

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDIO DE LA CATALISIS Y DEL RECONOCIMIENTO  
ESPECIFICO AL ADN POR LA ENDONUCLEASA  
EcoRI.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

LUIS MOISES LEDEZMA CANDANOZA

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO DEL 2000

282406

191261  
4



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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 los interesados en buscar la verdad;  
por dolorosa que sea...*

*A mi familia...*

*A Karla;  
un silencio y una mirada...*

## **Agradecimientos.**

A los Drs. Humberto y Xavier por dejarme dirigir el proyecto en una dirección.

A mis compañeros del laboratorio por aumentar mis dudas sugiriéndome caminos nuevos.

Al Dr. Guarneros por obligarme a ser un poco mejor.

A mis padres y hermanos por su apoyo y comprensión.

Sobre todo, a Karla, por su paciencia, por su amor, y por ser un remanso para mí.

Esta tesis fue desarrollada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría de los Drs. Humberto Flores Soto y Xaviér Soberón Mainero. Para el desarrollo de ésta tesis conté con el apoyo de una beca otorgada por el CONACyT, con número de registro 87825.

## INDICE.

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	3
LAS PROTEINAS Y LA UNION CON SUS LIGANDOS.....	4
LA AFINIDAD Y LA ESPECIFICIDAD.....	5
ASPECTOS TERMODINAMICOS DE LA UNION PROTEINA LIGANDO.....	6
PROTEINAS QUE SE UNEN AL ADN.....	7
LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION.....	9
LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> .....	11
EL MECANISMO CATALITICO DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> ES SIMILAR AL DE OTRAS ENDONUCLEASAS.....	13
RECONOCIMIENTO ESPECIFICO DEL ADN POR LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> .....	16
<b>OBJETIVO</b> .....	22
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
<b>METODOS</b> .....	24
MODELO DE ESTUDIO Y PLASMIDOS UTILIZADOS.....	25
MUTAGENESIS DE LA <i>EcoRI</i> .....	25
ELECTROTRANSFORMACION DE LOS PLASMIDOS CON EL GEN DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> EN CELULAS DE <i>E coli</i> .....	30
SELECCION DE LAS MUTANTES GENERADAS.....	31
SECUENCIACION DE LOS GENES MUTANTES.....	32
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA.....	33
INMUNODETECCION DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> SILVESTRE Y MUTANTES.....	34
PURIFICACION DE LAS MUTANTES DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> .....	35
COLUMNA DE FOSFOCELULOSA.....	35
COLUMNA DE HIDROXIAPATITA.....	36
ELECTROFORESIS Y TINCION CON NITRATO DE PLATA DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> Y LAS MUTANTES SELECCIONADAS.....	37
CARACTERIZACION <i>in vitro</i> DE LAS MUTANTES PURIFICADAS DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> MEDIANTE LA DIGESTION DE ADN	

DE FAGO $\lambda$ EN DIFERENTES CONDICIONES.....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
GENERACION DE LOS BANCOS Y SELECCION DE LAS MUTANTES DEL GEN DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> .....	40
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE LAS MUTANTES CON FENOTIPO ESTRELLA DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> .....	45
INMUNODETECCION DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> DE LAS CLONAS CON FENOTIPO NULO.....	46
PURIFICACION PARCIAL DE LAS CLONAS QUE MOSTRARON TENER UNA MAYOR ACTIVIDAD.....	48
CARACTERIZACION <i>in vitro</i> DE LAS CLONAS MUTANTES SELECCIONADAS DE LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> .....	49
<b>DISCUSION</b> .....	<b>55</b>
NO EXISTE UN INTERRUPTOR MOLECULAR EN LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> QUE DEPENDA DEL CONTACTO ESPECIFICO DE LOS RESIDUOS HIS114 Y GLU 170.....	56
NO PARECE EXISTIR UN INTERRUPTOR CONSTITUIDO POR LOS RESIDUOS QUE RELAJAN LA ESPECIFICIDAD EN LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> .....	59
¿EN QUE CONSISTE EL FENOMENO DE LA RELAJACION DE LA ESPECIFICIDAD OBSERVADO EN LA ENDONUCLEASA <i>EcoRI</i> ?.....	60
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>68</b>



## RESUMEN

## Resumen.

Los principios que rigen la unión de las proteínas con el ADN revisten una importancia fundamental para entender procesos tales como la transcripción, el empaquetamiento del ADN, la regulación de genes y la diferenciación celular. Uno de los modelos para abordar el estudio de la unión de proteínas al ADN lo constituye la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Esta proteína se ha estudiado ampliamente durante las últimas dos décadas. En base a evidencia estructural y genética se propuso que la His114 y el Glu170 podrían participar en la constitución de un interruptor molecular, a través de una interacción específica de puente salino o de hidrógeno. Tal interruptor activaría la catálisis de la endonucleasa *EcoRI* tras el reconocimiento específico al ADN. En este trabajo se demostró mediante mutagénesis a saturación de las posiciones 114 y 170 que estos residuos no constituyen un interruptor molecular en la endonucleasa *EcoRI*. Parte de la evidencia lo constituye el hecho de que se encontraron combinaciones de mutantes que no pueden interactuar de una manera específica entre sí, pero que aún presentan fenotipo silvestre en presencia de la metiltransferasa de *EcoRI*. También se observó que clones mutantes con residuos en estas posiciones que podrían establecer contactos específicos entre sí, muestran un fenotipo de corte estrella en presencia de la metiltransferasa. De acuerdo a la evidencia de mutagénesis y a la evidencia bioquímica presentada en este trabajo se estableció que estos residuos podrían participar en el reconocimiento del ADN por la endonucleasa *EcoRI* afectando la afinidad de la endonucleasa hacia él. La manera en que estos residuos contribuyen al reconocimiento específico no es clara, pero posiblemente sea a través de un mecanismo indirecto que involucraría la adaptación de la estructura terciaria de la proteína a las secuencias de ADN.

## **INTRODUCCION**

## LAS PROTEINAS Y LA UNION CON SUS LIGANDOS.

Las proteínas son parte fundamental en la vida de la célula, en la que llevan a cabo las reacciones del metabolismo y permiten la comunicación de ésta con el medio circundante. Las proteínas pueden llevar a cabo estas funciones gracias a que son capaces de discriminar entre las diversas moléculas presentes en el medio ambiente e interaccionar de manera específica con alguna (o algunas) de ellas, llamadas ligandos. La unión entre la proteína y su ligando se da a través de diferentes tipos de interacciones, las cuales favorecen la unión específica. Es claro que para que las proteínas puedan interaccionar favorablemente con sus ligandos, debe haber una complementariedad electrostática y estructural. Gracias a las técnicas de cristalografía y de RMN, se han determinado numerosas estructuras de proteínas en complejo con su ligando. Estos complejos muestran que existe una complementariedad entre la proteína y el ligando. En los complejos proteína-ligando analizados, se observa que existe una tendencia a interaccionar a través de una superficie extensa. Esto conduce a que, de manera general, los ligandos más grandes se unan en depresiones en la superficie de la proteína, mientras los grupos pequeños tales como los grupos hemo o prostéticos se unen en cavidades profundas. Las proteínas que unen ligandos lineales, como por ejemplo ADN y polisacáridos, lo hacen en hendiduras. La interfase entre la proteína y el ligando se encuentra tan empacada como lo está el interior de la proteína. Todos los grupos polares en la interfase se encuentran formando puentes de hidrógeno y las cargas electrostáticas generalmente se encuentran neutralizadas. Los puentes de hidrógeno son particularmente predominantes en la interacción con grupos polares y con frecuencia algunas moléculas de agua actúan como intermediarios (Bhat *et. al.*, 1994, Luecke and Quioco, 1989), como se observa claramente en las estructuras de antígeno-anticuerpo (Guddat *et. al.*, 1994). Los grupos iónicos normalmente no se embeben en la interfase a menos que haya grupos de carga opuesta en el ligando que deban ser neutralizados. En otros casos, en los que no hay "grupos neutralizantes", la carga formal del ligando es "solvatada" por múltiples puentes de hidrógeno de otros grupos de la proteína, logrando una efectiva dispersión de la carga (Quioco F. A. *et. al.*, 1987). Por otro lado, también se observa complementariedad entre la proteína y su ligando en muchos complejos cristalográficos. En estos se observa que las caras hidrofóbicas de la proteína y del ligando tienden a excluirse del solvente, favoreciendo con esto la unión.

## LA AFINIDAD Y LA ESPECIFICIDAD.

La afinidad de una molécula hacia otra, se refiere a la capacidad que tiene ésta de permanecer unida a aquella otra. La afinidad de dos moléculas, A y B, puede ser descrita de forma equivalente por la constante de equilibrio para la formación del complejo  $K_{eq} = \frac{[AB]}{[A_{libre}][B_{libre}]}$ , la energía libre para la formación del complejo  $\Delta G_{AB} = -RT \ln K_{eq}$  ó por la razón de las constantes de unión y no unión  $k_{on}/k_{off} = K_{eq}$ . La especificidad se refiere a la preferencia de una molécula para unirse a otra molécula en particular, esta propiedad se puede definir como la diferencia de afinidad entre dos ligandos determinados (A y A'):  $\Delta \Delta G_{AA'} = \Delta G_{AB} - \Delta G_{A'B}$ . Los valores de la afinidad ( $\Delta G$ ) y de la especificidad ( $\Delta \Delta G$ ) dependen de los requerimientos biológicos para un determinado proceso. El punto adecuado para la función de alguno de estos procesos podrá requerir una alta o baja afinidad, o bien, una alta o baja especificidad (Figura 1).

		AFINIDAD	
		ALTA	BAJA
ESPECIFICIDAD	ALTA	Huésped/hospedero Anticuerpo/antígeno	Represores de la regulación Anticuerpo/antígeno
	BAJA	MHC/péptido	Proteínas que se unen inespecíficamente al ADN

Figura 1. Ejemplos de macromoléculas con diferentes afinidades y especificidades (tomada de Szwajkajzer and Carey, 1997).

## **ASPECTOS TERMODINAMICOS DE LA UNION PROTEINA LIGANDO.**

Para que la unión entre una proteína y su ligando se lleve a cabo, es necesario que la energía libre del complejo disminuya con respecto a la de las moléculas por separado. La energía libre es una propiedad global del sistema y se define como la diferencia entre la entalpía y entropía del sistema:

$$G = H - TS$$

Donde G, es la energía libre del sistema; H, la entalpía; S, la entropía y T la temperatura. En la práctica, no es posible medir valores absolutos de estos tres términos, solamente pueden ser medidos los cambios de éstas tres funciones de estado. El término entálpico, se origina del cambio en los enlaces entre la proteína y el ligando. Las interacciones no covalentes para la formación del complejo incluyen muchas contribuciones de corto alcance tales como, fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno y puentes salinos. El término entálpico (H) es negativo o favorable, cuando se forman enlaces; y es positivo o desfavorable, cuando se rompen enlaces. El término entrópico (S), refleja los grados de libertad del sistema e involucra cambios en la estructuración de las moléculas del solvente, "contraíones", así como cambios en el patrón rotacional y translacional de los enlaces. La entropía es positiva o favorable, cuando el número de grados de libertad aumenta en cualquier lugar del sistema; mientras que es negativa o desfavorable, cuando sucede lo inverso. Ambos términos, H y S, tienden a contraponerse y a cancelarse mutuamente, haciendo que las fuerzas en el esquema de la energía libre que conducen a la unión sean confusas. Es fundamentalmente incorrecto decir que los complejos proteína-ligando están estabilizados solo por los enlaces entre ambos ( Szwajkajzer and Carey, 1997). En realidad los complejos se estabilizan por la diferencia neta de energía libre entre los estados de unión y libre de las moléculas participantes.

## **PROTEINAS QUE SE UNEN AL ADN.**

El estudio de la expresión genética y su modulación en el tiempo y en el espacio, requiere de un conocimiento detallado de la función de las proteínas que interaccionan de manera específica con el ADN (Jen-Jacobson, 1997). Dicho conocimiento permitirá entender procesos tales como el control de la expresión genética en la diferenciación, el desarrollo (Choo and Klug, 1994), la plasticidad celular (Bailey *et. al.*, 1996), etc.

Se han identificado un gran número de proteínas que se unen al ADN, las cuales llevan a cabo diversas funciones. Entre éstas, podemos encontrar a las que estructuran y organizan al ADN, tales como las girasas y las topoisomerasas; las que regulan la expresión de genes, como lo son los represores y activadores; las que hidrolizan al ADN en procesos de recombinación, las recombinasas y las encargadas de hidrolizar ADN foráneo, como son las nucleasas.

El análisis de la estructura primaria y terciaria de las proteínas ha permitido formar grupos o familias estructurales (Holm and Sander, 1994; Jones, 1999). Las proteínas que se unen al ADN no son la excepción, y en ellas se han encontrado motivos estructurales comunes (Figura 2; Harrison *et. al.*, 1990 ; Berg, 1993; Chen *et. al.*, 1998; O'Sea *et. al.*, 1991; Ellenberger *et. al.*, 1992; Somers and Phillips, 1992; Edmonson and Olson, 1993). No obstante, no todas las proteínas que se unen al ADN pueden ser clasificadas dentro de las familias de motivos estructurales conocidas. Un ejemplo de lo anterior lo constituyen las endonucleasa de restricción del tipo II, las cuales parecen tener cada una de ellas su propio plegamiento. Estas enzimas solo presentan semejanzas en la forma general de su estructura y en el núcleo de hebras  $\beta$  característico de este tipo de endonucleasas (Newman *et. al.*, 1994; Venclovas *et. al.*, 1994). Debido a la variedad de temas estructurales que interaccionan con al ADN, y a que no es posible establecer patrones de aminoácidos que reconozcan determinadas secuencias de bases; no ha sido posible establecer una correlación entre la estructura de la proteína y el reconocimiento de secuencias específicas en el ADN (Suzuki and Yagi, 1994; Suzuki *et. al.*, 1995, Wolfes *et.al.*, 1999).

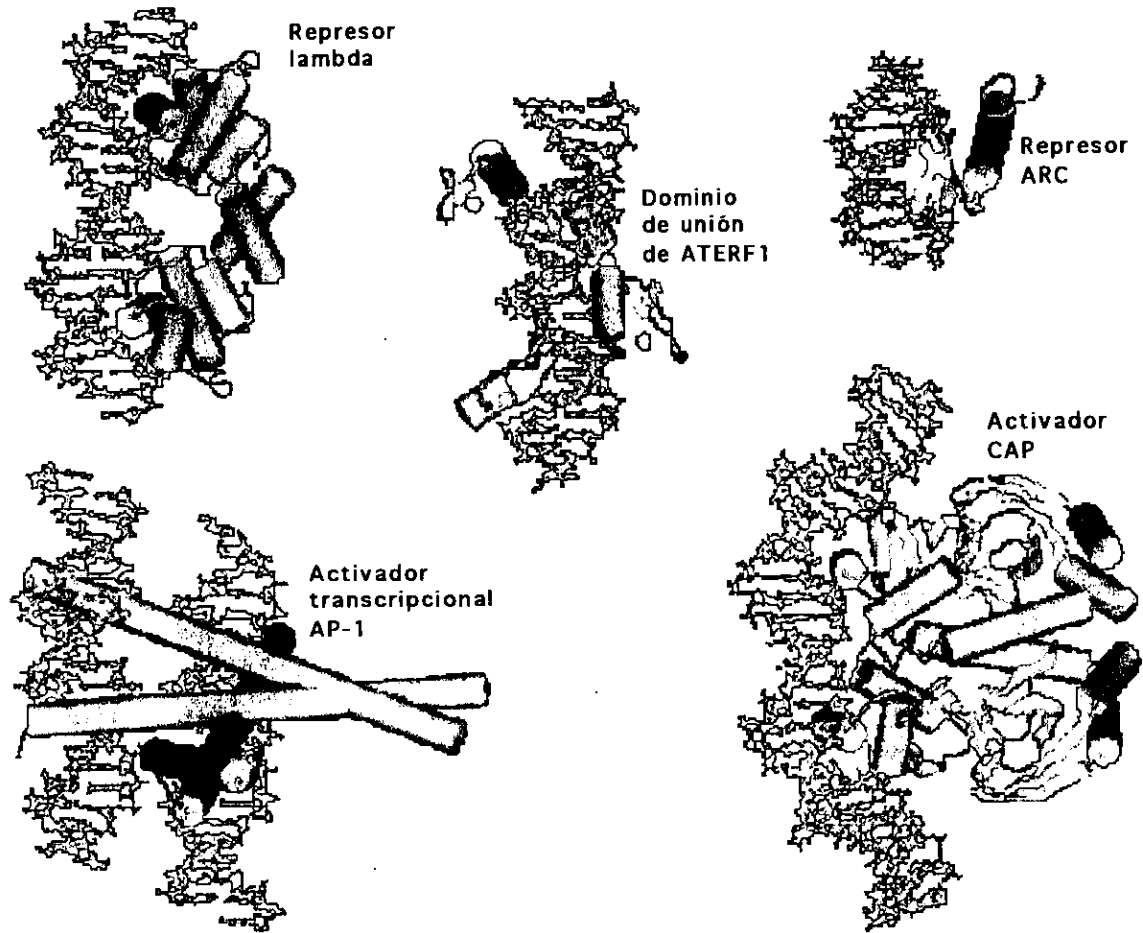


Figura 2. Modelo estructural de proteínas representantes de los diferentes plegamientos que han sido identificados. Hélice vuelta hélice: represor lambda; dedos de zinc: proteína ATERF1; lámina  $\beta$ : represor ARC; cierre de leucina: activador AP-1 y Hélice asa hélice: activador CAP. Los cilindros rojos denotan estructura secundaria  $\alpha$ -hélice, las flechas amarillas estructura  $\beta$ -plegada, en azul estan representadas las vueltas y en verde el plegamiento no estructurado ("random coil").

## LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

En la década de los 50's con la detección de cepas de *E. coli* resistentes a la infección por bacteriófago, empezaron a descubrirse otras cepas que eran capaces de hacer lo mismo (revisado en Wilson, 1991). Posteriormente se



reconoció que dichas cepas contenían ciertas actividades enzimáticas a las que se les llamó sistemas de restricción-modificación. Los sistemas de restricción-modificación forman parte de un sistema inmune primitivo, que protege a los microorganismos del ADN invasor. Estos sistemas constan de dos actividades enzimáticas: una actividad de endonucleasa que reconoce e hidroliza de forma específica al ADN y una actividad de metilasa que metila adeninas o citosinas de manera específica, impidiendo la hidrólisis del ADN (Pingoud and Jeltsch, 1997). Se han detectado y clasificado diferentes tipos de estos sistemas:

a) Tipo I. Las actividades enzimáticas de estos sistemas de restricción se encuentran en un complejo de tres proteínas, S, R y M, que modifican y restringen al ADN. La subunidad R hidroliza al ADN, para lo cual requiere ATP y  $Mg^{2+}$ , mientras que es estimulado por S-adenosilmetionina. La subunidad M metila el sitio evitando la hidrólisis. Esta subunidad utiliza como cofactor S-adenosilmetionina. La subunidad S determina la especificidad tanto para la actividad de restricción como para la de metilación (Wilson, 1991a).

b) Tipo II. Las actividades enzimáticas de estos sistemas de restricción se encuentran en dos proteínas separadas, la endonucleasa y la metilasa. Ambas proteínas reconocen secuencias que generalmente son palindrómicas (secuencias que se leen de igual forma de izquierda a derecha que de derecha a izquierda), que van de 4 a 8 pares de bases. La mayoría de las endonucleasas de este tipo realizan la hidrólisis del ADN dentro de la secuencia que reconocen y utilizan  $Mg^{2+}$  como cofactor. Las metilasas requieren S-adenosilmetionina para metilar al ADN (Wilson, 1991a).

c) Tipo IIs. Las actividades enzimáticas de estos sistemas de restricción se encuentran, al igual que el tipo anterior, en proteínas diferentes. La endonucleasa realiza la hidrólisis del ADN a una distancia de 20 nucleótidos del sitio de unión, el cual es asimétrico, no interrumpido, y de cuatro a siete nucleótidos de longitud. La endonucleasa de estos sistemas es mayor que las del tipo II y, probablemente, actúan como monómeros. La metilación es llevada a cabo algunas veces por dos metiltransferasas, una para cada hebra.

d) Tipo III. Las actividades enzimáticas de este tipo de sistema de restricción se encuentran en un complejo que consta de dos proteínas, una M y otra R. La proteína R requiere ATP para poder cortar al ADN y es estimulada por S-adenosilmetionina, realizando la hidrólisis a cierta distancia del sitio de

reconocimiento. La subunidad M es capaz de autometilarse, y ésta solamente metila una hebra del ADN para evitar el corte. La secuencia que reconocen es asimétrica, no interrumpida y de cinco a seis nucleótidos de longitud. El corte ocurre aproximadamente a 25 nucleótidos de la secuencia que reconocen (Wilson, 1991a).

e) Tipo IV. La actividad de restricción y metilación están en una sola cadena polipeptídica, aunque existe también una proteína separada capaz de metilar al ADN en el mismo sitio de reconocimiento. La hidrólisis del ADN es realizada fuera del sitio de reconocimiento (Janulaitis *et. al.*, 1992).

De los sistemas de restricción, los del tipo II son de gran importancia gracias a su amplio uso como herramientas en la biología molecular. Esto se debe a que reconocen y cortan dentro de secuencias específicas, facilitando la manipulación del ADN en la clonación y diagnóstico.

### **LA ENDONUCLEASA *EcoRI*.**

En la actualidad se cuenta con una amplia información acerca de la endonucleasa *EcoRI* (Figura 3), lo que la ha convertido en un buen modelo para el estudio de las interacciones proteína-ADN. La endonucleasa *EcoRI* es un homodímero de peso molecular de 28.5KDa, originalmente codificado en el plásmido RI13 (Newman *et. al.*, 1981). Esta endonucleasa reconoce de forma específica la secuencia nucleotídica 5'-GAATTC-3', e hidroliza al enlace fosfodiéster localizado entre la G y la A, dejando el grupo fosforilo en el extremo 5' de la A y un hidroxilo en el carbono 3' de la G (Figura 3A; Hedgpeth *et. al.*, 1972).

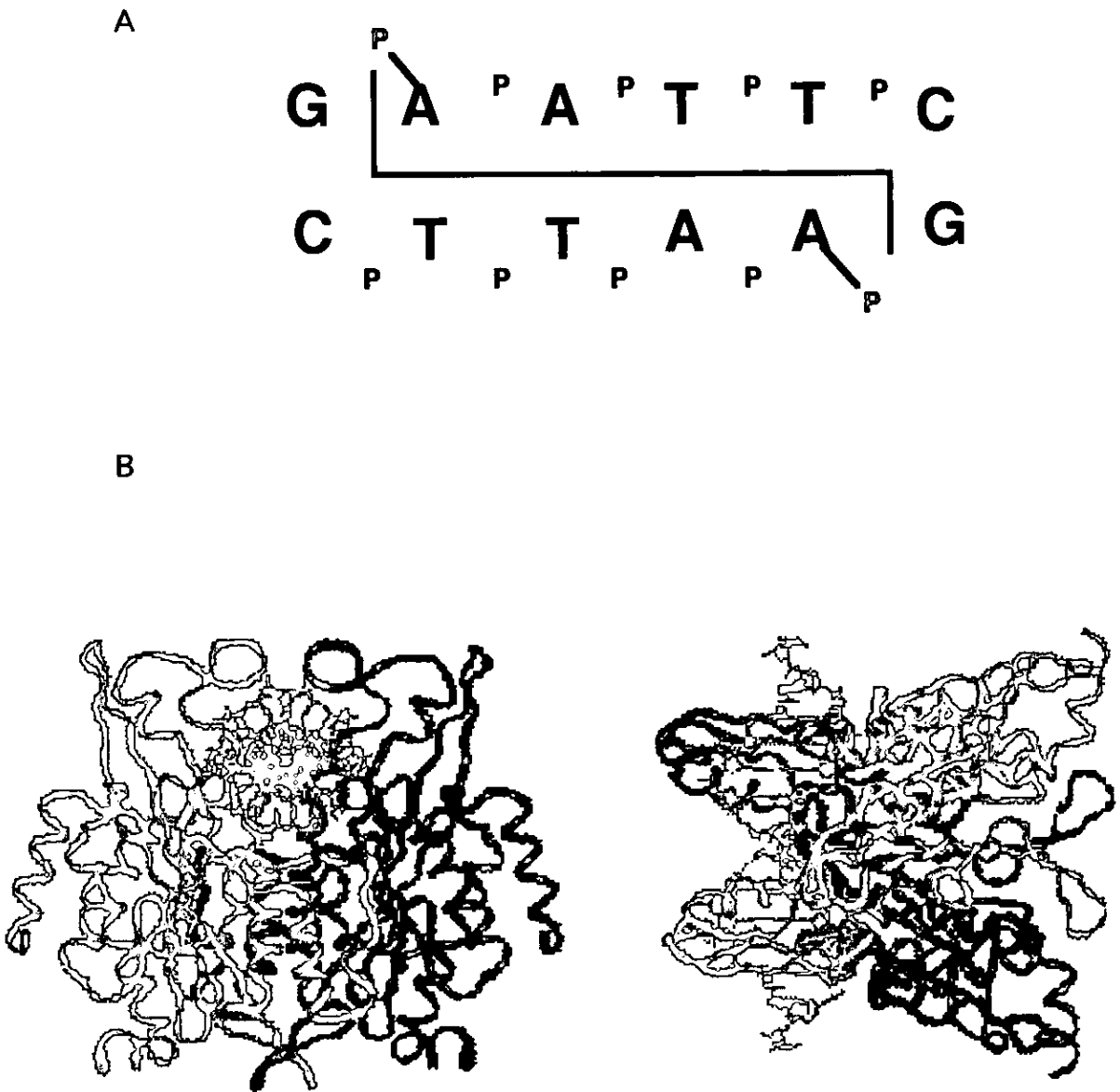


Figura 3. (A) Secuencia canónica reconocida por la endonucleasa *EcoRI*. Se indica el fosfato hidrolizable por la endonucleasa en color verde y los sitios en donde se lleva a cabo la hidrólisis. (B) Vista axial y lateral del modelo del complejo de la endonucleasa *EcoRI*-ADN (Kim *et al.*, 1990).

La estructura que presenta esta endonucleasa no corresponde a ninguno de los motivos de unión al ADN mencionados anteriormente (Figura 2), sino que representa un plegamiento único, que comparte sólo algunas características con los otros miembros de las endonucleasas del tipo II que han sido cristalizadas (Figura 3B, Newman *et. al.*, 1994, Venclovas *et. al.*, 1994).

## EL MECANISMO CATALITICO DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI* ES SIMILAR AL DE OTRAS ENDONUCLEASAS.

El mecanismo catalítico de todas las endonucleasas de restricción del tipo II parece ser muy similar, puesto que todas ellas requieren de iones divalentes para llevar a cabo su reacción, así como residuos de aminoácidos con carga negativa para unirlos. Los sitios activos de las endonucleasas del tipo II que cuentan con estructura cristalográfica, son semejantes, tanto por los residuos de aminoácidos que contienen (Tabla 1), como por la disposición estructural que presentan (Figura 4).

**Tabla 1.** Comparación de los residuos en los sitios catalíticos de las endonucleasas *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI* y *PvuII*. (Modificado de Grabowski *et. al.*, 1995).

<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>BamHI</i>	<i>PvuII</i>	Papel propuesto en la catálisis
Pro90	Pro73			Estructuración del sitio activo.
Asp91	Asp74	Asp94	Asp58	Unión del Mg <sup>2+</sup> y su orientación catalítica adecuada.
Glu111	Asp90	Glu111	Glu68	Unión del Mg <sup>2+</sup> y su orientación catalítica adecuada.
Lys113	Lys92	Glu113	Lys70	Estabilización del estado de transición.

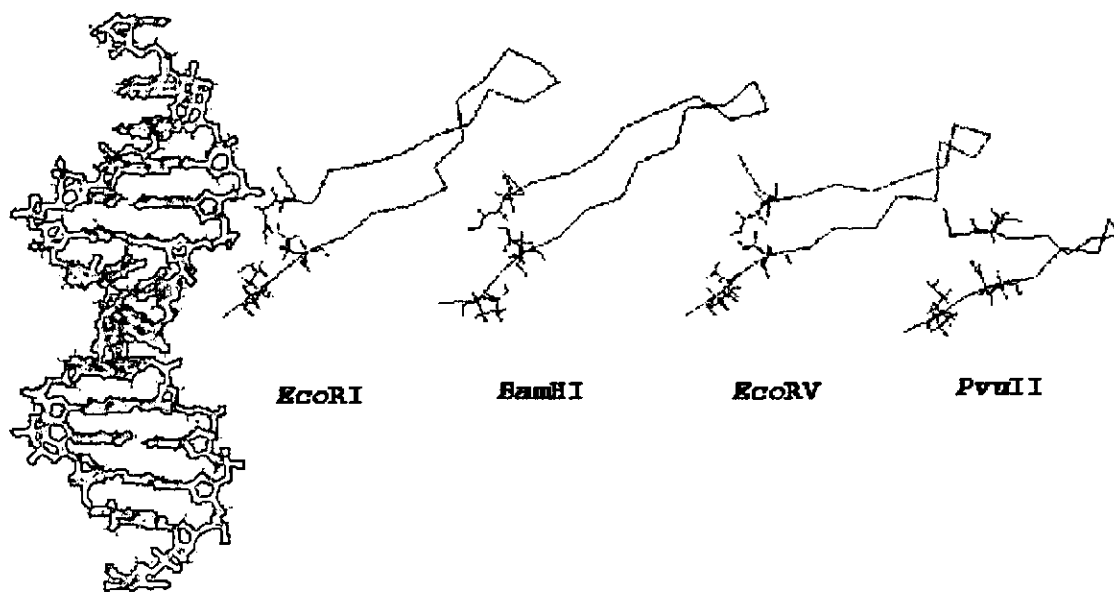


Figura 4. Comparación de la geometría de los tres residuos catalíticos sobre la traza de carbonos alfa de una parte de la estructura de cuatro endonucleasas del tipo II que han sido cristalizadas. El ADN (en vista lateral) a la derecha corresponde al sitio canónico de la endonucleasa *EcoRI*, y en relación a ésta se presentan orientados los residuos catalíticos de otras endonucleasas.

Con base en las estructuras cristalográficas y estudios de dinámica molecular de las endonucleasas *EcoRI* y *EcoRV*, se ha sugerido (Jeltsch *et. al.*, 1992) que la catálisis de estas enzimas se lleva a cabo por medio de un ataque nucleofílico  $S_N2$  al átomo de fósforo por una molécula de agua activada, la cual se encuentra en línea con el grupo 3'-OH saliente. Este tipo de ataque nucleofílico es compatible con la inversión de configuración observada en el átomo de fósforo (Connolly *et. al.*, 1984). Según Jeltsch y colaboradores el mecanismo propuesto requiere lo siguiente (Figura 5):

a) Un ácido de Lewis que polariza los enlaces oxígeno-fósforo no esterificados. Esta polarización incrementa la electrofilicidad del átomo de fósforo haciéndolo más reactivo para unir el ión OH proveniente de la molécula de agua activada. Según la estructura de los sitios activos de las endonucleasas mencionadas, este ácido podría ser el  $Mg^{2+}$ , el cual se encuentra unido por los residuos catalíticos ácidos (por ejemplo Asp91 y Glu111 en la endonucleasa *EcoRI*, ver Tabla 1).

b) Una base general que active la molécula de agua atacante, vía el incremento de la carga parcial negativa del oxígeno, aumentando entonces su nucleofilicidad. En algunas de estas proteínas se ha sugerido que la base general podría ser uno de los oxígenos unidos al fosfato 3' del enlace fosfodiéster hidrolizable (Jeltsch *et. al.*, 1993, Thorogood *et. al.*, 1996), aunque existe la objeción de que el  $pK_a$  de un oxígeno no esterificado es demasiado bajo para llevar a cabo esta función eficientemente. Debido a esto se ha propuesto que por lo menos para la endonucleasa *EcoRV*, el oxígeno no esterificado participa en la catálisis, ayudando en la estructuración del sitio catalítico. Esto permitiría que una molécula de agua proveniente de la esfera de hidratación de uno de los metales unido al sitio catalítico se active y ataque al fosfato del enlace fosfodiéster hidrolizable, lo cual podría ser cierto para el resto de las endonucleasas (Horton *et. al.*, 1998).

c) Un ácido de Lewis que estabilice la carga negativa extra del intermediario pentacovalente del fosfato durante el estado de transición. Inicialmente Jeltsch y colaboradores propusieron que la lisina presente en algunas de las endonucleasas (Tabla 1) podría funcionar para estabilizar la carga negativa incipiente que se forma en el estado de transición durante la catálisis. No obstante, Horton y colaboradores han propuesto que la lisina catalítica está involucrada en la disminución del  $pK_a$  y la orientación adecuada de la molécula de agua atacante. En este nuevo esquema el metal unido en el sitio activo frente al enlace fosfodiéster hidrolizable funcionaría estabilizando la carga negativa generada.

d) Un ácido de Brønsted que protone al oxígeno del grupo saliente, bajando su nucleofilicidad. De acuerdo a la estructura terciaria de la endonucleasa *EcoRV*, se ha sugerido que este ácido podría ser una molécula de agua proveniente de la esfera de hidratación del ión  $Mg^{2+}$  unido en el sitio activo (Jeltsch *et. al.*, 1992). Dicho ión se encuentra frente al fosfato del enlace fosfodiéster hidrolizable, a una distancia de puente de hidrógeno del oxígeno 3' saliente, lo cual podría ser cierto para otras endonucleasas (Horton *et. al.*, 1998).

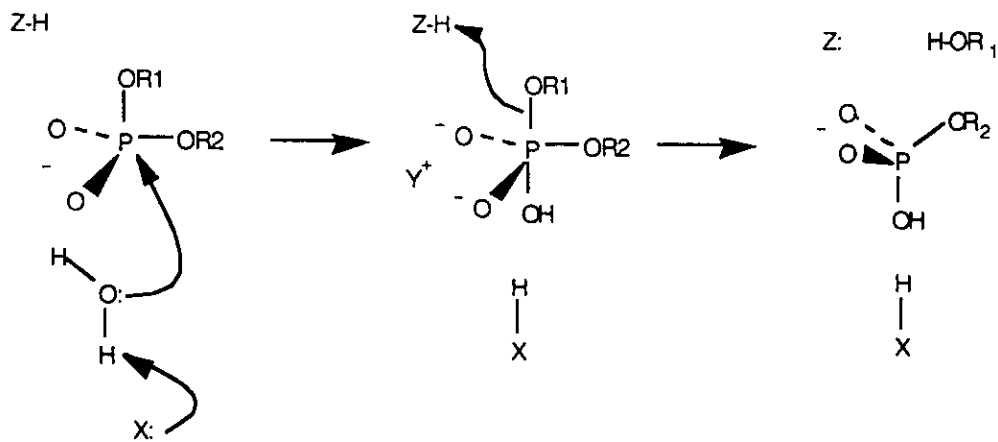


Figura 5. Ilustración esquemática del mecanismo general de hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de las endonucleasas. X, Y y Z-H son una base general, un ácido de Lewis y un ácido general, respectivamente. (basado en Jeltsch *et. al.*, 1992).

## RECONOCIMIENTO ESPECIFICO AL ADN POR LA ENDONUCLEASA *EcoRI*.

En un principio se pensó que el reconocimiento de las proteínas que se unen al ADN en forma específica estaba determinado únicamente por los residuos que interaccionan directamente con las bases (Needels *et.al.*, 1989), a esto se le conoce con el nombre de reconocimiento "directo" (Seeman *et. al.*, 1976). No obstante, mediante experimentos de mutagénesis se mostró que los contactos hacia las bases del ADN no eran suficientes para explicar la especificidad de las proteínas que se unen a ADN. Así que se sugirió que en estas proteínas existe un "reconocimiento indirecto" hacia el esqueleto de azúcares fosfatados del ADN, es decir que los contactos con los fosfatos del ADN contribuyen también al reconocimiento específico (Freemont *et. al.*, 1991). Con base en la estructura terciaria de la endonucleasa *EcoRI* y en experimentos genéticos, se ha propuesto que los siguientes residuos actúan en el reconocimiento específico por medio de contactos directos a las bases del ADN: His114, Gln115, Met137, Ala138, Gly140, Asn141, Ala142, Arg145, Ile197, Arg200 y Arg203 (Jeltsch *et al.*, 1995). Todos los residuos mencionados se encuentran en la interfase entre el ADN y la proteína (Figura 6). Un dodecapéptido en el que se encontraba la secuencia de aminoácidos de la cadena extendida (Met137-Arg145) de la endonucleasa *EcoRI*, la cual contacta a las bases del ADN por el surco mayor, mostró que se unía

específicamente al ADN en la secuencia 5'-GAATTC-3' (Jeltsch *et. al.*, 1995), aunque con baja afinidad. No obstante, la mutagénesis sobre los residuos que contactan a las bases del ADN en la endonucleasa *EcoRI* no ha producido cambio de especificidad. En este sentido se han modificado los residuos Glu144, Arg145 y Arg200 en forma dirigida (Alves *et. al.*, 1989) y en a saturación (Osuna *et.al.*, 1991), sin producir cambio alguno . Otras endonucleasas, como la *EcoRV*, tampoco han mostrado cambio de especificidad cuando se mutan los residuos que contactan a las bases del ADN, sino que solo se observa una baja importante de la actividad ( Wenz *et. al.*, 1998). Lo anterior sugiere que la especificidad de este tipo de endonucleasas esta dada por otros factores, además de los contactos con las bases del ADN.

Un determinante más de la especificidad podría estar dada por los residuos que intervienen en la catálisis, como claramente sucede en las endonucleasas *EcoRV* y *MunI* (Engler *et. al.*, 1997, Lagunavicius *et.al.*, 1997, Lagunavicius and Siksnys, 1997). En estas endonucleasas, el reconocimiento específico en condiciones fisiológicas, solo puede llevarse a cabo en presencia de  $Mg^{2+}$ , lo que indica que parte del reconocimiento podría estar dado por la estructuración adecuada del sitio catalítico. Sin embargo, edonucleasas como la *EcoRI* y la *BamHI*(Lesser *et.al.*, 1990; Engler *et. al.*, 1997) son capaces de reconocer de forma específica al ADN en ausencia de  $Mg^{2+}$ , aunque sin hidrolizar el ADN. Es posible que parte de la especificidad catalítica de las endonucleasas esté dada por la incapacidad de hidrolizar al ADN en sitios diferentes al canónico. Así, podríamos dividir al fenómeno de la especificidad de estas enzimas en dos partes: la especificidad de unión y la especificidad catalítica (que correspondería a la eficiencia catalítica). En este trabajo, entenderemos la especificidad como el reconocimiento y la hidrólisis de secuencias específicas del ADN.

En nuestro laboratorio, hemos estudiado el papel que juega la His114 en la actividad de la endonucleasa *EcoRI* (Flores *et. al.*, 1995). La His114 ha sido identificada por experimentos de mutagénesis, como un posible participante en el reconocimiento del substrato, puesto que que al mutarlo por algunos otros aminoácidos, es capaz de producir un "fenotipo estrella" (corte de ADN en secuencias que difieren sólo en un par de bases de la secuencia canónica; Gardner *et. al.*, 1982). La estructura cristológica del complejo *EcoRI*-ADN canónico (Kim *et al.*,1990) revela que la His114 no contacta directamente a las bases, sino que



podría contactar al fosfato del enlace fosfodiéster entre las adeninas en la secuencia canónica (Jeltsch *et al.*, 1993a). Dicha histidina se encuentra en una región de la endonucleasa *EcoRI*, en las que existen numerosas interacciones de reconocimiento y catálisis (Jeltsch *et al.*, 1993, Figura 7), lo que ha conducido a la propuesta de que en esta región pudiese existir un puente de comunicación entre el reconocimiento y la catálisis (Thielking *et al.*, 1991). La evidencia experimental existente no ha sido concluyente en cuanto al papel de la His114 en el reconocimiento hacia el ADN, o si este residuo funciona como un elemento comunicante entre el reconocimiento y la catálisis. En nuestro grupo de trabajo se ha señalado que los modelos cristalográficos de las estructuras de la endonucleasa *EcoRI* con y sin  $Mn^{2+}$ , sugiere la existencia de una interacción funcional entre la His114 y el Glu170. Dichos residuos se encuentran cercanos en la estructura terciaria de la endonucleasa *EcoRI* (Figura 8). También se ha observado que al mutar la posición 170 (Glu→Ala) produce un fenotipo estrella (Flores, 1995a). Esto, en conjunto con lo mencionado anteriormente, permitió emitir la hipótesis que establece que "la His114 de la endonucleasa *EcoRI* contacta al fosfato 5' de la adenina central de la secuencia canónica y al Glu170 de esta enzima en forma alterna; esto establece un sistema de comunicación tipo "interruptor" entre el reconocimiento y la catálisis de la endonucleasa *EcoRI*". En este trabajo presentamos evidencia que muestra que el *contacto específico* de los residuos codificados por los codones His114 y Glu170 no constituye un "interruptor", sino que estos residuos podrían formar parte del reconocimiento específico de la endonucleasa *EcoRI*, ayudando a la "adaptación" de la endonucleasa a la secuencia canónica en el ADN.

## CONTACTOS DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI* CON LAS BASES DEL ADN

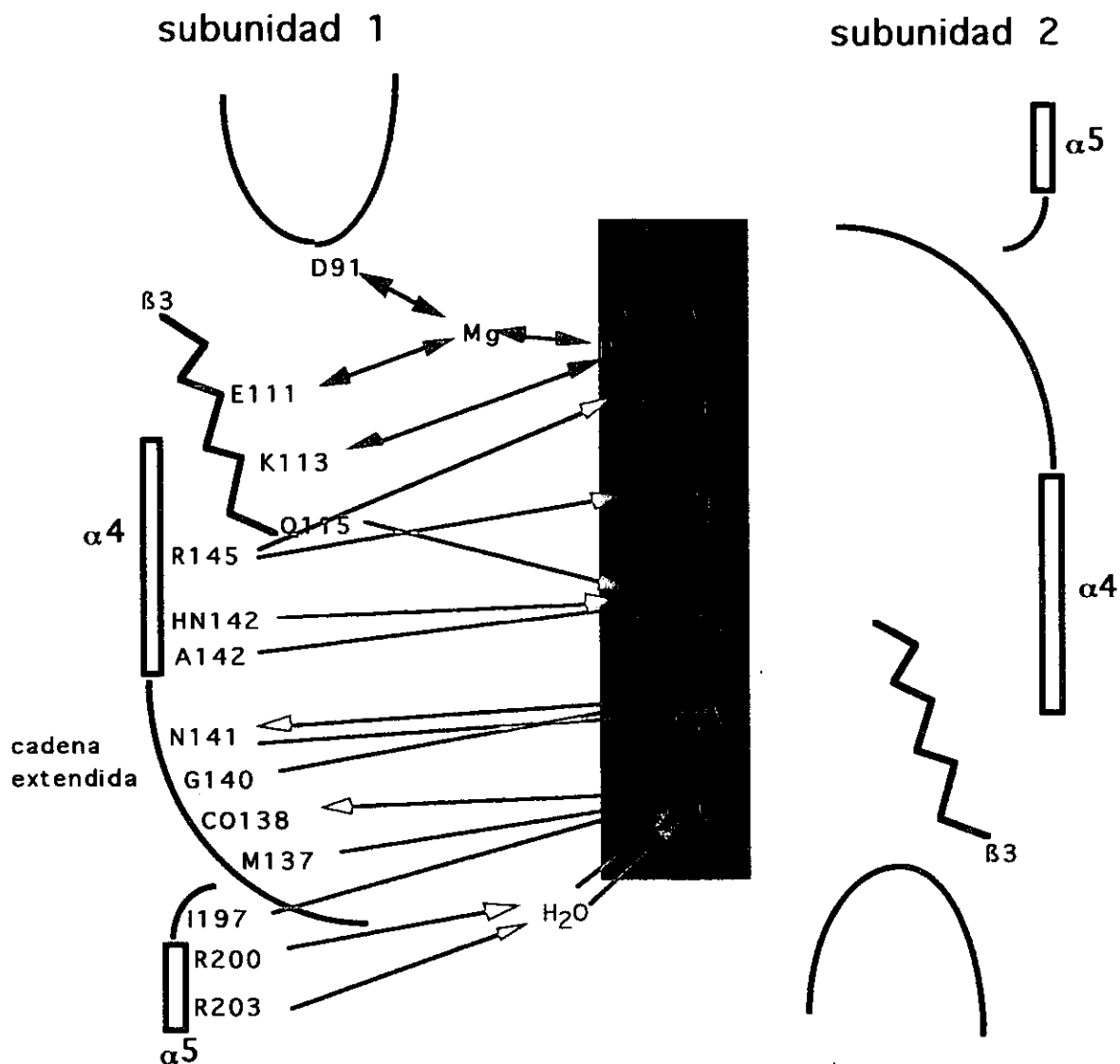


Figura 6. Diagrama que muestra en forma esquemática los residuos que contactan a las bases del ADN de la secuencia canónica de la endonucleasa *EcoRI*. Las flechas marrón indican los contactos de los residuos catalíticos, las rojas los contactos iónicos y las líneas azules los contactos hidrofóbicos (tomado de Pingoud and Jeltsch, 1997).



Figura 7. Modelo de la endonucleasa *EcoRI* en donde se muestra uno de los monómeros en color naranja y el ADN en color azul. Los residuos mutagenizados en este trabajo se muestran en color verde (His114 y Glu170). También se muestran en color amarillo los residuos de reconocimiento que se han identificado y en color rojo los residuos catalíticos.

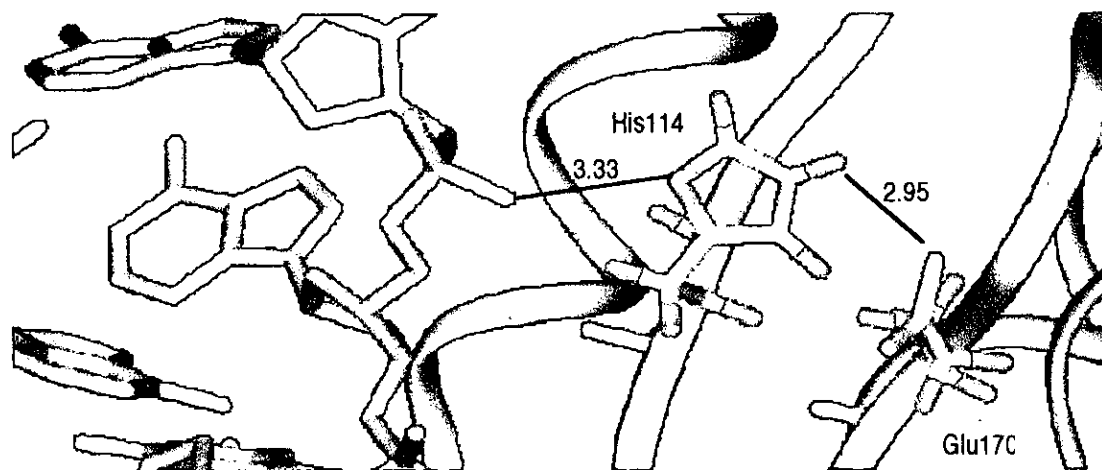


Figura 8. Modelo estructural de la endonucleasa *EcoRI* en el que se muestran los residuos His114, y el Glu170. El ADN esta representado en color azul y la estructura en listón de uno de los monómeros aparece en naranja. Se muestra también la distancia en angstroms de la His114 al ADN y de la His114 al Glu170. Los átomos de cada residuo se indican en el código de colores siguiente: C, verde; N, azul; O, rojo; H, blanco.

## **OBJETIVO**

## **OBJETIVO GENERAL.**

Contribuir al entendimiento del mecanismo de reconocimiento de la endonucleasa *EcoRI* hacia el ADN.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

a) Mediante mutagénesis a saturación, analizar la posible existencia de un "interruptor molecular" que conecte el reconocimiento con la catálisis de la endonucleasa *EcoRI*, constituido por el contacto específico de los residuos codificados por los codones His114 y Glu170,.

b) Explicar en base a las evidencias experimentales obtenidas el fenotipo estrella observado en algunas de las mutantes de la endonucleasa *EcoRI*, y de la endonucleasa silvestre bajo ciertas condiciones (pH, fuerza iónica, solventes orgánicos, etc.).

## **METODOS**

## **MODELO DE ESTUDIO Y PLASMIDOS UTILIZADOS.**

En nuestro laboratorio contamos con los genes que codifican al sistema de restricción-modificación *EcoRI*. La endonucleasa de este sistema es un buen modelo de estudio, debido a que ha sido ampliamente caracterizada por medios genéticos, bioquímicos y estructurales. Los genes de las dos enzimas que constituyen el sistema *EcoRI* se encuentran clonados en forma monocistrónica y dicistrónica. La endonucleasa se encuentra clonada monocistrónicamente en el plásmido pKGS160 y en forma dicistrónica, junto con la metilasa en el plásmido pKGS160Meti. En ambos plásmidos la endonucleasa se encuentra bajo el control del promotor lacUV5. El gen de la endonucleasa lleva una mutación en el codón Glu160, que lo cambia a Asp, cambio que aparentemente disminuye la estabilidad del monomero libre de la proteína, previo a la dimerización (Kuhn *et. al.*, 1986). Este cambio le permite a la bacteria sobrevivir en la ausencia de la metilasa *EcoRI* en condiciones de baja expresión de la endonucleasa. La metilasa se encuentra clonada monocistrónicamente en el plásmido pCJ1, y dicistrónicamente en el plásmido pKGS160Meti. La cotransformación de bacterias con los plásmidos pKGS160 y pCJ1, permite a las bacterias sobrevivir. No obstante, la eficiencia de la metilasa para proteger de la hidrólisis del ADN bacteriano producida por la endonucleasa, es limitada, comparada con la observada cuando está expresada en el mismo plásmido que la endonucleasa. Por tal motivo los experimentos fueron llevados a cabo en su mayoría mediante el uso del plásmido pKGS160Meti.

## **MUTAGENESIS DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI*.**

Para probar la posible comunicación de los residuos His114 y Glu170, el gen de la endonucleasa *EcoRI* fué mutado a saturación en los codones His114 y Glu170 por medio de técnicas de biología molecular convencional, PCR (Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) y por el método del megaprimer (Sarkar



and Sommer, 1990). También se mutó a saturación en forma independiente el codón Glu170, con el propósito de determinar si esta posición por si sola es capaz de producir mutantes con fenotipo estrella. La mutagénesis a saturación se hizo mediante el diseño de oligonucleótidos (oligos) en los que en las posiciones antes mencionadas se introdujo el codón NNS (N: mezcla equimolar de G, A, T, C; S: mezcla equimolar de G y C). Los oligos fueron sintetizados en la unidad de síntesis de oligonucleotidos del IBT, UNAM . También se usaron oligos para amplificar el gen de la endonucleasa por medio de PCR o para producir los fragmentos usados posteriormente como megaprimers. Tal es el caso del oligo168sat, que fué usado para verificar si el efecto de mutagenizar el codon Glu170 es exclusivo de esta posición; ó El oligo Glu111, que fué usado para obtener una enzima inactiva (Grabowski *et. al.*, 1995) empleada como control en los experimentos de inmunodetección. Los oligos sintetizados para hacer los cambios en el gen de la endonucleasa fueron los siguientes:

5'-Eco: 5'-TACAGGAATTCATGTCTAATAAAAAACAGTCAAATAGG-3'.

3'-Eco: 5'-GCTAGGATCCTCAGTGATGGTGATGGTGATGCTTAGATGTAAGCTGTTCAAAC-3'

114sat: 5'-CTTTACCTT**GS**NNTTTTGGCTTCAGC-3'.

170sat: 5-'AAAAAGTTAGACCC**SN**NTAGAAAAAGG-3'.

HindIII: 5'-GAAATAAATGAAGCTTTAAAAAAA-3'.

RevSeq: 5'-AATGCTTTTGCTTTTATGATTTACAA-3'.

168sat: 5'-GTCCTT**NNS**CTAGAGGGGTC-3'.

Gln111-Eco: 5'-CTTTACCTTGGTGTTTGGCTT**G**AGCAAC-3'.

Las posiciones marcadas en negritas en algunos de los oligos denotan los codones que fueron mutados en el gen de la endonucleasa *EcoRI*. Los sitios en donde hibridizan estos oligos en el gen de la endonucleasa, se esquematizan en la Figura 9:

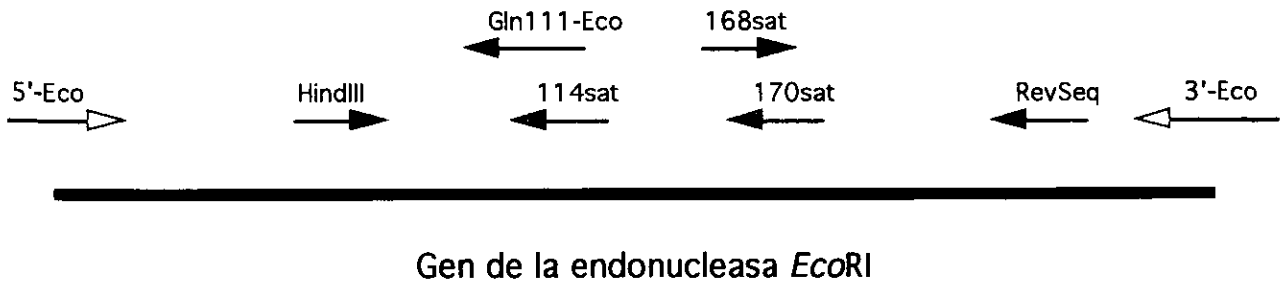


Figura 9. Diagrama esquemático que muestra el gen de la endonucleasa *EcoRI* y las zonas donde hibridizan los oligos utilizados en este trabajo.

La estrategia de mutagénesis de los codones His114 y Glu170 de la endonucleasa *EcoRI* se muestra en la Figura 10. Por medio de PCR, se sintetizó primero un megaprimer con la ayuda de los oligos 5'-Eco y 114sat. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 25pmoles de cada oligo, 100ng del plásmido pKGS160, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM de DNTP, 10mM de Tris-HCl, pH 8.3, 50mM de KCl, 2.5u de Taq polimerasa (Gibco-BRL). El programa de amplificación se hizo en un Robocycler™ 40 (Stratagene) de la siguiente manera: 25 ciclos[94°C 1 min., 55°C 1 min. y 72°C 2 min.], 94°C 1 min., 55°C 1 min. y 72°C 15 min. Estas condiciones de PCR se usaron para sintetizar todos los fragmentos de ADN utilizados en este trabajo. El producto de PCR se purificó de gel de agarosa al 1.5%. Para esto la muestra se cargó en el gel y se separó por electroforesis a un voltaje de 100volts en amortiguador TBE [90mM de Tris base, 90mM de ácido bórico, 24mM de EDTA], la banda del tamaño indicado se cortó del gel con una navaja y se pasó por una jeringa para romper la estructura del gel de agarosa, luego se le agregó 800µl de fenol saturado con 10mM de Tris-HCl pH 8, y se dejó 10 min. a -70°C; se

centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. y se separó el sobrenadante. A este se le hizo una extracción con fenol/cloroformo 1:1 y el ADN se precipitó con 0.2M de NaCl y 50% de etanol a -70°C. Se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 10min., la pastilla se secó al vacío y se se resuspendió en agua. Posteriormente se extendió el producto de PCR utilizando el megaprimer His114 como oligo 5', y el oligo 170sat como el 3'. Se purificó este fragmento generado por la PCR como ya se mencionó, y finalmente se extendió y amplificó el gen completo de la endonucleasa, usando como megaprimer a este producto purificado y al oligo 3'-Eco, el cual hibridiza en la parte final del gen de la endonucleasa (Figura 9). El producto de esta PCR fue reamplificado con los oligos 5'-Eco y 3'-Eco y digerido con las enzimas *HindIII* y *PstI* (50mM de Tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 50mM de NaCl, pH 8.0 a 37°C, por 3h mínimo). El fragmento que corresponde a la parte central de la endonucleasa se purificó de gel de agarosa y fué ligado (ligasa T4, Boehringer Mannheim, y amortiguador de ligasa Gibco-BRL [50mM de Tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de ATP, 1mM de DTT, 25% de polietilen-glicol-8000, pH 7.6], a 25°C, por 2h) al plásmido pKGS160Meti previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, en una proporción 1:7.5 veces el plásmido respecto al inserto, en un volúmen de 15µl.

Todas las estrategias de mutagénesis empleadas en este trabajo fueron realizadas de manera similar a la descrita en el párrafo anterior, utilizando los oligonucleótidos adecuados para cada una de ellas.

ESTRATEGIA PARA GENERAR EL BANCO DE MUTANTES DOBLES EN LAS POSICIONES 114 Y 170 DEL GEN *ecoRI*.

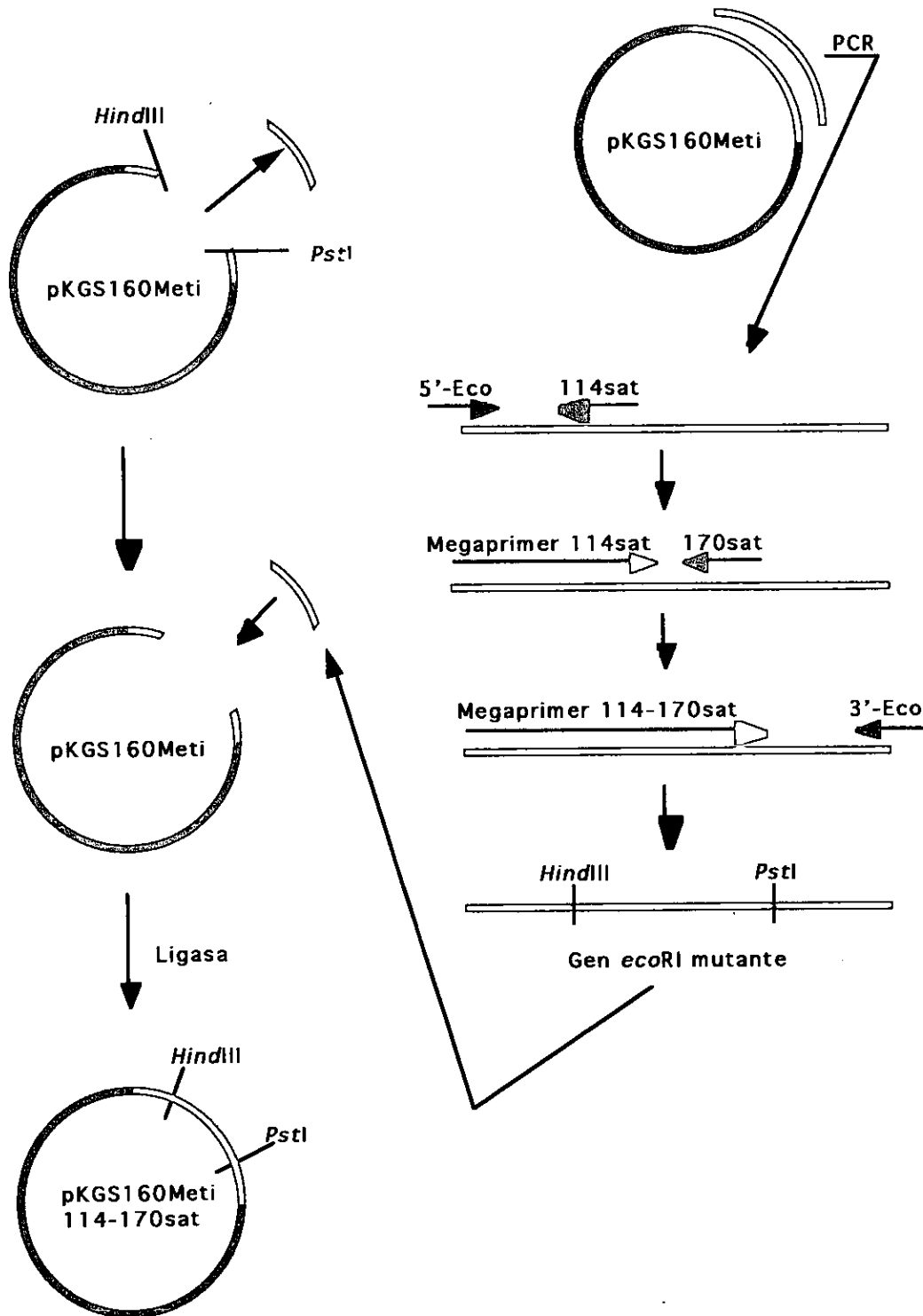


Figura 10. Estrategia para la generación y clonación del banco de mutantes dobles en las posiciones 114 y 170 del gen de la endonucleasa *EcoRI*.

## **ELECTROTRANSFORMACION DE LOS PLASMIDOS CON EL GEN DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI* EN CELULAS DE *E. coli*.**

Luego de ligar el fragmento *HindIII-PstI* de los productos de PCR en el plásmido pKGS160Meti, el cual se usó para electrotransformar células de *E. coli* de la cepa HF101 (Flores *et. al.*, 1995) en los casos en los que se requirió selección, o bien en la cepa JM101, para los casos en los que se requirió purificar plásmido. Las células de *E. coli* fueron preparadas de la siguiente manera: de un cultivo que creció durante toda la noche, se transfirió 1/100 de litro a un litro de medio Luria-Broth (LB). Este cultivo se dejó crecer durante 3h a 37°C, tiempo al cual el cultivo alcanzó una OD<sub>600</sub> de ≈8.9 (densidad óptica a 600nm). El cultivo se concentró mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. en tubos de 250ml. Se desechó el sobrenadante y las células se lavaron resuspendiéndolas en 125ml de glicerol estéril al 10%. El contenido de dos tubos se juntó en uno solo y las células se concentraron nuevamente por centrifugación. Se hicieron dos lavados más de la misma forma. Finalmente las células provenientes del litro de cultivo inicial se resuspendieron en 200ml de solución GYT (10% de glicerol, 0.125% de extracto de levadura y 0.25% de triptona) + 200μl de glicerol al 10%. De ésta suspensión se hicieron alícuotas de 60μl en tubos eppendorf estériles de 500μl.

La electrotransformación de los plásmidos que llevaban el gen de la endonucleasa se realizó de la siguiente manera: a la reacción de ligación se le extrajo el agua con butanol y luego se eliminó el butanol con etanol. La muestra se secó al vacío en un aparato DNA Speed Vac® (Savant) y luego se resuspendió en 10μl de agua. Se tomaron 2μl de ésta solución y se colocaron en un tubo con células competentes. La mezcla se transfirió a una celda para electroporación con una separación de electrodos de 1mm y se electrotransformó a un voltaje de 1.8volts, una resistencia de 200ohms y una capacitancia de 25μFa. Las células se transfirieron a 1ml de medio SOC (triptona al 2%, extracto de levadura al 0.5%, 10mM de NaCl, 2.5mM de KCl, 20mM de glucosa, 10mM de MgCl<sub>2</sub> y 10mM de MgSO<sub>4</sub>) y se incubaron

durante 1h a 37°C. Luego de este lapso de tiempo se tomaron 300µl y se sembraron en cajas con medio sólido suplementados con los antibióticos necesarios (los derivados de pKGS poseen resistencia a kanamicina, mientras que el plásmido pCJ1 tiene resistencia a cloramfenicol) y con X-Gal, en los casos en los que se requirió selección por color de la colonia.

### **SELECCION DE LAS MUTANTES GENERADAS.**

La selección de las mutantes producidas se hizo transformando la cepa HFJM101 (Flores *et. al.*, 1995) con el banco de mutantes. Dicha cepa lleva una fusión transcripcional en la que los genes del operón lac se encuentran bajo el promotor P<sub>dinD</sub>, el cual se induce durante la respuesta SOS en *E. coli*. El sistema SOS responde a la presencia de ADN hidrolizado ó de cadena sencilla (Figura 11). De esta manera las mutantes con actividad de corte pueden ser visualizadas como colonias azules en cajas Petri con medio LB sólido, X-Gal (30µg/ml) y kanamicina (25µg/ml), antibiótico al cual confieren resistencia los derivados del plásmido pKGS.

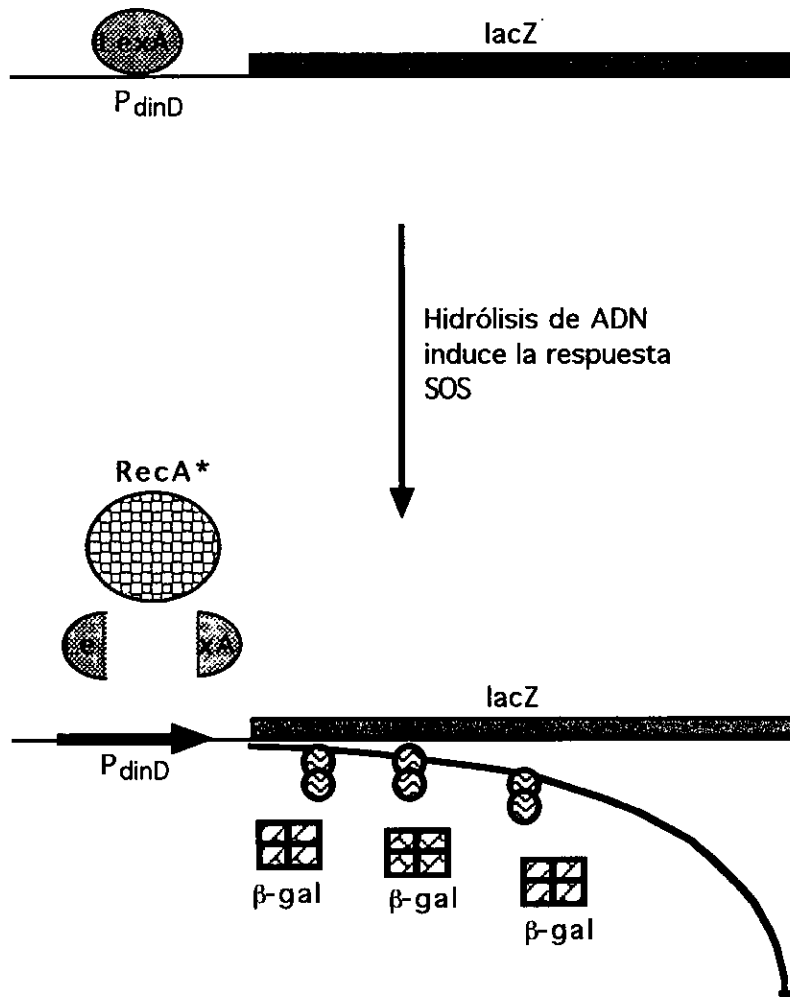


Figura 11. Inducción de la respuesta SOS acoplada a  $\beta$ -galactosidasa. La cepa SOS de *E. coli* contiene una fusión de un gen del sistema SOS de esta bacteria con el gen *lacZ*. Este gen se encuentra reprimido por la proteína LexA, al menos que exista en el medio intracelular ADN hidrolizado, el cual es censado por la proteína Rec\*, la cual inactiva a LexA, permitiendo la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa. Esto provee de un método para seleccionar colonias en las que existe una endonucleasa capaz de hidrolizar al ADN, utilizando un medio con X-Gal como indicador.

## **SECUENCIACION DE LOS GENES MUTANTES.**

Para la secuenciación de los genes se utilizó el "kit" de Termosequencia™ de Amersham. Se emplearon los reactivos y las condiciones marcadas en el "kit" de secuenciación. Los oligonucleótidos HindIII y REVSEQ (5pmoles) se usaron para secuenciar la parte central del gen de la endonucleasa. La reacción de secuencia se cargo en un gel de poliacrilamida al 7%, con 8M de urea y se corrió una electroforesis a una potencia de 55watts. El gel se secó y se expuso en una pantalla del Phosphorimager™, el cual posteriormente se "escaneó" y se determinó la secuencia del gen de la endonucleasa. Los genes de las mutantes seleccionadas para hacer una mayor caracterización se secuenciaron completamente con un secuenciador automático Perkin-Elmer 377-18 en la unidad de secuenciación del IBT, UNAM.

## **DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE $\beta$ -GALACTOSIDASA.**

De un cultivo de las mutantes seleccionadas que llevaban el plásmido pKGS160Meti en la cepa HF101, que creció durante toda la noche (over night, ON) en medio Luria-Broth (LB), a 37°C, se reinoculó en medio líquido LB un volúmen que correspondió a 1/100 del volúmen total de este medio, para hacer las determinaciones de  $\beta$ -galactosidasa. Luego de crecer durante 4h, las células se concentraron centrifugando a 14000 rpm durante 3 min., y se resuspendieron en 900ml de amortiguador Z (60mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 40mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 10mM de KCl, 1mM de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 50mM de 2- mercaptoetanol, pH 7.0). Luego se les agregó 70 $\mu$ l de SDS al 0.2% y 30 $\mu$ l de cloroformo. Las muestras se agitaron por 10 seg. y se les agregó ONPG (orto-nitro-fenil-galactopiranosido 16mg/ml en amortiguador Z). Después de cierto tiempo (de 20 segundos a 3 minutos) las muestras se tornaron amarillas y la reacción fué detenida agregando 500 $\mu$ l de 1M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm (microcentrífuga



Eppendorf) por 1 min., y luego se leyó la absorbancia a 420nm. En los ensayos en los que se usó 1mM de IPTG (isopropiltiogalactopiranosido), este se agregó 2h después de haber inoculado el cultivo.

## **INMUNODETECCION DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI* SILVESTRE Y ALGUNAS DE SUS MUTANTES.**

Con el fin de determinar si la falta de actividad de algunas de las mutantes de la endonucleasa *EcoRI* se debía a la ausencia de producción de la proteína, se hizo una inmunodetección con anticuerpos policlonales anti *EcoRI* de conejo (donados por Joseph Heitman). De un cultivo de células de *E. coli* que creció durante 10 horas en LB, se colectaron las células de 1 ml, por centrifugación a 14000 rpm durante 4 min. La pastilla se resuspendió en 50 $\mu$  l de agua + amortiguador 2X (125mM de Tris-HCl pH 6.8, 10% de 2-mercaptoetanol, 20% de glicerol, 4.6% de SDS, 0.01% de azul de bromofenol) y se cargó en un gel de poliacrilamida al 12% preparada en un amortiguador (375mM de Tris-HCl pH 8.8, 0.1% de SDS, 12% de acrilamida, 0.1% de persulfato de amonio, 0.04% de TEMED, con gel concentrador de acrilamida al 5%: 125mM de Tris-HCl pH 6.8, 0.01% de SDS, 5% de acrilamida, 0.01% de persulfato de amonio, 0.1% de TEMED). La proteínas se separaron por electroforesis en amortiguador de corrida (25mM de Tris, 192mM de glicina, 0.1% de SDS), con una corriente de 20mA. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a nitrocelulosa en una cámara de transferencia en un amortiguador (50mM de Tris, 380mM de glicina, 0.1% de SDS, 20% de metanol), a una corriente de 400mA durante 1h. La membrana de nitrocelulosa ya con las proteínas transferidas, se saturó con gelatina en el siguiente amortiguador: 10mM de Tris-HCl pH 8.0, 150mM de NaCl, 0.05% de Tween, 3% de gelatina, durante 1h a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces por 10 min. con agitación en amortiguador de lavado (Tris-HCl 10mM pH 8.0, NaCl 150mM, Tween'20 0.05%).

Posteriormente, la membrana se incubó 1h en 50ml de amortiguador de gelatina al 1% (10mM de Tris-HCl pH 8, 150mM de NaCl, 0.5% de Tween 20, 1% de gelatina) con el anticuerpo anti *EcoRI* diluido 1:2000. La membrana se lavó 3 veces por 10 min. en amortiguador de lavado, luego se transfirió a un recipiente con 30ml de amortiguador de gelatina al 1% con el anticuerpo anti IgG de conejo diluido 1:7500 y se incubó durante 1h. La membrana se lavó 3 veces por 10 min con amortiguador de lavado y luego se escurrió. Posteriormente, la membrana se colocó en un recipiente que contenía 15ml de amortiguador de reacción de fosfatasa alcalina (100mM de Tris-HCl pH 9.5, 100mM de NaCl, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 165mg/ml de NBT, 53mg/ml de BCIP), durante 1h en la oscuridad. Por último, la membrana se lavó con una solución 0.5M de EDTA para detener la reacción y se dejó secar sobre papel absorbente.

#### **PURIFICACION DE LAS MUTANTES DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI*.**

De un cultivo que creció durante toda la noche, se resembró 1/100 en un 1.0L de medio LB para la endonucleasa silvestre, ó 1.5L para las clonas mutantes con fenotipo estrella. Se dejaron crecer las células a 37°C durante 2h, se les agregó IPTG a una concentración final de 1mM, y se dejaron crecer por 2h más. Todos los pasos que se describen a continuación se realizaron a 4°C. Se colectaron las células en tubos de 40ml, centrifugando a 4000 rpm por 13 min., se resuspendieron en 20ml de amortiguador de lisis (20mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de EDTA [sal disódica del ácido etilendinitrilo tetracético], 1mM de PMSF [fluoruro de fenil-metil-sulfonilo]). Las células se sonicaron en un aparato VWR Scientific con vastago grueso con 5 pulsos de 15 seg. cada uno y dejando en hielo durante 3 minutos entre cada pulsación. Se centrifugaron 15 min. a 10000 rpm y luego se pasó la muestra a tubos de polipropileno y se centrifugaron a 21000 rpm por 60 min. en un rotor SW40Ti. Se le agregó 1/5 del volúmen en peso de sulfato

de estreptomicina y se agitó por 45 min en hielo. Posteriormente las muestras se centrifugaron 10000 rpm durante 15 min., se tomó el sobrenadante y este se dializó por tres horas, luego ON contra un amortiguador (20mM de  $KPO_4$ , 5mM de 2-mercaptoetanol, 200mM de KCl, 2mM de ditioneitol , 1mM de PMSF, 0.5mM de EDTA, 10% de glicerol, pH 7.4).

#### COLUMNA DE FOSFOCELULOSA.

La muestra de proteína dializada se cargó en una columna de fosfofocelulosa previamente activada (se trató con 0.5N de KOH durante 5 min. y luego se filtró y se lavó con agua, luego se trató con de 0.5N de HCl y se lavó con agua hasta que alcanzó un pH de 4.5 o más, después se lavó con un amortiguador [20mM de  $KPO_4$ , 100mM de KCl, 0.5mM de EDTA, pH 7.4]). La muestra se eluyó con una fase móvil (20mM de  $KPO_4$ , 5mM de 2-mercaptoetanol, 0.1mM de EDTA, 10% de glicerol) con un gradiente de 0.15M→1M de KCl y se tomaron fracciones de 3ml. Se determinó la actividad de las fracciones mediante digestiones de 500 ng de ADN de fago  $\lambda$ , utilizando 1ml de cada fracción. El amortiguador utilizado para las digestiones fue el "Buffer H" (Boehringer-Mannheim).

#### COLUMNA DE HIDROXIAPATITA.

Las fracciones de la columna de fosfofocelulosa que presentaron mayor actividad se cargaron en una columna de hidroxapatita previamente equilibrada con amortiguador (20mM de  $KPO_4$ , 5mM de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol, 200mM de KCl). Se lavó con 200ml de amortiguador de lavado (150mM de  $KPO_4$ , 5mM de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol). La muestra se eluyó con un amortiguador (5mM de 2-mercaptoetanol, 10% de glicerol) que contenía un gradiente 0.15M→0.8M de  $KPO_4$ . Se colectaron muestras de 3ml y se determinó la actividad de la endonucleasa en las fracciones como se describió para la columna de fosfofocelulosa.

Las fracciones con mayor actividad se juntaron y se les agregó EDTA a una concentración final de 1mM. La muestra se dializó durante 4h en el siguiente amortiguador: 20mM de  $KPO_4$ , 0.4M de KCl, 1mM de EDTA, 0.2mM de ditioneitol, 10% de glicerol; luego contra el mismo amortiguador por toda la noche, pero con contenido de glicerol al 50%. Finalmente, se agregaron 28 ml de glicerol por cada 100 ml de muestra de la endonucleasa.

A la muestra anterior se le determinó la concentración de proteína presente por medio de espectrofotometría a 278 nm, según Modrich y Zabel (1976).

### **ELECTROFORESIS Y TINCION CON NITRATO DE PLATA DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI* Y LAS MUTANTES SELECCIONADAS.**

Para verificar el grado de purificación obtenido de las mutantes de las endonucleasas purificadas se separaron las proteínas por medio de electroforesis en gel de acrilamida de manera similar al descrito en la sección previa a este apartado. El gel con las muestras se tiñó con  $AgNO_3$  al 0.1% de la siguiente manera: Se colocó el gel en isopropanol al 30% y Ac. acético al 10% durante 1h. Posteriormente se transfirió a isopropanol al 10% durante 10 min. y luego en isopropanol al 5% durante 10 min. Luego se colocó el gel en 100ml de DTT a 20mM durante 30 min. Luego se pasó el gel a una solución de  $AgNO_3$  al 0.1% durante 30 min., se enjuagó con agua y se transfirió a una solución que contenía  $Na_2CO_3$  al 3% y formaldehído al 0.02%, hasta que se revelaron las bandas correspondientes a las proteínas presentes en el gel. La reacción se detuvo enjuagando el gel varias veces con agua y finalmente a una solución de ácido acético al 1%.

## **CARACTERIZACION *in vitro* DE LAS MUTANTES PURIFICADAS DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI* MEDIANTE LA DIGESTION DE ADN DE FAGO $\lambda$ EN DIFERENTES CONDICIONES.**

Posterior a la purificación de las mutantes con mayor actividad, se caracterizaron *in vitro* mediante la digestión de ADN de fago  $\lambda$ .

La digestión de ADN de fago se llevó en diferentes condiciones:

a) Diferentes concentraciones de espermidina. La espermidina incrementa la especificidad de varias endonucleasas de restricción (Pingoud *et. al.*, 1984; Pingoud 1985) y podría aumentar la especificidad de las mutantes con fenotipo estrella de la endonucleasa *EcoRI*. La digestión se realizó en las siguientes condiciones: 20ng/ml de DNA de fago  $\lambda$ , 50mM de tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de DTE, 50mM de NaCl, 50nM de *EcoRI*, diferentes concentraciones de espermidina (2.5mM→40mM), en 20 ml de volúmen total, a 37°C, durante 1.5h.

b) Diferentes concentraciones de NaCl. Se ha demostrado que la endonucleasa *EcoRI* presenta fenotipo estrella en amortiguadores con baja fuerza iónica (Polisky *et. al.*, 1975). Con el propósito de determinar si el fenotipo estrella de las mutantes desaparece al aumentar la fuerza iónica, se hicieron digestiones de ADN de fago  $\lambda$  en las siguientes condiciones: 20ng/ml de DNA de fago  $\lambda$ , 50mM de tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de DTE, 50nM de *EcoRI* y diferentes concentraciones de NaCl (25mM→400mM), en 20 ml de volúmen total, a 37°C durante 1.5h.

c) Diferentes concentraciones de hidrocloreuro de guanidina(GndHCl). Para determinar el efecto de la GndHCl sobre la digestión de ADN de fago  $\lambda$  de las mutantes, se hicieron digestiones de ADN de fago  $\lambda$  en diferentes concentraciones de este desnaturizante en las siguientes condiciones: 20ng/ml de DNA de fago  $\lambda$ , 50mM de tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de DTE, 50mM de NaCl, 50nM de *EcoRI* y diferentes concentraciones de hidrocloreuro de guanidina (50mM→400mM), en 20 ml de volúmen total, a 37°C durante 1.5h.

d) Estabilidad a distintas temperaturas de las mutantes seleccionadas. Se determinó la estabilidad a la temperatura de las clonas *EcoRI* seleccionadas. Con este propósito se hicieron digestiones de ADN de fago de la siguiente manera: Se colocaron alicuotas de las mutantes purificadas a diferentes temperaturas durante 10 minutos en un aparato para PCR "Robocycler™" de Stratagene®. Las temperaturas variaron de 45 a 75°C. Luego se digirió el ADN de fago en las siguientes condiciones: 20ng/ml de DNA de fago  $\lambda$ , 50mM de tris-HCl, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1mM de DTT, 50mM de NaCl, 50nM de *EcoRI*, en 20 ml de volúmen total, a 37°C, durante 1.5h.

## **RESULTADOS**

## **GENERACION DE LOS BANCOS Y SELECCION DE LAS MUTANTES DEL GENE DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI*.**

Se generó un banco de mutantes dobles a saturación en los codones codones correspondientes a los residuos His114 y Glu170, y sencillas en el codón correspondiente al residuo Glu170 en el gen de la endonucleasa *EcoRI*. Las mutantes fueron seleccionadas utilizando los plásmidos pKGS160Meti y pKGS160 como vectores de expresión. El plásmido pKGS160Meti, como se mencionó antes, lleva los genes de la endonucleasa y la metilasa del sistema *EcoRI*. El banco de mutantes generado con este plásmido como vector permitió observar y seleccionar las clonas mutantes con fenotipo estrella, puesto que las mutantes que producen este fenotipo, hidrolizan al ADN aún en presencia de la metilasa. Por otro lado, la clonación del banco de mutantes en el plásmido pKGS160 (el cual solo lleva el gen de la endonucleasa) y la inducción de la endonucleasa con IPTG (1mM), permitió observar y seleccionar mutantes con fenotipo nulo (inactivas), dado que la expresión de la endonucleasa de las clonas que presentan actividad es letal para la bacteria. La transformación del plásmido pKGS160 en presencia y ausencia del plásmido pCJ1, el cual lleva el gen de la metilasa, permitió la selección de las clonas mutantes con fenotipo silvestre, debido a que las mutantes con dicho fenotipo son letales en ausencia de la metilasa, pero permiten el crecimiento celular en presencia de ella. La selección se basó en la forma, el tamaño y el color de la colonia (blancas o azules) que crecieron en LB suplementado con X-Gal.

De un banco de aproximadamente  $2 \times 10^4$  clonado en el plásmido pKGS160Meti, se seleccionó el fenotipo estrella de las mutantes de los codones His114 y Glu170. Este banco permitió que con una probabilidad mayor a .99 [según la fórmula  $N = \ln(1-p)/\ln(1-f)$ ; donde p es la probabilidad de obtener una mutante en particular, f es la frecuencia de aparición de esa mutante y N es el tamaño del banco a muestrear], estuvieran representadas las 1024 mutantes posibles (400 clonas con



combinaciones de aminoácidos diferentes), producto de la mutagénesis de los codones que codifican a los residuos His114 y Glu170. Los genes de las clonas de la endonucleasa *EcoRI* fueron secuenciados con los oligos HindIII y RevSeq, para determinar los residuos presentes en las posiciones mencionadas (ver Tabla 2). Asimismo a partir de un banco de aproximadamente de  $5 \times 10^3$  (con una *p* mayor a .99 de que estuvieran representadas todas las mutantes posibles) se aislaron y secuenciaron mutantes activas de fenotipo silvestre o nulo ( Tabla 3 y 4).

La mutagénesis del codón correspondiente al Glu170 generó un banco de  $3 \times 10^3$  (con una *p* mayor al .99 de que estuvieran representadas todas las mutantes posibles), el cual reveló que la sustitución de Glu por diferentes residuos (Tabla 5), induce fenotipo estrella a la endonucleasa *EcoRI*. Para determinar si el fenotipo estrella observado al mutar el codón del Glu170 podía ser inducido por la mutación de otro codón en la zona estructural en la que se encuentra el Glu170, decidimos mutagenizar a saturación el codón Phe168 (Tabla 6). La mutación sobre este residuo generó un banco de  $1 \times 10^3$ , el cual no produjo colonias con fenotipo estrella. La secuenciación de algunas de estas mutantes reveló que hubo varios cambios además de los generados en el codón Phe168, no obstante, la mayoría de los cambios fueron silenciosos, por lo que no se vió afectado el análisis.

**Tabla2.** Clonas producto de la mutagénesis combinatoria de las posiciones 114 y 170 de la endonuceasa *EcoRI* con actividad estrella.

Residuos en las posiciones 114 y 170	Número de veces encontrada	Fenotipo de la colonia con IPTG	Crecimiento de la colonia bajo inducción con IPTG		
			0mM	50mM	100mM
H-E (silvestre)	-	Normal	++++	++++	++++
H-T	18	Translúcido	++	-	-
T-T	6	Translúcido	++	-	-
Y-T	2	Translúcido	++	-	-
S-L	1	Translúcido	++	-	-
T-H	2	Translúcido	++	-	-
S-N	1	Translúcido	++	-	-
H-Q	4	Translúcido	++	+	+
A-Y	1	Translúcido	++	-	-
S-A	1	Translúcido	ND		
T-S	1	Translúcido	++	+	-
T-V	1	Translúcido	++	-	-
N-Q	1	Normal	++	+	+
H-A	1	Normal	++	++	+
T-E	-	Translúcido	++	+	+
F-E	-	Translúcido	++	-	-

Clonas de la endonucleasa *EcoRI* con fenotipo estrella encontradas en medio sólido suplementado con X-Gal. Estas clonas fueron seleccionadas utilizando el plásmido pKGS160Meti, el cual lleva la metilasa en cis (en forma dicistrónica). En la cuarta columna, el número de signos "+" indican el grado de crecimiento de la colonia. El signo "-" indica no crecimiento. ND : no determinado.

**Tabla 3.** Clonas producto de la mutagénesis combinatoria de las posiciones 114 y 170 de la endonucleasa *EcoRI* activas no estrella.

Residuos en las posiciones 114 y 170	Número de veces encontrada	Fenotipo de la colonia con IPTG	Crecimiento de la colonia bajo inducción con IPTG		
			0mM	50mM	100mM
*H-E (silvestre)	-	Translúcido	++++	+	-
L-L	3	Translúcido	++++	+	-
H-L	1	Translúcido	++++	+	-
H-H	1	Translúcido	++++	+	-
Q-L	1	Translúcido	++++	+	-

Las clonas de la *EcoRI* con fenotipo silvestre se encontraron al clonarias en el plásmido pKGS160, el cual carecen de la metiltransferasa de *EcoRI*, y luego con la cotransformación de este plásmido con el pCJ1, el cual lleva el gene de la metilasa. En la cuarta columna el simbolo "+" indica el crecimiento de la colonia. El signo "-" indica no crecimiento. \*Nota la eficiencia de la protección dada por la metiltransferasa en trans es menor que cuando se encuentra en cis.

**Tabla 4.** Clonas producto de la mutagénesis combinatoria de 114 y 170 de la endonucleasa *EcoRI* no activas.

Residuos en las posiciones 114 y 170	Número de veces encontrada	Fenotipo de la colonia con IPTG	Crecimiento de la colonia bajo inducción con IPTG
			100mM
H-E (silvestre)	-	Translúcido	++++
N-P	1	Normal	++++
P-H	4	Normal	++++
H-P	6	Normal	++++
P-R	1	Normal	++++
P-P	2	Normal	++++
P-A	1	Normal	++++
S-P	1	Normal	++++

**Tabla 5.** Mutantes de la endonucleasa *EcoRI* en la posición 170 que mostraron actividad estrella.

Residuos en las posiciones 114 y 170	Número de veces encontrada	Fenotipo de la colonia con IPTG	Crecimiento de la colonia bajo inducción con IPTG		
			0mM	50mM	100mM
H-E (silvestre)	-	Normal	++++	++++	++++
H-V	2	Translúcido	++++	+	+
H-Q	2	Translúcido	++++	+	+
H-A	1	Translúcido	++++	++	+
H-K	1	Translúcido	++++	+	+
H-T	3	Translúcido	+++	-	-
H-I	4	Normal	+++	+++	++
H-R	1	Normal	+++	+++	++

**Tabla 6.** Clonas secuenciadas de la endonucleasa *EcoRI* en la posición 168.

Residuos en las posiciones 114 y 170	Número de veces encontrada	Mutaciones diferentes a la posición 168	Crecimiento de la colonia bajo inducción con IPTG		
			0mM	50mM	100mM
F (silvestre)	1	Ninguna	Activa no estrella		
L	1	Ninguna	Semiactiva no estrella		
G	1	TAC-TAT en Y165Y	Activa no estrella		
R	1	GCT- ACT en A142T	inactiva		
F	1	GGG-TGG en G171W	inactiva		
E	1	TAC-TAT en Y165Y	inactiva		

No se detectaron mutantes en esta posición con actividad estrella. En las clonas secuenciadas se observaron mutaciones extra a la posición 168, pero en dos de los casos fue un cambios sinónimo (TAC-TAT en Y165Y), por lo que no se vió afectado el análisis.

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASA DE LAS MUTANTES CON FENOTIPO ESTRELLA DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI*.

Las clonas mutantes con fenotipo estrella (en la cepa HF101) que mostraron un color azul más intenso en medio sólido suplementado con X-Gal, lo que indicó la actividad estrella en las clonas, fueron seleccionadas para determinar su actividad de  $\beta$ -galactosidasa. La clona mutante que mostró una mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa sin induccion con IPTG fue la clona Thr114-Thr170 (Figura 12), mientras que bajo inducción con IPTG la clona más activa fue Thr114-His170 (Figura 13).

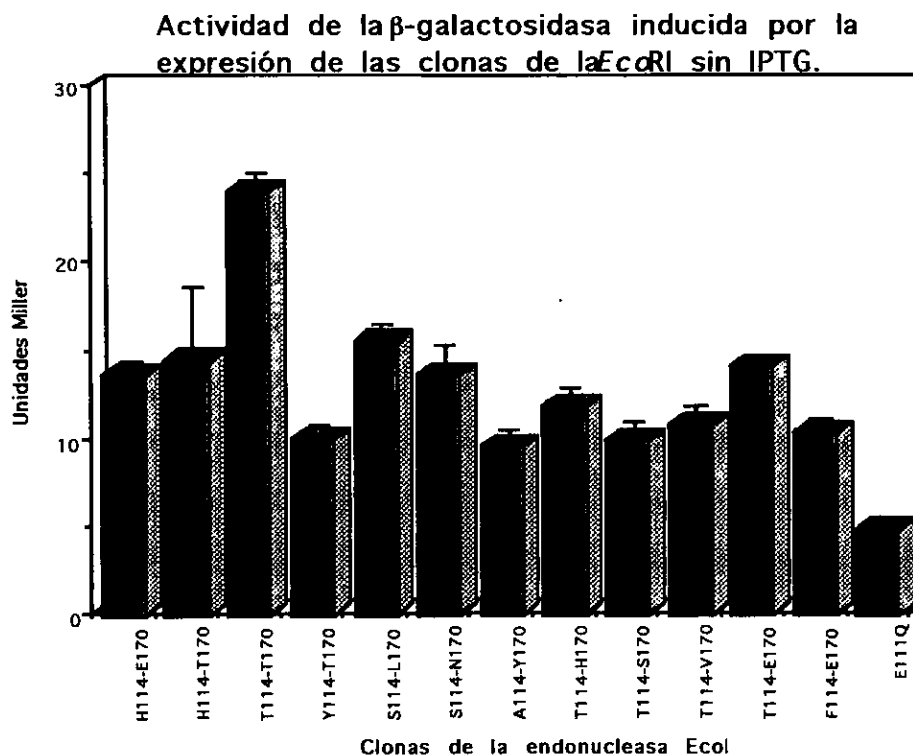


Figura 12. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa HF101 inducida por la expresión de las diferentes clonas de la endonucleasa *EcoRI*, en ausencia de IPTG. La endonucleasa silvestre esta representada por H114-E170, mientras que la endonucleasa inactiva esta indicada por E111Q.

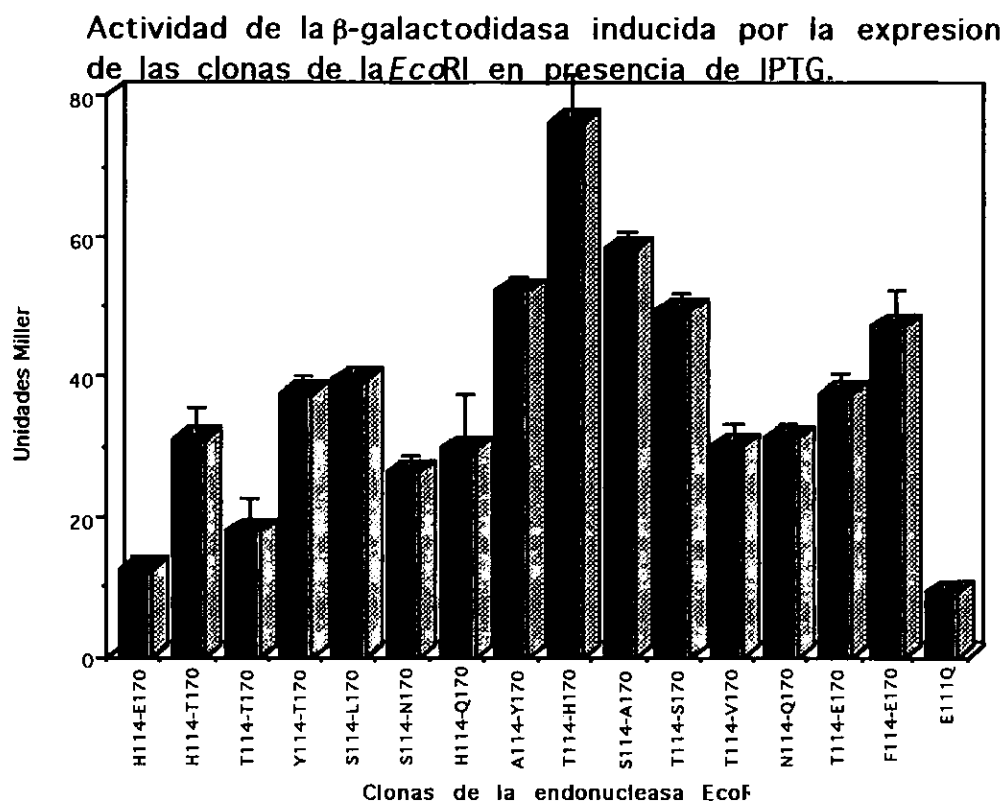


Figura 13. Actividad de  $\beta$ - galactosidasa en la cepa HF101 inducida por la expresi3n de las diferentes clonas de la endonucleasa *EcoRI* en presencia de 1mM de IPTG. La endonucleasa silvestre es H114-E170, mientras que la endonucleasa inactiva esta representada por E111Q.

### INMUNODETECCION DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI* EN LAS CLONAS CON FENOTIPO NULO.

Las clonas que mostraron un fenotipo nulo (inactivas), hasta donde pudimos observar, siempre tuvieron prolina en alguna de las dos posiciones (Tabla 4). Para determinar si el fenotipo nulo est3 determinado por la baja actividad de la endonucleasa mutante, o por la ausencia de prote3na, se hizo una inmunodetecci3n de tres de estas mutantes. Los resultados de la inmunodetecci3n con los

anticuerpos policlonales mostraron varias bandas. De acuerdo al peso molecular y a la comparación con la endonucleasa comercial, una de ellas correspondió a la endonucleasa *EcoRI*. La presencia de prolina en cualquiera de las posiciones analizadas, inactiva a la endonucleasa *EcoRI*. La clona His114-Pro170 inestabilizó a la proteína. Mientras que las clonas Pro114-Ala170 y Pro114-Pro170 inactivaron a la endonucleasa *EcoRI*, aboliendo probablemente su actividad catalítica y/o unión al ADN (Figura 13). Las bandas detectadas correspondientes a proteínas de peso molecular diferente a la endonucleasa *EcoRI*, probablemente se deban a la presencia de anticuerpos dirigidos contra proteínas presentes en la muestra de la endonucleasa *EcoRI* que fue utilizada para generar los anticuerpos. No parece ser que las bandas de peso molecular menor observadas se deban a degradación de la endonucleasa *EcoRI*, puesto que el control sin endonucleasa [E111Q -(H/S)] también las muestra.

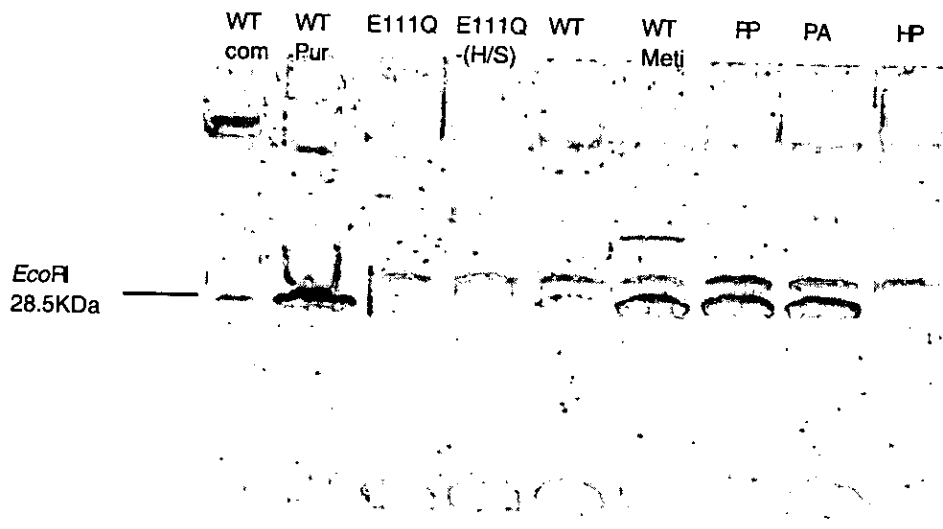


Figura 13. Inmunodetección de varias clonas de la endonucleasa *EcoRI* con anticuerpos policlonales de conejo anti *EcoRI*. De izquierda a derecha se muestran la *EcoRI* comercial (WTcom, Boehringer-Mannheim), la *EcoRI* silvestre purificada (WTPur), la *EcoRI* inactiva en E111Q (E111Q), la *EcoRI* silvestre de extracto celular (WT), la *EcoRI* silvestre clonada en pKGS160Meti (WTMeti), la clona Pro114-Pro170 (PP), la clona Pro114-Ala170 (PA) y la clona His114-Pro170 (HP). Todas las clonas excepto la mencionada en la línea anterior fueron clonadas en el plásmido pKGS160.

### PURIFICACION PARCIAL DE ALGUNAS DE LAS CLONAS SELECCIONADAS ENTRE LAS QUE MOSTRARON UN FENOTIPO ESTRELLA MAS INTENSO.

Se purificaron las proteínas de algunas de las clonas mutantes seleccionadas con mayor actividad estrella, además de la enzima "silvestre" (con cambio en Glu160Asp). Las proteínas de las clonas que se purificaron fueron la His114-Thr170, Thr114-His170, Phe114-Glu170 (esta clona no se aisló en este trabajo, pero se decidió caracterizarla, puesto que previamente se había observado en nuestro laboratorio que mostraba una alta actividad estrella [Flores *et. al.*, 1995]). En la Figura 14 se muestran los resultados de la purificación para la



endonucleasa silvestre y las clonas mutantes revelados mediante tinción con nitrato de plata. La purificación fué parcial, puesto que se observan otras proteínas en el gel, aunque todas las clonas purificadas mostraron una purificación arriba del 90%, excepto para la clona Thr114-His170, la cual quedó entre 60 y 80%. El rendimiento de la purificación fue variable para las diferentes clonas, obteniéndose una concentración mayor para endonucleasa silvestre, seguida por la clona His114-Thr170, la clona Phe114-Glu170 y la clona Thr114-His170. La concentración de las clonas determinada por la A<sub>278</sub> y un E<sub>1%</sub>,<sub>1cm</sub> = 8.3 (Modrich and Zabel, 1976) fueron las siguientes: 0.4702mg/ml para la clona His114-Thr170, 0.0518mg/ml para la Thr114-His170, 0.1556mg/ml para la Phe114-Glu170 y 0.6227mg/ml para la endonucleasa silvestre.

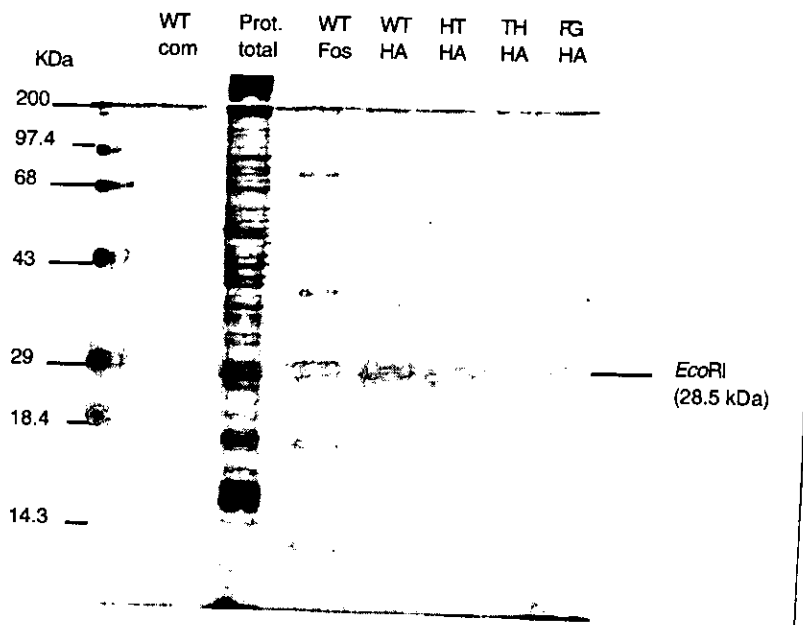


Figura 14. Gel de proteína teñido con plata en el que se muestra las diferentes clonas de la endonucleasa EcoRI luego de ser purificadas con una columna de hidroxapatita (HA). De izquierda a derecha se muestra un marcador de peso molecular en KDa, la EcoRI comercial (WT com, Boehringer-Mannheim), extracto de proteína totales (Prot Total), la EcoRI silvestre después de la columna de fosfocelulosa (WT Fos), la EcoRI silvestre después de la columna de hidroxapatita (WT HA), la clona His114-Thr170 (HT HA), la clona Thr114-His170 (TH HA) y la clona Phe114-Glu170 (FG HA).

## **CARACTERIZACION *in vitro* DE LAS CLONAS MUTANTES SELECCIONADAS DE LA ENDONUCLEASA *EcoRI*.**

Para poder analizar con mayor profundidad el problema, decidimos purificar y empezar a caracterizar a la endonucleasa de las clonas Thr114-His170 y His114-Thr170. Junto con estas clonas se caracterizó la clona Phe114-Glu170 (Tabla 1). La caracterización de estas clonas consistió en la hidrólisis de ADN de fago  $\lambda$  bajo las siguientes condiciones:

a) Diferentes concentraciones de espermidina. En estas curvas se observó que en nuestras condiciones la actividad catalítica de todas las clonas, incluida la "silvestre" (en este trabajo llamaremos silvestre a una mutante que tiene una mutación en la posición E160D, la cual ocasiona una aparente inestabilidad de la proteína, sin afectar otros parámetros, Kuhn *et al.* 1986), desapareció por completo a una concentración de 40mM de espermidina (Figura 15). La actividad estrella de las clonas analizadas fué cesando gradualmente al incrementar la concentración de espermidina. Para las clonas Thr114-His170 y Phe114-Glu170 la actividad estrella desapareció a una concentración de 20mM, mientras para la clona His114-Thr170 lo hizo a 10mM.

b) Diferentes concentraciones de NaCl. En estas curvas se observó un efecto similar al observado con espermidina. La actividad catalítica de todas las clonas analizadas se abolió a una concentración mayor a 400mM. La actividad estrella de las clonas mutantes desapareció gradualmente al incrementar la concentración de NaCl. Las clonas Thr114-His170 y His114-Thr170 dejaron de mostrar actividad estrella a 100mM de NaCl, mientras que la clona Phe114-Glu170 lo hizo a 200mM (Figura 16).

c) Diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina (GndHCl). La guanidina produjo la abolición de la actividad catalítica de la *EcoRI* silvestre y la clona Thr114-His170 a una concentración de 300mM, mientras que para las clonas

Phe114-Glu170 e His114-Thr170 lo hizo a 400mM. Estas dos últimas clonas mostraron una pequeña actividad de corte a 300mM de GndHCl (Figura 17).

d) Ensayos de estabilidad a la temperatura. En estos ensayos se observó que la actividad catalítica tanto la clona Thr114-His170 como la His114-Thr170 desapareció a los 70°C, mientras que para la silvestre y la clona Phe114-Glu170 lo hizo a los 75°C. También en estos ensayos se observó que la actividad estrella desapareció gradualmente a medida que se incrementó la temperatura (Figura 18).

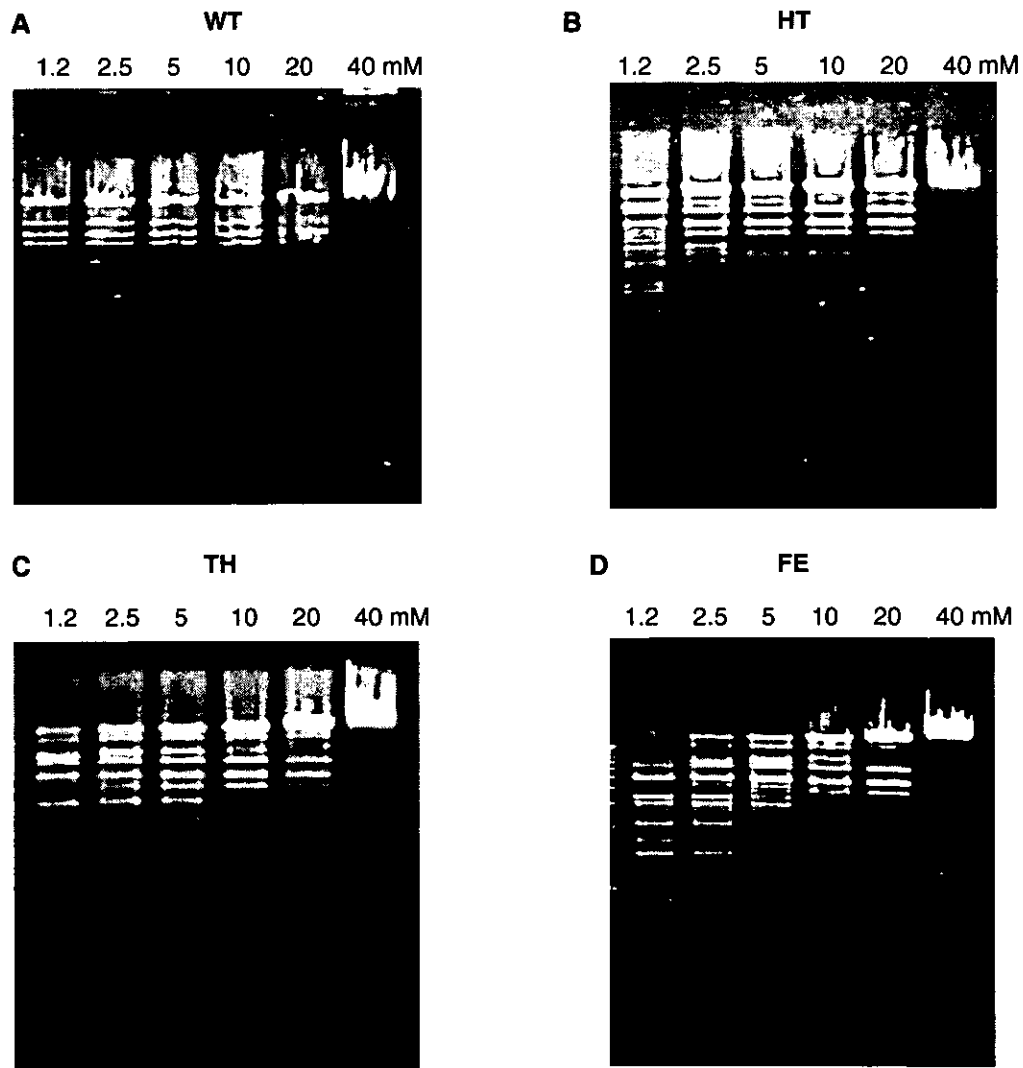


Figura 15. Patrón de digestión de ADN de fago  $\lambda$  de la endonucleasa *Eco*RI de las diferentes clonas purificadas, con diferentes concentraciones de espermidina. Panel A, *Eco*RI silvestre; panel B, clona His114-Thr170; panel C, clona Thr114-His170; panel D, clona Phe114-Glu170. Las digestiones se realizaron de acuerdo a las condiciones descritas en métodos.

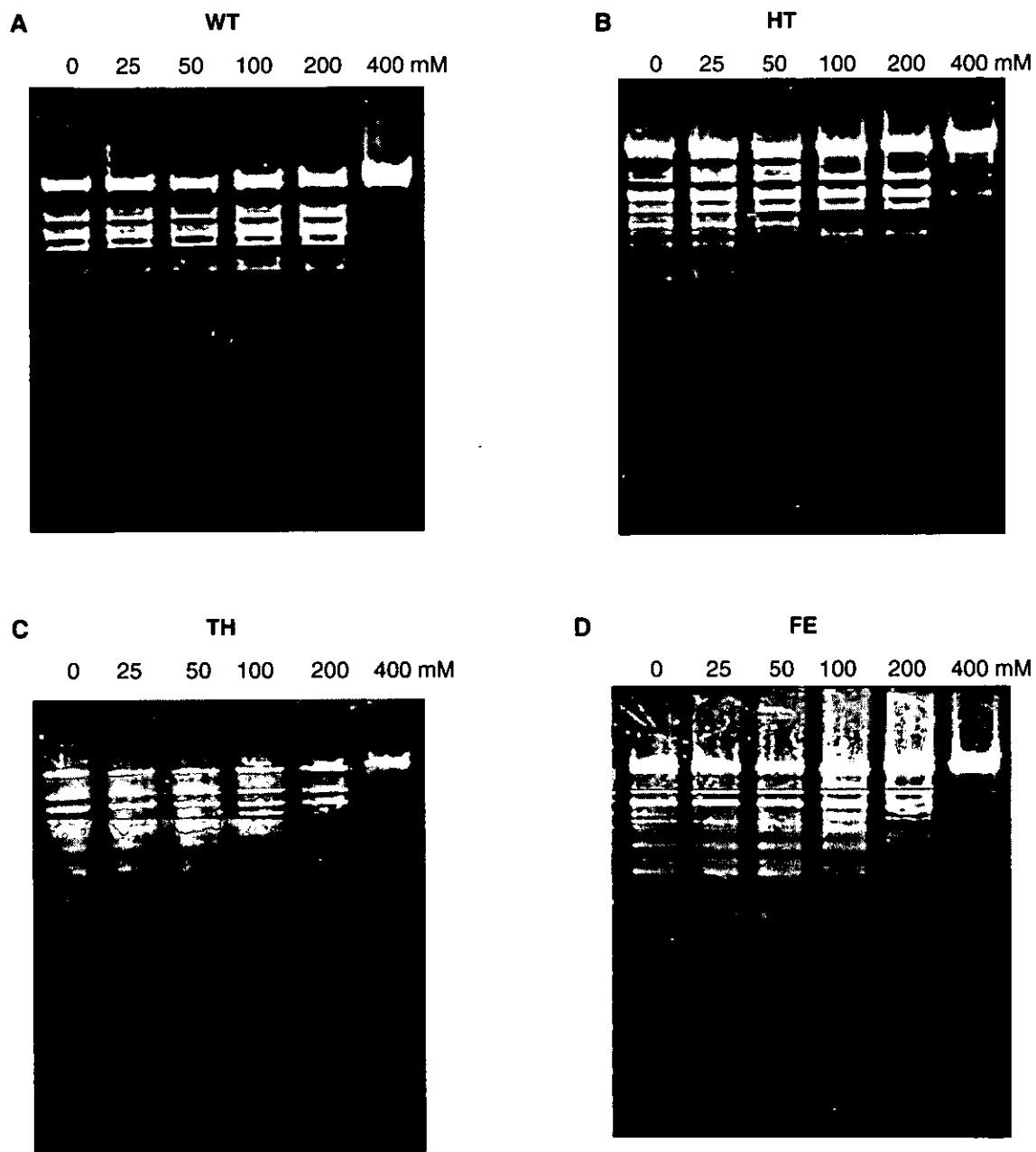


Figura 16. Patrón de digestión de ADN de fago  $\lambda$  de la endonucleasa *EcoRI* de las diferentes clonas purificadas, con diferentes concentraciones de NaCl. Panel A, *EcoRI* silvestre; panel B, clona His114-Thr170; panel C, clona Thr114-His170; panel D, clona Phe114-Glu170. Las digestiones se realizaron de acuerdo a las condiciones descritas en métodos.

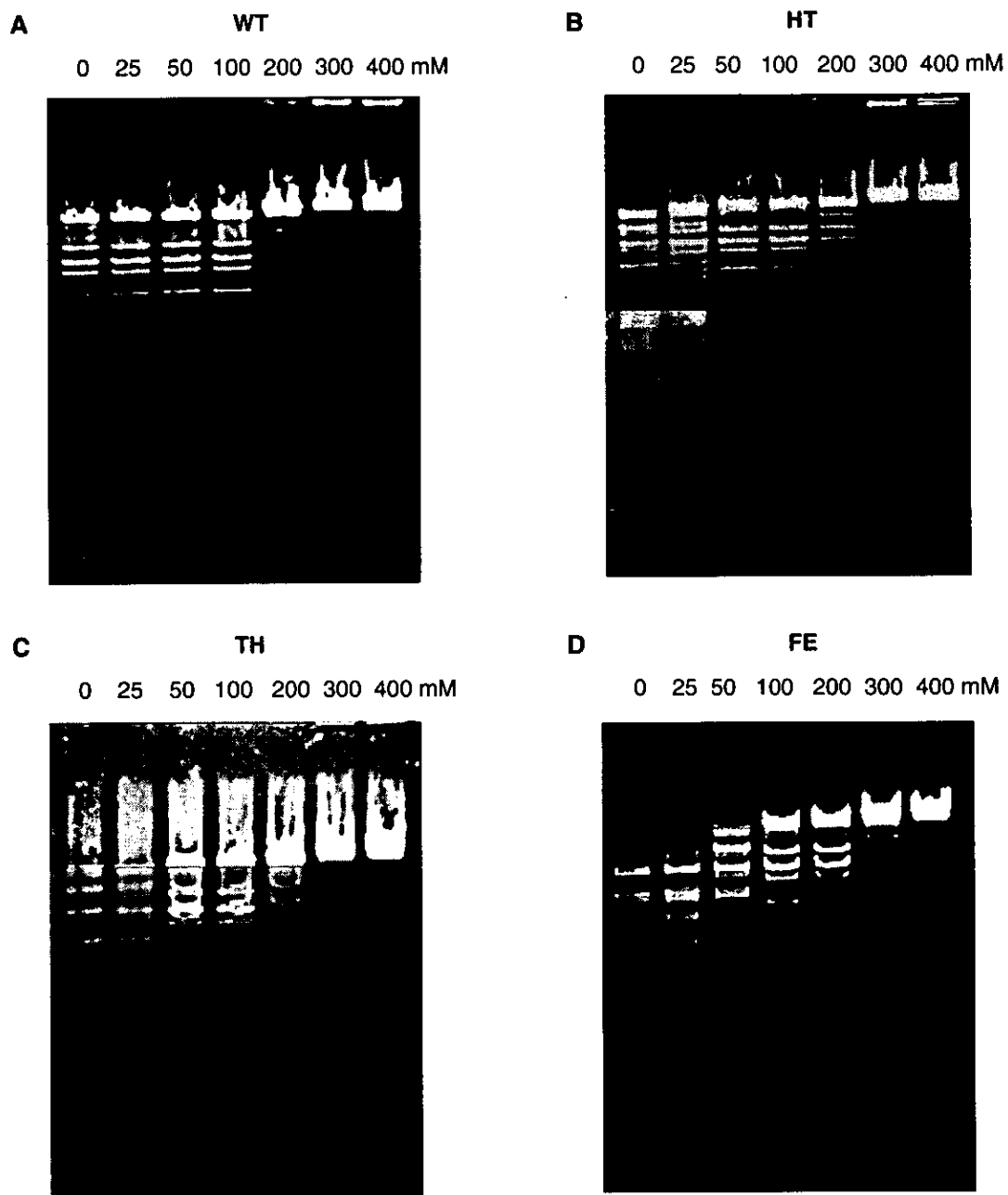


Figura 17. Patrón de digestión de ADN de fago  $\lambda$  de la endonucleasa *EcoRI* de las diferentes clonas purificadas, con diferentes concentraciones de guanidina (GndHCl). Panel A, *EcoRI* silvestre; panel B, clona His114-Thr170; panel C, clona Thr114-His170; panel D, clona Phe114-Glu170. Las digestiones se realizaron de acuerdo a las condiciones descritas en métodos.

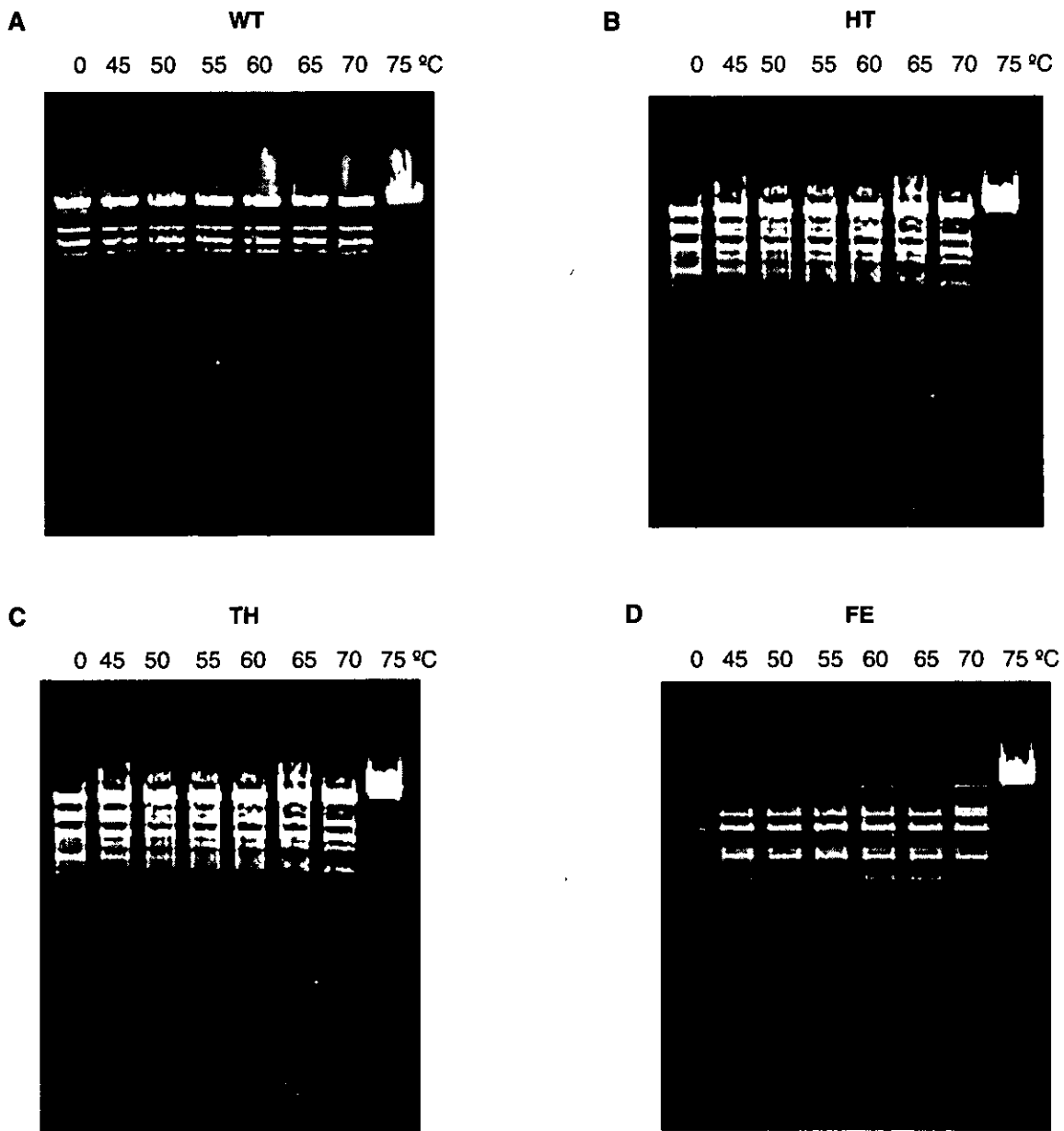


Figura 18. Patrón de digestión de ADN de fago  $\lambda$  de la endonucleasa *EcoRI* de las diferentes clonas purificadas. Las clonas fueron colocadas durante 10 min. a diferentes temperaturas y posteriormente se realizaron las digestiones de acuerdo a las condiciones descritas en los métodos. Panel A, *EcoRI* silvestre; panel B, clona His114-Thr170; panel C, clona Thr114-His170; panel D, clona Phe114-Glu170.

## **DISCUSSION**



## DISCUSION.

NO EXISTE UN INTERRUPTOR MOLECULAR EN LA ENDONUCLEASA *EcoRI* QUE DEPENDA DEL CONTACTO ESPECIFICO DE LOS RESIDUOS HIS114 Y GLU 170.

En nuestro laboratorio, mediante la observación de las estructuras de los complejos proteína-ADN con y sin  $Mn^{2+}$  de la endonucleasa *EcoRI* así como por experimentos de mutagénesis de los residuos His114 y Glu170, condujo a enunciar la hipótesis de la existencia de un "interruptor molecular" formado por el contacto específico de estos dos residuos. Este interruptor molecular actuaría conectando el reconocimiento con la catálisis, activandose ésta última una vez realizado el reconocimiento de la secuencia canónica. Se han propuesto interruptores moleculares alostéricos en otras proteínas, entre ellas la FixL (Gong *et. al.*, 2000), la hemoglobina (Gilles-Gonzalez *et. al.*, 1995) y la glucosamina-6-fosfato deaminasa (Montero-Morán *et. al.*, 1998). También en otra endonucleasa del tipo II, la *EcoRV*, se propuso un interruptor molecular que conectaría el reconocimiento con la catálisis, en el que participarían los residuos Asp36 (Stahl *et. al.*, 1998) y Thr37 (Wenz *et. al.*, 1996). A pesar de la aparente similitud entre la hipótesis del interruptor de las endonucleasas *EcoRI* y de la *EcoRV*, no existe relación a nivel de la estructura primaria y terciaria entre los residuos propuestos en la endonucleasa *EcoRV* y la His114 y el Glu170 de la endonucleasa *EcoRI*.

El análisis de la relación de los residuos His114 y Glu170 de la endonucleasa *EcoRI*, permitió probar la hipótesis del interruptor molecular formado por la interacción específica entre las cadenas laterales de estos dos residuos. El rompimiento de la interacción de la His114 y el Glu170 afectaría la conexión entre el reconocimiento y la catálisis, provocando que se relajara la especificidad de la endonucleasa, hidrolizando al ADN en sitios diferentes al canónico, conocidos como "sitios

estrella". En este contexto, la sustitución de los residuos 114 y 170 por residuos que mantuvieran un contacto específico, mantendría la especificidad hacia el ADN de la endonucleasa *EcoRI*, mientras que residuos que rompieran dicho contacto, relajarían la especificidad.

El análisis de los rotámeros (Biopolymer®) de la His114 y el Glu170 del modelo cristalográfico del complejo *EcoRI*-ADN (2.7Å de resolución) establece la posibilidad de la formación de un puente de hidrógeno entre estos dos residuos. Sin embargo, los experimentos de mutagénesis mostraron que dicho contacto no parece ser indispensable para la función normal de la endonucleasa. En este trabajo se seleccionaron mutantes de los codones que codifican para los residuos His114 y Glu170 que mantuvieron la especificidad canónica de la endonucleasa *EcoRI* (Tabla 3). En éstas clonas mutantes se observó que no es necesaria la existencia de un contacto específico entre estos dos residuos para mantener dicha especificidad. En este sentido, se aislaron clonas mutantes de la endonucleasa *EcoRI* como son la His114-Leu170 y la Gln114-Leu170 que no establecen un contacto específico a través de sus cadenas laterales, y que sin embargo mostraron un fenotipo silvestre. Anteriormente se había aislado otra mutante, la Ile114-Glu170 (Flores *et. al.*, 1995) que mostró un fenotipo silvestre, en la que tampoco existe un contacto específico entre las cadenas laterales de los residuos en las posiciones 114 y 170. En el caso inverso, en este trabajo se aislaron clonas mutantes de la *EcoRI* con fenotipo estrella que tienen residuos en las posiciones 114 y 170 con capacidad de formar puente de H; por ejemplo: Ser114-Asn170, His114-Gln170 y Asn114-Gln170. Esto indica que el contacto específico entre estos dos residuos de la endonucleasa *EcoRI* no es una condición necesaria para mantener el fenotipo silvestre de esta endonucleasa. Por otro lado, en las tablas 2 y 5, y en el trabajo publicado por Flores y col. (Flores *et. al.*, 1995), se puede observar que para que las clonas mutantes de *EcoRI* presenten un fenotipo

estrella, es necesario que cuando menos en una de las dos posiciones analizadas (114 ó 170) se presente un residuo "estrellizante". Es decir, hasta donde pudimos observar, no se encontraron combinaciones de residuos en las posiciones 114 y 170 que produjeran un fenotipo estrella estando juntos, y que en forma separada cada uno de estos residuos no lo produjeran. Esto también sugiere que no es necesaria una interacción específica de las posiciones 114 y 170 de la endonucleasa *EcoRI* para ésta funcione adecuadamente, lo que se contrapone a la idea del interruptor molecular localizado en estas dos posiciones. Más aún, se observa de los datos cristalográficos del complejo de la endonucleasa *EcoRI*, que los factores B promedio de los átomos de las cadenas laterales que denotan el movimiento vibracional de los residuos His114 y Glu170 son elevados ( $48.84\text{\AA}^2$  y  $47.61\text{\AA}^2$ , respectivamente). Esto indica que ambos residuos se encuentran oscilando a un nivel que no es compatible con la idea de una interacción a través de un puente de hidrógeno o salino de la His114 y Glu170, y soporta la hipótesis de que ambos residuos se encuentran apuntando hacia el solvente sin contactarse.

Un argumento alternativo para explicar el relajamiento de la especificidad de la endonucleasa *EcoRI* es que las cadenas laterales de la His114 y de el Glu170 establezcan un interaccionen de una forma diferente a un puente de hidrógeno o salino. Podría ser que ambos residuos tengan una buena complementaridad estérica. Esto es, que los volúmenes ocupados por las cadenas laterales de estos residuos sea óptima para llenar el espacio disponible en esta región. Sin embargo no parece ser este el caso. Las clonas mutantes en la posición 114 que presentaron fenotipo silvestre tienen residuos (Flores *et. al.*, 1995) cuyo volumen de las cadenas laterales varía por debajo del volumen de la His ( $153.2\text{\AA}^3$ ) como en el caso de la Gln ( $143.9\text{\AA}^3$ ) y Asp ( $111.1\text{\AA}^3$ ); o por arriba, para el caso de la Ile ( $166.7\text{\AA}^3$ ) y la Lys ( $168.6\text{\AA}^3$ )(Singh and Thornton, 1992). Para el caso de la posición 170 todos los residuos encontrados que tienen fenotipo estrella tienen

cadena lateral con volúmenes mayores al presentado por el Glu. No obstante, se encontraron residuos que “estrellizan” el fenotipo, que tienen un volumen muy similar al Glu (138.4Å<sup>3</sup>) tales como la Val (140Å<sup>3</sup>) y la Gln (143.9Å<sup>3</sup>)(Singh and Thornton, 1992).

Tomando en cuenta los datos generados en este trabajo y el análisis de las cadenas laterales de los residuos His114 y Glu170, concluimos que la hipótesis de la existencia de un interruptor molecular constituido por el par de residuos His114 y Glu170 en la endonucleasa *EcoRI* no es correcta.

NO PARECE EXISTIR UN INTERRUPTOR CONSTITUIDO POR LOS RESIDUOS QUE RELAJAN LA ESPECIFICIDAD EN LA ENDONUCLEASA *EcoRI*.

Cómo se expuso en el apartado anterior, no parece ser existir un interruptor molecular constituido por el par His114 y el Glu170 de la endonucleasa *EcoRI*. No obstante, podría existir un interruptor molecular más extenso formado por varios de los residuos que se encuentran en la estructura de la endonucleasa, además de la His114 y del Glu170. Una observación que apoya la presencia de un interruptor más extenso es que existen otras posiciones en la endonucleasa *EcoRI* en las que al mutarlas se produce la relajación de la especificidad. Estos residuos son la Ala138, el Glu192 y la Tyr193(Heitman and Model, 1990, Figura 20). No obstante, debido a la posición de los residuos Glu192 y Tyr193, los cuales no se encuentran en la interfase de la proteína-ADN, y a que no establecen contacto con otros residuos de la endonucleasa, la naturaleza del interruptor podría no ser igual a la propuesta inicialmente en este trabajo y los propuestos para otras proteínas. En los interruptores propuestos para otras proteínas, se observa que existen interacciones del ó de los residuos propuestos como participantes en dicho interruptor, con otros residuos de la proteína en cuestión. En la endonucleasa

*EcoRV*, se propuso que la Thr37 conecta el reconocimiento con la catálisis. La Thr37 establece varios contactos con residuos cercanos y se encuentra localizada en la estructura en una zona prominente entre el reconocimiento y la catálisis de la enzima. El cambio de la Thr37 por Ala produce efectos marcados a nivel de la catálisis de la enzima, sin que la especificidad de la enzima se modifique (Wenz *et. al.*, 1996). En cambio, en la endonucleasa *EcoRI*, la mutagénesis de los residuos que producen fenotipo estrella, no tienen, de manera general, efectos importantes en la catálisis de la endonucleasa, mientras que relajan la especificidad. Tampoco se observa que estos residuos, a excepción de His114 y Glu170, se encuentren localizados en una región de interacciones intramoleculares que les permita tener un papel importante como parte de un interruptor como el mencionado para la endonucleasa *EcoRV*. Por otro lado, en este trabajo se demostró que la interacción específica entre los residuos His114 y el Glu170, que, aunque sí se encuentran en una zona que podría conectar el reconocimiento con la catálisis, no es necesaria para el funcionamiento normal de la endonucleasa. Tomando todos estos datos en conjunto, podemos concluir que el relajamiento de la especificidad de la endonucleasa *EcoRI* observado en las mutantes acumuladas hasta el día de hoy, probablemente no depende de la participación de un interruptor molecular que conecte el reconocimiento con la catálisis en el sentido que ha sido propuesto para otras proteínas.

¿EN QUE CONSISTE EL FENOMENO DE LA RELAJACION DE LA ESPECIFICIDAD OBSERVADO EN LA ENDONUCLEASA *EcoRI*?

Se ha observado que bajo ciertas condiciones tales como baja fuerza iónica, elevado pH (Polisky *et. al.*, 1975),  $Mn^{2+}$  como cofactor (Hsu and Berg, 1978), la presencia de solventes como glicerol y dimetilsulfóxido (Malyguine *et. al.*, 1980) y una relación alta de la endonucleasa/ADN (Heitman and Model, 1990). De éstas

condiciones, algunas como la fuerza iónica y el  $Mn^{2+}$ , podrían ejercer su efecto a través del incremento de la afinidad de la endonucleasa hacia los sitios estrella del ADN. Es importante notar que el hecho de incrementar la cantidad de endonucleasa produce la relajación de la especificidad (Figura 19). Este hecho es contrario a la existencia de un interruptor molecular, puesto que indica que el sitio catalítico puede funcionar en las secuencias estrella si se "obliga" a la endonucleasa a unirse al ADN. Una posibilidad alterativa al del interruptor molecular para explicar el fenotipo estrella observado en las mutantes de la endonucleasa *EcoRI* es que las mutaciones en las posiciones 114 y 170 produzcan un incremento de la afinidad hacia el ADN de la endonucleasa. En este trabajo se probó el efecto de la concentración de NaCl y de espermidina. Ambos solutos pueden afectar la afinidad de la endonucleasa

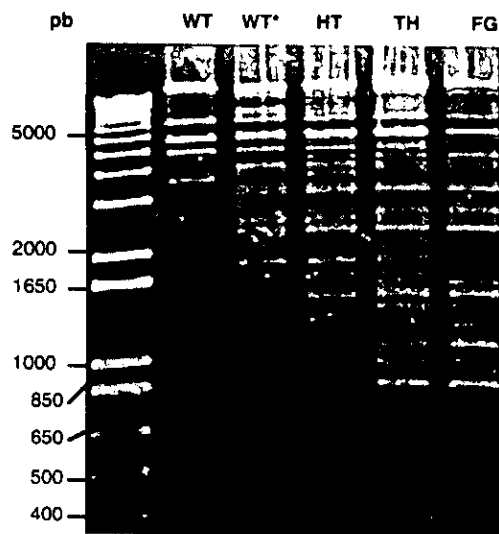


Figura 19. Patrón de digestión de ADN de fago  $\lambda$  observado por la endonucleasa *EcoRI* (WTE160D) en condiciones normales y de corte estrella (WT\*, concentración de la endonucleasa 15 veces mayor), así como el de las mutantes His114-Thr170 (HT), Thr114-His170 (TH) y Phe114-Glu170 (FG) en condiciones normales. La hidrólisis del ADN se realizó en las condiciones descritas en el método. A la izquierda se muestra el marcador 1Kbplus (Gibco).

hacia el ADN, debido a la competencia con la endonucleasa por el sustrato. A bajas concentraciones de NaCl decrece la fuerza iónica produciendo relajamiento de la especificidad en la endonucleasa silvestre. La espermidina es un compuesto que se intercala en el ADN y que incrementa la especificidad de varias endonucleasas (Pingoud *et al.* 1984; Pingoud 1985). A bajas concentraciones, tanto la espermidina como el NaCl pudieron eliminar la hidrólisis en los sitios estrella del ADN del fago  $\lambda$  de las clonas mutantes de la endonucleasa *EcoRI*, mientras que a altas concentraciones pueden eliminar la hidrólisis incluso de los sitios canónicos (Figuras 15 y 16). Lo anterior indica que la hidrólisis en los sitios estrella de las clonas mutantes podría deberse a un incremento de la afinidad hacia estos sitios en el ADN. La GndHCl también eliminó el corte estrella de las clonas mutantes a bajas concentraciones (100mM, Figura 17). A éstas concentraciones, la GndHCl podría estarse comportando de manera similar a la espermidina, compitiendo con la endonucleasa por el ADN, puesto que la guanidina  $[(H_2NC(=NH_2^+)NH_2)]$ , al igual que la espermidina  $[H_2N(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2]$ , es una poliamina, que podría competir por el ADN con la endonucleasa. Es importante notar que la clona Phe114-Glu170 es la que presenta mayor actividad estrella a altas concentraciones de espermidina y NaCl (Figuras 15 y 16), lo que posiblemente indique que es la que tiene mayor afinidad hacia los sitios estrella. La concentración a la cual la GndHCl evita totalmente la hidrólisis del ADN es de entre 300 y 400mM. No es claro si a éstas concentraciones la GndHCl produce el desplegamiento de la endonucleasa *EcoRI*. No fue posible medir con espectroscopía de UV ó fluorescencia si a éstas concentraciones ocurre el desplegamiento, puesto que los dos triptofanos que posee la *EcoRI* (W104 y W246) se encuentran expuestos en esta proteína. Sin embargo, en general, las proteínas se despliegan a concentraciones mayores a 500mM de GndHCl (Creighton, 1993; Sepúlveda-Becerra *et. al.*, 1996; Fan *et. al.*, 1998; Chattopadhyay and Mazumdar, 2000), por lo que lo más probable es que la

GndHCl haya inhibido la hidrólisis del ADN del fago  $\lambda$  de la endonucleasa *EcoRI* como se expuso antes.

No es fácil de explicar la manera en la que ciertas mutaciones en las posiciones 114, 138, 170, 192 y 193 relajan la especificidad de la endonucleasa *EcoRI*. Las posiciones 114 y 138 se encuentran en la interfase proteína-ADN, por lo que podrían ejercer su acción a través de la pérdida de contactos con el ADN, o por un cambio en la geometría del contacto. En el primer caso encontramos el remplazo de la His114 por Ile (Flores *et. al.*, 1995), lo cual representa la posible pérdida del contacto de endonucleasa con la cadena de fosfatos del ADN. Dicha pérdida de contacto no causa un relajamiento de la especificidad, lo que indica que la participación de éste residuo en la producción del fenotipo estrella no es necesariamente a través del contacto con el ADN. La sustitución de la Ala138 por Val (Heitman and Model, 1990), que probablemente mantiene el contacto con el ADN, relaja la especificidad. En este caso podría estar involucrado un cambio de geometría del contacto entre la endonucleasa y el ADN. Por otro lado, el resto de los residuos involucrados en el relajamiento de la especificidad se encuentran dirigidos hacia el solvente. La sustitución de ellos por residuos hidrofílicos que producen el relajamiento de la especificidad no rompe ningún enlace existente entre la proteína misma o el ADN. Dado lo anterior, podría ser que el relajamiento de la especificidad observado en las mutantes se debiera a la modificación de la energía libre ( $\Delta G$ ) a través de su término entrópico. Es decir, que la entropía haya disminuido en las clonas mutantes con fenotipo estrella. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos en los que se observó que la clona con mayor actividad estrella (Phe114-Glu170) presentó una mayor termoestabilidad, lo cual podría indicar una disminución en la entropía de la estructura de la endonucleasa. En este contexto, la energía libre extra podría ser utilizada para la unión hacia los sitios estrella en el ADN ó para deformar el ADN para alcanzar la geometría



## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES.

- a) Mutantes en el codón correspondiente al residuo Glu170 del gen de la endonucleasa *EcoRI* son capaces de producir fenotipo estrella.
  
- b) Hasta donde pudimos observar, la prolina es el único residuo capaz de inactivar a la endonucleasa *EcoRI* en las posiciones 114 y 170.
  
- c) No existe un "interruptor molecular" constituido por el par de residuos His114 y Glu170 en la endonucleasa *EcoRI*.
  
- d) La "relajación" de la especificidad de las mutantes de la endonucleasa *EcoRI* podría estar relacionado con un incremento de la estabilidad de la proteína, o de su asociación general al ADN.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA.

- Alves J., Rüther T., Geiger R., Fliess A., Maass G. and Pingoud A. (1989) Changing the hydrogen-bonding potencial in the DNA binding site of *EcoRI* by site directed mutagenesis drastically reduces the enzymatic activity, not, however, the preference of this restriction endonuclease for cleavage within the site -GAATTC-. *Biochemistry* **28**: 2678-2684.
- Arkin M.R. and Wells J.A. (1998) Probing the importance of second sphere residues in an esterolytic antibody by phage display. *J. Mol. Biol.* **284**:1083-1094.
- Bailey C.H., Bartsch D. and Kandel E.R. (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 13445-13452.
- Berg J.M. (1993). Zinc finger proteins. *Curr. Opin. Strct. Biol.* **3**: 11-16.
- Bhat T. N., Bentley G. A., Boulot G. Greene M. I., Tello D., Dall' Acqua W., Souchon H., Schwarz F., Mariazza R. A. and Poljak R. D. (1994). Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 1089-1093.
- Chattopadhyay K. and Mazumdar S. (2000) Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of the temperature and pH. *Biochemistry* **39**:263-270.
- Chen L., Glover J.N., Hogan P.G., Rao A., Harrison S.C. (1998) Structure of the DNA binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* **392**(6671): 42-48.
- Choo Y. and Klug A. (1994). Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: Selection of randomized fingers displayed on phage; *Proc. Natl. acad. Sci. USA*; **91**:11163-11167.
- Connolly B.A. Eckstein F. and Pingoud A. (1984) The stereochemical course of the restriction endonuclease *EcoRI*-catalyzed reaction. *J. Biol. Chem.* **259**(17): 10760-10763.
- Creighton T. E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*. 2nd. edition. Chapetrs 4, 8 and 9. W. H. Freeman and Co. New York.
- Edmonson D.G. and Olson E.N. (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Biol. Chem.* **268**(2): 755-758.
- Engler L.E., Welch K.K. and Jen-Jacobson L. (1997) Specific binding by *EcoRV* endonulease to its DNA recognition site GATATC. *J. Mol. Biol.* **269**: 82-101.
- Ellenberger T.E., Brandl C.J., Struhl K. And Harrison S.C. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted  $\alpha$ hélices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell.* **71**: 1223-1237.
- Fan Y., Zhou J., Kihara H. and Tsou C. (1998) Unfolding and refolding of the dimeric creatine kinase equilibrium and kinetic studies. *Protein Science* **7**:2631-2641.

- Flores H. (1995a) Análisis del reconocimiento molecular por medio de ingeniería de proteínas. Tesis doctoral. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Flores H., Osuna J., Heitman J. and Soberón X. (1995). Saturation mutagenesis of His114 of *EcoRI* reveals relaxed-specificity mutants. *Gene* **157**: 295-301.
- Freemont P.S., Lane A.N. and Sanderson M.R. (1991) Structural aspects of protein-DNA recognition. *Biochem J.* **278**: 1-23.
- Gardner R.C., Howart A.J., Messing J. and Shepherd R. (1982) Cloning and sequencing of restriction fragments generated by *EcoRI*<sup>\*</sup>. *DNA* **1**(2):109-115.
- Grabowski G. (1995). Site-directed mutagenesis in the catalytic center of the restriction endonuclease *EcoRI*; *Gene* **157**: 113-118.
- Guddat L.W., Shan L., Anchin J.M., Linthicum D.S. And Edmunson A.B. (1994). Local and transmitted conformational changes on complexation of an anti-sweetener Fab. *J. Mol. Biol.* **236**: 247-274.
- Harrison S.C. And Aggarwal A.K. (1990). DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 933-969.
- Hedgpeth J., Goodman H.M. and Boyer H.W. (1972) DNA nucleotide sequence restricted by the *EcoRI* endonuclease. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:3448-3452.
- Heitman J. (1992). How the *EcoRI* endonuclease recognizes and cleaves DNA; *BioEssays*; **14**(7):445-454.
- Heitman J. and Model P. (1990). Mutants of the *EcoRI* endonuclease with promiscuous substrate specificity implicate residues involved in substrate recognition; *The EMBO* **9**(10): 3369-3378.
- Holm L. and Sander C. (1994) The FSSP database of structurally aligned protein fold families. *Nucleic Acids Research.* **22**(17): 3600-3609.
- Horton N.C., Newberry K.J. and Perona J.J. (1998) Metal ion-mediated substrate-assisted catalysis in type II restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 13489-13494.
- Hsu M. and Berg P. (1978) Altering the specificity of restriction endonuclease: effect of replacing  $Mg^{2+}$  with  $Mn^{2+}$ . *Biochemistry* **17**:131-138.
- Janulaitis A., Petrusyte M., Maneliene Z., Klimasauskas S. and Batkus V. (1992). Purification and properties of the *Eco571* restriction endonuclease and methylase-prototypes of a new class (type IV). *Nucleic Acids Res.* **20**(22): 6043-6049.
- Jeltsch A., Alves J., Maass G. and Pingoud A. (1992) On the catalytic mechanism of *EcoRI* and *EcoRV*: a detailed proposal based on biochemical results, structural data and molecular modelling. *FEBS* **304**(1):4-8.

- Jeltsch A., Alves J., Oelgeschläger T., Wolfes H., Maass G. and Pingoud A. (1993). Mutational analysis of the function of Gln115 in the *EcoRI* restriction endonuclease, a critical amino acid for recognition of the inner thymidine residue in the sequence -GAATTC- and for coupling specific DNA binding to catalysis. *J. Mol. Biol.* **229**: 221-234.
- Jeltsch A., Alves J., Urbanke C., Maass G., Eckstein H., Lianshan Z., Bayer E. and Pingoud A. (1995). A dodecapeptide comprising the extended chain- $\alpha$ 4 region of the restriction endonuclease *EcoRI* specifically binds to the *EcoRI* recognition site; *J. Biol.Chem.*; **270**(10):512.
- Jeltsch A., Alves J., Wolfes H., Maass G. and Pingoud A (1993a). Substrate-assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8499-8503.
- Jen-Jacobson L. (1997) Protein-DNA recognition complexes: conservation of structure and binding energy in the transition state. *Biopoly* **44**: 153-180.
- Jen-Jacobson L., Engler L.E., Lesser D.R., Kurpiewski M.R., Yee C., McVerry B. (1996) Structural adaptations in the interaction of *EcoRI* endonuclease with methylated GAATC sites. *EMBO J.* **15**(11):2870-2882.
- Jones D.T. (1999) GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J. Mol. Biol.* **287**: 797-815.
- Kim Y., Grable J.C., Love R., Greene P.J. and Rosenberg J.M. (1990). Refinement of *EcoRI* endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing. *Science* **249**: 1307-1309.
- Kuhn I., Stephenson F.H., Boyer H.W. and Greene P.J. (1986) Positive selection vectors utilizing lethality of the *EcoRI* endonuclease. *Gene* **44**: 253-263.
- Lagunavicius A., Grazulis S., Balciunaite E., Vainius D. and Siksnys V. (1997) DNA binding specificity of *MunI* restriction endonuclease is controlled by pH and calcium ions: involvement of active site carboxylate residues. *Biochemistry* **36**:11093-11099.
- Lagunavicius A. and Siksnys V. (1997) Site-directed mutagenesis of putative active site residues of *MunI* restriction endonuclease: replacement of catalitically essential carboxylate residues triggers DNA binding specificity. *Biochemistry* **69**:11086-11092.
- Lesser D., Kurpiewski M. and Jen-Jacobson L. (1990). The energetic basis of specificity in the *EcoRI* endonuclease-DNA interaction. *Science* **250**: 776-786.
- Lesser D., Kurpiewski M., Waters T., Connolly B.A. and Jen-Jacobson L. (1993) Facilitated distortion of the DNA site enhances *EcoRI* endonuclease-DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7548-7552.
- Luecke H. and Quijcho F. A. (1989). Substrate specificity and affinity of a protein modulated by bound water molecules. *Nature* **340**: 404-407.

- Luecke H. and Quijcho F.A. (1989) Substrate specificity and affinity of a protein modulated by bound water molecules. *Nature* **340**:404-407.
- Lukas C.M., Kucera B., Schildkraut I., Aggarwal A.K. (2000) Understanding the immutability of restriction enzymes: crystal structure of BglII and its DNA substrate at 1.5 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 2000 Feb; **7**(2):134-140.
- Malyguine E., Vannier P. and Yot P. (1980) Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents. *Gene* **8**:163-177.
- Modrich P. and Zabel D. (1976) Physical and catalytic properties of the homogeneous enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **251**(19): 5886-5874.
- Needels M.C., Fried S.R., Love R., Rosemberg J.M., Boyer H.W. and Greene P.J. (1989) Determinants of *EcoRI* endonuclease sequence discrimination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3579-3583.
- Newman A.K., Rubin R.A., Kim S.H. and Modrich P. (1981) DNA sequences of structural genes for *EcoRI* DNA restriction and modification enzymes. *J. Biol. Chem.* **256**:2131-2139.
- Newman M., Strzelecka T., Dorner L.F., Schildkraut I. and Aggarwal A.K. (1994) Structure of restriction endonuclease *BamHI* and its relationship to *EcoRI*. *Nature* **238**: 660-664.
- O'Sea E.K., Klemm J.D., Kim P.S. and Albert T. (1991) X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* **254**(5031): 539-544.
- Osuna J, Flores H. and Soberón X. (1991) Combinatorial mutagenesis of three groove-contacting residues of *EcoRI*: single and double amino replacements retaining methyltransferase-sensitivity activities. *Gene* **106**: 7-12.
- Oue S., Okamoto A., Yano T. and Kagamiyama H. (1999) Redesigning the substrate of an enzyme by cumulative effects if the mutations of non-active site residues. *J. Biol. Chem.* **274**(4):2344-2349.
- Pingoud A., Urbanke C., Alves J., Ehbrecht H., Zabeau M. and Gualerzi C. (1984). Effect of polyamines and basic protein on cleavage of DNA by restriction endonucleases. *Biochemistry* **23**: 5697-5703.
- Pingoud A. and Jeltsch A. (1997) Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* **246**:1-22.
- Pingoud A. (1985). Spermidine increases the accuracy of type II restriction endonucleases. *Eur J. Biochem* **147**: 105-109.
- Polisky B., Greene P., Garfin D.E., McCarthy B.J., Goodman H.M., Boyer H.W. (1975) Specificity of substrate recognition by the *EcoRI* restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **72**(9):3310-3314.

- Quiocho F.A., Sack J.S., Vyas N.K. (1987) Stabilization of charges on isolated ionic groups sequestered in proteins by polarized peptide units. *Nature* **329**(6139):561-4.
- Sarkar G. and Sommer S.S. 1990 The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **8**(4):404-407 .
- Seeman N.C., Rosenberg J.M. and Rich A. (1976) Sequence specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**(3): 804-808.
- Sepúlveda-Becerra M.A., Ferreira S.T., Strasser R.J., Garzón-Rodríguez W., Beltrán C., Gómez-Poyou A. and Darszon A. (1996) Refolding of triosephosphate isomerase in low-water media investigated by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **35**:15915-15922.
- Singh J. and Thornton J.M. (1992) Protein side-chain interactions. Vol. 1. IRL Press Oxford University Press.
- Somers W.S. And Phillip S.E.V. (1992). Crystal structure of the Met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by  $\beta$ -strands. *Nature* **359**: 387-393.
- Stahl F., Wende W., Jeltsch A. and Pingoud A. (1998) The mechanism of DNA cleavage by the type II restriction enzyme *EcoRV*: Asp36 is not directly involved in DNA cleavage but serves to couple indirect readout to catalysis. *Biol Chem.***379**(4-5):467-73.
- Stryer L. (1988). *Biochemistry*. Chapter 8, Third Edition. W. H. Freeman and Co. New York.
- Szwajkajzer D. And Carey J. (1997) Molecular and biological constraints on ligand-binding affinity and specificity. *Biopoly* **44**: 181-198.
- Suzuki M., Brenner S.E., Gerstein M. and Yagi N. (1995) DNA recognition code of transcription factors. *Protein Eng* **8**(4): 319-328.
- Suzuki M. and Yagi N. (1994) DNA recognition code of transcription factors in the helix-turn-helix, probe helix, hormone receptor, and zinc finger families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(26): 12357-12361.
- Thielking V. (1991). Accuracy of the *EcoRI* restriction endonuclease: binding and cleavage studies with oligodeoxynucleotide substrates containing degenerate recognition sequences. *Biochemistry* **28**:4682-4691.
- Thorogood H., Grasby J.A. and Pingoud A. (1996). Influence of the phosphate backbone on the recognition and hydrolysis of DNA by the *EcoRV* restriction endonuclease. A study using oligodeoxynucleotide phosphorothioates. *J. Biol. Chem.* **271**(15): 8855-8862.
- Venclovas C., Timinskas A. and Siknys V. (1994) Five-stranded  $\beta$ -sheet sandwiched with two  $\alpha$ -helices: a structure link between restriction endonucleases *EcoRI* and *EcoRV*. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **20**: 279-282.



Wedemayer G.J., Patten P.A., Wang L.H. Schultz P.G. and Stevens R.C. (1997) Structural Insights into the evolution of an antibody combining site. *Science* **276**:1665-1669.

Wenz C., Hahn M. and Pingoud A. (1998) Engineering of variants of the restriction endonuclease *EcoRV* that depend in their cleavage activity on the flexibility of sequence flanking the recognition site. *Biochemistry* **37**: 2234-2242.

Wenz C., Jeltsch A. and Pingoud A. (1996) Probing the indirect readout of the restriction enzyme *EcoRV*. *J. Biol. Chem.* **271**(10):5565-5573.

Wilson G.G. (1991). Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 585-627.

Wilson G.G. (1991a). Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Res.* **19**(10):2539-2566.

Wolfe S.A., Greisman H.A., Ramm E.I., Pabo C.O. (1999) Analysis of zinc fingers optimized via phage display: evaluating the utility of a recognition code. *J. Mol. Biol.* **285**(5):1917-1934.