

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

03072
P
Leje.

Instituto de Biotecnología

Análisis de la Interacción DNA-proteína de la endonucleasa
EcoRI, por medio de mutagénesis dirigida

Tesis

que para obtener el grado de Maestro en Biotecnología

presenta

el Biólogo Humberto Flores Soto

Cuernavaca, Morelos

Febrero de 1994

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.

A mis padres con cariño.

A mis hermanos que me han apoyado en todo momento.

A los compañeros del laboratorio que me han soportado otro período de mi desarrollo académico (Joel, Mary, Gabo, Moreno, Ernesto, Marina, Paco, Paúl y Eugenio).

Al Dr. Xavier Soberón M. por guiar mi trabajo.

A las personas que me han apoyado de alguna manera.

A th que me mostró muchas cosas sobre el comportamiento humano.

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	TEMAS ESTRUCTURALES DE PROTEINAS QUE INTERACTUAN CON DNA	5
III.	SISTEMAS DE RESTRICCION Y MODIFICACION	11
IV.	SISTEMAS DE RESTRICCION-MODIFICACION DEL TIPO II	13
V.	ENZIMAS DE RESTRICCION DEL TIPO II	16
VI.	ENFOQUE PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA-FUNCION DE PROTEINAS	21
VII.	ANTECEDENTES	23
VIII.	OBJETIVOS	24
IX.	MATERIAL Y METODOS	25
X.	RESULTADOS	39
XI.	DISCUSION	52
XII.	CONCLUSIONES	61
XIII.	BIBLIOGRAFIA	63

INTRODUCCION

Importancia de la interacción DNA-proteína

El concepto de cómo una proteína puede interactuar de manera específica con otra molécula es de suma importancia para poder comprender procesos biológicos a nivel molecular. Entre las primeras ideas propuestas para explicar la especificidad se encuentra la de Fischer (1890), quien introdujo el concepto de "cerradura-llave", el cual propone que existe una complementariedad estructural entre el sitio de interacción de la proteína y la molécula a la que se une. Esta idea ha evolucionado y en la actualidad se acepta que existe una complementariedad no sólo estructural, sino que se dan interacciones de varios tipos entre la proteína y la molécula con la que interactúa, éstas son del tipo de puentes de hidrógeno, van der Waals, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas, flexibilidad, etc. Todo esto da como resultado que la unión de la proteína con su ligando posea una energía libre menor que la de cada molécula por separado, de tal manera que la unión se ve favorecida (1).

La interacción DNA-proteína se presenta en muchos procesos biológicos, tales como el mantenimiento de la información génica, la diferenciación celular, la transducción de señales, etc. Estas interacciones pueden ser para mantener la información del DNA o para regular la expresión de la información. En el proceso de regulación de la expresión genética intervienen proteínas, ya sea de manera directa o indirecta (2). Entre las que interactúan de manera directa podemos mencionar las proteínas que favorecen o inhiben la transcripción de genes específicos; cuya acción

se da al interactuar con las señales del gen en cuestión y/o con las proteínas que intervienen en la transcripción (3). Entre las indirectas podemos mencionar aquellas que modulan el estado de enrollamiento del DNA (girasas), ya que dependiendo del enrollamiento, se puede o no transcribir un gen, así como las que modifican al DNA al introducir grupos que modulan la unión de proteínas (metilasas) (4). La unión puede ser específica sobre una secuencia en particular o no. En este último caso la unión se da fundamentalmente por atracciones electrostáticas; el DNA es una macromolécula de carga negativa y la proteína puede contener zonas de carga positiva (5). Las proteínas cuya interacción es dependiente de la secuencia del DNA son las directamente responsables de modular muchos procesos importantes ya mencionados. Esta interacción se analizará con más detalle en esta introducción.

La primera pregunta que surge al tomar este problema es:

¿Qué determina que una proteína se una de manera específica a una secuencia de DNA?

Existen dos modelos que tratan de explicarlo. El primer modelo llamado de lectura directa propone que la especificidad está determinada por los grupos funcionales que presenta cada base del DNA en el surco mayor, que es donde el DNA tipo B presenta grupos que permiten que se puedan diferenciar las cuatro bases, mientras que el surco menor sólo permite saber si es un par A:T o G:C (Figura 1) (6). En la actualidad se conocen varios ejemplos que apoyan este modelo. Así, en represores y activadores tanto procariontes como eucariontes se han hecho estudios bioquímicos, estructurales y genéticos que lo apoyan. En estos ejemplos se observa que la sustitución de un residuo de aminoácido puede originar el cambio o ampliación de la

especificidad. Además cuando existen datos estructurales es posible observar que estos residuos se encuentran cercanos a los grupos de las bases (Figura 1) (7). Recientemente han aparecido ejemplos donde la especificidad está dada también por residuos que contactan el surco menor (8).

El segundo modelo llamado de lectura indirecta propone que la especificidad está mediada por contactos con el esqueleto del DNA, y que estos contactos son dependientes de la estructura del DNA (9). Este modelo se invoca, por ejemplo, en el caso del represor del operón de triptofano, del cual se conoce la estructura tridimensional en complejo con su DNA blanco. En esta estructura se observa que los contactos de la proteína con el DNA se dan principalmente con los grupos fosfato. De manera sobresaliente se observa que los residuos de aminoácidos que pueden estar contactando las bases no son importantes para la especificidad, ya que, cuando se alteran, ésta no se modifica (10). La aplicación de este modelo esta en debate para el caso del represor de Trp, ya que se duda que el DNA usado en el complejo presente la secuencia específica. Actualmente se acepta que el DNA en solución es polimórfico y que las variaciones estructurales que presenta son dependientes del contexto en que se encuentre (11).

En la actualidad se ha observado que los dos modos de interacción pueden ser relevantes para explicar la alta especificidad que tienen las proteínas que interactúan con DNA, que los dos procesos se dan durante la formación del complejo y que dependiendo del sistema, uno de los dos procesos puede ser el principal determinante de la especificidad (7).

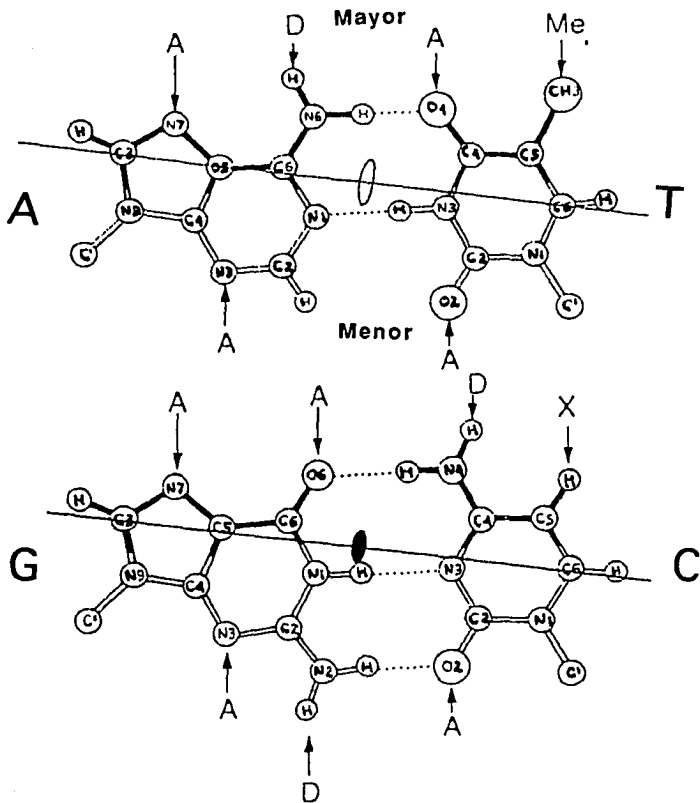


Figura 1. Patrón de puentes de hidrógeno que se pueden formar entre el DNA y una proteína.

A denota un átomo que puede actuar como aceptor y D un átomo que puede actuar como donador en un puente de hidrógeno. Mayor y menor se refiere a los surcos del DNA. X indica que no se dan interacciones con este átomo

TEMAS ESTRUCTURALES DE PROTEINAS QUE INTERACTUAN CON DNA

Los estudios estructurales de las proteínas que interactúan de manera específica con DNA han demostrado la existencia de motivos o temas estructurales que se repiten en estas proteínas. A continuación mencionaré los motivos que se conocen y algunos ejemplos de ellos.

HELICE VUELTA HELICE: Este tema estructural se observa en represores procariontes (Cro, CI, etc) y una estructura parecida se encuentra también en proteínas homeóticas (homeodominio). Este tema estructural consta de dos α -hélices conectadas por una pequeña vuelta β (generalmente 4 residuos). Las α -hélices poseen regiones que se conservan en este tema estructural, como son las cargas netas y, en algunos casos, residuos que son importantes para la formación y estabilidad de las α -hélices. Estos residuos forman puentes de hidrógeno con los oxígenos de los grupos fosfato del DNA y contactos entre las hélices, ayudando así a la estructura y ubicación del motivo en el DNA. La hélice amino terminal contacta el esqueleto del DNA y la carboxilo terminal se introduce en el surco mayor contactando las bases (Figura 2)(12).

DEDOS DE ZINC: Este motivo se observa en diversas proteínas activadoras eucariontes. El zinc no contacta al DNA, sino que participa en la formación del módulo que interactúa con el DNA. En la actualidad se han descrito varias subfamilias de este tema estructural. La división se basa en la manera en que el zinc es unido y la

estructura del módulo que interactúa con el DNA. Se han propuesto tres subfamilias; la primera es la más conocida y consta de módulos de 30 residuos de aminoácidos con un ion de zinc unido a dos cisteínas y dos histidinas. En esta subfamilia se encuentra el factor TFIIIA, cuyo dominio consta de dos láminas β y una hélice 3_{10} , formando una estructura globular (Figura 2)(13). La segunda subfamilia es un dominio de aproximadamente 70 residuos de aminoácidos encontrado en receptores de esteroides y moléculas parecidas a estas hormonas, consta de dos iones de zinc unidos por 4 cisteínas cada uno. La tercera contiene dos iones de zinc unidos a la proteína por 6 cisteínas y se ha encontrado en levaduras (represor GAL4).

CIERRE DE LEUCINA: Este tema estructural no contacta de manera directa al DNA, sino que permite la dimerización de la proteína y se ha observado en proteínas eucariotas que intervienen en la diferenciación celular como son cFos, cJun, etc. Dependiendo de la proteína que se trate, ésta puede unirse al DNA como homodímero, heterodímero o de ambas maneras. Este motivo permite que se formen heterodímeros, con lo cual se puede ampliar el repertorio de especificidades. Se llama cierre de leucina ya que estas se encuentran cada 7 residuos de aminoácidos, al formarse la α -hélice, estas leucinas se exponen en una cara de la hélice, permitiendo que se unan dos hélices, interaccionando paralelamente por fuerzas hidrofóbicas. En el extremo amino terminal se encuentra el dominio que se une a DNA que en algunos casos es también una hélice, éste último se ha observado en el dominio que une a DNA de la proteína GCN4 (Figura 2)(14).

LAMINA β : Este dominio que se observa en proteínas diméricas como el represor ARC del fago P22 y en el represor MET de *E. coli*. El dominio consta de dos láminas β antiparalelas (una de cada monómero) que se introducen en el surco mayor. El DNA blanco en el complejo se encuentra distorsionado, lo que permite que se formen contactos con las bases que de otra manera no se establecerían. La estructura se forma de la contribución de una lámina β de cada monómero del dímero (Figura 2)(15).

HELICE-ASA-HELICE: Este tema estructural permite la dimerización de proteínas con ellas mismas o con proteínas que contienen cierre de leucina. Por lo general estas proteínas poseen una zona básica que es la que interactúa con el DNA de manera específica. Este tema se observa en proteínas que intervienen en la diferenciación celular, entre las que podemos mencionar a MyoD (16).

Existen otras estructuras que se han observado, pero que son ejemplos únicos, por lo que se mencionarán brevemente. En el factor TFIIID se observa una lámina β antiparalela que se encuentra curvada (17). De esta estructura parten las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que dan la especificidad. En el dominio de unión a DNA de la proteína del papillomavirus-1 bovino E2, se observa un barril β , al cual se le une el DNA para establecer los contactos específicos (18).

Por último mencionaré brevemente la estructura que se observa en dos enzimas de restricción del tipo II y que no presentan ninguno de los temas estructurales que se han mencionado. En la endonucleasa EcoRV se observa que los contactos directos se establecen a partir de dos asas proteicas que contactan en

surco mayor y menor (19). En la endonucleasa EcoRI se observa que los contactos directos se establecen a partir de dos hélices proteicas que se introducen en surco mayor, así como un segmento de estructura no periódica que corre a lo largo del surco mayor del DNA al cual se une (Figura 3).

En la actualidad no se ha observado que exista un código único de contactos entre las bases y los residuos de aminoácidos. Así, por ejemplo, un residuo puede contactar diferentes bases, dependiendo del contexto en que se encuentre. También una base puede ser contactada por varios residuos a la vez (2). Además se han observado diversos tipos de deformaciones e interacciones novedosas dentro de las bases del DNA (20).

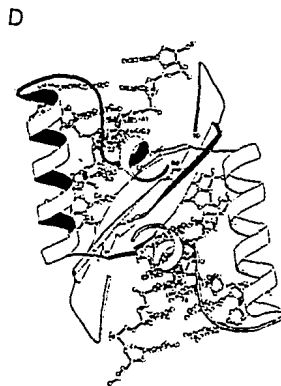
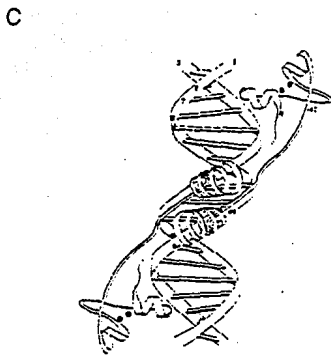
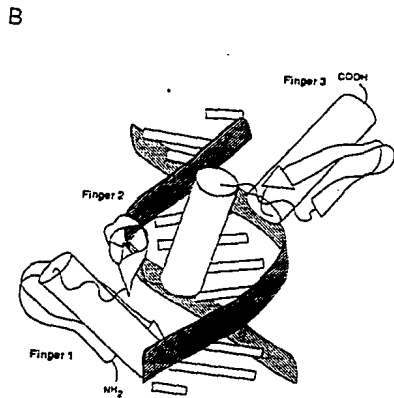
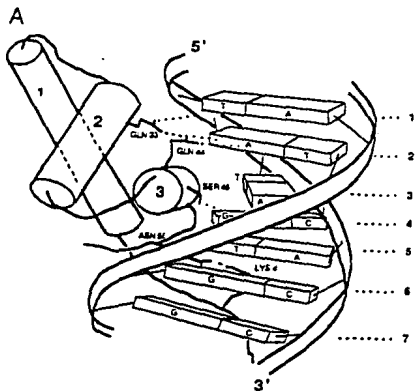


Figura 2. Temas estructurales en proteínas que interactúan con DNA.

A) Hélice vuelta hélice. B) Dedo de zinc. C) Cierre de Leucina. D) Lámina β .

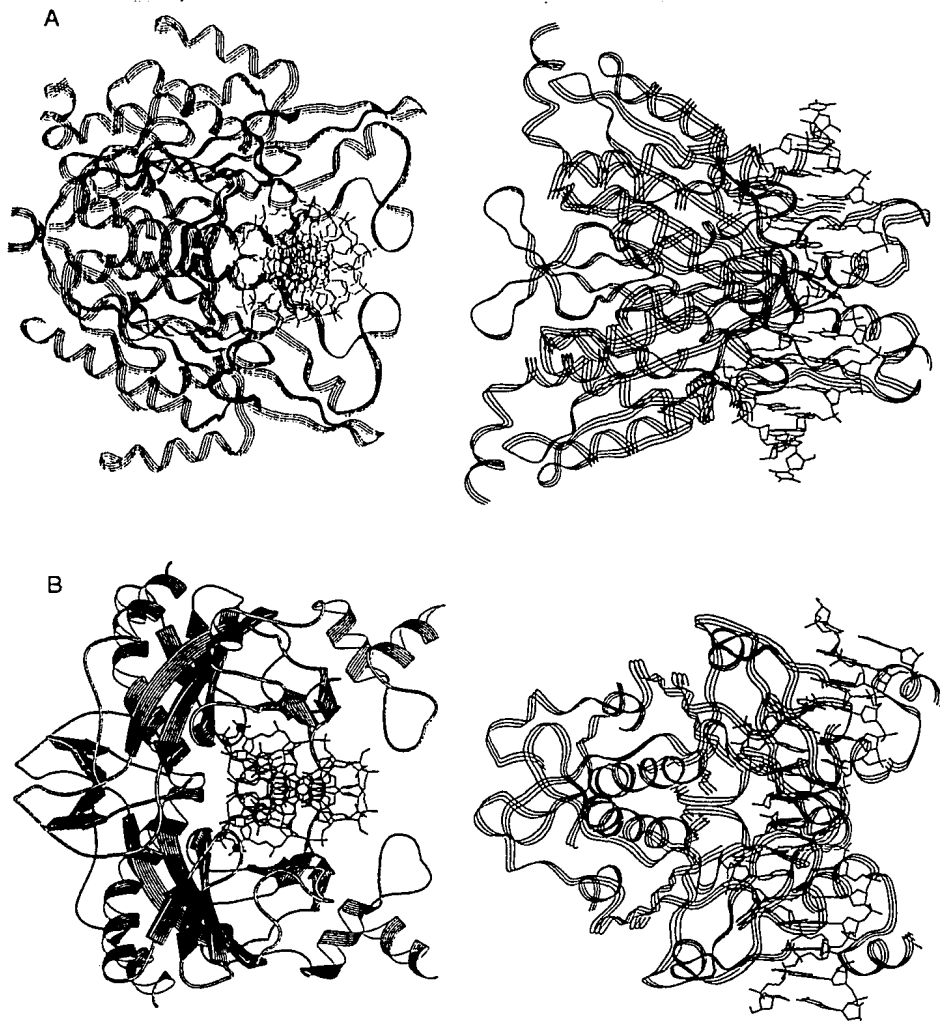


Figura 3. Estructura terciaria de las endonucleasas EcoRV y EcoRI.

A) Vistas de la estructura terciaria de la endonucleasa EcoRI.

B) Vistas de la estructura terciaria de la endonucleasa EcoRV

Para mayor claridad la proteína se muestra como listón y el DNA por barras

SISTEMAS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN

Los sistemas de restricción-modificación (RM) se encuentran presentes en muchas especies de bacterias, y funcionan como un sistema inmune para destruir DNA extraño que penetre en la célula. Estos sistemas constan de dos distintas actividades, la primera es la de modificación del DNA: que consiste en una metiltransferasa que metila las citosinas y las adeninas de secuencias específicas. La segunda actividad consiste en enzimas de restricción que hidrolizan enlaces fosfodiéster del DNA en los mismos sitios que la metiltransferasa reconoce. Estas enzimas de restricción solo pueden cortar el DNA mientras éste no este metilado por la acción de las metiltransferasas antes descritas. Cuando no existe esta actividad y está presente la actividad de endonucleasa, la célula muere, debido a que la endonucleasa corta el DNA que no se encuentra metilado. La falta de la actividad de endonucleasa en una célula sólo ocasiona que sea más sensible a la infección por DNA extraño. Estos sistemas se conocen desde los años 50's, cuando Luria y Human observaron un comportamiento diferencial a la infección por fago en distintas cepas de *E. coli* (21). En la actualidad se han encontrado cuatro clases de estos sistemas:

Tipo I.- Estos sistemas son complejos y consisten de tres proteínas, S, R y M que forman un complejo que restringe y modifica el DNA. Para cortar requieren como cofactores Mg^{++} , S-adenosilmetionina y ATP. Para modificar solo S-adenosilmetionina. El corte ocurre a distancias variables de la secuencia que reconocen. La subunidad S determina la especificidad (22).

Tipo II.- Estos sistemas son los más simples y diversos. Las actividades de

modificación y restricción se encuentran en proteínas separadas. La secuencia que reconocen es generalmente palindrómica y consta de 4 a 8 nucleótidos, el corte lo realizan generalmente en la secuencia que reconocen. La actividad de corte requiere Mg^{++} y la de metilación S-adenosilmetionina. Existe un subtipo llamado IIs que se diferencian en que reconocen secuencias no palindrómicas y el corte lo realizan a distancias considerables de la secuencia que reconocen. Estos sistemas son ampliamente utilizados en la manipulación del DNA (22).

Tipo III.- La actividad de restricción y modificación se encuentra en un complejo formado por una proteína M y otra R. La proteína M se autometila y la R requiere ATP para el corte, el cual es estimulado por S-adenosilmetionina. El sitio de reconocimiento solo presenta una hebra metilada, el corte es inhibida por la presencia de otros sitios metilados cercanos. El corte lo realizan a distancia del sitio que reconocen (22).

Tipo IV.- La actividad de restricción y modificación se encuentran en una sola cadena polipéptica, pero además existe otra proteína que sólo tiene la actividad de modificación. Estos sistemas, se piensa, son un intermediario evolutivo que da origen a los sistemas del tipo II y III. El corte lo realizan a una distancia determinada del sitio que reconocen (23).

SISTEMAS DE RESTRICCIÓN-MODIFICACIÓN DEL TIPO II

Como ya se mencionó las actividades de corte y modificación se encuentran en proteínas diferentes. Las secuencias que reconocen son simétricas y constan de 4 a 8 pares de bases, pudiendo tener bases intermedias que no son específicas. En la mayoría de los casos la endonucleasa opera como dímero y la metiltransferasa de mayor tamaño como monómero. La organización de los dos genes es variable, pero en la mayoría de los casos están contiguos.

La subfamilia IIs reconoce secuencias asimétricas, que no están interrumpidas, cuya longitud varía de 4 a 7 pares de bases. La endonucleasa realiza el corte fuera de la secuencia que reconoce a una distancia que varía de 1 a 20 pares de bases. La endonucleasa es monomérica y de mayor tamaño que la metiltransferasa. La metilación la realizan dos metiltransferasas, una para cada hebra y en algunos casos el nucleótido modificado es diferente en cada hebra (21). Las características que se mencionan a continuación se refieren a la primera subfamilia.

El mecanismo de acción de la endonucleasa involucra al Mg^{++} como cofactor para promover un ataque nucleofílico sobre el fosfato, favoreciendo la transición del grupo fosfato de una geometría tetrahédrica a trigonal bipyramidal. El corte ocurre con la inversión de la configuración del enlace fosfodiéster, generando un extremo 5'P y un 3'OH (Figura 4) (24).

En la actualidad se han encontrado dos grupos de endonucleasas del tipo II; esta división se basa en si necesitan el cofactor para reconocer su secuencia blanco o no. El primer grupo se llama SEL (specificity early and late) y comprende aquellas

enzimas donde la especificidad se manifiesta en ausencia o presencia del cofactor, un ejemplo es EcoRI. El segundo grupo se llama SLO (specificity late only), son aquellas que necesitan la unión del Mg^{++} para poder alcanzar su especificidad, un ejemplo es EcoRV (25).

Cerca de 100 sistemas de restricción modificación del tipo II han sido secuenciados y 50 publicados. En estos se han observado muy pocos casos con similitud global de secuencia. Por ejemplo, en las metiltransferasas se ha observado que se conservan varios segmentos de la proteína, que se creen están involucrados en la unión del cofactor S-adenosilmetionina; en la interacción con la base que metilan así como en la catálisis. En las endonucleasas se ha encontrado poca homología, aún en casos en que se trata de proteínas que reconocen la misma secuencia (isoisquizómeros) (HgiBI y SlnI). Existen otros ejemplos donde los isosquizómeros presentan una alta homología (EcoRI y RsrI, 55% a nivel de a.a.), lo que habla de una divergencia relativamente reciente, pero no de la evolución global de los sistemas de restricción y modificación del tipo II. Lo que sí se observa es que los genes de las endonucleasas del tipo II son ricos en pares A:T con respecto al organismo que los porta. Se ha especulado que esta similitud se puede deber a que estos sistemas se originaron de un organismo cuyo genoma era rico en pares A:T o a que sea una manera en la que se regula la expresión del gen (22). La evolución de estos sistemas es difícil de entender, ya que implica una coevolución donde el cambio de especificidad de una de las proteínas puede ser perjudicial al organismo que lo porta, si la otra proteína no ha cambiado su especificidad (La presión selectiva para los sistemas de restricción-modificación: es especificidad y catálisis).

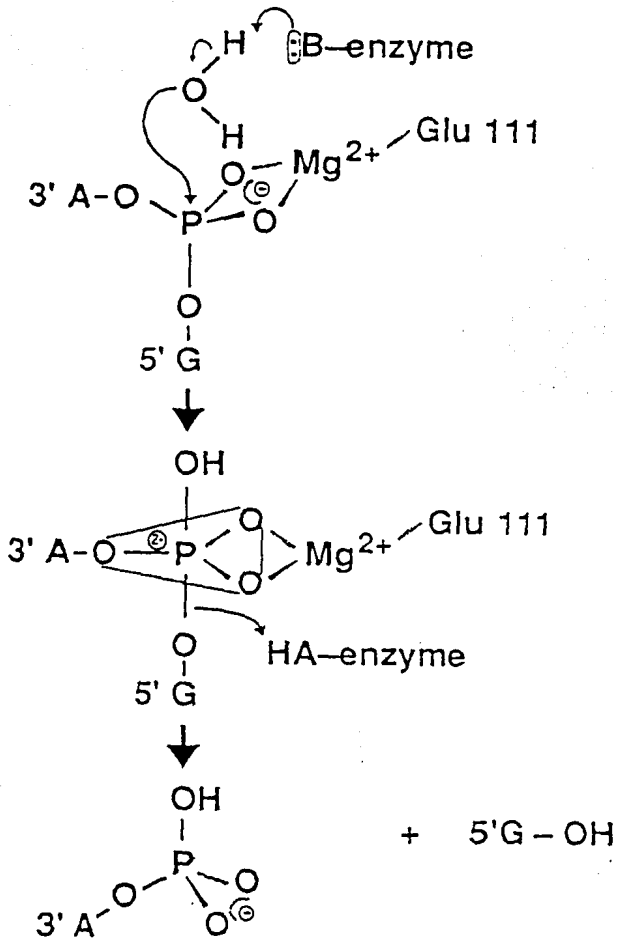


Figura 4. Mecanismo de acción propuesto para las endonucleasas de restricción del tipo II

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DEL TIPO II

En esta sección mencionaré sólo las características de dos enzimas de restricción: EcoRV y EcoRI, que son las que han sido caracterizadas en mayor detalle.

EcoRV

Esta enzima reconoce la secuencia **5'GATATC3'**, cortando entre la T y A, centrales generando extremos rasurados. La acción de esta enzima se inhibe cuando se encuentra metilada la adenina central en el N6. Se conoce la secuencia del gen que codifica para esta proteína; su producto se ha purificado y se conoce la estructura tridimensional de la proteína sola, en complejo con DNA no específico y específico (26). La enzima necesita Mg^{++} para poder alcanzar su alta especificidad, (27). La unión del Mg^{++} se potencia cuando se encuentra unida a su DNA blanco. Esto sugiere que la catálisis y el reconocimiento se encuentran estrechamente relacionados (28). EcoRV actúa como dímero e interactúa con el DNA de manera simétrica. Cada monómero introduce dos asas proteicas al DNA, una al surco mayor y la otra al menor. La deformación que presenta el DNA en el complejo específico, que es dependiente de la unión de la proteína, puede contribuir a la especificidad. Se observa que solo se establecen contactos con los dos pares de bases externos del sitio de reconocimiento, tanto en el surco mayor como en el menor. También se observan contactos con los grupos fosfato del sitio de reconocimiento y algunos aledaños (Figura 3).(19). Se han modificado los residuos de aminoácidos que pueden estar contactando las bases, no se ha logrado alterar la especificidad (29).

Los residuos que pueden ser parte del sitio catalítico, tienen su contraparte en la enzima EcoRI y, probablemente, en otras enzimas de restricción, por lo que se piensa que el modo de catálisis puede ser similar. Llama la atención, sin embargo, que las estructuras globales de las dos enzimas no estén relacionadas a pesar de realizar actividades similares (26).

EcoRI

La endonucleasa EcoRI fue la primera enzima de restricción finamente caracterizada. Se conoce la secuencia nucleotídica del gen que la codifica, se expresa en *E. coli* en grandes cantidades, y se conoce la estructura tridimensional en complejo con DNA específico. Esta enzima actúa como dímero y reconoce la secuencia 5'GAATTC3', e hidroliza el enlace fosfodiéster entre la guanina y la adenina. Su actividad de corte se inhibe cuando se encuentra metilada la adenina central en el N6. Para unirse de manera específica, la endonucleasa no requiere Mg⁺⁺, aunque sí para la hidrólisis (20). Se han hecho muchos estudios para tratar de modificar la especificidad de esta enzima. Muchos de estos estudios se realizaron sin el conocimiento de la estructura tridimensional y de ellos se logró identificar dos zonas importantes para su actividad. Con la aparición de la estructura tridimensional se observó que estas zonas se encontraban cercanas al DNA, pero curiosamente cambios en estas zonas no dan origen a una especificidad alterada. Cuando se obtuvo un nuevo conjunto de datos y se pudo refinar la estructura, se observó que se encontraba mal trazada la cadena polipéptica. En la nueva estructura (de la cual solo los carbonos alfa han sido depositados) se observa que existen más residuos

implicados en la interacción con el DNA, lo que explica porque los primeros estudios no lograban alterar la especificidad (30). En la actualidad existe un modelo estructural y funcional que se basa en datos estructurales y genéticos que es más completo (31). Los residuos implicados en reconocimiento directo son los siguientes: gln 115, met 137, ala 138, gly 140, asn 141, arg 145, ile 197, arg 200 y arg 203 (Figura 5). Estos hacen contacto directo con las bases del sitio de reconocimiento, con la excepción de arg 200 y arg 203 que contactan la guanina a través de una molécula de agua. Los implicados en catálisis son: asp 91, glu 111 y lys 113. Algunos de los residuos implicados en reconocimiento también lo están en catálisis, como es gln 115. Además existe un residuo que no está contactando directamente al DNA, pero la sustitución del mismo, origina un relajamiento de la especificidad (31).

En la estructura refinada se observa que la enzima modifica la conformación del DNA, aunque no como en el caso de la EcoRV, puesto que EcoRI amplía el surco mayor, en lugar de cerrarlo. Se observa que la enzima contacta grupos fosfato dentro y fuera del sitio que reconoce; los contactos con las bases se dan por el surco mayor y las cadenas laterales parten de dos hélices y un segmento proteico estructurado que corren por el surco mayor (Figura 5) (20).

En la actualidad se han construido muchas variantes de esta proteína, y pueden ser agrupadas en aquellas que alteran la especificidad, las que alteran su actividad catalítica y las que no modifican las propiedades. Entre las que modifican su actividad hay mutantes que involucran residuos de aminoácidos que pueden formar parte de su sitio activo y los que pueden estar contactando el DNA de manera directa. Por otro lado las proteínas cuya especificidad está alterada también presentan

residuos que pueden o no contactar las bases. Las mutantes con la actividad alterada no presentan un cambio de especificidad, sólo presentan un relajamiento de la misma (32). Todo esto, así como evidencias donde se ha modificado el DNA del sitio de reconocimiento han llevado a proponer que la especificidad no sólo se da durante la unión, sino que también durante el proceso que lleva al estado de activación de la enzima (33). Esto se puede entender si se postula que para la catálisis se dan contactos adicionales que no se observan en la estructura del complejo que esta sin Mg^{++} (32). Hasta el momento no se ha podido cristalizar el complejo en presencia de Mg^{++} , pero se ha observado que al adicionar Mg^{++} al cristal por difusión, la estructura de la proteína se modifica ligeramente (20).

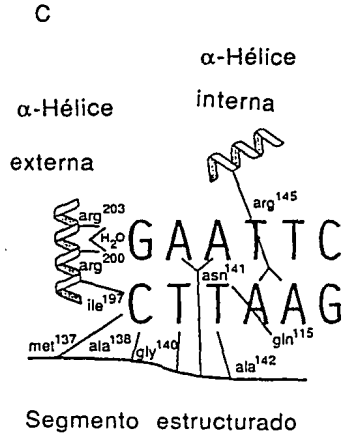
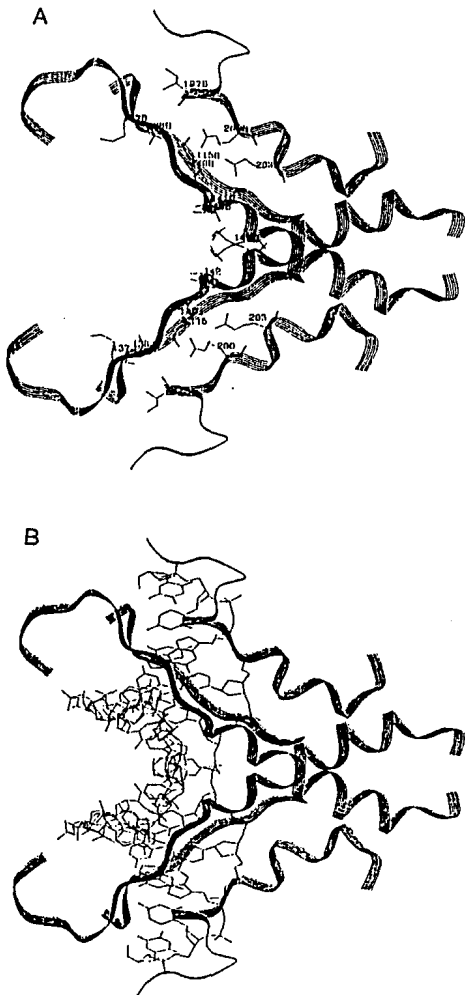


Figura 5. Contactos que se establecen entre la EcoRI y el DNA canónico.

A) Se muestran los elementos estructurales de donde parten las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que se proponen contactar al DNA. B) Se muestran los mismos elementos estructurales y el DNA con el sitio canónico. C) Representación esquemática de los contactos que se establecen entre el DNA y la proteína. D) Grupos fosfato que contacta la endonucleasa.

ENFOQUES PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA-FUNCION DE PROTEINAS

En el estudio de la relación estructura-función de una proteína es útil alterar la estructura primaria de la misma, ya sea de manera directa o indirecta. Para elegir la zona de la proteína que se quiere modificar se usan datos estructurales, bioquímicos y genéticos. Cuando no existen estos datos se puede modificar de manera generalizada y buscar mutantes que posean las características deseadas, para después caracterizar los cambios y con ello elaborar un mapa de las zonas que son importantes para cierta función. Para modificar la proteína se presentan dos alternativas:

- 1) Alteración directa de la proteína por medio de agentes químicos que reaccionan de manera específica con grupos químicos de los residuos de aminoácidos.
- 2) Modificación indirecta, a través del gene que codifica para la proteína.

Aunque cualquiera de estos enfoques puede, en principio, lograr cambios funcionales en las proteínas, la modificación a través del DNA resulta más conveniente para realizar ingeniería de proteínas, por su mayor versatilidad en la manera de introducir los cambios en éstas.

Por otra parte, existen diversas metodologías que pueden agruparse en:

- 1) Mutagénesis generalizada, es decir, se realiza sobre todo el gene.
- 2) Mutagénesis región-específica, se efectúa sobre una porción del gene.

Con la mutagénesis región-específica es posible diseñar cuales y cuantos cambios se

introducirán en una porción deseada del gene e incluso a varias porciones en el mismo gene. Esto es importante ya que, los residuos de aminoácidos implicados en una función, por lo general se encuentran lejanos en la estructura primaria de la proteína, pero cercanos en la estructura tridimensional. Además, no siempre es posible predecir cual es el cambio o los cambios necesarios para lograr la función deseada, por lo que también es necesario mutagenizar por diversos aminoácidos en las regiones involucradas en la función. Una de las metodologías ampliamente utilizada que permite realizar, con este detalle y reproducibilidad, las modificaciones en las proteínas, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta consiste en la amplificación cíclica de un segmento de DNA a partir de oligonucleótidos que flanquean la zona elegida. Los oligonucleótidos pueden portar mutaciones que son introducidas al fragmento amplificado. La temperatura de la reacción es variada para permitir la desnaturalización, hibridación y polimerización del DNA. Este ciclo es repetido de manera cíclica, con lo que se logra amplificar el DNA de interés (34).

ANTECEDENTES

La enzima EcoRI es una proteína que se utiliza mucho en el estudio de la relación estructura-función de proteínas que interactúan con DNA ya que se conoce la estructura en complejo con su DNA blanco es de un tamaño mediano (277 aa.), se conocen muchos datos bioquímicos y genéticos, así como modelos experimentales que permiten estudiar su actividad *in vivo* e *in vitro*. En el laboratorio se cuenta con el gen de la endonucleasa EcoRI en un plásmido bajo el promotor inducible Lac UV5, y la metilasa en un plásmido compatible. Previamente en el laboratorio se realizó un estudio de mutagénesis combinatoria dirigida sobre residuos implicados en la especificidad de la endonucleasa. Este trabajo mostró que los residuos 144, 145 y 200 al ser modificados de manera combinatoria, no dan como resultado una proteína con la especificidad alterada (35). Los datos anteriores, la rectificación de la estructura tridimensional de la endonucleasa EcoRI, así como evidencia genética que involucraban a otros residuos en la especificidad guío a nuestro grupo a realizar una mutagenesis combinatoria de la zona implicada en el reconocimiento. Existe evidencia genética, bioquímica y estructural que soporta la implicación de esta zona en el reconocimiento (20).

OBJETIVOS

En este trabajo se eligieron tres zonas de residuos de aminoácidos a mutar:

- 1.- La posición R200, que se encuentra cerca de la guanina del sitio de reconocimiento.
- 2.-La zona 137-145, que es donde se observa una mayor superficie de contacto entre los residuos de aminoácido y el DNA.
- 3.-La posición 114 que se encuentra un poco alejada del DNA, pero en donde se conoce una mutante en este residuo de aminoácido que tiene alterada su especificidad (relajada).

La elección de estos residuos además, se basó en el hecho de que se encuentran conservados en RsrI, que es una enzima que reconoce la misma secuencia y es homóloga, con un 55% de residuos de aminoácidos idénticos (36).

El objetivo del trabajo es caracterizar la importancia de estas zonas en la determinación de la especificidad. De esta manera, se espera contribuir a determinar el mecanismo que contribuye a lograr la alta especificidad de esta proteína.

MATERIAL Y METODOS

Diseño de los oligonucleótidos mutagénicos y para amplificar el gen de la endonucleasa

EcoMut114

1) 5'-CTTTACCTTGNNG/C¹⁰TTTGGCTTCAGC-3'

EcoMut137-145

2) 5'AGATCAAGATCTNNG/C¹NNG/C²NNG/C³NNG/C⁴NNC/C⁵NNG/C⁶NNG/C⁷NNG/C⁸NNG/C⁹TCT
CATAAGAATATATCT-3'

EcoMut200

3) 5'-ATAATTAGGTGCAGTTAGTCGATCTAANNG/C¹¹ATTTAATATACCAGA-3'

EcoHindIII

4) 5'-GAAATAAATGAAGCTTTAAAAAAA-3'

EcoRevSec

5) 5'-AATGCTTTTGTCTTTATGATTAC-3'

El oligonucleótido 1 introduce mutaciones en el codon 114; el oligonucleótido 2 en los codones 137-145 y el 3 en el codón 200 del gen de la endonucleasa EcoRI. En la mayoría de los codones a mutar, se introduce una mezcla controlada del codón silvestre y de 32 codones, que codifican para los 20 aminoácidos (incluyendo, inevitablemente, un codón de término). Esta mezcla, al introducirse a tasas controladas, permite tener una población de mutantes cuya distribución incluye reemplazos sencillos, dobles y triples de manera mayoritaria. La porción de codón mutante se muestra en la Tabla 1, los números superiores en los oligonucleótidos

indican el codon que se mutó.

Construcción del plásmido pKGS meti

En el laboratorio se contaba con un plásmido donde se tenía el gen de la metilasa y la endonucleasa en *cis*, pero esta construcción no tenía sitios de restricción únicos que son importantes para la mutagénesis del gen de la endonucleasa. Para quitar los sitios no deseados (HindIII y PstI), se realizaron digestiones parciales con HindIII (a temperatura ambiente y en el buffer recomendado por el distribuidor) y se purificó la fracción que correspondía a plásmido lineal. Para destruir el sitio, se repararon sus extremos usando la enzima Klenow para posteriormente ligar el plásmido sobre sí mismo. Esto ocasiona que desaparezca el sitio. Para seleccionar las construcciones que perdieron el sitio adecuado, se transformó el plásmido y se seleccionaron aquellas transformantes que presentaban actividad. Este procedimiento se repitió con la enzima PstI. Cuando se quitaron los dos sitios, se validó por una doble digestión (HindIII/PstI).

TABLA 1

aa	codon	%	aa	codón	%
M137	NNG/C ¹	20%	I143	NNG/C ⁷	20%
A138	NNG/C ²	20%	E144	NNG/C ⁸	50%
A139	NNG/C ³	50%	R145	NNG/C ⁹	50%
G140	NNG/C ⁴	50%	R200	NNG/C ¹⁰	50%
N141	NNG/C ⁵	50%	H114	NNG/C ¹¹	100%
A142	NNG/C ⁶	20%			

Tabla 1. En esta tabla se muestra la proporción de la mezcla mutagénica (NNG/C) que se introdujó en cada codón a mutar. La porción restante corresponde al codón silvestre. Donde N representa una mezcla equimolar de las cuatro bases y G/C una mezcla equimolar de estas dos bases. Esto da como resultado una mezcla de 32 codones, entre los que se encuentran representados los 20 aminoácidos y uno de término. Además esta mezcla da como resultado codones que son utilizados preferencialmente en *E. coli*. La letra a la derecha del número del codón mutagenizado indica el aminoácido que codifica el codón original (A, alanina; R, arginina; N, asparagina; D, aspártico; C, cisteína; Q, glutamina; E, glutámico; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; L, leucina; K, lisina; M, metionina; F, fenilalanina; P, prolina; S, serina; T, treonina; W, triptofano; Y, tirosina y V, valina.

Para calcular el tamaño de la población a rastrear para obtener una mutante en particular se uso la siguiente formula:

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

Donde f es la frecuencia de aparición de una mutante en particular; N es el tamaño del banco a muestrear para obtener una mutante en particular y p es la probabilidad deseada de obtener una mutante en particular.

Introducción de las mutaciones en el gen de la endonucleasa EcoRI

Las mutaciones se crearon por medio de oligonucleótidos, usando la técnica de PCR. El diseño de los experimentos de PCRs se muestra en la Figura 6 y 7. Las condiciones de la PCR se dan en los pies de las mismas. Las condiciones de la reacción son las recomendadas por el distribuidor de la enzima Taq polimerasa (Promega).

El producto de la PCR cuando se usaron los oligonucleótidos EcoMut200 y EcoMut137-145 se digirió con las siguientes enzimas de restricción BglII/PstI. En este caso, las condiciones del medio de reacción fueron las siguientes: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl y 1 mM Ditolteritol, pH 7.5. La digestión se incubó a 37°C durante 12 hrs. Cuando el producto provino de la PCR que usó los oligonucleótidos EcoHindIII/EcoMut114/EcoRevSec, se digirió con HindIII/PstI en el siguiente buffer: 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl y 1mM DTT, pH 7.5.

Se verificó el tamaño del producto de la PCR y se purificó de gel de acrilamida al 7%. Para purificar se cortó la banda del gel y se eluyó durante 12 hrs. en 0.5 ml buffer BE (0.3 M acetato de sodio pH 4.8, 4 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8 y 0.2% SDS); se retiró el fragmento de acrilamida y el DNA contenido en el buffer de elucion se precipitó con etanol y se resuspendió en agua. El DNA se cuantificó en gel de acrilamida al 7%. Para visualizar el DNA se tiñó con bromuro de etidio (10 µg/ml).

El gen de la endonucleasa esta clonado en dos vehículos, el pKGS y pKGS

meti (Figura 8). La expresión del gen de la endonucleasa está bajo el control del promotor lac UV5. En el primer plásmido sólo se cuenta con la endonucleasa y en el segundo, la endonucleasa y la metilasa EcoRI. El gen de la endonucleasa que usamos porta una mutación (E160-D), que permite que una cepa pueda soportar la presencia del gen de la endonucleasa en ausencia de la metilasa EcoRI en condiciones de represión (37).

Para introducir las mutaciones en el gen de la endonucleasa (Figura 6 y 7), se digirió este con las enzimas adecuadas. En este caso, la purificación se realizó en gel de agarosa al 0.8%. Para purificar se corrió el gel en buffer TBE, se tiñó con bromuro de etidio y se cortó la banda. La banda se homogenizó haciéndola pasar por una jeringa, se le añadió 3 volúmenes de fenol y se mezcló. Se congeló durante 15 minutos en hielo seco-etanol y se centrifugó a 12 Krpm durante 15 minutos. Se tomó la fase acuosa (la orgánica se descarta). Se realizó una extracción fenol/cloroformo y se precipitó. Se resuspendió en buffer TB o agua y se cuantificó.

El producto digerido de la PCR se ligó con el plásmido digerido con las enzimas adecuadas, la relación molar de plásmido inserto fue 1:10. La reacción de la ligasa se realizó a 16°C durante 12 hrs, en buffer de reacción que contiene 66 mM de Tris-HCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de dithioritritol y 1 mM de ATP a pH 7.5.

El producto de la ligación se usó para electrotransformar células de *E. coli*.

Electrotransformación de células de *E. coli*

Para preparar las células competentes se creció un cultivo (1 l a 37°C y 200 rpm) a una D.O. de ≈ 0.6 a 560 nm. El cultivo se colocó en hielo durante 15 minutos. Se colectaron las células por centrifugación (5000 rpm a 4°C) y se resuspendieron en un volumen de agua estéril. Se repitió la centrifugación y se resuspendió en la mitad del volumen original. Se centrifugaron y se resuspendieron en 20 ml de glicerol estéril al 20%. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en 2 ml de glicerol al 20%, se tomaron alícuotas de 40 μ l y se congelaron en hielo seco-etanol. Se almacenaron a -70°C (38). Para transformar, se tomaron las células, se dejaron descongelar en hielo, se les adicionó el DNA para transformar y se colocaron en una celda de 1 mm de separación entre los electrodos. Se le aplicó un pulso de 1.6 kV, 25 μ sd y 200 ohms. Se resuspendieron en medio SOC (38) y se recuperaron durante 1 hora a 37°C, y se platearon en cajas de luria sólido que contenía el antibiótico adecuado para seleccionar las transformantes. Este método dió eficiencias de transformación del orden de 1×10^7 colonias/ μ g de DNA superenrollado.

Métodos de selección de mutantes

Selección por medio de fenotipo

Este método se basa en el siguiente fenómeno: cuando una célula porta el gen silvestre (nosotros le llamamos silvestre, pero porta una mutación en la posición 160) de la endonucleasa en ausencia de la metilasa, el crecimiento de la célula es pobre (plana) y la colonia es translúcida (baja densidad celular). Cuando se induce la expresión del gen, la célula muere, debido a que el DNA de la célula es cortado por la

endonucleasa. De esta manera, se pueden detectar aquellas mutantes que preservan actividad, por el fenotipo que presenta la colonia: entre más activa sea la mutante, menor es el crecimiento de la colonia (35). En un experimento se transforman células de *E. coli* (JM101), con la mezcla de plásmidos mutantes y se seleccionan en cajas de luria sólido con 25 µg/ml de kanamicina. Se toman aquellas colonias que muestren una baja densidad celular (indicativo de la actividad de la endonucleasa). A las mutantes seleccionadas se les analiza el comportamiento que muestran cuando se induce la expresión del gen, ésto se logra con 0.5 mM de IPTG. Dependiendo de la actividad de la mutante, la colonia presentará diversos grados de crecimiento; cuando es muy activa la colonia no crecerá. Este método permite seleccionar mutantes con una especificidad alterada, ya que al estar presente la metiltransferasa, la enzima silvestre no muestra un efecto deletéreo sobre la colonia que la expresa. Una mutante con especificidad alterada, alterará el crecimiento de de la célula, ya que estará cortando en otras secuencias.

Selección por medio de la respuesta SOS

Este ensayo se basa en el fenómeno siguiente: cuando una célula bacteriana sufre daño de su DNA ó esta bajo condiciones de estrés, se desencadena una respuesta conocida como SOS. En esta respuesta se activa la transcripción de por lo menos 20 genes que intervienen en la reparación del DNA y otras funciones. Todos estos genes responden a la activación que se da por la degradación del represor LexA. Así, se cuenta con una cepa de *E. coli* (JH39) que tiene una fusión transcripcional, donde los genes estructurales del operón lac se encuentra bajo la

regulación de un promotor que se activa durante la respuesta SOS (Esta cepa fué donada por el Doctor Joseph Heitman de la Universidad Duke, Carolina del Norte) (39). En esta cepa el daño al DNA puede ser cuantificado por medio de la actividad de la enzima β -galactosidasa. Así, cuando las células expresan la endonucleasa EcoRI silvestre, desencadenan la respuesta SOS. Todo esto permite visualizar aquellas mutantes activas por medio del color azul que confiere a las colonias la expresión de la β -galactosidasa cuando crece en un medio con X-Gal. En un ensayo, se electroporan las células con la mezcla de plásmidos mutantes, se seleccionan las transformantes en cajas de Luria sólido con 25 μ g por ml de kanamicina y 30 μ g/ml de X-Gal. Se seleccionan aquellas transformantes cuyas colonias sean azules, que es un indicativo de la actividad de la endonucleasa.

Secuencia de los genes mutantes

Para secuenciar las mutaciones se usó el método de Secuenciana (USB). Las condiciones usadas son las recomendadas por el distribuidor. Solo se secuenció el fragmento HindIII/PstI, que es el que se genera durante la PCR.

Validación del genotipo

Para verificar que el genotipo secuenciado genera el fenotipo observado, se realizó la digestión HindIII/PstI del gen mutante y se purificó el fragmento menor, que porta las posiciones mutadas. Este fragmento se sustituyó en un gen silvestre que fué digerido con estas enzimas y se caracteriza nuevamente el fenotipo. De esta manera

se prueba que el fenotipo observado es causado por mutaciones presentes en la región secuenciada.

Purificación parcial de las endonucleasas mutantes

Para semipurificar la enzima, se creció un cultivo (100 ml a 37°C y 200 rpm) de la cepa que porta el gen de la endonucleasa. Cuando el cultivo alcanzó una D.O. de ≈ 0.5 a 560 nm, se le agregó IPTG (0.5 mM) para inducir la expresión de la endonucleasa. Se continuó con el crecimiento durante 30 minutos y se colectaron las células. Las células se resuspendieron en 0.5 ml de buffer de extracción BE (48), se sonicaron (3 pulsos de 30 segundos) y se centrifugaron a 12 Krpm (15 minutos) en el cuarto frío. Se tomó el sobrenadante que se aplicó a una columna de fosfocelulosa. Se eluyó con un gradiente de NaCl (0.2-1 M) y se colectaron fracciones de 0.5 ml. Se determinó la actividad usando como sustrato un plásmido (pMC9) que posee sitios de restricción para la enzima. Se observaron los fragmentos resultantes en gel de agarosa. Se juntaron las fracciones que poseían actividad y se pasaron por una columna de hidroxapatita. Se eluyó la enzima con buffer de extracción con 0.2 M de fosfato de potasio. Las fracciones que poseían actividad de corte se juntaron y se dializaron contra el buffer de extracción con glicerol al 50%. La enzima se almacena a -20°C (48).

Ensayos de actividad *in vitro*

Para los ensayos se usó la enzima semipurificada (1 a 2 μ l) y se realizaron a temperatura ambiente ó a 37°C. Las condiciones del buffer de reacción así como la cantidad de sustrato se dan en el pie de cada figura.

Preparación de los sustratos utilizados

Se utilizaron los siguientes sustratos para los ensayos de actividad:

1: 5'-TCGCAGAATTCTGCCGG-3' (17nt)

2: 5'-TCCGGCAGAATTCTGCG-3' (17nt)

Estos oligonucleótidos son complementarios entre sí, y el sitio de corte se encuentra fuera del centro, para así, poder diferenciar qué cadena se corta.

Se fosforiló uno de los oligonucleótidos con γ^{32} P ATP marca (actividad específica 40 μ Ci). Se tomaron cantidades equimolares de cada oligo y se juntaron, se calentó a 65°C durante 3 minutos y se dejó que la temperatura bajara para que se realice la hibridación. Se verificó por medio de gel de acrilamida (12.5%) que se vea exclusivamente el duplex. Para determinar el corte o unión a proteína se somete el gel a autoradiografía, para así ver el duplex y los productos. También se utilizó plásmido (pMC9) que tiene dos sitios de corte para la enzima EcoRI como sustrato. Este se purificó por el método de lisis alcalina (49).

Ensayo de unión in vitro

Para este ensayo se utilizó la técnica de retardamiento en gel (41). Esta se basa en el hecho que el DNA muestra una menor movilidad cuando se encuentra unido a una proteína. Para esta técnica se toma la proteína y se le agrega el DNA (el oligo usado para ver actividad marcado con ^{32}P), en un medio de reacción sin Mg^{++} (para evitar que ocurra hidrólisis). Se deja 30 minutos para que se forme el complejo DNA-proteína (en este caso no se compitió con DNA no específico) y se carga la muestra en un gel de acrilamida (12.5%) que se corre a 100 mV. Se expone el gel y se detecta el complejo específico.

CREACION DEL BANCO DE GENES MUTANTES DE LA ENDONUCLEASA EcoRI EN LAS POSICIONES 137-145 Y 200

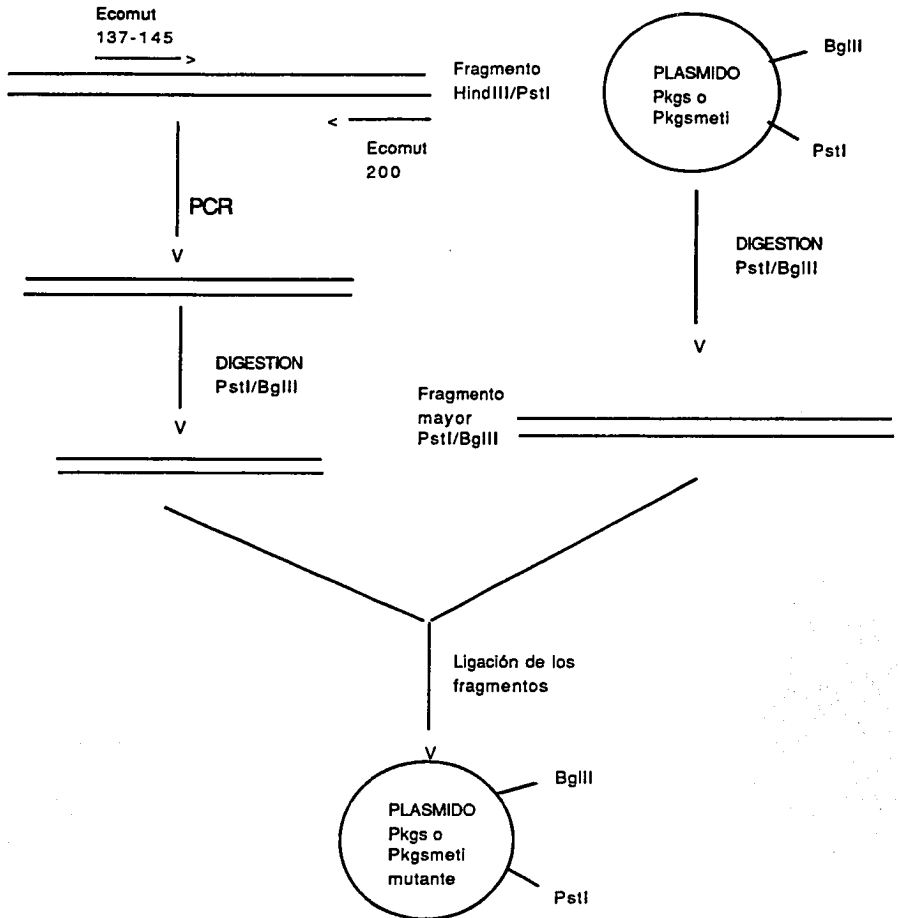


Figura 6. Diseño de la mutagenesis para la creación del banco de mutantes en los residuos de aminoácido 137-145 y 200 de la endonucleasa EcoRI. La mutagenesis se realizó por medio de PCR, usando los oligonucleótidos Ecomut 137 y Ecomut200. Las condiciones de la reacción son las recomendadas por el distribuidor. Las condiciones de la PCR son las siguientes; primero 5 ciclos de 1 minuto a 92°C; 1 minuto a 48°C y 3 minutos a 72°C; y 25 ciclos de 1 minuto a 92°C; 1 minuto a 55°C y 3 minutos a 72°C.

ESTRATEGIA DE MUTAGENESIS DEL RESIDUO 114 DE LA ENDONUCLEASA EcoRI

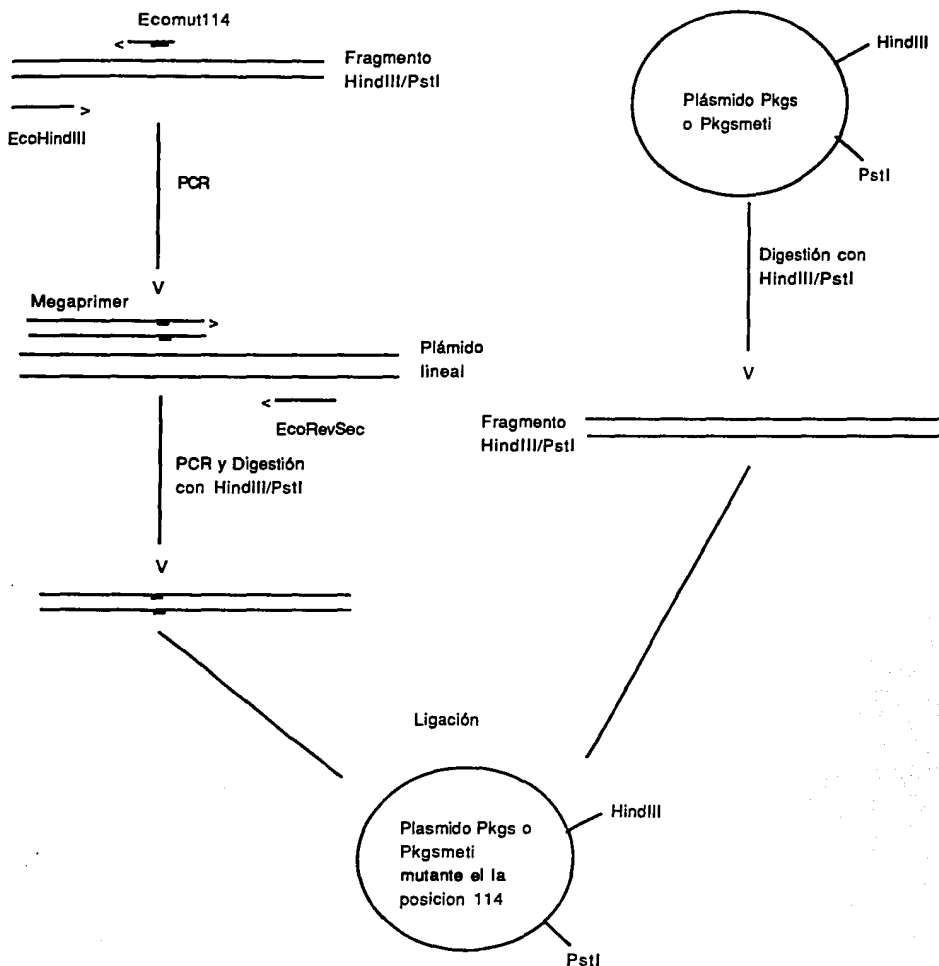


Figura 7. Estrategia de la mutagenesis de la posición 114. En la figura se muestran los oligonucleótidos utilizados para mutar la posición 114. En esta mutagenesis se realizaron dos PCR para producir el fragmento que se intercambia en el gen silvestre. Las condiciones de reacción de la PCR son las recomendadas por el distribuidor. Las condiciones de las pCRs son las siguientes, 30 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C y 3 minutos a 72°C.

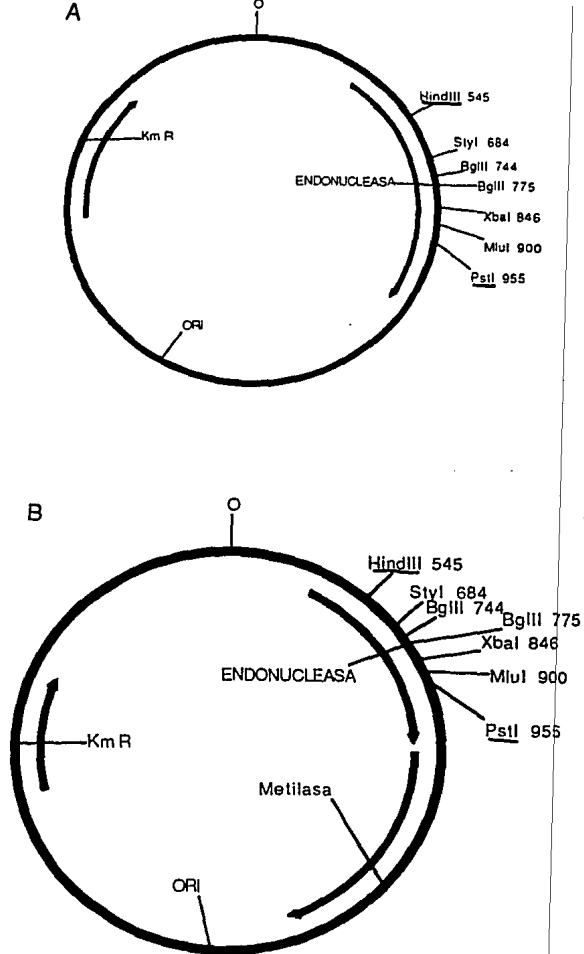


Figura 8. Plásmidos pKGS y pKGS Meti.

El plásmido pKGS Meti es un derivado del pKGS al cual se le clonó el gen de la metiltransferasa EcoRI. Este plásmido se rediseñó en el presente trabajo, ya que no presentaba algunos sitios únicos que eran importantes para el desarrollo del trabajo. A)pKGS. B)pKGS Meti.

RESULTADOS

Mutagénesis

La busqueda de mutantes con actividad o relajamiento de especificidad se realizó por medio del fenotipo que presenta la colonia (crecimiento reducido ó color azul). En la Tabla 2 se muestran las mutantes seleccionadas y su actividad comparada contra la enzima silvestre. Se seleccionaron 12 mutantes, 8 (1B, 3B, 7B, 4A, 6A, 8A 13A y 37A) de las cuales provienen de una población de 1×10^5 transformantes. Las cuatro restantes provienen de un población de 200 transformantes. Además, se encontró solo una mutación no diseñada y una mutación silenciosa (cambio de codón y no de aminoácido) (Gly 140) (datos no mostrados). Las mutantes seleccionadas se pueden dividir en dos grupos. El primer grupo comprende a las mutantes que presentan una actividad no letal a la célula en condiciones de inducción: 1B, 4A y 13A. El segundo grupo comprende a las mutantes que no permiten el crecimiento de la célula en condiciones de inducción. Este grupo se puede dividir en mutantes que muestran una actividad sensible a la presencia de la metilasa (7B, 8A, y 37A) y mutantes que muestran una actividad no sensible a la presencia de la metilasa (3B, 6A, 1, 2, 3 y 7). El criterio de selección no permite saber si las mutantes que muestran una actividad no sensible a la presencia de la metilasa estan cortando en otros sitios ó es por otro fenómeno la muerte celular (precipitación).

Existen dos bancos de mutantes: el primero comprende una zona de 10 residuos de aminoácidos (137-145 y 200). El segundo banco solo comprende el residuo 114 (his). La frecuencia de mutantes con actividad en el primer banco es muy

baja (8 de 1×10^5 transformantes). El segundo banco presenta más mutantes con actividad, casi el 33% de ellas eran activas en presencia de la metilasa y un 90 % en su ausencia (datos no mostrados).

Actividad *in vitro*

De las 12 mutantes seleccionadas se eligieron 3 para su caracterización *in vitro*. Los criterios para la selección se basaron en la presencia de actividad hacia el sitio canónico a pesar de haber perdido la mayoría de los contactos con las bases (mutante 8A, que es una mutante en tres posiciones, éste origina que sólo pueda establecer la mitad de los puentes de hidrógeno con el sitio canónico). Otro criterio es la presencia de actividad no sensible a la metilación por la metiltransferasa EcoRI. Varias mutantes cumplen este criterio, por lo que sólo se seleccionaron dos: mutante 3B (que es una doble mutante) y mutante 3 (que es mutante sencilla).

Purificación parcial

Para poder caracterizar las mutantes se realizó una purificación parcial de ellas. En la Figura 9 se muestra dos fracciones de la mutante 3 (H114F) colectadas de la columna de hidroxapatita. En el carril 1 se muestra marcadores de peso molecular y en los carriles 2 y 3 fracciones que presentaban actividad de la endonucleasa EcoRI. La endonucleasa migra como el marcador de 29 kDa. La fracción del carril 3 presenta más proteína EcoRI. Es importante hacer notar que existen varias proteínas contaminantes en la preparación, pero estas fracciones son libres de actividad inespecífica, ya que no hay degradación del DNA usado como sustrato.

Digestión de plásmido (pMC9)

Para poder observar la actividad de corte de las mutantes, se realizaron digestiones de plásmido. Se seleccionó el plásmido pMC9, ya que, presenta dos sitios de corte para la endonucleasa EcoRI. Es importante hacer notar, que ya que no se tenía a las proteínas purificadas a homogeneidad, no se usaron cantidades iguales de cada una de las proteínas. En la Figura 10 se muestra el patrón de corte de las mutantes y la enzima silvestre. En el panel A (carriles 1-6) se muestra reacciones realizadas en buffer normal y en el panel B se muestran las reacciones realizadas en buffer estrella. Los carriles 1 y 7 muestran el plásmido sin digerir. Los carriles 2 y 8 digestión con la enzima comercial. Los carriles 3 y 9 la digestión con la enzima silvestre purificada por nosotros. En este caso se observa que en condiciones de buffer estrella (carril 9), la enzima genera un patrón diferente de corte. Los carriles 4 y 10 muestran el patrón de corte generado con la mutante 3 (H114F). Se observa que en ambas condiciones se genera un patrón diferente de corte la de la enzima silvestre. El corte en condiciones estrella (carril 10) da menos fragmentos y de menor tamaño que en condiciones normales. En los carriles 5 y 11 se muestra el patrón de corte de la mutante 3B (doble mutante) que en general no muestra un patrón de corte diferente al silvestre en condiciones normales. Llama la atención que en condiciones estrella no genera un patrón de corte diferente (carril 11). Los carriles 6 y 12 muestran el patrón de corte de la mutante 8A (triple mutante), en condiciones normales casi no muestra actividad (carril 6). En condiciones estrella muestra una mayor actividad, pero el patrón se parece al de la enzima comercial (carril 8). Este experimento, demuestra que la mutante 3 (H114F) tiene una actividad relajada y que las otras dos mutantes tienen

una actividad pobre, pero no muestran un patrón de corte diferente al silvestre.

Digestión de oligonucleótido de doble cadena

Para observar la actividad de corte sólo sobre el sitio canónico se realizaron digestiones de oligonucleótidos(oligos). El usar oligos como sustrato ayuda a observar velocidades relativas de corte sin la interferencia de corte sobre otras secuencias ó asociaciones con otras secuencias de manera inespecífica. En la Figura 11 se muestra el corte de oligonucleótido con respecto al tiempo. En el carril 1 se muestra el oligonucleótido sin digerir. El panel 1 muestra el corte de la enzima comercial (carriles 2-4), el panel 2 el corte de enzima silvestre purificada por nosotros (carriles 5-8), el panel 3 el corte de la mutante 3 (H114F) (carriles 9-12), el panel 4 el corte de la mutante 3B (mutante doble) (carriles 13-16) y panel 5 el corte de la mutante 8A (mutante triple) (carriles 17-19). En cada caso son los siguientes tiempos: 10, 20, 30 y 60 minutos, menos en la enzima comercial y la mutante 8A, en los cuales sólo se llegó a 30 minutos de digestión.

Se observa que la enzima silvestre purificada por nosotros y la mutante 3 (H114F) (panel 2 y 3) tienen una mayor actividad de corte (aún mayor que la comercial). Las mutantes 3B (doble mutante) (panel 4) y la mutante 8A (mutante triple) (panel 5) muestran una pobre actividad. Siendo la más pobre la mutante 8A (mutante triple) que casi no muestra actividad de corte. Estos resultados se deben tomar con reserva, ya que no se usaron cantidades semejantes de enzima. Pero se puede observar que todas las mutantes presentan actividad de corte.

Efecto de Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ en la catálisis de las endonucleasa

Para observar el efecto de variar el cofactor (Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺), así como la concentración de los mismos (1.25, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM), se realizaron digestiones de plásmido (pMC9) con las endonucleasas. En la Figura 12 se muestra el patrón de corte observado. También se muestra una representación gráfica del patrón de bandas observado para mayor claridad.

El gel A muestra el efecto de variar la concentración de Mg⁺⁺ en la reacción. El panel 1 es la enzima silvestre, el panel 2 la mutante 3 (H114F), el panel 3 la mutante 3B (doble) y el panel 4 la mutante 8A (triple mutante). Se observa que la concentración de Mg⁺⁺ afecta la velocidad de reacción. A bajas concentraciones (1.25 mM) se observa una actividad nula (carriles 1, 6, 11 y 16). Al ir aumentando la concentración del cofactor se observa un aumento en la catálisis. Llama la atención que las mutantes 3B (mutante doble) y 8A (mutante triple) no muestran una actividad alta. Esto se refleja en que no logran cortar de manera total el plásmido. La mutante 3 (H114F) muestra que al ir aumentando la concentración del cofactor presenta una actividad estrella mayor.

El gel B muestra el patrón de corte generado en presencia de Mn⁺⁺. El panel 5 es la enzima silvestre, el panel 6 la mutante 3 (H114F), el panel 7 mutante 3B (mutante doble) y el panel 8 mutante 8A (mutante triple). Se observa que la enzima silvestre necesita más Mn⁺⁺ que Mg⁺⁺ para ser activa (5 mM) y que a altas concentraciones de Mn⁺⁺ se inhibe la actividad (panel 5). La mutante 3 (H114F) muestra una menor requerimiento de Mn⁺⁺ que la enzima silvestre (2.5 mM) y también se observa que al aumentar se inhibe la reacción (panel 6). La mutante 3B (mutante doble) muestra una

pobre actividad de corte, parece que solo relaja al plásmido (corte de una sola hebra) (panel 7). La mutante 8A (mutante triple) muestra poca actividad, a bajas concentraciones produce plásmido relajado y al ir aumentando la concentración se produce la forma lineal (panel 8). se observa que también existe una concentración óptima de Mn^{++} para la actividad (5 mM). En este último caso es más notorio que existe un una concentración óptima, ya solo a una concentración se observa mayor actividad, en los otros casos hay actividad alta en varias concentraciones.

Unión de las enzimas a oligonucleótido

Para observar si las mutantes se unen a DNA que posee el sitio canónico, se realizaron ensayos de unión. Esto se logró por medio de el cambio en la movilidad en gel que presenta el DNA cuando presenta unida la proteína. En la Figura 13 se muestra la autoradiografía de los complejos observados con nuestras proteína parcialmente purificadas. En el carril 1 se muestra el oligonucleótido de doble cadena. En el carril 2 se muestra el efecto que se produce cuando se le adiciona la enzima comercial, se observa el retardamiento de una fracción del oligonucleótido (oligo más proteína). En el carril 3 el efecto de la proteína silvestre purificada por nosotros. En este caso se retiene todo el oligonucleótido. En el carril 4 el efecto de la mutante 3 (H114F), en este caso se retiene todo el oligonucleótido. En el carril 5 se muestra el efecto de la mutante 3B (mutante doble). Está mutante presenta un comportamiento diferente, se observa un barrido entre el oligo libre y el complejo, esto puede indicar que se disocia el complejo durante el experimento. Además se observa una banda de retardamiento de mayor tamaño, que se puede deber a que

exista un complejo con más proteína asociada (tetramero en lugar de dímero) ó proteína precipitada. En el carril 6 se muestra el efecto de la mutante 8A (mutante triple), en este caso sólo una porción del oligo se retiene. Cuando sólo una porción del oligo se retiene se puede deber a que exista poca proteína, pero en general las cantidades utilizadas de enzima no son tan diferentes como para explicar este fenómeno en el caso de la mutante 8A.

TABLA 2

Fenotipo y genotipo de las mutantes

MUTANTE	GENOTIPO ¹	REPRESION ²		INDUCCION ³	
		M ⁻	M ⁺	M ⁻	M ⁺
WT	----	++	++++	-	++++
1B ⁴	A142V	+++	ND	++	ND
3B ⁴	N141S E144A	++++	++++	-	-
7B ⁴	N141C	+++	ND	-	ND
4A ⁵	R145K	+++	++++	++	+++
6A ⁵	E144S	++	++++	-	-
8A ⁵	N141S E144G R145G	+++	++++	-	++++
13A ⁵	N141G	++++	ND	++	ND
37A ⁵	A138V R145G	++	++++	-	++++
1 ⁶	H114T	ND	+++	ND	-
2 ⁶	H114Y	ND	+++	ND	-
3 ⁶	H114F	ND	+++	ND	-
7 ⁶	H114S	ND	+++	ND	-

1=El fenotipo se denota por el residuo de aminoácido silvestre a la derecha, seguido del número del aminoácido en la proteína madura y por último el residuo de aminoácido que sustituye al silvestre. Para denotar cada residuo de aminoácido se usa el código de una sola letra. 2=Las condiciones de represión son en ausencia del inductor. 3=Las condiciones de inducción son en presencia de 1 mM de IPTG. 4=Mutante aislada por el fenotipo de la colonia. 5=Mutante aislada por respuesta SOS. 6=Mutante aislada por presentar actividad insensible a la presencia de la metilasa EcoRI. M⁺=El gen *ecoRIM* complementado in *cis*. M⁻=La célula solo expresa la endonucleasa y no la metilasa. ND=no determinado, pero sensitivo a la metilasa in *trans*. ++++=Colonia de crecimiento normal. ++=Colonia de tamaño normal, pero translúcida. +=Colonia de tamaño pequeño y tanslúcida. -=No hay crecimiento

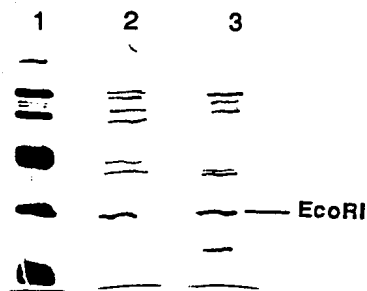


Figura 9. Gel de proteínas de la endonucleasa EcoRI purificada parcialmente.

En el carril 1 se muestran marcadores de peso molecular (miosina, 200kDa; fosforilasa b, 97.4 kDa; BSA, 68 kDa; ovalbumina, 43 kDa, anhidrasa carbónica, 29 Kda y β -lactoglobina, 18.4 kDa). Los carriles 2-3 muestran fracciones de la mutante 3 (H114F) colectadas de la columna de hidroxapatita. El gel de proteínas es de acrilamida al 10%, denaturalizante (SDS). Se tizó con azul de coomassie.

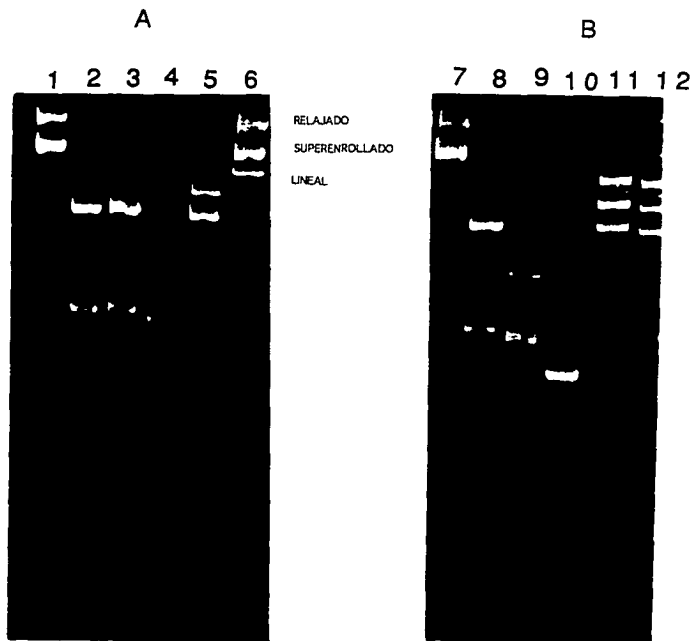


Figura 10. Digestiones del plásmido pMC9 con las enzimas parcialmente purificadas.

Panel A condiciones de reacción normales, Panel B condiciones estrella. Carriles 1 y 7 plásmido sin digerir. Carriles 2-6 digestiones en buffer normal de las enzimas comercial, silvestre, 3, 3B y 8A respectivamente. Carriles 8-12 digestiones en buffer estrella de las enzimas comercial, silvestre, 3, 3B y 8A respectivamente. Gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. Tiempo de digestión 12 horas. Buffer normal (100mM Tris HCl, pH7.5; 5mM MgCl₂ y 50 mM NaCl). Buffer estrella (25 mM Tris HCl, pH 8.5; 2 mM MgCl₂ y 5% de glicerol).

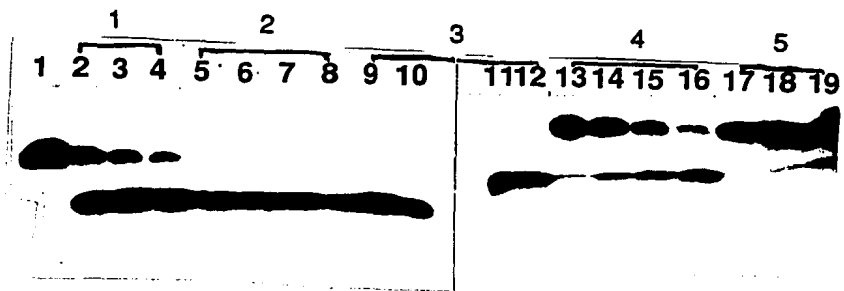


Figura 11. Corte de oligonucleótido de doble cadena con las endonucleasas.

El DNA fué incubado con la enzima durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones fueron iniciadas por la adición de Mg^{++} y se tomaron muestras a varios tiempos. Carril 1 oligonucleótido sin digerir. Carriles 2-4 enzima silvestre comercial (panel 1) (10, 20 y 30 minutos). Carriles 5-8 enzima silvestre purificada (panel 2) (10, 20, 30, y 60 minutos). Carriles 9-12 mutante 3 (panel 3) (10, 20, 30 y 60 minutos). Carriles 13-16 mutante 3B (panel 4) (10, 20, 30 y 60 minutos). Carriles 17-19 mutante 8A (panel 5) (10, 20 y 30 minutos). El gel es de acrilamida al 20%, 8 M de urea.

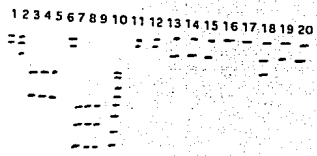
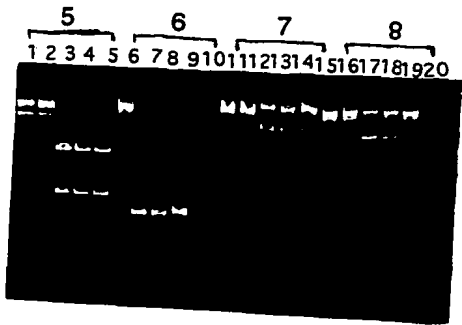
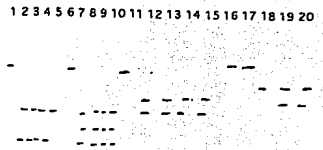
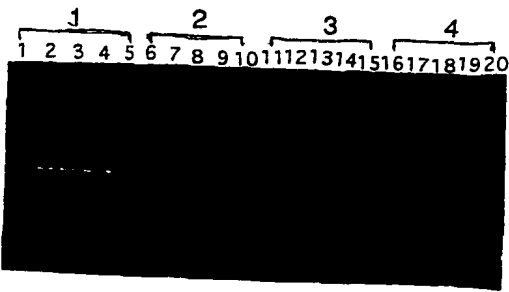


Figura 12. Efecto del Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺ en la actividad de las endonucleasas.

En la parte superior se muestra el efecto de diferentes concentraciones de Mg⁺⁺. En la parte inferior se muestra el efecto de diferentes concentraciones de Mn⁺⁺. Gel superior e inferior; carriles 1-5, enzima silvestre (paneles 1 y 5); carriles 6-10, mutantes 3 (paneles 2 y 6); carriles 11-15, mutantes 3B (paneles 3 y 7) y carriles 16-20, mutante 8A (paneles 4 y 8). En cada enzima las concentraciones ensayadas son 1.25, 2.5, 5, 7.5 y 10 mM respectivamente. La digestión se realizó sobre el plásmido pMC9. Para mayor claridad en la parte derecha del gel se muestra una representación gráfica del patrón de corte generado por los mutantes.

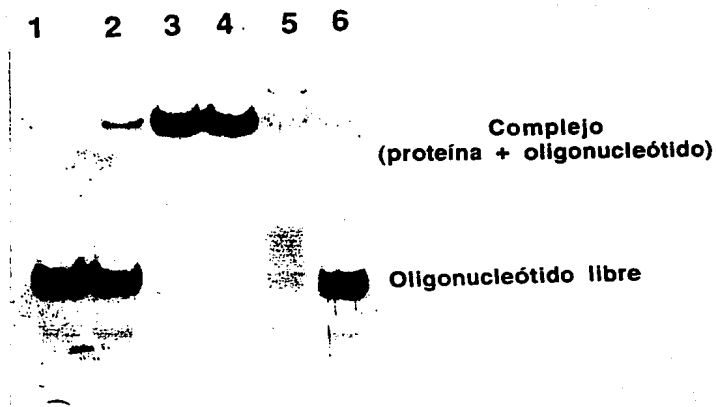


Figura 13. Ensayo de cambio de movilidad.

Las muestras de la proteína semipurificada y el oligonucleótido (marcado con ^{32}P) fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Carril 1 oligonucleótido solo. Carril 2, oligonucleótido más enzima comercial. Carril 3, oligonucleótido más enzima silvestre. Carril 4, oligonucleótido más mutante 3B (mutante doble). Carril 5, oligonucleótido más mutante 3B (mutante doble). Carril 6, oligonucleótido más mutante 8A (mutante triple). El gel es de acrilamida al 12.5% nativo. Se detectó por medio de autoradiografía.

Discusión

El objetivo de este trabajo fue evaluar la contribución en la especificidad de varios residuos de aminoácidos de la endonucleasa EcoRI que se encuentran cercanos o contactando el DNA blanco. Además se buscó la creación de mutantes con una nueva especificidad. Es necesario señalar que cambio de especificidad es cuando la proteína se une a una nueva secuencia con una afinidad mayor que sobre el sitio canónico. Cuando solo se logra que se una a otra secuencia, pero la secuencia conónicas es aún preferida, se habla de una ampliación o relajamiento de la especificidad (42).

En el presente trabajo se crearon dos bancos de mutantes, los productos mutantes portan las alteraciones en regiones que se encuentran cercanas al DNA. El primer banco (137M-138A-139A-140G-141N-142A-143I-144E-145R y 200R) es combinatorio ya que se estan mutando varios residuos al mismo tiempo (ver Tabla 1). En el segundo banco solo se mutó un codón (H114). La primera mutagénesis no fue a saturación ya que existe una porción del codon silvestre, en el segundo banco la mutagénesis fue a saturacion (NNG/C). En el primer banco se introdujo una porción de codón silvestre con el fin de poder tener una población pequeña donde se puedan ver las mutaciones sencillas, dobles y casi todas las triples. Si no se hace esto, la mayoría de las mutantes serían múltiples, si se hiciera una mutagénesis a saturación en 10 sitios, el total de mutaciones posibles (20^{10}) sería imposible de rastrear, y las mutantes activas se esperarían en una frecuencia baja.

La eficiencia de las mutagénesis fue bastante aceptable, ya que no se observó

la presencia de actividad silvestre y las mutantes que se encontraron portaban pocos cambios. Además, en el caso del banco de la posición 114, el método de selección permite excluir la posible presencia de la enzima silvestre. Esto se debe a que se selecciona una actividad que no está presente en la enzima silvestre (actividad en presencia de la metilasa). Por último es importante mencionar que solo se detectó una mutante con cambios en una posición no diseñada. Esto es importante ya que se ha reportado que la tasa de error de la Taq DNA polimerasa es alta, pero en este caso como se selecciona por actividad y el producto generado es pequeño (≈ 400 pb), la introducción de mutaciones por la enzima es baja (43).

Los residuos mutados de manera combinatoria (137-145 y 200) comprenden un segmento estructurado y las porciones amino terminal de dos α -hélices (Figura 5). Estos residuos se encuentran cercanos al DNA y algunos de ellos han sido propuestos a interactuar de manera directa con el DNA. En este banco no hemos detectado mutaciones sencillas en algunas posiciones (ej 200), esto es notorio, dado que se han reportado mutaciones en esta posición que preservan actividad (44). Esto se puede explicar por la existencia de varios factores que afectan el banco. En primer lugar la cantidad de secuencias que se generan en el banco es muy alta (1.024×10^{13}), así que para tener representadas todas las secuencias es necesario tener una alta cantidad de DNA (aproximadamente 3 μg de producto es necesario para tener representadas una vez todas las secuencias) y tasas de transformación que no se logran en la práctica. Este problema no es tan grave, ya que al introducir el codón silvestre, se logra que las mutaciones sencillas, dobles y triples estén sobrerrepresentadas, lo cual no concuerda con la falta de mutaciones sencillas

observada en algunas posiciones. Otra posibilidad es que no se haya muestreado bien el banco, por lo que no se encontraron estas mutantes (se observó aproximadamente una población de 1×10^5 mutantes), pero de acuerdo a datos estadísticos (ver Tabla 1), en esta población se encontraban representadas todas las mutaciones sencillas, dobles y casi todas las triples (45). La falta de mutantes en posiciones en las cuales no se han reportado mutantes con actividad se puede deber a que son importantes en la actividad de la enzima. Esto se ve apoyado por el hecho de encontrar una mutación silenciosa (cambio de codón, pero no de aminoácido) en la glicina de la posición 140. Este aminoácido está contactando al esqueleto del DNA por medio de la cadena principal, así que al parecer cualquier otro aminoácido altera la interacción con el DNA. Además existe evidencia reportada, donde cambios de aminoácidos en esta zona dan como resultado una proteína sin actividad (46).

La segunda mutagénesis comprende un solo residuo (H114) que se encuentra en una β -plegada, que comunica la catálisis y el reconocimiento (Figura 5). Este residuo no contacta el DNA, pero su alteración influye en la especificidad (32). Esta mutagénesis es más segura de muestrear ya que sólo se modificó un residuo, lo que permite tener las 19 mutaciones en un banco pequeño. Además el hecho de que al secuenciar se encontrara mutaciones repetidas indican que las cuatro mutantes insensibles a la presencia de la metilasa, son las únicas que dan esta actividad (Tabla 2).

Las mutagénesis anteriormente realizadas sobre las zonas incluidas en este trabajo no ha analizado de manera sistemática la importancia de estos residuos. Esto se debe a que la mayoría de los estudios realizados se concentraron solo en algunos

residuos presentes en esta zona y solo se sustituyo por otro residuo de aminoácido (44). Cuando se comenzó este estudio, no se contaba con muchos datos para la elección de la zona a mutar: se conocía la estructura tridimensional de la endonucleasa en complejo con su DNA específico (solo carbonos alfa), por lo que la elección de la zona 137-145 y 200 se basó en la cercanía que presentaba con el DNA. Además, existían datos genéticos que apoyaban la posible existencia de contactos de esta zona con el DNA. Actualmente, se han acumulado una serie de datos que apoyan la validez de la importancia de esta zona en la actividad de la proteína (31).

A continuación analizaremos el comportamiento de algunas mutantes. Es necesario recalcar que los resultados de experimentos *in vitro*, se deben tomar con cautela. Esto se debe a que no se usaron las mismas cantidades de cada enzima.

La mutante 3B (N141S y E144A) muestra poca actividad *in vivo* (translúcida y plana) cuando se encuentra reprimida su expresión y es deletéreo cuando se induce la expresión (Tabla 1). En un primer momento pensamos que el efecto observado se debía a que la proteína se precipitaba y esto podía ocasionar la muerte de la célula, este fenómeno se ha reportado con una mutante en la posición 200 (44). Cuando se analizó su comportamiento *in vitro*, se observó una alteración en la vida media del complejo entre la mutante y el DNA que presenta el sitio de unión (Figura 13). Esto se manifiesta como un barrido en el gel. Además, se observa que la mutante forma un complejo de mayor tamaño, lo cual no podemos explicar de manera adecuada (quizá se deba a que se formen tetrámeros de la proteína, pero esto no lo comprobamos). Por último, la mutante muestra actividad de corte (Figura 10 y 11), esta actividad es

pobre, pero detectable. El patrón de corte cuando se utiliza un sustrato con dos sitios, es idéntico al de la enzima silvestre (figura 10). Cuando se compara la actividad *in vitro* con respecto la silvestre se observa una actividad baja (Figura 10 y 11). Está mutante además muestra un comportamiento distinto a la silvestre respecto al efecto de distintas concentraciones de los cofactores Mg^{++} o Mn^{++} , siendo sus requerimientos de Mn^{++} mayores que de Mg^{++} (Figura 12). En la actualidad estamos caracterizando en mayor detalle esta mutante, para así poder dar una explicación mas exacta de su comportamiento.

La mutante 6A (E144S) no se analizó en mayor detalle, pero es interesante hacer notar que esta ya se había aislado anteriormente por otros grupos (incluyendonos) y no se había detectado actividad de este tipo. Así, que este efecto se puede deber a que en el actual trabajo se usa una construcción diferente, en la cual la metilasa se encuentra en el mismo plásmido.

En esta mutagénesis también se obtuvo una mutante que ha perdido la mitad de los puentes de hidrógeno que se han propuesto se establecen entre la proteína y el DNA. Esta mutante es la 8A (N141S, E144G y R145G), que muestra una actividad sensible a la presencia de la metilasa (Tabla 2). En represión es poco activa y cuando se induce no permite el crecimiento de la célula en ausencia de la metilasa. Esta mutante muestra una pobre unión a DNA que contiene la secuencia canónica (Figura 13), además de tener una baja actividad de corte (Figura 10 y 11). Su comportamiento es sensible a la concentración de Mg^{++} presente en el medio (Figura 12). La actividad de esta mutante muestra una concentración óptima de Mn^{++} , fenómeno no detectado en otras mutantes (Figura 12). El comportamiento de esta mutante se puede tratar de

explicar de la siguiente manera. A pesar de haber perdido estos contactos, conserva otros que aún mantienen la especificidad. La pobre unión observada se puede deber a que los residuos cambiados contribuyen a la energía de unión y al no existir estos contactos disminuya su afinidad.

La mutante 3 (H114F) demuestra que es posible alterar la especificidad cuando se modifican residuos de aminoácidos que no contactan al DNA. Este residuo forma parte de una β -plegada que se encuentra atrás de los segmentos implicados en contactos directos con el DNA. El residuo 113 (lys) está involucrado en la catálisis y el residuo 115 (gln) en interacción con el DNA, al estar entre ellos el 114 (his) se supone que está involucrado en la transducción de la señal de reconocimiento para dar lugar a la catálisis. Se ha reportado un estudio donde se muta el residuo 115 y se demuestra que está involucrado en catálisis y reconocimiento (47). Así, el papel del residuo 114 se puede deber a que altere también esta conexión, ya sea de manera directa o indirecta. Actualmente no podemos responder de que manera ejerce su influencia.

En la posición 114 se detectaron cuatro mutantes con actividad insensible a la presencia de la metilasa (H114T, Y, F y S). De ellas solo una se caracterizó en detalle (H114F). Esta mutante muestra una alta afinidad por DNA que posee el sitio canónico (Figura 13). La actividad de corte que muestra cuando se usa oligonucleótido de doble cadena con el sitio de corte canónico es bastante robusta, además que cuando se usa plásmido como sustrato el patrón de corte es diferente al silvestre (Figuras 10 y 11). Cuando se observa el comportamiento de esta mutante en condiciones que promueven la ampliación de la especificidad (condiciones estrella), el patrón de corte

se hace distinto, se observan menos bandas y las que se ven son de menor tamaño que en condiciones normales (Figura 10). Esto puede deberse a que en estas condiciones su especificidad es aun menor, por lo que corta sitios que antes eran refráctiles. Al variar la concentración de Mg^{++} su comportamiento es parecido a la enzima selvestre, cuando se usa Mn^{++} el comportamiento es distinto al de la selvestre (Figura 12). Su actividad es mayor en Mn^{++} que en Mg^{++} y su actividad se seduce a altas concentraciones de Mm^{++} .

La colección de mutantes que generamos es importante en el siguiente marco: primero valida la importancia de estos residuos de aminoácidos en la función de la proteína. También demuestra que el cambio o ampliación de la especificidad en un evento difícil, ya que se detectaron pocas mutantes que muestran una especificidad modificada. Al parecer la alta especificidad de la enzima se debe a que contacta casi todos los grupos presentes en el surco mayor del sitio de unión y que la unión está acoplada al mecanismo de catálisis. Así, cuando se modifica el contacto con el DNA el mecanismo de corte no se activa de manera adecuada. Cuando la proteína realiza la catálisis, sufre cambios estructurales que son importantes para el corte del DNA, cuando se modifica algún residuo se altera la interacción que tenía con otros residuos. Esto influye en el mecanismo de corte. Esto puede explicar porque la mayoría de los estudios realizados sobre residuos que están implicados en reconocimiento (en el surco mayor) dan mutantes con una actividad reducida. Esto representa un mecanismo que asegura la especificidad de la enzima al unir la catálisis a la unión específica. Existe otro mecanismo que aumenta la especificidad *in vivo*. En este caso se ha observado que la enzima selvestre puede cortar seudositios

pero solo corta una hebra del DNA, esto permite que sea reparado por la enzima ligasa (48).

El mecanismo propuesto, que une la catálisi y la especificidad, en la endonucleasa EcoRI es el siguiente. En este modelo, durante la transición hacia el estado de activación (primer corte de una hebra del DNA) la proteína y el DNA sufren cambios conformacionales complementarios. Cuando se trata de un sustrato no canónico se dan contactos no permitidos, ocasionando que la proteína se separe del DNA. Se ha demostrado que la ausencia de contactos con el DNA no altera drásticamente la energía de unión, sin embargo, cuando se introduce un grupo que ocasiona problemas estéricos, la energía de unión si se altera drásticamente (33). Es interesante hacer notar que la mutante triple (8A) forma un hueco en la interface DNA-proteína y aún muestra afinidad hacia el sitio canónico.

Las mutantes que presentan una actividad insensible a la presencia de la metilasa son importantes ya que apoyan el siguiente mecanismo: al unirse la proteína al DNA específico ocurre un cambio conformacional que forma el sitio de unión de Mg^{++} y así el sitio activo. El residuo 114 al encontrarse entre dos residuos de aminoácidos que son importantes en la catálisis (113) y especificidad (115), puede ser quien dispara la señal para que se forme el sitio activo. Las mutantes con actividad insensible a la presencia de la metilasa pueden tener alterado este mecanismo, de tal modo que forman mas fácilmente el sitio de unión al Mg^{++} . La formación del sitio activo es dependiente de que la proteína este unido al DNA canónico. Al estar este mecanismo alterado se pueden cortar otros sitios. Esto no

ocasiona que se modifique la especificidad, ya que solo se está modificando los requerimiento para la catálisis.

Para concluir, quiero mencionar que las enzimas de restricción del tipo II representa proteínas donde la especificidad es de suma importancia, esto se debe a que su actividad puede ser deletérea (cuando no se encuentra la actividad de metiltransferasa que proteja el DNA de la célula). La sobredeterminación de la especificidad y su unión a la catálisis, representa un mecanismo que asegura el control de la actividad de la enzima. Esto puede explicar por que el cambio de especificidad no se logra cuando se alteran residuos de aminoácido que estan contactando el DNA. La modificación de la especificidad se ha logrado en otras proteínas que interactúan con DNA, pero estas tienen funciones que al modificarse, no son tan drásticas para la célula como en el caso de las endonucleasas del tipo II. Es interesante mencionar que recientemente se ha determinado la estructura de otra enzima de restricción del tipo II (BamHI) que muestra una estructura semejante a la EcoRI (comunicación personal). Esta enzima no muestra una estructura primaria semejante a la EcoRI, esto puede decir que es posible alterar la especificidad de estas enzimas, pero está alteración se logrará solo al modificar varios residuos a la vez y no solo modificando los residuos que contactan DNA.

CONCLUSIONES

Para concluir podemos decir que el mecanismo de reconocimiento y catálisis se encuentran íntimamente relacionados en la endonucleasa EcoRI. Esto se basa en el hecho de que la mayoría de las mutantes observadas presentan una baja o casi nula actividad catalítica. Además de que sólo encontramos mutantes con especificidad relajada.

La ausencia de mutaciones en la mayoría de las posiciones estudiadas indica que estos aminoácidos son necesarios para la actividad catalítica. Como nuestro criterio de selección se basa en la presencia de actividad enzimática se deja abierta la posibilidad de la existencia de mutantes con cambio de especificidad, pero sin actividad catalítica.

La unión del mecanismo de unión y catálisis en la EcoRI puede ser una consecuencia de la presión de selección, que evita la aparición de mutantes con actividad de corte y con una especificidad nueva. Este tipo de mutantes no sobreviven, ya que la proteína mutante degrada el genoma de la célula.

El mecanismo de acción de la endonucleasa es muy específico, esto evita que la endonucleasa se una a otras secuencias parecidas y las corte. En este sistema el cambio de especificidad no se puede lograr de manera fácil, como es el caso de otras proteínas que se unen de manera específica a DNA (represores procariontes). El mecanismo de corte se altera cuando la proteína no está unida a su DNA blanco, esto aumenta la especificidad de la proteína. Nuestro trabajo es importante ya que se mutaron residuos de aminoácidos que están cercanos al DNA y al no encontrarse mutantes con una especificidad nueva, indica que es necesario conocer más el

mecanismo de acción de la proteína para lograr un cambio de especificidad. En este contexto la mutante en la posición 114 (H114F) es importante ya que, indica que existen residuos de aminoácidos que no contactan las bases del DNA, pero que están implicados en el mecanismo de acción (reconocimiento y catálisis).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Marshall, Garland R. (1992). Three-dimensional structure of peptide-protein complexes: implications for recognition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* Vol. 2:904-919.
- 2.- Pabo, Carl O. y Sauer, Robert T. (1992). Transcription factor: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 61:1053-1095.
- 3.- Johnson, Peter F. y McKnight, Steven L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58:799-839
- 4.- Steitz, Thomas A. (1990). Structural studies of protein-nucleic acid interaction: The source of sequence-specific binding. *Q. Reviews of Biophys.* Vol. 23, Num. 3:205-289.
- 5.- von Hippel, Peter H. y Berg, Otto G. (1989). Facilitated target location in biological systems. *J. Biol. Chem.* Vol. 264, Num. 2: 675-678.
- 6.- Seeman, Nadrian C.; Rosenberg, John M. y Rich, Alexander. (1976). Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* Vol. 73, Num. 3: 804-808.
- 7.- Travers, Andrew A. (1989). DNA conformation and protein binding. *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 58:427-452.
- 8.- Omichinski, James G.; Clore, G. Marius; Schaad, Olivier; Felsenfeld, Gary; Trainor, Cecelia; Appella, Ettore; Stahl, Stephen J. y Gronenborn, Angela M. NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* Vol. 256: 438-446.

- 9.- Freemont, Paul S.; Lane, Andrew N. y Sanderson, Mark R. (1991) Structural aspects of protein-DNA recognition. *Biochem. J.* Vol. 278: 1-23.
- 10.-Otwinowski, Z.; Schevitz, R. W.; Zhang, R.-G.; Lawson, C. L.; Joachimiak, A.; Marmorstei, R. Q.; Luisi, B. F. y Sigler, P. B. (1988). Crystal structure of *trp* repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature* Vol 335: 321-329.
- 11.-Chuprina, Vasily P.; Lipanov, Adrei A.; Fedoroff; Oleg Yu; Kim, Seong-Gi; Kintanar, Agustin y Reid, Brian. (1991). Sequence effects on local DNA topology. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* Vol. 88: 9087-9091.
- 12.-Harrison, Stephen C. y Aggarwal, Aneel K. (1990). DNA recognition by proteins with the helix-turn helix motif. *Annu. Rev Biochem.* Vol. 59: 933-969.
- 13.-Berg, Jeremy M. (1993). Zinc-finger proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* Vol. 3:11-16.
- 14.-Ellenberger, Thomas E.; Brandl; Christopher; J.; Struhl, Kevin y Harrison, Stephen C. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α helices: cristal structure of the protein-DNA complex. *Cell* Vol. 71: 1223-1237.
- 15.-Somers, William S. y Phillips, Simon E. V. (1992). Crystal structure of the *met* repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by β -strands. *Nature* Vol. 359:387-393.
- 16.-Edmondson, Diane G. y Olson, Eric N. (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Biol. Chem.* Vol. 268, Num. 2: 755-758.
- 17.-Nikolov, Dimitar B.; Hu, Shu-Hong; Lin, Judith; Gasch, Alexander; Hoffmann,

- Alexander; Horikoshi, Masami, Chua, Nam-hai; Roeder, Robert G. y Burley Stephen K. (1992). Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* Vol. 360: 40-46.
- 18.-Wolberger, Cynthia. (1993). Transcription factor structure and DNA binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* Vol. 3: 3-10.
- 19.-Winkler, Fritz K.; Banner, David W.; Oefner, Christian; Tsernoglou, Demetrius; Brown, Raymond S.; Heathman, Stephen; Bryan, Richard K.; Martin, Philip, D.; Petratos, Kyriakos y Wilson, Keith. (1993). The crystal structure of EcoRV endonuclease and of its complex with cognate and non-cognate DNA fragments. *EMBO* Vol. 12, Num 5: 1781-1795.
- 20.-Rosenberg, John M. (1991). Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* Vol. 1:104-113.
- 21.-Wilson, Geoffrey G. (1991). Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* Vol 25: 585-627.
- 22.-Wilson, Geoffrey G. (1991). Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Rev.* Vol 19, Num. 10:2539-2566.
- 23.-Janulaitis, Arvydas; Petrusyte, Mayte; Maneliene, Zita; Klimasauskas, Saulius y Butkus, Viktoras. (1992). Purification and properties of the Eco571 restriction endonuclease and methylase-prototypes of a new class (type IV). *Nucleic Acids Res.* Vol 20; Num. 22: 6043-6049.
- 24.-Jeltsch, Albert; Alves, Jürgen; Maass, Günter y Pingoud, Alfred. (1992). On the catalytic mechanism of EcoRI and EcoRV: A detailed proposal based on biochemical results, structural data and molecular modelling. *FEBS* Vol. 304 Num.

1:4-8.

- 25.-Zebala, Jonh A.; Choi, Jung, Trainor, George L. y Barany Francis. (1992). DNA recognition of base analogue and chemically modified sustrates by TaqI restriction endonuclease. *J. Biol. Chem.* Vol. 267, Num. 12: 8106-8116.
- 26.-Winkler, Fritz K. (1992). Structure and function of restriction endonucleases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* Vol. 2:93-99.
- 27.-Thielking, Vera; Selent, Ursel; Köhler , Eleonore, Landgraf, Axel, wolfes, Heiner; Alves, Jürgen y Pingoud Alfred. (1992). Mg⁺ confers DNA binding specificity to the EcoRV restriction endonuclease. *Biochemistry* Vol. 31, Num. 15:3727-3732.
- 28.-Vermote, Chritian L. M. y Halford, Stephen. (1992). EcoRV restriction endonuclease: communication between catalytic metal ions and DNA recognition. *Biochemistry.* Vol. 31: 6082-6089.
- 29.-Vermote, Christian L. M.; Vipond, I. Barry y Halford, Stephen. (1992). EcoRV restriction endonuclease: Communication between DNA recognition and catalysis. *Biochemistry.* Vol. 31: 6089-6097.
- 30.-Kim, Youngchang; Grable, John C.; Love; Robert; greene, Patricia J. y Rosenberg, John M. (1990). Refinement of EcoRI endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing. *Science* Vol. 249:1307-1309.
- 31.-Heitman, Joseph. (1992). How the EcoRI endonuclease recognizes and cleaves DNA. *BioEssays* Vol. 14, Num. 7: 445-454.
- 32.-Heitman, joseph y Model, Peter. (1990). Mutans of the EcoRI endonuclease with promiscuous substrate specificity implicate residue involved in sibstrate recognition.

EMBO Vol. 9, Num. 10: 3369-3378.

- 33.-Lesser, David R.; Kurpiewski, Michael R. y Jean-Jacobson, Linda. (1990). The energetic basis of specificity in the EcpRI endonuclease-DNA interaction. *Science* vol. 250:776-786.
- 34.-Zoller, Mark J. (1992). New recombinant DNA methodology for protein engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.* Vol. 3:348-354.
- 35.-Osuna, Joel; Flores, Soto H. y Soberón, Xavier. (1991). Combinatorial mutagenesis of three groove-contacting residues of EcoRI: single and double amino acid replacements retaining methyltransferase-sensitivi activities. *Gene* Vol. 106: 7-12.
- 36.-Stephenson, Frank H.; Ballard, Barry T.; Boyer, Helbert W.; Rosenberg, John M. y Greene, Patricia J. (1989). Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the RsrI and EcoRI restriction endonucleases. *Gene* Vol. 85:1-13.
- 37.-Kuhn, Irene; Stephenson, Frank H. ; Boyer, Herbet W. y Greene, Patricia. (1986). Positive-selection vector utilizing lethality of the EcoRI endonuclease. *Gene* Vol. 44: 253-263.
- 38.-Dower, William J.; Miller, Jeff F. y Ragsdale. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* Vol. 16, Num. 13:6127-2129.
- 39.-Heitman, Joseph y Model, Peter. (1991). SOS induction as an in vivo assay of enzyme-DNA interactions. *Gene* Vol. 103:1-9.
- 40.Greene, Patricia J.; Heyneker, Herbert L.; Bolivar, Franscisco; Rodrigríguez, Raymond L.; Betlach, Mary C.; Covarrubias, Alejandra A.; Backman, Keith;

- Russel, David J.; Tait, Robert y Boyer, Herbert W. (1978). A general method for the purification of restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* Vol. 5, Num. 7:2373-2380.
- 41.-Garner, Mark M. y Revzin, Arnold. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* Vol. 9, Num. 31:3047-3059.
- 42.-Benson, Nicholas; Adams, Curtis y Youderian, Philip. (1992). Mutant λ repressors with increased operator affinities reveal new, specific protein-DNA contacts. *Genetics* Vol. 130:17-26.
- 43.-Spee, Johan H.; de Vos, Willem, M. y Kuipers, Oscar P. (1993). Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Res.* Vol. 21, Num. 3:777-778.
- 44.-Needells, 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* Vol. 86:3579-3583.
- 45.-Maniatis, Fritsch, E. F. y Sambrook. (1982) *Molecular Cloning a laboratory manual*. Ed. Cold spring Harbor laboratory. USA. pp:270-274.
- 46.-Yanofsky, Stephen D.; Love, Robert; McClarin, Judith, Rosenberg, Jonh M. y Boyer, Herbert W. (1987). Clustering of null mutations in the EcoRI endonuclease. *Proteins:structure, function, and genetics* Vol. 2, Num. 2:273-282.
- 47.-Jeltsch, Albert; Alves, Jürger; Oelgeschläger, Wolfes, Heiner, Maass, Günter y Pingoud, Alfred. (1993). Mutational analysis of the function of Gln 115 in the EcoRI

restriction endonuclease, a critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence -GAATTC- an for coupling specific DNA binding to catalysis. *J. Mol. Biol.* Vol. 229:221-234.

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

49.-Birboim, H. C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* Vol 7:1513-1525

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA