



“Mutagénesis Dirigida de la Integrasa del Virus Moloney MLV”

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

ANDREA CAROLINA GARCÍA LIZAMA

Dr. Oscar León Decap
Director Seminario de Título

Oscar León Decap

Comisión Revisora

Dr. Miguel Allende Connelly
Presidente

Miguel Allende

Dra. Claudia Stange
Corrector

Claudia Stange



Santiago, 11 de agosto de 2006

UcH - Fc
Biotecnología
G 216 m
C. L

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA INTEGRASA DEL VIRUS MOLONEY MLV”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Andrea Carolina García Lizama



**Santiago de Chile
Agosto, 2006**



Pensar que costó tantas piedras que lleva el río...
(Amor, cuántos caminos. Pablo Neruda)

Entré a la Universidad el año 98, recién salida del colegio y con la idea de que estudiando esta carrera podría encontrar una mezcla perfecta entre matemáticas, química y biología. Y no solo fue así, en esta facultad encontré además amigos, sueños, ilusiones... y aunque ha pasado algún tiempo desde que egresamos y es probable que mi futuro no se encuentre entre pipetas y mesones, siempre recordaré esta época y espero encontrar la manera de relacionar lo vivido con mi nuevo camino.

AGRADECIMIENTOS

A mi grupo de laboratorio (Jorge, Roberto, Beatriz, Humberto), por la compañía, apoyo y complicidad en momentos complejos y por la alegría necesaria para enfrentar cada día. A mi profesor guía, Dr. Óscar León, por estos años de paciencia y dedicación.

A mis amigas de colegio, Claudia, Carla, Daniela, Carla, Cata y especialmente Rossana. Por aprenderse el nombre de la carrera y seguir siendo parte importante de mi vida después de tantos años.

A mis amigos de la U, Daniela, Rodrigo, Cristián, Viviana, Eduardo, Loreto, Marcos, Carlos, Andrés, Diego y Rafael, porque sin su apoyo y compañía nada habría sido igual. Por todas aquellas horas compartidas estudiando, en clases o simplemente carretiando.

A mi familia, papá, mamá, Natalia, Javiera, abuelitos, tíos, primos y sobrinos (prestados y propios). Por el cariño, entusiasmo y compañía de todos estos años.

A todos Ustedes... muchas gracias.





A mis padres... gracias.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
INDICE.....	III
INDICE DE FIGURAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Estructura y ciclo replicativo de los retrovirus.....	2
2.- Estructura y función de las integrasas.....	6
3.- Rol del dominio N-terminal.....	10
4.- Interacción IN-ADN.....	11
5.- Hipótesis.....	14
6.- Objetivos.....	14
II. MATERIALES.....	15
1.- Oligonucleótidos sintéticos de ADN.....	15
2.- Reactivos.....	15
3.- Plásmidos.....	16
III. MÉTODOS.....	18
1.- Construcción de mutante IN H208A 106-404	18



1.1.- Diseño de partidores mutagénicos.....	18
1.2.- Aislamiento de templado desde vector pETINH1.	19
1.3.- Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	19
purificación desde gel.	
1.4.- Amplificación de IN de M-MuLV por PCR	19
para obtener los fragmentos mutagénicos I y II.	
1.5.- Amplificación de fragmentos I y II por PCR	20
para obtener el fragmento mutagénico total.	
1.6.- Ligación al plásmido p-GEM-T.....	20
1.7.- Preparación de células competentes.....	20
1.8.- Transformación de células DH5α.....	21
1.9.- Minipreparación de ADN plasmidial.....	22
y selección de clones positivos.	
1.10.- Precipitación y concentración de ADN.....	23
1.11.- Secuenciación.....	23
1.12.- Maxipreparación de ADN plasmidial.....	24
1.13.- Digestión del plásmido pGEM-T IN 106/404 H208A ...	25
y del vector pET21a con <i>Bam</i> HI y <i>Nde</i> I.	
1.14.- Ligación.....	26
1.15.- Transformación de células DH5α.....	26
y selección de clones positivos para IN 106-404 H208A	

de M-MuLV.	
1.16.- Transformación <i>E. coli</i> BL21.....	27
2.- Purificación de IN de M-MuLV expresada en bacterias.....	27
2.1.- Western Blot.....	28
3.- Ensayos de actividad.....	30
3.1.- Marcaje y purificación de sustratos.....	30
3.2.- Medición de la actividad de IN <i>in vitro</i>	31
4.- Estudios de fotoentrecruzamiento de IN.....	32
con sustratos de desintegración "dumbbell" modificados	
con 5-IdU y marcados con γ -(³² P).	
4.1.- Digestión de Productos de fotoentrecruzamiento.....	32
con nucleasa S1	
IV. RESULTADOS.....	33
1.- Construcción de la mutante IN H208A 106-404 ,.....	33
2.- Subclonamiento y expresión de la mutante IN H208 106-404...	37
3.- Purificación de integrasas.....	41
4.- Actividad de H208A 106-404 IN.....	44
4.1.- Actividad de integración: transferencia de hebra.....	44
4.2.- Actividad de desintegración.....	46
5.- Estudios de fotoentrecruzamiento.....	49
V. DISCUSIÓN.....	53



VI. CONCLUSIÓN.....	59
VII BIBLIOGRAFÍA.....	60



ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1:</u> Esquema del genoma de M-MuLV.....	3
<u>Figura 2:</u> Etapas de integración.....	5
<u>Figura 3:</u> Reacciones catalizadas por la integrasa <i>in Vitro</i>	7
<u>Figura 4:</u> Esquema de sustratos de desintegración.....	7
<u>Figura 5:</u> Esquema de IN HIV-1 y M-MuLV.....	9
<u>Figura 6:</u> Esquema de mutantes por delección de IN de M-MuLV....	11
<u>Figura 7:</u> Esquema de reacciones de PCR.....	18
<u>Figura 8:</u> A) Electroforesis de fragmentos mutagénicos IN H208A... 106-404 I y II.	35
B) Electroforesis de amplificado final.....	35
<u>Figura 9:</u> Análisis de restricción de clones.....	37
p-GEMT/ IN H208A 106-404.	
<u>Figura 10:</u> Liberación de inserto IN H208A 106-404	38
desde el plásmido pGEM-T.	
<u>Figura 11:</u> A) Análisis de restricción clones.....	40
pET/ IN H208A 106-404.	
B) Análisis de restricción de clones 2 y 4.....	40
con la enzima <i>NdeI</i> .	
<u>Figura 12:</u> Perfil de proteínas totales de cultivos de IN H208A.....	41
106-404.	

<u>Figura 13:</u> Perfil electroforético de las integrasas purificadas.....	42
<u>Figura 14:</u> Western blot integrasas.....	43
<u>Figura 15:</u> Actividad de transferencia de hebra de mutante.....	45
IN H208A 106-404.	
<u>Figura 16:</u> Actividad de desintegración de mutante.....	47
IN H208A 106-404.	
<u>Figura 17:</u> Actividad de desintegración de mutante.....	48
IN H208A 106-404.	
<u>Figura 18:</u> Fotoentrecruzamiento de mutante IN H208A 106-404	50
con sustratos de desintegración sustituidos con 5-IdU.	
<u>Figura 19:</u> Complejos fotoentrecruzados digeridos con nucleasa S1..	52
<u>Figura 20:</u> Estabilización del complejo IN-ADN viral en VIH-1.....	54
<u>Figura 21:</u> Modelo estructural teórico de la región central de la IN...	56
de M-MuLV.	
<u>Figura 22:</u> Modelo de estabilización del complejo IN-ADN viral.....	58
para M-MuLV	

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido deoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BAF	Factor de barrera para la autointegración
BCIP	5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato-p-toluidina
BSA	Albúmina de suero de bovino
col.	Colaboradores
CHAPS	3-3-(cholamidopropil) dimetilamonio- 1-propanosulfonato
D. O.	Densidad Óptica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAsa I	Deoxirribonucleasa I
dNTP	Deoxi-nucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HMGA	Proteínas de alta movilidad
IN	Integrasa
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactósido
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria Bertani

LTR	Secuencias repetidas terminales
M	Molar
MES	2-(n.morfolino) ácido etanosulfónico
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Militros
M-MuLV	Virus de la leucemia murina
NBT	Cloruro de nitroazul de tetrazolio
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
NTA-Ni ²⁺	Ni ²⁺ -nitriloacetato-agarosa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Complejo de preintegración
Pipes	Piperazin-n,n`- bis ácido 2- etanosulfonico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorido
PSA	Persulfato de amonio
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio

seg	Segundos
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etileno-diamina
μL	Microlitro
μm	Micrometro
Vol.	Volumen

RESUMEN

Las integrasas (IN) retrovirales catalizan la integración del ADN viral en el genoma del hospedero. Actualmente no se dispone de información cristalográfica en la IN del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV), por lo que se desconoce como se asocian sus tres dominios estructurales y cómo interaccionan con el ADN viral. Previamente, en nuestro laboratorio, hemos realizado estudios de entrecruzamiento químico y fotoentrecruzamiento, utilizando sustratos sintéticos que imitan al intermediario de integración. Estos estudios han revelado que existiría una interacción entre la región 5' (cola) de este sustrato y una región central, flexible, que posee los aminoácidos LHCAY. De acuerdo a la especificidad del agente entrecruzante utilizado, (5-iodouridina), el residuo de histidina 208 sería un blanco en la reacción. Con el propósito de probar esta hipótesis se diseñó la construcción de la mutante IN H208A 106-404, enzima que además de carecer del dominio N-terminal, presenta una sustitución de histidina por alanina en la posición 208. Para esto se amplificó el gen de integrasa con partidores mutagénicos, se clonó en el vector pET21a, se expresó en células BL21 (DE3) y se purificó por cromatografía. La mutante IN H208A 106-404 no presentó actividad de desintegración ni transferencia de hebra. Al complementar IN 106-404 con el dominio N-terminal normalmente se recupera la actividad de procesamiento y aumenta la actividad de transferencia de hebra, sin embargo, la mutante IN H208A 106-404 no mostró actividad en esas condiciones. Por otra parte, la mutante IN H208A 106-404 no reacciona con el sustrato en la reacción de entrecruzamiento. Estos resultados sugieren que la histidina 208 participa en la unión al extremo 5' del sustrato de desintegración, confirmándose nuestra hipótesis.

ABSTRACT

Retrovirals integrases catalyze the integration of viral DNA in the guest genome. Nowadays there is no information available about the crystal structure in the IN M-MuLV, thus it is not known how the three structural domains interact between them and with the viral DNA. Previously, in our laboratory, we have performed chemical cross linking studies as well as photo cross linking, by using synthetic substrates that imitate the integration intermediary. These studies revealed that it may exist an interaction between the 5' region (tail) of the substrate with a central, flexible region, which holds the LHCAY amino acids. According to the specificity of the cross linking agent used, (5-IdU), the 208 histidine residue would be a target in the reaction. In order to prove this hypothesis, we have designed the construction of the mutant IN H208A 106-404. For this purpose, the IN gene was amplified with mutagenic primers, then it was cloned in the pET21a vector, it was expressed in BL21 (DE3) cells and finally was purified through chromatography. The mutant IN H208A 106-404 did not present disintegration or strand transfer activity. When complementing IN 106-404 with N-terminal domain, the processing activity usually recovers the strand transfer activity increases, nevertheless, the mutant IN H208A 106-404 did not show any activity in these conditions. On the other hand, the mutant IN H208A 106-404 did not reacted with the substrate in the reaction of cross linking. These results suggest that the 208 histidine is involved in the 5' union of the disintegration substrate, confirming our hypothesis.

I. INTRODUCCIÓN

La familia de los retrovirus comprende las subfamilias: oncovirinae, lentivirinae y spumavirinae. Los virus de la subfamilia oncovirinae presentan potencial oncogénico como el virus M-MuLV. La subfamilia lentivirinae deriva su nombre del curso prolongado de la infección que ellos ocasionan; tal es el caso del virus de inmunodeficiencia humano (VIH). La subfamilia spumavirinae deriva su nombre de la característica degeneración espumosa que estos virus producen en las células en cultivo y han sido aislados principalmente como contaminantes de cultivos celulares.

Una de las características de los retrovirus es que durante el ciclo replicativo su genoma constituido por ARN (+), es transcrito a ADN de doble hebra. Posteriormente ingresa al núcleo de la célula hospedera y es insertado en el ADN cromosomal. En esta forma (provirus) se produce la activación del promotor viral necesario para la transcripción de los genes virales.

La posibilidad de insertar un ADN en forma estable en el ADN cromosomal les ha permitido a los retrovirus ser importantes en la construcción de vectores de expresión, transgenización, etc. (Varmus, 1988). Tal es el caso del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV) que ha sido utilizado en las recientes décadas para transferir genes en células en división *in vitro* e *in vivo* (Revisado por Blesh, 2004). Por ese motivo, se requieren nuevos estudios acerca del mecanismo de integración para determinar posibles blancos de inhibición y evaluar la posibilidad de dirigir la integración a sitios más precisos del cromosoma eucarionte.

1.- Estructura y ciclo replicativo de los retrovirus.

El virión presenta en su interior el material genético del virus y varias proteínas retrovirales como transcriptasa inversa e integrasa, una capa intermedia denominada nucleocápside y una membrana formada por la bicapa lipídica de la célula hospedera. En la membrana coexisten una glucoproteína viral, gp 70 en el caso de M-MuLV, y proteínas celulares. La proteína viral gp 70 interactúa con proteínas específicas integrales de la membrana celular. En el caso del virus M-MuLV se ha demostrado que el receptor retroviral corresponde a un transportador de amino ácidos básicos (Wang y col, 1991). Otros estudios indican que además de transportadores, la interacción de proteínas virales con el receptor tipo "toll" 4 (TLR4), componente del sistema inmune innato, estaría involucrada en la activación directa de la vía de entrada del virus a la célula huésped (Rassa y col, 2002). La interacción producida entre la proteína viral y el receptor gatilla cambios estructurales, produciéndose la fusión entre la membrana plasmática y la envoltura viral, permitiendo que el "core" viral ingrese al citoplasma. En él, bajo la forma de un complejo ribonucleoproteico, ocurre la transcripción inversa del ARN viral, originando ADN de doble hebra. Esta reacción, catalizada por la transcriptasa reversa, comprende una primera etapa en que se sintetiza una hebra de ADN, utilizando como templado el ARN viral, y una segunda etapa en que la nucleasa RNasa H degrada el ARN del híbrido, permitiendo la polimerización de la segunda hebra de ADN (Hsu y Wainberg, 2000). Ocurrida esta reacción, el ADN viral, en el caso de VIH, se condensa y se une a proteínas virales como son la proteína de la matriz, integrasa y transcriptasa inversa (Bukrinsky y col, 1993) y a proteínas celulares como

BAF, que tiene un rol contra la autointegración y HMGA, proteína de tipo no-histona asociada a cromatina, formando el denominado Complejo de Preintegración (PIC) (Turlure y col, 2004). En el PIC, la integrasa (IN), reconoce específicamente las secuencias terminales repetidas, LTR (long terminal repeats), ubicadas en los extremos del ADN viral (figura 1), y cataliza la remoción de un dinucleótido adyacente al dinucleótido altamente conservado CA en ambos extremos 3' del ADN (figura 2A y 2B). Esta reacción, que ocurre en el citoplasma de la célula infectada, se conoce con el nombre de procesamiento de hebra y deja expuesto un grupo hidroxilo 3'.

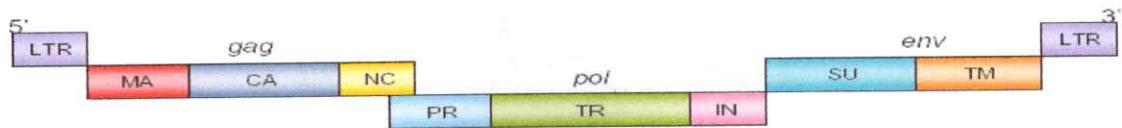


Figura 1. Esquema del genoma de M-MuLV. El genoma del virus contiene los genes *gag*, *pol* y *env*, flanqueados por terminaciones largas repetidas (LTR). El gen *gag* codifica para proteínas estructurales; el gen *pol* para las enzimas transcriptasa reversa, integrasa y una proteasa y el gen *env* codifica para las proteínas de la envoltura.

A continuación, el PIC entra al núcleo de células que no se están dividiendo a través del complejo del poro nuclear (VIH) o espera la disolución de la membrana en la división celular (M-MuLV) (Hindmarsh y Leis, 1999). Esta característica restringe la infección de M-MuLV a células en activa división. En el núcleo, IN cataliza la integración del ADN viral en el ADN cromosomal del huésped mediante una reacción

de transesterificación, en que los grupos hidroxilo de los extremos 3' del ADN viral, atacan en forma concertada uniones fosfodiéster en el ADN blanco (figura 2-C). Esta reacción se conoce con el nombre de transferencia de hebra (Engelman y col, 1991; Vink y col, 1991). Luego, enzimas celulares reparan los huecos generados en el ADN huésped por la reacción de transferencia de hebra (figura 2-D). Este paso genera pequeños repetidos directos rodeando el ADN viral que son característicos para cada retrovirus, (Dotan y col, 1995) siendo de 4 pares de bases para M-MuLV (Asante-Appiah y Skalka, 1997). El ADN viral integrado o provirus está listo para ser utilizado como templado para la producción de ARN y proteínas virales. En esta etapa, los LTR controlan la replicación viral. El 5' LTR posee un sitio promotor y regulador de la transcripción viral, mientras que el 3' LTR funciona en procesos posttranscripcionales, tales como la poliadenilación y la edición de transcritos virales. Los transcritos retrovirales cumplen funciones como ARN genómico y ARN mensajero para la traducción de las poliproteínas Gag, Pol y Env (Varmus, 1998).

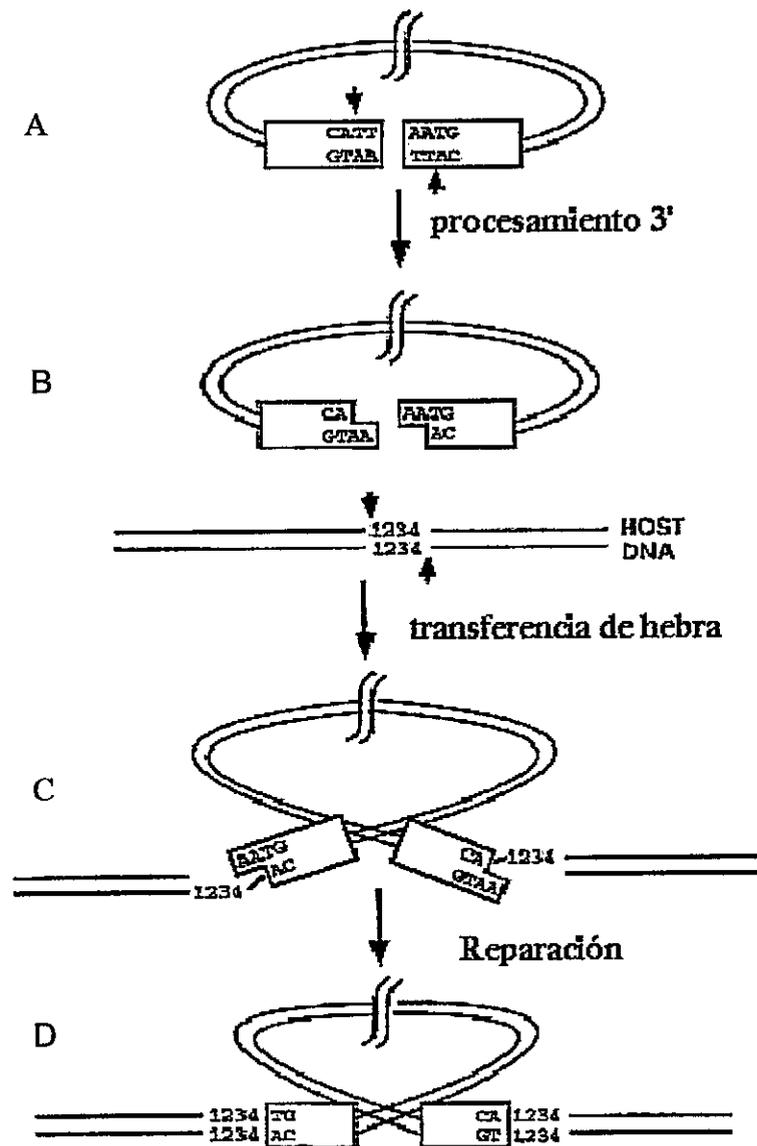


Figura 2. Etapas de integración. A) La integrasa reconoce específicamente los LTR ubicados en los extremos del ADN viral B) Remoción de un dinucleótido adyacente al dinucleótido altamente conservado CA en ambos extremos 3' del ADN. C) Ataque nucleofílico del grupo hidroxilo a enlaces fosfodiéster en el ADN blanco. D) Reparación y ordenamiento del intermediario de integración (Craigie, 2001).

2.- Estructura y función de las integrasas.

Las actividades catalizadas por IN se han determinado, *in vitro*, utilizando oligonucleótidos sintéticos que contienen las secuencias de los extremos del LTR. En la reacción de procesamiento se utiliza un oligonucleótido sintético que termina en la secuencia CAXX en el extremo 3' (figura 3-A), mientras en la reacción de transferencia de hebra se utiliza un oligonucleótido que tienen removido el dinucleótido final adyacente a CA (figura 3-B). Además, IN es capaz de catalizar, *in vitro*, la reacción inversa denominada desintegración (figura 3-C). Así, la enzima es capaz de desintegrar oligonucleótidos en forma de Y que imitan al complejo intermediario que se forma en un extremo viral durante la integración (figura 4). El descubrimiento de esta reacción ha permitido la caracterización de mutantes de IN que a pesar de haber perdido la capacidad de catalizar las reacciones de integración, mantienen la capacidad de desintegrar (Jonsson y col, 1993).

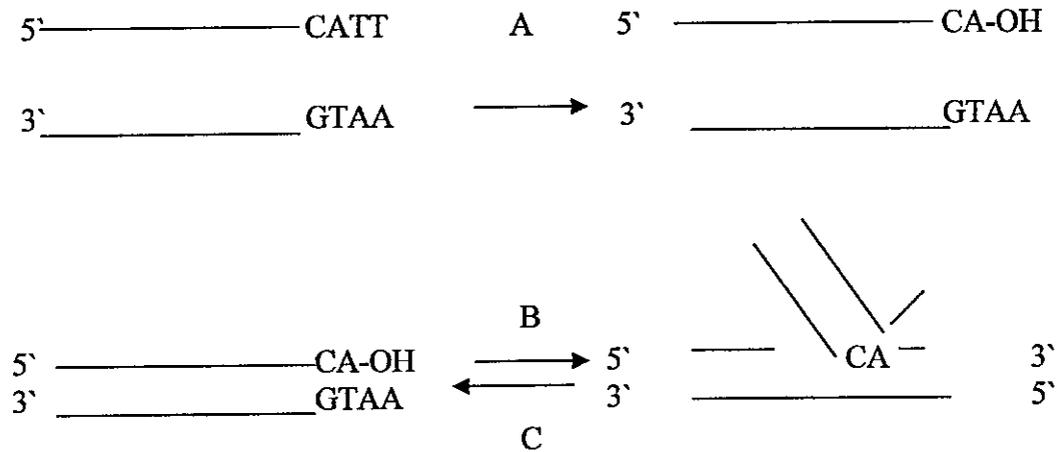
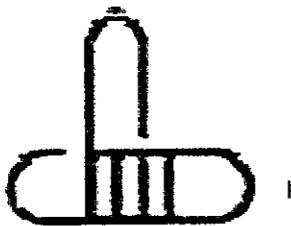


Figura 3. Reacciones catalizadas por la integrasa *in vitro*. A) Reacción de procesamiento 3'. B) Reacción de transferencia de hebra. C) Reacción de desintegración (Jonsson CB y col, 1993).

A sin ss-cola 5'



B con ss-cola 5'

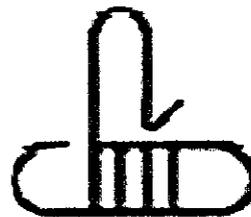


Figura 4. Esquema de sustratos de desintegración. A) sustrato dumbbell sin cola ss 5'.

B) sustrato dumbbell con cola 5'.

Análisis de las secuencias de las integrasas han revelado que IN posee tres dominios funcionales (Johnson y col, 1986) (figura 5). El extremo N-terminal de las integrasas presenta una estructura tipo dedos de zinc que posee cuatro residuos altamente conservados (HHCC). Estudios de mutagénesis sitio dirigida y modificación química en estos aminoácidos elimina completamente las reacciones de procesamiento 3' y de transferencia de hebra tanto *in vitro* como *in vivo*. Se observó, sin embargo, que la reacción de desintegración solo se veía afectada parcialmente. Estos resultados permiten suponer que la región HHCC podría estar implicada en el reconocimiento de la región terminal del LTR viral, en el posicionamiento correcto de este o en interacciones proteína-proteína. (Donzella y col, 1998; Jonsson y col, 1996; Hindmarsh and Leis, 1999).

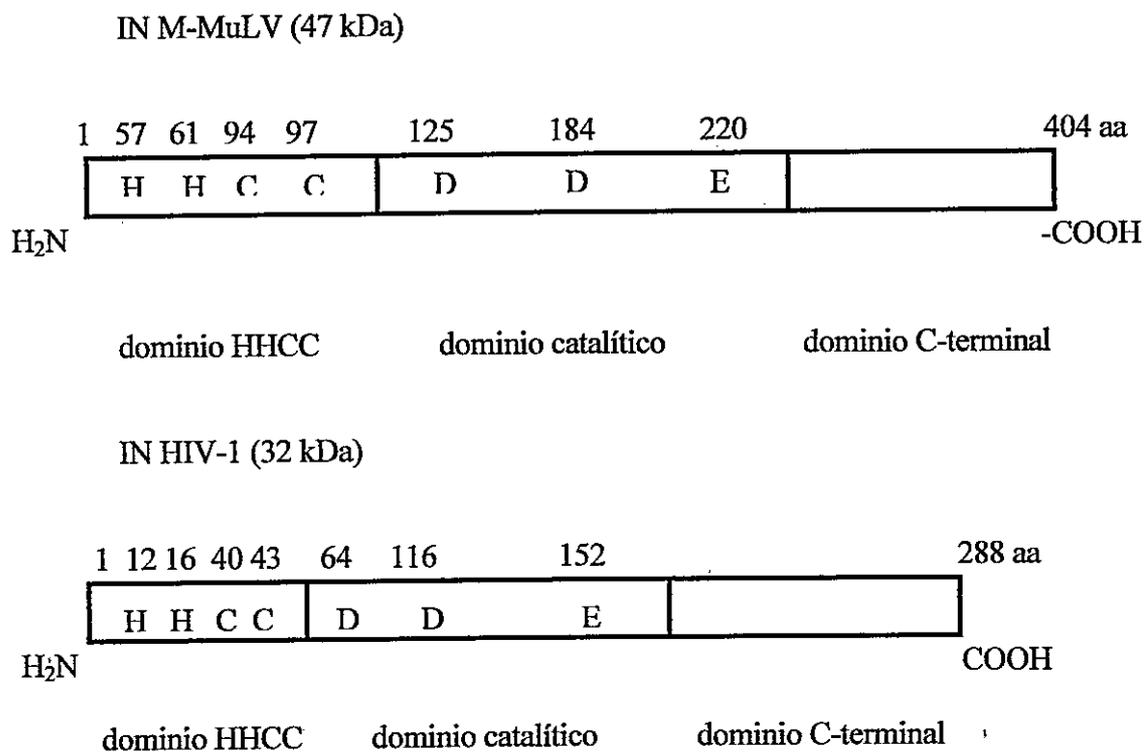


Figura 5. Esquema de IN M-MuLV e IN HIV-1. Las integrasas se componen de tres dominios estructurales. El dominio N-terminal posee los aminoácidos H, H, C, C, que conforman una estructura tipo dedos de Zinc. El dominio catalítico presenta una tríada catalítica responsable de las actividades de integración y desintegración. El dominio C-terminal presenta una región de unión inespecífica a ADN.

El dominio central o "core" corresponde al sitio catalítico de la enzima. En él se encuentra una tríada catalítica de tres residuos altamente conservados (D, D, E) puesto que la mayoría de las sustituciones en alguno de estos aminoácidos eliminan completamente las reacciones de integración y desintegración (Kulkosky y col, 1992). En este dominio se encuentra también una región flexible, conformando un asa que tendría un importante rol

en la interacción estable con la región de la cola-ss 5'. Experimentos recientes en VIH-1, han demostrado que Gln 148 jugaría un rol crucial en la interacción entre la proteína y el ADN viral. Esta importancia estaría dada por la necesidad de estabilizar el complejo mediante la formación de puentes de hidrógeno (Johnson y col, 2006) (Lu y col, 2004).

El dominio C-terminal es la región menos conservada de las integrasas. Mediante mutagénesis sitio dirigida se ha podido comprobar que existe una región de 28 aminoácidos que se uniría inespecíficamente al ADN blanco (Lutzke y col, 1994).

Los dominios aislados, expresados independientemente, han permitido determinar que existe una dimerización de los dominios N-terminal y catalítico (Cai y col, 1997; Hickamn y col, 1994). Experimentos de mutagénesis de los diferentes dominios en IN de VIH-1 permitieron conocer que los tres dominios existentes en esta proteína, son indispensables para las actividades de procesamiento y transferencia de hebra. La complementación en trans encontrada, permitió plantear la posibilidad de que la enzima funcione como un multímero (Engelman y col, 1993). Experimentos realizados en M-MuLV, han permitido confirmar la idea de que la actividad catalítica de la enzima estaría determinada por la interacción entre sus tres dominios y una multimerización de estos (Donzella y col, 1998).

3.- Rol del dominio N-terminal.

Utilizando una integrasa de M-MuLV que no posee el dominio N-terminal (IN 106-404) (figura 6), se observó que la carencia de este dominio anulaba la actividad de

procesamiento 3', limitaba la actividad de transferencia de hebra y aunque era capaz de desintegrar sustratos que imitan al intermediario formado durante la integración (sustrato dumbbell), era necesaria la presencia de la región de la cola ss-5' para desarrollar esta actividad. Se observó también, que la actividad de integración, podía ser recobrada si se complementaba la reacción adicionando una IN que solo tenía el dominio N-terminal (IN 1-105) (Jonsson y col, 1996; Yang y col, 1999; Yang y col, 2001). Este estudio permitió confirmar que el dominio N-terminal es una estructura independiente que puede interactuar en trans con el resto de la proteína.

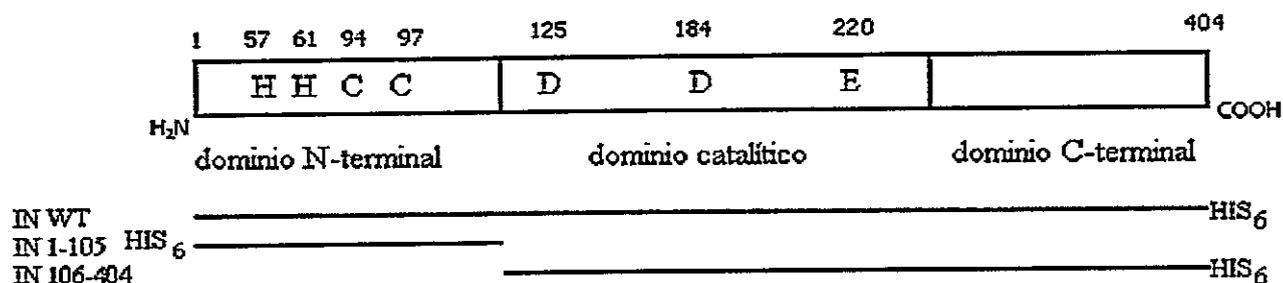


Figura 6: Esquema de mutantes por delección de IN de M-MuLV. La enzima WT corresponde a la integrasa silvestre, 106-404 a una mutante sin dominio amino-terminal y 1-105 a dominio amino terminal aislado.

4.- Interacción IN-ADN.

La estructura cristalográfica de fragmentos de la IN de VIH-1 ha sido determinada (Chen y col, 2000). Dado que se carece de esta información para IN M-MuLV, en el laboratorio se han realizado estudios de entrecruzamiento químico y

fotoentrecruzamiento, utilizando sustratos sintéticos de la enzima, para determinar qué regiones de la proteína estarían involucradas en el reconocimiento del ADN viral.

En la reacción de fotoentrecruzamiento, cuando se utiliza un análogo de nucleótido iodado, se genera una homólisis del enlace C-I produciéndose un radical C*. Esta especie altamente reactiva ataca residuos susceptibles en la proteína, formándose un complejo.

Estudios realizados en VIH-1 han identificado dos péptidos provenientes del "core" de esta enzima (residuo 49 al 69 y residuo 139 al 152), que se fotoentrecruzaron con la cola ss-5' del sustrato de desintegración. El péptido 139-152 forma parte de un asa flexible, cercana al sitio catalítico (Heuer y Brown 1997) y en él se encuentran los aminoácidos Gln 148 y Tyr 143 que darían cuenta del entrecruzamiento (Esposito y Craigie, 1998).

En el laboratorio, al realizar un estudio de fotoentrecruzamiento entre IN de M-MuLV y un sustrato de desintegración tipo dumbbell, que presenta una sustitución con 5-iododesoxiuridina (5-IdU) en la región 5', se ha observado entrecruzamiento entre una región central de la enzima con la cola del sustrato de desintegración. Esta interacción ocurriría, al igual que en VIH-1, a través del asa flexible, ubicada en el dominio central de la proteína. De los aminoácidos presentes en esta asa se piensa que el residuo de histidina (His208) estaría participando en la reacción de fotoentrecruzamiento con 5-IdU (Vera y col, resultados no publicados, 2002) ya que en otros sistemas se ha descrito que histidina, aminas primarias y aminoácidos aromáticos son susceptibles a la reacción con iodouridina

(Norris y col, 1996). Esta asa tiene probablemente una función en la estabilización del sustrato procesado y en la correcta interacción entre los dominios de la proteína, dado que además se ha descrito que la modificación por NEM de la cisteína 209 presente en esta asa afecta la complementación por el dominio HHCC sin modificación química (Donzella y col, 1998). En base a los antecedentes descritos, y para analizar el rol de la histidina presente en el asa catalítica en la interacción de la proteína con la región 5' del sustrato de desintegración, hemos diseñado la construcción de la mutante His208→Ala de IN 106-404 de M-MuLV.

5.- Hipótesis

La histidina 208 de la integrasa de M-MuLV participaría en la unión, directa o indirectamente, al extremo 5' del sustrato de desintegración.

6.- Objetivos

General

Determinar si la mutación H208A de IN 106-404 afecta su actividad.

Específicos

- Construcción de la mutante IN H208A 106-404 por PCR sobrelapado en el vector de clonamiento pGEM-T.
- Subclonamiento en el vector de expresión pET 21a.
- Purificación de integrasa.
- Caracterización de la mutante en cuanto a capacidad de integración y desintegración.

II. MATERIALES

1.- Oligonucleótidos sintéticos de ADN

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: 2783* 5'-GTCAGCGGGGGTCTTTCATT-3', 2785 5'-AATGAAAGACCCCCGCTGAC-3', Proc-LTR 5'-GTCAGCGGGGGTCTTTC-3', C-LTR 5'-AATGAAAGACCCCCGCTGAC-3', 6015 5'-CATGAAGCGTAAGCTTTCAACCTGCGTAAGCAGGTAGACCG AGAC CGTAAGGTCT-3', 7440 5'- TGAAGCGTAAGCTTTCAACCTGCGTAAGCAGGTAG ACCGTAAGCAGGTAGACCGTAAGGTCT-3', 6015/5IdU, partidor sentido PI 5'-CGCGCATATGTCTGCCGTTAAACA3', partidor antisentido P.Term 5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3', partidor antisentido MIH208A 5'-GGGTCTGTATGCACAAGCTAATTTTC-3', partidor sentido MIH208A 5'-GAAATTAGCTTGTGCATACAGACCC-3'.

2.- Reactivos

BIO-RAD: Acrilamida de grado electroforético, estándares de proteínas de amplio rango para electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes, persulfato de amonio, TEMED.

Boehringer Mannheim Biochemicals: Bisacrilamida de grado electroforético

Calbiochem: HEPES sal sódica, Tris base y Glicina.

DIFCO Laboratories: Reactivos para cultivo microbiológico.

GIBCO BRL: Agarosa grado electroforético, estándares de proteínas preteñidos de amplio rango, *Taq* polimerasa.

Invitrogen: Enzimas de restricción, partidores para PCR, marcadores de pares de bases para electroforesis en geles de agarosa, desoxinucleótidos.

J.T. Baker: Solventes orgánicos grado HPLC y sales.

Merck: Sales, tampones y solventes orgánicos grado pro-análisis.

NEN: (γ - ^{32}P) dATP, 6000 Ci/mmol.

Pharmacia Biotech: Sephadex G-25.

Promega: Enzimas de restricción, T4 ADN ligasa, *kits* para minipreparaciones de ADN plasmidial y para purificación de productos de PCR desde gel.

Qiagen: *Kit* para purificación de fragmentos de ADN desde gel.

Sigma Chemical Co.: Sales, reactivos y proteasas de grado biología molecular.

Biolabs: Enzimas de restricción.

Novagen: *Escherichia coli* DH5 α y BL(21)DE3 (material mantenido en el laboratorio).

3.- Plásmidos

Los vectores recombinantes pETINH1 que codifican para IN 1-404, IN 106-404 e IN 1-105 (Jonsson y Roth, 1993) fueron proporcionados por la Dra. Monica J. Roth del

Department of Biochemistry, University of Medicine and Dentistry of New Jersey-Robert
Wood Johnson Medical School, Piscataway, New Jersey, EE.UU.

III. MÉTODOS

1.- Construcción de mutante IN H208A 106-404.

1.1.- Diseño de partidores mutagénicos.

Para el diseño y análisis de los partidores externos y mutagénicos se utilizó el programa OligoTech. Estos fueron utilizados como se explica en la figura 7.

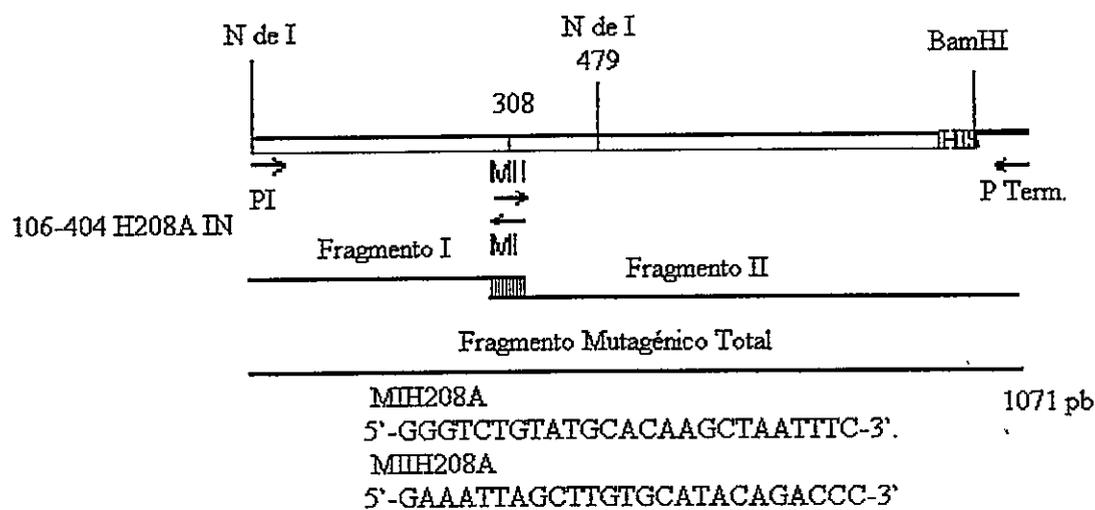


Figura 7: Esquema reacciones de PCR. Se realizó una mutagénesis sitio-dirigida por PCR para cambiar el codón 208 desde CAT a GCT. El método de extensión solapada requiere 2 primers mutagénicos (MI y MII) y otros 2 exteriores (PI y P Term.) que permiten la amplificación de un fragmento 5' (I) y un fragmento 3' (II) que se solapan. Ambos fragmentos, I y II, portan la mutación. A continuación se utilizan los fragmentos I y II en otra reacción para producir el ADN mutado de longitud completa.

1.2.- Aislamiento de templado desde vector pETINH1.

Se amplificó y aisló el fragmento codificante de IN 106-404 desde el vector pETINH1, utilizando los partidores PI y P Term.

La mezcla de reacción consistió de: 36,5 μ L de agua, 5 μ L de tampón de PCR 10X (Tris-Cl 100 mM pH 8,5, KCl 500 mM), 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ L de mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1 μ L de ADN pETINH1 (IN 106-404) (5 ng/ μ L), 2,5 μ L de cada uno de los partidores PI (10 μ M) y P terminador (10 μ M) y 1,0 μ L *Taq* polimerasa (5 U/ μ L). El programa utilizado consistió en 32 ciclos de amplificación con una temperatura de 94°C de denaturación (30 seg.), 52°C de apareamiento de los partidores (30 seg.) y 72°C de extensión (1 min.).

1.3.- Electroforesis de ADN en gel de agarosa y purificación desde gel.

El ADN se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/mL). El ADN fue extraído del gel y purificado siguiendo el protocolo de purificación desde geles de agarosa del kit para purificación de fragmentos desde gel de Qiagen, USA.

1.4.- Amplificación de IN de M-MuLV por PCR para obtener los fragmentos mutagénicos I y II.

Las mezclas de reacción consistieron en: 36,5 μ L de agua, 5 μ L de tampón de PCR 10X, 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 1 μ L de ADN obtenido en la

etapa 1.3 (5 ng/ μ L), 2,5 μ L de cada partidor (PI/MIH208A para fragmento I y P terminador/MIH208A para fragmento II) y 1,0 μ L *Taq* polimerasa (5 U/ μ L). El programa utilizado fue el mismo de la etapa 1.2.

1.5.- Amplificación de fragmento mutagénico total.

La mezcla de reacción consistió en: 18 μ L de agua, 5 μ L de tampón de PCR 10X, 1,5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 10 μ L de cada fragmento mutagénico I y II, obtenido en la etapa 1.4. (5 ng/ μ L), 2,5 μ L del partidor PI, 2,5 μ L del partidor terminador y 1,0 μ L *Taq* polimerasa (5 U/ μ L). El programa utilizado consistió en 32 ciclos de amplificación con una temperatura de 94°C de denaturación (30 seg.), 45°C de apareamiento de los partidores (30 seg.) y 72°C de extensión (1 min.).

1.6.- Ligación al plásmido p-GEM-T.

La mezcla de reacción para la ligación consistió en: 1 μ L pGEM-T (50 ng/ μ L), 7 μ L tampón de ligación rápida 2X (kit Promega), 5 μ L fragmento mutagénico (10 ng/ μ L) y 1 μ L T4 ADN ligasa. Se realizó el control de ligación incluido en el kit y control de ligación con una mezcla que no tenía inserto. La mezcla fue incubada por 2 horas a 24°C.

1.7.- Preparación de células competentes.

Las células competentes DH5 α y BL21 fueron preparadas según el siguiente protocolo (Maniatis, modificado): se inocularon 30 mL de medio LB (1% triptona, 0,5% extracto de levaduras, 0,5% NaCl, pH 7,5) con cada cepa de *E. coli*; se dejaron creciendo a

37°C, con agitación. Al día siguiente se tomaron 25 mL y se inocularon 475 mL de medio SOB (2% triptona, 0,5% extracto de levaduras, 0,05% NaCl, 1% v/v 250 mM KCl, 0,5% v/v 2 M MgCl₂, pH 7,0). Se dejó creciendo a 37°C con agitación y cuando alcanzó una densidad óptica de 0,6 fueron puestas en hielo por 10 minutos. A continuación se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se resuspendieron en 80 mL de TB frío (10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH ajustado a 6.7 con KOH) y se pusieron en hielo 10 minutos más. Luego nuevamente se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos y se resuspendieron en 20 mL de TB frío. Finalmente se agregó DMSO a una concentración final del 7%. Las células fueron puestas en hielo por 10 min. y se alicuotaron en fracciones de 500 µL y fueron guardadas a -80°C.

1.8.- Transformación de células DH5α.

Una vez removidas del refrigerador a -80°C y descongeladas en hielo, 100 µL de células competentes para cada transformación fueron puestas en un tubo Falcon de 15 mL estéril en hielo. Se les agregó la mezcla de ligación de la etapa anterior y se homogeneizó. La mezcla fue incubada en hielo por 30 minutos. A continuación se incubaron las células a 42°C por 45 segundos sin agitar. Se agregó 0.95 mL de medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levaduras, 0,05% NaCl, 1% v/v 250 mM KCl, 0,5% v/v 2 M MgCl₂, 20 mM glucosa, pH 7,0) a 20°C y se incubaron a 37°C por 1 hora con agitación. Transcurrido este tiempo se plaquearon 300 µL en placas LB/ampicilina (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl, 1,5% agar, pH 7,5 y 200 µg/mL ampicilina) y se incubaron a 37°C

por 24 horas. La eficiencia de transformación de las células fue de 10^6 colonias por 1 ng de plásmido.

1.9.- Mini preparación de ADN plasmidial y selección de clones positivos.

Se realizó un cultivo de 16 h. en medio LB/ampicilina de las colonias transformadas. Se realizó una extracción de ADN plasmidial a los cultivos utilizando el método para "miniprep express" que consistió en: tomar un mL de cultivo de noche y centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos; a continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 300 μL de solución STET (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 5% Tritón x-100). Se pusieron los tubos en hielo, se agregó 25 μL de lisozima (10 mg/mL en 10 mM Tris pH 8.0) y se incubaron en hielo por 3 minutos. Luego, sin agitar, se incubaron los tubos a 100°C por 2 minutos; se centrifugaron por 5 minutos a 10.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. A continuación se agregaron 400 μL de resina y se mezcló por inversión 5 minutos, luego se centrifugó a 2000 rpm por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Siguiendo con el protocolo, se lavó el precipitado con 500 μL de etanol 80% y se centrifugó a 2000 rpm por 1 minuto; se eliminó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente 1 hora aproximadamente. El precipitado obtenido se resuspendió en 60 μL de agua, se centrifugó a 2000 rpm por un minuto y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo.

Para cuantificar el ADN plasmidial obtenido se realizó una digestión de 2 horas a 37°C con *NcoI* bajo las siguientes condiciones: 8 μL de sobrenadante del paso anterior, 1

μL tampón N°3 (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, pH 8.0) y 1 μL de enzima.

La confirmación de la presencia del inserto esperado se realizó mediante digestión con la enzima *NdeI* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este protocolo fue utilizado cada vez que fue necesario cuantificar el ADN.

1.10.- Precipitación y concentración de ADN.

El ADN se concentró por precipitación con etanol y acetato de amonio. Para ello se agregó 1/10 de volumen de acetato de amonio 6M, 1 μL de glicógeno y 2,5 volúmenes de etanol. La mezcla se incubó toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos; se eliminó el sobrenadante (dejando 20 μL) y se lavó con 200 μL de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 10.000 rpm y el precipitado se secó a temperatura ambiente por 1 hora. El ADN se resuspendió en 20 μL de agua destilada estéril.

1.11.- Secuenciación.

La secuenciación del ADN plasmidial pGEMT-H208A IN 106-404 se realizó por amplificación por PCR en el centro de secuenciación de la empresa Genética y Tecnología (GENYTEC), utilizando 10 μL de ADN (40 ng/ μL) y 10 μL de los partidores PI y terminador 10 μM .

1.12.- Maxipreparación de ADN plasmidial.

Se realizó una purificación de ADN plasmidial a gran escala. Para ello, se dejó un cultivo de 16 horas noche de la cepa transformada en 300 mL de medio LB/ampicilina. Se realizó una extracción de ADN plasmidial por lisis alcalina que consistió en: tomar los 300 mL de cultivo y centrifugarlos a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante y resuspenderlo en 10 mL de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0). En esta etapa, y en todas las siguientes, se trabajó en hielo. Se agregó 1 mL de lisozima (10 µg/mL en tris pH 8.0), se homogeneizó cuidadosamente con la pipeta y se agregaron 20 mL de solución II (0,2 N NaOH, 1% SDS). La mezcla se incubó 10 minutos y trascurrido ese tiempo se agregaron 15 mL de solución III fría (60 mL acetato de potasio 5M, 11,5 mL ácido acético glacial, 28,5 mL agua destilada). Se realizó una agitación corta y se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se filtró con lana de vidrio y se precipitó agregando 0,6 Vol. de isopropanol. Nuevamente se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos y el precipitado se dejó secando 2 horas a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en 2 mL de agua destilada estéril y se separó en 4 tubos eppendorf. A cada tubo se le agregó 1 Vol. de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 24:23:1, se mezcló por vórtex 30 segundos y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos, luego el sobrenadante fue trasferido a un tubo eppendorf nuevo. Este procedimiento se repitió dos veces más. Posteriormente se realizó una extracción con 1 Vol. de cloroformo:alcohol isoamílico 23:1, se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante obtenido se precipitó con 2,5 Vol. de etanol 100% y 1/10 Vol. de acetato de

amonio 6 M. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y el precipitado se dejó secando 2 horas a temperatura ambiente. Luego, el ADN fue resuspendido en 200 μ L de agua destilada estéril/ RNAsa (10 μ g/mL) e incubado por 1 hora a 37°C.

1.13.- Digestión del ADN plasmidial pGEM-T 106/404 H208A IN y del vector pET21a con *Bam*HI y *Nde*I.

La digestión del vector P-GEMT que lleva la integrasa mutada se realizó en dos etapas. En la primera se incubó el ADN con la enzima *Bam*HI bajo las siguientes condiciones de reacción: 150 μ L de ADN (7,5 μ g), 17 μ L de tampón N°3 y 3 μ L de enzima. La reacción fue incubada por 3 horas a 37° C. En la segunda, y debido a que el gen de IN presenta un sitio interno de corte para *Nde*I, se realizó una digestión parcial con la finalidad de obtener el fragmento completo. La digestión se realizó de la siguiente manera: 23 μ L de esta mezcla (1 μ g de ADN) más 1 μ L enzima diluida 1U/ μ L fueron incubados a 37°C por 25 minutos. Transcurrido este tiempo, la enzima fue inactivada por 15 minutos a 65°C.

Para la obtención del vector pET21a, se realizó una purificación desde un cultivo bacteriano de 16 horas, siguiendo el protocolo descrito en métodos 2.2.7. A continuación, el vector fue digerido con *Bam*HI y *Nde*I simultáneamente. La mezcla de digestión del vector consistió en 10 μ L de ADN plasmidial (6 μ g), 1 μ L de *Bam*HI, 1 μ L *Nde*I, 2 μ L de tampón N°3 (Invitrogen), 6 μ L de agua destilada estéril; incubada 3 horas a 37°C.

1.14.- Ligación.

Se realizó una mezcla de ligación bajo las siguientes condiciones: 5 μ l de fragmento mutagénico de 1.071 pb (25 ng), 1 μ l de vector pET 21a/*Bam*HI/*Nde*I (50 ng), 2 μ l de tampón de ligación 10X (250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% (w/v) polyethylene glycol-8000), 1 μ l de T4 ADN ligasa (3 U) y 11 μ l de agua. Se realizaron controles de ligación con el vector pET21a digerido con *Bam*HI y con el vector digerido con ambas enzimas. Las mezclas de ligación fueron incubadas a T° ambiente por 4 horas y luego dejadas a 4°C toda la noche.

1.15.- Transformación de células DH5 α y selección de clones positivos para 106-404 H208A IN de M-MuLV.

La transformación de *E. coli* DH5 α se realizó del modo descrito en materiales y métodos 1.8.

Las colonias obtenidas se crecieron 16 horas en medio LB/ampicilina y se realizó una purificación de ADN plasmidial del mismo modo que fue descrito en materiales y métodos 1.9. Se realizó un análisis del tamaño del plásmido obtenido por digestión con *Bam*HI y *Nde*I. Las condiciones de restricción fueron las siguientes: 3 μ L de ADN plasmidial, 1 μ L de tampón N°3, 0,5 μ L de enzima y 5,5 μ L de agua destilada estéril. La digestión se realizó 1 h a 37° C.

Los clones que resultaron positivos para este segundo análisis fueron guardados en soluciones stock en medio LB/ampicilina/glicerol 20% a -80°C .

1.16.- Transformación *E. coli* BL21.

Con el ADN obtenido en la etapa anterior se transformó la cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3). El protocolo de preparación y transformación de las células competentes fue descrito en métodos 1.8.

2.- Purificación de IN de M-MuLV expresada en bacterias.

Las IN recombinantes (1-404, 1-105, 106-404 y H208A 106-404) poseen un segmento adicional de seis histidinas en alguno de los extremos amino o carboxilo terminal que presentan afinidad por la resina NTA-Ni²⁺ (Figura 6).

A partir de 1 L de cultivo, de cada una de las cepas, con una densidad óptica a 600 nm de 0,8 se indujo la expresión de la enzima agregando IPTG 1 mM. Luego de incubar por 3 h a 37°C con agitación, las células fueron colectadas a 6000 rpm a 4°C por 20 min y las bacterias colectadas fueron resuspendidas en 40 mL de solución de solubilización (10 mM CHAPS, 10 mM Imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1mM PMSF, 1 mM benzamidina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina). Una vez que la solución se encontraba homogénea, se agregó 100 mg de lisozima y se mantuvo en hielo por 15 minutos. Luego, las bacterias fueron sonicadas en hielo, en 4 ciclos de 15 seg cada uno. A continuación, se centrifugó a 6000 rpm por 1 hora, se tomó el sobrenadante y se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante con 1 mL de resina NTA-Ni²⁺ equilibrada

previamente por 10 minutos con solución de solubilización. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm y el sobrenadante se guardó a 4°C. La resina se lavó con 40 mL de tampón de lavado (10 mM CHAPS, 25 mM imidazol, 50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol, 20% glicerol). Luego, la resina resuspendida se traspasó a una columna y se lavó con 5 mL de tampón de lavado con una concentración final de 50 mM imidazol distribuido en 5 etapas de 1 mL cada uno. Cada fracción de 1 mL se colectó en tubos eppendorf y se mantuvo en hielo. El mismo procedimiento se utilizó con el tampón de lavado con una concentración final de 100 mM imidazol y con una concentración final de 250 mM imidazol y 50 mM NaH₂PO₄. La concentración de proteínas de cada fracción se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Aquéllas donde la proteína se encontraba más concentrada, fueron dializadas contra 200 mL de solución de diálisis (20 mM HEPES pH 7,4, 0,1% Nonidet P-40, 1,5 mM DTT, 400 mM KCl, glicerol 50%) a 4°C toda la noche.

2.1.- Western Blot

Se realizó un ensayo western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-integrasa. Para ello se cargó, en un gel de poliacrilamida al 12%, 5 µL de cada fracción de diálisis y un estándar de proteínas preteñidas de amplio rango. Las proteínas se sometieron a una electroforesis a 200 V por 40 minutos y se realizó la transferencia desde el gel a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis a 14 V toda la noche. Al día siguiente, la membrana se incubó con solución de bloqueo 5% leche descremada, PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,3), por dos horas con

agitación constante. Luego se agregó a la misma solución el anticuerpo primario anti integrasa hasta una dilución de 1:1000 y se incubó con agitación por 1 hora. Se realizaron 5 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. En cada oportunidad la membrana era incubada con agitación. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina por una hora a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo. A continuación se realizaron 5 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Para revelar la presencia de integrasa en la membrana se incubó esta con una solución con NBT 0,1% P/Vol. (0,5 g de NBT en 10 ml de dimetilformamida al 70%, en tampón fosfatasa alcalina pH 9.5 (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris)), más BCIP 0,05% P/Vol. (0,5 g de BCIP en 10 ml de dimetilformamida al 100%) hasta observar la aparición de bandas. La reacción se detuvo lavando la membrana con agua destilada.

3.- Ensayos de actividad.

3.1.- Marcaje y purificación de sustratos.

Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de fotoentrecruzamiento y de actividades enzimáticas fueron marcados radiactivamente con (γ - ^{32}P) dATP en su extremo 5', utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa, mediante la siguiente reacción: 40 pmoles de oligo fueron incubados con 0,5 U de T4 polinucleótido quinasa en tampón de reacción (70 mM Tris-Cl pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 0,1 M KCl, 1 mM β -mercaptoetanol) en un volumen de 20 μL . La reacción se realizó por 1 hora a 37°C y se detuvo agregando 20 μL de buffer formamida 2X (90% formamida, 20 mM EDTA, 0,01% azul de bromofenol, 0,01% xilen cianol).

Los oligonucleótidos utilizados para medir la actividad enzimática de las integrasas, fueron purificados desde geles de acrilamida 20%, urea 7 M. Una vez determinada su migración por autoradiografía, cada oligo fue cortado del gel y eluido en buffer acetato (0,5 M acetato de amonio, 5 mM MgCl_2) a temperatura ambiente toda la noche.

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de fotoentrecruzamiento fueron purificados por centrifugación en columnas de Sephadex G-25, equilibrada con una solución 20 mM HEPES pH 7,8.

Eluidos los oligos del gel, se concentraron en *speedvac* hasta 100 μ L. Para precipitarlos se les agregó 1 mL de etanol 100% y fueron enfriados por 1 hora a -20° C. Luego se centrifugó por 30 min a 12000 rpm y el precipitado fue lavado dos veces con 500 μ L de etanol 70% y se dejó secar a T° ambiente. Los oligonucleótidos fueron resuspendidos en 40 μ L agua destilada estéril.

Para obtener el sustrato LTR de doble hebra para las reacciones de procesamiento y transferencia de hebra, los oligonucleótidos marcados fueron hibridados con el oligo frío complementario (2783*- 2785 para procesamiento y Proc LTR*-C-LTR para transferencia de hebra). La condición de hibridación fue la siguiente: a cada oligo se le agregó 80 pmoles de oligo complementario y 4 μ L de 1 M NaCl. La solución se calentó a 85° C por 3 minutos y se dejó a enfriar lentamente hasta 30° C. Los oligonucleótidos fueron mantenidos a -20° C.

3.2.- Medición de la actividad de IN *in vitro*.

Las reacciones de procesamiento y transferencia de hebra se realizaron en las siguientes condiciones: 15 pmoles de enzima fueron incubados con 1 pmol de sustrato marcado radiactivamente en tampón STT 1X (20 mM MES pH 6,4, 10 mM KCl, 10 mM DTT, 20 mM $MnCl_2$, glicerol 5%). Las reacciones se realizaron a 37° C por 1 h. La reacción de desintegración se realizó de manera similar, utilizando tampón para desintegración 1X (20 mM PIPES pH 8,0, 10 mM CHAPS, 0,05% Nonidet P-40, 25 mM $MnCl_2$ y 10 mM DTT). Las reacciones fueron detenidas con 20 μ L de tampón formamida 2X. Los productos de estas reacciones fueron separados en geles de acrilamida 20%, urea 7

M. La electroforesis se realizó por 2-3 horas a 80W. Los geles fueron secados al vacío a 75°C y sometidos a una exposición autoradiográfica con placas Kodak BioMaxMR o en Phosphorimager.

4.- Estudios de fotoentrecruzamiento de IN con sustratos de desintegración "dumbbell" modificados con 5-IdU y marcados con γ -(^{32}P).

El marcaje de los oligonucleótidos utilizados en esta reacción se realizó del modo descrito en métodos 3.1. Las reacciones de fotoentrecruzamiento se realizaron bajo las siguientes condiciones: 15 pmoles de enzima, 1 pmol de sustrato marcado, tampón DES 1X. La mezcla fue irradiada en hielo por 30 minutos a 0,240 Joules x seg/cm^2 en un *UV Radiator Vilber Lourmat* a una distancia de 9 cms de las lámparas UV. Posteriormente, se removieron alícuotas de 5 μL y los productos de la reacción se separaron en geles de poliacrilamida al 20%, visualizándose por autoradiografía.

4.1.- Digestión de productos de fotoentrecruzamiento con nucleasa S1.

Se realizó una incubación de las alícuotas de los aductos formados en la etapa anterior con la nucleasa S1. A 5 μL de la mezcla de fotoentrecruzamiento se agregó 2 μL de tampón de reacción 10X de S1 (300 mM acetato de sodio pH 4,6, 10 mM acetato de zinc y 0,5% glicerol), 1 μL de S1 (1U/ μl), 0,33 μL de 3 M NaCl y se llevó a 20 μL con agua. Las mezclas se incubaron por 1 h a 37°C. Posteriormente, la digestión se visualizó por auto radiografía de un gel de poliacrilamida al 20%.

IV. RESULTADOS

Estudios de modificación química y de entrecruzamiento ADN-proteína realizados en M-MuLV IN sugieren que el extremo 5' de un sustrato que imita al intermediario formado durante la integración, se uniría a una región del dominio central de la integrasa que contiene a la cisteína 209 (Vera J, León O, resultados no publicados). Estudios de modelamiento sugieren que esta cisteína se encontraría formando parte de un asa flexible de 14 aminoácidos, cercana al sitio activo.

Para comprender la importancia del asa flexible en la estabilización del sustrato procesado se han iniciado estudios de mutagénesis sitio dirigida en esa región. A continuación se presentan los resultados correspondientes a la mutación de la histidina 208.

1.- Construcción de la mutante IN H208A 106-404.

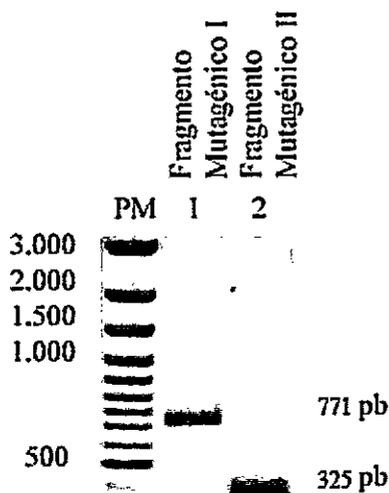
Para la reacción de mutagénesis sitio dirigida se utilizó el plásmido pETINH1 que contiene un fragmento del gen que codifica IN del virus M-MuLV (IN 106-404). Utilizando los partidores PI y P Term se amplificó un fragmento de 1.071 pb, que se utilizó de templado en la reacción siguiente. Luego de la purificación se obtuvieron 400 ng de ADN. La identidad del fragmento fue establecida por análisis de restricción con la enzima *NdeI*. Así, se observó la liberación de dos fragmentos de 592 y 479 pb, ya que existe un sitio un sitio interno *NdeI* en el gen de integrasa.

La primera etapa de la reacción de mutagénesis sitio dirigida consistió en la amplificación de los fragmentos I y II, indicados en la figura 7, que al alinearse son

capaces de incorporar la mutación H208A. El resultado de esta reacción y de la posterior purificación de los amplificadores, se observa en la figura 8a.

Luego de purificar los fragmentos mutagénicos, se obtuvieron 250 ng de cada uno. La segunda etapa de la reacción de mutagénesis sitio dirigida consistió en la amplificación del fragmento de ADN de 1.071 pb, portador de la mutación H208A. Para esta reacción se utilizaron de templado los fragmentos mutagénicos I y II, obteniéndose 200 ng. En la figura 8b se observa el fragmento completo. La identidad del fragmento se corroboró por análisis de restricción con la enzima *NdeI*.

A



B

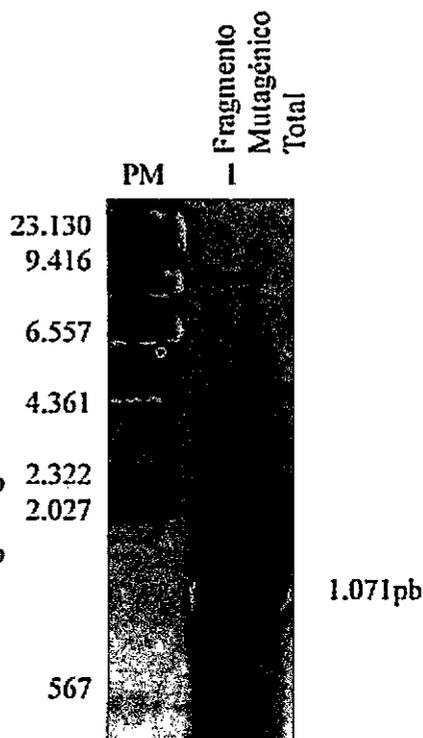


Figura 8: A) Electroforesis de fragmentos mutagénicos IN H208A 106-404 I y II. Fragmentos mutagénicos I y II en carriles 1 y 2 respectivamente. PM: estándar de peso molecular 100 bp, Invitrogen. B) Electroforesis de amplificado final. Fragmento mutagénico total en carril 1. PM: estándar de peso molecular ADN λ /HindIII, Invitrogen.

El ADN de 1.071 pb se ligó al plásmido pGEM-T en una razón 3:1 (inserto (50 ng): vector (50 ng)) y la mezcla se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron 30 colonias, mientras que en el control sin inserto se obtuvieron solo 3 colonias. Se analizaron dos colonias por digestión del ADN plasmidial con la enzima *Nde*I. En la figura 9 se

observa que en ambos clones analizados se liberan dos insertos (592 pb y 479 pb) que corresponde a lo esperado.

La presencia de la mutación se confirmó por secuenciación automática del ADN plasmidial del clon 1 (pGEM IN H208A 106-404). En la secuencia obtenida se observó el cambio en el triplete CAT en la posición 208, que codifica histidina, por el triplete GCT, que codifica alanina. Además, se observó la mutación del codón ACG por ACT en el triplete 111. Esta mutación, de carácter silencioso, no cambia la secuencia de la proteína pues ambos codones codifican para treonina.

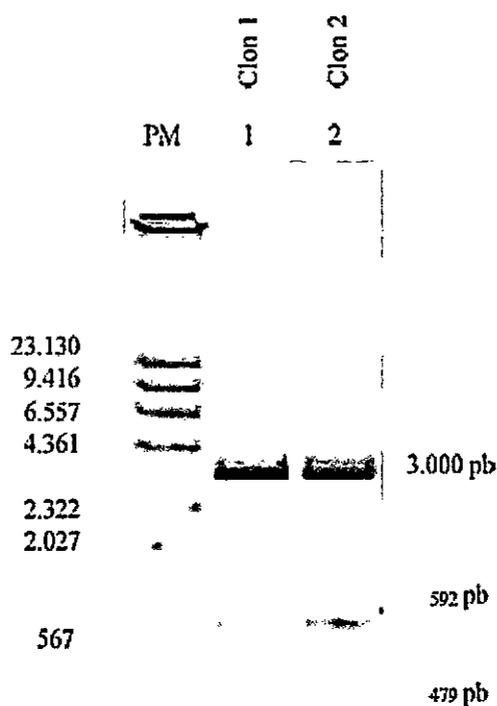


Figura 9. Análisis de restricción de clones p-GEMT/ IN H208A 106-404. Digestión del ADN de clones 1 y 2 con la enzima *NdeI*; carriles 1 y 2 respectivamente. PM: estándar de peso molecular ADN λ /HindIII, Invitrogen.

2.- Subclonamiento y expresión de la mutante IN H208 106-404.

El fragmento de ADN de 1.071 pb, codificante para la IN H208A 106-404, se liberó desde el plásmido pGEMT IN H208A 106-404, cortando con las enzimas *BamHI* y *NdeI* (figura 10) y se purificó por electroforesis en agarosa, obteniéndose 200 ng. El fragmento liberado se ligó al plásmido pET21a previamente digerido con *BamHI* y *NdeI* en una razón 3:1 (inserto (25 ng): vector (50 ng)), y se realizó una transformación de células competentes

de *E. coli* JM109. El resultado de la transformación fue de 12 colonias para la transformación con la mezcla de ligación que llevaba el inserto de la mutante de integrasa IN H208A 106-404, mientras que en el control sin inserto se obtuvieron 5 colonias.

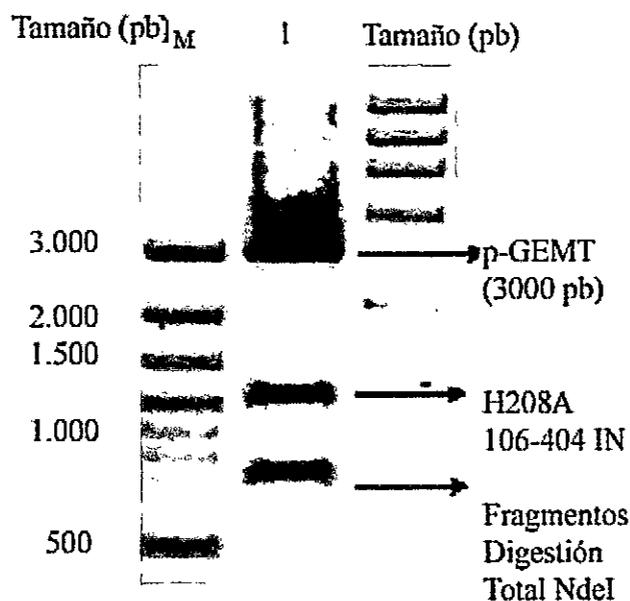
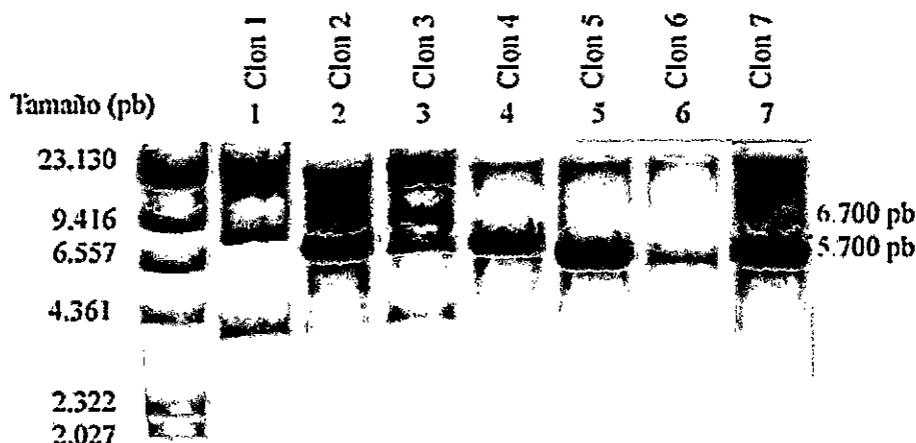


Figura 10. Liberación de inserto IN H208A 106-404 desde el plásmido pGEM-T. Digestión total del ADN clonado en pGEM-T con la enzima *Bam*HI y digestión parcial con la enzima *Nde*I para obtener el fragmento total. El fragmento liberado de 1.071 pb se observa en el carril 1. M: estándar de peso molecular 100 pb, Invitrogen.

La selección de clones positivos se realizó por digestión con la enzima *Bam*HI. Como se observa en la figura 11-A, en los carriles 2 y 4, solo 2 de las colonias analizadas presentaron un plásmido de un tamaño de alrededor de 6.700 pb, que coincidía con el tamaño esperado. Aquellos clones que de acuerdo a esta etapa resultaron positivos (2 y 4),

fueron sometidos a un segundo análisis de restricción con la enzima *NdeI*. En ambos clones se liberaron dos insertos de alrededor de 592 pb y 479 pb coincidentes con el tamaño esperado (figura 11-B). A continuación, se realizó la transformación de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el ADN pET21a H208A 106-404 IN y se analizó la expresión de la proteína. Para esto se creció un cultivo de 50 mL hasta una densidad óptica de 0.9, se indujo con IPTG por dos horas, se colectaron las bacterias y se lisó el precipitado con buffer SDS. La figura 12 muestra la separación de proteínas totales de la cepa pET 21a IN H208A 106-404 en un gel acrilamida-SDS, antes y después de inducirlos con IPTG. En cada carril se cargaron 60 uL de cultivo. En el carril 3 se observa la presencia de una proteína de 37 KDa, no visible en el cultivo sin inducción (carril 2).

A



B

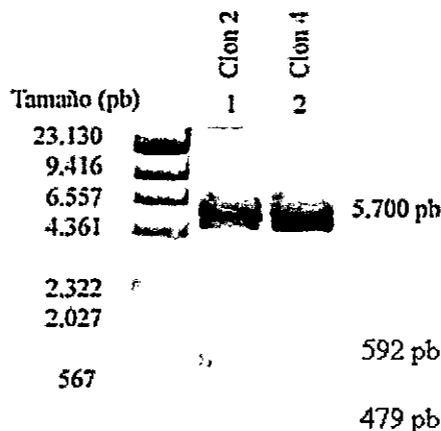


Figura 11. A) Análisis de restricción de clones pET/ IN H208A 106-404. Digestión con la enzima *Bam*HI. Los carriles 1-7 corresponden a diferentes clones obtenidos. En los carriles 2 y 4 se observa un plásmido de 6.700 pb que correspondería al plásmido más el inserto. **B) Análisis de restricción de clones 2 y 4 con la enzima *Nde*I.** En ambos clones, carriles 1 y 2, se observa la liberación de dos fragmentos de 592 y 479 pb, correspondientes a los tamaños esperados. El estándar de peso molecular utilizado en ambos casos fue ADN λ /HindIII, Invitrogen.

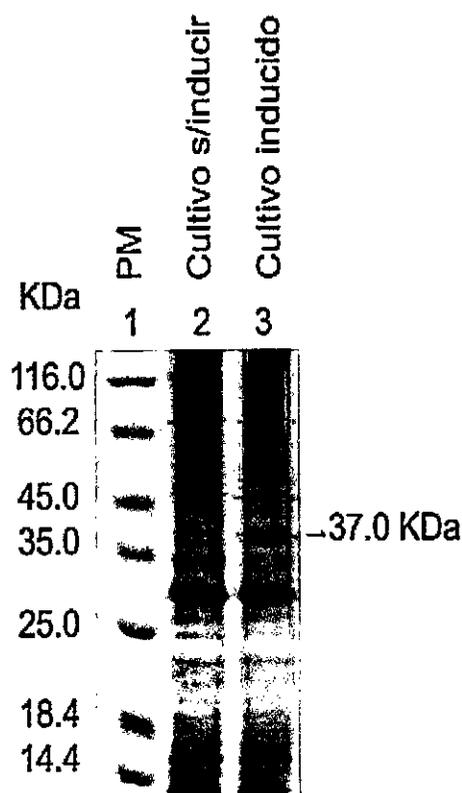


Figura 12. Perfil de proteínas totales de cultivos de *E. coli* transformadas con el plasmido pET/ IN H208A 106-404. En el carril 1 se observa el perfil de proteínas totales del cultivo sin inducir, en tanto que en el carril 2 se observa el perfil de proteínas totales del cultivo inducido con Iptg. M: estándar de proteínas.

3.- Purificación de integrasas.

La purificación de las integrasas IN 1-404, IN 1-105 e IN 106-404 se realizó a partir de los plásmidos pET IN 1-104, pET IN 1-105 y pET INH1 disponibles en el laboratorio; en tanto que la purificación de IN H208A 106-404 se realizó a partir del clon 4

pET 21a IN H208A 106-404. Para ello, se creció un cultivo de 1 L hasta una densidad óptica de 0.9, se indujo con IPTG por 2 horas y se colectaron las bacterias por centrifugación. A continuación el precipitado se resuspendió, se lisó con lisozima y se sonicó. El sobrenadante se unió a una resina de afinidad (NTA-Ni⁺²agarosa) y las proteínas fueron eluidas con concentraciones crecientes de sales e imidazol. Los resultados de estas purificaciones se muestran en la figura 13.

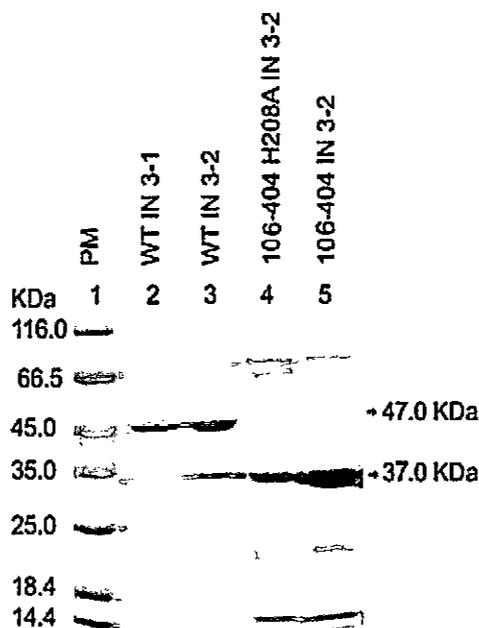


Figura 13. Perfil electroforético de las integrasas purificadas. Las proteínas purificadas fueron separadas por electroforesis en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalantes. Se cargaron 2 ug de IN WT y 6 ug de IN H208A 106-404. M: estándar de proteínas. Los carriles 2 y 3 muestran dos fracciones distintas de integrasa WT. El carril 4 corresponde a IN H208A 106-404 IN, mientras que el carril 5 corresponde a IN 106-404. La flechas indican la posiciones de IN WT 45 kDa y a la mutante IN H208A 106-404 37 kDa.

La concentración para cada proteína purificada fue de: 0,5 mg/mL 106-404 H208A, 1,8 mg/mL 106-404, 20 mg/mL 1-105 y 0,9 mg/mL 1-404. La identidad de cada una de las bandas fue confirmada por western blot, utilizando un anticuerpo anti-integrasa disponible en el laboratorio (figura 14).

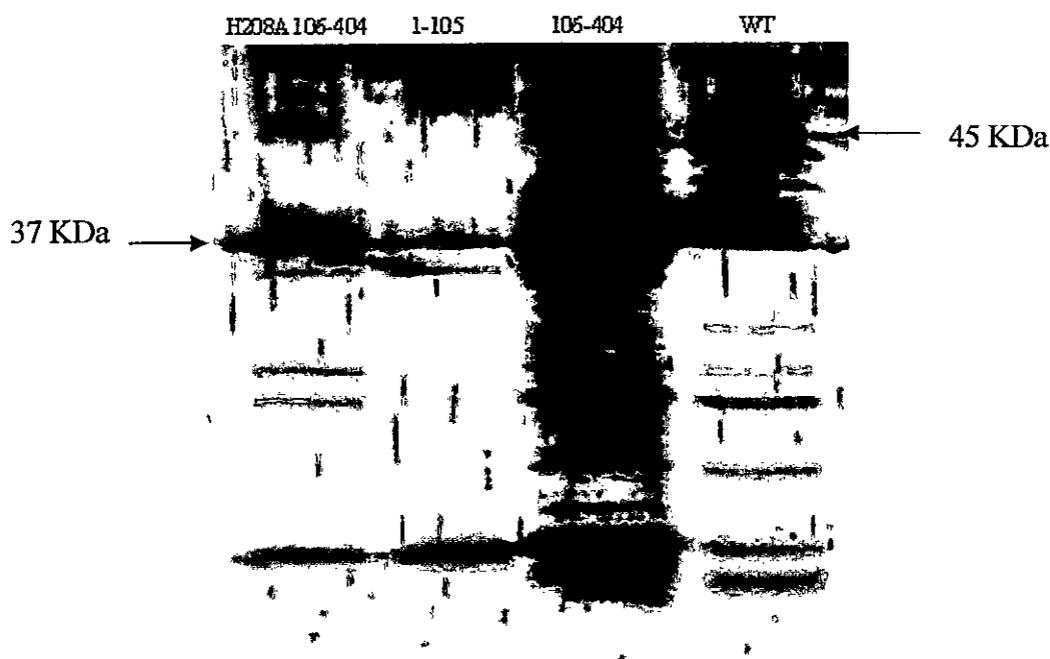


Figura 14. Western Blot integrasas. Para comprobar la expresión de integrasas se realizó un ensayo de Western Blot utilizando un anticuerpo anti-integrasa. En el carril 1 se observa una banda de tamaño similar a la banda observada para IN 106-404 (carril3). El carril 2 corresponde a IN 1-105 y el carril 4 a IN WT.

4.- Actividad de H208A IN 106-404

4.1.- Actividad de transferencia de hebra.

Se ha descrito que el dominio IN 106-404 es capaz de catalizar la transferencia de hebra en presencia del dominio N-terminal IN 1-105 agregado en trans. La actividad de transferencia de hebra de la IN silvestre, de IN 106-404 y de IN H208A 106-404 se observa en la figura 15. Como se observa, los productos de la reacción, que por su mayor tamaño presentan una menor migración en el gel, solo se observan cuando se utiliza IN WT (carriles 2 y 3) o en el caso de IN 106-404 cuando se complementa con el dominio N-terminal, IN 1-105 (carriles 4 y 5). En cambio, no se observan productos de integración en ninguna de las preparaciones de la mutante IN H208A 106-404 (carriles 6 ,7 y 8). Esto indica que tanto la IN WT, como IN 106-404, presentan actividad de integración, mientras que la mutante IN H208A 106-404 es inactiva.

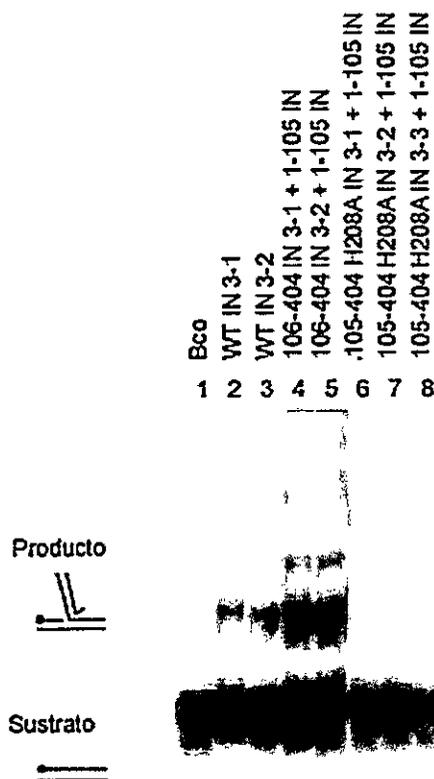


Figura 15. Actividad de transferencia de hebra de mutante IN H208A 106-404.

Evaluación de la actividad de integración de la mutante IN H208A 106-404. El carril corresponde al sustrato sin enzima. Los carriles 2 y 3 corresponden a reacciones con diferentes fracciones de IN WT. Los carriles 4 y 5 corresponden a reacciones utilizando diferentes fracciones de IN 106-404, complementada con dominio N-terminal. Los carriles 6, 7 y 8 corresponden a reacciones de transferencia de hebra con la enzima mutada.

4.2.- Actividad de desintegración

En la figura 16 se muestra la actividad de desintegración utilizando un sustrato dumbbell que presenta un extremo 5' (cola). Como se observa, la IN 106-404 (carril 3) es capaz de generar un producto de menor tamaño, es decir, es capaz de desintegrar en sustrato. En los carriles 3 y 4, correspondientes a la preparación de la mutante IN H208A 106-404, no se observan productos de desintegración.. La figura 17, en tanto, presenta la actividad de desintegración, utilizando un sustrato dumbbell que no presenta el extremo 5' (figura 4). Estudios preliminares (Donzella y col, 1998) demostraron que la IN 106-404 no es capaz de desintegrar un sustrato que carece del extremo ss 5', sin embargo, si se realiza agregar el dominio N-terminal, la proteína recupera su actividad. Según lo observado en el carril 3, IN H208A 106-404 con la mutante IN 1-105, la enzima no genera el producto de desintegración y, por tanto, es inactiva. En el caso de IN 106-404, se observa el producto esperado.



Figura 16. Actividad de desintegración de mutante IN H208A 106-404. Utilizando un sustrato dumbbell con extremo 5' (cola) se evaluó la actividad de desintegración de la mutante IN H208A 106-404. El carril 1 corresponde al sustrato sin enzima. El carril 2 corresponde a la reacción utilizando la enzima IN 106-404. Los carriles 3 y 4 corresponden a la reacción utilizando diferentes fracciones de IN H208A 106-404.

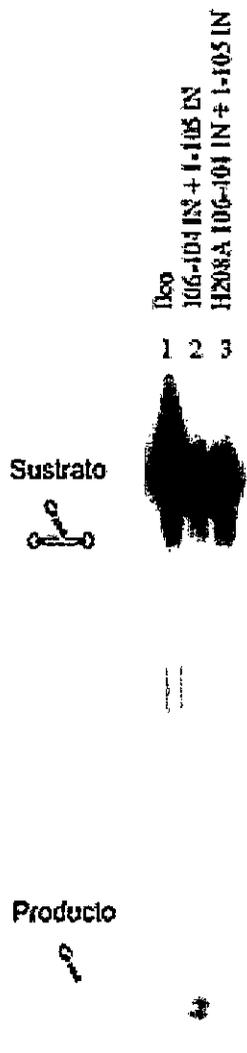


Figura 17. Actividad de desintegración de mutante IN H208A 106-404. Utilizando un sustrato dumbbell sin extremo 5' (cola), se evaluó la actividad de desintegración de la mutante IN H208A 106-404. El carril 1 corresponde al sustrato sin enzima. El carril 2 corresponde a la actividad utilizando IN 106-404 complementada con el dominio N-terminal. El carril 3 corresponde a la actividad de la mutante IN H208A 106-404 complementada con el dominio N-terminal..

5.- Estudios de fotoentrecruzamiento

Al utilizar un sustrato dumbbell que presenta una sustitución con 5-IdU en el extremo 5', se observó una notoria reacción de fotoentrecruzamiento, comparada con el sustrato control sin sustitución (Vera y col, resultados no publicados). El nucleótido sustituido es complementario a la adenina del par 5'-CA-3', reconocido por la enzima en el procesamiento-3'. Experimentos de digestión con proteasas de complejos proteína-ADN fotoentrecruzados, permitieron apuntar hacia un péptido de 5 aminoácidos (LHCAY), que participaría en la reacción de entrecruzamiento. Norris y col, en 1996, describieron la participación de histidina, entre otros aminoácidos, en reacciones de entrecruzamiento con 5-IdU, por lo que se piensa que este residuo (His208) podría estar participando en la reacción.

En la figura 18 se presentan los resultados de la reacción de entrecruzamiento entre el sustrato y las integrasas silvestre, IN 106-404 y IN H208A 106-404. El tamaño del aducto proteína-ADN formado corresponde a aproximadamente 53,8 KDa para la enzima silvestre (carriles 2 y 3) y de 41,7 KDa para la mutante IN 106-404 (carril 4), lo que sugiere una relación 1:1 enzima / sustrato ya descrita. En el caso de la mutante IN H208A 106-404, carril 5, no se observa una formación del aducto del tamaño correspondiente (41,7 KDa), sin embargo, se observa una marca de alrededor de 30 KDa.

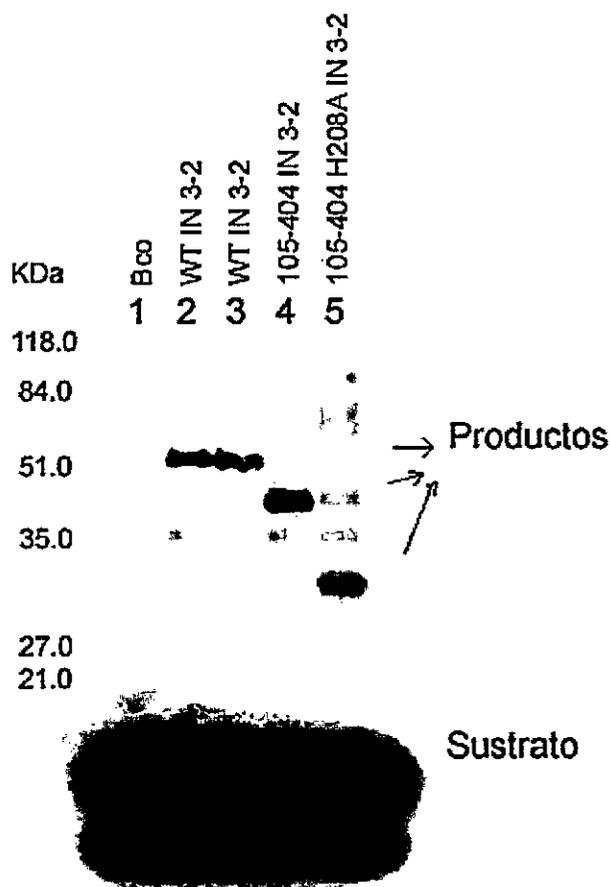


Figura 18. Fotoentrecruzamiento de mutante IN H208A 106-404 con sustratos de desintegración sustituidos con 5-IdU. El carril 1 corresponde al sustrato sin enzima. Los carriles 2 y 3 corresponden a la reacción de fotoentrecruzamiento utilizando diferentes fracciones de la enzima WT. El carril 4 corresponde a la reacción utilizando la enzima IN 106-404. El carril 5 corresponde al producto de la reacción de fotoentrecruzamiento entre el oligo sustituido y la mutante IN H208A 106-404.

Para analizar la naturaleza de la marca radioactiva de alrededor de 30KDa en el carril 5 de la figura 17, se realizó una digestión de los productos de la reacción de

entrecruzamiento con la nucleasa S1. En la figura 18, carril 5, se observa que existió una completa digestión de la marca de alrededor de 30 KDa, sugiriendo la posibilidad de que se hubiese tratado de un dímero de sustrato y no de un aducto formado entre la proteína y el sustrato. Las reacciones con la enzima silvestre (carriles 2 y 3) y con la IN 106-404 (carril 4) fueron utilizadas como control pues se conoce que en las condiciones en que se realizó la reacción, la marca radioactiva permanece en el complejo digerido, ya que se marca el nucleótido en el extremo N-terminal.

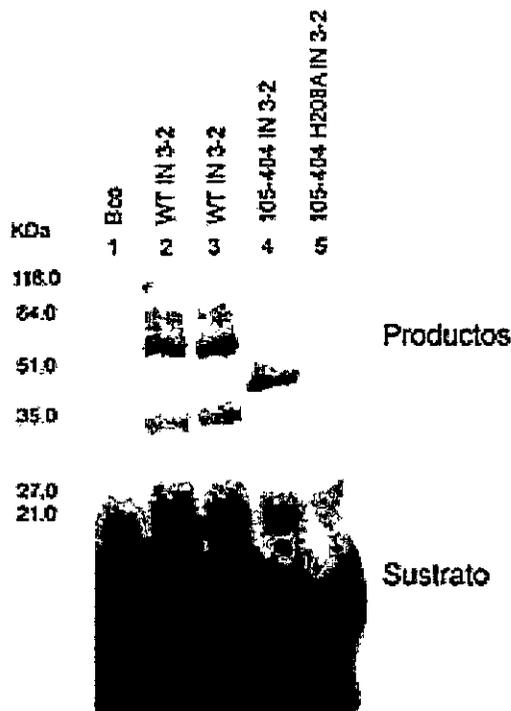


Figura 19. Complejos fotoentrecruzados digeridos con nucleasa S1. El carril 1 corresponde a la reacción sin enzima. Los carriles 2 y 3 corresponden a la reacción utilizando diferentes fracciones de la enzima IN WT. El carril 4 corresponde a la reacción utilizando la enzima IN 106-404. El carril 5 corresponde a la digestión del producto de fotoentrecruzamiento de la mutante IN H208A 106-404 con el oligonucleótido sustituido con 5-IdU.

V. DISCUSIÓN

Para persistir en una célula eucariota, los retrovirus requieren de la inserción estable de su genoma en los cromosomas de la célula huésped. Esta reacción, catalizada por la enzima retroviral integrasa, requiere una serie de procesos en etapas tempranas del ciclo replicativo (Varmus, 1988).

Experimentos de proteólisis (Engelman y Craigie, 1992), mutagénesis por deleción (Bushman y col, 1993) y complementación funcional (Engelman y col, 1993), han revelado que las integrasas se componen de tres dominios estructurales, N-terminal, catalítico y C-terminal. El dominio catalítico, además de tener una triada catalítica invariante que conforma el sitio activo, posee aminoácidos implicados en la interacción con el ADN viral durante la integración en la célula huésped.

Estudiando IN de VIH-1 se concluyó que los nucleótidos conservados 5'-CA-3' del ADN viral cumplen un importante rol en el reconocimiento y la unión de la enzima activa durante la integración (Jonsson y col, 1993); por lo que se postuló que existiría una interacción específica entre estos nucleótidos y ciertas regiones de la IN. Heuer y Brown, en 1997 y 1998, identificaron dos péptidos provenientes del sitio catalítico de IN de VIH-1, que se fotoentrecruzaron con la cola ss-5' de un sustrato que imita al intermediario formado durante la integración. Uno de ellos, que abarcaba del residuo 139 al 152, comprendía una región denominada asa catalítica, que correspondería a una región flexible, encargada de permitir los cambios conformacionales necesarios que permiten a la

enzima reaccionar con el ADN viral a una distancia de separación observada de 5 pb en el ADN blanco (20,4 Å) (Dotan y col, 1995).

Dentro del dominio catalítico, mediante fotoentrecruzamiento y ensayos enzimáticos, se ha señalado que los aminoácidos Lys-159, Tyr-143 y Gln-148 jugarían un rol importante, dado que su mutación puntual se traduce en la pérdida de la actividad de integración en ensayos *in vitro* (Esposito y Craigie, 1998). De estos, Gln 148, como parte del asa flexible de IN de VIH-1, permitiría la estabilización del complejo mediante puentes de hidrógeno, como se muestra en la figura 20 (Johnson y col, 2006)

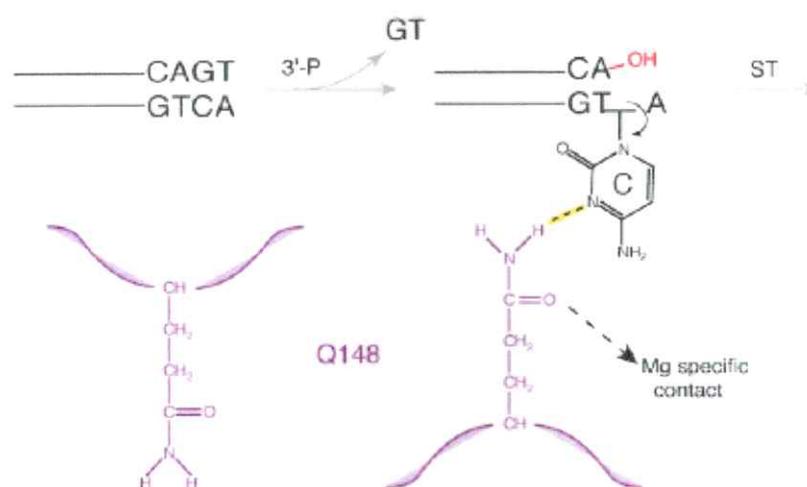


Figura 20. Estabilización del complejo IN-ADN viral en VIH-1. La formación de puentes de hidrógeno entre Gln 148 y la citosina ubicada en la posición -2 permitiría la estabilización del complejo (Johnson y col, 2006).

En IN de M-MuLV, al igual que IN de VIH-1, existe un sustrato de desintegración modelo que imita al intermediario formado durante la integración del LTR en un sitio del

ADN blanco Este oligonucleótido permite el estudio de los dominios de la proteína que están involucrados en la unión y/o el reconocimiento de secuencias del LTR. Donzella y col, en 1998, describieron la importancia de la región del extremo 5' del sustrato de desintegración a través de estudios de complementación realizados con mutantes por delección de la IN de M-MuLV. Según estos estudios, IN 106-404, que carece del dominio N-terminal, no es capaz de catalizar la desintegración de un sustrato que carecía de la cola 5' (figura 4). Sin embargo, al complementar en trans con este dominio aislado (IN 1-105), la actividad era restaurada.

Estudios de entrecruzamiento químico y fotoentrecruzamiento, además de ensayos enzimáticos, han permitido identificar una región de IN de M-MuLV que estaría involucrada en la unión y/o el reconocimiento de secuencias virales tales como el dinucleótido conservado 5'-CA-3' y la región del extremo 5' del sustrato de desintegración (Vera y col, resultados no publicados, 2002). Al utilizar sustratos de desintegración sustituidos en diferentes posiciones con 5-IdU en reacciones con IN M-MuLV, se visualizó la formación de un complejo covalente principal. Los resultados obtenidos fueron similares al utilizar la enzima silvestre y la mutante IN 106-404. Para obtener información acerca de la región de la proteína que participaría en el entrecruzamiento, se realizaron digestiones de complejos IN-ADN con proteasas. Al comparar los péptidos teóricos que se producían de la IN de M-MuLV, se encontró que sólo existe un pequeño péptido derivado del dominio central de la enzima posiblemente LHCAV. De acuerdo a la especificidad del agente entrecruzante utilizado, (5-iodouridina), el residuo de histidina 208 sería un posible blanco en la reacción de fotoentrecruzamiento (Norris y col, 1996).

Previamente, basándose en la estructura tridimensional del dominio catalítico de la IN de HIV-1, J. Vera y col. generaron un modelo para la estructura de la región comprendida entre los residuos Pro178 a Ser238 de la IN de M-MuLV (Val110 a Glu170 en IN de HIV-1, estructura PDB 1BIC3), usando el programa de modelamiento molecular Swiss Model (Figura 20). Al analizar la ubicación del residuo His208, se encontró que este formaría parte de la región flexible de la proteína, denominada asa catalítica. La ubicación de esta asa permite suponer que jugaría un importante rol en las interacciones de la enzima con el ADN, promoviendo cambios estructurales que permitan la formación de un complejo proteína-ADN estable durante la integración y desintegración del sustrato.

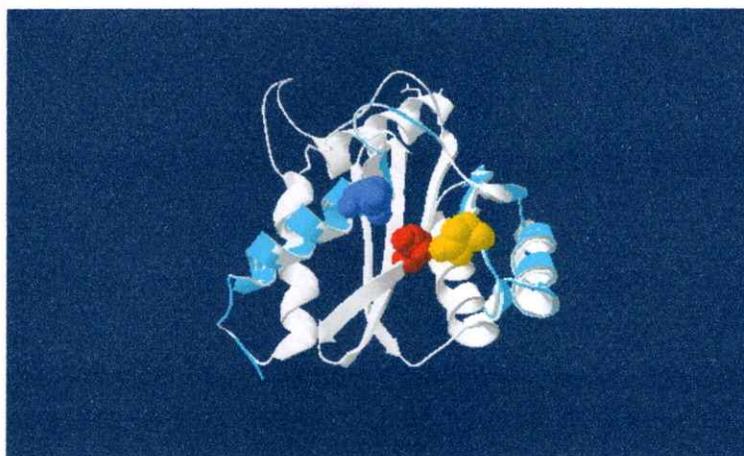


Figura 21. Modelo estructural teórico de la región central de la IN de M-MuLV.

Superposición de las dos estructuras de las INs, de HIV-1 (en blanco) y de M-MuLV (en celeste), destacando los residuos catalíticos de la IN de HIV-1 Asp 64 (rojo), Asp 116 (amarillo) y Glu 152 (azul) (J. Vera, tesis doctorado, programa Swiss Model 3D-PDBViewer 3.7).

Con el propósito de comprobar el rol de la histidina 208 en la actividad de desintegración de la IN de M-MuLV, se diseñó la construcción de la mutante IN H208A 106-404. La ausencia de actividad de desintegración detectada al reaccionar la mutante IN H208A 106-404 con el sustrato de desintegración que presenta el extremo 5', indicaría que el residuo His 208 estaría implicado en el reconocimiento del ADN viral.

Donzella y col, en 1996, describieron que al complementar la mutante 106-404 IN de M-MuLV con el fragmento 1-105 IN la actividad transferencia de hebra se recuperaba. Al realizar este experimento con la mutante IN H208A 106-404, no se observó actividad en esas condiciones. Esta inactividad podría ser explicada porque el asa catalítica podría estar implicada en la multimerización de la enzima y por lo tanto al sustituir la histidina 208, la flexibilidad del asa se vería afectada impidiendo una complementación en trans de la enzima o una correcta disposición de los dominios catalítico y C-terminal para llevar a cabo el ataque nucleofílico al ADN blanco. Donzella y col, en 1999, al modificar químicamente con NEM el residuo Cys 209, observaron que se afectaba la complementación por el dominio HHCC.

Al realizar la reacción de fotoentrecruzamiento entre la enzima mutante IN H208A 106-404 y el oligo sustituido con 5-IdU no se observó una reacción específica, sugiriendo que la histidina 208 estaría implicada en el reconocimiento del extremo 5' del sustrato de desintegración. Estos resultados concuerdan con resultados previos, que sostenían que al modificar la cisteína 209 con NEM no se observaba entrecruzamiento,

sugiriendo que este aminoácido o residuos cercanos, participarían en la unión del extremo 5' del sustrato de desintegración (Vera y col, resultados no publicados, 2002).

Los resultados obtenidos al realizar la actividad de transferencia de hebra y de desintegración con un sustrato que carece del extremo 5', permiten postular que la histidina 208, como parte de un asa flexible, estaría involucrada en la interacción entre el ADN viral y la proteína, a través de su interacción con la adenina ubicada en la posición -2 por medio de puentes de hidrógeno (figura 22).

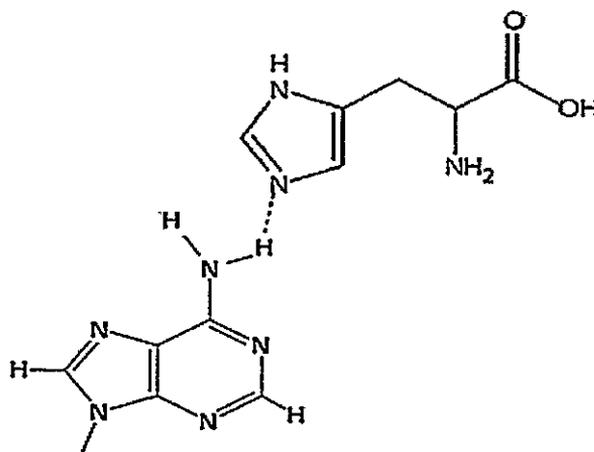


Figura 22. Modelo de estabilización del complejo IN-ADN viral para M-MuLV. Interacción entre adenina -2 e histidina 208 por medio de la formación de puentes de hidrógeno.

VI. CONCLUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis permiten conocer, en parte, la estrecha relación que existe entre el ADN viral y el asa flexible ubicada en el dominio central; y el rol de esta asa en la correcta interacción entre los dominios catalítico y N-terminal.

Considerando los resultados obtenidos, es posible decir que el residuo histidina 208 de la integrasa de M-MuLV participa en el reconocimiento del extremo 5' de un sustrato que imita al intermediario formado durante la integración del ADN viral, dado que al realizar el cambio de este aminoácido por una alanina no se produce la reacción de desintegración.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Blesch A. (2004). Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods*, 33 (2):164-72.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bukrinsky MI, Sharova N, McDonald TL, Pushkarskaya T, Tarpley WG, Stevenson M. (1993). Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (13):6125-9.

Bushman FD, Engelman A, Palmer I, Wingfield P, Craigie R. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3428-32.

Cai M, Zheng R, Caffrey M, Craigie R, Clore GM, Gronenborn AM. (1997). Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat. Struct. Biol.* 4(7):567-77.

Chen JC, Krucinski J, Miercke LJ, Finer-Moore JS, Tang AH, Leavitt AD, Stroud RM. (2000). Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (15):8233-8.

Clayton LK, Sieh M, Pious DA, Reinherz EL. (1989). Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding. *Nature*, 339 (6225):548-51.

Donzella GA, Jonsson CB, Roth MJ. (1996). Coordinated disintegration reactions mediated by Moloney murine leukemia virus integrase. *J Virol*, 70 (6):3909-21.

Donzella GA, Jonsson CB, Roth MJ. (1993). Influence of substrate structure on disintegration activity of Moloney murine leukemia virus integrase. *J Virol*, 67 (12):7077-87.

Donzella GA, Leon O, Roth MJ. (1998). Implication of a central cysteine residue and the HHCC domain of Moloney murine leukemia virus integrase protein in functional multimerization. *J Virol*, 72 (2):1691-8.

Dotan I, Scottoline BP, Heuer TS, Brown PO. (1995). Characterization of recombinant murine leukemia virus integrase. *J Virol* 69 (1):456-68.

Engelman A, Bushman FD, Craigie R. (1993). Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J*, 12 (8):3269-75.

Engelman A, Craigie R. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. : *J Virol*. 1992 Nov;66(11):6361-9.

Engelman A, Englund G, Orenstein JM, Martin MA, Craigie R. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J Virol*. 1995 May;69(5):2729-36.

Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R. (1991). HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell*, 67 (6):1211-21.

Esposito D and Craigie R. (1998). Sequence specificity of viral end DNA binding by HIV-1 integrase reveals critical regions for protein-DNA interaction. *EMBO J*, 17, 5832-5843.

Heuer TS, Brown PO. (1998). Photo-cross-linking studies suggest a model for the architecture of an active human immunodeficiency virus type 1 integrase-DNA complex. *Biochemistry*, 37 (19):6667-78.

Hindmarsh P and Leis J. (1999). Retroviral DNA integration. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63 (4):836-843.

Hickman AB, Palmer I, Engelman A, Craigie R and Wingfield P. (1994). Biophysical and enzymatic properties of the catalytic domain of HIV-1 integrase. *J. Biol. Chem.*, 269 (46):29279-29287.

Hsu M, Wainberg MA. (2000). Interactions between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, tRNA primer, and nucleocapsid protein during reverse transcription. *J Hum Virol*, 3 (1):16-26.

Johnson A, Santos W, Pais G, Marchand C, Amin R, Burke T, Verdine G, Pommier Y. (2006). Integration requires a specific interaction of the donor DNA terminal 5'-cytosine with glutamine 148 of the HIV-1 integrase flexible loop. *J. Biol. Chem*, 281 (1):461-467.

Johnson MS, McClure MA, Feng DF, Gray J, Doolittle RF. (1986). Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (20):7648-52.

Jonsson CB, Donzella GA, Gaucan E, Smith CM, Roth MJ (1996). Functional domains of Moloney murine leukemia virus integrase defined by mutation and complementation analysis. *J Virol*, 70 (7):4585-97.

Jonsson CB, Donzella GA, Roth MJ. (1993). Characterization of the forward and reverse integration reactions of the Moloney murine leukemia virus integrase protein purified from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 268 (2):1462-9.

Kozak SL, Platt EJ, Madani N, Ferro FE Jr, Peden K, Kabat D. (1997). CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 71 (2):873-82.

Kulkosky J, Jones KS, Katz RA, Mack JP, Skalka AM (1992). Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol*, 12 (5):2331-8.

Lu R, Limón A, Ghory H, Engelman A. (2005). Genetic analyses of DNA-binding mutants in the catalytic core domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Virol*. 79(4):2493-2505.

Lutzke RA, Vink C, Plasterk RH. (1994). Characterization of the minimal DNA-binding domain of the HIV integrase protein. *Nucleic Acids Res*, 22 (20):4125-31.

Norris C, Meisenheimer P, Koch T. (1996). Mechanistic studies of the 5-iodouracil chromophore relevant to its use in nucleoprotein photo-cross-linking. *J Am Chem Soc*, 118:5796-5803. Patton GS, Erlwein O, McClure MO. (2004). Cell-cycle dependence of foamy virus vectors. *J Gen Virol*, 85 (10):2925-30.

Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, Ross SR. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (4):2281-6.

Takeda A, Sweet RW, Ennis FA. (1990). Two receptors are required for antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection: CD4 and Fc gamma R. *J Virol*, 64 (11):5605-10.

Turlure F, Devroc E, Silver P, Engelman A. (2004). Human cell proteins and human immunodeficiency virus integration. *Frontiers in Bioscience*, 9:3187-3208.

Varmus H. Retroviruses. (1988). *Science*, 240 (4858):1427-35.

Vink C, Yeheskiely E, van der Marel GA, van Boom JH, Plasterk RH. (1991). Site-specific hydrolysis and alcoholysis of human immunodeficiency virus DNA termini mediated by the viral integrase protein. *Nucleic Acids Res*, 19 (24):6691-8.

Wang JY, Ling H, Yang W, Craigie R. (2001). Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *EMBO J*, 20 (24):7333-43.

Wu X, Li Y, Crise B., Burgess SM. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 300 (5626):1749-51.

Yang F, Leon O, Greenfield NJ, Roth MJ. (1999). Functional interactions of the HHCC domain of moloney murine leukemia virus integrase revealed by nonoverlapping complementation and zinc-dependent dimerization. *J Virol*, 73 (3):1809-17.

Yang F, Seamon JA, Roth MJ. (2001). Mutational analysis of the N-terminus of Moloney murine leukemia virus integrase. *Virology*, 291 (1):32-45.