

UCH-FC  
Biot. molecular  
N774  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“Caracterización de la interacción del dominio RNasa H con un sustrato que simula al intermediario de la remoción del partidor tRNA<sup>lys3</sup> mediante entrecruzamiento”.**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**MANUEL IGNACIO NOGALES LÓPEZ**

Director del Seminario de Título: Dr. Oscar León Decap.  
Profesor Patrocinante: Dr. Octavio Monasterio.

Septiembre de 2012  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Manuel Ignacio Nogales López**

**“Caracterización de la interacción del dominio RNasa H con un sustrato que simula al intermediario de la remoción del partidor tRNA<sup>lys3</sup> mediante entrecruzamiento”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

*Dr. Oscar León Decap*  
**Director Seminario de Título**

Handwritten signature of Oscar León Decap in blue ink, positioned above a horizontal line.

### **Comisión de Evaluación**

*Dra. Ana Preller*  
**Presidente Comisión**

Handwritten signature of Ana Preller in blue ink, positioned above a horizontal line. To the right of the signature is a circular stamp that reads "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE" with two stars.

*Dr. Octavio Monasterio*  
**Evaluador**

Handwritten signature of Octavio Monasterio in blue ink, positioned above a horizontal line.

Santiago de Chile, Septiembre de 2012



*“Papá, Mamá, Bruny y Flo  
esto es para ustedes...”*

## BIOGRAFÍA

La tarde del 23 de Noviembre de 1987 vio nacer al primer y único hijo de Florencio y María Teresa, al cual llamaron por su abuelo, Manuel Nogales. Su infancia estuvo marcada por el gran cariño y esfuerzo de sus padres, abuela y prima, que lograron darle los mejores primeros años que cualquier niño desearía.



Manuel comenzó a descubrir que el preguntar y aprender es uno de los fines máximos en la vida, por lo que se dedicó a leer todo lo que sus padres traían a casa intentando comprender el mundo que lo rodeaba. Con el tiempo ya tenía sus favoritos, pero no eran ni Papeluchos ni Principitos, sino que una enciclopedia escolar de evolución de las especies y un libro de química básica. De manera retrospectiva, Manuel ya tenía su futuro delineado.

Con esfuerzo y dedicación, logró ingresar a una carrera no muy conocida, quizás hasta ecléctica: Ingeniería en Biotecnología en la Facultad de Ciencias en la Universidad de Chile. La biotecnología se transformó en algo parte de su vida y descubrió que eran necesarios otros sacrificios aparte de largas tardes de lectura: madurez, resiliencia e incluso valentía para luchar por lo que uno desea, independiente de lo que dijeran de él.

De esta forma, Manuel dejó de ser el niño pequeño para transformarse en una persona que espera con ansias terminar esta etapa y así poder seguir nuevos proyectos que le permitan sentirse como un hombre íntegro. De esta forma, mantener el legado de su familia ayudando a todo aquel que lo necesite sin pedir nada a cambio, sin dar la espalda a sus amigos y sacrificando lo necesario para que la gente que lo rodea pueda llevar a cabo sus proyectos, tan importantes como los de él.

Esto no lo logré solo. Mucha gente me ayudó y necesito como mínimo darles un reconocimiento:

Nico y Julián...por esas risas, idas a Lota y festivales pasados y futuros.

Chicos del lab...por todo lo me enseñaron en el laboratorio.

Deborah...fuiste mi gran pilar con tu experiencia.

Dr.Oscar León...por intentar que la palabra rigurosidad sea prioritaria en mi vida.

Karina, Pame, Amparo, Carito y Nicole...por todas esas juntas y comidas ricas.

Leo, Pablo, Nacho y Diego...por esa espontaneidad que los caracteriza en todos los carretes.

Amigos de la "U"...sé que con todos he pasado al menos un muy buen rato capeando el estrés.

Carlos...difícil resumir todo lo que hiciste, gracias por estar conmigo.

David, Rodrigo, Felipe y Amaro...por tantos años de amistad que no pasan en vano.

Feña...porque esto lo vamos a vivir juntos, sé que tú también lo ibas a lograr y por muy injusta que pueda ser la vida, estarás a mi lado defendiendo lo imposible.

Profesores...por darme las herramientas para aprender sobre ciencia y humanidades.

Prim@s y tí@s...son muuch@s y compartieron conmigo desde que nací.

José...necesitaría una tesis nueva para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Has sido fundamental y ahora me toca a mí apoyarte en tu camino.

Bruny y Flo...son como mi hermana y sobrina, siempre las voy a querer, ya dije antes, esto lo dedico a ustedes.

Padres...me han dado todo, literalmente. Sin ustedes. nada hubiese sido posible. Muchas gracias, los amo demasiado.

...¡¡y muchos más!! ... esto no acaba aquí, ¡¡a seguir luchando!!

MUCHAS GRACIAS.



## 1. Índice

### 1.1. Índice de Contenidos.

1. Índice .....	II
1.1. Índice de Contenidos.....	VI
1.2. Índice de Figuras.....	VII
1.3. Índice de Tablas.....	X
1.4. Índice de Abreviaturas.....	XI
2. Resumen.....	01
3. Abstract.....	02
4. Introducción.....	04
4.1. Virus de la inmunodeficiencia humana.....	04
4.2. Transcripción reversa.....	06
4.3. Transcriptasa reversa de HIV-1.....	10
4.4. Dominio RNasa H de transcriptasa reversa de HIV-1.....	11
4.5. Reconocimiento del sustrato híbrido por el dominio de RNasa H.....	14
5. Objetivos.....	18
5.1. Objetivos generales.....	18
5.2. Objetivos específicos.....	18
6. Materiales y Métodos.....	19

<b>6.1. Materiales</b> .....	19
<b>6.1.1. Materiales y reactivos</b> .....	19
<b>6.1.2. Cepas bacterianas, plásmido y sustratos de ácido nucleicos</b> .....	20
<b>6.2. Métodos</b> .....	23
<b>6.2.1. Transformación</b> .....	23
<b>6.2.2. Expresión de proteínas</b> .....	23
<b>6.2.3. Purificación de proteínas</b> .....	24
<b>6.2.4. Determinación de actividad RNasa H</b> .....	26
<b>6.2.5. Marcaje de oligonucleótido</b> .....	26
<b>6.2.6. Entrecruzamiento</b> .....	27
<b>6.2.6.1. Acoplamiento de DSG al sustrato modificado</b> .....	27
<b>6.2.6.2. Ensayo de actividad de partidor tRNA<sup>lys3</sup></b> .....	27
<b>6.2.6.3. Ensayo de entrecruzamientos</b> .....	28
<b>6.2.7. Análisis de posibles lisinas cercanas al nucleótido modificado</b> .....	28
<b>7. Resultados</b> .....	31
<b>7.1. Expresión de la construcción p51-G-TCR</b> .....	31
<b>7.2. Purificación de la construcción p51-G-TCR</b> .....	31
<b>7.3. Ensayo de actividad de remoción de partidor tRNA<sup>lys3</sup></b> .....	37
<b>7.4. Entrecruzamiento</b> .....	39
<b>7.4.1. Efecto del Mg<sup>+2</sup> en la reacción de entrecruzamiento</b> .....	39

7.4.2. Entrecruzamiento de la RT de HIV-1.....	39
7.4.3. Entrecruzamiento de la construcción p51-G-TCR.....	45
<b>8. Discusión.....</b>	<b>48</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>54</b>
<b>10. Bibliografía.....</b>	<b>55</b>



## 1.2. Índice de Figuras.

<b>Figura 1.</b> Descripción general de los retrovirus.....	05
<b>Figura 2.</b> Ciclo replicativo de los retrovirus.....	07
<b>Figura 3.</b> Transcripción reversa del genoma de HIV.....	09
<b>Figura 4.</b> Modelo de cinta que representan la estructura de la RT de HIV-1 con un sustrato dsDNA.....	12
<b>Figura 5.</b> Dominios de la construcción p51-G-TCR de RNasa H.....	15
<b>Figura 6.</b> Estructura molecular del entrecruzante y el nucleótido modificado.....	21
<b>Figura 7.</b> Descripción de catálisis de remoción de partidor tRNA <sup>Lys3</sup> .....	29
<b>Figura 8.</b> Diagrama de entrecruzamientos.....	30
<b>Figura 9.</b> Extracto de proteínas de cultivo transformado de <i>E.coli</i> MIC2067 inducido con IPTG.....	33
<b>Figura 10.</b> SDS-PAGE 10% del perfil de elución de p51-G-TCR.....	34
<b>Figura 11.</b> Gráfico porcentaje de actividad RNasa H v/s la concentración del oligonucleótido competidor.....	36
<b>Figura 12.</b> Ensayo de remoción del partidor tRNA <sup>Lys3</sup> .....	38
<b>Figura 13.</b> Efecto de Mg <sup>+2</sup> en el entrecruzamiento.....	41
<b>Figura 14.</b> Entrecruzamiento de la RT HIV-1 con sustrato posición 5.....	42
<b>Figura 15.</b> Entrecruzamiento de la RT HIV-1 con sustrato posición 9.....	43
<b>Figura 16.</b> Entrecruzamiento de RT HIV-1 con sustrato posición 1' y -3'.....	44
<b>Figura 17.</b> Entrecruzamiento de p51-G-TCR con los sustratos posición 5, 9, 1' y -3'.....	46
<b>Figura 18.</b> Análisis computacional de la estructura de la RT de HIV-1 con un sustrato PPT/DNA.....	52

### 1.3. Índice de Tablas.

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de sustratos utilizados.....	22
<b>Tabla 2.</b> Fracciones purificadas por Ni-NTA de p51-G-TCR.....	35
<b>Tabla 3.</b> Fracciones dializadas.....	35
<b>Tabla 4.</b> Resumen de porcentajes de entrecruzamiento obtenidos.....	47
<b>Tabla 5.</b> Residuos más cercanos al nucleótido entrecruzante.....	53

#### 1.4. Lista de abreviaturas. Abreviaturas: Significados:

ATP	Adenosín trifosfato.
CCR5	C-C quimiocina receptora de tipo 5.
CD4	Cúmulo de diferenciación 4.
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dsDNA	DNA doble hebra (double stranded DNA).
DSG	Disuccinimidil glutarato.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
FRET	Fluorescencia de resonancia de transferencia de energía.
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.
HIV-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1.
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.
LYS	Lisina.
Mer	Unidades méricas (repetidas).
MLV	Virus de leucemia murina.
MGBT	Minor groove binding tract.
NNTA	Ácido nitrilotriacético.
p <sup>32</sup>	Fósforo 32.
PBS	Primer binding site.
PPT	Polypurine track.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNasa H	Ribonucleasa H.
RT	Transcriptasa reversa.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEMED	Tetrametiletilenediamina.
tRNA <sup>Lys3</sup>	Ácido ribonucleico de transferencia que transporta lisina.
U	Unidad de actividad RNasa H.

## 2. Resumen

El virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la que tiene como principal tratamiento la administración de drogas antivirales que disminuyen la capacidad de replicación del virus. Uno de los principales blancos utilizados en el desarrollo de antivirales es la transcriptasa reversa (RT). Esta enzima es capaz de sintetizar una molécula de DNA de doble hebra (dsDNA) a partir del RNA genómico viral de hebra simple, la cual es insertada en el genoma de la célula huésped. El dominio RNasa H de la RT es responsable de la degradación del RNA en el híbrido RNA/DNA que se forma durante la transcripción reversa, mediante un corte dependiente de polimerización. Además existe un corte independiente de la polimerización que genera y remueve los partidores RNA (+) PPT y RNA (-) tRNA<sup>Lys3</sup>.

Debido a que existe una interdependencia entre los sitios activos de polimerasa y RNasa H, no ha sido fácil caracterizar la unión del híbrido RNA/DNA con el dominio RNasa H independiente del de polimerasa. Con este objetivo, se han expresado construcciones que no poseen el dominio polimerasa y que han permitido determinar los aminoácidos que interactúan con un híbrido de RNA/DNA que emula al partidor PPT. Pese a lo descubierto, no se tiene información de la interacción del dominio de RNasa H con el híbrido tRNA<sup>Lys3</sup>/DNA. Es por esto que se realizó un entrecruzamiento entre la RT y una construcción sin dominio polimerasa (denominada p51-G-TCR), con 4 híbridos distintos de RNA/DNA que simulan ser el sustrato de remoción del partidor tRNA<sup>Lys3</sup> para poder identificar posibles zonas de interacción de este dominio con el sustrato.

Los resultados obtenidos con el entrecruzamiento permiten concluir que el sustrato modelo se une a la transcriptasa reversa y a la construcción p51-G-TCR, lo que indica que existen lisinas cercanas a los distintos nucleótidos modificados. De acuerdo al análisis realizado a una estructura cristalizada podemos teorizar que el sustrato tRNA<sup>Lys3</sup>/DNA tiene una orientación de unión distinta que el sustrato PPT/RNA.

### **3. Abstract.**

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), causes acquired immune deficiency syndrome (AIDS), which has a treatment that features several antivirals that decrease the replication capacity of the virus. One of the main targets used in the development of antiviral is reverse transcriptase (RT). This enzyme is responsible for the synthesis of a double-stranded molecule of DNA (dsDNA) from the viral genomic RNA strand, which is inserted into the genome of the host cell. The RT RNase H domain is responsible for the degradation of the RNA/DNA hybrid which is formed during the synthesis of dsDNA, by a polymerization dependent cleavage. Also, an independent polymerization cleavage generates and removes the RNA primers (+) and PPT RNA (-) tRNA<sup>Lys3</sup>.

Because there is interdependence between the polymerase and RNase H active sites, it has not been easy to characterize the binding of the RNA/DNA hybrid with the RNase H domain in absence of the polymerase domain. To study this, constructions without a polymerase domain have been expressed which will allow to determine which amino acids interact with the RNA/DNA hybrid that emulates the PPT primer. However, there is no information on the interaction of the RNase H domain with the RNA/DNA

hybrid that emulates the tRNA<sup>lys3</sup> primer. Thus, we conducted a crosslinking between RT and a construction without the polymerase domain, called P51-G-TCR, with 4 different RNA/DNA hybrids that mimic tRNA/DNA, to identify possible interaction zones of this domain with its substrate.

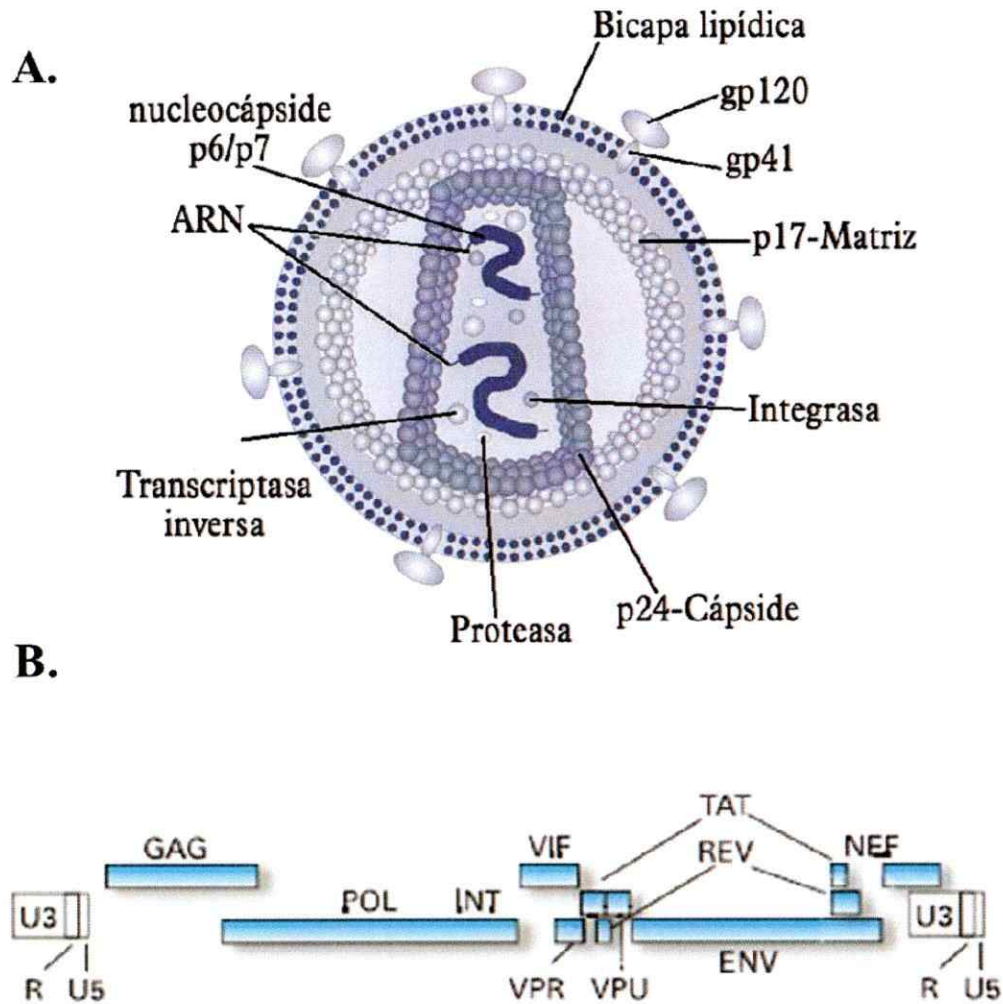
The results obtained from cross-linking permit us to conclude that the substrate binds the reverse transcriptase and p51-G-TCR, which implies that there are lysines near the modified nucleotides. From analysis made to the crystallized structure we propose that the tRNA/DNA substrate binds with a different orientation than the PPT/RNA substrate.

## 4. Introducción

### 4.1. Virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) es un lentivirus de la familia *Retroviridae*. Es la subespecie más común y patogénica de las dos descritas (Sharp and Hahn 2011) que causa el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Weiss 1993). Los retrovirus poseen una bicapa lipídica que envuelve una estructura denominada nucleocápside, que protege el genoma viral (Figura 1.A.).

El material genético de HIV-1 está compuesto por dos moléculas idénticas de RNA de hebra simple, con un tamaño de 9.8 Kb y de polaridad positiva, que contiene principalmente tres genes: *gag*, *pol*, y *env*. *Gag* codifica para la estructura interna del virus de la matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC), *pol* codifica para la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN), y *env* codifica para las proteínas de la envoltura del virus gp120 (SU) y gp41 (TM) que interactúan específicamente con los receptores celulares (David, Knipe, et al. 2007) (Figura 1.B). Además posee los genes regulatorios *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*, que codifican para proteínas que controlan la infectividad del HIV-1 y la producción de nuevas copias del virus (Kuiken et al 2008). El ciclo replicativo de HIV-1 comienza por el reconocimiento entre las proteínas de la envoltura del virus y el receptor de la célula blanco (CD4) y un correceptor (CCR5 en macrófagos). Posteriormente, la envoltura del virión se fusiona con la membrana celular, ocurre la internalización de la nucleocápside del virus y el desnudamiento de su



**Figura 1. Descripción general de los retrovirus. A. Estructura general de un retrovirus maduro.** Las partes más importantes se encuentran rotuladas (<http://ainhoadominguez.wordpress.com>). **B. Genoma de retrovirus.** Resumen de los genes estructurales más importantes de HIV-1, flanqueados por dos secuencias terminales repetitivas (LTR) (<http://www.abbottmolecular.com/>).

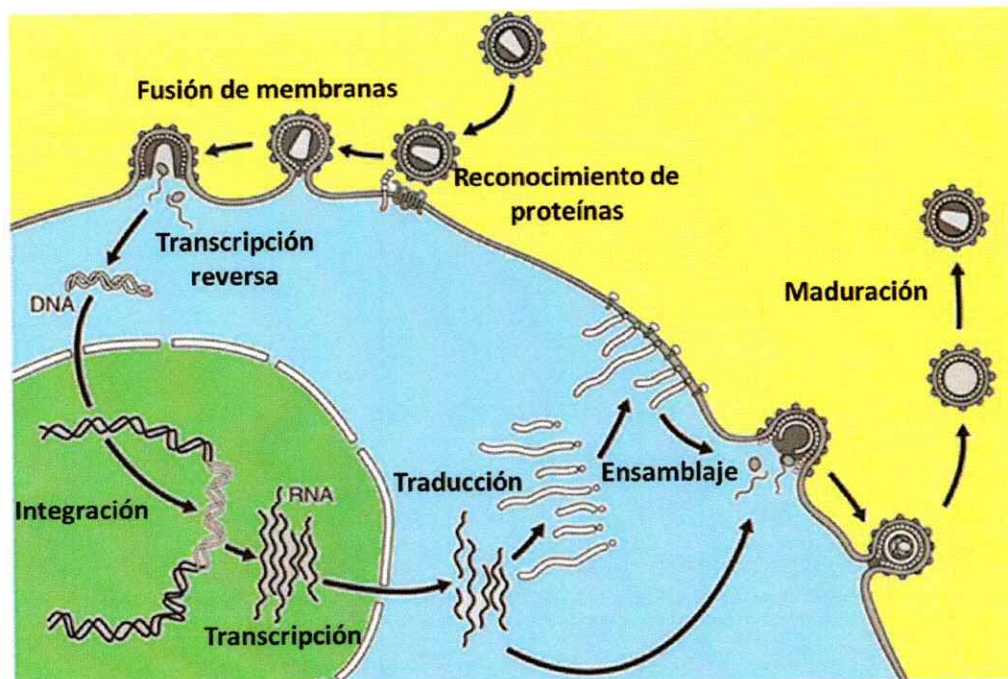


genoma. La transcriptasa reversa (RT) sintetiza una molécula de DNA doble hebra a partir de una de las dos copias del RNA genómico viral. El dsDNA es transportado al núcleo por un complejo proteico e integrado al genoma del huésped por acción de la integrasa viral. Los genes virales que codifican para las proteínas del virus son transcritos y traducidos por la maquinaria celular. La nucleocápside se ensambla cerca de la membrana celular, se forma una yema, y es liberada por gemación. El ciclo termina con el procesamiento de las proteínas de la nucleocápside por parte de la proteasa viral, formándose la partícula viral madura (Coffin, Hughes et al. 1997) (Figura 2).

#### **4.2. Transcripción reversa**

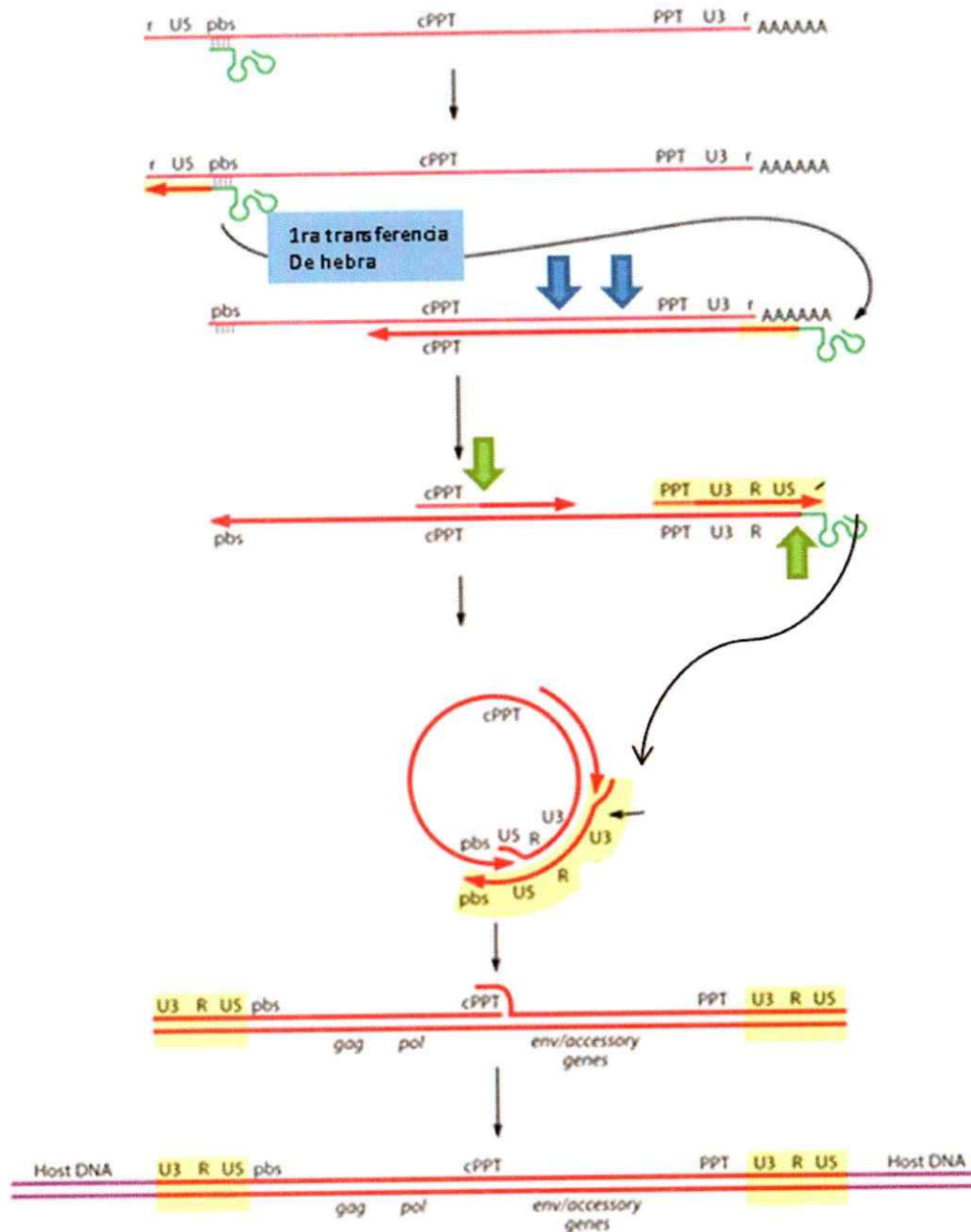
Un paso clave en el ciclo replicativo de los retrovirus es la síntesis de un DNA de doble hebra a partir del genoma viral de RNA, para integrarse al genoma huésped. La síntesis de DNA retroviral es dependiente de dos actividades enzimáticas de la RT: DNA polimerasa dependiente de DNA o RNA, y ribonucleasa H (RNasa H) que hidroliza el RNA del híbrido RNA/DNA (Coffin, Hughes et al. 1997). Existen dos eventos importantes en la transcripción reversa denominados transferencia o “salto” de hebra de la RT, que corresponden a una translocación de la RT desde un sector del genoma a otro (Muchiri, Rigby et al. 2011).

El genoma viral ingresa al citoplasma como parte de un complejo de proteínas. La transcripción reversa se inicia con la síntesis de la hebra negativa de DNA usando



**Figura 2. Ciclo replicativo de los retrovirus.** La dirección de las flechas indica el orden de las etapas (Adaptado de Münk, Landao et al. 2003).

como partidor al tRNA<sup>lys3</sup> (Jiang, Mak et al. 1993) que complementa con un segmento del genoma viral denominado PBS (*primer binding site*), de 18 nucleótidos cercano al extremo 5' (vecino a U5 en figura 3). La síntesis de la hebra negativa de DNA ocurre hacia el extremo 5' del genoma y paralelamente la hebra de RNA del híbrido generado es hidrolizada por la RNasa H mediante cortes inespecíficos (flechas azules en figura 3). Al llegar al extremo 5' del genoma viral ocurre el "primer salto de hebra" mediado por el apareamiento de bases entre secuencias duplicadas (R') que se encuentran en el extremo 3' de la hebra DNA naciente y el extremo 3' del genoma de RNA, para así completar la síntesis de hebra negativa de DNA. A continuación, la síntesis de la hebra positiva de DNA se inicia desde un segmento de RNA resistente al corte de RNasa H denominado PPT (*polypurine tract*), generado por un corte específico de la transcriptasa reversa (figura 3) (Oh, McWilliams et al. 2008). Posteriormente la RNasa H remueve el partidor tRNA<sup>lys3</sup>, dejando un ribonucleótido terminal (Furfine and Reardon, 1991). La secuencia complementaria al partidor removido hibrida con el extremo 3' de la hebra positiva de DNA, permitiendo la segunda transferencia de hebra. Las síntesis de hebra negativa y positiva son luego completadas, sirviendo cada una de templado de la otra (Coffin, JM., Hughes SH et al. 1997). La remoción de los partidores de tRNA<sup>lys3</sup> y PPT ocurren mediante cortes específicos y que generan las regiones U5 y U3, que permite la posterior integración al genoma de la célula huésped (flechas verdes en Figura 3) (Schultz and Champoux, 2008).



**Figura 3. Transcripción reversa del genoma de HIV-1.** Las flechas corresponden a los cortes realizados por la RNasa H de la transcriptasa reversa. Flechas azules representan el corte dependiente de polimerasa y verdes al corte independiente de polimerasa (Adewunmi et al. 2009).

### 4.3. Transcriptasa reversa de HIV-1.

La transcriptasa reversa (RT) de HIV-1 es un heterodímero asimétrico compuesto por dos subunidades relacionadas denominadas p66 y p51 (de 66kDa y 51kDa respectivamente) (Schultz and Champoux, 2008). La subunidad p66 tiene 560 aminoácidos y posee ambos sitios activos, de polimerasa y RNasa H. Esta subunidad está compuesta de 4 subdominios denominados *fingers* (F) (residuos 1–85 y 118–155), *palm* (P) (residuos 86–117 y 156–236), *thumb* (T) (237–318) y *connection* (C) (319–426) (Jacobo-Molina A., Ding J., et al. 1993), y el dominio RNasa H que se encuentra en la región C-terminal (Schatz, Cromme et al. 1989). La subunidad p51 tiene un rol principalmente estructural, se compone de 440 amino ácidos y se pliega en los mismos subdominios que p66 (*fingers*, *palm*, *thumb* y *connection*), pero el arreglo espacial es diferente (Figura 4).

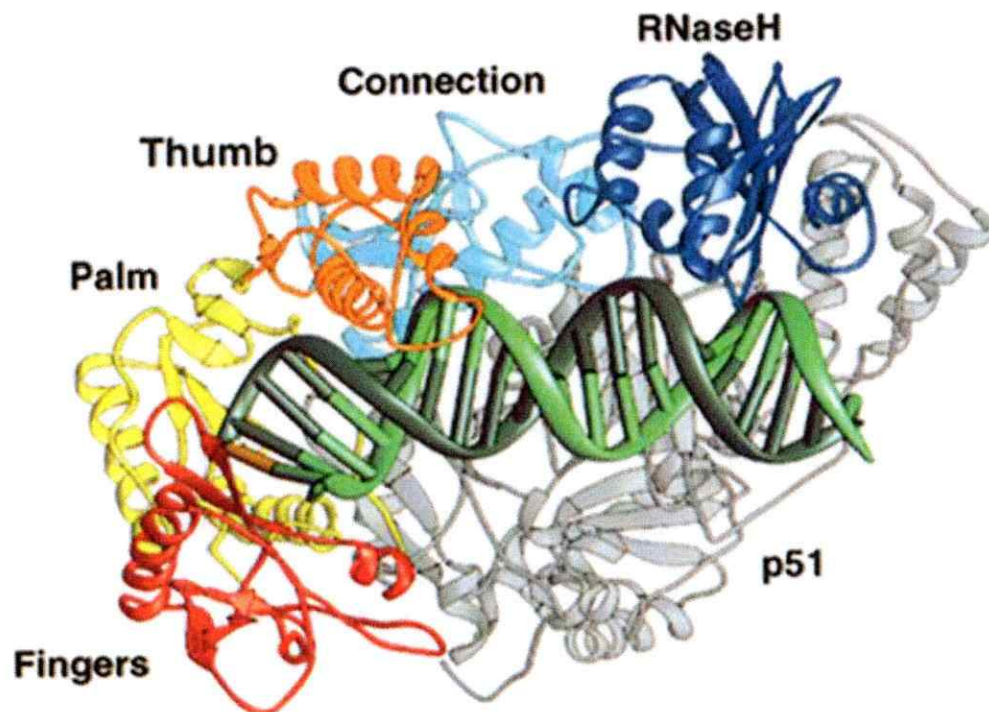
Se han descrito dos estructuras cristalinas de RT de HIV-: una unida a un dsDNA (Jacobo-Molina, Ding, et al. 1993) y otra a un híbrido de PPT/DNA (Sarafianos, Kalyan et al. 2001). En ambas estructuras la distancia del sitio activo de polimerasa al sitio activo de RNasa H es de 60 Å aproximadamente, lo que en términos de nucleótidos corresponde a 17-18 pares de bases. En ambos estudios, el sustrato muestra una torsión de aproximadamente 40° entre el sitio activo de la polimerasa y la región *thumb* de p66. Aun así ambas estructuras cristalinas presentan diferencias. El sustrato híbrido RNA/DNA presenta un nucleótido no apareado cercano al sitio de corte que juega un rol importante en la catálisis de RT (Dash, Yi- Brunozzi et al. 2004). Por otro lado, el sustrato dsDNA tiene una forma-A que no es óptima para interactuar con la RT (Jacobo-

Molina, Ding et al. 1993), mientras que el híbrido tiene una estructura que va desde una forma-A a una forma-B, la cual presenta una mayor cantidad de contactos con la enzima, facilitando la polimerización y procesividad de la RT (Sarafianos, Kalyan et al. 2001). El híbrido RNA/DNA utilizado en el estudio de Sarafianos, Kalyan et al. simula al partidador PPT, que es distinto al tRNA<sup>lys3</sup>. Hasta el momento no existen estudios cristalográficos de la RT de HIV-1 con el híbrido tRNA<sup>lys3</sup>/DNA, por lo que es importante caracterizar el reconocimiento de la RT de HIV-1 al partidador tRNA<sup>lys3</sup> y las zonas de interacción entre el sustrato tRNA<sup>lys3</sup>/DNA y la RT que permiten la remoción del partidador.

#### **4.4. Dominio RNasa H de transcriptasa reversa de HIV-1.**

El sitio activo del dominio RNasa H está compuesto por los aminoácidos D442, E478, D498 y D549 (Sarafianos, Marchand et al. 2009). El dominio RNasa H de HIV-1 presenta una gran similitud estructural con el dominio RNasa H de la RT del Virus de leucemia murina (MLV), la RNasa HI e *Echerichia coli* y la RNasa H1 humana (Schatz, Cromme et al. 1989). Una diferencia importante es la ausencia de una hélice de carga positiva en la RNasa H de HIV-1, la cual está involucrada en el reconocimiento y la actividad catalítica, pero que es reemplazada funcionalmente por una serie de residuos cargados en la subunidad p66 (Furfine and Reardon, 1991).

RNasa H es una endoribonucleasa (Nowotny, Gaidamakov et al. 2005), miembro de la superfamilia de las nucleotidil transferasas que catalizan la hidrólisis del enlace fosfodiéster de la hebra de RNA en el híbrido RNA/DNA, en presencia de cationes



**Figura 4. Modelo de cinta que representa la estructura de la RT de HIV-1 con un sustrato dsDNA (doble hebra).** Se muestran los subdominios de p66: *fingers* (rojo), *palm* (amarillo), *thumb* (naranja), *connection* (celeste) y el dominio RNasa H (azul); La hebra templado de 25 nucleótidos del dsDNA se muestra en verde claro y la hebra partidor de 21 nucleótidos en verde oscuro. PDB: 1RTD (Huang, Chopra et al. 1998).

divalentes como el  $Mg^{+2}$  y el  $Mn^{+2}$  (Elsasser and Fels, 2010). Estudios recientes de dinámica molecular han sugerido que aparte de los dos iones  $Mg^{+2}$  presentes en el sitio activo, existe un tercer ión  $Mg^{+2}$  en el bolsillo catalítico responsable del efecto de atenuación de la RNasa H a altas concentraciones de  $Mg^{+2}$  (Ho, De Vivo et al. 2010).

La catálisis enzimática de RNasa H ocurre en presencia de 3 residuos ácidos que sugieren un mecanismo de dos metales similar al de las polimerasas (Joyce and Steitz, 1994; Klumpp, Hang, et al. 2003). Una molécula de agua ataca nucleofílicamente al enlace fosfodiéster del ácido nucleico y los protones son transportados hacia una molécula de oxígeno, lo que genera como productos un extremo fosfato 5' y otro hidroxilo 3' (Elsasser and Fels, 2010).

La actividad RNasa H de RT de HIV-1 se clasifica en dos tipos: dependiente e independiente de polimerasa. La actividad dependiente de polimerasa degrada el RNA del híbrido RNA/DNA cuando se sintetiza la hebra de DNA. La actividad independiente de polimerasa es responsable de la remoción de los partidores en la transcripción inversa. El sitio activo de polimerasa posiciona el dominio de RNasa H en la unión RNA-DNA y realiza el corte a 18 nucleótidos del sitio de elongación de DNA (Furfine and Reardon, 1991).

Además, se ha determinado que un dominio aislado de RNasa H puede realizar la remoción del partidor  $tRNA^{Lys3}$  de forma similar a la RT en ausencia de polimerización (Smith and Roth 1993), pero se ve afectada negativamente cuando el tamaño del sustrato es menor a 14mer. Mediante *mismatch* y mutagénesis de un híbrido  $tRNA^{Lys,3}/DNA$  se determinó que los nucleótidos en la posición +2, +3, +4 y +6 son importantes en el reconocimiento y actividad de la enzima por lo que una



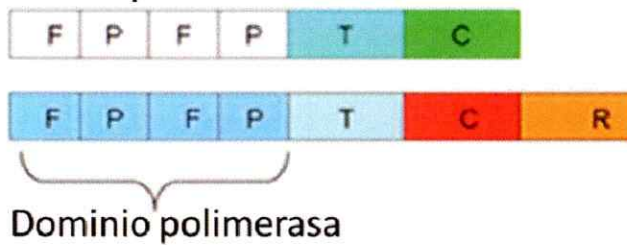
modificación de ellos vería afectada la catálisis de remoción del partidor (Smith, Leon et al. 1998).

Se ha expresado y purificado el dominio de RNasa H de HIV-1, pero ha resultado ser inactivo o con bajos niveles de actividad (Becerra, Clore et al. 1990; Stammers, Tisdale et al. 1991). En estudios de complementación entre subdominios de p66 y p51 expresados independientemente, se logró reconstituir la actividad RNasa H dependiente de  $Mg^{+2}$  (Smith, Gritsman et al. 1994). Basado en este descubrimiento se construyó un péptido denominado p51-G-TCR (figura 5), que conserva la actividad RNasa H dependiente de  $Mg^{+2}$ , la especificidad de corte de la RNasa H de HIV-1 en la remoción del partidor tRNA<sup>Lys3</sup> y las propiedades enzimáticas son comparables a la RT silvestre (Farias, Vargas et al. 2011, Bebenek, Bear et al. 1997).

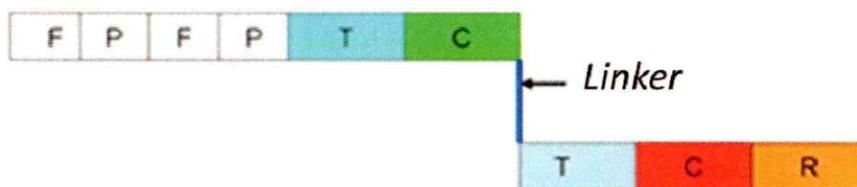
#### **4.5. Reconocimiento del sustrato híbrido por el dominio de RNasa H.**

La mayoría de las interacciones de la transcriptasa reversa con el sustrato ocurren en la cadena de azúcar-fosfato del ácido nucleico (Jacob-Molina, Ding, et al. 1993), permitiendo especificidad a la catálisis de RNasa H. Un ejemplo de estas interacciones corresponde a un grupo de aminoácidos cercanos al sitio activo RNasa H denominados “*RNasa H primer grip*” (Sarafianos, Kalyan et al. 2001). Esta región interactúa con la hebra de DNA del sustrato e incluye residuos de los dominios polimerasa, RNasa H y el subdominio *connection* de p66, además de dos residuos de la subunidad p51 (Julias, McWilliams, et al. 2003). Adicionalmente al *primer grip*, una de las principales interacciones con el sustrato ocurre en el MGBT que se encuentra situado en la

### Transcriptasa reversa HIV-1



### Construcción p51-G-TCR



**Figura 5. Dominios de la construcción p51-G-TCR de RNasa H.** Dominios *finger* (F), *palm* (P), *thump* (T), *connection* (C), y RNasa H (R). (Farias RV, Vargas D et al. 2011).

torsión de 40° del sustrato, lo que favorece una transición estructural del ácido nucleico de una forma-B a una forma-A (Latham, Forgacs, et al. 2000). Se le ha dado principal interés al ancho de la curvatura menor del ácido nucleico de doble hebra como causa de la especificidad de corte de RNasa H al (Szyperski, Götte et al. 1999), pero diferentes interacciones que posee la enzima con el sustrato también son importantes para la especificidad de la actividad de RNasa H.

En un trabajo previo se propuso determinar qué regiones de la RNasa H estarían en contacto con un híbrido RNA/DNA (Guaitiao, Zuniga, et al. 2004). Para ello, se realizó un entrecruzamiento de un dominio aislado RNasa H de HIV-1 utilizando como sustrato un híbrido que simula al tRNA<sup>lys3</sup>/DNA modificado con un reactivo de entrecruzamiento dirigido a lisinas. Se obtuvo un enlace covalente con la lisina 476 que en la estructura co-cristalina unida al híbrido PPT/DNA no se encontraba lo suficientemente cerca del sustrato como para permitir el entrecruzamiento (Sarafianos, Kalyan et al. 2001). Esta diferencia entre ambos estudios puede deberse a las siguientes hipótesis: 1) la estructura de tRNA<sup>lys3</sup>/DNA con PPT/DNA son distintas 2) la lisina 476 se encuentra en una posición alternativa a causa de la catálisis de RNasa H o 3) la unión al sustrato presenta una orientación diferente.

Esta última hipótesis ha sido apoyada por estudios recientes en el laboratorio de Le Grice mediante fluorescencia de resonancia de transferencia de energía (FRET). Ellos lograron observar que la RT puede unir al sustrato RNA:DNA/DNA en dos orientaciones: ya sea en la parte frontal del sustrato híbrido posicionado que facilita la extensión de DNA o al final de este, en una posición en que el dominio de RNasa H

queda cercano al extremo 3' del híbrido de RNA:DNA (Liu, Abbondanzieri et al. 2008). Además, se determinó que la orientación de la RT depende de la composición del sustrato (RNA/DNA versus DNA/DNA) y que puede cambiar rápidamente entre orientaciones cuando se une a un híbrido PPT/DNA para la síntesis de la hebra (+) DNA (Abbondanzieri, Bokinsky, et al. 2008).

En este trabajo se realizaron entrecruzamientos utilizando tanto la construcción p51-G-TCR como la enzima RT de HIV-1 con un sustrato híbrido modificado en 4 posiciones diferentes que simula al sustrato tRNA<sup>lys3</sup>/DNA, se contrastó con un análisis computacional de la RT unida a un sustrato PPT, para elucidar con la orientación que el dominio de RNasa H une al sustrato para la catálisis de remoción del partidor tRNA<sup>lys3</sup>.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivos generales.**

- Identificar posibles zonas de la interacción del dominio RNasa H de la transcriptasa reversa de HIV-1 con un sustrato modelo para la determinación de las zonas de unión de la construcción p51-G-TCR al intermediario de remoción del partidador de tRNA<sup>lys3</sup>.

### **5.2. Objetivos específicos.**

- Realizar ensayos de entrecruzamiento entre p51-G-TCR y la transcriptasa reversa, con varios sustratos que poseen un nucleótido modificado, con la finalidad de obtener el máximo producto de entrecruzamiento posible.
- Contrastar los resultados de entrecruzamiento con el análisis computacional de una estructura de RT unida a un PPT/DNA para elucubrar con una orientación alternativa de la RT con tRNA<sup>lys3</sup>/DNA.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Materiales.

#### 6.1.1. Materiales y reactivos.

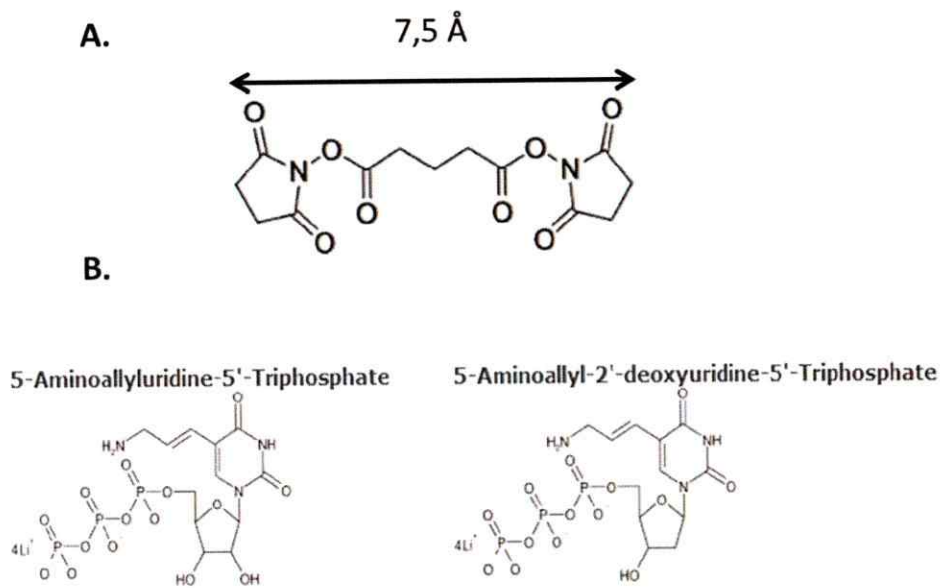
De Merck se obtuvo: glicerol, glucosa,  $\alpha$ -lactosa, tris-base. De Sigma se obtuvo: cloranfenicol, SDS, persulfato de amonio, detergente NP40, acrilamida, dietil pirocarbonato (DEPC), dimetil sulfóxido (DMSO). US Biological: ampicilina, kanamicina, CHAPS, HEPES, sephadex G.25. El  $\beta$ -mercapto etanol es JT Baker.

El extracto de levadura y triptona corresponden a Difco Laboratories. Bis-acrilamida es AMRESCO. TEMED y reactivo de Bradford corresponden a Bio-Rad, y el DTT es BioRad, El coctel de inhibidor de proteasas contiene: antipaína-dihidrocloruro, aprotinina, bestatina, quimostatina, E-64, EDTA- $\text{Na}_2$ , leupeptina, pefabloc SC, pepstatina, fosforamidon y es Roche. La resina de  $\text{Ni}^{+2}$ -nitriloacetato-agarosa es QIAGEN. El kit *ECL Western Blotting Detection Reagents* es GE Healthcare y el anticuerpo anti-tag histidinas es Pierce. El agua libre de nucleasas usada y los estándares de proteínas de amplio rango y preteñido son Winkler S.A. RNasin, polinucleótido quinasa  $\text{T}_4$  y su correspondiente Buffer son New England Biolabs. El entrecruzante disuccimidil glutarato (DSG) es Thermo Scientific (Figura 6.A). El ATP marcado radiactivamente ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ , dATP 6000Ci/mmol) es Perkin Elmer, NEN. Se utilizó transcriptasa reversa comercial de HIV obtenida de Calbiochem

### **6.1.2. Cepas bacterianas, plásmido y sustratos de ácido nucleicos.**

La cepa de *Escherichia coli* MIC2067 (DE3) (F-rnhA339::cat rnhB716::kam) fue obtenida gracias a la Dr. Mónica Roth.

El sustrato usado en el ensayo de competencia denominado 2783/2785 fue obtenido de IDT, Inc. El sustrato utilizado para el ensayo de fluorescencia fue obtenido de Trilink *Biotechnologies*, al igual que los sustratos para entrecruzar que contienen un nucleótido modificado (5-aminoallyl-dU o 5-aminoallyl-U) (Figura 6.B) (sustratos del C01A al C07A) (Tabla 1). El sustrato 17mer utilizado para el ensayo de corte específico fue obtenido de IDT, Inc.



**Figura 6. Estructura molecular del entrecruzante y el nucleótido modificado. A.** Molécula entrecruzante disuccimidil glutarato (DSG), la distancia indicada corresponde al brazo espaciador, que es el alcance del entrecruzador. **B.** Estructura de los nucleótidos modificados que poseen los sustratos para entrecruzamiento.



**Tabla 1. Secuencias de los sustratos utilizados.** En negrita se representan los desoxiribonucleótidos, y los no destacados son ribonucleótidos. 6-FAM: Posición en la que se encuentra el fluoróforo. Dabcyl-C6-NH: posición en la que se encuentra el apagador. **X**: 5-aminoallyl-U. **Z**: 5-aminoallyl-dU. **A**: Adenina que reemplaza a citosina de la secuencia original.

Óligo	Secuencia (5'--> 3')
17mer RNA	<b>AGCAGTGGCGCCCGAAC</b>
17mer RNA:DNA	<b>TCGTCACCGCGGGCUUG</b>
RNA ensayo	GAUCUGAGCCUGGGAGCU(6-FAM)
DNA ensayo	(Dabcyl) (C6-NH) <b>AGCTCCCAGGCTCAGATC</b>
2783	<b>GTCAGCGGGGGTCTTTCATT</b>
2785	<b>AATGAAAGACCCCGCTGAC</b>
C01A	<b>TCGTCACCGXGGGCU</b>
C02A	<b>TCGTCACCGCGGGXU</b>
C03A	<b>TCGTCACCGCGGGCU</b>
C04A	<b>AGCAGTGGCA<sup>A</sup>CCCGA</b>
C05A	<b>AGCAGTGGCGCC<sup>A</sup>A</b>
C06A	<b>AGCAGZGGCGCCCGA</b>
C07A	<b>AGZAGTGGCGCCCGA</b>

## **6.2. Métodos.**

### **6.2.1. Transformación.**

Se incubaron por 30 minutos en hielo 100  $\mu$ L de células competentes de *E.coli* MIC2067 con 20 ng del plásmido pETp51-G-TCR (Farias, Vargas, et al. 2011). Se sometieron a un shock térmico de 42 °C por 90 segundos, y se enfriaron en hielo por 2 minutos. Se agregó 1 ml de medio SOC y las células se recuperaron por 1 hora a 37 °C con agitación (agitador orbital), posteriormente se sembraron 100  $\mu$ L de células en placas de LB agar con ampicilina por 16 horas a 37 °C. Las colonias obtenidas fueron utilizadas para la expresión de proteínas.

### **6.2.2. Expresión de proteínas.**

Se realizó un cultivo de 2 mL de *E.choli* MIC2067 transformadas con pETp51-G-TCR y se indujo la expresión de p51-G-TCR con IPTG 1 mM. Las células se recolectaron por centrifugación y resuspendieron en agua libre de nucleasas. La resuspensión de células fue incubada con SDS a 80 °C, y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10%. Las proteínas del gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un amortiguador de transferencia (tris-HCl 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20 %, pH 8,0). La membrana se incubó en solución de bloqueo (leche descremada al 2 % disuelta en PBS 1X), se lavó con PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, 4 mM, pH 7,3) y se incubó con un anticuerpo primario anti-tag de histidina, el cual está conjugado a peroxidasa de rábano. La membrana se reveló en papel fotográfico B&N con el Kit *ECL Western Blotting*

*Detection Reagents*, mediante quimioluminiscencia debido a la oxidación del luminol catalizada por la peroxidasa y el peróxido de hidrógeno.

Para obtener la construcción p51-G-TCR a alta concentración y soluble se realizó el método de autoinducción en cultivos de alta densidad (Studier et al. 2005) con modificaciones. Se utilizaron clones de la cepa de *E. Coli* MIC2067 que expresan p51-G-TCR, y se inocularon en 6 ml de medio líquido LB con ampicilina 100 mg/mL, kanamicina 30 mg/mL y cloramfenicol 15 mg/mL. Se incubaron a 37 °C con agitación constante durante toda la noche.

Se utilizaron dos matraces de 2L cada uno con 400 mL de medio ZYM-5052, ampicilina 100 mg/mL, kanamicina 30 mg/mL, cloramfenicol 15 mg/mL y 400µL de cultivo crecido toda la noche de la cepa transformada de *E. choli* MIC2067 a 37 °C. El cultivo se mantuvo con agitación mínima (270 rpm) por 24 horas a 25 °C, controlando el pH (superior a 6) y hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 6. Se colectaron las células por centrifugaron de los cultivos a 4 °C por 30 minutos a 6000 rpm en una centrífuga Sorvall rotor GSA.

El pellet se resuspendió en tampón de solubilización (CHAPS 10 mM, imidazol 10 mM, NaCl 300 mM, amortiguador fosfato 50 mM pH 8,0 1 M y una tableta de inhibidores de proteasas roche) a 4°C.

### **6.2.3. Purificación de proteínas.**

La construcción p51-G-TCR expresada en *E. Coli* MIC2067 contiene un tag de hexahistidina en el N-terminal, lo que permite purificar la construcción mediante

cromatografía de afinidad en una resina de  $\text{Ni}^{+2}$ -nitriloacetato-agarosa ( $\text{Ni}^{+2}$ -NTA agarosa). Para esto, se sonicaron a 4 °C los pellet resuspendidos 6 veces por 15 segundos con un descanso de 1 minuto entre cada sonicación. Se obtuvieron dos extractos de proteínas y se centrifugaron por 1 hora a 4 °C a 6000 rpm, se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  del extracto crudo. Cada extracto crudo se incubó en 1 mL de resina  $\text{Ni}^{+2}$ -NTA agarosa (previamente incubada en 10 mL de tampón de solubilización por 10 minutos a 4 °C) por 16 horas a 4 °C. Después de incubar la resina con los extractos, se centrifugaron a 4 °C por 10 minutos a 2500 rpm, se extrajo una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y el restante se eliminó.

Cada una de las resinas fueron lavadas, con 10 mL de amortiguador de lavado frío (CHAPS 10 mM, imidazol 25 mM, NaCl 1 M, amortiguador fosfato 50 mM pH 8,0,  $\beta$ -mercapto etanol 10 mM y glicerol 20 %) por 10 minutos a 4 °C, se centrifugaron a 4 °C por 10 minutos a 2500 rpm y se eliminó el sobrenadante. A cada 1 mL de resina lavada se agregó 20 mL de amortiguador de lavado y se vaciaron juntos en una misma columna. El amortiguador de lavado se eluyó, se extrajo una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  y el resto se eliminó.

La proteína se eluyó con 5 mL de dos amortiguadores, con dos concentraciones de imidazol (50 y 300 mM), en CHAPS 10 mM, NaCl 1 M, amortiguador fosfato 50 mM pH 8,0, 2-mercaptoetanol 10 mM, glicerol 20% e imidazol pH 8,0. Se recolectó en fracciones de 1 mL, obteniendo un total de 10. La pureza de las fracciones eluidas se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10 % teñidos con azul de coomassie y la concentración de proteínas de cada fracción se cuantificó por el método de Bradford.

Finalmente las fracciones que contenían la enzima activa se dializaron durante 16 horas a 4°C contra amortiguador de diálisis (hepes 20 mM pH 7,4, DTT 1,5 mM, KCl 400 mM, NP-40 0,1 % y glicerol 20 %) y se guardaron a -80 °C.

#### **6.2.4. Determinación de actividad RNasa H.**

Para cuantificar la actividad de cada fracción purificada, se utilizó un sustrato híbrido RNA/DNA preparado a partir de dos oligonucleótidos modificados: un oligonucleótido RNA que está modificado en su extremo 3' con 6-carboxifluoresceína (longitud onda de excitación: 480 nm); y un oligonucleótido DNA que está modificado en su extremo 5' con una molécula apagadora, ácido 4-((-4-(dimetilamino)-fenil)-azo)-benzoico. La actividad RNasa H se detectó por la emisión de fluorescencia a 525 nm al degradarse la hebra de RNA. La reacción se incubó con un amortiguador Tris 50 mM, KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, sustrato 0,25 μM, 2 μL de fracción eluída en un volumen de 100 μL y se llevó a cabo a 37 °C. La emisión de fluorescencia se detectó con un lector de fluorescencia "fluoroskan II", utilizando el programa spectrosoft.

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 5 y se definió como una unidad enzimática (U), la cantidad de enzima necesaria para provocar un aumento de 1 en la fluorescencia a 525 nm en un tiempo de 1 minuto.

#### **6.2.5. Marcaje del sustrato modificado.**

Se marcó el extremo 5' de la hebra simple del sustrato modificado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 10 mCi/mL. 40 pmol de la hebra simple a marcar se incubaron con 0,5 U de T4 polinucleótido

quinasa en amortiguador quinasa 1X (Tris-Cl 70 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 5 mM) en un volumen de 30 µL durante 2 horas a 37 °C. En caso de ser una hebra RNA, se agregó 1 µL de *RNasin® Plus RNase Inhibitor*. La reacción se detuvo con 1 µL de EDTA 1 M pH 8,0 a 70 °C por 2 minutos y se eliminó el exceso [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP en una columna de sephadex G25 mediante centrifugación.

La hebra simple marcada radioactivamente se incubó con su hebra complementaria en relación molar 1:1 con hepes 50 mM pH 7,8 y KCl 50 mM en un volumen de 40 uL. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos a 70 °C y se enfrió lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 25 °C). Los sustratos híbridos se guardaron a -20 °C.

#### **6.2.6. Entrecruzamiento.**

##### **6.2.6.1. Acoplamiento de DSG al sustrato modificado.**

20 µL del sustrato hibridado y marcado se incubó por 10 minutos a 20 °C con hepes 50 mM pH 7,8, DMSO 40 % y DSG 20 mM disuelto en DMSO en un volumen final de 30 µL. El exceso de DSG se eliminó por centrifugación en una columna de sephadex G.25 previamente equilibrada con acetato de sodio 5 mM pH 6,0, por 3 minutos a 2000 rpm. El híbrido RNA/DNA se usó de forma inmediata.

##### **6.2.6.2 Ensayo de actividad de remoción de partidador tRNAlys3.**

Se incubó 5 pmol de RT a 37 °C con tris 50 µM, KCl 60 µM, MgCl<sub>2</sub> 5 µM, y 4 pmol de sustrato marcado con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP en el extremo 5' de la hebra RNA. Se tomaron

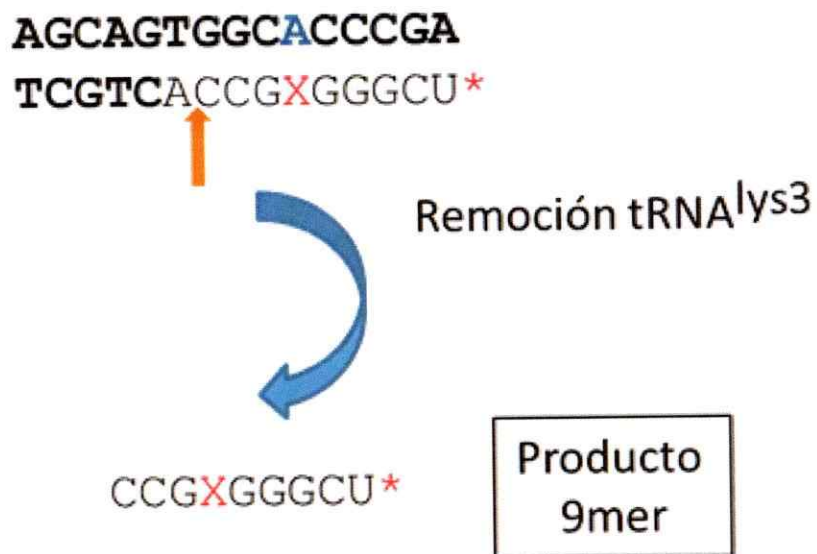
alícuotas y se detuvo la reacción con 2  $\mu$ L de amortiguador formamida 2x, se calentó a 55 °C por 2 minutos y se analizaron mediante un gel al 20 % de acrilamida con urea 7 M, en amortiguador Tris/borato/EDTA pH 7,6. El gel se secó a 65 °C y se expuso en un phosphoimager FX (BioRad (Figura 7).

#### **6.2.6.3. Ensayo de entrecruzamiento.**

El entrecruzamiento se realizó de acuerdo a lo descrito por Guaitiao, 2004 (con modificaciones). Se incubaron 7,5 pmol enzima en razón 1:1 con el sustrato acoplado a DSG en hepes pH 7,8 100 mM, KCl 60 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM a 24 °C en un volumen final de 70  $\mu$ L. Se tomaron alícuotas de 10  $\mu$ L a distintos momentos y la reacción se detuvo con amortiguador tris pH 8,0 70 mM, EDTA 140 mM pH 7,8. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 8 %, el gel se secó a 65 °C y expuso en un phosphoimager FX (BioRad) por 3 horas. El total de producto entrecruzado se cuantificó con el programa Quantity One 4.2.1.

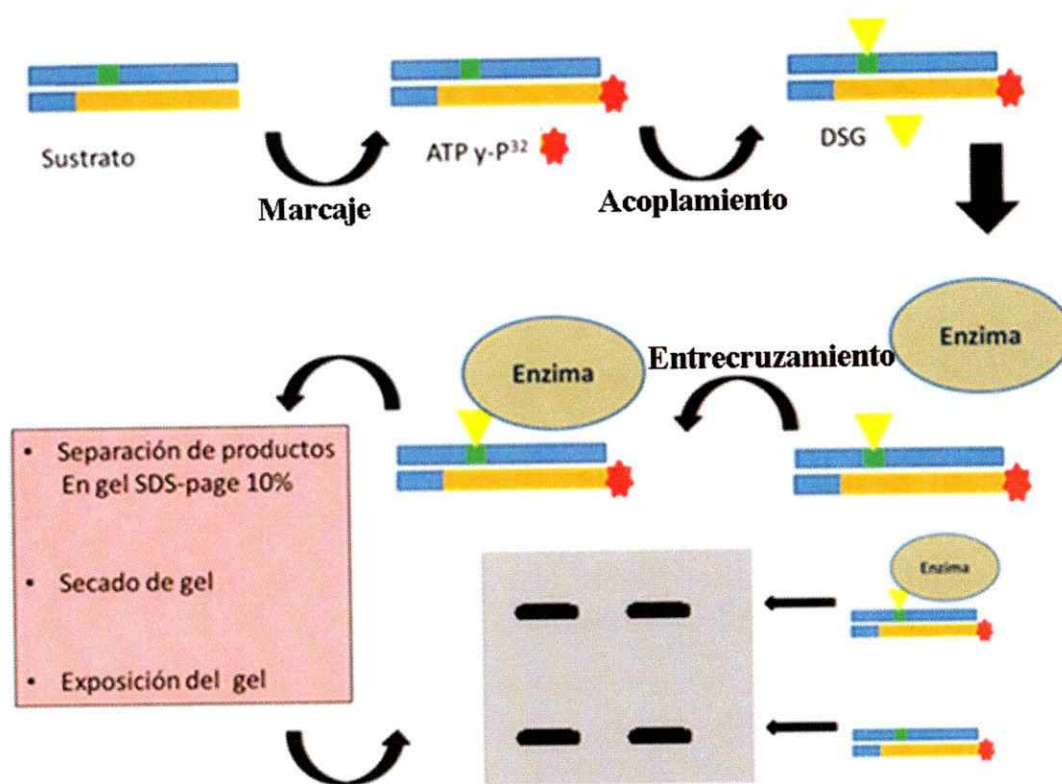
#### **6.2.7. Análisis de posibles lisinas cercanas al nucleótido modificado.**

Basado en los datos cristalográficos de Sarafianos, Kalyan y cols, 2001, se midió la distancia promedio que hay entre el nitrógeno del grupo amino de la cadena lateral del residuo de lisina, y el carbono 5 de la base nitrogenada modificada en el sustrato para entrecruzar. Se visualizó la estructura de RT de HIV-1 unida a un híbrido RNA/DNA (PDB: 1HYS) con el programa *Swiss-PdbViewer Deep View* V4.04 (Guex N, 1999).



**Figura 7. Descripción de catálisis de remoción del partidor tRNA<sup>lys3</sup>.** El ensayo se realizó con el sustrato posición 5 y posición 1'. Se observa el sustrato completo y el producto de 9mer. La marca radiactiva se simboliza con un asterisco rojo (\*). La flecha naranja representa el lugar de corte realizado por la RT para la remoción del tRNA<sup>lys3</sup>.





**Figura 8. Diagrama de entrecruzamiento.** Esquema resumen del proceso de preparación del sustrato para el entrecruzamiento y la obtención de datos descritos en los resultados. En azul claro el DNA, en naranja el RNA, en verde el nucleótido modificado con el grupo *aminoallyl*, en rojo la marca radiactiva y el triángulo amarillo invertido corresponde al DSG.

## **7. Resultados.**

### **7.1. Expresión de la construcción p51-G-TCR.**

Se transformaron *E. coli* MIC2067 con el plásmido pETp51-G-TCR y se indujo la producción de proteínas con IPTG. Se hizo un extracto de proteínas del cultivo inducido con IPTG y sin IPTG, y se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (Carril 1 y 2 de la figura 9.A). Además, se realizó un *Western Blot* utilizando un reactivo anti-tag de histidina, en el cual se observó una banda de 95 kDa en el extracto del cultivo inducido con IPTG que está ausente en el control sin IPTG, como se muestra en la figura 9.B, por lo que se concluye que las *E. coli* transformadas expresan la construcción p51-G-TCR.

### **7.2. Purificación de la construcción p51-G-TCR.**

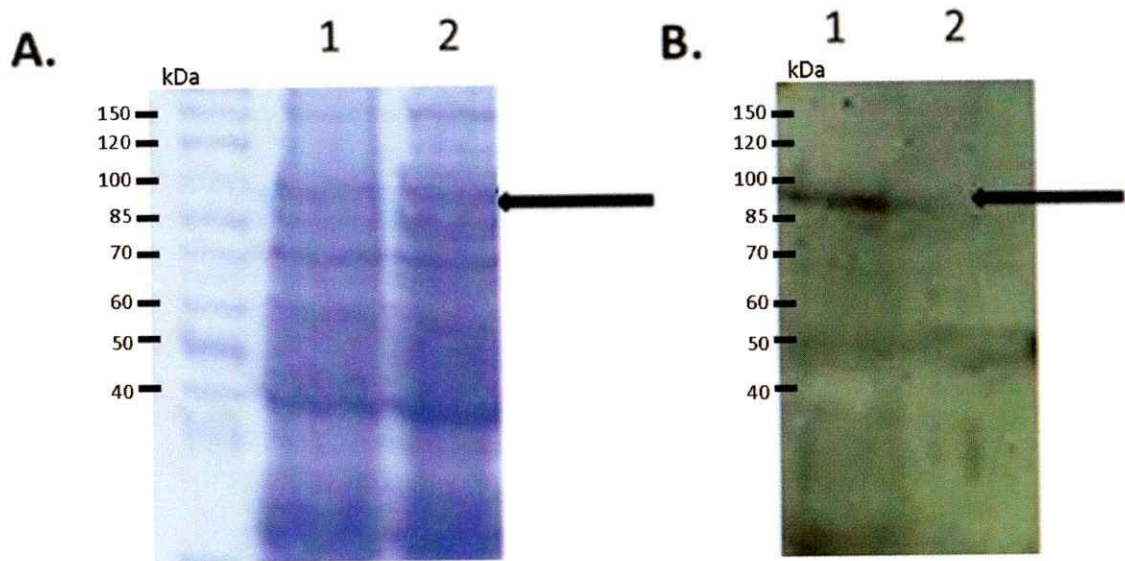
A partir de 800 mL de *E. coli* MIC2067 transformadas con el plásmido pETp51-G-TCR, se colectaron 6,39 g de pellet celular mediante centrifugación. p51-G-TCR se purificó desde un extracto obtenido del pellet celular, por cromatografía de afinidad en una columna con Ni<sup>+2</sup>-NTA-agarosa. Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y se determinó la concentración de proteínas de las fracciones mediante el método de Bradford. Se observa en la figura 10, desde el carril 6 al 10, que la proteína eluye principalmente con imidazol 300 mM, y que la mayor cantidad de proteínas se obtuvo de las fracciones 7 y 8.

Se realizó el ensayo fluorescente para determinar la actividad RNasa H a cada fracción eluida para determinar si p51-G-TCR se encuentra activa luego de ser purificada. Las

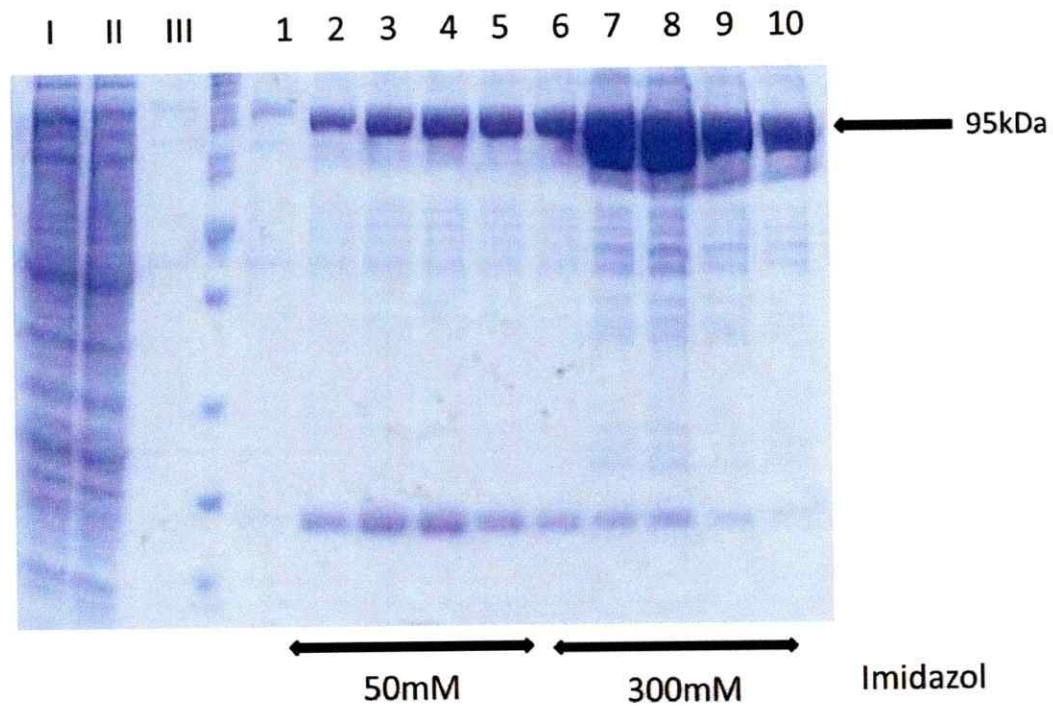
fracciones con mayor actividad total RNasa H corresponden a la fracción 8 (46650 U) y la fracción 7 (36200 U), mostradas en la tabla 2. Estas dos fracciones fueron dializadas contra amortiguador hepes 20 mM pH 7,4 para eliminar el imidazol y ser guardadas a -80 °C. Se obtuvieron 1,63 mg de p51-G-TCR con una actividad específica de 14.724 U/mg, la cual se utilizó en los ensayos de entrecruzamiento.

Para el entrecruzamiento se usaron varios híbridos de RNA/DNA que simulan al intermediario formado durante la remoción del tRNA partidor, que contienen nucleótidos modificados en distintas posiciones. Con el objetivo de determinar si la RT une al sustrato pese a las modificaciones (que corresponde a un híbrido RNA/DNA específico), se analizó la capacidad que tiene de competir contra el sustrato híbrido fluorescente (híbrido RNA/DNA inespecífico). Para esto se adicionó el oligonucleótido competidor a distintas concentraciones, se mantuvo constante la concentración del sustrato fluorescente y se incubó con la RT por 20 minutos. Se utilizó como competidor al sustrato modificado en la posición 1 y a un DNA doble hebra inespecífico (tabla 1).

En el gráfico de la figura 11 se observa que al aumentar la concentración del oligonucleótido competidor, hay una disminución de la actividad RNasa H de la RT medida por el lector de fluorescencia. Esto nos permite concluir indirectamente, que hay un desplazamiento del sustrato fluorescente por parte del competidor, y que el efecto de desplazamiento es mayor para el sustrato posición 1 que para el DNA de doble hebra específico. La enzima es capaz de discriminar entre un ácido nucleico inespecífico como lo es el DNA doble hebra y el sustrato híbrido, favoreciendo al híbrido pese al nucleótido modificado que presenta.



**Figura 9. Extracto de proteínas de cultivo de *E.coli* MIC2067 transformadas e inducidas con IPTG.** Las flechas negras indican la construcción p51-G-TCR. Carril 1: Cultivo con IPTG; 2: Cultivo sin IPTG. **A.** SDS-Page al 10% teñido con coomassie. **B.** Western Blot utilizando un anticuerpo anti-tag de histidinas.



**Figura 10. Perfil de elución de p51-G-TCR analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida.** Carril I: Extracto crudo bacteriano; II: Extracto que no se une a la resina Ni-NTA; III: Frente de elución; 1-5. Fracciones de elución con imidazol 50 mM; 6-10. Fracciones de elución con imidazol 300 mM.

**Tabla 2. Resumen de las fracciones purificadas mediante cromatografía de afinidad en una resina de Ni-NTA.**

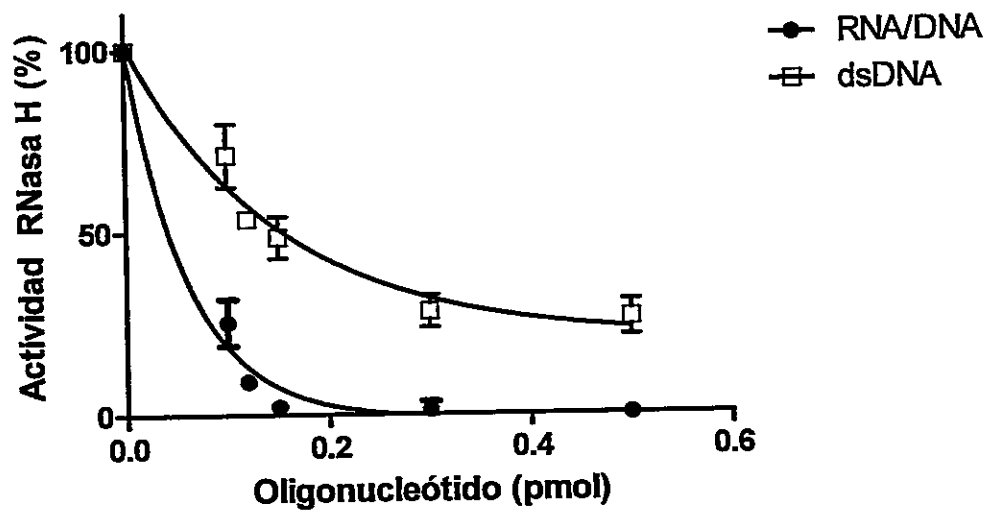
Fracciones	Pendiente	Concentración (pmol/μl)	Proteína total (pmol)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)
1	2,86	1,2	1179	1430	12767
2	1,06	1,3	1337	530	4173
3	1,10	2,0	2000	550	2894
4	0,64	1,3	1316	320	2560
5	0,70	0,7	726	350	5072
6	5,42	2,2	2232	2710	12783
7	93,4	21,3	21263	46650	23094
8	72,4	31,1	31105	36200	12250
9	49,7	6,9	6947	24850	37651
10	17,88	6,3	6284	8940	14974

La actividad RNasa H se determinó como el aumento de fluorescencia en un tiempo determinado. La proteína y actividad total se calculó para 1 mL de volumen de fracción y la actividad específica está en función de la concentración de cada fracción (obtenida mediante el método de Bradford).

**Tabla 3. Eficiencia de la diálisis.** Se describe la actividad total antes y después de dializar la fracción. Lo mismo se realizó para la cantidad de proteína, esto se calculó mediante método de Bradford.

Fracción	Actividad Pre dial. (U)	Actividad Post diál. (U)	Eficiencia Act. total %	Proteína total Pre dial. (pmol)	Proteína total Post diál. (pmol)	Eficiencia prot. total %
7	46650	19513	41,8	21263	8169	38,4
8	36200	15582	48,6	31105	8279	26,6

La actividad RNasa H se determinó como el aumento de fluorescencia en un tiempo determinado. La actividad total se calculó para 1 mL de volumen de fracción y la proteína total se obtuvo mediante el método de Bradford.



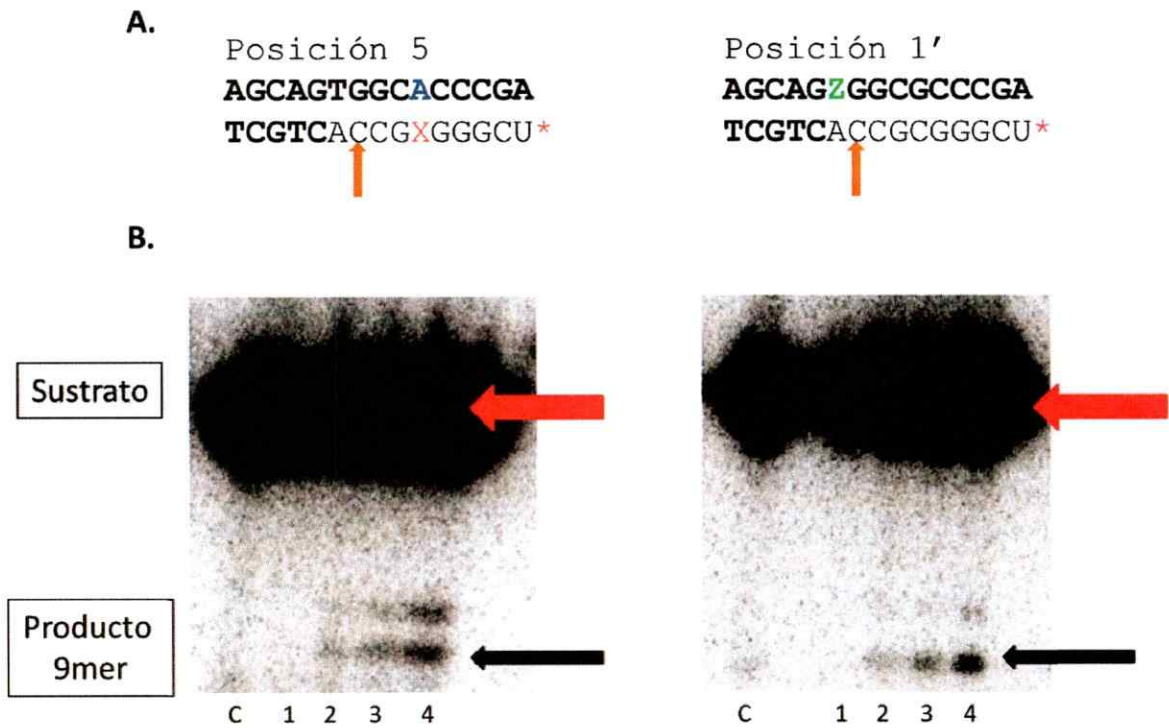
**Figura 11. Porcentaje de actividad RNasa H v/s la concentración del oligonucleótido competidor.** La mezcla de reacción contenía amortiguador Tris 50 mM, KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, sustrato 0,125  $\mu$ M, 6 pmol de RT y se llevó a cabo a 37 °C con un tiempo de incubación de 20 minutos. Se usaron 5 concentraciones distintas para cada uno de los oligonucleótidos competidores (0; 0,1; 0,12; 0,15; 0,3; 0,5 pmol).

### **7.3. Ensayo de actividad de remoción de partidor tRNA<sup>lys3</sup>.**

Se realizaron reacciones de entrecruzamiento entre 4 diferentes sustratos y la RT. Cada uno de estos sustratos tiene un nucleótido modificado que permite el acoplamiento con el entrecruzante DSG. Con el objetivo de determinar si la actividad de remoción del partidor de la RT se veía afectada por las modificaciones introducidas, se incubó la RT con los sustratos posición 1' y posición 5 (ver figura 12.A) previo marcaje del fosfato 5' de la hebra de RNA

En la figura 12.B, indicada por una flecha negra, se observa una banda de 9 nucleótidos que corresponde al producto de remoción del partidor. Para ambos sustratos., la cantidad de producto formado es dependiente del tiempo transcurrido. Por lo tanto, la modificación introducida en los sustratos utilizados en el entrecruzamiento no interfiere en el reconocimiento y actividad de la RT.





**Figura 12. Ensayo de remoción del partidor tRNA<sup>lys3</sup>.** **A.** Sustratos utilizados en cada reacción, en flecha naranja el lugar de corte de la RT HIV-1. **B.** La flecha negra corresponde al producto de la remoción del partidor y la flecha roja al sustrato completo de remoción del partidor. C: control sin enzima; 1-4 corresponden a diferentes tiempos de incubación; 1: 0 minutos; 2: 5 minutos; 3: 15 minutos; 4: 30 minutos.

## **7.4. Entrecruzamiento.**

### **7.4.1. Efecto del $Mg^{+2}$ en la reacción de entrecruzamiento.**

En general, la RNasa H ejerce su acción catalítica en presencia de  $Mg^{+2}$ , por lo que es necesario determinar su efecto en la reacción de entrecruzamiento. Se analizó el efecto de este catión divalente en la cantidad de producto entrecruzado entre p51-G-TCR y el sustrato posición 9 marcado en el extremo 5' del DNA, con 5mM de  $Mg^{+2}$  y en ausencia de este catión.

Se observa que en presencia de  $Mg^{+2}$  (gel de la izquierda, figura 13.A) se obtiene una banda de 110 kDa que corresponde a la masa de p51-G-TCR más el sustrato. En cambio, en ausencia de  $Mg^{+2}$  (gel de la derecha, figura 13.A), se observa un bajo porcentaje de producto entrecruzamiento. Además, del gráfico de la figura 13.B se concluye que el máximo de producto entrecruzado se alcanza a los 5 minutos.

### **7.4.2. Entrecruzamiento de la RT de HIV-1.**

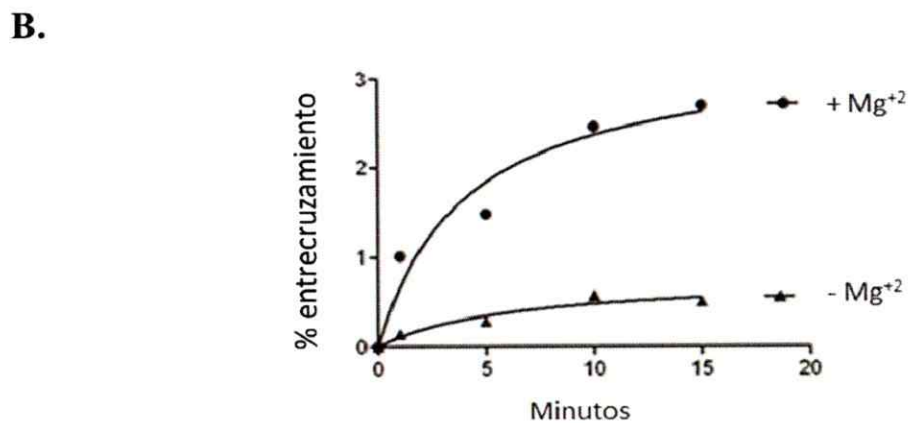
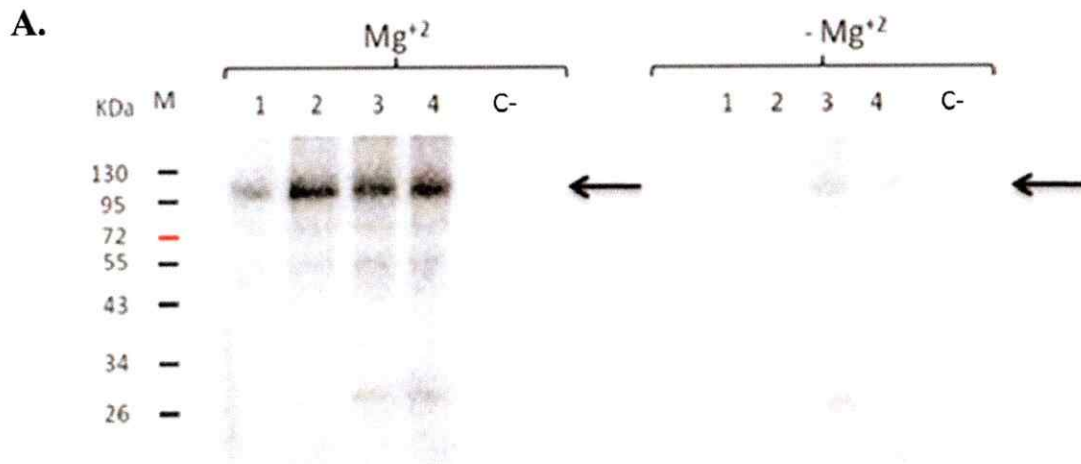
Se incubó la transcriptasa reversa de HIV-1 (figura 14, 15 y 16), al igual que p51-G-TCR (figura 17), con 4 sustratos modificados en diferentes posiciones individualmente. Las posiciones modificadas son: +5, +9, +1' y -3' (ver tabla 1). Para cada reacción se incubó el sustrato y la enzima en la misma proporción (1,5 pmol cada una), y los productos fueron separados por electroforesis y revelados por autoradiografía.

El entrecruzamiento con el sustrato posición 5 se realizó de dos formas: en una se marcó el extremo 5' de la hebra de DNA (ver figura 14.A.3) y en la otra el extremo 5' de

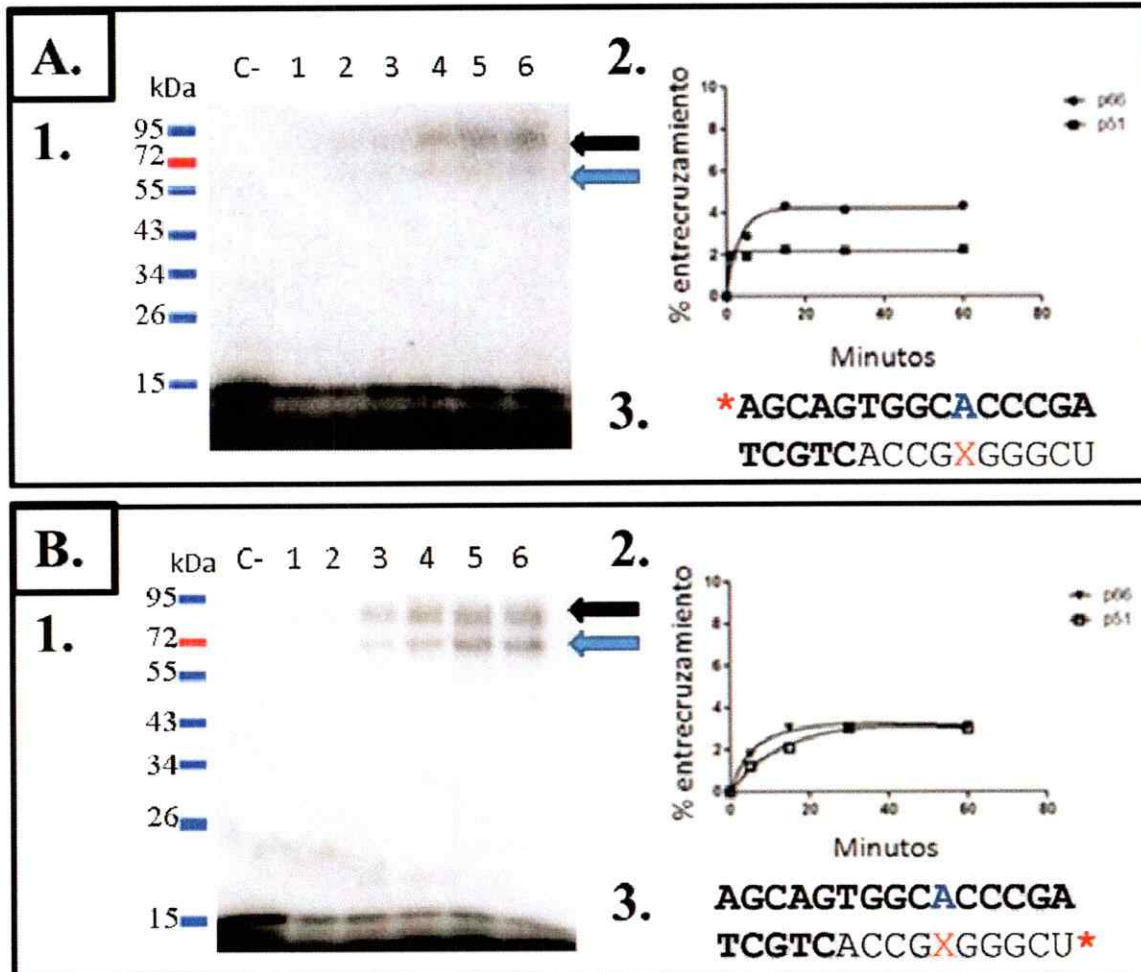
la hebra de RNA (ver figura 14.B.3). Para ambos protocolos de marcaje se obtienen dos bandas, correspondientes a la masa del sustrato unida a la subunidad p66, de 81 kDa (señalada por flecha negra en figura 14), o unida a p51 con 66 kDa de masa (señalada por flecha azul en figura 14). Para el ensayo con el sustrato marcado en el DNA, se obtuvo un 4,35 % de entrecruzamiento con la subunidad p66 y 2,26 % con p51 (carril 6, figura 14.A). La cantidad de producto entrecruzado para el ensayo con el sustrato marcado en el RNA fue de 3,16 % con la subunidad p66 y 2,99 % con p51 (carril 6, figura 14.B).

El resultado de los entrecruzamientos con el sustrato posición 9 se resume en la figura 15. Se observa entrecruzamiento con ambas subunidades, indicado por una flecha negra para el complejo entre el sustrato y p66, y una flecha azul para el complejo entre el sustrato y p51. En los dos ensayos, el producto con la subunidad p66 es predominante. En el ensayo marcado en el extremo 5' del DNA, se obtuvo un 54,99 % de producto entrecruzado unido a p66 y un 23,07 % a p51 (carril 6, figura 15.A). Para el ensayo con el sustrato marcado en el RNA se obtuvo 23,5 % de producto entrecruzado con p66 y 1,35 % con p51 (carril 6, figura 15.B).

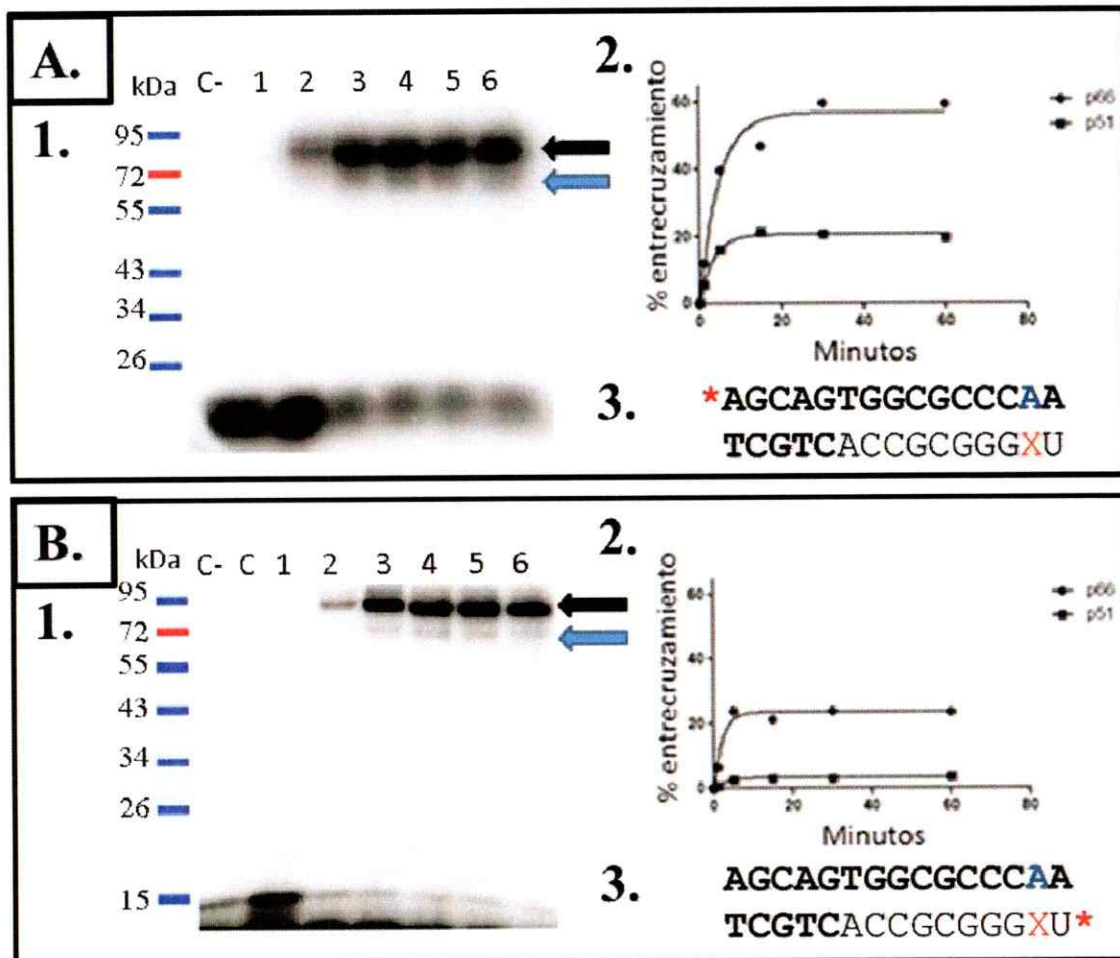
Para los sustratos posición 1' y -3' se marcó solo el extremo 5' de la hebra de DNA. Se observa en el carril 6 de la figura 16.A, que el entrecruzamiento con posición 1' ocurre con ambas subunidades de RT, mayormente con la subunidad p51 (21,93 %) que con la subunidad p66 (10,55 %). El sustrato posición -3' entrecruzó principalmente con la subunidad p66 (35,65 %, carril 6 figura 16.B).



**Figura 13. Efecto del  $Mg^{+2}$  en el entrecruzamiento.** **A.** La flecha negra corresponde al complejo del sustrato y p51-G-TCR. M: Marcador, C-: sin enzima; Carril 1: 1 minuto; Carril 2: 5 minutos; Carril 3: 10 minutos; Carril 4: 15 minutos. **B.** En el gráfico se comparó la cantidad de producto entrecruzado obtenido en función del tiempo, en los ensayos con 5mM de  $Mg^{+2}$  y sin  $Mg^{+2}$ .

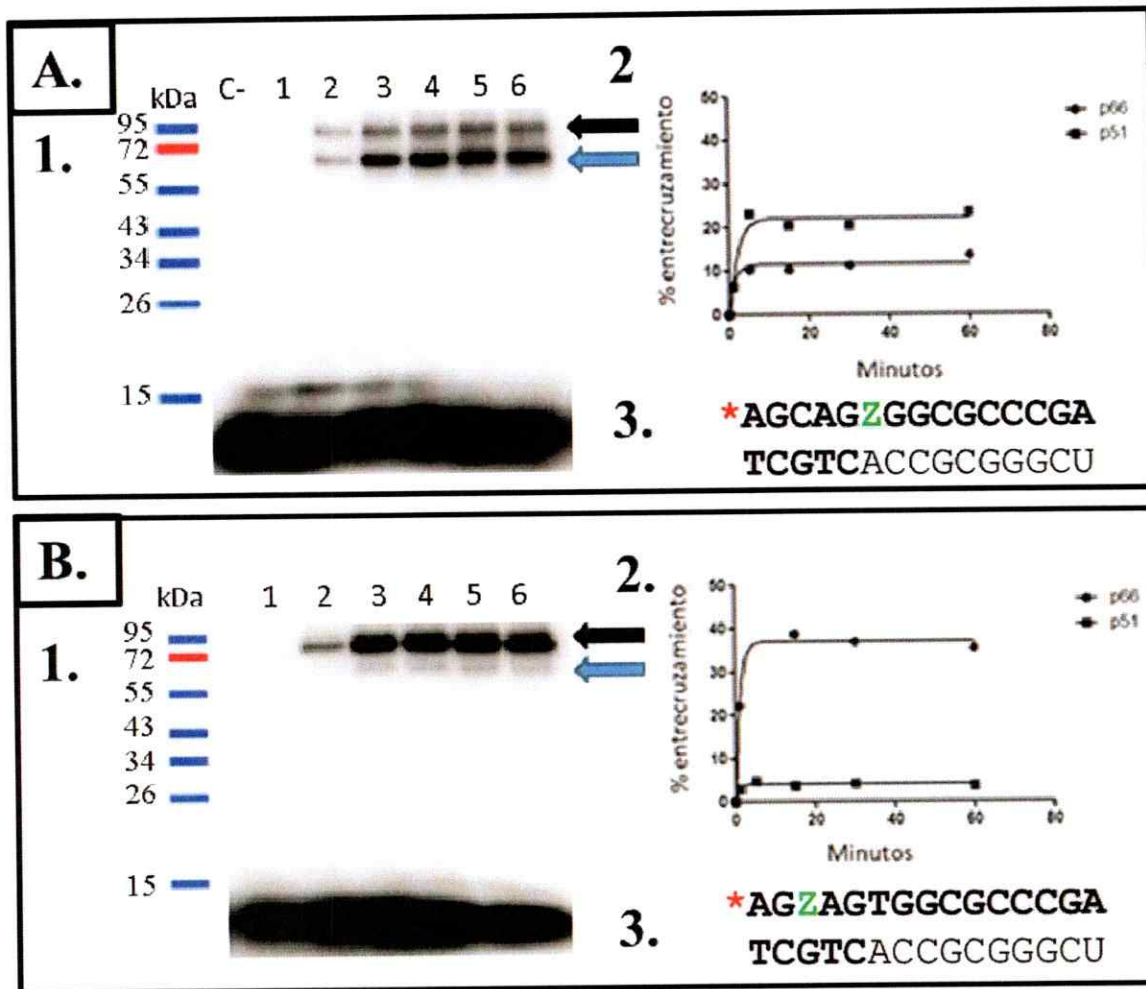


**Figura 14. Entrecruzamiento de la RT HIV-1 con sustrato posición 5.** **A.** Sustrato marcado en el extremo 5' DNA. **B.** Sustrato marcado en el extremo 5' de RNA. En ambos se muestra: **1.** Autoradiografía de geles SDS-Page al 10%. Flecha negra corresponde al complejo entre el sustrato y la subunidad p66, mientras que la flecha azul marca la banda que representa al complejo del sustrato más subunidad p51. C-: Control sin enzima; 1: 1 minuto; 2: 5 minutos; 3: 10 minutos; 4: 15 minutos; 5: 30 minutos; 6: 60 minutos. Geles expuestos con phosphoimager FX (BioRad). **2.** Gráfico porcentaje de entrecruzamiento v/s tiempo. **3.** Sustratos utilizados, X corresponde a 5-Aminoallyl-U; \* simboliza donde se encuentra la marca radiactiva de  $^{32}\text{P}$ .



**Figura 15. Entrecruzamiento de la RT HIV-1 con sustrato posición 9.** **A.** Sustrato marcado en el extremo 5' DNA. **B.** Sustrato marcado en el extremo 5' de RNA. En ambos se muestra: **1.** Autoradiografía de geles SDS-Page al 10 %. Flecha negra corresponde al complejo entre el sustrato y la subunidad p66, mientras que la flecha azul marca la banda que representa al complejo del sustrato más subunidad p51. C-: Control sin enzima; C: Sustrato sin DSG acoplado; 1: 1 minutos; 2: 5 minutos; 3: 10 minutos; 4: 15 minutos; 5: 30 minutos; 6: 60 minutos. Geles expuestos con phosphoimager FX (BioRad). **2.** Gráfico porcentaje de entrecruzamiento v/s tiempo. **3.** Sustratos utilizados, X corresponde a 5-Aminoallyl-U; \* simboliza donde se encuentra la marca radiactiva de p<sup>32</sup>.





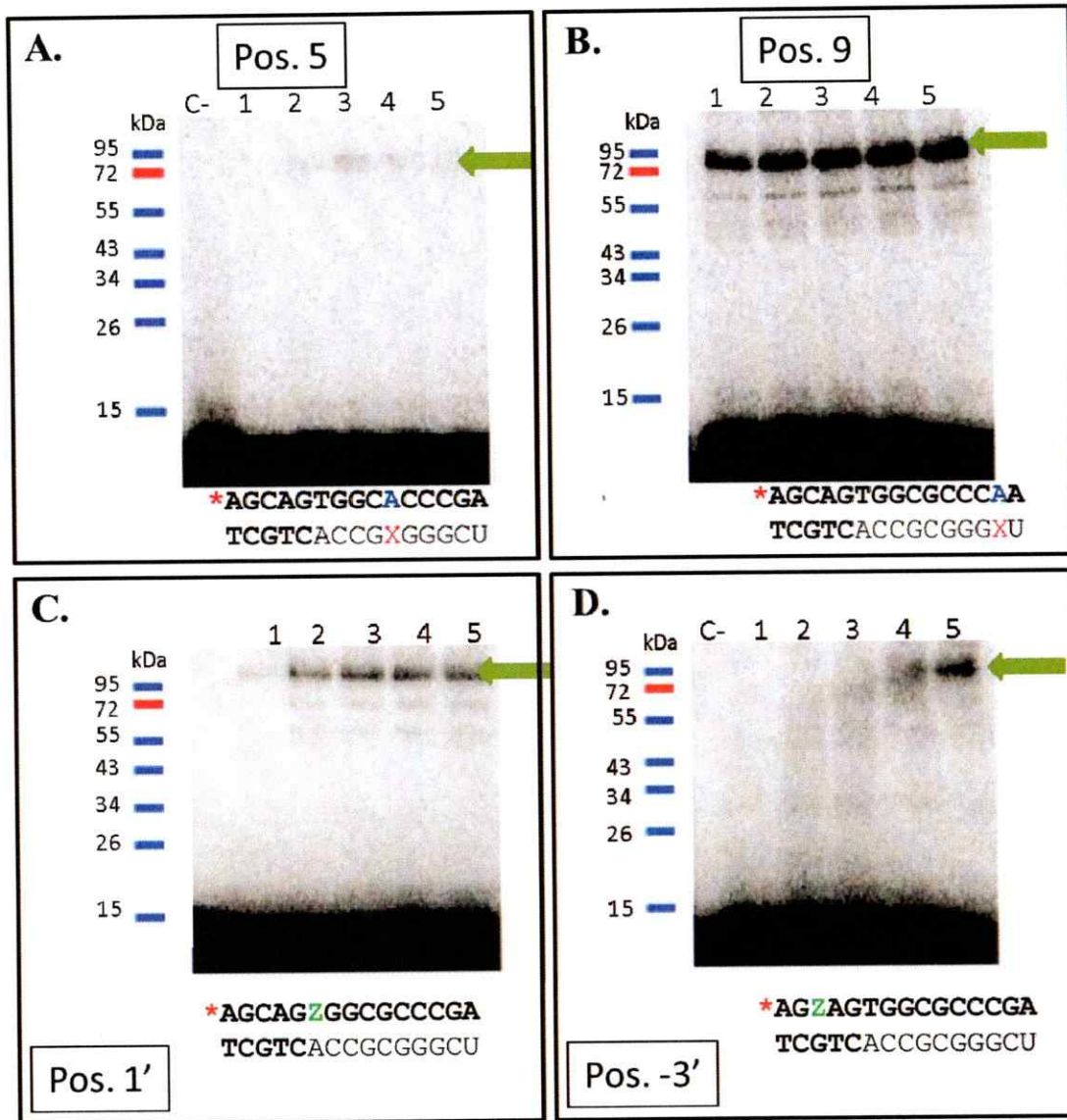
**Figura 16. Entrecruzamiento de RT HIV-1 con los sustratos posición 1' y -3'.** A. Entrecruzamiento sustrato posición 1'. B. Entrecruzamiento sustrato Posición -3'. 1. Autoradiografía de SDS-Page de acrilamida 10 %. Flecha negra corresponde al complejo del sustrato y p66 de RT, flecha azul es el complejo de sustrato más la subunidad p51. 2. Gráfico porcentaje de entrecruzamiento v/s tiempo. 3. Sustratos usados, \* corresponde a la marca con P<sup>32</sup> y Z el nucleótido modificado, 5-Aminoallyl-dU. C-: Control sin enzima; 1: 1 minuto; 2: 5 minutos; 3: 10 minutos; 4: 15 minutos; 5: 30 minutos; 6: 60 minutos. Geles expuestos con *phosphoimager* FX (BioRad).

### **7.4.3. Entrecruzamiento de la construcción p51-G-TCR.**

Se realizó el entrecruzamiento utilizando los 4 sustratos marcados en el extremo 5' de la hebra de DNA como se describió en métodos. Se observa en la figura 17, señalado por una flecha verde, una banda de 110 kDa correspondiente al complejo de la construcción más el sustrato. La cantidad de producto de entrecruzamiento obtenido con el sustrato posición 9 fue de 5,7 % (carril 5, figura 17.B), superando ensayos anteriores donde el producto no alcanzaba el 4 %.

El entrecruzamiento con el sustrato posición 9 fue el que obtuvo la mayor cantidad de producto para las dos proteínas, como también el sustrato posición 5 fue el que obtuvo la menor cantidad de producto entrecruzado. En todos los ensayos la cinética de entrecruzamiento es similar: la formación de producto entrecruzado alcanza su máximo a los 15 minutos, posteriormente se mantiene constante.





**Figura 17. Entrecruzamiento de p51-G-TCR con los sustratos posición 5, 9, 1' y -3'.**  
 A. Autoradiografía de geles de acrilamida 10 %. Flecha negra corresponde al complejo de sustrato más la construcción p51-G-TCR. C-: Control sin enzima; 1: 1 minuto; 2: 5 minutos; 3: 15 minutos; 4: 30 minutos; 5: 60 minutos. Geles expuestos con phosphoimager FX (BioRad). **X** corresponde a 5-Aminoallyl-U; **Z** el nucleótido modificado, 5-Aminoallyl- dU; \* simboliza donde se encuentra la marca radiactiva de  $p^{32}$ .

**Tabla 4. Resumen de porcentajes de entrecruzamiento obtenidos.**

Sustrato modificado	Transcriptasa Reversa HIV-1		Construcción
	Subunidad p66 (%)	Subunidad p51 (%)	p51-G-TCR (%)
Posición 9	23,5	1,35	ENR
Posición 5	3,16	2,99	ENR
Posición 9 *	54,99	20,07	5,7
Posición 5 *	4,35	2,26	0,94
Posición 1'	10,55	21,93	1,64
Posición -3'	35,65	--	1,94

(\*) Corresponde a los sustratos marcados radiactivamente en el extremo 5" DNA.  
ENR: Ensayo no realizado

## 8. Discusión.

En este trabajo se propuso utilizar entrecruzamiento químico para identificar las zonas de interacción de la RT de HIV-1 con el sustrato de remoción del partidor tRNA<sup>lys3</sup>. Para esto se probó el uso de entrecruzamiento dirigido a lisinas de la RT y de la construcción p51-G-TCR con el sustrato de remoción del partidor modificado con DSG en distintas posiciones. Los resultados obtenidos fueron analizados en función de la estructura del complejo de RT con el híbrido PPT/RNA con el objeto de determinar la probabilidad de que residuos de lisinas estuvieran disponibles cerca de los sitios en que se encontraría el DSG.

Para realizar los ensayos de entrecruzamiento, se utilizó un híbrido RNA/DNA con un nucleótido modificado, que no corresponde al sustrato fisiológico de la RT. Es por esto que para demostrar si la modificación afecta el reconocimiento por parte de la RT y su actividad de remoción, se realizó un ensayo de actividad de corte específico. El ensayo demostró que la RT es capaz de remover el partidor tRNA<sup>lys3</sup>, pese al nucleótido modificado. Por otra parte, el sustrato de remoción del partidor es capaz de desplazar al sustrato fluorescente (híbrido inespecífico), por lo tanto se une a la RNasa H en la RT. La razón de esto posiblemente se deba a que la secuencia del sustrato es un factor importante en el reconocimiento del sustrato, favoreciendo al intermediario de remoción del tRNA<sup>lys3</sup> (Smith, Leon et al. 1998). Además, el sustrato de remoción del partidor es más eficiente en desplazar al sustrato fluorescente en comparación a un DNA de doble hebra. Esto puede deberse a que la RT estabiliza al sustrato en una estructura intermedia entre forma-A y forma-B, descrito en híbridos RNA/DNA (Yu et al. 1996). En síntesis,

la modificación introducida en el nucleótido del sustrato para remoción del partidador no afecta al reconocimiento y la unión del sustrato a la RT.

En los entrecruzamientos se utilizó DSG, porque es probable encontrar residuos de lisina cercanos ya que son comunes en zonas cargadas positivamente, lo que permite la interacción con sustratos cargados negativos (Lim, Gregorio et al. 2006). Además, utilizando el programa *Swiss PDB viewer* en el complejo RT-PPT/DNA (PDB ID: 1HYS, Sarafianos, Kalyan et al. 2001), se midió la distancia de los residuos de lisinas más cercanos al nucleótido en la posición homóloga de aquel modificado en el sustrato, considerando aquellos que se encontraban a menos de 13 Å. La distancia fue medida desde el nitrógeno del grupo amino de la cadena lateral del residuo al carbono 5 de la base nitrogenada. El análisis se basa en la suposición de que el complejo RT-tRNA/DNA se uniría de manera similar a como lo hace el complejo RT-PPT/DNA (1HYS), por lo que las posiciones de los nucleótidos son homologables, en función del corte realizado por la RNasa H.

En la mayoría de los ensayos se obtuvo mayor porcentaje de entrecruzamiento con la subunidad p66 que con la subunidad p51. Esto puede deberse a que los complejos muestran una mayor interacción de la subunidad p66 con el sustrato (Sarafianos, Kalyan et al. 2001). Con el sustrato modificado en la posición 9 se obtuvo el mayor porcentaje de entrecruzamiento (54,99 % con la subunidad p66), posiblemente debido a su cercanía con la región denominada *primer grip* que está compuesto, en parte, por LYS390 y LYS476 (Delviks-Frankenberry, Nikolenko ,et al. 2007). El análisis computacional detallado en la figura 18.B nos mostró que existen 3 lisinas cercanas al

nucleótido posición 9: LYS281 y LYS287 de la subunidad p66, y LYS395 de p51, las cuales han sido descritas en la literatura. LYS281 interactúa con el templado de RNA (Jaeger, Restle, et al. 1998), y LYS395 estabiliza la hebra de DNA del híbrido RNA/DNA, siendo ambos candidatos a ser los residuos entrecruzados con dicho nucleótido (Temiz et al, 2002).

Los resultados del entrecruzamiento del nucleótido en posición 5 son congruentes con el análisis realizado a la estructura cristalina. Existen dos lisinas que se encuentran a una distancia de aproximadamente 13 Å, lo que podría explicar que es el sustrato que obtiene el menor porcentaje de producto entrecruzado (un 3 % de promedio).

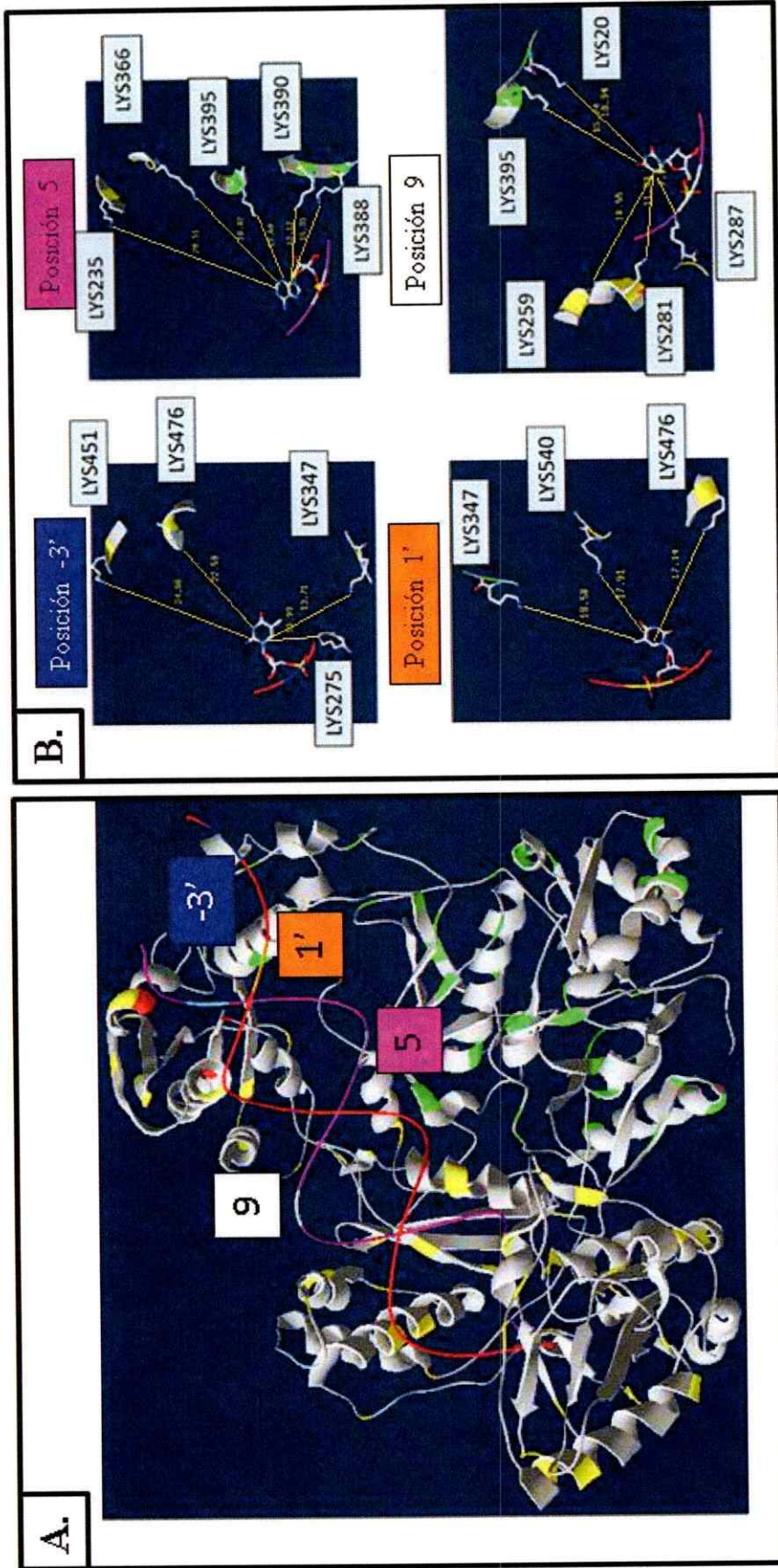
El sustrato posición 1' es el único que entrecruzó solo con la subunidad p51 (35,65 %). Esto se puede explicar porque el nucleótido de la hebra de DNA que está acoplado al entrecruzante se encuentra opuesto al sitio activo de RNasa H, que está más cerca espacialmente a la subunidad p51 (ver figura 18.A, recuadro azul). En la figura 18.B, LYS476 de la subunidad p66 es la más cercana, pero en el complejo cristalizado no está lo suficientemente cerca para entrecruzar. Así mismo, en el complejo dicha lisina se encuentra en la subunidad contraria a lo que entrecruza con el sustrato posición 1'.

También se observa una incongruencia entre el entrecruzamiento y el análisis computacional cuando se utiliza el sustrato modificado en la posición -3'. El sustrato posición -3' solo entrecruzó con la subunidad p66, sin embargo se observa en la figura 18.B que las lisinas más cercanas, LYS275 y LYS347, se encuentran a 14 Å. Entonces, no existirían residuos disponibles para entrecruzar en esta posición del sustrato intermediario de la remoción del tRNA<sup>lys3</sup> según el complejo de la RT unido a

PPT/DNA. Una razón para esta discordancia podría deberse a la naturaleza del sustrato, ya que la estructura descrita por Sarafianos y colaboradores está unida a un sustrato que emula a PPT/DNA, mientras que el sustrato de entrecruzamiento emula al tRNA<sup>lys3</sup>/DNA.

Estos estudios requieren de la digestión y secuenciación de los péptidos entrecruzados para identificar las lisinas entrecruzadas (Steen, Petersen et al. 2001). De esta forma podremos determinar qué lisina se encuentra cercana a cada nucleótido modificado y establecer los puntos de referencia necesarios para caracterizar la unión de la RT con el intermediario de la remoción del partidor tRNA<sup>lys3</sup>. Sólo así se podría proponer que la unión de la enzima con el híbrido tRNA<sup>lys3</sup>/DNA sería distinta a la descrita en la estructura cristalizada por Sarafianos y colaboradores en 2001.





**Figura 18. Análisis computacional de la estructura de la RT de HIV-1 con un sustrato PPT/DNA.** A. Diagrama de cinta de la estructura de RT de HIV-1 de resolución 3,0 Å con un sustrato RNA(PPT)/DNA. PDB: 1HYS (Sarafianos, kalyan y cols. 2001). La hebra RNA en color magenta y la hebra de DNA en rojo. Lisinas de la subunidad p66 en amarillo, y en verde claro las de p51. Los aminoácidos del sitio activo de RNasa H se encuentran en rojo y el sitio de corte en celeste. Los nucleótidos modificados se representan por: posición -3' en azul, posición 1' en naranja, posición 5 en rosa y posición 9 en blanco. B. Disposición espacial de los residuos de lisina más cercanos a cada nucleótido. En líneas punteadas las distancias de cada residuo al nucleótido modificado.

**Tabla 5. Residuos más cercanos al nucleótido entrecruzante.**

Posición nucleótido	Nº lisina (Subunidad)	Distancia (Å)
-3'	275 (p51)	13,71
	347 (p51)	13,99
1'	476 (p66)	17,14
5	390 (p51)	12,12
	395 (p51)	13,6
9	281 (p66)	11,93
	287 (p66)	7,14
	395 (p51)	15,74



## 9. Conclusiones

Los sustratos híbridos diseñados para el entrecruzamiento entregan información de la unión específica con la RT. La subunidad p51 de RT también coopera con las interacciones moleculares que estabilizan al sustrato en la hidrólisis de RNA. Los resultados de entrecruzamientos convierten a p51-G-TCR en un buen modelo para el estudio del reconocimiento de RNA/DNA independiente del dominio de la polimerasa. La unión de la RT con el sustrato tRNA<sup>lys3</sup>/DNA tiene una orientación contraria al sustrato PPT/DNA.

## 10. Bibliografía.

- Abbondanzieri EA., Bokinsky G., et al. (2008). "Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase." Nature **453**(7192): 184-189.
- Bebenek K., Beard WA, et al. (1997). "A minor groove binding track in reverse transcriptase." Nat Struct Biol. **3**: 194-197.
- Becerra SP., Clore GM., et al. (1990). "Purification and characterization of the RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase expressed in recombinant *Escherichia coli*." FEBS J **270**: 76-80.
- Coffin, JM., Hughes SH., et al. (1997). "Historical introduction of the general properties of retroviruses". Retroviruses. EE.UU: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Coffin, JM., Hughes SH., et al. (1997). "Reverse transcriptase and the generation of retroviral DNA". Retroviruses. EE.UU: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dash C., Yi-Brunozzi HY, et al. (2004). "Two modes of HIV-1 polypurine tract cleavage are affected by introducing locked nucleic acid analogs into the (-) DNA template." J Biol Chem **279**(35): 37095-37102.
- David M. Knipe, P., et al. (2007). "Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication" Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins
- Delviks-Frankenberry KA., Nikolenko GN., et al. (2007). "Mutations in human immunodeficiency virus type 1 RNase H primer grip enhance 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance."
- Elsasser B. and Fels G. (2010). "Atomistic details of the associative phosphodiester cleavage in human ribonuclease H." Phys Chem Chem Phys **12**(36): 11081-11088.
- Farias, RV., Vargas D., et al. (2011). "Expression of an Mg<sup>2+</sup>-dependent HIV-1 RNase H construct 1 for drug screening." Antimicrob Agents Chemother **10**: 4735-4741.
- Furfine ES. and Reardon JE. (1991). "Human immunodeficiency virus reverse transcriptase ribonuclease H: specificity of tRNA(Lys3)-primer excision." Biochem. **29**:7041-7416.
- Furfine ES. and Reardon JE. (1991). "Reverse Transcriptase: RNase H from the Human Immunodeficiency Virus." J Biol Chem. **266**: 406-412.

- Guaitiao JP., Zuniga RA, et al. (2004). "Lysine directed cross-linking of viral DNA-RNA:DNA hybrid substrate to the isolated RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase." Biochem. **43**(5): 1302-1308.
- Joyce CM. and Steitz TA. (1994). "Function and structure relationship in DNA Polymerase." Annu Rev Biochem. **63**: 777-822.
- Huang H., Chopra R., et al. (1998). "Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance." Science **282**: 1669-1675.
- Ho MH., De Vivo M., et al. (2010). "Understanding the effect of magnesium ion concentration on the catalytic activity of ribonuclease H through computation: does a third metal binding site modulate endonuclease catalysis?." J Am Chem Soc **132**(39): 13702-13712.
- Jacobo-Molina A., Ding J., et al. (1993). "Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA." Proc. Natl. **90**: 6320-6324.
- Jaeger J., Restle T., et al. (1998). "The structure of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an RNA pseudoknot inhibitor." The EMBO J. **17**: 4535-4542.
- Jiang, M., Mak J., et al. (1993). "Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1." J Virol **67**: 3246-3253.
- Julias JG., McWilliams MJ., et al. (2003). "Mutation of Amino Acids in the Connection Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase That Contact the Template-Primer Affects RNase H Activity." J Virol **77**(15): 8548-8554.
- Kuiken C. et al. (2008). HIV Sequence Compendium 2008. New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics **5**: 301.
- Klumpp K., Hang JQ., et al. (2003). "Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors." NAR **23**: 6852-6859.
- Latham GJ., Forgacs E., et al. (2000). "Vertical-scanning mutagenesis of a critical tryptophan in the "minor groove binding track" of HIV-1 reverse transcriptase. Major groove DNA adducts identify specific protein interactions in the minor groove." J Biol Chem **275**(20): 15025-15033.

Lim D., Gregorio G., et al. (2006). "Crystal structure of the moloney murine leukemia virus RNase H domain." J Virol **80**(17): 8379-8389.

Liu S., Abbondanzieri EA., et al. (2008). "Slide into action: dynamic shuttling of HIV reverse transcriptase on nucleic acid substrates." Science **322**(5904): 1092-1097.

Muchiri J M., Rigby ST., et al. (2011). "HIV-1 reverse transcriptase dissociates during strand transfer." J Mol Biol **412**(3): 354-364.

Münk C., Landau N., et al (2003). "Production and Use of HIV-1 Luciferase Reporter Viruses." Current Protocols in Pharmacology. Ontario: John Wiley & Sons Canada **12**:Unit12.5. S. J. Enna, Ed.

Nowotny M., Gaidamakov SA., et al. (2005). "Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis." Cell: **121**(7): 1005-1016.

Oh, J., McWilliams MJ., et al. (2008). "Mutations in the U5 region adjacent to the primer binding site affect tRNA cleavage by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in vivo." J Virol **82**(2): 719-727.

Onafuwa-Nugam A., Telesnitsky A. et al. (2009). "The remarkable frequency of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genetic recombination." MMBR **73**: 451-480.

Temiz NA., et al (2002). "Inhibitor binding alters the directions of domain motions in HIV-1 reverse transcriptase." Proteins **1**: 61-70.

Sarafianos SG., Kalyan D., et al. (2001). "Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA-DNA." EMBO **6**: 1449-1461.

Sarafianos SG., Marchand B., et al. (2009). "Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase." J. Mol. Biol **285**: 693-713.

Schatz O., Cromme FV., et al. (1989). "Point mutations in conserved amino acid residues within the C-terminal domain of HIV-1 reverse transcriptase specifically repress RNase H function." FEBS letters **257**: 311-314.

Schultz SJ. and Champoux JJ. (2008). "RNase H activity: Structure, specificity, and function in reverse transcription." Virus research **134**: 86-103.

Sharp PM. and Hahn BH. (2011). "Origins of HIV and the AIDS Pandemic." Cold Spring Harb Perspect Med **1**(1): 1-22.

Smith CM., Leon O., et al. (1998). "Sequence requirements for removal of tRNA by an isolated human immunodeficiency virus type 1 RNase H domain." J Virol **72**: 6805-6812.

Smith JS., Gritsman K., et al. (1994). "Contributions of DNA Polymerase Subdomains to the RNase H Activity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase." J Virol **68**: 5721-5729.

Smith JS. and Roth MJ. (1993). "Purification and characterization of an active human immunodeficiency virus type 1 RNase H domain." J Virol **67**: 4037-4049.

Stammers DK., Tisdale M., et al. (1991). "Rapid purification and characterisation of HIV-1 reverse transcriptase and RNaseH engineered to incorporate a C-terminal tripeptide  $\alpha$ -tubulin epitope." FEBS J **283**: 298-302.

Steen H., Petersen J., et al. (2001). "Mass spectrometric analysis of a UV-cross-linked protein-DNA complex: Tryptophans 54 and 88 of E. coli SSB cross-link to DNA." Protein Science **10**: 1989-2001.

Studier FW, et al (2005). "Protein production by auto-induction in high density shaking cultures." Protein Expr Purif. **41** (1):207-34.

Szyperski T., Götte M., et al. (1999). "NMR structure of the chimeric hybrid duplex r(gcaguggc).r(gcca)d(CTGC) comprising the tRNA-DNA junction formed during initiation of HIV-1 reverse transcription." J. Biomol. NMR **4**: 343-355.

Weiss RA. (1993). "How Does HIV Cause AIDS?" Science **260**: 1273-1279.

Yu FO., et al. (1996). "Structural variation among retroviral primer-DNA junctions: solution structure of the HIV-1 (-)-strand Okazaki fragment r(gcca)d(CTGC).d(GCAGTGCC)." Biochem. **34**: 11070-11080.