

03088

2
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

C.C.H.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

FALLA DE ORIGEN

ANALISIS DEL RECONOCIMIENTO MOLECULAR POR MEDIO DE

INGENIERIA DE PROTEINAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA PRESENTA:

M. en C. HUMBERTO FLORES SOTO

CUERNAVACA, MORELOS

1995

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS SE DESARROLLO EN EL LABORATORIO DEL Dr.
FRANCISCO XAVIER SOBERON MAINERO, EN EL INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM.

Director de tesis

Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero

Comité asesor

Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez

Dr. Felix Recillas Targa

Dra. Alejandra Bravo de la Parra

JURADO DE EXAMEN

Presidente Dr. Alberto Darszon Israel

Secretario Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero

Vocal Dr. David Romero Camarena

Vocal Dra. Carmen Gómez Eichelmam

Vocal Dr. Eduardo Horjales Reboredo

Suplente Dr. Fernando Valle Baheza

Suplente Dr. Enrique Merino Pérez

RESUMEN

La función de una proteína depende de su capacidad para interactuar con otras moléculas. Para poder entender como funcionan las proteínas es necesario estudiar cómo interactúan con su molécula blanco. La modificación de la proteína o del gen que la codifica ayudan a entender como está interaccionando con otra molécula. En este trabajo de tesis se analizan dos proteínas modelo: la endonucleasa de restricción *EcoRI* y la δ -endotoxina *CryIA(b)*.

La endonucleasa *EcoRI* se une de manera específica a la secuencia de DNA 5'-GAATTC-3'. Si la secuencia no se encuentra metilada en el nitrógeno 6 de la adenina central, la endonucleasa hidroliza el enlace fosfodiéster entre la guanina y la adenina. En esta proteína se estudió la existencia de determinantes de la especificidad que no están en contacto directo con las bases del DNA. Por medio de mutagénesis sitio dirigida se pudo detectar dos amino ácidos que están implicados en la especificidad. La modificación de ellos de manera independiente (amino ácido histidina 114 y glutámico 170) da como resultado enzimas con actividad, sólo un remplazo da como resultado una enzima inactiva (prolina 114). Sin embargo algunos remplazos (tirosina, treonina, fenilalanina y serina en la posición 114 ó alanina en la posición 170 de la proteína) dan como resultado endonucleasas con la especificidad alterada. El relajamiento en la especificidad se asemeja a la actividad llamada estrella que se puede inducir en la enzima silvestre al modificar el medio de reacción. El análisis de la estructura terciaria y los resultados anteriores nos permiten sugerir la existencia de un mecanismo que acopla la unión específica a la catálisis. Este mecanismo asegura la fidelidad de la actividad de la enzima.

Las δ -endotoxinas son una familia de proteínas producidas por *Bacillus thuringiensis* que presentan una actividad insecticida. Se conoce la estructura tridimensional de una de ellas (*CryIIIa*), donde se observan tres dominios estructurales. A cada dominio se le ha asignado un papel funcional. El dominio central se cree es el de unión específica. El mecanismo por el cual reconocen a sus proteínas blanco es poco entendido. Por ello en el presente trabajo se trató de tener como entidad separada al dominio central, al parecer este dominio es poco estable y no se pudo obtener. Para investigar en más detalle se contruyó un gen que codifica para los dominos central y carboxilo terminal. Esta proteína si se detecto, lo que demuestra que el dominio central necesita del dominio carboxilo para ser estable. La existencia de esta contrucción posibilita la investigación de los determinantes de especificidad de esta toxina.

ABSTRACT

The function of a protein depends upon its capacity to interact with other molecules. In order to understand how proteins function, it is necessary to study the way they interact with their target molecule. The modification of the protein or the gene coding for it helps us to understand how a protein is interacting with a molecule. In this thesis two model proteins are analyzed: *EcoRI* restriction endonuclease and δ -endotoxin CryIA(b).

EcoRI endonuclease recognizes, in a specific manner, the DNA sequence 5'GAATTC-3'. If the sequence is not methylated in nitrogen 6 of central adenine, the endonuclease hydrolyses the phosphodiester bond between adenine and guanine. We studied the existence of amino acids that determine specificity and which are not in direct contact with DNA bases. By means of site-directed mutagenesis it was possible to detect two amino acids that are involved in specificity. Modification of them in an independent manner (114 histidine and 170 glutamic acid) results in various active enzymes, as well as one mutant with severely impaired activity (114 proline). Moreover, some replacements (tyrosine, threonine, phenylalanine and serine in 114 position or alanine in 170 position of the protein) result in endonucleases with altered specificity. Relaxation in specificity resembles the so called "star" activity, which can be induced in the wt enzyme by modifying the reaction buffer. X-ray crystallographic analysis and the above results suggest the existence of a mechanism that associates specific binding to catalysis. This mechanism assures fidelity to the enzyme.

The δ -endotoxins constitute a family of proteins produced by *Bacillus thuringiensis*, and present an insecticide activity. The X-ray crystallographic structure of CryIIIA shows three structural domains. A functional property has been designated for each domain. It is believed that the central domain plays a binding function. The mechanism by which such domain recognizes its target protein is not known. That is the reason for handling the central domains as a separate entity in this work. The results show that this domain is not stable and the protein could not be obtained. To look this in detail, a gene was constructed a gene that codifies for the central domain and for the C-terminal region. As this protein was in fact detected, it appears that the central domain needs the C-terminal region to remain stable. The existence of this construction makes possible the investigation of the determinants of specificity, in the absence of the amino terminal domain, which is mainly involved in pore formation.

ABREVIATURAS USADAS

aa	amino ácido
ade	adenina
ala	alanina
asp	aspártica
asn	asparagina
fago	bacteriófago
gln	glutamina
glu	glutámico
gua	guanina
his	histidina
ile	isoleucina
lys	lisina
nt	nucleótido
oligo	oligonucleótido
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
phe	fenilalanina
PM	peso molecular
pro	prolina
ser	serina
try	tirosina
thr	treonina

INDICE

INTRODUCCION

PRINCIPIOS DEL RECONOCIMIENTO MOLECULAR	1
Formación de superficies complementarias para determinar la especificidad	1
Interacciones de largo y corto alcance	2
Unión parcialmente rígida y con movimientos inducidos durante la interacción con el sustrato, que pueden determinar la especificidad	4
Unión y catálisis: Enzimas	5
INGENIERIA DE PROTEINAS PARA ESTUDIAR EL FENOMENO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR	7
Modificación de proteínas	7
Separación de los dominios de una proteína para estudiar la función de cada uno	8
MODELOS DE ESTUDIO	
ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i>	11
Función	11
Propiedades	13
Mutantes generadas	15
Estructura de la proteína y su función; contactos con el DNA y formación del sitio activo	19
Relación de las estructuras conocidas y posible relación evolutiva	24
δ -ENDOTOXINA <i>CryIA(b)</i> berliner	26
Clasificación de las δ -endotoxinas	26
Actividad biológica de las δ -endotoxinas	27
Modo de acción	28
Relación entre la estructura y función de la toxina <i>CryIIIA</i>	32
Relaciones evolutivas que ayudan a fundamentar el uso de un gen del cual no se conoce la estructura de la proteína en cuestión	33
Potencial biotecnológico de las δ -endotoxinas	34

OBJETIVOS E HIPOTESIS DEL TRABAJO	35
OBJETIVOS	37
HIPOTESIS	37
ANTECEDENTES	
Endonucleasa <i>EcoRI</i>	38
δ -endotoxina	38
MATERIALES Y METODOS	
Endonucleasa <i>EcoRI</i>	39
δ -endotoxina CryIA(b) berliner	44
Diseño	44
Construcción de los vectores	48
Purificación de la proteína	49
Inmuno-detección	49
RESULTADOS	
Endonucleasa <i>EcoRI</i>	51
δ -endotoxina CryIA(b) berliner	53
ARTICULO	60
DISCUSION	
<i>EcoRI</i>	61
δ -endotoxina	65
Discusión general	67
CONCLUSIONES	69
Perspectivas de los modelos experimentales	70
BIBLIOGRAFIA	72

INTRODUCCION

PRINCIPIOS DEL RECONOCIMIENTO MOLECULAR

Formación de superficies complementarias para determinar la especificidad

El estudio de la interacción entre proteínas y otras moléculas es un área de gran interés, esto constituye la materia principal de lo que denominamos reconocimiento molecular. La función de una proteína depende de su interacción con otras moléculas; las proteínas pueden interactuar con todo tipo de moléculas, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos, etc.

En la actualidad se conocen numerosas estructuras tridimensionales de complejos proteína-ligando, donde resaltan los de anticuerpos unidos a sus antígenos, enzimas con análogos de los sustratos (inhibidores) y complejos proteína-DNA, entre otros (Janin y Chothia, 1990; Harrison, 1991). Se observa que las superficies que interactúan se complementan, lo que permite que se formen puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas. La naturaleza de las interacciones suele depender de las moléculas involucradas; por ejemplo, en los complejos proteína-carbohidrato, predominan los puentes de hidrógeno (Bourne *et al.*, 1993). Las moléculas de agua estructurales pueden tener una gran

ortancia en la especificidad ya que pueden estar actuando como mediadores de la interacción; por ejemplo, se han observado en complejos antígeno-anticuerpo, donde se propone que ayudan a estabilizar la unión (Kabat *et al.*, 1994) y también en proteínas que interactúan con DNA (Koch *et al.*, 1994).

Al estudiar la interacción entre moléculas se observa que los residuos involucrados en la unión pueden estar actuando ya sea de manera aditiva o sinérgica. Se puede ver que al alterar un residuo que interactúa con otra molécula se modifica la unión. En muchos casos, al quitar grupos químicos, la interacción puede ser mínima; pero lo que sobresale es que al introducir otros químicos la unión es, en general, drásticamente alterada (Lesser *et al.*, 1990).

Interacciones de largo y corto alcance

La velocidad con la que dos moléculas interactúan está limitada por la rapidez con la cual la difusión puede unir las. Cuando se comenzó a estudiar la unión entre el represor Lac y su DNA blanco se observó que la velocidad con la que se asocian era mucho mayor que la permitida por un proceso controlado por difusión facilitada (von Hippel y Berg, 1989). Para explicar cómo la asociación de dos moléculas puede ser mayor que la permitida por un fenómeno de difusión, se propuso que el potencial electrostático de las

moléculas interactuantes es lo que las guía a un encuentro productivo (Fersht, 1985), de tal manera que el área de interacción es mayor que sólo el sitio activo. Lo anterior se ha demostrado de manera experimental con la enzima superóxido dismutasa, cuya catálisis está limitada por la difusión y aumentada por un fenómeno de guía electrostática, en la que al modificar su potencial electrostático se logró hacerla más rápida (Getzoff *et al.*, 1992). También estudios teóricos con la enzima acetilcolinesterasa han demostrado como el campo electrostático de la proteína actúa como un embudo para guiar el sustrato al sitio activo (Gilson *et al.*, 1994). Se ha propuesto que al interactuar las dos moléculas, el campo electrostático actúa de tal manera que acomoda al sustrato para guiarlo al sitio de unión para que sea un evento productivo (Northrup *et al.*, 1988). En el caso de proteínas que interactúan con DNA, la carga negativa de éste actúa como un elemento para que la proteína se una de manera inespecífica y la búsqueda sea en una dimensión al deslizarse sobre el DNA, en un proceso independiente de energía (von Hippel y Berg, 1989).

Unión parcialmente rígida y con movimientos inducidos durante la interacción con el sustrato, que pueden determinar la especificidad

La unión de dos moléculas implica la interacción entre sus superficies; durante este proceso se pueden dar pequeños cambios estructurales que aumentan la complementaridad. Estos cambios sutiles son importantes para la función (Klibanov, 1995). La flexibilidad de las moléculas es importante; ya que permite que se minimice el costo energético de la transición conformacional cuando existe catálisis (Frankel, 1992). En los anticuerpos se ha propuesto que a veces la unión del antígeno induce cambios conformacionales (induced fit). En efecto, al comparar las estructuras de anticuerpos en ausencia y presencia de su antígeno se han observado cambios estructurales considerables (Rini *et al.*, 1992). En proteínas que unen DNA, también se observan cambios estructurales tanto en la proteína como en el DNA. Se ha demostrado que la flexibilidad de ambas moléculas es importante para la unión. La sola neutralización de la carga negativa de los fosfatos del DNA es suficiente para que éste se curve (Strauss y Mahrer, 1994). Dependiendo si la unión de la proteína es específica o no, el grado de la curvatura en el DNA puede variar (Erie *et al.*, 1994).

En la estructura tridimensional del represor MetR (biosíntesis de metionina) de *E. coli* se ejemplifica la influencia electrostática: tanto en presencia como en ausencia de su corepresor, así como unido a su operador, no se observan cambios estructurales; sin embargo, la unión del corepresor aumenta 1000 veces la afinidad hacia su operador. Este fenómeno se explica como una alteración electrostática que es provocada por la unión del corepresor (s-adenosil metionina) (Phillips y Phillips, 1994). En otros casos como en las proteínas con cierre de leucina y dominio básico, la unión al DNA ocasiona que la zona básica se estructure (O'Neil *et al.*; 1991). Es decir, esta zona no está estructurada y la unión al DNA específico favorece la formación de una α -hélice en esta zona.

Unión y catálisis: Enzimas

La función enzimática requiere tanto la unión específica como la catálisis propiamente dicha. La enzima une al sustrato, lo que ocasiona pequeños cambios conformacionales en ella. La superficie de la enzima adopta una forma complementaria al estado de transición, lo que demuestra por que los mejores inhibidores se parecen al estado de transición. En el caso de la enzima serín-proteasa, subtilisina, se ha observado que la unión del sustrato contribuye a la catálisis. Así, al cambiar la triada catalítica (Ser, Asp y His) por residuos de ala, se observa una actividad catalítica

entre 1000 y 10000 veces mayor que la reacción no enzimática (Creighton, 1993). Se propone que la unión del sustrato a la enzima favorece que éste tome una geometría cercana a la del estado de transición, lo que favorece la catálisis.

En el caso de la endonucleasa de restricción *EcoRV* se ha observado que la unión del cofactor (Mg^{++}) es importante para que la enzima sea específica. En su ausencia, la enzima se une al DNA de manera inespecífica (Thielking *et al.*, 1992). En contraste, la endonucleasa de restricción *EcoRI* se une de manera específica a su DNA blanco en ausencia de Mg^{++} . Lo interesante es que la afinidad por Mg^{++} es mayor cuando la enzima se encuentra unida al sitio específico. Estos ejemplos muestran cómo la especificidad está relacionada con la catálisis y juega un papel importante en la actividad de la enzima.

INGENIERIA DE PROTEINAS PARA ESTUDIAR EL FENOMENO DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR

Modificación de proteínas

Las distintas maneras de modificar una proteína se pueden agrupar en enzimáticas y químicas, tanto sobre el gen que la codifica como sobre la proteína ya sintetizada (Smith, 1990). Cada enfoque presenta ventajas y desventajas y de acuerdo al objetivo del estudio, se elige una de ellas. Aquí se tratará principalmente de la modificación realizada sobre el gen. En este caso podemos modificar de manera aleatoria o dirigida. Cuando se hace aleatoria se puede usar un reactivo químico que reaccione con el DNA o estrategias de PCR. Esto se usa cuando no existe evidencia experimental ó genética que ayude a seleccionar zonas a mutar de manera sitio dirigida. También se pueden utilizar condiciones de polimerización para introducir mutaciones en un gen que se esté sintetizando. La manera de introducir mutaciones sitio dirigidas es por medio de oligonucleótidos que funcionan como primeros para la síntesis de una cadena de DNA (revisado en Osuna *et al.*,1994).

Separación de los dominios de una proteína para estudiar la función de cada uno

Dado que el presente trabajo se tratará de expresar de manera independiente el dominio que se ha propuesto como mediador de la especificidad de una proteína, hablaré brevemente de ejemplos donde se ha realizado algo semejante. Un dominio estructural es una región de una proteína que presenta un plegamiento independiente. En la actualidad se han determinado las estructuras tridimensionales de varios cientos de proteínas. En estas estructuras se observa que existen ciertos dominios estructurales que se presentan en distintas proteínas (Campbell y Downing, 1994). Ejemplos claros lo constituyen los anticuerpos, así como las proteínas que presentan el motivo estructural hélice-vuelta-hélice para unión a DNA. En estas proteínas se ha demostrado que es posible tener el dominio de unión a DNA como una entidad funcional separada (Harrison, 1991). Cuando se analiza el banco de datos de secuencias de DNA, se pueden distinguir con claridad segmentos de DNA que son homólogos, ya que su identidad es muchas veces superior a la que se esperaría por azar. En tales casos, se puede inferir, y se ha comprobado, que estos segmentos codifican para un módulo estructural semejante (Brundell y Johnson, 1993). Más aún, existen proteínas que están constituidas por diversos

motivos estructurales, mismos que están presentes, juntos o separados, en otras proteínas. En muchos casos estos dominios tienen una actividad específica. Así, en algunas toxinas proteicas se observa que existen α -hélices que forman un dominio y que potencialmente pueden formar un poro. En otros casos existen dominios tipificados por secuencias firma que presentan una función determinada. Una secuencia firma es un patrón de amino ácidos (aa) que se presenta en proteínas con funciones semejantes. Como se mencionó, al estudiar una función en particular, se puede tratar de separar el dominio que porta dicha función. Con las colicinas es posible tener el dominio de formación de poro como una entidad separada (revisado en Li, 1992). También con la toxina de la difteria se ha podido separar el dominio de unión específica (Shen *et al.*, 1994). Como estos ejemplos existen muchos más donde se ha podido disectar a la proteína en sus diferentes módulos y funciones para estudiarlas más fácilmente.

Cuando se quiere separar un dominio se enfrentan varios problemas, como son la estabilidad y solubilidad del dominio (Leistler y Perham, 1994). Esto se debe a que cuando están fuera del contexto original, superficies que antes se encontraban en contacto con aa, ahora están rodeadas de solvente, lo que no es necesariamente el caso en la proteína nativa. Cuando se conoce la estructura terciaria es posible determinar la existencia de

regiones hidrofóbicas en la superficie del dominio. Esto permite el tratar de modificarlar la región para hacerla hidrofílica y de esta manera aumentar la solubilidad de la proteína (Leistler y Perham, 1994).

MODELOS DE ESTUDIO

ENDONUCLEASA *EcoRI*

Para estudiar la interacción DNA-proteína, nuestro laboratorio usa como modelo de estudio a la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Esta enzima pertenece a un sistema de restricción-modificación del tipo II y ha sido ampliamente estudiada. Los sistemas de restricción-modificación se clasifican en 3 grupos con base a su composición y cofactores que requieren. Los sistemas de restricción y modificación del tipo II son aquellos donde las actividades de modificación y restricción se encuentran en proteínas separadas, necesitando Mg^{++} y S-adenosil metionina como cofactores. De la enzima *EcoRI* se conocen las estructuras cristalinas en complejo con su DNA blanco, en presencia y en ausencia de Mn^{++} . La presencia de una actividad fácilmente detectable la hace un buen modelo para su estudio.

Función

Luria observó la existencia de sistemas de restricción-modificación en los años 50'. Él notó que existía un comportamiento diferencial en la infección de un bacteriófago (fago) sobre diferentes cepas bacterianas: el fago crecía mejor en algunas cepas, mientras que en otras no crecía. Esto indicaba la existencia de un sistema que restringía la entrada del fago.

Además , los pocos fagos que lograban crecer en cepas resistentes eran capaces de infectar a la misma cepa con una alta eficiencia, lo que indicaba la modificación del fago. A este fenómeno lo llamó variación e implicaba una actividad que restringía la entrada y otra que modificaba al fago cuando lograba entrar. En la actualidad se conocen tres sistemas (I, II y III), sobresaliendo los del tipo II que son ampliamente utilizados en ingeniería genética.

Actualmente se conocen más de 200 actividades distintas de restricción-modificación. Se han clonado aproximadamente 100 de ellos y se han secuenciado alrededor de 60 (Wilson y Murray, 1991). La función de estos sistemas es la de proteger a la célula procariota de la entrada de DNA extraño. También se les ha asignado un posible papel en la recombinación, pero esto ha recibido poca atención y ultimamente se les ha propuesto como genes egoistas (Naito *et al.*, 1995). El comportamiento egoista se refiere a que la actividad de restricción asegura la permanencia de los genes de restricción y modificación en la célula. Aproximadamente una cuarta parte de las bacterias examinadas a la fecha presentan sistemas de restricción-modificación y es posible que las tres cuartas restantes lo presenten, pero no se han identificado por la falta de sustratos adecuados. Resalta el hecho de que las bacterias que presentan estos sistemas, por lo

general tienen más de uno (Wilson y Murray, 1991). Estas proteínas reconocen de manera específica secuencias de DNA, generalmente palindrómicas, cuya longitud varía entre 4 y 8 pares de bases. El sistema *EcoRI* reconoce la secuencia 5'-GAATTC-3'. La actividad de modificación es realizada por una enzima llamada metiltransferasa, que metila residuos de adenina o citosina. En el caso de la enzima metiltransferasa *EcoRI*, ésta introduce un grupo metilo en el residuo de la adenina central (N₆). La actividad de restricción es realizada por una enzima llamada endonucleasa, que corta el enlace fosfodiéster; en el caso de la enzima *EcoRI* el corte se da entre la guanina y la adenina, lo que origina extremos 5'salientes (Modrich y Zabel, 1976).

Propiedades

El sistema de restricción-modificación *EcoRI* se encuentra formando un operón, donde primero está el gen de la endonucleasa y luego el de la metilasa (Greene *et al.*, 1981). Se observa que los genes presentan un alto contenido de guanina y citosina con respecto al genoma del organismo que los porta, lo que puede deberse a su origen evolutivo o a un mecanismo de regulación (uso de codones poco frecuentes en el organismo) (Wilson y Murray, 1991). La endonucleasa *EcoRI* es una proteína de 277 aa, con un peso molecular de 31063 Da (Newman *et al.*, 1981; Greene *et al.*, 1981).

Esta funciona como dímero y necesita como cofactor Mg^{++} . Reconoce la secuencia 5'-GAATTC-3', usando como sustrato plásmido, muestra una K_m de 8×10^{-9} M (k_d aparente). La enzima hidroliza el enlace fosfodiéster entre la guanina y adenina (Modrich y Zabel, 1976). En condiciones de alto pH, alta concentración de glicerol, proteína, o la sustitución de Mg^{++} por Mn^{++} como cofactor, la enzima relaja su especificidad reconociendo y cortando sitios que varían por un par de bases de la secuencia blanco; a ésta propiedad se le llama actividad "estrella" (Polisky *et al.*, 1975).

El mecanismo propuesto para la endonucleasa *EcoRI* es el siguiente: la enzima primero encuentra al DNA por un fenómeno de difusión en tres dimensiones, al unirse al DNA lo hace de manera inespecífica. Cuando se une al DNA, comienza una búsqueda en una dimensión, esto lo hace al deslizarse sobre el DNA en un proceso que es independiente de energía externa (Terry *et al.*, 1985). El movimiento es favorecido por el desplazamiento de moléculas de agua e iones del DNA. Durante este proceso, la enzima puede encontrar el sitio blanco. Se ha demostrado que los sitios que varían por una par de bases (sitios estrella) pueden detener momentáneamente a la enzima (Jeltsch *et al.*, 1994). Si la enzima no encuentra al sitio blanco, se disocia del DNA, para unirse a otro segmento. Cuando la enzima encuentra el sitio blanco, sufre cambios

conformacionales que permiten alterar la estructura del DNA, lo que también permite la formación del sitio catalítico (Alves *et al.*, 1989) (Figura 1A). El mecanismo catalítico implica la interacción del Mg^{++} con uno de los oxígenos no esterificados del fosfato, lo que da origen a que se favorezca el cambio de geometría del enlace fosfodiéster de tetrahédrico a bipiramidal. Esto origina la hidrólisis del enlace mediante un ataque nucleofílico S_N2 por parte del agua: el corte ocurre con la inversión de la configuración (Connolly, 1984). Un modelo más reciente propone que el fosfato 3' al enlace que se hidroliza actúa en el mecanismo catalítico al activar a la molécula de H_2O (catálisis asistida por el sustrato) (Figura 1B) (Jeltsch *et al.*, 1992). Este modelo ha sido apoyado por datos experimentales, donde se ha sustituido los oxígenos o removido todo el grupo fosfato y el DNA se hace resistente a la actividad de la endonucleasa *EcoRI* (Jeltsch *et al.*, 1993a).

Mutantes generadas

Con la endonucleasa *EcoRI* se han realizado muchos estudios genéticos y bioquímicos para tratar de entender cómo la proteína interactúa con su DNA específico. Se hará aquí una breve reseña de algunos de los trabajos más relevantes.

Uno de los primeros estudios realizados fué la mutagénesis del gen con

agentes químicos; en este estudio se observó que existía una zona que era importante para la actividad de la enzima, pero la estrategia de selección no buscaba mutantes con cambio de especificidad (Yanofsky *et al.*, 1987). En una estrategia semejante, se han encontrado variantes con la especificidad alterada (Heitman y model, 1990a). La mutagénesis de la enzima *EcoRI* realizada en el presente trabajo se basó en una de las posiciones determinadas en el estudio de Heitman y Model (Heitman y model, 1990a). Otros muchos estudios usando mutagénesis sitio dirigida se basaron en una estructura de la endonucleasa en complejo con su DNA blanco (a 3Å de resolución) (McClarín *et al.*, 1986) que posteriormente se demostró estaba mal determinada (Kim *et al.*, 1990). En estos estudios se observó que la sustitución de algunos residuos no alteraba la especificidad. La mayoría de las mutantes presentaban la catálisis alterada (Wolfes *et al.*, 1986; Geiger *et al.*, 1989; Oelgeschläger *et al.*, 1990; Needels *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; Heitman y Model, 1990b; Osuna *et al.*, 1991). Las evidencias más claras de que la primera estructura estaba mal determinada provienen de estudios con sustratos alterados, que demostraron la existencia de más contactos que los vistos en la estructura (Lesser *et al.*, 1990). Estudios cristalográficos posteriores demostraron que la primera estructura reportada estaba mal,

con un trazo erróneo de la cadena polipeptídica y que existían más aa involucrados en el reconocimiento de los que se suponía (Kim *et al.*, 1990). Algunos estudios posteriores han explorado la conexión entre la catálisis y la especificidad. Así, existen mutantes en aa que contactan el DNA, que tiene alterada la especificidad y la catálisis (Jeltsch *et al.*, 1993b).

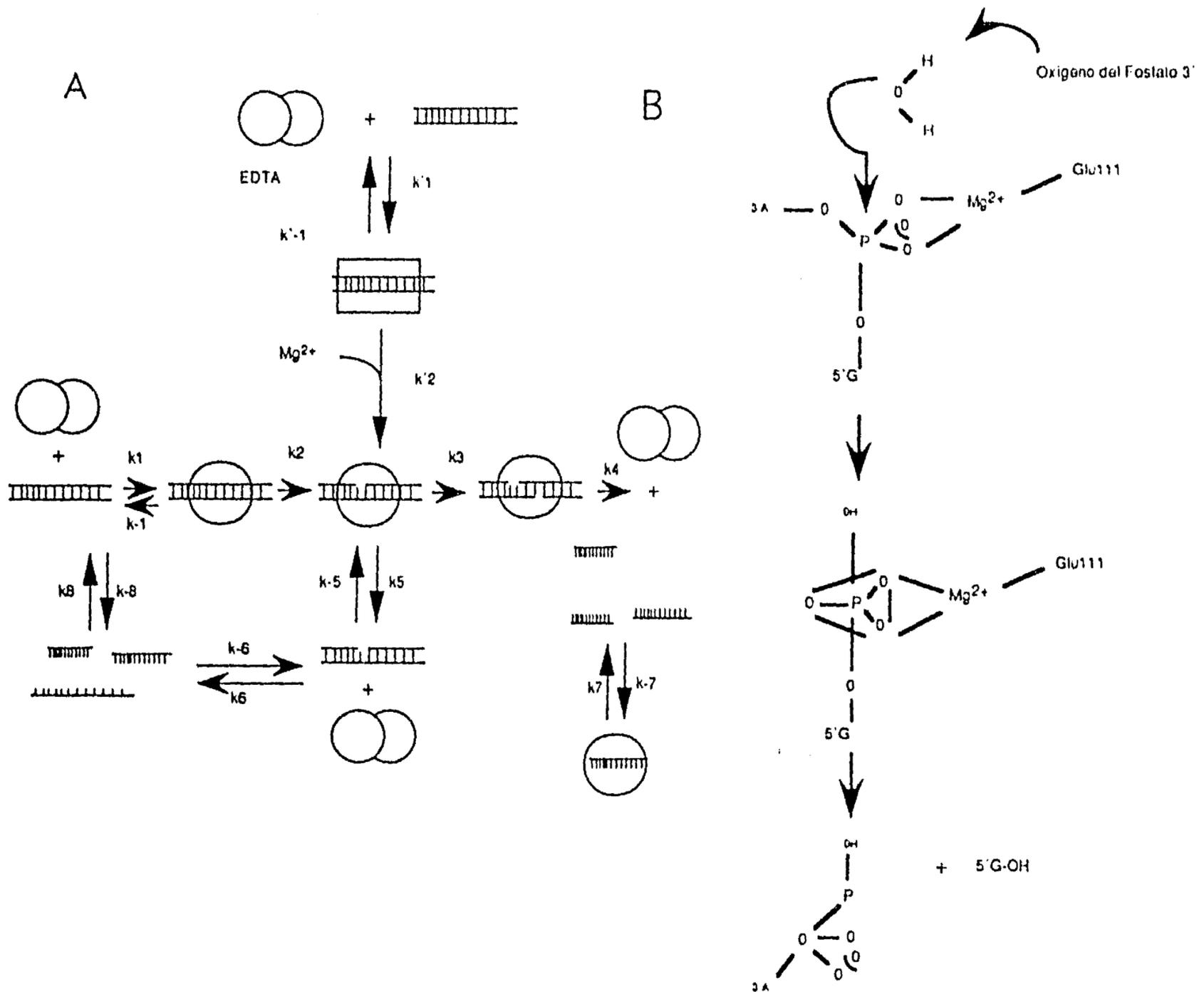


Figura 1. Esquema de la interacción y mecanismo catalítico de la endonucleasa *EcoRI*. En el panel A se muestra la interacción de la enzima con el DNA. Los círculos muestran al dímero de la enzima en presencia de Mg^{++} . El rectángulo muestra al dímero de la enzima en ausencia de Mg^{++} . La hebra representa el DNA y el corte se muestra cómo una ruptura en la hebra. Las flechas indican la dirección de la reacción. En el panel B se muestra el mecanismo catalítico de la reacción de la endonucleasa. Se muestra como el oxígeno 3' al enlace que se hidroliza activa la molécula de agua que participa en la reacción. También se muestra el papel del Mg^{++} en la catálisis

Estructura de la proteína y su función; contactos con el DNA y formación del sitio activo

La estructura corregida del complejo *EcoRI*-DNA se tiene a una resolución de 2.7Å, mostrando un dímero de estructura globular, con un diámetro de 50Å (Figura 2A) (Kim *et al.*, 1990). El DNA se encuentra abrazado por la proteína, donde el surco menor está expuesto al solvente y el surco mayor en la interfase DNA-proteína. El DNA se encuentra distorsionado y el surco mayor está ampliado, lo que permite que la proteína pueda interactuar con todas las bases del sitio de reconocimiento (Figura 2B y 2C). La distorsión del DNA pudiera inducirse sólo en parte por la proteína ya que, aparentemente, fragmentos de DNA que portan la secuencia blanco pueden tener una curvatura en ausencia de la proteína (Diekmann, 1988). Sin embargo, en la estructura se observa que existe un acercamiento entre los N₆ de las adeninas centrales, lo que puede ocasionar problemas estéricos. Al usar sustratos donde se eliminan estos grupos, se observa que la enzima presenta una afinidad mayor, lo que indica que la enzima también contribuye a la distorsión (Lesser *et al.*, 1993). Esto puede explicar por qué la metilación del DNA por la metilasa *EcoRI*, inhibe el corte del mismo. Cada monómero de la endonucleasa *EcoRI* posee una arquitectura α/β , consta de una lámina β que se encuentra con α -hélices en ambos lados. Los

aa involucrados en la catálisis están en la lámina β (aa 91, 111 y 113). Los aa involucrados en el reconocimiento están distribuidos en dos zonas. La primera zona es una estructura compuesta de cuatro α -hélices (dos de cada monómero) (aa 145, 200-203) y la segunda estructura es un segmento estructurado, no periódico, que corre a lo largo del surco mayor (aa 137-142) (Figura 2C y 2D). Este fragmento no periódico se ha sintetizado y muestra unión específica al sitio canónico. Como es de esperarse, su unión es menor que la que muestra la proteína completa (Jeltsch *et al.*, 1995). El reconocimiento está sobredeterminado, ya que de los 18 posibles contactos que se pueden establecer con el surco mayor del sitio de reconocimiento, se forman 16. Es importante mencionar que en otras proteínas, un número menor de contactos puede determinar la especificidad (Harrison, 1991). El número posible de grupos en el surco mayor del DNA que pueden formar interacciones con una proteína fueron calculados por Seeman y colaboradores en 1976 (Seeman *et al.*, 1976). En la estructura no se observan los primeros 16 aa de la enzima, ya que presentan una alta movilidad lo que impide su determinación en la cristalografía. Sin embargo hay evidencia experimental que apoya su importancia en la actividad (Jen-Jacobson *et al.*, 1986). Existen varias estructuras de la endonucleasa *EcoRI* en complejo con su DNA canónico,

una de ellas es en presencia de Mn^{++} . En esta estructura se observa que la unión del ión induce ligeros cambios estructurales para la formación del sitio catalítico que posiblemente contribuyen a su especificidad (Figura 3) (Rosenberg, 1991). La estructura global de la enzima no se altera sustancialmente, se observan cambios en las cadenas laterales de los aa que están en la interfase con el DNA. Las cadenas laterales de los aa que unen el Mg^{++} se mueven para poder unirlo.

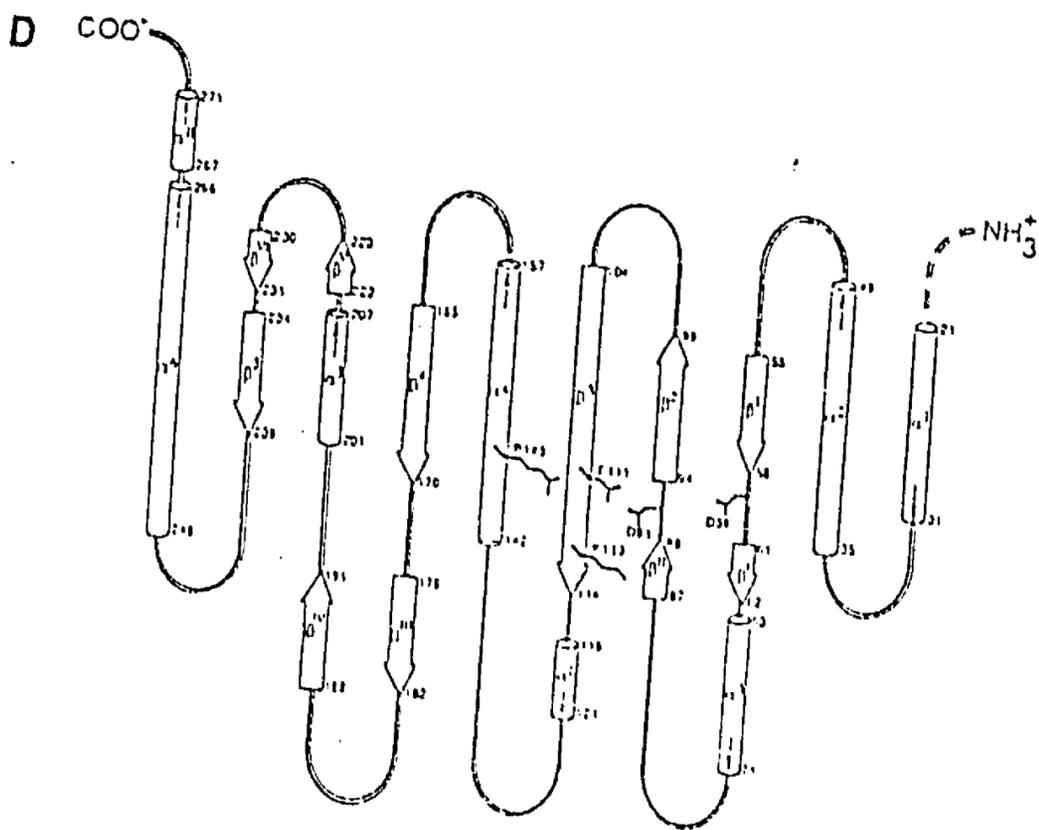
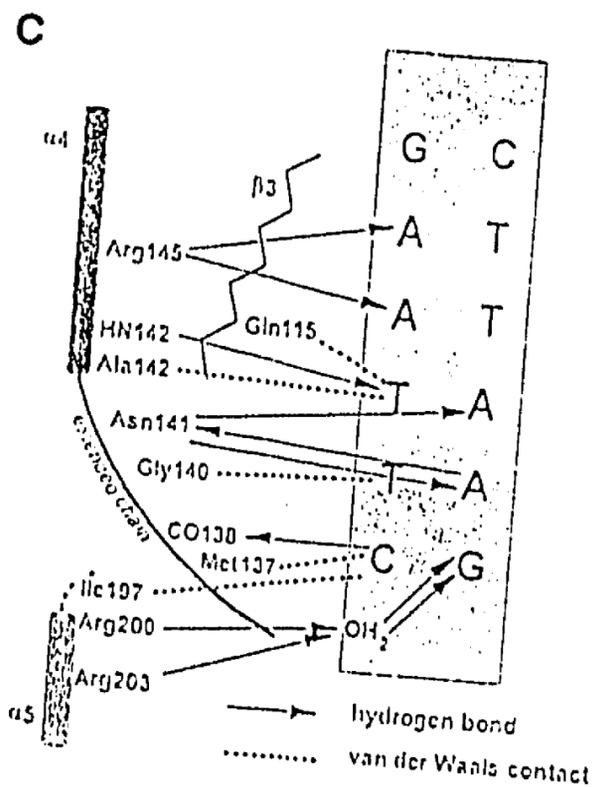
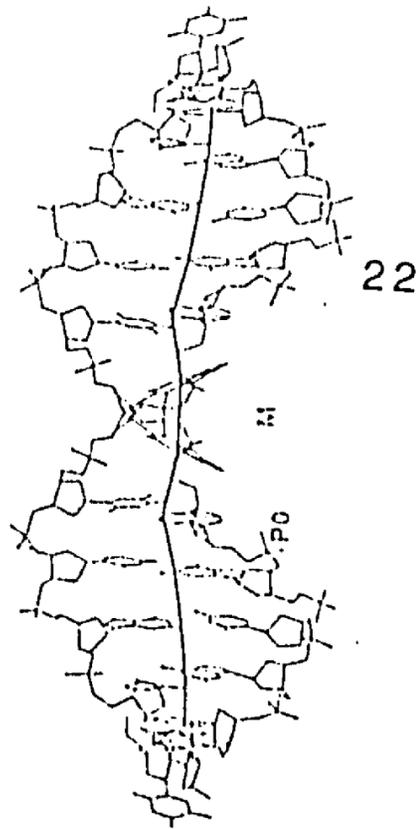
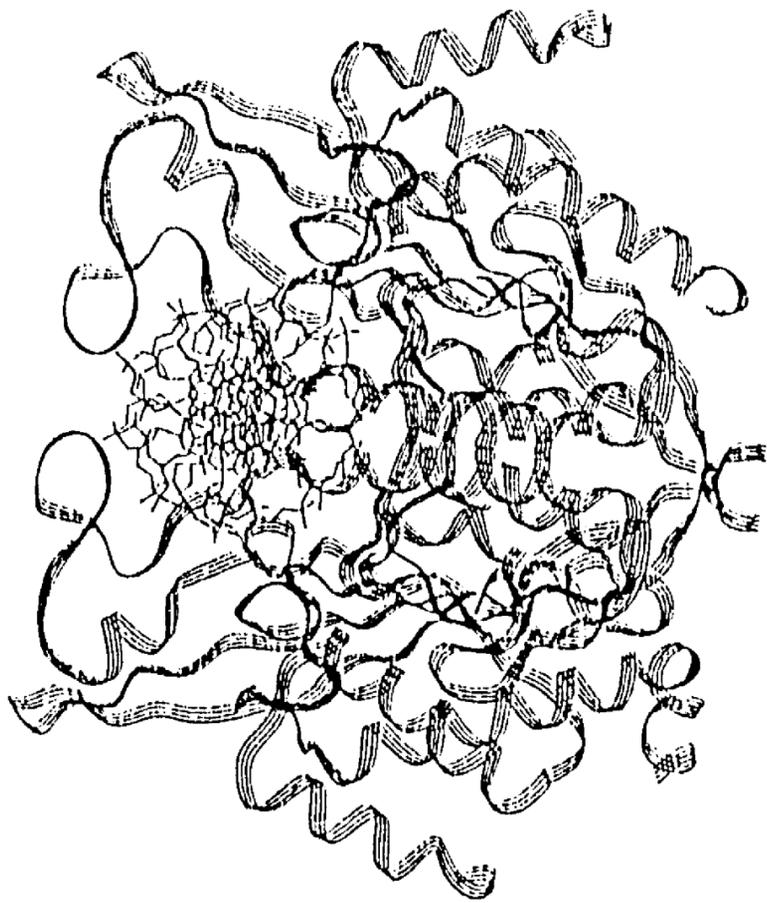


Figura 2. Endonucleasa *EcoRI*. En el panel A se muestra el dímero y el DNA visto desde arriba. En el panel B se muestra el DNA del complejo cristalizado, para claridad se quitó la proteína. M, indica el surco mayor que se encuentra ampliado; PO, indica el enlace fosfodiéster que se hidroliza. En el panel C se muestra la representación esquemática de los contactos que se establecen entre la proteína y las bases del DNA. En el panel D se muestra la estructura secundaria de la endonucleasa *EcoRI*. Las flechas indican estructura β y los cilindros las α -hélices.

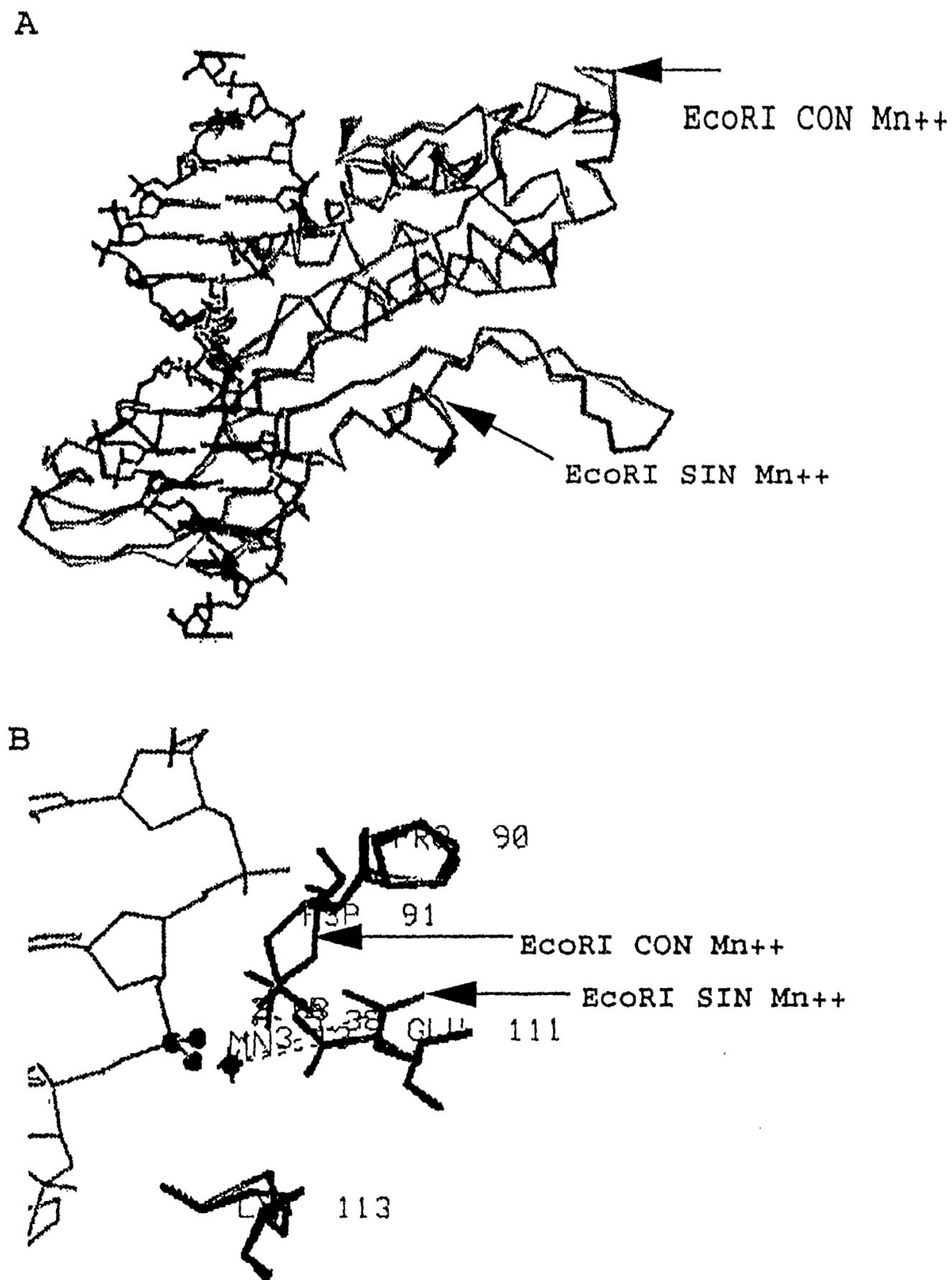


Figura 3. Cambios estructurales originados por la unión del Mn⁺⁺ en la endonucleasa *EcoRI*. En el panel A se muestra el DNA del complejo en ausencia de Mn⁺⁺ y el trazo de los carbonos α de un monómero de la endonucleasa *EcoRI* en presencia y ausencia de Mn⁺⁺. En el panel B se muestran los aa del sitio catalítico y como se acercan al Mn⁺⁺. Los números indican la distancia que existe entre los aa y el Mn⁺⁺. En rojo se muestra la estructura de la proteína en presencia de Mn⁺⁺ y en lila en ausencia de Mn⁺⁺.

Relación de las estructuras conocidas y posible relación evolutiva

La endonucleasa *EcoRI* posee varios isosquizómeros, de los cuales se conoce la estructura primaria de uno de ellos: *RsrI* (Stepheson *et al.*, 1989). La identidad con *RsrI* es mayor del 50% a nivel de aa, lo que indica su homología. Sin embargo, se han realizado estudios que demuestran que *RsrI* presenta ciertas diferencias en cómo interactúa con su DNA blanco (Aiken *et al.*, 1991). Esto se demostró al observar que la modificación de bases del DNA del sitio de reconocimiento afectaban de manera diferente la unión y catálisis de las enzimas. Existe otra endonucleasa clonada y secuenciada; *MunI* (Siksnys *et al.*, 1994), que reconoce una secuencia parecida a la de la endonucleasa *EcoRI*: 5'-CAATTG-3'. En este caso la identidad es del 19%; sin embargo existen argumentos funcionales que hacen suponer que la estructura terciaria es semejante. Esto es importante, ya que demuestra que a pesar de la baja identidad que existe entre diversos sistemas de restricción, éstos pueden ser homólogos. El origen de estos sistemas es un misterio, ya que se observa poca similitud de secuencia entre ellos para poder establecer relaciones filogenéticas. Estudios basados en las estructuras cristalográficas de *EcoRI*, *PvuII*, *BamHI* y *EcoRV* han demostrado que, a pesar de no ser semejantes en su

secuencia, presentan importantes similitudes estructurales. Estas enzimas se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo a sus semejanzas: (*EcoRI* y *BamHI*) y (*PvuII* y *EcoRV*). Estos grupos corresponden al tipo de extremo que dejan al hidrolizar el enlace fosfodiéster, 5'salientes y rasurados, respectivamente (Aggarwal, 1995). En otro estudio se observó que parte de las estructuras básicas de las endonucleasa *EcoRI* y *EcoRV* son semejantes, particularmente alrededor del sitio catalítico (Venclovas *et al.* 1994). Esto es muy importante ya que indican que los dos grupos podrían tener elementos con un origen común. Por último, recientemente se ha demostrado una homología entre la endonucleasa *NaeI* y ciertas DNA-ligasas. Se demostró que esta endonucleasa puede tener actividad de topoisomerasa y recombinasa. Aunque esta endonucleasa no es de las más representativas (presenta dos sitios de unión a DNA), permite trazar un posible origen para algunas de ellas (Jo y Topal, 1995).

δ -ENDOTOXINA CryIA(b) berliner

El segundo modelo corresponde a la δ -endotoxina que es una proteína que tiene actividad de bioinsecticida, ésta interacciona con glicoproteínas o proteínas, además se conoce la estructura cristalina de una de ellas. Su especificidad está poco caracterizada, ya que el tamaño de la proteína (≈ 600 aa) la hacen difícil de estudiar. El poder separar el dominio que está involucrado en la especificidad es importante ya que facilitaría su estudio. Esto requiere el conocer las interacciones que se forman entre los dominios (proteína-proteína) para poder separarlos adecuadamente.

Clasificación de las δ -endotoxinas

El esquema de clasificación de las δ -endotoxinas se basa primariamente en la identidad de secuencia entre los distintos genes y secundariamente, en su espectro de actividad (Höfte y Whiteley, 1989). Se reconocen dos principales categorías en este esquema; las llamadas Cry que actúan sobre células de insecto *in vivo* e *in vitro*. La otra categoría son conocidas como Cyt que son sólo activas *in vivo* contra dípteros, pero tienen un mayor espectro de actividad *in vitro*. El grupo de las Cry comprende una gran familia de proteínas que se clasifican según de la siguiente manera (Feitelson *et al.*, 1992):

CryI:lepidóptera

CryII:lepidóptera y díptera

CryIII:coleóptera

CryIV:díptera

CryV:nemátoda

CryVI:nemátoda

Las toxinas se pueden separar en dos grupos de acuerdo a su tamaño; de 140-130KDa (CryI, CryIVA y CryIVB) y de \approx 70KDa (CryII, CryIII y CryIVD).

En general, existe una identidad a nivel de aa que va del 25% a más del 90% entre las distintas Crys, con la excepción de CryVI que parece ser de un origen diferente (Figura 4). La clasificación basada en la actividad, en algunos casos correlaciona con su grado de identidad, pero no siempre.

Actividad biológica de las δ -endotoxinas

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva que forma esporas. Esta bacteria crece en forma vegetativa cuando los nutrientes son abundantes, pero cuando los nutrientes son limitantes, forma endoesporas y uno o más cristales proteicos. Algunas de las proteínas presentes en los cristales (conocidas como δ -endotoxinas) poseen una actividad insecticida. No todas han mostrado ser tóxicas a insectos, así en un estudio se observó que de 1000 cepas aisladas, un 40% no presentaban

actividad insecticida (Knowles y Dow, 1993). Sin embargo, se probaron sólo algunos insectos, lo que no excluye la posibilidad que sean tóxicas para otros insectos u organismos. La producción de estas toxinas durante la esporulación puede indicar que son importantes en el ciclo biológico de la bacteria. La bacteria no crece en el suelo, sólo en insectos sensibles y en condiciones de laboratorio. Así, la toxina claramente ayudan a dar las condiciones para que la bacteria crezca en el insecto (Aronson, 1993).

Modo de acción

Se ha propuesto un esquema general para el modo de acción de las δ -endotoxinas (Figura 5A-D) (Knowles, 1994). Este comienza con la ingestión de la endoespora y el cristal con las protoxinas. Al ser ingerido por la larva del insecto sensible, el cristal se solubiliza en el intestino medio, gracias al pH que existe en él (Du *et al.*, 1994). Además éste pH es importante para la actividad de la toxina (Feng y Bechtel, 1994). Una vez solubilizada, la protoxina sufre una maduración, la cual consiste en el corte proteolítico del amino y carboxilo terminal. Es importante mencionar que las características de la maduración depende de la toxina en cuestión. La porción central constituye la toxina madura y ésta se une a un receptor (una proteína o glicoproteína) presente en las microvellosidades de las células columnares del intestino medio (Hofmann

et al., 1988). Existen diferentes receptores para las toxinas y un organismo puede presentar varios posibles receptores para una toxina. Se ha demostrado que CryIA(c) se une a dos proteínas glicosiladas, una N aminopeptidasa y a una fosfatasa (Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994). En el caso de CryIA(b), se clonó el gen de una cadherina que es el receptor de la toxina (Vadlamudi *et al.*, 1995). Las toxinas CryIA(a) y CryIA(b) se unen a proteínas de peso molecular semejante (Oddou *et al.*, 1991). La toxina se inserta de manera irreversible a la membrana y origina la formación de un poro y así, la pérdida del potencial de membrana de la célula (Knowles y Ellar, 1987). La unión de la toxina a la célula no siempre indica que es tóxica, debido a que no necesariamente se inserta en la membrana. No se conoce como está formado el poro, ya que puede estar constituido por una o varias moléculas de toxina, pero existe evidencia que apoya la segunda propuesta. El evento siguiente es la lisis celular, daño del intestino y la muerte del insecto por ayuno o infección.

Es importante mencionar que existen pocos casos de resistencia generada a la toxina en el campo y esto hace suponer que la o las proteína a las cuales se une, están altamente comprometidas en la biología de la larva del insecto (Tabashnik *et al.*, 1994). Esto se demostró al generar poblaciones resistentes en condiciones de laboratorio, las poblaciones

resistentes mostraban una menor capacidad de reproducción. En el caso de CryIA(b) que se une a una cadherina se comprueba esto (Vadlamudi *et al.*, 1995). Así, las caherinas son proteínas altamente conservadas en la evolución que son importantes para la interacción entre las células de un

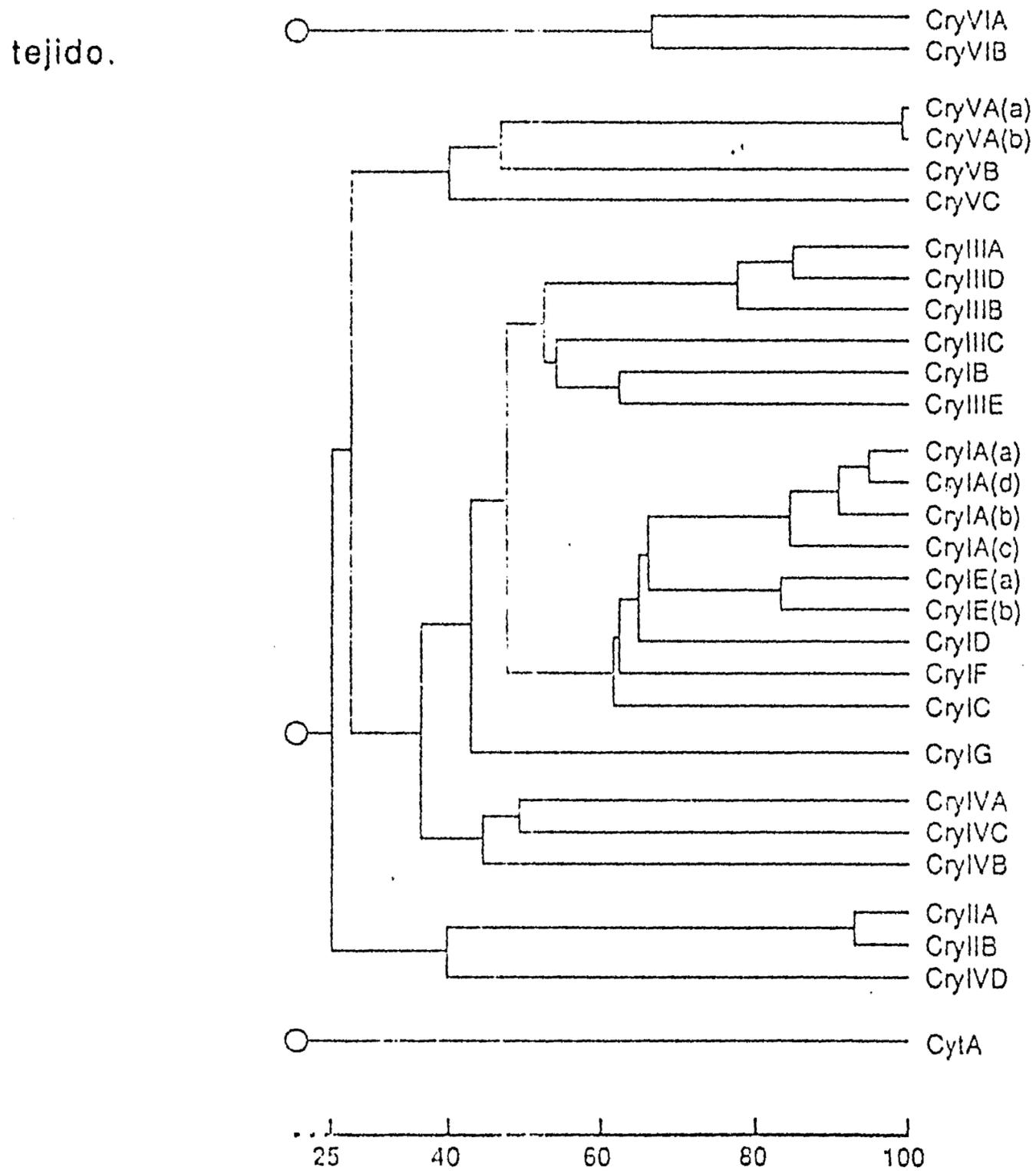
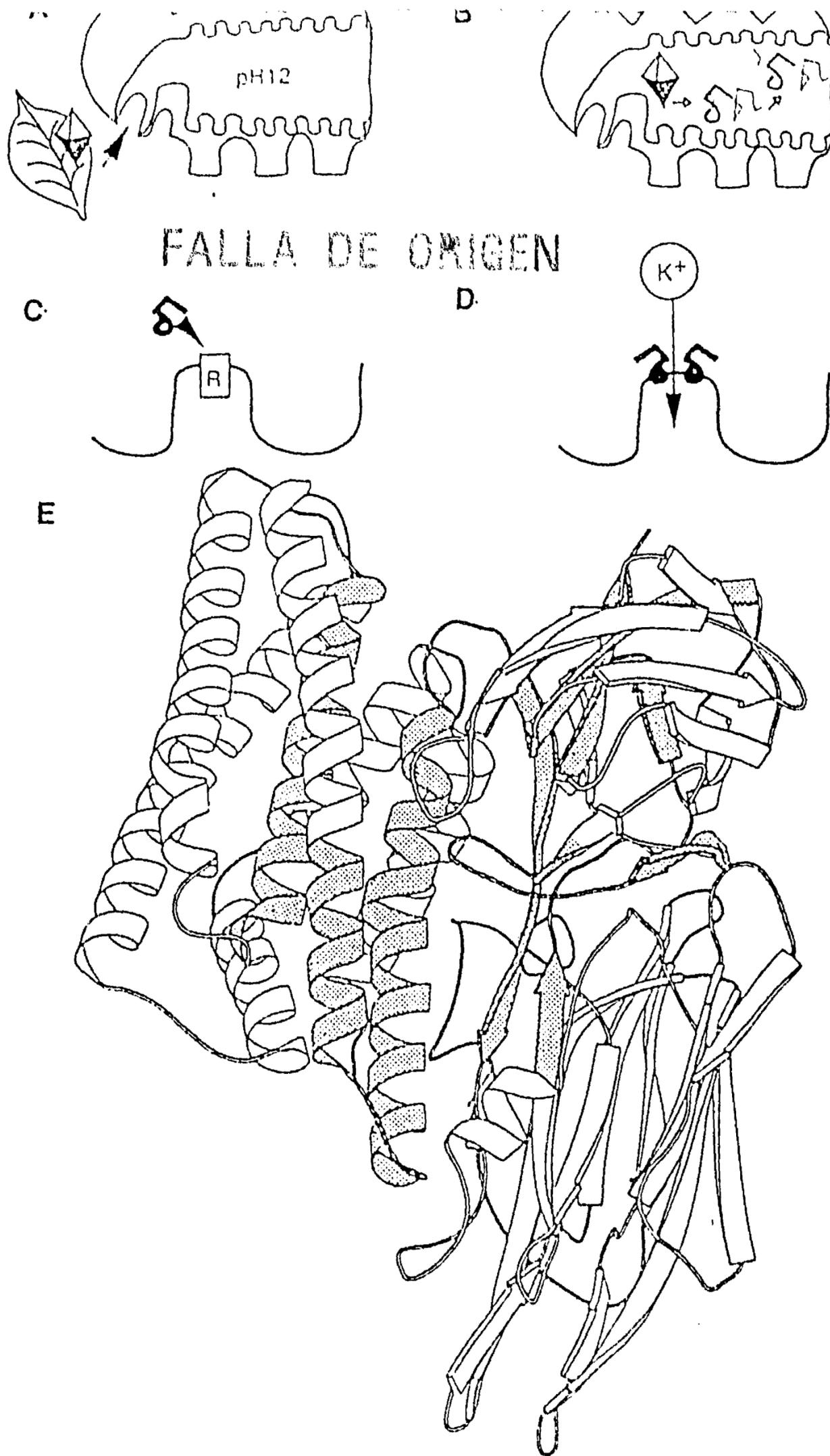


Figura 4. Posible relación evolutiva entre las clases de δ -endotoxinas. Se compararon 29 toxinas maduras (≈ 640 aa c/u) (Feitelson *et al.*, 1992).



FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Mecanismo de acción y estructura de la δ -endotoxina CryIII A. En el panel A se muestra la ingestión de la protoxina. En el panel B se muestra la solubilización y maduración de la toxina. En el panel C se muestra la interacción con un receptor del intestino medio. En el panel D se muestra la formación de un canal. En el panel E se muestra la estructura de la toxina CryIII A, donde se ven los tres dominios de la toxina. En oscuro se muestran las zonas conservadas entre las distintas toxinas.

Relación entre la estructura y función de la toxina CryIII_A

La estructura tridimensional de la δ -endotoxina CryIII_A consta de tres dominios estructurales (Li *et al.*, 1991) (Figura 5E). El dominio I que corresponde a la región amino terminal consta de 7 α -hélices. El dominio II que corresponde a la parte central, consta de tres láminas β , que forman una estructura triangular y una pequeña α -hélice. Por último, el dominio III que es la parte carboxilo terminal, forma un β -sandwich. A cada dominio se le ha dado un papel funcional en el mecanismo de acción de la toxina. El dominio I forma el poro, lo que ha sido demostrado por la actividad del fragmento proteolítico correspondiente (Walters *et al.*, 1993), por mutaciones (Chen *et al.*, 1995), por síntesis de la hélice que se inserta (Cummings *et al.*, 1994; Gazit *et al.*, 1994), así como por el dominio expresado de manera aislada (Von Tersch *et al.*, 1994). Al parecer la α -hélice central (α -5) es la que se inserta en la membrana (Cummings *et al.*, 1994; Gazit *et al.*, 1994). El dominio II está involucrado en la unión específica: existen evidencias de que las asas que se forman entre los elementos β , están involucradas en la interacción con el receptor (Widner y Whiteley, 1990; Smith y Ellar, 1994; Lu *et al.*, 1994; Liang y Dean, 1994; Bosch *et al.*, 1994a; Rajamohan *et al.*, 1995). Sin embargo, existen

estudios que demuestran que en algunos casos también es necesario partes del dominio III (Schnepf et al., 1990). El dominio III es interesante, ya que está involucrado en estabilidad de la toxina (Almond y Dean, 1993; Nishimoto et al. 1994; Wabiko y Yasuda, 1995), especificidad (Schnepf et al., 1990) y formación del poro (Chen et al., 1993; Chen et al., 1995).

Al comparar las secuencias de aa de las distintas toxinas, se observa que existen 5 bloques de aa básicos que se conservan. En la estructura cristalográfica se observa que dichos bloques se encuentran formando el núcleo de la toxina, lo cual es consistente con que incluso otras toxinas cuyo grado de identidad es menor pueden presentar una estructura similar. En el reporte de la obtención de cristales de la toxina CryIA(a) (tiene una identidad del 35% con respecto a CryIIA) se informó que posiblemente tiene una estructura cristalina semejante a la toxina CryIIA (Borisova et al., 1994).

Relaciones evolutivas que ayudan a fundamentar el uso de un gen del cual no se conoce la estructura de la proteína en cuestión
Se propone que las δ -endotoxinas son de origen monofilético, con la posible excepción de CryVI. Como se dijo anteriormente, el porcentaje de identidad entre las distintas familias varía entre un 25% y 90% (Feitelson et al., 1992) (Figura 4), lo cual es indicio de una estructura terciaria

semejante. En este sentido se acepta que cuando la similitud es mayor del 25%-30%, las proteínas son homólogas y, por lo tanto sus estructuras son semejantes (Chothia, 1992). También existen ejemplos donde la similitud es menor y sin embargo, las estructuras se parecen; en estos casos no es sencillo discernir entre homología y convergencia.

Potencial biotecnológico de las δ -endotoxinas

La importancia de las δ -endotoxinas radica en su actividad insecticida altamente específica, que generan poca resistencia y que son biodegradables. Todas estas características las hacen de suma importancia en el control de plagas. En la actualidad existen en el mercado diversos productos insecticidas basados en estas toxinas. Por otra parte, con el fin de ampliar la acción de estos bioinsecticidas, diversas empresas colectan y caracterizan *Bacillus*, buscando actividades insecticidas contra ciertas plagas, utilizando diversos métodos (Schnepf, 1995), en fechas recientes por medio de PCR (Cerón *et al.*, 1994).

OBJETIVOS E HIPOTESIS DEL TRABAJO

Todos los datos presentados anteriormente nos permiten formular varias preguntas sobre los posibles mecanismos que están implicados en la función de las proteínas modelo.

En el caso de la endonucleasa *EcoRI*, la pregunta que sobresale es cómo actúan los residuos de aa implicados en el reconocimiento y que no están en contacto con las bases del DNA. La evidencia experimental apoya la existencia de determinantes de la especificidad que no están en contacto directo con las bases del DNA del sitio blanco. Sin embargo, se propuso que la estructura cristalográfica mostraba a la enzima antes de ser activa, así que existen cambios conformacionales que pueden acercar a estos residuos al DNA durante la catálisis. El análisis enzimático de distintas mutantes (en posiciones que contactan el DNA) mostró que la mayoría de ellas tenían alterados sus parámetros catalíticos, lo que indicó la existencia de una conexión entre la especificidad y la catálisis. Un reporte en particular (Jeltsch *et al.*, 1993b), demostró que al alterar un residuo de aa, la energía de unión se modificaba lo esperado para la pérdida del contacto, pero además se veían alteradas sus constantes catalíticas (Jeltsch *et al.*, 1993b). Una manera de demostrar que el residuo participa o no en un contacto específico es la de cambiarlo y observar los efectos que ocasiona. De esta manera se puede observar la importancia de éste residuo

en la actividad de la enzima. Nosotros proponemos la existencia de un interruptor de la actividad enzimática de la endonucleasa *EcoRI* que acopla la unión específica a la formación de la maquinaria catalítica.

Las δ -endotoxinas poseen un gran potencial biotecnológico, pero existen muchas preguntas acerca de su función. Una de las más interesantes es poder determinar la zona de la toxina que participa en la especificidad y si dicha zona corresponde a un dominio estructural. Esto es importante para poder tratar de modificar la especificidad de la toxina hacia insectos que constituyen plagas de cultivos de importancia económica. Existen técnicas que permiten crear variabilidad y seleccionar a aquellas que posean una actividad en particular. El tamaño de la toxina madura (≈ 600 aa) hace difícil la aplicación de estas técnicas. Así, que una de las primeras preguntas es determinar si existe una modularidad estructural y funcional en la toxina. Como se mencionó anteriormente la estructura cristalográfica de CryIIIa muestra que existen tres módulos estructurales, por lo que parece factible la separación de ellos. La evidencia genética señala que el dominio II puede ser el principal determinante de la especificidad (Widner y Whiteley, 1990; Smith y Ellar, 1994; Lu *et al.*, 1994; Liang y Dean, 1994; Bosch *et al.*, 1994a; Rajamohan *et al.*, 1995). Existen casos donde el dominio III puede estar participando en la especificidad, pero las evidencias más fuertes, basadas en

mutaciones y la variabilidad de esta zona, apunta a que es el dominio II el principal determinante de la especificidad. El dominio II consta de aproximadamente 200 aa y es un buen candidato a probar en el sistema de despliegue en fago (Smith, 1985), para poder seleccionar variantes con especificidad alterada. El análisis de la estructura hace pensar que el dominio II puede ser estable cuando se expresa de manera independiente.

OBJETIVOS

En el caso de la enzima *EcoRI*, estudiar determinantes de la especificidad que no están contactando a las bases del DNA de manera directa. Así, cómo la existencia de más aa implicados en este reconocimiento indirecto.

Mientras que en el segundo modelo, es decir la δ -endotoxina CryIA(b), el objetivo consiste en aislar el dominio II de manera independiente y verificar si la especificidad reside en este dominio.

HIPOTESIS

En la endonucleasa *EcoRI* proponemos que existe un sensor de la especificidad que acopla la unión específica con la liberación de la maquinaria catalítica.

En la toxina CryIIIA proponemos que el dominio II en ciertas condiciones puede ser expresado de manera independiente y mostrar unión específica, lo que permitirá su estudio.

ANTECEDENTES

Endonucleasa *EcoRI*

En la literatura se había reportado una mutante en el aa 114 (H→S) de la endonucleasa *EcoRI* que mostraba una actividad estrella (Heitman y Model, 1990a). Esta mutación resulta interesante, ya que de acuerdo a la estructura cristalográfica, este residuo de aa no está haciendo contacto con las bases del sitio de reconocimiento. Esto nos motivó a mutagenizar a saturación ésta posición (Flores, 1994). El banco que se generó presentaba mutantes con una actividad insensible a la presencia de la metilasa, pero no se caracterizó a fondo. Es decir, a pesar de que el DNA se encontraba metilado en los sitios que reconoce la endonucleasa *EcoRI*, era cortado por la enzima. Esto era importante ya que hablaba de la posible existencia de un interruptor en el mecanismo de especificidad. Esto, además abría la posibilidad de tener mutantes con la especificidad alterada a partir de enzimas alteradas en dicho interruptor.

δ -endotoxina

Al comenzar el proyecto en colaboración con la Dra. Alejandra Bravo (Instituto de Biotecnología/UNAM) se contaba con un banco de datos con 50 distintos genes de δ -endotoxinas y el gen de la toxina CryIA(b). Se seleccionó este gen, ya que se contaba con las metodologías para ensayos

in vivo e *in vitro*. El poder manipular la especificidad de ésta proteína representa un objetivo para la generación de toxinas para controlar plagas. Existen técnicas para la generación y selección de proteínas variantes. El tamaño de la toxina madura representa una limitante para el uso de estas técnicas, por lo que poder trabajar con parte de esta es un objetivo en este campo.

MATERIALES Y METODOS

Endonucleasa *EcoRI*

Los materiales y métodos se describen en el artículo de la endonucleasa *EcoRI* que se genera del presente trabajo. Además de las mutaciones en el codón 114, se mutó el codón 160 y 170 del gen, más adelante se explica los motivos por los se mutaron estos codones. La estrategia de mutagénesis del codón 114 se muestran en la figura 2 del artículo. Se mutó el codón 160, ya que el gen seudosilvestre que usamos presenta un cambio en esta posición (glu→asp) (Kuhn *et al.*, 1986). Así, la mutación que introducimos, retorna al codón original (Figura 6). Existe evidencia de que está mutación no altera la especificidad y sólo altera ligeramente las constantes catalíticas. Esto nos permiten decir que las conclusiones del presente trabajo no se ven alteradas por está mutación adicional. El codón 170 (glu→gln, ala) lo mutamos para determinar su efecto en la

especificidad de la proteína (Figura 6). Se seleccionó gln ya que es un cambio conservativo y ala porque quita la posibilidad que interaccione con his 114. La mutagénesis del codón glu170 se basó en la observación de la estructura cristalográfica del complejo proteína-DNA en presencia de Mn^{++} donde se veía una posible interacción entre el residuo his114 y glu170. Las condiciones de PCR, clonación y secuencias de los oligos usados se dan en la figura 7.

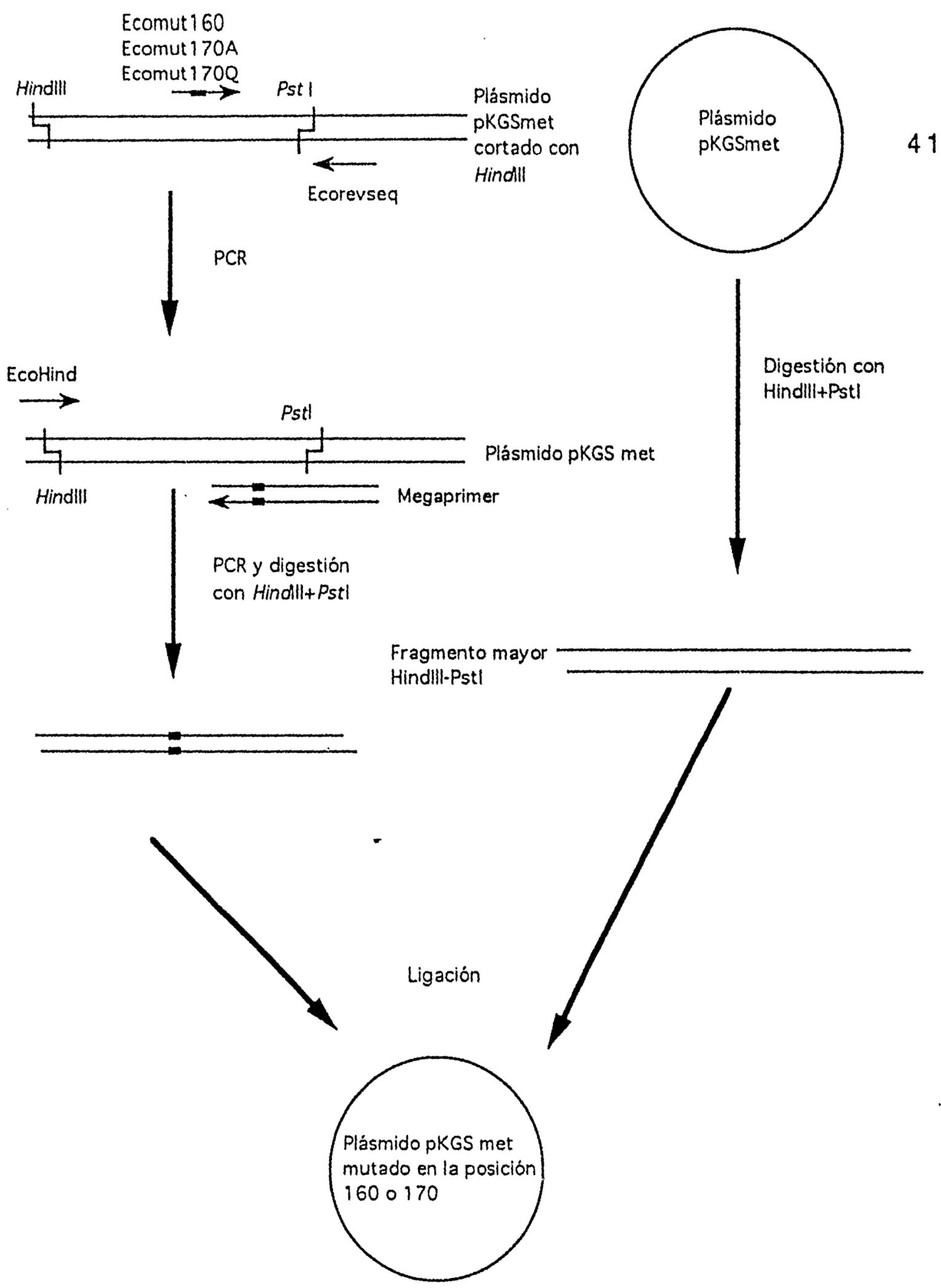


Figura 6. Estrategia de mutagénesis de las posiciones 160 y 170 del gen de la endonucleasa *EcoRI*. Las secuencias de los oligos utilizados se dan en la figura 7. La zona gruesa del oligo y del megaprimer representa la región que porta los cambios. La posición de los oligos es relativa, ya que el oligo Ecomut170 está un poco más hacia el extremo 3' del gen.

Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótidos utilizados con la endonucleasa *EcoRI*

- Ecomut 160 (26 nt)
 a) 5'-TTATGCTCTCTGAGAGCCACTTTCCT-3'
 Ecomut170 (41)
 b) 5'-CACTTTCCTTACGTCCTTTTTCTA(CAG/GCG)GGGTCTAACTTTTT-3'
 EcoHind (24 nt)
 c) 5'-GAAATAAATGAAGCTTTAAAAAAA-3'
 Ecorevseq (24 nt)
 d) 5'-AATGCTTTTGTCTTTATGATTTAC-3'

Oligonucleótidos utilizados en la clonación del dominio II y II-III de la δ -endotoxina CryIA(b) berliner

- Domi II 5' (47 nt)
 e) 5'-CGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACAAGAGAAATTTATACAAAC-3'
 Domi II 3' (46 nt)
 f) 5'-CAGTGCCAAGCTTGGCTTTACTGCAGACTACGATGTATCCAAGAGAA-3'
 Domi II H6 3' (51 nt)
 g) 5'-AGTGCCAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGACTACGATGTATCCAAGA-3'
 Domi II-III H6 3' (52 nt)
 h) 5'-AGTGCCAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGAACTAAATTGGATACTTGATC-3'

Figura 7. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos. Oligo a, nucleótido (nt) 467-494 (FMLSESHFP), el codón en negrillas corresponde al cambio asp160→glu. Oligo b, nt 483-524 (HFPYVLFLQQ/AGSNFL); en negrillas están los dos aa probados en esta posición (glu→gln/ala). Se sintetizaron dos oligos, uno para cada cambio. Oligo c, nt 193-216 (EINEALKK). Oligo d, del nt 667-690 (VNHKDKSI). Oligo e, nt 931-950 (TREIYTN), las negrillas corresponden a la zona del gen, las itálicas al sitio *Bam*HI utilizado para la clonación y la región 5' es parte del gen de la β -gal. Oligo f, nt 1498-1518 (FSWIHRS); las itálicas indican el sitio *Hind*III utilizado para la clonación. El fragmento que se produce corresponde del aa 264-459 de la toxina CryIA(b). Oligo g, nt 1501-1518 (SWIHRS); la región subrayada corresponde a los codones para la cola de his (6 codones). Los nt en itálicas corresponden al sitio *Hind*III utilizado para su clonación. Oligo h, nt 2076-2096 (DNVSNLV). Este oligo llega al final del gen de la toxina y ayuda a generar el dominio II-III que consta de 389 aa, que en este caso tiene además la cola de histidinas señalada por el subrayado (6 codones). Las condiciones de PCR son 25 ciclos: 1 min a 92°C, 1 min a 55°C y 3 min a 72°C. Un ciclo a 72°C durante 15 min. El buffer de reacción es :MgCl, 2.5mM; KCl, 50mM; Tris-HCl, 10mM pH 9 y 1% de Triton X-100. Además tiene 250 μ M de cada dNTP, 30 pmolas de cada oligo o 1 μ g de megaprimer, 100 ng de templado y 2.5 U de Taq polimerasa. Los productos de PCR fueron purificados, digeridos y clonados siguiendo técnicas convencionales. Los productos fueron electrotransformados en *E. coli* cepa JM101. Las clonaciones se confirmaron por secuencia y patrón de digestión. Las referencias de estas técnicas se dan en el artículo. Las construcciones de la toxina se clonaron en pUC18 y pBTAC como *Bam*HI/*Hind*III.

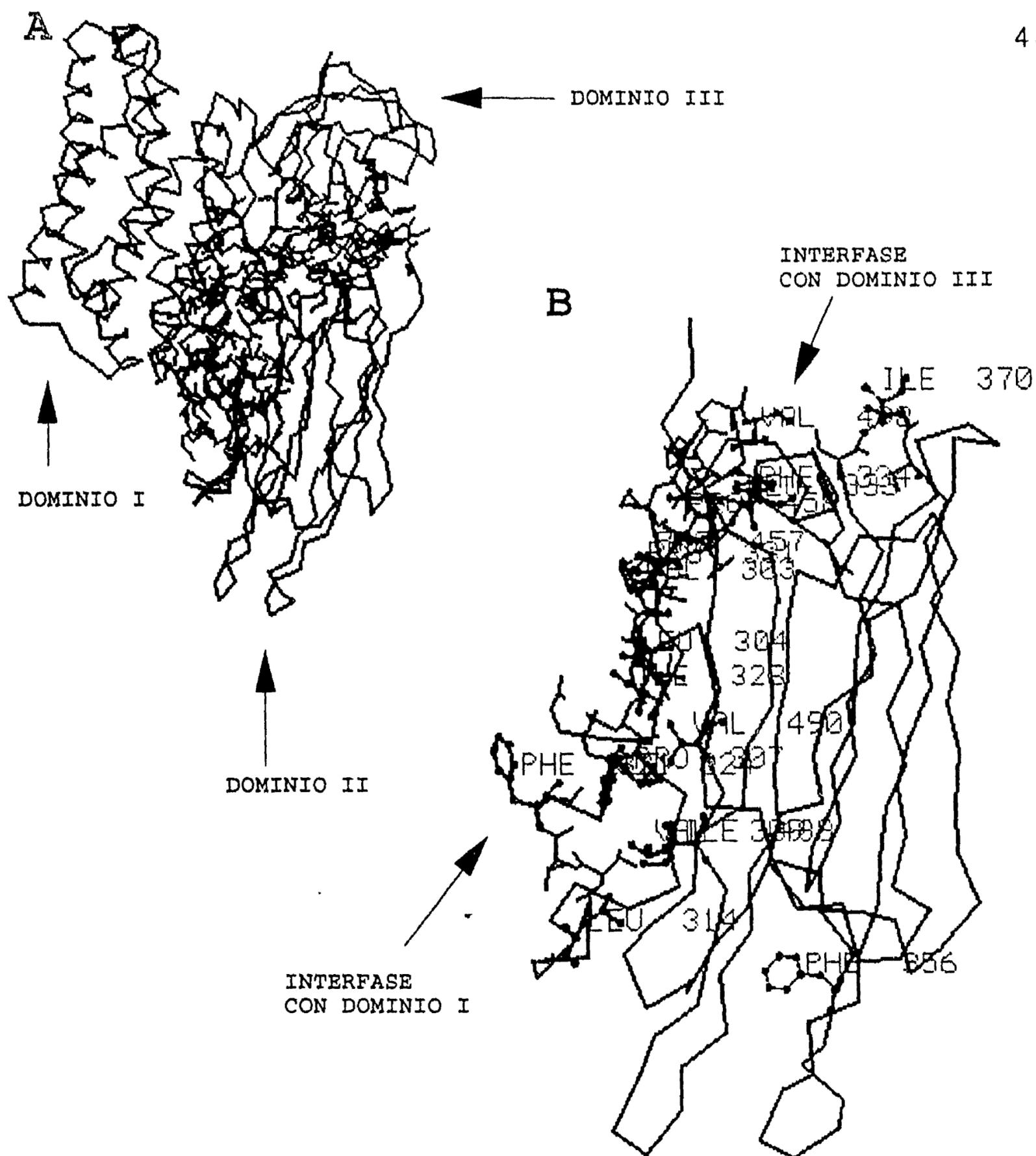


Figura 8. Interfase del dominio II de la δ -endotoxina CryIII A con los dominios II y III. En el panel A se muestran las cadenas laterales de la interfase. En el panel B se muestran los residuos hidrofóbicos del dominio II que se encuentran en la interfase. Se muestra una representación en bolas y varillas de los residuos hidrofóbicos en la interfase del dominio II.

δ -endotoxina CryIA(b) berliner

Diseño

Primero se analizó la estructura de la toxina CryIIIA para observar la interfase que existe entre el dominio II y los dominios I y III. Se observó que era factible separar el dominio II y que no existían zonas hidrofóbicas importantes que quedaran expuestas al solvente al remover los otros dos dominios y que pudiera dificultar la solubilidad de la proteína (Figura 8).

Se usó el plásmido pTP 658-3 que porta el gen de la toxina CryIA(b) berliner. Para poder delimitar el dominio II de la toxina, primero se realizó un alineamiento múltiple a nivel de proteína entre la subfamilia de toxinas CryIA y CryIIIA, ésta última es de la que se conoce la estructura tridimensional. Para el alineamiento se usó el programa Align (Hein, 1989). Del alineamiento se dedujo la porción de la proteína CryIA(b) que corresponde al dominio II (Figura 9).

0 IA(a)ent 1 IA(a)kur 2 IA(a)kur2 3 IA(a)sot 4 IA(b)aiz 5 IA(b)aiz3
 6 IA(b)ber1 7 IA(b)kurs 8 IA(b)kursH 9 IA(c)kurs 10 IIIAten4

Percentage de identidad										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	90	100	99	89	89	90	89	90	76	34
		90	90	99	99	100	99	100	84	35
			99	89	89	90	89	90	76	34
				89	90	90	89	90	76	34
					99	99	98	99	84	35
						99	99	99	84	35
							99	100	84	35
								99	84	35
									84	35
										33

MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADNNTAALDSSTTKDVIQKGI 70 10
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 9
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 4
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 6
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 3
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 0
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 2
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 5
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 1
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 8
 MDNN-----PNINECIPYNCLSNPEVEVL-----GGERIETGYT--PIDISL 40 7
 * * * * *

SVVGDLLGVVGFPPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFMEQVEALMDQKIADYAKNKALAELOGLQNNV 140 10
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 9
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 4
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 6
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 3
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 0
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 2
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 5
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 1
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 8
 SLTQFLLSE--FVPGAGFVLGLVDI IWGI-FGPSQWDAPLVQIEQLINQRIEEFARNQAI SRLEGLSNLY 107 7
 * * * * *

EDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRI RELFSQAESHEFRNSMPSHAI SCYVLEFLTTYQAANTHFLLLKD 210 10
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 9
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 4
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 6
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 3
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 0
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 2
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 5
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 1
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 8
 QIYAESFREWEADPT---NPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLEFAVQNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRD 174 7
 * * * * *

AQIYGEWGYEKEDIAEFYKRLKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNKYRREMTLTVLDLI 280 10
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 9
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 4
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 6
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 3
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 0
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 2
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 5
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 1
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 8
 VSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLIGNYTDHAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLTVLDIV 244 7
 * * * * *

ALFPLYDVRLYPKEVKTELTRDVLTDPIVGVNLRGYGTTFSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGY 350 10
 ALFPNYDSRRYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGSAQGIERSIRSPHLMIDLNSITTYTDAHRGY 313 9
 SLFPNYDSRTYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGSAQGIERSIRSPHLMIDLNSITTYTDAHRGE 313 4
 SLFPNYDSRTYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGSAQGIERSIRSPHLMIDLNSITTYTDAHRGE 313 6
 ALFSNYDSRRYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGMAQRIEQNIHQPHLMDILNKITTYTDVHRGF 313 3
 ALFSNYDSRRYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGMAQRIEQNIHQPHLMDILNSITTYTDVHRGF 313 0
 ALFSNYDSRRYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGMAQRIEQNIHQPHLMDILNSITTYTDVHRGF 313 2
 SLFPNYDSRTYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGSAQGIERSIRSPHLMIDLNSITTYTDAHRGE 313 5
 SLFPNYDSRTYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGSAQGIERSIRSPHLMIDLNSITTYTDAHRGE 313 1
 SLFPNYDSRTYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGSAQGIERSIRSPHLMIDLNSITTYTDAHRGE 313 8
 SLFPNYDSRTYP IRTVSQLTREIYTNP-VLENFDGSFRGSAQGIERSIRSPHLMIDLNSITTYTDAHRGE 313 7
 ** * * * * *

YGNSDFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPQONLEFN--GEKVYRAVANTNLAV-WPSAVYS 417 10
 Y-----YWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQORIVAQLGQGVYRTLSSTLYRR-PFNIGIN 376 9
 Y-----YWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQORIVAQLGQGVYRTLSSTLYRR-PFNIGIN 376 4
 Y-----YWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQORIVAQLGQGVYRTLSSTLYRR-PFNIGIN 376 6
 N-----YWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAP-PVLVSLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPN 376 3
 N-----YWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAP-PVLVSLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPN 376 0
 N-----YWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAP-PVLVSLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPN 376 2
 Y-----YWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQORIVAQLGQGVYRTLSSTLYRR-PFNIGIN 376 5
 Y-----YWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQORIVAQLGQGVYRTLSSTLYRR-PFNIGIN 376 1
 Y-----YWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQORIVAQLGQGVYRTLSSTLYRR-PFNIGIN 376 8
 Y-----YWSGHQIMASPVGFSGPEFTFPLYGTMGNAAPQORIVAQLGQGVYRTLSSTLYRR-PFNIGIN 376 7
 **** * * * * *

GVTKVEF SQYNDQTDDE-ASTQTYQSKRNVCAVSWDSIDQLPPETTEEPLEKGYSHQLNYVMCFMQGSRG 486 10
 NQQLSVLDGTEFAYGT-SSNLPSAVYRKSGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 443 9
 NQQLSVLDGTEFAYGT-SSNLPSAVYRKSGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 443 4
 NQQLSVLDGTEFAYGT-SSNLPSAVYRKSGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 443 6
 NQELFVLDGTEFSFASLTTNLPSTIYRQRGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 442 3
 NQELFVLDGTEFSFASLTTNLPSTIYRQRGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 442 0
 NQELFVLDGTEFSFASLTTNLPSTIYRQRGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 442 2
 NQQLSVLDGTEFAYGT-SSNLPSAVYRKSGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 443 5
 NQQLSVLDGTEFAYGT-SSNLPSAVYRKSGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 443 1
 NQQLSVLDGTEFAYGT-SSNLPSAVYRKSGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 443 8
 NQQLSVLDGTEFAYGT-SSNLPSAVYRKSGTV--DSLDEIPQNNVPPRQGFSHRLSHVSMFRSGFSNS 443 7
 * * * * *

T-----IPVLTWTHKSVDFNMI DSKKI TQLPLVKAYKLOSGASVWAGPRFTGGDI IOCTENGSAA TI YV	551	10
SVSII RAPMFSWIHRSAEFNNI IASDSITQIPAVKGNFLFNG-SVISCOPGFTGGDLVRLNSSGNNIQNRG	512	9
SVSII RPPMFSWIHRSAEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV	513	4
<u>SVSII RAPMFSWIHRSAEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV</u>	513	6
AVYTLRAPTFSWQHRS AEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV	512	3
AVYTLRAPTFSWQHRS AEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV	512	0
AVYTLRAPTFSWQHRS AEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV	512	2
SVSII RAPMFSWIHRSAEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV	513	5
SVSII RAPMFSWIHRSAEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV	513	1
SVSII RAPMFSWIHRSAEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV	513	8
SVSII RAPMFSWIHRSAEFNNI IPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDI LRRTSPGQISTLRV	513	7
* * * * *		
TPDV-----SYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFDKTI NKGDTLTYNSFN LASFSTPFELS	616	10
YIEVPIHFPSTSTRYRVRVRYASVTP IHLNVNWN GSSIFSNTPATATSLDNLQSSDFCYFESANAFTSS	582	9
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	578	4
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	578	6
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	577	3
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	577	0
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	577	2
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	578	5
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	578	1
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	578	8
NITA-----PLSQRYRVRIRYASTTNLQFHTSIDGRPI NQGNFSATMSSGNSLQSGSFRTVGFTTFFNFS	578	7
* * * * *		
GNN--LQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFTP-----V	643	10
LGN--IV-GVRNFSGTAGVIIDRFEFIPVTATLEAEYNLERAQKAVNALFTSTNQLGLKTNVTDYHIDQV	649	9
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	648	4
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	648	6
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	647	3
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	647	0
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	647	2
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	648	5
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	648	1
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	648	8
NGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDRIEFVPAEVTFEAEYDLERAQKAVNELFTSSNQIGLKTDTVTDYHIDQV	648	7
* * * * *		
-N- 644 10		
-S- 650 9		
SN- 650 4		
SN- 650 6		
SNL 650 3		
SNL 650 0		
SNL 650 2		
SN- 650 5		
SN- 650 1		
SN- 650 8		
SN- 650 7		
Sitios conservados 176		

Figura 9. Alineamiento de CriyIA(a, b y c) y CryIIIA. Los asteriscos indican aa 100% conservados. La linea continua indica el dominio II.

Construcción de los vectores

Se diseñaron 3 oligonucleótidos (Figura 7) para que por medio de PCR se pudiera aislar el dominio II y clonarlo bajo el promotor *lac* del plásmido pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Se diseñaron dos construcciones, una que porta 17 codones adicionales en el 5' y 2 codones en el extremo 3' del gen del dominio II (pUC II). La segunda construcción difiere en el carboxilo terminal, en que porta 6 codones que codifican para his (pUC II H6) (Figura 11). La cola de his permite purificar la proteína por afinidad en una columna de agarosa Ni⁺⁺ (Janknecht *et al.*, 1991). Esto se basa en la alta afinidad que muestra las his por el níquel y que existen pocas proteínas que presenten trectos de his. Adicionalmente, para expresarlo con más eficiencia se clonó bajo el promotor *tac* en el plásmido pBTAC-2 (Boer *et al.*, 1983). Esto se realizó por subclonación de la construcción anterior (pBTAC II y pBTA II H6) (Figura 10). Por el tipo de vector utilizado, ésta construcción sólo porta 6 codones extras en el extremo 5' del gen del dominio II.

Para realizar la construcción con el dominio II-III, se diseñó un oligonucleótido que introduce los codones para la cola de his en el extremo 3' del dominio III (Figura 7). Se clonó en pUC18 y pBTAC-2 (pUC II-III H6 y pBTAC II-III H6) (Figura 10). Todas las construcciones se verificaron por

patrones de restricción (datos no mostrado) y por secuencia (Sanger, *et al.*, 1977) del fragmento de DNA clonado.

Purificación de la proteína

La cola de histidinas se usó para purificar la proteína por afinidad, en una columna de agarosa-Ni⁺⁺(Jankecht *et al.*, 1991). La purificación se realizó en condiciones desnaturizantes y se siguieron las recomendaciones del fabricante (QIAGEN).

Inmuno-detección

Para los ensayos de inmuno-detección se usaron anticuerpos anti-CryIA(b) y anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina.

Para los ensayos de unión se usó el procedimiento de Bosch (Bosch *et al.*, 1994b). Que consiste esencialmente en la unión que muestra la toxina a vesículas del intestino medio de insectos sensible. Para ello se incubó la toxina en presencia de la toxina. Se colectan las vesículas por centrifugación. Se separan las proteínas en un gel de acrilamida al 7.5% y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Se inmunodetecta la toxina por medio de anticuerpos policlonales antiCryIA(b).

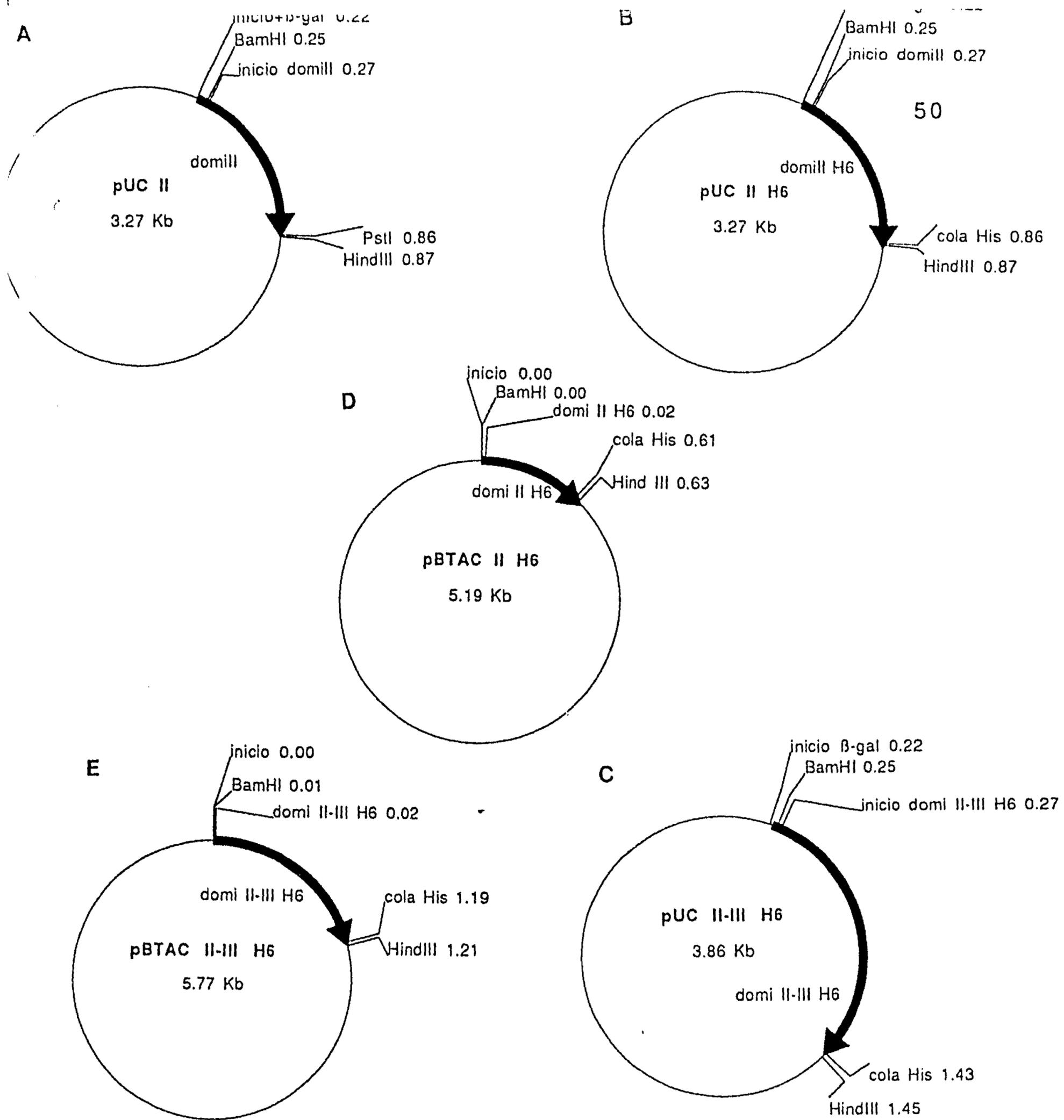


Figura 10. Contrucciones realizadas para la expresi3n del dominio II y II-III. A, pUCII. B, pUCII H6. C, pUC II-III H6. D, pBTAC II H6. E, pBTAC II-III H6.

FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Endonucleasa *EcoRI*

La mutagénesis de la posición H114 se discute en el artículo (ver página 60), pero aquí sólo quiero resaltar que ésta posición está implicada en un interruptor de la especificidad de la enzima. Esto se deriva del hecho de que algunas mutantes dan un relajamiento en la especificidad, que existen diversos reemplazos que dan enzimas activas y solo uno es inactivo. Todo esto puede excluir su posible participación en el contacto directo con el DNA y/o catálisis porque aa con propiedades totalmente diferentes dan una enzima activa.

La mutagénesis del aa 170 mostró que ésta posición participa en la especificidad (Tabla I). La actividad de la mutante glu170ala es insensible a la presencia de la metilasa, ya que al inducir su expresión, la cepa se muere. Esta mutante restringió mejor que la enzima silvestre a fago λ_{vir} metilado (casi un orden de magnitud más) y casi igual a fago no metilado (un orden de magnitud menor). La actividad de la mutante glu170gln no mostró actividad insensible a la presencia de la metilasa ya que su expresión inducida no es deletérea a la célula que portan la metilasa *EcoRI*. La restricción sobre fago λ_{vir} es menor que el de la silvestre (casi

dos ordenes de magnitud menos) y sobre λ_{vir} metilado no muestra diferencias con respecto a la silvestre.

TABLA I'

	RESTRICCION	FENOTIPO
w t fago M- fago M+	1.81×10^{-7} 0.67	silvestre
E170A fago M- fago M+	- +	estrella
E170Q fago M- fago M+	= --	silvestre

*Los resultados de está tabla son preliminares, ya que sólo se realizó una determinación. En general es necesario hacer varias determinaciones para sacar la media. Lo importante es la actividad que muestran con respecto a la presencia de la enzima metilasa *EcoRI*. Fenotipo silvestre indica que la expresión de la endonucleasa no es deletérea a la célula que la porta. Fenotipo estrella indica que la expresión de la endonucleasa es deletérea a la célula que la porta. - y + indican que la actividad de restricción se ve disminuida o aumentada casi un orden de magnitud con respecto a la enzima silvestre. -- indica que la restricción disminuyó casi dos ordenes de magnitud. = indica que la restricción es semejante a la silvestre. La enzima metilasa está en *trans*. Los experimentos se realizaron en células de *E. coli* cepa JM101.

La mutagénesis en la posición 160, para retornar el aa silvestre, también mostró que la enzima silvestre se produce en mayor cantidad que la seudosilvestre (Figura 11).

δ -endotoxina CryIA(b) berliner

El dominio II no se observó, ni bajo el promotor lac, ni con tac. La inmunodetección no detectó la proteína (Figura 12, carriles 3-6).

Cuando se trató de aislar el dominio II H6 por medio de una columna de agarosa Ni⁺⁺ se obtuvo una proteína del PM esperado (Figura 13, carriles 4-6), sin embargo, ésta no reaccionó contra los anticuerpos (datos no mostrados).

Los ensayos de unión o competencia no mostraron que el dominio se uniera a vesículas de *Trichoplusia ni* (datos no mostrados). Para tener un elemento adicional sobre la naturaleza de la proteína purificada se realizó un análisis de aa de ella. El análisis de aa reveló que la composición del supuesto dominio II H6 es diferente al esperado (Figura 14).

La construcción del dominio II-III no muestra una expresión alta ya que en geles de proteínas totales teñido con azul de coomassie, no se observa. Sin embargo se purificó una proteína del PM esperado (Figura 15). Esta proteína mostró reacción contra los anticuerpos anti-CryIA(b). Es

importante mencionar que la construcción con el promotor *lac* produce más cantidad de proteína a pesar de que este promotor es menos fuerte que el de *tac*. Para observar la influencia de la temperatura en la estabilidad de la proteína en la célula, se creció la bacteria a 30°C y 37°C. Se observó que la proteína se expresa mejor cuando la bacteria se cultiva a 37°C

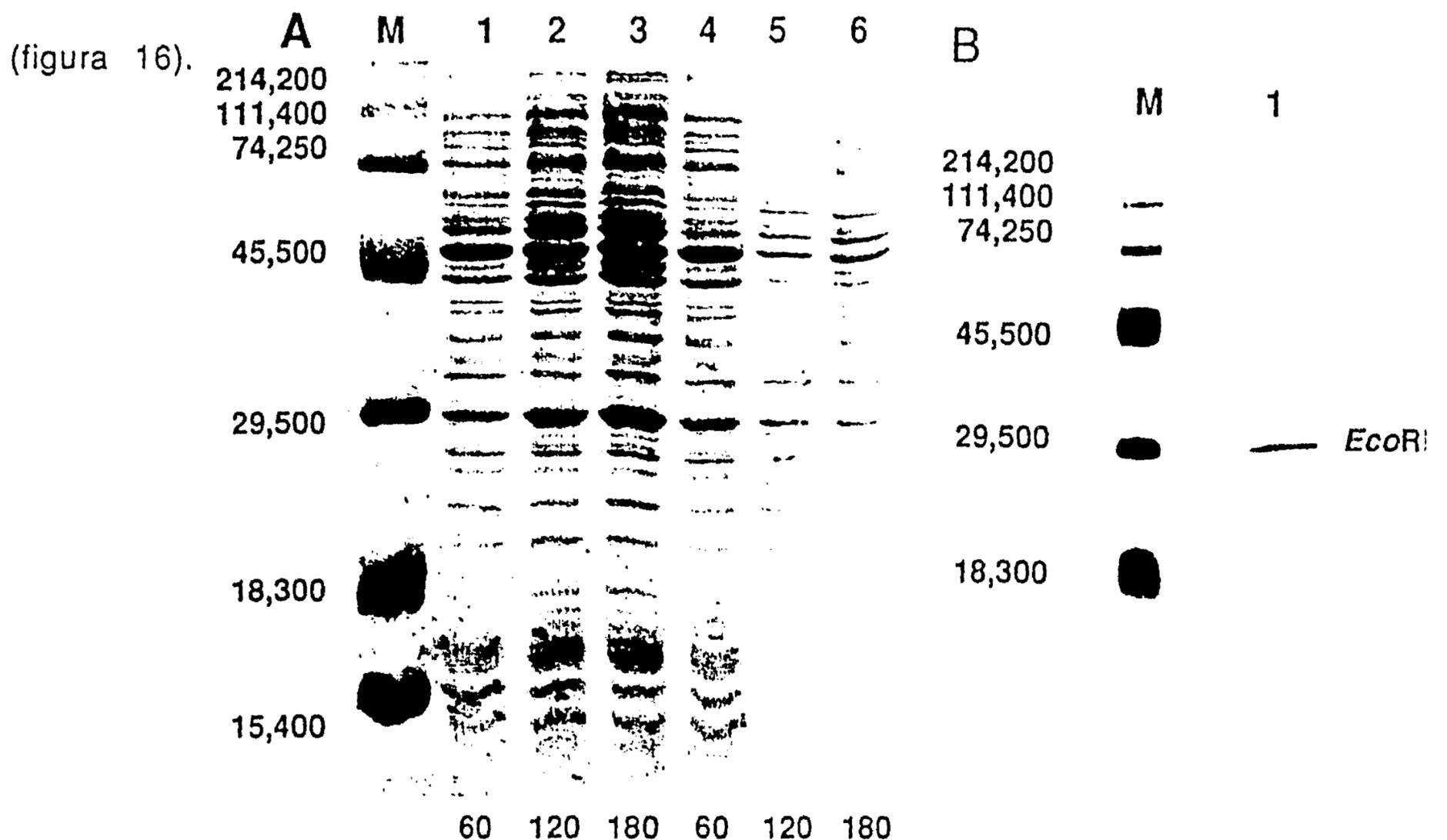


Figura 11. Gel de proteínas totales de cepas de *E. coli* JM101 que expresan la endonucleasa *EcoRI* silvestre y mutante en el aa 160. A) 1-3, enzima silvestre en el aa 160. 4-6, enzima mutante en el aa 160. B) 1, enzima purificada. M, marcadores de PM. La inducción fue en presencia de la metilasa *EcoRI* con 1 mM de IPTG cuando el cultivo tenía una $D.O_{600nm}=0.6$. Se colectaron células a los 60, 120 y 180 minutos (min) respectivamente. La banda de aproximadamente 30 kDa se ve aumentada en el caso de la proteína con el gen silvestre lo que indica que es más estable.

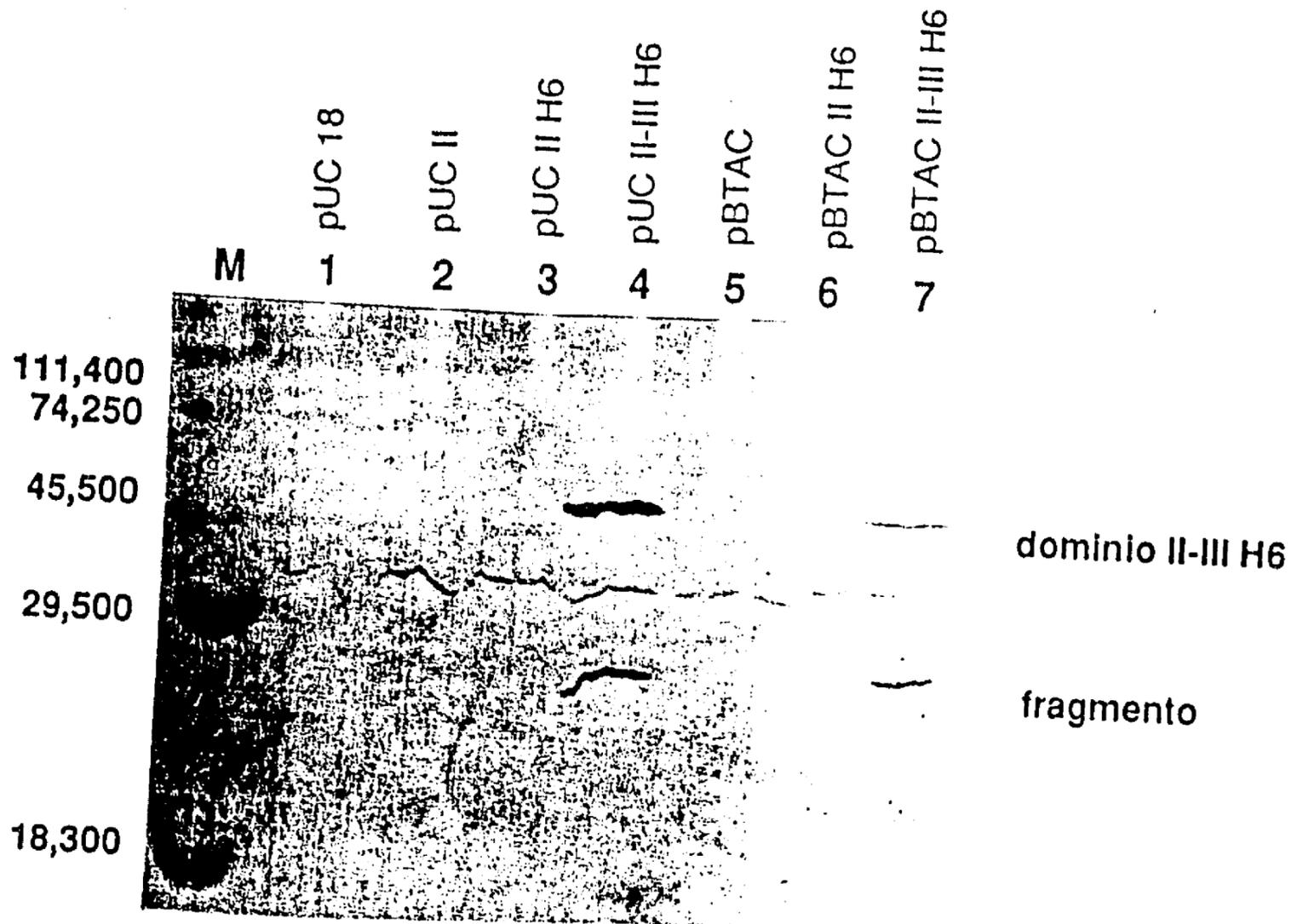


Figura 12. Inmuno detección del dominio II o dominios II-III de la δ -endotoxina CryIA(b) berliner en extractos de células de *E. coli* cepa JM101 portadoras de distintos plámidos. 1, pUC 18. 2, pUC II. 3, pUC II H6. 4, pUC II-III H6. 5, pBTAC. 6, pBTAC II H6. 7, pBTAC II-III H6. M, marcadores de peso molecular (cadena pesada de la Miosina, 214.2 kDa; fosforilasa B, 111.4 kDa; albumina de suero bovino, 74.25 kDa; ovalbumina, 45.5 kDa; anhidrasa carbónica, 29.5 kDa; β -lactoglobulina, 18.3 kDa y lisozima, 15.4 kDa). Se usó *E. coli* JM101 como cepa huésped. Para la inducción se creció a 37°C a una D.O.600 = 0.6, se le adicionó 1 mM de IPTG y se dejó creciendo durante 3 hrs. Se colectaron las células y se sonicaron en hielo. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 10% y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. Para la inmuno detección se saturó la membrana con gelatina y se usó anticuerpos policlonales contra la toxina madura. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti conejo anti IgG conjugado con fosfatasa alcalina. Para revelar se usó BCIP y NBT.

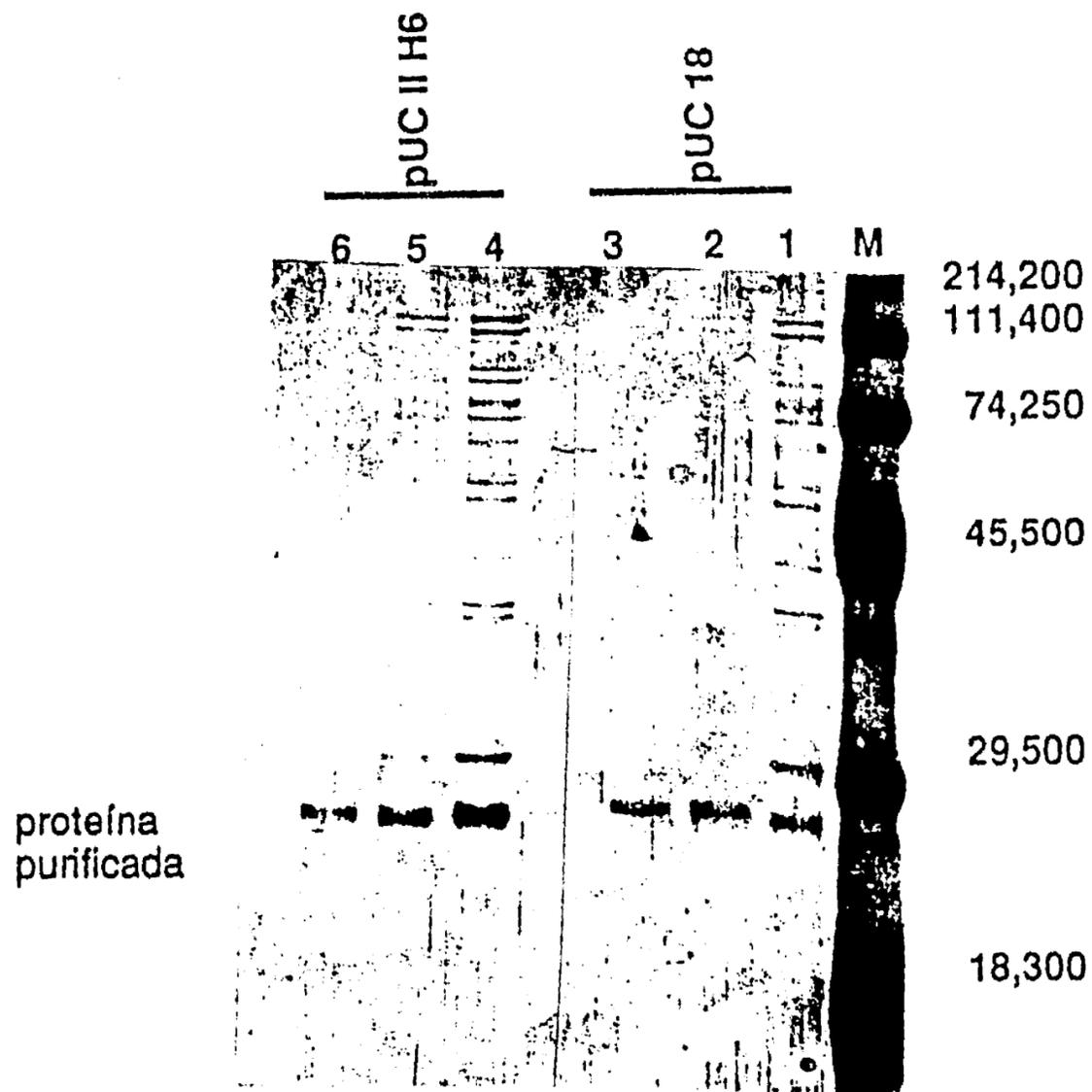


Figura 13. Gel de acrilamida de la proteína purificada por la columna de agarosa Ni⁺⁺. 1, 2 y 3 fracciones 1-3 de la cepa con el plásmido pUC18. 4, 5 y 6 fracciones 1-3 de la cepa con el plásmido pUC II H6. Las fracciones representan los 3 primeros mililitros del buffer usado para eluir la proteína. M, marcadores de peso molecular, los pesos se dan en la figura anterior. Para la purificación se creció e indujo como se menciona en la figura 12, todas las manipulaciones se realizaron a temperatura ambiente. Para la purificación se utilizó condiciones desnaturizantes. La pastilla celular de 100 ml de cultivo se resuspendió en 5 ml de buffer A (cloruro de guanidina, 6M; NaH₂PO₄, 0.1M; Tris, 0.01M, pH 8) y se dejó 1 hora en agitación continua. Se centrifugó a 10,000 g durante 15 minutos y se tomó el sobrenadante. Se le adicionó 0.5 ml de resina (equilibrada en buffer A) y se dejó en agitación continua durante 45 minutos. Se cargó en una columna de 1 cm de diámetro. Se lavó con 10 ml de buffer B (urea, 8M; NaH₂PO₄ 0.1M; Tris 0.01M, pH 8). Luego se lavó con 10 ml de buffer C (buffer B pH 6.3). Para eluir se usó 5 ml de buffer D (buffer B pH 5.9).

	#esperado	#observado	# contaminante
ala	9	16	14
cys	0	0	6
asp	7	15	19
glu	8	21	17
phe	11	7	4
gly	19	33	29
his	12	20	20
ile	15	7	3
lys	1	11	6
leu	13	16	14
met	7	4	4
asn	13	-	6
pro	15	8	5
gln	10	-	6
arg	14	4	4
ser	30	22	5
thr	13	13	5
val	11	18	25
trp	2	-	-
tyr	9	5	4

Figura 14. Análisis de aa de la proteína purificada por medio de la columna de agarosa Ni⁺⁺. #esperado, indica el contenido de aa deducido a partir de la secuencia de DNA clonado en pUC II H6. #observado, indica el contenido de aa calculado de la proteína purificada. #contaminante, indica el contenido de aa reportado para la proteína endógena de *E. coli* que se copurifica como contaminante (Wülfing *et al.*, 1994). El contenido de aa de la proteína purificada concuerda más con el de la proteína endógena de *E. coli*. El análisis de aa en HLPC lo realizó el lab del Dr. Possani del Instituto de Biotecnología/UNAM.

FALLA DE ORIGEN

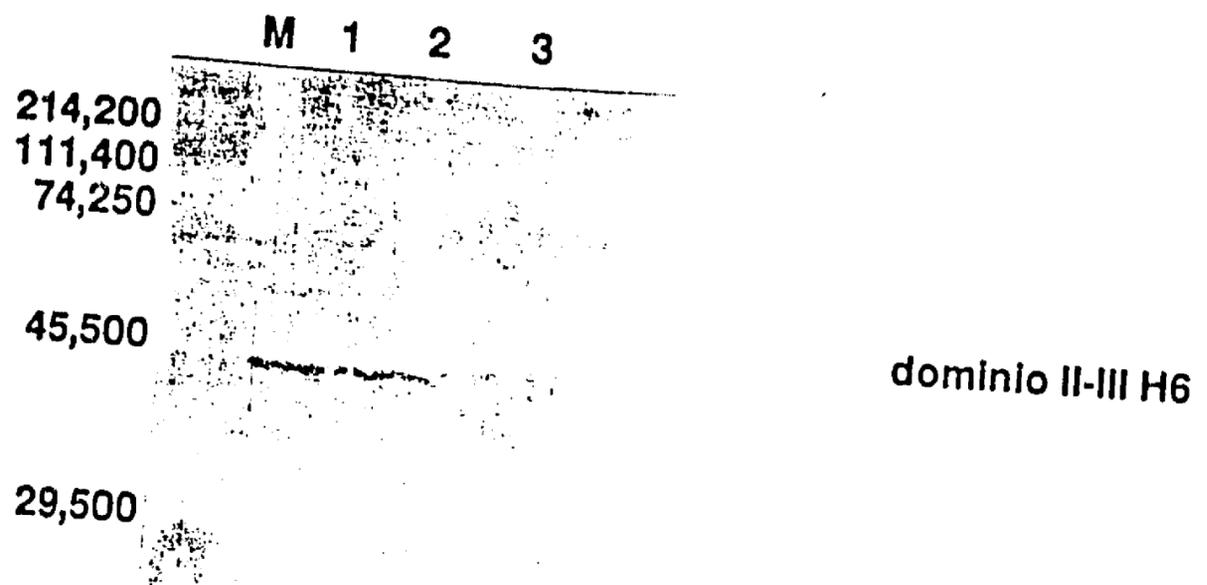


Figura 15. Inmuno detección de la proteína II-III H6 purificada por la columna de agarosa Ni⁺⁺. 1, 2 y 3, fracciones 1-3 de la columna. Las condiciones para la inmuno detección se detallan en la figura 12.

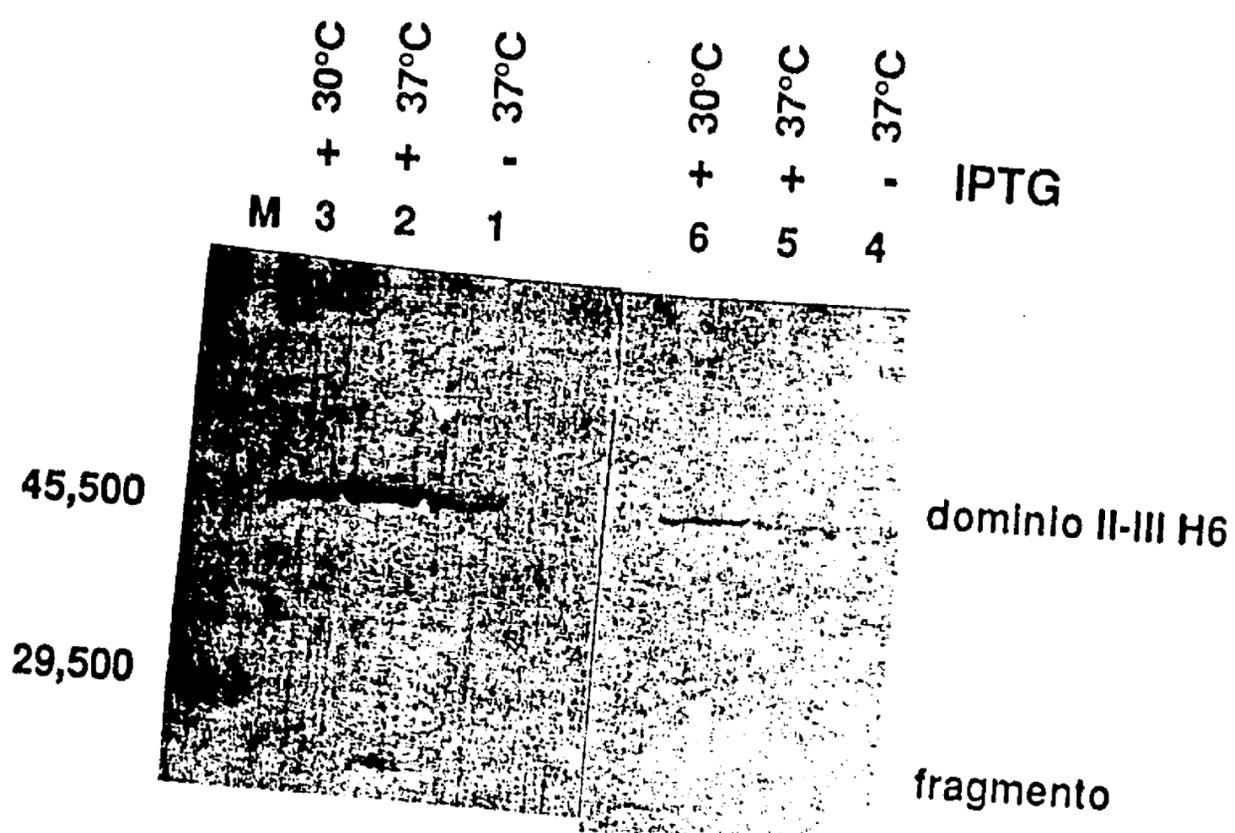


Figura 16. Inmuno detección de la proteína dominio I-II para observar su producción de la proteína a diferentes temperaturas. 1, pUC II-III H6 sin inducir a 37°C. 2, pUC II-III H6 inducido a 37°C. 3, pUC II-III H6 inducido a 30°C. 4, pBTA II-III H6 sin inducir a 37°C. 5, pBTAC II-III H6 inducido a 37°C. 6, pBTAC II-III H6 inducido a 30°C. Las condiciones de crecimiento e inducción se dan en la figura 11.

ARTICULO

GENE 08652

Saturation mutagenesis of His¹¹⁴ of *EcoRI* reveals relaxed-specificity mutants

(Protein-DNA interaction; sequence-specific DNA recognition; restriction-modification; DNA methyltransferase; restriction enzyme; restriction endonuclease; DNA cleavage; protein engineering; substrate specificity)

Humberto Flores^a, Joel Osuna^a, Joseph Heitman^b and Xavier Soberón^a

^aDepartment of Molecular Biology, Instituto de Biotecnología/UNAM, Cuernavaca, Mor. 62271, México; and ^bDepartments of Genetics and Pharmacology, and the Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Durham, NC, 27710, USA

Received by F. Barany: 8 July 1994; Revised/Accepted: 10 October/28 October 1994; Received at publishers: 25 November 1994

SUMMARY

EcoRI recognizes and cleaves DNA at GAATTC sites and is one of the best characterized sequence-specific restriction endonucleases (ENases). In previous studies, an *EcoRI* mutant, which exhibited relaxed substrate specificity and cleaved both canonical and *EcoRI* star sites, was isolated. This mutant enzyme has Tyr instead of His¹¹⁴. Here, we subjected residue 114 of the *EcoRI* ENase to saturation mutagenesis. The resulting mutant enzymes were characterized both in vivo and in vitro, resulting in the identification of mutants with canonical (H114K, Q, D, I) or relaxed (H114Y, F, S, T) specificity, as well as one mutant with severely impaired activity (H114P). In the X-ray structure of an *EcoRI*-substrate complex, His¹¹⁴ is located between the catalytic and recognition regions of *EcoRI* and may directly contact the DNA phosphate backbone. Based on our genetic and biochemical findings and the X-ray structure, we propose that His¹¹⁴ participates in substrate recognition and catalysis, either directly, via protein-DNA interactions, or indirectly, by mediating conformational changes that trigger DNA cleavage in response to substrate recognition.

INTRODUCTION

EcoRI is one of the best studied ENases (Heitman, 1992). However, despite numerous biochemical, structural and genetic studies (Rosenberg, 1991; Heitman, 1992), the mechanisms by which this enzyme recognizes its substrate have only recently begun to emerge. A

number of mechanisms of specific DNA interactions are common to both ENases and repressors, including linear diffusion along the DNA molecule (von Hippel and Berg, 1989) and recognition via hydrogen bonds and Van der Waals contacts in the DNA major groove (Seeman et al., 1976). However, it is important to stress that the mechanism of action of ENases involves not only the recognition of the target site, but also the coupling of recognition to catalysis. Genetic analysis has revealed that ENases are quite resilient to changes in specificity (Heitman and Model, 1990; Heitman, 1992). In contrast, alterations in specificity have been demonstrated for repressor-operator protein-DNA interactions (Youderian et al., 1983; 1994; Wharton and Ptashne, 1987; Pabo and Sauer, 1992).

A combination of genetic (Heitman and Model, 1990), crystallographic (Kim et al., 1990) and biochemical (Lesser et al., 1990) studies have implicated some aa in the mechanism of recognition and catalysis by the *EcoRI*. Previous genetic studies identified *EcoRI* mutants with

Correspondence to: Dr. X. Soberón, Instituto de Biotecnología/UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, México. Tel. (52-73) 114-904, ext. 273/260; Fax (52-73) 172-388; e-mail: soberon@pbr322.ceingebi.unam.mx

Abbreviations: A, absorbance (1 cm); aa, amino acid(s); bp, base pair(s); DTT, dithiothreitol; *ecoRI*, gene encoding *EcoRI*; ENase(R-), restriction endonuclease; IPTG, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; kb, kilobase(s) or 1000 bp; Km, kanamycin; LB, Luria-Bertani (medium); MTase(M-), DNA methyltransferase; N, equimolar mixture of A, T, G and C; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; PCR, polymerase chain reaction; S, equimolar mixture of G and C; wt, wild type; XGal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside.

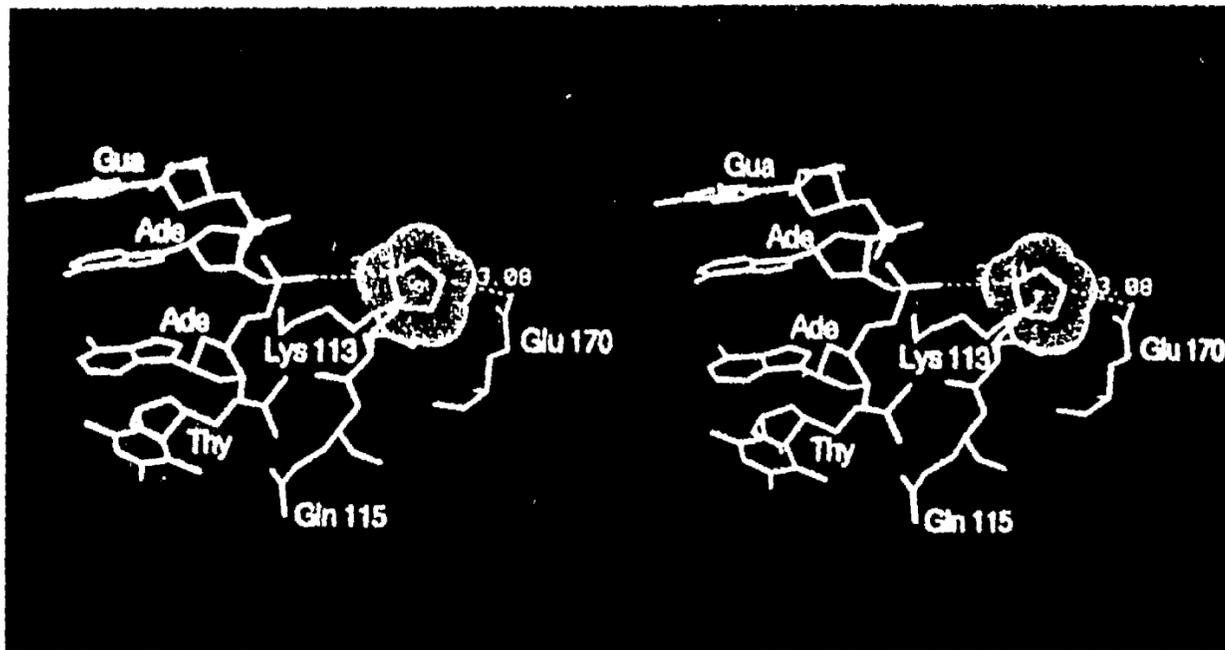


Fig. 1. Stereo drawing of the region surrounding residue His¹¹⁴ in the *EcoRI*-substrate complex. His¹¹⁴ (shown with dotted surface) lies between Lys¹¹³ and Gln¹¹⁵ in strand β 3. The phosphate at the scissile bond is indicated by a sphere. The majority of the direct hydrogen-bond protein-base interactions occur beyond the Gln¹¹⁵ side chain and would be located at the bottom of this representation. Distances are noted between the imidazole ring nitrogens and the oxygen atoms of the phosphate and the side chain of Glu¹⁷⁰ (coordinates of the *EcoRI*-DNA co-crystal structure were kindly provided by John M. Rosenberg).

relaxed substrate specificity (Heitman and Model, 1990). One of them is H114Y, with a specificity similar to that observed with the wt ENase in 'star' buffer conditions (Hsu and Berg, 1978; Gardner et al., 1982; Rosenberg and Greene, 1982; Robinson and Sligar, 1993). Inspection of the crystallographic structure of the *EcoRI*-DNA complex (Kim et al., 1990) reveals that aa¹¹⁴ does not directly contact DNA bases. Rather, His¹¹⁴ is located between a region containing an intricate set of interactions with the recognition site, the active site, and the substrate, and may hydrogen bond to one of the phosphate groups (Fig. 1) (Jeltsch et al., 1993a), leading to the proposal that this segment of *EcoRI* communicates a recognition event to the catalytic machinery (Thielking et al., 1991). Furthermore, part of the side chain of His¹¹⁴ is solvent exposed and may then mediate interactions in 'star' buffer conditions.

To further advance our understanding of how DNA recognition and catalysis might be coupled, we performed saturation mutagenesis of aa¹¹⁴. The resulting *EcoRI* ENase mutants were characterized in vivo and in vitro, revealing one null (inactive) mutant, several mutants with canonical specificity, ranging from low to more robust activities and four mutants with relaxed substrate specificity.

RESULTS AND DISCUSSION

(a) Saturation mutagenesis of *EcoRI* aa¹¹⁴

We generated a collection of mutant of *EcoRI* genes by introducing an NNS mixture at codon 114 (Fig. 2). We employed a mutant *EcoRI* (Glu¹⁶⁰ → Asp; E160D) (Kuhn

et al., 1986), that displays an activity very similar to wt, but is presumably unstable prior to dimerization so that, when produced at low levels, its activity can be tolerated by the cell in the absence of M-*EcoRI*. For simplicity, we refer here to this as the wt enzyme. The ligation mixture was transformed into *E. coli* JM101 cells and plated uninduced in the absence of IPTG. Colonies in this experiment displayed either a healthy or a flat, translucent phenotype. The latter indicates in vivo ENase activity (Osuna et al., 1991). Out of several hundred colonies scored, 76% displayed activity. In a separate transformation experiment, the mutagenized *ecoRIR* and the *ecoRIM* genes were introduced together on the same plasmid. Under these conditions, activity of the wt *R* gene present under repressing conditions does not produce a translucent phenotype. However, we identified 34% of the colonies as flat-translucent. We interpreted this result as follows: several aa replacements (66%) resulted in either a 'silent' phenotype, with little effect on the activity and specificity, or a null phenotype; a smaller proportion (34%) affords a new activity, with reduced sensitivity to the presence of methylated DNA.

Sequencing of plasmid DNA isolated from several colonies revealed various aa replacements that retained activity. Mutants H114Y, F, S and T displayed activities that were resistant to the presence of M-*EcoRI*. The H114D, Q, K and I mutant proteins were active, and still sensitive to inhibition by the M-*EcoRI*. The only inactive mutant we have sequenced is H114P (Table I). All active mutants induced an SOS response when expressed in a strain carrying the *lacZ* reporter gene fused to the *dinD* DNA-damage-inducible promoter (Table I) (Heitman and Model, 1990). Microscopic observation of cells bear-

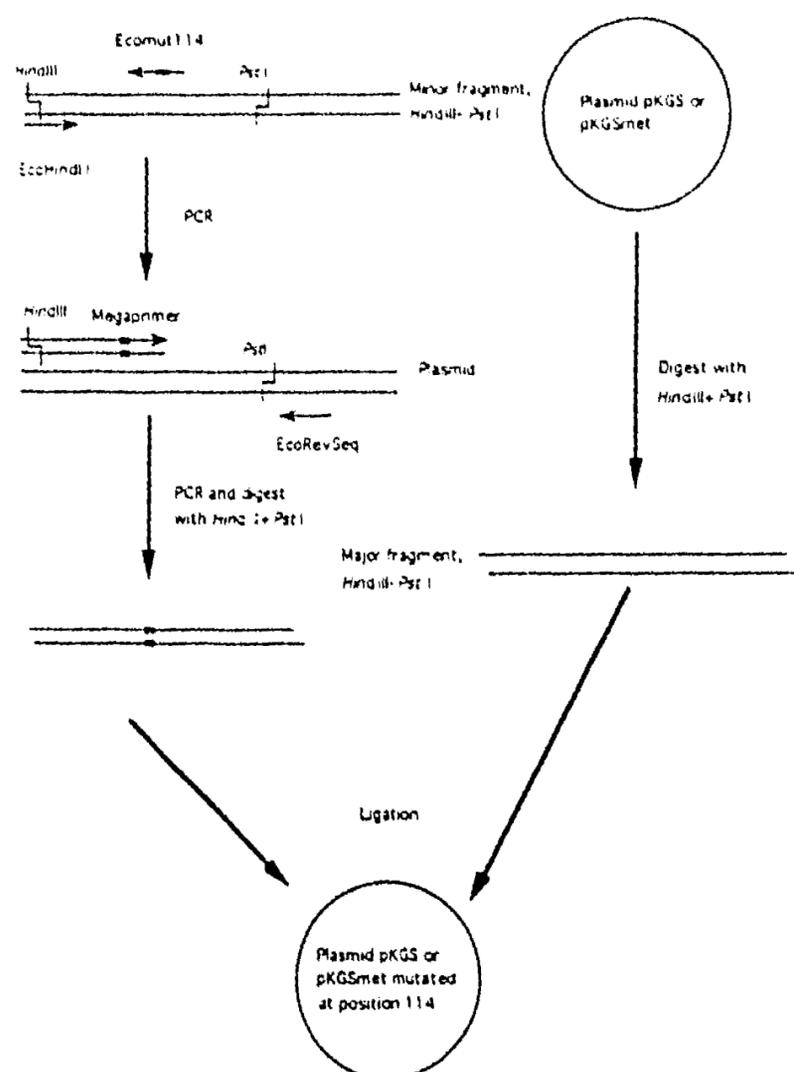


Fig. 2. Mutagenesis strategy. Short, solid lines indicate synthetic oligos used as mutagenic primers and extension primers (thickenings denote mutagenic codons, which were introduced by incorporating NNS at codon 114). **Methods:** Mutagenesis was performed by the 'megaprimer' method (Sarkar and Sommer, 1990). For the first PCR, oligo primers were 5'-CTTTACCTTGSNNITTTGGCTTCAGC (Ecomut114) and 5'-GAAATAAATGAAGCTTTAAAAAAA (EcoHindIII). For the second PCR, an oligo that hybridizes 44 bp beyond the unique *PstI* site present in the gene was used, i.e., 5'-AATG-CTTTTGTC TTTATGATTTAC (EcoRevSeq). Gel-purified oligos were provided by the Macromolecular Synthesis Facility of the Instituto de Biotecnología/UNAM. The second PCR-product was cloned as *HindIII-PstI* fragment, into either pKGS or pKGSmet, replacing the wt region as a cassette. Plasmid pKGS, which carries a full-length *ecoRIR* gene under the control of the inducible promoter *lacUV5* (a gift from P.J. Greene; Kuhn et al., 1986). Plasmid pKGSmet is a derivative of pKGS plasmid, containing the *ecoRIM* gene from pPG430 (Kuhn et al., 1986) as a *PstI* fragment, was cloned in the *PstI* site of pKGS). PCR reactions were performed for 30 cycles in the following conditions: 92°C, 1 min; 55°C, 1 min and 72°C, 3 min. Ligation mixtures from the PCR mutagenesis were electroporated (Dower et al., 1988) into *E. coli* strain JM101 ($\Delta lac-pro supE thi [F' traD36 proAB + lacI^*ZAM15]$) (Yanisch-Perron et al., 1985). The *HindIII-PstI* fragment encompassing the mutations were re-cloned in plasmids pKGS and pKGSmet and completely sequenced. JM101 colony phenotypes were assessed visually and by monitoring induction of a *dinD1::lacZ* fusion on XGal indicator medium with strain HF1 (a *dinD1::MudI* ($Ap^R lac$) derivative of JM101, obtained by P1 transduction, was used for SOS-induction assays; Heitman and Model, 1990). Colonies were grown on Luria-Bertani (medium) (LB) plates containing 25 μ g Km/ml. Inducing conditions were 1 mM IPTG.

ing the plasmid coding for mutants H114F, Y, S and T revealed a filamentous morphology, characteristic of SOS response (not shown).

We characterized all the mutants which cleave DNA to some extent despite the presence of the M-*EcoRI*. We also performed a preliminary characterization of the mutants with canonical specificity. The relaxed specificity mutants represent dissimilar departures from the wt residue: mutant H114F has a similar size and shape but, compared to His, Phe is hydrophobic and can not hydrogen-bond; mutants H114T and H114S provide hydrogen-bonding moieties, but have smaller side chains. The previously described H114Y *EcoRI* ENase mutant (Heitman and Model, 1990) was re-isolated in our screen and was also characterized.

It is striking that some of the canonical specificity mutants, specially H114I and H114D, displayed clear *in vivo* activity, despite a significant change in the nature of their side chains, as compared to the wt His.

(b) *In vivo* restriction activity

We also tested *in vivo* ENase activity of these *EcoRI* mutants, we tested their efficiency to restrict unmethylated and *EcoRI*-methylated bacteriophage λ vir. As shown in Fig. 3, the H114T mutant differs in activity, with respect to the H114Y, H114F and H114S mutants. The H114T mutant restricts unmethylated λ vir phage at a level comparable to wt *EcoRI*, but it is also slightly active against M-*EcoRI*-methylated λ phage. In comparison, the H114F, H114Y and H114S mutant enzymes are less active against unmethylated λ phage, but are significantly more active against M-*EcoRI*-methylated λ phage when compared to either wt *EcoRI* or the H114T mutant. This indicates spontaneous 'star' activity *in vivo*. Mutants H114I and H114D show diminished, but significant activity against unmethylated phage. They do not show any difference in restriction activity against methylated DNA when compared with the wt (not shown). To test if higher levels of restriction reflected an unhealthy state of the cells, incompatible with phage growth, we tested the susceptibility of cells bearing wt and mutant ENase genes to infection with the RNA phage R17. All cells were slightly less susceptible to infection, and the differences between them were orders of magnitude less pronounced than those observed with DNA phage (not shown).

(c) Purification and *in vitro* activity of mutant *EcoRI* proteins

To better characterize their enzymatic activities, mutant ENases were purified by phosphocellulose and hydroxyapatite chromatography as previously described (Cheng et al., 1984). Fig. 4 shows time courses of the cleavage pattern displayed by the purified mutant pro-

TABLE I
Mutants isolated by colony phenotype^a

	ALLELE ^b	Colony appearance ^c				SOS induction ^d				Phenotype
		Repressed		Induced		Repressed		Induced		
		M ⁻	M ⁺	M ⁻	M ⁺	M ⁻	M ⁺	M ⁻	M ⁺	
1.	H114	+	++++	-	++++	DB	LB	-	MB	wt
2.	H114T	n.d.	+++	n.d.	-	ND	DB	n.d.	-	Star
3.	H114Y	+	+++	-	-	DB	DB	-	-	Star
4.	H114F	n.d.	+++	n.d.	-	ND	DB	n.d.	-	Star
5.	H114S	n.d.	+++	n.d.	-	ND	DB	n.d.	-	Star
6.	H114I	++	++++	-	++++	MB	LB	-	MB	wt
7.	H114K	+	++++	-	++++	DB	LB	-	LB	wt
8.	H114Q	+	++++	-	++++	DB	LB	-	LB	wt
9.	H114D	+	++++	-	++++	DB	LB	-	LB	wt
10.	H114P	++++	n.d.	++++	n.d.	W	n.d.	W	n.d.	Null

^a M⁺ and M⁻ designations indicate the presence (+) or absence (-) of the *ecoRIM* gene, expressed from the same plasmid as the *ecoRIR* or pJC1 (Heitman and Model, 1990).

^b Designations for mutant ENases are the original aa, the residue number and the aa present in the mutant. Lines 1-6: *ecoRIM* gene present in *cis*. Lines 7-10: *ecoRIM* gene present in *trans*.

^c + + + + +, normal appearing colony; + + +, lower density of colonies but no decrease in colony size; +, reduced size and visibly translucent colonies; -, no growth; n.d., not determined.

^d SOS phenotypes were scored as dark blue (DB), medium blue (MB), light blue (LB) and white (W) on medium with 30 µg XGal/ml and 25 µg Km ml. n.d., not determined.

teins with double-stranded λ phage and pBR322 plasmid DNA. In all cases, the five known canonical *EcoRI* sites in λ phage are rapidly cleaved (Fig. 4A and C), with slower hydrolysis of secondary, non-canonical sites (Fig. 4B and D). In normal buffer conditions (Fig. 4E), pBR322 is readily cleaved at the canonical site by all mutants. The partial digests displayed by the mutants, as well as double digestions (not shown) are consistent with cleavage at the primary star sites of this plasmid (Gardner et al., 1982). Star conditions (Fig. 4F) also reveal a pattern very similar to that produced by the wt ENase and the previously described H114Y (Heitman and Model, 1990). This is an indication that the 'star' activity is not due to the presence of the distant, E160D, mutation. We note that the two mutants with aromatic aa (H114Y and H114F) exhibit higher activity for the secondary sites, in comparison to H114T and H114S. The specific activities of these mutant enzymes were determined semiquantitatively by monitoring the time course of digestion of a synthetic DNA fragment containing a canonical GAATTC *EcoRI* site (Fig. 5). No cleavage was observed in control reactions without enzyme (not shown). We find that canonical activity is higher in the H114S and H114T mutants and lower in the H114Y and H114F mutants, but is reduced in all of the mutants tested.

(d) Conclusions

It has been known for two decades that the *EcoRI* ENase cleaves sites that differ by one bp from the canoni-

cal recognition sequence (Hsu and Berg, 1978; Gardner et al., 1982; Rosenberg and Greene, 1982; Robinson and Sligar, 1993) under suitable conditions (high protein concentration, basic pH, presence of glycerol, Mn²⁺ as cofactor). This phenomenon is called *EcoRI* 'star' (or *EcoRI**) activity. The fact that *EcoRI* mutant proteins can be found which display similar 'star' activity under canonical buffer conditions (Heitman and Model, 1990; this work) suggests that there are elements of specificity that can be manipulated and whose study may shed light on the mechanism of action of the *EcoRI* ENase. The relaxed substrate specificity of the His¹¹⁴ *EcoRI* mutants is particularly interesting because this aa is located between two aa that have been directly implicated in *EcoRI* substrate recognition and catalysis. Lys¹¹³ has been postulated to be part of the catalytic machinery (Selent et al., 1992); Gln¹¹⁵, which hydrogen-bonds with the recognition network, has been shown to affect both specificity and catalytic activity, leading to the suggestion that it participates in communication between the substrate binding site and the active site in the enzyme-substrate complex (Jeltsch et al., 1993a). It is also noteworthy that the phosphate group near His¹¹⁴ has been postulated to participate in substrate-assisted catalysis (Jeltsch et al., 1992; 1993b). Additional information is provided by the report that H114N substitution reduces DNA cleavage activity by 160-fold (mainly due to a decrease in K_{cat}), but does not alter substrate specificity (Selent et al., 1992).

From the properties of the His¹¹⁴ mutant proteins, we

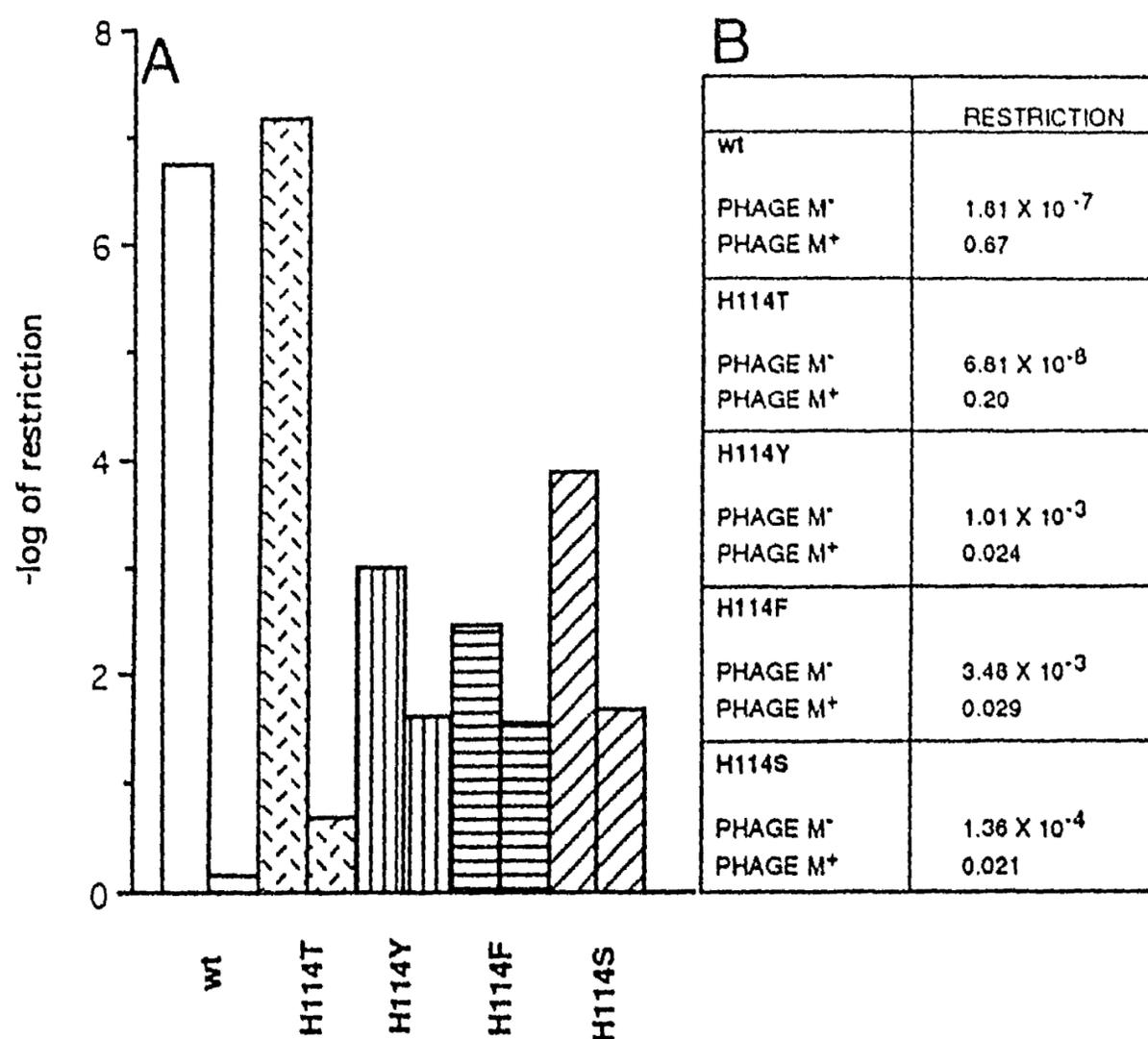


Fig. 3. Restriction of infection by methylated and unmethylated bacteriophage λ vir by wt and mutant *EcoRI*. The ability of mutant and wt ENases to restrict phage was assessed by measuring the titer of λ vir phage on strain JM101, and comparing it with the titer of phage on strain JM101 expressing the *R* genes. Restriction values, shown in panel B, are an average of three measurements and were calculated as follows: An appropriate dilution of phage was determined at which individual plaques could be counted within the spot containing phage. The number of plaques, divided by the dilution, was then obtained for each plasmid-bearing strain and divided by the value obtained with the plasmid-free strain. Methods: Restriction was determined quantitatively by spotting portions of serially diluted phage stocks on a lawn of bacteria harboring either no plasmid, or plasmid pKGSmet bearing the wt or mutant *ecoRI* genes. Strains were grown on LB-plates with 25 μ g Km/ml and 0.05 mM IPTG to partially induce the *lacUV5*-regulated *ecoRI* gene. Methylated λ vir DNA was obtained by growing the phage on a strain harboring the *ecoRI*M gene.

can not distinguish a clear pattern in the relationship between the level of activity, the relaxation of specificity and the sequence of the mutants. Although aa with hydrogen-bonding capacity are over-represented in the active mutants obtained, this property is not required to exhibit either relaxed or canonical specificity, as evidenced by the Phe and the Ile replacements, respectively. The residual activity of the Asp mutant is hard to understand in the vicinity of the phosphate group. Also noteworthy is the fact that mutant H114T is slightly more active at in vivo restriction than the wt enzyme, perhaps because of the added relaxed specificity. On the other hand, the in vitro activity against an oligo bearing a canonical *EcoRI* site is reduced in all of the H114X mutants tested. All mutants produce qualitatively similar patterns of digestion with two substrates, which are also similar to wt 'star' activity. This probably indicates that relaxation of specificity follows a similar order of preference in all cases.

At this point, we can envision three possible explana-

tions for our findings. First, our results could be interpreted according to the notion of a set of subtle interactions that allosterically couple recognition and catalysis. In this model, the mutations, as well as 'star' buffer conditions, are able to partially uncouple allosteric activation. Alternatively, His¹¹⁴ may directly participate in substrate recognition, or catalysis, or both. The His¹¹⁴ is positioned appropriately for such a role in the catalytically competent conformation. However, the diversity of replacements which retain activity, and the lack of conservation of this position in ENases with structurally similar active sites [*Bam*HI (Newman et al., 1994); *Eco*RV (Winkler, 1992); *Pvu*II (Athanasiadis et al., 1994)], as well as in ENases postulated to share this catalytic motif [*Mun*I (Siksnys et al., 1994); *Hha*II, *Pst*I and *Ngo*PII (Anderson, 1993) and *Fok*I (Waugh and Sauer, 1993)], argue against a role in catalysis. By this argument, His¹¹⁴ may fulfill an *EcoRI*-specific role, such as substrate recognition. Finally, aa¹¹⁴ may position critical residues in its vicinity (see Fig. 1). The catalytically-competent conformation

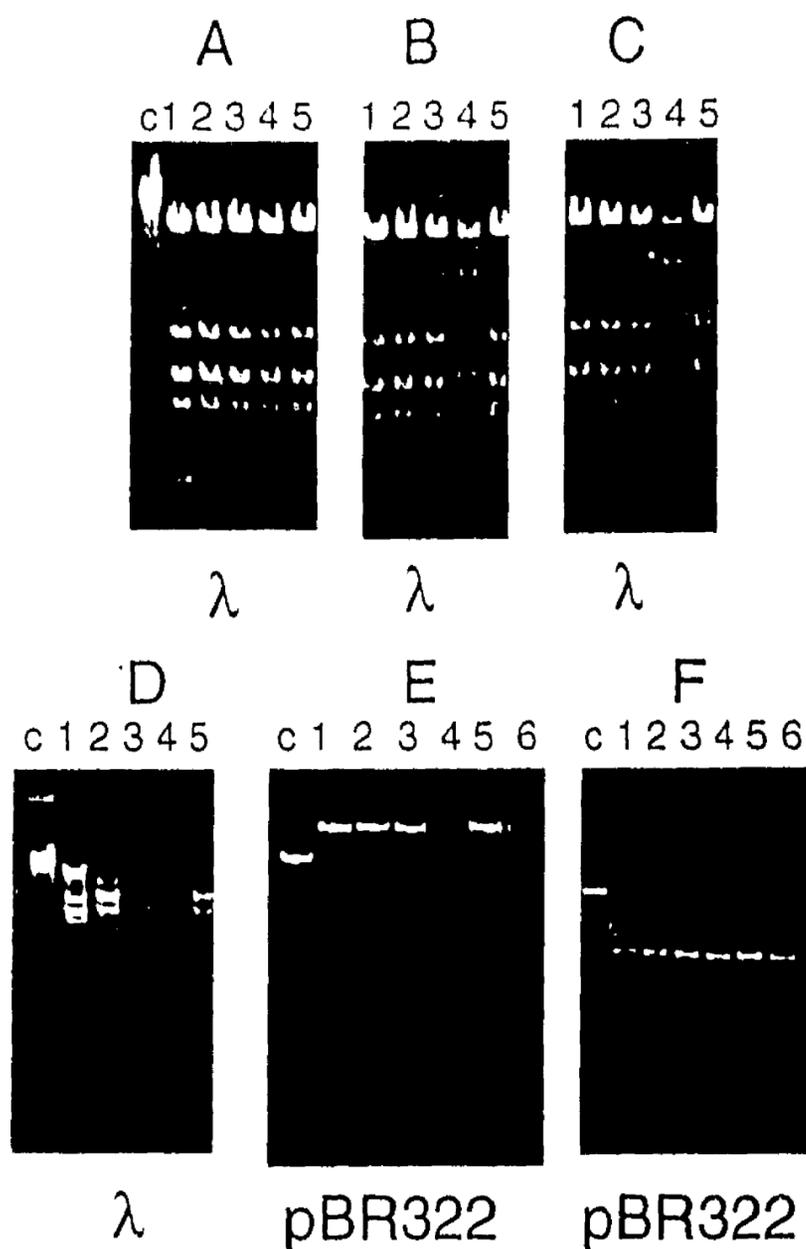


Fig. 4. Restriction digests of λ and pBR322 DNA with mutant or wt *EcoRI*. Panels A-D, λ DNA. Panels E and F, pBR322 DNA. Panels A-E, normal buffer. Panel F, star buffer. Panel A, 30 min; panel B, 60 min; panel C, 150 min and panels D-F, 16 h. Lanes C, undigested; lanes E, wt, 2, H114T; 3, H114Y; 4, H114F; 5, H114S. 6, mutant H114Y from (Heitman and Model, 1990). Methods: Reactions contained 0.01 pmol (dimeric) wt or mutant *EcoRI* proteins and 2.5 μ g λ or 1 μ g pBR322 DNA in 50 μ l of buffer N (50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl₂/100 mM NaCl 1 mM DTT) at 37 °C. Samples were withdrawn from reaction tubes at the indicated times, terminated by heating at 65 °C for 10 min, analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and stained with ethidium bromide. Star buffer conditions were: 25 mM Tris-HCl, pH 8.5 2 mM MgCl₂ 5% glycerol (from the enzyme storage buffer).

would, in this case, require mainly Van der Waals interactions that could be fulfilled, to varying extents, by a diversity of side chains.

Further characterization of these mutants by biochemical, molecular modeling, and X-ray crystallographic analyses, should further our understanding of the molecular interactions that underlie *EcoRI* substrate recognition and catalysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge María Elena Munguía for her technical assistance, María Elena Cárdenas for assis-

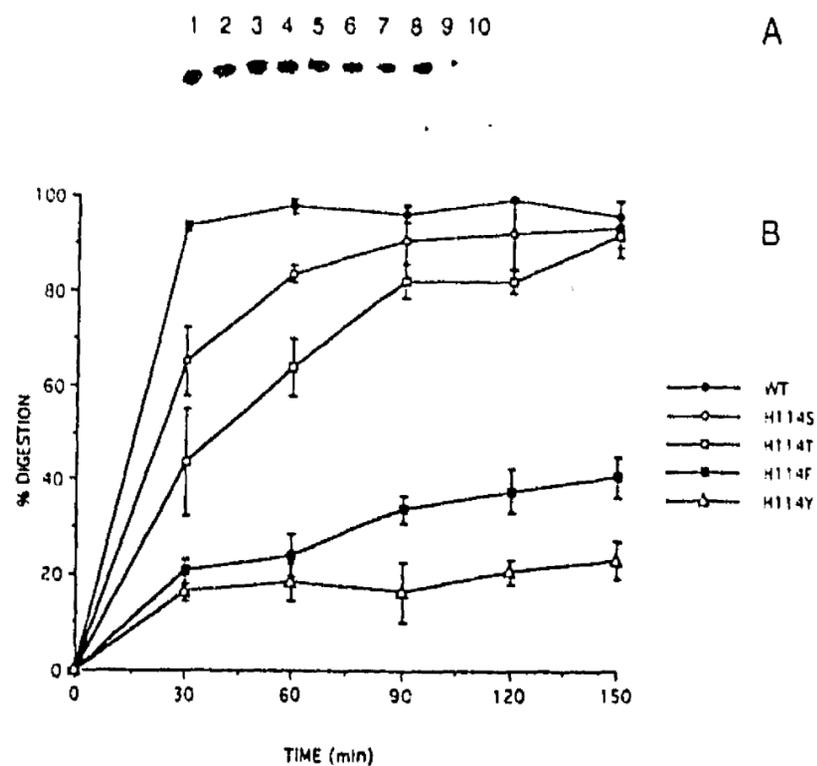


Fig. 5. Cleavage of double-stranded oligo by wt or mutant *EcoRI* ENases. Panel A shows representative time courses for DNA cleavage by H114F and H114S. Lanes 1-5, H114F and lanes 6-10, H114S (30, 60, 90, 120 and 150 min, respectively). Panel B shows the time-course of cleavage by wt and mutant enzymes. Values plotted are for the average of three independent experiments. Methods: The oligos 5'-TCGCAGAATTCTGCCGG and 5'-TCCGGCAGAATTCTGCCG (Lesser et al., 1990) were gel-purified and their 5' termini phosphorylated using T4 polynucleotide kinase and 10 μ Ci [γ -³²P]ATP. An equimolar mixture of the complementary strands was annealed by heating at 65 °C for 5 min and slowly cooled to room temperature. Reactions contained 10 pmol double-stranded oligonucleotide and 0.01 pmol ENase in buffer N and incubated at room temperature. Samples were removed at indicated times and the reactions stopped by the addition of formamide and heating to 65 °C for 10 min. Cleavage was quantified, after gel electrophoresis, using a PhosphorImager apparatus (Molecular Dynamics).

tance in *EcoRI* purification, Paul Gaytán and Eugenio López for oligo synthesis, and Alma Tremari for secretarial help. This work was supported in part by grant # IN206391, from PAPIID, DGAPA/UNAM to X.S. Support from CONACyT, México, to X.S. and H.F. is also acknowledged. J.H. is an investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

REFERENCES

- Anderson, J.: Restriction endonucleases and modification methylases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 (1993) 24-30.
- Athanasiadis, A., Vlassi, M., Kotsifaki, D., Tucker, P.A., Wilson, K.S. and Kokkinidis, M.: Crystal structure of *PvuII* endonuclease reveals extensive structural homologies to *EcoRV*. *Nature Struct. Biol.* 1 (1994) 469-475.
- Cheng, S.-C., Kim, R., King, K., Kim, S.-H. and Modrich, P.: Isolation of gram quantities of *EcoRI* restriction and modification enzymes from an overproducing strain. *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 11571-11575.

- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale.: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 6127-6129.
- Gardner, R.C., Howarth, A.J., Messing, J. and Shepherd, R.J.: Cloning and sequencing of restriction fragments generated by *EcoRI*. *DNA* 1 (1982) 109-115.
- Heitman, J.: How the *EcoRI* endonuclease recognizes and cleaves DNA. *BioEssays* 14 (1992) 445-454.
- Heitman, J. and Model, P.: Mutants of the *EcoRI* endonuclease with promiscuous substrate specificity implicate residues involved in substrate recognition. *EMBO J.* 9 (1990) 3369-3378.
- Hsu, M.-T. and Berg, P.: Altering the specificity of restriction endonucleases: Effect of replacing Mg^{2+} with Mn^{2+} . *Biochemistry* 17 (1978) 131-138.
- Jeltsch, A., Alves, J., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Maass, G. and Pingoud, A.: Mutational analysis of the function of Gln115 in the *EcoRI* restriction endonuclease, a critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence-GAATTC-and for coupling specific DNA binding to catalysis. *J. Mol. Biol.* 229 (1993a) 221-234.
- Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H., Maass, G. and Pingoud, A.: Substrate-assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993b) 8499-8503.
- Jeltsch, A., Alves, J., Maass, G. and Pingoud, A.: On the catalytic mechanism of *EcoRI* and *EcoRV*-A detailed proposal based on biochemical results, structural data and molecular modelling. *FEBS Lett.* 304 (1992) 4-8.
- Kim, Y., Grable, J.C., Love, R., Greene, P.J. and Rosenberg, J.M.: Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: A revised protein chain tracing. *Science* 249 (1990) 1307-1309.
- Kuhn, L., Stephenson, F.H., Boyer, H.W. and Greene, P.J.: Positive-selection vectors utilizing lethality of the *EcoRI* endonuclease. *Gene* 44 (1986) 253-263.
- Lesser, D.R., Kurpiewski, M.R. and Jen-Jacobson, L.: The energetic basis of specificity in the *EcoRI* endonuclease-DNA interaction. *Science* 250 (1990) 776-786.
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L., Schildkraut, I., and Aggarwal, A.: Structure of restriction endonuclease *BamHI* and its relationship to *EcoRI*. *Nature* 368 (1994) 660-664.
- Osuna, J., Flores, H. and Soberón, X.: Combinatorial mutagenesis of three major groove-contacting residues of *EcoRI*: single and double amino acid replacements retaining methyltransferase-sensitive activities. *Gene* 106 (1991) 7-12.
- Pabo, C.O. and Sauer, R.T.: Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61 (1992) 1053-1095.
- Robinson, C.R. and Sligar, S.G.: Molecular recognition mediated by bound water. *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 302-306.
- Rosenberg, J.M.: Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1 (1991) 104-113.
- Rosenberg, J.M. and Greene, P.: *EcoRI* specificity and hydrogen bonding. *DNA* 1 (1982) 117-124.
- Sarkar, G. and Sommer, S.: The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 8 (1990) 404-407.
- Seeman, N.C., Rosenberg, J.M. and Rich, A.: Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 804-808.
- Selent, U., Rüter, T., Köhler, E., Liedtke, M., Thielking, V., Alves, J., Oelgeschläger, T., Wolfes, H., Peters, F. and Pingoud, A.: A site-directed mutagenesis study to identify amino acid residues involved in the catalytic function of the restriction endonuclease *EcoRV*. *Biochemistry* 31 (1992) 4808-4815.
- Siksnys, V., Zareckaja, N., Vaisvila, R., Timinskas, A., Stakenas, P., Butkus, V. and Janulaitis, A.: CAAATTG-specific restriction-modification *munI* genes from *Mycoplasma*: sequence similarities between R-*MunI* and R-*EcoRI*. *Gene* 142 (1994) 1-8.
- Thielking, V., Selent, U., Köhler, E., Wolfes, H., Pieper, U., Geiger, R., Urbanke, C., Winkler, F.K. and Pingoud, A.: Site-directed mutagenesis studies with *EcoRV* restriction endonuclease to identify regions involved in recognition and catalysis. *Biochemistry* 30 (1991) 6416-6422.
- von Hippel, P.H. and Berg, O.G.: Facilitated target location in biological systems. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 675-678.
- Waugh, D. and Sauer, R.: Single amino acid substitutions uncouple the DNA binding and strand scission activities of *FokI* endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 9596-9600.
- Wharton, R.P. and Ptashne, M.: A new-specificity mutant of λ 34 repressor that defines an amino acid-base pair contact. *Nature* 326 (1987) 888-891.
- Winkler, F.: Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992) 93-99.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 (1985) 103-119.
- Youderian, P. and Arvidson, D.N.: Direct recognition of the *trp* operator by the *trp* holorepressor - a review. *Gene* 150 (1994) 1-8.
- Youderian, P., Vershon, A., Bouvier, S., Sauer, R.T. and Susskind, M.M.: Changing the DNA-binding specificity of a repressor. *Cell* 35 (1983) 777-783.

DISCUSION

EcoRI

El banco de mutantes en la posición his114 de la endonucleasa *EcoRI* muestra que la mayoría de los reemplazos en ésta zona generan enzimas con actividad catalítica detectable *in vivo* (Tabla I del artículo). Estas mutantes inducen la respuesta SOS. La respuesta SOS consiste en la activación de la transcripción de aproximadamente 20 genes, que están involucrados en la reparación del DNA. Esta respuesta se induce por varios factores, como son la presencia de cadena sencilla y corte del DNA entre otros. La activación de la respuesta SOS es un buen indicador de que las enzimas son expresadas y están cortando DNA. La secuenciación de mutantes que no inducen la respuesta SOS (10 mutantes), mostró que todas presentaban pro en ésta posición. Una hipótesis que resultaba interesante era que podría existir un relevo de protones entre el oxígeno 3', his144 y glu170. Esto ayudaría a la activación de la molécula de H₂O, pero la diversidad de reemplazos que conservan la actividad de la enzima la descarta. La diversidad de reemplazos activos sugiere que his114 no está involucrada directamente en el mecanismo catalítico. Además se puede inferir que la flexibilidad de ésta zona es importante para la función de la enzima, ya que el único reemplazo inactivo es pro que es un aa que quita

flexibilidad en la zona donde se encuentra. Una posible alternativa al efecto de pro en esta posición es que exista un impedimento estérico. En la estructura cristalina del complejo de la endonucleasa con su DNA blanco se observa que esta posición se encuentra cercana al esqueleto del DNA. Así, pro puede estar bloqueando la unión. El ensayo *in vivo* es sensible y permite detectar la existencia de mutantes con actividad residual. El mecanismo de acción de las mutaciones en la posición 114 es difícil de racionalizar por la diversidad de aa que conservan la actividad de la enzima (his114thr, tyr, phe, ser, ile, lys, gln, asp). Con respecto a la actividad estrella, también se observa que no existe un patrón claro que correlacione la actividad con la naturaleza del aa. La actividad sobre sustrato sintético muestra que existen dos grupos; el primero corresponde a mutantes con una actividad semejante a la silvestre (ser y thr) y el segundo con una actividad reducida (phe y tyr).

En la estructura del complejo DNA-*EcoRI* en ausencia de Mg^{++} , se observa que his114 puede estar formando un puente de hidrógeno con el oxígeno no esterificado del fosfato 3' al enlace que es hidrolizado (Figura 1 del artículo). Se ha propuesto que éste oxígeno juega un papel importante en el mecanismo catalítico de la enzima (catálisis asistida por el sustrato) (Jeltsch *et al.*, 1992). El papel asignado es el de activar la molécula de H_2O

que participa en la catálisis. Una evidencia adicional es que en la estructura del complejo DNA-*EcoRI*-Mn⁺⁺, se observa que éste aa se aleja del oxígeno y se acerca al aa 170(glu) pudiendo entonces formar un puente salino con éste. Una posible explicación es que his114 funcione como un interruptor de la especificidad. Es decir, parte de un interruptor que impide la formación del sitio catalítico a menos que se formen los contactos específicos. La maquinaria catalítica se encuentra apagada por la interacción entre el aa 114 y el oxígeno y sólo cuando está unida al sitio específico se libera. Para tratar de sustentar ésta propuesta, se mutó el aa 170(glu) que, según nuestro modelo, forma parte de éste interruptor. La mutante glu170ala mostró una actividad insensible a la presencia de la metilasa *EcoRI* y la mutante glu170gln mostró una actividad sensible a la metilasa *EcoRI*. Esto demuestra que este aa también participa en la especificidad de la enzima. Podemos interpretar que gln170 puede aun formar el puente de hidrógeno con his114 y por esto no tiene alterada la especificidad, mientras que ala170 no lo puede hacer. La existencia de residuos importantes para la especificidad que no están contactando a las bases del sitio de reconocimiento, apoyan la existencia de mecanismos adicionales que están operando en el reconocimiento específico. Este mecanismo implica el prendido y apagado de la maquinaria

catalítica y que este es dependiente de la unión específica. Se puede postular un mecanismo alostérico en la actividad de la enzima, es decir, el reconocimiento guía a la enzima a su estado activo. Al comparar la estructura de los complejos de la endonucleasa con su DNA blanco en ausencia y presencia de Mn^{++} , se observa que el sitio catalítico se forma cuando se une el cofactor. La actividad de restricción sobre fago λ_{vir} mostró que las mutantes estrella restringen al fago metilado, lo que es un indicativo de su actividad *in vivo*. Es interesante hacer notar que las mutantes con más actividad estrella, muestran menor actividad sobre fago no metilado. Al parecer la actividad estrella se gana a expensas de la actividad canónica. Sobresale la mutante his114thr que muestra un mayor grado de restricción sobre fago no metilado que la silvestre. Esto se puede explicar, ya que esta mutante está cortando tanto sobre el sitio canónico, como sobre los sitios estrella. Esta mutante corta casi igual que la silvestre DNA sintético y tiene actividad estrella, lo que puede explicar este comportamiento. Todo esto apoya nuestra hipótesis sobre la existencia de un acoplamiento entre la especificidad y la catálisis.

Por último la mutagénesis sobre el residuo asp160glu, dio como resultado que la proteína se exprese mejor. En un gel de proteínas se puede ver la banda que corresponde al tamaño esperado, mientras que la seudosilvestre

no se logra detectar. El residuo mutado se encuentra expuesto al solvente por lo que la mutación al parecer la hace menos estable y se degrada más fácilmente.

δ -endotoxina

Los resultados con el dominio II de la δ -endotoxina CryIA(b), indican problemas de estabilidad o expresión. El fragmento no se logra detectar ni en gel de proteínas teñido con azul de coomassie ni con anticuerpos policlonales contra la toxina. Una evidencia adicional es que no se logra purificar por afinidad en condiciones desnaturalizantes. Este tipo de purificación se ha usado con otras proteínas en nuestro laboratorio y ha dado buenos resultados. La proteína que se observó en la purificación, probablemente, es una contaminante endógena de *E. coli*. (Wülfing *et al.*, 1994). Esto es consistente con que en la cepa con el plásmido sin inserto observamos también esta proteína (Figura 13, carriles 1-3), los anticuerpos no reaccionan contra ella y el análisis de aa no corresponde al de la toxina. Hay que mencionar, sin embargo, que en el artículo sobre ésta proteína contaminante se reporta su secuencia y ésta no concuerda con el análisis preliminar de aa realizado sobre la proteína purificada en éste trabajo (Figura 14). En la mayoría de los casos el contenido de aa

concuenda con el de la proteína endógena de *E. coli*. Las diferencias se pueden deber a que exista polimorfismo de esta proteína. El número de aa de la proteína endógena de *E. coli* es de 196 aa, mientras que el dominio II consta de ≈ 219 aa, por lo que es difícil saber si se produce un poco y no es reconocido por los anticuerpos utilizados.

La construcción donde se tiene el dominio II-III sí se pudo detectar con anticuerpos; sin embargo no se observa una banda conspícua en un gel de proteínas totales teñido con azul de coomassie. Con los anticuerpos se observa un producto de degradación de ≈ 25 kDa, que puede corresponder al dominio III (Figura 12, carriles 4 y 7). Se puede proponer que el dominio II es poco estable y es necesario el dominio III para disminuir este problema. Existen evidencias reportadas de que cuando se va deletando de manera secuencial a la toxina, hay una zona en el extremo carboxilo terminal que es importante para la estabilidad de la toxina (aa 603-603 de la toxina CryIA(b) (Wabiko y Yasuda, 1995). Cuando se pasa este límite, la proteína se degrada y no se puede detectar ni con anticuerpos policlonales. Esto puede deberse a la poca estabilidad del dominio II. Un modelo que se ha propuesto para el mecanismo de acción de la toxina implica la inserción de la hélice 5 del dominio I. Para que se logre esto, es necesario que la toxina sufra cambios conformacionales drásticos. Así, el dominio II podría ser

flexible y sensar la unión específica, lo que daría como resultado que permita la inserción de la toxina a la membrana. Esto explicaría en parte, porque el dominio II aislado no es estable. Es importante mencionar que la mayor expresión observada con el promotor *lac* se puede deber a que esta construcción porta una porción adicional del péptido α de la enzima β galactosidasa y probablemente este la estabilice y proteja de la degradación. Un posible manera de ver esto sería el crear un sitio sensible a proteasas entre el dominio II y III para poder obtener el dominio II separado *in vitro*. Esta posibilidad es difícil ya que la unión entre los dominios no está expuesta en la estructura de la toxina CryIIIA.

Discusión general

Los datos presentados en este trabajo nos demuestran cómo la función de una proteína presenta detalles particulares que son difíciles de anticipar de la estructura cristalina ya sea sola o en complejo con su molécula blanco o análogos del sustrato. Así, es difícil visualizar qué residuos alejados de la interfase, que no contactan a la otra molécula, pueden estar actuando en el proceso de reconocimiento. El entender este tipo de mecanismo de regulación a distancia nos ayuda a tener una visión sobre la finura de la regulación de la función de las proteínas.

Por otra parte, el poder separar a una proteína en los módulos que la constituyen nos permite estudiar de manera aislada una función en particular. El poder delimitar de manera precisa cada módulo, es importante para poder lograr su expresión independiente. Como se observa, aún cuando las evidencias estructurales y funcionales indican que es posible separarlos, existen restricciones estructurales que dificultan su separación. En este caso, la función de la proteína implica cambios conformacionales en el dominio II que restringen su separación.

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que la flexibilidad y los contactos intramoleculares son importantes en la regulación de la proteína. Esto implica que cuando se está realizando la modificación de una proteína, es importante tener claro que la actividad deseada está principalmente determinada por los contactos directos, pero la finura de la misma, está determinada por el contexto donde se encuentra.

CONCLUSIONES

Se demostró que el aa his114 de la endonucleasa *EcoRI* está involucrado en la especificidad de la enzima y que no participa en la catálisis.

Se demostró la existencia de una conexión entre glu170 y la especificidad de la endonucleasa *EcoRI*. Se propone la posible existencia de un sistema de contactos intramoleculares que están involucrados en la interacción entre la actividad y la especificidad de la endonucleasa *EcoRI*. Este sistema involucra a los aa his114 y glu170.

Se demostró que la endonucleasa *EcoRI* mutante en la posición 160 está altera en su estabilidad. Esta variante no se acumula cuando se induce su expresión, cuando porta el aa original (glu160), la enzima se acumula en la célula.

Se demostró que la porción de la δ -endotoxina CryIA(b) correspondiente al dominio II no es estable de manera independiente.

Se demostró que el dominio III juega un papel importante en la estabilidad del dominio II.

Perspectivas de los modelos experimentales

Los modelos estudiados aún tienen muchas preguntas por contestar.

En el caso de la endonucleasa *EcoRI* faltaría realizar más estudios sobre la posible existencia de la comunicación entre la especificidad y la actividad. Un posible experimento sería realizar mutaciones simultáneas y a saturación en las posiciones 160 y 170 para encontrar un nuevo par de residuos que sean activos y conserven la especificidad. Dependiendo de la naturaleza del par generado se podría contestar de manera más adecuada ésta pregunta. Un segundo camino es la investigación del cambio de la especificidad. Hasta el momento no se ha logrado tener variantes con una especificidad nueva. Esto se puede deber a la existencia de este interruptor, por lo que las variantes con actividad insensible a la presencia de la metilasa pueden ayudar a lograr este objetivo.

En el caso de la δ -endotoxina CryIA(b) la primera pregunta que queda abierta es si la construcción con los dominios II y III muestran unión específica. Esto es importante, ya que permitiría tener una proteína más pequeña para su futura manipulación. Otra pregunta es ver si existen contactos entre el dominio II y III que puedan alterar la actividad de la toxina. Esto se debe a que posiblemente el dominio II sufra cambios conformacionales que estén determinados por el dominio III. Un avance

importante es que se demostró la factibilidad de la purificación de ésta proteína usando columnas de Ni^{++} que permite purificar a variantes que se expresan mal. Esto es relevante ya que muchas veces al modificar ésta proteína se altera su estabilidad, lo que dificulta su caracterización. Por último falta ensayar si cuando se clone el dominio II en una fusión traduccional ésta pueda ser estable. Esto se ha observado con otras proteínas y de ser cierto para este caso, se podría montar en el sistema de despliegue en fago. Esto último sería importante para la generación y selección de mutantes con especificidades nuevas.

BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal, A. K. (1995) Structure and function of restriction endonuclease *Curr.Opi. Struc. Biol.* 5:11-19.
- Aiken, C. H; McLaughlin, L. W. y Gumpert, R. I. (1991) The highly homologous isoschizomers *RsrI* endonuclease and *EcoRI* endonuclease do not recognize their target sequence identically. *J. Biol. Chem.* 266:19070-19078.
- Almond, B. D. y Dean, D. H. (1993) Suppression of protein structure destabilizing mutations in *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins by second site mutations. *Biochemistry.* 32:1040-1046.
- Alves, J; Urbanke, C; Fliess, A; Maass, G. y Pingoud, A. (1989) Fluorescence stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the *EcoRI* restriction endonuclease. *Biochemistry.* 28:7879-7888.
- Aronson, A. I. (1993) The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal protein and post-exponential survival. *Mol. Microbiol.* 7:489-496.
- Bhat, T. N; Bentley, G. A; Boulot, G; Greene, M. I; Tello, D; Dall'Acqua, W; Souchon, H; Schwarz, F; Mariazza, R. A. y Poljak, R. J. (1994) Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1089-1093.
- Blundell, T. y Johnson, M. (1993) Catching a common fold. *Protein Sci.* 2:877-883.
- Boer, H; Comstock, L. y Vasser, M. (1983) The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Nacl. Acad. Sci. USA.* 80:2895-2901.
- Borisova, S; Grochulski, P; Faassen, H. V; Pusztai-Carey, M; Masson, L. y Cygler, M. (1994) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the lepidoptera-specific insecticidal Crystal protein CryIA(a). *J. Mol. Biol.* 213:530-532.
- Bosch, D; Visser, B. y Stiekema, W. J. (1994a) Analysis of non-active engineered *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 118:129-134.
- Bosch, D; Schipper, B; van der Kleij, H; de Maagd, R. y Stiekema, W. (1994b) Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Bio/technology* 12:915-918.
- Bourne, Y; van Tilbeurgh, H. y Cambillau. (1993) Protein-carbohydrate

- interactions. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3:681-686.
- Campbell, I. D. y Downing, A. K. (1994) Building protein structure and function from modular units. *TIBTECH* 12:168-172.
- Cerón, J; Covarrubias, L; Quintero, R; Ortiz, A; Ortiz, M; Aranda, E; Lina, L. y Bravo, A. (1994) PCR analysis of cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:353-356.
- Chen, X. J; Lee, M. K. y Dean, D. H. (1993) Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:9041-9045.
- Chen, X. J; Curtiss, A; Alcantara, E. y Dean, D. H. (1995) Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270:6412-6419.
- Chothia, C. (1992) One thousand families for the molecular biologist. *Nature* 375:543-544.
- Connolly, B; Eckstein, F. y Pingoud, A. (1984) The stereochemical course of the restriction endonuclease *EcoRI*-catalyzed reaction. *J. Biol. Chem.* 259:10760-10763.
- Creighton, T. (1993) Proteins: structures and molecular properties. 2nd ed. Freeman and company. New York.
- Cummings, C. E; Armstrong, G; Hodgman, T. C. y Ellar, D. J. (1994) Structure and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Mol. Mem. Biol.* 11:87-92.
- Diekmann, S. y McLaughlin, W. (1988) DNA curvature in native and modified *EcoRI* recognition sites and possible influence upon the endonuclease cleavage reaction. *J. Mol. Biol.* 202:823-834.
- Du, C; Martin, P. A. W. y Nickerson, K. W. (1994) Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3847-3853.
- Erie, D. A; Yang, G; Schultz, H. C. y Bustamante, C. (1994) DNA bending by Cro protein in specific and nonspecific complex: implications for protein site recognition and specificity. *Science.* 266:1562-1566.
- Feitelson, J.; Payne, J. y Kim, L. (1992) *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/technology.* 10:271-275.
- Feng, Q. y Bechtel, W. J. (1994) pH-induced conformational transitions of

- CryIA(a), CryIA(c), and CryIIA δ -endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry*. 33:8521-8526.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme structure and mechanism*. W. H. Freeman and Company. New York. 293-310
- Flores, H. (1994) Análisis de la interacción DNA-proteína de la endonucleasa EcoRI, por medio de mutagénesis dirigida. *Tesis de Maestría* Instituto de Biotecnología/UNAM
- Frankel, A. D. (1992) The importance of being flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:11653.
- Gazit, E; Bach, D; Kerr, I. D; Sansom, M. S. P; Chejanovsky, N. y Shai, Y. (1994) The α -5 segment of *Bacillus Thuringiensis* δ -endotoxin: *in vitro* activity, ion channel formation and molecular modelling. *Biochem. J*. 304:895-902.
- Geiger, R; Rüter, T; Alves, J; Fliess, A; Wolfes, H; Pingoud, V; Urbanke, C; Maass, G; Pingoud, A; Düsterhöft, A. y Kröger, M. (1989) Genetic engineering of EcoRI mutants with altered amino acid residues in the DNA binding site: physicochemical investigations give evidence for an altered monomer/dimer equilibrium for the gln144lys145lys200 mutants. *Biochemistry*. 28:2667-2677.
- Getzoff, E. D; Cabelli, D. E; Fisher, C. L; Parge, H. E; Viezzoli, M. S; Banci, L. y Hallewell, R. A. (1992) Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature*. 358:347-351.
- Gilson, M. K; Straatsma, T. P; McCammon, J. A; Ripoll, D. R; Faerman, C. H; Axelsen, P. H; Silman, I. y Sussman, J. L. (1994) Open "Back Door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science*. 263:1276-1278.
- Greene, P. J; Gupta, M. y Boyer, H. W. (1981) Sequence analysis of the DNA encoding the EcoRI endonuclease and methylase. *J. Biol. Chem*. 256:2143-2152.
- Harrison, S. C. (1991) A structural taxonomy of DNA-binding.. *Nature* 353:715-719.
- Hein, J. (1989) A new method that simultaneously aligns and reconstructs ancestral sequences for any number of homologous sequences, when the phylogeny is given. *Mol. Biol. Evol*. 6:649-668.
- Heitman, J. y Model, P. (1990a) Mutants of the EcoRI endonuclease with promiscuous substrate specificity implicate residues involved in substrate recognition. *EMBO J*. 9:3369-3378.
- Heitman, J. y Model, P. (1990b) Substrate recognition by the EcoRI

- endonuclease. *Proteins*. 7:185-197.
- Hofmann, C; Vanderbruggen, H; Höfte, H; Rie, J. V; Jansens, S. y Mellaert, H. V. (1988) Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85:7844-7848.
- Höfte, H. y Whiteley, H. R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Janin, J. y Chothia, C. (1990) The structure of protein-protein recognition sites. *J. Biol. Chem.* 265:16027-16030.
- Jankecht, R; de Martynoff, G; Lou, J; Hipskind, R; Nordheim, A. y Stunneenberg, H. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:8972-8976.
- Jeltsch, A; Alves, J. Maass, G. y Pingoud, A. (1992) On the catalytic mechanism of *EcoRI* and *EcoRV*. *FEBS Lett* 304:4-8.
- Jeltsch, A; Alves, J; Wolfes, H; Maass, G. y Pingoud, A. (1993a) Substrate-assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes. *Proc. Natl. Acad. USA*. 90:8499-8503.
- Jeltsch, A; Alves, J; Oelgeschläger, T; Wolfes, H; Maass, G. y Pingoud, G (1993b) Mutational analysis of function of Gln115 in the *EcoRI* restriction endonuclease, a critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence -GAATTC- and for coupling specific DNA binding to catalysis. *J. Mol. Biol.* 229:221-234.
- Jeltsch, A; Alves, J; Wolfes, H; Mass, G. y Pingoud, A. (1994) Pausing of the restriction endonuclease *EcoRI* during linear diffusion DNA. *Biochemistry*. 33:10215-10219.
- Jeltsch, A; Alves, J; Urbanke, C; Maass, G; Eckstein, H; Lianshan, Z; Bayer, E. y Pingoud, A. (1995) A dodecapeptide comprising the extender chain- α 4 region of the restriction endonuclease *EcoRI* specifically binds to the *EcoRI* recognition site. *J. Biol. Chem.* 270:5122-5129.
- Jen-Jacobson, L; Lesser, D. y Kurplewski, M. (1986) The enfolding arms of *EcoRI* endonuclease: roles in DNA binding and cleavage. *Cell*. 45:619-629.
- Jo, K. y Topal M. D. (1995) DNA topoisomerase and recombinase activities in *NaeI* restriction endonuclease. *Science*. 267:1817-1820.
- Joachimiak, A; Haran, T. E. y Sigler, P. B. (1994) Mutagenesis supports water mediated recognition in the *trp* repressor-operator system. *EMBO J.* 13:367-372.

- Kim, Y; Grable, J. C; Love, R; Greene, P. J. y Rosenberg, J. M. (1990) Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing. *Science*. 249:1307-1309.
- King, K; Benkovic, S. J. y Modrich, P. (1989) Glu-111 is required for activation of the DNA Cleavage center of *EcoRI* endonuclease. *J. Biol. Chem.* 264:11807-11815.
- Klibanov, A. M. (1995) What is remembered and why? *Nature*. 374:596.
- Knight, P. J. K; Clickmore, N. y Ellar, D. J. (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11:429-436.
- Knowles, B. H. y Dow, A. T. (1993) The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*. 15:469-476.
- Knowles, B. H. (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* 24:275-308.
- Knowles, B. H. y Ellar, D. J. (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 924:509-518.
- Kuhn, I; Stepheson, F; Boyer, H. y Greene, P. (1986) Positive-selection vectors utilizing lethality of the *EcoRI* endonuclease. *Gene* 42:253-263.
- Leistler, B. y Perham, R. N. (1994) Solubilizing buried domains of proteins: a self-assembling interface domain from glutathione reductase. *Biochemistry*. 33:2773-2781.
- Lesser, D. R; Kurpiewski, M. R. y Jen-Jacobson, L. (1990) The energetic basis of specificity in the *EcoRI* endonuclease-DNA interaction. *Science*. 250:776-786.
- Lesser, D. R; Kurpiewski, M. R; Walters, T; Connolly, B. y Jen-Jacobson, L. (1993) Facilitated distortion of the DNA site enhancer *EcoRI* endonuclease-DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:7548-7552.
- Li, J; Carroll, J. y Ellar, D. (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. *Nature*. 353:815-821.
- Li, J. (1992) Bacterial toxins. *Curr. Opi. Struc. Biol.* 2:545-556.
- Liang, Y. y Dean, D. H. (1994) Location of a lepidopteran specificity region in insecticidal crystal protein CryIIA from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 13:569-575.

- Lu, H; Rajamohan, F. y Dean, D. H. (1994) Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryAa associated with membrane binding and Toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bac.* 176:5554-5559.
- McClarín, J. A; Frederick, C. A; Wang, B.-C; Greene, P; Boyer, H. W; Grable, J. y Rosenberg, J. M. (1986) Structure of the DNA-*EcoRI* endonuclease recognition complex at 3Å resolution. *Science*. 234:1526-1541.
- Modrich, P. y Zabel, D. (1976) *EcoRI* endonuclease: physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme. *J. Biol. Chem.* 251:5866-5874.
- Naito, T; Kusano, K. y Kobayashi I. (1995) Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science*. 267:897-899.
- Needels, M. C; Fried, S. R; Love, R; Rosenberg, J. M; Boyer, H. W. y Greene, P. J. (1989) Determinants of *EcoRI* endonuclease sequence discrimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:3579-3583.
- Newman, A. K; Rubin, R. A; Kim, S-H. y Modrich. (1981) DNA sequences of structural genes for *EcoRI* DNA restriction and modification enzymes. *J. Biol. Chem.* 256:2131-2139.
- Nishimoto, T; Yoshisue, H; Ihara, K; Sakai, H. y Komano, T. (1994) Functional analysis of block 5, one of the highly conserved amino acid sequences in the 130-kDa CryIVA protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEBS Lett.* 348:249-254.
- Northrup, S. H; Boles, J. y Reynolds, J. C. L. (1988) Brownian dynamics of cytochrome c and cytochrome c peroxidase association. *Science*. 241:67-70.
- Oddou, P; Hartmann, H. y Geiser, M. (1991) Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. *Eur. J. Biochem.* 202: 673-680.
- Oelgeschläger, T; Geiger, R; Rüter, T; Alves, J; Fliess, A. y Pingoud, A. (1990) Probing the function of individual amino acid residues in the DNA binding site of the *EcoRI* restriction endonuclease by analysing the toxicity of genetically engineered mutants. *Gene*. 89:19-27.
- O'Neil, K. T; Shuman, J. D. Ampe, C. y DeGrado, W. F. (1991) DNA-induced increase in the α -helical content of C/EBP and GCN4. *Biochemistry*. 30:9030-9034.
- Osuna, J; Flores; H. y Soberón, X. (1991) Combinatorial mutagenesis of three major groove-contacting residues of *EcoRI*: single and double amino acid replacements retaining methyltransferase-sensitive activities. *Gene* 106:7-12.

- Osuna, J; Flores, H. y Soberón, X. (1994) Microbial systems and directed evolution of protein activities. *Crit. Rev. Microbiol.* 20:107-116.
- Phillips, K. y Phillips, S. (1994) Electrostatic activation of *Escherichia coli* methionine repressor. *Structure.* 2:309-316.
- Polisky, B; Greene, P; Garfin, D. E; McCarthy, B. J; Goodman, H. M. y Boyer, H. W. (1975) Specificity of substrate recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease. *Proc. Nat. Acad. USA.* 72:3310-3314.
- Rajamohan, F; Alcantara, E; Lee, M. K; Chen, X. J; Curtiss, A. y Dean, D. H. (1995) Single amino acid charges in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryAb δ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bac.* 177:2276-2282.
- Rini, J. M; Schulze, U. y Wilson, I. A. (1992) Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science.* 255:959-965.
- Rosenberg, J. M. (1991) Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 1:104-113.
- Sangadala, S; Walters, F. S; English, L. H. y Adang, M. J. (1994) A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}^{+}$ - K^{+} efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269:10088-10092.
- Sanger, F; Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.
- Schnepf, H. E. (1995) *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. *Curr. Opi. Biotech.* 6:305-312.
- Schnepf, H. E; Tomczak, K; Ortega, J. P. y Whiteley, H. R. (1990) Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930.
- Seeman, N., Rosenberg, J. y Rich, A. (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73:804-808.
- Shen, W; Choe, S; Eisenberg, D. y Collier, R. (1994) Participation of lysine 516 and phenylalanine 530 of diphtheria toxin in receptor recognition. *J. Biol. Chem.* 269:29077-29084.
- Siksnys, V; Zareckaja, N; Vaisvila, R; Timinskas, A; Stakenas, P; Butkus, V, y Janulaitis, A. (1994) CAATTG-specific restriction-modification *munI* genes from *Mycoplasma*: sequence similarities between R-*MunI* and R-*EcoRI*. *Gene.* 142:1-8.
- Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that

- display cloned antigens on the virion surface. *Nature*. 228:1315-1317.
- Smith, G. P. y Ellar, D. J. (1994) Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.* 302:611-616.
- Smith, M. (1990) Site-directed mutagenesis and protein engineering. in *Proteins: form and function*. Ed, Bradshaw, R. y Purton, M. *Elsevier trends books*, Cambridge. 21-29.
- Stephenson, F. H; Ballard, B. T; Boyer, H. W; Rosenberg, J. M. y Greene, P. J. (1989) Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the *RsrI* and *EcoRI* restriction endonucleases. *Gene*. 85:1-13.
- Strauss, J. K. y Mahrer III, L. J. (1994) DNA bending by asymmetric phosphate neutralization. *Science* 266:1829-1834.
- Tabashnik, B. E; Finson, N; Groeters; Moar, W. J; Johnson, M. W; Lou, K. y Adang, M. J. (1994) Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:4120-4124.
- Terry, B. J; Jack, W. E. y Modrich, P. (1985) Facilitated diffusion during catalysis by *EcoRI* endonuclease. *J. Biol. Chem.* 260:13130-13137.
- Thielking, V; Selent, U; Köhler, E.; Landgraf, A; Wolfes, H; Alves, J. y Pingoud, A. (1992) Mg²⁺ confers DNA binding specificity to *EcoRV* restriction endonuclease. *Biochemistry*. 31:3727-3732.
- Vadlamudi, R; Weber, E; Ji, T. y Bulla, L. (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494.
- Venclovas, C; Timinskas, A. y Siksnys, V. (1994) Five-stranded β -sheet sandwiched with two α -helices: a structural link between restriction endonucleases *EcoRI* and *EcoRV*. *Proteins*. 20:279-282.
- von Hippel, P.H. y Berg, O. (1989) Facilitated target location in biological systems. *J. Biol. Chem.* 264:675-678.
- Von Tersch, M. A. V; Slatin, S. L; Kulesza, C. A. y English, L. H. (1994) Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleoptera-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3711-3717.
- Wabiko, H. y Yasuda, E. (1995) *Bacillus thuringiensis* protoxin: location of toxic border and requirement of non-toxic domain for high-level *in vivo* production of active toxin. *Microbiol.* 141:629-639.
- Walters, F. S; Slatin, S. L; Kulesza, C. A. y English, L. (1993) Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 196:921-926.

- Widner, W. R. y Whiteley, H. R. (1990) Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Bac.* 172:2826-2832.
- Wilson, G. G. y Murray, N. E. (1991) Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* 25:585-627.
- Wolfes, H; Alves, J; Fliess, A; Geiger, R. y Pingoud, A. (1986) Site directed mutagenesis experiments suggest that Glu111, Glu144 y Arg145 are essential for endonucleolytic activity of *EcoRI*. *Nucleic Acids Res.* 14:9063-9080.
- Wülfing, C; Lombardero, J. y Plückthun A. (1994) An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.* 269:2895-2901.
- Yanisch-Perron, C; Viera, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotidesequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33:103-119.
- Yanofsky, S. D; Love, R; McClarin; Rosenberg, J. M; Boyer, H. y Greene, P. (1987) Clustering of null mutations in the *EcoRI* endonuclease. *Proteins.* 2:273-282.