

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

**LA DNA POLIMERASA DEL BACTERIÓFAGO ϕ 29:
ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN
CON LA PROTEÍNA TERMINAL. BASE
ESTRUCTURAL DE LA PROCESIVIDAD Y LA
CAPACIDAD DE DESPLAZAMIENTO DE BANDA**

TESIS DOCTORAL

IRENE RODRÍGUEZ GARCÍA

Madrid, 2006

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

**LA DNA POLIMERASA DEL BACTERIÓFAGO ϕ 29:
ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN
CON LA PROTEÍNA TERMINAL. BASE
ESTRUCTURAL DE LA PROCESIVIDAD Y
LACAPACIDAD DE DESPLAZAMIENTO DE
BANDA**

Memoria presentada por la Lda. en Ciencias Biológicas Irene Rodríguez García para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Noviembre de 2006

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C.-U.A.M.) bajo la dirección del Dr. Miguel de Vega José y la Dra. Margarita Salas Falgueras.

*Lo importante es no dejar de preguntarse.
La curiosidad tiene su propia razón de existir. Uno no puede evitar
sentirse pasmado cuando se contemplan los misterios de la
eternidad, de la vida, de la maravillosa estructura de la realidad.
Es suficiente con que uno trate de aprehender un poco de ese misterio cada día.*

Albert Einstein

INDICE

<i>Abreviaturas</i>	iv
<i>Glosario de términos no castellanos</i>	vi
<i>Summary</i>	vii

INTRODUCCIÓN

1. LAS DNA POLIMERASAS.....	1
1.1. Clasificación de las DNA polimerasas.....	2
1.2. Características funcionales de las DNA polimerasas.....	5
1.3. Arquitectura básica de las DNA polimerasas.....	6
1.4. La polimerización del DNA: un mecanismo de acción común.....	9
2. LA REPLICACIÓN DEL DNA.....	11
2.1. Fidelidad en la inserción de nucleótidos.....	13
2.2. Capacidad de corrección de errores.....	13
2.3. Procesividad y desplazamiento de banda.....	13
3. LA DNA POLIMERASA DEL BACTERIÓFAGO ϕ 29: paradigma de la replicación.....	15
3.1. Replicación del genoma del bacteriofago ϕ 29.....	16
3.2. Características funcionales de la DNA polimerasa de ϕ 29.....	18
3.3. Estructura tridimensional de la DNA polimerasa de ϕ 29.....	20
OBJETIVOS	24

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES	
1.1. Nucleótidos.....	25
1.2. Proteínas.....	25
1.3. Sustratos de DNA.....	25
2. MÉTODOS	
2.1. Mutagénesis dirigida y expresión de las DNA polimerasas mutantes.....	26
2.2. Balance de las actividades de polimerización y exonucleolisis 3'-5'.....	26
2.3. Ensayo de la actividad exonucleasa 3'-5'.....	27
2.4. Ensayo de interacción DNA polimerasa/sustrato de DNA.....	27
2.5. Ensayo de fidelidad <i>in vitro</i>	28
2.6. Ensayo de procesividad sobre sustratos de DNA de corta longitud.....	28
2.7. Ensayo de desplazamiento de banda.....	29

2.8. Ensayo de síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda (replicación de DNA de M13).....	29
<i>Ensayos de actividades específicas de DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal</i>	
2.9. Ensayo de iniciación de la replicación (formación del complejo TP-dAMP).....	30
2.10. Ensayo de replicación de $\phi 29$ TP-DNA.....	30
2.11. Ensayo de amplificación de $\phi 29$ TP-DNA.....	31
<i>Análisis de la interacción entre la TP y las DNA polimerasas mutantes</i>	
2.12. Ensayo de interferencia.....	31
2.13. Ensayo de cosedimentación.....	31
<i>Comparaciones de secuencias de aminoácidos y modelado estructural.....</i>	32

RESULTADOS

Capítulo I:

<i>Interacción DNA polimerasa de $\phi 29$-TP (I):</i> El residuo Phe128 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, perteneciente al motivo conservado (S/T)Lx ₂ h, se requiere para llevar a cabo una interacción estable y funcional con la proteína terminal.....	33
---	----

Capítulo II:

<i>Interacción DNA polimerasa de $\phi 29$-TP (II):</i> Implicación de residuos conservados específicamente en DNA polimerasas que inician la replicación con TP.....	44
--	----

Capítulo III:

<i>Interacción DNA polimerasa de $\phi 29$-TP (III):</i> La inserción TPR1, conservada en las DNA polimerasas que inician la replicación con TP, está implicada en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el sitio activo de polimerización.....	53
---	----

Capítulo IV:

Un subdominio específico en la DNA polimerasa de $\phi 29$ confiere procesividad y desplazamiento de banda durante la replicación.....	63
--	----

Capítulo V:

Estudio del movimiento relativo entre los subdominios TPR2 y <i>thumb</i> de la DNA polimerasa de $\phi 29$ durante el proceso de replicación.....	71
--	----

DISCUSIÓN

1. Residuos aminoacídicos conservados específicamente en DNA polimerasas que inician la replicación con TP.....	78
1.1. Implicación del dominio exonucleasa 3'-5' en la interacción con la TP	
1.1.1. El residuo Phe128 de la DNA polimerasa de ϕ 29.....	79
1.1.2. Los residuos Arg96, Lys110, Lys112, Arg113 y Lys114 de la DNA polimerasa de ϕ 29.....	82
1.2. Implicación de la inserción TPR1 en la interacción con la TP	
1.2.1. Los residuos Lys305 y Tyr315 de la DNA polimerasa de ϕ 29.....	86
2. Un subdominio específico de la DNA polimerasa de ϕ 29 confiere procesividad y desplazamiento de banda.....	89
3. La replicación del genoma de ϕ 29 requiere una interacción dinámica entre los subdominios TPR2 y <i>thumb</i>	92
CONCLUSIONES	95
<i>Bibliografía</i>	98

Abreviaturas

ATP: adenosina-5'-trifosfato.

BSA: seroalbúmina bovina.

C-terminal: carboxilo terminal.

DBP: proteína de unión a DNA de cadena doble.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

dATP: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato.

dCTP: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato.

ddNTP: 2', 3'-didesoxinucleósido-5'-trifosfato.

dGTP: 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato.

dNTP: 2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato.

DTT: ditioneitol.

dsDNA/ssDNA: DNA de cadena doble/DNA de cadena sencilla.

dTTP: 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

h: hora.

kb: kilobase.

kDa: kilodalton.

mer: número de nucleótidos de un oligómero.

min: minuto.

nt: nucleótido.

N-terminal: amino terminal.

p: peso.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.

pb: par de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Pol: DNA polimerasa.

RT: transcriptasa reversa.

RNA: ácido ribonucleico.

s: segundo.

SDS: dodecil sulfato sódico.

SSB: proteína de unión a DNA de cadena sencilla.

TP: proteína terminal.

φ29 TP-DNA: DNA del bacteriófago φ29 con una molécula de proteína terminal unida covalentemente a cada uno de sus extremos 5'.

TP-dNMP: complejo covalente formado por la proteína terminal de $\phi 29$ y un residuo de dNMP.

Tris: trihidroximetil aminometano.

v: volumen.

wt: *wild-type* (tipo salvaje).

Glosario de términos no castellanos incluidos en esta tesis

En la medida de lo posible, se ha intentado evitar el uso de anglicismos. Sólo en los casos que se indican a continuación se ha preferido mantener la nomenclatura inglesa, bien sea por no existir una correspondencia apropiada en castellano, o por estar su uso muy generalizado en el lenguaje científico.

Downstream: término empleado para referirse a la cadena de DNA que hibrida con la cadena molde y cuyo extremo 5' se localiza "hacia abajo" una distancia determinada del extremo 3' de la cadena iniciadora.

Gap: hueco o espacio de ssDNA de longitud variable existente en un dsDNA.

Kit: equipo o conjunto de materiales que se requieren para un proceso determinado.

Loop: estructura flexible a modo de bucle o lazo presente en determinados dominios de algunas proteínas.

Palm, fingers y thumb: subdominios que conforman el dominio de polimerización de las DNA y RNA polimerasas, llamados así por la similitud que presentan con la palma, dedos y pulgar de una mano derecha.

Sliding-back: Término empleado para describir la translocación en sentido reverso del complejo TP-dAMP tras la reacción de iniciación por la DNA polimerasa de $\phi 29$.

Sliding-clamp: complejo proteico de estructura toroidal que confiere procesividad a DNA polimerasas replicativas durante la replicación.

Upstream: término empleado para la cadena de DNA hibridada con la cadena molde y cuyo extremo 3' será utilizado como iniciador de la replicación por la DNA polimerasa.

Wild-type: tipo salvaje, sin modificación genética. Término empleado para referirse a la DNA polimerasa de $\phi 29$, utilizada como control en los estudios de mutagénesis.

Summary

Bacteriophage $\phi 29$ encodes a DNA-dependent DNA polymerase belonging to the eukaryotic-type (family B) subgroup of DNA polymerases that use a protein as primer for initiation of DNA replication. $\phi 29$ DNA replication requires the formation of an heterodimer between the $\phi 29$ DNA polymerase and a free terminal protein (TP) molecule. During initiation, this polymerase catalyses the addition of dAMP to the OH group of Ser232 in the TP. It has been demonstrated that the same DNA polymerase that accomplishes initiation catalyses the elongation processively and coupled to strand displacement without the need of either processivity factors or helicase-like proteins.

The $\phi 29$ DNA polymerase has served as model for the study of the biochemical features and of the structure-function relationships of DNA polymerases by means of an exhaustive mutational analysis of the enzyme, carried out over more than one decade.

In this work, we have studied the functional role of several residues with a high degree of conservation among protein-primed DNA polymerases in specific reactions for these polymerases. Mutations introduced at residues Phe128, Glu161, Arg96, Lys110, Lys112, Arg113 and Lys114, belonging to the N-terminal domain of $\phi 29$ DNA polymerase, allow us to propose a contribution of those amino acids in establishing the appropriate interactions with DNA polymerase substrates, DNA and TP, to successfully accomplish the first steps of TP-DNA replication. In addition, we analysed the role of two conserved residues, Lys305 and Tyr315, of $\phi 29$ DNA polymerase located at the insertion called TPR1 (Terminal Protein Region 1), only found in the subgroup of DNA polymerases that use a TP as primer. We found that these residues are involved in the correct positioning of the primer-terminus at the polymerase active site. Mutations at these residues produced a severe impairment in the ability to replicate $\phi 29$ TP-DNA.

On the other hand, recent crystallographic studies of $\phi 29$ DNA polymerase have provided structural insights into its intrinsic processivity and ability to couple strand displacement to DNA synthesis. Biochemical analysis of a $\phi 29$ DNA polymerase deletion mutant lacking the TPR2 (Terminal Protein Region 2) subdomain demonstrates that it plays a critical role in processivity and strand displacement.

Finally, we studied the possible molecular dynamics between the TPR2 and *thumb* subdomains of $\phi 29$ DNA polymerase during $\phi 29$ DNA replication.

La transmisión de la información genética de un organismo de una generación a la siguiente ha sido uno de los principales objetivos en el estudio de los procesos que ocurren en la naturaleza. En la mayoría de los organismos, dicha información genética está contenida en una molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), requiriéndose la duplicación exacta de esta molécula para la transmisión del material genético de una célula parental a dos células hijas, proceso conocido como replicación (Kornberg y Baker, 1992). En dicho proceso intervienen un número diferente de enzimas y factores proteicos dependiendo, en gran medida, de la complejidad del organismo, llegando a constituir, a veces, verdaderas maquinarias proteicas. Sin embargo, en todos los sistemas vivos cuyo genoma es DNA, desde bacteriófagos a eucariotas, existe una enzima responsable de catalizar la adición de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) en el extremo de un iniciador de manera complementaria a una de las cadenas de DNA que actúa como molde. Estas enzimas son las DNA polimerasas, componentes centrales en la replicación y reparación del DNA, procesos que duplican los genomas y mantienen su integridad para asegurar la transmisión fiel de la información genética.

1. Las DNA polimerasas

En 1953, Watson y Crick, en el artículo donde describían la doble hélice de DNA, comentaban: “No ha escapado a nuestra atención que el apareamiento específico que hemos postulado sugiere un posible mecanismo de copia para el material genético” (Watson y Crick, 1953). Poco después, en 1958, el grupo de Arthur Kornberg descubriría la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, siendo el primer ejemplo conocido de esta clase de enzimas (Lehman et al., 1958). En los últimos años ha habido un gran avance en el conocimiento de los mecanismos de replicación del material genético gracias a la identificación de un creciente número de DNA polimerasas. Estos estudios han llevado a ampliar los límites funcionales atribuidos a esta enzima. La versatilidad que hoy día es conferida a las DNA polimerasas proviene de la caracterización de éstas no sólo en procesos de replicación y reparación, sino también en otros mecanismos como la recombinación y regulación del ciclo celular (ver Figura 1). Fiel reflejo de dicha versatilidad funcional es el hecho de haber sido identificadas 5 polimerasas diferentes en *E. coli*, 9 en *Saccharomyces cerevisiae*, y 16 en humanos (Goodman y Tippin, 2000; Hubscher et al., 2002; Shcherbakova et al., 2003).

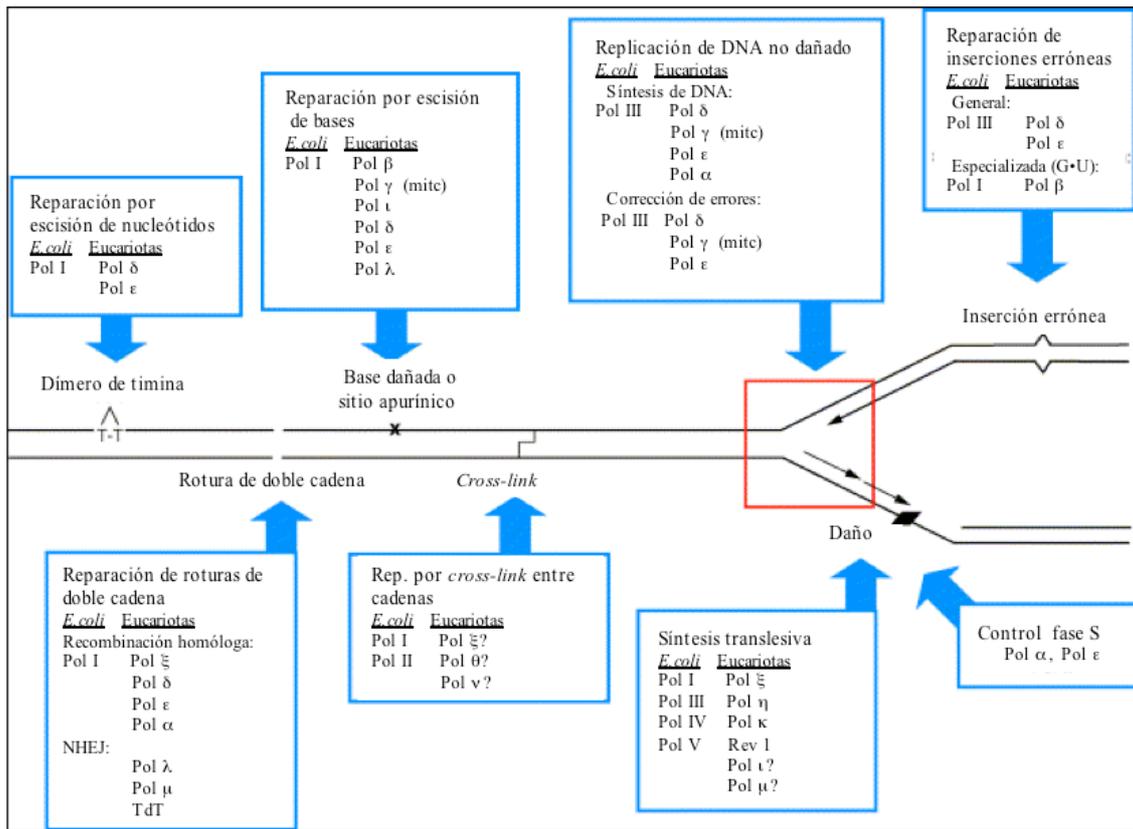


Figura 1. DNA polimerasas implicadas en replicación, reparación y síntesis translesiva de DNA.

1.1. Clasificación de las DNA polimerasas

En base a las diferencias en estructura primaria (Braithwaite e Ito, 1993; Delarue et al., 1990; Ito y Braithwaite, 1991) y en el comportamiento frente a drogas inhibitorias, así como al análisis de la estructura tridimensional (Steitz et al., 1994), las DNA polimerasas han sido clasificadas en diferentes familias.

La familia A, llamada así por el gen *pol A* de *E. coli* que codifica a la DNA polimerasa I, comprende DNA polimerasas replicativas y de reparación. Pertenecen a las primeras la DNA polimerasa de los bacteriófagos T3, T5 y T7, así como la DNA polimerasa mitocondrial eucariótica γ. Las DNA polimerasas replicativas suelen interactuar con otras proteínas con el fin de llevar a cabo una síntesis eficiente y fiel del material genético. Es el caso de la tiorredoxina de *E. coli* que interactúa con la DNA polimerasa del bacteriófago T7 confiriéndole procesividad en el proceso de replicación (Bedford et al., 1997). Las enzimas de reparación incluyen la DNA polimerasa I de *E. coli*, la Pol I de *Thermus aquaticus* (*Taq*) y la Pol I de *Bacillus stearothermophilus*, así como dos nuevas DNA polimerasas identificadas en células humanas, Pol θ (Seki et al., 2003; Sharief et al., 1999) y Pol ν (Marini et al., 2003).

Muchas de las DNA polimerasas de la familia A presentan actividad exonucleasa 5'-3', que interviene en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki generados durante la síntesis

de la cadena retrasada (Baker y Kornberg, 1992), así como una actividad exonucleasa 3'-5', responsable de la "corrección de errores" durante la replicación (ver más adelante).

La familia B comprende aquellas DNA polimerasas homólogas a la DNA polimerasa II de *E. coli* (Ito y Braithwaite, 1991), producto del gen *pol B*, conocidas también como eucarióticas o de tipo α por la similitud que presentan con la DNA polimerasa α eucariótica. Suelen estar formando parte de un complejo multiproteico en el que están presentes, entre otros, factores de procesividad, helicasas y proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (Baker y Kornberg, 1992). A esta familia pertenecen las DNA polimerasas que llevan a cabo la replicación procesiva del DNA cromosómico durante la división celular en eucariotas. Las DNA polimerasas pertenecientes a esta familia se caracterizan por una potente actividad exonucleasa 3'-5', que puede llegar a ser más de 1.000 veces mayor que la caracterizada en las DNA polimerasas de la familia A (Capson et al., 1992; Lin et al., 1994). La familia B comprende DNA polimerasas de organismos procariotas y eucariotas, incluyendo así a las DNA polimerasas replicativas de virus, bacteriófagos como T4 y RB69, arqueobacterias y las DNA polimerasas eucariotas α , δ y ϵ . Pertenecen también a esta familia la DNA polimerasa ζ (Nelson et al., 1996), implicada en llevar a cabo la síntesis de DNA sobre sustratos "dañados" (síntesis translesiva, TLS), y la Pol σ (Kaguni, 2004), que interviene en la reparación de roturas de doble cadena por recombinación homóloga.

Dentro de esta familia existe un subgrupo de DNA polimerasas que inician la replicación a partir de un grupo hidroxilo (-OH) perteneciente a un residuo aminoacídico de una proteína terminal (TP). A este grupo pertenece la DNA polimerasa de ciertos organismos que tienen como genoma una molécula de DNA de doble cadena (dsDNA) lineal, como es el caso de los bacteriófagos ϕ 29, PRD1 y Cp1, de algunos virus eucariotas como adenovirus y hepadnavirus, plásmidos lineales, así como del cromosoma de *Streptomyces lividans* (Salas, 1991).

La familia C agrupa a las DNA polimerasas encargadas de la replicación del cromosoma bacteriano (Kornberg y Baker, 1992). Como ocurre en el resto de DNA polimerasas replicativas, éstas interactúan con otras proteínas y forman grandes complejos multiproteicos en los que una actividad enzimática central está asociada con componentes adicionales que estimulan dicha actividad (holoenzima) (Kornberg y Baker, 1992). Esta familia incluye a la DNA polimerasa III de *E. coli*, cuya subunidad catalítica (subunidad α) es codificada por el gen *pol C*, así como a las DNA polimerasas replicativas de la mayoría de bacterias Gram-positivas (Bruck et al., 2003; Dervyn et al., 2001). La subunidad α de *E. coli*, que contiene la actividad de polimerización, está asociada a la subunidad ϵ , responsable de la actividad exonucleasa 3'-5' (Kelman y O'Donnell, 1995). Se ha obtenido recientemente la primera estructura cristalina de una polimerasa replicativa bacteriana (Bailey et al., 2006). A diferencia de las DNA polimerasas

replicativas eucarióticas pertenecientes a las familias A y B, el subdominio *palm* de estas polimerasas presenta un plegamiento y conectividad idénticos a la familia X.

Las DNA polimerasas encontradas en el subdominio euriarqueota de arqueas constituyen **la familia D**. Poco se conoce acerca de estas polimerasas ya que se está en una etapa temprana de su caracterización. Estas enzimas son heterodiméricas (Uemori et al., 1997), presentando la subunidad más pequeña cierta homología con la DNA polimerasa δ eucariótica (Cann et al., 1998). La subunidad mayor contiene la región catalítica. La caracterización de la DNA polimerasa II de *Pyrococcus furiosus* ha permitido identificar en la misma actividad tanto polimerasa como exonucleasa 3'-5' (Uemori et al., 1997).

La familia X incluye DNA polimerasas implicadas fundamentalmente en procesos de reparación. Son enzimas monoméricas que se caracterizan por ser distributivas y carecer de actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores. Dentro de esta familia encontramos la DNA polimerasa eucariótica más pequeña identificada, la DNA polimerasa β (Abbotts et al., 1988), que tiene preferencia por sustratos de DNA que carecen de algunos nucleótidos en su secuencia (*gap*) (Singhal y Wilson, 1993). Además del dominio de polimerización, estas DNA polimerasas presentan un dominio N-terminal denominado “dominio de 8 kDa” que interacciona con el grupo fosfato 5' de la cadena no molde *downstream* en un *gap* (Sawaya et al., 1997). En algunos casos, este dominio posee actividad desoxirribosa fosfato-liasa (dRP-liasa), implicada en el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER), importante para la reparación de sitios abásicos presentes en el DNA (Matsumoto y Kim, 1995). Algunos miembros de esta familia tienen dominios adicionales como el dominio BRCT (dominio BRCA1 C-terminal), que desempeña un papel importante en interacciones proteína-proteína o proteína-DNA (Bork et al., 1997; Callebaut y Mornon, 1997). Otros miembros de esta familia son la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Bollum, 1960), Pol λ (García-Díaz et al., 2000; Aoufouchi et al., 2000; Nagasawa et al., 2000) y Pol μ (Domínguez et al., 2000). Esta última parece estar relacionada con procesos de reparación de roturas de doble banda y con un mecanismo de diversificación de los receptores de antígeno, la hipermutación somática (Domínguez et al., 2000; Ruíz et al., 2001). El descubrimiento reciente de un miembro de esta familia en la bacteria *Deinococcus radiodurans* (Lecoite et al., 2004), así como de muchas pautas de lectura abierta (ORFs) identificadas en bacterias y arqueas, demuestra su presencia en los tres dominios de la vida (Aravind et al., 1999), lo cual sugiere que están desempeñando funciones celulares importantes.

La familia Y. La presencia de agentes que dañan el DNA induce la expresión de este tipo de enzimas. Cuando se produce una parada en la horquilla de replicación como consecuencia de un daño en el DNA, estas DNA polimerasas son capaces de “interpretar” la información de la cadena dañada incorporando dNMPs, permitiendo así la continuidad del proceso replicativo. No son, por tanto, DNA polimerasas de reparación, sino más bien de

tolerancia al daño durante la replicación del DNA. Gracias a su capacidad de llevar a cabo síntesis de DNA sobre sustratos “dañados”, las DNA polimerasas pertenecientes a esta familia favorecen la supervivencia de la célula. Exhiben elevadas tasas de error como consecuencia de una baja fidelidad de inserción, así como de la ausencia de actividad exonucleasa 3'-5' (Zhou et al., 2001). Cada una de estas DNA polimerasas difiere en la especificidad del sustrato sobre el que actúan.

En *E. coli*, dos de las cinco polimerasas identificadas pertenecen a esta familia, Pol IV (DinB) y Pol V (UmuC) (Ohmori et al., 2001). Proteínas homólogas a UmuC y DinB existen en todas las eubacterias, y homólogos de DinB se han encontrado incluso en algunas arqueas (Kulaeva et al., 1996). En humanos, han sido descritas la Pol η , ι , κ y una desoxicitidil transferasa dependiente de molde (Rev1) (McDonald et al., 1990; Ohashi et al., 2000).

La familia de las Transcriptasas Reversas (RTs) incluyen las RTs de retrovirus y las telomerasas eucarióticas. Las RTs interactúan con un amplio espectro de sustratos de ácidos nucleicos para convertir un genoma viral de RNA de cadena sencilla en un DNA proviral de doble cadena (Gotte et al., 1999). Dentro de esta familia se han identificado polimerasas diméricas, como en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y polimerasas monoméricas, como ocurre en el virus de la leucemia murina de Moloney (MuLV). Estas enzimas poseen un dominio polimerasa así como un dominio RNasa H, este último con objeto de degradar el RNA viral durante la síntesis de DNA (Moelling et al., 1971).

En el caso de las telomerasas eucarióticas, estas DNA polimerasas utilizan como molde su propio RNA (Greider y Blackburn, 1985).

1.2. Características funcionales de las DNA polimerasas

A pesar de la diversidad existente entre las DNA polimerasas, se pueden establecer una serie de características presentes en la práctica totalidad de este grupo de enzimas (Kornberg y Baker, 1992):

- Utilización de **dNTPs** para llevar a cabo la polimerización del DNA, mediante la incorporación secuencial de desoxirribonucleósidos monofosfato (dNMPs), con la posterior liberación de una molécula de pirofosfato (PP_i). Algunas son capaces de incorporar ribonucleótidos (NTPs) con gran eficiencia, como es el caso de la Pol μ (Ruíz et al., 2003).
- Requerimiento de un **molde**. La reacción de polimerización es dirigida por una cadena molde de DNA que es copiada según las reglas de apareamiento de bases predichas por Watson y Crick, dictando de esta forma el orden de incorporación de los dNTPs. Este descubrimiento fue especialmente importante no sólo porque proporcionó la base química de la replicación semiconservativa del DNA, sino porque representó el primer ejemplo del uso de un molde para guiar una reacción biosintética. No obstante, se han identificado DNA

polimerasas con capacidad para llevar a cabo la síntesis en ausencia de molde, como es el caso de la TdT y Pol μ (Bollum, 1960; Domínguez et al., 2000).

- Para iniciar la síntesis de DNA, las DNA polimerasas requieren **un iniciador o cebador** que aporte un grupo -OH al que se pueden añadir nucleótidos dado que no pueden llevar a cabo la síntesis *de novo* de una cadena de DNA. Un iniciador puede ser un segmento de cadena de DNA o RNA, o incluso, algunas DNA polimerasas utilizan el grupo -OH de un aminoácido específico (Ser, Thr o Tyr) de una proteína terminal (Salas, 1991).
- Para que tenga lugar la reacción de transferencia de nucleótidos se requiere la presencia de un par de **iones metálicos divalentes**, preferentemente Mg^{2+} (Steitz et al., 1994), que actúan como cofactores en dicha reacción.
- La **síntesis de DNA es direccional**; las DNA polimerasas catalizan la síntesis desde el extremo 5' al extremo 3' de la cadena de DNA.

Aparte de estas propiedades comunes entre las DNA polimerasas, también se pueden definir diferencias funcionales. Algunas polimerasas tienen actividades enzimáticas adicionales a la polimerización, como actividad exonucleasa 3'-5', actividad exonucleasa 5'-3' (Baker y Kornberg, 1992; Lyamichev et al., 1993), actividad RNasa H, actividad dRP-liasa (Saxowsky et al., 2002; Sobol y Wilson, 2001), o actividad primasa, entre otras. Estas actividades pueden residir en dominios separados dentro del mismo polipéptido, o estar localizadas en subunidades separadas pero firmemente asociadas entre sí.

1.3. Arquitectura básica de las DNA polimerasas

La porción C-terminal de la Pol I de *E. coli* (fragmento *Klenow*, Pol Ik) (Klenow y Henningsen, 1970), que carece del dominio exonucleasa 5'-3', fue la primera estructura de una DNA polimerasa en ser resuelta cristalográficamente (Ollis et al., 1985). Se identificaron dos dominios estructural y funcionalmente diferenciados, el dominio de polimerización y el dominio exonucleasa 3'-5'. Posteriormente, se obtuvieron diferentes estructuras de esta enzima con un sustrato de DNA unido en el dominio exonucleasa 3'-5' (Beese et al., 1993a; Freemont et al., 1988), con dNTP y con PP_i (Beese et al., 1993b). Desde los inicios del estudio estructural de Pol Ik, la estructura del dominio polimerasa ha sido comparada a una mano derecha ligeramente abierta, distinguiéndose tres subdominios llamados *palm*, *fingers* y *thumb*, siguiendo la similitud anatómica (Ollis et al., 1985). Estructuras posteriores de DNA polimerasas muestran que esta topología está universalmente conservada entre las diferentes familias de DNA polimerasas pese a la poca homología de secuencia observada entre ellas (ver Figura 2).

El subdominio *palm*, formado por cadenas β antiparalelas, contiene los residuos catalíticos, conservados evolutivamente, que coordinan dos iones metálicos divalentes. De hecho, todas las polimerasas presentan el mismo mecanismo de dos iones metálicos para catalizar la reacción de transferencia de nucleótidos (Wang et al., 1997). Este subdominio forma

la base del surco de unión del DNA constituido por los subdominios *fingers* y *thumb*. Más allá de este aspecto común, las polimerasas son muy diversas tanto entre diferentes familias como dentro de las mismas. El subdominio *fingers*, formado generalmente por hélices α , está implicado en la unión del nucleótido entrante, así como en el establecimiento de contactos con la cadena molde.

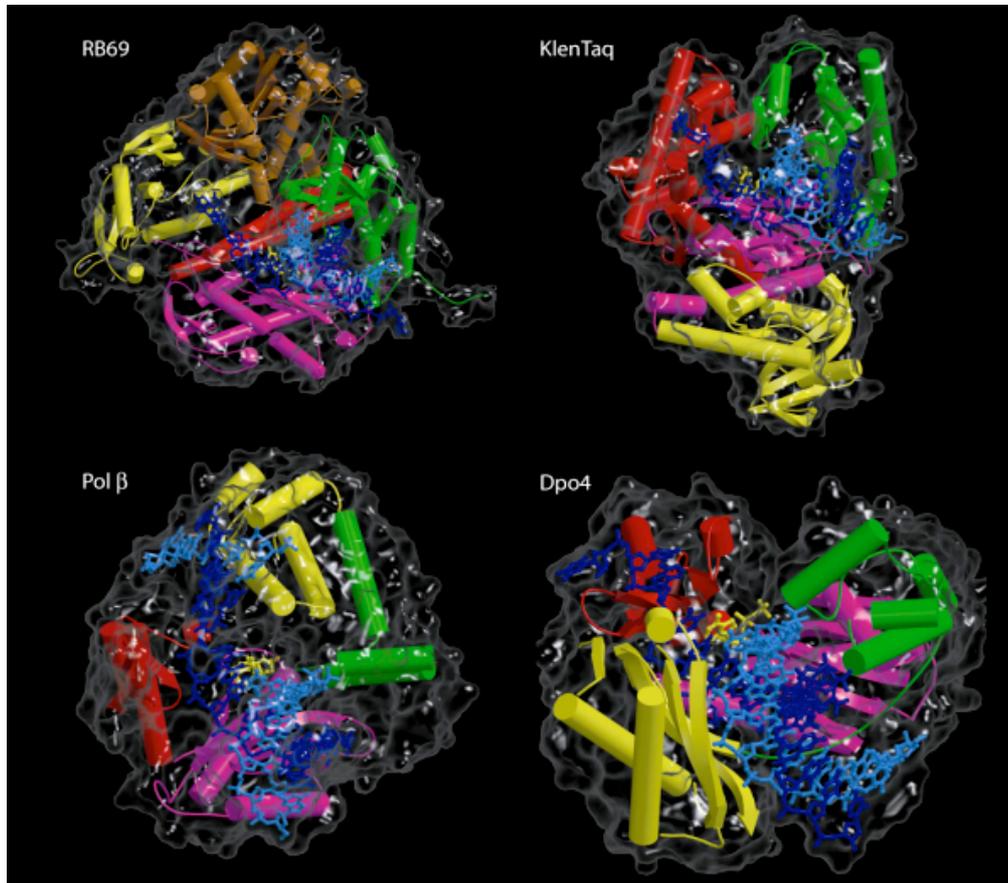


Figura 2. Plegamiento común entre las diferentes DNA polimerasas. Representación de la estructura ternaria de DNA polimerasas de las familias A (KlenTaq (fragmento Klenow de *Taq*)), B (DNA polimerasa del bacteriófago RB69), X (Pol β humana) e Y (Dpo4 de *Sulfolobus solfataricus*). Los elementos de estructura secundaria de los distintos dominios se muestran coloreados: en malva el subdominio *palm*, en rojo el subdominio *fingers*, y en verde el subdominio *thumb*. Los subdominios adicionales se muestran en amarillo (el dominio N-terminal de la polimerasa de RB69 y de KlenTaq, el de 8kDa de la Pol β , y el subdominio *little fingers* de la Dpo4). El dominio exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa de RB69 se muestra en marrón. La superficie transparente representa la superficie molecular de la enzima. La figura se ha tomado de la Tesis Doctoral de García-Díaz (2003).

Por otro lado, el subdominio *thumb*, con un marcado carácter α helicoidal, es responsable de estabilizar la interacción de la DNA polimerasa con el producto dúplex de DNA, así como de coordinar las actividades de polimerización y exonucleasa 3'-5' en aquellas polimerasas que la poseen (Beese et al., 1993a; Minnick et al., 1996; Bedford et al., 1997; Shamoo y Steitz, 1999; Franklin et al., 2001; Pérez-Arnaiz et al., 2006). Estos subdominios se han visto en DNA polimerasas de la familia A (T7, *Taq*, *B. stearothermophilus*) (Doublé et

al., 1998; Kiefer et al., 1998; Korolev et al., 1995), de la familia B (RB69, *Thermus gorgonarius*, *P. kodakaraensis*, *Thermococcus litoralis*, $\phi 29$) (Wang et al., 1997; Hopfner et al., 1999; Hashimoto et al., 2001; Rodríguez et al., 2000; Kamtekar et al., 2004), de la familia X (Pol β , Pol λ) (Pelletier, 1994; García-Díaz et al., 2004), de la familia Y (DinB de *S. solfataricus*, η de *S. cerevisiae*, Pol ι humana (Silvian et al., 2001; Trincao et al., 2001; Nair et al., 2004), y en RTs (MuLV, HIV-1 y HIV-2) (Das and Georgiadis, 2004; Esnouf et al., 1995; Hsiou et al., 1996; Rodgers et al., 1995; Ren et al., 2002). En estas últimas, el subdominio *fingers* está formado por dos cadenas β antiparalelas. Aparte de este patrón estructural común observado en todas las familias de DNA polimerasas, se han encontrado otros dominios y estructuras diversas, algunas de ellas específicas de la familia en cuestión (ver Figura 3). Entre ellas destacaríamos el dominio 3'-5', responsable de la capacidad correctora de errores, presente

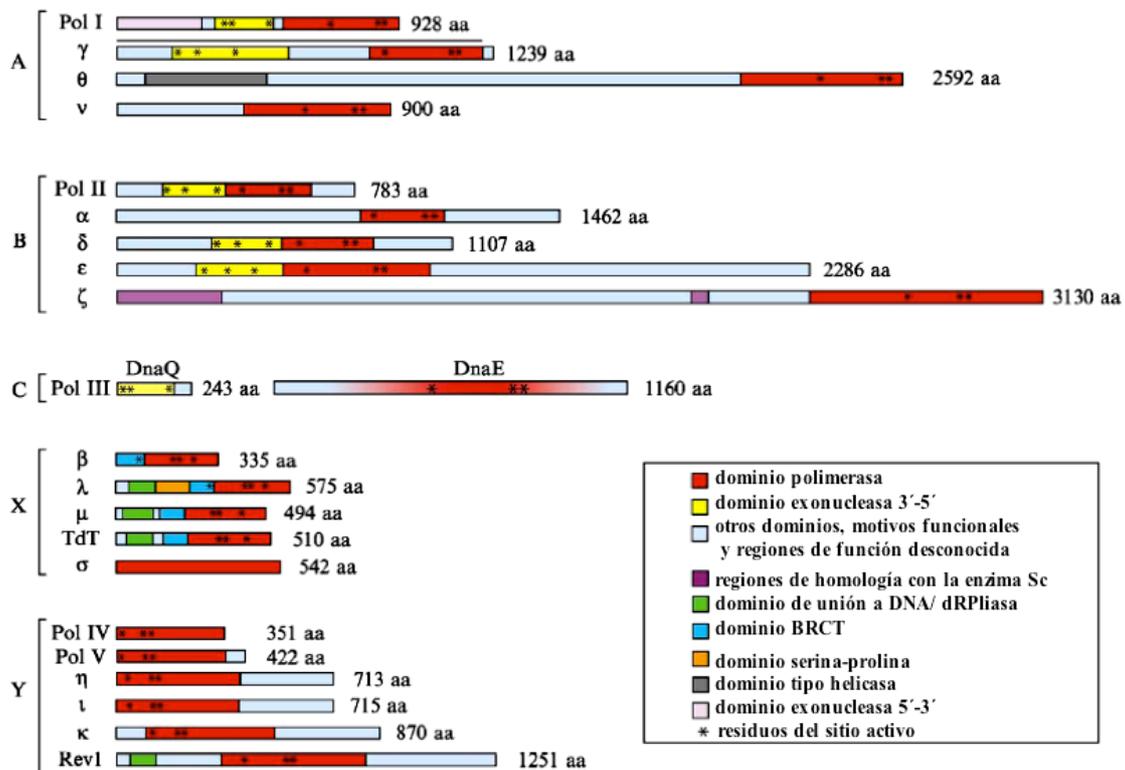


Figura 3. Organización modular de DNA polimerasas de diferentes familias.

en miembros de la familia A, B y C, que se localiza en una posición N-terminal respecto al dominio de polimerización (Bernad et al., 1989). Las DNA polimerasas de los bacteriófagos RB69 y T4, ambas pertenecientes a la familia B, presentan un dominio N-terminal que interacciona específicamente con su propio RNA mensajero con objeto de reprimir su traducción, regulando de esta forma su expresión. Por otra parte, las DNA polimerasas de la familia X contienen el anteriormente mencionado dominio de 8 kDa, en determinados casos con actividad dRP-liasa, así como otros dominios exclusivos de algunos miembros de DNA

polimerasas pertenecientes a esta última familia, como los dominios BRCT, PHP (fosfodiesterasa) o APE (AP endonucleasa). Entre los miembros de la familia Y se ha identificado un subdominio adicional en el extremo C-terminal llamado *little fingers* o dominio asociado a polimerasa (PAD), conectado al *thumb* pero localizado físicamente junto al subdominio *fingers*. La capacidad de estas polimerasas de llevar a cabo TLS tiene su correspondencia estructural en el reducido tamaño de los subdominios *fingers* y *thumb* con respecto al resto de polimerasas, lo que conlleva una mayor accesibilidad al centro activo del subdominio *palm*, pudiendo actuar así sobre estructuras de DNA molde no canónicas. Entre las polimerasas de la familia de las RTs, además del dominio de polimerización, existe un dominio RNAasa H encargado de llevar a cabo la degradación del RNA viral durante la síntesis de DNA (Moelling et al., 1971).

1.4. La polimerización del DNA: un mecanismo de acción común

Básicamente, la DNA polimerasa cataliza la incorporación de dNMPs a la cadena iniciadora del DNA dúplex, atendiendo a su complementariedad con la base del dNMP localizado en la cadena molde de la doble hélice (Kornberg y Baker, 1992).

A pesar de la diversidad encontrada entre las DNA polimerasas, se ha podido establecer un mecanismo de acción común a todas ellas (Steitz et al., 1994). En la Figura 4 se esquematiza un modelo general de la adición de nucleótidos por una DNA polimerasa. Estas enzimas catalizan la síntesis de DNA vía un mecanismo ordenado en el que tiene lugar, como primer paso, la unión a la enzima de una molécula sustrato de DNA de tipo iniciador/molde, resultando el complejo binario DNA polimerasa-DNA.

La parte dúplex del DNA se posiciona en un surco formado entre los subdominios *palm* y *thumb*. Este último establece múltiples contactos con el DNA, desencadenándose un cambio conformacional en la enzima gracias al cual la cadena de DNA queda rodeada por el *thumb*. Dicho subdominio establece la interacción necesaria con el esqueleto de fosfatos del DNA a través del surco menor. El subdominio *thumb* está implicado en la estabilización del complejo DNA polimerasa/DNA. En la mayoría de las DNA polimerasas replicativas, este subdominio interacciona a su vez con un factor proteico que confiere una procesividad elevada al proceso de replicación.

La incorporación del nucleótido en este complejo es iniciada por la unión de un dNTP al complejo enzima-sustrato para formar el complejo ternario DNA polimerasa-DNA-dNTP.

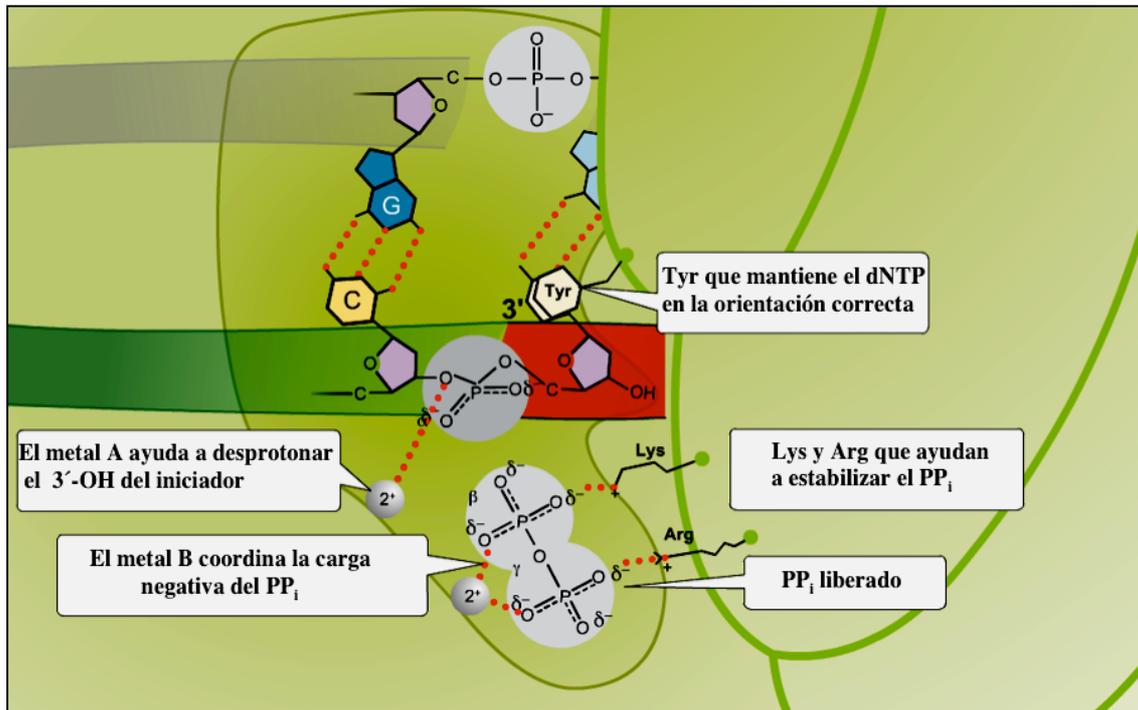


Figura 4. Mecanismo de transferencia de nucleótidos. Dos metales divalentes estabilizan el estado de transición generado durante la reacción. El metal A facilita el ataque nucleofílico del 3'-OH del último nucleótido del iniciador al fosfato α del nucleótido entrante. El metal B estabiliza la carga negativa que se genera en el oxígeno saliente del fosfato α y, al mismo tiempo, facilita la salida de la molécula de PP_i (fosfatos β y γ del nucleótido incorporado).

El subdominio *fingers* juega un papel fundamental en el correcto posicionamiento del dNTP en el centro activo de polimerización. Este subdominio contiene residuos conservados importantes en el establecimiento de interacciones con los fosfatos γ y β del nucleótido entrante, así como con el extremo de la cadena iniciadora y molde. En ausencia de nucleótidos, el subdominio *fingers* está en conformación abierta. Una vez unido el nucleótido, este subdominio rota un determinado número de grados, según la polimerasa, hacia el subdominio *palm*, cerrando de esta forma el centro activo y permitiendo la orientación adecuada de los sustratos y residuos requeridos para que tenga lugar la catálisis de la reacción. A diferencia del resto de familias, las DNA polimerasas de la familia Y poseen el subdominio *fingers* en conformación cerrada, independientemente de la unión del sustrato. El paso limitante en la polimerización es la conversión de este complejo ternario en un complejo activado competente para que tenga lugar la reacción química. En esta reacción intervienen dos iones metálicos divalentes (A y B) coordinados por dos residuos carboxílicos catalíticos conservados de manera invariable en los motivos A y C, tanto en DNA como RNA polimerasas (ver Figura 4). El metal A interacciona con el grupo $-OH$ del extremo 3' de la cadena iniciadora permitiendo el ataque nucleofílico por parte del mismo al fosfato α del dNTP entrante, dando lugar a la formación de un enlace fosfodiéster. El metal B interviene en la liberación de la molécula de pirofosfato (PP_i) generada

tras la reacción. Ambos iones estabilizan la estructura y carga del estado de transición pentacovalente formado durante el transcurso de la reacción. Este mecanismo catalítico de dos iones metálicos parece estar universalmente conservado entre todas las familias de DNA y RNA polimerasas (Steitz et al., 1994).

En este punto, la enzima puede dissociarse de la molécula sustrato (síntesis distributiva) o continuar unida a ella para localizar el nuevo extremo 3' en el centro activo de polimerización para una nueva ronda de incorporación (síntesis procesiva). Si la incorporación del nucleótido es errónea, el extremo de la cadena iniciadora puede ser dirigido al dominio exonucleasa 3'-5' (si está presente en la DNA polimerasa) con objeto de ser eliminado.

Las DNA polimerasas presentan diferencias con respecto a sus propiedades de polimerización, lo que conlleva a una gran diferenciación funcional. Así, la eficiencia con la que insertan nucleótidos puede variar en un rango de más de 10^7 según la polimerasa (Beard et al., 2002); la fidelidad de inserción de nucleótidos, desde uno de cada tres en Pol ι a 10^{-5} en DNA polimerasas replicativas como T7 (Bebenek et al., 2001); el número de nucleótidos que alguna de estas enzimas es capaz de incorporar por suceso de unión al sustrato varía desde tan sólo uno (Bebenek y Kunkel, 2004) a más de 70.000, como es el caso de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Blanco et al., 1989). Existen también diferencias con respecto a la preferencia de sustrato, desde el uso de DNA con *gaps* de un sólo nucleótido (Pol β) a la utilización preferente de un DNA dañado (Pol μ) (McCulloch et al., 2004). Como anteriormente comentamos, existen también polimerasas que no requieren la dirección de una cadena molde para la replicación del DNA, como es el caso de la TdT (Bollum, 1960).

2. La replicación del DNA

La viabilidad de un organismo depende de la correcta replicación de su genoma, proceso que llevan a cabo las DNA polimerasas replicativas.

En general, la replicación del DNA comienza en regiones internas de la molécula, conocidas como orígenes de replicación. Una serie de proteínas de unión a estas secuencias específicas de DNA reconocen y abren parcialmente la doble hélice, permitiendo la entrada de una proteína helicasa, necesaria para extender la desnaturalización local del DNA a medida que avanza la horquilla de replicación. El DNA de cadena sencilla es recubierto por proteínas de unión a DNA de banda simple (SSBs) con objeto de protegerla de la acción de posibles nucleasas y evitar la formación de estructuras secundarias que pudieran impedir el paso de la horquilla de replicación. En esta "burbuja" de replicación se ensamblarán el resto de proteínas que conforman el replisoma (ver Figura 5).

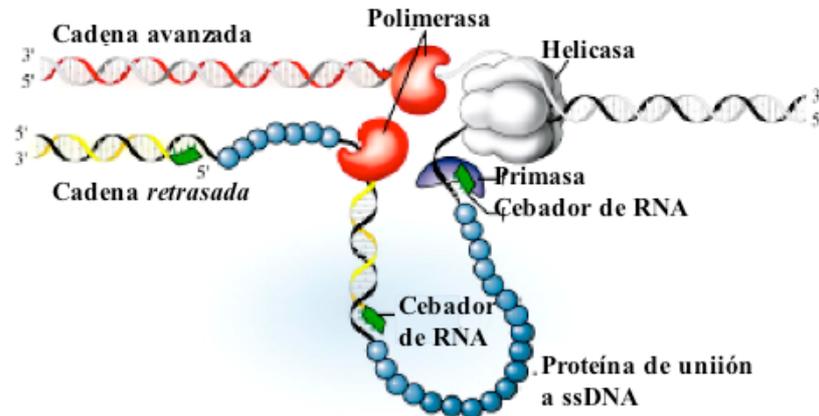


Figura 5. Modelo de la horquilla de replicación.

Debido, por una parte, a que las DNA polimerasas sólo sintetizan en dirección 5'-3' y, por otra, al hecho de ser las dos cadenas antiparalelas de la doble hélice replicadas de forma coordinada (Kornberg y Baker, 1992; McHenry, 2003), una de las dos cadenas del DNA se sintetiza de modo continuo (cadena avanzada), mientras que la otra es copiada discontinuamente (retrasada) en fragmentos de hasta 1.000 nucleótidos (fragmentos de Okazaki). Al ser las DNA polimerasas incapaces de iniciar la polimerización por sí mismas, otra proteína, la primasa, sintetiza cadenas cortas de RNA (una para comenzar la cadena de síntesis continua, y una por cada fragmento de Okazaki en la discontinua), que serán posteriormente elongadas por la DNA polimerasa. Para coordinar la replicación de ambas cadenas, en la horquilla de replicación tienen que intervenir varias DNA polimerasas. En *E. coli*, la acción coordinada de las polimerasas está posibilitada por la unión física de las mismas en un gran complejo multiproteico llamado holoenzima DNA pol III, que incluye dos copias de la DNA pol III unidas a una copia del complejo γ (constituido por 5 subunidades proteicas). Conforme la helicasa “abre” el DNA en la horquilla de replicación, la cadena avanzada es copiada de manera continua, mientras que la cadena retrasada lo es de manera discontinua. Cuando la polimerasa completa un fragmento de Okazaki, la DNA polimerasa se disocia del DNA pero permanece asociada al holoenzima, volviéndose a unir al 3'-OH de otro cebador para la síntesis de un nuevo fragmento de Okazaki (Glover y McHenry, 2001).

En eucariotas, la horquilla de replicación requiere la intervención de tres DNA polimerasas diferentes: DNA pol α /primasa, DNA pol δ y ϵ . La DNA polimerasa α /primasa lleva a cabo la iniciación de la síntesis de DNA, mientras que Pol δ y ϵ continúan la elongación de las cadenas de DNA iniciadas. Aunque existe evidencia que Pol δ y ϵ sintetizan cadenas opuestas, no está claro cuál es la encargada de replicar la cadena avanzada y cuál la retrasada.

2.1. Fidelidad en la inserción de nucleótidos

La replicación del DNA se caracteriza por ser altamente fiel, incorporándose el dNMP complementario al que está siendo empleado como molde. La mayor contribución a la fidelidad que presenta el proceso de replicación es aportado por la DNA polimerasa, capaz de incorporar un nucleótido específico en cada ciclo catalítico frente a los cuatro existentes, junto a una variedad de análogos de nucleótido. Considerando la elevada fidelidad que las caracteriza, las DNA polimerasas deben tener mecanismos que aseguren la correcta incorporación de nucleótidos. Éstos son, la selección de bases y la capacidad de corrección de errores. La acción combinada de estos dos mecanismos asegura que sólo se cometa, por término medio, un error de cada 10^8 nucleótidos incorporados (Loeb y Kunkel, 1982; Echols y Goodman, 1991). Esta precisión puede incrementarse en uno o dos órdenes de magnitud por la acción del sistema de reparación que actúa de forma postreplicativa.

2.2. Capacidad de corrección de errores

Cuando se incorpora un dNMP erróneo, la adición nucleotídica siguiente se haya fuertemente inhibida debido a la orientación incorrecta del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización. La DNA polimerasa deshibrida los últimos pares de bases formados, permitiendo el posicionamiento del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleolisis con objeto de eliminar el dNMP erróneo. Esta reacción catalítica, al igual que la reacción de polimerización, es llevada a cabo por un mecanismo de dos iones metálicos coordinados por una serie de residuos catalíticos. En base a los estudios estructurales de las DNA polimerasas de RB69 y Pol I (Shamoo y Steitz, 1999; Beese et al., 1993a), se observa una rotación del DNA dúplex con respecto a su eje helicoidal. El cambio de posición de la doble hélice es dirigido por el movimiento del extremo del subdominio *thumb* que se halla en contacto directo con la cadena de DNA. Este movimiento permite a la cadena iniciadora entrar en el centro activo de exonucleolisis. En la DNA polimerasa de RB69, se ha descrito la existencia de una estructura de tipo horquilla, localizada entre los centros activos de polimerización y exonucleolisis, que confiere estabilidad a la porción de DNA parcialmente desnaturalizado (Shamoo y Steitz, 1999).

2.3. Procesividad y desplazamiento de banda: dos requisitos fundamentales en el proceso de replicación del DNA

Uno de los requisitos más importantes de las replicasas es que tengan una elevada procesividad para conseguir la replicación completa del genoma de manera continua y eficiente. En el contexto del proceso replicativo, entendemos por procesividad la capacidad de llevar a cabo un número determinado de eventos catalíticos previamente a que ocurra la disociación entre la enzima y el sustrato. La gran mayoría de DNA polimerasas *per se* sólo son capaces de

incorporar unos pocos nucleótidos por suceso de unión al sustrato. Generalmente, se precisa la intervención de factores accesorios (factores de procesividad) que actúan confiriendo el anclaje necesario de la DNA polimerasa al DNA para que el proceso de replicación sea procesivo.

En la mayoría de los sistemas de replicación estudiados hasta la fecha se han identificado este tipo de proteínas. Aunque no existe conservación de secuencia entre los diferentes factores de procesividad, su estructura tridimensional es muy similar en todos ellos (ver Figura 6). Los llamados *sliding-clamps* suelen formar oligómeros que adoptan una estructura toroidal o en forma de anillo que “abrazo” a la doble hélice de DNA, deslizándose a lo largo de la misma en asociación con la DNA polimerasa. La cavidad central de esta estructura tiene un diámetro que oscila entre 30 y 35 Å, espacio suficiente para acomodar la doble hélice en su interior.

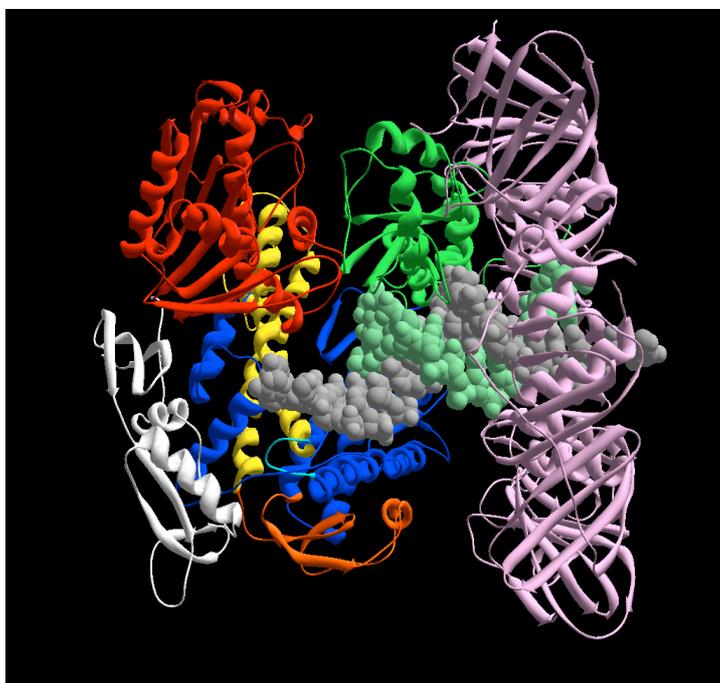


Figura 6. Estructura tridimensional del complejo binario de la DNA polimerasa de RB69 en presencia de su factor de procesividad. Se muestran los subdominios de la DNA polimerasa en diferentes colores (el dominio exonucleasa en rojo, el subdominio N-terminal en blanco, y los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb* en azul, amarillo y verde, respectivamente). La cadena molde de la doble hélice se representa en gris y la iniciadora en verde. El factor de procesividad (color malva) interacciona con el extremo del subdominio *thumb* de la DNA polimerasa, quedando la molécula de DNA “abrazada” por la estructura anular de esta proteína.

Se han descrito otros tipos de factores de procesividad minoritarios que no presentan la estructura anular comentada anteriormente para los *sliding-clamps*, siendo además monoméricos. Es el caso de la proteína UL42 del virus del herpes simple (HSV) que interacciona con la DNA polimerasa a través del subdominio *thumb* (Digard et al., 1993), así como la tiorredoxina de *E.coli*, factor responsable de la elevada procesividad alcanzada por la DNA polimerasa del bacteriófago T7 (Bedford et al., 1997). Curiosamente, en este último caso, el factor de procesividad carece de interacción directa con el DNA.

Por otra parte, en la mayoría de los sistemas de replicación, el movimiento de la horquilla de replicación a lo largo del DNA dúplex requiere una actividad que permita la apertura de las cadenas complementarias de la doble hélice con objeto de permitir a la DNA polimerasa actuar sobre una de ellas. Por lo general, esta actividad no es intrínseca de la

polimerasa sino que es desempeñada por una proteína conocida como helicasa (ver Figura 7). Este desplazamiento a lo largo del DNA, así como la apertura del mismo, están asociados a la hidrólisis de NTPs. Estas proteínas pueden ser monoméricas u oligoméricas, siendo el patrón hexamérico de oligomerización el más extendido. Presentan una estructura a modo de anillo formando un poro o canal central a través del cual pasaría la cadena de DNA, siendo en la mayoría de los casos ssDNA (ver Figura 7). Esta conformación está conservada desde organismos procariotas a eucariotas. Están presentes en bacteriófagos (T7, T4 y SPP1), plásmidos bacterianos (RepA), virus eucariotas (papilloma y polyoma), bacterias, eucariotas y arqueas. La mayoría de helicasas no muestra especificidad de secuencia ya que estas proteínas están implicadas en procesos que requieren su desplazamiento sobre la molécula de DNA.

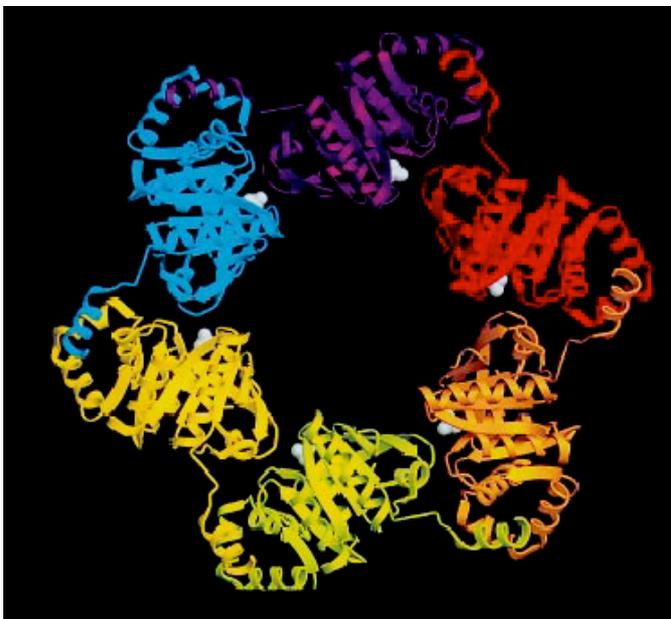


Figura 7. Estructura cristalográfica de la proteína helicasa del bacteriófago T7.

Existen clasificaciones diversas de las helicasas atendiendo a diferentes criterios como puede ser el tipo de sustrato sobre el que actúan, la direccionalidad en su desplazamiento o la naturaleza oligomérica de su estructura.

La integridad y estabilidad de la información genética depende en gran medida de la eficacia de la

reacción catalizada por la helicasa. Son miembros ubicuos de casi todas las reacciones del metabolismo de los ácidos nucleicos (Lohman y Bjornson, 1996; Matson y Kaiser-Rogers, 1990).

3. La DNA polimerasa del bacteriófago ϕ 29: paradigma de la replicación

Como hemos comentado anteriormente, las DNA polimerasas son incapaces de iniciar la síntesis de DNA *de novo*. Todas precisan de un grupo 3'-OH proporcionado por un cebador o iniciador a partir del cual continuar la elongación. La solución más extendida en los sistemas vivos frente a esta limitación es la existencia de cadenas de RNA sintetizadas por la enzima primasa (Baker y Kornberg, 1992). Estas cadenas suelen tener una longitud de unos pocos nucleótidos que serán degradadas posteriormente. Sin embargo, en los genomas lineales, la eliminación del último cebador de la cadena retrasada llevaría consigo una pérdida de la

información genética en el extremo del DNA. En diferentes organismos se han encontrado mecanismos diversos para resolver el problema de la replicación de los extremos de los genomas lineales. En eucariotas, la telomerasa resuelve esta situación añadiendo tras la replicación secuencias específicas en los extremos del cromosoma (Greider y Blackburn, 1985; Cech, 2004). En bacterias y virus de DNA es común la presencia de secuencias repetidas en los extremos, favoreciéndose la formación de moléculas circulares o concatémicos, como en el caso de los fagos T4 y λ , o bien, la creación de estructuras a modo de horquilla en dichos extremos como ocurre en el genoma de Vaccinia. Otros organismos, como algunos bacteriófagos, virus eucariotas, plásmidos lineales y cromosomas bacterianos, han solucionado este problema mediante la utilización de una proteína como iniciador de la replicación, quedando ésta covalentemente unida a los extremos 5' del genoma (Salas, 1991; Salas et al., 1996; Salas, 1999). De todos los sistemas de replicación que tienen como iniciador una proteína, ha sido el del bacteriófago $\phi 29$ el más extensamente estudiado (revisado en Salas 1991; Salas et al., 1996; Salas, 1999).

3.1. Replicación del genoma del bacteriófago $\phi 29$

El genoma del bacteriófago $\phi 29$ es un dsDNA lineal de 19.285 pares de bases (pb) (Paces et al., 1986), en cuyos extremos 5' se encuentra unida covalentemente una TP (Salas et al., 1978). La replicación en este virus requiere la formación previa de un heterodímero entre la DNA polimerasa y una molécula de TP libre (Blanco et al., 1987). Este complejo reconoce los orígenes de replicación que se hallan en los extremos de la molécula de DNA, caracterizados por la presencia de una secuencia repetida de 6 pb (3'-TTTCAT-5') (Salas, 1991). Durante la iniciación, la DNA polimerasa cataliza en ambos extremos la adición de dAMP al grupo hidroxilo de la Ser232 de la TP (Blanco et al., 1984; Hermoso et al., 1985), empleando como base molde el segundo dTMP de la cadena (Méndez et al., 1992). Seguidamente, con objeto de recuperar la primera posición de la cadena que está siendo empleada como molde, y gracias a la reiteración de secuencia en los extremos del genoma, el complejo se desliza una posición hacia atrás (*sliding-back*), quedando el primer nucleótido incorporado enfrentado a la primera posición (dTMP) del genoma (Méndez et al., 1992). A continuación, esta misma molécula de polimerasa lleva a cabo la elongación del DNA (Blanco y Salas, 1985b). A partir de la incorporación del sexto dNMP, la DNA polimerasa y la TP experimentan una serie de cambios conformacionales, etapa de transición (Méndez et al., 1997), que desencadenarán la disociación del heterodímero a partir de la incorporación del décimo dNMP, quedando la TP unida covalentemente al extremo 5' de la cadena naciente del DNA. A partir de ese momento, la DNA polimerasa lleva a cabo la síntesis completa de la molécula de manera procesiva y acoplado el desplazamiento de la cadena que no está siendo copiada (Blanco et al., 1989). Cuando las dos

horquillas de replicación se encuentran, las dos cadenas parentales parcialmente replicadas se separan y la síntesis del genoma se completa (ver Figura 8).

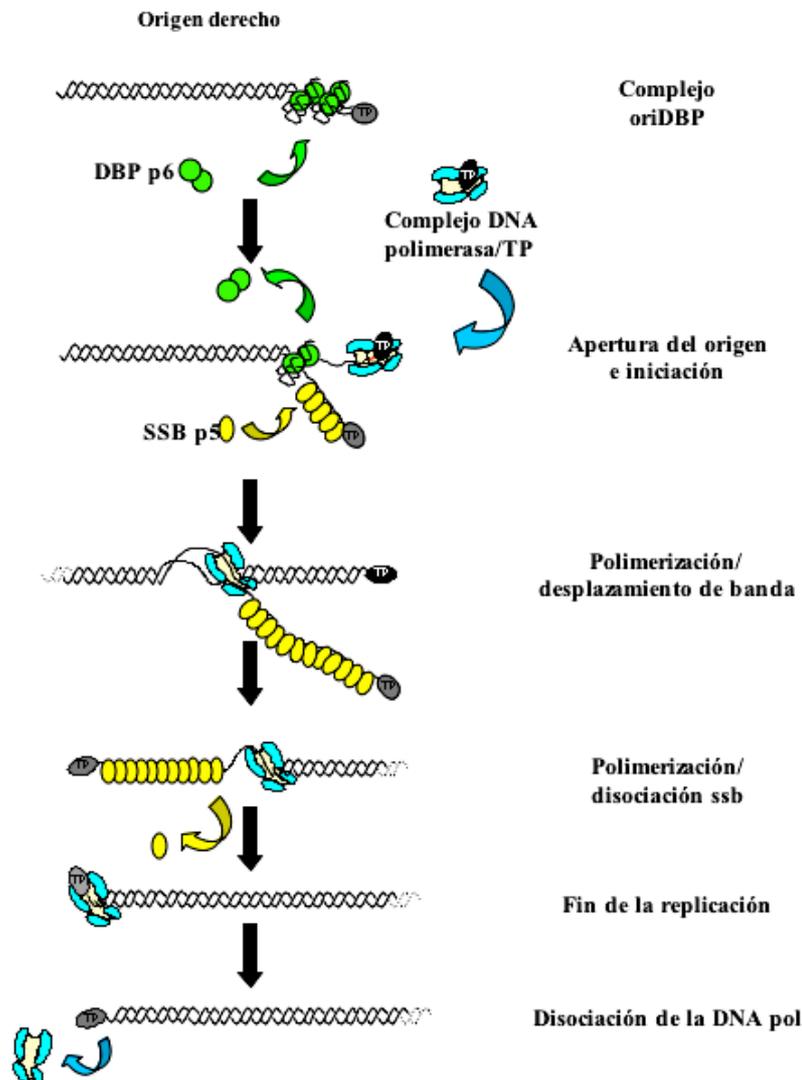


Figura 8. Representación esquemática de la replicación del genoma del bacteriófago φ29.

Otros factores necesarios para la replicación del genoma de φ29 son las proteínas virales de unión a DNA de banda simple y de unión a DNA de banda doble (DBP). La primera se une a la cadena sencilla que está siendo desplazada en el proceso de replicación, evitando de esta forma la acción de las nucleasas (Martín et al., 1989), así como la formación de estructuras secundarias (Soengas et al., 1995). La DBP de φ29 se une a los extremos del genoma del fago formando un complejo nucleoproteico que favorece la apertura de los extremos del DNA para la iniciación de la replicación (Blanco et al., 1986; Gutiérrez et al., 1986; Serrano et al., 1989). Por otra parte, existen dos proteínas virales, p1 y p16.7, que están unidas a la membrana bacteriana e interaccionan con la molécula de TP-DNA. Este hecho sugiere que ambas proteínas son responsables de la asociación de la replicación del DNA del bacteriófago a la membrana

bacteriana, probablemente facilitando la unión a ésta del complejo de replicación (Bravo y Salas, 1997; Meijer et al., 2001).

3.2. Características funcionales de la DNA polimerasa de $\phi 29$

La enzimología de la replicación del DNA del bacteriófago $\phi 29$ se basa principalmente en las múltiples actividades catalíticas y en las propiedades peculiares del producto del gen 2 del fago, la DNA polimerasa (Blanco et al., 1984).

La DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ es una enzima monomérica de 66 kDa perteneciente a la familia B de DNA polimerasas dependientes de DNA (Blanco et al., 1987), y dentro de ésta, al subgrupo de aquellas que inician la replicación a partir de una TP. Posee actividad polimerasa y exonucleasa 3'-5' (Blanco et al., 1984; Blanco y Salas, 1985a), cada una de ellas localizada en un dominio estructuralmente independiente (Blanco y Salas, 1995; Blanco y Salas, 1996) (ver Figura 9). Esta enzima cataliza tanto la iniciación a partir de una TP (Peñalva y Salas, 1982) como la elongación posterior de la cadena de DNA que ha de ser sintetizada (Blanco y Salas, 1995b). La DNA polimerasa de $\phi 29$ posee dos actividades de degradación sobre DNA, la anteriormente mencionada actividad exonucleasa 3'-5' y la pirofosforólisis (Blasco et al., 1991). Esta última es el reverso de la actividad de polimerización, cuyo papel funcional no se ha establecido hasta el momento.

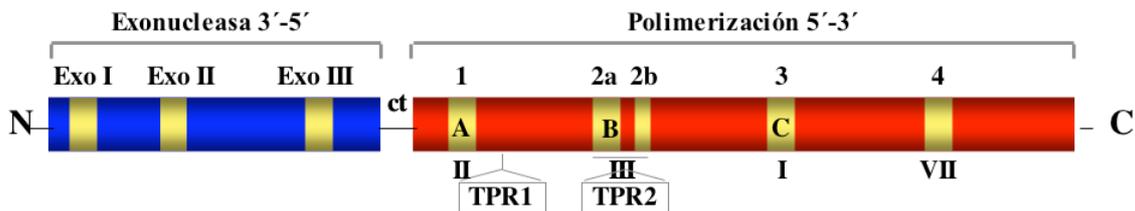


Figura 9. Representación lineal de los dos dominios funcionales de la DNA polimerasa de $\phi 29$. El esquema muestra los motivos más conservados en las DNA polimerasas tanto de origen procariontico como eucariotico. Los dominios N-terminal y C-terminal están representados por un rectángulo de color azul y rojo, respectivamente. El enlace entre estos dos dominios (ct) está implicado en la “comunicación” (*cross-talk*) entre ambos dominios. En el dominio C-terminal se indican las diferentes nomenclaturas que reciben las regiones que contienen a los motivos. También se muestran las dos inserciones específicas del grupo de DNA polimerasas que inician la replicación con TP (TPR1 y TPR2).

Como características distintivas frente al resto de DNA polimerasas, la DNA polimerasa de $\phi 29$ lleva a cabo la replicación completa de su genoma de forma procesiva (sin disociarse del sustrato) y acoplada al desplazamiento de la cadena de DNA que no está siendo empleada como molde (Blanco et al., 1989). Todo ello sin la intervención de proteínas accesorias de tipo *sliding-clamp* o helicasa, presentes habitualmente en el resto de sistemas de replicación. Estas características han sido la base para el desarrollo de sistemas de amplificación isotérmica de DNA basados en la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Dean et al., 2001).

Durante décadas, la DNA polimerasa de $\phi 29$ ha servido como modelo de estudio de la relación estructura-función de las DNA polimerasas en base a un exhaustivo análisis mutacional de la enzima (Blanco y Salas, 1996), llevado a cabo en aquellos residuos conservados según el alineamiento de regiones con homología de secuencia de aminoácidos en DNA polimerasas procedentes de diferentes organismos (ver Figura 10). De esta forma, se pudo definir la región N-terminal donde reside la actividad exonucleasa 3'-5' (Blanco y Salas, 1985a). Este dominio posee cinco residuos catalíticos pertenecientes a los tres motivos altamente conservados entre las polimerasas con capacidad de corrección de errores: Exo I, Exo II y Exo III (Bernad et al., 1989; Soengas et al., 1992; Blanco et al., 1991). En este dominio también se han identificado los residuos que establecen contacto directo con la cadena de ssDNA (de Vega et al., 1996; de Vega et al., 1997; de Vega et al., 1998a; de Vega et al., 1998b; de Vega et al., 2000). En la región C-terminal, donde se localiza la actividad polimerasa, están presentes los segmentos más conservados entre las DNA polimerasas de tipo eucariótico: los motivos Dx₂SLYP (motivo A o 1), YxDTDS (motivo C o 3) (Bernad et al., 1987), que incluyen los tres residuos carboxílicos catalíticos (Bernad et al., 1990; Blasco et al., 1992; Blasco et al., 1993a; Blasco et al., 1993b), y Kx₃NSxYG (motivo B o 2a) (Bernad et al., 1987), cuyos residuos están implicados en la unión de la cadena molde, así como en la unión y selección de dNTPs (Blasco et al., 1992; Blasco et al., 1993a). Otro motivo conservado es el Tx₂G/AR (motivo 2b) (Méndez et al., 1994), cuyos residuos están implicados en la unión del DNA y la TP, así como en la catálisis de la reacción.

Región	Motivo	Unión de metal y catálisis	Unión de DNA	Unión de TP	Unión de dNTP	Desplazamiento de banda
N-terminal	ExoI "DxE"	D ¹² , E ¹⁴	T ¹⁵			D ¹² , E ¹⁴
	ExoII "Nx ₂₋₃ F/YD"	D ⁶⁶	Y ⁵⁹ , H ⁶¹ , N ⁶² , F ⁶⁵ , F ⁶⁹ R ⁹⁶ , K ¹¹⁰ , K ¹¹² , K ¹¹³	F ⁶⁵ , Y ⁶⁹ , F ⁶⁹ , H ⁶¹ R ⁹⁶ , K ¹¹⁴		D ⁶⁶
	pre-"(S/T)Lx ₂ h"		S ¹²² , L ¹²³ , F ¹²⁸	R ⁹⁶ , K ¹¹⁴ S ¹²² , F ¹²⁸		
	"(S/T)Lx ₂ h"	K ¹⁴³				K ¹⁴³
ExoIII "Yx ₃ D"	Y ¹⁶⁵ , D ¹⁶⁹					Y ¹⁶⁵ , D ¹⁶⁹
ct	"YxGG"		Y ²²⁶ , F ²³⁰ , R ²²³	R ²²³ , G ²²⁸ , G ²²⁹ , F ²³⁰		
C-terminal	A/I/II "Dx ₂ SLYP"	D ²⁴⁹	S ²⁵²		Y ²⁵⁴	
	TPR1		K ³⁰⁵ , Y ³¹⁵	D ³³² , K ³⁰⁵ , Y ³¹⁵		
	Pre-B				K ³⁷¹ , K ³⁷⁹	
	B/2a/III "Kx ₃ NSxYG"		N ³⁸⁷ , G ³⁹¹ , F ³⁹³ , L ³⁸⁴		K ³⁸³ , Y ³⁹⁰ , K ³⁹²	
	2b/III "Tx ₂ GR"	R ⁴³⁸	T ⁴³⁴ , R ⁴³⁸	T ⁴³⁴ , R ⁴³⁸		
C/3/I "YxDTDS"	D ⁴⁵⁶ , D ⁴⁵⁸				Y ⁴⁵⁴	
4/VII "KxY"		K ⁴⁹⁸ , Y ⁵⁰⁰				

Figura 10. Estudios de relación estructura-función en la DNA polimerasa de $\phi 29$. Se esquematiza el papel atribuido a aquellos residuos pertenecientes a distintos motivos de la polimerasa que han sido estudiados mediante mutagénesis dirigida.

El motivo con la secuencia consenso KxY (motivo 4) (Blasco et al., 1995), está también implicado en interacción con la molécula de DNA. El motivo YxGG/A, localizado entre los dominios C- y N-terminales, juega un papel importante en el movimiento del DNA entre los centros activos de polimerización y exonucleolisis durante la replicación (Truniger et al., 1996).

Por último, se ha identificado recientemente el motivo PreB que interviene en la afinidad de la polimerasa por el nucleótido entrante (Truniger et al., 2002).

Una de las principales diferencias entre la DNA polimerasa de $\phi 29$ y el resto de miembros de la familia B es la presencia en el dominio de polimerización de dos regiones adicionales, que corresponden a inserciones de secuencia, conservadas específicamente entre las DNA polimerasas que inician la replicación con una proteína terminal (ver Figura 9). Son las llamadas regiones TPR1 (*Terminal Protein Region 1*) y TPR2 (*Terminal Protein Region 2*) (Blasco et al., 1990; Dufour et al., 2000).

3.3. Estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$

La estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$, recientemente determinada (Kamtekar et al., 2004), muestra una conformación espacial muy similar al resto de polimerasas cristalizadas hasta la fecha, especialmente a aquellas pertenecientes a la familia B (RB69 (Wang et al., 1997), *T. gorgonarius* (Hopfner et al., 1999), *P. kodakaraensis* (Hashimoto et al., 2001), *T.sp.9°N-7* (Rodríguez et al., 2000), y *Desulfurococcus tok* (Zhao et al., 1999)). Consiste en un dominio exonucleasa 3'-5' localizado en la parte N-terminal de la enzima (residuos 5-189), y un dominio polimerasa en la región C-terminal (residuos 190-575).

La estructura del dominio exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa de $\phi 29$ confirma el análisis mutacional llevado a cabo en base a la conservación de secuencia, según el cual los residuos D12, E14, D66 y D169 poseen los grupos carboxílicos catalíticos (responsables de unir los metales en el centro activo), y cuya sustitución por alanina disminuye la actividad exonucleasa en 10^5 veces (Bernad et al., 1989; Soengas et al., 1992; Esteban et al., 1994). Por otra parte, la estructura de la polimerasa de $\phi 29$ unida a un pentanucleótido ((dT)₅) ha permitido confirmar el papel como ligandos de ssDNA de los residuos previamente identificados por análisis bioquímico (de Vega et al., 1996; de Vega et al., 1998b; de Vega et al., 1998a; de Vega et al., 2000).

El dominio polimerasa está estructurado como una mano derecha y puede ser subdividido en los ya mencionados subdominios *palm*, *fingers* y *thumb*. En el subdominio *palm*, como en el resto de polimerasas cristalizadas, residen los residuos carboxílicos (D249, D456 y D458) responsables de la reacción de transferencia de nucleótidos. El subdominio *fingers* se halla en conformación abierta, lo cual es esperable en ausencia de los sustratos de DNA y de dNTP. Como en el resto de miembros de esta familia de polimerasas, el subdominio *fingers* contiene un par de hélices α antiparalelas donde se localizan los residuos responsables de unir el nucleótido entrante (motivo B y PreB).

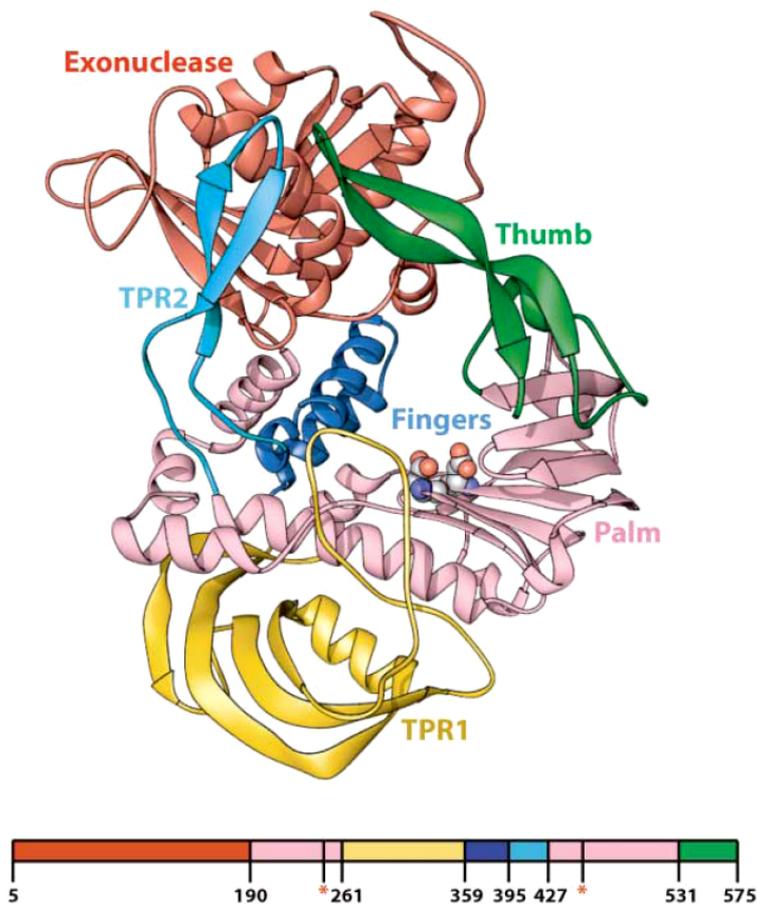


Figura 11. Estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$. El dominio exonucleasa se muestra en rojo, el subdominio *palm* en rosa, el *fingers* en azul oscuro y el *thumb* en verde. Las dos inserciones específicas de las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, TPR1 y TPR2, en amarillo y azul claro, respectivamente. Los Asp catalíticos del dominio de polimerización se representan como esferas en el subdominio *palm*.

El subdominio thumb presenta una forma inusual con respecto a la observada en el resto de DNA polimerasas. De tamaño relativamente pequeño (45 aminoácidos)

y con poco carácter helicoidal, este subdominio está constituido básicamente por una estructura de tipo horquilla, β -giro- β . Como anteriormente comentamos, la principal diferencia entre la DNA polimerasa de $\phi 29$ y el resto de miembros de la familia B es la presencia de las regiones adicionales TPR1 y TPR2, conservadas específicamente entre las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal (Figura 11). La resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ confirió a estas inserciones el nivel de subdominios discretos en la estructura de la enzima (Kamtekar et al., 2004).

El subdominio TPR1, localizado en la estructura primaria entre los subdominios *palm* (motivo Dx₂SLYP) y *fingers*, conforma una estructura prominente adyacente al subdominio *palm* (ver Figura 11). Como se observa en la Figura 12, el modelado de la apoenzima con DNA obtenido a partir del complejo ternario de la DNA polimerasa de RB69, sugiere que el subdominio TPR1 estaría estableciendo contacto directo con el surco mayor del DNA a través de un *loop* formado por los residuos 304-314 de dicho subdominio (Kamtekar et al., 2004).

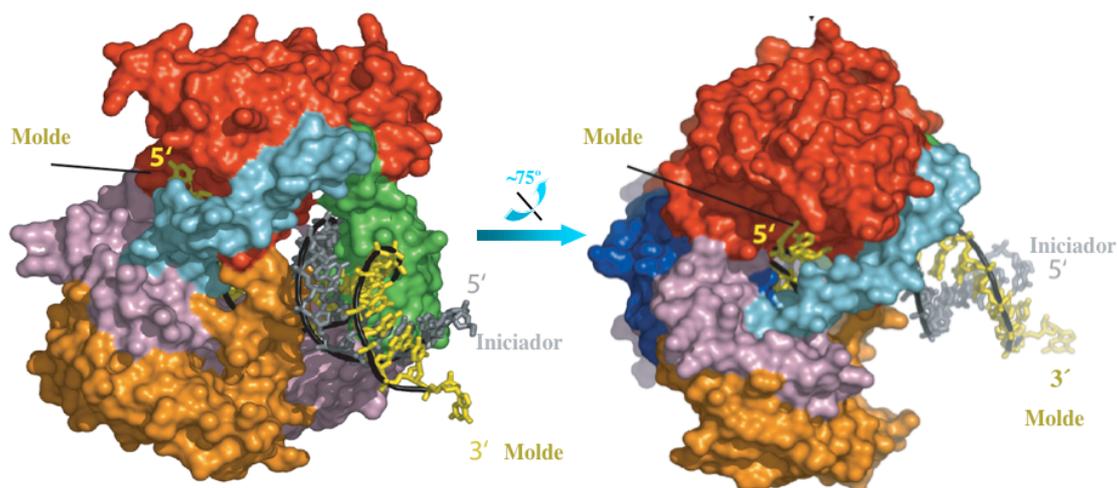


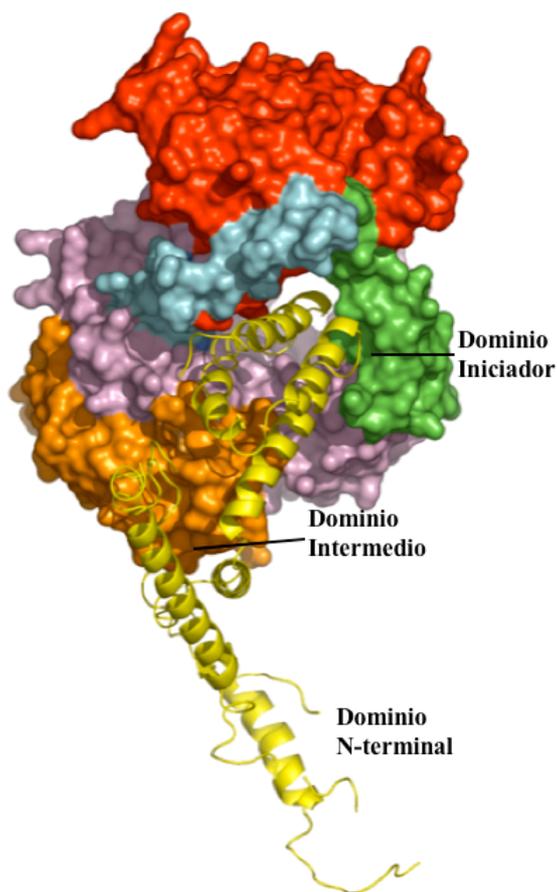
Figura 12. Modelado de la DNA polimerasa de ϕ 29 con DNA a partir de la estructura tridimensional del complejo ternario de la DNA polimerasa de RB69 (Kamtekar et al., 2004). La orientación de la DNA polimerasa en la imagen de la izquierda muestra el modo en el que la molécula de DNA quedaría “abrazada” por los subdominios *palm*, *thumb* y TPR2. Una rotación de 75° aproximadamente (figura derecha) muestra el surco por el que podría pasar la cadena molde, formado por el dominio exonucleasa y los subdominios *palm* y TPR2 antes de su entrada en el sitio activo de polimerización. El dominio de exonucleolisis se muestra en rojo, y los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb* se presentan en malva, azul oscuro y verde, respectivamente. Los subdominios específicos de DNA polimerasas que inician la replicación con TP, TPR1 y TPR2, están coloreados en naranja y azul claro, respectivamente.

El subdominio TPR2, localizado entre los motivos Kx_3NSxYP (subdominio *fingers*) y Tx_2GR (subdominio *palm*), presenta gran similitud con una región en forma de horquilla (*specificity loop*) de la RNA polimerasa de T7. Este subdominio, enfrentado al subdominio *thumb*, conforma con éste y el subdominio *palm* una estructura anular. El modelado de la DNA polimerasa de ϕ 29 con DNA sugiere que esta estructura a modo de anillo podría estar jugando un papel importante en la estabilización del sustrato de DNA, ya que éste quedaría abrazado completamente por la DNA polimerasa (ver Figura 12). Asimismo, la disposición en la estructura del subdominio TPR2 junto con el dominio exonucleasa y el subdominio *fingers* origina un pequeño túnel cuyas dimensiones sugieren que podría unir la cadena molde, forzando la apertura del DNA *downstream* para permitir que dicha cadena alcance el centro activo de polimerización.

Como se discutirá detalladamente más adelante, los datos estructurales junto con los resultados bioquímicos obtenidos en esta Tesis, nos permiten proponer un papel esencial para el subdominio TPR2 en conferir tanto procesividad como capacidad de desplazamiento de banda a la DNA polimerasa de ϕ 29.

Junto a la resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de ϕ 29, se ha obtenido recientemente la estructura del complejo DNA polimerasa/TP (Kamtekar et al., 2006). La estructura de este complejo permite distinguir tres zonas o dominios en la TP, el dominio N-

terminal, un dominio intermedio y el llamado dominio de iniciación localizado en la porción C-terminal de la proteína (Figura 13). Este último ocuparía el mismo túnel (formado por los



subdominios TPR2, *thumb* y *palm*) que el DNA.

Figura 13. Estructura tridimensional del heterodímero DNA polimerasa de $\phi 29$ /TP. La estructura fundamentalmente helicoidal de la proteína terminal se representa en amarillo. Se muestran los diferentes subdominios de la DNA polimerasa de $\phi 29$ con distintos colores: en rojo el dominio exonucleasa, y los subdominios *palm* y *thumb* en malva y verde, respectivamente. El subdominio TPR1 se presenta en naranja, y el TPR2 en azul claro.

El residuo Ser232 que proporciona el grupo hidroxilo para que tenga lugar la iniciación de la replicación, se localiza en una estructura tipo *loop* perteneciente al dominio de iniciación de la TP, muy próximo al centro activo de polimerización. En la resolución cristalográfica se observa que los dominios intermedio y de iniciación

de la TP establecen múltiples contactos con la polimerasa. Por una parte, el dominio intermedio de la TP interacciona con el subdominio TPR1 de la polimerasa, y por otra, el dominio iniciador de la TP, con un fuerte carácter electronegativo, establece contactos con residuos de los subdominios *thumb* y TPR2, fundamentalmente.

La superposición de las estructuras de la apoenzima y el heterodímero ha mostrado que el cambio más apreciable en la estructura de la DNA polimerasa cuando interacciona con la TP se da a nivel del subdominio TPR1, concretamente entre los residuos 304-314. El *loop* localizado en esta región se desplaza para permitir a la TP la entrada al centro activo de polimerización.

Hasta la fecha, la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ ha sido la única polimerasa perteneciente al subgrupo de aquellas que inician su replicación utilizando como iniciador una proteína terminal, en ser resuelta cristalográficamente. De ahí la importancia del estudio de las características catalíticas específicas de esta polimerasa que la distinguen del resto de DNA polimerasas resueltas estructuralmente.

Estudios previos a esta Tesis, identificaron residuos pertenecientes a diferentes motivos de la DNA polimerasa de $\phi 29$, implicados en el establecimiento de contactos con la TP durante el proceso de replicación del DNA. El objetivo inicial fue ampliar el estudio funcional y/o estructural de residuos conservados específicamente en DNA polimerasas que inician la replicación con TP. La elección de estos residuos se hizo en base a la conservación de secuencia que presentan este grupo de DNA polimerasas. La posible relevancia funcional de dichos residuos se estableció mediante el análisis bioquímico de los derivados mutantes obtenidos.

1.- Identificación y análisis funcional de residuos pertenecientes al dominio N-terminal de la DNA polimerasa de $\phi 29$, conservados en DNA polimerasas que emplean una proteína terminal como iniciador de la replicación.

2.- Identificación y análisis funcional de residuos localizados en la inserción TPR1 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, conservada específicamente en las DNA polimerasas que inician la replicación a partir de una proteína terminal.

Durante el desarrollo del trabajo expuesto en esta Tesis, se obtuvo la estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$. En base a la localización espacial de la inserción TPR2, segunda región conservada específicamente en las DNA polimerasas que emplean como mecanismo de iniciación de la replicación una TP, el siguiente objetivo fue el estudio del papel funcional del subdominio TPR2 en el proceso de replicación.

3.- Implicación del subdominio TPR2 en las dos características distintivas de la DNA polimerasa de $\phi 29$: elevada procesividad y capacidad de desplazar banda durante la síntesis de DNA.

4.- Identificación de residuos pertenecientes al subdominio TPR2 que pudieran estar desempeñando un papel activo en el desplazamiento de banda.

5.- Estudio de un posible mecanismo de apertura de la estructura anular, formada por los subdominios TPR2, *thumb* y *palm* de la DNA polimerasa de $\phi 29$, en el proceso de replicación del DNA.

1. MATERIALES

1.1. Nucleótidos

Los nucleótidos no marcados radiactivamente fueron comprados a Pharmacia P-L Biochemicals. [α - 32 P]dATP (3000 Ci/mmol) y [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol) se compraron a Amersham International plc.

1.2. Proteínas

La DNA polimerasa *wild-type* del bacteriófago ϕ 29 se purificó a partir de células de *E. coli* NF2690 que portaban el plásmido pJLPM (un derivado de pT7-4w2), como está descrito en Lázaro et al., (1995). Los mutantes de la DNA polimerasa de ϕ 29 que se describen en esta memoria se purificaron a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) que portaban los diferentes plásmidos recombinantes, básicamente como se describe para la DNA polimerasa *wild-type*. La proteína terminal de ϕ 29 se purificó como se describe en Zaballos y Salas, (1989). La proteína de unión a banda simple así como la de unión a banda doble, obtenidas a partir de células de *B. subtilis* infectadas con el bacteriófago ϕ 29, fueron purificadas como se describe en Martín et al., (1989) y en Pastrana et al., (1985), respectivamente. La enzima polinucleótido kinasa de T4 se compró a Boehringer Mannheim. Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs.

En el caso de la DNA polimerasa de ϕ 29 mutante G410C/P562C, la fracción reducida de la enzima se consiguió previa incubación con el mismo tampón empleado para la fracción oxidada (25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM EDTA, 0.5 M ClNa, 0.05% Tween y 50% glicerol) suplementado con 40 mM DTT. Ambas fracciones de la enzima se mantuvieron a 4 °C.

1.3. Sustratos de DNA

Todos los oligonucleótidos (ver abajo) fueron comprados a Isogen y purificados a partir de geles de poliacrilamida al 20%-8 M urea. El oligonucleótido sp1 (15mer), marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P]ATP y polinucleótido kinasa de T4, fue hibridado con los oligonucleótidos correspondientes en presencia de 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) y 0.2 M NaCl, obteniéndose una molécula híbrida de tipo iniciador/molde para ser utilizada en los diferentes ensayos en los que se emplea como molécula sustrato dsDNA. Para analizar la capacidad de desplazamiento de banda de la DNA polimerasa diseñamos la molécula sp1-D13/sp1c+18 (C+G), en la que los 13 primeros nucleótidos del extremo 5' del oligonucleótido sp1c+18 (C+G) son complementarios al oligonucleótido D13, mientras que los 15 últimos lo son al sp1; de tal manera que la estructura que se genera sería la de una molécula de dsDNA con un *gap* de 5 nucleótidos de longitud en una de sus cadenas.

El DNA de $\phi 29$ ($\phi 29$ TP-DNA) fue obtenido por tratamiento de las partículas víricas con proteinasa K en presencia de SDS (Inciarte et al., 1976), posterior extracción con fenol, y precipitación con etanol.

El ssDNA de M13mp18, comprado a Pharmacia Biotech., fue hibridado con el oligonucleótido universal (Isogen) de 17mer de longitud, en presencia de 0.2 M NaCl y 60 mM Tris-HCl (pH 7.5), y la molécula resultante se usó como DNA iniciador/molde para analizar la síntesis procesiva de DNA acoplada al desplazamiento de banda.

Sp1: 5'GATCACAGTGAGTAC

Sp1c+6: 5'TCTATTGTACTIONACTGTGATC

Sp1c+18: 5'ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTIONACTGTGATC

Sp1c+21: 5'ACTTCATGACTTCGTTCTATTGTACTIONACTGTGATC

Sp1c+18 (C+G): 5'GGGGGGCCGCCGCCGGTACTCACTIONACTGTGATC

D13: 5'GCGGCGGCCCCC

2. MÉTODOS

2.1. Mutagénesis dirigida y expresión de las DNA polimerasas mutantes

Las DNA polimerasas mutantes de $\phi 29$ fueron obtenidas empleando el *kit* de mutagénesis dirigida QuickChange de Amersham Pharmacia. El plásmido pJLPM, que contiene el gen de la DNA polimerasa de $\phi 29$, se utilizó como sustrato molde de la DNA polimerasa *Pfu* Turbo para la reacción de mutagénesis. Los oligonucleótidos complementarios diseñados hibridan con las cadenas opuestas del plásmido en las regiones flanqueantes a la mutación. Después del ciclo térmico y el posterior tratamiento con la endonucleasa *DpnI*, el DNA sintetizado se transformó en células competentes XL1-blue. La presencia de las mutaciones deseadas, así como la ausencia de otras, se verificó por secuenciación del gen completo. La expresión de todos los mutantes se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG (Studier y Moffatt, 1986).

2.2. Balance de las actividades de polimerización y exonucleolisis 3'-5'

La molécula híbrida sp1/sp1c+6 (en algunos ensayos, sp1/sp1c+18) contiene un extremo 5' protuberante de 6 nucleótidos de longitud (18 en el caso de sp1/sp1c+18), de forma que el oligonucleótido sp1 puede ser sustrato tanto de la actividad exonucleasa 3'-5' como de la polimerización. Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 μ l que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ (1 mM MnCl₂ en el caso del mutante Δ TPR2), 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml de BSA, 1.2 nM de sustrato de DNA y una cantidad de DNA polimerasa variable según los mutantes ensayados, así como las concentraciones de dNTPs

indicadas en cada caso. Después de una incubación de 5 min a 25 °C, las reacciones se detuvieron añadiendo 10 mM EDTA. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Las actividades de polimerización y exonucleasa 3'-5' se detectaron por un incremento o disminución, respectivamente, de la longitud del sustrato original (15mer).

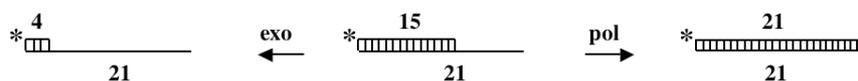


Figura 14. Esquema del equilibrio entre las actividades exonucleasa 3'-5' y polimerasa sobre una molécula de DNA de tipo iniciador/molde.

Para evaluar la actividad en condiciones en las que cada molécula de DNA polimerasa sólo actúe sobre una molécula de DNA sustrato, se diseñaron experimentos de competición con el ssDNA de M13mp18. Se preincubaron todos los componentes de la reacción salvo el metal activador durante 5 min a 4 °C. Esta preincubación permite la formación del complejo DNA polimerasa-sustrato. La reacción se disparó añadiendo el metal activador junto a un exceso del DNA competidor (DNA de M13). Como control de la eficiencia del DNA competidor o trampa se llevaron en paralelo reacciones en las que el DNA trampa se mezcló con el DNA sustrato antes de añadir la DNA polimerasa.

2.3. Ensayo de la actividad exonucleasa 3'-5'

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 µl que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ (1 mM MnCl₂ en el caso del mutante ΔTPR2), 1 mM DTT, 4% glicerol y 0.1 mg/ml de BSA. Como sustrato de ssDNA se utilizó 1.2 nM de oligonucleótido sp1 marcado. Como sustrato de dsDNA se utilizó el mismo número de moléculas híbridas. La cantidad de proteína (indicada en cada caso) se ajustó para conseguir condiciones lineales de reacción. Las muestras se incubaron a 25 °C durante los tiempos indicados, y se pararon añadiendo 10 mM EDTA. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea, con la posterior densitometría de las autorradiografías obtenidas. La degradación total se obtuvo calculando el número de eventos catalíticos que dieron lugar a los diferentes productos de degradación. A partir de esos datos pudimos calcular la eficiencia catalítica de cada polimerasa mutante y relativizarla a la de la proteína *wild-type*.

2.4. Ensayo de interacción DNA polimerasa-sustrato de DNA

Para analizar la interacción que establece la DNA polimerasa con los diferentes sustratos de DNA se llevaron a cabo ensayos de retraso en gel. Las reacciones se hicieron en un volumen de 20 µl que contenía 12 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 20 mM sulfato

amónico, 0.1 mg/ml de BSA, 1.2 nM de sp1 o sp1/sp1c+6 (en este caso también se añadió metal activador), y las cantidades indicadas de DNA polimerasa. Después de la incubación durante 5 min a 4 °C, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (80:1 monómero:bis) al 4% (p/v) que contenía 12 mM Tris-acetato (pH 7.5). Tras la electroforesis, llevada a cabo a 4 °C y en el mismo tampón a 8 V/cm (Carthew et al., 1985), los complejos DNA polimerasa/DNA se detectaron como un retraso en la movilidad del sustrato marcado en las autorradiografías.

2.5. Ensayo de fidelidad *in vitro*

Las condiciones son esencialmente las mismas que las empleadas para el ensayo de acoplamiento pol/exo anteriormente descrito. Se utilizó la molécula sustrato sp1/sp1c+6 y concentraciones crecientes de dATP como único nucleótido, que es complementario a las posiciones 1, 2, 4 y 6 de la cadena molde. La cantidad de DNA polimerasa, tanto *wild-type* como mutante, fue de 20 ng. Con objeto de prevenir la degradación exonucleolítica del extremo 3' del oligonucleótido sp1, se utilizó 25 µM dCTP. Tras una incubación de 5 min a 30 °C, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea. Después de obtener la autorradiografía de los mismos, se puede detectar la incorporación errónea de dAMP en posiciones no complementarias a la cadena molde por la aparición de productos cuya longitud es superior a la del producto de extensión correcto de 17mer.

Las condiciones para el cálculo de la K_m aparente por dNTP de las DNA polimerasas mutantes K305I y Y315A fueron las mismas que en el ensayo de fidelidad (Creighton et al., 1995; Saturno et al., 1995). La incubación se hizo a 4 °C durante 1 min. En este ensayo, la primera incorporación que lleva a cabo la enzima corresponde a la posición en estudio. El procesamiento de las muestras fue idéntico al anteriormente señalado.

2.6. Ensayo de procesividad sobre sustratos de DNA de corta longitud

La procesividad de la DNA polimerasa sobre sustratos de DNA de tipo iniciador/molde fue analizada en el caso del mutante de delección Δ TPR2.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 µl que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml de BSA, 1.2 nM de sustrato de DNA marcado (15/33mer), 50 µM dNTPs y cantidades decrecientes tanto de enzima *wild-type* como mutante. Después de 5 min de incubación a 25 °C, las reacciones se pararon añadiendo EDTA para obtener una concentración final de 10 mM. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea, y posterior autorradiografía. La procesividad de polimerización por la DNA polimerasa mutante se valoró analizando la longitud de los productos de replicación obtenidos en función de la relación DNA polimerasa/DNA.

2.7. Ensayo de desplazamiento de banda

Para estudiar la capacidad de desplazar banda del mutante de delección en la región TPR2 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ se empleó la molécula iniciador/molde (15/33mer) con un oligonucleótido de 13mer hibridado *downstream* al oligonucleótido iniciador, quedando entre ambos un *gap* de 5nt (ver Nucleótidos en Materiales). Como control se utilizó la misma molécula sin el oligonucleótido *downstream* a desplazar.



Figura 15. Molécula con un *gap* de 5 nt empleada para analizar la capacidad de desplazamiento de banda de la DNA polimerasa de $\phi 29$ con la delección en el subdominio TPR2. Se muestra a la derecha la molécula híbrida de tipo iniciador/molde utilizada como control.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 μ l que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml de BSA, 1.2 nM de sustrato de DNA marcado, 20 y 300 ng de DNA polimerasa *wild-type* y mutante, respectivamente, y las concentraciones indicadas de los cuatro dNTPs. Después de incubar durante 10 min a 25 $^{\circ}C$, las reacciones se detuvieron añadiendo EDTA hasta una concentración final de 10 mM. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 20%-8 M urea, y posterior autorradiografía. La capacidad de la enzima para llevar a cabo el desplazamiento de banda se analizó comparando la longitud de los productos de elongación obtenidos según la molécula sustrato empleada.

2.8. Ensayo de síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda (replicación de DNA de M13)

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ l que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml de BSA, 40 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μ Ci de $[\alpha\text{-}^{32}P]dATP$, 0.25 μ g de ssDNA M13mp18 hibridado con un oligonucleótido de 17mer y 100 ng de DNA polimerasa. Después de los tiempos de incubación a 30 $^{\circ}C$ indicados, las reacciones se pararon con 10 mM EDTA y 0.1% SDS. Las muestras fueron filtradas a través de columnas de Sephadex G-50 en presencia de 0.1% SDS por centrifugación con objeto de eliminar los dNTPs no incorporados. La actividad relativa de las DNA polimerasas mutantes respecto a la enzima *wild-type* se obtuvo contando la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido de cada muestra después del filtrado. El tamaño de la molécula de DNA sintetizada se analizó por electroforesis en gel alcalino de agarosa (0.7%) (McDonnell et al., 1977), detectándose la unidad de longitud correspondiente al DNA M13mp18 mediante tinción con bromuro de etidio. Posteriormente, el gel fue secado y autorradiografiado.

Para analizar la procesividad de la DNA polimerasa sobre este sustrato se llevó a cabo el mismo tipo de ensayo, bajo las mismas condiciones pero disminuyendo progresivamente la cantidad de DNA polimerasa frente a una cantidad fija de molécula sustrato.

Ensayos de actividades específicas de DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal

2.9. Ensayo de iniciación de la replicación (formación del complejo TP-dAMP)

La mezcla de reacción contenía, en 25 μ l, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml de BSA, 0.2 μ M dATP, 2 μ Ci de [α -³²P]dATP, 500 ng de ϕ 29 TP-DNA, y las cantidades indicadas en cada ensayo de TP y DNA polimerasa. Las muestras se incubaron a 30 °C durante los tiempos indicados. En el caso de los ensayos de iniciación independiente de molde (desoxinucleotidilación de la TP) se empleó 1 mM MnCl₂ como metal activador en lugar de MgCl₂, 15 ng de TP y 30 ng de DNA polimerasa. Posteriormente, las muestras se incubaron a 30 °C durante el tiempo indicado en cada caso. Las reacciones se detuvieron añadiendo 10 mM EDTA y 0.1% SDS, se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50, y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0.1% SDS. La cuantificación fue realizada mediante densitometría de las bandas correspondientes al complejo TP-dAMP, detectadas por autorradiografía.

2.10. Ensayo de replicación de ϕ 29 TP-DNA

La mezcla de reacción contenía, en 25 μ l, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml de BSA, 20 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μ Ci de [α -³²P]dATP, 500 ng de ϕ 29 TP-DNA, 15 ng de TP y 30 ng de DNA polimerasa. Después de la incubación a 30 °C durante los tiempos indicados, las reacciones se detuvieron con 10 mM EDTA-0.1% SDS. Posteriormente, las muestras se filtraron por centrifugación a través de columnas de Sephadex G-50. La actividad relativa se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen extraído. El análisis de los tamaños se llevó a cabo mediante la desnaturalización del DNA sintetizado con 0.7 M NaOH, y posterior electroforesis en gel alcalino de agarosa al 0.7% (McDonnell et al., 1977). Después de la electroforesis, la posición de la molécula unidad correspondiente al ϕ 29 TP-DNA (19.285 pb) se detectó por tinción con bromuro de etidio de los geles que, a continuación, fueron secados y autorradiografiados. La tasa de elongación relativa de cada mutante analizado con respecto a la enzima *wild-type* se infirieron a partir de los tamaños de los productos de elongación obtenidos.

El análisis de los productos de transición se llevó a cabo como se acaba de describir pero utilizando 100 ng de DNA polimerasa y 125 ng de TP, proporcionando la concentración y tipo de dNTP indicado en cada caso. Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida

12%-0.1% SDS (360×280×0.5 mm) con objeto de alcanzar la resolución necesaria para distinguir los primeros productos de elongación.

2.11. Ensayo de amplificación de ϕ 29 TP-DNA

La mezcla de reacción contenía, en 25 μ l, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml de BSA, 80 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μ Ci de [α -³²P]dATP, 5 ng de ϕ 29 TP-DNA, 5 ng de TP, 5 ng de DNA polimerasa, 10 μ g de SSB de ϕ 29 y 10 μ g de DBP de ϕ 29. Después de la incubación durante 90 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron con 10 mM EDTA-0.1% SDS. El procesamiento de las muestras fue análogo al descrito en el ensayo de replicación de ϕ 29 TP-DNA.

Análisis de la interacción entre la TP y las DNA polimerasas mutantes

2.12. Ensayo de interferencia

El ensayo consiste en una reacción de iniciación sin molde en la que se utiliza una cantidad limitante de TP y diferentes proporciones de la DNA polimerasa *wild-type* y mutante. El mutante D249E (catalíticamente inactivo pero con la capacidad intacta de interactuar con la TP) se empleó como control positivo del ensayo de interferencia (Blasco et al., 1993a). Las cantidades de proteína utilizadas fueron ligeramente diferentes según los mutantes ensayados. En el caso de los mutantes F128Y/A y E161Q/A, se emplearon 5 ng de TP, 25 ng de DNA polimerasa *wild-type*, y 25, 50, 100 y 200 ng de DNA polimerasa mutante. Las cantidades de proteínas utilizadas con los mutantes R96A, K110A, K112A, R113A y K114A fueron: 8 ng de TP, 20 ng de DNA polimerasa *wild-type* o mutante (K110A, K112A, R113A y K114A), y cantidades crecientes (20, 40, 80 y 160 ng) de la polimerasa mutante D249E. Por otra parte, se incubaron 20 ng de polimerasa *wild-type* con cantidades crecientes (20, 40, 80 y 160 ng) de la DNA polimerasa mutante R96A. En todos los casos, la incubación se llevó a cabo a 30 °C durante 4 h. Posteriormente, las reacciones se pararon y analizaron como se indica en el apartado 2.9.

2.13. Ensayo de cosedimentación

La mezcla de incubación contenía, en 150 μ l, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 20 mM sulfato amónico, 3 μ g de TP y 6 μ g de DNA polimerasa. Después de incubar las muestras durante 30 min a 4 °C, se depositaron en la parte superior de un gradiente de glicerol continuo del 15 al 30%. El gradiente, de 4 ml, se generó en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM sulfato amónico, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA y 7 mM 2-mercaptoetanol, y se sometió a ultracentrifugación durante 24 h, a 4 °C, y a 58.000 rpm (en un rotor Beckman TST 60.4). Posteriormente, se recogieron fracciones individuales desde la parte

inferior del tubo y se examinaron en geles de poliacrilamida 12%-0.1% SDS. Después de la separación electroforética, los geles fueron teñidos con azul de *Coomassie*.

Comparaciones de secuencias de aminoácidos y modelado estructural

Los alineamientos múltiples de las secuencias aminoacídicas correspondientes a las diferentes DNA polimerasas del subgrupo de aquellas que usan una proteína terminal como iniciador de la replicación se hicieron con el programa MULTALIN (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>), y el resultado fue ajustado manualmente.

Las coordenadas de las estructuras tridimensionales se obtuvieron del banco de datos de proteínas *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Las tres estructuras diferentes de la polimerasa de ϕ 29 utilizadas fueron: 1XHX (correspondiente a la estructura de la apoenzima), 1XHZ (correspondiente al complejo formado por la DNA polimerasa con un pentanucleótido) y 2EX3 (correspondiente al complejo heterodimérico DNA polimerasa y proteína terminal). Las estructuras tridimensionales de la DNA polimerasa de ϕ 29 y sus construcciones mutantes se modelaron utilizando el programa Swiss PDB Viewer (<http://www.expasy.ch/spdbv>).

Estudios anteriores llevados a cabo con la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ han puesto de manifiesto la existencia de diferentes regiones de esta DNA polimerasa implicadas en la interacción con la proteína terminal. Así, en el dominio de polimerización C-terminal fueron identificados como ligandos de la TP residuos pertenecientes a los motivos Tx_2GR (Méndez et al., 1994; Truniger et al., 1999; Dufour et al., 2000). Por otra parte, la expresión aislada del dominio C-terminal de esta DNA polimerasa dio lugar a una disminución drástica de su interacción con la TP, indicando un papel del dominio N-terminal en dicha interacción (Truniger et al., 1998). De hecho, se han podido identificar residuos de este dominio pertenecientes a los motivos Exo II (Eisenbrandt et al., 2002) y (S/T) Lx_2h (de Vega et al., 1998a) implicados en la unión de la TP.

En este capítulo analizamos el papel de los residuos Phe128 y Glu161 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, pertenecientes a los motivos (S/T) Lx_2h y Exo III (de Vega et al., 1998a; Bernad et al., 1989), respectivamente, regiones bien caracterizadas del dominio N-terminal (exonucleasa 3'-5') de las DNA polimerasas que inician la replicación a partir de una proteína terminal.

Aminoácidos conservados en el dominio exonucleasa 3'-5' de las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal

Mediante alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos de DNA polimerasas de la familia B, hemos podido identificar residuos específicamente conservados en el subgrupo de las DNA polimerasas que utilizan una proteína terminal como iniciador de la replicación.

En la Figura 16 se presenta uno de dichos alineamientos, restringido a dos segmentos de secuencia de aminoácidos correspondientes al dominio exonucleasa 3'-5' de las DNA polimerasas pertenecientes a este subgrupo. El primer bloque de residuos aminoacídicos corresponde al motivo definido por la secuencia consenso (S/T) Lx_2h , localizado entre los motivos Exo II y Exo III (de Vega et al., 1998a). El análisis bioquímico previo de las DNA polimerasas de $\phi 29$ mutantes en los residuos Ser122 y Leu123, demostraron la importancia funcional de estos dos aminoácidos en el establecimiento de contactos con ssDNA, estando el residuo de Ser implicado también en interacción con la TP (de Vega et al., 1998a; de Vega et al., 1998b). En este segmento de secuencia se localiza un residuo aromático conservado en 16 de las 19 DNA polimerasas alineadas. En 12 de ellas, este residuo aromático es Phe, mientras que en las otras cuatro es un residuo de Tyr. El segundo segmento de similitud en el alineamiento múltiple mostrado en la Figura 16 es el motivo Exo III, que contiene uno de los Asp catalíticos implicados en la unión y catálisis de la actividad exonucleasa 3'-5', y una Tyr que orienta la molécula de agua en la reacción de hidrólisis de nucleótidos (Blanco et al., 1991).

En la cuarta posición precediendo a dicha Tyr se encuentra un residuo de Glu, específicamente conservado en 14 de las 19 DNA polimerasas alineadas.

		(S/T)Lx ₂ h		Exo III
Adeno-2	/361/	THT SL RKAAQAYAL	(57)	IKETLD Y FALD Y Q
Adeno-7	/361/	THT SL RNAAQAYAL	(57)	IQETL NY FALD Y L
Adeno-12	/361/	THT SL RKAAQAYAL	(57)	IGETL NY FALD Y L
pGKL1	/481/	LLC SL ANASKAFLN	(60)	IEWSKD Y CRND Y L
pGKL2	/470/	ILT SL DKASKAFNV	(57)	LENAIE Y CKVD Y L
pSKL	/475/	ILT SL DKAAKAFNV	(57)	IEKAIE Y CSID Y I
pCLK1	/545/	LPE SL RDLC KDYNI	(47)	KDETLE Y LNL D LI
S-1	/356/	LKV KL ADLADSF	(17)	REDSL TY LKQD Y L
pAI2	/659/	LPI SL DNLSKAFNI	(57)	FKELKN Y FEID Y L
pMC3-2	/379/	LPE SL KRLGTN F NT	(60)	KKE--- Y LEQD Y IK
pEM	/283/	VPE SL DKALSSNGC	(60)	KKECL NY LKD Y L
maranhar	/441/	LPC SL DKLAKDHNI	(60)	EKETI TY LEK D IK
kalilo	/472/	LPI SL DKLSN F FNN	(58)	KKELIK Y FEID Y II
pAL2-1	/517/	LPD KL DNLAKS F GT	(51)	RKQTL Y LERD Y L
PRD1	/111/	LPV EL AASDE----	(17)	KAEILE Y LKG D YV
M2	/116/	IYI SL KKLP-- F PV	(29)	TPEE Y E Y LKN D IE
GA-1	/117/	FYI SL KKLP-- F KV	(28)	DNE-IE Y LKH D IL
Cp1	/115/	FRI SL KILN-- F SI	(28)	KPEWID Y IHV D YA
φ29	/119/	IYI SL KKLP-- F PV	(29)	TPEE Y AYLKN D IQ

*

*

Figura 16. Alineamiento múltiple de dos segmentos de secuencia correspondientes al dominio exonucleasa 3'-5' de DNA polimerasas de la familia B (tipo eucariótico) que usan una proteína como iniciador de la replicación. La nomenclatura y secuencia de las DNA polimerasas se recogen en Braithwaite e Ito, (1993), con la excepción de las secuencias de pMC3-2 y pAL2-1, codificadas por plásmidos lineales de *Morcella conica* (Rohe et al., 1991) y *Podospora anserina* (Hermanns y Osiewacz, 1992), respectivamente; y las DNA polimerasas de los bacteriófagos Nf (González-Huici et al., 2001) PZA (número de acceso PO6950), B103 (número de acceso CAA67649) y Cp1 (número de acceso Q37989). Los números indican la posición del primer aminoácido alineado con respecto al extremo amino de la DNA polimerasa correspondiente. Los residuos altamente conservados de los motivos (S/T)Lx₂h (S y L) y Exo III (Y y D), se presentan en blanco sobre fondo negro. El residuo aromático conservado del motivo (S/T)Lx₂h y el residuo glutámico del motivo Exo III se muestran en negro sobre fondo gris y están marcados con asterisco.

El alto grado de conservación de estos dos residuos dentro del subgrupo de DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, nos llevó a estudiar su implicación en las reacciones catalizadas específicamente por esta clase de DNA polimerasas.

Mutagénesis dirigida en los residuos Phe128 y Glu161 de la DNA polimerasa de φ29

Con objeto de estudiar el papel fisiológico de estos residuos, llevamos a cabo la mutagénesis dirigida en dichas posiciones de la DNA polimerasa de φ29. La Phe128 fue sustituida tanto por Tyr (F128Y) para mantener el grupo aromático, como por Ala (F128A) para eliminarlo. En la posición 161 se introdujo, por una parte, un residuo de Gln (E161Q) adquiriéndose de esta forma una carga positiva en dicha posición y, por otra, una Ala (E161A) con objeto de eliminar la carga negativa del residuo original. Estas DNA polimerasas mutantes fueron sobreexpresadas y purificadas (Materiales y Métodos) para, posteriormente, ser

analizadas bioquímicamente mediante una serie de ensayos *in vitro* correspondientes a las diferentes etapas del mecanismo de replicación, cuya iniciación tiene lugar mediante una proteína terminal.

Equilibrio pol/exo sobre un sustrato de DNA de tipo iniciador/molde de las DNA polimerasas mutantes en los residuos Phe128 y Glu161

Para estudiar si estas mutaciones afectaban a la actividad de polimerización de la enzima, utilizamos la molécula híbrida con estructura de tipo iniciador/molde de 15/21mer, en la que marcamos radiactivamente el extremo 5' de la cadena iniciadora (sp1) (ver Materiales y Métodos). Este ensayo permite el estudio directo del equilibrio dinámico entre las actividades exonucleasa 3'-5' y de polimerización, ya que la molécula híbrida empleada es sustrato de ambas actividades. En ausencia de nucleótidos, los únicos productos que se detectan provienen de la actividad exonucleasa 3'-5' sobre la cadena iniciadora. El tipo de patrón obtenido, así como el grado de degradación de la molécula, reflejan el nivel de actividad exonucleasa 3'-5' que caracteriza a estos mutantes con respecto a la enzima *wild-type*.

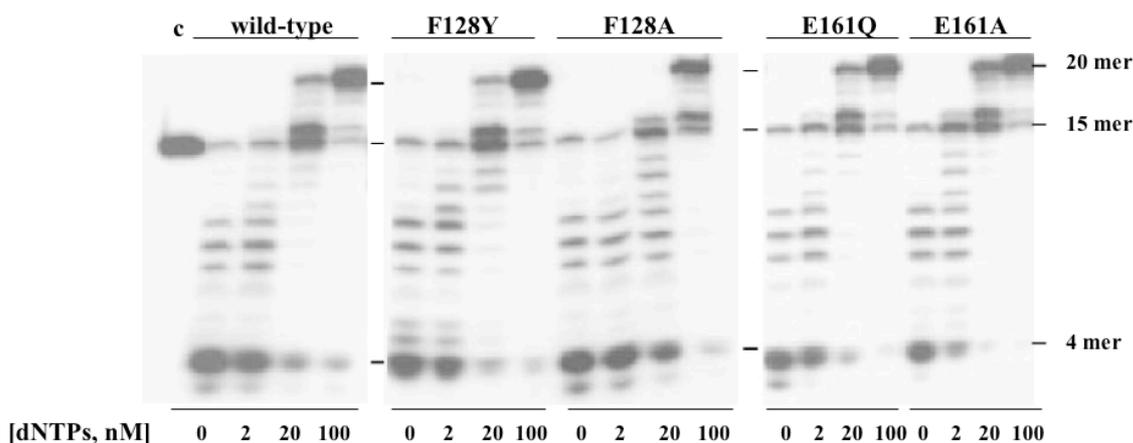


Figura 17. Balance pol/exo de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes en los residuos Phe128 y Glu161. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando la molécula híbrida de 15/21mer como DNA de tipo iniciador/molde, y las concentraciones indicadas de dNTPs. Las actividades de polimerización y exonucleasa 3'-5' son detectadas como un incremento o descenso, respectivamente, en la longitud (15mer) de la cadena iniciadora marcada en su extremo 5' con ^{32}P . La relación pol/exo productiva se indica en la Tabla I.

Como se observa en la Figura 17, los derivados mutantes presentaron un patrón de degradación similar al de la polimerasa *wild-type*, lo cual indica que, bajo las condiciones del ensayo, estas mutaciones no interfirieron en dichas actividades. Por otra parte, a medida que aumentamos la concentración de dNTPs, la exonucleolisis es progresivamente competida por la actividad de polimerización. El requerimiento nucleotídico necesario para conseguir una elongación eficiente por parte de la enzima puede ser empleado para definir la relación pol/exo productiva mostrada por las DNA polimerasas mutantes, que es independiente de la cantidad de

complejos enzima/DNA formados (ver Materiales y Métodos). De esta forma, si una de las actividades anteriormente mencionadas estuviera específicamente afectada, dicho equilibrio se desplazaría hacia la polimerización (baja actividad exonucleasa) o hacia la exonucleolisis (baja actividad de polimerización). Como puede observarse en la misma figura, las polimerasas mutantes presentaron un requerimiento nucleotídico (20/100 nM) similar al de la enzima *wild-type* (Tabla I). Estos resultados nos llevaron a concluir que los cambios introducidos en estas posiciones no afectan a la actividad polimerasa de la enzima, al menos bajo condiciones en las que la polimerización es iniciada por DNA.

Empleando cantidades limitantes de DNA polimerasa, pudimos estudiar específicamente su actividad exonucleasa 3'-5' sobre este tipo de sustrato, utilizando un amplio rango de tiempos. Bajo tales condiciones, el mutante F128Y mostró una reducción de 30 veces dicha actividad (ver Tabla I). Teniendo en cuenta su balance pol/exo *wild-type*, podríamos concluir que la mutación está afectando a la interacción general con el dsDNA pero no de manera específica a alguna de las actividades anteriormente mencionadas. En el caso de los mutantes E161Q y E161A, la reducción fue de 2 y 5 veces, respectivamente (ver Tabla I). El resultado obtenido fue similar cuando se empleó como sustrato ssDNA (ver Tabla I).

Tabla I. Actividades enzimáticas de las DNA polimerasas de $\phi 29$ *wild-type* y mutantes

Parámetro ensayado	Substrato	DNA polimerasa de $\phi 29$ ^a				
		wt	Phe128		Glu161	
			F168Y	F168A	E161Q	E161A
Exonucleasa 3'-5'	dsDNA (15/21mer)	100	3	90	35	20
	ssDNA (15mer)	100	8	62	51	52
Unión Enzima/DNA ^b	dsDNA (15/21mer)	100	n.d.	81	59	55
	ssDNA (15mer)	100	n.d.	43	26	32
Relación Pol/Exo ^c	15/21mer, dNTPs	20/100	20/100	20/100	20/100	20/100
Replicación $\phi 29$ TP-DNA	$\phi 29$ TP-DNA, TP, dNTPs	100	20	2	109	77
Amplificación $\phi 29$ TP-DNA	$\phi 29$ TP-DNA, TP, SSB, DBP, dNTPs	100	3	20	120	130
Replicación M13 DNA	M13 DNA hibridado, dNTPs	100	105	52	115	105
Iniciación $\phi 29$ TP-DNA	$\phi 29$ TP-DNA, TP, dATP	100	<1	<1	67	53
TP-deoxinucleotidilación	TP, dATP	100	<1	<1	62	31

^a Los números indican el porcentaje medio de actividad relativo a la enzima *wild-type* obtenido de varios experimentos.

^b Analizado por ensayo de retraso en gel de poli(acrilamida) en condiciones de baja fuerza iónica.

^c Los números indican la concentración de dNTP (en nM) requerida para elongar eficientemente la cadena iniciadora (15mer) hasta la posición de 20mer.
n.d. no detectado.

Estudio de la interacción enzima/DNA

Para valorar la capacidad de estos mutantes de reconocer eficientemente la estructura del extremo de la cadena iniciadora e interaccionar de forma estable con la misma, se llevó a cabo un ensayo de retraso en gel, empleando como sustrato la misma molécula que en el experimento precedente y Mg^{2+} como metal activador. En estas condiciones, la enzima *wild-type* forma un complejo estable competente para llevar a cabo la replicación de DNA, dando lugar a una única banda retrasada (ver Figura 18) cuya intensidad depende de la cantidad de enzima adicionada.

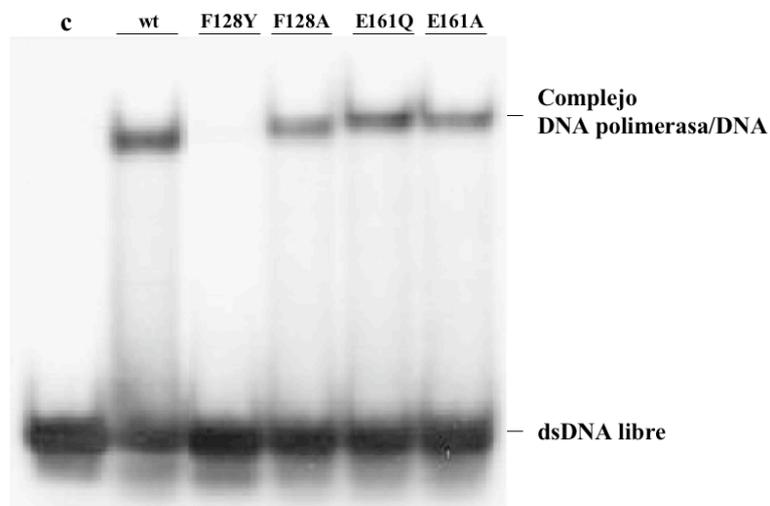


Figura 18. Interacción con dsDNA de las DNA polimerasas de $\phi 29$ *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo empleando la molécula híbrida de 15/21mer como sustrato, marcada en su extremo 5' con ^{32}P , en presencia de 2.5 ng de DNA polimerasa. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida nativo. Las bandas corresponden al DNA libre y al complejo DNA polimerasa/dsDNA.

Como se observa en la Figura 18, las polimerasas mutantes F128A, E161Q y E161A fueron capaces de interaccionar con la molécula sustrato a un nivel similar al de la enzima *wild-type*. Sin embargo, bajo estas mismas condiciones, no se detectó interacción estable entre la polimerasa mutante F128Y y el sustrato de 15/21mer. Este resultado indica que el cambio F128Y afecta a la formación de complejos DNA polimerasa/dsDNA estables.

Por otra parte, se observó una ligera diferencia en la movilidad del complejo formado entre los mutantes E161Q y E161A, y el DNA. Este hecho podría ser interpretado como el resultado de una distorsión parcial de la unión del DNA al centro activo exonucleasa. Cuando se utilizó como sustrato DNA de banda simple, los resultados obtenidos fueron paralelos a los obtenidos con dsDNA (ver Tabla I), lo que sugiere que el residuo Phe128 podría estar orientado en la estructura de la enzima para poder interaccionar con ambos tipos de sustrato.

Las mutaciones introducidas en la Phe128 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ afectan a la replicación del DNA de $\phi 29$

Como se ha explicado en la Introducción, la replicación del genoma de $\phi 29$ conlleva una serie de pasos. Para iniciar la replicación del genoma, la DNA polimerasa tiene que formar un heterodímero con una molécula de TP libre con objeto de catalizar la incorporación dirigida por molde de dAMP en el grupo hidroxilo de la Ser232 de la proteína terminal (iniciación),

dando lugar a la formación del complejo covalente TP-dAMP (Hermoso et al., 1985). La disociación de la DNA polimerasa de la TP que ha iniciado la replicación no ocurre inmediatamente después de la adición del primer nucleótido, sino que tiene lugar cuando el décimo nucleótido se ha incorporado a la cadena de DNA naciente (Méndez et al., 1997). En esta etapa de transición se producen productos abortivos. Posteriormente, la DNA polimerasa lleva a cabo la síntesis completa de la molécula de forma procesiva y acoplado a ella el desplazamiento de la cadena paterna no molde (elongación) (Blanco et al., 1989). Con el fin de estudiar si las mutaciones introducidas en los residuos Phe128 y Glu161 jugaban algún papel en el proceso de replicación del genoma viral, utilizamos el sistema mínimo de replicación de $\phi 29$, TP-DNA, TP y DNA polimerasa. Como se puede observar en la Figura 19A, los mutantes F128Y y F128A presentaron una eficiencia 5 y 50 veces menor, respectivamente, que la de la enzima *wild-type*. Los mutantes E161Q y E161A mostraron, sin embargo, niveles normales de actividad (ver también Tabla I).

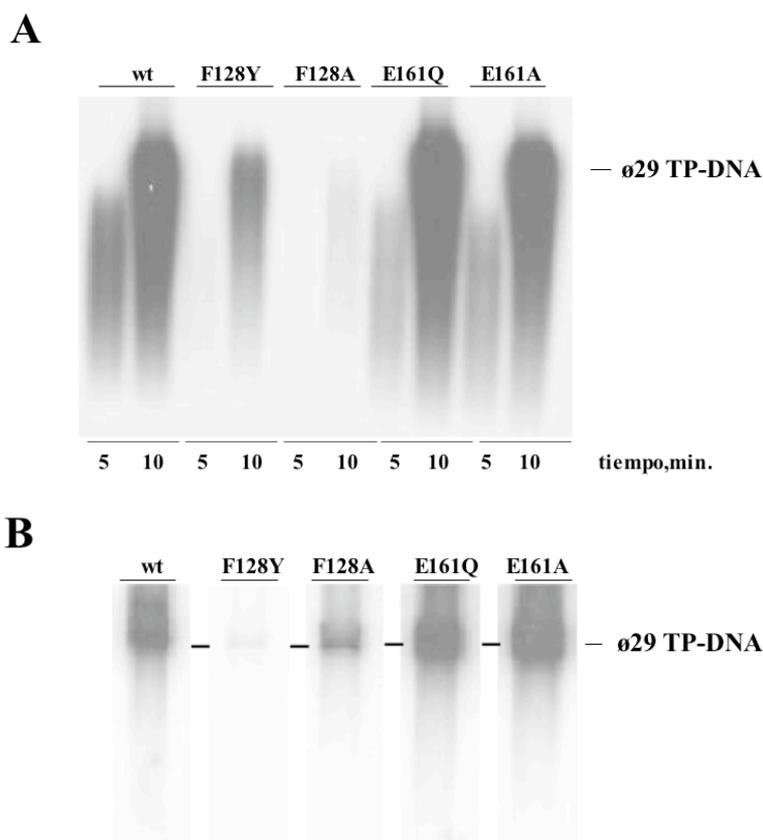


Figura 19. A, Replicación de $\phi 29$ TP-DNA por las DNA polimerasas de $\phi 29$ *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo según se describe en Materiales y Métodos en presencia de 15 ng de TP y 30 ng de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Después de la incubación durante 5 y 10 min a 30 °C, se calcularon los valores de actividad relativa, y la longitud de los productos de DNA sintetizados fue analizada por electroforesis en gel de agarosa alcalino. Se indica la posición a la que migra la molécula unidad de $\phi 29$ TP-DNA. **B, Amplificación de $\phi 29$ TP-DNA.** El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 5 ng de DNA polimerasa *wild-type* o mutante, 5 ng de $\phi 29$

TP, 10 μ g de $\phi 29$ DBP y 10 μ g de $\phi 29$ SSB. Tras la incubación a 30 °C durante 90 min, las muestras se procesaron y el DNA amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa alcalino. Se indica la posición a la que migra la molécula unidad de $\phi 29$ TP-DNA (19.285 pb).

Uno de los sistemas más eficientes de amplificación isotérmica de DNA *in vitro* fue desarrollado hace unos años basado en la maquinaria de replicación de $\phi 29$ (Blanco et al., 1994). Usando cantidades apropiadas de las cuatro proteínas que intervienen en la replicación

del DNA de $\phi 29$ se consigue una amplificación de más de tres órdenes de magnitud. Cuando se llevó a cabo este ensayo, ambos mutantes, F128Y y F128A, estaban severamente afectados en comparación con la enzima *wild-type*, 30 y 5 veces, respectivamente (ver Figura 19B y Tabla I). Por otra parte, los mutantes en el residuo E161 presentaron una actividad de amplificación *wild-type*.

Desplazamiento de banda acoplado a la capacidad de polimerización de las DNA polimerasas mutantes

Como mencionamos anteriormente, la DNA polimerasa de $\phi 29$ tiene que acoplar el desplazamiento de banda a la síntesis procesiva de DNA en ausencia de proteínas accesorias o helicasas (Blanco et al., 1989). Para analizar si el defecto mostrado por las polimerasas mutantes F128Y y F128A en la replicación de $\phi 29$ TP-DNA era debido a un defecto en su capacidad para desplazar banda, llevamos a cabo un ensayo de replicación con un sustrato de ssDNA circular (M13) hibridado con un oligonucleótido de 17mer de longitud. Sobre este sustrato, la DNA polimerasa comienza la replicación a partir del extremo 3'-OH del oligonucleótido hibridado. La primera ronda de replicación no requiere desplazamiento de banda, pero una vez completada, la polimerasa encuentra el extremo 5' del cebador a partir del cual necesita acoplar la polimerización procesiva al desplazamiento de banda para poder continuar la síntesis de DNA.

Como se observa en la Figura 20, los mutantes en el residuo Glu161 fueron capaces de replicar este sustrato con la misma eficiencia que la presentada por la enzima *wild-type*. La polimerasa mutante F128Y también presentó el mismo nivel de actividad que la polimerasa *wild-type*. Sin embargo, el tamaño de los productos de replicación obtenidos con el mutante F128A revela un defecto en la velocidad de polimerización durante el primer ciclo de replicación. Cuando este mutante empieza la segunda ronda, para lo cual requiere la capacidad

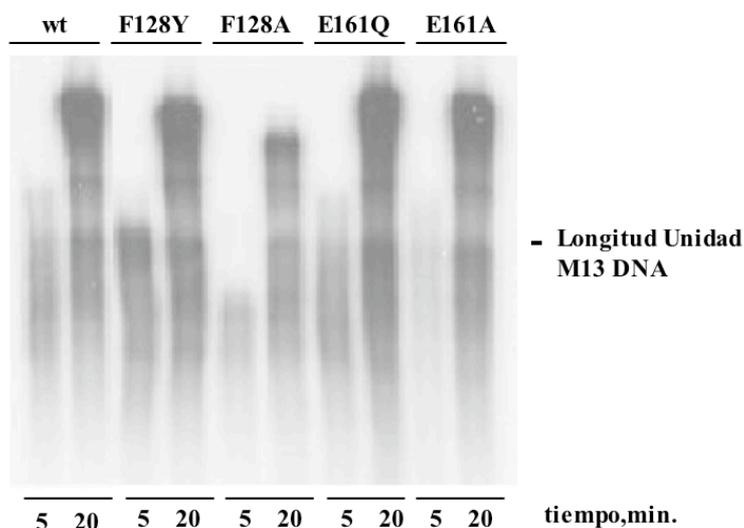


Figura 20. Desplazamiento de banda acoplado a la replicación de M13 DNA por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. La replicación de M13 DNA hibridado con el oligonucleótido iniciador universal se llevó a cabo empleando 40 μ M dNTPs y 100 ng de DNA polimerasa. Después de la incubación durante los tiempos indicados a 30 °C, los valores de actividad relativa fueron calculados en base a la incorporación de dNMPs (ver Tabla I). La posición de la molécula unidad se indica a la derecha.

para desplazar banda, este defecto en la velocidad se agrava con respecto al comportamiento *wild-type*. La presencia de la proteína SSB de $\phi 29$ restauró la velocidad de la polimerasa mutante F128A (no mostrado). La SSB mantiene el molde de ssDNA en una conformación óptima para la elongación, ya que evita la formación de estructuras secundarias y reduce el requerimiento energético necesario para el proceso de apertura de cadenas durante la polimerización (Soengas et al., 1995). Este hecho podría explicar la recuperación parcial experimentada por este mutante en el ensayo de amplificación (en presencia de SSB) con respecto al ensayo de replicación de $\phi 29$ TP-DNA (en ausencia de SSB). Estos resultados sugieren que el residuo Phe128 podría tener alguna implicación en el mecanismo de desplazamiento de banda de la DNA polimerasa de $\phi 29$.

Formación de TP-dAMP (reacción de iniciación) por las DNA polimerasas mutantes

Para empezar la replicación del DNA de $\phi 29$, la DNA polimerasa tiene que formar un heterodímero con una molécula de proteína terminal libre. Una vez que el origen de replicación es reconocido por este complejo, la DNA polimerasa cataliza la inserción dirigida por molde de dAMP en el grupo hidroxilo de la Ser232 de la TP, usando como molde el segundo dTMP de la cadena. Como se observa en la Figura 21, los mutantes en el residuo F128 presentaron una disminución severa en su capacidad de iniciación, mientras que la actividad de los mutantes en el residuo E161 sólo estaba ligeramente afectada (Tabla I). Considerando que la iniciación es un proceso dirigido por molde, podría ocurrir que el defecto que presentaban los mutantes en el residuo F128 fuese consecuencia de una afinidad débil por el molde de DNA. Esta posibilidad puede analizarse ya que la DNA polimerasa de $\phi 29$ tiene la capacidad de llevar a cabo la iniciación en ausencia del sustrato molde (desoxinucleotidilación de la TP) (Blanco et al., 1992). Bajo estas condiciones, la actividad de los derivados mutantes en los residuos Phe128 y Glu161 de la polimerasa fue similar a la obtenida en presencia de molde (ver Figura 21 y Tabla I). Por tanto, la disminución en la capacidad de iniciación mostrada

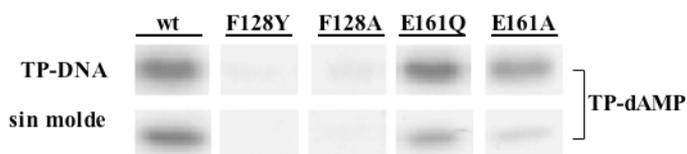


Figura 21. Formación del complejo TP-dAMP catalizada por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes en presencia o ausencia de $\phi 29$ TP-DNA. La reacción dependiente de molde (arriba) se realizó en presencia

de 10 mM MgCl₂, 0.5 μ g TP-DNA, 7.5 ng TP y 15 ng de DNA polimerasa. El tiempo de incubación fue de 3 min a 30 °C. La reacción independiente de molde (abajo) se llevó a cabo en presencia de 1 mM MnCl₂, 15 ng TP y 30 ng de DNA polimerasa. El tiempo de incubación fue de 120 min a 30 °C. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y posterior autorradiografía. Las bandas corresponden al complejo de iniciación TP-dAMP.

por los mutantes F128Y y F128A podría ser debida a un defecto en la interacción con la proteína terminal iniciadora. La capacidad de estos mutantes para interactuar con la TP se analizó mediante un ensayo de interferencia (ver Materiales y Métodos) en el que las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes compiten por una cantidad limitada de TP. Como control se empleó la DNA polimerasa mutante D249E, catalíticamente inactiva pero con una capacidad de interacción con la TP intacta (Blasco et al., 1993a). Como se muestra en la Figura 22, el patrón de inhibición obtenido con este mutante fue paralelo al teórico. Por otra parte, aunque el mutante F128A fue capaz de interferir la unión de la TP con la polimerasa *wild-type*, dicha capacidad, en las dosis más altas de la proteína mutante, fue ligeramente menor que la presentada por el mutante D249E, sugiriendo una interacción defectuosa con la TP. Por el contrario, la enzima *wild-type* no fue competida por el mutante F128Y reflejando una deficiencia en la interacción de este último con la TP. Estos resultados están de acuerdo con una posible implicación del residuo Phe128 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en contactar con la TP.

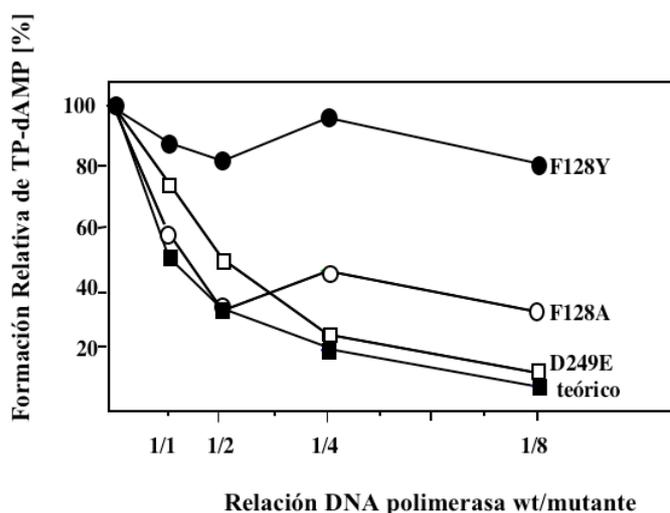


Figura 22. Ensayo de interferencia por la unión a la TP. Las reacciones se llevaron a cabo como se describió en el ensayo de iniciación independiente de molde, usando en este caso una cantidad limitante de TP y diferentes dosis de DNA polimerasa mutante (12.5 ng, 25 ng, 50 ng y 100 ng). Se indica el porcentaje de producto TP-dAMP formado en las diferentes condiciones de competición con respecto al formado en ausencia total de competición (100%).

Con objeto de confirmar estos resultados, se estudió la interacción de las polimerasas mutantes F128Y y F128A con la proteína terminal por ultracentrifugación en gradiente de glicerol, como se describe en Materiales y Métodos. La DNA polimerasa *wild-type* (66 kDa) y la TP (31 kDa) forman un heterodímero de 97 kDa, cosedimentando ambas proteínas en las mismas fracciones. Sin embargo, la polimerasa mutante F128Y y la TP eluyeron independientemente como monómeros, lo que confirma la deficiente interacción de este mutante con la TP. Bajo estas mismas condiciones, el mutante F128A mantuvo su capacidad de unión con la TP (resultados no mostrados). Estos resultados apuntaban a la Phe128 como un residuo importante para que tenga lugar una interacción estable y funcional entre la DNA polimerasa y la TP.

Análisis de la fase de transición por las DNA polimerasas mutantes

Debido a la interacción deficiente y no funcional con la TP que presentaban las DNA polimerasas mutantes F128Y y F128A, respectivamente, consideramos interesante estudiar la etapa de transición que tiene lugar durante los primeros estadios de la replicación del DNA de ϕ 29, que comprende desde la fase de iniciación a la de elongación (Méndez et al., 1997). Con tal propósito, llevamos a cabo un ensayo de elongación truncada (ver Materiales y Métodos).

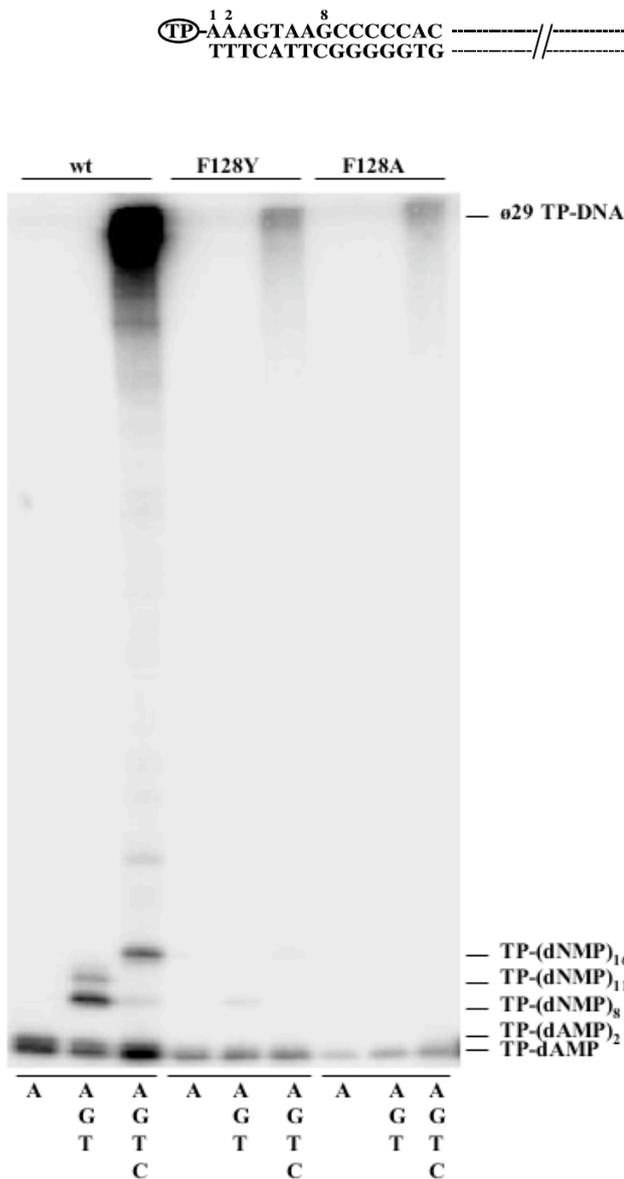


Figura 23. Análisis de los productos de transición generados durante el proceso de replicación de ϕ 29 TP-DNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando 15 ng de TP, 30 ng de DNA polimerasa y 5 μ M de los dNTPs indicados. Tras la incubación durante 5 min a 30 °C, los productos de transición obtenidos se analizaron por SDS-PAGE de alta resolución. Las moléculas completamente replicadas permanecen en la interfase del gel (arriba). En la figura se indica la longitud de los diferentes productos de transición así como la posición correspondiente a la longitud completa de la molécula ϕ 29 TP-DNA.

En presencia de dATP como único nucleótido, la enzima *wild-type* dio lugar a los productos TP-dAMP y TP-(dAMP)₂, como era de esperar considerando que el producto TP-(dAMP)₃ es degradado por la actividad exonucleasa 3'-5' (Esteban et al.1993). En presencia de dATP, dGTP y dTTP, la polimerasa *wild-type* elonga los productos de iniciación hasta generar

las moléculas TP-(dNMP)₈ y TP-(dNMP)₁₁, que son las longitudes esperadas teniendo en cuenta la secuencia de los orígenes de replicación (ver Figura 23). Durante esta etapa de transición, la enzima *wild-type* elongó alrededor del 29% de las moléculas iniciadas. Sin embargo, en el caso de la enzima mutante F128Y fueron elongados sólo el 4% de los productos de iniciación y, prácticamente, no se observó elongación en el caso del mutante F128A. Además, la cantidad relativa de productos TP-(dAMP)₂ obtenida con respecto al TP-dAMP fue mucho menor en los

mutantes F128Y y F128A que en el caso de la enzima *wild-type*. La baja cantidad de productos elongados por las polimerasas mutantes no puede ser consecuencia de la actividad exonucleasa 3'-5' ya que apenas se observó acumulación del producto TP-(dAMP)₂. Por tanto, estos resultados reflejan un defecto de las DNA polimerasas mutantes en el residuo Phe128 durante la etapa de transición del proceso de replicación.

Los resultados presentados en este capítulo, junto con el alto grado de conservación de la Phe128 entre las DNA polimerasas que tienen como iniciador una proteína, sugieren un papel funcional para este residuo de aminoácido en el establecimiento de contactos con la proteína terminal durante los primeros estadios de la replicación del genoma, así como con el DNA en los posteriores pasos de la replicación.

En este capítulo, continuamos estudiando el papel del dominio N-terminal de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en aquellas reacciones específicas de DNA polimerasas que emplean como iniciador de la replicación una proteína terminal. Para ello, hemos analizado bioquímicamente la función de los residuos Arg96, Lys110, Lys112, Arg113 y Lys114 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, localizados en dirección N-terminal respecto al motivo (S/T)L_xh, descrito en el capítulo anterior.

Conservación de residuos aminoacídicos en el dominio exonucleasa 3'-5' de las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal

La Figura 24 muestra un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del subgrupo de las DNA polimerasas que inician la replicación con una proteína terminal, y que contiene la región definida por la secuencia consenso (S/T)L_xh (de Vega et al., 1998a; capítulo anterior).

Como se muestra en la Figura 24, existe un residuo con carga positiva conservado específicamente en 22 de las 25 DNA polimerasas alineadas, y localizado a una distancia de entre 24 y 28 residuos en dirección N-terminal (con la excepción de PAI-2, situado a una distancia de 32 residuos) desde el aminoácido Ser del motivo (S/T)L_xh. Como se observa en la figura, entre dicho residuo y el motivo (S/T)L_xh existe una región con numerosos residuos con carga positiva. El primero de ellos está específicamente conservado en 19 de las 25 DNA polimerasas alineadas. El segundo está localizado a dos posiciones en dirección C-terminal al residuo anterior y está conservado en 13 polimerasas. Contiguo a este último, existe otro con carga positiva presente en 15 polimerasas. Por último, el cuarto residuo con carga positiva que sigue al anterior se encuentra conservado en 16 de estas DNA polimerasas. El alto nivel de conservación de estos residuos en las DNA polimerasas eucarióticas que inician la replicación con proteína terminal podría sugerir un papel en las funciones intrínsecas al mecanismo de iniciación de la replicación utilizado por esta clase de polimerasas, llevándonos a estudiar el papel fisiológico que desempeñan mediante la construcción y posterior análisis funcional de polimerasas mutantes en las posiciones correspondientes, Arg96, Lys110, Lys112, Arg113 y Lys114 de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Con objeto de eliminar la carga positiva, todos estos aminoácidos fueron sustituidos por alanina.

			(S/T)Lx ₂ h
Adenovirus -2	/328/	KRTDFLLWEQGGCDDTDF	KYQYLKV---MVRDTFALTH
pSKL	/444/	-KDKYI IKNNMITYSELYFK	-HSKI-----ILKDPFLFIL
S1	/336/	MRNDCIYSIKLYKVS	---NGDKRLV---LTFMDSYLLLK
pGKL-1	/451/	-KNILIRNNSFISFNFAHDGV	KF-----SVKDSYSFLL
pGKL-2	/439/	-KDKYI IKNNMITYGE	LYYENAI-----YLRDPYLFIL
pCLK-1	/481/	TRNSDILKLTIKRTVDG	--KT-RKV-T--I--NDSFALLP
PAI-2	/621/	GKIDIIMRDDKIMKLIK	TFKIPGKNTTEYSISPIDSLMLP
pMC3-2	/349/	LQLDMTLKTFETNTKCC	--K-NKRMVL-----KDSYLLLP
pAL2-1	/488/	-RDDRIKLCVIK	-----KTPSGYNK--ITFDISYNLP
pEM	/252/	GQWIDNSILYLKIV	---DST-RKL-T--IKLRDSIKLVP
kalilo	/431/	SRNGKILKLTFNFTLP	--NSKRKY-T--LYFMDSLILP
maranhar	/410/	LSIKISYKPEPKKKGG	--KAERH--T--ITIA DSCRLLP
Gelasinospora	/456/	MRNGKILKLTFNFTLP	--NSKRKY-T--LQFMDSLILP
B.napus	/400/	MRNNCLYQLSIYN	-----KGNLLLY--KYMDSLKVL
F.velutipes	/352/	IRDGKIEELRABPNY	---NDNKKTVI---VFRDSL LLLP
P.kluyveri	/521/	RREAKVLKMTVRYMDESG	-KESQM-----VMDSLTVLN
P.purpurea	/104/	IKTIWEGAKYIKLIYTIL	TTHIL-----SLRDSLNL P
PRD1	/82/	-KYFRGKLVN	GRILEVEHGIH-----KFRDSYAILP
CP1	/97/	NDMGVWYSITLFP	---DFTL-----TFRDSLKILN
GA-1	/95/	SGMGQWYAVDVCINT	---RGKNKNHV---VFYDSLK KLP
NF	/94/	SKMGQWYMIDICPGY	---RGKRKLHT---VIYDSLK KLP
B103	/92/	SKMGQWYMIDICPGY	---KGKRKLHT---VIYDSLK KLP
M2	/92/	SKMGQWYMIDICPGY	---KGKRKLHT---VIYDSLK KLP
PZA	/92/	SRMGQWYMIDICLGY	---KGKRKIHT---VIYDSLK KLP
ø29	/94/	SRMGQWYMIDICLGY	---KGKRKIHT---VIYDSLK KLP

Figura 24. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de la región localizada en dirección N-terminal al motivo (S/T)Lx₂h de las DNA polimerasas que inician la replicación con TP. La nomenclatura y secuencia de las DNA polimerasas se recogen en Braithwaite e Ito, (1993), con la excepción de las DNA polimerasas del plásmido lineal mitocondrial de *Gelasinospora* sp. (número de acceso S62752), *Brassica napus* (número de acceso NP862323), *Flammolives velutipes* (número de acceso BAB13499), *Pichia kluyveri* (número de acceso T28426) y *Porphira purpurea* (número de acceso NP049297), las secuencias de pMC3-2 y pAL2, codificadas por plásmidos lineales de *Morchella conica* (Rohe et al., 1991) y *Podospora anserina* (Hermanns y Osiewacz, 1992), respectivamente; y las DNA polimerasas de los bacteriófagos Nf (González-Huici, 2001), PZA (número de acceso PO6950), B103 (número de acceso CAA67649) y Cp1 (número de acceso Q37989). Los números indican la posición del primer aminoácido alineado con respecto al extremo N-terminal de la DNA polimerasa correspondiente. Los residuos altamente conservados se muestran en letras blancas sobre fondo negro. Los residuos conservados se presentan en negro sobre fondo gris. Los residuos estudiados en el capítulo se indican con asteriscos (Arg96, Lys110, Lys112, Arg113 y Lys114 en ø29) y los que han sido estudiados en trabajos anteriores se señalan con puntos negros (Ser122 y Leu123).

Balance pol/exo de las DNA polimerasas mutantes sobre un sustrato de tipo iniciador/molde

Como se describió en el capítulo anterior, la molécula sp1/sp1c+6 es útil para evaluar la capacidad de polimerización en función de la concentración de nucleótidos (balance pol/exo). Así, en ausencia de los mismos, los productos generados nos darán una estimación de la capacidad exonucleolítica de las DNA polimerasas mutantes.

Como puede verse en la Figura 25, aunque el patrón de degradación obtenido por los mutantes fue similar al *wild-type*, el nivel de degradación por la polimerasa mutante R96A fue menor. De hecho, cuando ensayamos la actividad exonucleasa 3'-5' de estas DNA polimerasas en dicho sustrato usando cantidades limitantes de enzima, el mutante R96A presentó una

reducción de la actividad de solo 2.5 veces con respecto a la enzima *wild-type* (ver Tabla II). Asimismo, las polimerasas mutantes presentaron un balance neto de polimerización (ver Tabla II).

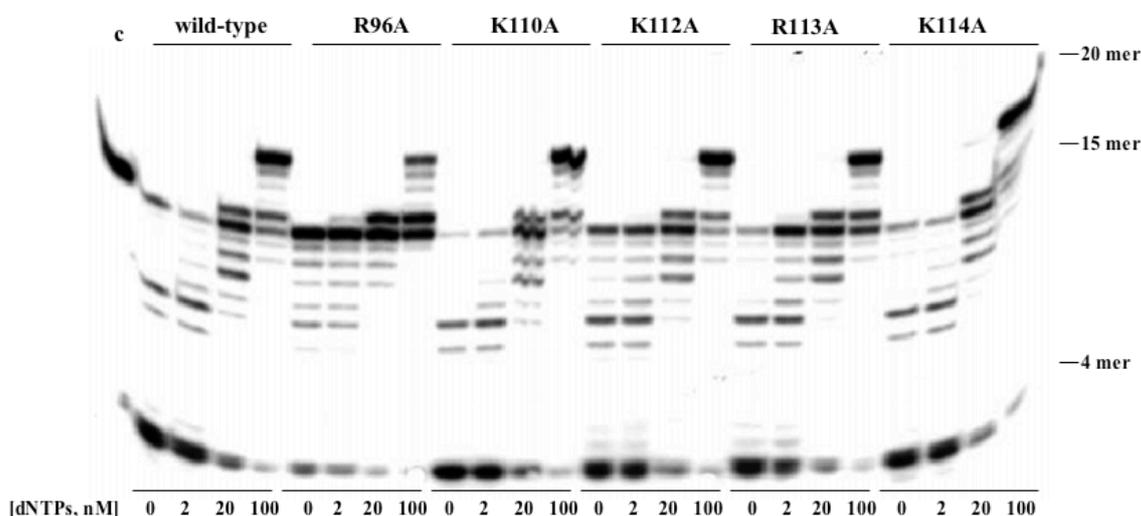


Figura 25. Balance pol/exo de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos usando la molécula híbrida de 15/21mer como DNA iniciador/molde, y las concentraciones indicadas de dNTPs. La actividad de polimerización o exonucleolisis se detectó como un aumento o disminución, respectivamente, en la longitud de la cadena iniciadora (15mer) marcada radiactivamente en su extremo 5'. La relación pol/exo productiva se indica en la Tabla II.

Este resultado sugería que las mutaciones introducidas en los residuos seleccionados no afectan a la actividad polimerasa, como podía ser esperado considerando la localización de los mismos en el dominio N-terminal de la DNA polimerasa. Aunque el mutante R96A mostró una disminución en su actividad de degradación, su balance pol/exo *wild-type* indica que esta mutación está afectando a la estabilidad de la interacción con dsDNA (se aprecia la existencia de una fracción de sustrato que no es usada por el mutante).

Por otra parte, cuando se analizó la fidelidad de estas enzimas en el proceso de polimerización, llevando a cabo un ensayo de incorporación errónea (ver Materiales y Métodos), todas las DNA polimerasas mutantes extendieron la cadena iniciadora únicamente hasta las posiciones de 16 y 17mer, como en el caso de la *wild-type*, indicando que no se produce incorporación nucleotídica estable en posiciones no complementarias al molde (no se muestra).

Interacción de las DNA polimerasas mutantes con el sustrato de DNA

La interacción de las diferentes polimerasas mutantes con la molécula iniciador/molde fue analizada mediante un ensayo de retraso en gel (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 26, las DNA polimerasas mutantes K110A, K112A, R113A y, en menor

grado K114A, mostraron un nivel de interacción similar al de la enzima *wild-type*, mientras que el mutante R96A presentó una disminución en la eficiencia de unión, detectándose una banda

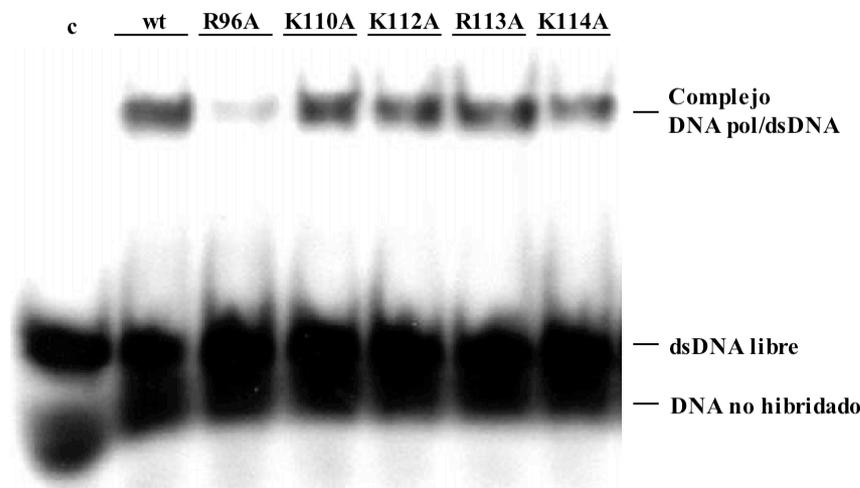


Figura 26. Retraso en gel por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo usando como sustrato la molécula híbrida de 15/21mer marcada en el extremo 5', en presencia de 1.25 ng de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las

bandas correspondientes al DNA libre así como al complejo DNA polimerasa/DNA se detectaron por autorradiografía.

retrasada bastante tenue. Este resultado indica que la pérdida de la carga positiva en la posición 96 y, a un menor nivel en la posición 114, afecta a la interacción de la enzima con el sustrato de dsDNA, lo cual sugiere que ambos residuos ejercen un papel en el establecimiento de los contactos necesarios entre la enzima y el DNA para la formación de un complejo estable.

Tabla II. Actividades enzimáticas de las DNA Polimerasas de $\phi 29$ *wild-type* y mutantes

Parámetro ensayado	Substrato	DNA polimerasa de $\phi 29$ ^a					
		wt	R96A	K110A	K112A	R113A	K114A
Exonucleasa 3'-5'	dsDNA (15/21mer)	100	40	105	95	94	50
	ssDNA (15mer)	100	30	78	79	88	78
Unión Enzima/DNA ^b	dsDNA (15/21mer)	100	20	87	76	86	57
	ssDNA (15mer)	100	32	150	170	130	74
Relación Pol/Exo ^c	15/21mer, dNTPs	20/100	20/100	20/100	20/100	20/100	20/100
Replicación $\phi 29$ TP-DNA	$\phi 29$ TP-DNA, TP, dNTPs	100	2	45	54	16	3
Amplificación $\phi 29$ TP-DNA	$\phi 29$ TP-DNA, TP, SSB, DBP, dNTPs	100	2	26	40	11	4
Replicación M13 DNA	M13 DNA hibridado, dNTPs	100	148	97	96	110	104
Iniciación $\phi 29$ TP-DNA	$\phi 29$ TP-DNA, TP, dATP	100	4	30	45	25	4
TP-deoxinucleotidilación	TP, dATP	100	3	100	120	110	10

^a Los números indican el porcentaje medio de actividad relativa a la enzima *wild-type* a partir de varios experimentos.

^b Analizado mediante ensayo de retraso en gel de poliacrilamida en condiciones de baja fuerza iónica.

^c Los números indican la concentración de dNTP (en nM) requerida para la elongación eficiente de la cadena iniciadora de 15mer hasta la posición de 20mer.

Replicación de $\phi 29$ TP-DNA por las DNA polimerasas mutantes

Utilizando el sistema mínimo de replicación, basado en $\phi 29$ TP-DNA, TP y DNA polimerasa, las DNA polimerasas mutantes K110A y K112A y, a un nivel menor R113A, fueron capaces de sintetizar la molécula completa de $\phi 29$ TP-DNA, lo que nos llevó a descartar defectos en la procesividad y el desplazamiento de banda (Figura 27A). Sin embargo, los mutantes R96A y K114A presentaron una actividad fuertemente reducida con respecto a la enzima *wild-type* (ver Tabla II).

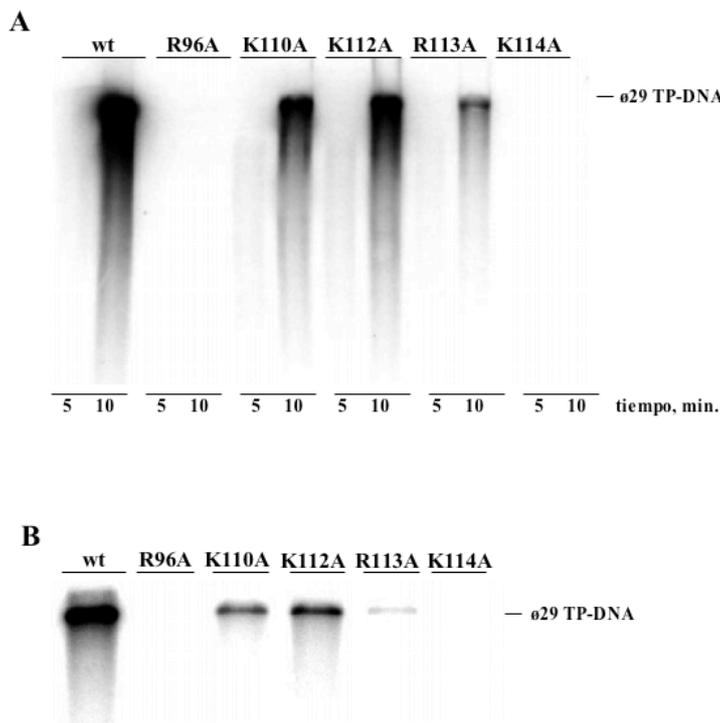


Figura 27. A, Replicación de $\phi 29$ TP-DNA por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 30 ng de DNA polimerasa y 15 ng de TP. Después de la incubación durante 5 min a 30°C, se calcularon los valores de actividad relativa (ver Tabla II). La longitud del DNA sintetizado se analizó por electroforesis en gel de agarosa alcalino. En la figura se indica la posición de migración de la molécula unidad de $\phi 29$ TP-DNA. **B, Amplificación de $\phi 29$ TP-DNA.** El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 5 ng de TP-DNA, 5 ng de DNA polimerasa, 5 ng de TP y 10 μ g

tanto de $\phi 29$ SSB como de DBP. Después de la incubación durante 90 min a 30°C, las muestras se procesaron y el DNA amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa alcalino. Se indica igualmente la posición de migración de la molécula unidad de $\phi 29$ TP-DNA (19.285 pb).

De forma similar, en los ensayos de amplificación de DNA de $\phi 29$, cuyas condiciones se aproximan a la situación *in vivo* (ya que además de TP y DNA polimerasa, se emplean cantidades limitantes de $\phi 29$ TP-DNA, así como las proteínas de unión a ssDNA y a dsDNA de $\phi 29$), se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el ensayo de replicación de TP-DNA (ver Figura 27B y Tabla II).

Capacidad de desplazamiento de banda por las DNA polimerasas mutantes

Como anteriormente mencionamos, con objeto de llevar a cabo la replicación del genoma eficientemente, la DNA polimerasa de $\phi 29$ tiene que acoplar a la síntesis procesiva del DNA el desplazamiento de banda en ausencia de proteínas accesorias o helicasas (Blanco et al., 1989).

Para analizar si la disminuida capacidad que presentaron los mutantes en la replicación de $\phi 29$ TP-DNA era consecuencia de un defecto específico en dicho acoplamiento, llevamos a cabo el ensayo de replicación sobre el DNA de M13 (Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 28 y en la Tabla II, la eficiencia catalítica global, así como la longitud de los productos sintetizados (varias veces el tamaño de la molécula molde) por las polimerasas mutantes indicaban que son capaces de llevar a cabo un desplazamiento de banda procesivo. En el caso del mutante R96A, esta actividad fue incluso mayor a la de la polimerasa *wild-type* a pesar de mostrar una disminución en su capacidad de interacción con el dsDNA. Este fenotipo podría ser explicado como consecuencia de la recuperación de la estabilidad del complejo polimerasa/DNA debido a otras interacciones establecidas entre el sustrato molde, de mayor longitud, y la enzima.

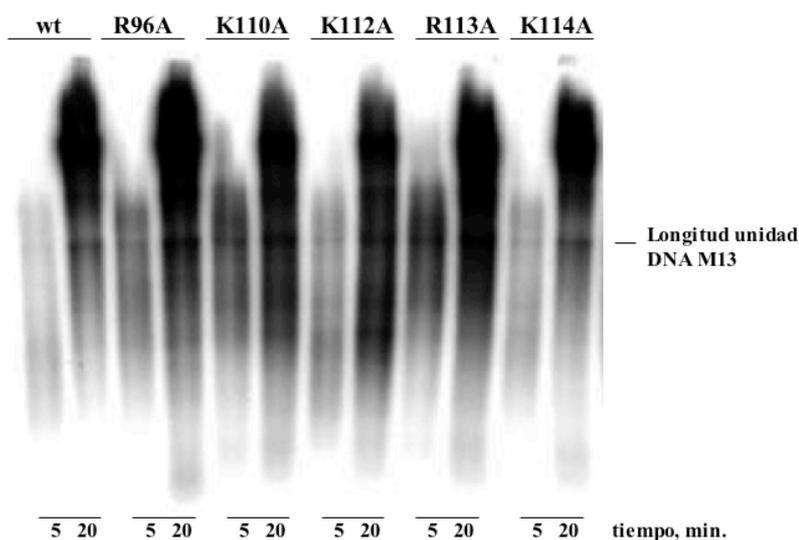


Figura 28. Desplazamiento de banda acoplado a la replicación de DNA de M13. La replicación de la molécula de DNA de M13 hibridada con un oligonucleótido se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, usando 40 μ M dNTPs y 100 ng de DNA polimerasa. Después de la incubación a 30 °C durante los tiempos indicados, los valores de actividad relativa se calcularon en base a la incorporación de dNMPs (ver Tabla II).

Iniciación de la replicación por las DNA polimerasas mutantes

Como hemos descrito anteriormente, las DNA polimerasas mutantes R96A, K114A y, en menor grado R113A, presentaron un nivel de actividad de replicación de $\phi 29$ TP-DNA muy bajo aunque mantuvieron la procesividad característica de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Para analizar la actividad de iniciación de la replicación por estos mutantes, estudiamos la capacidad de los mismos para catalizar la formación del producto TP-dAMP. Como se puede apreciar en la Figura 29 y en la Tabla II, las polimerasas R96A y K114A mostraron una disminución drástica en la reacción de iniciación (25 veces), estando el resto de mutantes ligeramente afectados (2-4 veces).

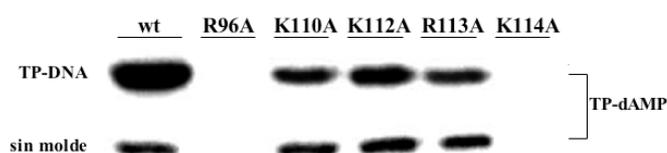


Figura 29. Formación del complejo TP-dAMP catalizado por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes en presencia o ausencia de $\phi 29$ TP-DNA. La reacción dependiente de

molde (arriba) se realizó en presencia de 10 mM MgCl₂, 0.5 µg de φ29 TP-DNA, 15 ng de TP y 30 ng de DNA polimerasa. La incubación fue de 1.5 min a 30 °C. La reacción independiente de molde (abajo) se hizo en presencia de 1 mM MnCl₂, 15 ng de TP y 30 ng de DNA polimerasa. La incubación fue de 3 horas a 30 °C. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y posterior autorradiografía. Las bandas correspondientes al complejo de iniciación TP-dAMP formado fueron detectadas por autorradiografía y la cuantificación de las mismas se realizó por análisis densitométrico.

Considerando que la iniciación en φ29 es un proceso dirigido por molde (Méndez et al., 1992), el defecto observado podría ser consecuencia de una afinidad reducida por el sustrato de DNA. En ausencia de molde, la actividad del mutante R96A fue similar a la correspondiente reacción dirigida por molde. Con respecto al mutante K114A, el nivel de actividad se mantuvo igualmente bajo, aunque fue 2.5 veces mayor que en presencia de TP-DNA (Figura 29 y Tabla II). En el caso de los mutantes K110A, K112A y R113A la recuperación de la actividad fue total (Figura 29 y Tabla II). Este último resultado indicaba que las polimerasas mutantes K110A, K112A y R113A tienen afectada su capacidad de interacción con el sustrato φ29 TP-DNA. Por otra parte, los bajos niveles de actividad obtenidos con los mutantes R96A y K114A en ambos ensayos, con y sin molde, estaban apuntando a un defecto más específico en la interacción con la proteína terminal.

Interacción entre las DNA polimerasas mutantes y la proteína terminal

Puesto que los mutantes K110A, K112A, R113A y K114A conservaron de forma total o parcial la actividad de desoxinucleotidilación de la TP (ver Tabla II), la interacción de éstos con la proteína terminal fue competida con cantidades crecientes de la enzima mutante D249E, presentando todos un patrón de interferencia muy similar al de la enzima *wild-type* (Figura 30).

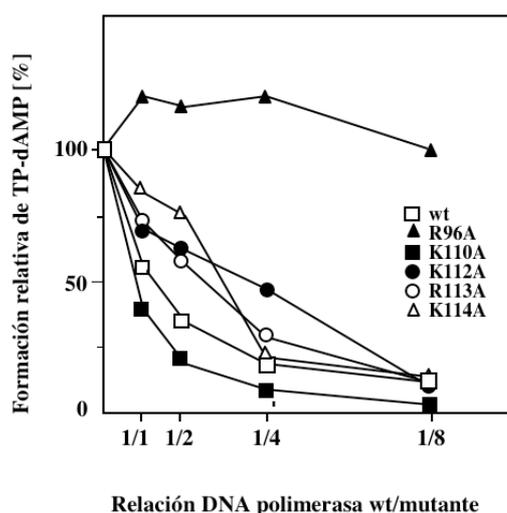


Figura 30. Ensayo de interferencia por la unión con la TP de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. Las reacciones se llevaron a cabo como se describió para la formación independiente de molde del complejo TP-dAMP por las polimerasas *wild-type*, K110A, K112A, R113A y K114A, una cantidad limitada de TP y cantidades crecientes de la DNA polimerasa mutante D249E (ver Materiales y Métodos). Para analizar la capacidad de interferencia del mutante R96A se incubó la DNA polimerasa *wild-type* con cantidades crecientes de la polimerasa mutante. En la gráfica se indica el TP-dAMP formado en las diferentes condiciones de competición con respecto al formado en ausencia de competición (100%).

Estos resultados indican que, al menos bajo estas condiciones, estos mutantes mantuvieron la capacidad de interacción con la TP. Sin embargo, la polimerasa *wild-type* no fue competida por el mutante R96A, lo que probablemente refleja un defecto de este último en su

interacción con la TP. Este resultado sugiere la participación de este residuo de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en la interacción con la proteína terminal.

Para confirmar estos resultados, la interacción de las polimerasas mutantes con la TP se analizó directamente por ultracentrifugación en gradiente de glicerol, como se describe en Materiales y Métodos. Tanto la enzima *wild-type* como los mutantes K110A, K112A, R113A y K114A, formaron un heterodímero de 97 kDa con la TP, cosedimentando ambas proteínas en las mismas fracciones (Figura 31). Sin embargo, la DNA polimerasa y la TP sedimentaron independientemente como monómeros en el caso del mutante R96A, confirmando el defecto en interacción con la proteína terminal observado en el ensayo de interferencia (Figura 31).

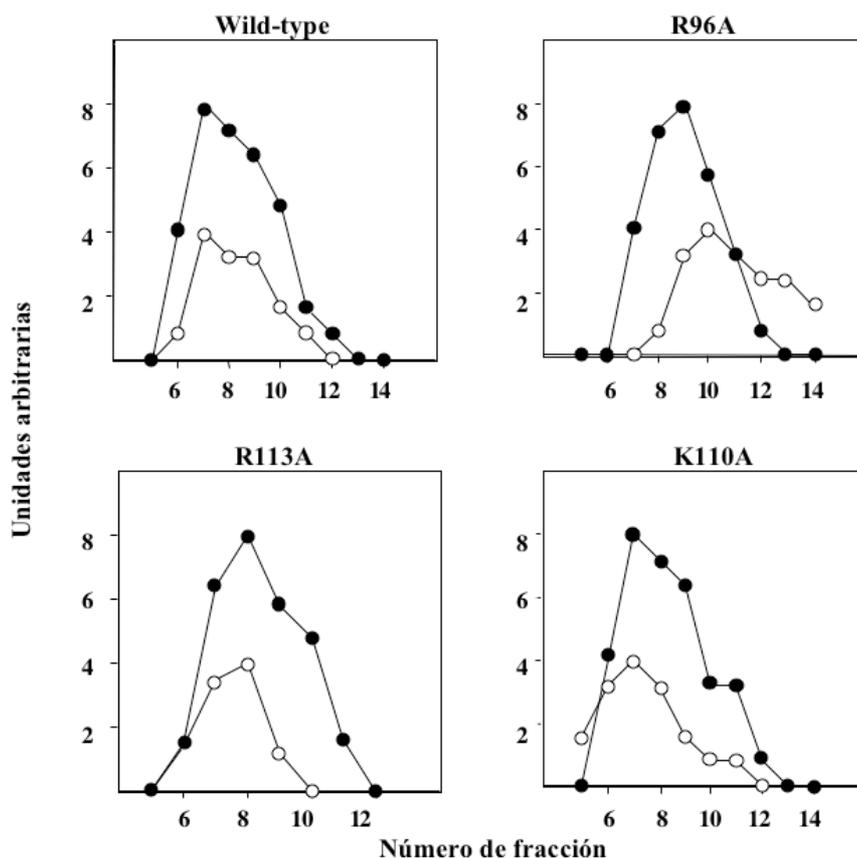


Figura 31. Interacción entre la DNA polimerasa y la TP analizada por ultracentrifugación en gradiente de glicerol. Las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes fueron incubadas con TP durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, las muestras se cargaron en la parte superior de un gradiente de glicerol continuo 15%-30% (4 ml) y se centrifugaron como se describe en Materiales y Métodos. Se fraccionaron los gradientes y se sometieron a SDS-12% PAGE. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de *Coomassie*. En las gráficas se representa la cuantificación densitométrica en unidades arbitrarias de la DNA polimerasa (círculos negros) y la TP (círculos blancos).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con estos mutantes, analizamos el comportamiento de los mismos durante la fase de transición, que tiene lugar tras la iniciación de la replicación, llevando a cabo un ensayo de replicación truncada en el que se utilizan dosis elevadas tanto de DNA polimerasa y TP. En todos los casos, la proporción de moléculas parcialmente elongadas [TP-(dNTP)₂₋₈] con respecto a productos iniciados [TP-dAMP + TP-

(dNTP)₂₋₈] por parte de todas las polimerasas mutantes fue igual a la obtenida con la enzima *wild-type* (no mostrado). Este resultado sugería que los defectos que presentaban los mutantes R96A y K114A se restringen a la fase de iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$.

Los resultados mostrados en este capítulo, junto con estudios anteriores, nos permitieron en aquel momento entender la interacción entre la DNA polimerasa y la proteína terminal como un proceso complejo que implica residuos pertenecientes, al menos, a tres regiones de la DNA polimerasa. Estos residuos podrían estar formando un subdominio específico de interacción con la TP.

Alineamientos múltiples de secuencias de DNA polimerasas de tipo eucariótico condujeron a la identificación de dos regiones de residuos de aminoácidos que sólo están presentes en el grupo de las DNA polimerasas que utilizan como iniciador de la replicación una proteína terminal. Una de esas regiones, llamada TPR1, está insertada entre los motivos Dx_2SLYP (en el subdominio *palm*) y Kx_3NSxYG (en el subdominio *fingers*) (Blasco et al., 1990). Estudios previos llevados a cabo en el residuo Asp332 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, altamente conservado en esta región, mostraron su implicación en la interacción funcional con la TP (Dufour et al., 2000). En este capítulo se muestra el análisis funcional de otros dos residuos conservados en la región TPR1, correspondientes a la Lys305 y Tyr315 en la DNA polimerasa de $\phi 29$.

Conservación de la inserción TPR1 en las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal

La inserción TPR1 fue identificada específicamente en el subgrupo de DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal (Blasco et al., 1990). Esta región está localizada entre los motivos conservados A (Dx_2SLYP) y B (Kx_3NSxYG), en el dominio de polimerización (ver Figura 32). Cuando se alinea la secuencia de aminoácidos de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ con la del bacteriófago RB69, pertenecientes ambas a la familia B de DNA polimerasas, esta región estaría localizada entre los residuos 474 y 475 de la DNA polimerasa de RB69 (Wang et al., 1997; Franklin et al., 2001). La ausencia en aquel momento de la estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$, nos hizo sugerir que la inserción TPR1 quedaría anclada en el subdominio *fingers* de la DNA polimerasa de $\phi 29$ y, por tanto, podría estar desempeñando un papel en la interacción con el DNA. Como se detallará en la Discusión de esta Tesis, la posterior resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ puso de manifiesto que la región TPR1 constituye un subdominio estructuralmente independiente, adyacente al subdominio *palm* y previo al *fingers*.

Con objeto de estudiar el posible papel funcional de esta región, llevamos a cabo mutagénesis dirigida en los residuos Lys305 y Tyr315 de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Como se muestra en la Figura 32, en todas las secuencias de las DNA polimerasas comparadas se encontró un residuo básico, arginina o lisina, en la posición correspondiente a la 305 en la DNA polimerasa de $\phi 29$, mientras que se encontró un residuo aromático (tirosina, fenilalanina o triptófano) en la posición 315 en 14 de las polimerasas alineadas. De esta forma se obtuvieron las DNA polimerasas mutantes K305I, K305R, Y315A y Y315F. El cambio de Lys a Ile permitió la introducción de una cadena lateral hidrofóbica, mientras que el cambio conservativo a Arg se diseñó para mantener la carga positiva. El cambio de Tyr a Ala introdujo una pequeña

cadena lateral hidrofóbica, frente al cambio a Phe que permitió la conservación del grupo aromático.

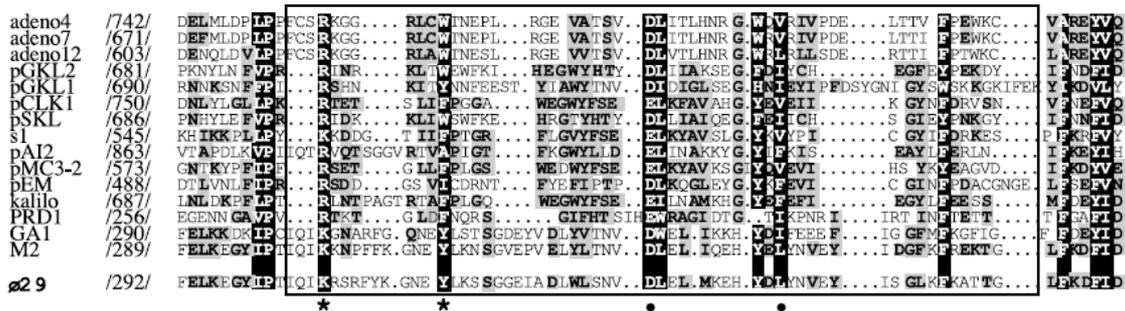


Figura 32. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de DNA polimerasas que contienen la región TPR1. La nomenclatura y secuencia de las DNA polimerasas se recogen en Braithwaite e Ito, (1993), con la excepción de la DNA polimerasa de adenovirus tipo 4 (número de acceso X74672), la DNA polimerasa del plásmido lineal mitocondrial de *Morchella conica*, pMC3-2 (Rohe et al., 1991) y la DNA polimerasa de GA-1 (Illana et al., 1996). Los números entre barras indican la posición del primer aminoácido de la secuencia con respecto al extremo N-terminal de la polimerasa. Los residuos altamente conservados de la región TPR1 se muestran en letras blancas sobre fondo negro. Los residuos conservados de esta región están en negro sobre fondo gris. Los residuos que se estudian en este capítulo se han señalado con asteriscos (Lys305 y Tyr315), y los estudiados anteriormente a esta Tesis se indican con un punto negro (Asp332 y Leu342).

Balance de las actividades de polimerización y exonucleolisis de las DNA polimerasas mutantes en la región TPR1

El efecto de las mutaciones introducidas en la capacidad de la enzima para catalizar la polimerización se analizó sobre una molécula híbrida de tipo iniciador/molde de 15/33mer (ver Materiales y Métodos).

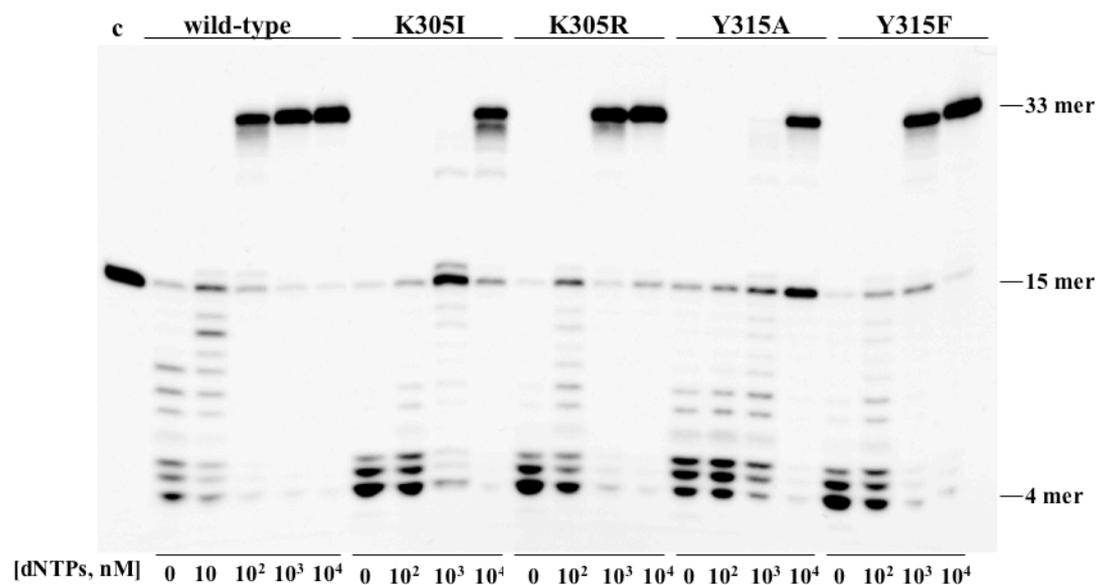


Figura 33. Ensayo acoplado de las actividades de polimerización 5'-3' y exonucleasa 3'-5'. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos usando la molécula 15/33mer marcada con ³²P como molécula híbrida de tipo iniciador/molde, y las concentraciones de dNTPs indicadas. Se señalan las posiciones de 4mer, 15mer (cadena iniciadora no elongada) y 33mer (elongación completa). Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida del 20%-8 M urea.

Como se observa en la Figura 33, las polimerasas mutantes requirieron una concentración superior a la de la *wild-type* (100 nM) para conseguir la polimerización neta. Los derivados mutantes con cambios conservativos, K305R y Y315F, presentaron un requerimiento nucleotídico 10 veces mayor (1 μ M dNTPs) (Tabla III), mientras que las polimerasas con cambios no conservativos, K305I y Y315A, necesitaron una concentración de 10 μ M dNTPs para obtener una polimerización neta. Por otra parte, las cuatro polimerasas mutantes presentaron un nivel de degradación mayor sobre dsDNA respecto a ssDNA en comparación con la DNA polimerasa *wild-type* (ver Figura 33 y Tabla III).

Tabla III. Actividades enzimáticas de las DNA polimerasas de ϕ 29 *wild-type* y mutantes

Parámetro ensayado	Substrato	DNA polimerasa de ϕ 29 ^a				
		wt	Lvs ³⁰⁵		Tvr ³¹⁵	
			K305I	K305R	Y315A	Y315F
Exonucleasa 3'-5'	dsDNA (15/33mer)	100	211	178	240	178
	ssDNA (15mer)	100	107	101	83	114
Relación Pol/Exo ^b	dsDNA (15/33mer)	100	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ³
Replicación M13 DNA	M13 DNA hibridado, 80 μ M dNTPs					
	Mg ²⁺	100	16	55	14	35
	Mn ²⁺	100	33	74	29	34
Replicación ϕ 29 TP-DNA	ϕ 29 TP-DNA, TP, 20 μ M dNTPs	100	<1	22	<2	18
Iniciación ϕ 29 TP-DNA	ϕ 29 TP-DNA, TP, dATP	100	5	101	54	89
TP-deoxinucleotidilación	TP, dATP	100	<1	59	31	87

^a Los números indican el porcentaje medio de actividad relativo a la enzima *wild-type* obtenido de varios experimentos.

^b Los números indican la concentración de dNTP (en nM) requerida para la elongación eficiente de la cadena iniciadora de 15mer hasta la posición de 20mer.

Para determinar si el elevado balance pol/exo mostrado por las DNA polimerasas mutantes era debido únicamente a su incrementada actividad exonucleasa, construimos mutantes dobles introduciendo el cambio en el residuo Asn62 a Asp. Esta sustitución en la DNA polimerasa de ϕ 29 provoca una disminución drástica en la actividad exonucleolítica sobre dsDNA, manteniendo un nivel *wild-type* en el resto de las actividades (de Vega et al., 1996). En dichas condiciones, y empleando el mutante N62D como control, los mutantes K305I/N62D y Y315A/N62D continuaban presentando un balance pol/exo muy elevado requiriendo, respectivamente, una concentración de dNTPs 50 y 5 veces mayor que en el caso de la DNA polimerasa *wild-type* para obtener la elongación productiva de la cadena iniciadora (no mostrado). Estos resultados nos llevaron a analizar si las polimerasas mutantes estaban

afectadas en el uso de los dNTPs mediante la medida de la K_m aparente. Diseñamos un experimento usando como sustrato la molécula de tipo iniciador/molde marcada radiactivamente en el extremo 5' de la cadena iniciadora (Creighton et al., 1995; Saturno et al., 1995) y empleando dATP como único nucleótido. Estos ensayos se llevaron a cabo a 4 °C con el fin de evitar la actividad exonucleasa. En dichas condiciones, los valores de K_m aparente (μM) que presentaron las DNA polimerasas ensayadas fueron 1.5, 200, 10, 29.1 y 7.6 para la enzima *wild-type*, K305I, K305R, Y315A y Y315F, respectivamente.

Estabilización del extremo de la cadena iniciadora por las DNA polimerasas mutantes

El hecho de que los mutantes de la región TPR1 presentaran una actividad exonucleasa mayor que la *wild-type* específicamente sobre sustratos de DNA de doble cadena, junto con el alto valor de K_m por nucleótido obtenido, podría ser consecuencia de un defecto en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización. Para estudiar la interacción que establecen las polimerasas mutantes con dsDNA, llevamos a cabo ensayos de retraso en gel (descritos en Materiales y Métodos). Como se comentó en capítulos anteriores, la formación de un complejo estable enzima/DNA, competente para la replicación, da lugar a una única banda retrasada cuya intensidad depende de la cantidad de DNA polimerasa utilizada (Figura 34). En ausencia de Mg^{2+} , para evitar la actividad exonucleasa, la interacción entre dsDNA y la DNA polimerasa depende exclusivamente de aquellos residuos que actúan como ligandos específicos de DNA. Como puede apreciarse en la Figura 34A, los mutantes K305I y Y315A presentaban disminución en su interacción con el sustrato, mientras que el mutante Y315F estaba sólo ligeramente afectado. La interacción en el caso de la polimerasa K305R fue *wild-type*. No obstante, el mutante K305I y, en menor extensión el mutante Y315A, presentaron una banda difuminada a lo largo del carril, lo cual podría interpretarse como una interacción inestable con el DNA. Se sabe que los iones magnesio estimulan la formación del complejo de polimerización entre la DNA polimerasa y el DNA (Méndez et al., 1994). Como se observa en la Figura 34B, en presencia de Mn^{2+} , el mutante K305I, y en menor extensión el mutante Y315A, dieron lugar a una banda retrasada bastante débil así como a otra situada por debajo del dsDNA libre, consecuencia de su mayor actividad exonucleasa (Tabla III).

Estos resultados, junto con las diferencias mostradas en la degradación de dsDNA y ssDNA, están de acuerdo con la hipótesis de que estas dos polimerasas mutantes están afectadas en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización, favoreciéndose la “apertura” o deshibridación parcial del extremo 3' y, por tanto, la unión preferente del mismo en el centro activo de exonucleolisis.

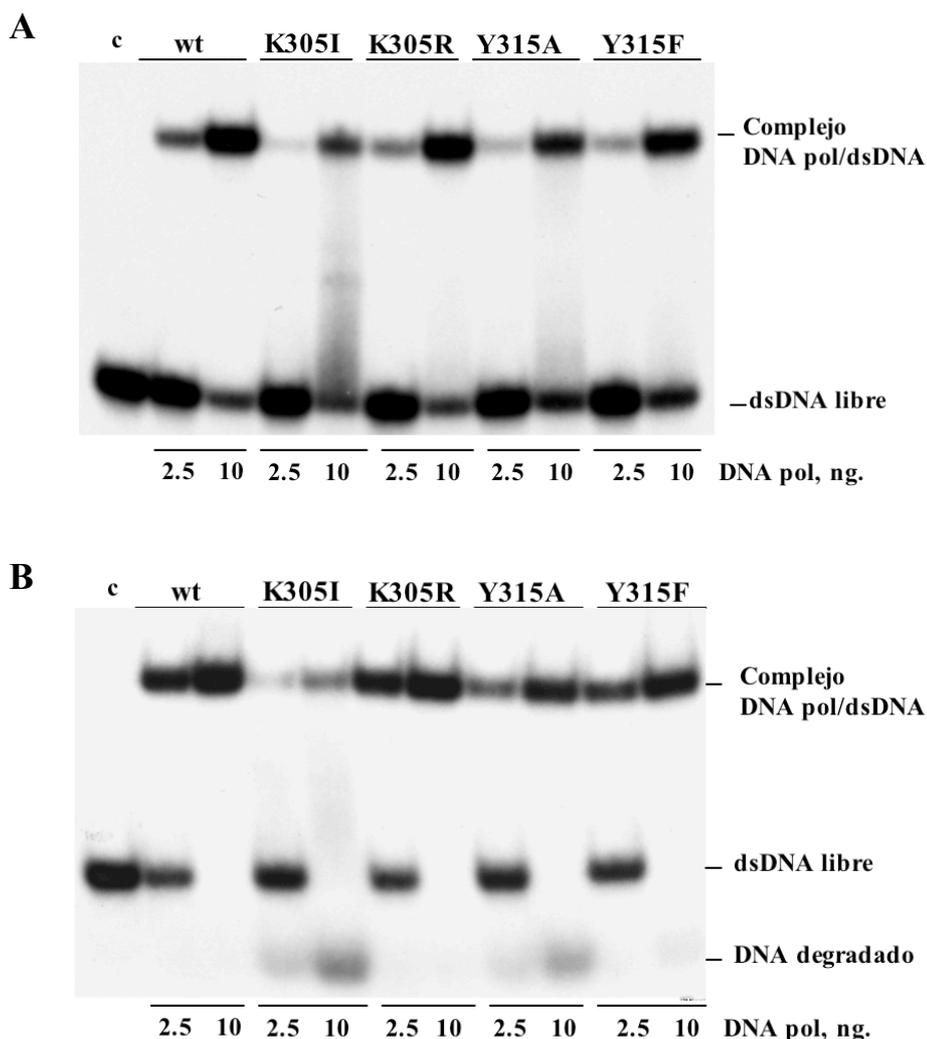


Figura 34. Interacción de las DNA polimerasas mutantes con dsDNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando como sustrato la molécula híbrida de 15/33mer marcada con ^{32}P en su extremo 5'. La interacción entre las DNA polimerasas y la molécula de DNA se ensayó tanto en ausencia (**A**) como en presencia de 10 mM MgCl_2 (**B**). Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida a 4 °C.

Capacidad de síntesis procesiva de las DNA polimerasas mutantes

Puesto que todas las DNA polimerasas mutantes fueron capaces de elongar una molécula híbrida de DNA lineal de pequeño tamaño, llevamos a cabo el proceso de replicación *in vitro* usando una molécula de ssDNA circular (M13) hibridada con un oligonucleótido de 17mer, con el fin de estudiar la síntesis procesiva de DNA acoplada al desplazamiento de banda. Cuando utilizamos Mg^{2+} como metal activador, a pesar de ser ocho veces mayor la concentración de dNTPs presente en este ensayo con respecto al anterior, los mutantes K305I y Y315A estaban fuertemente afectados en su capacidad de replicación (ver Tabla III). Por otra parte, aunque las polimerasas mutantes K305R y Y315F fueron capaces de replicar completamente la molécula sustrato (no se muestra), el nivel de actividad fue menor al de la enzima *wild-type* (ver Tabla III).

Con objeto de analizar la procesividad de estos mutantes, llevamos a cabo este mismo ensayo utilizando diluciones crecientes de la enzima y Mn^{2+} como metal activador, ya que dicho ión incrementa la cantidad de DNA sintetizado en la mayoría de los casos. Un patrón no procesivo de elongación daría lugar a una disminución de la longitud de los productos de DNA sintetizados a medida que se incrementa la dilución de la enzima.

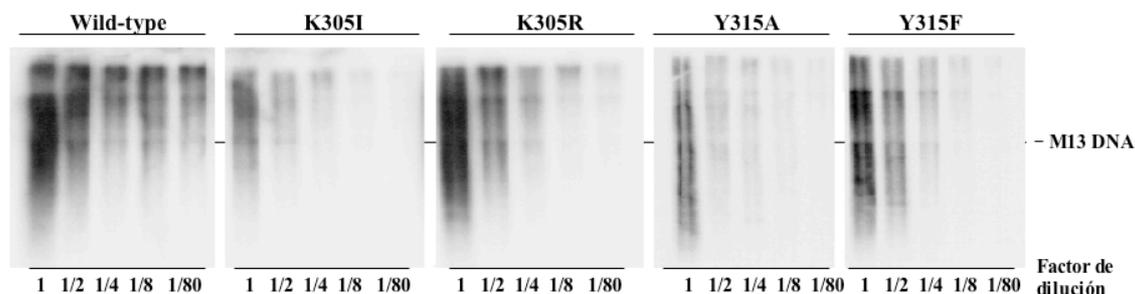


Figura 35. Procesividad en la replicación de DNA de M13 por las DNA polimerasas mutantes. Este ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando 80 μM dNTPs y cantidades decrecientes de DNA polimerasa, en presencia de 1 mM $MnCl_2$. Después de la incubación durante 40 min a 30 °C, los valores de actividad relativa se calcularon a partir de la incorporación de dNMPs (ver Tabla III). Las muestras fueron analizadas como se detalla en Materiales y Métodos. Se indica la posición de la longitud unidad de la molécula de M13 DNA.

Como se muestra en la Figura 35, la disminución progresiva de la relación molar DNA polimerasa/DNA reduce la cantidad de DNA sintetizado, aunque su longitud sea la misma en todos los casos. Este hecho indica que la misma molécula de enzima que inicia la replicación elonga la cadena de DNA sin que medie disociación durante el proceso. Por otra parte, este ensayo nos permitió analizar la capacidad de desplazamiento de banda de las polimerasas mutantes, ya que cuando la horquilla de replicación llega al extremo 5' del oligonucleótido iniciador, tras la primera ronda de síntesis, la polimerización debe proceder acoplada al desplazamiento de la cadena no molde. Como puede verse en la Figura 35, todos los mutantes consiguieron sintetizar productos de DNA de una longitud superior a la de la molécula unidad, indicando que mantienen la capacidad de desplazar banda. Aunque estas DNA polimerasas fueron capaces de replicar de manera procesiva la molécula de DNA de M13, la cantidad de DNA sintetizado fue menor que en el caso de la enzima *wild-type*, especialmente en los cambios no conservativos (K305I y Y315A), probablemente consecuencia del defecto en interacción con el sustrato.

Replicación del genoma de $\phi 29$ por las DNA polimerasas mutantes en la región TPR1

Para valorar la capacidad de las polimerasas mutantes en llevar a cabo la replicación del genoma de $\phi 29$, usamos el sistema mínimo de replicación que contiene DNA polimerasa y TP como únicas proteínas (ver Materiales y Métodos).

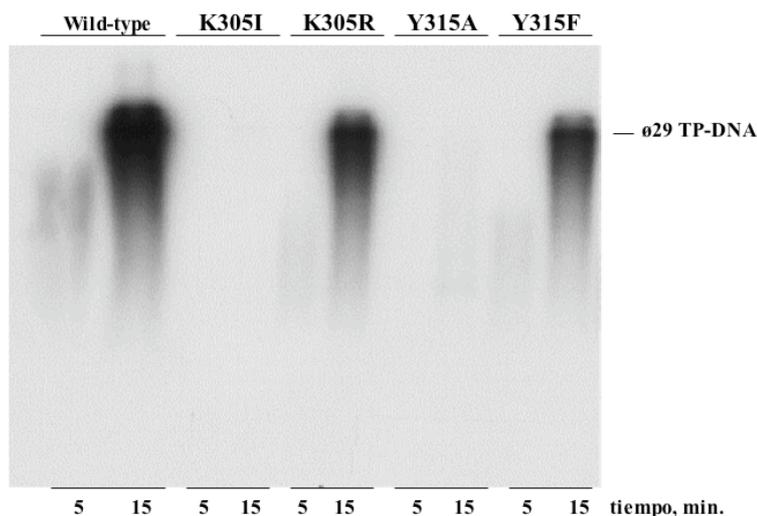


Figura 36. Replicación de ϕ 29 TP-DNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 30 ng de DNA polimerasa y 15 ng de TP. Las muestras fueron incubadas a 30 °C durante los tiempos indicados. Se señala la posición de la longitud unidad de la molécula de ϕ 29 TP-DNA.

Como se observa en la Figura 36, los mutantes K305R y Y315F estaban afectados en la replicación de ϕ 29 TP-DNA (22% y 18% de actividad, respectivamente, con respecto a la enzima *wild-type*), mientras que apenas se detectó actividad de replicación sobre dicho sustrato con los mutantes K305I y Y315A (ver Tabla III).

Para identificar el paso concreto en el que los mutantes estaban afectados, se analizó la capacidad de llevar a cabo la desoxinucleotidilación de la TP (ver Materiales y Métodos) por las DNA polimerasas mutantes. Como se observa en la Tabla III, no se detectó actividad alguna por parte del mutante K305I, mientras que el mutante Y315A alcanzó el 31% de la actividad de la enzima *wild-type*. El derivado mutante K305R estaba ligeramente afectado (59%), mientras que el mutante Y315F mostró un nivel de actividad similar al de la polimerasa *wild-type*.

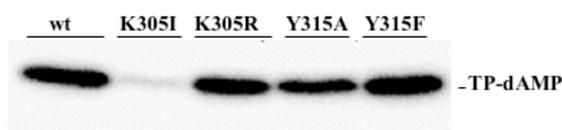


Figura 37. Formación del complejo TP-dAMP catalizado por las DNA polimerasas mutantes. El ensayo se llevó a cabo en presencia de 15 ng de TP, 30 ng de DNA polimerasa y 0.5 μ M de TP-DNA. El tiempo de incubación fue de 1.5 min a 30°C.

Cuando el sustrato TP-DNA fue añadido como molde para la formación del complejo TP-dAMP (Figura 37), el mutante K305I alcanzó el 5% de la actividad *wild-type*, el mutante Y315A fue más activo (54%), y los mutantes K305R y Y315F lograron un nivel de iniciación *wild-type* (ver Tabla III). Por tanto, la reducida capacidad de iniciación de las enzimas mutantes K305I y Y315A podría deberse a un defecto en la interacción con la proteína terminal.

Interacción de las DNA polimerasas mutantes con la TP

Con objeto de analizar la capacidad de las DNA polimerasas mutantes para interactuar con la TP se llevó a cabo un ensayo de interferencia (ver Materiales y Métodos) con los mutantes K305I y Y315A. El patrón de interferencia obtenido con el mutante K305I fue paralelo al teórico. Puesto que la DNA polimerasa mutante Y315A presentaba cierto nivel de

actividad de desoxinucleotidilación de la TP (ver Tabla III), su interacción con la TP fue competida con cantidades crecientes de D249E, originando un patrón de interferencia similar al de la enzima *wild-type* (Figura 38). Estos resultados reflejan que, al menos en estas condiciones de ensayo, tanto el mutante K305I como el Y315A mantuvieron su capacidad de unión con la TP. De hecho, estos mutantes fueron capaces de cosedimentar con la TP tras la ultracentrifugación en gradiente de glicerol del mismo modo que lo hizo la DNA polimerasa *wild-type* (datos no mostrados). Por tanto, la baja actividad de iniciación de la polimerasa mutante K305I no era debida a un defecto en la interacción con la TP.

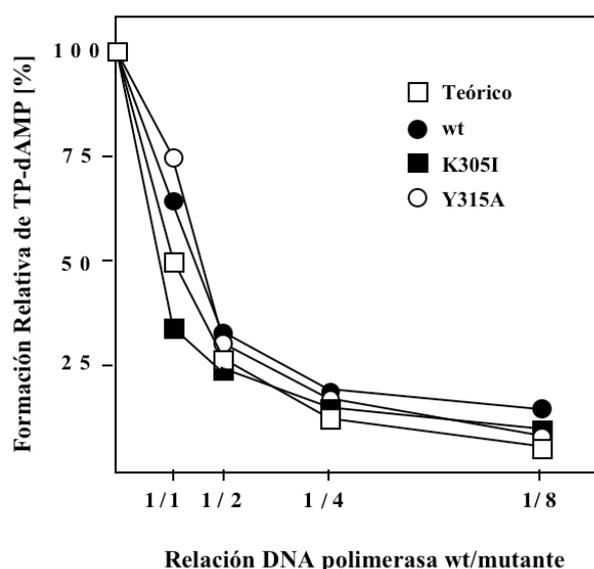


Figura 38. Ensayo de interferencia por la unión de la TP. La reacción de formación de TP-dAMP independiente de molde llevada a cabo por la DNA polimerasa *wild-type* o mutante, K305IA y Y315A, se realizó en presencia de cantidades crecientes de la DNA polimerasa D249E, catalíticamente inactiva pero con la capacidad intacta para interactuar con la TP. Esta DNA polimerasa mutante se empleó como control del 100% de competición, patrón que fue paralelo al teórico. En la gráfica se indica el porcentaje de TP-dAMP formado en las diferentes condiciones de competición con respecto al formado en ausencia de competición (100%).

Como hemos mostrado anteriormente, los mutantes K305I y Y315A presentaron deficiencias en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora del DNA sustrato en el centro activo de polimerización. En este punto, podríamos proponer un papel similar para estos residuos aminoacídicos, especialmente en el caso de la Lys305, en la estabilización del grupo -OH de la Ser232 de la TP. Así, aunque el mutante K305I interaccionara eficientemente con la TP, sería incapaz de catalizar la reacción de iniciación.

Análisis de los productos de transición obtenidos por las DNA polimerasas mutantes K305I y Y315A

Con objeto de valorar la capacidad de los mutantes para llevar a cabo el paso de transición, analizamos los productos de reacción obtenidos llevando a cabo una replicación truncada (dCTP ausente) (ver Figura 39A). Proporcionando dATP como único nucleótido, tanto la DNA polimerasa *wild-type* como los mutantes dieron lugar a los productos TP-dAMP y TP-(dAMP)₂. En presencia de los tres nucleótidos añadidos, la DNA polimerasa *wild-type* se para en la posición octava cuando la replicación comienza desde el origen derecho del genoma del bacteriófago, y en la posición undécima si parte desde el extremo izquierdo. En el caso de los

mutantes K305I y Y315A, el patrón de bandas obtenido fue el mismo en ambos, detectándose únicamente los productos TP-dAMP y TP-(dAMP)₂. Los mutantes K305R y Y315F presentaron el mismo patrón que la enzima *wild-type*, aunque la cantidad de producto elongado fue menor, de acuerdo con su reducida capacidad de replicación de TP-DNA (no mostrado).

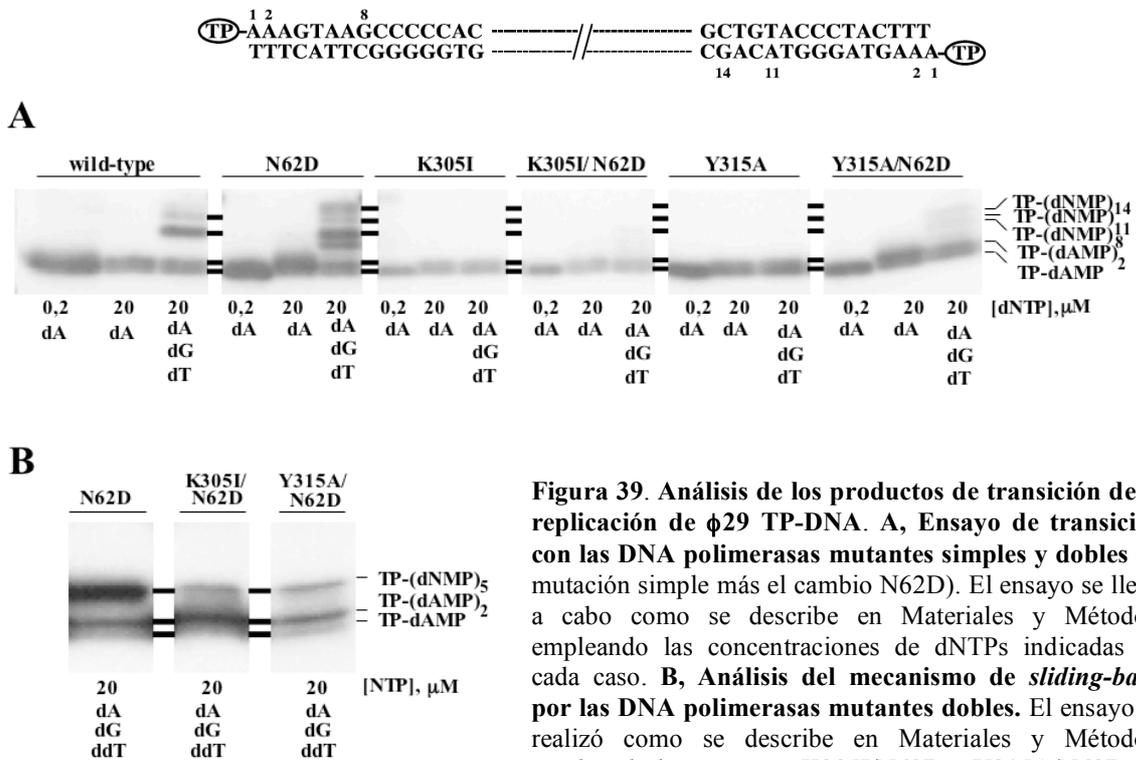


Figura 39. Análisis de los productos de transición de la replicación de ϕ 29 TP-DNA. A, Ensayo de transición con las DNA polimerasas mutantes simples y dobles (la mutación simple más el cambio N62D). El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando las concentraciones de dNTPs indicadas en cada caso. B, Análisis del mecanismo de *sliding-back* por las DNA polimerasas mutantes dobles. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, empleando los mutantes K305I/N62D y Y315A/N62D, en

presencia de la proteína DBP de ϕ 29 y las cantidades indicadas de dATP, dGTP y ddTTP. La DNA polimerasa mutante N62D se llevó como control. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en SDS-PAGE de alta resolución. La longitud de los diferentes productos de transición se indica a la derecha.

La ausencia de productos de una longitud mayor en el caso de los mutantes K305I y Y315A podría ser debida al alto nivel de actividad exonucleasa exhibido por ambos mutantes (ver Tabla III). Para descartar dicha posibilidad, analizamos el comportamiento de los dobles mutantes K305I/N62D y Y315A/N62D. Como se observa en la Figura 39A, con el mutante N62D fue posible detectar además de TP-(dNMP)₈ y TP-(dNMP)₁₁, los productos TP-(dNTP)₆ y TP-(dNTP)₁₄, no observados con la enzima *wild-type*. El producto TP-(dNTP)₆ probablemente corresponda a aquellas moléculas abortadas durante la transición, y el TP-(dNTP)₁₄ sería consecuencia de una incorporación errónea en la posición 12 desde el origen derecho seguida de una elongación posterior (Truniger et al., 1999). La incorporación de la mutación N62D en los mutantes K305I y Y315A permitió la detección de productos de longitud mayor a TP-(dAMP)₂, aunque en un nivel bastante menor que el obtenido con la DNA polimerasa mutante N62D. Por tanto, podemos descartar la posibilidad de que sea un nivel de degradación exonucleolítica elevado el causante de la baja capacidad de transición que presentan estos mutantes.

Por otra parte, considerando la repetición de tres timinas consecutivas en el extremo del genoma, podría ser que las DNA polimerasas mutantes tuvieran un defecto en el mecanismo de “paso atrás” o *sliding-back* si utilizaran la antepenúltima base de timina de la cadena como nucleótido molde para la inserción de la segunda molécula de dAMP. Para estudiar dicha posibilidad, llevamos a cabo el mismo tipo de ensayo que el anteriormente descrito pero usando como nucleótidos dATP, dGTP y ddTTP. Además, con objeto de mejorar el paso de transición llevado a cabo por las DNA polimerasas mutantes, añadimos a la reacción la proteína DBP del bacteriófago $\phi 29$ (Méndez et al., 1997). Bajo tales condiciones, la polimerasa pararía la síntesis tras la incorporación de ddTMP en la posición quinta, dando lugar a productos de 5 nucleótidos de longitud. La presencia de productos con una longitud de un nucleótido menor indicaría un defecto en el paso de *sliding-back*. Las DNA polimerasas con doble mutación llevaron a cabo la transición de forma más eficiente en presencia de DBP de $\phi 29$ que en ausencia de la misma (comparar Figura 39 A y B). Además, la presencia de un producto alargado de 5 nucleótidos de longitud indicó que las DNA polimerasas mutantes fueron capaces de llevar a cabo el paso de *sliding-back*. No obstante, la elongación de TP-dAMP y TP-(dAMP)₂ fue menor en los mutantes K305I/N62D y Y315A/N62D en comparación con el mutante N62D. Este comportamiento podría reflejar un defecto específico en la síntesis entre las posiciones 2 y 5, probablemente como consecuencia de su incapacidad para estabilizar el extremo de la cadena iniciadora en el sitio activo de polimerización. Sin embargo, no puede descartarse un posible defecto en la interacción entre la DNA polimerasa y la proteína terminal durante la etapa de transición.

El elevado balance pol/exo, junto con los defectos de estabilización del DNA en el centro activo de polimerización de los mutantes K305I y Y315A, así como los defectos mostrados por estas polimerasas en los pasos de la replicación dependientes de TP, sugieren un papel general para los residuos Lys305 y Tyr315 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ en la estabilización del extremo 3'-OH iniciador en el centro activo de polimerización.

Una vez concluidos los estudios presentados en los capítulos precedentes, se obtuvo la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Kamtekar et al., 2004) que proporcionó las bases estructurales tanto de su procesividad como de su capacidad para acoplar la polimerización al desplazamiento de banda. La DNA polimerasa mostraba un patrón de plegamiento común a otras DNA polimerasas eucarióticas cristalizadas: un dominio de polimerización que se asemeja a una mano derecha parcialmente abierta, conteniendo los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb*, y un dominio exonucleasa 3'-5' implicado en la actividad correctora de errores. La principal diferencia entre la DNA polimerasa de $\phi 29$ y el resto de DNA polimerasas eucarióticas es la presencia de dos inserciones de secuencia específicas, conservadas en las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, estructuradas como los subdominios TPR1 y TPR2 (Blasco et al., 1990; Dufour et al., 2000). El modelado de la DNA polimerasa de $\phi 29$ con un DNA procedente del complejo ternario de la DNA polimerasa de RB69 (Franklin et al., 2001), sugiere un posible papel funcional para estas inserciones. En concreto, la disposición en la estructura de la polimerasa del subdominio TPR2 ayuda a formar un túnel estrecho a través del cual podría unir la cadena molde *downstream*, y cuya entrada en el centro activo tendría que estar precedida por la apertura de las dos cadenas parentales. Además, el TPR2 junto con los subdominios *palm* y *thumb* formaría una estructura anular alrededor del producto de DNA *upstream*, potenciando presumiblemente la procesividad de la enzima. Como se muestra en este capítulo, el análisis bioquímico de un mutante de delección de la DNA polimerasa de $\phi 29$ que carece de la inserción TPR2, demuestra el papel funcional de esta región en conferir tanto una elevada procesividad como capacidad de desplazamiento de banda a la DNA polimerasa de $\phi 29$.

Delección del subdominio TPR2, una inserción específica de las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal

La DNA polimerasa de $\phi 29$ contiene dos inserciones en el subdominio *palm*, conservadas específicamente en el subgrupo de las DNA polimerasas que utilizan una proteína como iniciador de la replicación (Blasco et al., 1990; Dufour et al., 2000). Tales inserciones son el subdominio TPR1, cuyos residuos conservados fueron propuestos como posibles ligandos de la proteína terminal y el DNA (Dufour et al., 2000; Capítulo III de esta Tesis), y el subdominio TPR2, con un papel funcional desconocido (ver Figura 40A). La inserción TPR2 comprende los residuos 394-427 y está localizada entre los motivos conservados Kx₃NSxYG (motivo B) y Tx₂G/AR (ver Figura 40A y B). Contiene una estructura β -giro- β (*β -hairpin*), de tipo horquilla, que conecta las hélices α N (perteneciente al subdominio *fingers*) y O (perteneciente al subdominio *palm*) (Kamtekar et al., 2004) (ver figura 40B). La región TPR2 se localiza justo

enfrentada al subdominio *thumb*, también con estructura β -*hairpin* en contraste a otras DNA polimerasas estructuralmente resueltas.

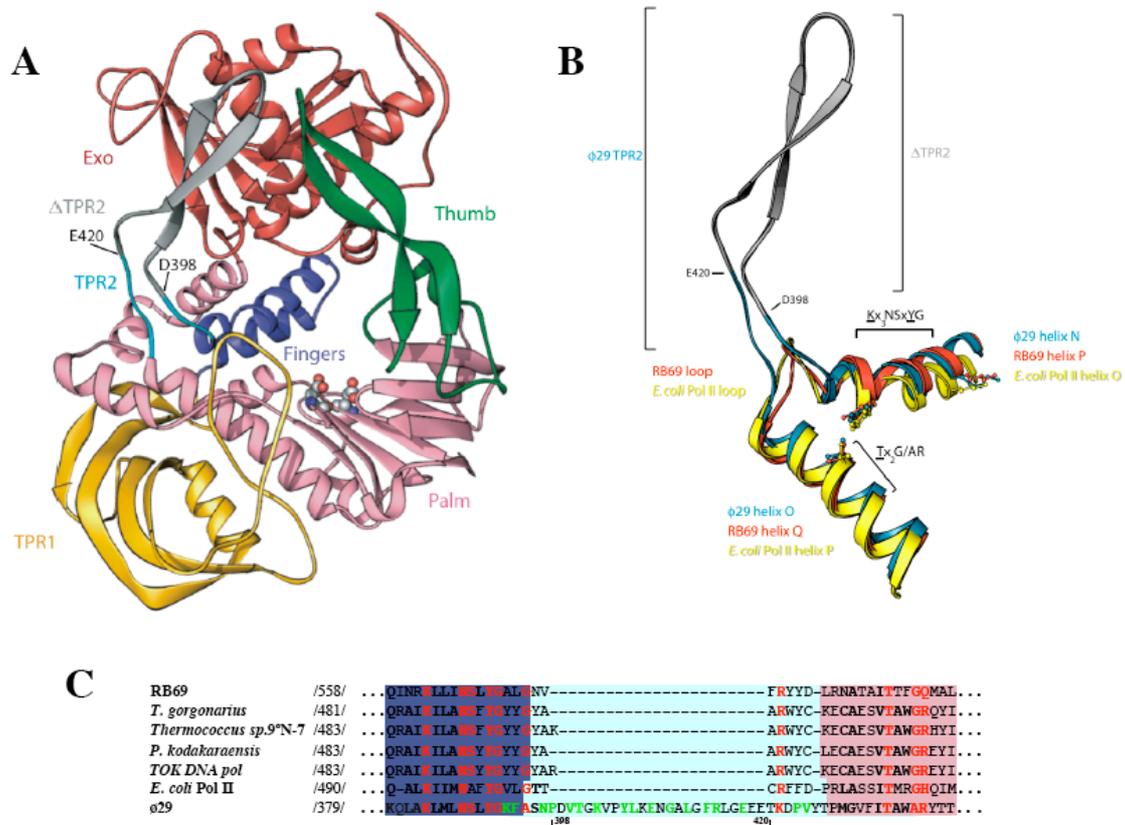


Figura 40. La inserción TPR2 de la DNA polimerasa de ϕ 29, un subdominio específico de las DNA polimerasas que inician la replicación con TP. **A**, Localización de la inserción TPR2 de la DNA polimerasa de ϕ 29. La representación estructural de la polimerasa muestra sus cuatro subdominios coloreados como sigue: el dominio exonucleasa 3'-5' en rojo y los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb* en rosa, azul y verde, respectivamente. La inserción TPR2 que conecta las hélices N (*fingers*) y O (*palm*) se presenta en azul claro, mientras que la región delecionada de la inserción se representa en gris. Los datos cristalográficos están recogidos en Kamtekar et al., (2004). **B**, Superposición de las hélices α de los subdominios *fingers* y *palm* homólogos de las DNA polimerasas de tipo eucariótico de los bacteriófagos ϕ 29 y RB69, y de la DNA polimerasa II de *E. coli*, obtenida por ajuste automático de los residuos Lys y Tyr del motivo Kx₃NSxYG, y de la Thr del motivo Tx₂G/AR usando el programa SWISS-PDBVIEWER (www.expasy.org/spdbv). La inserción TPR2 de la DNA polimerasa de ϕ 29 se presenta en gris y sus hélices α flanqueantes están coloreadas en azul. Las hélices correspondientes en las DNA polimerasas de RB69 y II de *E. coli*, y el bucle localizado entre ellas se muestra en rojo y amarillo, respectivamente. Los datos cristalográficos provienen de los códigos ID obtenidos de la base de datos *Protein Data Bank*: 1IG9 (DNA polimerasa de RB69), 1XHX (DNA polimerasa de ϕ 29) y 1Q8I (DNA polimerasa II de *E. coli*). Las cadenas laterales representadas en las hélices α pertenecen a los aminoácidos subrayados en los motivos Kx₃NSxYG y Tx₂G/AR. **C**, Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la región comprendida entre los motivos Kx₃NSxYG y Tx₂G/AR de DNA polimerasas dependientes de DNA pertenecientes a la familia B o de tipo eucariótico. La nomenclatura y secuencia de las DNA polimerasas se han recogido de Braithwaite e Ito, (1993), con la excepción de las DNA polimerasas bacterianas de *T. gorgonarius* (no. de acceso en GenBank P56689), *P. kodakaraensis* (no. de acceso en GenBank BAA06142), *T. sp.9^oN-7* (Rodríguez et al., 2000), la DNA polimerasa de la arqueobacteria *D. tok* (no. de acceso en GenBank 1QQCA), y la DNA polimerasa del bacteriófago RB69 (no. de acceso en GenBank Q38087). Los números indican la posición del primer aminoácido alineado con respecto al extremo amino de la DNA polimerasa correspondiente. Los residuos altamente conservados entre las DNA polimerasas de la familia B se muestran en letras rojas. Los residuos conservados específicamente en el subgrupo de las DNA polimerasas dentro de la familia B que inician la replicación con proteína terminal se muestran en verde. En el alineamiento se indica la

secuencia de aminoácidos comprendida entre los residuos Asp398 y Glu420, delecionada en el mutante de la DNA polimerasa de $\phi 29$.

Según la resolución cristalográfica, los subdominios TPR2, *thumb* y *palm* constituyen una estructura en forma de anillo que podría estar “abrazando” al DNA *upstream* en el dominio de polimerización durante la replicación, otorgando a la polimerasa la estabilidad requerida para su interacción con el DNA. En la misma posición, otras DNA polimerasas contienen un pequeño bucle, formado por entre 7 a 9 aminoácidos (ver Figura 40B). Por tanto, como puede verse en las DNA polimerasas alineadas en la Figura 40C, la inserción TPR2 está presente sólo en la DNA polimerasa de $\phi 29$ pero conservada en el subgrupo de las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal (no se muestra). Con objeto de estudiar el papel funcional del subdominio TPR2 en la capacidad de la DNA polimerasa de $\phi 29$ de replicar el genoma viral de forma procesiva y acoplada al desplazamiento de banda, llevamos a cabo la deleción de dicho subdominio en esta DNA polimerasa eliminando los residuos comprendidos entre las posiciones 398 y 420 (Δ TPR2). La proteína resultante mantiene 11 residuos aminoacídicos entre las hélices α N y O con el fin de preservar el correcto plegamiento y la adecuada orientación del subdominio *fingers* con respecto al subdominio *palm*.

Interacción entre la DNA polimerasa mutante y el DNA

El modelado de un sustrato de DNA de tipo iniciador/molde en la DNA polimerasa de $\phi 29$ sugería que el subdominio TPR2, junto con los subdominios *thumb*, *fingers* y *palm*, se dispondrían rodeando el DNA dúplex en el sitio activo de polimerización confiriéndole procesividad a la enzima (Kamtekar et al., 2004). Con objeto de analizar la capacidad del mutante Δ TPR2 para interaccionar eficientemente con el DNA, se llevaron a cabo ensayos de retraso en gel utilizando como sustrato una molécula híbrida de 15/33mer (ver Materiales y Métodos).

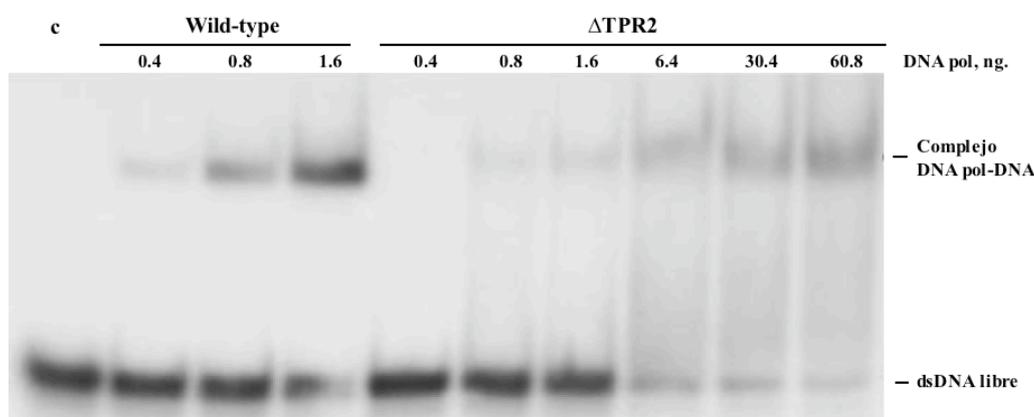


Figura 41. La DNA polimerasa mutante Δ TPR2 está afectada en su capacidad de interacción estable con el DNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos usando como sustrato una molécula de DNA de tipo iniciador/molde de 15/33mer marcada radiactivamente. Se indican

las concentraciones de DNA polimerasa *wild-type* y mutante. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior autorradiografía. En la figura se indica la posición de las bandas correspondientes al DNA libre y al complejo DNA polimerasa/DNA.

Como se muestra en la Figura 41, la enzima *wild-type* dio lugar a una única banda retrasada. El mutante Δ TPR2 estaba fuertemente afectado en su capacidad de interacción con el DNA (Figura 41). Además, en presencia de una concentración relativamente alta de enzima mutante (6.4 ng), se observa difusión de la banda a lo largo del carril, lo cual indica la formación de complejos DNA polimerasa/DNA inestables.

La DNA polimerasa mutante Δ TPR2 tiene actividad de polimerización y exonucleolisis

Para analizar tanto la actividad de polimerización como de exonucleolisis, estudiamos el acoplamiento funcional entre la síntesis y la degradación sobre la misma molécula híbrida empleada en el ensayo de retraso en gel, en función de la concentración de dNTPs (ver Materiales y Métodos). El mutante Δ TPR2 presentó actividad exonucleasa aunque la longitud de los productos de degradación fue mayor que con la polimerasa *wild-type* (Figura 42). Por otra parte, el mutante de delección también presentó actividad de polimerización aunque requirió una concentración de dNTPs mayor (500 nM) para obtener la elongación eficiente de la cadena iniciadora. Sin embargo, a una concentración de 20 nM dNTPs, la banda +1 fue más intensa que la obtenida con la DNA polimerasa *wild-type*. Además, el mutante Δ TPR2 mostró una mejora en la capacidad para incorporar el nucleótido complementario a la última posición de la cadena molde (comparar las actividades de ambas enzimas a 500 nM). Estos resultados podrían estar reflejando un comportamiento distributivo por parte de la DNA polimerasa mutante, incapaz de continuar la replicación en presencia de una concentración de dNTPs relativamente baja.

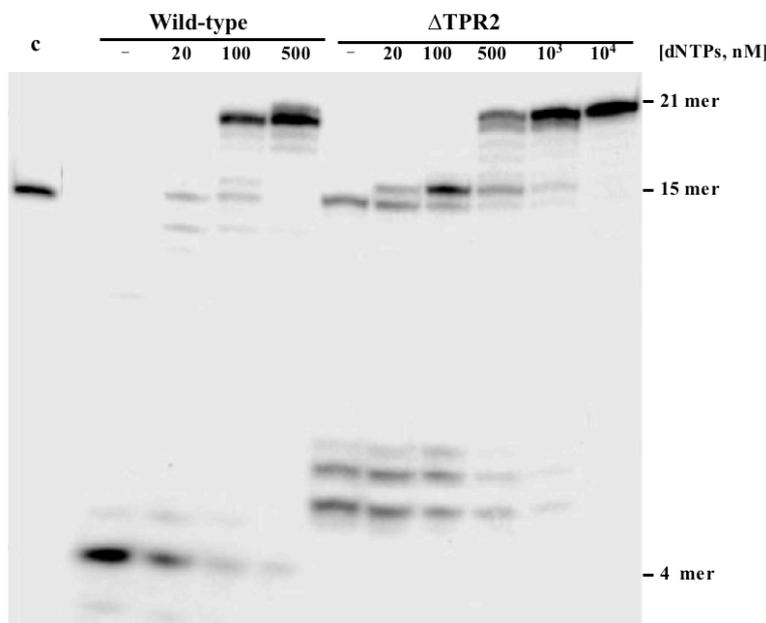


Figura 42. La DNA polimerasa mutante Δ TPR2 presenta actividad de polimerización y exonucleolisis. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, usando como molécula sustrato un DNA de 15/33mer y las concentraciones indicadas de dNTPs. Las actividades de polimerización y exonucleasa 3'-5' se detectaron como un aumento o disminución, respectivamente, de la longitud (15mer) de la cadena iniciadora marcada en su extremo 5' con ³²P.

Por otra parte, la fidelidad en la inserción de nucleótido por la polimerasa mutante durante la replicación en este tipo de moléculas iniciador/molde (ver Materiales y Métodos) fue similar a la de la DNA polimerasa *wild-type* (datos no mostrados). El hecho de que la polimerasa mutante conserve tanto la actividad de polimerización como de exonucleolisis, así como una fidelidad inalterada en la inserción de nucleótidos, descarta la posibilidad de un plegamiento no funcional como consecuencia del cambio introducido en la molécula.

Análisis de la capacidad procesiva de la DNA polimerasa de $\phi 29$ mutante $\Delta TPR2$

La DNA polimerasa de $\phi 29$ es un paradigma de la replicación procesiva del DNA, ya que es capaz de incorporar >70 kb sin disociarse del DNA en ausencia de factores accesorios (Blanco et al., 1989).

Con objeto de estudiar si la eliminación de la inserción TPR2 tuvo algún efecto en la procesividad de la enzima, analizamos la longitud de los productos obtenidos durante la polimerización en función de la relación enzima/DNA. Como se muestra en la Figura 43, la disminución de la relación enzima/DNA no alteró la longitud (33mer) de los productos de elongación sintetizados por la enzima *wild-type*, hasta un límite en el que la relación fue demasiado baja para detectar elongación de la cadena iniciadora. Por el contrario, la longitud de los productos sintetizados por el mutante $\Delta TPR2$ disminuyó con la relación enzima/DNA (Figura 43), de acuerdo a un patrón de polimerización distributivo.

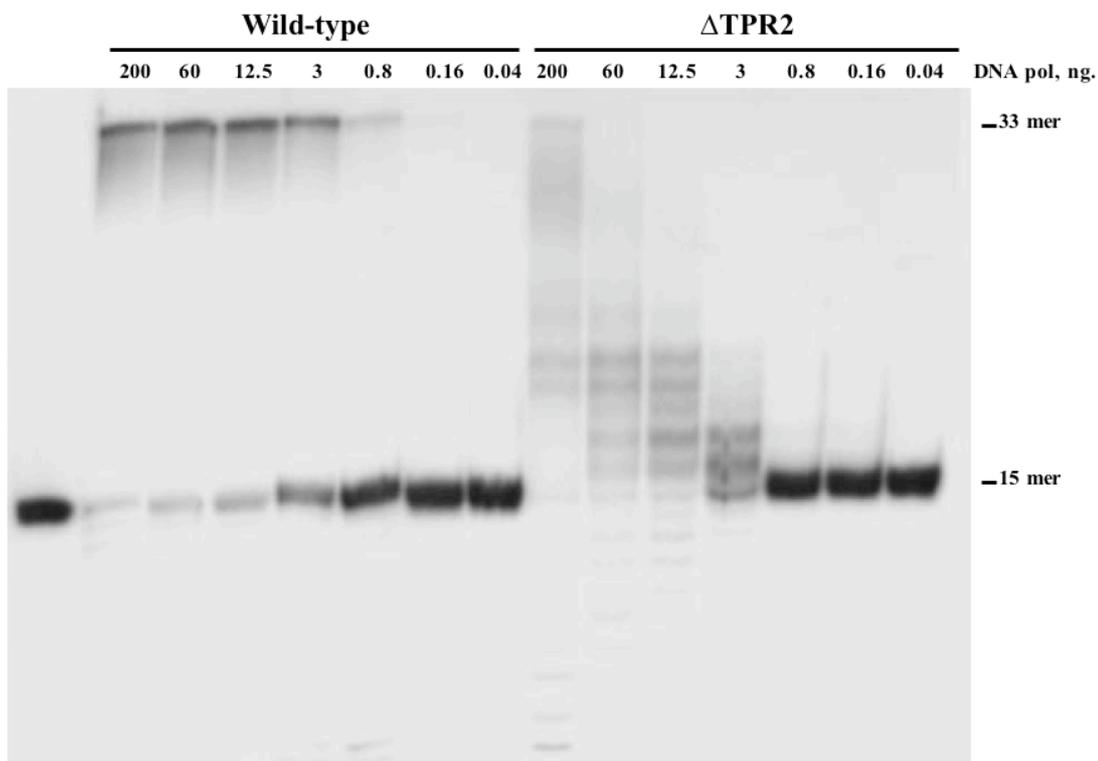


Figura 43. La DNA polimerasa mutante $\Delta TPR2$ muestra un patrón de polimerización distributivo. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, usando como sustrato la molécula

híbrida de 15/33mer marcada radiactivamente y en presencia de las concentraciones indicadas de DNA polimerasa *wild-type* y mutante.

Estudio de la capacidad para desplazar banda de la DNA polimerasa de $\phi 29$ mutante $\Delta TPR2$

Para analizar si la delección del subdominio TPR2 tenía alguna consecuencia en la capacidad de desplazamiento de banda de la DNA polimerasa de $\phi 29$, analizamos la extensión de la cadena iniciadora en moléculas de DNA con un *gap* (ver Figura 44).

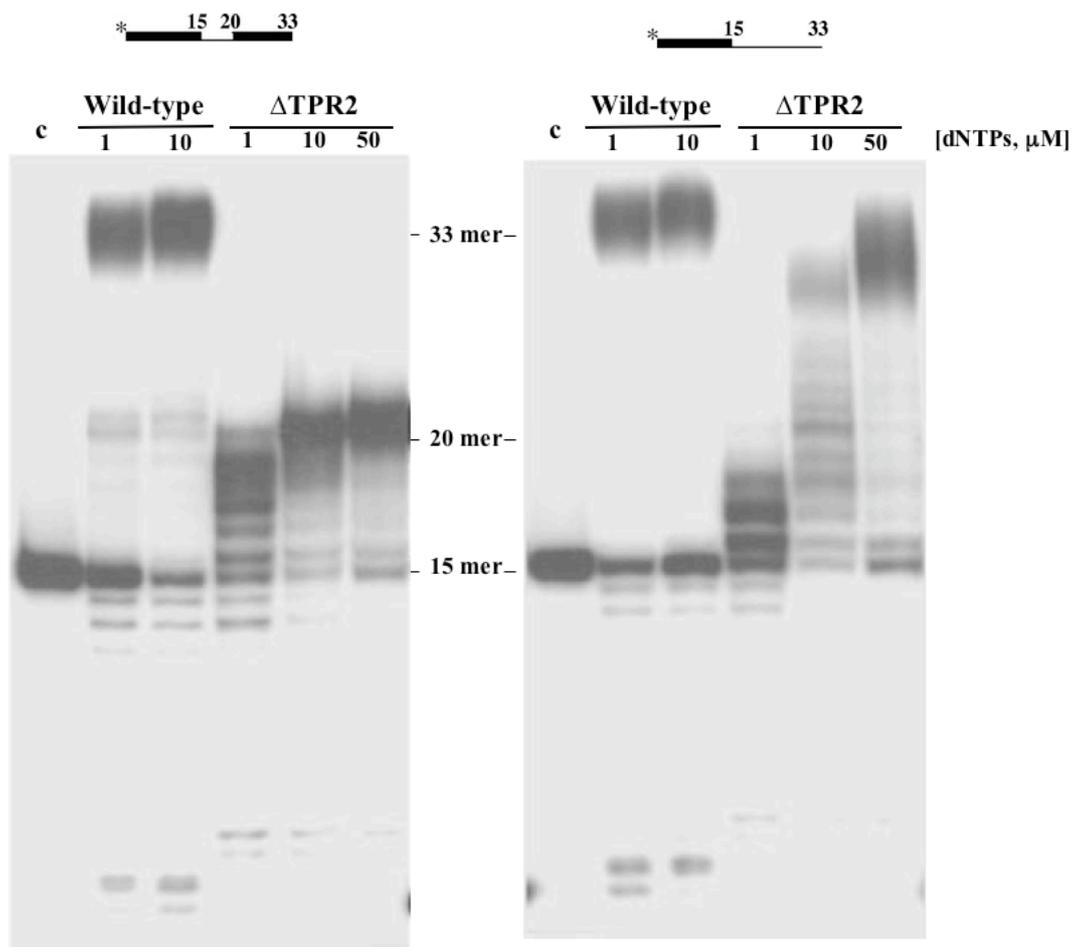


Figura 44. La eliminación de la inserción TPR2 anula la capacidad de la DNA polimerasa de $\phi 29$ de acoplar la polimerización de DNA al desplazamiento de banda. El ensayo de polimerización se llevó a cabo según Materiales y Métodos, empleando como sustrato una molécula de tipo iniciador/molde con un *gap* de 5nt (izquierda) y, como control (derecha) la misma molécula sin el oligonucleótido *downstream* a desplazar. Se utilizaron 20 y 300 ng de DNA polimerasa *wild-type* y mutante, respectivamente, y las concentraciones indicadas de los cuatro dNTPs. Después de la incubación durante 10 min a 25 °C, las reacciones se pararon y las muestras fueron analizadas por PAGE 20%-8 M urea y posterior autorradiografía.

Como se esperaba, la enzima *wild-type* fue capaz de rellenar el *gap* de 5 nucleótidos introducido en la molécula, continuando posteriormente la síntesis de DNA a través de la región dúplex vía desplazamiento de banda. Se observaron sólo algunas moléculas alrededor de las posiciones +6 y +7, punto en el que comienza la región de DNA de doble cadena. Este hecho

indica que la polimerasa en muy pocas ocasiones es incapaz de hacer la transición entre el relleno del hueco y la síntesis acoplada al desplazamiento de banda. Sin embargo, el mutante Δ TPR2 fue muy ineficiente en esta transición; la longitud de la mayoría de los productos sintetizados correspondió a la obtenida tras haber rellenado el *gap* de 5 nucleótidos (ver Figura 44). La inserción TPR2 parece, por tanto, ser crucial para la polimerización acoplada al desplazamiento de banda. En paralelo, se llevó a cabo un experimento control en el que usamos la molécula iniciador/molde de 15/33mer (ver Figura 44), la cual contiene la misma cadena molde pero carece del oligonucleótido localizado *downstream*. La enzima *wild-type* fue capaz de elongar completamente la cadena iniciadora a baja concentración de dNTPs (1 μ M); la polimerasa mutante Δ TPR2 llevó a cabo la extensión completa de la molécula aunque a una concentración nucleotídica mayor. El hecho de que la polimerasa mutante no mostrara una parada preferencial en las posiciones +6 y +7 descarta la posibilidad de que el bloqueo observado en la molécula de DNA con el *gap* fuera debido al contexto de secuencia. Estos experimentos confirman la hipótesis de que la inserción Δ TPR2 es necesaria para el desplazamiento de banda por la DNA polimerasa de ϕ 29.

Estos resultados muestran que la inserción TPR2, específica de las DNA polimerasas de la familia B que inician la replicación con proteína terminal, es un elemento necesario para llevar a cabo la replicación de manera procesiva y acoplada al desplazamiento de banda, sin la intervención de factores accesorios necesarios en el resto de replicasas.

Análisis funcional de residuos específicos localizados en el subdominio TPR2 en procesividad y desplazamiento de banda durante la replicación

Una vez establecido el papel del subdominio TPR2 en conferir a la DNA polimerasa de ϕ 29 capacidad de desplazamiento de banda, la siguiente cuestión que abordamos fue si dicho dominio simplemente representa un impedimento estérico que fuerza la separación de las dos cadenas del DNA o, por el contrario, contiene residuos que están jugando un papel activo en dicha actividad tipo helicasa.

Mutagénesis dirigida en residuos pertenecientes al subdominio TPR2 de la DNA polimerasa de ϕ 29

La ubicación de la cadena molde en el túnel formado por los subdominios TPR2, *palm* y *fingers*, y el dominio exonucleasa, implica que la banda desplazada interaccionaría con la cadena β formada por los residuos 410-427 de la inserción TPR2 (ver Figura 45). Esta cadena se caracteriza por poseer una región fuertemente electronegativa, formada por los residuos Glu418,

Glu419 y Glu420, muy conservados entre las DNA polimerasas que tienen como iniciador de la replicación una proteína terminal. Se podría especular que el desplazamiento de banda fuese llevado a cabo por la repulsión electrostática entre el esqueleto polifosfato de la cadena desplazada de DNA y dichos residuos electronegativos. Para comprobar la hipótesis propuesta hicimos un triple cambio de los residuos Glu418, Glu419 y Glu420 a alanina, eliminando de esta forma las cargas negativas, así como a lisina, con objeto de sustituirlas por cargas positivas. Posteriormente, las DNA polimerasas mutantes se sobreexpresaron y purificaron (Materiales y Métodos) para, finalmente, analizar su capacidad de desplazar banda mediante ensayos bioquímicos *in vitro*.

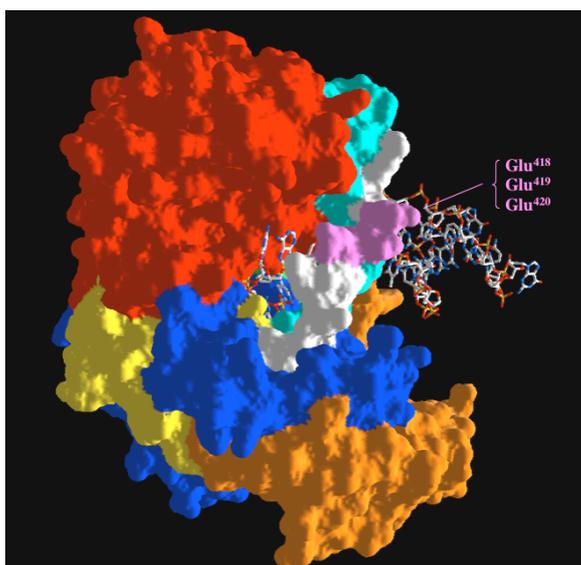


Figura 45. Localización de los residuos Glu418, Glu419 y Glu420 en la estructura de la DNA polimerasa de ϕ 29. Se señala en blanco la cadena β que comprende los residuos 410-427, perteneciente al subdominio TPR2.

Replicación de ϕ 29 TP-DNA por las DNA polimerasas mutantes

Ensayos preliminares mostraron cómo las DNA polimerasas mutantes fueron capaces de replicar la molécula completa de TP-DNA con un nivel de actividad similar al de la polimerasa *wild-type*, lo que nos llevó a descartar cualquier impedimento en la procesividad y el desplazamiento de banda de las polimerasas ensayadas (Figura 46).

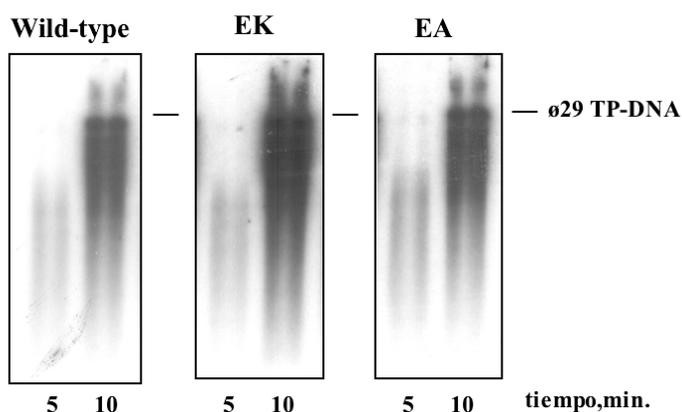


Figura 46. Replicación de ϕ 29 TP-DNA por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes puntuales del subdominio TPR2. El ensayo se llevó a cabo en presencia de 30 ng de DNA polimerasa y 15 ng de TP. Después de la incubación durante 5 min a 30°C, se calcularon los valores de actividad relativa. La longitud del DNA sintetizado se analizó por electroforesis en gel de agarosa alcalino.

Por tanto, los resultados preliminares obtenidos con estas DNA polimerasas mutantes, permitirían descartar que residuos específicos del subdominio TPR2 estén implicados de forma activa en el mecanismo de desplazamiento de banda de la DNA polimerasa de ϕ 29 durante la replicación.

Una vez concluido el estudio presentado en el capítulo anterior por el que se identificó la base estructural de la procesividad y el desplazamiento de banda, propiedades intrínsecas de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ (Blanco et al., 1989), se pasó a estudiar la implicación que sobre la replicación tenía la estructura anular formada por los subdominios TPR2, *thumb* y *palm* de esta DNA polimerasa.

A partir de la resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Kamtekar et al., 2004) se pudieron localizar en la estructura los diferentes dominios y subdominios que conforman la enzima. Concretamente, las estructuras de tipo β -*hairpin* distintivas de los subdominios TPR2 y *thumb* de esta DNA polimerasa, se disponen enfrentadas entre sí constituyendo la estructura anular anteriormente descrita que rodearía al producto de DNA *upstream*, potenciando así la procesividad de la enzima.

Sabemos que la DNA polimerasa de $\phi 29$ es capaz de llevar a cabo la replicación de moléculas de ssDNA circular, como es el caso del DNA de M13. Aunque en la estructura obtenida de esta enzima, la disposición relativa de los subdominios TPR2 y *thumb* genera un “anillo” prácticamente cerrado, sería necesaria la apertura de esta estructura para el emplazamiento del sustrato de DNA circular en el surco de unión de DNA de la enzima, así como durante la terminación de la replicación del TP-DNA.

Con objeto de introducir una restricción topológica que impidiera el posible mecanismo de apertura de la estructura anular presente en la DNA polimerasa de $\phi 29$, generamos una enzima mutante con un puente disulfuro entre los extremos de los subdominios TPR2 y *thumb*, llevando a cabo posteriormente los ensayos bioquímicos *in vitro* descritos en capítulos anteriores.

Formación de un puente disulfuro en la estructura de la DNA polimerasa de $\phi 29$

En base a la resolución tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$, identificamos los residuos ubicados en la región del giro de las estructuras β -*hairpin* de los subdominios TPR2 y *thumb*, que corresponden a los residuos Gly410 y Pro562, respectivamente (ver Figura 47). Con el fin de verificar la probabilidad del establecimiento de un enlace covalente entre las posiciones seleccionadas, en base a las distancias de enlace de sus átomos, recurrimos al programa de predicción de residuos para la formación de un puente disulfuro *SSBOND* (Hazes y Dijkstra, 1988). Posteriormente, mediante mutagénesis dirigida se llevó a cabo el cambio de los residuos Gly410 y Pro562 al aminoácido Cys con la intención de obtener, bajo condiciones oxidativas, la formación del puente disulfuro.

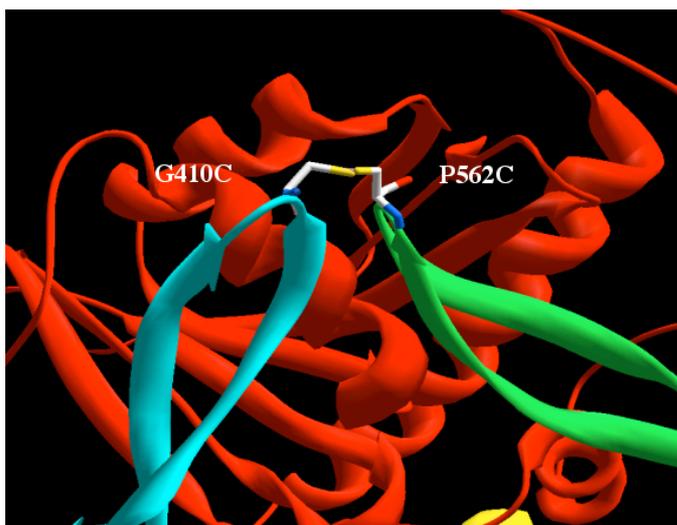


Figura 47. Formación de un puente disulfuro entre los extremos de los subdominios TPR2 y *thumb* en la DNA polimerasa de $\phi 29$. Por mutagénesis dirigida se han introducido dos residuos de Cys situados en las posiciones indicadas. El subdominio TPR2 y *thumb* se presentan en azul claro y en verde, respectivamente. En rojo se representa el dominio exonucleasa 3'-5'.

La DNA polimerasa mutante fue sobreexpresada y purificada (ver Materiales y Métodos) para luego, ser analizada bioquímicamente

mediante una serie de ensayos *in vitro* correspondientes a las diferentes etapas del mecanismo de replicación. Se hicieron fracciones correspondientes a las formas reducida y oxidada tanto de la polimerasa *wild-type* como mutante (ver Materiales y Métodos).

Balance de las actividades de polimerización y exonucleólisis sobre un sustrato de DNA de tipo iniciador/molde

Para estudiar si la formación de un puente disulfuro entre los residuos sustituidos por Cys afectaba a la capacidad de polimerización de la enzima sobre un sustrato de DNA de tipo iniciador/molde, ensayamos las fracciones reducidas y oxidadas de la DNA polimerasa *wild-type* y mutante en el ensayo acoplado pol/exo (ver Materiales y Métodos; capítulos anteriores). Como se observa en la Figura 48, las fracciones reducida y oxidada de la polimerasa mutante presentaron el mismo requerimiento nucleotídico entre sí y con respecto a la enzima *wild-type* (100 nM) para conseguir un balance neto de polimerización (ver Tabla IV). Por otra parte, las dos fracciones de la polimerasa mutante presentaron un patrón de degradación similar al de la polimerasa *wild-type*. Estos resultados indicaban que bajo condiciones en las que el sustrato es una molécula de tipo iniciador/molde, estas mutaciones no interfieren en dichas actividades, no requiriéndose en principio, la apertura del “anillo” interno presente en la DNA polimerasa de $\phi 29$ para la unión de una molécula de DNA lineal en el dominio de polimerización. Por otra parte, se observa cómo en la posición correspondiente a la cadena iniciadora (15mer), la cantidad de molécula sustrato que permanece sin ser utilizada por la enzima en ambas fracciones del mutante es mayor que en el caso de la *wild-type*. Este hecho indica una deficiencia en la interacción de la enzima con el sustrato de DNA como consecuencia de las mutaciones introducidas.

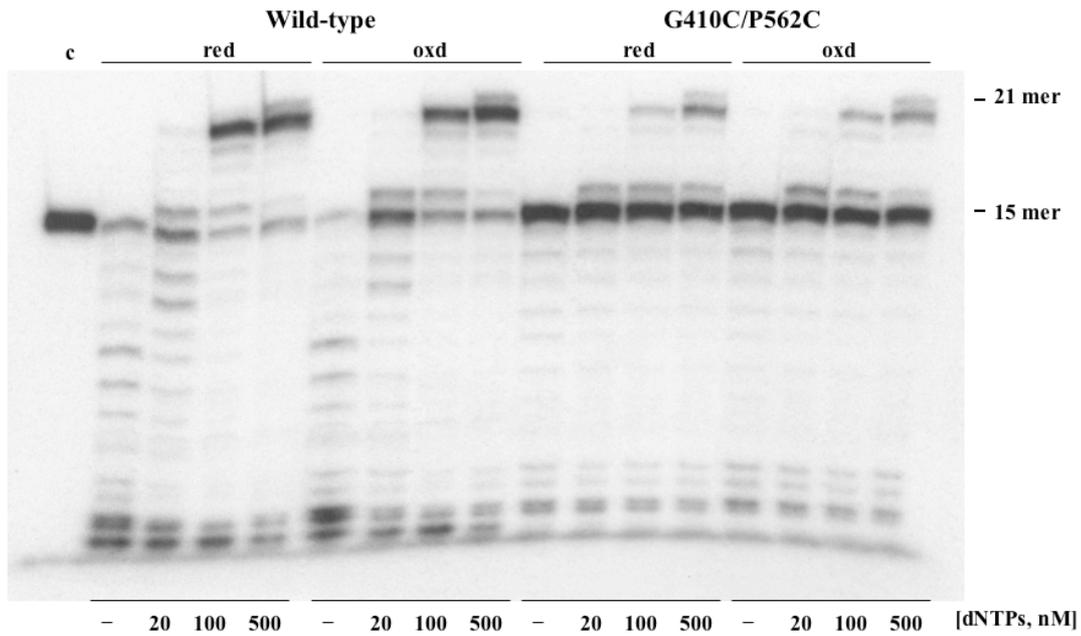


Figura 48. Balance pol/exo de la fracción reducida y oxidada de las DNA polimerasas *wild-type* y mutante. El ensayo se llevó a cabo empleando la molécula híbrida de 15/21mer como DNA de tipo iniciador/molde, y las concentraciones indicadas de dNTPs. Las cantidades de DNA polimerasa *wild-type* y mutante fueron 20 y 100 ng, respectivamente. Las actividades exonucleasa 3'-5' y polimerasa son detectadas como una disminución o aumento, respectivamente, en la longitud de la cadena iniciadora (15mer) marcada en su extremo 5' con ³²P.

Interacción de la DNA polimerasa mutante con DNA

Para valorar la capacidad de estos mutantes para interactuar de forma estable con DNA, se llevó a cabo un ensayo de retraso en gel empleando como sustrato la misma molécula que en el experimento precedente y Mg²⁺ como metal activador. Como se observa en la Figura 49, ambas fracciones de la polimerasa mutante estaban fuertemente afectadas en su interacción con el DNA ya que fueron necesarias cantidades mayores de enzima para conseguir un retraso similar al obtenido por la *wild-type*. Además, se observa difusión de la banda retrasada a lo largo del carril por parte de las dos fracciones de DNA polimerasa mutante, lo que sugiere la formación de complejos DNA polimerasa/DNA inestables.

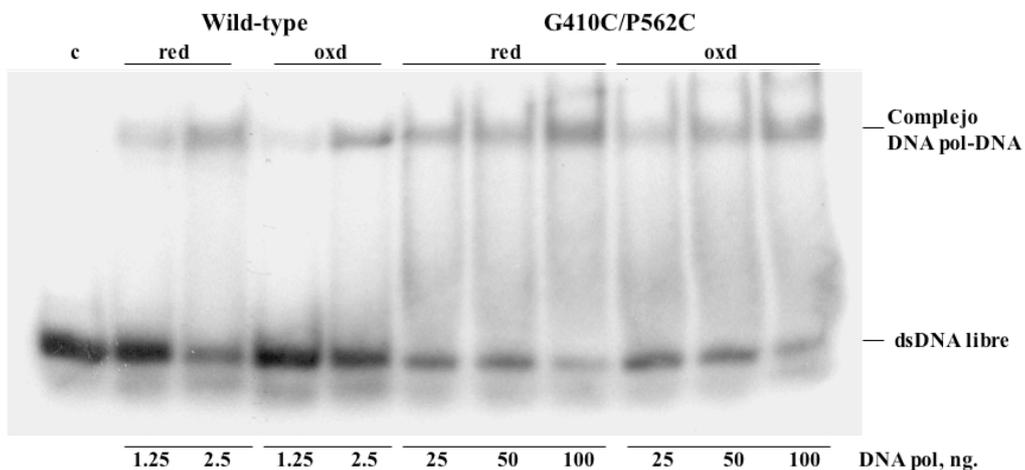


Figura 49. Interacción con dsDNA de las DNA polimerasas de $\phi 29$ *wild-type* y mutante. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando la molécula híbrida de 15/21mer como sustrato, marcada en su extremo 5' con ^{32}P , en presencia de las cantidades indicadas de DNA polimerasa. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida nativo. Las bandas correspondientes al DNA libre y al complejo DNA polimerasa/dsDNA fueron detectadas por autorradiografía.

Tabla IV. Actividades enzimáticas de las DNA polimerasas de $\phi 29$ *wild-type* y mutante

Parámetro ensayado	Sustrato	DNA polimerasa de $\phi 29^a$			
		<u>Wild-type</u>		<u>G410C/P562C</u>	
		red	oxd	red	oxd
Balance Pol/Exo ^b	dsDNA (15/21mer), dNTPs	20/100	20/100	20/100	20/100
Unión Enzima/DNA	dsDNA (15/21mer)	100	100	10	10
Replicación M13 DNA	M13 DNA hibridado, dNTPs	100	100	30	<1
Replicación $\phi 29$ TP-DNA	$\phi 29$ TP-DNA, TP, dNTPs	100	100	21	<1
Iniciación $\phi 29$ TP-DNA	$\phi 29$ TP-DNA, TP, dATP	100	100	33	36

^a Los números indican el porcentaje medio de actividad relativo a la enzima *wild-type* obtenido de varios experimentos.

^b Los números indican la concentración de dNTP (en nM) requerida para elongar eficientemente la cadena iniciadora (15mer) hasta la posición de 20mer.

Replicación de un DNA circular por la DNA polimerasa mutante

Una vez probada la capacidad para llevar a cabo la correcta polimerización sobre una molécula de DNA lineal por la polimerasa mutante con el puente disulfuro y, con objeto de analizar si la restricción de la movilidad relativa entre los subdominios TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa de $\phi 29$ impedía la síntesis sobre un sustrato de DNA circular, llevamos a cabo un ensayo de replicación con el ssDNA circular de M13. Sobre este sustrato, la DNA polimerasa comienza la replicación a partir del extremo 3'-OH del oligonucleótido hibridado al DNA de M13 (ver Materiales y Métodos). Como se observa en la Figura 50, tanto la fracción reducida como la oxidada de la enzima *wild-type* llevaron a cabo la síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda con una eficiencia similar. En el caso de la polimerasa mutante, la fracción reducida fue capaz de replicar este sustrato aunque menos eficientemente que la misma fracción de la polimerasa *wild-type* (ver Tabla IV), consecuencia de su disminuida capacidad de interacción con el DNA. La obtención de productos de replicación de tamaño similar al de la *wild-type* indicaba que la introducción de las dos mutaciones no estaba afectando a la velocidad de polimerización de la enzima ni a su capacidad de desplazamiento de banda. Sin embargo,

como puede observarse en la Figura 50, la forma oxidada de la polimerasa mutante, en la que se ha formado el puente disulfuro, no presentó actividad detectable sobre el DNA circular de M13 (Tabla IV), confirmando la necesidad de apertura de los subdominios TPR2 y *thumb* para alojar este tipo de sustrato.

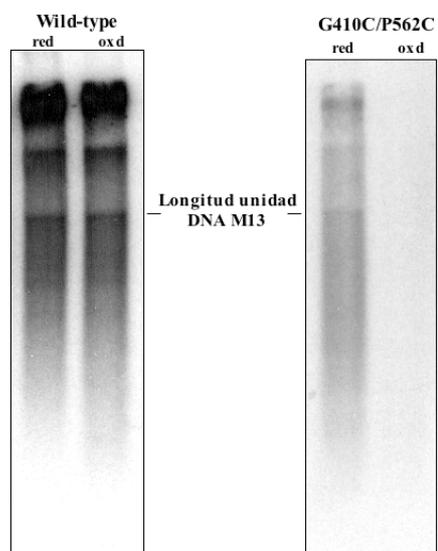


Figura 50. Capacidad de replicación sobre un DNA circular por la DNA polimerasa de $\phi 29$ mutante con el puente disulfuro. El ensayo se llevó a cabo según se describe en Materiales y Métodos, empleando 500 ng de DNA de M13, 100 ng de DNA polimerasa y 40 μ M dNTPs. Después de la incubación durante 40 min a 30 °C, se calcularon los valores de actividad relativa. La longitud de los productos de DNA sintetizados fue analizada por electroforesis en gel de agarosa alcalino. Se indica la posición a la que migra la molécula unidad de M13 DNA.

Replicación del genoma de $\phi 29$ por la DNA polimerasa mutante

El siguiente paso en la caracterización de este doble mutante en sus dos formas, reducida y oxidada, fue analizar la capacidad de replicación del genoma viral. Para tal fin utilizamos el sistema mínimo de replicación, es decir, el $\phi 29$ TP-DNA, la proteína terminal y la DNA polimerasa. Como puede observarse en la Figura 51, las dos fracciones de la DNA polimerasa *wild-type* fueron capaces de llevar a cabo la síntesis completa del DNA de $\phi 29$ de manera procesiva y acoplando a ella el desplazamiento de banda. La fracción reducida del doble mutante mostró una eficiencia de replicación 3 veces menor con respecto a la enzima *wild-type*, manteniéndose el tamaño esperado de los productos de replicación. La fracción oxidada, sin embargo, estaba fuertemente afectada en dicha actividad (ver Tabla IV).

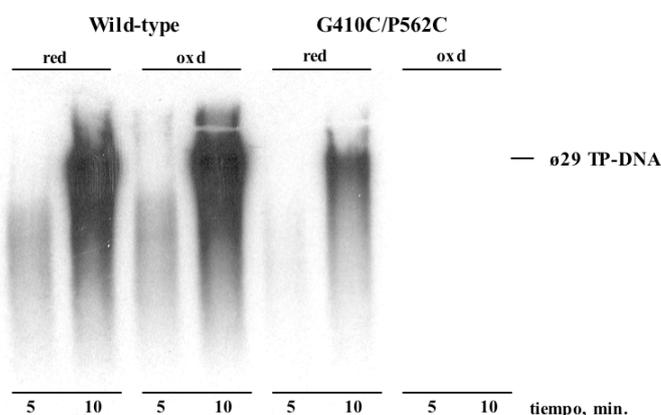


Figura 51. Replicación de $\phi 29$ TP-DNA por las DNA polimerasas *wild-type* y mutante. El ensayo se llevó a cabo en presencia de 100 ng de DNA polimerasa y 50 ng de TP. Después de la incubación a 30 °C durante los tiempos indicados, se calcularon los valores de actividad relativa (ver Tabla IV). La longitud del DNA sintetizado se analizó por electroforesis en gel de agarosa alcalino.

Iniciación de la replicación

Como se ha explicado en la Introducción, la replicación de $\phi 29$ TP-DNA conlleva una serie de fases. Para empezar la replicación del DNA de $\phi 29$, la DNA polimerasa tiene que formar un heterodímero con una molécula de proteína terminal libre y, posteriormente, catalizar la formación de TP-dAMP. Para analizar la actividad de iniciación de la replicación del mutante en sus dos formas, estudiamos la capacidad de las mismas para llevar a cabo dicha reacción. Como puede apreciarse en la Figura 52 y en la Tabla IV, ambas fracciones de la polimerasa mutante fueron capaces de catalizar la formación de TP-dAMP, aunque presentaron una disminución en su capacidad de iniciación (3 veces).

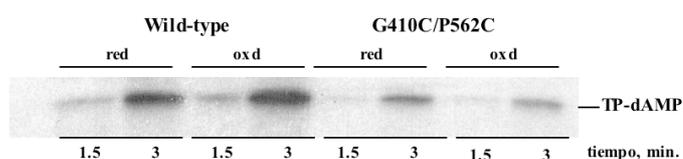


Figura 52. Iniciación de la replicación por las DNA polimerasas *wild-type* y mutante en presencia de $\phi 29$ TP-DNA. La reacción de formación del complejo

TP-dAMP dependiente de molde se realizó en presencia de 50 ng de TP y 100 ng de DNA polimerasa. Los tiempos de incubación a 30 °C fueron de 1.5 y 3 min. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y la cuantificación se hizo por análisis densitométrico de la banda correspondiente al complejo TP-dAMP marcado, detectado por autorradiografía.

Los resultados presentados en este último capítulo ponen de manifiesto la existencia de flexibilidad de movimiento del subdominio TPR2 con respecto al subdominio *thumb*, frente al cuál se sitúa, y al dominio exonucleasa de la DNA polimerasa de $\phi 29$.

La replicación es un proceso complejo en el que intervienen un amplio número de proteínas y actividades enzimáticas (Kornberg y Baker, 1992). La actividad de síntesis de DNA es llevada a cabo por las DNA polimerasas que, siguiendo la información contenida en la cadena molde, añaden nucleótidos al extremo 3'-OH de una cadena iniciadora. Las DNA polimerasas son incapaces de iniciar la síntesis de DNA *de novo*. Todas precisan de un grupo 3'-OH proporcionado por un cebador o iniciador a partir del cual continuar la elongación. La solución más extendida en los sistemas biológicos frente a esta limitación es la existencia de cadenas de RNA sintetizadas por una RNA polimerasa específica (primasa). Sin embargo, el requerimiento absoluto de un cebador para la iniciación de la síntesis de DNA representa un problema para la replicación de los extremos en los genomas lineales. La eliminación del último cebador de la cadena retrasada en estos genomas lleva consigo una pérdida de la información genética en el extremo del DNA. En diferentes organismos se han encontrado mecanismos diversos para resolver el problema de la replicación de los extremos de los genomas lineales. En eucariotas, la telomerasa resuelve esta situación añadiendo secuencias específicas en los extremos del cromosoma tras la replicación, y utilizando como molde su propio RNA (Greider y Blackburn, 1985; Cech, 2004). En bacterias y virus de DNA es común la presencia de secuencias repetidas en los extremos, favoreciéndose la formación de moléculas circulares o concatémicos, como en el caso de los bacteriófagos T4 y λ , o bien la creación de estructuras a modo de horquilla en dichos extremos (Kornberg y Baker, 1992). Otros organismos, como algunos bacteriófagos, virus eucariotas, plásmidos lineales y cromosomas bacterianos, han solucionado este problema mediante el uso de una proteína como iniciador de la replicación, en la que el grupo -OH de un residuo específico de Ser, Thr o Tyr, actúa como cebador de la elongación, quedando la proteína covalentemente unida a los extremos 5' del genoma (Salas, 1991; Salas et al., 1996). De todos los sistemas de replicación que tienen como iniciador una proteína, el del bacteriófago $\phi 29$ es el más extensamente estudiado.

La enzimología de la replicación del DNA de $\phi 29$ se basa en las múltiples actividades catalíticas y propiedades específicas de su DNA polimerasa. La DNA polimerasa de $\phi 29$ es una enzima relativamente pequeña (66 kDa), siendo la única DNA polimerasa implicada en la replicación del genoma del fago, catalizando tanto la iniciación de la replicación como la posterior elongación de los productos de iniciación para sintetizar la molécula completa de TP-DNA (Blanco y Salas, 1985b). Además, las peculiares propiedades de polimerización de la DNA polimerasa de $\phi 29$, alta procesividad y desplazamiento de banda, hacen innecesaria la participación de factores de procesividad y de tipo helicasa durante la replicación del TP-DNA (Blanco et al., 1989).

Los resultados presentados en los Capítulos I-III que se describen en esta Tesis fueron previos a la resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Kamtekar et al., 2004). Por tanto, la interpretación de estos resultados se hizo en base al análisis bioquímico de polimerasas mutantes, así como a su extrapolación a estructuras tridimensionales de otras DNA polimerasas pertenecientes, como la DNA polimerasa de $\phi 29$, a la familia B como es el caso de la DNA polimerasa del bacteriófago RB69 (Wang et al., 1997). Todas ellas presentan una organización bimodular estructural y funcionalmente, con un dominio N-terminal que contiene la actividad exonucleasa 3'-5' y un dominio C-terminal con la actividad de polimerización.

La DNA polimerasa de $\phi 29$ ha sido la primera y, hasta la fecha, la única DNA polimerasa perteneciente al subgrupo de las que inician la replicación con TP en ser resuelta cristalográficamente. Este hecho ha permitido, por una parte, revisar la implicación de los residuos mutados anteriormente y, por otra, ampliar el estudio de esta enzima partiendo directamente del análisis de su estructura. De esta forma, se ha encontrado la base estructural de las dos principales características intrínsecas de la DNA polimerasa de $\phi 29$, la procesividad y el desplazamiento de banda.

1. Residuos aminoacídicos conservados específicamente en DNA polimerasas que inician la replicación con TP

En las DNA polimerasas que inician su replicación utilizando como iniciador una proteína terminal, el primer requisito para que se lleve a cabo dicho proceso es la formación de un heterodímero estable entre la DNA polimerasa y la proteína terminal. La interacción entre estas proteínas es bastante compleja ya que debe ser, por una parte, lo suficientemente estable para ser mantenida durante los primeros pasos de la replicación del DNA y, por otra, lo suficientemente dinámica para permitir el cambio progresivo de sustrato (TP y DNA).

Previamente a la obtención de la estructura de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Kamtekar et al., 2004), se identificaron residuos que fueron descritos como ligandos en la interacción DNA polimerasa/TP, localizados a lo largo de la estructura primaria de la polimerasa y pertenecientes tanto al dominio C-terminal de polimerización como al N-terminal con la actividad exonucleasa 3'-5'. La mayoría de estos residuos juegan también un papel en la unión y establecimiento de interacciones entre el DNA y la DNA polimerasa. De esta forma, en el dominio C-terminal de polimerización, se han identificado los residuos Thr434 y Arg438, pertenecientes al motivo Tx₂G/AR (Méndez et al., 1994), Tyr226 y Gly229, en el motivo YxGG/A (Truniger et al., 1999) y Asp332 en la región TPR1 (Dufour et al., 2000), implicados en interacción con la TP. Por otra parte, la expresión aislada del dominio C-terminal llevó a una disminución drástica de la interacción entre la TP y la DNA polimerasa (Truniger et al., 1998), lo cual sugería un papel importante para el dominio N-terminal en dicha interacción. De hecho, en los últimos años, se

han descrito residuos pertenecientes a distintos motivos de este dominio de la polimerasa implicados en la interacción con la TP, como son la Ser122 del motivo (S/T)L_xh, y la Tyr59, His61 y Phe65 localizados en el motivo Exo II (Truniger et al., 1998; Eisenbrandt et al., 2002).

Los resultados anteriores apoyaban la idea de la existencia de múltiples residuos distribuidos en diferentes regiones de la polimerasa implicados en la interacción con la TP. Se consideró la posibilidad de que estos residuos pudieran estar formando un subdominio específico en la estructura tridimensional de las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, responsable de la interacción y orientación eficiente de la proteína iniciadora. La resolución cristalográfica de la estructura del heterodímero DNA polimerasa/TP (Kamtekar et al., 2006) pone de manifiesto que, si bien no existe un subdominio estructural específico implicado en la interacción con la TP, dicha interacción está constituida por residuos pertenecientes al dominio exonucleasa, así como a los subdominios TPR2, TPR1, *thumb* y *palm* del dominio de polimerización.

1.1. Implicación del dominio exonucleasa 3'-5' en la interacción con la TP

1.1.1. El residuo Phe128 de la DNA polimerasa de ϕ 29

En este trabajo, hemos estudiado el papel de los residuos Phe128 y Glu161, pertenecientes a los motivos (S/T)L_xh y Exo III, respectivamente, de la DNA polimerasa de ϕ 29, en sus actividades de síntesis comunes al resto de polimerasas, así como en aquellas específicas de las DNA polimerasas que inician su replicación mediante una proteína terminal. Las mutaciones introducidas en estos residuos no alteraron la capacidad de la DNA polimerasa para llevar a cabo las reacciones de síntesis de DNA, como puede observarse por el balance pol/exo de las enzimas mutantes. Sin embargo, el mutante F128Y perdió parte de su capacidad de interacción con el DNA, siendo necesarias cantidades mayores de enzima para conseguir un comportamiento similar a la polimerasa *wild-type* cuando se empleaban sustratos de DNA de corta longitud. Al aumentar el tamaño de la cadena molde, el defecto de unión desapareció, como queda reflejado en el ensayo con DNA de M13. Este hecho podría estar sugiriendo un papel auxiliar para el residuo Phe128 de la DNA polimerasa de ϕ 29 en el establecimiento de contactos con el dsDNA durante las actividades de exonucleolisis y polimerización, concretamente cuando existen pocos puntos de interacción entre la polimerasa y la cadena molde de ssDNA. Esta situación podría darse durante la terminación de la replicación. De esta forma, una cadena molde de mayor longitud podría establecer contactos inespecíficos con residuos pertenecientes a la superficie de la polimerasa, mejorando así la estabilidad de la unión enzima/sustrato.

Por otra parte, las DNA polimerasas mutantes F128Y y F128A mostraron una disminución en la eficiencia de replicación y amplificación de ϕ 29 TP-DNA. En el caso del

mutante F128Y, dicho defecto no puede estar relacionado con la pérdida de la capacidad para desplazar banda, ya que es capaz de llevar a cabo la replicación de tipo círculo rodante sobre el sustrato M13 hibridado con el oligonucleótido universal. Sin embargo, el mutante F128A presentó una disminución en su capacidad para desplazar banda, recuperándose parcialmente en presencia de la SSB de $\phi 29$, situación similar a la que tiene lugar *in vivo*. De hecho, el mutante recuperó parte de su actividad en el ensayo de amplificación, en el que la proteína SSB está presente, con respecto al ensayo de replicación que carece de la misma. El análisis de la reacción de iniciación utilizando la TP como cebador reveló que ambos mutantes estaban bastante afectados en este paso, tanto en presencia como en ausencia del molde $\phi 29$ TP-DNA. Este defecto podría estar relacionado con una disminución de la capacidad para formar un heterodímero estable y/o funcional entre la DNA polimerasa y la TP. Mediante ensayos de interferencia y gradiente de glicerol se vio un efecto moderado en el caso del mutante F128A, mientras que en el del mutante F128Y se observó un claro defecto en la interacción con la TP. El mutante F128A, aunque fue capaz de establecer una interacción estable con la TP, mostró una reducida actividad de iniciación que podría reflejar la importancia del residuo Phe128 en la formación de complejos DNA polimerasa/TP funcionalmente activos. Según esto, no sólo sería importante la fuerza de la interacción, sino también, la correcta orientación de la TP en el sitio activo de polimerización de la enzima. La interacción deficiente con la TP mostrada por las DNA polimerasas mutantes en el residuo Phe128 podría ser la causa del defecto observado posteriormente en el paso de transición de la replicación. Estas polimerasas fueron extremadamente ineficientes en dicha fase ocasionando la parada de la replicación, principalmente a nivel del producto TP-(dAMP).

Por otra parte, las mutaciones introducidas en el residuo Glu161 no alteraron la capacidad de la enzima para llevar a cabo las actividades específicas por las DNA polimerasas pertenecientes al subgrupo de aquellas que inician la replicación con proteína terminal. Se propone, por tanto, que el alto grado de conservación del residuo Glu161 en este subgrupo de enzimas podría deberse a un papel más estructural que funcional en las mismas.

Comparando el modelado de la DNA polimerasa de $\phi 29$ con DNA, obtenido a partir del complejo ternario de la DNA polimerasa de RB69 resuelto cristalográficamente, con la estructura del heterodímero DNA polimerasa de $\phi 29$ /TP (Kamtekar et al., 2006), se observa que la localización del dominio de iniciación de la TP solapa con la posición del DNA iniciador/molde unido a la enzima (Figura 53). Esto tiene importantes implicaciones tanto a nivel funcional como a nivel de residuos de la DNA polimerasa que establecen contacto con ambos sustratos. El residuo Phe128 se dispone en la estructura con el grupo aromático orientado hacia el surco de unión del DNA. Teniendo en cuenta, por una parte, que es en este mismo surco en el que se sitúa la TP durante la iniciación y, por otra parte, los resultados bioquímicos obtenidos de las polimerasas mutantes en la posición Phe128, este residuo podría establecer

contacto directo con la TP durante los primeros pasos del proceso de replicación, contribuyendo a la correcta orientación de la TP en la fase de iniciación. Pese a que en la estructura del heterodímero no se observa dicha interacción, no podemos descartar que, en presencia de metal y dNTP, lo que llevaría al complejo a un estado activado, tenga lugar un cambio conformacional en la polimerasa que lleve a un reajuste de la TP en el surco de unión, llegando a establecer contacto con la Phe128, como sugieren los resultados bioquímicos.

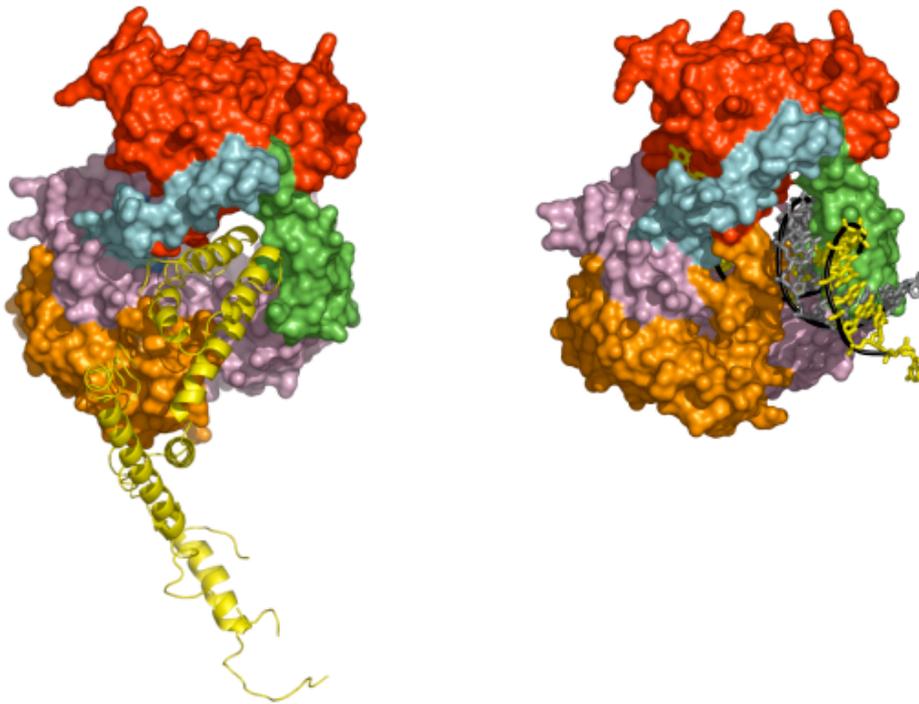


Figura 53. Solapamiento del surco de unión de la TP y el DNA en la DNA polimerasa de ϕ 29. En la figura de la izquierda se muestra la estructura del heterodímero DNA polimerasa/TP (Kamtekar et al., 2006). La imagen de la derecha corresponde al modelado de la DNA polimerasa de ϕ 29 con un DNA en base a la estructura cristalográfica del complejo binario de la DNA polimerasa de RB69 (Franklin et al., 2001).

Por otra parte, la Phe128 se encuentra en el “camino” que ha de seguir el *loop* iniciador de la TP, así como el extremo del DNA durante la elongación, para acceder al centro activo exonucleasa 3’-5’. Teniendo en cuenta que durante la iniciación de la replicación ambos iniciadores, TP y DNA, tienen que moverse entre los centros de polimerización y exonucleólisis para eliminar nucleótidos introducidos erróneamente, es plausible que la Phe128 facilite los contactos necesarios para que la coordinación de las actividades de síntesis y degradación tenga lugar de manera eficiente.

La cristalización del heterodímero DNA polimerasa/TP (Kamtekar et al., 2006) ha permitido proponer un modelo para la etapa de transición que tiene lugar entre la iniciación por la TP y la posterior elongación. Esta fase implica cambios conformacionales en la TP ya que, a medida que la cadena iniciadora es elongada, el producto de DNA dúplex irá desplazando a la proteína terminal para ocupar el canal al que inicialmente se encontraba unido el dominio de

iniciación de la TP. Según la disposición de los diferentes dominios de la TP en la estructura del heterodímero, la bisagra que articula los dominios iniciador e intermedio de la TP parece permitir la incorporación de entre 6 a 10 nucleótidos antes de que tenga lugar la disociación DNA polimerasa/TP. Este modelo, basado en la resolución cristalográfica del heterodímero, es consistente con los datos bioquímicos que indican que la disociación ocurre después de la incorporación del décimo nucleótido (Méndez et al., 1997).

Por otra parte, según la estructura, el residuo Glu161 se localiza en la superficie que está en contacto con el solvente, fuera de las regiones que establecen contacto con los diferentes sustratos de la enzima. Por tanto, como se propuso en base a los resultados bioquímicos obtenidos, el residuo Glu161 desempeñaría un papel puramente estructural.

1.1.2. Los residuos R96A, K110A, K112A, R113A y K114A de la DNA polimerasa de ϕ 29

Hemos analizado el papel de cinco residuos aminoacídicos localizados en dirección N-terminal al motivo (S/T)Lx₂h del dominio exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa de ϕ 29, y conservados específicamente entre las DNA polimerasas que inician la replicación con TP. Todos ellos poseen en sus cadenas laterales grupos con carga positiva. Los correspondientes en la DNA polimerasa de ϕ 29 son Arg96, Lys110, Lys112, Arg113 y Lys114. Ninguna de las polimerasas mutantes presentó disminución en la eficiencia para incorporar dNMPs en el extremo de la cadena iniciadora. Por tanto, estas mutaciones no alteraron el centro activo de polimerización de la enzima. Por otra parte, estas polimerasas mantuvieron el balance pol/exo característico de la polimerasa *wild-type*. Estos resultados indicaban que los cambios introducidos en la enzima no estaban afectando específicamente a las actividades catalíticas de síntesis y degradación. Mediante ensayos de retraso en gel observamos que los mutantes R96A y K114A presentaban una deficiencia en la interacción con el sustrato de dsDNA. Esto sugería un papel para ambos residuos en la interacción estable DNA polimerasa/DNA, sin estar afectando de forma específica a la unión del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleólisis y/o en el de polimerización. Mediante ensayos de replicación de DNA de M13 se observó que los cambios introducidos en la enzima no alteraron la capacidad de acoplar la síntesis procesiva del DNA al desplazamiento de banda. En el mutante R96A, el empleo de un sustrato de mayor longitud, como es el caso de este último, permitió la estabilización de su unión al DNA, lo cual se tradujo en un número mayor de moléculas replicadas. Probablemente, este efecto sea debido al establecimiento de interacciones no específicas del DNA con residuos de la superficie de la enzima, como ocurre en el caso del mutante en el residuo Phe128 descrito en el Capítulo I de este trabajo.

Cuando se ensayó la capacidad de replicación y amplificación de $\phi 29$ TP-DNA, los mutantes R96A, R113A, K114A y, en menor grado, los mutantes K110A y K112A, mostraron una reducción en su eficiencia con respecto a la enzima *wild-type*. Considerando que estas polimerasas, según el ensayo de replicación de M13, eran capaces de llevar a cabo la replicación acoplada al desplazamiento de banda de manera procesiva, pasamos a analizar los primeros pasos que tienen lugar en la replicación de $\phi 29$ TP-DNA. Las polimerasas mutantes R96A, K114A y, de forma más leve, los mutantes K110A, K112A y R113A, presentaron una disminución en la reacción de iniciación. Sin embargo, en ausencia de molde (desoxinucleotidilación de la TP), las polimerasas mutantes K110A, K112A y R113A recuperaron por completo dicha actividad. Este resultado sugería que los residuos Lys110, Lys112 y Arg113 podrían estar estableciendo contacto con el TP-DNA molde durante el primer paso de la replicación. La ausencia de interacción con la TP presentada por la polimerasa mutante R96A, deducida a partir del ensayo de interferencia y por gradiente de glicerol, nos permitió concluir que el residuo Arg96 es un ligando importante de la TP. La interacción correcta entre la DNA polimerasa y la TP es esencial para la formación de un heterodímero estable y funcional. En el caso del mutante K114A, a pesar de mantener intacta la capacidad de interacción con la TP, apenas se aprecian productos de iniciación. Este hecho podría estar reflejando la importancia del residuo Lys114 en la formación de un complejo DNA polimerasa/TP funcionalmente activo, probablemente asegurando la correcta orientación de la TP en el centro activo de polimerización. Posteriormente, se analizó la fase de transición entre los dos modos de iniciación (TP y DNA), lo que permitió restringir el defecto observado en la replicación de $\phi 29$ TP-DNA en estos mutantes a la fase de iniciación.

El alineamiento de esta región en las DNA polimerasas de $\phi 29$ y RB69, sugirió que el residuo homólogo de la Arg96 en $\phi 29$, podría ser la Arg260 en el bacteriófago RB69 (Shamoo y Steitz, 1999). Se había descrito que este último estaba formando parte de una estructura de tipo horquilla que se localiza entre el surco de entrada al centro activo de exonucleolisis y el canal por el que pasa la cadena molde (Shamoo y Steitz, 1999). La incorporación errónea de un dNMP desestabiliza la estructura de la doble hélice de DNA en el extremo 3' de la cadena iniciadora. Este hecho disminuye la tasa de ataque nucleofílico por el 3'-OH del cebador al fosfato α del nucleótido entrante, lo cual permite la escisión del dNMP incorrecto gracias a la actividad correctora de errores del dominio exonucleasa 3'-5'. Esta escisión requiere el movimiento del extremo 3' desde el centro activo de polimerización al de exonucleolisis (ver Figura 54A). En este contexto, la estructura de tipo horquilla actuaría a modo de cuña separando ambos sitios activos (Shamoo y Steitz, 1999) y proyectándose entre las cadenas de dsDNA, estabilizando así la estructura parcialmente desnaturalizada de la doble hélice en este punto. De hecho, el residuo Arg260 junto con la Phe123 de RB69 estarían bloqueando la cadena molde en

el modo de exonucleolisis al interactuar con el penúltimo nucleótido desde el extremo 3' de la cadena iniciadora (Shamoo y Steitz, 1999), contribuyendo a la estabilización de la estructura parcialmente desnaturalizada del sustrato de DNA.

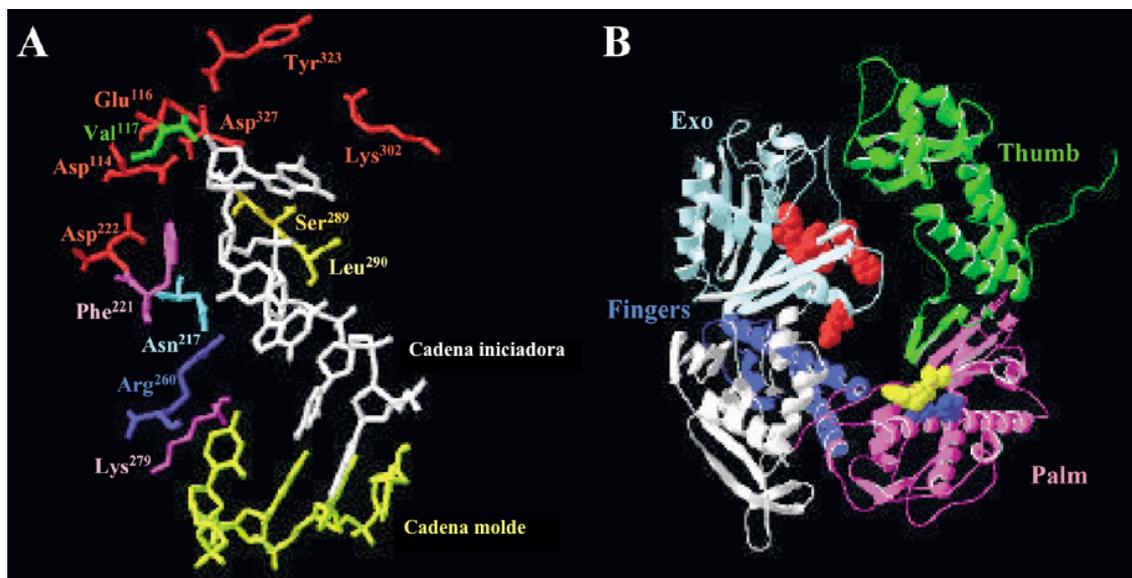


Figura 54. A, Representación estructural del centro activo del dominio exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa del bacteriófago RB69. Las coordenadas corresponden a la estructura cristalina de la enzima en el modo de exonucleolisis (PDB1CLQ37). Sólo se representan los cinco nucleótidos del extremo 3'-terminal de la cadena iniciadora y los cuatro nucleótidos del extremo 5'-terminal de la cadena molde. Los residuos representados pertenecen a tres categorías: (1) los directamente implicados en catálisis (Asp114, Glu116, Asp222 y Asp327); (2) los que cumplen un papel auxiliar en catálisis (Lys302 y Tyr323); y los que son ligandos de ssDNA (Asn217, Phe221, Ser289 y Leu290). También se muestran los residuos Arg260 y Lys279 de la DNA polimerasa de RB69, homólogos a los residuos Arg96 y Lys114, respectivamente, de la DNA polimerasa de $\phi 29$. **B, Localización en la estructura tridimensional de la polimerasa de RB69 de los residuos homólogos que juegan un papel dual en la unión del DNA y la TP en las DNA polimerasas que tienen como iniciador una proteína terminal.** El dominio exonucleasa de la DNA polimerasa de RB69 se muestra en azul claro, y los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb* en magenta, azul oscuro y verde, respectivamente. La región N-terminal se representa en blanco. Los residuos Trp216, Phe221, Arg260, Lys279, Ser289 y Phe296, pertenecientes al dominio exonucleasa, se presentan en rojo. Los residuos Tyr391 y Ala394 del motivo YxGG, localizado entre los dominios de exonucleolisis y polimerización, están coloreados en amarillo. Por último, los residuos Thr587 y Gln591 del motivo Tx₂GR, localizado en el subdominio *palm*, se han representado en azul oscuro.

La posterior resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Kamtekar et al., 2004) y del heterodímero DNA polimerasa/TP (Kamtekar et al., 2006) puso de manifiesto que los resultados obtenidos en base a la mutagénesis dirigida en el residuo Arg96 de la enzima confirmaban el papel supuesto para dicho residuo. La estructura del heterodímero muestra que el residuo Arg96 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ establece un puente de hidrógeno con los residuos Tyr250 y Gln253 de la TP (Kamtekar et al., 2006). Este último dato estructural confirma la existencia de interacción entre el residuo Arg96 y la TP, predicha previamente en base al análisis bioquímico de la polimerasa mutante R96A (Figura 55). La pérdida de contacto entre ambos residuos por el cambio mutacional anula, por tanto, la interacción entre la DNA polimerasa y la TP, necesaria para la replicación de $\phi 29$ TP-DNA.

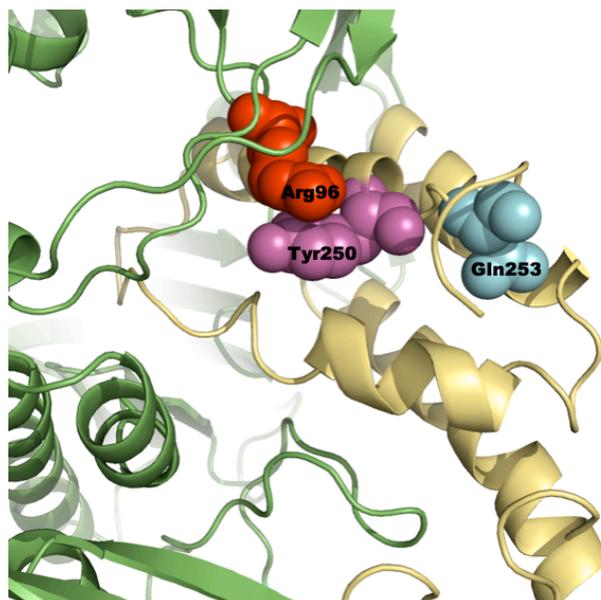


Figura 55. El residuo Arg96 de la DNA polimeasa de ϕ 29 establece interacción directa con la TP. Sobre la estructura de la DNA polimerasa de ϕ 29 (mostrada en verde) se destaca el residuo Arg96, que interacciona con los residuos Tyr250 y Gln253 de la TP (mostrada en amarillo).

El análisis de la estructura de la apoenzima muestra que la Arg96 está interaccionando con residuos del *loop* del subdominio TPR1, probablemente contribuyendo a la correcta orientación de éste para llevar a cabo su interacción con el DNA. Teniendo en cuenta el

solapamiento estructural del DNA y del dominio de iniciación de la TP, sería predecible que tuviera lugar una sustitución de las interacciones que la Arg96 crea con la TP por otras establecidas con el DNA, justificando de esta forma los defectos de unión a DNA presentados por el mutante R96A. Por otra parte, dicha unión defectuosa podría ser consecuencia indirecta de una inadecuada orientación del *loop* del subdominio TPR1 debido a la pérdida de contactos con el residuo Arg96 de la DNA polimerasa de ϕ 29.

Los residuos Lys110, Lys112 y Arg113 del dominio exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa de ϕ 29 se sitúan en un *loop* exterior expuesto al solvente, sobresaliendo de la estructura por la parte opuesta a donde se ubicaría el dsDNA (según el modelado) y la TP (ver Figura 56). La disposición espacial de estos residuos en la estructura de la DNA polimerasa podría justificar la interacción propuesta para estos residuos con la TP del sustrato molde TP-DNA (ver Figura 56). Por tanto, este modelo justificaría que los mutantes recuperen la actividad de iniciación en ausencia de molde.

Atendiendo a la estructura de la DNA polimerasa de ϕ 29, el residuo Lys114 se sitúa en el mismo *loop* donde se localizan los residuos Lys110, Lys112 y Arg113. Según los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro*, la ausencia de actividad de iniciación no es debida a un defecto de interacción con la TP (ver ensayo de cosedimentación). Teniendo en cuenta su disposición espacial, es probable que la mutación introducida haya ocasionado, al menos parcialmente, un cambio conformacional del dominio exonucleasa, teniendo como consecuencia indirecta la formación de complejos DNA polimerasa/TP funcionalmente inactivos. No podemos descartar tampoco que la Lys114 juegue un papel en el reconocimiento de la TP paterna, como se ha propuesto para los residuos Lys110, Lys112 y Arg113.

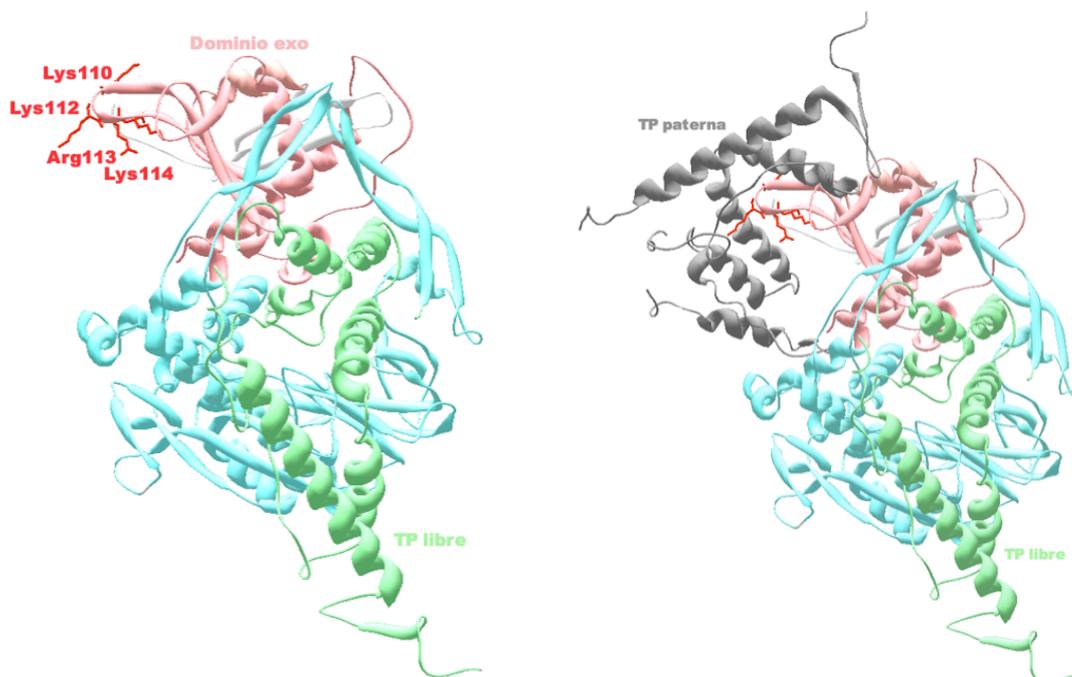


Figura 56. Localización en la estructura de la DNA polimerasa de $\phi 29$ del *loop* positivo situado en el dominio exonucleasa 3'-5', donde se localizan los residuos Lys110, Lys112, Arg113 y Lys114. En ambas imágenes, se muestran en rojo los residuos Lys110, Lys112 y Arg113. En la figura de la derecha, se presenta la posible interacción de la TP paterna (en gris) con el *loop* positivo de la DNA polimerasa.

1.2. Implicación de la inserción TPR1 en interacción con la proteína terminal

1.2.1. Los residuos Lys305 y Tyr315 de la DNA polimerasa de $\phi 29$

La inserción TPR1 es una de las dos regiones de secuencia exclusivas del subgrupo de DNA polimerasas que inician la replicación con TP (Blasco et al., 1990). Esta región se sitúa entre los motivos A y B del dominio C-terminal de estas DNA polimerasas. Estudios previos a esta Tesis describieron al residuo Asp332, perteneciente a la región TPR1, como el único aminoácido de la DNA polimerasa de $\phi 29$ encontrado hasta la fecha implicado exclusivamente en establecer contactos con la proteína terminal (Dufour et al., 2000). Con objeto de ampliar el estudio del subdominio TPR1, se llevó a cabo mutagénesis dirigida en dos de los residuos de la DNA polimerasa de $\phi 29$, Lys305 y Tyr315, conservados en este subgrupo de DNA polimerasas.

Las cuatro polimerasas mutantes obtenidas, y más específicamente aquellas con el cambio no conservativo, mostraron un balance pol/exo muy elevado. Además, presentaron una actividad exonucleasa 3'-5' sobre dsDNA mayor que la de la enzima *wild-type*, mientras que en ssDNA el comportamiento de todas las polimerasas mutantes fue *wild-type*. Estos resultados, junto con la baja interacción a dsDNA que presentaron en los ensayos de retraso en gel, así como la elevada K_m por el dNTP entrante, sugieren que las DNA polimerasas mutantes están afectadas en la estabilización del extremo iniciador en el centro activo de polimerización.

Por otra parte, las polimerasas mutantes con el cambio no conservativo, K305I y Y315A, fueron incapaces de llevar a cabo la replicación del TP-DNA. Esto sugiere que los residuos de Lys en la posición 305 y de Tyr en la posición 315 son esenciales para las actividades de la polimerasa en las que el iniciador de la reacción es la proteína terminal. Cuando se ensayaron en la reacción de iniciación de la replicación del DNA de $\phi 29$, el mutante K305I estaba severamente afectado en la formación del enlace fosfodiéster entre la TP y el dAMP, a pesar de conservar intacta su capacidad de interacción con la TP. Este resultado, junto con el hecho de que ambos mutantes presentaran un defecto en la transición entre los dos modos de iniciación de la replicación, nos llevó a concluir que dichos residuos estaban desempeñando un papel en la reacción de iniciación utilizando como cebador la TP, así como en el posterior posicionamiento del extremo 3'-OH de la cadena de DNA en el centro activo de polimerización.

Por estudios anteriores a esta Tesis, se había demostrado que tanto la TP como el dsDNA ocupan el mismo canal en la DNA polimerasa de $\phi 29$ (de Vega et al., 1998a; Truniger et al., 2000). Por tanto, estos residuos tendrían un papel en la estabilización del extremo 3'-OH de la TP y, posteriormente, del 3'-OH del DNA en el sitio activo de polimerización. Del estudio mutacional se pudo concluir que la inserción TPR1, específica de las DNA polimerasas pertenecientes al subgrupo de las que inician la replicación con TP, sería importante durante los primeros pasos de la síntesis de DNA de $\phi 29$, así como en la siguiente etapa de transición, probablemente jugando un papel en la estabilización de extremo 3'-OH de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización.

Con la obtención, posterior a estos resultados, de la estructura de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Kamtekar et al., 2004), se observó que la inserción TPR1 forma un subdominio dentro de esta estructura, comprendiendo los residuos 261-358 y disponiéndose en una zona adyacente al subdominio *palm*. No se ha observado homología alguna con otras estructuras conocidas. El aspecto más llamativo de este subdominio es la existencia de una región, comprendida entre los aminoácidos 304 y 314, que se encuentra formando un bucle o *loop* que presenta elevados valores de temperatura, indicio de cierto grado de flexibilidad. Según el modelado con DNA obtenido en base al complejo ternario de la DNA polimerasa de RB69, el *loop* del subdominio TPR1 establecería contacto directo con el DNA dúplex que está siendo sintetizado al introducirse en el surco mayor de la doble hélice (Figura 57). Este hecho sugiere que, si bien los residuos K305 y Y315 no están contactando directamente con el 3'-OH del DNA, son importantes para el correcto posicionamiento del extremo iniciador en el centro activo de polimerización. Esto último justificaría los defectos de unión al DNA mostrados por los mutantes K305I y Y315A, así como la elevada K_m aparente por nucleótido.

Por otra parte, a partir de la resolución cristalográfica del complejo DNA polimerasa/TP, se vio que tanto el dominio intermedio como el dominio de iniciación de la TP establecen un elevado número de contactos con la DNA polimerasa (Kamtekar et al., 2006).

Concretamente, el dominio intermedio de la TP comparte un área de interacción de 575Å con el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa, pudiendo estar actuando de punto de anclaje de la TP durante los primeros pasos de la replicación. Por otra parte, se observa que la estructura de tipo bucle en la que están localizados los residuos Lys305 y Tyr315 de la DNA polimerasa de $\phi 29$, experimenta un cambio en su posición relativa desplazándose hacia fuera del centro de polimerización en presencia de la TP con objeto, probablemente, de dejar paso a esta última para que se lleve a cabo la iniciación de la replicación (ver Figura 12 en Introducción). El establecimiento de un gran número de interacciones entre el *loop* “curvado” de la DNA polimerasa y la “base” del dominio iniciador de la TP, junto con los datos bioquímicos obtenidos, permiten proponer un papel para los residuos K305 y Y315 en la correcta orientación del -OH de la Ser232 en el centro activo de polimerización.

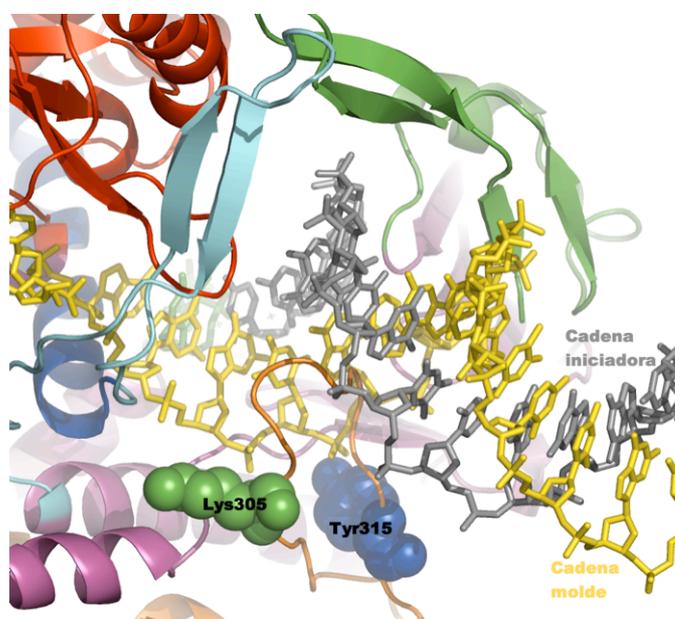


Figura 57. Localización en la estructura de la DNA polimerasa de $\phi 29$ de los residuos Lys305 y Tyr315. El dominio exonucleasa se muestra en rojo y los subdominios TPR2 y *thumb* en azul claro y verde, respectivamente. Los residuos en estudio están representados con esferas, situados en el *loop* del subdominio TPR1 (naranja) de la polimerasa. Se muestra la interacción existente entre estos residuos y el DNA modelado sobre la estructura de la DNA polimerasa de $\phi 29$.

Por tanto, los resultados obtenidos a partir de la mutagénesis en los residuos

Lys305 y Tyr315 son compatibles con los datos estructurales obtenidos con posterioridad. A medida que el DNA va siendo sintetizado irá ocupando el canal de unión para el producto dúplex de DNA, surco inicialmente ocupado por el dominio iniciador de la TP, y para lo cual es necesario el progresivo desplazamiento de este último. Es predecible que las interacciones establecidas entre el *loop* del TPR1 de la DNA polimerasa y el dominio iniciador de la TP jueguen un papel importante durante la transición. A medida que se sintetiza la cadena de DNA, se romperán interacciones y se establecerán otras nuevas en ese dominio de la TP. Esta hipótesis viene refrendada por los resultados bioquímicos obtenidos para las polimerasas mutantes en los residuos Lys305 y Tyr315, los cuales mostraban una deficiencia en la fase de transición.

2. Un subdominio específico de la DNA polimerasa de $\phi 29$ confiere procesividad y capacidad de desplazamiento de banda

En la mayoría de sistemas de replicación de DNA, el movimiento de la horquilla a lo largo de la doble hélice requiere la deshibridación de ambas cadenas para que el proceso se lleve a cabo. De forma general, dicha actividad no es intrínseca a la DNA polimerasa, sino que es proporcionada por enzimas monoméricas o multiméricas, conocidas como helicasas, que desnaturalizan la doble hélice de una manera dependiente de ATP. Por otra parte, la procesividad (número de nucleótidos incorporados por suceso de unión al DNA) de la mayoría de polimerasas *per se* no es lo suficientemente alta para conseguir la replicación completa del genoma, requiriéndose la intervención de los llamados factores de procesividad (revisado en Kornberg y Baker, 1992).

La DNA polimerasa de $\phi 29$ lleva a cabo la replicación de su genoma completo en ausencia de factores de procesividad o proteínas accesorias de tipo helicasa (Blanco y cols., 1989). Estas propiedades enzimáticas tienen su base en la capacidad intrínseca de esta DNA polimerasa para llevar a cabo la síntesis de manera procesiva, así como de acoplar a ella el desplazamiento de la cadena no molde. Desde que se observaron por vez primera mediante ensayos bioquímicos estas dos propiedades de la DNA polimerasa de $\phi 29$ que la distinguían del resto de DNA polimerasas, uno de los aspectos más interesantes a conocer ha sido cómo esta enzima relativamente pequeña es capaz de coordinar ambas actividades en la misma cadena polipeptídica. Años de estudio de mutagénesis dirigida en residuos específicos de la DNA polimerasa de $\phi 29$ no llegaron a resolver esta cuestión.

La reciente obtención de la estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\phi 29$ (Kamtekar et al., 2004) sugirió la posibilidad de que fuera el subdominio TPR2, específico de las DNA polimerasas que inician la replicación con TP, el que estuviera jugando un papel funcional en este sentido. Esta inserción se sitúa entre los subdominios *fingers* y *palm*, conectando las hélices α N (perteneciente al *fingers*) y O (perteneciente al *palm*) (Kamtekar et al., 2004). La estructura anular que conforman los subdominios TPR2, *thumb* y *palm* parece estar abrazando al dsDNA en el dominio de polimerización durante la replicación, proporcionando de esta forma estabilidad al complejo DNA polimerasa/DNA. Por otro lado, la disposición del subdominio TPR2 en la estructura establece un canal estrecho por el que pasaría la cadena molde de banda simple antes de su entrada al sitio activo de polimerización, forzando de esta forma la separación entre las cadenas molde y desplazada (Kamtekar et al., 2004).

El mutante con la delección en el subdominio TPR2 de la DNA polimerasa de $\phi 29$ presentó una relación de actividades exonucleasa/polimerasa similar a la de la enzima *wild-type*, aunque fue necesaria una mayor cantidad de polimerasa para conseguir la elongación neta del sustrato. Este hecho, junto con la deficiencia que presenta en interacción con DNA en los

ensayos de retraso en gel, indican que la inserción TPR2 es un subdominio de la DNA polimerasa de $\phi 29$ requerido para que haya una fuerte interacción DNA polimerasa/DNA. Una consecuencia directa de esta reducción en la capacidad de unión al sustrato fue la pérdida de la extraordinaria procesividad de la polimerasa, pasando de 70.000 nucleótidos incorporados por suceso de unión a sólo unos pocos. Por tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el TPR2 es un subdominio que confiere procesividad a la DNA polimerasa de $\phi 29$.

Como comentamos en la Introducción de este trabajo, el dominio de polimerización de las DNA polimerasas comprende, por analogía a una mano derecha, los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb*. En conjunto, estos subdominios forman un surco al que se une la molécula de DNA iniciador/molde. Comparando las estructuras de diferentes DNA polimerasas en sus formas de apoenzima así como unidas a DNA, es frecuente la rotación del subdominio *thumb* cuando está presente un oligonucleótido (Franklin et al., 2001; Doublie et al., 1998; Li et al., 1998; Cannistraro y Taylor, 2004). Aunque este cambio conformacional estabiliza la unión del DNA, la mayoría de polimerasas replicativas precisan de factores adicionales de tipo *sliding-clamp* para conseguir la procesividad necesaria para la duplicación del genoma (Kong et al., 1992; Krishna et al., 1994; Shamooy y Steitz, 1999; Miyata et al., 2004; Bowman et al., 2004). Estas proteínas presentan por lo general una conformación toroidal con un agujero en el centro a través del cual pasa el dsDNA, de forma que la DNA polimerasa queda estabilizada en el punto donde se sitúa el extremo iniciador. La DNA polimerasa de $\phi 29$ es intrínsecamente procesiva, ya que el TPR2 junto con los subdominios *thumb*, *fingers* y *palm*, constituyen un *clamp* interno (Kamtekar et al., 2004) proporcionando a la enzima la estabilidad de unión necesaria para replicar todo el genoma (19.285 pb) a partir de un único suceso de unión.

Por otra parte, la eliminación de esta inserción causa también la pérdida de la capacidad intrínseca de desplazamiento de banda que posee la DNA polimerasa de $\phi 29$. En la estructura, el subdominio TPR2 forma, junto con los subdominios *fingers* y *palm*, y el dominio exonucleasa, un túnel de tales dimensiones que sólo permite la unión de una cadena de ssDNA, en contraste al canal abierto presente en el resto de DNA polimerasas de la familia B (Kamtekar et al., 2004). Una consecuencia de esta restricción topológica es que sólo la cadena molde puede ser enhebrada a través de dicho túnel para alcanzar el centro activo de polimerización. Aunque no podemos descartar que existan otros subdominios en la polimerasa que pudieran contribuir a la capacidad para desplazar banda, los resultados presentados en esta Tesis validan el papel clave propuesto para la inserción TPR2 en dicha capacidad (Kamtekar et al., 2004). Así, el subdominio TPR2 actuaría de “cuña molecular” al separar las dos cadenas parentales de la doble hélice, confiriéndole de esta forma a la enzima una función de tipo helicasa (Figura 58). De hecho, la región responsable de la separación de las cadenas debe estar localizada muy próxima al sitio activo de polimerización, ya que la parada de la replicación en el mutante de delección tiene lugar en la posición en la que comienza la región de DNA dúplex.

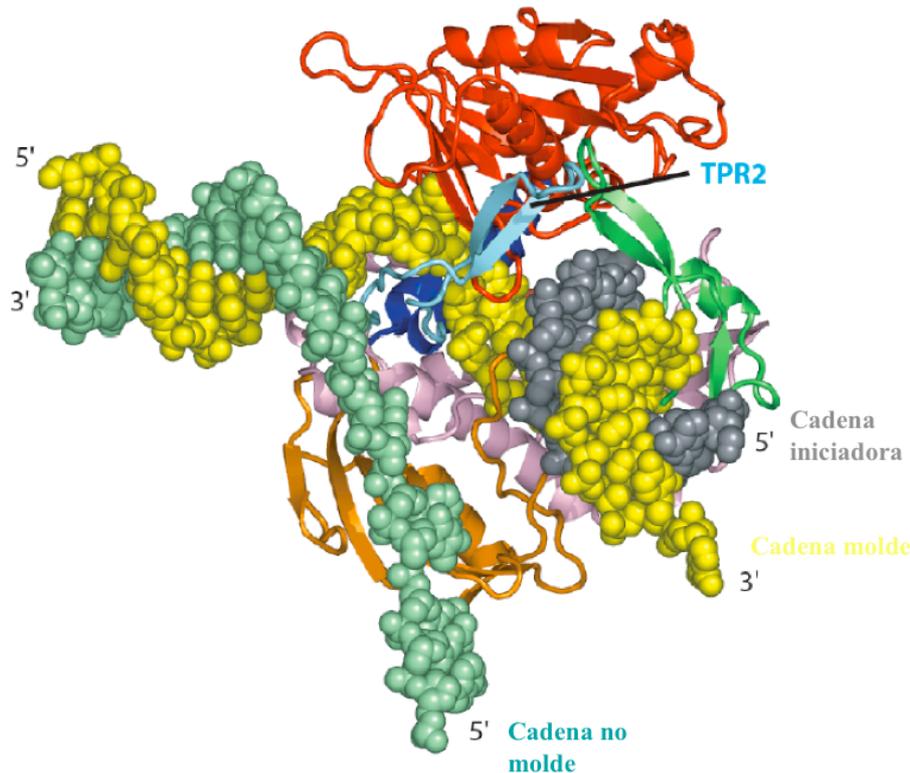


Figura 58. Modelo para la procesividad y el desplazamiento de banda en la DNA polimerasa de $\phi 29$. La inserción TPR2 podría contribuir a la formación de una estructura anular en la polimerasa otorgándole procesividad al “abrazar” a la molécula de DNA. Paralelamente, por su disposición en la estructura, podría constituir una barrera estructural forzando la deshibridación de la doble hélice previa entrada de la cadena molde en el centro activo de polimerización.

Se han descrito ejemplos de estructuras intercalantes en el dsDNA similares en varias RNA polimerasas, como la de los bacteriófagos T7 (Cheetham et al., 1999) y $\phi 6$ (Butcher et al., 2001). En estos casos, la RNA polimerasa puede desnaturalizar parcialmente el dsRNA y desplazar la banda durante la iniciación de la transcripción en ausencia de helicasas. En este punto, cabría la posibilidad de que la capacidad para desplazar banda por la DNA polimerasa de $\phi 29$ fuera debida al papel activo que podrían estar desempeñando residuos específicos localizados en la cadena β externa del subdominio TPR2. Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos apuntan al subdominio TPR2 como la barrera topológica que, de forma pasiva, facilita la apertura de la doble hélice por su mera disposición en la estructura.

La DNA polimerasa de $\phi 29$ ha evolucionado para resolver dos requerimientos cruciales en la replicación del genoma, la procesividad y el desplazamiento de banda, mediante la inserción de una región en su secuencia localizada entre los subdominios *fingers* y *palm*. Esta inserción, común al resto de DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, cierra el surco de unión de dsDNA en el dominio de polimerización, conservado universalmente, generando por una parte un *clamp* interno y, por otra, un túnel que imita a una helicasa al estar rodeando a la cadena molde de banda simple, contribuyendo también de esta

forma al mantenimiento de la estabilidad de la unión con el DNA necesaria para llevar a cabo una replicación procesiva. Por tanto, es muy probable que al estar conservada esta inserción de secuencia entre las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, las funciones que otorgan las estructuras de tipo *sliding-clamp* y helicasa en la mayoría de los sistemas de replicación de DNA, caracterizadas por primera vez en la DNA polimerasa de $\phi 29$, estén también presentes en otros miembros de DNA polimerasas pertenecientes a este subgrupo.

3. La replicación del genoma de $\phi 29$ requiere una interacción dinámica entre los subdominios TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa de $\phi 29$

La presencia de la estructura que a modo de pinza presenta la DNA polimerasa de $\phi 29$, identificada a partir de su resolución tridimensional (Kamtekar et al., 2004), junto a la capacidad de replicación de esta enzima utilizando sustratos de DNA circular, nos llevó a sugerir un posible mecanismo de apertura de esta estructura para el emplazamiento de la molécula sustrato en el surco de unión del DNA. El diseño de una polimerasa mutante en la que el movimiento de apertura de este “anillo” estuviera impedido, nos permitió estudiar la posible dinámica que tendría lugar entre los subdominios TPR2 y *thumb* en la replicación de los diferentes sustratos de DNA. Con dicho objetivo se diseñó un doble mutante con el cambio de los residuos seleccionados a Cys para permitir la formación de un puente disulfuro en condiciones oxidativas, y “cerrar” así la estructura anular generada por la disposición relativa de los subdominios TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa de $\phi 29$.

El balance de las actividades de exonucleolisis y polimerización similar a la *wild-type* por las fracciones reducida y oxidada de la polimerasa mutante sobre una molécula sustrato lineal de tipo iniciador/molde, mostró que la replicación de este tipo de molécula no requiere la apertura de la estructura toroidal de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Probablemente, la localización en el centro de polimerización de una molécula de DNA lineal se lleve a cabo por “deslizamiento” del extremo 5' de la cadena molde a través del surco de unión del DNA (ver más arriba). Por otra parte, la mayor proporción de molécula sustrato no utilizada por parte de ambas fracciones de polimerasa mutante con respecto a la enzima *wild-type*, así como la necesidad de una mayor cantidad de enzima para obtener retraso en un gel de poliacrilamida nativo, ponían de manifiesto una deficiencia en la interacción polimerasa/DNA debido a la introducción del doble cambio aminoacídico. Una vez estudiado el comportamiento de la enzima mutante sobre una molécula de DNA lineal, llevamos a cabo el ensayo de replicación sobre una molécula de DNA circular. En este caso, la ausencia de productos de replicación por la fracción oxidada frente a los obtenidos por la fracción reducida probó la necesidad de apertura de la estructura anular formada por los subdominios TPR2 y *thumb*, con objeto de ubicar la molécula sustrato en el centro activo de polimerización.

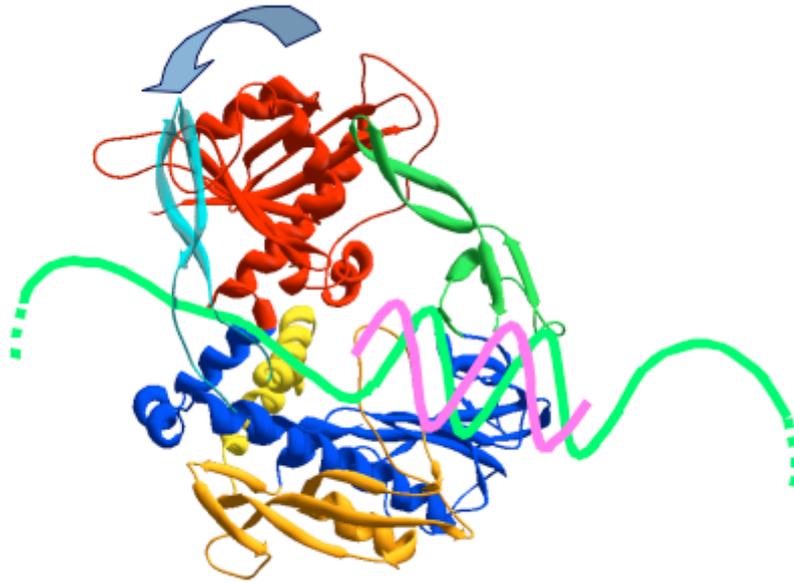


Figura 59. Dinámica del subdominio TPR2 en la unión de una molécula de DNA circular.

En condiciones en las que el sustrato es el genoma de $\phi 29$, situación más próxima a la que ocurre en la naturaleza, la ausencia de replicación por la fracción de la polimerasa mutante que posee el puente disulfuro, denota el requerimiento de flexibilidad entre ambos subdominios para llevar a cabo la replicación de $\phi 29$ TP-DNA. Por otra parte, tanto la fracción oxidada como la reducida de la polimerasa mutante llevaron a cabo la reacción de iniciación de manera análoga. Este hecho indicaba que, como ocurría en el caso de la unión de un DNA de tipo iniciador/molde, no se requiere la separación de los subdominios TPR2 y *thumb* para unir la TP. Este resultado está de acuerdo con la ausencia de diferencias estructurales en la disposición relativa de ambos subdominios cuando se compara la apoenzima con el complejo DNA polimerasa/TP.

In vivo, en la fase final de la replicación de los extremos del DNA de $\phi 29$, la base del extremo 5' de la molécula molde está unida covalentemente a la TP y resulta difícil considerar que la conformación observada en la estructura de la DNA polimerasa permita el acceso al sitio activo de ese gran sustrato. Según esto, la fase de terminación de la replicación de $\phi 29$ TP-DNA también conllevaría cierta movilidad entre los subdominios TPR2 y *thumb*.

Actualmente, se desconoce la dinámica molecular exacta de apertura de la estructura toroidal interna de la DNA polimerasa de $\phi 29$. Existe la posibilidad de que implique un movimiento de distanciamiento en el mismo plano por parte del β -*hairpin* del subdominio TPR2 con respecto al subdominio *thumb* (ver Figura 59). Estudios recientes realizados en otros sistemas de replicación con el fin de dilucidar el mecanismo de apertura de los factores de procesividad para ser posicionados sobre el DNA, han llevado al establecimiento de pautas de

acción comunes en bacterias y eucariotas. En el caso de los organismos eucariotas, es el complejo heteropentamérico RF-C el que lleva a cabo la apertura del PCNA (O'Donnell y Kuriyan, 2006) mediante cambios conformacionales asociados a la unión e hidrólisis de ATP. Por simulación molecular, se ha observado que el anillo de PCNA se abre fuera del plano para formar una espiral dextrógira (Kazmirski et al., 2005) que abraza al DNA. Estos resultados son consistentes con reconstrucciones recientes que, por microscopía electrónica, se han realizado con el complejo RF-C/PCNA de organismos pertenecientes al dominio de arqueas (Miyata et al., 2005).

De estos estudios podríamos concluir que la DNA polimerasa de $\phi 29$ ha evolucionado para resolver dos requerimientos cruciales en la replicación del genoma, la procesividad y el desplazamiento de banda, mediante la inserción de una región en su secuencia localizada entre los subdominios *fingers* y *palm*. Esta inserción de secuencia estructurada como el subdominio TPR2, común al resto de DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, genera junto con los subdominios *thumb* y *palm*, una estructura toroidal a modo de *clamp* que, lejos de ser una estructura rígida dentro de la enzima, presenta una dinámica de movimiento durante la replicación de $\phi 29$ TP-DNA, una vez llevada a cabo la iniciación.

1.- Mediante mutagénesis dirigida en el gen de la DNA polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ y el análisis bioquímico de los mutantes obtenidos, hemos demostrado el papel del residuo Phe128, localizado en el motivo (S/T)Lx₂h del dominio N-terminal de la DNA polimerasa, en el establecimiento de interacciones tanto con la TP como con el DNA. Estos resultados, junto con el alto grado de conservación entre las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, sugieren un papel funcional secuencial para este residuo en el establecimiento de contactos con la TP durante los primeros pasos de la replicación del genoma, y con el DNA en los posteriores pasos de elongación del producto de iniciación.

2.- Mediante análisis bioquímico de la DNA polimerasa mutante en el residuo Glu161, localizado en el motivo Exo III del dominio N-terminal de la DNA polimerasa de $\phi 29$, así como por su localización en la estructura tridimensional de la enzima, se propone que el residuo Glu161 juega un papel puramente estructural en la DNA polimerasa.

3.- Mediante alineamientos múltiples de secuencias hemos identificado cinco residuos aminoacídicos, cargados positivamente, específicamente conservados en el grupo de las DNA polimerasas que inician la replicación con TP, y localizados en posición N-terminal respecto al motivo (S/T)Lx₂h. El análisis mutacional de los correspondientes residuos de la DNA polimerasa de $\phi 29$, Arg96, Lys110, Lys112, Arg113 y Lys114, junto a su disposición en la estructura tridimensional de esta enzima, nos permite concluir que la Arg96 juega un papel importante como ligando de DNA y TP, esencial para formar complejos estables DNA polimerasa/DNA(TP) y, por lo tanto, en la unión secuencial de ambos sustratos durante la replicación del TP-DNA. Por otra parte, los resultados bioquímicos obtenidos con los mutantes en las posiciones Lys110, Lys112 y Arg113, junto con su disposición espacial en la estructura de la DNA polimerasa formando un *loop* externo expuesto al solvente, permiten proponer un papel para estos residuos en el establecimiento de contactos con la TP parental durante las primeras etapas de la replicación del genoma.

4.- Los residuos Lys305 y Tyr315, pertenecientes al subdominio TPR1, específico de las DNA polimerasas que emplean una proteína terminal como iniciador de la replicación, desempeñan un papel en la estabilización del extremo 3'-OH del DNA en el centro activo de polimerización. Según la estructura tridimensional del heterodímero DNA polimerasa/TP, estos residuos se localizan en el *loop* del subdominio TPR1 que interacciona tanto con el DNA, intercalándose en el surco mayor de la doble hélice, como con la base del subdominio de iniciación de la TP cuando éste sirve de cebador para la iniciación de la replicación.

5.- El análisis bioquímico de un mutante de delección de la DNA polimerasa de $\phi 29$ que carece de los residuos Asp398-Glu420 de la inserción TPR2 (Δ TPR2), indica que su capacidad de unión al DNA está afectada, disminuyendo drásticamente su procesividad. Este resultado apoya la hipótesis de que la inserción TPR2 conforma un subdominio en la estructura de la polimerasa que cumple un papel esencial en la procesividad intrínseca de la DNA polimerasa de $\phi 29$, ya que estaría “abrazando” al DNA en el surco de unión de DNA del dominio de polimerización.

6.- Además, el estudio bioquímico del mutante de delección Δ TPR2 ha indicado que el subdominio TPR2 contribuye a la capacidad intrínseca de desplazar banda de la DNA polimerasa de $\phi 29$. En base al análisis mutacional realizado en la región TPR2, no se han encontrado residuos que de una forma activa estén implicados en dicha capacidad de desplazamiento de banda de la polimerasa. Por su disposición en la estructura de la polimerasa, el subdominio TPR2 probablemente constituya una barrera estérica que fuerza la deshibridación de la doble hélice previa entrada de la cadena molde en el centro activo de polimerización.

7.- Tras la iniciación de la replicación de $\phi 29$ TP-DNA, la DNA polimerasa de $\phi 29$ precisa una dinámica de movimiento por parte de la estructura toroidal presente en la enzima. De igual modo, la replicación de genomas circulares por esta polimerasa requiere cierto grado de flexibilidad que permita la apertura del anillo casi “cerrado” que conforman los subdominios TPR2, *thumb* y *palm* de la DNA polimerasa de $\phi 29$.

Abbotts, J., SenGupta, D. N., Zmudzka, B., Widen, S. G., Notario, V., y Wilson, S. H. (1988). Expression of human DNA polymerase beta in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry* 27, 901-909.

Aoufouchi, S., Flatter, E., Dahan, A., Faili, A., Bertocci, B., Storck, S., Delbos, F., Cocea, L., Gupta, N., Weill, J. C., y Reynaud, C. A. (2000). Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res* 28, 3684-3693.

Aravind, L., Walker, D. R., y Koonin, E. V. (1999). Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems. *Nucleic Acids Res* 27, 1223-1242.

Bailey, S., Wing, R. A., y Steitz, T. A. (2006). The Structure of *T. aquaticus* DNA Polymerase III Is Distinct from Eukaryotic Replicative DNA Polymerases. *Cell* 126, 893-904.

Beard, W. A., Shock, D. D., Vande Berg, B. J., y Wilson, S. H. (2002). Efficiency of correct nucleotide insertion governs DNA polymerase fidelity. *J Biol Chem* 277, 47393-47398.

Bebenek, K., y Kunkel, T. A. (2004). Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem* 69, 137-165.

Bebenek, K., Matsuda, T., Masutani, C., Hanaoka, F., y Kunkel, T. A. (2001). Proofreading of DNA polymerase eta-dependent replication errors. *J Biol Chem* 276, 2317-2320.

Bedford, E., Tabor, S., y Richardson, C. C. (1997). The thioredoxin binding domain of bacteriophage T7 DNA polymerase confers processivity on *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 479-484.

Beese, L. S., Derbyshire, V., y Steitz, T. A. (1993a). Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science* 260, 352-355.

Beese, L. S., Friedman, J. M., y Steitz, T. A. (1993b). Crystal structures of the Klenow fragment of DNA polymerase I complexed with deoxynucleoside triphosphate and pyrophosphate. *Biochemistry* 32, 14095-14101.

- Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J. M., Martín, G., y Salas, M. (1989). A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* 59, 219-228.
- Bernad, A., Blanco, L., y Salas, M. (1990). Site-directed mutagenesis of the YCDTDS amino acid motif of the phi 29 DNA polymerase. *Gene* 94, 45-51.
- Bernad, A., Zaballos, A., Salas, M., y Blanco, L. (1987). Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Embo J* 6, 4219-4225.
- Blanco, L., Bernad, A., Blasco, M. A., y Salas, M. (1991). A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. *Gene* 100, 27-38.
- Blanco, L., Bernad, A., Esteban, J. A., y Salas, M. (1992). DNA-independent deoxynucleotidylation of the phi 29 terminal protein by the phi 29 DNA polymerase. *J Biol Chem* 267, 1225-1230.
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M., Martín, G., Garmendia, C., y Salas, M. (1989). Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* 264, 8935-8940.
- Blanco, L., García, J. A., y Salas, M. (1984). Cloning and expression of gene 2, required for the protein-primed initiation of the Bacillus subtilis phage phi 29 DNA replication. *Gene* 29, 33-40.
- Blanco, L., Gutierrez, J., Lázaro, J. M., Bernad, A., y Salas, M. (1986). Replication of phage phi 29 DNA in vitro: role of the viral protein p6 in initiation and elongation. *Nucleic Acids Res* 14, 4923-4937.
- Blanco, L., Lázaro, J. M., de Vega, M., Bonnin, A., y Salas, M. (1994). Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12198-12202.
- Blanco, L., Prieto, I., Gutierrez, J., Bernad, A., Lázaro, J. M., Hermoso, J. M., y Salas, M. (1987). Effect of NH₄⁺ ions on phi 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. *J Virol* 61, 3983-3991.
- Blanco, L., y Salas, M. (1985a). Characterization of a 3'----5' exonuclease activity in the phage phi 29-encoded DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 13, 1239-1249.

Blanco, L., y Salas, M. (1985b). Replication of phage phi 29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full-length phi 29 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6404-6408.

Blanco, L., y Salas, M. (1995). Mutational analysis of bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Methods Enzymol* 262, 283-294.

Blanco, L., y Salas, M. (1996). Relating structure to function in phi29 DNA polymerase. *J Biol Chem* 271, 8509-8512.

Blasco, M. A., Bernad, A., Blanco, L., y Salas, M. (1991). Characterization and mapping of the pyrophosphorolytic activity of the phage phi 29 DNA polymerase. Involvement of amino acid motifs highly conserved in alpha-like DNA polymerases. *J Biol Chem* 266, 7904-7909.

Blasco, M. A., Blanco, L., Pares, E., Salas, M., y Bernad, A. (1990). Structural and functional analysis of temperature-sensitive mutants of the phage phi 29 DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 18, 4763-4770.

Blasco, M. A., Esteban, J. A., Méndez, J., Blanco, L., y Salas, M. (1992). Structural and functional studies on phi 29 DNA polymerase. *Chromosoma* 102, S32-38.

Blasco, M. A., Lázaro, J. M., Blanco, L., y Salas, M. (1993a). Phi 29 DNA polymerase active site. Residue ASP249 of conserved amino acid motif "Dx2SLYP" is critical for synthetic activities. *J Biol Chem* 268, 24106-24113.

Blasco, M. A., Lázaro, J. M., Blanco, L., y Salas, M. (1993b). Phi 29 DNA polymerase active site. The conserved amino acid motif "Kx3NSxYG" is involved in template-primer binding and dNTP selection. *J Biol Chem* 268, 16763-16770.

Blasco, M. A., Méndez, J., Lázaro, J. M., Blanco, L., y Salas, M. (1995). Primer terminus stabilization at the phi 29 DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif KXY. *J Biol Chem* 270, 2735-2740.

Bollum, F. J. (1960). Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem* 235, PC18-20.

- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A. F., Altschul, S. F., y Koonin, E. V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J* 11, 68-76.
- Bowman, G. D., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (2004). Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature* 429, 724-730.
- Braithwaite, D. K., e Ito, J. (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 21, 787-802.
- Bravo, A., y Salas, M. (1997). Initiation of bacteriophage phi29 DNA replication in vivo: assembly of a membrane-associated multiprotein complex. *J Mol Biol* 269, 102-112.
- Bruck, I., Goodman, M. F., y O'Donnell, M. (2003). The essential C family DnaE polymerase is error-prone and efficient at lesion bypass. *J Biol Chem* 278, 44361-44368.
- Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H., y Stuart, D. I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410, 235-240.
- Callebaut, I., and Mornon, J. P. (1997). From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett* 400, 25-30.
- Cann, I. K., Komori, K., Toh, H., Kanai, S., e Ishino, Y. (1998). A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14250-14255.
- Cannistraro, V. J., y Taylor, J. S. (2004). DNA-thumb interactions and processivity of T7 DNA polymerase in comparison to yeast polymerase eta. *J Biol Chem* 279, 18288-18295.
- Capson, T. L., Peliska, J. A., Kaborod, B. F., Frey, M. W., Lively, C., Dahlberg, M., y Benkovic, S. J. (1992). Kinetic characterization of the polymerase and exonuclease activities of the gene 43 protein of bacteriophage T4. *Biochemistry* 31, 10984-10994.
- Carthew, R. W., Chodosh, L. A., y Sharp, P. A. (1985). An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* 43, 439-448.
- Cech, T. R. (2004). Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* 116, 273-279.

- Cheetham, G. M., Jeruzalmi, D., y Steitz, T. A. (1999). Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. *Nature* 399, 80-83.
- Creighton, S., Bloom, L. B., y Goodman, M. F. (1995). Gel fidelity assay measuring nucleotide misinsertion, exonucleolytic proofreading, and lesion bypass efficiencies. *Methods Enzymol* 262, 232-256.
- Das, D., y Georgiadis, M. M. (2004). The crystal structure of the monomeric reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus. *Structure* 12, 819-829.
- de Vega, M., Blanco, L., y Salas, M. (1998a). phi29 DNA polymerase residue Ser122, a single-stranded DNA ligand for 3'-5' exonucleolysis, is required to interact with the terminal protein. *J Biol Chem* 273, 28966-28977.
- de Vega, M., Ilyina, T., Lázaro, J. M., Salas, M., y Blanco, L. (1997). An invariant lysine residue is involved in catalysis at the 3'-5' exonuclease active site of eukaryotic-type DNA polymerases. *J Mol Biol* 270, 65-78.
- de Vega, M., Lázaro, J. M., y Salas, M. (2000). Phage phi 29 DNA polymerase residues involved in the proper stabilisation of the primer-terminus at the 3'-5' exonuclease active site. *J Mol Biol* 304, 1-9.
- de Vega, M., Lázaro, J. M., Salas, M., y Blanco, L. (1996). Primer-terminus stabilization at the 3'-5' exonuclease active site of phi29 DNA polymerase. Involvement of two amino acid residues highly conserved in proofreading DNA polymerases. *Embo J* 15, 1182-1192.
- de Vega, M., Lázaro, J. M., Salas, M., y Blanco, L. (1998b). Mutational analysis of phi29 DNA polymerase residues acting as ssDNA ligands for 3'-5' exonucleolysis. *J Mol Biol* 279, 807-822.
- Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., y Lasken, R. S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 11, 1095-1099.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D., y Argos, P. (1990). An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng* 3, 461-467.

Dervyn, E., Suski, C., Daniel, R., Bruand, C., Chapuis, J., Errington, J., Janniere, L., y Ehrlich, S. D. (2001). Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science* 294, 1716-1719.

Digard, P., Bebrin, W. R., Weisshart, K., y Coen, D. M. (1993). The extreme C terminus of herpes simplex virus DNA polymerase is crucial for functional interaction with processivity factor UL42 and for viral replication. *J Virol* 67, 398-406.

Domínguez, O., Ruíz, J. F., Lain de Lera, T., García-Díaz, M., González, M. A., Kirchhoff, T., Martínez, A. C., Bernad, A., y Blanco, L. (2000). DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *Embo J* 19, 1731-1742.

Doublíé, S., Tabor, S., Long, A. M., Richardson, C. C., y Ellenberger, T. (1998). Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature* 391, 251-258.

Dufour, E., Méndez, J., Lázaro, J. M., de Vega, M., Blanco, L., y Salas, M. (2000). An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein. *J Mol Biol* 304, 289-300.

Echols, H., y Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu Rev Biochem* 60, 477-511.

Eisenbrandt, R., Lázaro, J. M., Salas, M., y de Vega, M. (2002). Phi29 DNA polymerase residues Tyr59, His61 and Phe69 of the highly conserved ExoII motif are essential for interaction with the terminal protein. *Nucleic Acids Res* 30, 1379-1386.

Esnouf, R., Ren, J., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D., y Stuart, D. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol* 2, 303-308.

Esteban, J. A., Soengas, M. S., Salas, M., y Blanco, L. (1994). 3'-->5' exonuclease active site of phi 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism. *J Biol Chem* 269, 31946-31954.

Franklin, M. C., Wang, J., y Steitz, T. A. (2001). Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* 105, 657-667.

- Freemont, P. S., Friedman, J. M., Beese, L. S., Sanderson, M. R., y Steitz, T. A. (1988). Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 8924-8928.
- García-Díaz, M., Bebenek, K., Krahn, J. M., Blanco, L., Kunkel, T. A., y Pedersen, L. C. (2004). A structural solution for the DNA polymerase lambda-dependent repair of DNA gaps with minimal homology. *Mol Cell* *13*, 561-572.
- García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernandez, L. A., de Lera, L. T., Saniger, M. L., Ruíz, J. F., Parraga, M., García-Ortiz, M. J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., *et al.* (2000). DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol* *301*, 851-867.
- Glover, B. P., y McHenry, C. S. (2001). The DNA polymerase III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases. *Cell* *105*, 925-934.
- Goodman, M. F., y Tippin, B. (2000). Sloppier copier DNA polymerases involved in genome repair. *Curr Opin Genet Dev* *10*, 162-168.
- Gotte, M., Li, X., y Wainberg, M. A. (1999). HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* *365*, 199-210.
- Greider, C. W., y Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* *43*, 405-413.
- Gutiérrez, J., Vinos, J., Prieto, I., Méndez, E., Hermoso, J. M., y Salas, M. (1986). Signals in the phi 29 DNA-terminal protein template for the initiation of phage phi 29 DNA replication. *Virology* *155*, 474-483.
- Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., y Kai, Y. (2001). Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J Mol Biol* *306*, 469-477.
- Hazes, B., y Dijkstra, B. W. (1988). Model building of disulfide bonds in proteins with known three-dimensional structure. *Protein Eng* *2*, 119-125.

Hermanns, J., y Osiewacz, H. D. (1992). The linear mitochondrial plasmid pAL2-1 of a long-lived *Podospira anserina* mutant is an invertron encoding a DNA and RNA polymerase. *Curr Genet* 22, 491-500.

Hermoso, J. M., Méndez, E., Soriano, F., y Salas, M. (1985). Location of the serine residue involved in the linkage between the terminal protein and the DNA of phage phi 29. *Nucleic Acids Res* 13, 7715-7728.

Hopfner, K. P., Eichinger, A., Engh, R. A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R., y Angerer, B. (1999). Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3600-3605.

Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark, A. D., Jr., Hughes, S. H., y Arnold, E. (1996). Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure* 4, 853-860.

Hübscher, U., Maga, G., y Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem* 71, 133-163.

Illana, B., Blanco, L., y Salas, M. (1996). Functional characterization of the genes coding for the terminal protein and DNA polymerase from bacteriophage GA-1. Evidence for a sliding-back mechanism during protein-primed GA-1 DNA replication. *J Mol Biol* 264, 453-464.

Inciarte, M. R., Lázaro, J. M., Salas, M., y Viñuela, E. (1976). Physical map of bacteriophage phi29 DNA. *Virology* 74, 314-323.

Ito, J., y Braithwaite, D. K. (1991). Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res* 19, 4045-4057.

Kaguni, L. S. (2004). DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* 73, 293-320.

Kamtekar, S., Berman, A. J., Wang, J., Lázaro, J. M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M., y Steitz, T. A. (2004). Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage phi29. *Mol Cell* 16, 609-618.

Kamtekar, S., Berman, A. J., Wang, J., Lázaro, J. M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M., y Steitz, T. A. (2006). The phi29 DNA polymerase:protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition. *Embo J* 25, 1335-1343.

Kazmirski, S. L., Zhao, Y., Bowman, G. D., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (2005). Out-of-plane motions in open sliding clamps: molecular dynamics simulations of eukaryotic and archaeal proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13801-13806.

Kelman, Z., y O'Donnell, M. (1995). DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* 64, 171-200.

Kiefer, J. R., Mao, C., Braman, J. C., y Beese, L. S. (1998). Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature* 391, 304-307.

Klenow, H., y Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65, 168-175.

Kong, X. P., Onrust, R., O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (1992). Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* 69, 425-437.

Kornberg, A. y Baker, T. (1992) DNA replication. 2nd edition. Freeman (San Francisco).

Korolev, S., Nayal, M., Barnes, W. M., Di Cera, E., y Waksman, G. (1995). Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I at 2.5-Å resolution: structural basis for thermostability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9264-9268.

Krishna, T. S., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M., y Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79, 1233-1243.

Kulaeva, O. I., Koonin, E. V., McDonald, J. P., Randall, S. K., Rabinovich, N., Connaughton, J. F., Levine, A. S., y Woodgate, R. (1996). Identification of a DinB/UmuC homolog in the archeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mutat Res* 357, 245-253.

Lázaro, J. M., Blanco, L., y Salas, M. (1995). Purification of bacteriophage phi 29 DNA polymerase. *Methods Enzymol* 262, 42-49.

Lecointe, F., Shevelev, I. V., Bailone, A., Sommer, S., y Hubscher, U. (2004). Involvement of an X family DNA polymerase in double-stranded break repair in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol Microbiol* *53*, 1721-1730.

Lehman, I. R., Zimmerman, S. B., Adler, J., Bessman, M. J., Simms, E. S., y Kornberg, A. (1958). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. V. Chemical Composition of Enzymatically Synthesized Deoxyribonucleic Acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* *44*, 1191-1196.

Li, Y., Korolev, S., y Waksman, G. (1998). Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *Embo J* *17*, 7514-7525.

Lin, T. C., Karam, G., y Konigsberg, W. H. (1994). Isolation, characterization, and kinetic properties of truncated forms of T4 DNA polymerase that exhibit 3'-5' exonuclease activity. *J Biol Chem* *269*, 19286-19294.

Loeb, L. A., y Kunkel, T. A. (1982). Fidelity of DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* *51*, 429-457.

Lohman, T. M., y Bjornson, K. P. (1996). Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu Rev Biochem* *65*, 169-214.

Lyamichev, V., Brow, M. A., y Dahlberg, J. E. (1993). Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* *260*, 778-783.

Marini, F., Kim, N., Schuffert, A., y Wood, R. D. (2003). POLN, a nuclear PolA family DNA polymerase homologous to the DNA cross-link sensitivity protein Mus308. *J Biol Chem* *278*, 32014-32019.

Martín, G., Lázaro, J. M., Méndez, E., y Salas, M. (1989). Characterization of the phage phi 29 protein p5 as a single-stranded DNA binding protein. Function in phi 29 DNA-protein p3 replication. *Nucleic Acids Res* *17*, 3663-3672.

Matson, S. W., y Kaiser-Rogers, K. A. (1990). DNA helicases. *Annu Rev Biochem* *59*, 289-329

- Matsumoto, Y., y Kim, K. (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* *269*, 699-702.
- McCulloch, S. D., Kokoska, R. J., Masutani, C., Iwai, S., Hanaoka, F., y Kunkel, T. A. (2004). Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase eta occurs with biased fidelity. *Nature* *428*, 97-100.
- McDonald, J. P., Raptic-Otrin, V., Epstein, J. A., Broughton, B. C., Wang, X., Lehmann, A. R., Wolgemuth, D. J., y Woodgate, R. (1999). Novel human and mouse homologs of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta. *Genomics* *60*, 20-30.
- McHenry, C. S. (2003). Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences. *Mol Microbiol* *49*, 1157-1165.
- Meijer, W. J., Horcajadas, J. A., y Salas, M. (2001). Phi29 family of phages. *Microbiol Mol Biol Rev* *65*, 261-287; second page, table of contents.
- Méndez, J., Blanco, L., Esteban, J. A., Bernad, A., y Salas, M. (1992). Initiation of phi 29 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide of the linear template: a sliding-back mechanism for protein-primed DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 9579-9583.
- Méndez, J., Blanco, L., Lázaro, J. M., y Salas, M. (1994). Primer-terminus stabilization at the psi 29 DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif TX2GR. *J Biol Chem* *269*, 30030-30038.
- Méndez, J., Blanco, L., y Salas, M. (1997). Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *Embo J* *16*, 2519-2527.
- Minnick, D. T., Astatke, M., Joyce, C. M., y Kunkel, T. A. (1996). A thumb subdomain mutant of the large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I with reduced DNA binding affinity, processivity, and frameshift fidelity. *J Biol Chem* *271*, 24954-24961.
- Miyata, T., Oyama, T., Mayanagi, K., Ishino, S., Ishino, Y., y Morikawa, K. (2004). The clamp-loading complex for processive DNA replication. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 632-636.

- Miyata, T., Suzuki, H., Oyama, T., Mayanagi, K., Ishino, Y., y Morikawa, K. (2005). Open clamp structure in the clamp-loading complex visualized by electron microscopic image analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13795-13800.
- Moelling, K., Bolognesi, D. P., y Bauer, H. (1971). Polypeptides of avian RNA tumor viruses. 3. Purification and identification of a DNA synthesizing enzyme. *Virology* 45, 298-302.
- Nagasawa, K., Kitamura, K., Yasui, A., Nimura, Y., Ikeda, K., Hirai, M., Matsukage, A., y Nakanishi, M. (2000). Identification and characterization of human DNA polymerase beta 2, a DNA polymerase beta -related enzyme. *J Biol Chem* 275, 31233-31238.
- Nair, D. T., Johnson, R. E., Prakash, S., Prakash, L., y Aggarwal, A. K. (2004). Replication by human DNA polymerase-iota occurs by Hoogsteen base-pairing. *Nature* 430, 377-380.
- Nelson, J. R., Lawrence, C. W., y Hinkle, D. C. (1996). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science* 272, 1646-1649.
- O'Donnell, M., y Kuriyan, J. (2006). Clamp loaders and replication initiation. *Curr Opin Struct Biol* 16, 35-41.
- Ohashi, E., Bebenek, K., Matsuda, T., Feaver, W. J., Gerlach, V. L., Friedberg, E. C., Ohmori, H., y Kunkel, T. A. (2000). Fidelity and processivity of DNA synthesis by DNA polymerase kappa, the product of the human DINB1 gene. *J Biol Chem* 275, 39678-39684.
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T. A., Lawrence, C. W., Livneh, Z., Nohmi, T., *et al.* (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell* 8, 7-8.
- Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G., y Steitz, T. A. (1985). Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature* 313, 762-766.
- Paces, V., Vlcek, C., Urbanek, P., y Hostomsky, Z. (1986). Nucleotide sequence of the right early region of *Bacillus subtilis* phage PZA completes the 19366-bp sequence of PZA genome. Comparison with the homologous sequence of phage phi 29. *Gene* 44, 115-120.

- Pastrana, R., Lázaro, J. M., Blanco, L., García, J. A., Méndez, E., y Salas, M. (1985). Overproduction and purification of protein P6 of *Bacillus subtilis* phage phi 29: role in the initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res* *13*, 3083-3100.
- Pelletier, H. (1994). Polymerase structures and mechanism. *Science* *266*, 2025-2026.
- Penalva, M. A., y Salas, M. (1982). Initiation of phage phi 29 DNA replication in vitro: formation of a covalent complex between the terminal protein, p3, and 5'-dAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 5522-5526.
- Pérez-Arnaiz, P., Lázaro, J. M., Salas, M., y de Vega, M. (2006). Involvement of phi29 DNA polymerase thumb subdomain in the proper coordination of synthesis and degradation during DNA replication. *Nucleic Acids Res* *34*, 3107-3115.
- Ren, J., Bird, L. E., Chamberlain, P. P., Stewart-Jones, G. B., Stuart, D. I., y Stammers, D. K. (2002). Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14410-14415.
- Rodgers, D. W., Gamblin, S. J., Harris, B. A., Ray, S., Culp, J. S., Hellmig, B., Woolf, D. J., Debouck, C., y Harrison, S. C. (1995). The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 1222-1226.
- Rodríguez, A. C., Park, H. W., Mao, C., y Beese, L. S. (2000). Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7. *J Mol Biol* *299*, 447-462.
- Rohe, M., Schrage, K., y Meinhardt, F. (1991). The linear plasmid pMC3-2 from *Morchella conica* is structurally related to adenoviruses. *Curr Genet* *20*, 527-533.
- Ruíz, J. F., Domínguez, O., Lain de Lera, T., García-Díaz, M., Bernad, A., y Blanco, L. (2001). DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *356*, 99-109.
- Ruíz, J. F., Juárez, R., García-Díaz, M., Terrados, G., Picher, A. J., González-Barrera, S., Fernández de Henestrosa, A. R., y Blanco, L. (2003). Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res* *31*, 4441-4449.

- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem* 60, 39-71.
- Saturno, J., Blanco, L., Salas, M., and Esteban, J. A. (1995). A novel kinetic analysis to calculate nucleotide affinity of proofreading DNA polymerases. Application to phi 29 DNA polymerase fidelity mutants. *J Biol Chem* 270, 31235-31243.
- Sawaya, M. R., Prasad, R., Wilson, S. H., Kraut, J., y Pelletier, H. (1997). Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry* 36, 11205-11215.
- Saxowsky, T. T., Matsumoto, Y., y Englund, P. T. (2002). The mitochondrial DNA polymerase beta from *Crithidia fasciculata* has 5'-deoxyribose phosphate (dRP) lyase activity but is deficient in the release of dRP. *J Biol Chem* 277, 37201-37206.
- Seki, M., Marini, F., y Wood, R. D. (2003). POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic Acids Res* 31, 6117-6126.
- Serrano, M., Gutierrez, J., Prieto, I., Hermoso, J. M., y Salas, M. (1989). Signals at the bacteriophage phi 29 DNA replication origins required for protein p6 binding and activity. *Embo J* 8, 1879-1885.
- Shamoo, Y., y Steitz, T. A. (1999). Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell* 99, 155-166.
- Sharief, F. S., Vojta, P. J., Ropp, P. A., y Copeland, W. C. (1999). Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. *Genomics* 59, 90-96.
- Shcherbakova, P. V., Pavlov, Y. I., Chilkova, O., Rogozin, I. B., Johansson, E., y Kunkel, T. A. (2003). Unique error signature of the four-subunit yeast DNA polymerase epsilon. *J Biol Chem* 278, 43770-43780.
- Silvian, L. F., Toth, E. A., Pham, P., Goodman, M. F., y Ellenberger, T. (2001). Crystal structure of a DinB family error-prone DNA polymerase from *Sulfolobus solfataricus*. *Nat Struct Biol* 8, 984-989.

Singhal, R. K., y Wilson, S. H. (1993). Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *J Biol Chem* 268, 15906-15911.

Sobol, R. W., y Wilson, S. H. (2001). Mammalian DNA beta-polymerase in base excision repair of alkylation damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68, 57-74.

Soengas, M. S., Esteban, J. A., Lázaro, J. M., Bernad, A., Blasco, M. A., Salas, M., y Blanco, L. (1992). Site-directed mutagenesis at the Exo III motif of phi 29 DNA polymerase; overlapping structural domains for the 3'-5' exonuclease and strand-displacement activities. *Embo J* 11, 4227-4237.

Soengas, M. S., Gutierrez, C., y Salas, M. (1995). Helix-destabilizing activity of phi 29 single-stranded DNA binding protein: effect on the elongation rate during strand displacement DNA replication. *J Mol Biol* 253, 517-529.

Steitz, T. A., Smerdon, S. J., Jager, J., y Joyce, C. M. (1994). A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science* 266, 2022-2025.

Studier, F. W., y Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.

Trincao, J., Johnson, R. E., Escalante, C. R., Prakash, S., Prakash, L., y Aggarwal, A. K. (2001). Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase eta: implications for translesion DNA synthesis. *Mol Cell* 8, 417-426.

Truniger, V., Blanco, L., y Salas, M. (1999). Role of the "YxGG/A" motif of Phi29 DNA polymerase in protein-primed replication. *J Mol Biol* 286, 57-69.

Truniger, V., Blanco, L., y Salas, M. (2000). Analysis of O29 DNA polymerase by partial proteolysis: binding of terminal protein in the double-stranded DNA channel. *J Mol Biol* 295, 441-453.

Truniger, V., Lázaro, J. M., Esteban, F. J., Blanco, L., y Salas, M. (2002). A positively charged residue of phi29 DNA polymerase, highly conserved in DNA polymerases from families A and B, is involved in binding the incoming nucleotide. *Nucleic Acids Res* 30, 1483-1492.

Truniger, V., Lázaro, J. M., Salas, M., y Blanco, L. (1996). A DNA binding motif coordinating synthesis and degradation in proofreading DNA polymerases. *Embo J* 15, 3430-3441.

Truniger, V., Lázaro, J. M., Salas, M., y Blanco, L. (1998). Phi 29 DNA polymerase requires the N-terminal domain to bind terminal protein and DNA primer substrates. *J Mol Biol* 278, 741-755.

Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H., e Ishino, Y. (1997). A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells* 2, 499-512.

Wang, J., Sattar, A. K., Wang, C. C., Karam, J. D., Konigsberg, W. H., y Steitz, T. A. (1997). Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell* 89, 1087-1099.

Watson, J. D., y Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.

Zaballos, A., y Salas, M. (1989). Functional domains in the bacteriophage phi 29 terminal protein for interaction with the phi 29 DNA polymerase and with DNA. *Nucleic Acids Res* 17, 10353-10366.

Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Moarefi, I., Leighton, L., Lasken, R., y Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of an archaebacterial DNA polymerase. *Structure* 7, 1189-1199.

Zhou, B. L., Pata, J. D., y Steitz, T. A. (2001). Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol Cell* 8, 427-437.