de polimerasas; esto es congruente con sus funciones, pues la única especificidad de la que adolecen, entre sus capacidades de polimerasa naturales, es la incorporación de ribonucleótidos como sustratos, para poder realizar todas las combinaciones posibles de molde-sustrato. Sin embargo, como se indica en el Cuadro 1 algunas RT's son capaces de incorporar rNTP's, bajo ciertas condiciones.

El primero en hacerse evidente como motivo conservado de importancia funcional fue el motivo C y tempranamente se propuso que podría estar involucrado en catálisis o en la unión al catión divalente indispensable para la reacción enzimática. En particular los residuos involucrados

directamente serían los residuos D en los cuales está centrado el motivo. Como se puede apreciar en el cuadro 2 todas las polimerasas presentan al menos un residuo D en el motivo C. La denominación de motivo conservado se basó, no en el hallazgo de muchas identidades de residuos de aminoácidos, sino en la composición de la región: principalmente residuos hidrofóbicos flanqueando al o a los residuos de aspártico (Kamer y Argos, 1984). De hecho se propusieron una serie de reglas que debería cumplir una región para considerar que es equivalente al motivo C, con el fin de poder identificar posibles genes de polimerasas, éste motivo se ha considerado incluso como la “firma” de las polimerasas. La demostración de que el motivo C cumple una función fundamental y es la misma en todas las polimerasas apoyaría su denominación de motivo y en consecuencia apoyaría la idea d un origen común para las polimerasas.

RMINQVH	D	.ELVFEV	DNA polimerasa I de <i>E. coli</i> .
NLEVIYG	D	TDSIMIN	DNA polimerasa α humana.
RGAESSG	D	MDVLLTH	DNA polimerasa β de rata.
IVIIQYM	D	.DLYVGS	Transcriptasa reversa de HIV-1.
LKMIAYG	D	.DVIASY	RNA replicasa del virus de la polio.
LDFASVH	D	.SYWTHA	RNA polimerasa de mitocondria.

Cuadro 2. Comparación del motivo C de las familias de polimerasas. Se utiliza un representante de cada familia para comparar sus características. En el recuadro está el residuo aspártico (D) presente en todas las polimerasas. En negritas los residuos conservados internamente en cada familia. Los datos se tomaron de Delarue, *et al.*, 1990.

Se han realizado múltiples estudios funcionales del motivo C, por mutagénesis dirigida, en varias polimerasas. Se han introducido mutaciones en el motivo C de la Q β replicasa (Inokuchi e Irashima, 1987); de la RNA polimerasa de poliovirus (Jablonski, *et al.*, 1991); RNA replicasa del virus de encefalomiocarditis (Sankar y Porter, 1992) y de la DNA polimerasa α humana (Copeland y Wang, 1993). Invariablemente se ha encontrado que las mutaciones en el motivo C afectan fuertemente la actividad de polimerasa, y que al mutar los residuos de D esta actividad se destruye casi por completo; ésto ha revelado que los residuos D o E del motivo C son indispensables para mantener la función catalítica. En particular se han realizado múltiples mutaciones en el motivo C y algunas en el motivo A de la RT de HIV-1 (Cuadro 3). En todos los casos se ha analizado la actividad de DNA polimerasa, pero no se ha estudiado si la RT de HIV-1 presenta alteraciones de la especificidad de sustrato y si las mutaciones que afectan la actividad de DNA polimerasa podrían afectar la actividad enzimática que permite incorporar nucleótidos no específicos.

Mutación	Actividad (%)	Motivo (Secuencia)	Subdominio Estructural	Referencia
D110Q	<0.01	A	Palma	Larder, <i>et al.</i> , 1987.
M184Q	<0.01	C	Palma	Larder, <i>et al.</i> , 1987.
Y181C	70	C	Palma	DeVreese, <i>et al.</i> , 1992.
Y181I	150	C	Palma	DeVreese, <i>et al.</i> , 1992.
Y181C,S,I,I,P,T,I	-----	C	Palma	Sardana, <i>et al.</i> , 1992.
Y183S	1.2	C	Palma	Larder, <i>et al.</i> , 1987.
M184L	5	C	Palma	Larder, <i>et al.</i> , 1989.
D185H	<0.01	C	Palma	Larder, <i>et al.</i> , 1987.
D185N	2.1	C	Palma	Le Grice, <i>et al.</i> , 1991.
D185N	<0.01	C	Palma	Lowe, <i>et al.</i> , 1991.
D185E	<0.01	C	Palma	Lowe, <i>et al.</i> , 1991.
DD185NN	2.5	C	Palma	Le Grice, <i>et al.</i> , 1991.
D186N	0.7	C	Palma	Le Grice, <i>et al.</i> , 1991.
D186N	<0.01	C	Palma	Lowe, <i>et al.</i> , 1991.
D186E	<0.01	C	Palma	Lowe <i>et al.</i> , 1991.
D186H	0.5	C	Palma	Este trabajo.
Y188L	100	C	Palma	DeVreese, <i>et al.</i> , 1992.
Y188C,H,P,L	-----	C	Palma	Sardana, <i>et al.</i> , 1992.
G190R	23	C	Palma	Lowe, <i>et al.</i> , 1991.

Cuadro 3. Mutaciones en el motivo C. Mutaciones en residuos de los motivos A y Cde la RT de HIV-1 y actividad de DNA polimerasa de las mutantes. El cuadro se leaboró utilizando los datos de los artículos que se citan en la columna de referencias.

El hecho de que mutaciones en los residuos D abaten la actividad en varias polimerasas sugirió la idea de que efectivamente están implicados de algún modo en catálisis y que posiblemente unen los cationes divalentes esenciales para la reacción de polimerización. Los datos estructurales de que se dispone han confirmado que los residuos D del motivo C de la DNA polimerasa β de rata unen el catión divalente (Davies, *et al.*, 1994). No obstante que el motivo C se encuentra en todas las polimerasas conocidas, existen diferencias importantes entre las secuencias de los motivos C de las diversas familias de polimerasas (Cuadro 2). De hecho son escasas las identidades en los motivos entre las polimerasas, en particular en el motivo C solo está conservado universalmente el residuo D. Esto sugiere que algunas de las diferencias podrían ser de importancia funcional y plantea el problema de que podrían estar relacionadas directamente con las especificidades de molde y sustrato de los diferentes grupos de polimerasas o se trata de residuos diferentes por deriva génica (es decir porque estaban presentes en la polimerasa que dió origen a cada grupo) o bien corresponden a restricciones estructurales particulares para cada grupo (en el último caso estarían tal vez relacionadas con especificidad de manera indirecta). Este es un problema abierto, para el cual aún no se tiene una respuesta.

ESTRUCTURA: SUBDOMINIOS Y MOTIVOS FUNCIONALES EN POLIMERASAS

Actualmente se conoce la estructura tridimensional de 4 polimerasas: Fragmento Klenow (KF) de la DNA polimerasa de *E. coli* (Ollis, *et al.*, 1985; Beese, *et al.*, 1993), transcriptasa reversa (RT) de HIV-1 (Kohlstaedt, *et al.*, 1992; Jacobo-Molina, *et al.*, 1993), RNA polimerasa del fago T7 (RNAP-T7) (Sousa, *et al.*, 1993) y dominio catalítico de la DNA polimerasa β de rata (Davies, *et al.*, 1994; Pelletier, *et al.*, 1994). La conformación general del dominio polimerasa, en todos los casos sugiere la estructura de una mano derecha con varios subdominios claramente distinguibles (Figura 2), a éstos se les ha denominado subdominios "dedos", "pulgar" y "palma" (Kohlstaedt, *et al.*, 1992).

Palma. El subdominio palma está formado, en todos los casos, por una estructura "sandwich α - β " de dos capas, una capa formada por dos hélices alfa empacadas contra una cara de una estructura beta (Sawaya, *et al.*, 1994). Al comparar las estructuras palma de las polimerasas se ha encontrado que es posible sobrelapar regiones importantes, en particular la que corresponde al motivo C, no obstante que hay muy pocos residuos idénticos entre ellas. Para el caso del motivo C, de 14 residuos, sólo 4 son idénticos entre RT y KF; en el motivo A, de 24 residuos, sólo hay 3 identidades entre estas polimerasas (Delarue, *et al.*, 1990). Los residuos carboxílicos D o E de los motivos A y C de las polimerasas cuya estructura es conocida son cercanos espacialmente, como se ilustra en la Figura 16, se aprecia claramente la similitud de estructuras y la superposición del trío de carboxilatos de las cuatro polimerasas.

La proposición de que los residuos de D del motivo C unen el catión divalente esencial para catálisis ha encontrado apoyo en los recientes datos estructurales obtenidos con varias polimerasas. Los más claros son los obtenidos con la DNA polimerasa β de rata. Se encontraron dos iones de manganeso (aunque no es el catión natural, se utilizó en este estudio) que interaccionan cada uno con uno de los oxígenos del grupo carboxilato de la cadena lateral del residuo D190 que se encuentra entre los dos metales (Davies, *et al.*, 1994). En otro estudio de la estructura de la subunidad catalítica de la misma enzima en un complejo con molde-iniciador (sintético), un sustrato (ddCTP) y magnesio, se logró ubicar a los iones magnesio coordinados por los residuos D en dos sitios de unión. El sitio A, donde participan los residuos D 190 y D 192 (motivo C), presenta un ión Mg^{2+} unido como bidenato (es decir, quelado por ambos átomos de oxígeno del grupo carboxilato del residuo D) a los fosfatos β y γ del ddCTP. El sitio B, en el que participan los residuos Asp 190, Asp 192 y Asp 256 (éste último del motivo A); el ión coordinado por éstos residuos se une al fosfato α del ddCTP (Pelletier, *et al.*, 1994). En la literatura se ha mencionado el hallazgo de cationes divalentes en la vecindad del trío de carboxilatos Asp-Glu-Asp, de la estructura de KF (datos de Beese, L.S. y Steitz, T.A. no publicados, citados en Kohlstaedt, *et al.*, 1992). Se confirma así la importancia funcional de los residuos D y E del motivo C en estas dos polimerasas, pues aunque aparentemente no participan directamente en catálisis, tienen la función de unir los cationes catalíticos.

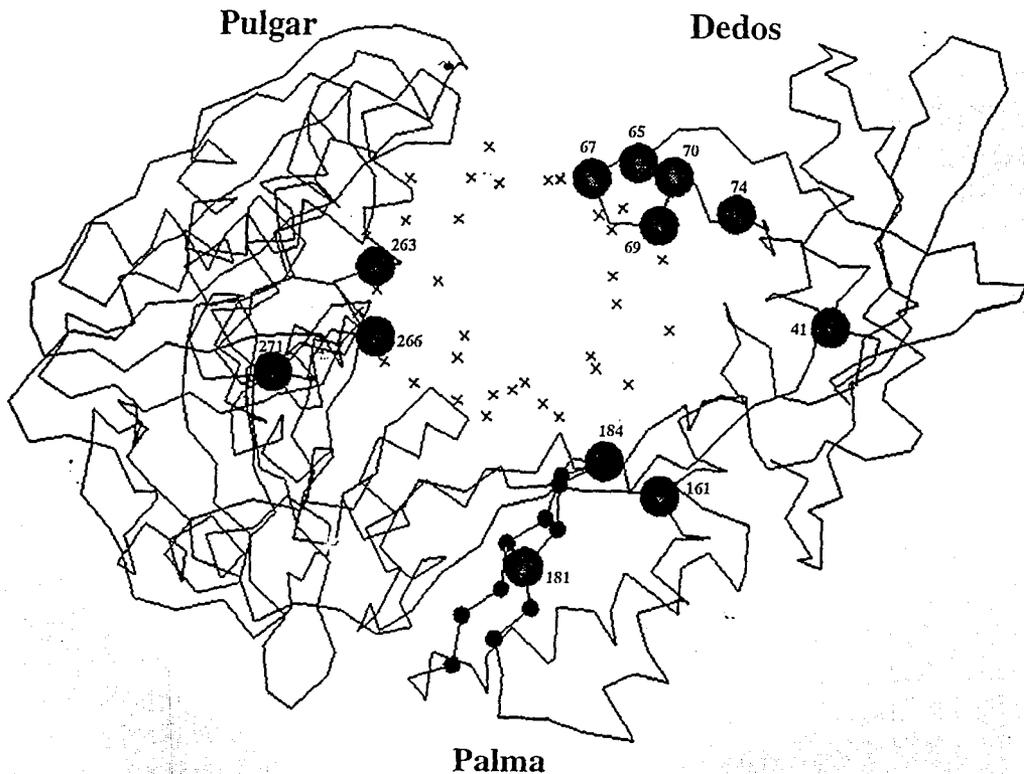


Figura 2. Estructura de la subunidad catalítica (p66) de la RT de HIV-1 (carbonos α). Se indican los subdominios Palma, Dedos y Pulgar. Las cruces indican la posición de los grupos fosfato de una molécula de DNA de doble cadena molde-iniciador. Las esferas grandes numeradas indican los residuos cuya mutación confiere resistencia a análogos de nucleótidos. Los residuos del motivo C están marcados con esferas más pequeñas. Las coordenadas de la trayectoria de los carbonos α de la estructura de la RT se obtuvieron del Brookhaven Protein Data Bank (archivo 1hmi), de la estructura obtenida a 3 Å de resolución (Jacobo-Molina, *et al.*, 1993). La estructura que se presenta se generó utilizando el programa Insight II.

Dedos. Se ha encontrado que una mutación en el residuo Tyr 766 de éste motivo estructural en KF, afecta la discriminación entre desoxi y didesoxirribonucleótidos (Joyce, C.M., datos no publicados, citados en Joyce y Steitz, 1994).

Pulgar. Se ha encontrado que en éste subdominio existen regiones que son estructuralmente superponibles entre KF, RT y RNA polimerasa del fago T7, ellas son las hélices J y K de KF, las cadenas 12, 13 y 14 de RT y la hélice P de RNAP-T7 (Pelletier, et al., 1994). Se han observado diferencias conformacionales en la estructura de la RT cuando tiene unido DNA (Jacobo-Molina, et al., 1992) y cuando no (Kohlstaedt, et al., 1992), esto ha llevado a proponer que esta estructura tiene movilidad. Otros estudios estructurales de polimerasas quiméricas en diferentes formas cristalinas han mostrado diferencias que apoyan la idea de que el subdominio pulgar es móvil (Sousa, et al., 1994).

Sitio de unión a nucleótido. Mediante diversos estudios se ha tratado de dilucidar qué regiones y qué residuos están involucrados en la unión al nucleótido y eventualmente en la discriminación entre ribonucleótidos (rNTP's) y desoxirribonucleótidos (dNTP's). Se ha sugerido que la lisina 263 de la RT de HIV-1 está involucrada en esta función ya que la interacción de la enzima con piridoxal 5-fosfato bloquea la unión a dNTP y se ha visto que el piridoxal-5-fosfato se une al residuo mencionado (Basu, et al., 1989). En la misma enzima, se ha encontrado que mutaciones introducidas en los residuos de las posiciones 113(D), 114(A) y 266(W) provocan una disminución en la sensibilidad de la RT a la azidotimidina (AZT), lo cual sugiere que esta región podría estar involucrada en la unión a sustrato (Larder, et al., 1987). Otros estudios de inhibición de la RT, en particular con análogos de nucleótidos, han arrojado datos interesantes. En muchos casos se ha encontrado que al aplicar el inhibidor, eventualmente se seleccionan mutantes. Es notable que mutaciones en el residuo M184, que forma parte del motivo C y se localiza en el subdominio palma, estén involucradas en conferir resistencia a 5 análogos de nucleótidos; esto sugiere que dicho residuo podría estar involucrado en la unión y discriminación de nucleótido. Otros residuos cuya mutación confiere resistencia a inhibidores de la RT se localizan en el subdominio dedos y son los residuos 41, 65, 67, 69, 70 y 74 (revisados por Beard y Wilson, 1994), sugiriendo que también estarían involucrados en interacción con nucleótido.

Los datos anteriores podrían indicar que, si un conjunto de residuos están involucrados en la interacción con nucleótido para modificar la especificidad, habría que mutar varios residuos en una o varias regiones en cualquier polimerasa. Sin embargo, existe la posibilidad de que una sola mutación pudiera ser suficiente para provocar un cambio de especificidad ya que se ha encontrado que una mutación en el residuo Y766 del subdominio estructural dedos de KF afecta la discriminación entre dNTP y ddNTP (Joyce, C.M., datos no publicados, citados en Joyce y Steitz, 1994), en este caso la diferencia entre los dos tipos de nucleótidos es un grupo hidroxilo, al igual que la diferencia entre rNTP's y dNTP's (Figura3).

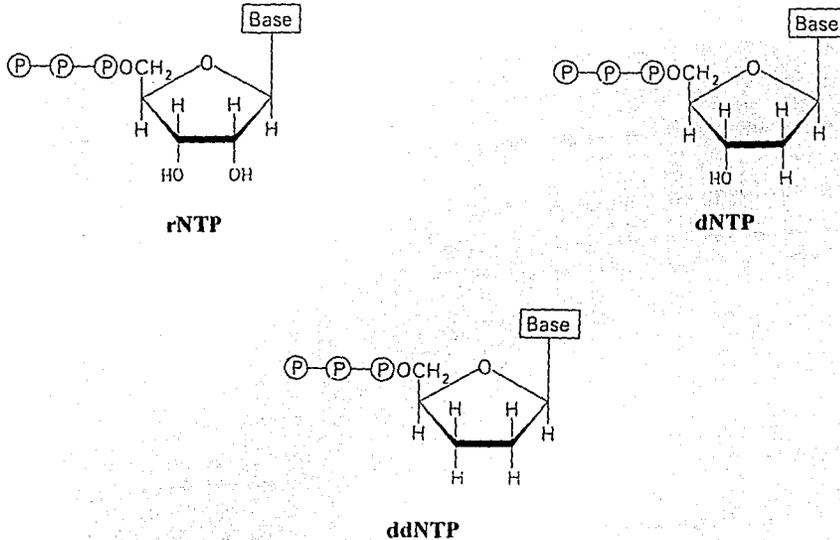


Figura 3. Tres tipos de nucleótidos. Diferencias en el azúcar de los ribonucleótidos (rNTP) que presenta dos grupos hidroxilo, desoxirribonucleótidos (dNTP) que presenta un grupo hidroxilo y didesoxirribonucleótidos (ddNTP) que no presentan grupos hidroxilo en las posiciones 2' y 3'. P: grupo fosfato.

ORIGEN Y EVOLUCION DE LAS POLIMERASAS

A pesar de la presencia del motivo C en todas las polimerasas, su bajo grado de similitud y las diferencias en la conectividad de las estructuras comunes a las polimerasas cuya estructura terciaria se conoce, existe una polémica en torno al origen de las polimerasas. Una corriente sostiene que es un grupo monofilético (Lazcano, *et al.*, 1992; Pelletier, *et al.*, 1994) y la otra que es un grupo polifilético (Steitz, *et al.*, 1994). Desde una perspectiva evolutiva, si tienen un origen común entonces debió existir una polimerasa ancestral que dió origen al resto de las polimerasas. En el contexto de la hipótesis de genomas celulares ancestrales de RNA y de una transición posterior a genomas de DNA, la polimerasa ancestral debió tener actividad de RNA replicasa. Además, en el curso de la evolución, sus duplicados debieron tener la posibilidad de usar un sustrato diferente y de hacerse específicas para el nuevo sustrato y molde. El objetivo de este trabajo fue modificar la especificidad de sustrato de una polimerasa para recuperar una posible actividad de RNA replicasa y obtener evidencia de si el mismo sitio es responsable de la incorporación del nucleótido específico y del no específico. Se propuso estudiar una transcripatasa reversa pues, como se mencionó anteriormente, por los motivos que comparte con otras polimerasas parece una polimerasa quimérica, lo cual podría facilitar la alteración de la especificidad. Además puede utilizar DNA y RNA como molde y se le ha propuesto como el tipo

de polimerasa que debió surgir inmediatamente después de las RNA replicasas durante la transición hacia un genoma celular de DNA de acuerdo con la hipótesis de una biósfera precámbrica basada en células con material genético y enzimas constituidos de RNA.

En particular se planteó por un lado estudiar el efecto del manganeso sobre la actividad de DNA polimerasa y sobre la especificidad de sustrato de la RT de HIV-1 y por otro el efecto de mutaciones puntuales en el motivo C sobre la interacción de la RT con cationes divalentes y sustratos.

Si el manganeso es capaz de provocar una modificación en la especificidad de sustrato y si el mismo sitio es responsable de esta nueva actividad, entonces, mutaciones puntuales que afectan al sitio catalítico responsable de la incorporación del nucleótido específico, podrían afectar también la incorporación de nucleótidos no específicos. Por otro lado, se pensó que si el manganeso induce alteraciones de especificidad de sustrato en polimerasas, la presencia de mutaciones que favorecieran la unión de otros metales podrían elevar la eficiencia de la incorporación del nucleótido no específico. El residuo D186 de la RT de HIV-1 forma parte del motivo C y es uno de los tres carboxilatos estructuralmente cercanos (junto con 110 y 186) que se encuentran en la base de la palma y cuyos correspondientes espaciales en la estructura de la DNA polimerasa β de rata unen magnesio o manganeso (Pelletier, *et al.*, 1994). Se ha observado que el residuo H, junto con residuos D, se encuentran en muchas metaloproteínas uniendo al ión metálico (Chakrabarti, 1990a; Higaki, *et al.*, 1992), que en algunos casos es manganeso. Se propuso mutar el residuo D 186 a H, con lo que posiblemente no se destruiría completamente la actividad de polimerasa, pues tal vez aún permitiría la unión del catión específico esencial para catálisis.

La transcriptasa reversa (RT, EC 2.7.7.49) del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 está codificada por el gen *pol* (junto con una proteasa y una integrasa) de su genoma diploide de RNA. La RT enzimáticamente activa se encuentra en el virión, está constituida por 2 subunidades, p66, de 66Kda, formada por 560 residuos de aminoácidos y p51 de 51kda, formada por 440 residuos de aminoácidos, resultado de la escisión proteolítica de un fragmento de 120 residuos del extremo carboxilo de p66. La RT es la responsable de la formación de un DNA dúplex (que se integra al DNA celular) a partir de la cadena de RNA positivo viral (Goff, 1990).

La RT es una polimerasa que podría considerarse con una alta ambigüedad de molde, debido a que tiene la capacidad de utilizar tanto RNA como DNA. La diferencia entre éstos dos tipos de ácidos nucleicos no reside solamente en la composición química, sino, de manera muy importante, en la conformación espacial que puede adoptar cada uno de ellos. Se ha propuesto que las polimerasas seleccionan la conformación que puede adoptar el molde-iniciador. Así, las polimerasas RNA dependientes sólo pueden acomodar un ácido nucleico de la forma A (es decir, un RNA o bien un híbrido DNA-RNA), mientras que las DNA polimerasas DNA dependientes solamente de la forma B (es decir, solamente DNA's). En esta función de discriminación de molde estaría involucrado el subdominio dedos.

De las secuencias completas de 18 cepas de HIV-1 analizadas, ninguna presenta mutaciones en el motivo C de la RT. La RT de HIV-2 difiere en el motivo C (LIQYMDDILIASDR) con respecto a la de HIV-1 (IYQYMDDLIVGSDL) y es activada más fuertemente por el manganeso (Le Grice, et al., 1988). Se ha visto que otras RT's pierden especificidad de sustrato en presencia de manganeso (Lazcano, et al., 1992), Cuadro 1. No obstante los múltiples estudios realizados en varias polimerasas sobre el cambio de especificidad de sustrato, no se sabe si el sitio catalítico que incorpora el nucleótido no específico es el mismo que incorpora el nucleótido específico. Si se pudiese mostrar que la misma región o dominio de una polimerasa es capaz de funcionar como DNA polimerasa y como RNA polimerasa se daría apoyo a la hipótesis de un origen común para las polimerasas. Considerando que la similitud en secuencia en el motivo C entre las polimerasas es baja (una sola identidad entre los 14 residuos), la demostración de que el motivo C participa tanto en la actividad de DNA polimerasa como en la de RNA polimerasa en la misma enzima, apoyaría la idea de que los motivos C de DNA y RNA polimerasas son efectivamente homólogos. Así, en este trabajo se propuso mostrar: 1) que una DNA polimerasa es capaz de comportarse como RNA polimerasa y 2) analizar si residuos que son esenciales para la función natural de DNA polimerasa también son indispensables para una posible actividad inducida de RNA polimerasa.

OBJETIVOS

1. Estudiar el efecto del manganeso sobre la especificidad de sustrato de la RT de HIV-1. En particular, analizar si la presencia de manganeso induce la incorporación de ribonucleótidos sobre un molde de RNA (inducción de actividad de RNA replicasa).
2. Estudiar el efecto del manganeso sobre la actividad de DNA polimerasa de la RT.
3. Mutagenizar residuos del motivo C de la RT de HIV-1 y analizar que efecto tienen las mutaciones sobre:
 - a) La actividad de DNA polimerasa en presencia de magnesio y en presencia de manganeso.
 - b) La especificidad de sustrato en presencia de manganeso (efecto de dichas mutaciones sobre la actividad de RNA replicasa).

MATERIAL Y METODOS

Reactivos. Los nucleótidos con isótopos radioactivos se adquirieron en Amersham, al igual que la proteína A marcada con ^{125}I . El anticuerpo anti-RT se adquirió en New England Nuclear (Dupont). El kit para la reacción de polimerasa en cadena y los nucleótidos se adquirieron en Perkin Elmer. La DNA polimerasa Vent, las enzimas de restricción, la DNA ligasa y la Polinucleótido cinasa del fago T4 fueron de la marca New England Biolabs. El homopolímero poliC y el oligonucleótido oligo(dG) así como el DEAE-Sephacel se obtuvieron de Pharmacia. De los oligonucleótidos para la mutagénesis 2 (oD186H y oS1) se obtuvieron de la Unidad de Síntesis del CISEI-INSP (cuando estuvo a cargo de la Dra. Yolanda Fuchs), el resto de la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El kit de Secuensa Versión 2, la urea ultrapura y el kit USBioclean se adquirieron de la marca USB. Los filtros DE-81 fueron de la marca Whatman. El Tolueno y el Metanol fueron de J. T. Baker. Otros reactivos utilizados que fueron adquiridos de la marca SIGMA se enlistan a continuación: DNA celulosa, isopropil- β -D-galactopiranosido (IPTG), Tris-HCl, Tris base, Tritón X-100, GTP, NaCl, MgCl_2 , MnCl_2 , Acrilamida, Bis-acrilamida, MgSO_4 , Lisozima, etilén diamín tetra acetato (EDTA), dithiotreitol (DTT), glicerol, glicina, azida de sodio, Ampicilina, Kanamicina, 1,4-bis(2-5 feniloxazol) benceno (POPOP), 2-5 difeniloxazol (PPO) y citrato de sodio.

Cepas y plásmidos. Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 α . Se utilizó el plásmido pRT/CG, que contiene el gen *pol* de HIV-1 (región BglII-NdeI del genoma de HIV-1, que contiene el marco de lectura abierta *pol*), el promotor PN25^{5'}/O (fusión del promotor PN25 del fago T5 con el operador *lac* de *E. coli*), un sitio sintético de unión al ribosoma y un terminador t1 (terminador del operón *rrnB* de *E. coli*), además de la región PvuII-EcoRI del plásmido pBR322 que contiene el gen de β -lactamasa y el origen de replicación (Leuthardt y LeGrice, 1988); este plásmido fue donado amablemente por el Dr. S.F.J. Le Grice.

Purificación de la transcriptasa reversa. Se inocularon cultivos con bacterias (*E. coli* DH5 α) conteniendo el plásmido pRT/CG en medio Luria, se dejaron crecer hasta una densidad óptica de 0.7 unidades. Inmediatamente después se indujeron con Isopropil- β -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 4 horas. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 3,000 rpm durante 15 minutos a 20°C (rotor GSA), se resuspendieron en amortiguador de lisis (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 10mM, NaCl 0.3M) a razón de 2ml por gramo de bacterias. Las bacterias se lisaron agregando 2mg/ml de lisozima a la suspensión, se incubaron durante 30 minutos a 0°C. Se

agregó a la suspensión NaCl a una concentración final de 1M y se incubó durante 15 minutos a 0°C. Los restos celulares se precipitaron por centrifugación a 30,000rpm en rotor 80Ti durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se rescató y se dializó durante 12 horas contra amortiguador de diálisis (Tris-HCl 50mM, pH 7.5, EDTA 1mM, DTT 1mM, Tritón X-100 0.1% v/v, NaCl 25mM y glicerol 10%). Los ácidos nucleicos se removieron precipitándolos con amortiguador A (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1mM, DTT 1mM, NaCl 25mM, glicerol 10% v/v y sulfato de estreptomycin 5% p/v) preparado al momento. El extracto dializado sin ácidos nucleicos se aplicó a una columna cromatográfica de DEAE-Sephacel de 4ml equilibrada con amortiguador I (Tris-HCl 50mM, pH 8.0, EDTA 1mM, DTT 1mM y glicerol 10%) conteniendo NaCl 25 mM. La RT se eluyó con el mismo amortiguador (este paso se modificó para poder purificar la mutante, en éste caso la columna se equilibró con amortiguador I con 10mM de NaCl y las fracciones se eluyeron con un gradiente de 10 a 40 mM de NaCl en el mismo amortiguador, éste proceso modificado también funcionó para la silvestre). En las fracciones eluidas se analizó la actividad de DNA polimerasa mediante ensayos de actividad enzimática. Las fracciones con actividad enzimática de transcriptasa reversa se juntaron y constituyeron el extracto semipurificado. El extracto semipurificado se aplicó a una columna de DNA celulosa equilibrada con amortiguador II (Tris-HCl 50mM, pH 8.0, EDTA 1mM, DTT 0.5mM y glicerol 10% v/v). La RT se eluyó de esta columna con un gradiente de 0 a 0.7M de NaCl (Le Grice, *et al.*, 1988). Las fracciones con actividad enzimática de transcriptasa reversa se mezclaron, se concentraron por diálisis hasta una concentración de glicerol de 50% y se almacenaron a -70 C).

Western blot. La separación de las proteínas obtenidas se realizó por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12.5%, de acuerdo con el método de Laemli (1970). Al concluir la separación las proteínas, éstas se electrotransfirieron a filtros de nitrocelulosa durante 3 horas a 50 volts en amortiguador de transferencia (Tris-base 3.06g/l, glicina 14.4g/l y metanol 20%v/v). Los filtros se bloquearon con solución TBS (NaCl 50mM, Tris 20mM pH 7.4 y Azida de sodio 0.02%) con leche al 10%p/v (leche descremada en polvo), durante cuatro horas. Los filtros bloqueados se incubaron toda la noche con una dilución 1:100 del anticuerpo anti RT (monoclonal IgG1 de ratón, molécula completa; NEN-DUPONT). Después de la incubación los filtros se lavaron 4 veces durante 15 minutos con TBS-leche al 5%. Los filtros se incubaron con el segundo anticuerpo (anti IgG de ratón) durante dos horas y se lavaron cuatro veces como se indicó arriba. Finalmente los filtros se incubaron dos horas con ¹²⁵I-Proteína A y se lavaron nuevamente cuatro veces con TBS-leche 5%. Los filtros se

sellaron dentro de bolsas de polietileno y se expusieron placas autorradiográficas al filtro a -70°C durante 12 horas.

Mutagénesis. Se hizo por amplificación del plásmido completo utilizando dos oligonucleótidos localizados "cola a cola" (encontrados por sus extremos 5') sobre las cadenas opuestas del DNA; la secuencia de uno de los oligonucleótidos es la silvestre y el otro lleva la mutación deseada (Helmsley, *et al.*, 1989). Los oligonucleótidos para introducir las mutaciones fueron: oM184G, AATACGGGGATGATTTGTAT ; oD186H, AATACATGGATCATTGTAT y oDD185/186DTD, AATACATGGATACTGATTTGTATG. El oligonucleótido con secuencia silvestre fue: oS1, GATAGATAACTATGTCTGGA, en todos los casos. El programa de amplificación fue: 1'30" a 94°C , 1'30" a 56°C y 3'30" a 72°C durante 25 ciclos en un regulador térmico por ciclos (Techne PHC2). A la mezcla de amplificación (Tris-HCl 50mM, pH 8.0, MgSO_4 2mM, albúmina de suero bovino (BSA) 1mg/ml, 200mM de cada uno de los dNTP's: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) se le agregaron 650ng de cada oligonucleótido y 40ng de DNA molde (pRT/CG) en 100ml de volumen final. La mezcla se incubó a 94°C durante 5 minutos y después se enfrió rápidamente en hielo. A la mezcla se agregó 1u de DNA polimerasa Taq y 1u de DNA polimerasa Vent (para obtener DNA con extremos romos). La mezcla se agitó cuidadosamente, se cubrió con 50 ml de aceite mineral y se inició el programa de ciclos de amplificación. El DNA obtenido se fosforiló, se purificó (con el kit USBioclean) y se ligó de acuerdo con los métodos descritos en Sambrook, *et al.*, 1989. Con el DNA ligado se transformaron bacterias que se cultivaron en medio selectivo con Ampicilina y Kanamicina. El DNA de plásmido de las clonas obtenidas se cortó con enzimas de restricción. Las clonas con un patrón de restricción que mostraba un plásmido sin deleciones aparentes se seleccionaron para obtener la secuencia y corroborar la presencia de la mutación. La secuencia se hizo por el método de Sanger utilizando el kit de Sequenasa Versión 2 de USB, se siguieron las indicaciones del fabricante. Se seleccionó una clona que presentó la mutación y se obtuvo la secuencia de la región EcoRV-Pf1M1 para corroborar que no estaban presentes otras mutaciones. El fragmento EcoRV-Pf1M1 con la mutación deseada se subclonó en el plásmido pRT/CG con el gen *pol* silvestre. Se obtuvo nuevamente la secuencia de la región EcoRV-Pf1M1 para confirmar la presencia de la mutación, antes de inducir la expresión de la proteína mutante.

Ensayos de actividad enzimática. En este trabajo a la actividad de DNA polimerasa RNA dependiente, es decir a la incorporación de dNTP's sobre un molde de RNA, se le denominará actividad de DNA polimerasa. A la actividad de RNA polimerasa RNA dependiente, que incorpora rNTP's sobre un molde de RNA, se le denominará actividad de RNA replicasa. Los ensayos de actividad de polimerasa se hicieron en un volumen final de 10 μ l. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM, DTT 5mM, Tritón X-100 0.1%, poli(rC) 10mg/ml como molde ("templado"), oligo(dG)₁₀ 5mg/ml como iniciador ("primer") y 5mM sustrato. Para los ensayos de DNA polimerasa se utilizó dGTP y 1mCi de α -³² PdGTP como sustrato; para la actividad de RNA replicasa se utilizó GTP y 1 mCi de α -³² PGTP. Después de agregar la enzima las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Los ensayos se hicieron por duplicado. Las reacciones se pararon agregando EDTA a una concentración final de 25mM y se virrieron sobre filtros de papel Whatman DE81. Los filtros se lavaron 6 veces durante 5 minutos en SSC 2X (SSC 20X: NaCl 175.3g/l, citrato de sodio 88.2g/l), 2 veces con etanol y 2 veces con agua. Los filtros se secaron, se les agragaron 3ml de líquido de centelleo (PPO 5g/l y POPOP 0.3g/l disueltos en Tolueno) y se contaron en un contador de centelleo beta. Una **unidad enzimática** se definió como la cantidad de enzima que incorpora un picomol de nucleótido en ácido nucleico precipitable a 37°C en 15 minutos. Para el análisis de los productos polimerizados las reacciones se llevaron a cabo en 25ml, después de detener las reacciones 10ml se contaron como se describió anteriormente y 10ml se cargaron a un gel de poliacrilamida 10%-urea 8M. La electroforesis se hizo a 500 Volts durante 2 horas. Los geles se secaron y se expusieron con placas fotográficas para obtener las autorradiografías.

RESULTADOS

PURIFICACIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA.

La transcriptasa reversa silvestre de HIV-1 se purificó más de 5,000 veces a partir de extractos de cultivos bacterianos (*E. coli* DH5 α transformada con pRT/CG) inducidos con IPTG durante 4 horas (Leuthardt y Le Grice, 1988). Las fracciones eluidas de la columna cromatográfica de afinidad (DNA celulosa) se analizaron por el ensayo de actividad enzimática de DNA polimerasa, las que presentaron actividad se mezclaron y se concentraron. En la Figura 4A se muestra un análisis de la proteína purificada en un gel de poliacrilamida teñido con Coomasie, se presentan dos bandas de proteína que corresponden a las dos subunidades de la RT (p66 y p51). La actividad específica obtenida a lo largo del proceso de purificación se presenta en el pánel B de la misma Figura. Con la proteína silvestre purificada se estudió el efecto del manganeso sobre la especificidad de sustrato y sobre la actividad de DNA polimerasa de la RT mediante ensayos de actividad.

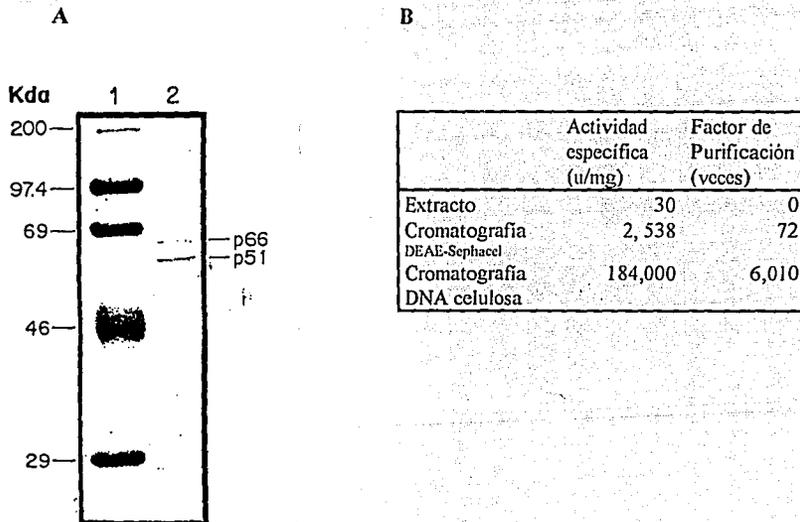


Figura 4. Transcriptasa reversa purificada. A) Análisis de la proteína purificada por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12.5%, teñido con Coomasie (ver Materiales y Métodos). Carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2 RT purificada. Se indican las subunidades p66 y p51 de la RT. B) Registro de la actividad específica (en u/mg de proteína) durante el proceso de purificación de la RT.

ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA.

Al igual que otras polimerasas la RT de HIV-1 requiere un catión divalente para su actividad enzimática de DNA polimerasa, específicamente requiere magnesio. Se hicieron ensayos de actividad de DNA polimerasa en presencia de magnesio o de manganeso con el fin de analizar si éste último catión era también capaz de activar a la RT para esta actividad. Como se muestra en la Figura 5 se encontró que la RT purificada era enzimáticamente activa en presencia de magnesio. La RT es activada para la incorporación de dNTP's por manganeso, pero a un nivel diez veces menor que en presencia de magnesio (Figura 5). Este resultado muestra que la RT prefiere utilizar al magnesio como catión activador para su actividad de DNA polimerasa como se ha reportado previamente (Lightfoote, *et al.*, 1986).

ACTIVIDAD DE RNA REPLICASA.

Uno de los objetivos de este trabajo fué alterar la especificidad de sustrato de la RT con el fin de mostrar que una polimerasa puede cumplir funciones de otro tipo de polimerasa. Es decir que puede utilizar un sustrato diferente a aquél para el que es específica, pues si tienen un origen común este fenómeno debió haber ocurrido como parte de la divergencia de funciones. Solamente existen dos sustratos naturales posibles para las polimerasas, los rNTP's y los dNTP's, el sustrato específico para la RT son los dNTP's. Con el fin de determinar si el manganeso es capaz de alterar la especificidad de sustrato de la RT se analizó la incorporación de rNTP's en presencia de este catión (Figura 6). La RT incorpora ribonucleótidos en presencia de manganeso, esta actividad de RNA replicasa es reducida, pero claramente detectable, corresponde en este ensayo aproximadamente al 3% de la actividad de DNA polimerasa. La incorporación de rNTP's también fué activada en presencia de magnesio pero a un nivel 10 veces menor que en presencia de manganeso. En la alteración de la especificidad de sustrato posiblemente también está contribuyendo la concentración de sustrato ya que sólo está presente el sustrato no específico. Sin embargo, en las mismas condiciones el magnesio activa la incorporación de ribonucleótidos a un nivel 10 veces menor que el manganeso.

Aunque el manganeso altera la especificidad de sustrato de la RT no la invierte, pues aún en presencia de este catión puede seguir incorporando su sustrato específico (dNTP's). En la Figura 7 se compara la actividad específica de DNA polimerasa y de RNA replicasa en presencia de manganeso. Como puede apreciarse, en presencia de manganeso la RT es capaz de incorporar los dos tipos de sustratos, tanto rNTP's como dNTP's, es decir su especificidad de sustrato se amplía, aunque la eficiencia de incorporación del sustrato específico es diez veces menor que en presencia de magnesio. Así, la polimerasa en presencia de manganeso tiene especificidad de sustrato poco restringida.

La máxima eficiencia en incorporación de dNTP's ocurre en presencia de magnesio (Figura 5) y la máxima eficiencia de incorporación de rNTP's ocurre en presencia de manganeso (Figura 6). Los dNTP's se incorporan más eficientemente que los rNTP's en cualquier caso.

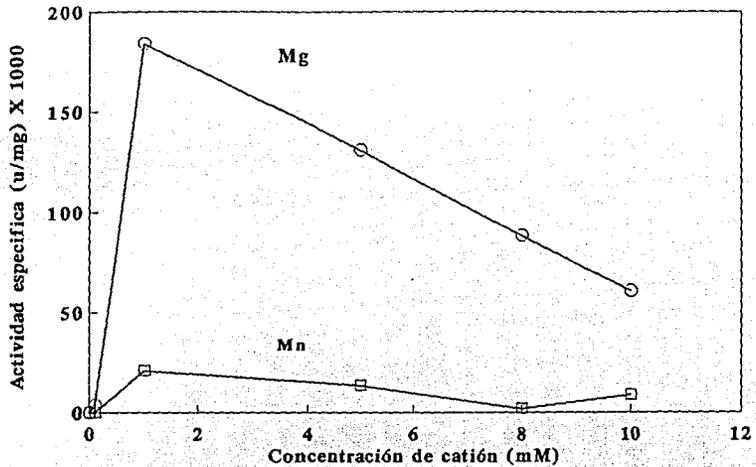


Figura 5. Actividad de DNA polimerasa de la RT de HIV-1. Se muestra la actividad específica de DNA polimerasa (u/mg de proteína) en función de la concentración de magnesio (o) y la misma actividad a concentraciones crecientes de manganeso como catión activador (□). Cada curva representa un ensayo independiente en las mismas condiciones excepto que el catión activador es diferente para cada caso. El sustrato utilizado fue $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dGTP. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a 37°C.

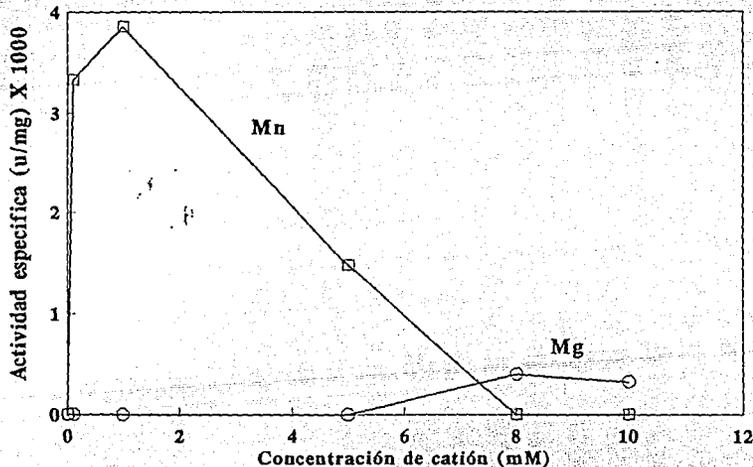


Figura 6. Actividad de RNA replicasa. Se muestra la actividad específica de RNA replicasa (en u/mg de proteína) en función de la concentración de manganeso (□) o de magnesio (o). Cada curva representa un ensayo independiente en las mismas condiciones excepto que el catión activador es diferente para cada caso. El sustrato utilizado fue $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ GTP. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a 37°C.

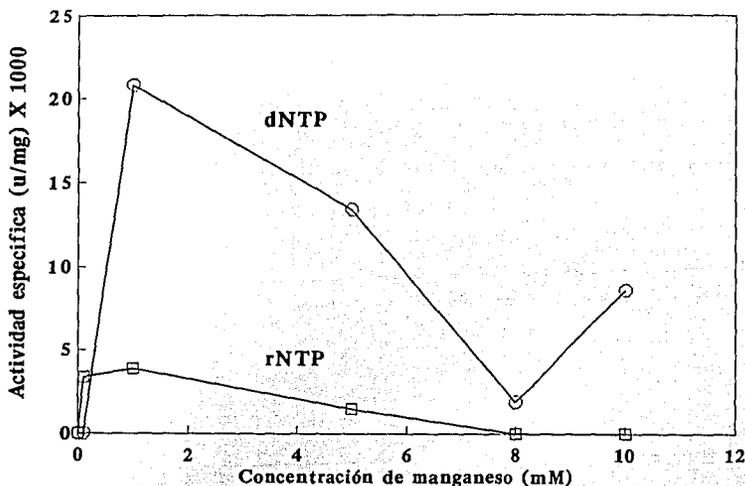
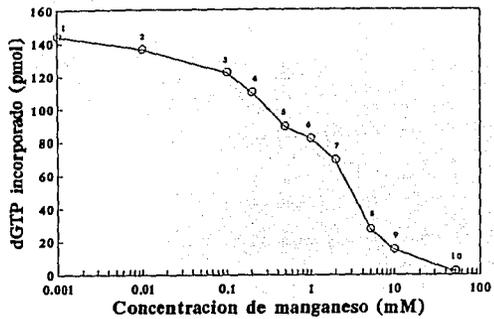


Figura 7. Actividades de DNA polimerasa y de RNA replicasa en presencia de manganeso. Actividad específica (en u/mg de proteína) de RNA replicasa (□) y de DNA polimerasa (o) en función de la concentración de manganeso como catión activador. Como sustrato se usó ^{32}P GTP para la actividad de RNA replicasa y ^{32}P dGTP para la actividad de DNA polimerasa. El manganeso permite la incorporación de ambos sustratos. Las condiciones de ensayo son las mismas que se indican en las Figuras 5 y 6.

EFFECTO DEL MANGANESO SOBRE LA ACTIVIDAD DE DNA POLIMERASA.

Ya que el manganeso como único catión presente activó la incorporación de dNTP's, se propuso estudiar el efecto del manganeso sobre la actividad de DNA polimerasa RNA dependiente cuando la RT es activada por magnesio (Figura 8). Se encontró que en presencia de magnesio (8 mM) y a concentraciones crecientes de manganeso se inhibe la actividad de DNA polimerasa de la RT. En la Figura 8A está graficada la actividad de DNA polimerasa (pmoles de dGTP incorporados) en función de la concentración de manganeso. A concentraciones tan bajas como 100 μM de manganeso la actividad se redujo al 85% y a 2mM de manganeso la actividad se redujo drásticamente, al 50%. Los polímeros producidos por la actividad de DNA polimerasa se analizaron en geles de poli(acrilamida-urea) con el fin de tener una referencia para el análisis de los polímeros producidos por la actividad de RNA replicasa. La Figura 8B es una autorradiografía del gel de poli(acrilamida-urea) en el que se analizó una réplica de cada uno de los puntos graficados en la Figura 8A. El iniciador (o primer) que se utiliza en todos los ensayos es de 10 nucleótidos (nt) de longitud; en los geles utilizados el xilén cianol comigra con oligonucleótidos de 10 nt y el azul de bromofenol comigra con oligonucleótidos de 28 nt de longitud. La longitud de los DNA's producidos fué de más de 28 bases pues en la autorradiografía aparece un barrido por arriba del azul de bromofenol y hasta el nivel de los pozos (Figura 8B). Es decir que la polimerasa agregó, al menos, 18 nucleótidos al iniciador.

A



B

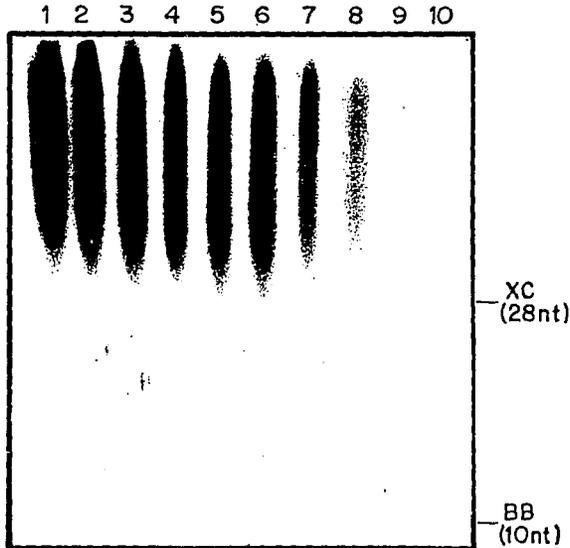


Figura 8. Efecto del manganeso sobre la actividad de DNA polimerasa. El ensayo de actividad de DNA polimerasa (o) se realizó en presencia de 8 mM de magnesio. A) Gráfica de la actividad de DNA polimerasa (en pmoles de α - 32 PdGTP incorporados) en función de la concentración de manganeso. El ensayo se hizo por triplicado y una de las tres reacciones de cada punto representado en la gráfica se analizó en gel de poliacrilamida. B) Análisis de los productos polimerizados en gel de poliacrilamida 10%-urea 8M. Autorradiografía del gel, cada carril corresponde a un punto de la gráfica (nt, nucleótidos). Los números de los carriles corresponden a los de los puntos graficados en el pánel A.

Se ha encontrado que ciertas mutaciones confieren resistencia a la inhibición de la RT por diversos compuestos. Un ejemplo es la mutación Y181I (De Vreeze, *et al.*, 1992), que confiere resistencia a compuestos derivados de TIBO (tetrahydro-imidazol (4,5,1-jk)-benzodiazepina-2(1H) uno y tiona). Esta mutante es interesante porque hace al motivo C de la RT de HIV-1 más parecido al de la RT de HIV-2 y ésta última enzima es naturalmente resistente a los derivados de TIBO. Por otro lado se ha visto que el manganeso induce una mayor activación de la RT de HIV-2 en comparación con la de HIV-1. Ante el hallazgo de que el manganeso inhibió la actividad de DNA polimerasa de la RT, se propuso estudiar el efecto del manganeso sobre la actividad de DNA polimerasa de esta mutante, donada por el Dr. Jozeff Anneé. Se encontró que la mutante Y181I es resistente a dicha inhibición. En la Figura 9 se muestra la actividad de ésta mutante (en pmoles de α -³²PdGTP incorporados) activada por magnesio 8 mM y a concentraciones crecientes de manganeso, comparada con la RT silvestre. Aunque la actividad de la mutante es mucho más baja que la actividad de la silvestre, la actividad de DNA polimerasa de la mutante permanece casi constante aún a concentraciones relativamente altas de manganeso. La disminución en la activación por magnesio y de la inhibición por manganeso en esta mutante sugiere que el residuo Y 181 podría estar involucrado en la unión a ambos cationes.

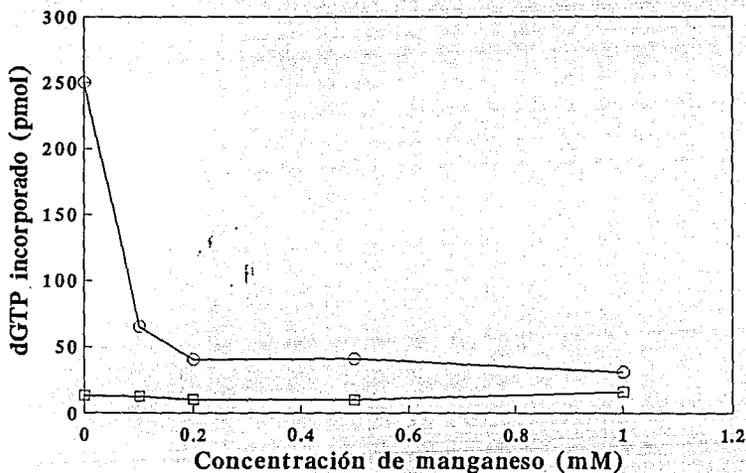


Figura 9. Efecto del manganeso sobre la actividad de DNA polimerasa de la mutante Y181I. En la gráfica se muestra la actividad de DNA polimerasa de la RT silvestre (o) y de la mutante Y181I (□) en función de la concentración de manganeso. Ambas enzimas fueron activadas por magnesio 8 mM en el ensayo. En la gráfica se presenta la actividad en pmoles de α -³²P dGTP incorporados. Estas dos enzimas recombinantes fueron semipurificadas (De Vreeze, *et al.*, 1992) en el laboratorio del Dr. Anneé y en el extremo amino presentan 2 residuos de aminoácido diferentes (D'Aquila y Summers, 1989) a la enzima silvestre que se utilizó a lo largo de éste trabajo.

PROCESIVIDAD DE LA ACTIVIDAD DE RNA REPLICASA.

Los productos de polimerización de ribonucleótidos se analizaron de manera similar a la anterior para tratar de determinar si los polinucleótidos producidos por la actividad de RNA replicasa eran de longitud comparable a los obtenidos en la actividad de DNA polimerasa. En la Figura 10 se muestra la actividad de RNA replicasa registrada (en pmoles de rNTP incorporados) y el autorradiograma correspondiente. Así, los puntos de mayor actividad, 5 (0.5mM Mn), 6 (1mM Mn) y 7 (1.5mM Mn), de la Figura 10A corresponden a los carriles con los polimeros más largos: Figura 10B carriles 5, 6 y 7. En el autorradiograma (Figura 10B) se aprecia un barrido que está por encima del nivel a donde migra el azul de bromofenol (que comigra con polinucleótidos de 28 bases). Como el iniciador es de 10 bases de longitud, entonces es posible que la RT esté produciendo polirribonucleótidos en los que incorpora, al menos, 18 rNTP's. Sin embargo se requiere el análisis de ésta actividad sobre un molde heteropolímero de longitud conocida para determinar la procesividad de la actividad de RNA replicasa inducida por manganeso.

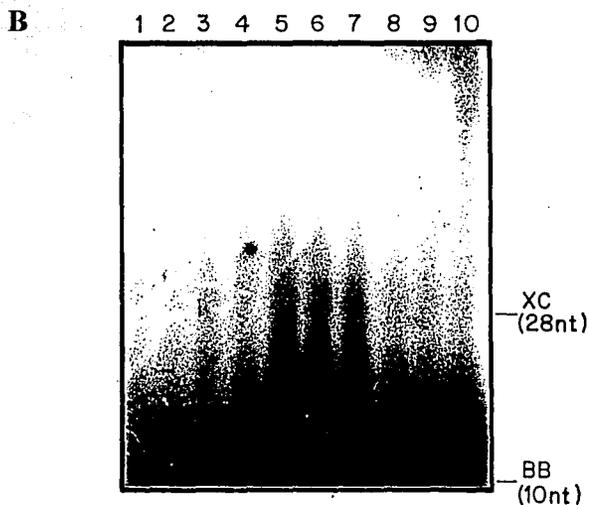
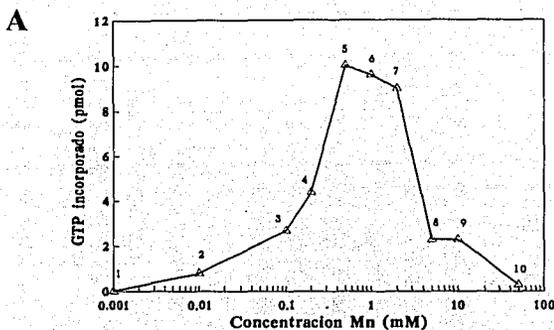


Figura 10. Actividad de RNA replicasa. A) Actividad de RNA replicasa (en pmoles de α - 32 P-GTP incorporados) a concentraciones crecientes de manganeso como catión activador. El ensayo se hizo en $10\mu\text{l}$ a 37°C durante 15 minutos y se hizo por triplicado. Dos reacciones se cuantificaron por centelleo (el promedio de las dos está representada un punto) y la tercera se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida 10%- urea 8M. B) Análisis de los productos de la actividad de RNA replicasa. Autorradiografía del gel donde se analizaron una de cada tres reacciones. Los números de los carriles corresponden a los de los puntos graficados en el pánel A. El iniciador o primer es el que se usa en todos los ensayos, poli(dG) $_{10}$ (de 10 bases de longitud).

CONSTRUCCION DE LA MUTANTE D186H EN EL MOTIVO C.

Habiendo inducido una alteración en la especificidad de sustrato se plantea el problema que el mismo sitio catalítico podría ser o no responsable de la actividad de DNA polimerasa y de la actividad de RNA replicasa. El hallazgo de la ampliación de la especificidad de sustrato podría apoyar la hipótesis de que las DNA polimerasas y las RNA polimerasas tienen un origen común si se muestra que ambas actividades dependen del mismo sitio catalítico.

Con el objeto de estudiar si los residuos del motivo C de la RT están involucrados en la unión a metal y en las actividades de DNA polimerasa y de RNA replicasa se propuso generar mutaciones en dicho motivo. Al hacer mutagénesis sitio dirigida por PCR como se indica en Materiales y Métodos se obtuvieron dos mutantes: D186H y M184G. En este trabajo solamente se analizó la primera. Se obtuvo la secuencia de los 506 pares de bases entre los sitios de restricción EcoRV y PflMI, no se encontraron mutaciones adicionales a la mutación G→C que cambia el codón GAT(D) por GAC(H). El fragmento EcoRV-PflMI se subclonó en el plásmido con el gen *pol* silvestre y se obtuvo nuevamente la secuencia. En la Figura 11 se muestra la secuencia de la mutante en la región que codifica para el motivo C comparada con la secuencia silvestre.



Figura 11. Secuencia de la región del motivo C de la RT silvestre y de la mutante D186H. Las bases de la secuencia silvestre están marcadas como w y las de la mutante como m. Las flechas señalan a la base G de la silvestre y a la C de la mutante que ocupan la misma posición. Las reacciones de secuencia se hicieron con el kit de Sequenasa versión 2, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (USB).

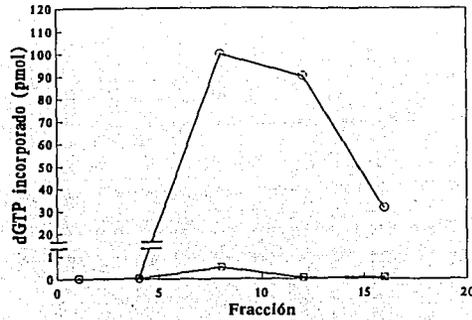
PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUTANTE D186H.

Para comparar las actividades de la RT silvestre con las de la mutante se propuso purificar esta última. Como existía la posibilidad de que la mutante no presentara actividad de DNA polimerasa, la purificación de la mutante se hizo a manera de réplica de la silvestre en paralelo. En particular en las cromatografías se seleccionaron las fracciones que tenían el mismo número (es decir, las que eluyeron al mismo volumen de la columna) que las fracciones con actividad eluidas durante la purificación de la enzima silvestre. Además se utilizaron anticuerpos contra la RT silvestre para corroborar la presencia de la mutante e identificarla en los extractos y a lo largo de la purificación.

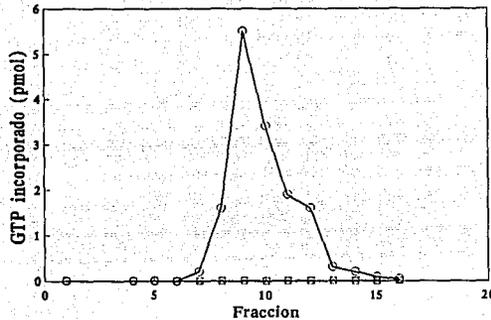
Debido a que no existía seguridad de que la misma metodología de purificación funcionara para la mutante, durante el proceso de purificación se analizaron las actividades de DNA polimerasa y de RNA replicasa de las fracciones eluidas de las columnas cromatográficas. Aplicando la metodología originalmente descrita para la purificación de la RT (Leuthart y Le Grice, 1988) no fue posible detectar claramente las dos subunidades de la RT mutante (por Western blot); esto sugiere que la mutación pudo haber modificado algunas propiedades de la enzima. Para lograr la purificación de la mutante se modificó la metodología: la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel se desarrolló con un gradiente de 10 a 40mM de NaCl. La purificación de la RT silvestre se modificó en el mismo sentido para poder hacerlas como réplicas.

En la Figura 12 se ilustra la fase de purificación que corresponde a la cromatografía de intercambio iónico. En la gráfica del panel A se muestra la actividad de DNA polimerasa de las fracciones de la mutante y de la silvestre. La máxima actividad de DNA polimerasa de la mutante apareció en la fracción número 8 y corresponde a 0.5 pmoles de α -³²PdGTP incorporado comparados con 100pmoles para la misma fracción de la RT silvestre. Una vez determinada la actividad de DNA polimerasa se analizó la actividad de RNA replicasa de las fracciones del pico de actividad de la RT silvestre y de su correspondiente en la mutante D186H. En la Figura 12B se muestra la actividad de RNA replicasa de dichas fracciones. Las de la RT silvestre presentaron actividad de RNA replicasa y las de la mutante no presentaron actividad detectable. Para corroborar la presencia de la mutante D186H en las fracciones correspondientes al pico de actividad de la RT silvestre se analizaron algunas por Western blot. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón contra la RT (subclase Ig1, NEN-9304, DUPONT) y se reveló con ¹²⁵I-Proteína A. Se encontró que las fracciones 8 a 12 del pico de actividad de la RT silvestre y sus correspondientes en la mutante D186H presentaron dos proteínas, p66 y p51. Estas proteínas corresponden a las dos subunidades de la RT (Figura 12C). Así aunque se mostró que la mutante está presente en las fracciones, éstas presentaron baja actividad de DNA polimerasa y no se detectó actividad de RNA replicasa. Por lo que se pudo demostrar que la mutación afectó ambas actividades drásticamente.

A



B



C

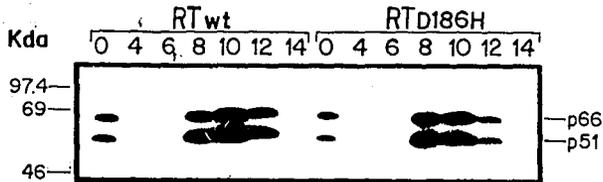


Figura 12. Análisis de las actividades de DNA polimerasa y de RNA replicasa en las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico. A) Actividad de DNA polimerasa (en pmoles de α -³² PdGTP incorporados) de las fracciones eluidas en la columna de la RT silvestre (o) y de la mutante D186H (□). B) Actividad de RNA replicasa (en pmoles de α -³² PGTP incorporados) de las fracciones del pico de actividad de DNA polimerasa de la RT silvestre (o) y de su correspondiente en la mutante (□). C) Análisis de las fracciones del pico de actividad por Western blot. El número del carril representa el número de fracción colectada y en el carril 0 está el extracto crudo. RTwt, fracciones de la RT silvestre; RT_{D186H}, fracciones de la mutante D186H. Se indican las subunidades p66 y p51. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón contra la RT (subclase Ig1, NEN-9304, DUPONT) y se reveló con ¹²⁵I-Proteína A. La placa autorradiográfica se expuso durante 12 horas.

Debido a que se encontró que haciendo la réplica de la primera fase de purificación de la RT silvestre sí se obtenía la mutante en las mismas fracciones (Figura 12), se realizó la purificación completa de la mutante y se analizaron nuevamente sus actividades de polimerasa. En la Figura 13 se muestra la mutante D186H purificada, analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y por Western blot. Se encontró que en la proteína mutante D186H purificada están presentes las dos subunidades de la RT, es decir los péptidos p66 y p51 (Figura 13 A) que muestran reactividad al anticuerpo anti-RT (Figura 13B).

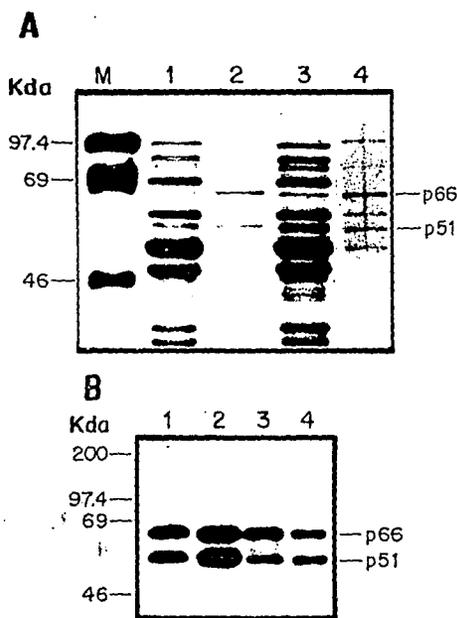


Figura 13. Análisis de la mutante D186H purificada. A) Análisis de los extractos y de las enzimas RT silvestre y mutante D186H purificadas por SDS-PAGE. Las muestras se cargaron a un gel de poliacrilamida al 12.5%, el gel se tiñó con Coomassie (ver Material y Métodos). Carril M, marcadores de peso molecular; carril 1, extracto de la RT silvestre; carril 2, RT silvestre purificada; carril 3, extracto de la mutante D186H; carril 4, mutante D186H purificada. B) Análisis de los extractos y de las enzimas purificadas por Western blot. Un duplicado del gel del panel A se transfirió a un filtro de nitrocelulosa que se bloqueó y se incubó con anticuerpo anti-RT (ver Materiales y Métodos). Se reveló con proteína A yodada con ^{125}I y se obtuvo una autorradiografía exponiendo una placa durante 12 horas al filtro revelado. Se indican los péptidos p66 y p51 reactivos al anticuerpo, que corresponden a las dos subunidades de la RT. (Kda: kilodaltones).

ACTIVIDADES DE POLIMERASA DE LA MUTANTE D186H

Finalmente, se analizaron las actividades de polimerasa de la mutante D186H purificada y se compararon con la silvestre. Al analizar la actividad de DNA polimerasa de la mutante se encontró que solamente presenta una actividad del 0.5% de la actividad de la enzima silvestre en presencia de magnesio. Cuando se analizó ésta actividad en presencia de manganeso se encontró que es superior a la encontrada en presencia de magnesio. Así, la mutante D186H es mejor activada por el manganeso para su actividad de DNA polimerasa, es decir bajó su actividad y cambió su preferencia de catión activador (Figura 14). Este resultado sugiere que el residuo mutado podría estar involucrado en la unión a metal.

Al analizar si la mutante presentaba o no actividad de RNA replicasa se intentó activarla con manganeso primero y después con magnesio, en ningún caso se obtuvo actividad detectable de RNA replicasa. Así, la mutación D186H hace disminuir fuertemente la actividad de DNA polimerasa y hace indetectable la actividad de RNA replicasa. Es decir, la misma mutación tiene un efecto muy importante sobre ambas actividades. El residuo D186 es indispensable para la integridad de ambas actividades.

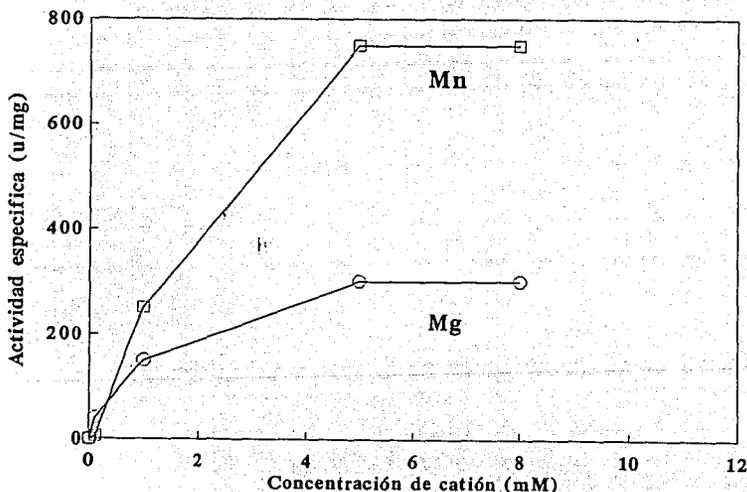


Figura 14. Análisis de la actividad de DNA polimerasa de la mutante D186H. Actividad específica de DNA polimerasa de la mutante D186H en presencia de magnesio (○) o en presencia de manganeso (□). El ensayo de actividad se realizó en un volumen de 10 μ l y se incubó a 37 °C durante 15 minutos como se describe en Materiales y Métodos. El ensayo se hizo por duplicado y se repitió dos veces.

DISCUSION

I. ACTIVIDAD DE RNA REPLICASA y ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

Al igual que otras polimerasas (Cuadro 1), la RT de HIV-1 fue capaz de incorporar un sustrato no específico, en este caso un ribonucleótido. Se encontró que la actividad de RNA replicasa inducida por manganeso puede alcanzar aproximadamente el 7% de la actividad de DNA polimerasa en condiciones óptimas para ambos casos. La única diferencia entre los ensayos de DNA polimerasa y los de RNA replicasa es el catión activador y, desde luego, el sustrato; todas las demás condiciones fueron iguales en ambos ensayos. Así, la actividad óptima de DNA polimerasa alcanza 140pmol en presencia de 8 mM de cloruro de magnesio (Figura 8), en tanto que la actividad más alta de RNA replicasa es de 10pmol a 0.5 mM de cloruro de manganeso (Figura 10). En ausencia de catión no hay incorporación de ribonucleótidos. La alta concentración del sustrato no específico posiblemente contribuye a éste relajamiento de la especificidad de sustrato, sin embargo en las mismas condiciones su incorporación es mucho menor en presencia de magnesio, ésto sugiere que el manganeso es el factor que determina tanto la activación como la alteración de la especificidad de sustrato.

En la estructura del dominio catalítico de la DNA polimerasa β de rata se han encontrado dos sitios de unión a magnesio; los dos iones están unidos al trío de carboxilatos estructuralmente conservados de los motivos A y C (Davies, *et al.*, 1994). En contraste, en los complejos de la misma enzima con manganeso se ha reportado por un lado un solo sitio de unión (Sawaya, *et al.*, 1994) y por otro lado 2 sitios (Davies, *et al.*, 1994), en la misma región del trío de carboxilatos; no obstante en ambos casos la coordinación del ión manganeso por los residuos D es diferente a la del ión magnesio. Si retomamos estas diferencias como modelo para interpretar el cambio de especificidad de la RT, es posible que el manganeso se esté uniendo, en la RT de HIV-1, a los residuos carboxílicos que guardan posiciones similares a los de la DNA polimerasa mencionada, es decir, a los residuos de D 110, 185 y 186. Esta unión podría ser la causa de la activación de la enzima y de la alteración de su especificidad de sustrato, que permite la incorporación de ribonucleótidos. Además la coordinación del manganeso por medio de los residuos de D podría ser diferente a la del magnesio y los cambios conformacionales que ésto pueda provocar podrían estar haciendo menos eficiente la incorporación del sustrato específico, ésto se ve apoyado por la demostración de que el manganeso inhibe la actividad de DNA polimerasa de la RT aún en presencia de 8 mM de magnesio, su catión natural.

Las RNA polimerasas como la del fago T7 presentan un solo residuo D en el motivo C (Sousa, *et al.*, 1993), aunque no se conoce si éste residuo coordina el catión y cómo lo hace es posible que la unión de manganeso simule la conformación de los iones necesaria para la incorporación de ribonucleótidos.

La diferencia entre los dos tipos de sustrato consiste solamente en un hidroxilo adicional en el carbono 2' del azúcar de los ribonucleótidos (Figura 3). A éste respecto es interesante mencionar que de acuerdo con la estructura del complejo DNA polimerasa β -molde-iniciador-ddCTP, se hizo un modelaje de los hidroxilos sobre el azúcar del ddCTP (Pelletier, *et al.*, 1994). Se encontró que bastaría

con un pequeño cambio en la orientación del ddCTP para reducir el impedimento estérico en el carbono 2' de la ribosa. Esto explicaría porqué es tan sencillo inducir un cambio de especificidad de sustrato en las polimerasas, como en el caso de la RT, en presencia de manganeso. Es posible que el manganeso al unirse a los residuos D en la RT, por su tamaño, induzca el cambio conformacional necesario para reducir el impedimento estérico entre los residuos del sitio activo y el hidroxilo adicional del ribonucleótido.

Aunque las evidencias indican que posiblemente un gran número de residuos intervienen en la unión a nucleótido, es posible que sólo algunos de ellos determinen la especificidad de sustrato. La inducción de actividad de replicasa por manganeso podría significar, a nivel estructural, una eliminación del impedimento estérico para la entrada de ribonucleótidos en el sitio activo, mediante el desplazamiento en la orientación de algunos residuos que normalmente lo impiden. Si el manganeso induce cambios que afectan la especificidad de sustrato, entonces es posible que la conformación de los residuos que interactúan con el sustrato y del sustrato mismo encontrados en los complejos de la DNA Pol β con manganeso, no correspondan a la conformación real requerida para la actividad catalítica de incorporación de los nucleótidos específicos. Sería interesante observar si existen diferencias en la estructura tridimensional obtenida con magnesio, respecto a la obtenida con manganeso, aunque esto requiere una mayor resolución.

Desde el punto de vista funcional sea interesante determinar si las alteraciones provocadas por el manganeso hacen que el mismo sitio catalítico adquiera la capacidad de incorporar dos sustratos diferentes o si para el no específico se utiliza un sitio catalítico adicional. Es posible que el sitio activo responsable de la actividad de RNA replicasa que se reporta aquí, no sea el mismo que el responsable de la actividad de DNA polimerasa de la RT. Desde el punto de vista evolutivo si se demuestra que es el primer caso entonces se daría sustento a la hipótesis del origen común de las polimerasas, pues un sitio catalítico ancestral con ambigüedad de sustrato podría haber dado origen a polimerasas con sitios catalíticos específicos. Aunque no está claro que residuos o regiones están directamente involucrados en la especificidad de sustrato es fácil alterarla, lo cual tiene implicaciones funcionales y evolutivas importantes, pues aún las polimerasa actuales pueden presentar cierta ambigüedad.

II. INHIBICIÓN DE LA RT POR MANGANESO

Se encontró que, en condiciones óptimas para su actividad de DNA polimerasa RNA dependiente (incluyendo 8 mM de cloruro de magnesio), la RT de HIV-1 es inhibida por manganeso. Este efecto podría deberse a la unión del manganeso al sitio activo, provocando cambios conformacionales que afectan la actividad catalítica. Esto implicaría que las estructuras de polimerasas obtenidas en presencia del catión no específico y del sustrato específico, serían irrelevantes desde el punto de vista funcional y del mecanismo de reacción.

Existen otros dos casos de inhibición de polimerasas por manganeso, la RT de AMV (Lazcano, *et al.*, 1992) y la DNA polimerasa γ humana (Focher, *et al.*, 1990). Posiblemente las estructuras y los mecanismos guarden similitud con los de la RT de HIV-1.

En un trabajo previo propusimos que el hallazgo de que el manganeso inhibe algunas RT's, podría resultar de utilidad terapéutica en pacientes con enfermedades causadas por retrovirus, como el SIDA. Hemos encontrado que una mutación en el residuo Y181 a I (mutante donada amablemente por el Dr. Joseph Anneé) confiere resistencia a inhibición por manganeso, aunque presenta una actividad muy baja de DNA polimerasa (Figura 9). Es posible que este tipo de mutantes se seleccionen en pacientes si se llegara a utilizar el manganeso para fines terapéuticos en enfermedades causadas por retrovirus.

El hecho de que ésta mutación confiere resistencia a la inhibición por manganeso sugiere que el residuo Y181 también podría estar implicado en la unión a catión divalente activador. En particular es interesante que la RT de HIV-2 presenta isoleucina (I) y no tirosina (Y) en la posición equivalente y es mejor activada por manganeso que la RT de HIV-1 (Le Grice, *et al.*, 1988). Esto sugiere que posiblemente el residuo Y interviene en la unión a manganeso.

III. LA MUTANTE D186H

Al analizar la actividad enzimática de DNA polimerasa RNA dependiente, de la mutante D186H semipurificada y purificada, en presencia de magnesio, se encontró que la mutación abate ésta actividad. Sólo se detecta una actividad residual de 0.5% (0.5pmol) en comparación con la actividad de la enzima silvestre (100pmol), en las mismas condiciones (Figura 12).

En forma inusitada se encontró que la mutante D186H es activada más eficientemente por manganeso que por magnesio para la actividad de DNA polimerasa RNA dependiente. Así en presencia de manganeso hay una activación de 1.6% (1.6 pmol), esto es, la enzima mutante se activa 3 veces más con manganeso que con magnesio (Figura 14). Este hecho indica que efectivamente se ha alterado un sitio de unión a metal, sugiriendo que el residuo mutado podría estar involucrado directamente en esta función. Dado que el radio iónico del Mn (0.80 Å) es ligeramente mayor que el del Mg (0.66 Å), es posible que el residuo de histidina (Figura 15) esté contribuyendo a ligar el catión, pero posiblemente lo hace con una geometría más adecuada para el manganeso, permitiendo la incorporación de dNTP's.

La actividad de RNA replicasa de la mutante desciende a niveles no detectables de incorporación de ribonucleótido (cpm al nivel o por debajo del ruido de fondo). Ninguno de los dos cationes logró inducir actividad detectable de RNA replicasa en la enzima mutante. No se detectó actividad de RNA replicasa en las fracciones eluidas de la cromatografía de intercambio iónico o en la proteína purificada. Los cambios conformacionales locales que podría estar provocando la interacción simultánea del residuo de histidina y del ión Mn con el resto del sitio activo podrían impedir la entrada o el acomodo adecuado de los ribonucleótidos en el sitio activo debido a la presencia de su grupo hidroxilo adicional (respecto a los dNTP's).

La mutación D186H podría estar distorsionando la estructura general de la RT y sería posible que por esta razón se hayan visto afectadas ambas actividades de polimerización, aún cuando

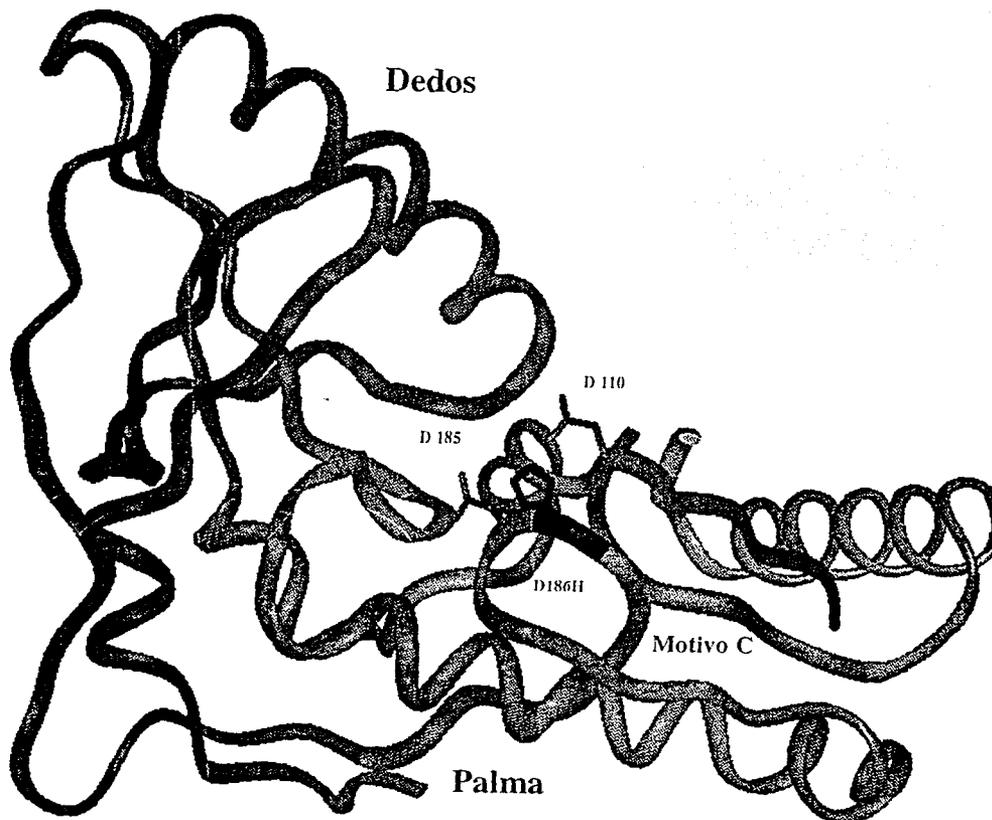


Figura 15. Ubicación del residuo mutado en la estructura del dominio catalítico de la RT de HIV-1. Se indican los subdominios Palma y Dedos. El motivo C se presenta en color verde y sobre éste se ubica el residuo mutado 186 (D186H en color azul) y el residuo D 185 (en rojo). Sobre el motivo A se encuentra indicado el residuo conservado D110 (en rojo). Estos tres residuos, localizados en la base de la palma, parecen constituir la parte medular del sitio de unión al catión divalente y a la vez del sitio activo. Las coordenadas del dominio catalítico de la RT se obtuvieron del Brookhaven Protein Data Bank (archivo 1har) de la estructura obtenida a 2.2 Å de resolución (Unge, *et al.*, 1994). La estructura que se presenta se generó utilizando el programa Insight II.

residieran en sitios diferentes de la enzima. Sin embargo, existen evidencias que indican que las perturbaciones estructurales provocadas por la mutación D186H en la RT podrían ser muy locales, éstas se describen a continuación. Aparentemente las dos subunidades aún se dimerizan, lo cual es indispensable para el procesamiento que da como resultado la subunidad p51, que fué detectada con anticuerpos en las preparaciones de la mutante (Figura 13). La mutante aún es capaz de acomodar el molde-iniciador (híbrido RNA-DNA) y utilizarlo para su actividad de DNA polimerasa, lo que indica que la estructura del canal formado por la palma, los dedos y el pulgar también se mantiene. Además, en la estructura de la RT los residuos D 185 y 186 parecen estar en contacto con el solvente pues se encuentran en la superficie del subdominio palma, que constituye la base del canal en el que se acomoda el molde-iniciador. Si la actividad de RNA replicasa existe en la mutante y es indetectable debido a que no es posible detectar el 7% de los 0.5 pmoles de actividad de DNA polimerasa, ésto indica también que la actividad de RNA replicasa se ve afectada en la medida en que se altera el sitio del que depende la actividad de DNA polimerasa, sugiriendo un solo sitio activo para ambas actividades. En caso contrario, debería ser posible detectar los 10 pmoles (aproximadamente) de actividad de RNA replicasa que se encontraron en la RT silvestre, si la mutación no hubiese afectado el sitio activo responsable de ésta actividad y residiera en un sitio diferente al de DNA polimerasa. Es decir, si la actividad de RNA replicasa dependiera de un sitio diferente al de DNA polimerasa, entonces las mutantes D186H y Y181I deberían tener la misma actividad de replicasa que la RT silvestre.

En la estructura de la DNA polimerasa β de rata los iones de manganeso se unen al mismo sitio que el magnesio, pero con una geometría diferente (Davies, *et al.*, 1994). Si en la RT los cationes se estuvieran uniendo a los residuos D del motivo C equivalentes a los de la DNA polimerasa β de rata, entonces es posible que el mismo sitio activo sea responsable de ambas actividades. Además la misma mutación parece afectar fuertemente ambas actividades, apoyando a su vez esta idea.

Por otro lado, incluso en otras polimerasas en las que se ha inducido una alteración de la especificidad (ver Cuadro 1), el manganeso podría haberse unido a los residuos homólogos a los residuos D de los motivos A y C de la DNA polimerasa β y de la RT de HIV-1. En éstos casos el mismo sitio activo podría ser responsable de la incorporación de ambos tipos de nucleótidos. Por otro lado se ha encontrado que ciertas mutaciones de los residuos D en sitios de unión a metal alteran la afinidad por el catión (Huang y Cowan, 1994), por lo que la pérdida de actividad en éste caso también podría deberse a una unión más débil del magnesio y del manganeso, contra lo que se había pensado al iniciar este trabajo. Así, aunque la similitud en secuencia del motivo C es muy baja entre RNA polimerasas y DNA polimerasas e incluso entre DNA polimerasas (KF y RT), la similitud estructural (Yadav, *et al.*, 1994) y el hecho de que la mutación D186H afecta ambas actividades en la RT favorecen la idea de un origen común para RNA polimerasas y DNA polimerasas.

Algunas RT's virales, como la de virus MoMuLV, utilizan manganeso como catión activador óptimo y la RT de HIV-2 (que difiere en varios residuos del motivo C con la de HIV-1) es

parcialmente activada por manganeso (Le Grice, *et al.*, 1988), de tal modo que algunas diferencias en la estructura primaria del motivo C podrían ser responsables del uso diferencial de catión activador. Es posible que algunas mutaciones sean capaces de inducir un cambio en el uso de catión activador; éste podría ser el caso de la mutación D186H en la RT de HIV-1 y de las mutaciones D1002N y T1003S en la DNA polimerasa α humana (Copeland y Wang, 1993), que permiten una activación por manganeso para la actividad de DNA polimerasa, mejor que en presencia de magnesio (catión óptimo para las respectivas enzimas silvestres), sería interesante medir la afinidad de la RT silvestre y de la mutante D186H por cada uno de las cationes (Mg y Mn) pues ésto contribuiría a comprender la disminución en la actividad de DNA polimerasa y el cambio en catión preferencial provocados por la mutación.

Aunque la mutación D186H provocó que la RT fuera activada más eficientemente por manganeso que por magnesio para su actividad de DNA polimerasa, ésta no hizo más eficiente la incorporación de ribonucleótidos, es posible que la mutación afecte fuertemente el sitio catalítico. La mutación podría impedir el acomodo de nucleótidos, efecto que es parcialmente revertido por el manganeso para los dNTP's, pero recordemos que los ribonucleótidos tienen un grupo hidroxilo adicional y aún en presencia de manganeso la mutación podría haber inducido otros cambios conformacionales que introducen un impedimento estérico adicional en el caso particular de los rNTP's. En la mutante Y181I también se ven afectadas las dos actividades, pues la actividad de DNA polimerasa disminuye y la de RNA replicasa es indetectable. Esto muestra nuevamente que los residuos del motivo C son importantes para ambas actividades. Esto implicaría además que la preferencia por el catión puede relacionarse directamente con la función de otros residuos, aparte de los residuos D, presentes cerca del sitio activo y su conformación en el sitio activo. En cuanto a la especificidad de molde-iniciador la diferencia entre el específico y el no específico además del azúcar distinto, también implica la forma que puede adoptar ésta molécula. El DNA puede adoptar forma B, mientras que el RNA solamente la forma A y los híbridos RNA-DNA pueden adoptar la conformación A. Como se indicó anteriormente el manganeso también induce cambios de especificidad de molde. El mecanismo en éste caso podría ser de carácter diferente al que induce el cambio de especificidad de sustrato. En el caso del sustrato se ha visto en la DNA polimerasa β de rata que el catión interactúa directamente con los fosfatos del nucleótido entrante y la conformación con manganeso es diferente que con magnesio. En el caso del molde podría ser que se genere un cambio conformacional en el canal de la palma por la presencia de los iones inespecíficos en el sitio de unión a metal que se sobrelapa con el de unión a molde-sustrato. Se ha encontrado que la doble mutación A114S/V118S, en la RT de HIV-1, provoca una disminución drástica en la actividad de DNA polimerasa RNA dependiente pero no presenta actividad de DNA polimerasa DNA dependiente, es decir pierde su capacidad de utilizar al DNA como molde (Boyer, *et al.*, 1994), esto indica que se requieren pocos cambios para cambiar la especificidad de molde, aunque tal vez se requieren mutaciones adicionales para que haya eficiencia en la polimerización después del cambio.

El motivo C de KF (y de otras polimerasas de la familia Pol) presenta un residuo D y uno E, a diferencia del par de residuos D que presentan otras DNA polimerasas como la RT. Es notable que cuando se ha mutado cualquiera de los residuos D a E en la RT, se abate completamente la actividad enzimática; ésto sugiere que hay algunas restricciones de tipo estructural que impiden la actividad, incluso considerando que el E forma parte del sitio activo de otras polimerasas y de unión a metal en otras proteínas (Chakrabarti, *et al.*, 1990b) . Es decir, que se requieren mutaciones en residuos adicionales para mantener la estructura que permite la actividad catalítica, aunque dichos residuos no participen directamente en catálisis.

IV. IMPLICACIONES EVOLUTIVAS

Polimerasas y material genético. El contexto en el que se desarrolló este trabajo es la hipótesis de que el RNA antecedió al DNA como material genético. En el curso de la evolución debieron ocurrir varios eventos para que el DNA pasara a ser el material genético en las células. Durante la transición de RNA a DNA como material genético se habrían seleccionado mutaciones que favorecieran la utilización de un nuevo molde o sustrato o bien mutaciones que permitieran un cambio en el uso de catión divalente que a su vez favoreciera este cambio de especificidad y así reclutar una nueva enzima. Considerando que los genomas de RNA evolucionan a una tasa más alta que los de DNA (Holland, *et al.*, 1982), resulta lógico pensar que las nuevas especificidades para molde y sustrato se hubiesen seleccionado muy rápidamente. Esto se ve apoyado por el hecho de que al aplicar análogos de nucleótidos como inhibidores de la RT de HIV-1, se seleccionan rápidamente mutantes resistentes; ésto ha ocurrido prácticamente para todos los análogos de nucleótidos que se han utilizado hasta ahora.

Una polimerasa mínima. Los motivos A y C podrían constituir el centro catalítico ancestral de la función de polimerasa, ya que se encuentran en todas las polimerasas y su integridad es indispensable para la actividad catalítica específica, como lo muestran los resultados obtenidos en esta tesis y en otros trabajos, es decir que podría constituir una "unidad polimerasa mínima". A pesar de las diferencias entre los motivos de DNA y RNA polimerasas, la facilidad con la que se logró alterar la especificidad de sustrato en la RT sugiere que ambos tipos de polimerasas utilizan un mecanismo de reacción similar y podrían tener un origen común. La drástica disminución de la capacidad de incorporar ambos tipos de nucleótidos por la misma mutación apoya ésta idea. Se ha sugerido que entre las primeras proteínas en surgir evolutivamente estarían precisamente las RNA polimerasas RNA dependientes (Lazcano, *et al.*, 1990). Sin embargo ésta capacidad de polimerización basada en la unión de 2 iones, podría haber estado presente en moléculas de RNA o ribozimas capaces de unir los 2 cationes divalentes como se ha sugerido anteriormente (Valverde, 1990; Pelletier, *et al.*, 1994).

Centros catalíticos similares. Existen otras proteínas cuyos centros catalíticos y/o centros de unión a metal presentan tríadas de carboxilatos con un arreglo similar al que se encuentra en polimerasas. Es el caso de varias proteínas de *E. coli* como el subdominio exonucleasa de la DNA

polimerasa I (Beese, *et al.*, 1993), la Topoisomerasa I (Lima, *et al.*, 1994), la ribonucleasa H y el sitio de unión a metal de helicasas (Bernad, *et al.*, 1990). A su vez, la región de conexión de la RT de HIV-1 es similar al subdominio ribonucleasa de la misma enzima y se ha encontrado similitud estructural entre el sitio activo ATPasa de la Hexocinasa y la región de conexión de la RT de HIV-1 (Artymiuk, *et al.*, 1993). Considerando la hipótesis de que las polimerasas podrían contarse entre las proteínas más antiguas (Lazcano, *et al.*, 1988; Lazcano, *et al.*, 1992), es posible que lo que se ha llamado "unidad polimerasa mínima", comprendida por los motivos A y C, haya dado origen por duplicación génica a otras funciones como las que se mencionan arriba. O tal vez sólo a algunas de ellas, especialmente las que están involucradas en la formación, degradación y modificación de ácidos nucleicos. De cualquier modo habría que determinar entre este conjunto de proteínas que incluye a las polimerasas, cuáles son de mayor antigüedad.

La hipótesis del origen común de las polimerasas. Tomando como base el análisis de secuencias de las polimerasas, el grado de similitud es realmente muy bajo considerando a las proteínas completas y aún considerandolas solamente de manera local, por ejemplo en el motivo C solamente hay una posición en la que el mismo residuo se conserva en todas las polimerasas, es el primer residuo D del motivo. De las diferencias en estructura primaria, secundaria y terciaria no se sabe aún cuáles corresponden a diferencias funcionales y cuáles a la historia evolutiva, es decir a los intervalos de tiempo de divergencia entre las diferentes polimerasas. No obstante la gran cantidad de datos sobre secuencia y estructura de las polimerasas, aún no se sabe qué regiones son responsables de las diferencias que les permiten actuar e interactuar en formas diferentes con distintas combinaciones de molde-sustrato. Existe una corriente que ha propuesto al menos 2 orígenes independientes para las polimerasas (Steitz, *et al.*, 1994), debido a que la DNA polimerasa β de rata presenta una conectividad diferente en la estructura de la palma (Figura 16), donde se encuentran los residuos D conservados, con respecto a las otras polimerasas cuya estructura es conocida. Sin embargo, las diferencias en la conectividad podrían haberse originado a partir de inserciones y a través de la evolución de las funciones específicas de esta polimerasa en particular. Además otros autores basándose en la superposición de los residuos carboxílicos de los motivos A y C han encontrado que es posible sobrelapar las cuatro polimerasas de estructura conocida, quedando muy bien sobrelapadas otras regiones importantes de la palma (Moras, 1993; Pelletier, *et al.*, 1994; Pelletier, 1994; Figura 16), ésto lo ha conducido a pensar que las polimerasas tienen, en efecto, un origen común.

Las líneas de evidencia que sugieren que el RNA antecedió al DNA como material genético en las células (Alberts, 1986; Gilbert, 1986; Lazcano, 1986) indicarían que la actividad de RNA polimerasa habría surgido primero y las DNA polimerasas habrían derivado de las RNA polimerasas. Sin embargo, de acuerdo con los resultados presentados aquí, es plausible que las primeras polimerasas hayan sido enzimas no específicas para sustrato (aunque utilizaran como sustratos rNTP's) y que dicha especificidad haya surgido cuando apareció la biosíntesis de los dNTP's, de manera simultánea para ambos tipos de sustratos. Por otra parte si algunas mutaciones en la RT

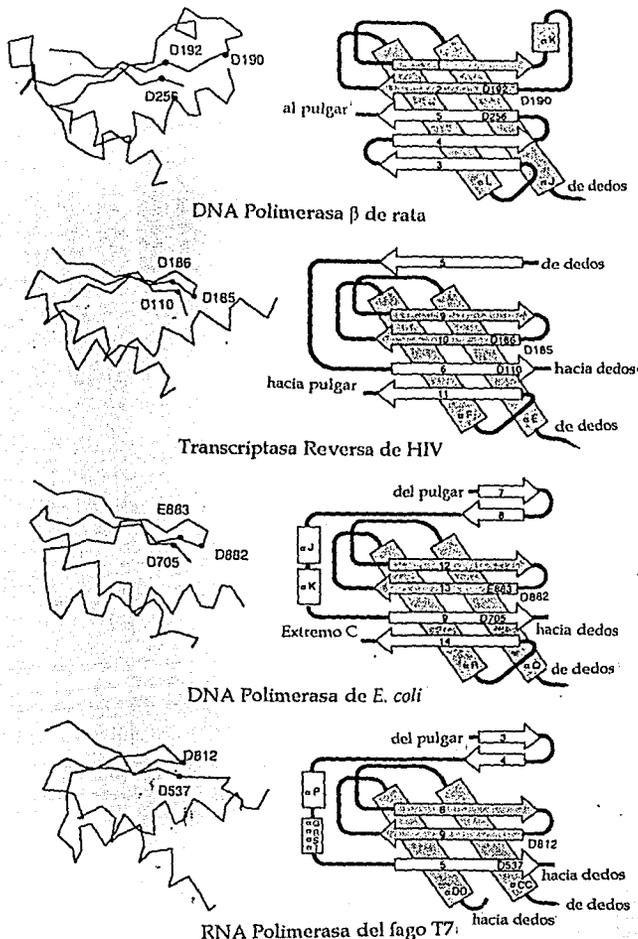


Figura 16. Topología comparada de la palma de polimerasas: DNA Pol β , RT, KF y T7RNAP. **Columna de la izquierda:** Trayectoria de los carbonos α de los elementos estructurales comunes a todas las palmas de las cuatro polimerasas: DNA Pol β , RT, KF y T7RNAP. Después de sobreponerlas se desplazaron para observarlas. En la vista que se presenta, el eje de simetría pseudo doble pasa verticalmente a través del centro de la palma. **Columna de la derecha:** Diagramas de la topología de las cuatro polimerasas. Los residuos ácidos conservados de los motivos A y C están marcados con su posición en la estructura primaria y símbolos del código de aminoácidos de una letra. Los residuos ácidos del motivo A son: D190 (DNA Pol β); D110 (RT); D705 (KF); D537 (RNAP). Los residuos conservados del motivo C son: D190, D192 (DNA Pol β); D185 y D186 (RT); D882 y E883 (KF); D812 (T7RNAP). Los motivos A y C están situados sobre láminas β antiparalelas en RT, KF y RNAP; en Pol β están situados sobre láminas β paralelas. La región topológicamente conservada entre las cuatro polimerasas, que contiene el motivo C está sombreada (tomado de Sawaya, *et al.*, 1994).

provocan la pérdida de la capacidad de utilizar DNA como molde (Boyer, *et al.*, 1994), es posible que de manera similar pero en sentido inverso, en el curso de la evolución ciertas mutaciones en una polimerasa ancestral hubiesen permitido la utilización de un nuevo ácido nucleico como molde, el DNA, originando así a las DNA polimerasas. El hecho de que la RT en presencia de manganeso pueda incorporar ambos tipos de sustratos (Figura 7) sugiere que podrían haber existido polimerasas ancestrales con ambigüedad de sustrato y que en el curso de la evolución hayan adquirido especificidad de sustrato y molde mediante varios mecanismos entre los que se incluirían: síntesis selectiva del sustrato para evitar la incorporación del no específico, unión selectiva a un catión activador que favorezca solo la incorporación del sustrato específico y mutaciones que impidan la entrada de sustratos no específicos al sitio activo. Este posible trayecto de evolución en las polimerasas sería congruente con el modelo de evolución de vías metabólicas que sugiere que las primeras enzimas habrían sido catalizadores no regulados y con ambigüedad de sustrato (Jensen y Byang, 1982).

Origen y evolución de la síntesis de ácidos nucleicos. Se ha propuesto que en la evolución de las polimerasas podrían haber existido ribozimas que utilizaran cationes divalentes para catalizar la polimerización de nucleótidos (Valverde, 1990), esta hipótesis se basó en que al parecer los cationes juegan un papel fundamental en la catálisis. Ahora se sabe que existe al menos una ribozima que cataliza el mismo tipo de reacción que catalizan las polimerasas actuales: la formación de un enlace fosfodiéster a partir del ataque de un grupo hidroxilo sobre el fosfato α de un grupo 5'-trifosfato (Mörl, *et al.*, 1992) y también depende de catión para su actividad, resulta interesante que esta ribozima ligasa puede unir DNA con RNA. La telomerasa, una ribonucleoproteína cuya parte proteínica contiene el motivo C, podría representar otra de las fases intermedias en la evolución de las polimerasas a partir de una ribozima (Valverde, 1990).

Así la ribozima ligasa podría constituir un modelo de las polimerasas más antiguas (sería interesante intentar que polimerizara rNTPs, dNTPs o ambos) de RNA. La telomerasa podría ser un modelo de una etapa siguiente en la que las polimerasas pudieron haber sido ribonucleoproteínas. Posteriormente habrían surgido las polimerasas constituidas solamente de proteína pero con ambigüedad de sustrato (la RT en presencia de manganeso sería un modelo de esta etapa) y finalmente habrían surgido las polimerasas con alta especificidad de sustrato, a partir de una polimerasa ancestral común. Este esquema hipotético sobre la evolución de polimerasas se hace en el contexto de la hipótesis de que el RNA constituyó el catalizador a la vez que el material genético en las primeras células (Alberts, 1986; Gilbert, 1986; Lazcano, 1986) y que a partir de éste tipo de células evolucionaron posteriormente células con DNA como material genético y proteínas como catalizadores más abundantes (White, 1976).

CONCLUSIONES

1. El manganeso es capaz de inducir una alteración de la especificidad de sustrato en la RT de HIV-1, permitiendo la incorporación de rNTP's. En estas condiciones la RT también incorpora dNTP's. Por lo tanto la RT en presencia de manganeso amplía su especificidad, adquiere lo que se podría llamar una ambigüedad de sustrato, pues es capaz incorporar los dos tipos de nucleótidos.

2. En presencia de magnesio el manganeso inhibe la actividad de DNA polimerasa RNA dependiente de la RT. Existe al menos una mutación que confiere resistencia a la inhibición por manganeso: Y181I. En esta mutante la actividad de DNA polimerasa es muy baja y la actividad de RNA replicasa es indetectable.

3. La mutación D186H provoca un cambio en la preferencia por catión activador: la mutante es más eficiente en presencia de manganeso para la actividad de DNA polimerasa, a diferencia de la RT silvestre que prefiere magnesio. El cambio en preferencia de catión activador de magnesio en la enzima silvestre a manganeso en la mutante D186H sugiere que el residuo 186 podría formar parte del sitio de unión a metal.

4. Considerando que:

- i) Se han detectado ribonucleótidos en moléculas de DNA sintetizadas intracelularmente por DNA polimerasas;
- ii) Existen DNA polimerasas que pueden sintetizar ribo-desoxirribopolinucleótidos;
- iii) Varias polimerasas pueden ampliar su especificidad de sustrato en presencia de manganeso, incluyendo a la RT de HIV-1 como aquí se reporta;
- iv) Se han visto iones de magnesio y de manganeso unidos a los residuos D del motivo C en la estructura de al menos una polimerasa (DNA polimerasa β de rata) y
- v) Mutaciones (D186H, Y181I) en el motivo C de la RT de HIV-1 afectan tanto a la actividad de DNA polimerasa como a la actividad de RNA replicasa inducida por manganeso,

Se sugiere que el sitio activo responsable de la actividad de DNA polimerasa podría ser el mismo sitio responsable de la actividad de RNA replicasa inducida por manganeso. Si esto es así, entonces es posible que hubiese existido una polimerasa ancestral con ambigüedad de sustrato, es decir con la capacidad de incorporar ambos tipos de sustratos, que podría haber dado origen a los diversos tipos de polimerasas a través del establecimiento de la especificidad de sustrato y de molde.

PERSPECTIVAS

La determinación de la estructura de la RT en complejos productivos, con molde-iniciador y sustrato, en presencia de magnesio y en presencia de manganeso arrojaría información muy importante para entender cómo es que la presencia de manganeso favorece la incorporación de rNTPs. Alternativamente, ya que se conoce la estructura de la DNA polimerasa β de rata tanto en presencia de magnesio como en presencia de manganeso, y se ha visto que ambos iones se unen a los residuos D del motivo C, se podría intentar inducir actividad de RNA replicasa o RNA polimerasa DNA dependiente en presencia de manganeso en esta polimerasa. Este tipo de ensayos en la DNA polimerasa β de rata y la construcción de mutantes similares a la mutante RT_{D1861I} contribuirían a saber si las actividades de DNA polimerasa y de RNA polimerasa pueden residir en el mismo sitio activo. En este contexto, la medición de la afinidad de las enzimas silvestres y las mutantes por los iones metálicos magnesio y manganeso también aportaría información para comprender la inducción de alteraciones en la especificidad de sustrato y el efecto de las mutaciones en el motivo C.

Los resultados e hipótesis expuestos en este trabajo se verían enriquecidos si se analiza la procesividad de la actividad de RNA replicasa de la RT inducida por manganeso. La realización de ensayos de actividad de DNA polimerasa y de RNA replicasa en presencia de un inhibidor específico de la RT de HIV-1 contribuiría a hacer más claro si es que ambas actividades dependen del mismo sitio.

REFERENCIAS

- Alberts, B. M. (1986) The function of the Hereditary Materials: Biological Catalyses Reflect the Cell's Evolutionary History. *Amer. Zool.* **26**: 781-796.
- Argos, P. (1988) A sequence motif in many polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9909-9916.
- Artymiuk, P. J., Grindley, H. M., Kumar, K., Rice, D. W. y Willett, P. (1993) Three-dimensional structural resemblance between the ribonuclease H and connection subdomains of HIV reverse transcriptase and ATPase fold revealed using graph theoretical techniques. *FEBS Lett.* **324**: 15-21.
- Babiuk, L. A. y Rouse, B. T. (1976) Ribonucleotides in infectious bovine rhinotracheitis virus DNA. *J. Gen. Virol.* **32**: 221-230.
- Barre-Sinoussi, F., Cherman, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Charnaret, S., Gruest, J., Daugey, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983) *Science* **220**: 868-871.
- Basu, A., Nanduri, V. B., Gerard, G. F. y Modak, M. J. (1988) Substrate Binding Domain of Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase. *J. Biol. Chem.* **263**: 1648-1653.
- Basu, A., Tirumalai, R. S., y Modak, M. J. (1989) Substrate binding in Human Immunodeficiency Virus reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **264**: 8746-8752.
- Beard, W. A. y Wilson, S. H. (1994) Site directed mutagenesis of HIV-1 reverse transcriptase to probe enzyme processivity and drug binding. *Current Opinion in Biotechnology* **5**: 414-421.
- Beese, L., Derbyshire, V. y Steitz, T. A. (1993) Structure of DNA Polymerase γ Klenow Fragment Bound to Duplex DNA. *Science* **260**: 352-355.
- Bellsoleil, L., Prieto, J., Serrano, L. y Coll, M. (1994) Magnesium Binding to the Bacterial Chemotaxis Protein CheY Results in Large Conformational Changes Involving its Functional Surface. *J. Mol. Biol.* **238**: 489-495.
- Berg, P., Fancher, H., y Chamberlin, M. (1963) The synthesis of mixed polynucleotides containing ribo and deoxyribonucleotides by purified preparations of DNA polymerase from *Escherichia coli*. En: Vogel, H.J., Bryson, V. y Lampen, J. O. (eds.). Informational Macromolecules. Academic Press, N. Y., pp 467-483.
- Bernad, A., Zaballos, A., Salas, M. y Blanco, L. (1987) Structural and functional relationships between prokariotic and eukariotic DNA polymerases. *EMBO J.* **6**: 4219-4225.
- Bernad, A., Lázaro, J. M., Salas, M. y Blanco, L. (1990) The highly conserved amino acid sequence motif Tyr-Gly-Asp-Thr-Asp-Ser in α -like DNA polymerases is required by phage ϕ 29 DNA polymerase for protein-primed initiation and polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4610-4614.
- Bone, R., Frank, L., Springer, J. P., Pollak, S. J., Osborne, S., Atack, J. R., Knowles, M. R., McAllister, G., Ragan, C. I., Broughton, H. B., Baker, R. y Fletcher, S. R. (1994) Structural Analysis of Inositol Monophosphatase Complexes with substrates. *Biochemistry*
- Boyer, P.L., Ferris, A.L., Clark, P., Whitmer, J., Frank, P., Tantillo, C., Arnold, E., y Hughes, S.H. (1994) Mutational Analysis of the Fingers and Palm subdomains of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) Reverse Transcriptase. *J. Mol. Biol.* **243**: 472-483.
- Biswal, N. y Beyenesh-Melnik, M. (1969) Complementary nuclear RNA s of murine sarcoma-leukemia virus complex in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 934-937.
- Chakrabarti, P. (1990a) Interaction of metal ions with carboxylic and carboxamide groups in protein structures. *Protein Engineering* **4**: 49-56.
- Chakrabarti, P. (1990b) Geometry of interaction of metal ions with histidine residues in protein structures. *Protein Engineering* **4**: 57-63.

- Chakrabarti, P. (1994) Conformational Analysis of Carboxylate and Carboxamide Side-chains bound to Cations. *J. Mol. Biol.* **239**: 306-314.
- Conn, M. M. y Rebek Jr., J. (1994) The design of self-replicating molecules. *Curr. Op. Structural Biol.* **4**: 629-635.
- Copeland, W. C. y Wang, T. S. F. (1993) Mutational Analysis of the Human DNA Polymerase α . *J. Biol. Chem.* **268**: 11028-11040.
- D'Aquila, R.T. y Summers, W.C. (1989) HIV-1 Reverse Transcriptase/Ribonuclease H: High level expression in *Escherichia coli* from a plasmid constructed using the polymerase chain reaction. *J. Acquired Immune Defic. Syn.* **2**:579-587.
- Darnell, J. E. y Doolittle, W. F. (1986) Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 1271-1275.
- Davies II, J. F., Almasy, R. J., Hostomska, Z., Ferre, R. A., y Hostomsky, Z. (1994) 2.3 A Crystal Structure of the catalytic domain of DNA polymerase B. *Cell* **76**: 1123-1133.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. and Argos, P. (1990) An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* **3**: 461-467.
- De Vreeze, K., Derbyser, Z., Vandamme, A., Pauwels, R., Desmyter, J., De Clerk, E. y Anné, J. (1992) Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase to TIBO Derivatives Induced by Site-Directed Mutagenesis. *Virology* **188**: 900-904.
- Doolittle, R. F. (1994) Convergent evolution: the need to be explicit. *TIBS* **19**: 15-18.
- El-Deiry, W. S., So, G. A. y Downey, K. M. (1988) Mechanism of Error Discrimination by *Escherichia coli* DNA Polymerase I. *Biochemistry* **27**: 546-533.
- Focher, F., Verri, A., Maga, G., Spadari, S. y Hübscher, U. (1990) Effect of divalent and monovalent cations on calf thymus PCNA-independent DNA Polymerase γ and its 3' 5' exonuclease. *FEBS Lett.* **259**: 349-352.
- Gilam, S., Jahnke, P. y Smith, M. (1978) Enzymatic synthesis of oligodeoxirribonucleotides of defined sequence. *J. Biol. Chem.* **253**:2532-2539.
- Gilbert, W. (1986) The RNA world. *Nature* **319**: 618.
- Goel, R., Beard, W. A., Kumar, A., Casas-Finet, R., Strub, M., Stahl, S. J., Lewis, M. S., Bebenek, K., Becerra, S. P., Kunkel, T. A. y Wilson, S. (1993) Structure/Function Studies of HIV-1 Reverse Transcriptase:Dimerization -Defective Mutant L289K. *Biochemistry* **32**: 13012-13018.
- Goff, S. P. (1990) Retroviral Reverse Transcriptase: Synthesis, structure and function. *J. Acquired Immune Defic. Syndromes* **3**:817-831.
- Grossman, L. I., Watson, R., y Vinograd, J. (1973) The presence of ribonucleotides in Mature closed circular mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**:3339-3343.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. y Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849-857.
- Hansen, J., Schultze, T., Mellert, W. and Moelling, K. (1988) *EMBO J.* **7**: 239-243.
- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M.D., Cortopassi, G. and Galas, D.J. (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* **17**: 6545-6551.
- Higaki, J. N., Fletterik, R. J. y Craik, C. S. (1992) Engineered metalloregulation in enzymes. *TIBS* **17**: 100-104.
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. y VandePol, S. (1982) Rapid Evolution of RNA Genomes. *Science* **521**: 1577-1585.

- Hsieh, W.T. (1978) Polymerization of deoxyribonucleoside from an *Escherichia coli* mutant lacking deoxyribonucleic acid polymerase activity. *J. Biol. Chem.* **246**: 1780-1784.
- Huang, H. W. y Cowan, J. A. (1994) Metallobiochemistry of the magnesium ion. *Eur. J. Biochem.* **219**: 253-260.
- Inokuchi, Y. e Irashima, A. (1987) Interference with viral infection by defective RNA replicase. *J. Virol* **61**:3946-3949.
- Ito, J. y Braithwaite, D. K. (1991) Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucl. Acids Res.* **19**: 4045-4057.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark, A. D., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R. L., Kamer, G., Ferris, A. L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S. H. y Arnold, E. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6320-6324.
- Jablonski, S., Luo, M. y Morrow, C. D. (1991) Enzymatic activity of Polyovirus RNA Polymerase Mutants with Single Amino Acid Changes in the Conserved YGDD Amino Acid Motif. *J. Virol* **65**: 4565-4572.
- Johnson, M.S., McClure, M.A., Feng, D.F., Gray, J. and Doolittle, R.F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7648-7652.
- Joyce, G. F., Schwartz, A. W., Miller, S. L. y Orgel, L. E. (1987) The case for an ancestral genetic system involving simple analogues of the nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4938-4402.
- Joyce, C. M. and Steitz, T. A. (1994) Function and Structure relationships in DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 777-882.
- Kamer, G. and Argos, P. (1984) Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucl. Acids Res.* **12**: 7269-7652.
- Konarska, M.M. y Sharp, P. A. (1989) Replication of RNA by the DNA dependent RNA polymerase of Phage T7. *Cell* **57**:423-431
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. y Steitz, T. A. (1992) Crystal Structure at 3.5 Å Resolution of HIV Reverse Transcriptase Complexed with an inhibitor. *Science* **256**: 1783-1790
- Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. y Cech, T. R. (1982) Self splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**: 147-157.
- Larder, B., Purifoy, D., Powell, K.L. and Darby, G. (1987a) Site specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature* **327**: 716-717.
- Lazcano, A. (1986) Prebiotic evolution and the origin of cells. *Trends Soc. Cat. Biol.* **39**:73-103.
- Lazcano, A., Fastag, J., Gariglio, P., Ramirez, C. and Oró, J. (1988) On the early evolution of RNA Polymerases. *J. Mol. Evol.* **27**: 365-376.
- Lazcano, A., Valverde, V., Fastag, J., Gariglio, P., Ramirez, C. and Oró, J. (1990) In Proceedings of the 8th College Park Colloquium on Chemical Evolution (F.Eirich and C. Ponnampemuma eds.) A. DEEPARK Publ. Co. Hampton, VA, USA.
- Lazcano, A., Valverde, V., Hernández, G., Gariglio, P., Fox, G.E. and Oró, J. (1992) On the Early Emergence of Reverse Transcription: Theoretical basis and Experimental evidence. *J. Mol. Evol.* **35**: 524-536.
- Le Grice, S.F.J., Zehle, R. and Mous, J. (1988) A single 66 Kilodalton Polypeptide processed from the Human Immunodeficiency Virus type 2 *pol* polyprotein in *Escherichia coli*: displays reverse transcriptase activity. *J. Virol* **62**: 2525-2529.

- Le Grice, S.F.J., Naas Thierry, Wohlgensinger, B., y Schatz, O. (1991) Subunit selective mutagenesis indicates minimal polymerase activity in heterodimer-associated HIV-1 reverse transcriptase. *EMBO J.* **10**:3905-3911.
- Leuthardt, A. and Le Grice, S.F.J. (1988) Biosynthesis and analysis of a genetically engineered HIV-1 reverse transcriptase/endonuclease polyprotein in *Escherichia coli*. *Gene* **68**: 35-42.
- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Schimabukuro, J. M., and L. S. Oshiro (1984) *Science* **225**: 840-842.
- Lightfoote, M.M., Coligan, J.E., Folks, T.M., Fauci, A.S., Martin, M.A. and Venkatesan, S. (1986) Structural characterization of Reverse Transcriptase and Endonuclease Polypeptides of the Acquired Immunodeficiency Syndrome Retrovirus. *J. Virol* **60**: 771-775.
- Lima, C. D., Wang, J. C. y Mondragón, A. (1994) Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature* **367**: 138-146.
- Lingner, J., Kellerman, J. y Keller, W. (1991) Cloning and expression of the essential gene for poly(A) polymerase from *S. Cerevisiae*. *Nature* **354**: 496-498.
- Llaca, V., Silva, A., Lazcano, A., Rangel, L.M., Gariglio, P., y Oro, J. (1990) In search of the ancestral RNA polymerase: an experimental approach. In: Proceedings of the (th College Park Colloquium on Chemical Evolution. F. Eirich y C. Ponnampurumma (eds.) A. DEEPARK Publ. Co. Hampton, VA, USA.
- Lowe, D.M., Parmar, V., Kemp, S.D. and Larder, B.A. (1991) Mutational analysis of two conserved sequence motifs in HIV-1 reverse transcriptase. *FEBS Lett.* **282**: 231-234.
- Lundbald, V. y Blackburn, E. H. (1990) RNA-Dependent Polymerase Motifs in EST1: Tentative Identification of a Protein Component of an Essential Yeast Telomerase. *Cell* **60**: 529-530.
- Lyakov, D. L., Rechinsky, V. O., Tunitskaya, V. L., Chernov, V. K., y Kochetkov, S. N. (1992) *J. Biol. Chem. Suppl.* **16E**: 166-169.
- McAllister, W.T., y Raskin, C.A. (1993) The phage RNA polymerases are related to DNA polymerases and reverse transcriptases. *Molec. Microbiol.* **10**:1-6.
- Mitsuya, H., Yarchoan, R. and Broder, S. (1990) *Science* **249**: 1533-1544.
- Moras, D. (1993) Two sisters and their cousin. *Nature* **364**: 572-573.
- Mörl, M., Niemer, I., y Schmelzer, C. (1992) New reactions catalyzed by a group II intron ribozyme with RNA and DNA substrates. *Cell* **70**:803-810.
- Myers, T. W., y Gelfand, D. H. (1991) Reverse transcription and DNA Amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**: 7661-7666.
- Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G., y Steitz, T. A. (1985) *Nature* **313**: 762-766.
- Orgel, L. E. (1992) Molecular replication. *Nature* **358**: 203-209.
- Patarca, R. and Haseltine, W.A. (1984) *Nature* **309**: 728.
- Pelletier, H., Saaya, M. R., Kumar, A., Wilson, S. H. y Kraut, J. (1994) Structures of Ternary Complexes of Rat DNA Polymerase- β , a DNA Template-Primer, and ddCTP. *Science* **264**: 1891-1903.
- Pelletier, H. (1994) Polymerase Structures and Mechanism. *Science* **266**: 2025-20-26.
- Poch, O., Sauvaget, Y., Delarue, M. and Tordo, N. (1989) Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* **8**: 3867-3874.
- Polesky, A. H., Dahlberg, M. E., Benkovic, S. J., Grindley, N. D. F. y Joyce, C. M. (1992) Side Chains Involved in Catalysis of the Polymerase Reaction of DNA Polymerase I from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 8417-8428.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. (1984) *Science* **224**: 497-500.
- Raabe, T., Bollum, F. J. y Manley, J. L. (1991) Primary structure and expression of bovine poly(A) polymerase. *Nature* **253**: 229-234.

- Richetti, M. y Buc, H. (1993) E. coli DNA Polymerase I as a reverse transcriptase. *EMBO J.* **12**: 387-396.
- Rosenkranz, H.S. (1973) RNA in coliphage T7. *Nature* **242**:327-329.
- Rowen, L. y Kornberg A. (1978) A ribo-deoxirribonucleotide primer synthesized by primase. *J. Biol. Chem.* **253**:770-774.
- Sankar, S. y Porter, A. G. (1992) Point Mutations Which Drastically Affect the Polymerization Activity of Encephalomyocarditis Virus RNA-dependent RNA Polymerase Correspond to the Active Site of Escherichia coli DNA Polymerase I. *J. Biol. Chem.* **267**: 10168-10176.
- Sardana, V. V., Emini, E. A., Gotlib, L., Graham, D. J., Lineberger, D. W., Long, W. J., Schlabach, A. J., Wolfgang, J. A. y Condra J. H. (1992) Funcional Analysis of HIV-1 Reverse Transcriptase Amino Acids Involved in Resistance to Multiple Nonnucleoside Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **267**: 17526-17530.
- Sawaya, M. R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S. H. y Kraut, J. (1994) Crystal Structure of Rat DNA Polymerase β : Evidence for a Common Polymerase Mechanism. *Science* **264**: 1930-1935.
- Sousa, R., Chung, Y. J., Rose, J. P. y Wang, B. (1993) Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature* **364**: 593-599.
- Speyer, J.F., Chao, J. y Chao, L. (1972) Ribonucleotides covalently linked to deoxirribonucleic acid in T4 bacteriophage. *J. Virol* **10**:902-908.
- Steitz, T. A. (1993) DNA- and RNA-dependent DNA polymerases. *Curr. Op. Structural Biol.* **3**: 31-38.
- Steitz, T. A., Smerdon, S. J., Jäger, J. y Joyce, C. M. (1994) A Unified Polymerase Mechanism for Nonhomologous DNA and RNA Polymerases. *Science* **266**: 2022-2025.
- Stavenger, E., Ringol, G., Varmus, H.E. y Bishop, M. (1976) RNA complementary to the genome of RNA tumor viruses in virions and virus-producing cells. *J. Virol* **20**: 342-347.
- Tainer, J. A., Roberts, V. A. y Getzoff, E. D. (1991) Metal-binding sites in proteins. *Curr. Op. Biotech.* **2**: 582-591.
- Toh, H., Hayashida, H. and Miyata, T. (1983) *Nature* **305**: 827-829.
- Unge, T., Knight, S., Bhikhabhai, R., Lovgren, S., Dauter, Z., Wilson, K. y Strandberg, B. (1994) 2.2 Ångstroms resolution structure of the amino terminal half of HIV-1 reverse transcriptase (Fingers and Palm subdomains). *Structure* **2**:924-928.
- Valverde, V. (1990) Reverso transcriptasa Caracterización de su actividad de replicasa e implicaciones en la evolución de genomas celulares. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias, UNAM.
- White, H.B. (1976) Coenzymes as Fossils of an earlier metabolic state. *J. Mol. Evol.* **7**:101-105.
- Yadav, P. N. S., Yadav, J. S., Arnold, E. y Modak, M. (1994) A Computer-assisted Analysis of Conserved Residues in the Three-dimensional Structures of Polymerase Domains of Escherichia coli DNA Polymerase I and HIV-1 Reverse Transcriptase. *J. Biol. Chem.* **269**: 716-720.
- York, J. D., Ponder, J. W., Chen, Z., Mathews, F. S. y Majerus, P. (1994) Crystal Structure of Inositol Polyphosphate 1-Phosphatase at 2.3 Å Resolution. *Biochemistry* **33**: 13164-13171.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA