



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Análisis bioquímico de las proteínas de reparación del DNA
Ku y Ligasa D de *Bacillus subtilis*

TESIS DOCTORAL

Ana de Ory López
Madrid, 2016

**Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**

**Análisis bioquímico de las proteínas de reparación del DNA
Ku y Ligasa D de *Bacillus subtilis***

Memoria de investigación presentada por la Licenciada en Biología **Ana de Ory López** para optar al grado de Doctora en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC/UAM) bajo la dirección del Doctor **Miguel de Vega José**. Para su realización se contó con una beca predoctoral para la Formación del Personal Investigador (FPI, BES-2012-053642) del Ministerio de Economía y Competitividad.

A mis padres.

Abreviaturas	1
Glosario de términos no castellanos incluidos en esta Tesis.....	5
Resumen.....	7
<i>Summary</i>	9
Introducción	11
1. Daños en el DNA y vías de reparación.....	13
2. Reparación por escisión de bases (BER)	15
3. Reparación de roturas de doble cadena (DSBs).....	17
3.1. Unión de extremos no-homólogos (NHEJ)	19
3.2. La proteína Ku bacteriana.....	19
3.3. La Ligasa D bacteriana	21
3.3.1. El dominio polimerasa de las LigD procariotas (PolDom).....	22
3.3.2. El dominio ligasa de las LigD procariotas (LigDom)	24
3.3.3. El dominio fosfoesterasa de las LigD procariotas (PEDom).....	25
4. Síntesis a través de lesión (TLS).....	27
5. <i>Bacillus subtilis</i> como modelo para el estudio de la NHEJ	28
Objetivos	31
Materiales y Métodos.....	35
1. Materiales	37
1.1. Nucleótidos y proteínas	37
1.2. Oligonucleótidos y sustratos de DNA.....	37
1.3. Construcción de cepas de <i>B. subtilis</i> que expresan el mutante E184A.....	40
1.4. Preparación de las esporas.....	41
2. Métodos.....	42
2.1. Clonaje, sobreexpresión y purificación de proteínas de <i>P. aeruginosa</i>	42

2.1.1. Clonaje, sobreexpresión y purificación de la proteína Ku de <i>P. aeruginosa</i> (<i>PaeKu</i>)	42
2.1.2. Clonaje, sobreexpresión y purificación de la proteína LigD de <i>P. aeruginosa</i> (<i>PaeLigD</i>).....	43
2.2. Sobreexpresión y purificación del dominio Ligasa de <i>BsuLigD</i> (<i>LigDom</i>).....	43
2.3. Mutagénesis dirigida	44
2.3.1. Mutagénesis dirigida en el gen <i>ykoV</i>	44
2.3.2. Mutagénesis dirigida en el gen <i>ykoU</i>	44
2.4. Actividad AP-liasa de <i>BsuKu</i>	45
2.5. Actividad 5'-dRP liasa de <i>BsuKu</i>	45
2.6. Experimentos cinéticos	46
2.6.1. Análisis cinéticos de <i>BsuKu</i>	46
2.6.2. Parámetros cinéticos del estado estacionario de la reacción de 5'-dRP liasa de <i>BsuLigD</i>	46
2.7. Ensayos de atrapamiento en presencia de NaBH ₄	46
2.7.1. Ensayo de atrapamiento de <i>BsuKu</i>	46
2.7.2. Ensayos de atrapamiento de <i>BsuLigD</i> , <i>PaeLigD</i> y <i>BsuLigDom</i>	47
2.8. Sedimentación de <i>BsuKu</i> en un gradiente de glicerol	47
2.9. Ensayo de retraso en gel de agarosa de DNA plasmídico por <i>BsuKu</i>	48
2.10. Actividad AP-liasa de <i>BsuKu</i> en sitios AP internos en el DNA	48
2.10.1. DNAs circulares.....	48
2.10.2. DNA lineal.....	48
2.11. Ensayo de retraso en gel (EMSA)	49
2.12. Unión de moléculas de DNA de plásmidos lineales.....	49
2.13. Determinación del grado de adenilación de <i>BsuLigD</i>	49
2.14. Unión de moléculas de DNA con extremos parcialmente complementarios	50
2.15. Unión de moléculas de DNA parcialmente complementarias con sitios AP próximos al extremo 5' ...	50
2.16. Restitución <i>in vitro</i> de un sustrato de BER con un <i>gap</i> de un nucleótido por <i>BsuLigD</i>	50
2.17. Actividad 5'-dRP liasa de <i>BsuLigD</i> en intermediarios de BER rellenos	51
2.18. Actividad AP-liasa de <i>BsuLigD</i>	51

2.18.1. Sustratos tipo <i>flap</i> con una 2'-desoxiuridina o un THF	51
2.18.2. Sustratos de dsDNA con extremos romos o 5'-recesivos	51
2.19. Ensayo de resistencia de las esporas a desecación extrema [<i>ultrahigh vacuum</i> (UHV)].....	52
2.20. Experimentos de <i>bypass</i> de lesiones en <i>gaps</i> de un nucleótido	53
Resultados	55
Capítulo 1. Procesamiento eficiente de sitios AP por proteínas Ku bacterianas de la ruta de NHEJ.....	57
1. <i>BsuKu</i> posee una actividad AP-liasa intrínseca	59
2. <i>BsuKu</i> posee actividad 5'-dRP liasa	64
3. La actividad AP-liasa no es exclusiva de <i>BsuKu</i>	65
4. Búsqueda de los residuos responsables de la actividad AP/5'-dRP liasa de <i>BsuKu</i>	67
5. La actividad AP-liasa de <i>BsuKu</i> puede actuar sobre sitios AP internos en moléculas de DNA sin extremos	69
6. Coordinación de la actividad AP/5'-dRP liasa de <i>BsuKu</i> y las actividades polimerasa y ligasa de <i>BsuLigD</i>	72
Capítulo 2. Identificación de una actividad 5'-dRP liasa conservada en Ligasas D bacterianas	81
1. <i>BsuLigD</i> es capaz de eliminar un grupo 5'-dRP	83
2. <i>BsuLigD</i> escinde los grupos 5'-dRP mediante un mecanismo de β -eliminación.....	86
3. La <i>BsuLigD</i> posee actividad AP-liasa sobre sitios AP internos	89
4. La actividad 5'-dRP liasa está conservada en otras LigD bacterianas.....	91
5. La actividad 5'-dRP liasa de <i>BsuLigD</i> se localiza en el dominio ligasa N-terminal.....	93
6. La resistencia de las esporas a desecación extrema (<i>ultrahigh vacuum</i> , UHV) depende de <i>BsuLigD</i> y Nfo.....	95
Capítulo 3. Análisis de la actividad AP-liasa de <i>BsuLigD</i> sobre sustratos de DNA 5'-recesivos	99
1. La actividad AP-liasa de <i>BsuLigD</i> no es capaz de procesar un sitio AP central en sustratos de dsDNA.....	101

Índice

2. <i>BsuLigD</i> tiene actividad AP-liasa sobre sitios AP próximos a extremos 5'-recesivos.....	102
3. Requerimientos de la actividad AP-liasa de <i>BsuLigD</i> y la posterior reacción de ligación.....	103
4. <i>BsuLigD</i> emplea como <i>primer</i> el oligonucleótido molde, formando un <i>hairpin</i>	107
5. <i>BsuKu</i> estimula la actividad AP-liasa de <i>BsuLigD</i>	108
Capítulo 4. Análisis de la capacidad de <i>BsuLigD</i> de insertar nucleótidos frente a lesiones en el molde.....	111
1. Análisis de la capacidad de adición de nucleótidos del mutante E184A de <i>BsuLigD</i> frente a lesiones en la cadena molde.....	114
2. Capacidad de <i>BsuLigD</i> de ligar un extremo 5'-P a un 3'-OH NMP situado frente a una lesión.....	116
Discusión.....	119
1. Procesamiento eficiente de sitios AP por proteínas Ku bacterianas.....	121
2. Actividad 5'-dRP liasa de proteínas LigD bacterianas de NHEJ y su potencial papel en BER.....	123
3. Actividad AP-liasa de <i>BsuLigD</i> en sustratos 5'-recesivos.....	126
4. <i>Bypass</i> de lesiones por <i>BsuLigD</i> y su posible papel en TLS.....	129
Conclusiones.....	135
Bibliografía.....	139
Artículos científicos publicados.....	159

- 5'-dRP**: 5'-desoxirribosa fosfato
- 8oxodG**: 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina
- A-EJ**: unión alternativa de extremos (del inglés, *Alternative End-Joining*)
- AEP**: primasas de arqueas y eucariotas (del inglés, *Archaeo-Eukaryotic Primases*)
- AMP**: adenosina-5'-monofosfato
- AP**:apurínico/apirimidínico
- ATP**: adenosina-5'-trifosfato
- BER**: reparación por escisión de bases (del inglés, *Base Excision Repair*)
- bp**: par de bases (del inglés, *base pair*)
- BSA**: seroalbúmina bovina (del inglés, *Bovine Serum Albumin*)
- C-terminal**: carboxilo terminal
- Cam^R**: resistencia a cloranfenicol
- CMP**: citidina-5'-trifosfato
- CPD**: dímero de pirimidina ciclobutano (del inglés, *Cyclobutane Pyrimidine Dimer*)
- CTP**: citidina-5'-trifosfato
- dAMP**: 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato
- dCMP**: 2'-desoxicitidina-5'-monofosfato
- dCTP**: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
- ddCMP**: 2'-3'-didesoxicitidina-5'-monofosfato
- ddCTP**: 2'-3'-didesoxicitidina-5'-trifosfato
- ddNMP**: 2'-3'-didesoxinucleósido-5'-monofosfato
- DE**: Desviación Estándar
- dGMP**: 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato
- DNA**: ácido desoxirribonucleico (del inglés, *DeoxyriboNucleic Acid*)
- dNMP**: 2'-desoxinucleósido-5'-monofosfato
- dNTP**: 2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
- ds**: banda doble (del inglés, *double-stranded*)
- DSB**: rotura de doble cadena (del inglés, *Double-Strand Break*)
- EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético (del inglés, *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)
- EMSA**: ensayo de retraso en gel (del inglés, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*)
- EndoIII**: endonucleasa III
- Erm^R**: resistencia a eritromicina
- F**: directo (del inglés, *forward*)
- GMP**: guanosina-5'-monofosfato

Abreviaturas

GTP: guanosina-5'-trifosfato

hAPE1: AP-endonucleasa 1 humana

HEPES: ácido 4-[(2-hidroxietil)-1-piperacil]-etanosulfónico

HR: recombinación homóloga (del inglés, *Homologous Recombination*)

IPTG: isopropil β-D-tiogalactopiranosido

KDa: Kilo Dalton

LB: Luria Bertani

mer: número de nucleótidos de un oligómero

MMEJ: unión de extremos mediada por microhomologías (del inglés, *Microhomology-Mediated End Joining*)

MMR: reparación de desapareamientos (del inglés, *Mismatch Repair*)

N-terminal: amino terminal

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido

NB: del inglés, *Nutrient Broth*

Neo^R: resistencia a neomicina

NER: reparación por escisión de nucleótido (del inglés, *Nucleotide Excision Repair*)

NHEJ: unión de extremos no-homólogos (del inglés, *Non-Homologous End Joining*)

Ni-NTA: níquel-ácido nitroloacético

NMP: nucleósido-5'-monofosfato

NTP: nucleósido-5'-trifosfato

OB: de unión a oligonucleótido (del inglés, *Oligonucleotide-Binding*)

OH: hidroxilo

OH-C: 5-hidroxi-2'-desoxicitidina

P: fosfato

p/v: peso/volumen

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

PEI: polietilenimina

PNK: polinucleótido kinasa

Pol: polimerasa

PPi: pirofosfato inorgánico

PUA: aldehído-α,β-fosfoinsaturado

R: reverso (del inglés, *reverse*)

RNA: ácido ribonucleico (del inglés, *RiboNucleic Acid*)

ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés, *Reactive Oxygen Species*)

SAP: dominio de unión a DNA (**SAF-A/B, Acinus, PIAS**)

SASP: proteínas ácidas pequeñas y solubles de la espora (del inglés, *Small Acid-soluble Spore Proteins*)

SDS: dodecilsulfato sódico (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*)

ss: banda simple (del inglés, *single-stranded*)

SSB: rotura de cadena sencilla (del inglés, *Single-Strand Break*)

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal

Tgly: 5,6-dihidro-5,6-dihidroxi-2'-desoxitimidina

THF: tetrahidrofurano

TLS: síntesis a través de lesión (del inglés, *TransLesion Synthesis*)

Tris: trihidroximetil aminometano

tRNA: ácido ribonucleico de transferencia (del inglés, *transfer RiboNucleic Acid*)

UDG: uracil DNA glicosilasa

UFC: unidades formadoras de colonias

UHV: tratamiento a desecación por ultravacío (del inglés, *UltraHigh Vacuum*)

UMP: uridina-5'-monofosfato

UTP: uridina-5'-trifosfato

vWA: dominio de interacción proteína-proteína (**von Willebrand A**)

wt: tipo natural o silvestre, sin modificación genética (del inglés, *wild-type*)

En la medida de lo posible se ha evitado el uso de anglicismos. En los casos que se describen a continuación se ha conservado la nomenclatura inglesa, bien por no existir una correspondencia apropiada en castellano, bien por su uso generalizado en el lenguaje científico.

Backup: término utilizado para designar un mecanismo de recambio de una determinada actividad de reparación de DNA.

Cluster: Agrupación.

Downstream: fragmento o secuencia de DNA situado “hacia abajo” con respecto a un punto de referencia.

Flap: extremo de cadena sencilla en el DNA que se genera por desapareamiento de las cadenas.

Gap: secuencia de DNA de cadena simple de longitud variable que está flanqueada por zonas de DNA de doble cadena.

Hairpin: término utilizado para designar la formación de un bucle intramolecular en un DNA.

Nick: rotura del enlace fosfodiéster de una de las cadenas del DNA.

Pellet: material insoluble precipitado.

Primer: Molécula de DNA, RNA o proteína que se requiere para iniciar la síntesis de DNA.

Supershift: término que hace referencia a un incremento adicional en el peso molecular aparente resultante de la interacción de una proteína con un complejo DNA-proteína previamente formado.

Tag: término que hace referencia a una extensión de aminoácidos que se fusiona a uno de los extremos de una proteína.

Upstream: fragmento o secuencia de DNA situado “hacia arriba” con respecto a un punto de referencia.

Wild-type: tipo natural o silvestre, sin modificación genética.

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva formadora de esporas provista del sistema de reparación de roturas de las dos cadenas del DNA mediante la Unión de Extremos No Homólogos (NHEJ). Este sistema está constituido por la proteína de unión a DNA Ku (*BsuKu*) que se une a las roturas y recluta a la Ligasa D dependiente de ATP (*BsuLigD*) que posteriormente cataliza el relleno de los pequeños *gaps* que pudieran surgir durante el alineamiento de los extremos y el sellado de los *nicks* resultantes, contribuyendo a la estabilidad genómica durante la fase estacionaria y la germinación de las esporas.

Hasta el momento, las únicas funciones descritas para la proteína Ku procariota eran la unión a los extremos del DNA procedentes de roturas y el reclutamiento de la LigD para su posterior procesamiento y reparación. En esta Tesis Doctoral, se ha identificado la presencia de una actividad AP/5'-dRP liasa en *BsuKu*, capaz de reconocer y procesar sitios abásicos (AP) tanto en ssDNA, dsDNAs con extremos 5'-protuberantes y romos, así como en moléculas de DNA sin extremos. Esta nueva actividad de *BsuKu*, en coordinación con las actividades de polimerización y ligasa de *BsuLigD*, hacen posible la unión eficiente de fragmentos de DNA portadores de sitios AP próximos a extremos 5'-protuberantes. Además, hemos demostrado la presencia de la actividad AP-liasa también en la proteína Ku de la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, hecho que nos permite expandir nuestros resultados a otras proteínas Ku bacterianas.

Por otra parte, hemos identificado la presencia de una actividad dRP-liasa localizada en el dominio ligasa N-terminal de la proteína *BsuLigD*. Esta actividad, junto con las de polimerización y ligación, permite la reparación eficiente de un DNA portador de un sitio AP en una reacción reconstituida *in vitro* de Reparación por Escisión de Bases (BER). El requerimiento de los pasos de polimerización, eliminación del grupo 5'-dRP y ligación final, junto con el hecho de que *BsuLigD* y Nfo (la AP-endonucleasa de la espora), confieren a las esporas resistencia a la desecación, sugiere que *BsuLigD* podría estar participando activamente en una potencial vía BER en la espora. Hemos demostrado que la actividad dRP-liasa no es específica de *BsuLigD*, sino que se encuentra también en la de *P. aeruginosa*, permitiéndonos extrapolar nuestras observaciones al resto de LigDs bacterianas.

Asimismo, se ha determinado que *BsuLigD* tiene una actividad AP-liasa clásica en sustratos de DNA con extremos 5'-recesivos. Esta actividad requiere la presencia de metal, así como la unión (aunque no la incorporación) en el centro activo de polimerización del nucleótido correcto que habría de reemplazar el sitio AP tras su eliminación, sugiriendo la necesidad de la formación de un complejo preternario estable para que se lleve a cabo el procesamiento del sitio AP a la espera de la posterior reacción de ligación a un *primer*.

Por último, se ha mostrado la capacidad de *BsuLigD* de incorporar ribonucleótidos frente a lesiones en el molde de moléculas de DNA, tales como 8-oxodG, timidin-glicol y 5-hidroxi desoxicidina, y la posterior ligación del producto elongado a un extremo 5'-P. Estos resultados podrían implicar a esta proteína no solo en las rutas NHEJ y BER, sino también en la ruta de tolerancia al daño en el DNA conocida como Síntesis a Través de Lesión.

Bacillus subtilis is a Gram-positive sporulating bacterium endowed with a double-strand break Non-Homologous End-Joining (NHEJ) repair system. This system is constituted by the DNA-binding protein Ku (*BsuKu*) that binds to the broken ends and recruits the ATP-dependent DNA ligase D (*BsuLigD*) that further catalyses both, filling of the short gaps that could arise after synapsis, and ligation of the resulting nicks, contributing to genome stability during the stationary phase and the spore germination.

So far, the only described functions for the prokaryotic Ku were binding to the broken ends of DNA and recruitment of LigD. In this Thesis, we have identified the presence of an AP/5'-dRP lyase activity in *BsuKu*. This protein can recognize and process AP sites present in ssDNA, in both, 5'-protruding and blunt ends, as well as in DNA molecules without ends. This newly identified activity in *BsuKu*, in coordination with *BsuLigD*'s polymerization and ligation activities, makes possible the efficient joining of 5'-protruding DNA ends with near terminal AP sites. We have shown that the homolog protein from the distantly related Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* also exhibits this activity, a fact that allows us to infer its general presence in the bacterial Ku proteins.

Additionally, we have identified the presence of a 5'-dRP-lyase activity located at the N-terminal ligase domain of *BsuLigD*. This activity, along with its polymerization and ligation activities, allows efficient repairing of AP-containing DNA in an *in vitro* reconstituted Base Excision Repair (BER) reaction. The requirement of a polymerization, a 5'-dRP removal and a final sealing step in BER, together with the joint participation of *BsuLigD* with the spore specific AP-endonuclease Nfo in conferring spore resistance to desiccation, suggests that *BsuLigD* could actively participate in this pathway. We have demonstrated that this 5'-dRP-lyase is also present in *P. aeruginosa* LigD, allowing us to expand our results to other bacterial LigDs.

Likewise, we have determined that *BsuLigD* has a classical AP-lyase activity that acts on 5'-recessive DNA ends. In this case the cleavage at the AP site requires the presence of metal ions, as well as the binding of the correct nucleotide that would replace the AP site at the polymerization active site, a fact that suggests the formation of a stable preternary complex required to process the AP site before the subsequent ligation to an incoming primer strand.

Finally, it is shown the ability of *BsuLigD* to incorporate ribonucleotides opposite lesions in the template strand, such as 8-oxodG, thymidine-glycol and 5-hydroxy deoxycytidine, ligating the extended product to a 5'-P end. These results could involve *BsuLigD* not only in NHEJ and BER, but also in the DNA damage tolerance pathway Translesion Synthesis.

Introducción

El DNA es la molécula que sostiene la vida. La mayoría de los organismos vivos almacenan su información genética en esta molécula, de manera que su correcta replicación y mantenimiento son cruciales para garantizar la integridad genómica, la supervivencia celular y la transmisión fiel del material genético a la siguiente generación. Sin embargo, el DNA está expuesto continuamente a múltiples agentes genotóxicos que pueden alterar su estructura química, amenazando la homeostasis celular.

En eucariotas superiores los fallos en la reparación del DNA pueden ocasionar numerosas enfermedades e incluso la muerte celular (Friedberg *et al.*, 2006). En humanos se ha asociado la inestabilidad genética al envejecimiento prematuro, a la predisposición a diversos tipos de cáncer y a enfermedades hereditarias (Aguilera y Gómez-González, 2008). En procariotas los daños en el DNA y la acumulación de mutaciones pueden afectar a la viabilidad celular, si bien es cierto que la mutagénesis puede conferir una ventaja selectiva a la bacteria que le permita adaptarse a los cambios del ambiente (Zinser y Kolter, 1999).

1. Daños en el DNA y vías de reparación

Los agentes que amenazan la integridad genómica proceden de tres orígenes diferentes. En primer lugar, las reacciones espontáneas intrínsecas a la propia naturaleza del DNA, en su mayoría de hidrólisis, generan lesiones en esta molécula. Por otra parte, el metabolismo celular provoca la aparición de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), de nitrógeno y de carbonilo, agentes alquilantes endógenos y productos de la peroxidación de lípidos. Por último, distintos agentes exógenos, tanto físicos como químicos, pueden asimismo dañar el DNA (Lindahl, 1993; De Bont y van Larebeke, 2004; Hoeijmakers, 2009).

Debido a que la cantidad y diversidad de las lesiones que pueden dañar el DNA es enorme (figura 1) [en mamíferos se ha estimado que el genoma de cada célula puede sufrir entre 10^4 y 10^5 lesiones al día (Friedberg *et al.*, 2006; Swenberg *et al.*, 2011)] no existe un proceso único que pueda reparar todos los tipos de daño, sino que existen diferentes rutas especializadas en reconocer y reparar tipos de lesiones específicas y que han debido surgir muy temprano en la evolución. Este hecho explicaría por qué la mayoría de esas rutas de reparación se encuentran conservadas desde procariotas hasta eucariotas superiores (Hoeijmakers *et al.*, 2001) y gracias a ello, el estudio de estas vías de reparación en bacterias ha permitido comprender numerosos procesos del mantenimiento de la integridad del genoma en organismos complejos [revisado en (Lenhart *et al.*, 2012)]. La modificación de bases nitrogenadas, los sitiosapurínicos/apirimidínicos (sitios AP) y las roturas de cadena sencilla (*Single-Strand Breaks*, SSBs), son reparadas por la ruta de reparación por escisión

Introducción

de bases (*Base Excision Repair*, BER). Cuando se trata de daños voluminosos como los dímeros de pirimidina ciclobutano (*Cyclobutane Pyrimidine Dimer*, CPD) y los fotoproductos, entra en juego la vía de reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair*, NER). Por su parte, los entrecruzamientos intercatenarios son reparados por recombinación homóloga (*Homologous Recombination*, HR), y las roturas de doble cadena (*Double-Strand Breaks*, DSBs) se reparan por HR o mediante la unión de extremos no-homólogos (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ). Los desapareamientos se reparan por la vía de reparación de desapareamientos (*Mismatch Repair*, MMR) [revisado en (Hoeijmakers, 2001; Helleday *et al.*, 2008)]. Por último, los organismos han desarrollado un mecanismo, conocido como síntesis a través de tensión (*Translesion Synthesis*, TLS), mediante el cual una DNA polimerasa especializada es capaz de introducir un nucleótido frente a una lesión que no haya podido ser reparada, evitando de ese modo que esta bloquee los procesos de transcripción y replicación, y permitiendo que el daño sea tolerado [revisado en (Sale *et al.*, 2012)]. A continuación se explican más en detalle la BER, la reparación de DSBs y la vía de tolerancia al daño TLS.

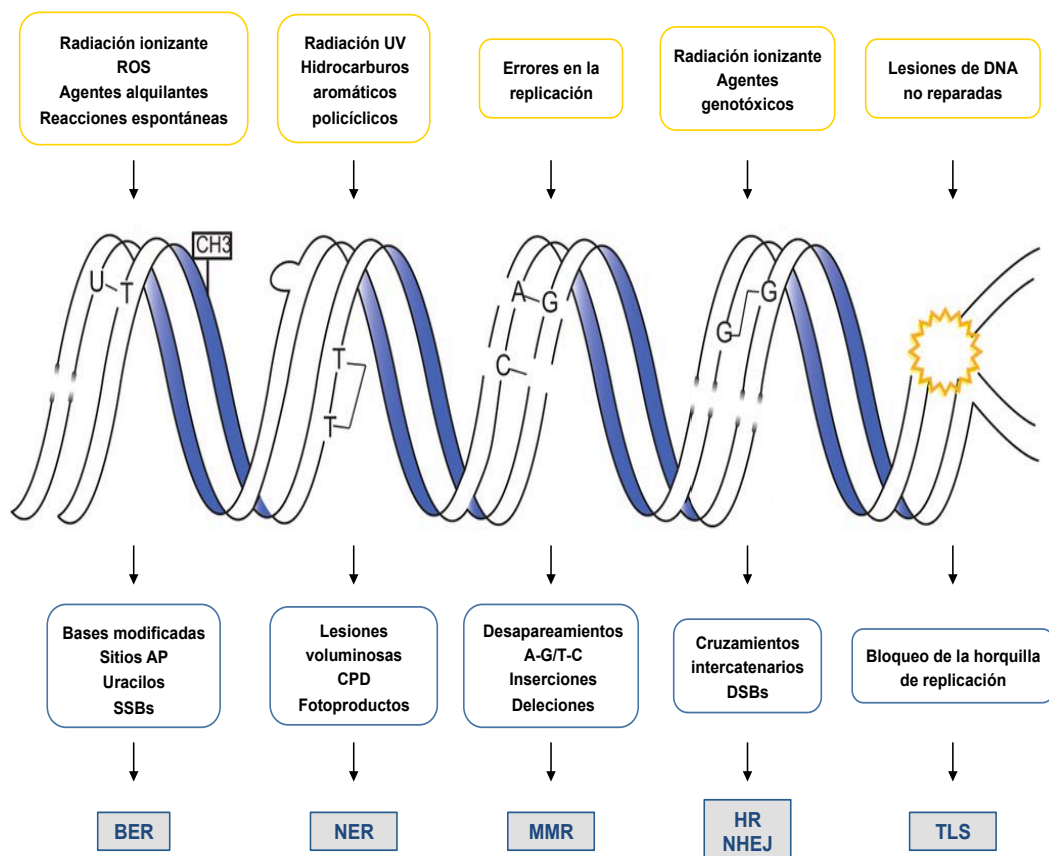


Figura 1. Agentes genotóxicos, daños en el DNA y vías de reparación o tolerancia del daño [adaptado de (Genois *et al.*, 2014)].

2. Reparación por escisión de bases (BER)

Las ROS, los agentes alquilantes y los rayos X, entre otros agentes genotóxicos, ocasionan lesiones no voluminosas en el DNA que no distorsionan la estructura de la doble hélice, tales como los sitios AP, las bases oxidadas, desaminadas o alquiladas, o las SSBs, que son reparadas por la ruta BER [revisado en (Krwawicz *et al.*, 2007)]. En la reparación de este tipo de lesiones, intervienen una extensa variedad de enzimas, que están conservadas en procariontes y eucariotes.

El proceso general comienza cuando una DNA-glicosilasa reconoce la lesión e hidroliza el enlace N-glicosídico entre la base dañada y la desoxirribosa, aunque este enlace también puede sufrir una hidrólisis espontánea (McCullough *et al.*, 1999), generándose en ambos casos un sitio AP. Las DNA-glicosilasas se clasifican según su mecanismo de reacción y pueden ser monofuncionales o bifuncionales. Las DNA-glicosilasas monofuncionales eliminan la base dañada mediante la hidrólisis del enlace N-glicosídico generando un sitio AP (figura 2, *a*). Las DNA-glicosilasas bifuncionales por su parte, además de poseer actividad glicosilasa, son capaces de romper el enlace fosfodiéster del DNA en posición 3' del sitio AP (actividad AP-liasa), reacción que llevan a cabo mediante un mecanismo de β -eliminación (figura 2, *b*, *c*). Esta reacción es independiente de metal y genera un extremo 5'-fosfato (5'-P) y un aldehído fosfo- α,β insaturado en 3' (3'-PUA). Por su parte, las enzimas con actividad AP-liasa pueden actuar sobre sitios AP generados por DNA-glicosilasas monofuncionales (figura 2, *c*), llevando a cabo una reacción de β -eliminación o de β,δ -eliminación, tal y como se explicará más adelante [revisado en (Fromme y Verdine, 2004; Khodyreva y Lavrik, 2011)]. Tras la acción de las DNA glicosilasas, otras actividades enzimáticas procesarán los distintos extremos generados. Las AP-endonucleasas hidrolizan el enlace fosfodiéster en posición 5' al sitio AP. Pueden actuar sobre un sitio AP generado por una DNA-glicosilasa monofuncional, produciendo extremos 3'-hidroxilo (3'-OH) y 5'-desoxirribosa fosfato (5'-dRP) (figura 2, *d*). Si actúan sobre un sitio AP previamente digerido por una DNA-glicosilasa bifuncional, dan lugar a extremos 3'-OH y 5'-P (figura 2, *e*). Asimismo, las AP-endonucleasas suelen poseer otras actividades adicionales, tales como 3'-fosfatasa, 3'-fosfodiesterasa o exonucleasa 3'-5', que permiten el procesamiento posterior de los extremos. El grupo 5'-dRP ha de ser eliminado por una 5'-dRP liasa, que lo escinde generando un extremo 5'-P (figura 2, *f*). Una vez que los extremos han sido saneados intervienen enzimas accesorias para reparar completamente la lesión. En este sentido se han descrito dos subrutas de BER: de trecho corto y de trecho largo [revisado en (Dogliotti *et al.*, 2001; Almeida y Sobol, 2007)]. Por un lado, la BER de trecho corto requiere de una DNA polimerasa que rellene un *gap* de uno o unos pocos nucleótidos, generando un *nick* que es sellado por una DNA ligasa. Por su parte, en la BER de trecho largo intervienen una DNA polimerasa que una vez rellenado el *gap* continúa la síntesis de DNA desplazando entre cinco y diez nucleótidos de la

Introducción

cadena *downstream* así como una *flap*-endonucleasa que elimina el DNA desplazado, y una DNA ligasa que sella el *nick* resultante (figura 2, g) [revisado en (Dalhus *et al.*, 2009)].

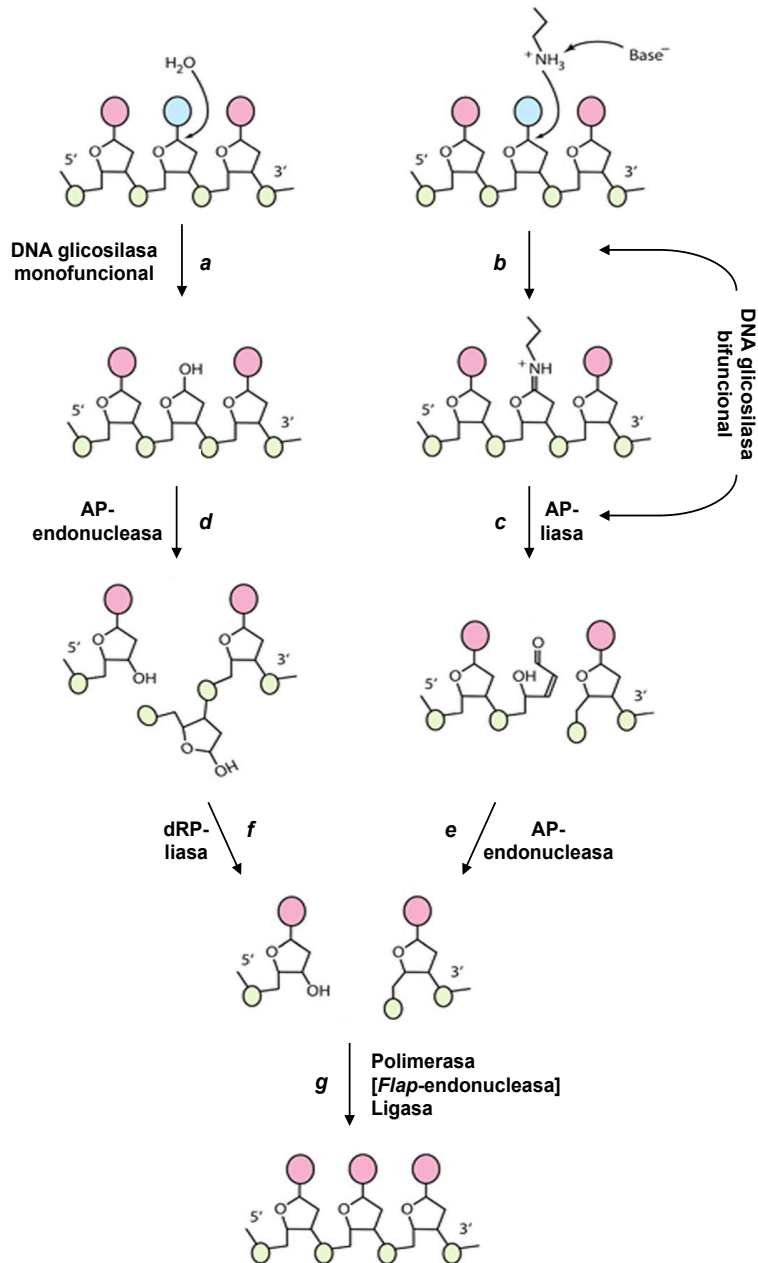


Figura 2. Ruta de BER. La ruta comienza con la acción de DNA glicosilasas que detectan y escinden una lesión en el DNA (en azul). Las DNA glicosilasas monofuncionales eliminan la base y generan un sitio AP (a). Las DNA-glicosilasas bifuncionales (b, c) tienen actividad AP-liasa. Las AP-endonucleasas pueden actuar sobre sitios AP generados por DNA-glicosilasas monofuncionales (d) o bifuncionales (e). En el primer caso generan extremos 5'-dRP que son posteriormente procesados por una actividad 5'-dRP liasa (f). Una vez que los extremos han sido "saneados", se requieren enzimas adicionales: polimerasa y ligasa en la BER de trecho corto, o polimerasa, *flap*-endonucleasa y ligasa en la BER de trecho largo [modificado de (Dalhus *et al.*, 2009)].

En *Escherichia coli* la principal polimerasa de BER es la Pol I [revisado en (Baute y Depicker, 2008)]. En eucariotas, la Pol β , perteneciente a la familia X, es fundamental en la ruta BER de trecho corto (Sobol *et al.*, 1996; Beard y Wilson, 2006). Sin embargo, también se ha descrito la participación en esta ruta de otra polimerasa de la misma familia, la Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2001), de manera que podría compensar la ausencia de Pol β en determinadas circunstancias (Braithwaite *et al.*, 2005).

En estudios previos se ha mostrado cómo algunas polimerasas eucariotas (tales como las Pol β , ι , λ , θ y Rev1) son capaces de escindir el grupo 5'-dRP generado por las AP-endonucleasas en las etapas tempranas del BER, puesto que poseen una actividad 5'-dRP liasa intrínseca, aunque es la Pol β la que opera principalmente en el procesamiento del 5'-dRP en la ruta eucariota (Matsumoto y Kim, 1995; Bebenek *et al.*, 2001; García-Díaz *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2009, 2016).

3. Reparación de roturas de doble cadena (DSBs)

Las DSBs son las lesiones más letales que puede sufrir el DNA: una única DSB es suficiente para provocar la muerte de la célula (Jackson y Bartek, 2010). Si su reparación es deficiente puede ocasionar reordenamientos cromosómicos, aneuploidías e incluso carcinogénesis y muerte celular en células de mamíferos (Pitcher *et al.*, 2007a). Ocurren con una frecuencia aproximada de diez por célula y día y son generadas por factores endógenos, como las ROS, o exógenos, como la radiación ionizante (Lieber, 2010).

Cuando las DSBs acontecen en el genoma pueden ser reparadas mediante HR (Cromie *et al.*, 2001) o NHEJ (Krejci *et al.*, 2003; Lees-Miller y Meek, 2003). En la HR, la información genética contenida en una copia intacta del DNA roto se emplea como molde para la síntesis de DNA, de modo que la lesión es reparada de manera fiel (Krejci *et al.*, 2012). En este mecanismo uno o los dos extremos de la DSB es procesado por una exonucleasa, que genera un extremo 3'-protuberante que invade la cromátida hermana y aparea con la secuencia de DNA complementaria. Este proceso es dirigido por la proteína RecA en bacterias, por RadA en arqueas y por Rad51 en eucariotas (Haldenby *et al.*, 2009; Ayora *et al.*, 2011) (figura 3A).

Por el contrario, cuando en la célula no existe una copia extra del DNA, las DSBs son reparadas por la ruta de NHEJ (Lieber, 1999). En la NHEJ los extremos son unidos directamente, haciendo innecesaria la presencia de una cromátida hermana. En esta ruta los extremos son procesados normalmente por actividades nucleasas y/o polimerasas antes de ser ligados, un hecho que frecuentemente da lugar a una reparación mutagénica (figura 3B) [revisado en (Burma *et al.*, 2006)]. Si bien es cierto que un sistema de reparación mutagénico parece contraproducente para la célula, puede resultar beneficioso en ciertas situaciones, como por ejemplo en el proceso de recombinación V(D)J en

eucariotas superiores, en el que la incorporación de nucleótidos en la NHEJ durante los reordenamientos programados de los genes de las inmunoglobulinas y los receptores de las células T es crucial para la diversificación del repertorio inmune (Bertocci *et al.*, 2006; Malu *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha descrito una ruta alternativa de unión de extremos de DNA, conocida como unión alternativa de extremos (*Alternative-End Joining*, A-EJ) o unión de extremos mediada por microhomologías (*Microhomology-Mediated End Joining*, MMEJ), en la que no intervienen las proteínas implicadas en las otras rutas de reparación de DSBs. La MMEJ se basa en la presencia de microhomologías entre los extremos del DNA roto, y requiere de la intervención de distintas actividades nucleasas, así como de DNA polimerasas especializadas, como la Pol θ de eucariotas superiores (figura 3C) [revisado en (Frit *et al.*, 2014; Black *et al.*, 2016)].

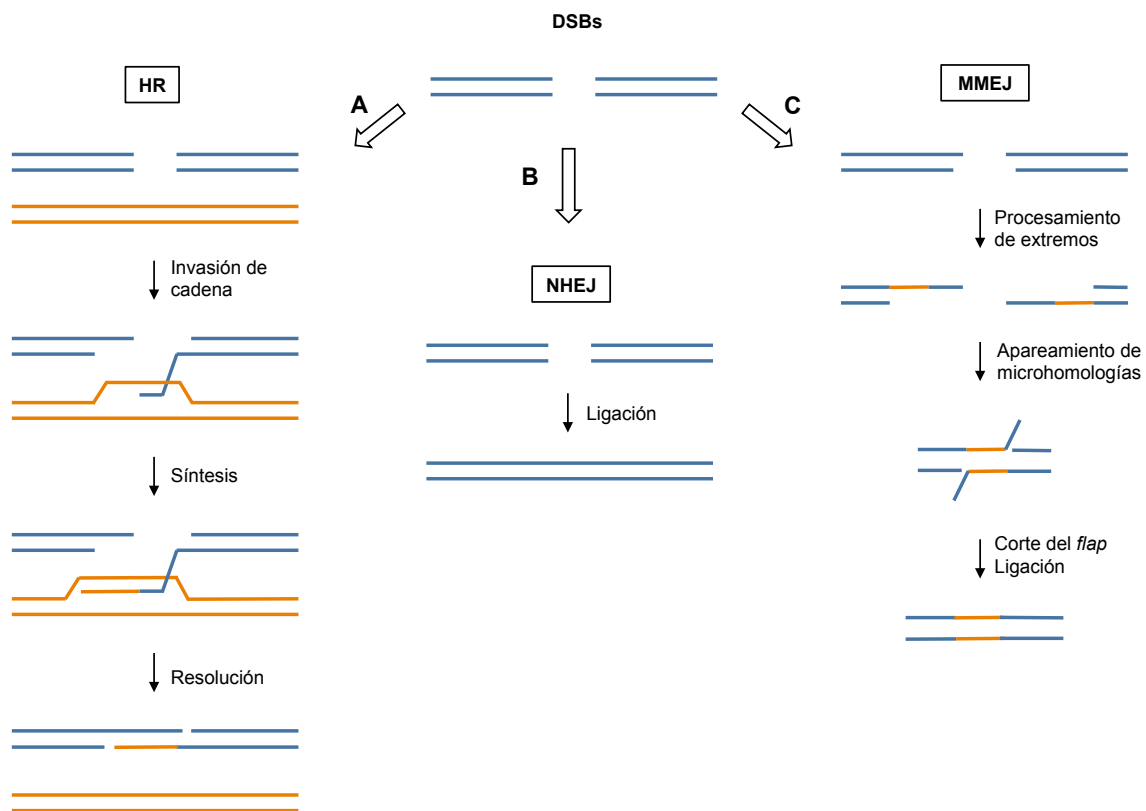


Figura 3. Vías de reparación de roturas de doble cadena (DSBs). Cuando el DNA sufre una DSB, puede ser reparada mediante tres mecanismos diferentes. **(A)** Recombinación homóloga (HR): el DNA roto (en azul) es procesado en su extremo 5' o 3' por una exonucleasa. Esto genera una extensión 3'-OH que invade la cromátida hermana intacta (en naranja). La cadena invasora sirve como *primer* para una DNA polimerasa que copia la información de la cromátida intacta, dando lugar a dos copias con la misma información. **(B)** Unión de extremos no homólogos (NHEJ): Los extremos del DNA roto son unidos directamente, o tras la acción de actividades nucleolíticas y/o polimerasa. Al no existir una copia intacta del genoma que sirva como molde, es un mecanismo de reparación infiel. **(C)** Unión de extremos mediada por microhomologías (MMEJ): Los extremos son procesados por nucleasas hasta que se generan regiones complementarias cortas, que permiten el apareamiento de las regiones 3' de los dos extremos rotos. Tras la eliminación de los *flap* generados, se lleva a cabo la ligación [adaptado de (Hiom, 2010)].

3.1. Unión de extremos no-homólogos (NHEJ)

La NHEJ se identificó por primera vez en células de mamíferos y se consideró que era exclusiva de eucariotas [revisado en (Pitcher *et al.*, 2007a)]. En eucariotas, el proceso comienza cuando el heterodímero Ku70/80 se une a los extremos de DNA, recluta a la DNA-PKcs (subunidad catalítica de la kinasa dependiente de DNA) (Gottlieb y Jackson, 1993; Lees-Miller y Meek, 2003) y ambas llevan a cabo la sinapsis entre los extremos rotos del DNA. A continuación, enzimas con actividad nucleasa (tales como Artemis o Fen1) y/o polimerasas (Pol λ y Pol μ en eucariotas superiores, y Pol IV en levaduras) (Mahajan *et al.*, 2002; Krejci *et al.*, 2003; Dudášová *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Daley *et al.*, 2005; Pryor *et al.*, 2015) son reclutadas y procesan los extremos, que finalmente son ligados por el complejo Ligasa IV/XRCC4/XLF [revisado en (Lieber, 2010)].

Pese a la consideración inicial de que la ruta de NHEJ no existía en bacterias, mediante estudios *in silico* de genomas microbianos se pudo identificar la presencia de genes Ku putativos en especies procariotas filogenéticamente alejadas (Aravind y Koonin, 2001; Doherty *et al.*, 2001). Además, en un amplio rango de especies bacterianas dichos genes estaban normalmente asociados con genes que codificaban DNA ligasas dependientes de ATP. La conservación de asociaciones genéticas entre bacterias filogenéticamente diversas normalmente indica que dichos genes son coexpresados y que sus productos interactúan funcionalmente en una ruta común. Este hecho condujo al descubrimiento de la presencia del sistema de NHEJ en procariotas (Weller *et al.*, 2002). Numerosas especies bacterianas pasan parte de su ciclo en fase estacionaria (Kolter *et al.*, 1993), durante la cual una única copia del genoma está disponible. Es en ese momento en el que opera la vía de NHEJ para reparar las DSBs (Shuman y Glickman, 2007).

El sistema de NHEJ de bacterias es menos complejo que su homólogo en eucariotas. Está formado por dos proteínas capaces de llevar a cabo por sí mismas la reparación completa de las DSBs: la proteína Ku, homóloga a la Ku eucariota, que se une a los extremos del DNA (Doherty y Jackson, 2001), y la Ligasa D (LigD), reclutada por Ku, que en la mayoría de las especies bacterianas se encuentra genéticamente asociada a esta (Weller y Doherty, 2001) y lleva a cabo el procesamiento y la unión de los extremos.

3.2. La proteína Ku bacteriana

En eucariotas, el heterodímero Ku70/80 posee una región central en forma de anillo, además de dos dominios adicionales: un dominio N-terminal llamado factor von Willebrand A (vWA), que interviene en la interacción proteína-proteína, y una extensión C-terminal, conocida como dominio SAP,

Introducción

necesario en la interacción proteína-DNA (véase la figura 4) (Doherty y Jackson, 2001; Walker *et al.*, 2001).

Por su parte, la proteína Ku procariótica, cuya estructura se predijo por su homología de secuencia de aminoácidos con la proteína Ku eucariótica, es también un complejo dimérico con forma de anillo (Doherty y Jackson, 2001; Bowater y Doherty, 2006). Está codificada por un gen único, lo cual hace que funcione como un homodímero (Aravind y Koonin, 2001; Doherty *et al.*, 2001), a diferencia del heterodímero eucariota Ku70/80. Ambas proteínas, procariota y eucariota, conservan en común la región central en forma de anillo. Sin embargo, el Ku procariota carece de los dos dominios adicionales presentes en la proteína eucariota, vWA y SAP (véase la figura 4). Ku está presente en los tres dominios de la vida, arqueas, bacterias y eucariotas, lo cual sugiere que se trata de una proteína de origen antiguo, cuyo ancestro primigenio probablemente existió como un homodímero con una estructura conformada por el dominio del anillo central conservado en el Ku procariota y eucariota (Pitcher *et al.*, 2007a).

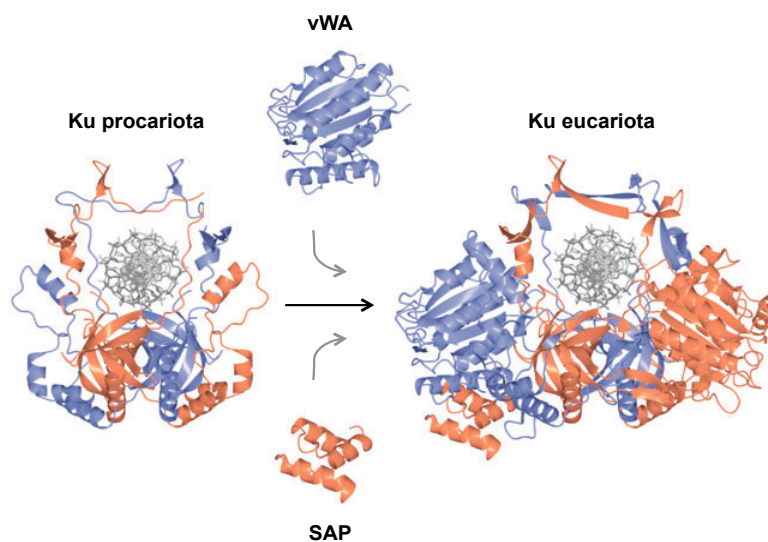


Figura 4. Evolución de las proteínas Ku procariota y eucariota. En procariotas, Ku es un homodímero que forma un anillo central que rodea al DNA (en gris). En eucariotas, Ku70/80 forma un complejo heterodimérico que posee los dominios adicionales vWA y SAP [adaptado de (Pitcher *et al.*, 2007a)].

Ku juega un papel fundamental en la ruta de NHEJ, ya que une el DNA a través de su canal central, y alinea los extremos de la rotura. Además, tiene la capacidad de unirse al DNA de manera independiente de su longitud, como si se tratase de las “cuentas de un collar” (Pitcher *et al.*, 2007a). Por último, es la encargada de reclutar al otro componente de la NHEJ, la LigD, que lleva a cabo el sellado de los extremos (Weller *et al.*, 2002; Pitcher *et al.*, 2005a; de Vega, 2013). La proteína Ku bacteriana se

ha estudiado en miembros de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium* y no se han hallado funciones adicionales distintas a las anteriormente descritas (Weller *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2010; Zhu y Shuman, 2010; de Vega, 2013). Por el contrario, en el dominio vWA de la proteína Ku humana se ha identificado recientemente una actividad AP-liasa importante en la eliminación de sitios AP próximos a los extremos del DNA, lo cual indica que esta proteína tiene un papel significativo en la “limpieza” de los extremos previa a la unión de estos en la ruta de NHEJ (Roberts *et al.*, 2010; Strande *et al.*, 2012).

3.3. La Ligasa D bacteriana

La LigD es una proteína multifuncional normalmente compuesta por un dominio polimerasa (PolDom), un dominio ligasa (LigDom) y un dominio fosfoesterasa (PEDom). La organización de los dominios de la LigD varía según la especie bacteriana, pudiendo incluso estar ausente alguno de los dominios funcionales, como ocurre en la LigD de *B. subtilis* (*BsuLigD*) que posee únicamente los dominios ligasa y polimerasa (figura 5). La LigD es reclutada a la DSB por Ku, y lleva a cabo la sinapsis y, en caso necesario, el posterior procesamiento de los extremos gracias a la actividad nucleolítica. Su actividad de polimerización le permite el relleno de los *gaps* que puedan surgir durante la sinapsis, y finalmente su actividad ligasa sella los *nicks* resultantes (Della *et al.*, 2004; Pitcher *et al.*, 2007a; Shuman y Glickman, 2007).

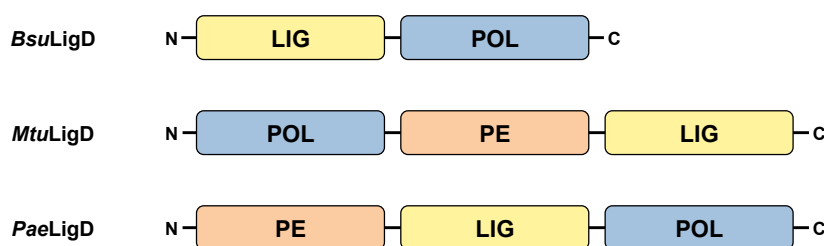


Figura 5. Organización de las distintas actividades enzimáticas de las LigDs de *B. subtilis* (*BsuLigD*), *M. tuberculosis* (*MtuLigD*) y *P. aeruginosa* (*PaeLigD*). Los dominios polimerasa (POL), ligasa (LIG) y fosfoesterasa (PE) se representan en azul, amarillo y naranja, respectivamente [adaptado de (de Vega, 2013)].

Algunas bacterias, tales como *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* o *Agrobacterium tumefaciens*, poseen otra DNA ligasa dependiente de ATP que parece estar implicada en una ruta minoritaria de NHEJ dependiente de Ku: la LigC. Esta DNA ligasa es similar al LigDom de la LigD, aunque carece de PolDom y PEDom. Se ha descrito que esta DNA ligasa adicional funciona como un mecanismo de

backup cuando la LigD no está disponible (Gong *et al.*, 2004, 2005; Zhu y Shuman, 2007; Bhattarai *et al.*, 2014).

3.3.1. El dominio polimerasa de las LigD procariotas (PolDom)

Las características enzimológicas del PolDom de las LigDs procarióticas fueron determinadas gracias al estudio bioquímico de las LigDs de *M. tuberculosis* y *P. aeruginosa* (Zhu *et al.*, 2006; Pitcher *et al.*, 2007b; Brissett *et al.*, 2011). El PolDom es una polimerasa única, capaz de reconocer y elongar una amplia variedad de sustratos de DNA (Della *et al.*, 2004; Zhu y Shuman, 2005a; Yakovleva y Shuman, 2006; Pitcher *et al.*, 2007b). Sin embargo, la incorporación de nucleótidos que lleva a cabo el PolDom es más lenta e infiel que la de las DNA polimerasas replicativas. Posee actividad transferasa terminal tanto en sustratos de ssDNA como en dsDNAs romos. Además, puede extender moléculas de dsDNA 3'-recesivas y rellenar moléculas de dsDNA con *gaps* de manera dependiente del molde. Por otro lado, el PolDom incorpora y extiende eficientemente nucleótidos frente a 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8oxodG). Por último, esta polimerasa es capaz de dislocar y realinear la cadena molde permitiendo de esa manera la extensión del *primer* mediante la adición de nucleótidos complementarios a aquellos del molde que se encuentran en posición distal al extremo del *primer*, generando deleciones y sustituciones de base [revisado en (Pitcher *et al.*, 2007a)].

El PolDom posee una estructura globular monomérica y se clasifica como un miembro divergente de la superfamilia AEP (primasas de arqueas y eucariotas) (Koonin *et al.*, 2000; Aravind y Koonin, 2001; Weller y Doherty, 2001; Iyer *et al.*, 2005), a diferencia de las polimerasas de la vía NHEJ en eucariotas, tales como Pol μ , Pol λ , y TdT, agrupadas en la familia X (García-Díaz *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2007). El PolDom posee los motivos catalíticos I, II y III, presentes en las AEP (Koonin *et al.*, 2000; Weller y Doherty, 2001). Mientras que los motivos I y III contienen los residuos conservados de aspártico implicados en la coordinación del catión divalente, el motivo II posee los residuos de interacción con el nucleótido entrante (Koonin *et al.*, 2000). Ambas familias de polimerasas, AEP y X, aunque son estructuralmente distintas, poseen en común la tríada de aspárticos de unión de metal (Pitcher *et al.*, 2007b).

Además de la amplia variedad de actividades polimerasa, el PolDom posee otras características requeridas en el procesamiento de extremos. El principal determinante de la unión específica al DNA es la presencia de un fosfato en 5' en moléculas protuberantes o con un *gap*. El reconocimiento de este fosfato estimula la actividad polimerasa y la selección de nucleótido (Pitcher *et al.*, 2007b; de Vega, 2013). Las polimerasas eucarióticas de NHEJ Pol μ y Pol λ poseen esta misma capacidad de reconocer

un fosfato en 5', aunque en su caso lo hacen a través de un motivo Hélice-giro-Hélice, ausente en el PolDom [revisado en (Pitcher *et al.*, 2007a)].

La actividad polimerasa del dominio PolDom de las LigDs bacterianas es óptima en presencia de Mn^{2+} (Zhu y Shuman, 2005a; de Vega, 2013). Esta polimerasa incorpora preferentemente ribonucleótidos (NTPs) frente a desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Della *et al.*, 2004; Zhu y Shuman, 2005a; Yakovleva y Shuman, 2006; Pitcher *et al.*, 2007b; de Vega, 2013). Esta preferencia en la inserción de NTPs y la ausencia de especificidad en el reconocimiento del 2' reflejan la plasticidad catalítica de la enzima, que se mantiene en otras DNA polimerasas del NHEJ eucariotas como Pol μ (Nick McElhinny y Ramsden, 2003). En ambos casos, la inserción preferente de NTPs puede ser beneficiosa en momentos del ciclo celular en los que los niveles de dNTPs sean bajos [revisado en (Pitcher *et al.*, 2007a)]. Sin embargo, su actividad polimerasa disminuye progresivamente tras la incorporación de cada NTP (Zhu y Shuman, 2005a, 2005b; de Vega, 2013).

Estudios tanto *in vitro* como estructurales llevados a cabo con el PolDom de la LigD de *M. tuberculosis* han puesto de manifiesto que este dominio media la sinapsis entre dos extremos de DNA no complementarios. Dicha sinapsis puede ser llevada a cabo gracias a la plasticidad de su centro activo que puede ser consecuencia del limitado número de contactos entre la enzima y los extremos 3', posibilitando el apareamiento de microhomologías, y permitiendo desapareamientos e incluso extremos 3' con estructuras tipo *hairpin*. En la figura 6 se puede observar la estructura cristalográfica de dos complejos binarios entre el PolDom de *M. tuberculosis* (*MtuPolDom*) y un DNA 5'-recesivo (Brissett *et al.*, 2007).

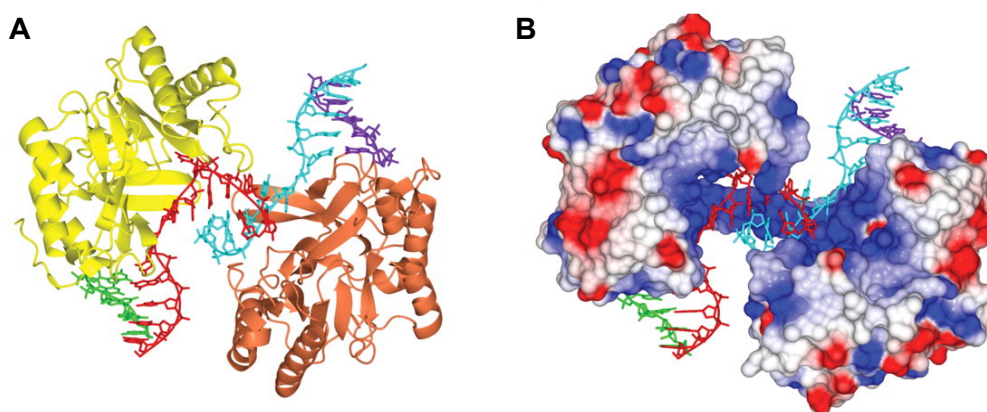


Figura 6. Estructura cristalográfica del complejo sináptico DNA-*MtuPolDom*. (A) Estructura tridimensional de dos complejos binarios *MtuPolDom*-DNA. Los polipéptidos se representan con distintos colores (en amarillo y naranja) así como cada DNA (verde-rojo y morado-cian). (B) Potencial electrostático de superficie de los dos monómeros de PolDom. Se puede observar la simetría del complejo sináptico y un atrio cargado positivamente (superficie azul) donde descansan los dos extremos 3' de la sinapsis [adaptado de (Brissett *et al.*, 2007)].

3.3.2. El dominio ligasa de las LigD procariotas (LigDom)

Las DNA ligasas son las enzimas que unen un extremo 3'-OH y un 5'-P adyacentes mediante la formación de un enlace fosfodiéster, siendo esenciales en el mantenimiento del genoma. La reacción que llevan a cabo estas enzimas ocurre en tres etapas que, en rasgos generales, son las siguientes: (i) la ligasa forma un complejo enzima-adenilato con el AMP procedente de una molécula de ATP o NAD⁺, en función de la familia a la que pertenezca la enzima; (ii) el complejo reconoce el extremo 5'-P del *nick* que ha de sellarse, transfiriendo posteriormente el AMP a dicho extremo y formando un complejo DNA-adenilato y (iii) este complejo es atacado nucleofílicamente por el extremo 3'-OH adyacente formándose el enlace fosfodiéster entre este y el extremo 5'-P con la liberación de AMP (figura 7). Estas tres etapas requieren de la presencia de un catión divalente como cofactor (Shuman, 2009).

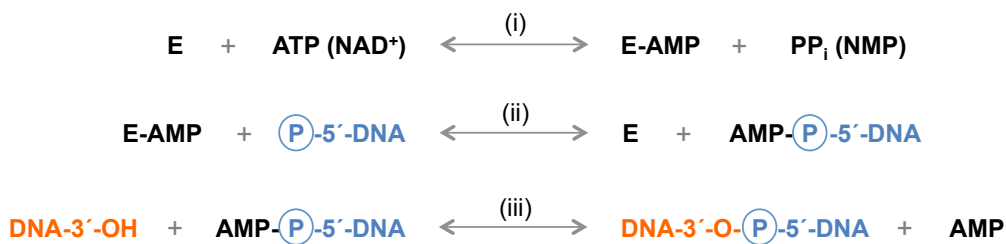


Figura 7. Mecanismo químico de las DNA ligasas. La ligación ocurre en tres etapas. (i) La ligasa (E) se adenila usando ATP o NAD⁺, formándose un complejo enzima-adenilato (E-AMP) y liberándose PP_i o NMP. (ii) El AMP se transfiere al extremo 5'-P de una molécula de DNA, formándose el complejo DNA-adenilato (AMP-P-5'-DNA). (iii) Se forma el enlace fosfodiéster con la liberación de un AMP [modificado de (Lohman *et al.*, 2011)].

Existen dos familias de DNA-ligasas, en función del sustrato requerido para la formación del complejo ligasa-adenilato: las ligasas dependientes de ATP y las ligasas dependientes de NAD⁺. La mayoría de los organismos poseen varias ligasas que funcionan en la replicación del DNA, o que están especializadas en alguna vía de reparación (Shuman, 2009). En eucariotas, así como en arqueas y en virus, todas las ligasas identificadas son ATP-dependientes. Aunque todas las bacterias poseen ligasas NAD⁺-dependientes como la LigA que es la responsable de la ligación de los fragmentos de Okazaki durante la replicación del DNA [revisado (Pitcher *et al.*, 2007a)], algunas bacterias tienen, además, DNA ligasas adicionales, entre las que se encuentra la actividad ligasa perteneciente a la enzima LigD. Esta actividad se encuentra en el dominio ligasa (LigDom) y se trata de una DNA ligasa dependiente de ATP. El estudio de la estructura cristalográfica del LigDom de la LigD de *M. tuberculosis* ha permitido

conocer su organización bimodular constituida por un dominio nucleotidiltransferasa que une AMP, en la región N-terminal, y un dominio OB C-terminal (Akey *et al.*, 2006).

Las ligasas ATP-dependientes de la NHEJ procariota requieren la presencia de un NMP en el extremo 3'-OH para llevar a cabo el sellado eficiente de los extremos. Sin embargo, su actividad ligasa se inhibe cuando hay segundo NMP en la penúltima posición de la cadena que contiene el extremo 3'-OH (Zhu y Shuman, 2008; Shuman, 2009). En este sentido, se ha especulado que este tipo de ligasas son incapaces de distorsionar el extremo 3'-OH del DNA a la conformación A como está descrito que lo hacen otras DNA ligasas dependientes de ATP, que no discriminan entre DNA y RNA en la cadena 3'-OH (Shuman, 2009). Esta distorsión no sería necesaria con un 3'-monorribonucleótido, hecho que facilita la reacción de ligación que llevan a cabo las LigDs bacterianas.

3.3.3. El dominio fosfoesterasa de las LigD procariotas (PEDom)

Algunas LigDs, tales como las de *M. tuberculosis* y *P. aeruginosa*, poseen además de los dominios ligasa y polimerasa, un dominio fosfoesterasa (PEDom). El PEDom posee las actividades enzimáticas 3'-fosfodiesterasa y 3'-fosfatasa, ambas dependientes de Mn^{2+} (Pitcher *et al.*, 2007a; Shuman y Glickman, 2007). La actividad 3'-fosfodiesterasa liberaría mononucleósidos generando un extremo 3'-P, mientras que la 3'-fosfatasa eliminaría el grupo 3'-P para dar lugar a un extremo 3'-OH que posteriormente podría ser ligado a un extremo 5'-P (Zhu y Shuman, 2006). Esta actividad permitiría procesar los extremos 3' desapareados que se originan tras la sinapsis de dos extremos del DNA antes de su elongación y/o posterior ligación. Este dominio no está presente en todas las LigD bacterianas, como es el caso de la LigD de *B. subtilis*, por lo que se ha propuesto que otras proteínas deberían intervenir para procesar los extremos, probablemente reclutadas por la proteína Ku de *B. subtilis* (BsuKu) (de Vega, 2013).

Teniendo en cuenta las funciones de Ku anteriormente explicadas y los distintos dominios de la LigD, resulta sencillo comprender el funcionamiento de la ruta de NHEJ en bacterias. En la figura 8 se esquematiza esta ruta en procariotas, en la cual Ku reconoce y alinea los extremos del DNA y recluta a la LigD que, tras el reconocimiento de los grupos 5'-P produce la sinapsis de dichos extremos y, a través de sus actividades nucleasa, polimerasa y ligasa lleva a cabo la unión final de los mismos (Pitcher *et al.*, 2007a).

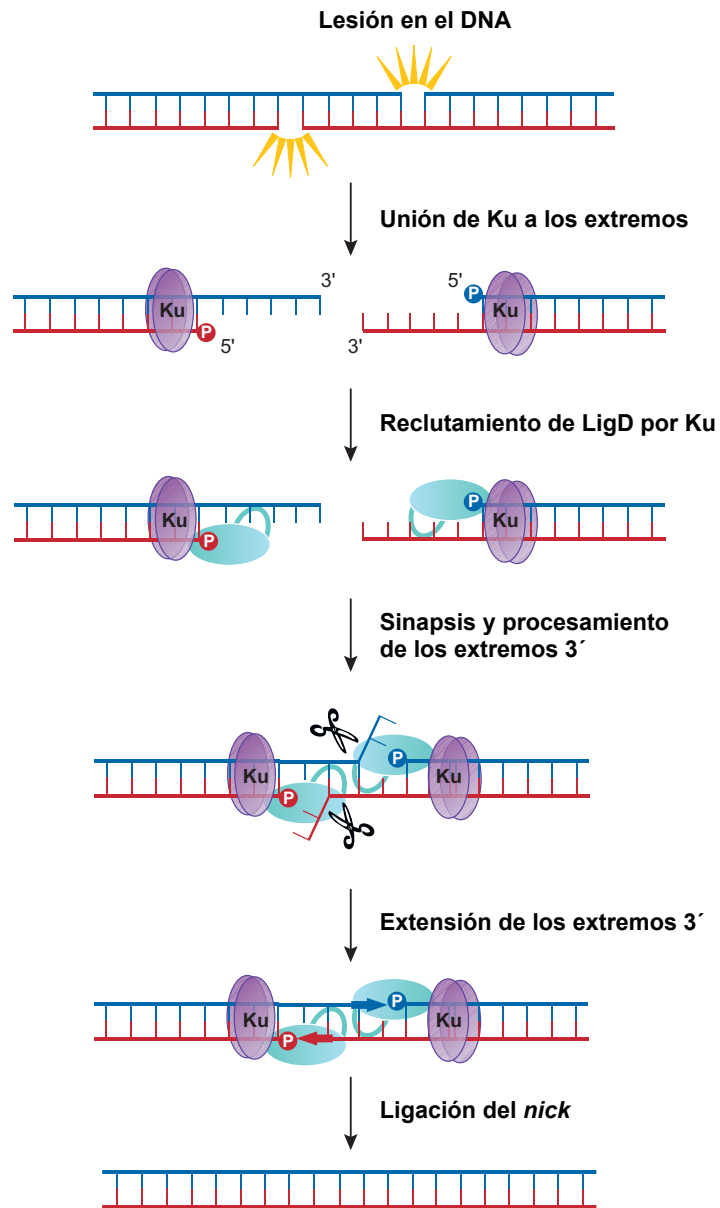


Figura 8. NHEJ en procariotas. Cuando se produce una DSB en el DNA, la proteína Ku se une a los extremos del DNA roto y recluta a la LigD, que reconoce específicamente los extremos 5'-P. Esta lleva a cabo el procesamiento (actividad nucleasa) y la extensión de los extremos (actividad polimerasa) tras lo cual los liga (actividad ligasa) en una reacción infiel [adaptado de (Pitcher *et al.*, 2007a)].

4. Síntesis a través de lesión (TLS)

La presencia de lesiones no reparadas en el DNA supone un desafío para los procesos de transcripción y replicación. Aunque no todas las lesiones bloquean la acción de las DNA polimerasas replicativas, muchas sí lo hacen, por lo que las células han adoptado un sistema que permite la tolerancia a los daños que puede sufrir el genoma: la TLS [revisado en (Sale *et al.*, 2012; Fuchs y Fujii, 2013)]. En este proceso, la DNA polimerasa replicativa es desplazada de manera transitoria por otra DNA polimerasa especializada que puede incorporar nucleótidos frente a la lesión (figura 9).

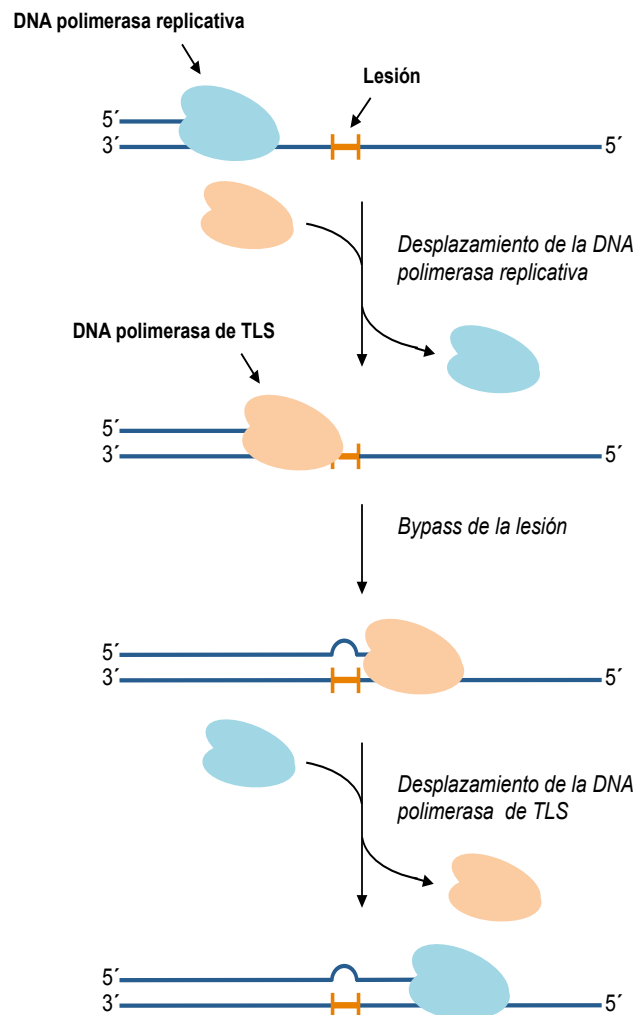


Figura 9. Mecanismo básico de la síntesis a través de lesión (TLS). La TLS es un proceso con varias etapas. Frente a un daño en el DNA (en naranja), la polimerasa replicativa se bloquea. Es entonces cuando una polimerasa especializada es reclutada al extremo 3' del *primer* e introduce un nucleótido (correcto o incorrecto) frente a la lesión. Puesto que se trata de polimerasas distributivas, tras la síntesis de un tramo corto de DNA, la polimerasa de TLS se disocia, tras lo cual es reemplazada rápidamente por la polimerasa replicativa, que continúa con la síntesis [adaptado de (Sale *et al.*, 2012)].

La mayoría de las DNA polimerasas que intervienen en la ruta de TLS se agrupan en la familia Y, y se encuentran presentes en todos los reinos de la vida (Yang y Woodgate, 2007). Las DNA polimerasas de la familia Y tienen una serie de características comunes: se expresan en presencia de agentes que causan daños en el DNA, son distributivas y son propensas a introducir errores, aunque no siempre sean mutagénicas (Kunkel, 2004).

En eucariotas, las DNA polimerasas que intervienen en TLS son Pol η , Pol ι , Pol κ y Rev1 que pertenecen a la familia Y, y Pol ζ , de la familia B (Prakash *et al.*, 2005). En *E. coli* las DNA polimerasas de TLS son Pol IV y Pol V, ambas pertenecientes a la familia Y (Reuven *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1999; Sale *et al.*, 2012), y son homólogas a las proteínas PolY1 y PolY2 de *B. subtilis* (Sung *et al.*, 2003), que protegen el DNA de la bacteria en esporulación (Rivas-Castillo *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que la Pol I de *B. subtilis*, que pertenece a la familia A, interviene junto con PolY1 y PolY2 en la ruta de TLS, de modo que Pol I se encarga de continuar con la síntesis de DNA, tras la incorporación del nucleótido frente al daño por parte de las Pol Y, hasta que un replisoma funcional reanude la replicación (Duigou *et al.*, 2005).

5. *Bacillus subtilis* como modelo para el estudio de la NHEJ

B. subtilis es una bacteria Gram-positiva con forma bacilar, no patógena, que crece generalmente en suelos, asociada al sistema radicular de plantas y con materia vegetal en descomposición (Siala y Gray, 1974; Earl *et al.*, 2008). Como todas las especies que pertenecen al género *Bacillus*, *B. subtilis* puede formar endosporas altamente resistentes en respuesta a la privación de nutrientes o ante otros factores de estrés ambiental mediante un proceso conocido como esporulación [revisado en (Earl *et al.*, 2008; Higgins y Dworkin, 2012; Tan y Ramamurthi, 2014)]. La esporulación implica la protección del genoma bacteriano en un lugar seguro, la espora, hasta que las condiciones ambientales mejoren, momento en el que la espora germina y vuelve al estado vegetativo. La figura 10 muestra un esquema del proceso de la esporulación de *B. subtilis*: cuando los nutrientes escasean, la célula detiene su crecimiento y sufre una división asimétrica cerca de uno de los polos celulares, que resulta en la formación de una célula de menor tamaño, la preespora, y una de mayor tamaño, la célula madre, separadas por un septo. A continuación, la célula madre envuelve a la preespora, proceso que está coordinado con la formación de una serie de capas protectoras alrededor de la espora: las membranas externa e interna, el córtex y la cubierta, que quedan formadas en la esporulación tardía. Finalmente, se produce la lisis de la célula madre, y la espora es liberada al medio (Higgins y Dworkin, 2012; McKenney *et al.*, 2012).

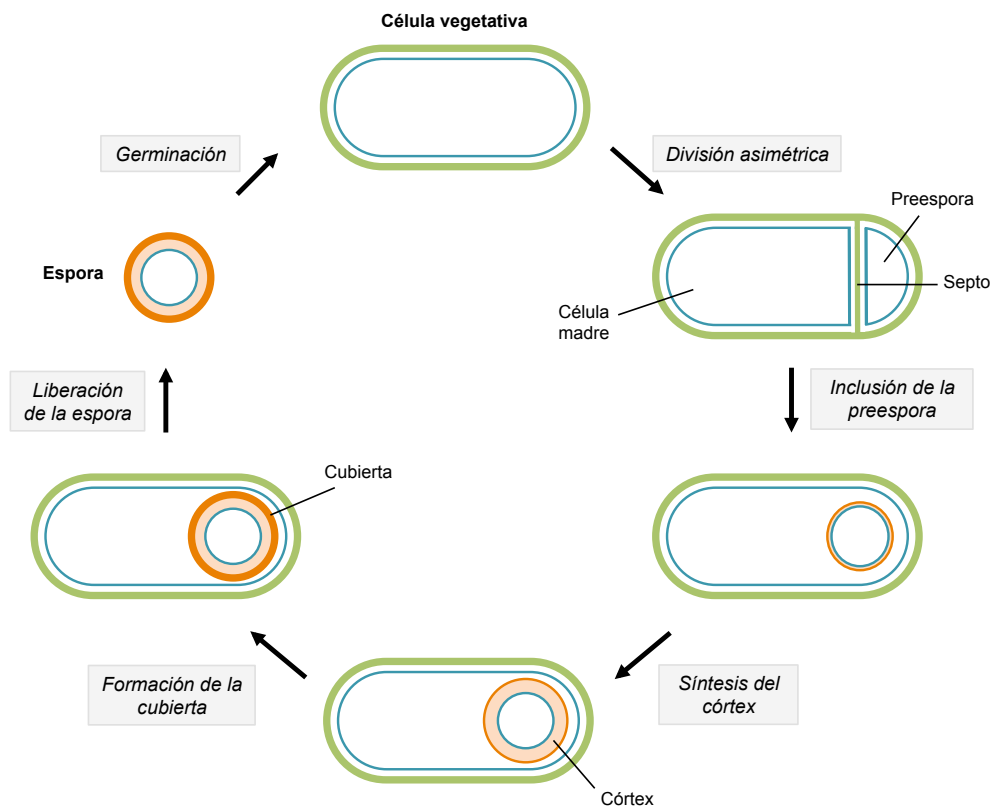


Figura 10. Esporulación de *B. subtilis*. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables la célula sufre una división asimétrica, formándose la célula madre y la preespora, ambas separadas por el septo. A continuación la célula envuelve la preespora tras lo cual se sintetizan el córtex y la cubierta. La célula madre lisa para liberar la espora al medio, y esta germinará cuando las condiciones ambientales se lo permitan [Modificado de (Higgins y Dworkin, 2012)].

La formación de la endospora implica la expresión de numerosos genes, bajo el control de los factores de la RNA polimerasa σ^G y σ^F , y las proteínas de unión al DNA RsfA y SpoVT, genes necesarios no solo para la formación de la espora sino también en el proceso de germinación (Wang *et al.*, 2006).

El DNA se encuentra localizado en un compartimento interno de la espora latente, y esta posee un amplio arsenal de mecanismos para protegerlo, entre los que destacan los quelatos de calcio y ácido dipiconílico, que protegen de la desecación, y las proteínas SASP-tipo- α/β (proteínas ácidas, pequeñas y solubles), que se unen al DNA, que pasa a su conformación A, más empaquetada, quedando así protegido de distintos agentes que podrían dañarlo (Setlow y Setlow, 1995; Nicholson *et al.*, 2000; Setlow, 2006). Sin embargo, y debido a que la espora de *B. subtilis* puede pasar largos períodos de latencia, los daños en el DNA pueden acumularse y poner en peligro la supervivencia de la célula. Tal

y como se ha mencionado previamente, las lesiones más letales para la célula, las DSBs, son reparadas mayoritariamente mediante HR o NHEJ. En la HR, RecN junto con la PNPasa (que tiene actividad 3'-exonucleasa sobre ssDNA y actividad polimerasa) activan la respuesta al daño (Ayora *et al.*, 2011; Lenhart *et al.*, 2012; Kreuzer, 2013), tras lo cual se lleva a cabo la resección de los extremos en sentido 5'-3'. Este proceso requiere la actividad del complejo AddAB (homólogo a RecBCD de *E. coli* o AdnAB de *M. tuberculosis*) o RecJ junto con una DNA helicasa (RecQ o RecS) y SsbA (Dillingham y Kowalczykowski, 2008; Lenhart *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2013). Sin embargo, y puesto que en la fase estacionaria solo hay una copia del cromosoma bacteriano disponible, la reparación de las DSBs recae en el sistema de NHEJ (Shuman y Glickman, 2007), aunque no está claro el mecanismo por el cual se bloquea la HR y se activa la NHEJ. El sistema de NHEJ de *B. subtilis* está conformado por las proteínas *BsuKu* y *BsuLigD*. Los genes que codifican estas proteínas, llamados *ykoV* (*BsuKu*) e *ykoU* (*BsuLigD*), se expresan durante la formación de la espora. Estos genes se encuentran regulados bajo el control del factor σ^G y SpoVT (Wang *et al.*, 2006). En estudios previos se mostró cómo la delección de estos genes provocaba la sensibilización de las células de *B. subtilis* a radiación ionizante en la fase estacionaria (Weller *et al.*, 2002) y de las esporas ante distintos tratamientos que causan DSBs en el DNA (Wang *et al.*, 2006; Moeller *et al.*, 2007; Lenhart *et al.*, 2012).

Por otra parte, mediante el análisis *in vitro* de las propiedades funcionales de las proteínas purificadas *BsuKu* y *BsuLigD* se mostró que las características bioquímicas de estas estaban de acuerdo con la función propuesta para ellas en NHEJ. Así, *BsuLigD* posee una actividad de polimerización con inserción preferente de NTPs; reconoce específicamente un grupo fosfato en el extremo 5' de la cadena *downstream* del DNA; posee una actividad ligasa dependiente de ATP; es capaz de llevar a cabo reordenamientos tanto de la cadena *primer* como del molde durante la elongación de extremos 3' desapareados y, finalmente, es reclutada al DNA por *BsuKu*, que estimula tanto las actividades de polimerización como de ligación de la enzima, permitiéndole actuar sobre realineamientos inestables (de Vega, 2013).

Objetivos

Las proteínas que conforman el sistema de NHEJ en procariotas han sido ampliamente estudiadas en especies de los géneros *Pseudomonas* y *Mycobacterium*. Asimismo, el trabajo recientemente publicado por de Vega (2013) muestra la caracterización de este sistema de reparación en la bacteria *B. subtilis*, el cual está constituido por las proteínas *BsuKu* y *BsuLigD*. En la presente Tesis se plantea profundizar en el estudio de las proteínas *BsuKu* y *BsuLigD*, así como explorar la posibilidad de la existencia de nuevas actividades enzimáticas no descritas previamente en estas, mediante el abordaje de los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio de la presencia de una actividad AP/5'-dRP liasa en proteínas Ku procariotas, usando como modelo el sistema de *B. subtilis* (*BsuKu*).
2. Análisis de la manera en que actúan la actividad AP-liasa de *BsuKu* y las actividades polimerasa y ligasa de *BsuLigD* en reacciones que simulan la NHEJ *in vitro*.
3. Exploración de la presencia de nuevas actividades enzimáticas adicionales en la proteína LigD de *B. subtilis* (*BsuLigD*).
 - a. Actividad 5'-dRP liasa en intermediarios de la ruta de BER con *gaps* flanqueados por extremos 5'-dRP.
 - b. Actividad AP-liasa clásica.
4. Estudio de la capacidad de *BsuLigD* de reparar un intermediario de la vía BER *in vitro* a través de sus actividades 5'-dRP liasa, polimerasa y ligasa.
5. Determinación de la conservación en otras especies bacterianas de las actividades enzimáticas identificadas en *BsuKu* y *BsuLigD*.
6. Estudio de la capacidad de *BsuLigD* de incorporar y ligar nucleótidos frente a lesiones en la cadena molde en moléculas de DNA con *gaps* de un nucleótido.

Materiales y Métodos

1. MATERIALES

1.1. Nucleótidos y proteínas

Los nucleótidos no marcados radiactivamente se obtuvieron de GE Healthcare. Los nucleótidos marcados [γ - ^{32}P] ATP (3.000 Ci/mmol) y [α - ^{32}P]-Cordicepina 5'-trifosfato (5.000 Ci/mmol) se compraron a Perkin Elmer. Las endonucleasas de restricción *AatII*, *HindIII*, *EcoRI* y *SmaI*, la polinucleótido kinasa (PNK) de T4, la transferasa terminal humana (TdT), la endonucleasa *DpnI*, la AP-endonucleasa 1 humana (*hAPE1*), la uracil DNA glicosilasa (UDG) de *E. coli*, la EndoIII de *E. coli*, la *nickasa* Nt.BStnBI y la DNA ligasa de T4 se obtuvieron de New England Biolabs. La DNA polimerasa λ (Pol λ) fue generosamente donada por el Dr. Luis Blanco (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid). La trombina fue adquirida en Novagen. Las proteínas Ku y LigD de *B. subtilis* (*BsuKu* y *BsuLigD*) se purificaron como está descrito (de Vega, 2013).

1.2. Oligonucleótidos y sustratos de DNA

La tabla 1 muestra el nombre y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos *in vitro* realizados en la presente Tesis Doctoral. Los oligonucleótidos se marcaron en su extremo 3' con [α - ^{32}P]-Cordicepina (3'-dATP) y la enzima TdT o en su extremo 5' con [γ - ^{32}P] ATP y la PNK de T4, según se indica en cada experimento.

Tabla 1. Oligonucleótidos de DNA empleados en los experimentos *in vitro*.

NOMBRE	SECUENCIA
pU	5'- CTGCAGCTGATGCGC(U)GTACGGATCCCCGGGTAC
pG	5'- GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG
H	5'- GTACCCGGGGATCCGTAC(H)GCGCATCAGCTGCAG
SU	5'-GCTTCCGGTGATCCGTTCCGTGAGGTCTCGACATGCGC(U)GTACG ATTGCGCTAGTACTGGCCGACGTTTGTACTGT
SU-compl	5'biotin-ACAGTGTACAAACGTCGGCCAGTGTACTAGCGCAATCGTA CAGCGCATGTTCGAGACCTCACGGAACGGATCACCGGAAGC-biotin- TEG
sp1	5'- GATCACAGTGAGTAC
p-Dws	5'- (p)AACGACGGCCAGT
sp1c+13	5'- ACTGGCCGTCGTTGTACTCACTGTGATC
sp1CGG	5'- GATCACAGTGAGTACCGG
sp1c	5'- GTACTCACTGTGATC

sp1GCC	5'- GATCACAGTGAGTACGCC
sp1TCC	5'- GATCACAGTGAGTACTCC
sp1ACC	5'- GATCACAGTGAGTACACC
sp1c(p)	5'- (p)GTACTCACTGTGATC
U2	5'- T(U)AGACTGATCACAGTGAGTAC
U4	5'- TCA(U)ACTGATCACAGTGAGTAC
U19	5'- GATCACAGTGAGTACTCA(U)ACT
U21	5'- GATCACAGTGAGTACTCAGA(U)T
U4c	5'- AGTCTGATCACAGTGAGTAC
sp1cddC	5'- GTACTCACTGTGAT(ddC)
sp1c-1	5'- GTACTCACTGTGAT
comp-sp1c/U4a	5'- CCGTACTGCGCATCAGCTGATCACAGTGAGTAC
Ph-U1	5'- (p)(U)AGCTGATGCGCAGTACGG
comp-sp1/H	5'- CTGCAGCTGATGCGCGTACTCACTGTGATC
HU	5'- GTACCCGGGGATCCGTAC(U)GCGCATCAGCTGCAG
U4al	5'- CTG(U)AGCTGATGCGCAGTACGG
pnickP	5'- (p)AACGACGGCCAGT
comp-U4al+4	5'- CCGTACTGCGCATCAGCTGCAGCAAG
U4al-CUC	5'- CTC(U)CGCTGATGCGCAGTACGG
U4al-GUG	5'- CTG(U)GGCTGATGCGCAGTACGG
U4al-TUT	5'- CTT(U)TGCTGATGCGCAGTACGG
comp-GGG	5'- CCGTACTGCGCATCAGCGGGAGCAAG
comp-CCC	5'- CCGTACTGCGCATCAGCCCCAGCAAG
comp-AAA	5'- CCGTACTGCGCATCAGCAAAAAGCAAG
U4al-CUG	5'- CTC(U)GGCTGATGCGCAGTACGG
comp-GCC-3' ddC	5'- CCGTACTGCGCATCAGCGCCAGCAA(ddC)
44mer	5'- CCGTACTGCGCATCAGCCCCAGCAAGGGCTGATGCGCAGTACGG
sp1CTTGCTG	5'- GATCACAGTGAGTACCTTGCTG
T4	5'- GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG
hy-C	5'- GTACCCGGGGATCCGTAC(OH-C)GCGCATCAGCTGCAG
T-gly	5'- GTACCCGGGGATCCGTAC(Tgly)GCGCATCAGCTGCAG
8oxoG2	5'- GTACCCGGGGATCCGTAA(8oxodG)GCGCATCAGCTGCAG
Cy5-pber	5'- (Cy5)CTGCAGCTGATGCGC
5pGpber Dws	5'- (p)GTACGGATCCCCGGGTAC
5pTpber Dws	5'- (p)TTACGGATCCCCGGGTAC

(U)=2'-desoxiuridina; (H)=Tetrahidrofurano (THF); (ddC)=2',3'-dideoxiCMP; (p)=fostato; (OH-C)=5-hidroxi-2'-desoxicitidina; (Tgly)=5,6-dihidro-5,6-dihidroxi-2'-desoxitimidina; (8oxodG)=7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina; (Cy5)=fluoróforo Cy5.

pU se hibridó con pG para obtener un sustrato romo. SU se hibridó con SU-compl para obtener un dsDNA de 80 pb de longitud. U4 se hibridó con sp1cddC para dar lugar a una estructura 5'-protuberante. U4c se hibridó con sp1c o sp1c-1 para formar dos estructuras diferentes con un extremo 5'-protuberante. sp1CGG se hibridó con sp1c para generar una molécula con un extremo 3'-protuberante CGG. sp1GCC,

sp1TCC y sp1ACC se hibridaron con el oligonucleótido complementario sp1c(p) para obtener moléculas con un extremo 3'-protuberante con -GCC, -TCC y -ACC respectivamente. U2, U4, U19 y U21 se hibridaron con sp1c para generar moléculas 5'-(U2 y U4) o 3'-(U19 y U21) protuberantes. El sustrato que presenta un *nick* se consiguió hibridando los oligonucleótidos *upstream* sp1 y *downstream* p-Dws al oligonucleótido molde sp1c+13.

Para obtener un híbrido que imitase un sustrato de BER con el *gap* relleno, se hibridaron los oligonucleótidos *upstream* sp1c o sp1cddC y *downstream* Ph-U1 al oligonucleótido molde comp-sp1c/U4a. Para generar moléculas tipo *flap* se hibridaron los oligonucleótidos *upstream* sp1 y *downstream* HU (que contiene una 2'-desoxiuridina en posición 19) o H (que contiene un THF en la misma posición) al oligonucleótido molde comp-sp1/H. Para obtener un sustrato con un *flap* de 4 nucleótidos se hibridaron los oligonucleótidos *upstream* sp1c y *downstream* U4a1 con el oligonucleótido molde comp-sp1c/U4a. Para formar una molécula con un *nick* se hibridaron los oligonucleótidos *upstream* sp1 y *downstream* pnickP al oligonucleótido molde sp1c+13.

Los oligonucleótidos con una 2'-desoxiuridina próxima a 5' U4a1, U4a1-CUC, U4a1-TUT, U4a1-GUG y U4a1-CUG se hibridaron a los oligonucleótidos comp-U4a1+4, comp-GGG, comp-AAA, comp-CCC y comp-GCC-3'ddC respectivamente para dar lugar a sustratos con extremos 5'-recesivos.

El oligonucleótido sp1CTTGCTG se hibridó al oligonucleótido sp1c para dar lugar a una molécula que protuberara 7 nucleótidos en su extremo 3'.

Para obtener los híbridos con un *gap* enfrentado a distintos nucleótidos sin y con daño se hibridaron el oligonucleótido *upstream* Cy5-pber (marcado en 5' con el fluoróforo Cy5) y el oligonucleótido *downstream* 5pGpber Dws a los oligonucleótidos molde T4, hy-C, T-gly y H para dar lugar a los sustratos sin daño, con un OH-C, con un Tgly o con un THF frente al *gap*, respectivamente. Para generar el sustrato que presenta un *gap* frente a un 8oxodG se hibridaron los oligonucleótidos *upstream* Cy5-pber y *downstream* 5pTpber Dws al oligonucleótido molde 8oxoG2.

Todas las hibridaciones se hicieron en presencia de 0,2 M NaCl. En cada experimento se indican el/los híbrido/s empleados.

La tabla 2 muestra los oligonucleótidos utilizados en el clonaje de la proteína *PaeKu*, así como los oligonucleótidos diseñados para realizar la mutagénesis dirigida de *BsuKu* y *BsuLigD* y para obtener el LigDom de *BsuLigD*.

Un fragmento de DNA de 216 pb correspondiente al gen *yshC* de *B. subtilis* se amplificó por PCR utilizando como molde el DNA genómico, se marcó radiactivamente en su extremo 5' y se usó en los ensayos de retraso en gel.

El plásmido pUC19 se obtuvo de Fermentas. El plásmido pcDNA3.1 fue adquirido en Invitrogen.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en el clonaje de *PaeKu*, y en los mutantes puntuales de *BsuKu* y *BsuLigD*, y para el dominio LigDom de *BsuLigD*.

NOMBRE	SECUENCIA
PaKu-F	5'- CGCGCGGGCATATGGCGCGTGCGATCTGGAAAGG
PaKu-R	5'- GGCCGGATCCTCAGGCCTTGCGCCGGAACG
KuK138A-F	5'- GGGATAATGGGACGGCGGCCTATAACCTGC
KuK138A-R	5'- GCAGGGTATAGGCCGCCGTCCCATTATCCC
KuK241A-F	5'- GCAAAGAGTCAACGACGCGCTAGAAAATAAAGAAACG
KuK241A-R	5'- CGTTTCTTTATTTTCTAGCGCGTCGTTGACTCTTTGC
LigDK24A-F	5'- GGC GTTACGAAGTAGCATATGATGGGTACCGC
LigDK24A-R	5'- GCGGTACCCATCATATGCTACTTCGTAACGCC
LigDK189A-F	5'- GGAGAAGGAATTGTAGCGGCGAAAACAAACAGCAAATGG
LigDK189A-R	5'- CCATTGCTGTTTGTTCGCGCTACAATTCCTTCTCC
LigDK206A-F	5'- GGTCGTCCGATTGGCTCGCATATAAAAAC TTAAACAAGC
LigDK206A-R	5'- GCTTGTTTAAAGTTTTTATATGCGAGCCAATCGGACGACC
LigDK208A-F	5'- CCGATTGGCTCAAATATGCAAAC TTAAACAAGC
LigDK208A-R	5'- GCTTGTTTAAAGTTTGCATATTTGAGCCAATCGG
LigDE184A-F	5'- GGTAATAAAATATGACGGAGCAGGAATTGTAGCGAAGAAAAC
LigDE184A-R	5'- GTTTTCTTCGCTACAATTCCTGCTCCGTCATATTTTATTACC
LigDom-F	5'- CGACTCCAAACCGTAGCACCCAAAGCTCC
LigDom-R	5'- CGACTCCAAACCGTAGCACCCAAAGCTCC

F=Forward; R=Reverse.

1.3. Construcción de las cepas de *B. subtilis* que expresan el mutante E184A

El gen que codifica *BsuLigD* (*ykoU*), que contiene la mutación E184A, se amplificó del plásmido pET28a-*ykoU*-E184A con un *primer* 5' que contiene un sitio de restricción para *XmaI* y con un *primer* 3' que contiene un sitio de restricción para *EcoRV* y para *XbaI*. El fragmento amplificado se clonó en los sitios *XmaI-XbaI* del plásmido pUC18. El gen *ykoT*, en posición *downstream* a *ykoU*, se amplificó del cromosoma de *B. subtilis* con un *primer* 5' que contenía un sitio de restricción para *XbaI* y *SacII*, y un *primer* 3' con un sitio de restricción para *PstI*. Este gen se clonó en el plásmido anteriormente citado. El gen *neo* de resistencia a neomicina (NeoR) derivado del plásmido pUB110 (Maciag *et al.*, 1988) se amplificó con un *primer* 5' que contiene un sitio de restricción para *EcoRV* y un *primer* 3' con un sitio de restricción para *SacII*. El gen *neo* digerido con *EcoRV-SacII* se clonó entre los genes *ykoU* (o *ykoUE184A*) e *ykoT* en el plásmido pUC18 anteriormente citado. Los plásmidos con el operón *ykoU neo ykoT* o *ykoUE184A neo ykoT* se usaron para transformar células competentes de *B. subtilis* (cepa BG214), como está descrito (Maciag *et al.*, 1988). Los transformantes resistentes a neomicina se secuenciaron para seleccionar aquellos con el gen *neo* cromosómico entre los genes *wild-type ykoU* e *ykoT* (cepa BC1000) o entre *ykoUE184A* e

ykoT (cepa BC1001) (ver tabla 3). El DNA GP1502 se usó para transformar la cepa BC1000 para dar lugar a la cepa BC1002. El plásmido con el operón *ykoUE184A neo ykoT* se usó para transformar la cepa 1002 (Δnfo) de *B. subtilis* para obtener la cepa BC1003 (tabla 3). Estas construcciones fueron realizadas por la Dra. Begoña Carrasco, del laboratorio del Dr. Juan Carlos Alonso (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

Tabla 3. Cepas bacterianas usadas.

CEPA	GEN	GENOTIPO	FUENTE/REFERENCIA
168	<i>wt</i>	<i>trpC2</i>	Cepa de laboratorio
BFS1845	LigD	+ <i>ykoU:erm</i> ^a	(Weller <i>et al.</i> , 2002)
GP1502	Nfo	+ $\Delta nfo:cat$ ^b	(Gunka <i>et al.</i> , 2012)
GP1502L	LigD Nfo	+ <i>ykoU:erm</i> $\Delta nfo:cat$ ^c	BFS1845 transformado con DNA de GP1502
BG214	<i>wt</i>	<i>trpCE metA5 amyE1 ytsJ1 rsbV37 xre1 xkdA1 att</i> ^{SPβ} <i>att</i> ^{ICEBs1}	Cepa de laboratorio
BC1000	<i>wt</i>	+ <i>neo</i> ^d	(de Ory <i>et al.</i> , 2016)
BC1001	LigDE184A	+ <i>ykoUE184A neo</i> ^d	(de Ory <i>et al.</i> , 2016)
BC1002	Nfo	+ $\Delta nfo:cat$ ^b <i>neo</i> ^d	(de Ory <i>et al.</i> , 2016)
BC1003	LigDE184A Nfo	+ <i>ykoUE184Aneo</i> ^d $\Delta nfo:cat$ ^b	(de Ory <i>et al.</i> , 2016)

^aResistencia a eritromicina (Erm^R, 2 μ g/ml), ^bResistencia a cloranfenicol (Cam^R, 5 μ g/ml), ^cErm^R (2 μ g/ml) y Cam^R (5 μ g/ml),

^dResistencia a neomicina (Neo^R, 5 μ g/ml).

1.4. Preparación de las esporas

Todas las cepas bacterianas utilizadas en la presente Tesis doctoral son derivadas de la cepa 168 y aparecen recogidas en la tabla 3. Las esporas se obtuvieron mediante el cultivo en condiciones de aireación fuerte en medio líquido de esporulación de Schaeffer doblemente concentrado (Schaeffer *et al.*, 1965), tras lo cual las esporas se purificaron y conservaron como está descrito (Nicholson y Setlow, 1990; Moeller *et al.*, 2007; Vlašić *et al.*, 2014). Según el caso, se añadió al medio cloranfenicol (5 μ g/ml), neomicina (5 μ g/ml) o eritromicina (2 μ g/ml). La preparación de las esporas consistió en extractos de esporas individuales sin agrupaciones detectables y libres (99%) de células vegetativas, esporas germinadas y restos celulares, lo cual se comprobó por microscopía en contraste de fase (Nicholson y Setlow, 1990; Moeller *et al.*, 2007; Vlašić *et al.*, 2014). Las esporas purificadas se resuspendieron en 5 ml de agua destilada y se conservaron a 4°C hasta su uso. La preparación de las esporas fue realizada por nuestros colaboradores Katja Nagler, Marina Raguse y el Dr. Ralf Moeller (German Aerospace Center, Colonia, Alemania).

2. MÉTODOS

2.1. Clonaje, sobreexpresión y purificación de proteínas de *P. aeruginosa*

2.1.1. Clonaje, sobreexpresión y purificación de la proteína Ku de *P. aeruginosa* (*PaeKu*)

El gen que codifica para *PaeKu* (Aravind y Koonin, 2001) se amplificó por PCR a partir del DNA genómico de la cepa de *P. aeruginosa* PAO-1 [generosamente donado por el Dr. José Berenguer (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid)], empleando los oligonucleótidos directo y reverso PaKu-F y PaKu-R (ver tabla 2), los cuales contienen en su secuencia una diana para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El vector empleado en el clonaje fue el plásmido pET28a(+) (Novagen) para expresar la proteína fusionada a un *tag* de 6 histidinas en su extremo N-terminal, lo que permite la purificación de la misma mediante el uso de columnas de afinidad de Ni²⁺. Tanto el vector como el DNA amplificado se digirieron con las enzimas *BamHI* y *NdeI*, y el inserto fue clonado entre ambas dianas. El gen se secuenció completamente para descartar la presencia de mutaciones en su secuencia. El plásmido recombinante resultante se usó para transformar la estirpe 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; Studier, 1991). Las células transformadas con el plásmido pET-28*PaeKu* se cultivaron toda la noche en medio LB a 37°C en presencia de kanamicina. Se reinoculó medio LB con 0,1 volúmenes del cultivo de *E. coli* crecido durante la noche y se incubó en un agitador a 34°C hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0,6 unidades. Posteriormente se añadió IPTG (Sigma) a una concentración final de 0,5 mM y se continuó la incubación durante 1 hora adicional, tras la cual se añadió rifampicina (50 µg/ml) y se incubó durante 90 minutos a 30°C. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación durante 10 minutos a 6143 x g y posteriormente lisadas mediante abrasión con alúmina a 4°C. El lisado se resuspendió en tampón B [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 7 mM β-mercaptoetanol, 5% glicerol], 0,7 M NaCl, y se centrifugó durante 5 minutos a 650 x g a 4°C, para eliminar la alúmina y los restos celulares. En estas condiciones, la proteína *PaeKu* estaba en estado soluble y se sometió a una nueva centrifugación a 23430 x g durante 20 minutos, para separar el extracto soluble de las proteínas insolubles. El DNA fue precipitado con polietilénimina (PEI) al 0,3% mediante centrifugación durante 10 minutos a 23430 x g. El sobrenadante obtenido se precipitó con sulfato amónico al 65% de saturación para obtener un *pellet* de proteínas libre de PEI. Tras una centrifugación a 23430 x g durante 25 minutos, el *pellet* se resuspendió en tampón B (0,25 M NaCl). Esta fracción se pasó a través de una columna de fosfocelulosa previamente equilibrada en tampón B (con 0,25 M NaCl) y *PaeKu* fue eluida con tampón A [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 7 mM β-mercaptoetanol, 5% glicerol], 0,5 M NaCl. El eluido se pasó a través de una columna Ni-NTA (Qiagen) preequilibrada en tam-

pón A (0,3 M NaCl). La proteína unida a la columna se eluyó con 200 mM imidazol en tampón A (0,3 M NaCl). *PaeKu* se dializó frente a un tampón con 0,3 M NaCl y 50% glicerol. Se estimó un grado de pureza superior al 90% mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS.

2.1.2. Clonaje, sobreexpresión y purificación de la proteína LigD de *P. aeruginosa* (*PaeLigD*)

El gen PA2138 que codifica *PaeLigD* se sintetizó en GenScript Corporation y se clonó entre las dianas *NdeI* y *BamHI* del vector de expresión pET16b, que permite la expresión de la proteína recombinante fusionada a un *tag* de 10 histidinas en su extremo N-terminal. El plásmido recombinante pET-16*PaeLigD* se usó para transformar la estirpe de *E. coli* BL21(DE3). Las células se crecieron en medio LB a 37°C en presencia de ampicilina hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0,6 unidades. La expresión de la proteína se indujo con 0,5 mM IPTG y se incubó posteriormente durante 20 horas a 15°C, tal y como está descrito (Zhu y Shuman, 2005a). Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación durante 10 minutos a 6143 x g y posteriormente lisadas mediante abrasión con alúmina a 4°C. El lisado se resuspendió en tampón A (0,7 M NaCl) y se centrifugó durante 5 minutos a 650 x g a 4°C, para eliminar la alúmina y los restos celulares. En estas condiciones, la proteína *PaeLigD* estaba en estado soluble y se sometió a una nueva centrifugación a 23430 x g durante 20 minutos, para separar el extracto soluble de las proteínas insolubles. El extracto soluble se pasó a través de una columna Ni-NTA (Qiagen) preequilibrada en tampón A (0,7 M NaCl, 4 mM imidazol). La proteína unida a la columna se eluyó con 200 mM imidazol en tampón A (0,7 M NaCl) y posteriormente se diluyó en tampón B sin NaCl para conseguir una concentración final de 0,3 M NaCl. La muestra se pasó a través de una columna de fosfocelulosa previamente equilibrada en tampón B (0,3 M NaCl) y *PaeLigD* fue eluida con tampón B (0,4 M NaCl). Finalmente, se llevó a cabo la diálisis de la proteína frente a un tampón con 0,25 M NaCl y 50% glicerol. Se estimó un grado de pureza superior al 90% mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS.

2.2. Sobreexpresión y purificación del dominio Ligasa de *BsuLigD* (*LigDom*)

El plásmido recombinante de expresión pET28a-*ykoU* (de Vega, 2013) se usó como molde para introducir un codón stop en posición 320 (ver los oligonucleótidos directo, *LigDom-F*, y reverso, *LigDom-R*, en la tabla 2) con el kit QuickChange de mutagénesis de Stratagene para dar lugar al plásmido pET28-*LigDom*. Las células transformadas con el plásmido pET-28*LigDom* se crecieron toda la noche en medio LB a 37°C en presencia de kanamicina. Las células se diluyeron en el mismo medio y se incubaron en un agitador a 30°C hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó un valor de 0,6 unidades.

Posteriormente se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se continuó la incubación durante 2 horas más. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación durante 10 minutos a 6143 x g y posteriormente lisadas mediante abrasión con alúmina a 4°C. El lisado se resuspendió en tampón A (0,5 M NaCl) y se centrifugó durante 5 minutos a 650 x g a 4°C, para eliminar la alúmina y los restos celulares. En estas condiciones, la proteína era soluble y se sometió a una nueva centrifugación a 23430 x g durante 20 minutos para separar el extracto soluble de las proteínas insolubles. El extracto soluble se diluyó en tampón A sin sal para obtener una concentración final de NaCl de 0,25 M. La muestra se pasó a través de una columna Ni-NTA (Qiagen) preequilibrada en tampón A (0,25 M NaCl, 5 mM imidazol). La proteína unida a la columna se eluyó con 200 mM imidazol en tampón A (0,25 M NaCl). Finalmente, LigDom se dializó frente a un tampón con 0,3 M NaCl, 50% glicerol, 1mM EDTA, 0,05% Tween. Se estimó un grado de pureza superior al 90% mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS.

2.3. Mutagénesis dirigida

Los mutantes de *BsuKu* K138A y K241A y los mutantes de *BsuLigD* K24A, K189A, K206A, K208A y E184A fueron obtenidos con el kit QuickChange de mutagénesis de Stratagene.

2.3.1. Mutagénesis dirigida en el gen *ykoV*

El plásmido pET28a-*ykoV* que contiene el gen *ykoV* que codifica *BsuKu* se usó como molde para la reacción de mutagénesis. Los oligonucleótidos directo y reverso para cada mutante (K138A-F, K138A-R y K241A-F, K241A-R) empleados aparecen recogidos en la tabla 2. Tras los ciclos de temperatura usando la DNA polimerasa *PfuTurbo* y el posterior tratamiento con la endonucleasa *DpnI*, se transformaron células competentes XL1-blue con el DNA sintetizado. La presencia de las mutaciones deseadas, así como la ausencia de otras, se verificó por secuenciación del gen completo. La expresión y purificación de los mutantes de *BsuKu* se llevó a cabo como está descrito para la proteína *wild-type* (de Vega, 2013).

2.3.2. Mutagénesis dirigida en el gen *ykoU*

El plásmido pET28a-*ykoU* que contiene el gen *ykoU* que codifica *BsuLigD* se usó como molde para la reacción de mutagénesis (de Vega, 2013). Los oligonucleótidos directo y reverso para cada mutante (K24A-F, K24A-R, K189A-F, K189A-R, K206A-F, K206A-R, K208A-F, K208A-R, E184A-F y K184A-R) aparecen recogidos en la tabla 2. La presencia de las mutaciones deseadas, así como la ausencia de otras, se verificó por secuenciación del gen completo. La expresión se realizó en células de *E. coli* Solubl-

21TM (Genlantis) y purificadas como está descrito para la proteína *wild-type* (de Vega, 2013).

2.4. Actividad AP-liasa de *BsuKu*

El análisis de la actividad AP-liasa se llevó a cabo empleando como sustrato el oligonucleótido pU (ver tabla 1). Se trata de un DNA de banda simple de 34-mer en cuya posición 16 posee una 2'-desoxiuridina. Este sustrato se marcó en su extremo 3' o 5', según se indica en cada caso. La actividad AP-liasa sobre un DNA de banda doble se realizó usando el híbrido formado por los oligonucleótidos pU (marcado en 3') y pG. La capacidad de *BsuKu* de actuar sobre sitios AP próximos a extremos 5'-protuberantes se analizó empleando los híbridos marcados en 3' U2/sp1c y U4/sp1c. Para estudiar esta misma actividad en sustratos con sitios AP en extremos 3'-protuberantes se utilizaron los híbridos marcados en 5' U19/sp1c y U21/sp1c. Todos estos oligonucleótidos, que contienen una 2'-desoxiuridina en su secuencia, se incubaron con la enzima UDG (0,2 U) durante 15 minutos a 37°C en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol. Tras la incubación, 0,2 U de *hAPE1*, 2 U de *EndoIII* o las concentraciones indicadas en cada caso de *BsuKu*, *PaeKu* o las proteínas mutantes de *BsuKu* K138A y K241A se añadieron a la mezcla de reacción. Las muestras se incubaron a 30°C durante el tiempo indicado en cada caso, tras lo cual la reacción se paró mediante la adición de NaBH_4 a una concentración final de 100 mM y la posterior incubación en hielo durante 20 minutos. El DNA obtenido fue precipitado con etanol en presencia de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de tRNA. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y autorradiografía. El análisis de la actividad AP-liasa sobre un DNA con un THF se llevó a cabo de la misma manera, empleando como sustrato el oligonucleótido H, el cual posee un THF en posición 19 (ver tabla 1).

2.5. Actividad 5'-dRP liasa de *BsuKu*

Se empleó el sustrato pU marcado en su extremo 3' el cual se hibridó al oligonucleótido complementario pG para dar lugar a un dsDNA de 34-mer. La mezcla de reacción contenía 30 mM de HEPES (pH 7,5), 4% glicerol, 0,2 U de UDG y 0,2 U de *hAPE1* en un volumen final de 12,5 μl . La reacción se inició mediante la adición a la mezcla de 228 nM de *BsuKu* o *Pol λ* según se indica, tras lo cual se incubó durante 30 minutos a 30°C. La reacción se paró tal y como se ha descrito en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos (Actividad AP-liasa de *BsuKu*) y las muestras se procesaron y analizaron de la misma manera.

2.6. Experimentos cinéticos

2.6.1. Análisis cinéticos de *BsuKu*

Los experimentos cinéticos se llevaron a cabo tal y como se ha descrito (Roberts *et al.*, 2010), mediante la incubación de concentraciones de saturación de la proteína *BsuKu* con los sustratos indicados, a 30°C. Las bandas correspondientes al DNA procesado por la enzima visualizadas en la autorradiografía, se densitometraron. Con los datos obtenidos se determinó la fracción del producto generado (y) a distintos tiempos (x). Los valores de las constantes observadas (k_{obs}) se determinaron mediante un ajuste de los datos a una regresión no lineal según la ecuación $y = y_{max}(1 - e^{-k_{obs} \cdot x})$ (Prism 5, Graphpad software).

2.6.2. Parámetros cinéticos del estado estacionario de la reacción de 5'-dRP liasa de *BsuLigD*

Para determinar los parámetros cinéticos de la actividad 5'-dRP liasa de *BsuLigD*, se cuantificó la eliminación del extremo 5'-dRP en función de la concentración de sustrato, como está descrito (Longley *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1998). De esta manera, se incubaron concentraciones crecientes de (0-2000 nM) del sustrato obtenido mediante la hibridación de los oligonucleótidos *upstream* sp1cddC y *downstream* Ph-U1 marcado en 3', al oligonucleótido molde comp-sp1c/U4a con la enzima UDG para dar lugar a un DNA con un grupo 5'-dRP. Este sustrato se incubó con 50 nM de *BsuLigD* durante 30 minutos a 30°C, tras lo cual las reacciones se estabilizaron añadiendo 100 mM NaBH₄ del mismo modo que se ha descrito en el apartado 2.4 (Actividad AP-liasa de *BsuKu*). Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y autorradiografía. La k_{obs} (min⁻¹) se representó frente a la concentración de DNA. La constante de Michaelis-Menten K_m y la k_{cat} se obtuvieron mediante una regresión no lineal por mínimos cuadrados ajustada a una hipérbola rectangular usando el software Prism 5 (Graphpad).

2.7. Ensayos de atrapamiento en presencia de NaBH₄

2.7.1. Ensayo de atrapamiento de *BsuKu*

Este experimento se realizó en presencia de 228 nM de *BsuKu*, o de las proteínas mutantes de *BsuKu* K138A y K241A, según se indica, y 3,1 nM del oligonucleótido pU marcado en 3' y previamente incubado con UDG (0,4 U). La adición de 100 mM de NaBH₄ o NaCl fue inmediatamente posterior a la adición de la proteína. Cuando aparece indicado, la proteína *BsuKu* purificada se incubó con 0,05 U de trombina en su tampón de reacción durante 1 hora a 20°C en un volumen total de 15 μ l para eliminar el

tag de histidinas presente en su extremo N-terminal. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5) y 4% glicerol. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS, seguido por una tinción con el colorante azul de Coomassie y autorradiografía.

2.7.2. Ensayos de atrapamiento de *BsuLigD*, *PaeLigD* y *BsuLigDom*

El híbrido marcado en 3' pU/pG se trató con UDG (0,4 U) durante 15 minutos a 37°C en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol. Tras esta incubación, se añadió 5 nM de *hAPE1* y 1 mM $MnCl_2$ y se incubó durante 30 minutos a 37°C. El DNA resultante (2,6 nM) se incubó con 95 nM de la proteína *BsuLigD* purificada y 10 μ M de CTP durante 2,5 minutos, formándose la base de Schiff que se redujo al añadir 100 mM de $NaBH_4$. Cuando se indica, la proteína *BsuLigD* purificada se incubó con 0,05 U de trombina en su tampón de reacción durante 1 hora a 20°C en un volumen total de 15 μ l para eliminar el *tag* de histidinas presente en su extremo N-terminal. Tras una incubación de 30 minutos en hielo, las muestras se analizaron como se ha explicado previamente.

Cuando se indica, se usó como sustrato aquel obtenido a partir de la hibridación de los oligonucleótidos *upstream* sp1c y *downstream* U4al con el oligonucleótido molde comp-sp1c/U4a (4,1 nM). Este híbrido se incubó con UDG durante 15 minutos a 37°C en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol. El sustrato resultante (4 nM) se incubó con *BsuLigD* (100 mM), *PaeLigD* (100 mM) o *BsuLigDom* (147 nM) y las muestras se procesaron como se ha indicado previamente.

2.8. Sedimentación de *BsuKu* en un gradiente de glicerol

La mezcla de incubación se realizó en un volumen final de 200 μ l y contenía 5 μ g de la proteína *BsuKu* purificada en 50 mM HEPES (pH 7,5). La muestra se depositó en la parte superior de un gradiente continuo de glicerol del 15% al 30%. El gradiente, de 4 ml, se generó en un tampón que contenía 30 mM HEPES (pH 7,5), 20 mM sulfato amónico, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA y 7 mM β -mercaptoetanol, y se sometió a ultracentrifugación durante 24 h, a 4°C, y a 348134 x g en un rotor Beckman TST 60.4. Posteriormente, se recogieron 24 fracciones individuales desde la parte inferior del tubo para su posterior análisis. Las fracciones fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS tras lo cual el gel fue teñido con colorante azul de Coomassie. Por su parte, 5 μ l de cada una de las fracciones recogidas se ensayaron individualmente en un experimento de AP-liasa.

2.9. Ensayo de retraso en gel de agarosa de DNA plasmídico por *BsuKu*

El plásmido superenrollado pUC19 (2 µg) se incubó con 10 U de la *nickasa* Nt.BStNBI para obtener la molécula relajada. El ensayo de unión a DNA se realizó incubando las cantidades indicadas de *BsuKu* con 100 ng del plásmido superenrollado o relajado en presencia de 50 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol en un volumen final de 10 µl durante 60 minutos a temperatura ambiente. Cuando se indica, el complejo nucleoprotéico fue disociado mediante la adición a la mezcla de reacción de Proteinasa K y su posterior incubación durante 1 hora a 50°C en presencia de 0,2% de SDS. Las muestras se analizaron en gel de agarosa al 0,7% y posterior tinción con bromuro de etidio.

2.10. Actividad AP-liasa de *BsuKu* en sitios AP internos en el DNA

2.10.1. DNAs circulares

Los sitios AP se generaron tal y como está descrito (Neto *et al.*, 1992). Los plásmidos superenrollados negativamente pUC19 y pcDNA3.1 se incubaron con 25 mM citrato sódico (pH 4,8), 250 mM KCl a 70°C durante 1 hora en un volumen final de 50 µl. La reacción se paró mediante la adición de 1M Tris-HCl pH 8 frío, seguido del cambio de este tampón por agua mediante la centrifugación con una columna del kit Qiaquick de Qiagen. El experimento de la actividad AP-liasa se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl en presencia de 50 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol y 10 mM MgCl₂, 100 ng del DNA no tratado (pcDNA3.1 y pUC19) o tratado (pcDNA3.1-AP y pUC19-AP) con una de las siguientes proteínas: 10 U de *hAPE1*, 10 U de *EcoRI*, 100 ng de BSA o las concentraciones indicadas de *BsuKu*. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 30°C para a continuación tratarse con 10 µg de Proteinasa K a 50°C durante 1 hora en presencia de 0,2% de SDS. Las muestras se analizaron en gel de agarosa al 0,7% y posterior tinción con bromuro de etidio.

2.10.2. DNA lineal

El oligonucleótido de 80-mer SU marcado en 3', el cual posee una 2'-desoxiuridina en posición 40, se hibridó a su complementario SU-comp, que está biotinilado en sus extremos 3' y 5' (ver tabla 1). Este híbrido (3,2 nM) se incubó con la enzima UDG (0,2 U) durante 15 minutos a 37°C en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol, en ausencia o presencia de estreptavidina (200 nM). Tras la incubación, se añadieron las dosis indicadas de *BsuKu* y se incubó a 30°C durante los tiempos indicados. La reacción se paró mediante la adición de 10 µg de Proteinasa K y su incubación posterior a 50°C durante 1

hora en presencia de 0,2% de SDS. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y autorradiografía.

2.11. Ensayos de retraso en gel (EMSA)

La mezcla de reacción contenía 12 mM Tris-HCl (pH 7,5), 4% glicerol, 1 mM EDTA, 20 mM sulfato amónico, 0,1 mg/ml de BSA, 1 nM del fragmento de DNA de 216 pb descrito previamente y marcado en 5', y las cantidades indicadas de cada proteína, en un volumen final de 20 µl. Para determinar la interacción entre *BsuKu* y *BsuLigD* mediante EMSA, el DNA se preincubó durante 10 minutos a 4°C con 3 nM de *BsuKu*, tras lo cual se añadieron las concentraciones indicadas de *BsuLigD*. Las muestras se incubaron durante 10 minutos adicionales a 4°C, y a continuación se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (80:1 monómero:bis) al 4% (p/v) el cual contenía 12 mM Tris-acetato (pH 7,5) y 1 mM EDTA. La electroforesis se llevó a cabo a 4°C en el mismo tampón a 8 V/cm (Carthew *et al.*, 1985). La autorradiografía mostró la formación del complejo DNA proteína como un retraso en la movilidad del sustrato marcado.

2.12. Unión de moléculas de DNA de plásmidos lineales

La mezcla de reacción contenía 12 mM Tris-HCl (pH 7,5), 4% glicerol, 1 mM EDTA, 20 mM sulfato amónico, 0,1 mg/ml BSA, 100 ng del plásmido lineal indicado (pUC19 digerido con *HindIII*, *AatII* o *SmaI*), 0,2 mM ATP, 0,64 mM MnCl₂, 100 ng de *BsuLigD* y/o *BsuKu* cuando se indica, en un volumen final de 20 µl. Tras una incubación a 30°C durante 60 minutos la reacción se paró mediante la adición de 0,2% SDS y 10 mM EDTA. Las muestras se incubaron con 10 µg de Proteinasa K durante 60 minutos a 50°C y fueron posteriormente analizadas en gel de agarosa al 0,7%.

2.13. Determinación del grado de adenilación de *BsuLigD*

La mezcla de reacción contenía 12 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 20 mM sulfato amónico, 0,1 mg/ml BSA, 40 µM MnCl₂, 300 fmol del sustrato que contiene un *nick* (híbrido de los oligonucleótidos *upstream* sp1, *downstream* p-Dws y molde sp1c+13, ver tabla 1) y las concentraciones indicadas de *BsuLigD* en un volumen final de 12,5 µl. Tras una incubación de 6 horas a 30°C, la reacción se paró mediante la adición de 10 mM EDTA. Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía.

La estimación del grado de adenilación de *BsuLigD* se realizó mediante la representación gráfica del pro-

ducto ligado frente la dosis de *BsuLigD* en el rango lineal, y mediante el posterior ajuste a una regresión lineal con el software Kaleidagraph 3.6.4.

2.14. Unión de moléculas de DNA con extremos parcialmente complementarios

La mezcla de reacción contenía 12 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 20 mM sulfato amónico, 0,1 mg/ml BSA, 1,25 nM del híbrido marcado sp1CGG/sp1c y 2,5 nM de cada uno de los híbridos no marcados indicados que poseen una región 3'-protuberante, 71 nM de ambas proteínas de *B. subtilis* Ku y LigD, 0,64 mM MnCl₂ y 100 nM del nucleótido indicado en un volumen final de 12,5 µl. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 30°C tras lo cual se paró la reacción mediante la adición de 10 mM EDTA. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y autorradiografía.

2.15. Unión de moléculas de DNA parcialmente complementarias con sitios AP próximos al extremo 5'

El sustrato U4 marcado en su extremo 3' se hibridó al oligonucleótido sp1cddC para dar lugar a un híbrido con una región 5'-protuberante de 7 nucleótidos (sustrato *A* en las figuras 30, 31 y 32). Este sustrato se incubó con la enzima UDG, tal y como se ha descrito previamente, para obtener una molécula que posee un sitio AP próximo a su extremo 5'. Cuando se indica, el DNA deglicosilado se incubó con *hAPE1* para dar lugar a un sustrato con un grupo dRP en su extremo 5'. Estos sustratos (0,68 nM) se incubaron en un volumen final de 15 µl en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol, 114 nM de *BsuKu* y/o 114 nM de *BsuLigD*, 0,64 mM MnCl₂, 1 nM del híbrido no marcado sp1c/U4c (sustrato *upstream D* en las figuras 30, 31 y 32) o del híbrido no marcado sp1c-1/U4c (sustrato *upstream E* en las figuras 30, 31 y 32) y 10 µM del nucleótido indicado. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 30°C tras lo cual la reacción se paró con la adición de NaBH₄ y las muestras se procesaron como se ha indicado previamente y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y autorradiografía.

2.16. Restitución *in vitro* de un sustrato de BER con un gap de un nucleótido por *BsuLigD*

El oligonucleótido pU, marcado en 3' o en 5', se hibridó a su complementario pG para dar lugar a un dsDNA de 34-mer. Las reacciones, que se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 µl, contenían 0,53 nM del híbrido de DNA, 30 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol, 27 nM de UDG, 5 nM de *hAPE1*, 0,64 mM MnCl₂, y las concentraciones indicadas del nucleótido correspondiente. La reacción se inició

mediante la adición de 57 nM de la proteína *BsuLigD* purificada, tras lo cual las muestras se incubaron durante 30 minutos a 30°C. Finalmente, se añadió 100 mM NaBH₄ para parar la reacción, tras lo cual las muestras se procesaron como se ha indicado. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y autorradiografía.

2.17. Actividad 5'-dRP liasa de *BsuLigD* en intermediarios de BER rellenos

Los híbridos que imitan un sustrato de BER con el *gap* relleno obtenidos mediante la hibridación de los oligonucleótidos *upstream* sp1c o sp1cddC y *downstream* Ph-U1 al oligonucleótido molde comp-sp1c/U4a, se incubaron con la enzima UDG durante 15 minutos a 37°C, en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol. Tras esto, se añadió 3,5 nM de EndoIII o 60 nM de la LigD indicada (*PaeLigD* o *BsuLigD*) o 216 nM de *BsuLigDom* en ausencia o presencia de 0,64 mM MnCl₂, tal y como se indica. En el experimento realizado con las proteínas mutantes de *BsuLigD* (*wild-type*, K24A, K189A, K206A, K208A y E184A) se incubó 28 nM de la proteína indicada en presencia de 0,64 mM de MnCl₂. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 30°C tras lo cual se procesaron y analizaron como se ha descrito anteriormente.

2.18. Actividad AP-liasa de *BsuLigD*

2.18.1. Sustratos tipo *flap* con una 2'-desoxiuridina o un THF

Se incubaron los híbridos constituidos por los oligonucleótidos *upstream* sp1 y *downstream* HU (que contiene una 2'-desoxiuridina en posición 19) o H (que contiene un THF en la misma posición) al oligonucleótido molde comp-sp1/H (0,53 nM) con 27 nM de UDG durante 15 minutos a 37°C en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5) y 4% glicerol. A continuación se añadió a la mezcla 3,5 nM de EndoIII, 5 nM de *hAPE1* o concentraciones crecientes de *BsuLigD* y se incubó 30 minutos a 30°C. La reacción se paró al añadir 100 mM NaBH₄ y las muestras se procesaron y analizaron como se ha descrito.

2.18.2. Sustratos de dsDNA con extremos romos o 5'-recesivos

El sustrato romo empleado se obtuvo al hibridar el oligonucleótido pU a su complementario pG. Los sustratos 5'-recesivos se obtuvieron mediante las siguientes hibridaciones: U4al y comp-U4al+4; U4al-CUC y comp-GGG; U4al-TUT y comp-AAA; U4al-GUG y comp-CCC y U4alCUG y comp-GCC-3'ddC. Los oligonucleótidos pU, U4al, U4al-CUC, U4al-TUT, U4al-GUG, U4al-CUG y 44mer se mar-

caron en su extremo 3'. Los híbridos (indicados específicamente en cada experimento) se pretrataron con UDG durante 15 minutos a 37°C en presencia de 30 mM HEPES (pH 7,5), 4% glicerol, tras lo cual se incubaron con 114 nM de *BsuLigD*, 5 mM de $MnCl_2$ cuando se indica, 10 μ M de cada uno de los NTPs (ATP, CTP, GTP o UTP) cuando se indica y 5 nM de uno de los híbridos de DNA no marcado constituidos por los oligonucleótidos sp1CGG/sp1c o sp1ACC/sp1c cuando se indica. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C la reacción se paró al añadir $NaBH_4$ 100 mM y las muestras se procesaron y analizaron como se ha descrito.

Para estudiar la estimulación de la actividad AP-liasa de *BsuLigD* por *BsuKu*, 0,83 nM del híbrido constituido por los oligonucleótidos U4al-GUG y comp-CCC se pretrató con UDG como se ha indicado previamente. A continuación se incubó con 57 nM de *BsuLigD*, 114 nM de *BsuKu*, en presencia de 5 mM de $MnCl_2$, 10 μ M de ATP o GTP según se indica, y 4,1 nM del DNA no marcado obtenido mediante la hibridación de los oligonucleótidos sp1CTTGCTG y sp1c cuando se indica. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C la reacción se paró al añadir $NaBH_4$ 100 mM y las muestras se procesaron y analizaron como se ha descrito.

2.19. Ensayo de resistencia de las esporas a desecación extrema [*ultrahigh vacuum* (UHV)]

Las esporas se inmovilizaron en monocapas en discos de acero inoxidable de 7 mm y fueron expuestas durante 7 días a desecación extrema (UHV) producida por una bomba de captador de iones (4001/s; Varian SpA, Torino, Italia) alcanzándose una presión final de 3×10^{-6} Pa (Horneck, 1993; Moeller *et al.*, 2007; Vlašić *et al.*, 2014). Las esporas inmovilizadas en discos de cuarzo se recuperaron empleando una solución acuosa de alcohol polivinílico al 10%, tal y como está descrito (Horneck, 1993; Moeller *et al.*, 2007). Se plaquearon las diluciones apropiadas de las muestras de esporas tratadas y sin tratar en placas de NB agar para contar UFCs como medida de la supervivencia de las esporas. Las UFCs de las esporas sin tratar se tuvieron en cuenta para considerarse como el 100% de la supervivencia. Este experimento se realizó por triplicado. Las UFCs de las esporas sometidas a UHV se dividieron entre la media del valor de UFC de las muestras de esporas no tratadas para obtener la supervivencia tras el daño. Los datos presentados se expresan como medias con su desviación estándar. El porcentaje de supervivencia de las esporas tratadas se comparó estadísticamente mediante un test de *t*-Student y se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con p -valor $\leq 0,05$ (Horneck, 1993; Moeller *et al.*, 2007; Vlašić *et al.*, 2014). Estos experimentos fueron realizados por nuestros colaboradores Katja Nagler, Marina Raguse y el Dr. Ralf Moeller (German Aerospace Center, Colonia, Alemania).

2.20. Experimentos de *bypass* de lesiones en *gaps* de un nucleótido

Para realizar los experimentos de inserción de nucleótidos frente a distintas lesiones en el molde de estructuras tipo *gap* se incubó 4,8 nM de cada sustrato marcado en 5' con el fluoróforo Cy5: sin daño (híbrido de los oligonucleótidos *upstream* Cy5-pber, *downstream* 5pGpber Dws y molde T4), con OH-C (híbrido de los oligonucleótidos *upstream* Cy5-pber, *downstream* 5pGpber Dws y molde hy-C), con Tgly (híbrido de los oligonucleótidos *upstream* Cy5-pber, *downstream* 5pGpber Dws y molde T-gly), con 8oxo-dG (híbrido de los oligonucleótidos *upstream* Cy5-pber, *downstream* 5pTpber Dws y molde 8oxoG2) y con THF (híbrido de los oligonucleótidos *upstream* Cy5-pber, *downstream* 5pGpber Dws y molde H) con 2,3 nM de la proteína mutante *BsuLigD* E184A con las concentraciones indicadas de cada NTP (ATP, CTP, GTP y UTP) en presencia de 5 mM de $MnCl_2$. Los distintos tiempos de incubación para cada sustrato fueron los que se indican en cada figura. Las reacciones se pararon mediante la adición a la mezcla de 20 mM EDTA y 95% formamida. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y visualizadas utilizando un escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare). Se llevó a cabo la cuantificación mediante análisis densitométrico de las bandas correspondientes a los productos elongados.

Para analizar la inserción de nucleótido frente a distintas lesiones en el molde de una molécula con estructura tipo *gap* y la posterior ligación, se emplearon los mismos sustratos indicados arriba: sin daño, con OH-C, con Tgly, con 8oxodG y con THF. Se incubó 4,8 nM de cada híbrido de DNA con 11,4 nM de la proteína *wild-type* *BsuLigD* en presencia de 40 μ M de $MnCl_2$ a las concentraciones indicadas en cada caso de cada NTP (ATP, CTP, GTP y UTP) y durante los tiempos señalados. Las reacciones se pararon mediante la adición a la mezcla de 20 mM EDTA y 95% formamida y las muestras se analizaron como se ha indicado previamente. Se llevó a cabo la cuantificación mediante análisis densitométrico de las bandas correspondientes a los productos elongados y ligados.

Resultados

Capítulo 1

Procesamiento eficiente de sitios AP por proteínas Ku bacterianas de la ruta de NHEJ

La proteína Ku bacteriana, estudiada en especies de *Bacillus*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*, se une a los extremos del DNA que surgen tras la rotura de sus dos cadenas y recluta a la LigD (Weller *et al.*, 2002; Della *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2010; Zhu y Shuman, 2010; de Vega, 2013; Kushwaha y Grove, 2013a, 2013b). La proteína Ku humana, por su parte, también desempeña ambas funciones: reconoce los extremos del DNA y une distintas proteínas que intervienen en la NHEJ. Sin embargo, recientemente se ha descrito que además tiene actividad AP-liasa, y por tanto es capaz de eliminar sitios AP próximos a DSBs para permitir la ligación de los extremos que contengan dicha lesión (Roberts *et al.*, 2010; Strande *et al.*, 2012). Esta actividad reside en el dominio vWA, en la región N-terminal de la subunidad Ku70 de la proteína (ver figura 4). Dicho dominio no está presente en las proteínas Ku bacterianas, por lo que la presencia de una actividad AP-liasa en estas no era predecible *a priori*. Pese a esto, se analizó la potencial capacidad de *BsuKu* de reconocer y escindir sitios AP en el DNA.

1. *BsuKu* posee una actividad AP-liasa intrínseca

Las proteínas de reparación de DNA que poseen una actividad AP-liasa reconocen los sitios AP e inciden en su extremo 3' en una reacción independiente de metal, que puede ser de β -eliminación o de β,δ -eliminación. Cuando la reacción es de tipo β -eliminación, los extremos generados son 5'-P y 3'-PUA. Por el contrario, si ocurre una β,δ -eliminación, se generan grupos -P tanto en 5' como en 3'. Por otra parte, y tal y como se ha mencionado en la Introducción, cuando los sitios AP son reconocidos por una AP-endonucleasa, se generan extremos 5'-dRP y 3'-OH (véase la figura 11) (Khodyreva y Lavrik, 2011). Como resultado de la acción de estas enzimas, se genera una SSB en el DNA, cuyos extremos 5' y/o 3' contienen grupos químicos que deben ser procesados para la reparación de la lesión.

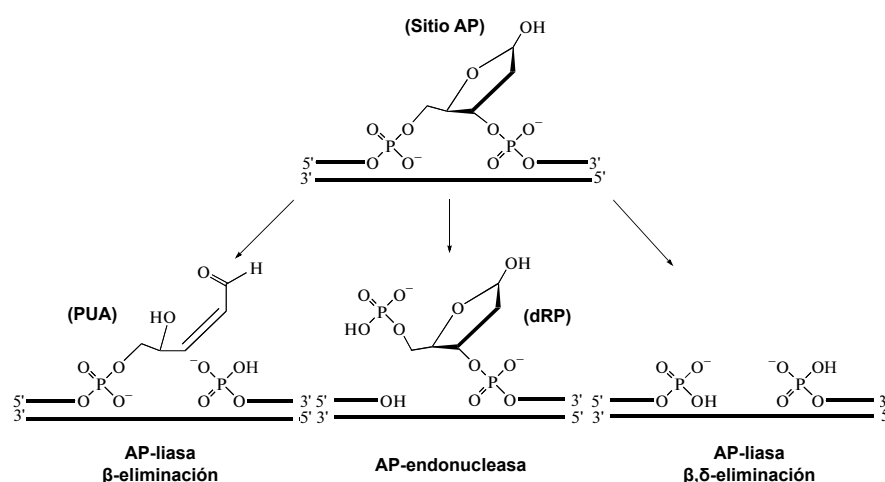


Figura 11. Esquema del procesamiento de un sitio AP por enzimas AP-liasa (β -eliminación o β,δ -eliminación) o AP-endonucleasa [adaptado de (Rechkunova *et al.*, 2015)].

Resultados 1

Teniendo en cuenta los estudios previos realizados con la proteína Ku humana, se quiso analizar la capacidad de la proteína homóloga *BsuKu* de reconocer e introducir un *nick* sobre sitios AP internos. Para ello, se empleó un oligonucleótido de DNA de banda simple de 34-mer que contenía una 2'-desoxiuridina en posición 16. Al incubar el oligonucleótido con la enzima UDG se genera un sitio AP natural, que puede ser procesado por enzimas con actividad AP-liasa (como la EndoIII de *E. coli*) o AP-endonucleasa (como la *hAPE1*) (figura 12A). En la figura 12B se observa que la incubación de este sustrato con la *hAPE1* en presencia del catión Mn^{2+} , da lugar a un producto de 15-mer con un grupo -OH en su extremo 3' como consecuencia de la hidrólisis del enlace fosfodiéster 5' a la lesión (Krwawicz *et al.*, 2007). Por el contrario, la incubación de este DNA con la enzima EndoIII de *E. coli*, da lugar a un producto que migra más lentamente, debido a la presencia del grupo PUA en el extremo 3' generado por la incisión en 3' del sitio AP. Cuando se incubó el DNA que contiene el sitio AP con concentraciones crecientes de *BsuKu* en ausencia de metal, se obtuvo un producto cuya movilidad electroforética coincidía con la del obtenido tras la incubación con la EndoIII. El hecho de que *BsuKu* incida sobre la región 3' del sitio AP en una reacción independiente de metal, sugiere que esta proteína posee una actividad AP-liasa intrínseca. *BsuKu* también es activa sobre sitios AP internos en moléculas de dsDNA, aunque sobre este tipo de sustrato la actividad es menos eficiente, tal y como se deduce de las constantes observadas (k_{obs}) sobre ssDNA ($0,011 \pm 1,5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) y dsDNA ($5 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) (figura 13).

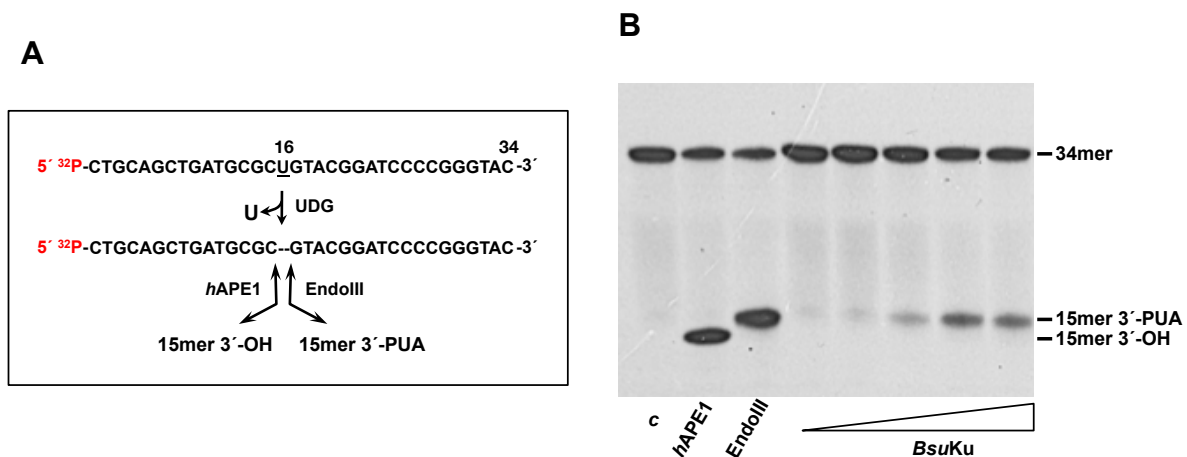


Figura 12. *BsuKu* incide sobre el enlace fosfodiéster 3' al sitio AP. (A) Esquema de la reacción. El oligonucleótido pU (que contiene una 2'-desoxiuridina en posición 16) se marcó en 5' (véase Materiales y Métodos) y se trató con la enzima UDG, generándose un sitio AP natural. (B) El sustrato pretratado con UDG se incubó con *hAPE1*, que hidroliza en 5' del sitio AP, con EndoIII, que actúa en 3' y con concentraciones crecientes de *BsuKu* (9, 18, 36, 72 y 142 nM) durante 1 hora a 30°C, tal y como se describe en Materiales y Métodos. c: DNA de partida de la reacción. Tras la incubación con *hAPE1*, EndoIII y *BsuKu* las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Las posiciones de los productos aparecen indicadas.

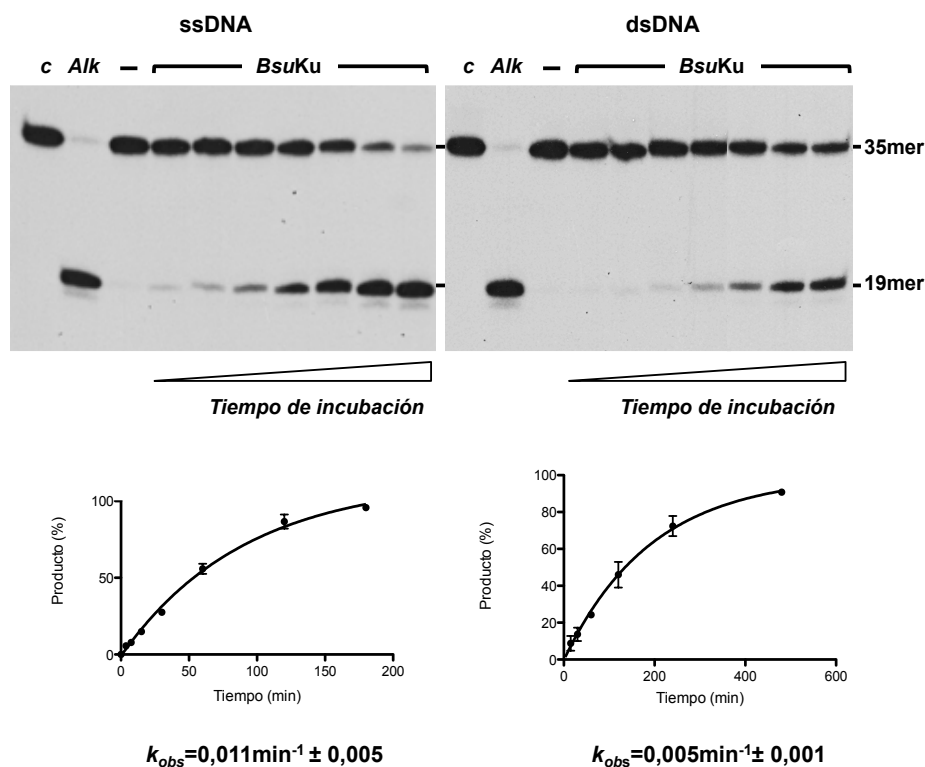


Figura 13. Actividad AP-liasa de *BsuKu* sobre sustratos de DNA de banda simple y banda doble con un sitio AP. El oligonucleótido pU, marcado en 3' con ^{32}P -cordicepina (véase Materiales y Métodos) contiene un sitio AP en posición 16. Este sustrato se ensayó en banda simple (ssDNA, panel izquierdo) o formando un híbrido con el oligonucleótido complementario pG (dsDNA, panel derecho) (véase Materiales y Métodos). Tras la incubación con UDG se generaron sustratos que contienen un sitio AP natural, tal y como se deduce del cambio de movilidad del producto en el control *Alk*. (el DNA pretratado con UDG se hidroliza en presencia de NaOH). Tras la incubación de estos sustratos que contienen un sitio AP con *BsuKu* (228 nM) durante 4, 8, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indican las posiciones 35-mer (sustrato de partida) y 19-mer (producto tras la actividad AP-liasa).

El resultado observado en la figura 12 sugiere que la proteína procesa el sitio AP mediante una reacción de β -eliminación y no una β,δ -eliminación, ya que en este último caso el producto generado migraría más que aquel obtenido al incubar con la AP-endonucleasa *hAPE1*, debido a la presencia de un grupo fosfato en 3' (véase la figura 11). Para confirmar la presencia de una actividad AP-liasa en *BsuKu*, la proteína se incubó con un oligonucleótido en cuya posición 19 hay un THF que es un análogo estable de un sitio AP, resistente específicamente a su procesamiento por β -eliminación, pero no por endonucleolisis (Matsumoto y Kim, 1995; Khodyreva y Lavrik, 2011). En la figura 14 se observa como, a diferencia de la actividad endonucleolítica de la *hAPE1* que hidroliza este sustrato en el sitio AP, la actividad de *BsuKu* se encuentra inhibida al igual que la de EndoIII, lo cual permite confirmar que la reacción que está llevando a cabo *BsuKu* es de β -eliminación.

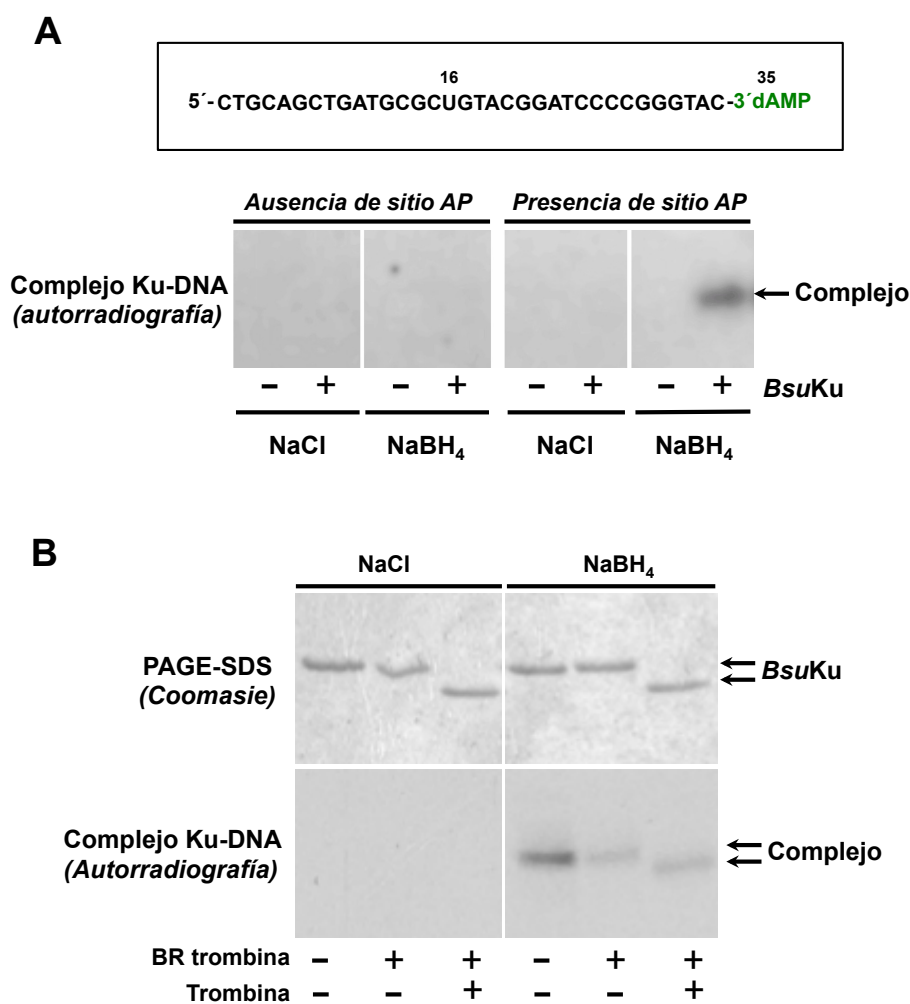


Figura 15. Formación de complejos *BsuKu*-DNA. (A) La formación del complejo DNA-enzima es dependiente de la presencia de un sitio AP. Se incubó *BsuKu* (228 nM) con 3,1 nM del oligonucleótido pU marcado en su extremo 3' (panel superior) sin tratar (sin sitio AP) y tratado con UDG (con sitio AP) en presencia de NaCl o NaBH₄ (100 mM). Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS y la autorradiografía que muestra la formación del complejo se observa en el panel inferior. (B) El complejo con el DNA observado corresponde a *BsuKu*. La reacción de formación del complejo DNA-enzima se llevó a cabo en presencia de 228 nM de *BsuKu* y 3,1 nM del oligonucleótido pU marcado en 3' en cuya posición 16 hay un sitio AP natural. En los paneles superiores se muestra la tinción con azul de Coomassie tras la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS. En los paneles inferiores se observa la autorradiografía correspondiente a la formación del complejo proteína-DNA tras la separación electroforética. En la figura aparecen indicadas las muestras que se incubaron con el tampón de reacción (BR) de la trombina o con 0,05 U de trombina a 20°C durante 1 hora.

Otra prueba que apoya la presencia intrínseca de una actividad en una enzima es la cosedimentación de ambas, actividad y proteína, tras una ultracentrifugación a través de un gradiente de glicerol. Así, *BsuKu* se centrifugó en un gradiente del 15%-30% glicerol y las fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS y posterior tinción con azul de Coomassie

Resultados 1

(figura 16, panel superior). Las fracciones 11-18 fueron ensayadas individualmente en la actividad AP-liasa (figura 16, panel inferior), para lo que se utilizó un oligonucleótido que posee una 2'-desoxiuridina en posición 16, marcado en 3' y pretratado con UDG (véase Materiales y Métodos). La figura 16 muestra que el máximo de actividad AP-liasa se alcanza en las fracciones 14 y 15, coincidiendo con el máximo de masa de proteína, lo cual es una prueba más de que la actividad AP-liasa es intrínseca de *BsuKu*.

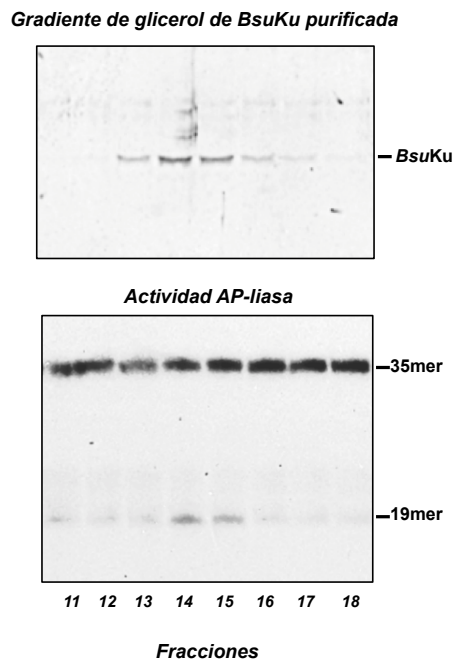


Figura 16. La actividad AP-liasa de *BsuKu* es intrínseca. Tras la centrifugación de *BsuKu* en un gradiente de glicerol del 15%-30% (panel superior), se incubaron 5 μ l de cada una de las fracciones 11 a 18 con el oligonucleótido pU (véase Materiales y Métodos) marcado en su extremo 3' y pretratado con UDG, durante 2 horas a 30°C. La reacción se paró mediante la adición de NaBH₄ (100 mM) y se analizó en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición del producto de 19-mer de la reacción.

2. *BsuKu* posee actividad 5'-dRP liasa

Una vez analizada la actividad AP-liasa de *BsuKu*, se quiso estudiar si *BsuKu* podía también escindir un grupo 5'-dRP como los que resultan tras la hidrólisis de un sitio AP por una AP-endonucleasa. Para ello, se empleó un sustrato de dsDNA que contenía una 2'-desoxiuridina en posición central de la cadena marcada radiactivamente en su extremo 3'. El sustrato, pretratado con UDG, fue posteriormente incubado con la enzima *hAPE1*, dando lugar a una molécula con un *nick* cuyo producto 3' posee en su ex-

tremo 5' un grupo dRP (figura 17A). Tal y como se puede observar en la figura 17B (carril *c*) este producto se mantiene estable a lo largo de la reacción. Como control de la reacción, el sustrato se sometió a la bien caracterizada actividad 5'-dRP de Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2001), que genera un producto cuya movilidad electroforética es mayor a la del sustrato (Figura 17B). Como se puede observar en la figura, *BsuKu* es capaz de eliminar el grupo 5'-dRP, como se deduce de la reducción del tamaño del sustrato marcado en 3' ($k_{obs} = 0,06 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$).

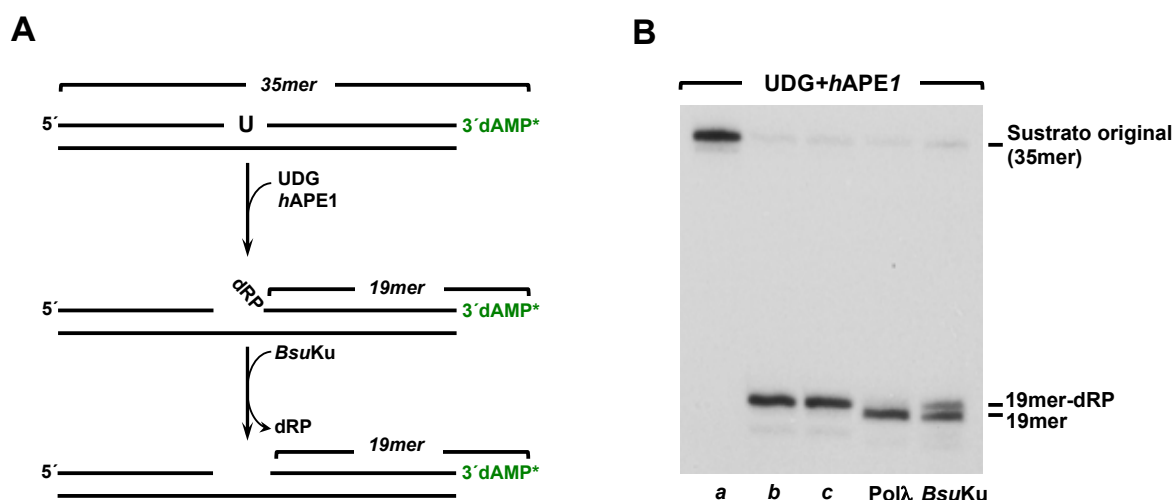


Figura 17. Actividad 5'-dRP liasa de *BsuKu*. (A) Representación esquemática de las actividades AP-endonucleasa (*hAPE1*) y 5'-dRP liasa (*BsuKu*) sobre un sustrato que contiene un sitio AP natural generado mediante la incubación de un híbrido de DNA marcado en 3' (oligonucleótidos pU y pG, véase Materiales y Métodos) con la UDG. (B) El sustrato tratado con UDG (*a*) es incubado con *hAPE1* para dar lugar a un producto de 19-mer con un grupo dRP en su extremo 5' (*b*). Este producto permanece estable durante toda la reacción (*c*). El sustrato de 19-mer-dRP se incubó con 228 nM de Pol λ o *BsuKu* y las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos de 19-mer-dRP y 19-mer, así como del sustrato original de la reacción (35-mer).

3. La actividad AP-liasa no es exclusiva de *BsuKu*

Teniendo en cuenta la inesperada presencia de una actividad AP-liasa en *BsuKu*, se quiso analizar si esta actividad es exclusiva de esta, o si por el contrario otras proteínas Ku bacterianas también la poseen. Para ello, se escogió la proteína ortóloga de la bacteria Gram-negativa *P. aeruginosa* (*PaeKu*), ya que este organismo ha sido utilizado como modelo de estudio de la ruta de NHEJ bacteriana durante años (Pitcher *et al.*, 2007a; Shuman y Glickman, 2007). *PaeKu* se clonó en el plásmido de expresión pET28a(+) y fue expresada en la cepa de *E. coli* BL21(DE)3 como se describe en Materiales y Métodos. Como se puede

Resultados 1

observar en la figura 18A, cuando se lleva a cabo un ensayo con extractos bacterianos en los que se ha sobreexpresado la proteína *PaeKu*, en presencia de NaBH_4 se forma un complejo estable con un DNA que contiene un sitio AP, complejo ausente en los extractos no inducidos. La diferente movilidad del complejo tras la digestión con trombina demuestra que la proteína *PaeKu* expresada es la que ha formado el complejo con el DNA que porta el sitio AP. Por otra parte, al incubar dosis crecientes de la proteína *PaeKu* purificada con el DNA que contiene un sitio AP se observa como, en ausencia de cationes divalentes se obtiene un producto con idéntica movilidad electroforética al obtenido por *BsuKu* (figura 18B). Estos resultados permiten concluir que la actividad AP-liasa es extensiva a otras especies bacterianas.

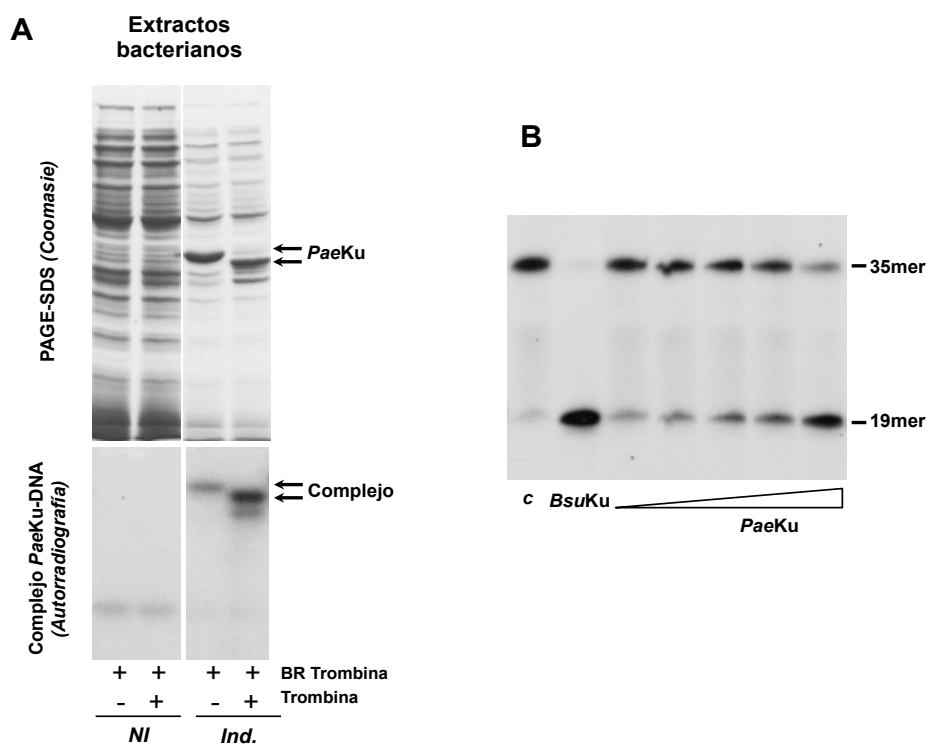


Figura 18. La proteína Ku de la bacteria Gram-negativa *P. aeruginosa* posee actividad AP-liasa. (A) Formación del complejo *PaeKu*-DNA. Los paneles superiores muestran la expresión de la proteína recombinante *PaeKu*. Para una mejor visualización de la inducción de *PaeKu* se cargaron 15 y 6 μg del extracto celular no inducido (NI) e inducido (Ind.), respectivamente. En los paneles inferiores se muestra la autorradiografía en la que se observa la formación del complejo DNA-proteína después de la separación en electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, incubando 3,1 nM del oligonucleótido pU marcado en 3' y que contiene un sitio AP (tras la incubación con UDG) en presencia de 100 mM NaBH_4 y de 1,7 μg del extracto bacteriano no inducido o de 0,7 μg del extracto inducido. Cuando se indica, los extractos fueron previamente tratados, bien con el tampón de reacción (BR) de trombina, bien con 0,05 U de trombina durante 1 hora a 20°C. **(B)** Actividad AP-liasa de *PaeKu*. Se incubó 3,1 nM del oligonucleótido pU marcado en 3' y que contiene un sitio AP en la posición 16 (después del tratamiento con la UDG) con las proteínas *BsuKu* (228 nM) o *PaeKu* (14, 28, 57, 114, 228 nM) durante 1 hora a 30°C como se describe en Materiales y Métodos. Carril c: control del DNA tras el tratamiento con la UDG. Tras la incubación, las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Las posiciones de los productos aparecen indicadas.

4. Búsqueda de los residuos responsables de la actividad AP/5'-dRP liasa de *BsuKu*

Tal y como se ha explicado anteriormente, en las proteínas con actividad AP-liasa que llevan a cabo una reacción de β -eliminación, el grupo ϵ -NH₂ de la lisina nucleofilica forma una base de Schiff con el C1' de la desoxirribosa. Para intentar dilucidar qué lisina puede ser la responsable de la actividad AP/5'-dRP liasa de *BsuKu*, se realizó un alineamiento múltiple de secuencia de la proteína Ku de distintas especies bacterianas filogenéticamente alejadas (figura 19A). Los residuos conservados en todas las especies analizadas aparecen sobre fondo negro, mientras que aquellos que aparecen conservados en la mayoría de las especies analizadas aparecen sombreados en gris. Entre todos los residuos marcados destacaron dos lisinas, que aparecían conservadas en un mayor número de especies analizadas, y correspondientes a la Lys138 y la Lys241 de *BsuLigD* (señaladas en la figura con un círculo y un asterisco, respectivamente). Se realizó un modelado estructural de la proteína *BsuKu* utilizando como molde el heterodímero eucariótico Ku70/80 para determinar la posición de estas lisinas, que como se puede observar en la Figura 19B, se encuentran en la parte externa del anillo central de unión al DNA del homodímero. Ambos residuos se cambiaron a alanina para generar los mutantes puntuales de *BsuKu* K138A y K241A (véase Materiales y Métodos).

A

<i>Bsu</i>	91	LTDEDLKSLKQEHEEKAVETVDFVQLQEIDPIVFNRSYVCGPG-DNGTKAYTLREALRSTGKIGIANMTIRSKQQLAIL	169
<i>Afu</i>	107	LTDEDFEIKPLKST-KSIEIIRCFDPAELGLIIVYSSFYVISPDKGGEKAYLLKKAMEETNSMGIGKMTMRGKENVAL	184
<i>Cst</i>	74	LNDADFEAAKSSGgKNIIEILDFVNLSEIDPVVFDKTYVLSPO-ETGAKAYNLLRRAMSDTKGIAIARVTIRSKETLAAL	152
<i>Pae</i>	75	LSEEEIRAAHPKST-QTIEIEFAFVDSQEIPLQHFDTFYVLPAD-RRGGKVYALLRETLERTGKVALANVVLHTRQHLALL	152
<i>Mtu</i>	74	ITDDDIASLPEERS-RELEVLLEFVPAADVDPMMFDRSYVLEPD-SKSSKSYVLLAKTLAETDRMAIVHFTLRNKTRLAAL	151
<i>Tma</i>	74	IDEDDLERIPMPVT-KTIDIVDFVDIGQIDPIVYDKTYVIVPE-DIGTKPYVLLRDSMKETKRVALAKVIRSKQSLACI	151
<i>Sme</i>	76	IEDSDLESVRIESN-HTMNEAFVDAGSVDVIYQDAHYVLPADgAMAEEFVVLREALRRSGKLAIALRVLSSRERVVTI	154
<i>Dti</i>	75	LSDELDAAAPKTG-RTIEIESEFVDLVSIIDPIYDKFYVLLPE-ERAAKAYQLLVNAMVKAGKVALAKFVMRNKEYLAAL	152
<i>Dru</i>	74	IREDDFENLPGENT-RSINIVDFVDLTEIDPLVFDKGYVLPAG-DGGQRVYELKKSMEEETGKVALAKVIRNKESLAAL	151
<i>Bdi</i>	82	VTKEELEIEALEST-RTIEIDDFVDKSEIDPRYLIREYVLRPDgKVGHDFAVIRETIREMNKVALIGRVVLTNREHIAL	160
<i>Bhi</i>	75	LSDEDFRRANDVAT-QTIEIEIEFVQAAEVPLYVYDTPYVLEPD-KRGGPCYVLLRDALRKSGLALGQVVLHTRQHLAAL	152
<i>Cwo</i>	75	VTQEDLDALDPRAT-KTIDIEEFVDLADIDPVVYDSAYHAPPA-TGGAKAYRLLLSAMEEAGKVALIGRFVLRTRQQLCAL	152
<i>Jan</i>	75	LSDEDLKRANIEAT-QTIDILDFVHAEEVPLIYEHFYVLPAS-RGGDKVYALLRETLRGGKIGIANVVMRTKQHLCAL	152
<i>Ppu</i>	75	ISEEIEIRKARPEAT-QTIDIEFSFVAGDIPLQHFDTFYVLPAD-RRGGKVYALLRETLRKTGKVALATVVLHTRQHLALL	152
<i>Pno</i>	89	LSDDDFKRANTAAT-QSIDVLSFVQGESEVPLYVYDTPYVLPAD-KRGDKGYVLFREVLRKSGLLALASVVLHKSQYLAAM	166
●			
<i>Bsu</i>	170	RVYE---NCIVMESIHPDEVRSAAQVPG---VPDQSNVNDKELQTAITLIDELTAKFEPEKEDTYRQALLQRYVNDKLE	243
<i>Afu</i>	185	RPYD---GGIVLAQLHYIDEVRSPLELPG---WGAVAEITEELELAKKLLILAMKPLKLEEFREDEYKEALMQLTEAKLS	258
<i>Cst</i>	153	RVYK---NALVMEILFYADEVRPAEQIPG---LPEVTEITNEKELDIAVKLIESLTTKFEPEKYVINEYKTAITELTRKIVE	226
<i>Pae</i>	153	RPLQ---DALVLIILRWPSQVRSLDGLELDESUTE-AKLDKRELEMAKRLVEDMASHWEPDEYKDSFSDKIMKLVBEKAA	228
<i>Mtu</i>	152	RVKD (4) EVMMVHLLWPDETRDPDF-PV---LDQKVEIKPAELKMAQGVVDSMADDFNPDYVDTYQEQQLQELIDTKLE	228
<i>Tma</i>	152	RVYD (1) KYMVMETMHFPDEIKSTNQLPP---LRE-VNLHENEIKMAKQLVDTLTSDFKPEKYVDNRYKRTLIEMLSEKIQ	225
<i>Sme</i>	155	GPRE---TGMFVCLRNPNVVRGTADYFGNI---PVGKDPPEMLQIAEALIEQKTTTFDPKQYEDRYEVALMQMTRKLLK	228
<i>Dti</i>	153	RPLQ---NVICLEIMRFTNEVILAEQLEG---MPKVPVDERELKMAQQLIDSLSSEKFEFGKYSDEYSGRLQELQKIE	226
<i>Dru</i>	152	RVAE---GVITMSRMFYDPEVRKTTAIE---LHYQVSIHDNELKMAIDLINNLAAFPHPKRYVDEYREQLMQVTOAKVA	225
<i>Bdi</i>	161	EPMD---KGLVGTLLRYPYEVRSQEYFDEI---QDVKVTKMDLIDLARHIVNQKAGTFDPEKFBDEYESALVELINQKRA	234
<i>Bhi</i>	153	LPQG---DALMMVILRYAETREAPELDLPA----KHAGARETDMALRLIDDMSVDWDPAYQYHDAYREDLAAITRAKIK	224
<i>Cwo</i>	153	RPSD---GVMVLSMFLFGDEVNSPQRLEDEaLGD-VEANERVVVARQLIESLSAPFEPTRFRDDYREQVLELTERKAA	228
<i>Jan</i>	153	VCIG---EAIVLNLRVHDEITRAADELKLPAaTSKAAGISDKELQALSLVDGMTEAWOPEQYRDTYREDLILALVERKIA	229
<i>Ppu</i>	153	RPLN---QALVMILRWPEVVRGLETELDAsVTD-SKVEKRELEMAKRLVEDMSGPWKPGDYHDAFRQTIMDLVBEKAS	228
<i>Pno</i>	167	FPLD---DVLMLVIMRYADETRDVAELDIPH---GKDSAPNAREMQASRLLEDMTLPWDEPCYRDEYRDDLLATTEBKIA	241

*

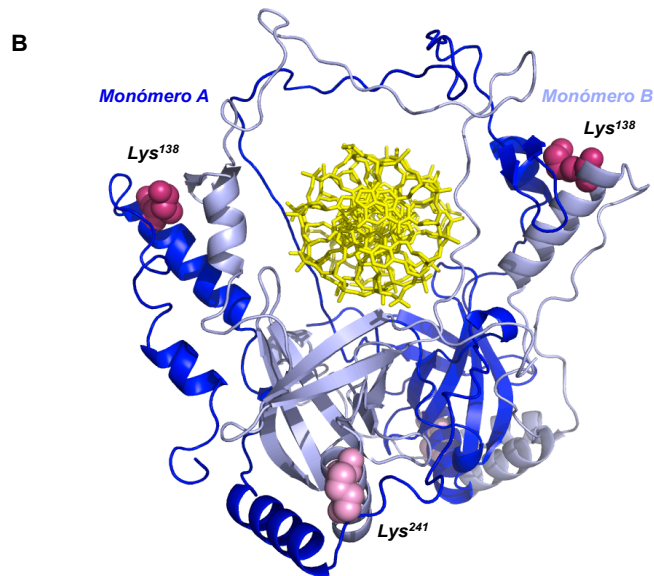


Figura 19. Búsqueda de residuos responsables de la actividad AP/5'-dRP liasa. (A) Alineamiento múltiple de secuencia de proteínas Ku procarióticas. Debido al elevado número de secuencias, se alinearon únicamente las más representativas. Los nombres de los organismos se han abreviado como sigue: *Bsu*, *B. subtilis* (referencia NCBI: NC_000964.3); *Afu*, *Archaeoglobus fulgidus* (referencia NCBI: NP_070554.1); *Cst*, *Clostridium stercorarium* (referencia NCBI: YP_007373202.1); *Pae*, *P. aeruginosa* (referencia GenBank: EZN98627.1); *Mtu*, *M. tuberculosis* (referencia GenBank: KBZ88696.1); *Tma*, *Thermoanaerobacter mathranii* (referencia NCBI: YP_003677551.1); *Sme*, *Sinorhizobium meliloti* (referencia NCBI: YP_006842588.1); *Dti*, *Desulfomoniletidjei* (referencia NCBI: YP_006447310.1); *Dru*, *Desulfotomaculum ruminis* (referencia NCBI: YP_004545398.1); *Bdi*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* (referencia NCBI: NP_768228.1); *Bhi*, *Bordetella hinzii* (referencia GenBank: KCB25507.1); *Cwo*, *Conexibacter woesei* (referencia NCBI: YP_003393615.1); *Jan*, *Janthinobacterium sp.* (referencia NCBI: WP_017875901.1); *Ppu*, *Pseudomonas putida* (referencia NCBI: WP_004374467.1); *Pno*, *Pusillimonas noertemannii* (referencia NCBI: WP_017523500.1). Los residuos conservados aparecen indicados en negrita sobre un fondo gris (si aparece en el 70% de las secuencias alineadas) o sobre un fondo negro (si aparece en el 100%). Los residuos de lisina que están moderada (Lys138 en *BsuKu*) y altamente conservados (Lys241 en *BsuKu*) se indican con un círculo negro o un asterisco respectivamente. **(B)** Representación del modelo estructural de *BsuKu* y localización de los residuos Lys138 y Lys241. El modelo fue proporcionado por el servidor de modelado por homología Swiss-Model, utilizando como molde la estructura cristalográfica del heterodímero eucariótico Ku70/80 [PDB IB 1JEY (Walker *et al.*, 2001)]. Los dos monómeros de *BsuKu* se representan en azul y gris, el DNA en amarillo y la Lys138 y la Lys241 en granate y rosa respectivamente. La figura fue creada con el programa PyMOL (<http://www.pymol.org>).

En la figura 20A se observa como ambos mutantes procesan el sitio AP natural del oligonucleótido representado en el panel superior de la figura del mismo modo que lo hace la proteína *wild-type*, lo que parece indicar que ninguna de las dos lisinas cambiadas parece ser la responsable de la actividad. Para confirmar este resultado, se llevó a cabo el ensayo de atrapamiento en presencia de NaBH_4 . Tal y como muestra la figura 20B, ambos mutantes son capaces de formar un complejo con el DNA que contiene un

sitio AP en presencia del agente reductor NaBH_4 , por lo que los residuos Lys138 y Lys241 no son los responsables de la actividad AP-liasa de *BsuKu*.

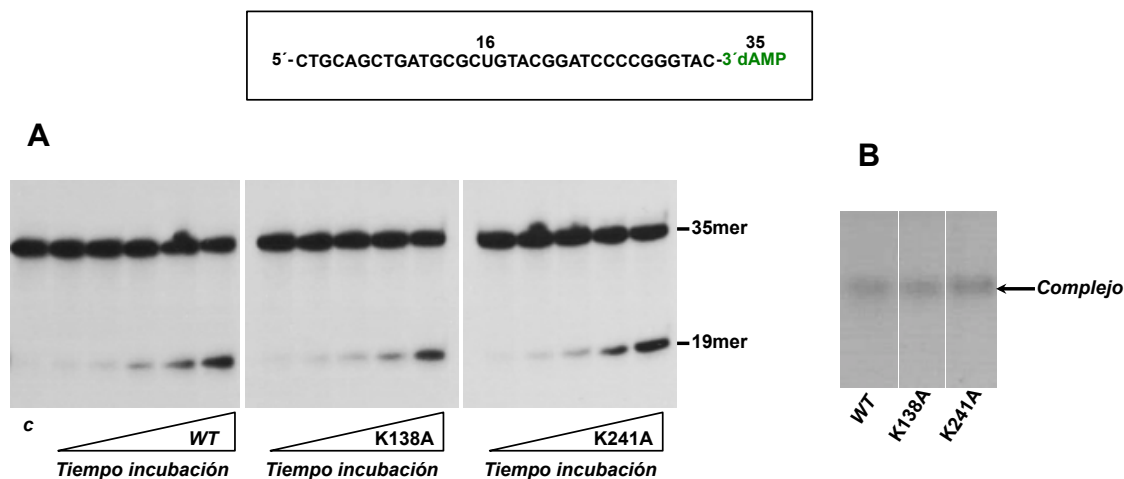


Figura 20. La Lys138 y la Lys241 de *BsuKu* no son responsables de la actividad AP-liasa de la proteína. (A) Actividad AP-liasa de los mutantes K138A y K241A de *BsuKu*. El oligonucleótido pU marcado en 3' se incubó con la UDG generándose un DNA con un sitio AP natural en posición 16 (véase Materiales y Métodos). Este sustrato se incubó con la proteína *BsuKu* *wild-type*, así como con las proteínas mutantes K138A y K241A (228 nM) durante 8, 15, 30, 60 y 120 minutos. *c*: DNA utilizado en la reacción. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indican las posiciones 35-mer (sustrato inicial) y 19-mer (producto tras la actividad AP-liasa). **(B)** Formación del complejo DNA-enzima en presencia de NaBH_4 con los mutantes K138A y K241A de *BsuKu*. El experimento se realizó como se describe en Materiales y Métodos: la reacción de formación del complejo DNA-enzima se llevó a cabo en presencia de 228 nM de cada una de las proteínas (*wild-type*, K138A y K241A) y 3,1 nM del oligonucleótido pU marcado en 3' en cuya posición 16 hay un sitio AP natural. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS y autorradiografía

5. La actividad AP-liasa de *BsuKu* puede actuar sobre sitios AP internos en moléculas de DNA sin extremos

Teniendo en cuenta la ausencia de extremos en el genoma bacteriano, el procesamiento de sitios AP por *BsuKu* requeriría la unión de la proteína a sitios internos del cromosoma. Por este motivo se analizó la potencial habilidad de *BsuKu* de unirse a un DNA carente de extremos libres. Para ello, se incubaron dosis crecientes de *BsuKu* con el plásmido pUC19 superenrollado (figura 21A). Al aumentar la dosis de proteína se observa un retraso en la movilidad electroforética del plásmido, lo cual indica que la proteína es capaz de unirse a sitios internos de la molécula de DNA. Para comprobar que esta reducción

Resultados 1

de la migración del DNA no es artefactual debida a un cambio conformacional del plásmido por roturas espontáneas ocurridas en el transcurso de la reacción, el DNA se trató posteriormente con Proteinasa K, recuperándose la movilidad original del sustrato. De la misma manera, *BsuKu* forma un complejo con DNA circular relajado (figura 21B). Estos resultados sugieren que, además del modo canónico de unión al DNA descrito, en el que *BsuKu* “enhebra” el DNA a través de su anillo central, la proteína es capaz de unir dsDNA de una manera alternativa.

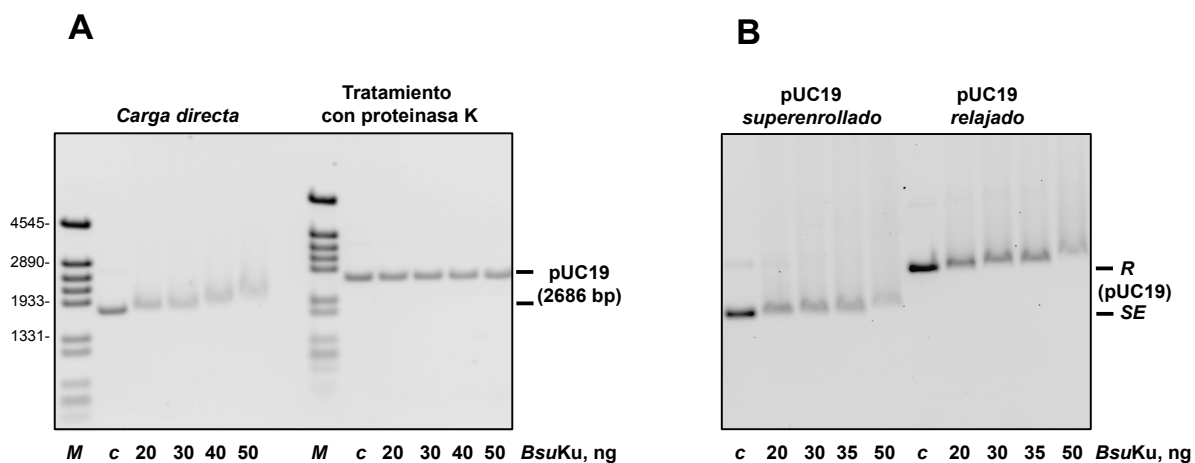


Figura 21. *BsuKu* se une a un DNA circular. (A) *BsuKu* se une al plásmido pUC19 covalentemente cerrado. Las concentraciones indicadas de *BsuKu* se incubaron con 100 ng del plásmido pUC19 superenrollado. Los productos se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Mientras que la mitad de la mezcla de incubación se cargó directamente en el gel, la otra mitad se incubó posteriormente con Proteinasa K. Tras esta digestión proteolítica las muestras se cargaron en el mismo gel. En el carril *c* se muestra la incubación del mismo DNA con 50 ng de BSA. (B) *BsuKu* se une tanto a DNA plasmídico superenrollado como relajado. El experimento se realizó esencialmente como se ha descrito en (A). SE: superenrollado; R: relajado.

Una vez determinada la capacidad de *BsuKu* de unirse a moléculas de DNA sin extremos, se estudió si la proteína podía reconocer e introducir *nicks* a través de su actividad AP-liasa en sitios AP internos en el plásmido circular pcDNA3.1 (véase Materiales y Métodos). La ausencia (pcDNA3.1) o presencia de sitios AP (pcDNA3.1-AP) en la molécula se comprobó mediante la incubación de los plásmidos con la enzima *hAPE1*. Tal y como se puede observar en la figura 22A, prácticamente todas las moléculas de pcDNA3.1-AP contienen al menos un sitio AP ya que tras el tratamiento con *hAPE1* la molécula pasa de la conformación superenrollada a la relajada. Como se muestra en la figura, *BsuKu* también relaja el plásmido pcDNA3.1-AP superenrollado, indicando que la proteína reconoce e introduce *nicks* en sitios AP internos a través de su actividad AP-liasa. La figura 22B muestra un resultado similar cuando el DNA

empleado es el plásmido pUC19. En este caso, ambas proteínas *hAPE1* y *BsuKu* hacen lineal el plásmido superenrollado, probablemente debido a la presencia de dos sitios AP muy próximos y en cadenas complementarias.

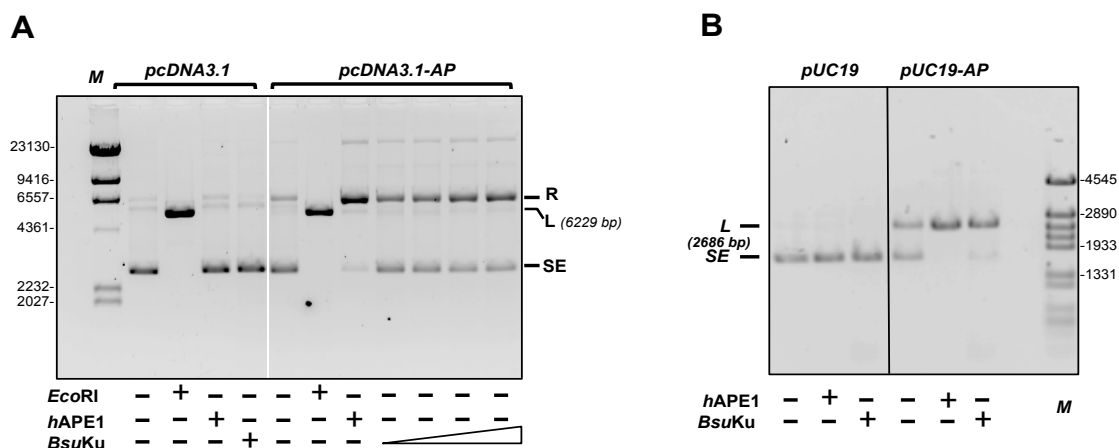


Figura 22. La actividad AP-liasa de *BsuKu* puede actuar en un DNA circular. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos incubando o 142 nM de *BsuKu* con 100 ng de plásmido sin sitios AP (pcDNA3.1) o 18, 36, 72 y 142 nM de *BsuKu* con 100 ng del plásmido que contiene sitios AP (pcDNA3.1-AP) (A). La ausencia o presencia de sitios AP en ambos plásmidos fue confirmada mediante la digestión con *hAPE1*. Como control de la forma lineal, los plásmidos se digirieron con *EcoRI*. El ensayo mostrado en (B) se llevó a cabo mediante la incubación de 100 ng de plásmido sin (pUC19) o con sitios AP (pUC19-AP) con *hAPE1* o 142 nM *BsuKu*, según se indica. SE: superenrollado; R: relajado; L: lineal.

Por otra parte, se analizó la actividad AP-liasa sobre un DNA lineal de doble cadena de 80-mer con un sitio AP en posición 40 (híbrido de los oligonucleótidos SU y SU-compl, véase Materiales y Métodos). Esta molécula está biotinilada en 3' y 5', y sus extremos permanecen bloqueados debido a la unión covalente de estreptavidina a la biotina, impidiendo que *BsuKu* se una a través de su anillo central. En las condiciones ensayadas se comprobó mediante retraso en gel que todas las moléculas de DNA estaban unidas por dos moléculas de estreptavidina (no mostrado). Los resultados mostrados en la figura 23 indican que la actividad AP-liasa de *BsuKu* es capaz de reconocer y actuar sobre el sitio AP en posición central del DNA. Este hecho sugiere que el residuo responsable de la actividad se encuentra fuera del anillo central de la enzima, tal y como está descrito para la proteína humana Ku70 (Roberts *et al.*, 2010).

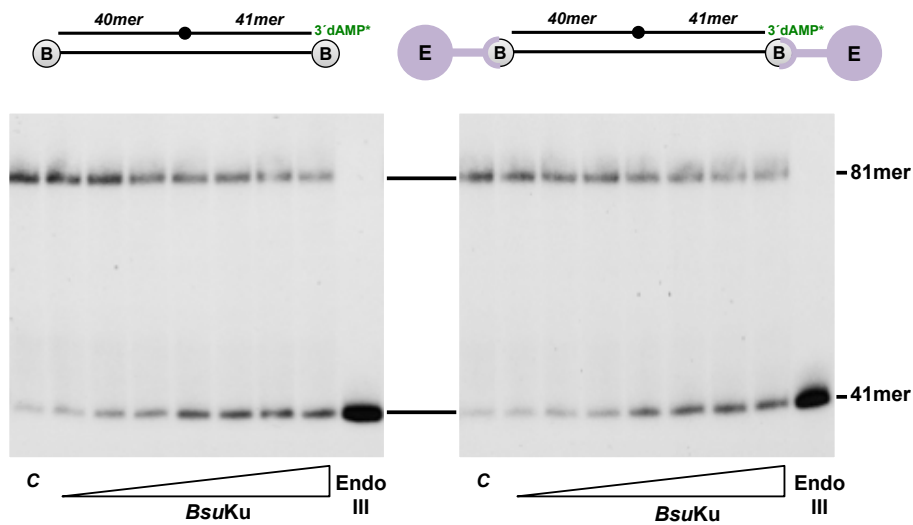


Figura 23. La actividad AP-liasa de *BsuKu* puede actuar sobre un único sitio AP interno. El oligonucleótido SU de 80-mer que posee un sitio AP en posición 40, se marcó en su extremo 3' y se hibridó al oligonucleótido complementario SU-compl, el cual está biotinilado en sus extremos 3' y 5' (véase Materiales y Métodos). El híbrido de DNA (3,2 nM) se incubó en ausencia (panel izquierdo) o presencia (panel derecho) de estreptavidina (200 nM) durante 5 minutos a 4°C. El sustrato fue posteriormente tratado con UDG para generar un único sitio AP en todas las moléculas. El DNA resultante se incubó con cantidades crecientes de *BsuKu* (0; 3,2; 6,2; 12,5; 25; 50; 100 y 200 ng) durante 1 hora a 30°C. La reacción se paró mediante la incubación con 10 µg de Proteínasa K a 50°C durante 1 hora en presencia de 0,04% de SDS. Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indican los tamaños del sustrato (81-mer) y producto (41-mer). *c*: DNA utilizado en la reacción.

6. Coordinación de la actividad AP/5'-dRP liasa de *BsuKu* y las actividades polimerasa y ligasa de *BsuLigD*

Según el modelo descrito para la ruta de NHEJ en bacterias, Ku reconoce los extremos generados tras la rotura de las dos cadenas de DNA, se une a estos y recluta a la LigD que lleva a cabo el posterior relleno de los *gaps* generados tras la sinapsis y la ligación final de los *nicks* resultantes (Brissett *et al.*, 2007; Pitcher *et al.*, 2007a; Shuman y Glickman, 2007). Para estudiar el posible papel de la actividad AP-liasa de *BsuKu* en la unión de extremos se analizó en primer lugar la capacidad del complejo *BsuKu*-LigD de unir moléculas de DNA cuyos extremos no estuvieran dañados. Para ello, se utilizó el plásmido pUC19 que mediante una digestión independiente con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *AatII* queda en su forma lineal, para obtener extremos 3'-protuberantes y recesivos, respectivamente. A la vista de la figura 24 se deduce que *BsuKu* no tiene capacidad de unir los extremos por sí misma, pero su presencia es necesaria para que *BsuLigD* lleve a cabo la reacción de unión tanto de extremos 3'-protuberantes como de 3'-recesivos, tal y como se puede deducir de la formación de dímeros.

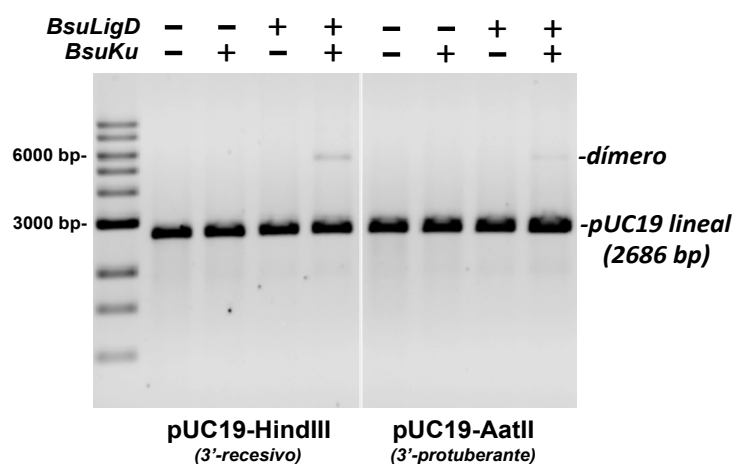


Figura 24. Unión de extremos de plásmidos lineales. El experimento se llevó a cabo tal y como se indica en Materiales y Métodos. Se incubaron 100 ng del plásmido pUC19 digerido con *HindIII* o *AatII* con 0,6 mM de $MnCl_2$ en ausencia (-) o presencia (+) de *BsuLigD* y/o *BsuKu* (142 nM) durante 60 minutos a 30°C. El resultado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Se indican las posiciones y el tamaño del marcador de DNA.

Estos datos coinciden con los publicados con las proteínas de NHEJ pertenecientes a otras especies bacterianas (Della *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006; Zhu y Shuman, 2010). Por tanto, *BsuKu* resulta imprescindible en la estabilización de *BsuLigD* en los extremos del DNA para garantizar una correcta unión de estos. En estudios previos se describió la existencia de una interacción física entre las proteínas Ku y LigD de *M. tuberculosis* en los extremos de moléculas de DNA (Weller *et al.*, 2002), de manera similar a la descrita para las proteínas eucariotas Ku-LigasaIV/XRCC4 (Nick McElhinny *et al.*, 2000). Por todo esto, se estudió si las proteínas *BsuKu* y *BsuLigD* también interaccionaban, para lo que se llevó a cabo un experimento de retraso en gel empleando como sustrato un dsDNA de 216 pb marcado radiactivamente. Como se puede observar en la figura 25, *BsuKu* forma varios complejos estables DNA-proteína, debido a su alta afinidad por el DNA, así como su capacidad de difundir a lo largo de la molécula, tal como se ha descrito para otras proteínas Ku procarióticas (de Vries *et al.*, 1989; Weller *et al.*, 2002; Downs y Jackson, 2004). *BsuLigD*, por su parte, es incapaz por sí misma de formar un complejo estable con el DNA. Sin embargo, cuando *BsuLigD* se incorpora a la reacción posteriormente a la formación del complejo *BsuKu*-DNA aparece un complejo DNA-proteína con menor movilidad electroforética al obtenido en presencia únicamente de *BsuKu*, indicando que *BsuKu* recluta a *BsuLigD* al extremo del DNA.

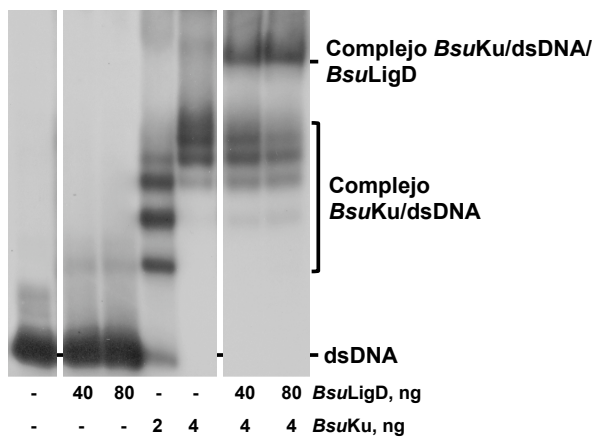


Figura 25. *BsuKu* recluta a *BsuLigD* a los extremos del DNA. Tal y como se describe en Materiales y Métodos, se incubó 1 nM de un DNA de 216 pb con las concentraciones indicadas de *BsuLigD* y *BsuKu*. Para la reacción de *supershift*, el DNA se incubó previamente con *BsuKu* para a continuación añadir las cantidades indicadas de *BsuLigD*.

Como se ha comentado anteriormente, la proteína *BsuLigD* posee un dominio DNA ligasa dependiente de ATP (de Vega, 2013). El hecho de que en la figura 24 se observe que la proteína es capaz de ligar extremos incluso en ausencia de ATP se debe a la proporción de moléculas de *BsuLigD* que ya vienen adeniladas de la bacteria de expresión, tal y como está descrito para otras DNA ligasas dependientes de ATP (Zhu y Shuman, 2005a; Nishida *et al.*, 2006; Zhu y Shuman, 2007; Nickens *et al.*, 2010; Petrova *et al.*, 2012). En la figura 26 puede observarse que la cantidad de producto de DNA ligado en ausencia ATP aumenta de manera lineal en función de la cantidad de proteína que se añada en la reacción. La pendiente de la curva de titulación indica que se ligan 0,37 fmol del sustrato de DNA (una molécula con un *nick*) por cada fmol de *BsuLigD*. Teniendo en cuenta que la ligación dependiente de ATP es una reacción de único recambio (es decir, una vez que la reacción ha tenido lugar, la ausencia de ATP exógeno impide que esa molécula de LigD lleve a cabo otra reacción de ligación), se estimó que el 37% de las moléculas de la *BsuLigD* purificada contenían AMP unido covalentemente al sitio activo, una proporción similar a la descrita para otras LigDs (Zhu y Shuman, 2005a).

La figura 27 refleja que la incorporación de 0,2 mM de ATP a la reacción estimula la formación de dímeros, trímeros e incluso tetrámeros (en el caso del DNA de extremos romos producidos por la digestión del plásmido pUC19 con la endonucleasa de restricción *SmaI*). Además, bajo estas condiciones experimentales, el complejo *BsuKu*-LigD provoca eventos de ligación intramoleculares, tal y como se puede deducir de la formación de monómeros circulares.

Una vez establecido que el complejo *BsuKu*-LigD era capaz de llevar a cabo la ligación entre moléculas con extremos complementarios, se analizó si también podría unir sustratos 3'-protuberantes procedentes de moléculas de DNA independientes que diesen lugar a un intermediario sináptico tipo *gap* (Brissett *et al.*, 2013). Para ello se incubaron dos moléculas de DNA con extremos 3'-protuberantes y que difieren en el nucleótido adyacente al grupo 5'-P, con el complejo *BsuKu*-LigD, tal y como muestran los esquemas superiores de la figura 28. Las condiciones del experimento se ajustaron para evitar la autoliga-

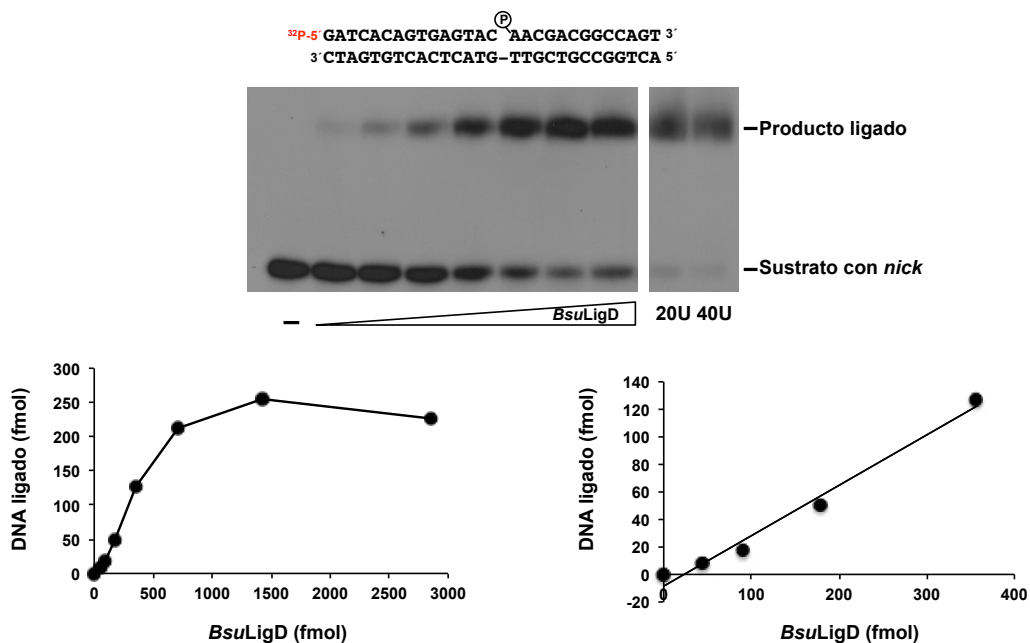


Figura 26. Reacción de ligación por *BsuLigD* independiente de ATP. Se incubaron 300 fmol del híbrido de DNA que contiene un *nick* (híbrido con los oligonucleótidos sp1, p-Dws y sp1c+13, véase Materiales y Métodos) (esquema superior de la figura) con concentraciones crecientes de *BsuLigD* (45, 89, 179, 357, 714, 1.428 y 2.845 fmol) durante 6 horas a 30°C, tras lo cual se paró la reacción con 10 mM de EDTA. Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Para determinar la proporción del sustrato que permanecía sin ligar se incubó el DNA durante 3 horas a 37°C con 20 o 40 U de la DNA ligasa de T4 en su tampón de reacción correspondiente. La proporción de las moléculas de *BsuLigD* que están adeniladas se estimó a partir de la pendiente (panel inferior derecho) de la curva de titulación (panel inferior izquierdo).

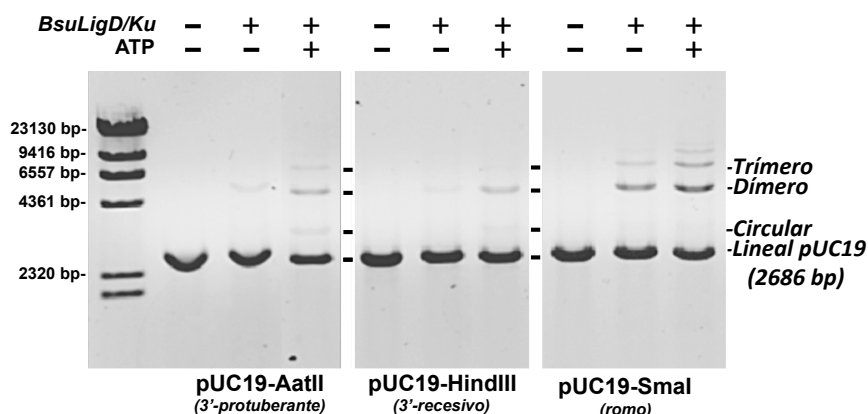


Figura 27. Efecto del ATP en la unión de extremos de DNA de plásmidos lineales. El experimento fue llevado a cabo como se indica en el pie de la figura 24. Se incubaron 142 nM de *BsuLigD* y *BsuKu* en ausencia y presencia de 0,2 mM de ATP. Se indican las posiciones y el tamaño del marcador de DNA.

Resultados 1

ción de las moléculas marcadas (véase Materiales y Métodos). En la figura 28 se observa que la extensión del extremo 3' de la cadena marcada sólo ocurre en presencia del NTP complementario al nucleótido adyacente al extremo 5'-P de la molécula no marcada. La presencia necesaria de *BsuKu* en la reacción (no mostrado) indica que la sinapsis entre las dos moléculas ha tenido lugar. Tras la incorporación del nucleótido complementario, la actividad ligasa de *BsuLigD* sella el *nick* resultante, dando lugar al producto reparado (ligado). Este resultado demuestra la capacidad del complejo *BsuKu-LigD* de unir moléculas de DNA parcialmente complementarias que forman un complejo sináptico tipo *gap* que es rellenado y ligado por las actividades polimerasa y ligasa de *BsuLigD*, imitando una reacción de reparación de una DSB.

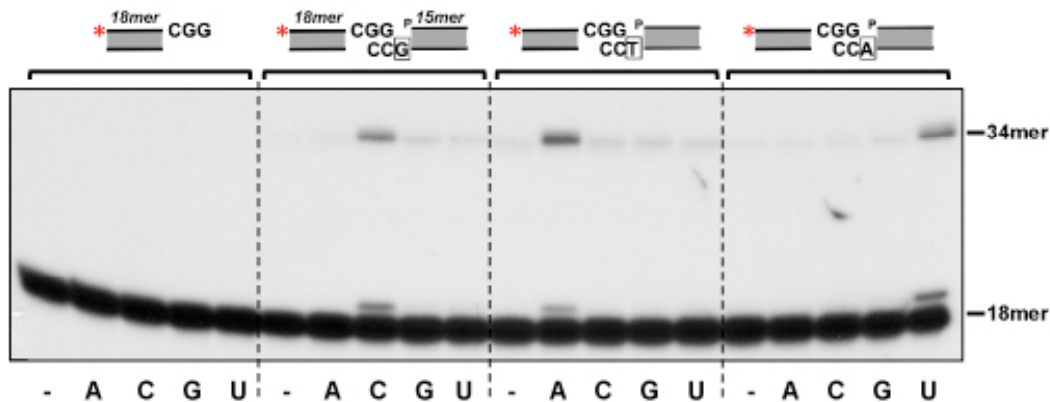


Figura 28. Unión de extremos de DNA 3'-protuberantes parcialmente complementarios. Se incubó 1,25 nM del híbrido marcado en 5' (sp1CGG/sp1c, véase Materiales y Métodos) representado en la parte superior de la figura, en presencia de 71 nM de la *BsuLig* y de *BsuKu*, 0,6 mM de $MnCl_2$, 2,5 nM de los híbridos no marcados mostrados en la parte superior de cada panel [sp1GCC/sp1c(p), sp1TCC/sp1c(p), sp1ACC/sp1c(p)] y 100 nM del NTP indicado. Las tres moléculas de DNA *downstream* solo difieren entre sí en el nucleótido marginal señalado con un cuadrado en cada caso. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, los productos de elongación y ligación se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. El asterisco rojo indica el extremo 5' marcado de la cadena del *primer*.

Posteriormente se analizó la capacidad de *BsuKu* de incidir sobre sitios AP próximos a los extremos de moléculas de DNA. Tal y como se muestra en la figura 29, *BsuKu* introduce un *nick* de manera eficiente sobre sitios AP que se encuentran en un extremo 5'-protuberante, generando extremos 5'-P que podrían ser posteriormente ligados. Sin embargo, cuando el sitio AP se encuentra en un extremo 3'-protuberante la actividad no es detectable, de la misma manera que ocurre en el caso de la proteína Ku humana (Strande *et al.*, 2012).

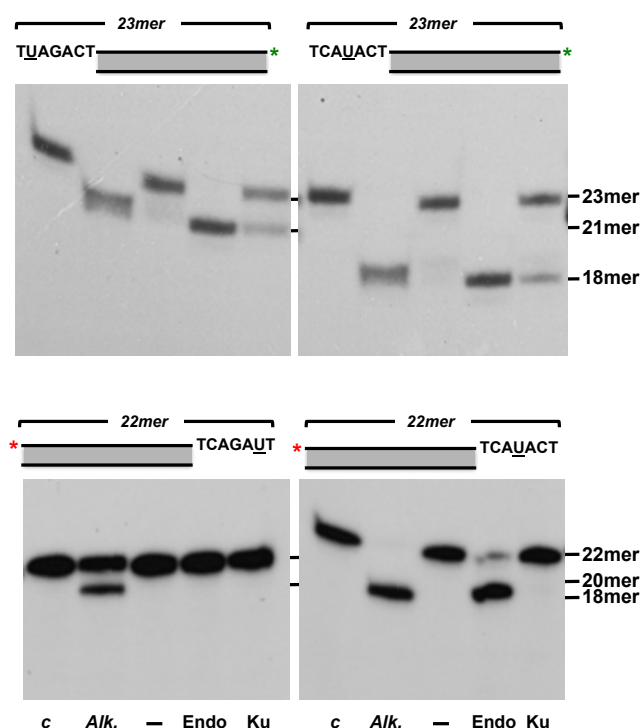


Figura 29. Actividad AP-liasa de *BsuKu* sobre sustratos con extremos protuberantes. Se incubaron distintos sustratos portadores de una 2'-desoxiuridina en posición variable próxima al extremo 5' o 3' (híbridos U2/sp1c y U4/sp1c, y U19/sp1c y U21/sp1c, respectivamente, véase Materiales y Métodos) con la UDG. Estos sustratos se incubaron con la EndoIII (2 U) o con *BsuKu* (142 nM) durante 30 minutos a 30°C. Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Los asteriscos rojos y verdes indican el marcaje radiactivo en el extremo 5' y 3' del sustrato, respectivamente. Se indican los tamaños de los productos obtenidos. *c*: DNA utilizado en la reacción. *Alk.*: hidrólisis alcalina del DNA tratado con la UDG.

Una vez descrita la capacidad de complejo *BsuKu*-LigD de unir intermolecularmente moléculas de DNA sin daño en sus extremos protuberantes, se quiso analizar si el sistema podría unir sustratos que contuvieran sitios AP próximos a sus extremos 5'-protuberantes (véase el esquema en la figura 30). La molécula *downstream A*, marcada en su extremo 3', presenta un sitio AP (indicado con un círculo negro) próximo al extremo 5'-protuberante, el cual es parcialmente complementario a los sustratos *upstream* no marcados *D* y *E* (véase respectivamente las partes izquierda y derecha del esquema de la figura 30). Solo cuando una actividad AP-liasa incide sobre el sitio AP de la molécula *A*, la molécula resultante, *B*, tendrá un extremo 5'-protuberante que podrá establecer una sinapsis con las moléculas *D* y *E*, para dar lugar a una molécula con un *nick* (figura 30, izquierda) o un *gap* de un nucleótido (figura 30, derecha), respectivamente.

En la figura 31 se muestra cómo *BsuKu* reconoce e incide en el sitio AP de la molécula *A* (23-mer) dando lugar a la molécula *B* de 19-mer (carril b) que no es utilizado como sustrato autoligable por *Bsu*-LigD (carril c). Por el contrario, cuando se adicionan simultáneamente a la reacción las moléculas *A* y o bien *D* o *E* se observa la aparición de un producto de 34-mer, resultado del corte de *A* por *BsuKu*, la sinapsis con *D* o *E* y la ligación final por *BsuLigD*. Es importante destacar que cuando la molécula *E* es usada como sustrato *upstream* se requiere el relleno del *gap* de un nucleótido resultante tras la sinapsis antes de la ligación (ambas actividades, polimerización y ligación, son realizadas por *BsuLigD*) (carriles g, h, i).

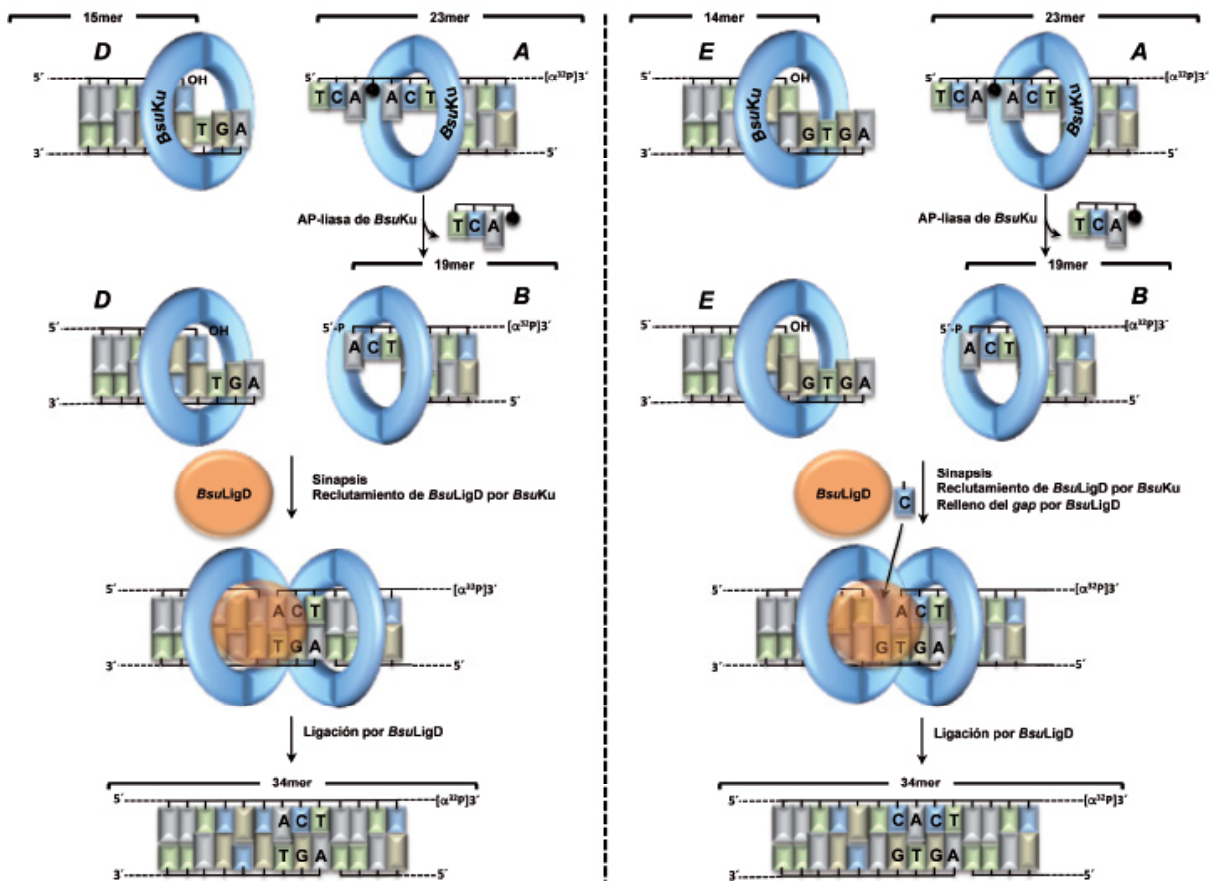


Figura 30. Representación esquemática de la unión de sustratos de DNA con sitios AP próximos al extremo 5'. El sustrato *A* de 23-mer (obtenido mediante la hibridación de los oligonucleótidos U4 y sp1cddC para dar lugar a una estructura con un extremo 5'-protuberante, véase Materiales y Métodos) presenta un sitio AP (representado como un círculo de color negro) próximo a su extremo 5'. Los sustratos *D* y *E* (obtenidos al hibridar el oligonucleótido U4c con sp1c o sp1c-1, respectivamente, véase Materiales y Métodos) poseen una región 5'-protuberante parcialmente complementaria a la región 5'-protuberante del sustrato *A*. Tras la actividad AP-liasa de *BsuKu* sobre el sustrato *A* se genera el sustrato *B*, cuya zona 5'-protuberante resultante es complementaria a la región 5'-protuberante de *D* (generándose un *nick* que habrá de ser sellado por *BsuLigD*) y a la de *E* (generándose un *gap* de un nucleótido que deberá ser rellenado y ligado por *BsuLigD*).

Los sitios AP son lesiones muy frecuentes en el DNA que pueden generar DSBs cuando ocurren en posiciones próximas en las dos cadenas, como consecuencia de su hidrólisis por las AP-endonucleasas, tal y como se ha observado en estudios realizados en *E. coli* y en células de mamíferos (Dianov *et al.*, 1991; D'souza y Harrison, 2003; Malyarchuk *et al.*, 2008). Por lo tanto, analizamos *in vitro* la capacidad del complejo *BsuKu-LigD* en la unión de ese tipo de moléculas. Como se puede observar en la figura 32, cuando el sitio AP de la molécula *A* es hidrolizado por una AP-endonucleasa (carril a), el grupo 5'-dRP resultante es eliminado por *BsuKu* (carriles b, d, f) para permitir el paso de ligación final por *BsuLigD* (carriles d, g, h). De nuevo, para llevar a cabo la ligación final con el sustrato *downstream E*, es necesario

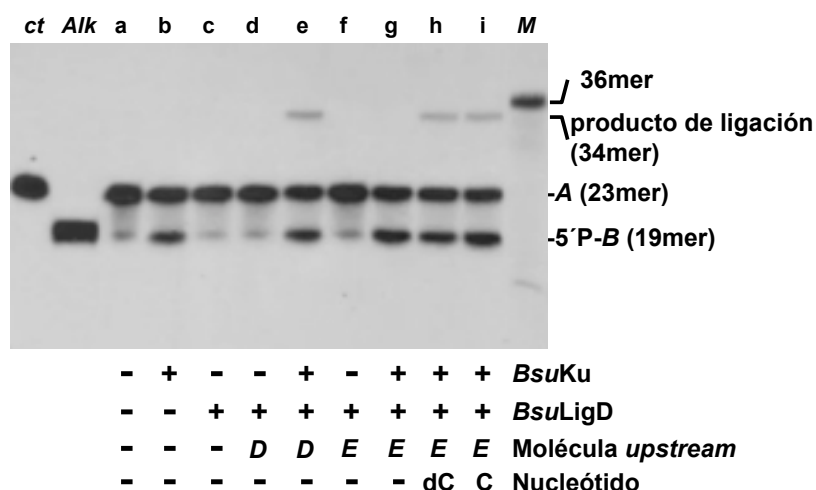


Figura 31. Unión de moléculas de DNA parcialmente complementarias con sitios AP próximos al extremo 5'. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos incubando 0,7 nM del sustrato *A* marcado en 3' (véase la figura 30) y, cuando se indica 114 nM de *BsuKu*, 114 nM de *BsuLigD*, 10 μ M del nucleótido indicado y 1 nM de la molécula upstream *D* o *E* (véase la figura 30), durante 30 minutos a 30°C. Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía (*M*: oligonucleótido de 36-mer utilizado como marcador de tamaño; *ct*: migración del DNA tras la incubación con la UDG; *Alk.*: hidrólisis alcalina del DNA tratado con la UDG).

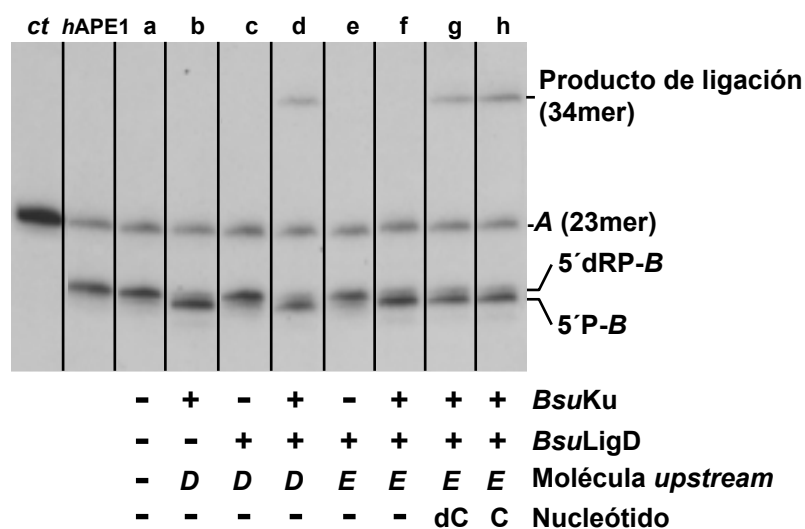


Figura 32. Unión de extremos con una molécula de DNA downstream que contiene un extremo 5'-dRP protuberante. El ensayo se realizó tal y como se detalla en Materiales y Métodos: 0,7 nM de la molécula *A* (véase la figura 30) se incubó con la *hAPE1* generándose un extremo 5'-dRP protuberante. Este sustrato se incubó, tal y como se indica, en presencia de 114 nM *BsuKu*, 114 nM de *BsuLigD*, 10 μ M del nucleótido indicado y 1 nM de las moléculas upstream *D* o *E* (véase la figura 30) durante 30 minutos a 30°C. Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. *ct*: migración del DNA tras la incubación con la UDG. La figura es una imagen compuesta a partir de diferentes partes del mismo experimento.

Resultados 1

rellenar previamente el *gap* resultante tras la sinapsis (comparar carril f con los carriles g, h). Estos resultados sugieren que el complejo *BsuKu-LigD* tiene la capacidad potencial de reparar DSBs generados como consecuencia de la hidrólisis endonucleolítica de sitios AP dispuestos en *clusters* después de la germinación de la espora.

Los resultados recogidos en este capítulo demuestran la inesperada presencia de una actividad AP/5'-dRP liasa en un factor Ku bacteriano. Su capacidad para actuar sobre ssDNA, moléculas con *nicks*, o sobre sustratos circulares, así como su coordinación funcional con una AP-endonucleasa y con *BsuLigD*, indica que esta proteína podría ser capaz de cooperar en el procesamiento de sitios AP durante la NHEJ. Además, hemos demostrado como esta actividad no es específica de *BsuKu* sino que también está presente en la proteína Ku de la bacteria Gram-negativa *P. aeruginosa*, filogenéticamente muy distante a la Gram-positiva *B. subtilis*.

Capítulo 2

Identificación de una actividad 5'-dRP liasa conservada en Ligasas D bacterianas

Los sitios AP son lesiones muy frecuentes en el DNA y su reparación está a cargo de la vía BER. Las AP-endonucleasas reconocen los sitios AP e hidrolizan el enlace fosfodiéster en 5'. Como consecuencia de esta hidrólisis, se generan *gaps* de un nucleótido flanqueados por extremos 3'-OH y 5'-dRP, teniendo que ser estos últimos procesados para regenerar un grupo 5'-P para que, una vez que el *gap* haya sido rellenado por una actividad polimerasa, el *nick* resultante pueda ser sellado de modo que el daño quede reparado. Tal y como está descrito, la reparación de los sitios AP que se hayan ido acumulando en la espora de *B. subtilis* requiere de la actividad de AP-endonucleasas específicas (Salas-Pacheco *et al.*, 2003; Urtiz-Estrada *et al.*, 2003; Salas-Pacheco *et al.*, 2005). Este hecho sugiere que debe existir una vía BER activa durante la germinación y posterior crecimiento de la espora. Para ello, además de una actividad AP endonucleasa, deberían existir una actividad de polimerización para rellenar el *gap*, una actividad 5'-dRP liasa para eliminar el grupo 5'-dRP y finalmente una actividad DNA ligasa para sellar el *nick*. Si bien la LigD se ha implicado fundamentalmente en la reparación de DSBs producidos en la espora, al menos posee dos de las actividades, polimerización y ligasa, requeridas en BER. En este capítulo se estudia la capacidad de *BsuLigD* de participar *in vitro* en la reparación de sustratos portadores sitios AP mediante la generación de intermedios de reparación tipo BER.

1. *BsuLigD* es capaz de eliminar un grupo 5'-dRP

Estudios previos demostraron que *BsuLigD* es capaz de reconocer específicamente el grupo 5'-P de la cadena *downstream* en *gaps* cortos de uno o dos nucleótidos y a continuación llevar a cabo el relleno del mismo con su actividad de polimerización y el sellado del *nick* resultante con su actividad DNA ligasa (de Vega, 2013). Puesto que *BsuLigD* se expresa durante la esporulación (Wang *et al.*, 2006), se evaluó *in vitro* su papel potencial en la reparación de sustratos intermediarios de BER. En primer lugar se analizó la capacidad de *BsuLigD* de llevar a cabo el relleno del *gap* en un intermedio de BER, el cual está flanqueado por un 3'-OH y un 5'-dRP, tal y como se ha mencionado. Para ello, se incubó un dsDNA de 34-mer marcado en 5', en cuya posición 16 contiene una 2'-desoxiuridina (véase el panel superior y el carril *a* de la figura 33A) con la UDG. Posteriormente se incubó con la *hAPE1* que hidroliza el enlace fosfodiéster 5' al sitio AP, dando lugar a una molécula portadora de un extremo 5'-dRP opuesto a un dGMP en la cadena molde (carril *b*, Figura 33A). Como se puede observar, *BsuLigD* catalizó la adición dirigida por molde tanto de dCMP (carril *e*) como de CMP (carril *f*) extendiendo el 75% y 90% de las moléculas del *primer*, respectivamente, discriminando en la inserción de ddCMP (carril *d*; 29% de las moléculas de *primer* elongadas) debido a que en este caso desaparecen los contactos directos y mediados por agua entre la proteína y los grupos O2' y O3' de la ribosa (Zhu *et al.*, 2006). Como se puede observar, además del producto +1 (16-mer) esperado tras la inserción del nucleótido, la enzima generó un producto de 34-mer

Resultados 2

en presencia de CTP (correspondiente al 33% de las moléculas *primer*). En este caso se puede descartar que ese producto sea consecuencia de la ligación directa del extremo 3'-OH al 5'-dRP ya que en ausencia de nucleótido (carril *c*) no hay producto de ligación, lo que podría sugerir que *BsuLigD* sería capaz de eliminar el grupo 5'-dRP, y ligar el extremo 3'-OH del *primer* elongado al extremo 5'-P recién generado.

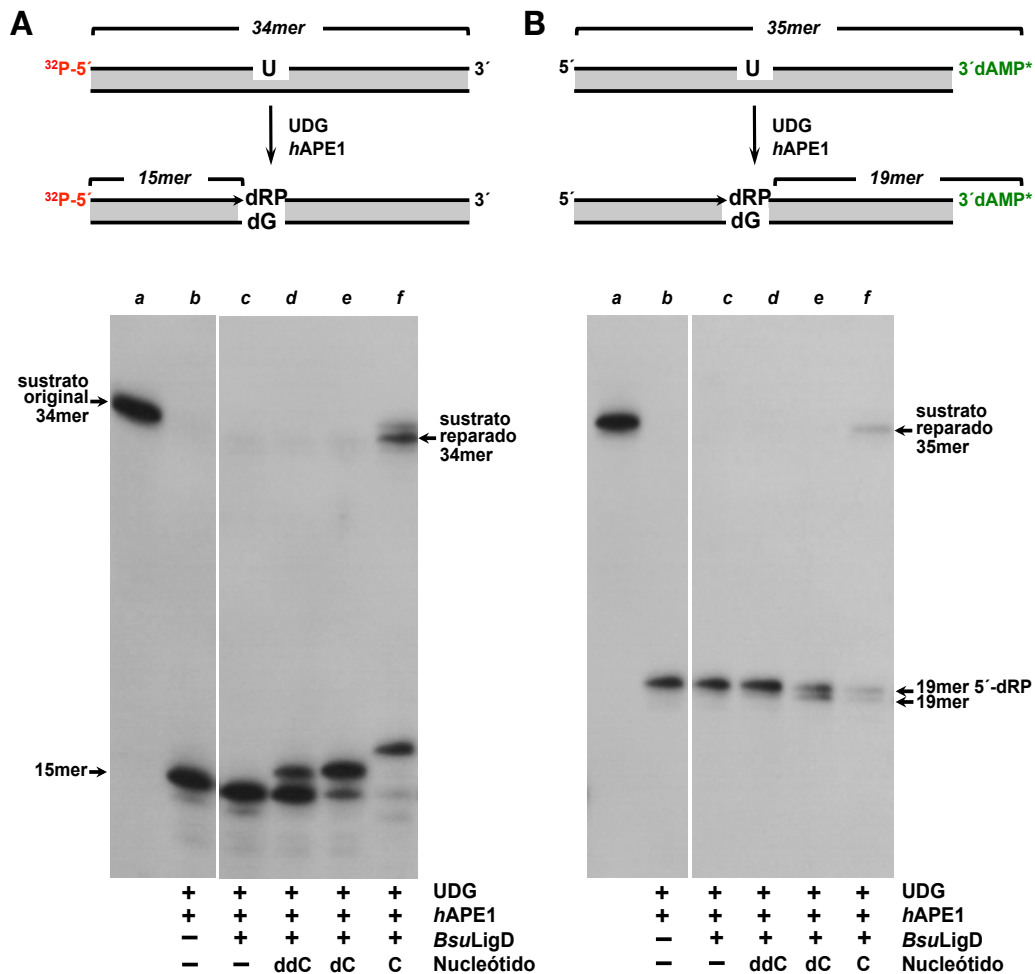


Figura 33. *BsuLigD* lleva a cabo la reparación completa de un sustrato intermediario de BER. *Parte superior:* representación esquemática de la formación de un sustrato de BER (obtenido mediante la hibridación del oligonucleótido pU a su complementario pG, véase Materiales y Métodos) en el que se indican los tamaños del sustrato original [a la izquierda, marcado en su extremo 5' con ³²P-ATP (en rojo); a la derecha, marcado en 3' con ³²P-cordicepina (verde)] y de los productos obtenidos tras la incubación con las enzimas UDG y hAPE1. *Parte inferior:* autorradiografías que muestran la capacidad de *BsuLigD* de reparar un intermediario de BER. Los experimentos se realizaron tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Cuando se indica, las reacciones se incubaron en presencia de 57 nM *BsuLigD* y o 300 μM ddCTP, 10 μM dCTP o 10 μM CTP. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. La figura es una imagen compuesta a partir de diferentes partes del mismo experimento.

Para comprobar la hipótesis mencionada anteriormente, se llevó a cabo el mismo tipo de experimento pero en este caso el sustrato de dsDNA de 34-mer indicado fue marcado previamente en su extremo 3' (véase el panel superior y carril *a* de la figura 33B). El grupo 5'-dRP resultante tras la incubación con las enzimas UDG y *h*APE1 permaneció estable durante todo el ensayo (carril *b*, figura 33B). Como se observa en la figura 33B, una vez que el *gap* se ha rellenado tras la adición de dCMP (carril *e*) o CMP (carril *f*), *BsuLigD* escinde el 47% y 68%, respectivamente de los grupos 5'-dRP, eliminación que es detectada por una disminución del tamaño del sustrato marcado (19-mer 5'-P) de acuerdo con la presencia de una actividad 5'-dRP liasa en la enzima. Además, el relleno del *gap* con CMP permitió la ligación final del *nick* (49% de las moléculas 19-mer 5'-P) dando lugar a un producto reparado de 35-mer. Es importante indicar que el marcaje en 3' de la molécula permite descartar que este producto de ligación sea consecuencia de la elongación completa del *primer*. Esto muestra la propensión de *BsuLigD* de sellar *nicks* en cuyo extremo 3' hay un NMP, lo cual, tal y como se ha mencionado en la Introducción, es una característica propia de las ligasas bacterianas de NHEJ (Zhu y Shuman, 2008; Shuman, 2009).

A la vista de los resultados mostrados en la figura 33, se puede deducir que *BsuLigD* es capaz de rellenar el *gap* restaurando el nucleótido original, lo cual revela una nueva actividad en la proteína: la capacidad de eliminar un grupo 5'-dRP para generar un *nick* flanqueado por extremos 3'-OH y 5'-P, que podrá ser ligado posteriormente con la actividad ligasa de la enzima. Es importante destacar que, a diferencia de lo que ocurre en otras polimerasas implicadas en la ruta BER, como Pol β (Matsumoto y Kim, 1995), ι (Bebenek *et al.*, 2001), λ (García-Díaz *et al.*, 2001) y θ (Prasad *et al.*, 2009) que pueden eliminar el grupo 5'-dRP en ausencia de nucleótido (es decir, no requieren, al menos *in vitro*, rellenar el *gap* previamente), *BsuLigD* es incapaz de escindir directamente el grupo 5'-dRP (figura 33B, carril *c*). El requerimiento del paso previo de relleno del *gap* parece indicar que el sustrato óptimo para esta actividad precisa que el extremo 3'-OH *upstream* esté adyacente al último enlace fosfodiéster de la cadena *downstream*. Esta hipótesis explicaría la baja actividad de *BsuLigD* sobre el grupo 5'-dRP en presencia de ddCTP (<9%, carril *d* de la figura 33B) que podría deberse a la ineficiente elongación del *primer* con este nucleótido (figura 33A, carril *d*).

Por otra parte, *BsuLigD* no es capaz de ligar directamente un 3'-OH y un 5'-dRP (véase el carril *c* de la figura 33B), resultado que difiere con los descritos para otras ligasas dependientes de ATP, como la del bacteriófago T4, que puede llevar a cabo esta reacción regenerándose un sitio AP, que tendría que ser posteriormente procesado por actividades AP-lisasas o AP-endonucleasas (Boghenhagen y Pinz, 1998).

2. *BsuLigD* escinde los grupos 5'-dRP mediante un mecanismo de β -eliminación

En los experimentos mostrados en la figura 33 se requería la presencia de iones Mn^{2+} en la mezcla de reacción para que *BsuLigD* llevase a cabo el paso del relleno del *gap*, lo que no permitía analizar si la eliminación del 5'-dRP era dependiente de cationes divalentes.

Para analizar si la presencia de metal era necesaria en la escisión del grupo 5'-dRP, se llevaron a cabo experimentos similares usando como sustrato un DNA que imita el paso previo a la eliminación del 5'-dRP, con el extremo 3'-OH de la cadena *upstream* adyacente al enlace fosfodiéster entre el penúltimo nucleótido en 5' y el grupo 5'-dRP de la cadena *downstream* (véase el esquema en la parte superior izquierda de la figura 34). En estas condiciones, se observa que la ausencia de cationes divalentes no impide que *BsuLigD* escinda el grupo 5'-dRP (figura 34, carril *c*), lo cual indica que la reacción ocurre de manera independiente de metal. Sin embargo, aunque sea innecesaria, la adición de Mn^{2+} a la mezcla de reacción estimula la actividad 5'-dRP liasa de *BsuLigD* (Figura 34, carril *d*), lo cual puede deberse a que la presencia de este ión metálico [que es el catión preferente para *BsuLigD* en sus actividades de ligación y polimerización (de Vega, 2013)] estabilizaría la unión de la proteína al sustrato, tal y como se ha descrito para la actividad 5'-dRP liasa de Pol β (Matsumoto y Kim, 1995; Prasad *et al.*, 1998). El producto de DNA de 34-mer que se observa en la figura 34 (carril *d*) no se hidroliza cuando se incuba la mezcla posteriormente con NaOH, (carril *e*) lo cual indica que el producto reparado no se debe a la ligación directa de la cadena *upstream* al grupo 5'-dRP. Cuando se realizó el ensayo con un sustrato similar pero que posee un ddNMP en el extremo 3' de la cadena *upstream* (figura 34, panel derecho) se obtuvieron resultados similares. Como era de esperar, en este caso no se observa un producto de ligación. Estos resultados indican que la actividad 5'-dRP liasa no es resultado del ataque en línea del grupo 3'-OH al último enlace fosfodiéster, como ocurre en las DNA ligasas (Shuman, 2009).

Las DNA polimerasas β , ι , λ , θ , γ y Rev1 liberan el grupo 5'-dRP mediante una β -eliminación, reacción que implica la formación de una base de Schiff con el sitio AP que permite catalogar la actividad como 5'-dRP liasa (Matsumoto y Kim, 1995; Longley *et al.*, 1998; Bebenek *et al.*, 2001; García-Díaz *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2009, 2016). Para analizar si, del mismo modo, *BsuLigD* escinde el 5'-dRP mediante una β -eliminación, se empleó el agente reductor $NaBH_4$, que reduce la base de Schiff para dar lugar a un complejo covalente entre el DNA y la enzima que puede detectarse por autorradiografía (puesto que el DNA está marcado radiactivamente) tras la separación en electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS. Tal y como puede observarse en la figura 35A, *BsuLigD* forma un complejo estable con el DNA de 19-mer marcado en 3' y portador de un grupo 5'-dRP, para lo cual es necesario tanto la presencia de un sitio 5'-dRP en el DNA como la adición a la mezcla de reacción de $NaBH_4$. Estos resultados indican que *BsuLigD* lleva a cabo la escisión del grupo 5'-dRP mediante un mecanismo de β -eliminación. Cuando

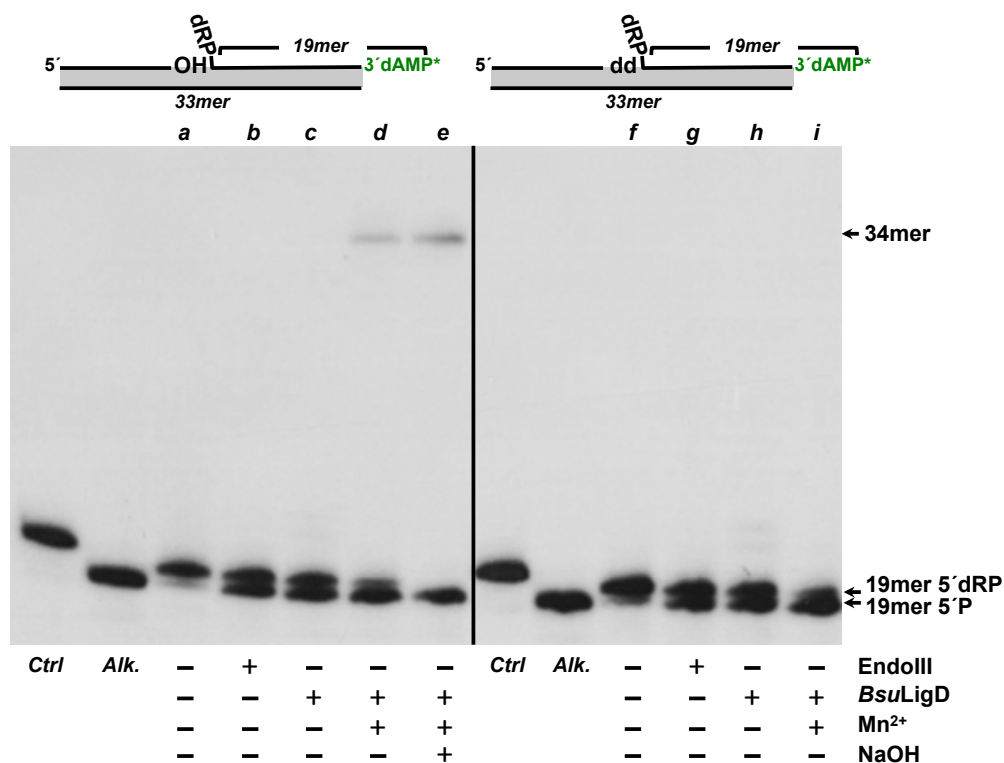


Figura 34. *BsuLigD* escinde el grupo 5'-dRP de manera independiente de metal. *Parte superior:* representación esquemática de los sustratos empleados en el experimento, los cuales corresponden a un *gap* relleno con un grupo 5'-dRP desplazado en la molécula *downstream* (marcada en 3') y o bien un hidroxilo (izquierda) o un dideoxi- (derecha) en el extremo 3' del sustrato *upstream* (híbridos con los oligonucleótidos *upstream* sp1c o sp1cddC, respectivamente, *downstream* Ph-U1, y molde comp-sp1c/U4a, véase Materiales y Métodos). *Parte inferior:* autorradiografía que muestra la eliminación del grupo 5'-dRP por *BsuLigD*. Las reacciones se llevaron a cabo como se ha descrito en Materiales y Métodos, en presencia de 3,5 nM de EndoIII (carriles *b*, *g*) o 57 nM de *BsuLigD* (carriles *c*, *d*, *e*, *h*, *i*). Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *Alk.*, hidrólisis alcalina del grupo 5'-dRP. Los carriles *a* y *f* muestran el sustrato original; carriles *c* y *h*: las reacciones se realizaron en ausencia de metal; carriles *d* e *i*: las reacciones se realizaron en presencia de 0,64 mM MnCl₂; carril *e*: la reacción se llevó a cabo en presencia de 0,64 mM MnCl₂ y posteriormente se incubó con NaOH. El carril indicado como *Ctrl* corresponde al control del DNA empleado en el experimento antes de comenzar la reacción. La figura es una imagen compuesta a partir de diferentes partes del mismo experimento.

se incubaba *BsuLigD* con trombina (figura 35B), proteasa que elimina el *tag* de seis histidinas presente en el extremo N-terminal de la proteína, el complejo DNA-enzima presenta una mayor movilidad electroforética, cambio que también se observa en la proteína purificada. Esto permite descartar que la actividad observada sea debida a la presencia de un contaminante de la bacteria de expresión *E. coli*.

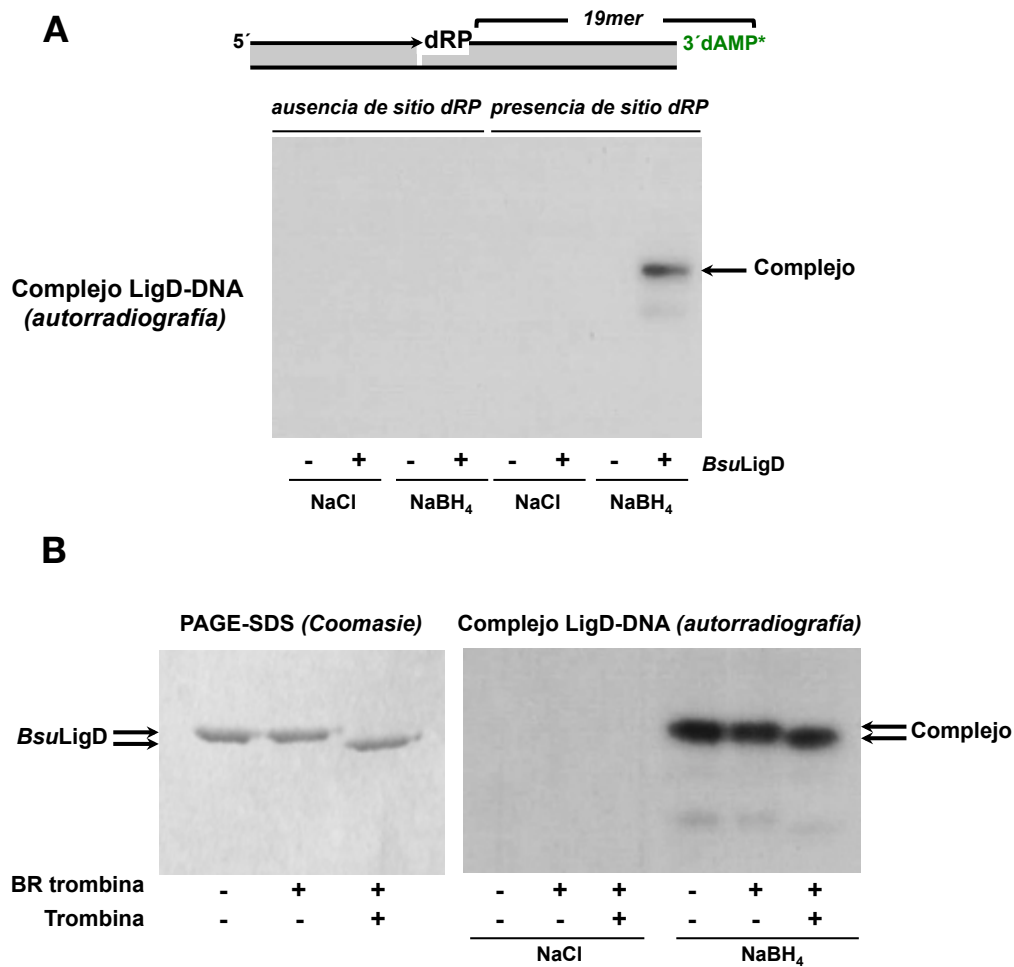


Figura 35. Formación de complejos *BsuLigD*-DNA. (A) La formación del complejo es dependiente de la presencia de un sitio AP y la adición de NaBH₄. La reacción se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos, incubando 95 nM de *BsuLigD* con 2,6 nM del sustrato marcado en 3' que se indica en la parte superior de la figura, (obtenido hibridando el oligonucleótido pU a su complementario pG) sin tratar (DNA sin 5'-dRP) o tratado (DNA con 5'-dRP) con UDG y *hAPE1*, en presencia de 10 μM CTP, 0,64 mM MnCl₂ y 100 mM NaCl o NaBH₄, según se indica. Se muestra la autorradiografía del complejo proteína-DNA correspondiente tras la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS. (B) El complejo con el DNA observado corresponde a *BsuLigD*. El experimento se realizó como se ha indicado en (A), incubando 95 nM de *BsuLigD* con el sustrato marcado en 3' indicado en la parte superior de la figura e incubado previamente con UDG y *hAPE1*. En el panel de la izquierda se observa la tinción de Coomassie tras la separación electroforética de la proteína *BsuLigD* purificada. El panel de la derecha muestra la autorradiografía de la formación del complejo DNA-enzima. En la figura aparecen indicadas las muestras que se incubaron con el tampón de reacción (BR) de la proteasa trombina o con 0,05 U de trombina a 20°C durante 1 hora.

La presencia de una actividad AP-liasa no enzimática se ha descrito en macromoléculas celulares básicas, tales como poliaminas, histonas y tripéptidos como Lys-Trp-Lys y Lys-Tyr-Lys (Bailly y Verly, 1988), aunque en estos casos la reacción tiene muy baja eficiencia (Lindahl y Andersson, 1972). Para determinar si la actividad observada en *BsuLigD* es efectivamente catalítica, se llevó a cabo un experimento

en condiciones de estado estacionario como está descrito (Longley *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1998). El sustrato empleado fue el híbrido de DNA que imita el paso previo a la eliminación del 5'-dRP, que posee un extremo 3'-ddNMP en la cadena *upstream* adyacente al enlace fosfodiéster entre el penúltimo nucleótido en 5' y el grupo 5'-dRP en el extremo de la cadena *downstream* (véase el esquema en la parte superior derecha de la figura 34). La K_m aparente para este DNA y la k_{cat} fueron de $2 \pm 0,65 \mu\text{M}$ y $0,88 \pm 0,17 \text{ min}^{-1}$ respectivamente (véase la figura 36). La k_{cat} de *BsuLigD* es cinco veces inferior a la obtenida con Pol β [$4,5 \text{ min}^{-1}$ (Prasad *et al.*, 1998)], pero tres veces mayor que la k_{cat} de la actividad 5'-dRP liasa de Pol γ (Longley *et al.*, 1998). Estos resultados, junto con el acoplamiento de la actividad 5'-dRP liasa a la actividad de polimerización y su aumento en presencia de iones Mn^{2+} permite concluir que la actividad 5'-dRP de *BsuLigD* es catalítica.

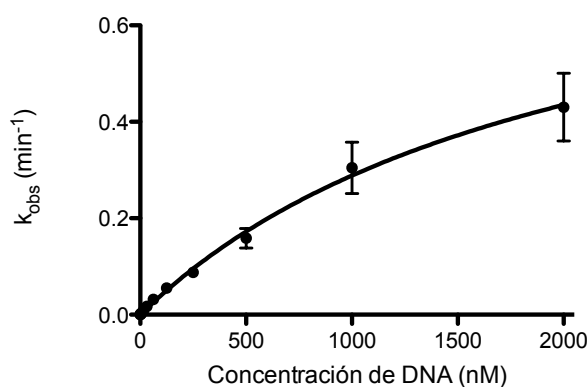


Figura 36. Análisis cinético en estado estacionario de la actividad 5'-dRP liasa de *BsuLigD*. La eliminación del grupo 5'-dRP de un sustrato marcado en 3' y conteniendo un 5'-dRP (véase Materiales y Métodos) se analizó en función de las concentraciones indicadas de sustrato tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las reacciones contenían 50 nM de *BsuLigD* y se incubaron durante 20 minutos a 30°C. Las actividades aparentes se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados. Los valores representados pertenecen a la media de tres experimentos independientes.

3. La *BsuLigD* posee actividad AP-liasa sobre sitios AP internos

Tras haber descrito la capacidad de *BsuLigD* de escindir un grupo 5'-dRP, se analizó si la proteína puede además reconocer y procesar sitios AP internos, ya que tradicionalmente las 5'-dRP liasas se consideran un subconjunto dentro de las AP-liasas (Piersen *et al.*, 2000). Para ello se empleó como sustrato un híbrido tipo *flap*, el cual aparece esquematizado en la parte superior izquierda de la figura 37, y que

Resultados 2

tiene en posición 19-mer del oligonucleótido *downstream* una 2'-desoxiuridina. Este sustrato se trató con UDG, y posteriormente con *hAPE1*, dando un producto de 16-mer con un grupo 5'-dRP, o con la EndoIII, que genera un producto con un extremo 5'-P cuya migración electroforética es mayor al obtenido tras la incubación con *hAPE*, como se ha comentado en el Capítulo 1. Tal y como muestra la figura 37 A, cuando se incuban concentraciones crecientes de *BsuLigD* con el sustrato indicado de DNA, en ausencia de cationes divalentes, se obtiene un producto con idéntica movilidad electroforética al producido por la EndoIII, consistente con una rotura del enlace fosfodiéster 3' al sitio AP independiente de metal.

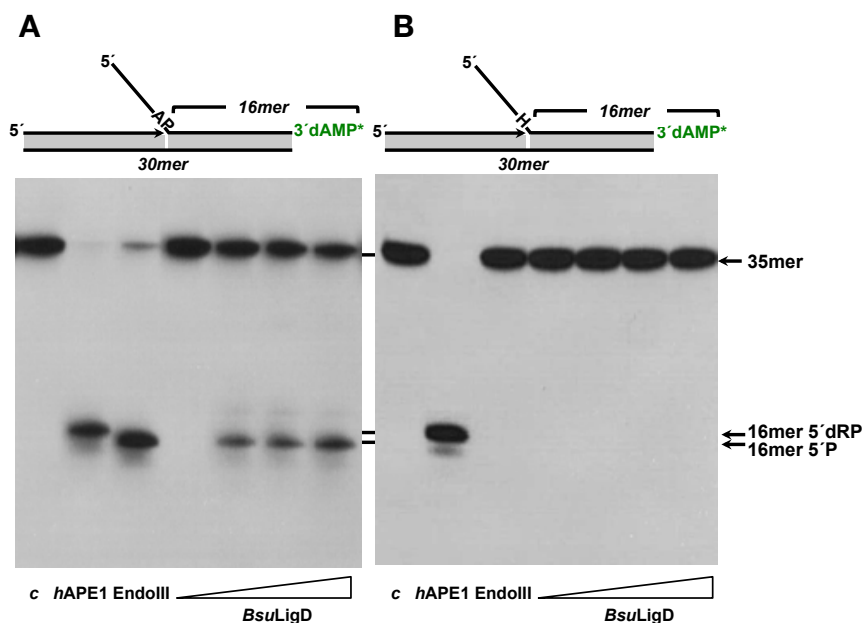


Figura 37. *BsuLigD* posee actividad AP-liasa. (A) Análisis de la capacidad de *BsuLigD* de romper el enlace fosfodiéster en un sitio AP interno. El sustrato *flap* marcado en 3' que se muestra en la parte superior de la figura (véase Materiales y Métodos) se trató con UDG (carril c), dando lugar a un sitio AP natural. La molécula de DNA resultante se incubó con 5 nM de *hAPE1*, 3,5 nM de EndoIII o con concentraciones crecientes de *BsuLigD* (0, 29, 57 y 114 nM) durante 1 hora a 30°C. Tras la incubación, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. (B) Análisis de la capacidad de *BsuLigD* de romper el enlace fosfodiéster en un THF (H) interno. En este caso el híbrido contiene el análogo THF resistente a la actividad AP-liasa, y se incubó en presencia de *hAPE1*, de EndoIII o de concentraciones crecientes de *BsuLigD*, como se ha descrito para (A). Se indican las posiciones correspondientes a los productos de 16-mer con un 5'-P o 5'-dRP. La figura es una imagen compuesta a partir de diferentes partes del mismo experimento.

Para descartar que esta actividad pueda deberse a la presencia de trazas de metal procedentes de la purificación de la proteína, *BsuLigD* se incubó durante 16 horas con concentraciones crecientes de EDTA y se ensayó con ese mismo sustrato. Como puede observarse en la figura 38, la proteína conservó una acti-

vidad a 100 mM EDTA similar a la que presenta en su ausencia, permitiéndonos concluir que la capacidad de *BsuLigD* de actuar sobre un sitio AP interno, al igual que ocurre con la actividad 5'-dRP de la proteína, es independiente de metal. Este resultado indica que *BsuLigD* tiene una actividad AP-liasa intrínseca mediante un mecanismo de β -eliminación. Para confirmar estos resultados, se realizó el experimento en condiciones idénticas, pero empleando un DNA híbrido que en la posición 19 del oligonucleótido *downstream* presenta un THF (véase el esquema superior derecho de la figura 37). En el panel derecho de la figura 37 se observa que *BsuLigD* es incapaz de introducir un *nick* sobre este sustrato, lo cual permite confirmar que la proteína lleva a cabo una reacción de β -eliminación.

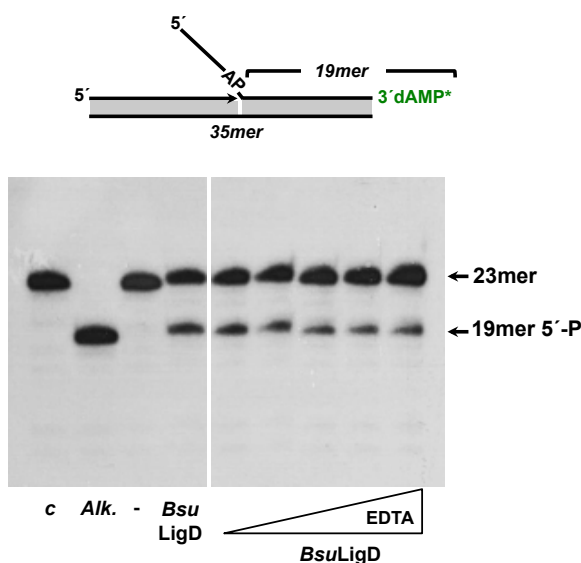


Figura 38. Actividad AP-liasa de *BsuLigD* en presencia de EDTA. El híbrido marcado en 3' mostrado en la parte superior de la figura se obtuvo como está descrito en Materiales y Métodos. Este DNA se incubó con UDG para dar lugar a una molécula con un sitio AP natural interno. El ensayo se llevó a cabo preincubando 57 nM de *BsuLigD* con concentraciones crecientes de EDTA (0; 12,5; 25; 50 y 100 mM) durante 16 horas a 4°C, tras lo cual, tanto la proteína incubada, como 57 nM de *BsuLigD* recién diluida, se incubaron con el sustrato de DNA durante 30 minutos a 30°C. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *c*: DNA de partida de la reacción *Alk.*, hidrólisis alcalina del sitio AP

4. La actividad 5'-dRP liasa está conservada en otras LigD bacterianas

Tras la identificación de una actividad 5'-dRP liasa en *BsuLigD*, se analizó si esta actividad era específica de la proteína procedente de *B. subtilis* o si por el contrario se encontraba presente en otras LigDs bacterianas. Para ello se purificó la LigD de *P. aeruginosa* (*PaeLigD*, véase Materiales y Métodos) puesto que se trata de una LigD que ha servido como modelo de las LigD bacterianas durante años (Pitcher

Resultados 2

et al., 2007a; Shuman y Glickman, 2007), presenta una estructura diferente a *BsuLigD* (ya que contiene un dominio fosfoesterasa adicional en su extremo N-terminal, véase la figura 5) y procede de una bacteria Gram-negativa, filogenéticamente alejada de *B. subtilis*. En la figura 39 se muestra como la proteína *PaeLigD* posee una actividad 5'-dRP liasa independiente de metal que elimina el grupo 5'-dRP del sustrato marcado en 3' dando lugar al producto 19-mer 5'-P. Parte de este producto es adenilado por los complejos AMP-*PaeLigD* procedentes de la bacteria de expresión, tal y como está descrito (Zhu y Shuman 2007; Zhu y Shuman 2008), y en presencia de iones Mn^{2+} es ligado a la cadena *primer* dando lugar a un producto de 35-mer. En la figura 40 se observa como la proteína *PaeLigD* purificada es capaz de formar un complejo covalente con el DNA portador del grupo 5'-dRP en presencia de $NaBH_4$. Todos estos resultados permiten concluir que la actividad 5'-dRP liasa no es exclusiva de *BsuLigD*, sino que está presente en la *LigD* de otras especies bacterianas.

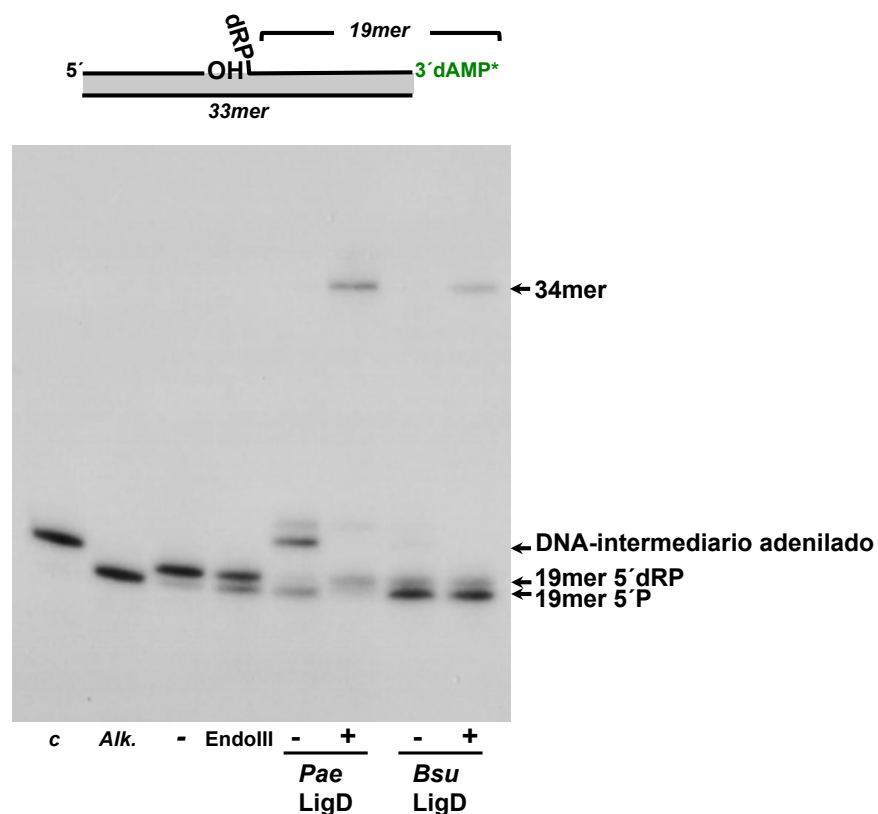


Figura 39. *PaeLigD* posee actividad 5'-dRP liasa. El sustrato empleado (híbrido de los oligonucleótidos *upstream* sp1c, *downstream* Ph-U1, y molde comp-sp1c/U4a, véase Materiales y Métodos) se representa en la parte superior de la figura. El DNA se incubó en presencia de 3,5 nM de EndoIII o 60 nM de *PaeLigD* o *BsuLigD*, en ausencia (-) o presencia (+) de 0,64 mM $MnCl_2$ durante 30 minutos a 30°C, tras lo cual las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *Alk.*, hidrólisis alcalina del grupo 5'-dRP.

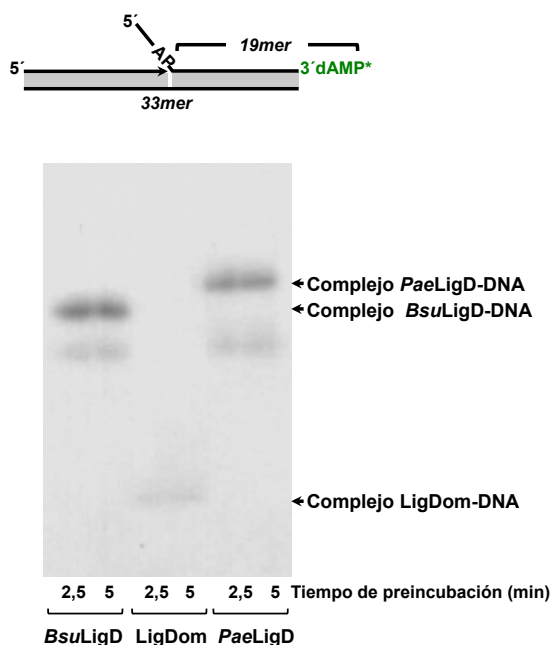


Figura 40. Formación de complejos DNA-proteína. Como sustrato de la reacción se empleó el híbrido marcado en 3' mostrado en la parte superior de la figura. La reacción se llevó a cabo como se detalla en Materiales y Métodos incubando 4 nM del sustrato de DNA (pretratado con la UDG) con la proteína indicada (100 nM de *BsuLigD* o *PaeLigD*, 147 nM de *LigDom*) durante los tiempos indicados en presencia de 0,64 mM $MnCl_2$. Tras la incubación, las muestras se redujeron mediante la adición de 100 mM de $NaBH_4$ y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0,1% SDS y posterior autorradiografía. Se indican las movilidades de los distintos complejos proteína-DNA.

5. La actividad 5'-dRP liasa de *BsuLigD* se localiza en el dominio ligasa N-terminal

Estudios previos mostraron que distintas DNA ligasas dependientes de ATP, tales como la de los bacteriófagos T4 y T7, así como la mitocondrial humana, poseen actividad 5'-dRP liasa (Bogenhagen y Pinz, 1998; Pinz y Bogenhagen, 1998). Como se ha descrito anteriormente, *BsuLigD* es una enzima bimodular en cuyo extremo N-terminal posee el dominio ligasa dependiente de ATP (residuos 1-331) unido al dominio polimerasa C-terminal (332-611; véase figura 5). Por consiguiente, parecía razonable especular que la actividad 5'-dRP pudiera residir en el dominio N-terminal de la enzima. Para comprobar dicha hipótesis, se clonó y purificó el dominio ligasa de *BsuLigD* (*LigDom*) (véase Materiales y Métodos). Como se muestra en la figura 41, el *LigDom* es capaz de escindir el grupo 5'-dRP del sustrato indicado (véase el esquema en la parte superior de la figura 41) en una reacción independiente de iones Mn^{2+} . En la figura 40 se observa como, además, el *LigDom* forma un complejo covalente con el DNA tras la reducción con $NaBH_4$. Estos resultados permiten concluir que el sitio catalítico responsable de la actividad 5'-dRP liasa de *BsuLigD* se localiza en el *LigDom* de la enzima.

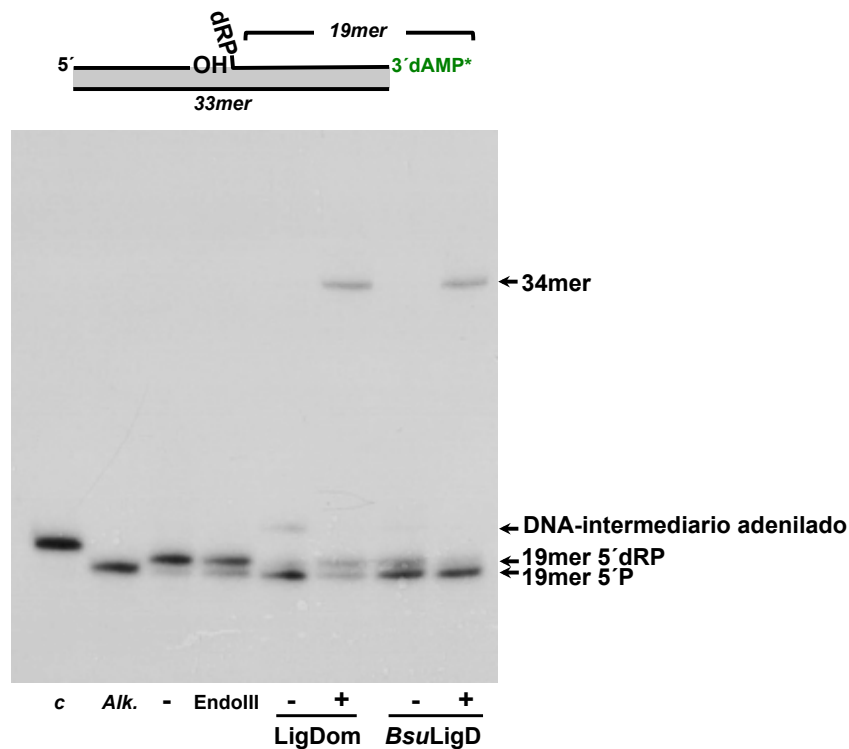


Figura 41. La actividad 5'-dRP de *BsuLigD* reside en su dominio ligasa. El experimento se realizó tal y como se ha descrito en el pie de figura 39, aunque en este caso en presencia de 216 nM de LigDom, en ausencia (-) o presencia (+) de 0,64 mM MnCl₂. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *Alk.*, hidrólisis alcalina del grupo 5'-dRP.

La formación de un complejo estable entre *BsuLigD* y un DNA con un 5'-dRP en presencia de NaBH₄ llevó a analizar cuál podría ser el residuo nucleofílico que forma el intermedio de la base de Schiff con el sitio AP, y si las actividades ligasa y AP-liasa residían en el mismo sitio activo. Para ello, se cambiaron a alanina los residuos Lys24 (K24A), Lys189 (K189A), Lys206 (K206A) y Lys208 (K208A), homólogos de los residuos Lys481, Lys618, Lys635 y Lys637 de la proteína LigD de *M. tuberculosis* (*MtuLigD*), que forman parte del sitio activo de la actividad ligasa de esta proteína (Akey *et al.*, 2006). Además, también se cambió a alanina el aminoácido Glu184 (E184A), homólogo al ligando de metal Glu613 de *MtuLigD* responsable de la catálisis de la actividad de ligación (Akey *et al.*, 2006). Como se muestra en la figura 42, todas las proteínas mutantes fueron deficientes en la actividad ligasa, como era esperable (A), pero presentaron unos niveles de actividad 5'-dRP liasa similares a los mostrados por la enzima *wild-type* (B). Estos resultados nos permitieron concluir que ambas actividades no comparten el mismo centro activo.

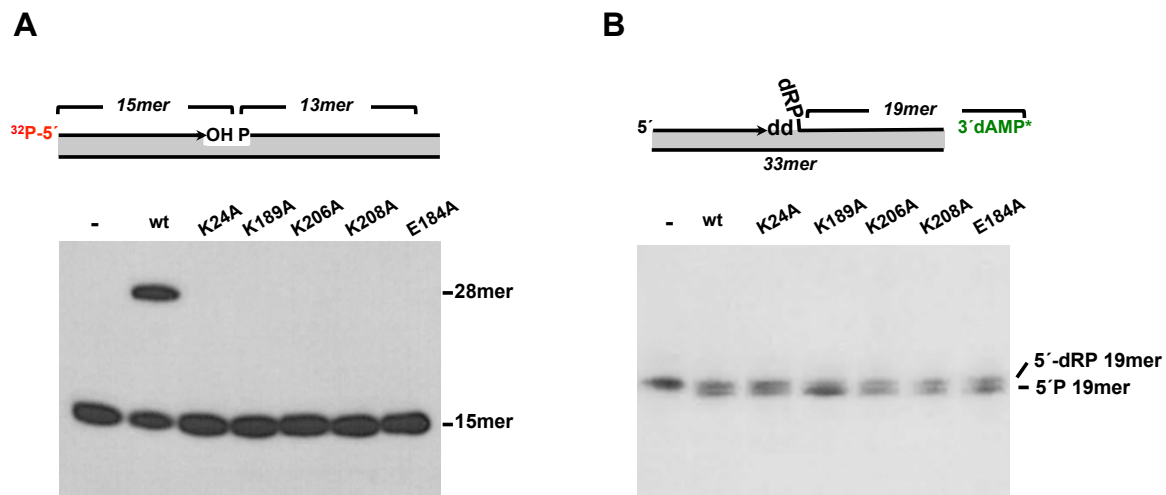


Figura 42. Análisis de la actividad 5'-dRP liasa de los mutantes K24A, K189A, K206A, K208A y E184A de *BsuLigD*. (A) Actividad ligasa. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos incubando 23 nM de cada una de las proteínas indicadas con 1,2 nM del híbrido de DNA portador de un *nick* indicado en la parte superior de la figura (Materiales y Métodos), en presencia de 5 μ M de $MnCl_2$ durante 30 minutos a 30°C. Tras la incubación, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. (B) Actividad 5'-dRP liasa. El ensayo se llevó a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. El DNA representado en la parte superior de la figura (y obtenido como se detalla en Materiales y Métodos) se incubó con 28 nM de la proteína indicada en presencia de 0,64 mM de $MnCl_2$ durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente las reacciones se pararon mediante la adición a la mezcla de 100 mM de $NaBH_4$. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía

6. La resistencia de las esporas a desecación extrema (*ultrahigh vacuum*, UHV) depende de *BsuLigD* y *Nfo*

Estudios previos mostraron que esporas de *B. subtilis* en las que se delecionaban los genes que codifican las AP-endonucleasas eran más sensibles a la desecación debido a la inducción de SSB (Salas-Pacheco *et al.*, 2005). Además, la desecación por UHV también reducía la supervivencia de las esporas mutantes $\Delta ligD$ como consecuencia de DSBs en el DNA (Moeller *et al.*, 2007). Para determinar si existe una relación entre *BsuLigD* y la vía de BER, esporas mutantes de *B. subtilis* que carecen de *BsuLigD* ($\Delta ligD$), de la AP-endonucleasa específica de la spora *Nfo* (Δnfo) y de ambas ($\Delta ligD \Delta nfo$) se sometieron a un tratamiento de desecación por UHV. Tal y como se muestra en la figura 43, en las esporas $\Delta ligD$ la supervivencia se reducía cuatro veces. Del mismo modo, la delección del gen *nfo* aumentaba dos veces la sensibilidad al daño en la spora. Estos resultados indican que ambas proteínas de *B. subtilis* están implicadas

Resultados 2

en la reparación del DNA en las esporas tras una exposición a UHV de siete días. Es interesante destacar que ambas enzimas, LigD y Nfo no parecen contribuir de manera aditiva a la resistencia de la espora tras la exposición a UHV, ya que las esporas $\Delta ligD \Delta nfo$ presentaban una sensibilidad estadísticamente similar a la obtenida en las esporas del mutante simple $\Delta ligD$, lo cual sugiere que existe una interacción funcional entre ambas proteínas de reparación.

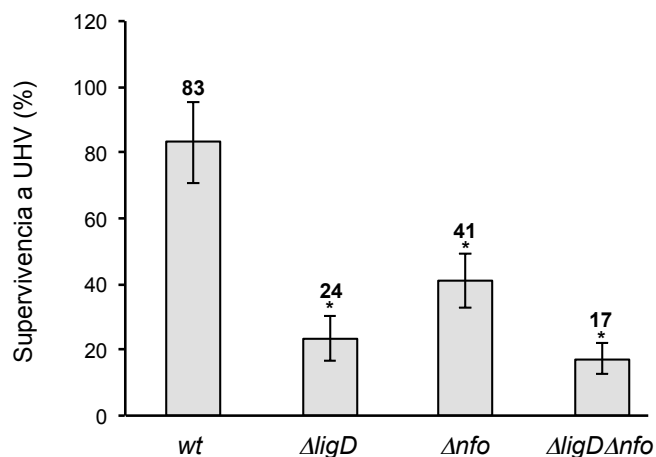


Figura 43. Supervivencia de las esporas de *B. subtilis* deficientes en *BsuLigD* y/o *Nfo*. El experimento se llevó a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Las UFCs de las esporas expuestas a UHV se dividieron entre la media de los valores de UFC de las muestras de esporas no tratadas para obtener la supervivencia tras la exposición al daño. Los datos presentados se expresan como la media \pm DE, N=3. Los asteriscos (*) indican los valores de supervivencia a UHV que son significativamente diferentes (P-valor \leq 0,05) con respecto a los valores de las esporas *wild-type* (wt). Estos experimentos fueron llevados a cabo por nuestros colaboradores Katja Nagler, Marina Raguse y el Dr. Ralf Moeller (German Aerospace Center, Colonia, Alemania)

Cuando se analizaron los efectos de la mutación E184A de *BsuLigD*, que inactiva la actividad ligasa de la proteína, sobre la eficiencia de reparación de lesiones inducidas por UHV, se obtuvieron resultados similares (figura 44). Estos resultados apoyan la existencia de una ruta BER específica de la espora para reparar los sitios AP que se generan durante la germinación, vía en la que *BsuLigD* parece desempeñar un papel fundamental.

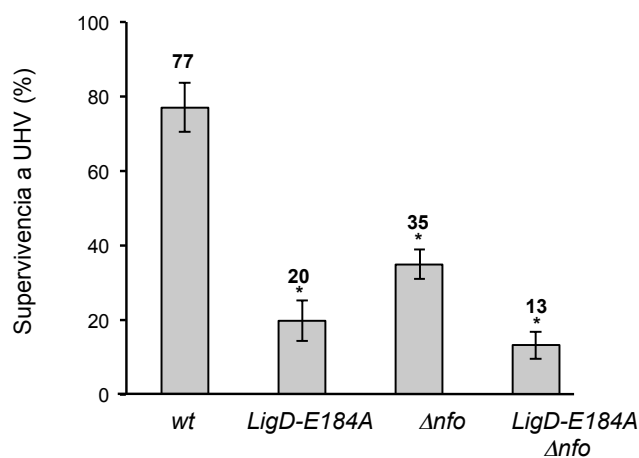


Figura 44. Supervivencia de las esporas de *B. subtilis* que expresan el mutante de *BsuLigD* deficiente para la actividad ligasa (E184A) y/o la AP endonucleasa *Nfo*. El experimento se llevó a cabo como se detalla en Materiales y Métodos. Las UFCs de las esporas expuestas a UHV se dividieron entre la media de los valores de UFC de las muestras de esporas no tratadas para obtener la supervivencia tras la exposición al daño. Los datos presentados se expresan como la media \pm DE, N=4. Los asteriscos (*) indican los valores de supervivencia a UHV que son significativamente diferentes (P-valor \leq 0,05) con respecto a los valores de las esporas *wild-type* (wt). Estos experimentos fueron llevados a cabo por nuestros colaboradores Katja Nagler, Marina Raguse y el Dr. Ralf Moeller (German Aerospace Center, Colonia, Alemania). La construcción de las estirpes empleadas fue realizada por la Dra. Begoña Carrasco, del laboratorio del Dr. Juan Carlos Alonso (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

Capítulo 3

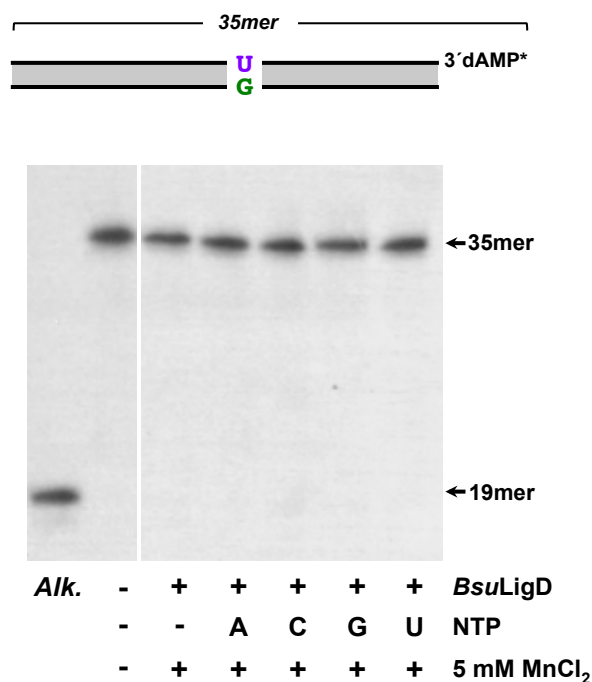
Análisis de la actividad AP-liasa de *BsuLigD* sobre sustratos de DNA 5'-recesivos

En el Capítulo 2 se ha descrito la capacidad de la proteína *BsuLigD* de reconocer y procesar sitios AP internos localizados en sustratos tipo *flap* mediante su actividad AP-liasa (véase la figura 37). Para dilucidar si se trata una actividad específica para este tipo de sustrato o, por el contrario, *BsuLigD* tiene una actividad AP-liasa clásica, se analizó dicha actividad sobre sitios AP presentes en moléculas de DNA de distinta naturaleza.

1. La actividad AP-liasa de *BsuLigD* no es capaz de procesar un sitio AP central en sustratos de dsDNA

En primer lugar, se analizó la capacidad de *BsuLigD* de actuar sobre sitios AP ubicados en una posición central en un sustrato de doble cadena romo. Para ello, se empleó un híbrido de DNA de 34-mer marcado en su extremo 3' en cuya posición 16 tiene una 2'-desoxiuridina (véase el esquema en la parte superior de la figura 45), y que fue tratado con la UDG. A continuación, se incubó con *BsuLigD*, en presencia de $MnCl_2$. En la figura 45 se observa como *BsuLigD* no es capaz de incidir sobre el sitio AP en presencia de Mn^{2+} . Por otra parte, se analizó si se requería la presencia de nucleótidos en la mezcla de reacción para que *BsuLigD* llevara a cabo su actividad AP-liasa en este tipo de sustratos, para lo cual el experimento se realizó en presencia de cada uno de los NTPs (ATP, CTP, GTP y UTP). En la figura 45 se observa que, tanto en ausencia como en presencia de cada nucleótido, *BsuLigD* no es capaz de procesar el sitio AP cuando este se halla en posición central.

Figura 45. *BsuLigD* es incapaz de procesar un sitio AP cuando está localizado en la posición central de un sustrato de dsDNA. Panel superior, representación esquemática del sustrato empleado en el experimento, un dsDNA de 34-mer obtenido mediante la hibridación de los oligonucleótidos pU, marcado en 3', y pG, (véase Materiales y Métodos). G=dGMP; U=UMP. Panel inferior: autorradiografía que muestra que *BsuLigD* es incapaz de procesar el sitio AP de esta molécula. El experimento se realizó tal y como se detalla en Materiales y Métodos. El híbrido de DNA pretratado con UDG se incubó con 114 nM de *BsuLigD*, 5 mM de $MnCl_2$ y 10 μ M de cada uno de los NTPs (ATP, CTP, GTP o UTP). Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *Alk.*, hidrólisis alcalina del sitio AP.



2. *BsuLigD* tiene actividad AP-liasa sobre sitios AP próximos a extremos 5'-recesivos

Puesto que existen proteínas con actividad AP-liasa que actúan preferentemente cuando el sitio AP se localiza próximo al extremo 5', tales como *BsuKu* (Capítulo 1, figura 29) o la proteína Ku humana (Strande *et al.*, 2012), se analizó si la actividad AP-liasa de *BsuLigD* era capaz de actuar sobre sitios AP próximos a dicho extremo. Para ello, se empleó el sustrato que aparece indicado en la parte superior de la figura 46, en el que la cadena marcada en 3' posee un extremo 5'-recesivo y una 2'-desoxiuridina en la cuarta posición. Tras un pretratamiento con la UDG, este DNA se incubó con *BsuLigD* en presencia de $MnCl_2$ y con cada uno de los NTPs. Tal y como se observa en la figura 46, *BsuLigD* es capaz de introducir un *nick* sobre el sitio AP únicamente en presencia de GTP, que es el nucleótido complementario al dCMP de la cadena molde localizado frente al sitio AP, dando lugar a un producto de 19-mer. Este resultado parece indicar que el nucleótido que se ha de incorporar en el lugar del sitio AP se requiere para que la actividad AP-liasa de *BsuLigD* incida sobre el sitio AP. Como puede observarse en la figura, en presencia de GTP se observa además la aparición de un DNA de menor movilidad electroforética correspondiente a un producto de ligación.

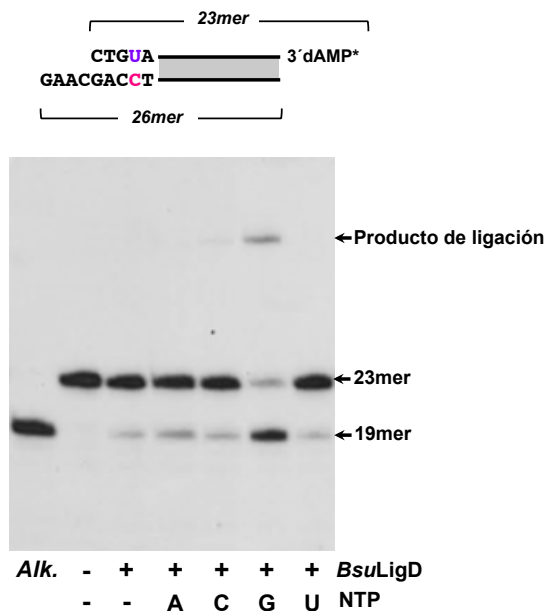


Figura 46. La actividad AP-liasa de *BsuLigD* puede actuar sobre un sitio AP próximo a un extremo 5'-recesivo en presencia de nucleótido. *Panel superior:* representación esquemática del sustrato empleado en el experimento, un DNA 5'-recesivo obtenido mediante la hibridación del oligonucleótido de 22-mer U4al marcado en 3' con el oligonucleótido comp-U4al+4 (véase Materiales y Métodos). *Panel inferior:* el híbrido de DNA se trató con la UDG y posteriormente se incubó con 114 nM de *BsuLigD*, 5 mM de $MnCl_2$ y 10 μ M de cada uno de los NTPs durante 30 minutos a 30°C. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *Alk.*, hidrólisis alcalina del sitio AP.

3. Requerimientos de la actividad AP-liasa de *BsuLigD* y la posterior reacción de ligación

Para confirmar el requerimiento del nucleótido correcto en la actividad AP-liasa de *BsuLigD*, se analizaron distintos contextos de secuencia, variando los nucleótidos frente al sitio AP. En la figura 47A se observan los diferentes híbridos empleados, que fueron diseñados de manera que en la posición del molde enfrentada a la 2'-desoxiuridina, y en las dos que flanquean a esta, hubiera el mismo nucleótido. Así, en el híbrido *a* (esquema superior de la figura 47A) la secuencia de esa zona del oligonucleótido es 5'-CUC (y su complementaria 5'-GGG en el molde), en el híbrido *b* (esquema central de la figura 47A) es 5'-TUT (y su complementaria 5'-AAA en el molde) y en el *c* (esquema inferior de la figura 47A) es 5'-GUG (y su complementaria 5'-CCC en el molde). Estos sustratos *a*, *b* y *c*, pretratados con UDG, se incubaron con *BsuLigD* en ausencia y presencia de cada uno de los cuatro NTPs, y en presencia de $MnCl_2$. En la figura 47B se observa que la aparición del producto de 19-mer se consigue fundamentalmente tras incubación con *BsuLigD* y el nucleótido complementario a aquel de la cadena molde que se encuentra enfrentado al sitio AP en cada sustrato analizado (indicado a la izquierda de cada panel de la figura 47A). Así, el panel superior de la figura 47B muestra como la actividad AP-liasa de *BsuLigD* sobre el sustrato *a* requiere fundamentalmente CTP; el panel medio muestra la dependencia de UTP para llevar a cabo la incisión en el sitio AP en el sustrato *b* y el panel inferior indica el requerimiento de GTP para que la proteína actúe sobre el sustrato *c*. Estos resultados permiten confirmar que la presencia del nucleótido correcto en la mezcla de reacción es necesaria para que *BsuLigD* lleve a cabo su actividad AP-liasa sobre este tipo de sustratos. Es de destacar que sólo en el caso del híbrido *c* (esquema y panel inferior de la figura 47A y B), y en presencia de GTP, se observó un DNA de menor movilidad electroforética, correspondiente a un producto de ligación. El hecho de que el único DNA con un extremo 3'-OH libre (y por tanto "ligable") que hay en la reacción es el del oligonucleótido molde, que presenta un dGMP en su extremo 3'-protuberante (señalado con una flecha en el esquema de la figura 47Ac), sugiere que la proteína podría estar empleando como sustrato *upstream* en la reacción de ligación este extremo, cuyo nucleótido terminal en 3' hibridaría con el nucleótido de la cadena molde en la posición anterior a la que queda frente al sitio AP, a diferencia de los sustratos *a* y *b*, en los que el dGMP en 3' no es complementario a la posición anterior a la enfrentada al sitio AP, siendo dGMP y dAMP, respectivamente.

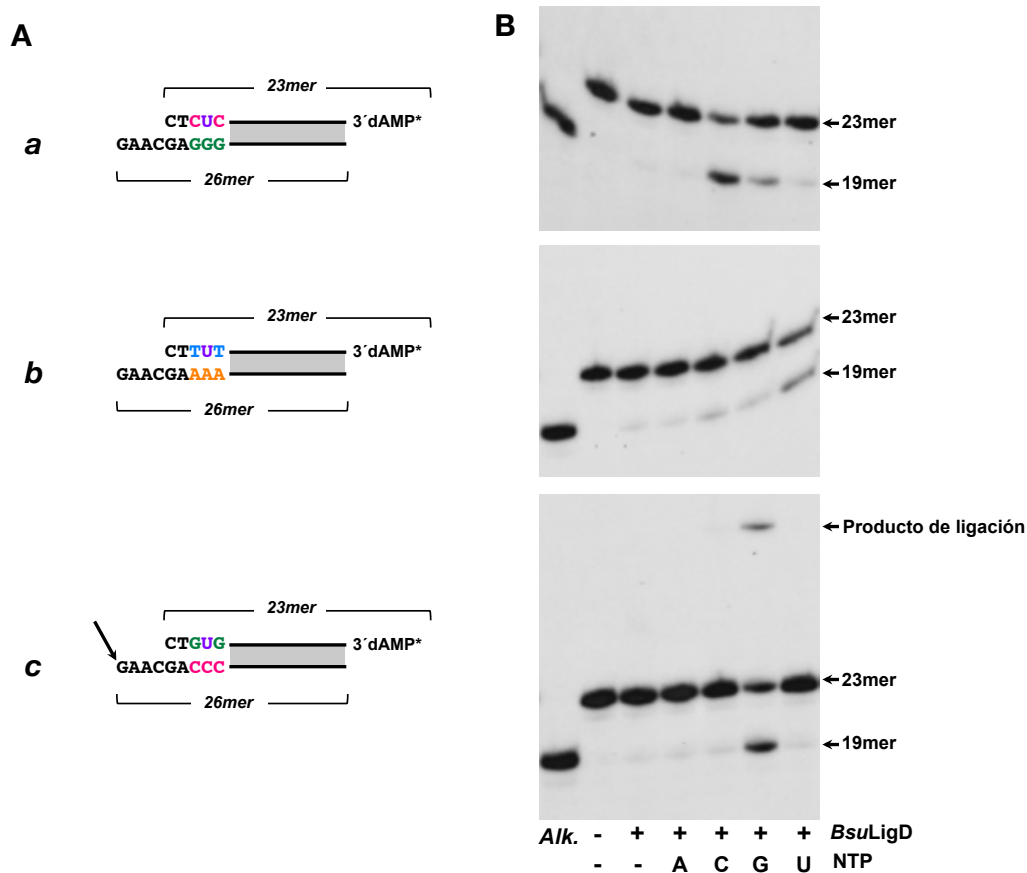


Figura 47. Procesamiento de sitios AP próximos al extremo 5'-recesivo de moléculas con distinto contexto de secuencia. (A) Híbridos de DNA con extremos 5'-recesivos empleados en el experimento. Los distintos sustratos se obtuvieron mediante la hibridación de los siguientes oligonucleótidos: (a) U4al-CUC (22-mer) y comp-GGG (26-mer), (b) U4al-TUT (22-mer) y comp-AAA (26-mer) y (c) U4al-GUG (22-mer) y comp-CCC (26-mer) (véase Materiales y Métodos). La cadena marcada en cada híbrido es la que contiene la 2'-desoxiuridina (U). (B) Los sustratos a, b y c, pretratados con la UDG se incubaron con 114 nM de *BsuLigD*, 5 mM de $MnCl_2$ y 10 μM de cada uno de los NTPs durante 30 minutos a 30°C, según se indica. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *Alk.*, hidrólisis alcalina del sitio AP. La figura es una imagen compuesta a partir de diferentes partes del mismo experimento.

Para comprobar que efectivamente el producto de ligación correspondía a la unión del DNA con el extremo 3'-OH libre en la reacción (el molde), se realizó un experimento empleando un híbrido de DNA de estructura similar a los utilizados en la figura 47, pero que presentase un ddCMP en el extremo 3' del DNA molde y que, por tanto, no pudiera ser ligado al extremo 5'-P que se genera tras la β -eliminación en el sitio AP. En la parte superior de la figura 48 se muestran los sustratos empleados en el experimento: mientras que el sustrato de la izquierda presenta un molde en cuyo extremo 3' hay un dGMP, en el de la derecha, hay un ddCMP. Ambos sustratos se trataron con la UDG. Como se puede observar en el panel

izquierdo de la figura 48, la *BsuLigD* introduce un *nick* en el sitio AP (producto de 19-mer) en presencia de GTP, dando lugar, como se ha comentado anteriormente, a un producto de ligación. Cuando se empleó el sustrato con un ddCMP en el extremo 3' del molde (panel derecho de la figura 48), se observa que *BsuLigD* es capaz de reconocer y procesar el sitio AP en presencia fundamentalmente de GTP, pero no da lugar a un producto de ligación. Este hecho parece confirmar que la proteína está empleando como sustrato *upstream* en la reacción de ligación el oligonucleótido molde. Asimismo, este resultado indica que el nucleótido correcto, esencial para la actividad AP-liasa, no es incorporado necesariamente, sino que su presencia es probablemente requerida para que la interacción entre *BsuLigD* y el sitio AP sea lo suficientemente estable para que posteriormente la enzima lleve a cabo la reacción de β -eliminación sobre el sitio AP, sin que sea imprescindible la formación del enlace fosfodiéster entre el dNMP del extremo 3' del sustrato *upstream* (el *primer*) y el NTP entrante. En este ensayo, además, se llevó como control de tamaño un sustrato de banda simple de 45-mer (diseñado con la secuencia del oligonucleótido molde, comp-CCC,

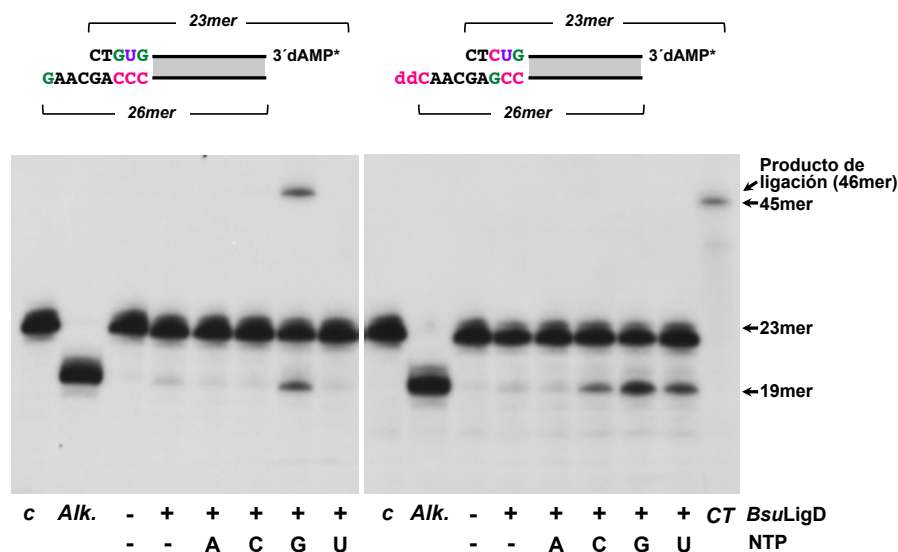


Figura 48. *BsuLigD* no da lugar a un producto de ligación cuando en el extremo 3' del DNA molde hay un ddNMP. *Arriba:* sustratos empleados en el experimento. Izquierda: el oligonucleótido U4alGUG marcado en 3' se hibridó con comp-CCC para dar lugar a un sustrato 5'-recesivo con un 3'-OH en el molde (una G, marcada en color verde); derecha: el oligonucleótido UalCUG marcado en 3' se hibridó al oligonucleótido comp-GCC-3'ddC para producir un sustrato 5'-recesivo con un dideoxi- en el extremo 3' del molde (marcado como ddC, en rosa) (véase Materiales y Métodos). *Abajo:* autorradiografía del experimento realizado con el sustrato que presenta en el extremo 3' del molde un OH (izquierda) o un dideoxi- (derecha). Los híbridos pretratados con UDG, se incubaron con 114 nM de *BsuLigD*, 5 mM de $MnCl_2$ y 10 μ M de cada NTP durante 30 minutos a 30°C, según se indica. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *c*, DNA de partida; *Alk.*, hidrólisis alcalina del sitio AP; *CT*, control de tamaño de 44-mer, marcado en 3' (45-mer). La figura es una imagen compuesta a partir de diferentes partes del mismo experimento.

Resultados 3

seguido de la secuencia del oligonucleótido U4a1-GUG a partir del sitio AP y marcado en 3', véase Materiales y Métodos). Teniendo en cuenta que la movilidad electroforética del producto de ligación es ligeramente menor a la del marcador de tamaño, *BsuLigD* estaría incorporando el nucleótido correcto (GTP) al sustrato *upstream*, previa escisión del sitio AP y, a continuación, ligando el producto elongado al 5'-P recién generado tras el corte del sitio AP en el sustrato *downstream*.

Una vez determinado que *BsuLigD* estaría empleando como sustrato *upstream* en la reacción de ligación el oligonucleótido molde, se quiso estudiar si este sustrato donador del 3'-OH procedía de la misma molécula, de manera que se estaría formando un *hairpin*, o por el contrario, de otra molécula independiente. La figura 49 muestra un modelo que explica ambas posibilidades. *BsuLigD* es capaz de reconocer el sustrato que contiene un sitio AP (representado con un círculo de color negro) próximo al extremo 5'-recesivo de la molécula. La unión del nucleótido correcto (indicado con una G, en rojo) estabilizaría el complejo DNA-proteína. El sitio AP es procesado por la actividad AP-liasa de *BsuLigD*, generándose un extremo 5'-P "ligable" en el oligonucleótido *downstream*. Según el modelo simplificado en la figura 49A, el *primer* empleado por *BsuLigD* procede de una molécula distinta a la cual está unida la enzima. En el modelo indicado en la figura 49B, el sustrato donador del *primer* es la propia molécula a la cual está unida *BsuLigD*, formándose un *hairpin*. El producto de ligación obtenido en ambos modelos, y tras la incorporación de GMP sería del mismo tamaño (46-mer, por estar marcado en 3').

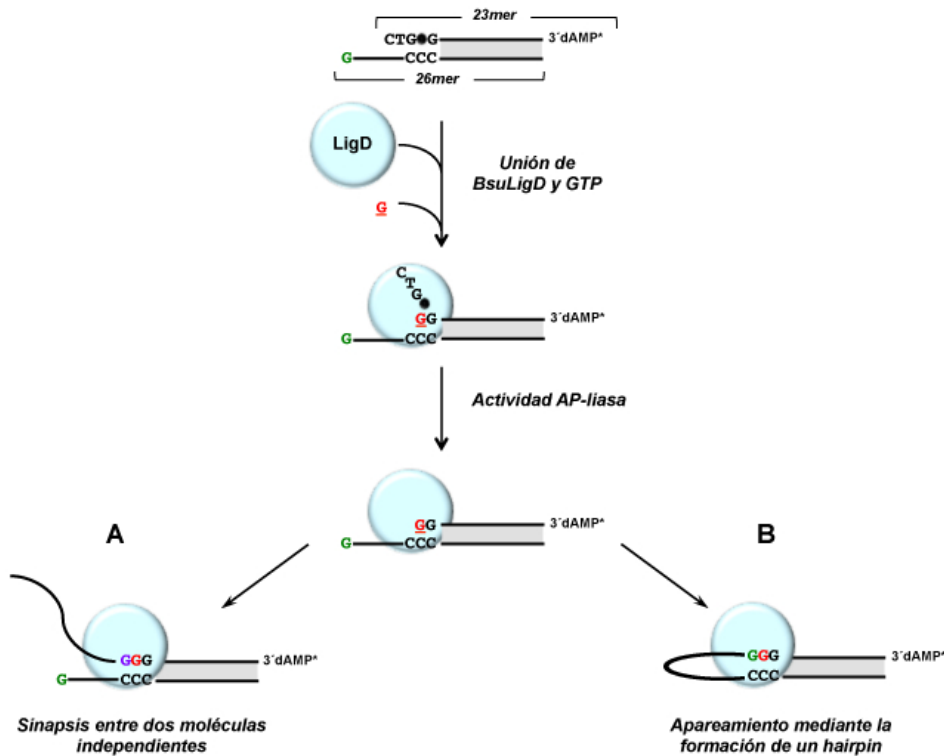


Figura 49. Esquema mostrando las dos posibles procedencias del *primer* empleado por *BsuLigD* en la reacción de ligación tras romper el enlace fosfodiéster de un sitio AP en un DNA con un extremo 5'-recesivo.

4. *BsuLigD* emplea como *primer* el oligonucleótido molde, formando un *hairpin*

Para analizar cuál de las dos situaciones posibles expuestas en la figura 49 podía estar teniendo lugar, se realizó un experimento en presencia de un exceso de distintas moléculas de DNA no marcado cuya región 3' protuberaba tres nucleótidos: -CGG o -ACC. En la parte superior de la figura 50 se observa el sustrato empleado marcado en 3', y en la parte inferior, los sustratos no marcados con una región protuberante de 3-mer. Si *BsuLigD* estuviese empleando como *primer* una molécula de DNA diferente a la cual está unida (modelo A de la figura 49), en presencia del nucleótido correcto GTP se observaría la aparición de un producto de ligación de movilidad electroforética mayor a la observada en ausencia de DNA no

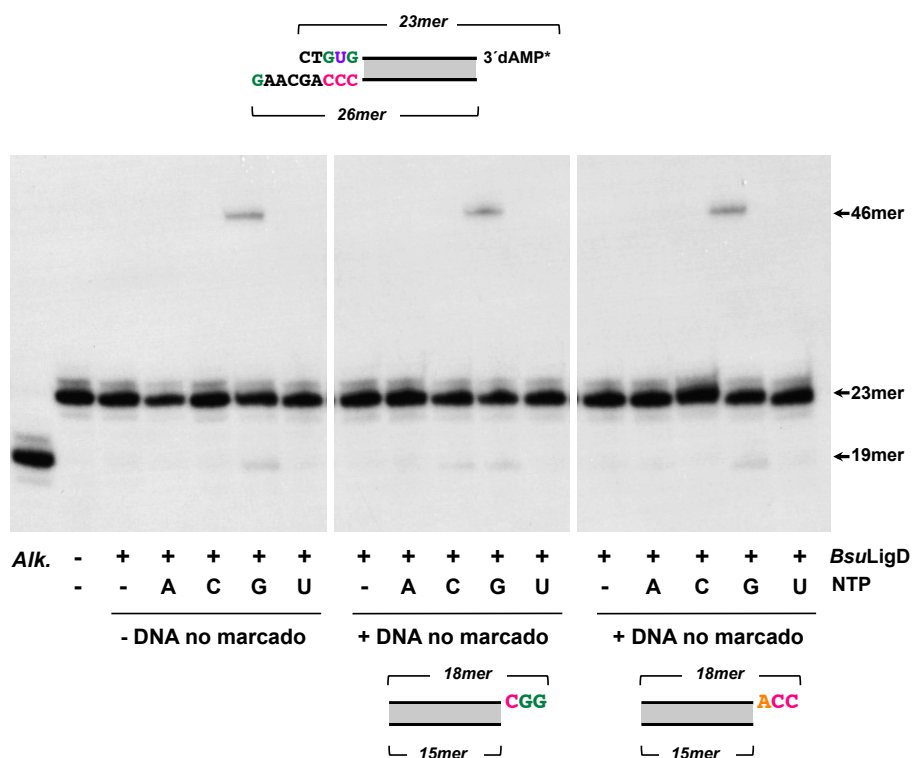


Figura 50. El producto de ligación obtenido en presencia del nucleótido correcto tras la actividad AP-liasa de *BsuLigD* es resultado de la ligación intramolecular del extremo de la cadena molde al extremo 5'-P generado.

Panel superior: representación esquemática del sustrato empleado en el experimento. El oligonucleótido U4al-GUG (22-mer) marcado en 3' (23-mer), se hibridó al oligonucleótido comp-CCC para formar un sustrato 5'-recesivo (véase Materiales y Métodos). *Paneles centrales:* 0,83 nM del híbrido de DNA pretratado con la UDG, se incubó con 114 nM de *BsuLigD*, 5 mM de $MnCl_2$, 10 μ M de cada uno de los NTPs, y, cuando se indica, 5 nM del híbrido de DNA no marcado representado en la parte inferior de cada panel (véase Materiales y Métodos). Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. *Alk.*, hidrólisis alcalina del sitio AP. La figura es una imagen compuesta a partir de diferentes partes del mismo experimento.

marcado (panel izquierdo de la figura 50). Sin embargo, tanto en presencia del híbrido no marcado cuya región protuberante es -CGG (panel central, figura 50) como aquel cuya región protuberante es -ACC (panel derecho, figura 50), se observa un producto de ligación de idéntico tamaño al obtenido en ausencia de DNA no marcado. Estos resultados indican que, en estas condiciones, *BsuLigD* parece estar empleando como *primer* la propia molécula a la cual está unida, formándose un *hairpin* en la molécula, es decir, la situación expuesta en el modelo B de la figura 49.

5. *BsuKu* estimula la actividad AP-liasa de *BsuLigD*

Puesto que *BsuKu* estimula las actividades polimerasa y ligasa de *BsuLigD* *in vitro* (de Vega, 2013), se analizó si la actividad AP-liasa de *BsuLigD* también aumentaba en presencia de *BsuKu* y si esta última favorecía la ligación intermolecular. Para ello, se realizó el experimento mostrado en la figura 51 con el sustrato 5'-recesivo y marcado radiactivamente esquematizado en la parte superior. Este DNA se preincubó con UDG, tras lo cual se incubó con *BsuKu*, con *BsuLigD*, o con ambas, en presencia de GTP (el NTP correcto) y $MnCl_2$, así como en presencia o ausencia de un exceso de un DNA no marcado y con un extremo 3'-protuberante complementario a la zona protuberante de siete nucleótidos del sustrato que posee el sitio AP una vez que haya actuado la actividad AP-liasa de *BsuLigD* (ver figura 51, DNA no marcado). La utilización de este sustrato permitiría descartar que la preferencia mostrada por *BsuLigD* a la hora de emplear como *primer* el extremo 3'-protuberante de la misma molécula de DNA a la que se encontraba unida fuera debida a esa falta de complementariedad (figura 50). Como se puede observar en la figura 51, la aparición de un producto de 19-mer en presencia de *BsuKu* (carriles *a* y *b*) indica que esta proteína es capaz de introducir un *nick* en el sitio AP, aunque de manera poco eficiente. *BsuLigD*, por su parte, también es capaz de llevar a cabo la reacción de β -eliminación sobre el sitio AP (carriles *c* y *d*) y dar lugar a un producto de ligación (46-mer). La ausencia de un producto de ligación de distinta movilidad en ausencia (carril *c*) o presencia (carril *d*) del DNA no marcado, indicaría de nuevo que se está generando un *hairpin*, y el propio molde de la molécula está siendo empleado por *BsuLigD* como *primer*. Por otra parte, cuando en la mezcla de reacción están presentes ambas proteínas, *BsuKu* y *BsuLigD* (carriles *e* y *f*), se observa una estimulación de la actividad AP-liasa, aunque la cantidad de producto de ligación permanece estable. Teniendo en cuenta que, tal y como se ha descrito en el Capítulo 2, *BsuKu* tiene actividad AP-liasa, se quiso comprobar que el aumento de actividad observado en presencia de ambas proteínas respecto a cada una por separado, se debe a una estimulación de *BsuLigD* por *BsuKu* y no al contrario.

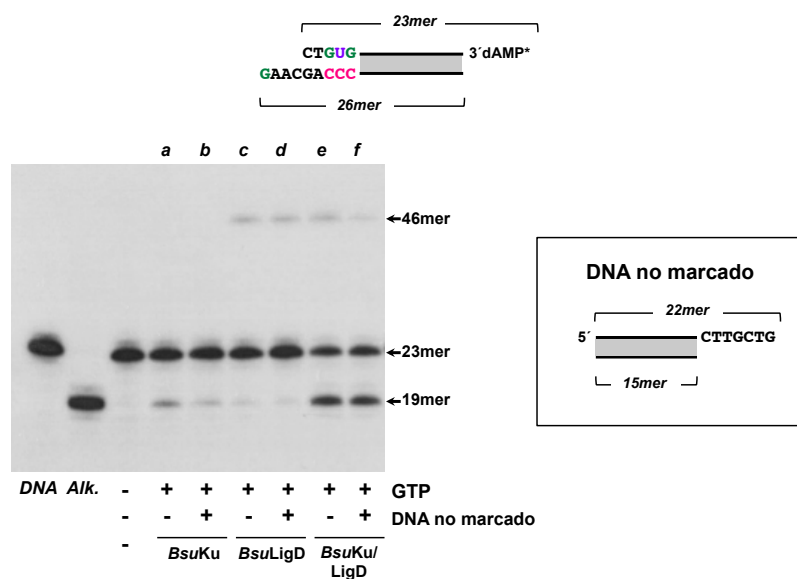


Figura 51. La presencia de *BsuKu* no favorece la ligación intermolecular tras el procesamiento del sitio AP.

Parte superior: esquema del sustrato marcado empleado en el experimento: El oligonucleótido U4aI-GUG marcado en 3' se hibridó al oligonucleótido comp-CCC para dar lugar a un sustrato 5'-recesivo (véase Materiales y Métodos). *Parte inferior, derecha:* DNA no marcado empleado en el experimento, híbrido de los oligonucleótidos sp1CTTGCTG y sp1c que da lugar a una molécula con un extremo 3'-protuberante de 7 nucleótidos, perfectamente complementaria al extremo 3'-protuberante del sustrato marcado una vez que haya actuado una AP-liasa (véase Materiales y Métodos). *Parte inferior, izquierda:* autorradiografía del experimento. El DNA marcado (0,83 nM) pretratado con UDG se incubó con 114 nM de *BsuKu* (carriles *a* y *b*), 57 nM de *BsuLigD* (carriles *c* y *d*) o ambas (carriles *e* y *f*), en presencia de 10 μ M de GTP, 5 mM de $MnCl_2$ y en ausencia o presencia de 4,1 nM del DNA no marcado. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. DNA: sustrato de partida de la reacción. *Alk.*, hidrólisis alcalina del sitio AP.

Para conocer la contribución de cada una de las proteínas en la incisión sobre el sitio AP, se realizó el experimento mostrado en la figura 52. El sustrato, representado en la parte superior de la figura, se trató con UDG, y a continuación se incubó con *BsuKu* (carril *a*), *BsuLigD* (carril *b*) o ambas (carriles *c* y *d*), en presencia de $MnCl_2$ y del NTP indicado (el nucleótido correcto GTP, o un nucleótido incorrecto, ATP). Como se puede observar en la figura, ambas proteínas son capaces de actuar sobre el sitio AP, como se deduce de la aparición del producto de 19-mer. Cuando en la mezcla de reacción están simultáneamente *BsuKu* y *BsuLigD*, en presencia de un nucleótido incorrecto (ATP) (carril *c*), no se observa una estimulación de la actividad. Únicamente cuando hay GTP en la reacción (carril *d*), hay un aumento del producto de corte, lo cual sugiere que *BsuKu* está estimulando la actividad AP-liasa de *BsuLigD*.

Por otra parte, en presencia de *BsuKu/LigD* y del nucleótido incorrecto ATP (carril *c*), se observa un producto de ligación de 45-mer, que correspondería a la ligación directa del *primer* al 5'-P recién ge-

Resultados 3

nerado tras la actividad AP-liasa, sin que se haya incorporado ningún nucleótido. Teniendo en cuenta la cantidad de producto obtenido tras la incisión del sitio AP, similar a la observada en presencia únicamente de *BsuKu*, así como que el nucleótido adicionado en la mezcla no es el correcto, lo más probable es que la actividad AP-liasa que haya actuado en este caso sea la de *BsuKu*, y no la de *BsuLigD*. En presencia de GTP y de ambas proteínas (carril *d*), si bien se incrementa la cantidad de producto de 19-mer, la eficiencia de la ligación posterior no aumenta. Este hecho sugiere que, al menos en estas condiciones, la unión de *BsuKu* a los extremos del DNA podría estar inhibiendo la formación del *hairpin*.

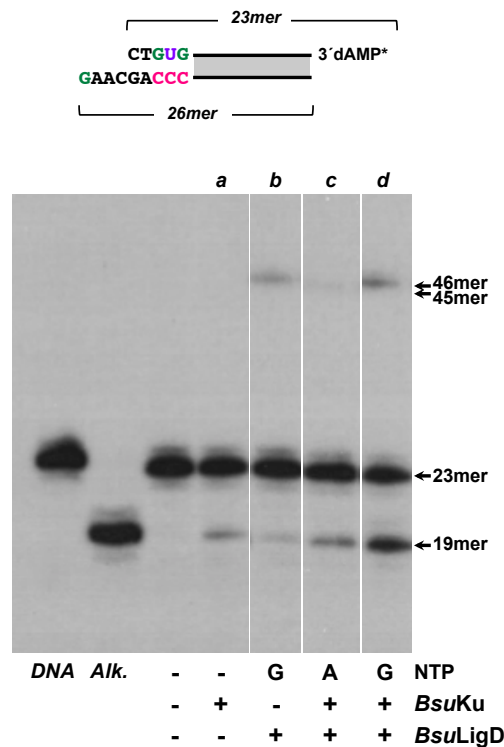


Figura 52. *BsuKu* estimula la actividad AP-liasa de *BsuLigD*. *Parte superior:* esquema del sustrato marcado empleado en el experimento, obtenido al hibridar el oligonucleótido U4al-GUG marcado en 3' al oligonucleótido comp-CCC para dar lugar a un sustrato 5'-recesivo (véase Materiales y Métodos). *Parte inferior:* El DNA marcado pretratado con UDG se incubó con 114 nM de *BsuKu* (carril *a*), 57 nM de *BsuLigD* (carril *b*) o ambas, en presencia de 10 μ M de ATP (carril *c*) o GTP (carril *d*) y 5 mM de $MnCl_2$. Tras una incubación de 30 minutos a 30°C, las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior autorradiografía. Se indica la posición de los productos. DNA: sustrato de partida de la reacción. *Alk.*, hidrólisis alcalina del sitio AP. La figura es una imagen compuesta a partir de diferentes partes del mismo experimento.

Capítulo 4

Análisis de la capacidad de *Bsu*LigD de insertar nucleótidos frente a lesiones en el molde

La TLS es un proceso de tolerancia al daño en el DNA que implica el “intercambio” de las DNA polimerasas replicativas por DNA polimerasas especializadas (normalmente pertenecientes a la familia Y) y capaces de introducir con alta eficiencia uno o varios nucleótidos (correcto o incorrecto) frente a la lesión (Sale *et al.*, 2012). Una DSB puede llevar asociados daños en las bases, de modo que la maquinaria de NHEJ debería enfrentarse a distintos tipos de lesiones para llevar a cabo la unión de los extremos. Teniendo en cuenta que las LigDs juegan un papel importante en la reparación del DNA, se quiso determinar cómo la *BsuLigD* respondía a la presencia de daños en la cadena molde. Para ello se utilizaron moléculas de DNA con *gaps* de un nucleótido que portaban en el nucleótido molde una serie de lesiones frecuentes en el DNA que implican la modificación o pérdida de las bases nitrogenadas: timin-glicol, 5-hidroxicitosina, 8-oxoguanina y THF (análogo químicamente estable de un sitio AP) (ver figura 53).

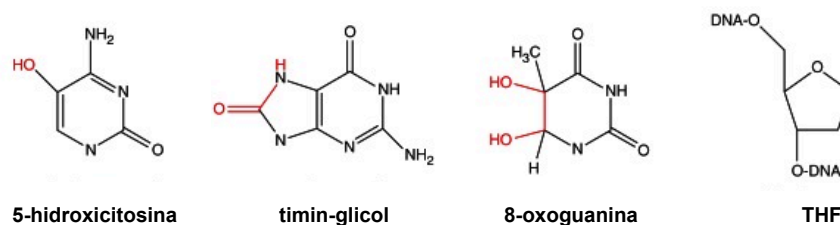


Figura 53. Estructura química de las lesiones en las bases nitrogenadas empleadas en los experimentos de *bypass* del presente capítulo [modificado de (Krokan y Bjørås, 2013)].

Las ROS provocan la oxidación de las bases nitrogenadas, dando lugar a distintos nucleótidos modificados. El timin-glicol es una modificación por oxidación de la timina. Esta lesión es muy tóxica ya que provoca distorsiones en la doble hélice, bloqueando la acción de las polimerasas y, aunque se trata de un daño voluminoso, normalmente es reparado por la vía de BER (Hatahet y Wallace, 1998; Nilsen y Krokan, 2001). Otra modificación altamente mutagénica debido a que provoca la transición C→T, es la oxidación de la citosina, que da lugar a la lesión 5-hidroxicitosina, también reparada por BER (Feig *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1998). Sin embargo, el daño más estable producido por estrés oxidativo es la 8-oxoguanina, originado por la oxidación de la guanina (Laval *et al.*, 1998). Se trata de una lesión elevadamente mutagénica debido a que el nucleótido que contiene esta base modificada tiene una capacidad dual de apareamiento con dCMP o dAMP. Por último, otro tipo de daño muy frecuente es la aparición de sitios AP producidos como consecuencia de la actividad de las glicosilasas durante la BER o por la hidrólisis espontánea de los enlaces N-glicosídicos (McCullough *et al.*, 1999). Estos sitios AP son las lesiones más comunes en el DNA, pudiendo darse hasta 50.000 al día en células de mamíferos (Lindahl, 1993).

En trabajos previos se mostró la capacidad del PolDom de las LigDs de *M. tuberculosis* y *P. aeruginosa* de realizar el *bypass* de 8oxodG y THF, respectivamente (Yakovleva y Shuman, 2006; Pitcher *et al.*, 2007b). Aquí analizamos la capacidad de *BsuLigD* de insertar NMPs frente a distintos tipos de daños empleando la proteína completa. Para facilitar la interpretación de los resultados en cuanto a la inserción de nucleótidos frente a las lesiones se utilizó la proteína mutante E184A, puesto que, tal y como se ha explicado en el Capítulo 2, el aminoácido Glu184 es uno de los responsables de la actividad ligasa por ser el residuo de unión de metal (Akey *et al.*, 2006). Por otra parte, para analizar la capacidad de la proteína de ligar un sustrato elongado frente a una lesión se empleó la proteína *wild-type*.

1. Análisis de la capacidad de adición de nucleótidos del mutante E184A de *BsuLigD* frente a lesiones en la cadena molde

En primer lugar se analizó si *BsuLigD* era capaz de realizar la inserción de nucleótidos en moléculas con un *gap* de un nucleótido frente a distintas lesiones: OH-C, Tgly, 8oxodG, y THF. Para ello se diseñaron diferentes moléculas de DNA con un *gap* de un nucleótido, marcadas en 5' con el fluoróforo Cy5 (véase Materiales y Métodos y panel superior de la figura 54). Como se puede observar en la figura, en ausencia de lesión la proteína introduce mayoritariamente el nucleótido correcto (CMP) (figura 54A). Sin embargo, *BsuLigD* también es capaz de introducir UMP lo cual indica que, tal y como está descrito para el dominio polimerasa de otras LigDs (Yakovleva y Shuman, 2006; Pitcher *et al.*, 2007b), *BsuLigD* presenta una baja fidelidad de inserción. En presencia de la lesión OH-C (figura 54B), *BsuLigD* apenas discrimina entre la inserción de AMP, GMP y UMP, llevando a cabo, por tanto, una reacción infiel. Frente a la lesión Tgly, la proteína introduce preferentemente el nucleótido correcto (AMP) (figura 54C), aunque también es capaz de insertar con alta eficiencia los nucleótidos GMP y UMP. En estas condiciones la proteína es mutagénica. Por otro lado, cuando en el molde hay un 8oxodG (figura 54D), *BsuLigD* incorpora tanto AMP como CMP. Estos resultados contrastan con la LigD de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* en las que se ha descrito que su PolDom inserta de manera mucho más eficiente CMP que AMP frente a esta lesión (Pitcher *et al.*, 2007b). Es interesante destacar que en estas condiciones, *BsuLigD* introduce CMP frente a 8oxodG en el molde de manera más eficiente que frente al nucleótido GMP (sin daño) (ver figura 54A). Por último, frente a un sitio AP (THF) en el molde, *BsuLigD* introduce mayoritariamente AMP.

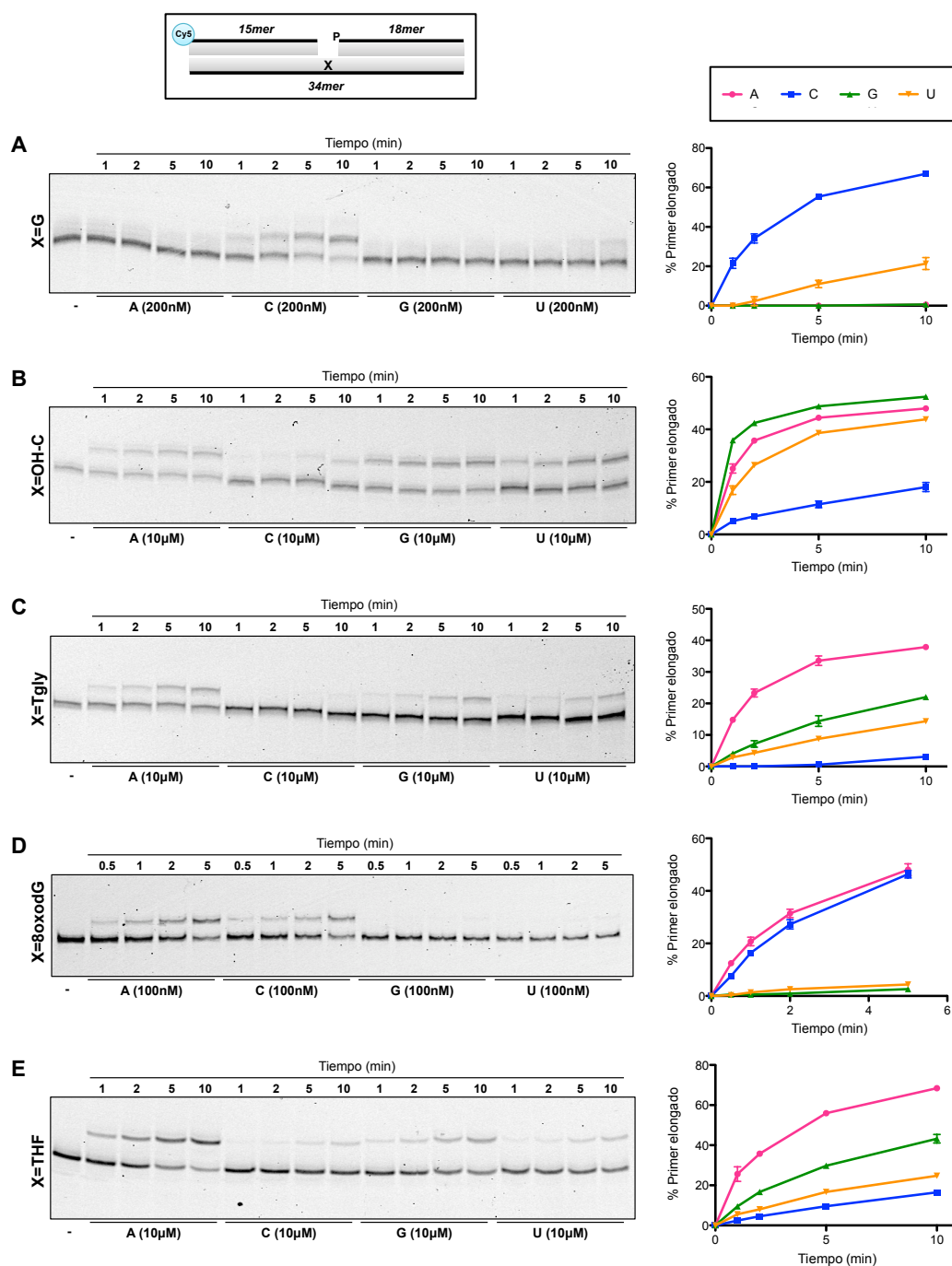


Figura 54. Inserción de NTPs del mutante E184A de *BsuLigD* frente a daños en la cadena molde. Parte superior: representación esquemática de la estructura de las moléculas empleadas en el ensayo. La X indica qué nucleótido hay en el molde en cada caso. El gap está flanqueado por un fosfato en 5' en el oligonucleótido downstream. El oligonucleótido upstream (Cy5-pber) está marcado en 5' con el fluoróforo Cy5. Los híbridos se formaron como se indica en Materiales y Métodos. En todos los casos se incubó 2,3 nM de la proteína mutante E184A de *BsuLigD* con 4,8 nM de DNA, 5 mM de $MnCl_2$ y la concentración de NTP indicada en cada caso. Las reacciones se incubaron a 30°C durante los tiempos indicados. Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y visualizadas con un escáner Typhoon 9410. A la derecha de cada panel se observa la representación del porcentaje del primer elongado (cuantificado mediante análisis densitométrico de las bandas de los productos elongados) frente al tiempo para cada NTP.

2. Capacidad de *BsuLigD* de ligar un extremo 5'-P a un 3'-OH NMP situado frente a una lesión

Una vez analizada la capacidad de *BsuLigD* de introducir cada NMP frente a distintas lesiones en el DNA, se quiso estudiar si la proteína era además capaz de llevar a cabo una ligación eficiente del sustrato elongado frente a cada tipo de daño. Para ello, se incubó la proteína *wild-type* con cada uno de los híbridos empleados en el apartado anterior durante un tiempo de reacción y en presencia de concentraciones de NTPs suficientes para que se produjera la elongación de la cadena *primer* (véase Materiales

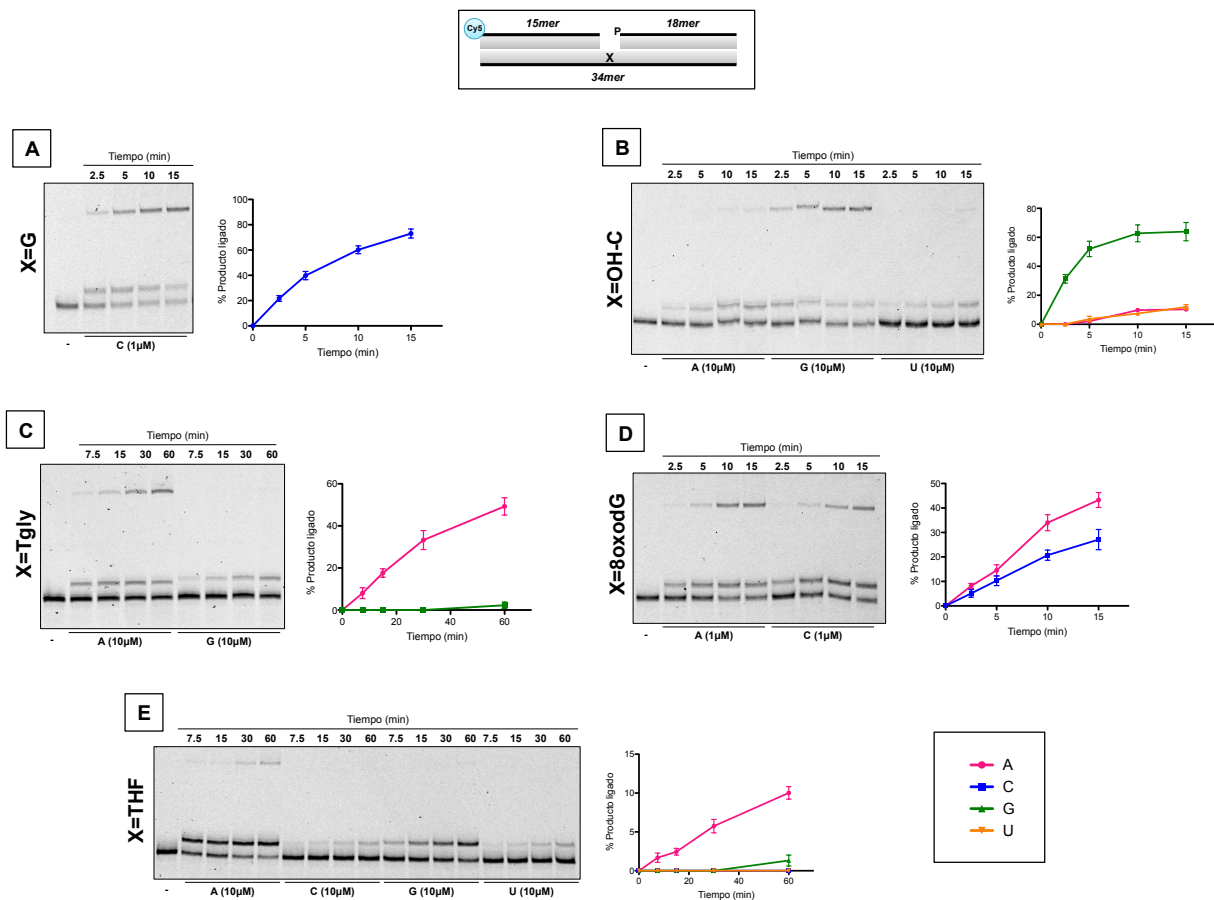


Figura 55. Actividad polimerasa y ligasa de *BsuLigD* en sustratos con un *gap* de un nucleótido portadores de distintos daños en el nucleótido molde. Parte superior: representación esquemática de la estructura de las moléculas empleadas en el ensayo. La X indica qué nucleótido hay en el molde en cada caso. El *gap* está flanqueado por un fosfato en 5' en el oligonucleótido *downstream*. El oligonucleótido *upstream* (Cy5-pber) está marcado en 5' con el fluoróforo Cy5. Los híbridos se constituyeron como se indica en Materiales y Métodos. En todos los casos se incubó 11,4 nM de *BsuLigD* *wild-type* con 4,8 nM de DNA en presencia de 40 μ M de $MnCl_2$ y la concentración de cada NTP indicada en cada caso. Las reacciones se incubaron a 30°C durante los tiempos indicados. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8 M urea y posterior visualización con un escáner Typhoon 9410. A la derecha de cada panel se observa la representación del porcentaje del producto ligado en presencia de cada NTP (cuantificado mediante análisis densitométrico de las bandas) frente al tiempo.

y Métodos y Figura 55). En estos experimentos se empleó una dosis de MnCl_2 adecuada para obtener producto de ligación (40 μM).

Como se puede observar *BsuLigD* inserta el NMP correcto frente a un molde no dañado y liga el producto elongado (Figura 55A). En presencia del resto de los NTPs no se observó producto elongado ni, por tanto, ligación (no mostrado). Tal y como se observa en la figura 55B, pese a que la enzima es capaz de incorporar AMP, GMP y UMP frente a un molde con un OH-C, *BsuLigD* muestra preferencia a la hora de ligar el extremo 3' del NMP correcto (GMP), lo cual indica que la proteína, a pesar de realizar una incorporación infiel de NMPs, mantiene la fidelidad en la ligación. Del mismo modo, cuando *BsuLigD* se encuentra en el molde un Tgly (figura 55C) es capaz de introducir AMP y GMP, pero la reacción de ligación sólo se da en presencia del NTP correcto. Por otra parte, si bien la *BsuLigD* llevaba a cabo la inserción de AMP y CMP frente a un 8oxodG con una eficiencia similar (figura 54D), la posterior reacción de ligación es ligeramente más eficiente cuando el nucleótido introducido es AMP (figura 55D). Por tanto, frente a este daño, *BsuLigD* tiene una potencial capacidad mutagénica. Por último, la eficiencia de la ligación del extremo 3'-OH de un NMP introducido frente a un THF es muy baja ya que, si bien en las condiciones empleadas más del 80% de las moléculas de *primer* han sido extendidas, solo el 10% de estas son posteriormente ligadas al extremo 5'-P de la cadena *downstream* (figura 55E).

Discusión

1. Procesamiento eficiente de sitios AP por proteínas Ku bacterianas

Los sitios AP son lesiones muy frecuentes en el DNA generadas por diversos agentes genotóxicos endógenos o exógenos, que han de ser reparadas para garantizar el mantenimiento del genoma y la supervivencia de las células. Estos sitios AP son reconocidos por enzimas especializadas en escindirlos, bien mediante hidrólisis del enlace fosfodiéster en su lado 5' (AP-endonucleasas) o mediante la ruptura del enlace C3'-O-P del lado 3' por un mecanismo de β -eliminación (AP-liasas), de manera que generan *nicks* en el DNA flanqueados por distintos tipos de extremos (Khodyreva y Lavrik, 2011).

Antes del comienzo de esta Tesis Doctoral se había descrito que la proteína Ku humana era capaz de eliminar sitios AP próximos a los extremos del DNA gracias a una actividad AP/5'-dRP liasa (Roberts *et al.*, 2010; Strande *et al.*, 2012). A pesar de que la presencia de esa actividad no era predecible en las proteínas Ku bacterianas, puesto que carecen del dominio vWA, región de la subunidad Ku70 de la proteína humana en la que reside dicha actividad, esos estudios nos llevaron a evaluar la capacidad de las proteínas Ku bacterianas en reconocer sitios AP y procesarlos. En esta Tesis se ha identificado por primera vez la presencia de una actividad AP/5'-dRP liasa en la proteína Ku de *B. subtilis*. Así, se ha mostrado que *BsuKu* reconoce los sitios AP introduciendo un *nick* en 3' en ausencia de metal (actividad AP-liasa) mediante una reacción de β -eliminación que, por tanto, genera extremos 3'-PUA y 5'-P. Por otro lado, la proteína es capaz de eliminar el grupo 5'-dRP (actividad 5'-dRP liasa) producido tras la acción de una AP-endonucleasa sobre un sitio AP, generando extremos 5'-P que posteriormente pueden ser ligados a un grupo 3'-OH *upstream*.

En esta Tesis Doctoral se ha mostrado que *BsuKu* es capaz de actuar sobre sitios AP presentes en diferentes sustratos de DNA. La proteína ejerce su actividad AP-liasa sobre ssDNA y dsDNA. Además, *BsuKu* es capaz de unirse a DNAs sin extremos de distinta naturaleza, e introducir *nicks* en sitios AP contenidos en estos. Estos resultados sugieren que (i) además de unirse al DNA de manera "clásica" a través de su anillo central, *BsuKu* es capaz de unirse de una manera alternativa en la que podría estar interaccionando con el DNA a través de cargas positivas en la superficie de la proteína, como ocurre en la proteína Ku de *M. smegmatis* (Kushwaha y Grove, 2013a); y, por tanto, (ii) probablemente el residuo responsable de la actividad AP-liasa se localiza fuera del anillo central de *BsuKu*, tal y como está descrito para el Ku70 humano (Roberts *et al.*, 2010). Ambos hechos, la unión "no canónica" al DNA sin extremos y la potencial localización externa del residuo responsable de la actividad AP-liasa, podrían facilitar el reclutamiento de la proteína a los sitios AP del DNA para llevar a cabo su actividad AP-liasa.

En la búsqueda del residuo responsable de la actividad, se han analizado las lisinas 138 y 241 de *BsuKu*, por estar altamente conservadas y localizarse en la superficie externa de la proteína (véase la figura 19). Se puede concluir que ninguno de estos residuos es el responsable de la actividad AP-liasa de *BsuKu*,

puesto que su actividad es similar a la proteína *wild-type*. Se ha descrito que en la proteína Ku humana es necesario mutar dos lisinas en el monómero Ku70 (Lys31 y Lys160) y seis lisinas adicionales en el Ku80 (Lys543, Lys544, Lys545, Lys565, Lys566 y Lys568) para que la actividad AP-liasa sobre sitios AP internos se reduzca por debajo del 10% con respecto a la proteína *wild-type* (Strande *et al.*, 2014). Esto abre la posibilidad que también en el caso de *BsuKu* no sea un único residuo, sino varios, los responsables de la actividad AP/5'-dRP liasa.

En esta Tesis se ha descrito que, del mismo modo que ocurre con la proteína Ku humana, *BsuKu* presenta preferencia por ciertos sustratos para llevar a cabo su actividad AP-liasa (Strande *et al.*, 2012; Kosova *et al.*, 2016). Es capaz de romper el enlace fosfodiéster en sitios AP próximos a extremos 5'-protuberantes, pero no actúa cuando estas lesiones están próximas a extremos 3'-protuberantes. Este hecho supondría una ventaja en un contexto de unión de extremos: si *BsuKu* pudiese actuar de manera eficiente sobre sitios AP presentes en extremos 3'-protuberantes se generaría un grupo PUA que debería ser posteriormente procesado por una actividad nucleolítica adicional para regenerar un extremo 3'-OH y permitir la ligación final por parte de *BsuLigD*. Sin embargo, puesto que *BsuKu* actúa únicamente sobre sitios AP en extremos 5'-protuberantes, tras la actividad AP-liasa se elimina parte de la región de ssDNA que contiene el grupo 3'-PUA, mientras que permanece el grupo 5'-P que puede ser ligado directamente al 3'-OH perteneciente al otro extremo de la DSB, sin que fuera necesaria la intervención de actividades enzimáticas adicionales.

Estudios bioquímicos previos llevados a cabo con las proteínas de NHEJ de *B. subtilis* Ku y LigD mostraron la existencia de una interacción funcional entre ellas (de Vega, 2013). En esta Tesis se ha descrito que la unión previa de *BsuKu* al DNA es necesaria para reclutar a *BsuLigD* y otorgarle la estabilidad necesaria para reunir y posteriormente ligar los extremos de la rotura. El complejo *BsuKu-LigD* es capaz de unir no sólo extremos de DNAs perfectamente complementarios (3'-protuberantes, 3'-recesivos o romos) y parcialmente complementarios, en los que se genera un complejo sináptico con un *gap* de un nucleótido, que es rellenado y ligado por la LigD, sino que además une de manera eficiente moléculas que contienen un sitio AP próximo a extremos 5'-protuberantes *in vitro*. Para ello actúan de manera secuencial y coordinada las actividades de ambas proteínas del sistema: Ku se une a los extremos, reconoce y rompe el enlace fosfodiéster en 3' del sitio AP, recluta a la LigD que posteriormente ligará los extremos, bien directamente si existiera una total complementariedad entre ellos, o previo relleno del *gap* que se pudiera generar en la sinapsis de las dos moléculas de DNA.

B. subtilis puede sobrevivir en condiciones ambientales adversas porque es capaz de formar endosporas. Debido a la ausencia de actividades enzimáticas en la espora, se produce una acumulación de daños en el DNA que deberán ser reparados cuando la célula germine (Setlow, 2003). Unas de las lesiones más frecuentes son los sitios AP, cuya presencia simultánea en zonas próximas de las dos cadenas pueden

dar lugar a DSBs como consecuencia de la posterior actividad de enzimas AP-endonucleasas, tal y como se ha mencionado en el Capítulo 1. En esta Tesis se muestra la capacidad del complejo Ku-LigD para unir moléculas de DNA que contienen sitios AP próximos a extremos 5'-protuberantes, previo procesamiento de los mismos. Estos resultados, junto con el hecho de que, tal y como se ha mencionado en la Introducción, los genes que codifican *BsuKu* y *BsuLigD* se expresen en la preespora sugieren que el complejo *BsuKu-LigD* tendría la potencialidad de reparar eficientemente las DSBs producidas por la hidrólisis endonucleolítica de sitios AP próximos en las dos cadenas durante la germinación y posterior crecimiento de la espora.

Por último, la actividad AP-liasa descrita no se restringe a *BsuKu*, tal y como se ha demostrado en la presente Tesis. La proteína *PaeKu*, de la bacteria Gram-negativa *P. aeruginosa*, filogenéticamente alejada de *B. subtilis*, también es capaz de procesar los sitios AP a través de una actividad AP-liasa. Este resultado permite extender el papel de Ku en la reparación de sitios AP a otras especies bacterianas que posean el sistema de reparación de DSBs por NHEJ.

2. Actividad 5'-dRP liasa de proteínas LigD bacterianas de NHEJ y su potencial papel en BER

Las esporas son formas de resistencia metabólicamente inactivas, sin apenas moléculas energéticas (como ATP o NADH) ni actividades enzimáticas, que son capaces de sobrevivir durante largos períodos de escasez de nutrientes (Setlow, 1994; Cowan *et al.*, 2003). Pese a que la espora de *B. subtilis* posee mecanismos de protección del DNA, tales como las proteínas SASP-tipo- α/β , que se unen a este y alteran su estructura y propiedades protegiéndolo de distintos agentes genotóxicos (Setlow, 2006; Leggett *et al.*, 2012), las esporas están continuamente expuestas a diversas condiciones ambientales que pueden provocar una acumulación de daños en su genoma. Estas lesiones, tales como los fotoproductos, las roturas de cadena, las bases modificadas y los sitios AP, son potencialmente letales y mutagénicas (Setlow y Setlow, 1995).

B. subtilis posee tres genes que codifican AP-endonucleasas: *exoA*, expresado en células en crecimiento y en la preespora; *nfo*, cuya expresión se restringe a la esporulación (Salas-Pacheco *et al.*, 2005); e *yshC*, que codifica una DNA polimerasa de la familia X con actividad AP-endonucleasa y cuyo patrón de expresión aún no se ha determinado (Baños *et al.*, 2010). El gen *nfo* de *B. subtilis*, que codifica la Nfo, se expresa bajo el control del factor de transcripción σ^G en la preespora (Urtiz-Estrada *et al.*, 2003), por lo que la proteína está presente en la espora madura. Por otra parte, existen estudios que sugieren que el gen *exoA*, que codifica la AP endonucleasa ExoA, también se expresaría en la esporulación ya que la medición de los niveles de actividad β -galactosidasa de una fusión *exoA-lacZ* mostró que aumentaban durante la

esporulación (Salas-Pacheco *et al.*, 2005), aunque en este caso no se ha determinado si la proteína está presente en la espora latente. Resultados previos mostraron como las esporas de *B. subtilis* carentes de ExoA y/o Nfo incrementaban su sensibilidad a los tratamientos que generaban sitios AP y roturas en el DNA. Esos trabajos ya avanzaban la potencial importancia de la ruta de BER para reparar los sitios AP que se hubieran acumulado durante la latencia de la espora (Salas-Pacheco *et al.*, 2003, 2005; Moeller *et al.*, 2011). Sin embargo, para llevar a cabo la BER se requerirían, además de una AP-endonucleasa, una 5'-dRP liasa, una polimerasa y una ligasa en la espora.

Como se ha expuesto anteriormente, la proteína *BsuLigD* es codificada por el gen *ykoU*, que forma parte del regulón σ^G , y su expresión es activada por la proteína de unión al DNA SpoVT en la preespora (Wang *et al.*, 2006). En la presente Tesis se ha mostrado que *BsuLigD* podría potencialmente intervenir en la vía de BER ya que la enzima (véase la figura 56) (i) rellena de manera eficiente un *gap* de un nucleótido de una molécula de DNA que contiene un extremo 5'-dRP, (ii) mediante su actividad liasa elimina el grupo 5'-dRP dando lugar a un *nick* flanqueado por extremos 3'-OH y 5'-P, (iii) sella el *nick* y (iv) parece participar junto con la AP endonucleasa Nfo en la reparación de lesiones en el DNA inducidas por desecación por UHV. La habilidad de *BsuLigD* de rellenar el *gap* previamente al corte del grupo 5'-dRP, así como su incapacidad de unir extremos 3'-OH y 5'-dRP, garantizaría la reparación de la lesión sin que se produzca pérdida de información genética. La ausencia de enzimas accesorias en los experimentos de reconstitución de BER indica que las actividades de polimerización, eliminación del 5'-dRP y ligación de *BsuLigD* podrían ser necesarias y suficientes para la reparación por BER de sitios AP durante la germinación y posterior crecimiento, junto con la AP-endonucleasa de *B. subtilis* Nfo y/o ExoA.

Por tanto, aunque *a priori* *BsuLigD* parecía estar implicada únicamente en la reparación de DSBs mediante la vía de NHEJ, los resultados presentados en esta Tesis parecen sugerir una participación potencial de esta proteína también en la vía BER, hipótesis que podría extenderse al resto de bacterias con el sistema NHEJ de reparación de DSBs (en vista a los resultados obtenidos con la LigD de *P. aeruginosa*) y quizás a la recientemente descrita DNA Ligasa de NHEJ de la arquea *Methanocella paludicola* (Bartlett *et al.*, 2013). El papel dual observado en *BsuLigD* ha sido también descrito en proteínas de NHEJ de eucariotas, donde polimerasas de la vía NHEJ intervienen en la vía BER para reparar roturas de cadena asociadas a daños en el DNA (Ramsden, 2011). Por otra parte, recientemente se ha comprobado como la delección de Ku70 o Ku80 en ratones provoca sensibilidad en las células a agentes genotóxicos que provocan lesiones en el DNA, tales como bases alquiladas y oxidadas, y SSBs que son reparadas por las proteínas de la vía de BER (Li *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2014).

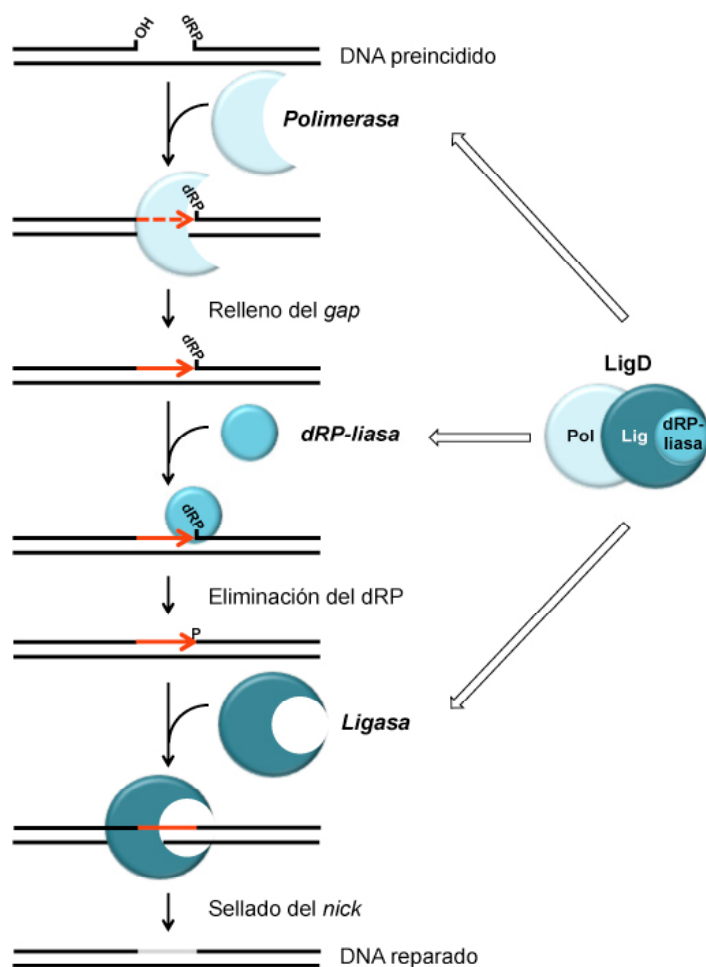


Figura 56. Modelo del papel de *BsuLigD* en BER. *BsuLigD* rellena un *gap* de un nucleótido en un DNA generado tras la acción de una AP-endonucleasa sobre un sitio AP. Con su actividad 5'-dRP liasa elimina el grupo 5'-dRP desplazado, generándose un extremo 5'-P. Por último, sella el *nick* entre el nucleótido incorporado y el 5'-P recién generado, de modo que la lesión queda reparada.

En esta Tesis se ha descrito que el sitio activo responsable de la actividad AP/5'-dRP liasa reside en el LigDom N-terminal de la proteína, si bien no se puede descartar la existencia de residuos en el dominio de polimerización que pudieran contribuir a dicha actividad. La presencia de una actividad 5'-dRP liasa ha sido descrita previamente en las DNA ligasas dependientes de ATP de los bacteriófagos T4 y T7 (Bogehagen y Pinz, 1998) y en la ligasa mitocondrial humana (Pinz y Bogehagen, 1998). Estudios previos han descrito que la ligasa del bacteriófago T4 es capaz de unir directamente un extremo 3'-OH a un 5'-dRP en un *nick* regenerando el sitio AP, que tendría que ser posteriormente procesado por actividades AP-liasas o AP-endonucleasas. Como consecuencia de esta reacción se generaría en el extremo 3' un grupo PUA, que debería ser procesado por una actividad nucleolítica adicional para dar lugar a un extremo 3'-OH "elongable". Por el contrario, *BsuLigD* no es capaz de llevar a cabo esa reacción, ya que

únicamente se observa el producto de ligación en presencia del NTP correcto y una vez se ha eliminado el 5'-dRP (véase la figura 33). Así pues, la prevención de la ligación directa por *BsuLigD* de esos extremos representaría una ventaja, ya que la enzima estaría obligada a eliminar previamente el grupo 5'-dRP, no siendo necesarias actividades enzimáticas accesorias.

Estudios evolutivos sugieren que todas las DNA ligasas dependientes de ATP descienden de un ancestro común y tienen seis motivos conservados en su secuencia (I, III, IIIa, IV, V y VI) que definen una familia de nucleotidiltransferasas [revisado en (Martin y MacNeill, 2002)]. Por lo tanto, la presencia de una actividad 5'-dRP liasa en el dominio ligasa de las LigDs bacterianas permite aventurar que es una característica general de, al menos, las DNA ligasas dependientes de ATP.

3. Actividad AP-liasa de *BsuLigD* en sustratos 5'-recesivos

En el Capítulo 2 se ha descrito que *BsuLigD* presenta actividad AP-liasa sobre moléculas tipo *flap*, sustratos que podrían generarse como consecuencia de la unión de extremos de DNA con zonas protuberantes parcialmente complementarias. Las enzimas con actividad AP-liasa actúan de manera preferente sobre distintos tipos de sustratos de DNA. Mientras que la proteína Ku humana (Strande *et al.*, 2012) y *BsuKu* (Capítulo 1) actúan con su actividad AP-liasa sobre sitios AP próximos a extremos 5', Pol β es más eficiente escindiendo grupos 5'-dRP preincididos por una AP-endonucleasa (Prasad *et al.*, 1998). En esta Tesis Doctoral se ha querido profundizar en la capacidad de *BsuLigD* de procesar sitios AP ubicados en distintas posiciones de la molécula de DNA.

BsuLigD no es activa cuando el sitio AP se encuentra en posición central en un dsDNA (véase la figura 45). Si así fuera, se generaría un *gap* flanqueado por un 3'-PUA que requeriría la actividad adicional de una nucleasa. A diferencia de *BsuLigD*, otras LigDs presentan, además de los dominios polimerasa y ligasa, un dominio fosfoesterasa con actividad 3'-fosfodiesterasa que interviene en la regeneración de los extremos 3'-OH de las cadenas rotas en un paso previo a la ligación (Zhu y Shuman, 2006, 2007). Esta actividad 3'-fosfodiesterasa podría ser capaz de procesar el extremo 3'-PUA, pero puesto que *BsuLigD* carece de este dominio fosfoesterasa, la incapacidad de actuar sobre sitios AP centrales garantizaría que no se generasen extremos que no se pudiesen reparar posteriormente.

Sin embargo, la proteína sí es capaz de procesar sitios AP próximo a extremos 5'-recesivos. En la figura 46 se observa que el procesamiento de estos ocurre en presencia de Mn^{2+} y del nucleótido correcto que debería ser incorporado sustituyendo al sitio AP. El requerimiento de metal y nucleótido podrían indicar que son necesarios para que se forme un complejo estable y catalíticamente activo entre la LigD y el DNA. En este sentido, los estudios estructurales y bioquímicos llevados a cabo con el PolDom de *M. tuberculosis* pusieron de manifiesto la capacidad de este de formar un complejo preternario estable consti-

tuido por un monómero de PolDom con dos iones metálicos y el nucleótido complementario al molde en su sitio activo, unido a un extremo 5'-recesivo, y en ausencia de una cadena *primer* que aporte el extremo 3'-OH (Brissett *et al.*, 2011). La formación de este complejo es relevante porque aceleraría la reacción de NHEJ, probablemente porque provee un sitio de unión del *primer* preparado para ser utilizado en la unión de los extremos. Del mismo modo, *BsuLigD* podría estar formando un complejo con la cadena 5'-recesiva que contiene un sitio AP, el nucleótido correcto que debería incorporarse cuando se eliminase la lesión y el ión Mn^{2+} . El modelo sugerido sería el que se muestra en la figura 57, y se explica a continuación: (1) Se formaría un complejo binario entre la proteína y el DNA con el sitio AP, como ocurre con el PolDom de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (Pitcher *et al.*, 2007b). Está descrito que el PolDom de la LigD de *M. tuberculosis* interacciona con el fosfato en 5' del oligonucleótido *downstream*. Sin embargo, en los experimentos presentados en el Capítulo 3, el sustrato *downstream* empleado carece de este 5'-P. Probablemente, en este caso el complejo se estaría estabilizando gracias a la interacción de la proteína con un fosfato interno. En este sentido se ha descrito la habilidad del PolDom de *M. tuberculosis* de unirse a fosfatos internos (Brissett *et al.*, 2011). (2) La unión del nucleótido correcto permitiría la estabilización del complejo. (3) Una vez posicionado el nucleótido correcto, la actividad AP-liasa de *BsuLigD* rompería el enlace fosfodiéster en el sitio AP del DNA, generando un fosfato en 5'. Este grupo 5'-P recién generado podría interactuar con los residuos Lys331 y Lys341 de *BsuLigD*, descritos como los responsables de la interacción con el fosfato en 5' (de Vega, 2013), lo cual favorecería más aún la estabilización del complejo preternario entre la proteína, el nucleótido y el DNA, a la espera de la llegada de un *primer* que permitiese llevar a término la reacción de unión de extremos.

Como se ha mostrado en las figuras 46, 47 y 48, se observa la aparición de un producto de ligación únicamente en presencia del NTP correcto y siempre y cuando el NMP en 3' de la cadena molde sea complementario al nucleótido anterior al que se localiza frente al sitio AP. Este hecho indica que la molécula donadora del 3'-OH, es decir, la que está actuando como *primer* en la reacción de ligación, es la cadena molde, bien de la misma molécula de modo que se estaría formando un *hairpin*, bien de una diferente, estableciéndose una sinapsis entre dos moléculas independientes. Para dilucidar cuál de estas dos reacciones se favorece, empleamos diversas moléculas de DNA no marcado con extremos 3'-protuberantes en exceso, para fomentar la reacción de sinapsis frente a la formación del *hairpin*. Según los resultados obtenidos con los distintos DNAs no marcados ensayados, se observa que el *primer* utilizado por *BsuLigD* es, en todos los casos analizados, la cadena molde de la misma molécula, de modo que se estaría formando un *hairpin* en el que solo habría un apareamiento que cerraría el extremo del DNA. En estudios realizados con el PolDom de *M. tuberculosis* (Brissett *et al.*, 2007), los autores observaron que la proteína era capaz de generar sustratos que imitaban un *gap* de un nucleótido mediante autoapareamiento, de manera similar a lo que podría estar ocurriendo en el caso de *BsuLigD*. Si bien es cierto que en ese trabajo se muestra que

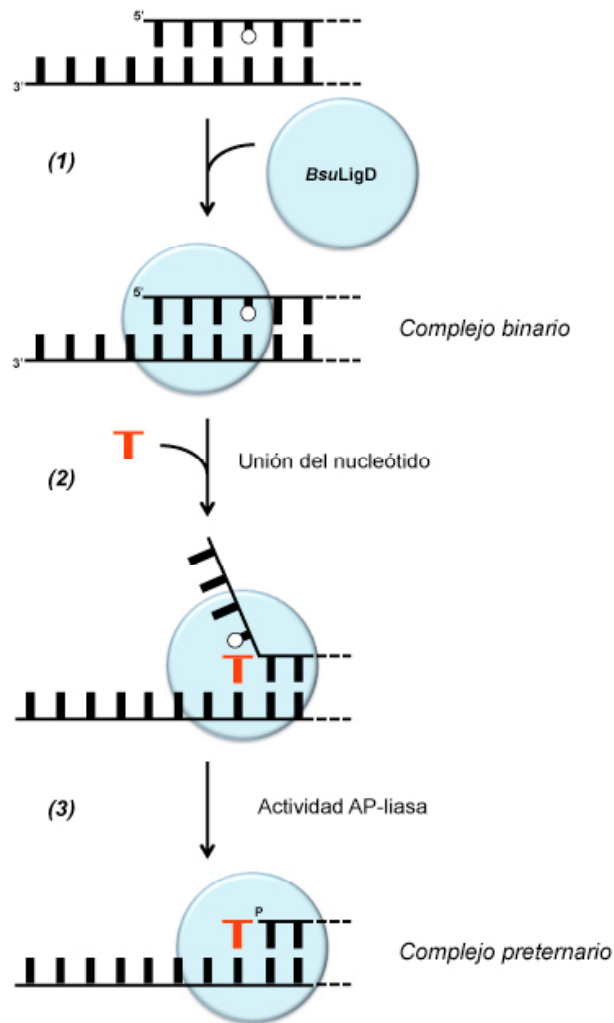


Figura 57. Modelo de la formación del complejo preternario de *BsuLigD* con un DNA 5'-recesivo con un sitio AP. (1) El sitio AP (esquemático con un círculo blanco) es reconocido por *BsuLigD* estabilizándose probablemente por la interacción con un fosfato interno en el DNA, formándose el complejo binario. (2) *BsuLigD* une el nucleótido correcto (en rojo) que debería insertarse sustituyendo al sitio AP, pero sin formar el enlace fosfodiéster. (3) La actividad AP-liasa de *BsuLigD* incide sobre la región 3' del sitio AP, generándose un fosfato en 5' que podría interactuar con el dominio polimerasa de la proteína, estabilizando el complejo. El complejo DNA-proteína-NTP estaría preparado para la llegada de un *primer*.

PolDom promueve la sinapsis entre dos moléculas independientes, en los experimentos mostrados en el Capítulo 3 todos los productos de ligación obtenidos eran consecuencia del autoapareamiento de la molécula molde, que estaba actuando a su vez como *primer*.

Por otra parte, en el Capítulo 1 se ha determinado que *BsuKu* recluta a *BsuLigD* permitiendo la

unión de dos moléculas de DNA, y está descrito que estimula sus actividades polimerasa y ligasa (de Vega, 2013). Por esto resultó interesante analizar si la presencia de *BsuKu* favorecería la unión entre dos moléculas independientes en detrimento de la formación del *hairpin*. Según los resultados mostrados en la figura 51, incluso en presencia de *BsuKu* y un DNA no marcado en exceso se observó un producto de ligación del tamaño correspondiente al autoapareamiento de la molécula molde, lo cual podría deberse a que no se ha hallado la longitud óptima de la región 3'-protuberante del sustrato no marcado para favorecer la reacción de sinapsis entre dos moléculas independientes.

Puesto que en el Capítulo 1 se ha descrito que *BsuKu* a su vez es capaz de procesar sitios AP, era interesante analizar cual sería la contribución de cada una de las proteínas al corte del sitio AP observado en la figura 51. Se puede concluir que *BsuKu* estimula *in vitro* la actividad AP-liasa de *BsuLigD* y no al revés, puesto que se observó un aumento del producto en presencia de ambas proteínas pero sólo cuando el nucleótido aportado en la reacción es el correcto (véase la figura 52), requisito necesario para el funcionamiento de *BsuLigD*. En este mismo experimento se obtuvo un resultado interesante: mientras que la estimulación por parte de *BsuKu* de la actividad AP-liasa de *BsuLigD* sobre el sustrato 5'-recesivo fue notable, no se observó un aumento del producto de ligación obtenido tras el procesamiento del sitio AP, es decir *BsuKu* potenció la actividad AP-liasa de *BsuLigD* pero limitó la reacción de ligación, de modo que podría estar impidiendo la formación del *hairpin*. De esta manera, *BsuKu* supondría un mecanismo de protección de los extremos evitando que quedasen sellados y bloqueasen la reparación por NHEJ, lo cuál supondría un suicidio para la célula. En la literatura se han descrito otras proteínas con una actividad AP-liasa "suicida", tales como PARP-1 que permanece unida covalentemente al sitio AP tras romper el enlace fosfodiéster, de manera que representa un complejo de reparación abortivo (Prasad *et al.*, 2014). En el caso del sistema de reparación de NHEJ de *B. subtilis*, *BsuKu* garantizaría que la molécula de DNA cuyo sitio AP ha sido procesado por *BsuLigD* no quedase bloqueado por esta y permaneciera disponible para una posible reacción de NHEJ posterior.

4. Bypass de lesiones por *BsuLigD* y su posible papel en TLS

La proteína *BsuLigD* tiene dos dominios funcionales: LigDom y PolDom. El PolDom de las LigDs bacterianas pertenece a la superfamilia AEP, tal y como han descrito análisis *in silico* (Iyer *et al.*, 2005) y estudios cristalográficos (Zhu *et al.*, 2006; Pitcher *et al.*, 2007b). Las AEPs son polimerasas absolutamente necesarias para la iniciación de la replicación del DNA en arqueas y eucariotas (Frick y Richardson, 2001), pero además intervienen en numerosos procesos celulares, ya que poseen una amplia variedad de actividades nucleotidil transferasas, tales como primasa, transferasa terminal y de relleno de *gaps* de DNA (Lao-Sirieix *et al.*, 2005; Pitcher *et al.*, 2005b; Bowater y Doherty, 2006). Las LigDs actúan sobre molé-

culas de DNA con *gaps*, que pueden surgir durante el apareamiento limitado de bases en los extremos de DNA producidos por DSBs (Pitcher *et al.*, 2007a; Shuman y Glickman 2007). Por otra parte, en la reparación de DSBs, la rotura puede estar asociada a daños en el DNA, de manera que en las etapas de unión de extremos y relleno previas al sellado de las cadenas se podría eventualmente requerir el apareamiento con bases dañadas en el molde. La TLS es el proceso por el que se incorporan nucleótidos frente a lesiones en el DNA para que no se bloquee la acción de las polimerasas, y permite que el daño sea tolerado y se restaure el proceso replicativo (Sale *et al.*, 2012). La mayoría de las polimerasas responsables de la TLS pertenecen a la familia Y, habiéndose descrito en *B. subtilis* dos proteínas que intervienen en este proceso: PolY1 y PolY2. PolY1 se expresa constitutivamente y PolY2 en presencia de daños en el DNA (Duigou *et al.*, 2004). El hecho de que sus patrones de expresión difieran indica que ambas desempeñan un papel biológico diferente. Además, se ha descrito que la Pol I, perteneciente a la familia A, puede también colaborar en esta vía de tolerancia al daño (Duigou *et al.*, 2005).

En estudios previos se ha mostrado la preferencia de *BsuLigD* en la inserción de NTPs en detrimento de dNTPs (de Vega, 2013), lo cual puede ser particularmente ventajoso en los periodos de quiescencia de *B. subtilis*, cuando es probable que las reservas de dNTPs escaseen en relación con las de NTPs (Gon *et al.*, 2006).

Por todo esto, en esta Tesis se ha analizado la capacidad de la proteína *BsuLigD* de tolerar distintas lesiones en el molde de moléculas con un *gap* de un nucleótido en presencia de cada uno de los NTPs. En la literatura existen trabajos en los que se ha estudiado el *bypass* de lesiones en el molde de moléculas de DNA, tales como THF y 8oxodG por parte del PolDom de LigDs de *Pseudomonas* y *Mycobacterium* respectivamente (Yakovleva y Shuman, 2006; Pitcher *et al.*, 2007b). Sin embargo, en la presente Tesis se quiso emplear la proteína completa para analizar la capacidad de polimerizar sobre un daño (*BsuLigD* mutante E184A) y la posterior ligación del *primer* elongado (*BsuLigD wild-type*). Esto permite obtener una visión más cercana a la realidad del proceso completo que tendría lugar en un *gap* de un nucleótido con un daño en el molde.

La oxidación de las bases nitrogenadas provoca la aparición de nucleótidos modificados en el DNA, lesiones que alteran el metabolismo replicativo de la célula. El Tgly y la OH-C son lesiones altamente citotóxicas producidas por la oxidación de la timina y la citosina, respectivamente. En esta Tesis se ha observado que cuando en el molde se halla un Tgly, *BsuLigD* a través de su PolDom, es capaz de incorporar un nucleótido frente al daño. Pese a que muestra cierta preferencia en la incorporación de AMP, también incorpora otros nucleótidos de manera infiel (figura 54C). Este resultado contrasta con el descrito para la polimerasa de la familia Y Pol η , que incorpora de manera fiel dAMP frente a un molde con un Tgly, y con una eficiencia similar a la inserción frente a un molde sin daño (Kusumoto *et al.*, 2002). Analizando el *bypass* que realiza la *BsuLigD* frente a la lesión OH-C se observa asimismo que incorpora nucleótidos

de manera infiel (figura 54B). Esta descrito que la proteína humana Pol ι , de la familia Y, lleva a cabo una incorporación fiel cuando se enfrenta a este tipo de lesión en el molde (Vaisman y Woodgate, 2001). A pesar del comportamiento mutagénico de la *BsuLigD* frente a las lesiones OH-C y Tgly, cuando se analiza su capacidad de sellar el *primer* elongado frente a estos nucleótidos modificados al oligonucleótido *downstream*, se observa que la reacción de ligación es fiel (véase la figura 55B y C), puesto que *BsuLigD* sella el *nick* cuando el nucleótido incorporado frente al daño es el correcto. Estos resultados indican que en este tipo de sustrato las actividades polimerasa y ligasa de *BsuLigD* actúan de manera eficiente y fiel para tolerar un Tgly o un OH-C presente en el molde. La disminución en la eficiencia de ligación cuando el *primer* ha sido extendido con un nucleótido erróneo podría permitir que otras actividades nucleolíticas pudieran eliminarlo, confiriendo a la LigD una nueva oportunidad para introducir el nucleótido correcto.

Otra lesión analizada es el 8oxodG, que procede de la oxidación de la guanina. El 8oxodG puede aparearse tanto con dCMP como con dAMP, por lo que se trata de una lesión altamente mutagénica. *BsuLigD* incorpora de manera similar AMP y CMP (véase figura 54D). Este comportamiento es diferente al mostrado por la DNA polimerasa de la familia Y Pol κ , la cual incorpora preferentemente dAMP frente a un 8oxodG (Zhang *et al.*, 2000). Por el contrario, los resultados obtenidos en estudios previos realizados con los PolDom de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* muestran que la polimerización frente a este tipo de lesiones es preferencialmente no-mutagénica (Pitcher *et al.*, 2007b). Por otra parte la Pol ι humana, así como la Pol η de *Saccharomyces cerevisiae*, ambas pertenecientes a la Familia Y, también incorporan preferentemente dCMP frente a este tipo de lesión y por tanto promueven la formación del par correcto dCMP:8oxodG (McCulloch *et al.*, 2009; Kirouac y Ling, 2011). Cuando se analiza la capacidad de *BsuLigD* a la hora de sellar el *nick* resultante de la elongación del *primer* sobre un 8oxodG en el molde (véase figura 55D), se observa una ligación preferente del par AMP:8oxodG. Estos resultados indican que *BsuLigD* incorporaría de manera estable el nucleótido incorrecto frente a 8oxodG.

Pese a que las polimerasas pertenecientes a la familia Y difieren enormemente en su estructura del PolDom de las LigDs, ambos grupos comparten la plasticidad de su centro activo que es inusualmente amplio y expuesto, permitiendo acomodar nucleótidos modificados voluminosos presentes en el molde. Los limitados contactos del centro activo con el DNA y el nucleótido entrante contribuyen también a la reducida fidelidad de estas polimerasas (Sale *et al.*, 2012; Yang, 2014).

En esta Tesis también se ha analizado la capacidad de la actividad polimerasa de *BsuLigD* de llevar a cabo el *bypass* sobre un sitio AP presente en el molde de moléculas de DNA con un *gap* de un nucleótido. *BsuLigD* incorpora preferentemente AMP frente a un THF en el molde (véase figura 54E). Resultados similares se han obtenido con las polimerasas humanas de la familia Y, Pol κ y Pol η , así como con la DNA polimerasa 4 (Dpo4) de *Sulfolobus solfataricus* (Zhang *et al.*, 2000; Kokoska *et al.*, 2003). Esta preferencia en la incorporación de nucleótidos de adenina frente a una lesión es una característica común

a numerosas DNA polimerasas y es la conocida como “regla de la A” (Strauss, 2002). Sin embargo, la reacción de ligación observada en estas condiciones es muy poco eficiente, es decir, que a pesar de incorporar un nucleótido frente al daño, *BsuLigD* no parece capaz de sellar el *nick* resultante (véase figura 55E).

En el Capítulo 4 se ha descrito que *BsuLigD* es capaz de realizar el *bypass* de lesiones en el molde en moléculas con un *gap* de un nucleótido de manera fiel (OH-C, Tgly) o infiel (8oxodG). Por otro lado, la actividad ligasa de *BsuLigD* de la proteína es capaz de sellar los *nicks* generados tras la elongación de un *primer* frente a distintos tipos de lesiones (Tgly, OH-C y 8oxodG), siendo además una reacción fiel para los daños Tgly y OH-C. Estos resultados parecen sugerir que además de las ampliamente descritas polimerasas de TLS de *B. subtilis*, PolY1 y PolY2, así como PolI, asimismo relacionada con la TLS, *BsuLigD* también podría intervenir en este proceso de tolerancia al daño. Sin duda, será interesante analizar si la proteína es capaz de llevar a cabo la posterior elongación de dichos nucleótidos o si, por el contrario, sería necesaria otra polimerasa especializada en TLS para llevar a cabo la reacción. Está descrito que *BsuKu* estimula las dos actividades de *BsuLigD*, polimerización y ligación sobre sustratos no dañados (de Vega, 2013) por lo que será importante determinar la influencia de Ku en las reacciones de *bypass* de lesiones, no solo durante la inserción del nucleótido sino también en su posterior elongación y/o ligación tanto sobre moléculas tipo *gap*, como durante la sinapsis de extremos portadores de dichas lesiones.

A la vista de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, cabe destacar en primer lugar la enorme versatilidad de *BsuLigD*, a cuyas actividades polimerasa y ligasa descritas previamente (de Vega, 2013), se suma la aquí presentada AP/5'-dRP liasa. Además, *BsuLigD* es capaz de realizar el *bypass* de lesiones en moldes de moléculas con un *gap* de un nucleótido, y llevar a cabo la ligación final. Estos resultados parecen indicar un potencial papel de esta enzima, no sólo en la ruta de NHEJ, sino en otras vías de reparación (BER) o de tolerancia al daño (TLS) del DNA. En este sentido, se ha relacionado una función de la LigD de *P. putida* independiente de Ku en mutagénesis en fase estacionaria (Paris *et al.*, 2015), por lo que los autores conjeturan que la LigD podría estar implicada en otros procesos relacionados con el metabolismo del DNA tales como TLS y/o el relleno de *gaps* en DNAs dañados. El patrón de expresión de *BsuLigD* en la esporulación asegura su presencia en la germinación de la espora, momento en el que la célula puede ser especialmente vulnerable, puesto que se han podido acumular daños en su genoma que pongan en peligro la supervivencia de la bacteria. La multifuncionalidad de *BsuLigD* podría suponer un sistema energéticamente económico pero eficiente para garantizar la estabilidad del genoma. Por otra parte, en esta Tesis se ha descrito que el otro componente de la ruta NHEJ de *B. subtilis*, *BsuKu*, también interviene en la reparación de sitios AP en moléculas circulares y no solo recluta y estimula a *BsuLigD*, sino que regula en cierta medida sus actividades. El hecho de que *BsuKu* esté especializada en el procesamiento de sitios AP cuando estos se encuentran en extremos 5'-protuberantes, mientras que *BsuLigD* pro-

cesa principalmente sitios AP cercanos a extremos 5'-recesivos, podría estar indicando una diferenciación funcional de ambas proteínas según el tipo de extremos generados, pero en cualquier caso, la presencia de la misma actividad en las dos proteínas no hace sino ahondar en la importancia que tiene la reparación de los sitios AP en la viabilidad celular. En este sentido, se han descrito numerosas proteínas que poseen una actividad 5'-dRP liasa que podría participar en la protección de las células contra los sitios AP [revisado en (Khodyreva y Lavrik, 2011)]. Entre estas proteínas encontramos a la DNA polimerasa I de *E. coli* (Pinz y Bogenhagen, 2000); la proteína UvrA, implicada en la ruta de NER de *E. coli* (Snowden *et al.*, 1990); las glicosilasas de mamíferos NEIL-1, -2 y -3, cuya actividad 5'-dRP es similar a la de Pol β (Grin *et al.*, 2006); y PARP-1 y -2, proteínas implicadas en la regulación de la vía BER en eucariotas (Khodyreva *et al.*, 2010; Kutuzov *et al.*, 2011). Por otro lado, la Pol X de *Bacillus subtilis* es capaz de procesar sitios AP mediante una actividad AP-endonucleasa intrínseca (Baños *et al.*, 2010). Todos estos ejemplos ponen de manifiesto la importancia de una reparación eficiente de los sitios AP, puesto que se trata del daño más abundante en las células (Lindahl, 1993).

Conclusiones

1. La proteína *BsuKu* posee una actividad AP-liasa capaz de incidir en el enlace fosfodiéster en 3' al sitio AP mediante un mecanismo de β -eliminación en una reacción independiente de metal, siendo capaz de actuar sobre sitios AP en moléculas de ssDNA, dsDNA, DNAs sin extremos y con extremos 5'-protuberantes. Las actividades coordinadas de las proteínas Ku (AP-liasa) y LigD (ligasa y polimerasa) de *B. subtilis* permiten unir sustratos con un sitio AP próximo a extremos 5', simulando una reacción de NHEJ *in vitro*.
2. La proteína *BsuKu* tiene actividad 5'-dRP liasa, y junto con la *BsuLigD*, tiene la capacidad potencial de reparar de manera eficiente roturas de doble cadena producidas por hidrólisis endonucleolítica de sitios AP acumulados durante la germinación de la espora.
3. La presencia de la actividad AP-liasa en la proteína Ku de *P. aeruginosa* permite extrapolar los resultados obtenidos con la *BsuKu* al resto de proteínas Ku bacterianas.
4. La *BsuLigD* posee una actividad 5'-dRP liasa que permite la eliminación de un grupo 5'-dRP, generado por la hidrólisis de un sitio AP por una AP-endonucleasa y, en coordinación con sus actividades de polimerización y ligasa permite la reparación eficiente de DNAs que contienen un sitio AP en una reacción de BER reconstituida *in vitro*. El hecho de que la *BsuLigD* no sea capaz de ligar directamente grupos 3'-OH y 5'-dRP adyacentes, sino que requiera el relleno previo del *gap* antes de eliminar el grupo 5'-dRP, garantizaría que no haya pérdida de información genética en la reparación.
5. La actividad 5'-dRP liasa de la *BsuLigD* se localiza en el dominio ligasa N-terminal de la enzima. Este hecho, junto con la presencia de una actividad 5'-dRP liasa en otras DNA ligasas dependientes de ATP, indicaría que se trata de una característica común a este grupo de ligasas.
6. El requerimiento de un paso de polimerización, de eliminación del grupo 5'-dRP y finalmente de ligación en la ruta BER, junto con la participación de la *BsuLigD* con la AP-endonucleasa de la espora Nfo en la reparación de lesiones en el DNA inducidas por desecación (UHV), sugiere que ambas proteínas podrían formar parte de una vía BER que opere en la espora.
7. La presencia de una actividad 5'-dRP liasa también en la proteína homóloga de la bacteria *P. aeruginosa* permite generalizar los resultados obtenidos con la *BsuLigD* al resto de las LigDs bacterianas.
8. La *BsuLigD* tiene actividad AP-liasa sobre sitios AP próximos a extremos 5'-recesivos, para lo que

Conclusiones

requiere del catión Mn^{2+} , así como de la presencia del nucleótido correcto que ha de incorporarse en la posición del sitio AP una vez que sea eliminado. Estos requerimientos sugieren la necesidad de la formación de un complejo preternario DNA-nucleótido-proteína para garantizar la rápida unión de un *primer* al grupo 5'-P generado tras el procesamiento del sitio AP.

9. La proteína *BsuKu* estimula la actividad AP-liasa de la *BsuLigD* pero inhibe la formación de un *hair-pin*, evitando así que los extremos del DNA queden sellados y no pueda llevarse a cabo la unión de dos moléculas de DNA independientes.
10. La *BsuLigD* es capaz de introducir ribonucleótidos frente a lesiones tales como OH-C, Tgly y 8oxodG en moléculas de un *gap* de un nucleótido. Una vez insertado el nucleótido, la *BsuLigD* es capaz de llevar a cabo el posterior paso de ligación siempre que el nucleótido introducido sea el correcto (GMP y AMP en el caso de las lesiones OH-C y Tgly, respectivamente) o el incorrecto (AMP) frente a la lesión 8oxodG, lo cual podría sugerir un potencial papel de *BsuLigD* en la ruta de tolerancia al daño TLS en esporas.

Bibliografía

- Aguilera, A. y Gómez-González, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet*, **9**, 204–17.
- Akey, D., Martins, A., Aniwku, J., Glickman, M.S., Shuman, S. y Berger, J.M. (2006). Crystal structure and nonhomologous end-joining function of the ligase component of *Mycobacterium* DNA ligase D. *J Biol Chem*, **281**, 13412–23.
- Almeida, K.H. y Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 695–711.
- Alonso, J.C., Cardenas, P.P., Sanchez, H., Hejna, J., Suzuki, Y. y Takeyasu, K. (2013). Early steps of double-strand break repair in *Bacillus subtilis*. *DNA Repair (Amst)*, **12**, 162-76.
- Aravind, L. y Koonin, E.V. (2001). Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res*, **11**, 1365–74.
- Ayora, S., Carrasco, B., Cárdenas, P.P., César, C.E., Cañas, C., Yadav, T., Marchisone, C. y Alonso, J.C. (2011). Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev*, **35**, 1055–81.
- Bailly, V. y Verly, W.G. (1988). Possible roles of β -elimination and δ -elimination reactions in the repair of DNA containing AP (apurinic/aprimidinic) sites in mammalian cells. *Biochem J*, **253**, 553–9.
- Baños, B., Villar, L., Salas, M. y de Vega, M. (2010). Intrinsic apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease activity enables *Bacillus subtilis* DNA polymerase X to recognize, incise, and further repair abasic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 19219–24.
- Bartlett, E.J., Brissett, N.C. y Doherty, A.J. (2013). Ribonucleolytic resection is required for repair of strand displaced nonhomologous end-joining intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E1984–91.
- Baute, J. y Depicker, A. (2008). Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Crit Rev Biochem Mol*, **43**, 239–76.
- Beard, W.A. y Wilson, S.H. (2006). Structure and mechanism of DNA polymerase β . *Chem Rev*, **53**, 2768–80.

Bibliografía

- Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E.G., McDonald, J.P., Prasad, R., Wilson, S.H., Woodgate, R. y Kunkel, T.A. (2001). 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase ϵ *in vitro*. *Science*, **291**, 2156–9.
- Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J.C. y Reynaud, C.A. (2006). Nonoverlapping functions of DNA polymerases Mu, Lambda, and Terminal Deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination *in vivo*. *Immunity*, **25**, 31–41.
- Bhattarai, H., Gupta, R. y Glickman, M.S. (2014). DNA ligase C1 mediates the LigD-independent nonhomologous end-joining pathway of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, **196**, 3366–76.
- Black, S., Kashkina, E., Kent, T. y Pomerantz, R. (2016). DNA Polymerase θ : A Unique Multifunctional End-Joining Machine. *Genes (Basel)*, **7**, 67.
- Bogenhagen, D.F. y Pinz, K.G. (1998). The action of DNA ligase at abasic sites in DNA. *J Biol Chem*, **273**, 7888–93.
- Bowater, R. y Doherty, A.J. (2006). Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet*, **2**, 0093–9.
- Braithwaite, E.K., Prasad, R., Shock, D.D., Hou, E.W., Beard, W.A. y Wilson, S.H. (2005). DNA polymerase λ mediates a back-up base excision repair activity in extracts of mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, **280**, 18469–75.
- Brissett, N.C., Pitcher, R.S., Juarez, R., Picher, A.J., Green, A.J., Dafforn, T.R., Fox, G.C., Blanco, L. y Doherty, A.J. (2007). Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science*, **318**, 456–9.
- Brissett, N.C., Martin, M.J., Pitcher, R.S., Bianchi, J., Juarez, R., Green, A.J., Fox, G.C., Blanco, L. y Doherty, A.J. (2011). Structure of a preternary complex involving a prokaryotic NHEJ DNA polymerase. *Mol Cell*, **41**, 221–31.
- Brissett, N.C., Martin, M.J., Bartlett, E.J., Bianchi, J., Blanco, L. y Doherty, A.J. (2013). Molecular basis for DNA double-strand break annealing and primer extension by an NHEJ DNA polymerase. *Cell Rep*, **5**, 1108–20.

- Burma, S., Chen, B.P.C. y Chen, D.J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1042–8.
- 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**, 439–48.
- Choi, Y.J., Li, H., Son, M.Y., Wang, X.H., Fornasaglio, J.L., Sobol, R.W., Lee, M., Vijg, J., Imholz, S., Döllé, M.E.T., van Steeg, H., Reiling, E. y Hasty, P. (2014). Deletion of individual Ku subunits in mice causes an NHEJ-independent phenotype potentially by altering apurinic/apyrimidinic site repair. *PLoS One*, **9**, e86358.
- Cowan, A.E., Koppel, D.E., Setlow, B. y Setlow, P. (2003). A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: implications for spore dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4209–14.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C. y Leach, D.R.F. (2001). Recombination at double-strand breaks and DNA ends: Conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell*, **8**, 1163–74.
- D'souza, D.I. y Harrison, L. (2003). Repair of clustered uracil DNA damages in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4573–81.
- Daley, J.M., Vander Laan, R.L., Suresh, A. y Wilson, T.E. (2005). DNA joint dependence of Pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *J Biol Chem*, **280**, 29030–7.
- Dalhus, B., Laerdahl, J.K., Backe, P.H. y Bjørås, M. (2009). DNA base repair - Recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev*, **33**, 1044–78.
- David, S.S. y Williams, S.D. (1998). Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair. *Chem Rev*, **98**, 1221–62.
- De Bont, R. y van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data. *Mutagenesis*, **19**, 169–85.
- de Vega, M. (2013). The minimal *Bacillus subtilis* nonhomologous end joining repair machinery. *PLoS One*, **8**, e64232.

Bibliografía

- de Ory, A., Nagler, K., Carrasco, B., Raguse, M., Zafra, O., Moeller, R. y De Vega, M. (2016). Identification of a conserved 5'-dRP lyase activity in bacterial DNA repair ligase D and its potential role in base excision repair. *Nucleic Acids Res*, **44**, 1833–44.
- de Vries, E., van Driel, W., Bergsma, W.G., Arnberg, A.C. y van der Vliet, P.C. (1989). HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J Mol Biol*, **208**, 65–78.
- Della, M., Palmbo, P.L., Tseng, H.M., Tonkin, L.M., Daley, J.M., Topper, L.M., Pitcher, R.S., Tomkinson, A.E., Wilson, T.E. y Doherty, A.J. (2004). Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science*, **306**, 683–5.
- Dianov, G.L., Timchenko, T.V., Sinitsina, O.I., Kuzminov, A.V., Medvedev, O.A. y Salganik, R.I. (1991). Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation. *Mol Gen Genet*, **225**, 448–52.
- Dillingham, M.S. y Kowalczykowski, S.C. (2008). RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol Mol Biol Rev*, **72**, 642-71.
- Dogliotti, E., Fortini, P., Pascucci, B. y Parlanti, E. (2001). The mechanism of switching among multiple BER pathways. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **68**, 3–27.
- Doherty, A.J. y Jackson, S.P. (2001). DNA repair: How Ku makes ends meet. *Curr Biol*, **11**, 920–4.
- Doherty, A.J., Jackson, S.P. y Weller, G.R. (2001). Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS Lett*, **500**, 186–8.
- Downs, J.A. y Jackson, S.P. (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 367–78.
- Dudášová, Z., Dudáš, A. y Chovanec, M. (2004). Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **28**, 581–601.
- Duigou, S., Ehrlich, S.D., Noirot, P. y Noirot-Gros, M.F. (2004). Distinctive genetic features exhibited by the Y-family DNA polymerases in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **54**, 439–51.

- Duigou, S., Ehrlich, S.D., Noirot, P. y Noirot-Gros, M.F. (2005). DNA polymerase I acts in translesion synthesis mediated by the Y-polymerases in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **57**, 678–90.
- Earl, A.M., Losick, R. y Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol*, **16**, 269–75.
- Feig, D.I., Sowers, L.C. y Loeb, L.A. (1994). Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 6609–13.
- Frick, D.N. y Richardson, C.C. (2001). DNA primases. *Annu Rev Biochem*, **70**, 39–80.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A. y Ellenberg, T. (2006). *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd ed. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Frit, P., Barboule, N., Yuan, Y., Gomez, D. y Calsou, P. (2014). Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst)*, **17**, 81–97.
- Fromme, J.C. y Verdine, G.L. (2004). Base excision repair. *Adv Protein Chem*, **69**, 1–41.
- Fuchs, R.P. y Fujii, S. (2013). Translesion DNA synthesis and mutagenesis in prokaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**, a012682.
- García-Díaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A. y Blanco, L. (2001). Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in Human DNA Polymerase λ . *J Biol Chem*, **276**, 34659–63.
- 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 λ -dependent repair of DNA gaps with minimal homology. *Mol Cell*, **13**, 561–72.
- Genois, M.M., Paquet, E.R., Laffitte, M.C.N., Maity, R., Rodrigue, A., Ouellette, M. y Masson, J.Y. (2014). DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, **78**, 40–73.

Bibliografia

- Gon, S., Camara, J.E., Klungsøyr, H.K., Crooke, E., Skarstad, K. y Beckwith, J. (2006). A novel regulatory mechanism couples deoxyribonucleotide synthesis and DNA replication in *Escherichia coli*. *EMBO J*, **25**, 1137–47.
- Gong, C., Martins, A., Bongiorno, P., Glickman, M.S. y Shuman, S. (2004). Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria. *J Biol Chem*, **279**, 20594–606.
- Gong, C., Bongiorno, P., Martins, A., Stephanou, N.C., Zhu, H., Shuman, S. y Glickman, M.S. (2005). Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 304–12.
- Gottlieb, T.M. y Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, **72**, 131–42.
- Grin, I.R., Khodyreva, S.N., Nevinsky, G.A. y Zharkov, D.O. (2006). Deoxyribose phosphate lyase activity of mammalian endonuclease VIII-like proteins. *FEBS Lett*, **580**, 4916–22.
- Gunka, K., Tholen, S., Gerwig, J., Herzberg, C., Stüllke, J. y Commichau, F.M. (2012). A high-frequency mutation in *Bacillus subtilis*: Requirements for the decryptification of the *gudB* glutamate dehydrogenase gene. *J Bacteriol*, **194**, 1036–44.
- Haldenby, S., White, M.F. y Allers, T. (2009). RecA family proteins in archaea: RadA and its cousins. *Biochem Soc Trans*, **37**, 102–107.
- Hatahet, Z. y Wallace, S. (1998). Translesion DNA Synthesis. In: Nickoloff H. A., Hoekstra M. F. (Eds.), *DNA damage and repair, Vol 1: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes*. Totowa, NJ, 229–62.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. y Sharma, R.A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **8**, 193–204.
- Higgins, D. y Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev*, **36**, 131–48.
- Hiom, K. (2010). Coping with DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, **9**, 1256–63.

- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**, 366–74.
- Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*, **361**, 1475–85.
- Horneck, G. (1993). Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: Results from experiments in space. *Orig Life Evol Biosph*, **23**, 37–52.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., Leipe, D.D. y Aravind, L. (2005). Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: Structural insights and new members. *Nucleic Acids Res*, **33**, 3875–96.
- Jackson, S.P. y Bartek, J. (2010). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**, 1071–8.
- Khodyreva, S.N., Ilina, E.S., Kutuzov, M.M., Sukhanova, M.V y Lavrik, O.I. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 interaction with apurinic/apyrimidinic sites. *Dokl Biochem Biophys*, **431**, 69–72.
- Khodyreva, S. y Lavrik, O.I. (2011). New players in recognition of intact and cleaved AP sites: Implication in DNA repair in mammalian cells. In: Chen, C. (Ed.), *Selected Topics in DNA Repair*. Rijeka, Croatia, 305–30.
- Kirouac, K.N. y Ling, H. (2011). Unique active site promotes error-free replication opposite an 8-oxoguanine lesion by human DNA polymerase η . *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 3210–5.
- Kolter, R., Siegele, D.A. y Tormo, A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol*, **47**, 855–74.
- Kokoska, R.J., McCulloch, S.D. y Kunkel, T.A. (2003). The efficiency and specificity of apurinic/apyrimidinic site bypass by human DNA polymerase η and *Sulfolobus solfataricus* Dpo4. *J Biol Chem*. **278**, 50537–45.
- Koonin, E.V, Wolf, Y.I., Kondrashov, A.S. y Aravind, L. (2000). Bacterial homologs of the small subunit of eukaryotic DNA Primase. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **2**, 509–12.

Bibliografia

- Kosova, A.A., Khodyreva, S.N. y Lavrik, O.I. (2016). Ku antigen displays the AP lyase activity on a certain type of duplex DNA. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics*, **1864**, 1244–52.
- Krejci, L., Chen, L., Komen, S. Van, Sung, P. y Tomkinson, A.E. (2003). Mending the break: Two DNA double-strand break repair machines in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **74**, 159–201.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. y Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res*, **40**, 5795–818.
- Kreuzer, K.N. (2013). DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**, a012674.
- Krokan, H.E. y Bjørås, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**, a012583.
- Krwawicz, J., Arczewska, K.D., Speina, E., Maciejewska, A. y Grzesiuk, E. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Pol*, **54**, 413–34.
- Kunkel, T.A. (2004). DNA Replication Fidelity. *J Biol Chem*, **279**, 16895–8.
- Kushwaha, A.K. y Grove, A. (2013a). *Mycobacterium smegmatis* Ku binds DNA without free ends. *Biochem J*, **456**, 275–82.
- Kushwaha, A.K. y Grove, A. (2013b). C-terminal low-complexity sequence repeats of *Mycobacterium smegmatis* Ku modulate DNA binding. *Biosci Rep*, **33**, 175–84.
- Kusumoto, R., Masutani, C., Iwai, S. y Hanaoka, F. (2002). Translesion synthesis by human DNA polymerase eta across thymine glycol lesions. *Biochemistry*, **41**, 6090–9.
- Kutuzov, M.M., Ilina, E.S., Sukhanova, M.V, Pyshnaya, I.A., Pyshnyi, D.V., Lavrik, O.I. y Khodyreva, S.N. (2011). Interaction of poly(ADP-ribose) polymerase 1 with apurinic/aprimidinic sites within clustered DNA damage. *Biochemistry (Mosc)*, **76**, 147–56.
- Lao-Sirieix, S.H., Pellegrini, L. y Bell, S.D. (2005). The promiscuous primase. *Trends Genet*, **21**, 568–72.

- Laval, J., Jurado, J., Sapparbaev, M. y Sidorkina, O. (1998). Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat Res*, **402**, 93–102.
- Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., García-Díaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z. y Povirk, L.F. (2004). Implication of DNA polymerase λ in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem*, **279**, 805–11.
- Lees-Miller, S.P. y Meek, K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, **85**, 1161–73.
- Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P. y Maillard, J.Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *J Appl Microbiol*, **113**, 485–98.
- Lenhart, J.S., Schroeder, J.W., Walsh, B.W. y Simmons, L.A. (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **76**, 530–64.
- Li, H., Marple, T. y Hasty, P. (2013). Ku80-deleted cells are defective at base excision repair. *Mutat Res*, **745-6**, 16–25.
- Lieber, M.R. (1999). The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes cells*, **4**, 77–85.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*, **79**, 181–211.
- Lindahl, T. y Andersson, A. (1972). Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **11**, 3618–23.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709–15.
- Lohman, G.J.S., Chen, L. y Evans, T.C. (2011). Kinetic characterization of single strand break ligation in duplex DNA by T4 DNA ligase. *J Biol Chem*, **286**, 44187–96.

Bibliografía

- Longley, M.J., Prasad, R., Srivastava, D.K., Wilson, S.H. y Copeland, W.C. (1998). Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12244–8.
- Maciag, I.E., Viret, J.F. y Alonso, J.C. (1988). Replication and incompatibility properties of plasmid pUB110 in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet*, **212**, 232–40.
- Mahajan, K.N., Nick McElhinny, S.A., Mitchell, B.S. y Ramsden, D.A. (2002). Association of DNA polymerase μ (pol μ) with Ku and ligase IV: role for pol μ in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **22**, 5194–202.
- Malu, S., Malshetty, V., Francis, D. y Cortes, P. (2012). Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol Res*, **54**, 233–46.
- Malyarchuk, S., Castore, R. y Harrison, L. (2008). DNA repair of clustered lesions in mammalian cells: Involvement of non-homologous end-joining. *Nucleic Acids Res*, **36**, 4872–82.
- Martin, I.V. y MacNeill, S.A. (2002). ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol*, **3**, reviews 3005.1-7.
- 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., Garg, P., Burgers, P.M. y Kunkel, T.A. (2009). The efficiency and fidelity of 8-oxo-guanine bypass by DNA polymerases δ and η . *Nucleic Acids Res*, **37**, 2830–40.
- McCullough, A.K., Dodson, M.L. y Lloyd, R.S. (1999). Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu Rev Biochem*, **68**, 255–85.
- McKenney, P.T., Driks, A. y Eichenberger, P. (2012). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol*, **11**, 33–44.
- Moeller, R., Stackebrandt, E., Reitz, G., Berger, T., Rettberg, P., Doherty, A.J., Horneck, G. y Nicholson, W.L. (2007). Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J Bacteriol*, **189**, 3306–11.

- Moeller, R., Setlow, P., Pedraza-Reyes, M., Okayasu, R., Reitz, G. y Nicholson, W.L. (2011). Role of the Nfo and ExoA apurinic/apyrimidinic endonucleases in radiation resistance and radiation-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*, **193**, 2875–9.
- Moon, A.F., García-Díaz, M., Bebenek, K., Davis, B.J., Zhong, X., Ramsden, D.A., Kunkel, T.A. y Pedersen, L.C. (2007). Structural insight into the substrate specificity of DNA Polymerase μ . *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 45–53.
- Neto, J.B.C., Gentil, A., Cabral, R.E.C. y Sarasin, A. (1992). Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J Biol Chem*, **267**, 19718–23.
- Nicholson, W.L. y Setlow, P. (1990). Sporulation, germination and outgrowth. In: Harwood, C.R., Cutting, S. (Eds.), *Molecular Biology Methods for Bacillus*. Chichester, 391–450.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. y Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 548–72.
- Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.M., McCarville, J. y Ramsden, D.A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol*, **20**, 2996–3003.
- Nick McElhinny, S.A. y Ramsden, D.A. (2003). Polymerase mu is a DNA-directed DNA/RNA polymerase. *Mol Cell Biol*, **23**, 2309–15.
- Nickens, D.G., Bardiya, N., Patterson, J.T. y Burke, D.H. (2010). Template-directed ligation of tethered mononucleotides by T4 DNA ligase for kinase ribozyme selection. *PLoS One*, **5**, e12368.
- Nilsen, H. y Krokan, H.E. (2001). Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis*, **22**, 987–98.
- Nishida, H., Kiyonari, S., Ishino, Y. y Morikawa, K. (2006). The closed structure of an archaeal DNA ligase from *Pyrococcus furiosus*. *J Mol Biol*, **360**, 956–67.
- Paris, Ü., Mikkil, K., Tavita, K., Saumaa, S., Teras, R. y Kivisaar, M. (2015). NHEJ enzymes LigD and Ku participate in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair (Amst)*, **31**, 11–8.

Bibliografía

- Petrova, T., Bezsudnova, E.Y., Boyko, K.M., Mardanov, A.V., Polyakov, K.M., Volkov, V.V., Kozin, M., Ravin, N.V., Shabalin, I.G., Skryabin, K.G., Stekhanova, T.N., Kovalchuk, M.V. y Popov, V.O. (2012). ATP-dependent DNA ligase from *Thermococcus* sp. 1519 displays a new arrangement of the OB-fold domain. *Acta Crystallogr F-Struct Biol Cryst Commun*, **68**, 1440–7.
- Piersen, C.E., McCullough, A.K. y Lloyd, R.S. (2000). AP lyases and dRPases: Commonality of mechanism. *Mutat Res*, **459**, 43–53.
- Pinz, K.G. y Bogenhagen, D.F. (1998). Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol Cell Biol*, **18**, 1257–65.
- Pinz, K.G. y Bogenhagen, D.F. (2000). Characterization of a catalytically slow AP lyase activity in DNA polymerase γ and other family A DNA polymerases. *J Biol Chem*, **275**, 12509–14.
- Pitcher, R.S., Tonkin, L.M., Green, A.J. y Doherty, A.J. (2005a). Domain structure of a NHEJ DNA repair ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol*, **351**, 531–44.
- Pitcher, R.S., Wilson, T.E. y Doherty, A.J. (2005b). New insights into NHEJ repair processes in prokaryotes. *Cell Cycle*, **4**, 675–8.
- Pitcher, R.S., Brissett, N.C. y Doherty, A.J. (2007a). Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu Rev Microbiol*, **61**, 259–82.
- Pitcher, R.S., Brissett, N.C., Picher, A.J., Andrade, P., Juarez, R., Thompson, D., Fox, G.C., Blanco, L. y Doherty, A.J. (2007b). Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *J Mol Biol*, **366**, 391–405.
- Prakash, S., Johnson, R. y Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem*, **74**, 317–53.
- Prasad, R., Beard, W.A, Strauss, P.R. y Wilson, S.H. (1998). Human DNA polymerase β deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem*, **273**, 15263–70.
- Prasad, R., Longley, M.J., Sharief, F.S., Hou, E.W., Copeland, W.C. y Wilson, S.H. (2009). Human DNA polymerase θ possesses 5'-dRP lyase activity and functions in single-nucleotide base excision repair *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, **37**, 1868–77.

- Prasad, R., Horton, J.K., Chastain, P.D., Gassman, N.R., Freudenthal, B.D., Hou, E.W. y Wilson, S.H. (2014). Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair. *Nucleic Acids Res*, **42**, 6337–51.
- Prasad, R., Poltoratsky, V., Hou, E.W. y Wilson, S.H. (2016). Rev1 is a base excision repair enzyme with 5'-deoxyribose phosphate lyase activity. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkw869.
- Pryor, J.M., Waters, C.A., Aza, A., Asagoshi, K., Strom, C., Mieczkowski, P.A., Blanco, L. y Ramsden, D.A. (2015). Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, E4537–45.
- Ramsden, D.A. (2011). Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 2509–19.
- Rechkunova, N.I., Lebedeva, N.A. y Lavrik, O.I. (2015). Tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 is a new player in repair of apurinic/apyrimidinic sites. *Russ J Bioorganic Chem*, **41**, 474–80.
- Reuven, N.B., Arad, G., Maor-Shoshani, A. y Livneh, Z. (1999). The mutagenesis protein UmuC is a DNA polymerase activated by UmuD', RecA, and SSB and is specialized for translesion replication. *J Biol Chem*, **274**, 31763–6.
- Rivas-Castillo, A.M., Yasbin, R.E., Robleto, E., Nicholson, W.L. y Pedraza-Reyes, M. (2010). Role of the Y-family DNA polymerases YqjH and YqjW in protecting sporulating *Bacillus subtilis* cells from DNA damage. *Curr Microbiol*, **60**, 263–7.
- Roberts, S.A., Strande, N., Burkhalter, M.D., Strom, C., Havener, J.M., Hasty, P. y Ramsden, D.A. (2010). Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature*, **464**, 1214–7.
- Salas-Pacheco, J.M., Urtiz-Estrada, N., Martínez-Cadena, G., Yasbin, R.E. y Pedraza-Reyes, M. (2003). YqfS from *Bacillus subtilis* is a spore protein and a new functional member of the type IV Apurinic/Apyrimidinic-Endonuclease Family. *J Bacteriol*, **185**, 5380–90.
- Salas-Pacheco, J.M., Setlow, B., Setlow, P. y Pedraza-Reyes, M. (2005). Role of the Nfo (YqfS) and ExoA apurinic/apyrimidinic endonucleases in protecting *Bacillus subtilis* spores from DNA damage. *J Bacteriol*, **187**, 7374–81.

Bibliografía

- Sale, J.E., Lehmann, A.R. y Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **13**, 141–52.
- Schaeffer, P., Millet, J. y Aubert, J.P. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **54**, 704–11.
- Setlow, P. (1994). Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. *J Appl Bacteriol*, **76**, 49S–60S.
- Setlow, B. y Setlow, P. (1995). Small, Acid-Soluble Proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 2787–90.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Curr Opin Microbiol*, **6**, 550–6.
- Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*, **101**, 514–25.
- Shuman, S. y Glickman, M.S. (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 852–61.
- Shuman, S. (2009). DNA ligases: Progress and prospects. *J Biol Chem*, **284**, 17365–9.
- Siala, A. y Gray, R.G. (1974). Growth of *Bacillus subtilis* and spore germination in soil observed by a fluorescent-antibody technique. *J Gen Microbiol*, **81**, 191–8.
- Snowden, A., Kow, Y.W. y Van Houten, B. (1990). Damage repertoire of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease complex includes abasic sites, base-damage analogues, and lesions containing adjacent 5' or 3' nicks. *Biochemistry*, **29**, 7251–9.
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Kühn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K. y Wilson, S.H. (1996). Requirement of mammalian DNA polymerase- β in base-excision repair. *Nature*, **379**, 183-6.
- Strande, N., Roberts, S.A., Oh, S., Hendrickson, E.A. y Ramsden, D.A. (2012). Specificity of the dRP/AP lyase of ku promotes nonhomologous end joining (NHEJ) fidelity at damaged ends. *J Biol Chem*, **287**, 13686–93.

- Strande, N., Carvajal-García, J., Hallett, R.A., Waters, C.A., Roberts, S.A., Strom, C., Kuhlman, B. y Ramsden, D.A. (2014). Requirements for 5′dRP/AP lyase activity in Ku. *Nucleic Acids Res*, **42**, 11136–43.
- Strauss, B.S. (2002). The “A” rule revisited: Polymerases as determinants of mutational specificity. *DNA Repair (Amst)*, **1**, 125–35.
- 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**, 113–30.
- Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol*, **219**, 37–44.
- Sung, H.M., Yeaman, G., Ross, C.A. y Yasbin, R.E. (2003). Roles of YqjH and YqjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **185**, 2153–60.
- Swenberg, J.A., Lu, K., Moeller, B.C., Gao, L., Upton, P.B., Nakamura, J. y Starr, T.B. (2011). Endogenous versus exogenous DNA adducts: Their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicol Sci*, **120**, 130–45.
- Tan, I.S. y Ramamurthi, K.S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol Rep*, **6**, 212–25.
- Urtiz-Estrada, N., Salas-Pacheco, J.M., Yasbin, R.E. y Pedraza-Reyes, M. (2003). Forespore-specific expression of *Bacillus subtilis* *yqfS*, which encodes Type IV Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease, a component of the base excision repair pathway. *J Bacteriol*, **185**, 340–8.
- Vaisman, A. y Woodgate, R. (2001). Unique misinsertion specificity of Pol ι may decrease the mutagenic potential of deaminated cytosines. *EMBO J*, **20**, 6520–9.
- Vlašić, I., Mertens, R., Seco, E.M., Carrasco, B., Ayora, S., Reitz, G., Commichau, F.M., Alonso, J.C. y Moeller, R. (2014). *Bacillus subtilis* RecA and its accessory factors, RecF, RecO, RecR and RecX, are required for spore resistance to DNA double-strand break. *Nucleic Acids Res*, **42**, 2295–307.
- Wagner, J., Gruz, P., Kim, S.R. Yamada, M., Matsui, K., Fuchs, R.P.P. y Nohmi, T. (1999). The *dinB* gene encodes a novel *E. coli* DNA polymerase, DNA pol IV, involved in mutagenesis. *Mol Cell*, **4**, 281–6.

Bibliografía

- Walker, J.R., Corpina, R.A. y Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, **412**, 607–14.
- Wang, D., Kreuzer, D.A. y Essigmann, J.M. (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: Insights from studies using defined lesions. *Mutat Res*, **400**, 99–115.
- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R. y Eichenberger, P. (2006). The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, **358**, 16–37.
- Weller, G.R. y Doherty, A.J. (2001). A family of DNA repair ligases in bacteria? *FEBS Lett*, **505**, 340–2.
- Weller, G.R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L.M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S.K., Day, J.P., Wilkinson, A., d'Adda di Fagagna, F., Devine, K.M., Bowater, R.P., Jeggo, P.A., Jackson, S.P. y Doherty, A.J. (2002). Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, **297**, 1686–9.
- Williams, S.D. y David, S.S. (1998). Evidence that MutY is a monofunctional glycosylase capable of forming a covalent Schiff base intermediate with substrate DNA. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5123–33.
- Wright, D., DeBeaux, A., Shi, R., Doherty, A.J. y Harrison, L. (2010). Characterization of the roles of the catalytic domains of *Mycobacterium tuberculosis* ligase D in Ku-dependent error-prone DNA end joining. *Mutagenesis*, **25**, 473–81.
- Yakovleva, L. y Shuman, S. (2006). Nucleotide misincorporation, 3'-mismatch extension, and responses to abasic sites and DNA adducts by the polymerase component of bacterial DNA ligase D. *J Biol Chem*, **281**, 25026–40.
- Yang, W. y Woodgate, R. (2007). What a difference a decade makes: insights into translesion DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 15591–8.
- Yang, W. (2014). An overview of Y-Family DNA polymerases and a case study of human DNA polymerase eta. *Biochemistry*, **53**, 2793–803.
- Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., Wang, M., Rechkoblit, O., Taylor, J.S., Geacintov, N.E. y Wang, Z. (2000). Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase kappa *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4138–46.

- Zhu, H. y Shuman, S. (2005a). A primer-dependent polymerase function of *Pseudomonas aeruginosa* ATP-dependent DNA ligase (LigD). *J Biol Chem*, **280**, 418–27.
- Zhu, H. y Shuman, S. (2005b). Novel 3'-ribonuclease and 3'-phosphatase activities of the bacterial non-homologous end-joining protein, DNA ligase D. *J Biol Chem*, **280**, 25973–81.
- Zhu, H., Nandakumar, J., Aniukwu, J., Wang, L.K., Glickman, M.S., Lima, C.D. y Shuman, S. (2006). Atomic structure and nonhomologous end-joining function of the polymerase component of bacterial DNA ligase D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1711–6.
- Zhu, H. y Shuman, S. (2006). Substrate specificity and structure-function analysis of the 3'-phosphoesterase component of the bacterial NHEJ protein, DNA ligase D. *J Biol Chem*, **281**, 13873–81.
- Zhu, H. y Shuman, S. (2007). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* DNA ligases C and D. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3631–45.
- Zhu, H. y Shuman, S. (2008). Bacterial nonhomologous end joining ligases preferentially seal breaks with a 3'-OH monoribonucleotide. *J Biol Chem*, **283**, 8331–9.
- Zhu, H. y Shuman, S. (2010). Gap filling activities of *Pseudomonas* DNA ligase D (LigD) polymerase and functional interactions of LigD with the DNA end-binding Ku protein. *J Biol Chem*, **285**, 4815–25.
- Zinser, E.R. y Kolter, R. (1999). Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *J Bacteriol*, **181**, 5800–7.

Artículos científicos publicados

Efficient processing of abasic sites by bacterial nonhomologous end-joining Ku proteins

Ana de Ory, Olga Zafra and Miguel de Vega*

Instituto de Biología Molecular 'Eladio Viñuela' (CSIC), Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' (CSIC-UAM). Nicolás Cabrera 1, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received March 31, 2014; Revised October 06, 2014; Accepted October 09, 2014

ABSTRACT

Intracellular reactive oxygen species as well as the exposure to harsh environmental conditions can cause, in the single chromosome of *Bacillus subtilis* spores, the formation of apurinic/aprimidinic (AP) sites and strand breaks whose repair during outgrowth is crucial to guarantee cell viability. Whereas double-stranded breaks are mended by the nonhomologous end joining (NHEJ) system composed of an ATP-dependent DNA Ligase D (LigD) and the DNA-end-binding protein Ku, repair of AP sites would rely on an AP endonuclease or an AP-lyase, a polymerase and a ligase. Here we show that *B. subtilis* Ku (*BsuKu*), along with its pivotal role in allowing joining of two broken ends by *B. subtilis* LigD (*BsuLigD*), is endowed with an AP/deoxyribose 5'-phosphate (5'-dRP)-lyase activity that can act on ssDNA, nicked molecules and DNA molecules without ends, suggesting a potential role in BER during spore outgrowth. Coordination with *BsuLigD* makes possible the efficient joining of DNA ends with near terminal abasic sites. The role of this new enzymatic activity of Ku and its potential importance in the NHEJ pathway is discussed. The presence of an AP-lyase activity also in the homolog protein from the distantly related bacterium *Pseudomonas aeruginosa* allows us to expand our results to other bacterial Ku proteins.

INTRODUCTION

DNA double-strand breaks (DSBs), the most dangerous DNA lesions as they provoke cell death or DNA rearrangements, can arise either during DNA replication or after exposition to damaging agents (1,2) their repair being crucial for the maintenance of genome integrity. Two main pathways mend these lesions: homologous recombination (HR) and nonhomologous end joining (NHEJ). In HR the information from an intact copy of the broken DNA duplex is used as template for DNA synthesis through the lesion, en-

suring a faithful repair (3). Hence, HR is the main repair pathway in bacteria under conditions of rapid proliferation (4,5), but it is restricted to the S and G2 phases of the higher eukaryotic cell cycle. Contrarily, as in NHEJ the DNA ends are directly joined, the presence of a sister chromatid to act as template for DNA synthesis is unnecessary (6). For that reason, this pathway is active through the eukaryotic cell cycle (7–10), as well as in many bacterial species that spend much of their life cycle in stationary phase during which only a single copy of their chromosome is present (5,11). In NHEJ, the ends are usually processed by nucleolytic and/or polymerization activities before the final sealing, a fact that often leads to a mutagenic repair [reviewed in (12)].

In higher eukaryotes NHEJ is started by the binding to the DNA ends of the Ku70/80 heterodimer that together with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (13,14) bring about the synapsis of the broken ends. Further recruitment of nucleases (Artemis, Fen1) and/or polymerases (λ , μ and yeast Pol IV) (15–19) causes the processing of the ends that are finally ligated by the complex Ligase IV/XRCC4/XLF [reviewed in (7)].

In prokaryotes, the NHEJ complex is composed by a Ku homodimer and a dedicated ligase (LigD), a multidomain protein that in most cases contains phosphoesterase, polymerase and ligase activities that account for the end processing, gap filling and sealing steps [reviewed in (4,5)]. Recently, the presence of a bacterial related NHEJ complex has been reported also in archaea and constituted by Ku, and stand-alone ligase, polymerase and phosphoesterase proteins (20).

In both bacterial and eukaryotic NHEJ, Ku plays a pivotal role by threading the broken ends through its central DNA binding ring, allowing their alignment. Previous identification of prokaryotic Ku homologs (21) and later resolution of the human Ku heterodimer structure (22) allowed to dissect the protein into three distinct domains. Thus, the central ring-shaped core, conserved in eukaryotes and prokaryotes, contains the regions responsible for dimerization and for encircling duplex DNA. The von Willebrand A domain, specifically fused to the N-terminus of the core in the eukaryotic Ku, mediates protein–protein interactions (21–23). Finally, the eukaryotic Ku70 subunit has a C-terminal extension similar to SAP domains involved in

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34911964717; Fax: +34911964420; Email: mdevega@cbm.csic.es

DNA binding, the only bacterial homolog with a SAP-like domain being the Ku protein from *Streptomyces coelicolor* (21,22).

Although the role of eukaryotic Ku in NHEJ had been previously assumed only to recognize broken DNA ends and to recruit the above-mentioned factors, an unexpected primary role in end processing has been recently demonstrated (24). Thus, human Ku possesses an intrinsic AP lyase activity essential for the efficient removal of AP sites near DSBs to allow final joining of those damaged ends (24,25). Such an activity was mapped at the N-terminal von Willebrand A domain of the Ku70 subunit, therefore the presence of an AP-lyase in a bacterial Ku could not be anticipated. Thus, notwithstanding that bacterial Ku has been also studied in members of the genera *Bacillus*, *Mycobacterium* and *Pseudomonas*, no additional roles other than DNA binding and recruitment of LigD have been identified so far (26–33).

In this paper we show that *Bacillus subtilis* Ku (*BsuKu*), is endowed with an intrinsic AP/5'-dRP lyase activity. The *BsuKu*–LigD complex coordinates efficient processing of DNA ends with near terminal abasic sites to allow the repair of DSBs through the NHEJ pathway.

MATERIAL AND METHODS

Proteins and reagents

Unlabeled nucleotides were purchased from GE Healthcare. Labeled nucleotides were obtained from Perkin Elmer Life Sciences. Substrates were radiolabeled at the 3' end with [α -³²P]-Cordycepin (3'-dATP) and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) or at the 5' end with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase (T4PNK). TdT, T4PNK, hAPE1, *Escherichia coli* Uracil DNA Glycosylase (UDG), *E. coli* EndoIII, nickase Nt.BStNBI, T4 DNA ligase and restriction enzymes AatII, HindIII and SmaI were obtained from New England Biolabs. Thrombin was from Novagen. Streptavidin was from Sigma-Aldrich. *BsuKu* and *BsuLigD* were purified as described (26). The purified *BsuKu* was further loaded onto a 4 ml glycerol gradient (15–30%) containing 30 mM Hepes, pH 7.4, 20 mM ammonium sulfate, 180 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 7 mM β -mercaptoethanol and centrifuged at 4°C for 24 h at 348 134 x g in a Beckman TST 60.4 Swinging rotor. After centrifugation, 24 fractions were collected from the bottom of the tube for further analysis. Five microliters of each fraction were analysed in the AP-lyase activity (see below).

Cloning, overexpression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* Ku (*PaeKu*). A DNA encoding *PaeKu* (21) was PCR-amplified from *P. aeruginosa* strain PAO-1 genomic DNA using forward (5'-CGCGCGGGCATA TGGCGGTGCGATCTGAAAGG) and reverse (5'-GGCCGGATCCTCAGGCCTTGC GCCGCAACG) primers. The forward and reverse primer contained an NdeI and BamHI site, respectively. Therefore, the amplified DNA was digested with NdeI and BamHI before cloning in the NdeI-BamHI digested pET-28a(+) bacterial expression vector (Novagen), which carries an N-terminal His-Tag configuration to express the recombinant protein as fusions with an N-terminal hexahistidyl for purification on Ni²⁺-affinity resins. The insert was sequenced completely to rule

out the acquisition of mutations during amplification and cloning. *Escherichia coli* BL21(DE3) cells were transformed with the recombinant expression plasmid pET-28PaeKu, and such construction was further confirmed by DNA sequencing. Expression of the His-tagged *PaeKu* protein was carried out in the *E. coli* strain BL21(DE3), which contains the T7 RNA polymerase gene under the control of the isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)-inducible lacUV5 promoter (34,35). Cells, previously transformed with plasmid pET-28PaeKu were grown overnight in LB medium at 37°C in the presence of kanamycin. Cells were diluted into the same media and incubated at 34°C until the DO₆₀₀ reached 0.6. Then, IPTG (Sigma) was added to a final concentration of 0.5 mM. After additional 1 h at 30°C, 50 μ g/ml of rifampicin was added and incubation was continued for 90 min at 30°C. Cells were thawed and ground with alumina at 4°C. The slurry was resuspended in Buffer B (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.7 M NaCl, 7 mM β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 5% glycerol) and centrifuged for 5 min at 650 x g, at 4°C to remove alumina and intact cells. The recombinant *PaeKu* protein was soluble under these conditions, since it remained in the supernatant after a new centrifugation for 20 min at 23 430 x g, to separate insoluble proteins from the soluble extract. The DNA present was removed by stirring for 10 min the soluble extract containing 0.3% polyethyleneimine (PEI) followed by centrifugation for 10 min at 23 430 x g. The resulting supernatant was precipitated with ammonium sulfate to 65% saturation to obtain a PEI-free protein pellet. After centrifugation for 25 min at 23 430 x g, the pellet was resuspended in Buffer B 0.25 M NaCl. This fraction was loaded onto a phosphocellulose column equilibrated with Buffer B (0.25 M NaCl) and the *PaeKu* protein was eluted with Buffer A (0.5 M NaCl). The eluate was loaded onto a Ni-NTA column (Qiagen) pre-equilibrated with Buffer A (0.5 M NaCl). The bound protein was eluted by 200 mM imidazole in Buffer A (0.3 M NaCl). Finally, *PaeKu* was dialyzed against a buffer containing 0.3 M NaCl and 50% glycerol and stored at -20°C. Final purity of the protein was estimated to be >90 % by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

DNA substrates

Oligonucleotides H (5'-GTACCCGGGGATCCGTAC HGCGCATCAGCTGCAG) where H stands for tetrahydrofuran (THF); pU (5'-CTGCAGCTGATGCGCU GTACGGATCCCCGGGTAC); pG (5'-GTACCCGG GGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG); U4 (5'-TCAUACTGATCACAGTGAGTAC); splcddC (5'-GTACTCACTGTGATddC) where ddC stands for 2',3'-dideoxycMP; U4c (5'-AGTGATCACAGTGAGTAC); splc (5'-GTACTCACTGTGATC); splc-1 (5'-GTACTCACTGTGAT); splCGG (5'-GATCACAG TGAGTACCGG); splGCC (5'-GATCACAGTGAGTAC CGCC); splTCC (5'-GATCACAGTGAGTACTCC); splACC (5'-GATCACAGTGAGTACACC); splc(p) (5'-pGTACTCACTGTGATC); U2 (5'-TUAGACTGATCACAGTGAGTAC); U19 (5'-GATCACAGTGAGTACTCAUACT) and U21 (5'-GATCACAGTGAGTACTCAGAUT) were obtained from Invit-

rogen. Oligonucleotides sp1 (5'-GATCACAGTGAGTAC); Dws 5'-P (5'-P-AACGACGGCCAGT), sp1c+13 (5'-ACTGGCCGTCGTTGTACTCACTGTGATC), SU (5'-GCTTCCGGTGATCCGTTCCGTGAGGTCTCG ACATGCGCUGTACGATTGCGCTAGTACTACTGG CCGACGTTTTGTACTACTGT) and SU-compl (5'-biotin-ACAGTGTACAAACGTCCGGCCAGTGTACTAGCG CAATCGTACAGCGCATGTGCGAGACCTCACGGA ACGGATCACCGGAAGC-biotinTEG) were obtained from Sigma-Aldrich. pU was hybridized with pG to obtain a blunt substrate. SU was hybridized to SU-compl to obtain a dsDNA 80 bp long. U4 was hybridized with sp1cddC to obtain a 5'-protruding structure. U4c was hybridized with sp1c or sp1c-1 to obtain two different 5'-protruding substrates. sp1CGG was hybridized to sp1c to obtain a dsDNA molecule with a CGG protruding 3' end. sp1GCC, sp1TCC and sp1ACC were hybridized to the complementary sp1c(p) to obtain dsDNA molecules with -GCC, -TCC and -ACC protruding 3' ends, respectively. U2, U4, U19 and U21 were hybridized to sp1c to obtain 5' (U2/U4) or 3' (U19/U21) protruding ends. Nicked substrate was made by hybridizing oligonucleotides sp1 and Dws 5'-P to sp1c+13. All the hybridizations were performed in the presence of 0.2 M NaCl. A 216 bp DNA fragment corresponding to *B. subtilis* gene *yshC* was PCR-amplified using as template genomic DNA, 5-labeled and used as substrate in DNA gel retardation assays (see below). All the experiments presented were repeated at least three times.

AP/5'-dRP lyase activity assay on uracil containing substrates

Analysis of the AP-lyase activity on ssDNA was evaluated with the 34-mer oligonucleotide pU, labeled at the indicated 3' or 5' end. Activity on dsDNA was gauged on the 3' labeled-pU/pG hybrid. The ability of *BsuKu* to act on AP sites placed at 5' protruding ends was studied using as substrates the 3' labeled-U2/sp1c and 3' labeled-U4/sp1c hybrids, whereas the activity on 3' protruding ends was evaluated with the 5' labeled-U19/sp1c and 5' labeled-U21/sp1c hybrids, as indicated. Those uracil-containing molecules were treated with *E. coli* UDG (0.2 U) for 15 min at 37°C in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol. After incubation, the mixture was supplemented with 0.2 U *hApe*1, 2 U of Endo III or the indicated concentration of either *BsuKu* or *PaeKu*. Samples were incubated at 30°C for the indicated times and reactions were stopped by addition of freshly prepared NaBH₄ to a final concentration of 100 mM and incubation on ice for an additional 20 min. DNA was ethanol-precipitated in the presence of 0.2 µg/ml tRNA. Reactions were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Analysis of the activity on THF containing DNA was performed as described above using oligonucleotide H that harbors a THF at position 19.

To analyse the 5'-dRP lyase activity, 3'-radiolabeled substrate pU was hybridized to oligonucleotide pG to obtain a 34-mer dsDNA substrate. Reactions (12.5 µl) contained 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol (v/v), 0.2 U *E. coli* UDG and 0.2 U *hApe*1. Reactions were initiated by adding 228 nM of either purified *BsuKu* or Pol λ as indicated. Samples were incubated at 30°C for 30 min. The reactions were

stopped by addition of freshly prepared NaBH₄ to a final concentration of 100 mM and further incubated for additional 20 min on ice. DNA was ethanol-precipitated in the presence of 0.2 µg/ml tRNA and analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography.

Analysis of kinetics was carried out as described in (24), by incubating saturating concentrations of *BsuKu* with the above-described substrates at 30°C and the fraction of product (y) generated at various times (x) was determined by electrophoresis. Values for k_{obs} were determined by a non-linear regression fitting of the data to the equation $y = y_{\max}(1 - e^{-k_{\text{obs}}x})$ (Prism, Graphpad software).

NaBH₄ trapping assay

The Schiff base intermediate formed between an AP site and purified *BsuKu* was trapped by the addition of 100 mM NaBH₄ or 100 mM NaCl immediately after adding 228 nM of *BsuKu* to 3.1 nM of deglycosylated 3'-labeled oligonucleotide pU (see above). When indicated, and to remove the N-terminal His-tag, the purified *BsuKu* was preincubated with thrombin (0.05 U) in its reaction buffer for 1 h at 20°C in a total volume of 15 µl. The reactions were performed in a total volume of 25 µl in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5 and 4% glycerol. After incubation for 30 min at 37°C, samples were analysed by 12% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining and autoradiography of the dried gel.

Agarose gel retardation

Two micrograms of supercoiled pUC19 plasmid (Fermentas) were incubated with 10 U of the nickase Nt.BStNBI to obtain nicked pUC19. The DNA-binding assay was performed by incubating the indicated amounts of *BsuKu* with 100 ng of either supercoiled or nicked pUC19 in buffer containing 50 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol (v/v), in a final volume of 10 µl for 60 min at room temperature. When indicated the nucleoprotein complex was dissociated by proteinase K digestion for 1 h at 50°C in the presence of 0.2% SDS. Complexes were resolved on 0.7% TAE-agarose gels and visualized with ethidium bromide staining.

AP-lyase activity at internal abasic sites

AP-lyase activity at internal abasic sites generated in circular DNAs. AP sites were generated essentially as described (36). Briefly, negatively supercoiled plasmids pUC19 and pcDNA3.1 (Invitrogen) were incubated in 50 µl of 25 mM sodium citrate, pH 4.8, 250 mM KCl at 70°C for 1 h. Reactions were stopped by addition of 50 µl of precooled 1 M Tris-HCl, pH 8, followed by buffer exchange into water in a Qiaquick spin column (Qiagen). The AP-lyase assay was carried out in a final volume of 10 µl containing 50 mM Hepes, pH 7.4, 4% glycerol (v/v) and 10 mM MgCl₂, 100 ng of the nontreated (pcDNA3.1 and pUC19) or AP-containing plasmids (pcDNA3.1-AP and pUC19-AP) with either 10 U of *hApe* 1, 10 U of EcoRI, 100 ng of BSA or the indicated amount of *BsuKu*. Samples were incubated for 30 min at 30°C and further incubated with 10 µg of proteinase

K at 50°C for 1 h in the presence of 0.2% SDS. The reaction products were resolved on 0.7% TAE-agarose gels and visualized with ethidium bromide staining.

AP-lyase activity at an internal abasic site in a linear DNA. The 3'-labeled oligonucleotide SU, which contains a uracil at position 40 was hybridized to the complementary oligonucleotide SU-comp harboring a 5'-biotin and a 3'-biotin TEG modification, and 3.2 nM of this uracil-containing molecule were treated with *E. coli* UDG (0.2 U) for 15 min at 37°C in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol, in the absence or presence of 200 nM streptavidin. After incubation, the mixture was supplemented with the indicated concentration of *BsuKu* and further incubated at 30°C for the indicated times. Reactions were stopped by addition of 10 µg of proteinase K and further incubation at 50°C for 1 h in the presence of 0.4% SDS. Reactions were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

The incubation mixture contained, in a final volume of 20 µl, 12 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 20 mM ammonium sulfate, 0.1 mg/ml BSA, 1 nM of either the labeled 5 nucleotides gapped DNA structure or a 5'-labeled 216 bp DNA fragment and the indicated amounts of the specified protein. For the supershift reactions, DNA was preincubated for 10 min at 4°C with 3 nM of *BsuKu* followed by the addition of the indicated concentrations of *BsuLigD*. After incubation for 10 min at 4°C, the samples were subjected to electrophoresis in precooled 4% (w/v) polyacrylamide gels (80:1, monomer:bis) containing 12 mM Tris-acetate, pH 7.5 and 1 mM EDTA, and run at 4°C in the same buffer at 8 V/cm (37). After autoradiography, protein-DNA complexes were detected as a shift (retardation) in the migrating position of the labeled DNA.

End-joining of linearized plasmids

The reaction mixture contained, in a final volume of 20 µl, 12 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 20 mM ammonium sulfate, 0.1 mg/ml BSA, 100 ng of the indicated linearized plasmid (HindIII-, AatII- or SmaI-digested pUC19 plasmid), 0.2 mM ATP, 0.64 mM MnCl₂, 100 ng of *BsuLigD* and/or 100 ng of *BsuKu*, when indicated. After incubation for 60 min at 30°C, reactions were quenched by adjusting the mixtures to 0.2% SDS, 10 mM EDTA. Samples were incubated with 10 µg of proteinase K during 60 min at 50°C and subjected to 0.7% agarose gel electrophoresis.

End joining of partially complementary 3'-protruding DNA ends

The reaction mixture contained, in a final volume of 12.5 µl, 12 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 20 mM ammonium sulfate, 0.1 mg/ml BSA, 1.25 nM of the labeled sp1CGG/sp1c hybrid and 2.5 nM of each of the indicated nonlabeled DNA molecule containing a protruding 3' end, 71 nM of both *BsuLigD* and *BsuKu*, 0.64 mM MnCl₂ and 100 nM of the indicated NTP. After incubation for 30 min at 30°C, the reactions were stopped by adding EDTA up to

10 mM. Samples were analysed by 8 M urea, 20% PAGE and autoradiography.

End joining of partially complementary DNA ends with near terminal AP sites

The 3'-labeled substrate U4 was hybridized to sp1cddC to obtain a 7 nt 5'-protruding DNA (substrate *A* in Figure 9). This substrate was deglycosylated with *E. coli* UDG, as described above to obtain an AP site in the protruding 5'-end. When indicated, the deglycosylated DNA was incubated in the presence of *hAPE1* to produce a 5'-dRP containing substrate at the protruding 5'-end. The 0.68 nM of each of the above processed substrates were incubated in a reaction volume of 15 µl in the presence of 30 mM Hepes pH, 7.5, 4% glycerol (v/v), 114 nM of purified *BsuKu* and/or 114 nM of purified *BsuLigD*, 0.64 mM MnCl₂, 1 nM of either the nonlabeled hybrid sp1c/U4c (upstream substrate *D* in Figure 9) or the nonlabeled hybrid sp1c-1/U4c (upstream substrate *E* in Figure 9), and 10 µM of the indicated nucleotide. Samples were incubated at 30°C for 30 min. The reactions were stopped by addition of freshly prepared NaBH₄ to a final concentration of 100 mM and incubated 20 min on ice. DNA was ethanol-precipitated in the presence of 0.2 µg/ml tRNA. Reactions were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography.

RESULTS AND DISCUSSION

BsuKu is endowed with an AP/dRP-lyase activity

DNA repair proteins endowed with an AP lyase activity recognize AP sites and incise at their 3' side through a nonmetal-dependent β-elimination reaction, resulting in strand breaks harboring a 3'-phospho-α,β-unsaturated aldehyde (3'-PUA) end that should be cleaned to allow subsequent repair reactions to occur. Previous studies in human Ku led us to evaluate the ability of bacterial Ku to recognize and incise an internal AP site. To this end, a 34-mer ssDNA containing a uracil at position 16 was previously treated with *E. coli* UDG to get a natural AP site (see Materials and Methods and scheme in Figure 1). As expected, incubation of this substrate with *hAPE1* and Mn²⁺ ions produced a 15-mer product with a 3'-OH end (Figure 1A) as this enzyme is a metal-dependent AP endonuclease that hydrolyzes the phosphodiester bond 5' to the AP site [(38) and references therein]. In contrast, incision at the 3' side by the AP-lyase activity of *E. coli* Endo III left a product that migrates slower due to the presence of the resulting 3'-PUA [(38) and references therein]. As observed in Figure 1A, incubation of the AP site containing DNA with increasing amounts of highly purified *BsuKu* in the absence of divalent cations rendered a nicked product with identical electrophoretic mobility to those produced by Endo III and with an observed rate (k_{obs}) of $0.011 \pm 1.5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. These results are consistent with cleavage 3' to the AP site in a metal-independent manner, leading us to infer the presence of an intrinsic AP-lyase activity in *BsuKu*, active also on AP-containing dsDNA substrates, although much less efficiently than on ssDNA molecules ($k_{obs} = 5 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) (see Supplementary Figure S1). Furthermore, the results suggest that *BsuKu* exerts its AP lyase ac-

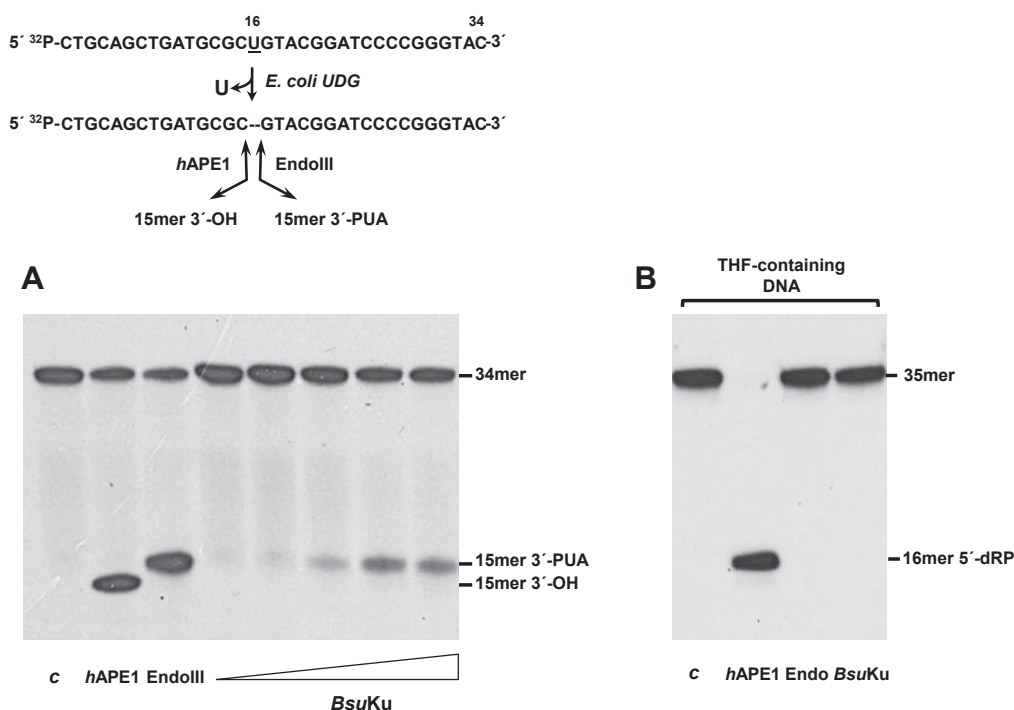


Figure 1. *BsuKu* is endowed with AP-lyase activity. (A) The [32 P]5'-labeled uracil-containing oligonucleotide was treated with *Escherichia coli* UDG, leaving an intact AP site. The resulting AP-containing DNA was incubated in the presence of either *hAPE1* that cleaves 5' to the AP site, *EndoIII* that incises 3' to the AP site or increasing concentrations (9, 18, 36, 72 and 142 nM) of *BsuKu* for 1 h at 30°C, as described in Materials and Methods. *c*: control DNA after treatment with *E. coli* UDG. After incubation samples were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated. (B) The 3' [32 P]3'-dAMP labeled oligonucleotide containing the lyase-resistant analog tetrahydrofuran (THF) at position 19 was incubated in the presence of either *hAPE1*, *EndoIII* or *BsuKu* (228 nM) as described above. *c*: control DNA incubated in the absence of proteins. Position corresponding to product (16mer 5'-dRP) is indicated.

tivity through a β -elimination reaction since if it had been through a β,δ -mechanism the products released should have migrated even faster than those produced by *hAPE1* due to the presence of a 3' phosphate group (39). The aforementioned conclusion was supported by the inhibition of *BsuKu* activity when the AP site was replaced with tetrahydrofuran (THF), a stable AP analog resistant to the β -elimination reaction (Figure 1B) (39,40). Additionally, it was analysed whether a covalent *BsuKu*-DNA complex could be trapped by chemical reduction as it occurs with other enzymes that proceed through a β -elimination mechanism (41). During AP site cleavage the ϵ -NH₂ of the nucleophilic lysine forms a Schiff base with the C1' atom of the deoxyribose. This intermediate can be reduced *in vitro* by sodium borohydride (NaBH₄) treatment, making an irreversible covalent enzyme-DNA adduct (39,42-45). As shown in Figure 2A, *BsuKu* forms a stable adduct with the 3' labeled AP site-containing 35mer ssDNA that was dependent on both, addition of NaBH₄ as no radioactive bands were detected when the protein was incubated with an equimolar concentration of NaCl, and presence of an AP site in the ssDNA (Figure 2B). Removal of the fused N-terminal His-tag from *BsuKu* after incubation with thrombin gave rise to DNA-*BsuKu* adducts whose faster migration paralleled the elec-

trophoretical pattern of the purified protein, a result that serves to unequivocally assign the observed AP-lyase activity to *BsuKu* (Figure 2A). Additionally, the purified protein was sedimented through a glycerol gradient, and the collected fractions were individually assayed for AP-lyase activity (see Materials and Methods). As shown in Supplementary Figure S2, the maximum activity coincided with the protein peak, identified by Coomassie Blue staining after SDS-PAGE analysis of each gradient fraction. These results allowed us to ascribe the AP-lyase activity to *BsuKu*, ruling out the presence of a contaminant AP lyase from the expression bacteria *E. coli*.

The presence of an AP-lyase activity in *BsuKu* led us to analyse the ability of the protein to excise the 5'-dRP moiety as those that results after hydrolysis of an AP site by a class II endonuclease during the first steps of the BER pathway. To this end, a 35-mer double-stranded oligonucleotide, containing a dUMP at position 16 of the 3'-labeled strand (see scheme in Figure 3 and lane *a*) was treated with *E. coli* UDG to render an AP site. Further incubation with *hAPE1* released a nicked molecule whose 3' product contains a 5'-dRP end (see scheme and lane *b* in Figure 3) that remained stable throughout the assay (lane *c*). As a control, substrate was subjected to the well-characterized 5'-dRP lyase activ-

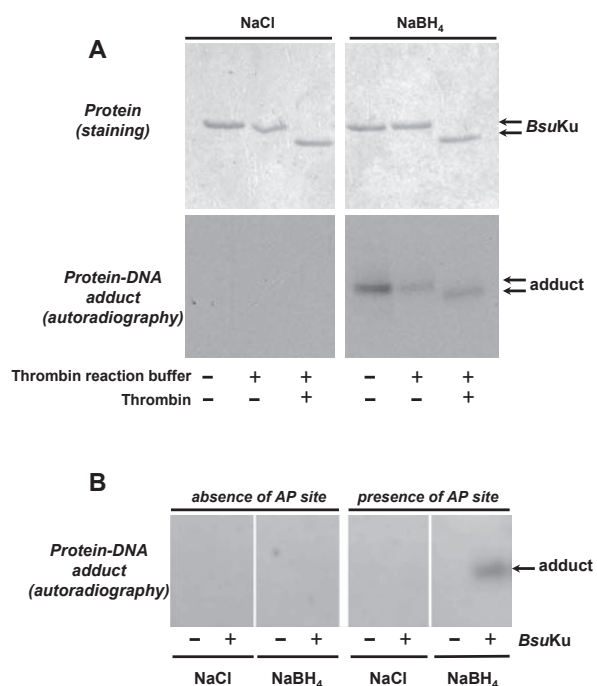


Figure 2. Formation of *BsuKu*-DNA adducts. (A) Dependence of *BsuKu*-DNA cross-link on NaBH₄. Reactions were performed as described in Materials and Methods, incubating 228 nM *BsuKu* with 3.1 nM of the 3^[32P]3'-dAMP labeled 35mer oligonucleotide containing an AP site at position 16 (after treatment with *Escherichia coli* UDG), in the presence of either 100 mM NaBH₄ or NaCl (as indicated). Top panels, Coomassie blue staining after SDS-PAGE of purified *BsuKu*. Bottom panels, autoradiography of corresponding protein-DNA adducts after the SDS-PAGE separation shown in top panels. When indicated, protein was previously incubated with 0.05 U of thrombin at 20°C for 60 min. (B) Adduct formation is dependent on the presence of an abasic site. Reactions were performed as described in (A) but using as substrate 3.1 nM of the 3^[32P]3'-dAMP labeled 35mer oligonucleotide without removing the uracil at position 16 (absence of AP site) or after treatment with *E. coli* UDG (presence of AP site), in the presence of either 100 mM NaBH₄ or NaCl (as indicated). Autoradiography of corresponding protein-DNA adduct after the SDS-PAGE separation is shown.

ity of Pol λ (46). As shown, *BsuKu* was able to remove the 5'-dRP group, as deduced from the reduction in the size of the 3'-labeled substrate ($k_{obs} = 0.06 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$).

The unexpected presence of an AP-lyase activity in *BsuKu* led us to study whether this activity is specific to the *B. subtilis* protein or, by the contrary is present in other bacterial Ku. To this end, similar assays were performed with the Ku ortholog from the Gram- bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (*PaeKu*) (see Materials and Methods) as this organism has been used as model for the bacterial NHEJ for years (4,5). *PaeKu* was cloned in expression plasmid pET28a and expressed in the *E. coli* BL21(DE)3 strain (see Materials and Methods). As shown in Figure 4A, expression of *PaeKu* gives rise to a protein-DNA adduct after reduction with NaBH₄, absent with the noninduced bacterial extracts. The different mobility of the adduct after digestion with thrombin demonstrates that the expressed *PaeKu* is the protein crosslinked to the AP-containing DNA. As

observed in Figure 4B, incubation of the AP site containing DNA with increasing amounts of the purified *PaeKu* in the absence of divalent cations rendered a nicked product with the same electrophoretic mobility to that produced by *BsuKu*. These results allow us to extend the observation of an AP-lyase activity to other bacterial members.

BsuKu can nick internal AP sites in a DNA without free ends

Considering the absence of DNA ends in the bacterial genome, processing of abasic sites by *BsuKu* would require binding of the protein to internal sites of the chromosome. Hence, to ascertain the potential ability of *BsuKu* to associate with a DNA without free ends, we analysed the binding of the protein to a supercoiled plasmid DNA. As shown in the left panel of Figure 5A, addition of increasing amounts of *BsuKu* resulted in a reduction in the electrophoretic mobility of the DNA, indicating that the protein binds to internal sites of the superhelical plasmid. Such a binding is not an artifact of a conformational change of the plasmid due to a possible nicking activity as the substrate recovered its original form upon treatment with proteinase K. Similarly, *BsuKu* was also able to form protein-DNA complexes with a relaxed circular DNA (Figure 5, right panel). Hence, binding of *BsuKu* to supercoiled DNA does not depend on the presence of potential extrusion of hairpin structures. These results suggest that besides the 'canonical' binding mode in which the dsDNA is threaded through the central ring, *BsuKu* shows an alternative binding manner, most probably through positive charges located at the surface of the protein, as suggested for *Mycobacterium smegmatis* Ku (29).

The ability to bind internal sites appears to be a common feature of Ku. In this sense, eukaryotic Ku protein has been shown to bind, besides to DNA ends, to internal sites of the chromosome as to nicks, to structural transition as well as to replication origins (47,48). In addition, bacterial Ku homologs, as that from *M. smegmatis*, have been recently shown to also bind circular plasmids (29). Therefore, once established the ability of *BsuKu* to bind a DNA molecule lacking free ends, we analysed the capacity of the AP-lyase activity to recognize and cleave the internal AP sites generated in a circular plasmid [(pcDNA3.1-AP); see Materials and Methods]. The absence (in pcDNA3.1) and presence (in pcDNA3.1-AP) of AP sites was checked by incubation of these plasmids with *hAPE1*. Thus, as shown in the left panel of Figure 5B, nearly all pcDNA3.1-AP molecules contained at least one AP site as deduced from the conversion of the supercoiled molecules to the open form (nicked circles) after treatment with *hAPE1*. Importantly, *BsuKu* also relaxed the supercoiled plasmid pcDNA3.1-AP, indicating that the protein recognizes and introduces nicks at the AP sites through its inherent AP-lyase activity. A similar result was obtained with a pUC19 plasmid (Figure 5B, right panel). In this case, both *hAPE1* and *BsuKu* linearized the supercoiled plasmid most probably due to the proximity of two AP sites in opposite strands. Similar results were obtained on a 3',5'-biotinylated linear dsDNA 80 bp long with streptavidin-blocked ends to prevent *BsuKu* from sliding on the DNA, as described in (29) (see Supplementary Figure S3). These results would suggest that the AP-lyase

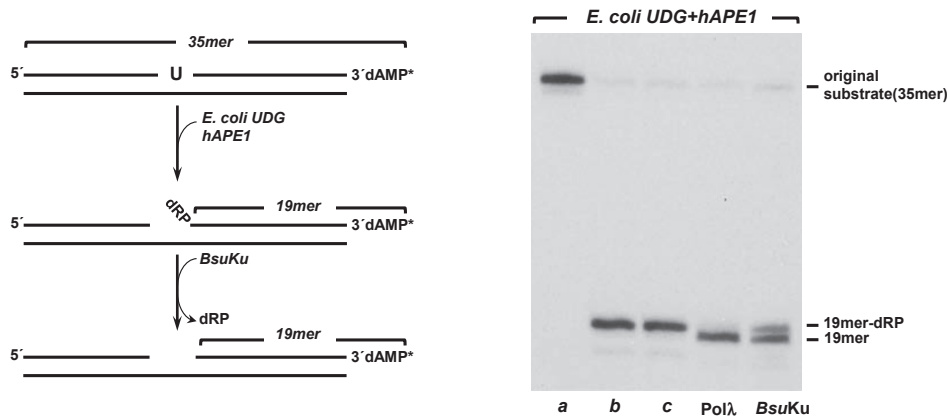


Figure 3. 5'-dRP lyase activity of *BsuKu*. *In vitro* reconstitution of single-nucleotide BER, indicating the different products formed. *Right*, autoradiogram illustrating *BsuKu* 5'-dRP lyase activity. *a*, original substrate; *b*, 5'-dRP-19mer product obtained after incubation with *Escherichia coli* UDG and *hAPE1*; *c*, 5'-dRP-19mer product incubated for 30 min at 30°C. Reactions were carried out as described in Materials and Methods in the presence of 228 nM *BsuKu* or *Pol λ*, as indicated.

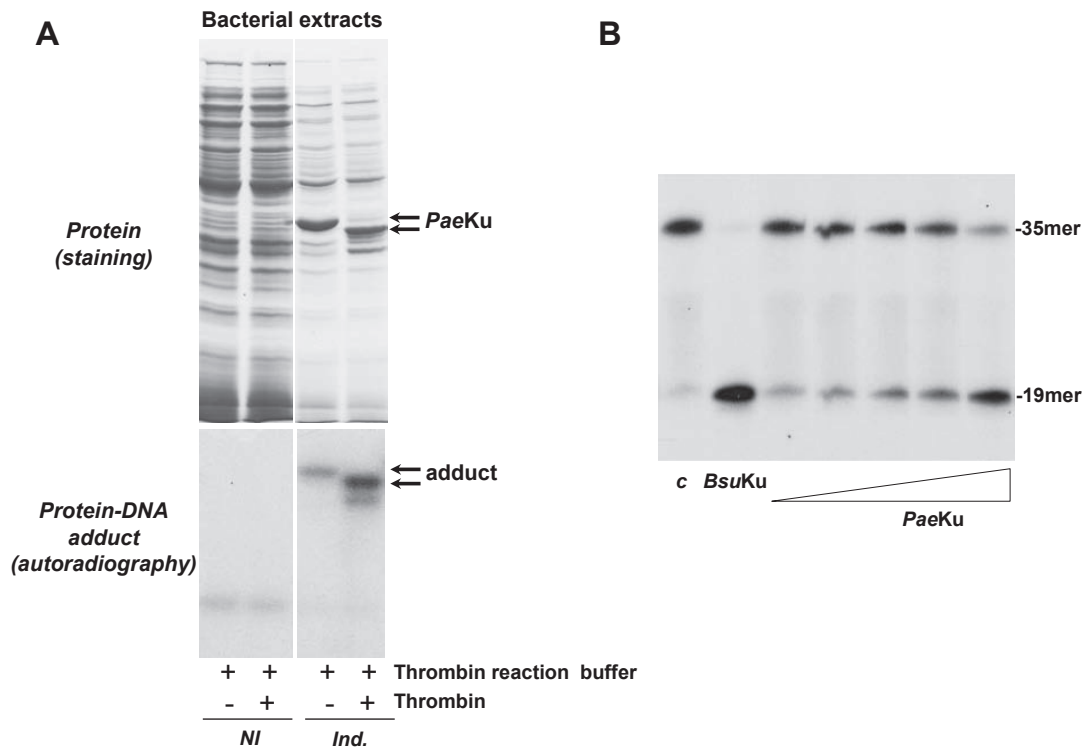


Figure 4. AP-lyase activity is also present in the Ku protein from the Gram- bacteria *P. aeruginosa*. (A) Formation of *PaeKu*-DNA adducts. *Top panels*, expression of the recombinant *PaeKu*. For a better visualization of the induced *PaeKu*, 15 and 6 μg of total protein from the cellular extracts were loaded in the noninduced (NI) and in the induced (Ind.) lanes, respectively. *Bottom panels*, autoradiography of corresponding protein-DNA adducts after the SDS-PAGE separation. Reactions were performed as described in Materials and Methods, incubating either 1.7 μg of the noninduced bacterial extract or 0.7 μg of the induced extract with 3.1 nM of the 3' [³²P]3'-dAMP labeled 35mer oligonucleotide containing an AP site at position 16 (after treatment with *Escherichia coli* UDG), in the presence of 100 mM NaBH₄. When indicated, the bacterial extracts were previously incubated with 0.05 U of thrombin at 20°C for 60 min. (B) AP-lyase activity of purified *PaeKu*. 3.1 nM of the 3' [³²P]3'-dAMP labeled 35mer oligonucleotide containing an AP site at position 16 (after treatment with *E. coli* UDG) was incubated in the presence of either *BsuKu* (228 nM), or increasing concentrations (14, 28, 57, 114 and 228 nM) of *PaeKu* for 1 h at 30°C, as described in Materials and Methods. *c*: control DNA after treatment with *E. coli* UDG. After incubation, samples were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated.

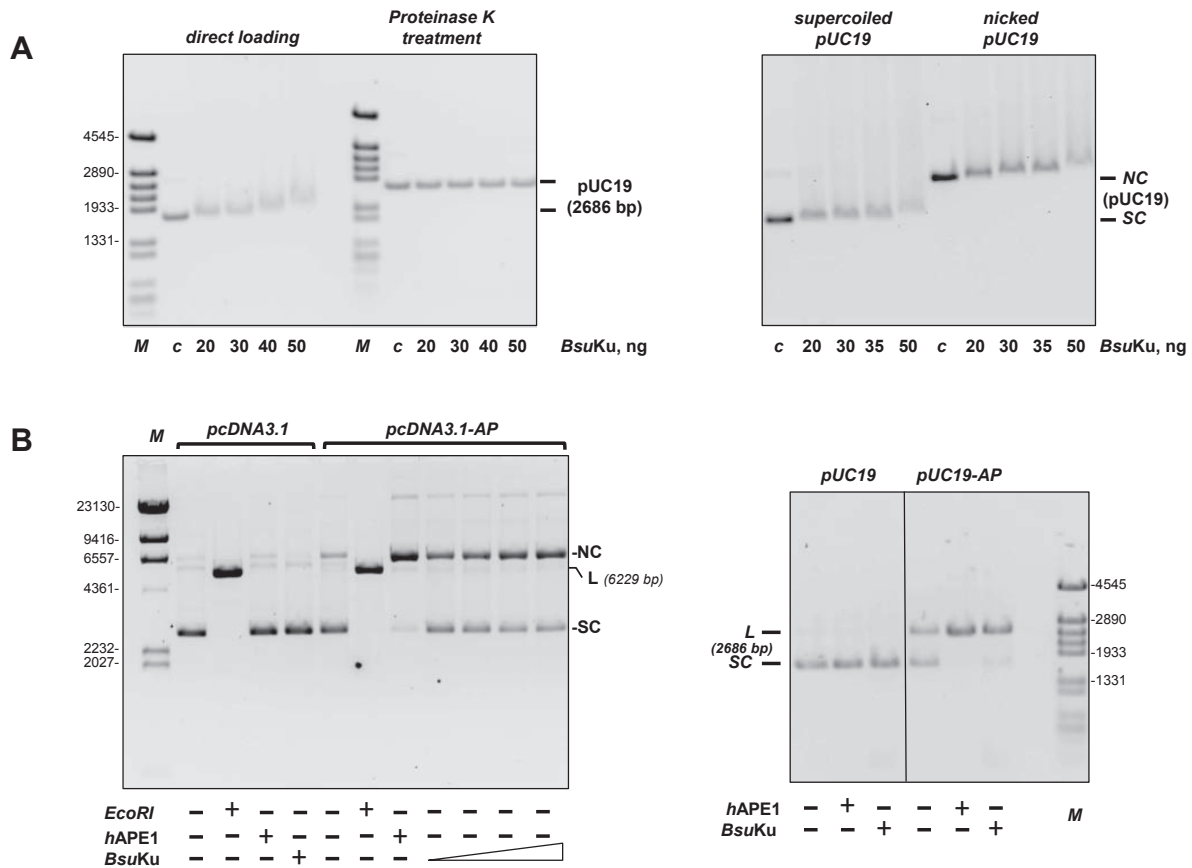


Figure 5. *BsuKu* binds circular DNA. (A) *Left panel*, *BsuKu* binding to covalently closed pUC19 plasmid. The assay was performed as described in Materials and Methods incubating the indicated amounts of *BsuKu* with 100 ng of supercoiled plasmid pUC19. Products were analysed on 0.7% agarose electrophoresis. One half of each reaction mixture was loaded directly onto the agarose gel (direct loading lanes), while the other half was being treated with Proteinase K. After proteolytic digestion, those samples were loaded in the same agarose gel (Proteinase K treatment lanes). The electrophoretic mobility of the pUC19 plasmid in each case is indicated. In lane c, DNA was incubated with 50 ng of BSA. *Right panel*, *BsuKu* binding to supercoiled and relaxed plasmid DNA. The assay was performed essentially as described above. (B) *BsuKu* AP lyase activity can act on circular substrates. The assay was performed as described in Materials and Methods, incubating either 142 nM of *BsuKu* with 100 ng of plasmid without AP sites (pcDNA3.1) or 18, 36, 72 and 142 nM of *BsuKu* with 100 ng of plasmid containing AP sites (pcDNA3.1-AP) (left panel). The absence and presence of the AP sites in pcDNA3.1 and pcDNA3.1-AP, respectively, was confirmed after digestion with *hAPE1*. As a control of the linear form, plasmids were also digested with *EcoRI*. NC: nicked circles; SC: supercoiled; L: linear. The assay shown in the right panel was performed by incubating 100 ng of plasmid without (pUC19) or with (pUC19-AP) AP sites with either *hAPE1* or 142 nM of *BsuKu*, as indicated. Figure 5B, right panel is a composite image made from different parts of the same experiment.

active site is located out of the central channel of *BsuKu*, as it occurs in human Ku70 (24). Therefore, the potential external placement of the AP-lyase active site, and the ‘non-canonical’ binding mode of *BsuKu* to a DNA without free ends could facilitate the recruitment of the protein to sites of DNA damage to exert its lyase activity.

B. subtilis possesses three known AP endonuclease genes, *exoA*, expressed in growing cells and in the forespore compartment of the sporulating cell (49), *yqfs* (*nfo*) whose expression is under the control of the σ^F transcription factor and consequently is expressed late during sporulation (50) and *yshC* that codes for a family X DNA polymerase endowed with an AP endonuclease activity and whose expression pattern remains to be determined (51). Previous re-

sults indicated that *B. subtilis* spores lacking *ExoA* and/or *Nfo* showed an increased sensitivity to treatments that damage spore DNA through generation of AP sites and strand breaks. Those works advanced the potential importance of the BER pathway to repair the AP sites that accumulate during spore dormancy (49–50,52). However, besides an AP endonuclease, a dRP-lyase, a polymerase and a ligase should also be expressed during sporulation to reconstitute a complete BER pathway in the spore. The genes coding for *BsuKu* and *BsuLigD* proteins form part of a regulon under the control of both, the RNA-polymerase sigma factor σ^G and the DNA-binding protein SpoVT whose expression is turned on in the forespore (53). These studies together with the finding of AP/5-dRP lyase that can act also on internal

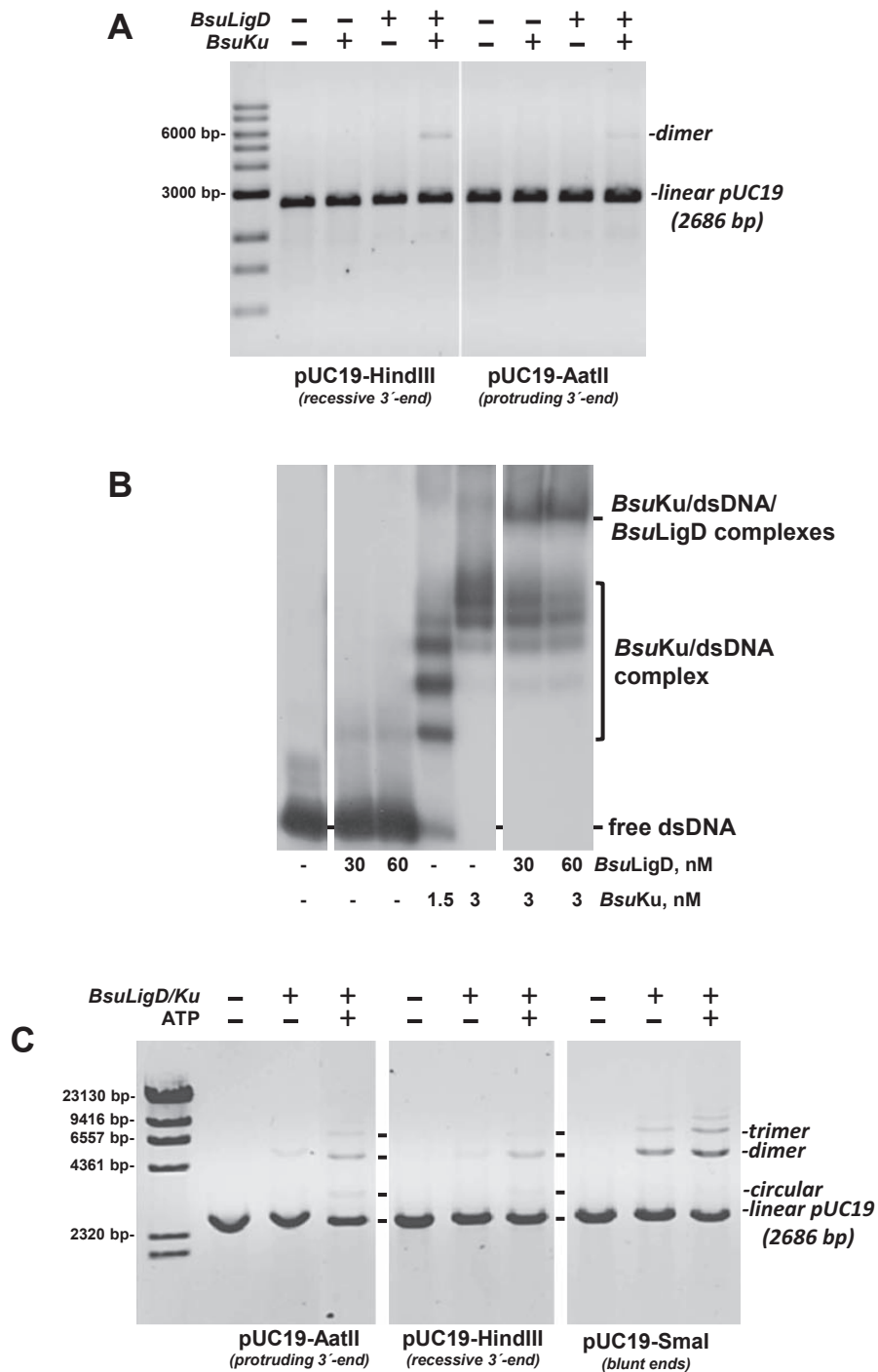


Figure 6. (A) End joining of linearized plasmids. The assay was performed as described in Materials and Methods by incubating 100 ng of the specified digested pUC19 plasmid with 0.6 mM MnCl₂ in the absence (-) or presence (+) of 142 nM of *BsuLigD* and *BsuKu*. After incubation for 60 min at 30°C, reactions were quenched by adjusting the mixtures to 0.2% SDS, 10 mM EDTA. Samples were incubated with 10 µg of proteinase K during 60 min at 37°C and further subjected to 0.7% agarose gel electrophoresis. The positions and size of DNA markers are indicated. (B) *BsuKu* recruits *BsuLigD* to DNA ends. Reactions were performed as described in Materials and Methods by incubating 1 nM of a 216 bp DNA fragment and the indicated concentrations of *BsuLigD* and *BsuKu*. For the supershift reactions, DNA was previously preincubated with *BsuKu* followed by the addition of the indicated amounts of *BsuLigD*. (C) Effect of ATP on the end-joining of linearized plasmids. The assay was performed essentially as described in (A). When indicated, 142 nM of *BsuLigD*/142 nM of *BsuKu* and/or 0.1 mM ATP were added.

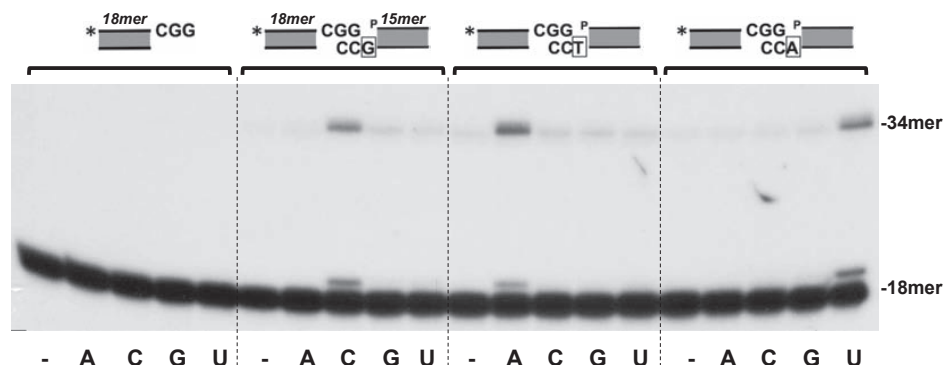


Figure 7. End joining of partially complementary 3'-protruding DNA ends. The assays were carried out as described in Materials and Methods by incubating 1.25 nM of the labeled hybrid sp1CGG/sp1c depicted on top of Figure in the presence of 71 nM of both *Bsu*LigD and *Bsu*Ku, 0.6 mM MnCl₂, 2.5 nM of the nonlabeled hybrid (see Materials and Methods) indicated on top of Figure and 100 nM of the indicated NTP. The three DNA substrate molecules only differ in the marginal nucleotide indicated with open squares. After incubation for 30 min at 30°C, the elongation and ligation products were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Asterisks indicate the 5'³²P-labeled end of the primer strand.

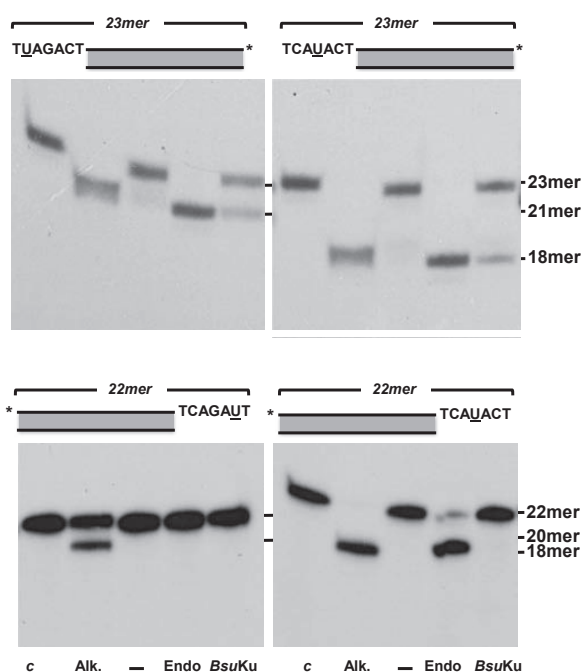


Figure 8. *Bsu*Ku AP-lyase on protruding ends. The assay was performed as described in Materials and Methods. The substrates containing a uracil at the specified position within the 5'- (upper panels) or 3'- (lower panels) protruding ends were incubated with *Escherichia coli* UDG (c) to create an AP site in nearly all DNA molecules. After incubation of the AP-containing molecules with 2 units of *E. coli* Endo III (Endo), or 142 nM *Bsu*Ku for 30 min at 30°C, samples were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography, as described in Materials and Methods. Positions corresponding to the products are indicated. Asterisks indicate either the ³²P-5' or the [³²P]3'dAMP-3' end.

abasic sites (this work) could be indicative of a role of the NHEJ proteins in the BER pathway operating during spore outgrowth.

Coordination of the AP/5'dRP- lyase activity of *Bsu*Ku and *Bsu*LigD polymerization and ligase activities during end joining

Both eukaryotic and prokaryotic Ku have been described to bind dsDNA with high affinity (31,33,54). In the current working model of bacterial NHEJ, Ku recognizes and binds to the broken ends, recruiting LigD that further catalyzes both, filling of the gaps that could arise after synapsis and ligation of the resultant nick (4-5,55). To advance in the analysis of the AP-lyase activity of *Bsu*Ku during end-joining, we started analysing the ability of *Bsu*Ku/LigD complex to join nondamaged DNA ends, using as substrate a linearized pUC19 plasmid singly-digested with HindIII or AatII to obtain recessive or protruding 3'-ends, respectively. As shown in Figure 6A, *Bsu*Ku had not end-joining activity by itself, as expected, but its presence was absolutely necessary to allow *Bsu*LigD to join both, protruding and recessive 3'-ends, as deduced from the formation of dimers and as described in other bacterial members (27,33,56-57). These results suggest that *Bsu*Ku would be required to stabilize *Bsu*LigD binding to the termini of the DNA to guarantee the end-joining reaction. In this sense, previous studies showed the existence of a physical interaction between bacterial Ku and LigD at the ends of DNA molecules (31), similar to those described for eukaryotic Ku-Ligase IV/XRCC4 proteins (58). Therefore, to search for potential interactions between *Bsu*Ku and *Bsu*LigD, EMSAs assays with a radio-labeled dsDNA probe (216 bp) were performed. As shown in Figure 6B, whereas *Bsu*Ku led to the generation of several and stable Ku/DNA complexes, reflecting its high DNA binding efficiency and its ability to diffuse along DNA [as described for other Ku homologs (31,59-60)], *Bsu*LigD did not bind stably to the DNA substrate, accounting for the absence of ligation products described above. Conversely, addition of *Bsu*LigD to the preformed *Bsu*Ku-DNA complexes led to the generation of a stable DNA protein complex with a slower mobility than those formed by *Bsu*Ku alone. Thus, *Bsu*Ku would recruit *Bsu*LigD to the DNA termini endowing it with the binding stability required to

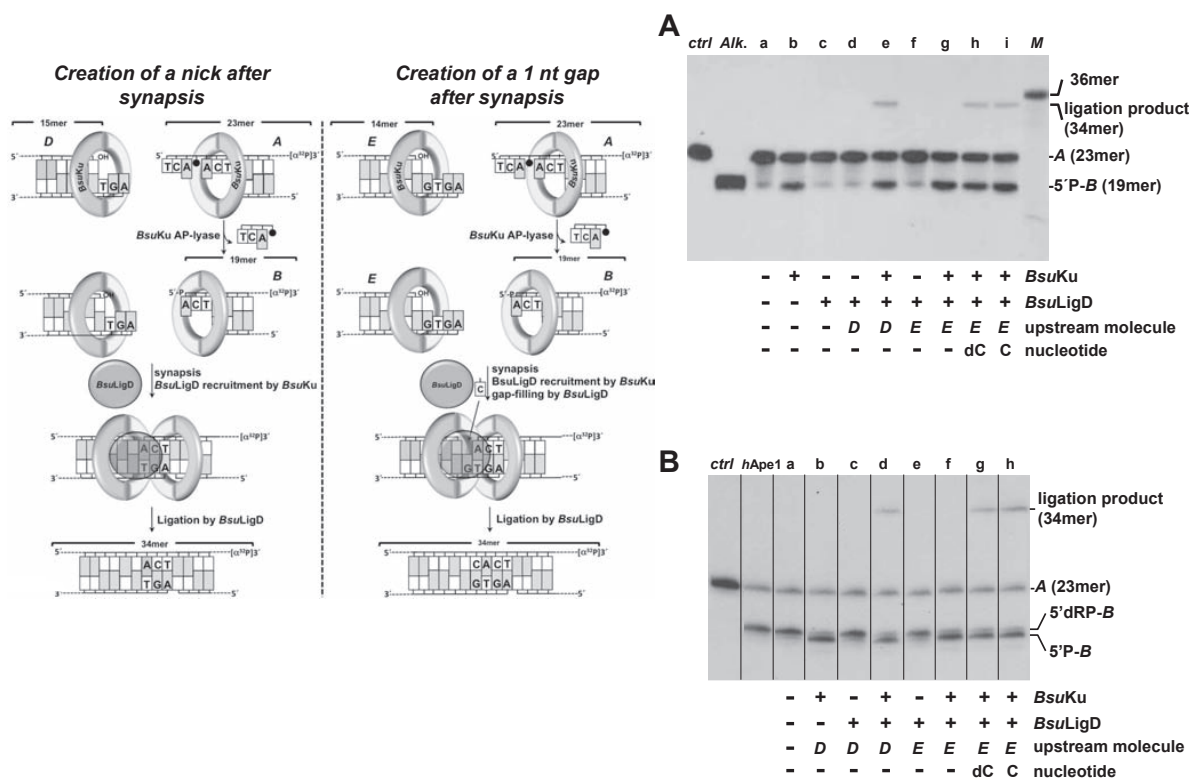


Figure 9. End joining of partially complementary DNA ends with near terminal AP sites. *Left panel*, schematic representation of the end-joining reaction, indicating the different substrates (filled circle represents an abasic site), products and the catalytic reactions that take place (see main text). **(A)** End joining of partially complementary DNA ends with near terminal AP sites; the assay was carried out as described in Materials and Methods by incubating 0.7 nM of the 3'-labeled substrate A and, when indicated 114 nM of *BsuKu*, 114 nM *BsuLigD*, 10 μ M of the indicated nucleotide and 1 nM of the specified upstream substrate. After incubation for 30 min at 30°C, the products of the reaction were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography (*M*: 36mer oligonucleotide used as size marker; *ctrl*: DNA after incubation with *E. coli* UDG; *Alk.* alkaline hydrolysis of the UDG-treated DNA). **(B)** End joining with a downstream DNA molecule bearing a protruding 5'-dRP end; the assay was performed as described in Materials and Methods by incubating 0.7 nM of the 3'-labeled substrate A with *hApe1*. When indicated, the digested substrate was incubated with 114 nM of *BsuKu*, 114 nM of *BsuLigD*, 10 μ M of the indicated nucleotide and 1 nM of the specified upstream substrate for 30 min at 30°C. After incubation, the products of the reaction were analysed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. The lengths of the labeled substrate and the degradation and ligation products are indicated. Figure 9B is a composite image made from different parts of the same experiment.

rejoin and ligate two broken ends. Previous studies demonstrated that *BsuLigD* is an ATP-dependent ligase (26). The ability of *BsuLigD* to perform the ligation reaction in the absence of exogenous ATP (Figure 6A) is due to the proportion of the molecules that are already adenylated in the expression bacteria, as it has been reported to occur in other ATP-dependent DNA ligases (61–65). As shown in Supplementary Figure S4, the yield of ligated DNA in the ATP-independent ligation reaction increased linearly as a function of input *BsuLigD*. The slope of the titration curve indicated that 0.37 fmol of the nicked DNA substrate was ligated per fmol of input *BsuLigD*. Considering that ATP-dependent ligation is a single-turnover reaction, we estimated that 37% of the *BsuLigD* molecules contained AMP bound covalently at the ligation active site, a proportion similar to that obtained in other LigDs (64). Thereby, addition of 0.2 mM ATP enhanced the formation of dimers, trimers and, in the specific case of a blunt end plasmid (the *SmaI*-digested pUC19 plasmid) even tetramers (see Fig-

ure 6C). Under these experimental conditions, *BsuLigD*–*BsuKu* complex also promoted intramolecular repair events, as deduced from the monomer circles among the reaction products.

Once established the competence of the *BsuLigD*/*BsuKu* to carry out intermolecular ligation of complementary ends, we wondered whether such a complex could connect partially complementary 3'-protruding DNA ends coming from independent DNA molecules to form a 'gap-like' synaptic intermediate (66). Therefore, two hybrid molecules containing 3' protruding DNA ends that differ in the nucleotide adjacent to the 5'-P were simultaneously incubated with the *BsuKu*–*LigD* complex (see scheme depicted in the top of Figure 7 note that only one of the molecules is 5'-labeled). The assay conditions were adjusted to prevent self-ligation of the labeled molecules (see Figure 7). As it is shown, 3' extension of the labeled strand occurred specifically when the incoming ribonucleotide was complementary to the nucleotide adjacent to the 5'-P of the nonla-

beled molecule (Figure 7). This reaction was absolutely dependent on the presence of *BsuKu* (not shown), indicating that synapsis between the two molecules took place. After addition of the complementary nucleotide, the resulting nick was sealed by the ligase activity to render a repaired (ligated) product. Thus, these results show the ability of *BsuKu*–LigD complex to mediate the bridging of two partially complementary DNA ends, generating a minimum gap-like synaptic complex that is filled and subsequently sealed by the polymerization and ligase activities, mimicking a DSB repair reaction.

As shown in Figure 8, *BsuKu* AP-lyase was also active on AP sites placed within a protruding 5' end, whereas its activity was negligible on 3' overhangs like human Ku (25). This fact could be relevant in an end-joining context, as nicking at a protruding 3' end would generate a 3'-PUA terminus that should be sanitized by additional nucleolytic activities before ligation. Contrarily, nicking within a 5' protruding end would release an ssDNA portion with a ligatable 5' terminus.

Once proved the capacity to perform end-joining of non-damaged DNA ends, we assessed the ability of the *BsuKu*–LigD complex to join substrates that contain AP sites proximal to their 5' protruding ends (see scheme in Figure 9). The labeled downstream molecule *A* harbors a AP site containing 5'-protruding end that is solely partially complementary to unlabeled upstream substrates *D* (left panel of scheme) and *E* (right panel of scheme). Only after precise incision at the AP site in molecule *A*, the resultant molecule *B* would harbor a 5' protruding end so that synapsis to substrates *D* and *E* would render a nicked and a 1 nt gapped molecule, respectively. Figure 9A shows that, as expected, *BsuKu* incises at the AP site of molecule *A* (23mer) to produce the 19mer molecule *B* (lane *b*) that is not used as self-ligatable substrate by *BsuLigD* (lane *c*). In contrast, simultaneous addition of substrates *A* and either *D* or *E* gave rise to a 34mer ligation product that results from the incision of *A* by *BsuKu*, synapsis to either *D* or *E* and final sealing by *BsuLigD*. Importantly, when molecule *E* was used as the upstream substrate, the 1 nt gapped molecule that resulted after synapsis had to be filled by *BsuLigD* before the ligation step (lanes *g*, *h* and *i*).

Several genotoxicants, as reactive oxygen species and ionizing radiation generate a variety of DNA damage including AP sites. *In vitro* and *in vivo* studies in *E. coli* (67,68), as well as in mammalian cells (69) have shown that attempted repair of two closely opposed AP sites can result in the formation of DSBs due to the introduction of single-stranded breaks by the cellular AP endonucleases. In mammalian cells, the DNA can be degraded or inaccurately repaired by Ku-independent pathways as single-strand annealing and microhomology-mediated end joining, or by the Ku-dependent NHEJ (69). Therefore, we analysed *in vitro* the ability of the *BsuKu*–LigD complex to perform end joining on these kind of molecules. As it can be observed in Figure 9B, when the AP site of molecule *A* is hydrolyzed by an AP endonuclease (lane *a*), the resulting 5'dRP moiety is removed by *BsuKu* (lanes *b*, *d* and *f*) to allow the final sealing step by *BsuLigD* (lanes *d*, *g* and *h*), rendering a repaired product. These results suggest that the *BsuKu*–LigD complex has the potentiality to repair efficiently the DSBs pro-

duced by endonucleolytic hydrolysis of clustered AP sites during spore outgrowth.

CONCLUSION

Although initially described in human Ku, the presence of an AP-lyase in bacterial homologs could not be anticipated as these members lack the N-terminal von Willebrand A domain of the eukaryotic Ku70 where the lysine responsible for this activity resides. To our knowledge, this is the first report of the presence of an AP-lyase activity in a bacterial Ku factor. Its ability to act on ssDNA, nicked molecules and on circular DNAs, as well as its functional coordination with an AP endonuclease and its natural partner, *BsuLigD*, makes this protein able to cooperate in processing of AP sites during the NHEJ pathway. Our results show that this activity is not restricted to *B. subtilis* as is also present in the Ku protein of the phylogenetically distant bacterium *P. aeruginosa*, allowing us to expand our observations to other bacterial members provided with an NHEJ system.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr Margarita Salas and Dr Modesto Redrejo for critical reading of the manuscript, Dr Luis Blanco for Pol λ and Dr José Berenguer for the genomic DNA of *P. aeruginosa*. We also want to thank to the four anonymous reviewers whose constructive criticisms greatly helped to improve the article.

FUNDING

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [BFU2011-23720 to M.V.]; Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'; Formación de Personal Investigador fellowship [BES-2012-053642] from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [to A.O.]. Funding for open access charge: Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [BFU2011-23720].

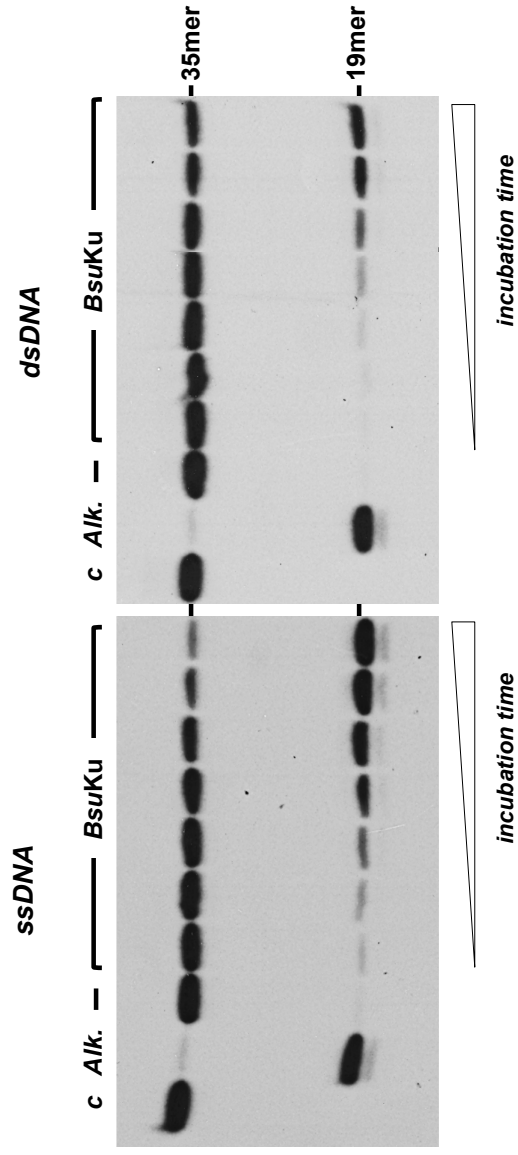
Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

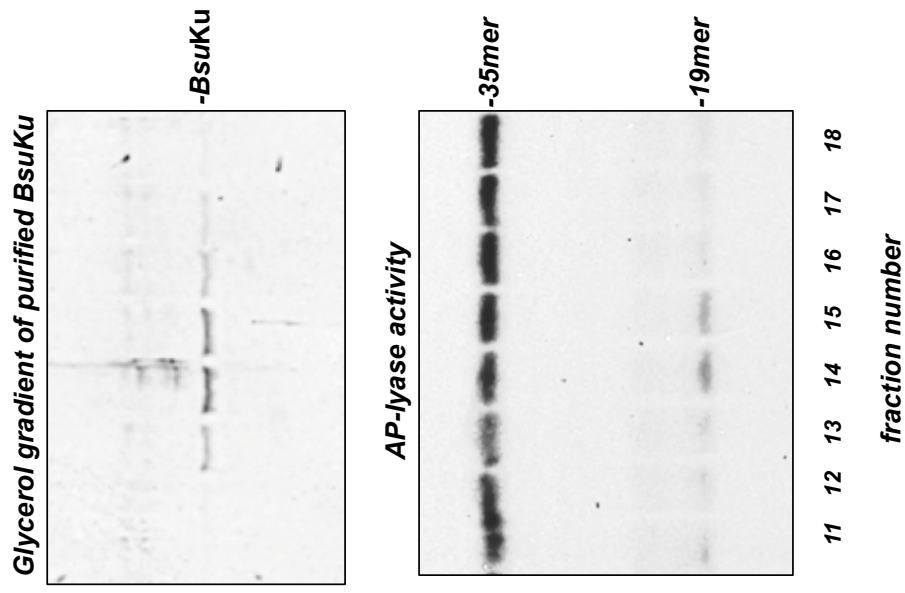
1. Aguilera, A. and Gomez-Gonzalez, B. (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 204–217.
2. Daley, J.M., Palmbo, P.L., Wu, D. and Wilson, T.E. (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu. Rev. Genet.*, **39**, 431–451.
3. Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M. and Zhao, X. (2012) Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5795–5818.
4. Pitcher, R.S., Brissett, N.C. and Doherty, A.J. (2007) Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 259–282.
5. Shuman, S. and Glickman, M.S. (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 852–861.
6. van Gent, D.C. and van der Burg, M. (2007) Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene*, **26**, 7731–7740.

7. Lieber, M.R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 181–211.
8. Bowater, R. and Doherty, A.J. (2006) Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet.*, **2**, e8.
9. Critchlow, S.E. and Jackson, S.P. (1998) DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 394–398.
10. Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K. (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amsterdam)*, **3**, 817–826.
11. Pitcher, R.S., Brissett, N.C., Picher, A.J., Andrade, P., Juárez, R., Thompson, D., Fox, G.C., Blanco, L. and Doherty, A.J. (2007) Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *J. Mol. Biol.*, **366**, 391–405.
12. Burma, S., Chen, B.P. and Chen, D.J. (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amsterdam)*, **5**, 1042–1048.
13. Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P. (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, **72**, 131–142.
14. Lees-Miller, S.P. and Meek, K. (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, **85**, 1161–1173.
15. Daley, J.M., Laan, R.L., Suresh, A. and Wilson, T.E. (2005) DNA joint dependence of pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *J. Biol. Chem.*, **280**, 29030–29037.
16. Dudasova, Z., Dudas, A. and Chovanec, M. (2004) Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 581–601.
17. Krejci, L., Chen, L., Van Komen, S., Sung, P. and Tomkinson, A. (2003) Mending the break: two DNA double-strand break repair machines in eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **74**, 159–201.
18. Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z. and Povirk, L.F. (2004) Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J. Biol. Chem.*, **279**, 805–811.
19. Mahajan, K.N., Nick McElhinny, S.A., Mitchell, B.S. and Ramsden, D.A. (2002) Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 5194–5202.
20. Bartlett, E.J., Brissett, N.C. and Doherty, A.J. (2013) Ribonucleolytic resection is required for repair of strand displaced nonhomologous end-joining intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, E1984–E1991.
21. Aravind, L. and Koonin, E.V. (2001) Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res.*, **11**, 1365–1374.
22. Walker, J.R., Corpina, R.A. and Goldberg, J. (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, **412**, 607–614.
23. Whittaker, C.A. and Hynes, R.O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 3369–3387.
24. Roberts, S.A., Strande, N., Burkhalter, M.D., Strom, C., Havener, J.M., Hasty, P. and Ramsden, D.A. (2010) Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature*, **464**, 1214–1217.
25. Strande, N., Roberts, S.A., Oh, S., Hendrickson, E.A. and Ramsden, D.A. (2012) Specificity of the dRP/AP lyase of Ku promotes nonhomologous end joining (NHEJ) fidelity at damaged ends. *J. Biol. Chem.*, **287**, 13686–13693.
26. de Vega, M. (2013) The minimal *Bacillus subtilis* nonhomologous end joining repair machinery. *PLoS One*, **8**, e64232.
27. Della, M., Palmos, P.L., Tseng, H.M., Tonkin, L.M., Daley, J.M., Topper, L.M., Pitcher, R.S., Tomkinson, A.E., Wilson, T.E. and Doherty, A.J. (2004) Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science*, **306**, 683–685.
28. Kobayashi, H., Simmons, L.A., Yuan, D.S., Broughton, W.J. and Walker, G.C. (2008) Multiple Ku orthologues mediate DNA non-homologous end-joining in the free-living form and during chronic infection of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.*, **67**, 350–363.
29. Kushwaha, A.K. and Grove, A. (2013) *Mycobacterium smegmatis* Ku binds DNA without free ends. *Biochem. J.*, **456**, 275–282.
30. Kushwaha, A.K. and Grove, A. (2013) C-terminal low-complexity sequence repeats of *Mycobacterium smegmatis* Ku modulate DNA binding. *Biosci. Rep.*, **33**, 175–184.
31. Weller, G.R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L.M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S.K., Day, J.P., Wilkinson, A., d'Adda di Fagagna, F. et al. (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, **297**, 1686–1689.
32. Wright, D., DeBeaux, A., Shi, R., Doherty, A.J. and Harrison, L. (2010) Characterization of the roles of the catalytic domains of *Mycobacterium tuberculosis* ligase D in Ku-dependent error-prone DNA end joining. *Mutagenesis*, **25**, 473–481.
33. Zhu, H. and Shuman, S. (2010) Gap filling activities of *Pseudomonas* DNA ligase D (LigD) polymerase and functional interactions of LigD with the DNA end-binding Ku protein. *J. Biol. Chem.*, **285**, 4815–4825.
34. Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.*, **219**, 37–44.
35. Studier, F.W. and 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.
36. Neto, J.B., Gentil, A., Cabral, R.E. and Sarasin, A. (1992) Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19718–19723.
37. Carthew, R.W., Chodosh, L.A. and 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.
38. Krwawicz, J., Arzewska, K.D., Speina, E., Maciejewska, A. and Grzesiuk, E. (2007) Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: I. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim. Pol.*, **54**, 413–434.
39. Khodyreva, S. and Lavrik, O.I. (2011) New players in recognition of intact and cleaved AP sites: implication in DNA repair in mammalian cells. In Chen, C.C. (ed.), *Selected Topics in DNA Repair*. InTech.o.o. Rijeka, Croatia. pp. 305–330.
40. Matsumoto, Y. and Kim, K. (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, **269**, 699–702.
41. Piersen, C.E., Prasad, R., Wilson, S.H. and Lloyd, R.S. (1996) Evidence for an imino intermediate in the DNA polymerase beta deoxyribose phosphate excision reaction. *J. Biol. Chem.*, **271**, 17811–17815.
42. David, S.S. and Williams, S.D. (1998) Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair. *Chem. Rev.*, **98**, 1221–1262.
43. McCullough, A.K., Dodson, M.L. and Lloyd, R.S. (1999) Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 255–285.
44. Piersen, C.E., McCullough, A.K. and Lloyd, R.S. (2000) AP lyases and dRPases: commonality of mechanism. *Mutat. Res.*, **459**, 43–53.
45. Williams, S.D. and David, S.S. (1998) Evidence that MutY is a monofunctional glycosylase capable of forming a covalent Schiff base intermediate with substrate DNA. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5123–5133.
46. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A. and Blanco, L. (2001) Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34659–34663.
47. Novac, O., Matheos, D., Araujo, F.D., Price, G.B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (2001) In vivo association of Ku with mammalian origins of DNA replication. *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 3386–3401.
48. Tuteja, R. and Tuteja, N. (2000) Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 1–33.
49. Salas-Pacheco, J.M., Setlow, B., Setlow, P. and Pedraza-Reyes, M. (2005) Role of the Nfo (YqfS) and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in protecting *Bacillus subtilis* spores from DNA damage. *J. Bacteriol.*, **187**, 7374–7381.
50. Urtiz-Estrada, N., Salas-Pacheco, J.M., Yasbin, R.E. and Pedraza-Reyes, M. (2003) Forespore-specific expression of *Bacillus subtilis* yqfS, which encodes type IV apurinic/aprimidinic endonuclease, a component of the base excision repair pathway. *J. Bacteriol.*, **185**, 340–348.

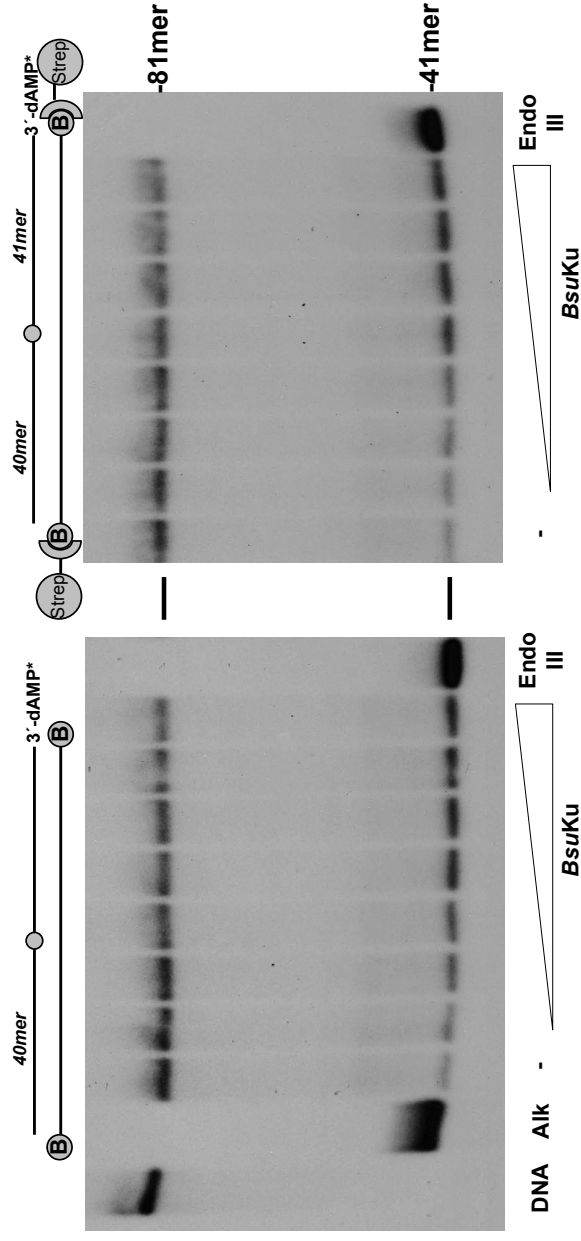
51. Baños, B., Villar, L., Salas, M. and de Vega, M. (2010) Intrinsic apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease activity enables *Bacillus subtilis* DNA polymerase X to recognize, incise, and further repair abasic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 19219–19224.
52. Salas-Pacheco, J.M., Urtiz-Estrada, N., Martínez-Cadena, G., Yasbin, R.E. and Pedraza-Reyes, M. (2003) YqfS from *Bacillus subtilis* is a spore protein and a new functional member of the type IV apurinic/aprimidinic endonuclease family. *J. Bacteriol.*, **185**, 5380–5390.
53. Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R. and Eichenberger, P. (2006) The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, **358**, 16–37.
54. Bliss, T.M. and Lane, D.P. (1997) Ku selectively transfers between DNA molecules with homologous ends. *J. Biol. Chem.*, **272**, 5765–5773.
55. Brissett, N.C., Pitcher, R.S., Juárez, R., Picher, A.J., Green, A.J., Dafforn, T.R., Fox, G.C., Blanco, L. and Doherty, A.J. (2007) Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science*, **318**, 456–459.
56. Gong, C., Martins, A., Bongiorno, P., Glickman, M. and Shuman, S. (2004) Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria. *J. Biol. Chem.*, **279**, 20594–20606.
57. Zhu, H., Nandakumar, J., Aniwu, J., Wang, L.K., Glickman, M.S., Lima, C.D. and Shuman, S. (2006) Atomic structure and nonhomologous end-joining function of the polymerase component of bacterial DNA ligase D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 1711–1716.
58. Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.M., McCarville, J. and Ramsden, D.A. (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 2996–3003.
59. de Vries, E., van Driel, W., Bergsma, W.G., Arnberg, A.C. and van der Vliet, P.C. (1989) HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J. Mol. Biol.*, **208**, 65–78.
60. Downs, J.A. and Jackson, S.P. (2004) A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 367–378.
61. Nickens, D.G., Bardiya, N., Patterson, J.T. and Burke, D.H. (2010) Template-directed ligation of tethered mononucleotides by t4 DNA ligase for kinase ribozyme selection. *PLoS One*, **5**, e12368.
62. Nishida, H., Kiyonari, S., Ishino, Y. and Morikawa, K. (2006) The closed structure of an archaeal DNA ligase from *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.*, **360**, 956–967.
63. Petrova, T., Bezudnova, E.Y., Boyko, K.M., Mardanov, A.V., Polyakov, K.M., Volkov, V.V., Kozin, M., Ravin, N.V., Shabalin, I.G., Skryabin, K.G. et al. (2012) ATP-dependent DNA ligase from *Thermococcus* sp. 1519 displays a new arrangement of the OB-fold domain. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **68**, 1440–1447.
64. Zhu, H. and Shuman, S. (2005) A primer-dependent polymerase function of *Pseudomonas aeruginosa* ATP-dependent DNA ligase (LigD). *J. Biol. Chem.*, **280**, 418–427.
65. Zhu, H. and Shuman, S. (2007) Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* DNA ligases C and D. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3631–3645.
66. Brissett, N.C., Martin, M.J., Bartlett, E.J., Bianchi, J., Blanco, L. and Doherty, A.J. (2013) Molecular basis for DNA double-strand break annealing and primer extension by an NHEJ DNA polymerase. *Cell Rep.*, **5**, 1108–1120.
67. D'Souza, D.I. and Harrison, L. (2003) Repair of clustered uracil DNA damages in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4573–4581.
68. Dianov, G.L., Timchenko, T.V., Sinitsina, O.I., Kuzminov, A.V., Medvedev, O.A. and Salganik, R.I. (1991) Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation. *Mol. Gen. Genet.*, **225**, 448–452.
69. Malyarchuk, S., Castore, R. and Harrison, L. (2008) DNA repair of clustered lesions in mammalian cells: involvement of non-homologous end-joining. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4872–4882.



Supplementary Figure S1. *BsuKu* AP-lyase activity on ss- and dsDNA containing an abasic site. Either the 3' [³²P]3'-dAMP labeled 35mer oligonucleotide pJ containing a uracil at position 16 (ssDNA) or hybridized to the complementary oligonucleotide pG (dsDNA) was treated with *E. coli* UDG to leave an intact AP site in nearly all DNA molecules (*Alk.* alkaline hydrolysis of the UDG-treated DNA). After incubation of the AP-containing molecules with *BsuKu* (228 nM) for 4, 8, 15, 30, 60, 120 and 180 min at 30 °C, samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography, as described in Materials and Methods. Position corresponding to product (19mer) is indicated.

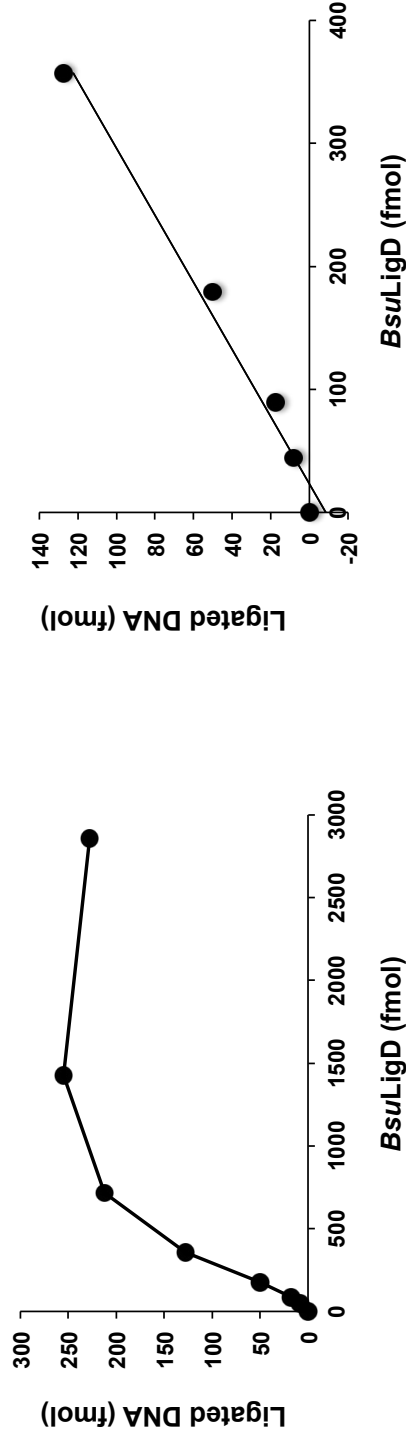
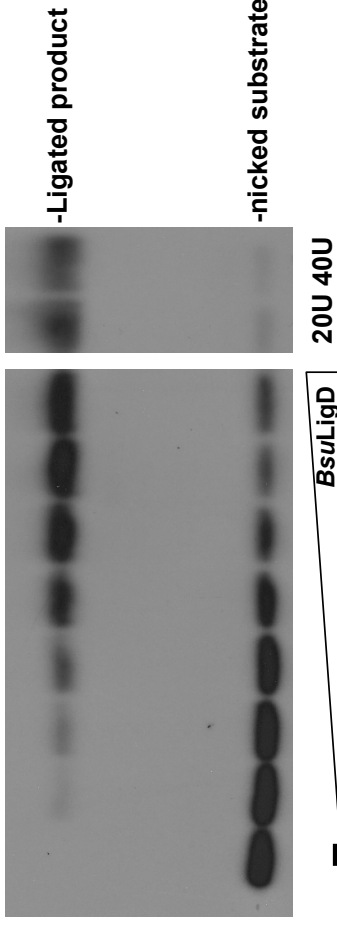


Supplementary Figure S2. AP-lyase activity is intrinsic to BsuKu. The [32 P]3'-end labeled 35mer oligonucleotide containing an uracil at position 16 was treated with *E. coli* UDG, leaving an intact AP site. The resulting AP-containing DNA was incubated for 2 h at 30°C with 5 μ l of fractions 11–18 obtained after sedimentation of the purified BsuKu on a 15–30% glycerol gradient. After incubation reactions were stopped by adding 100 mM NaBH₄ and further analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated.



Supplementary Figure S3. *BsuKu* AP-lyase activity on a single internal abasic site. The $3' [^{32}P]3'$ -dAMP labeled 81mer oligonucleotide SU containing a uracil at position 40 was hybridized to the complementary 3'- and 5' biotinylated oligonucleotide SU-compl (see Materials and Methods). 3.2 nM of the hybrid molecule was preincubated for 5 min at 4 °C in the absence (left panel) or presence (right panel) of 200 nM Strptavidine. The substrate was further treated with *E. coli* UDG to leave an intact AP site in nearly all DNA molecules (*Alk.* alkaline hydrolysis of the UDG-treated DNA). The resulting AP-containing DNA was incubated with increasing amounts of *BsuKu* (0, 3.2, 6.2, 12.5, 25, 50, 100 and 200 ng) at 30 °C for 1 h. Reactions were stopped by addition of 10 μ g of proteinase K and further incubation at 50 °C for 1 h in the presence of 0.4% SDS. Reactions were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated.

³²P-5' GATCACAGTGAGTAC^(P) AACGACGGCCAGT 3'
 3' CTAGTGTCACTCATG-TTGCTGCCGGTCA 5'



Supplementary Figure S4. ATP-independent sealing reaction. The incubation mixture contained, in a final volume of 12.5 μ l, 12 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 20 mM ammonium sulphate, 0.1 mg/ml BSA, 40 μ M MnCl₂, 300 fmols of the nicked substrate and increasing amounts of BsuLigD (45, 89, 179, 357, 714, 1428, 2856 fmols). After incubation for 6 h at 30 °C, the reactions were stopped by adding EDTA up to 10 mM. Samples were analyzed by 8 M urea, 20% PAGE and autoradiography. Estimation of the proportion of adenylylated BsuLigD was performed by plotting the ligation product yielded against BsuLigD amounts in the linear range and further linear regression with the Kaleidagraph 3.6.4 software. Determination of the proportion of non-ligatable substrate was performed by incubating the nicked substrate with 20 and 40 units of T4 DNA ligase (NEB) in its corresponding reaction buffer for 3 h at 37 °C. The proportion of adenylylated BsuLigD molecules was estimated from the slope (bottom, right) of the titration curve (bottom, left).

Identification of a conserved 5'-dRP lyase activity in bacterial DNA repair ligase D and its potential role in base excision repair

Ana de Ory¹, Katja Nagler², Begoña Carrasco³, Marina Raguse², Olga Zafra¹, Ralf Moeller^{2,*} and Miguel de Vega^{1,*}

¹Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid), Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain, ²Radiation Biology Department, German Aerospace Center (DLR), Institute of Aerospace Medicine, Linder Hoehe, D-51147 Cologne, Germany and ³Centro Nacional de Biotecnología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Darwin 3, 28049 Madrid, Spain

Received August 07, 2015; Revised January 18, 2016; Accepted January 20, 2016

ABSTRACT

Bacillus subtilis is one of the bacterial members provided with a nonhomologous end joining (NHEJ) system constituted by the DNA-binding Ku homodimer that recruits the ATP-dependent DNA Ligase D (*BsuLigD*) to the double-stranded DNA breaks (DSBs) ends. *BsuLigD* has inherent polymerization and ligase activities that allow it to fill the short gaps that can arise after realignment of the broken ends and to seal the resulting nicks, contributing to genome stability during the stationary phase and germination of spores. Here we show that *BsuLigD* also has an intrinsic 5'-2-deoxyribose-5-phosphate (dRP) lyase activity located at the N-terminal ligase domain that in coordination with the polymerization and ligase activities allows efficient repairing of 2'-deoxyuridine-containing DNA in an *in vitro* reconstituted Base Excision Repair (BER) reaction. The requirement of a polymerization, a dRP removal and a final sealing step in BER, together with the joint participation of *BsuLigD* with the spore specific AP endonuclease in conferring spore resistance to ultrahigh vacuum desiccation suggest that *BsuLigD* could actively participate in this pathway. We demonstrate the presence of the dRP lyase activity also in the homolog protein from the distantly related bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, allowing us to expand our results to other bacterial LigDs.

INTRODUCTION

DNA double strand breaks (DSBs) are the most dangerous lesions whose repair is essential for maintenance of

genome integrity (1). As bacterial cells often contain multiple partially replicated chromosomes during their vegetative growth, an intact copy of the chromosome is usually available to repair DSBs through the faithful homologous recombination pathway in which the information of the intact duplex is used as template for DNA synthesis across the break (2). However, many bacterial species spend much of their life cycle in stationary phase during which only a single copy of the chromosome is present. In most of these cases the bacterium is also endowed with a two-component nonhomologous end-joining (NHEJ) system (3) that mends DSBs through the direct joining of the DNA ends (3,4). Bacterial NHEJ is composed of the homodimer Ku, homologous to the eukaryotic counterpart (5,6), and the dedicated multifunctional ATP-dependent DNA ligase D (LigD). Extensive characterization of these proteins both *in vitro* and *in vivo* has allowed envisioning how NHEJ operates in bacteria (7–10). Briefly, the NHEJ repair process starts with the recognition and binding of Ku to both sides of the DSB by threading the DNA through its open-ring structure. LigD is further recruited by Ku to mediate the synapsis event required for end-joining. LigD often has a phosphoesterase (PE) activity that heals 3'-ends (11,12); a polymerase activity that fills the gaps that arise after the synapsis; and an intrinsic ATP-dependent ligase activity that finally seals the ends (3,4). Due to the processing of the ends by nucleolytic and/or polymerization activities before final ligation, this pathway is often mutagenic (8,13,14).

Base excision repair (BER) is the most frequently used DNA repair pathway *in vivo* and responsible for the repair of a broad spectrum of non-bulky and non-helix distorting lesions. The increasing number of proteins involved in BER has led to define multiple branches of this repair pathway [see review in (15)]. The general BER process starts with the detection and further removal of the lesion by a spe-

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 911964717; Fax: +34 911964420; Email: mdevega@cbm.csic.es
Correspondence may also be addressed to Ralf Moeller. Tel: +49 2203 601 3145; Fax: +49 2203 61790; Email: ralf.moeller@dlr.de

cific *N*-glycosylase. The resultant AP site is recognized and processed by AP endonucleases or AP lyases that incise at the 5' and 3' sides of the AP site, respectively, requiring further cleaning of the 3'-end by exonucleases and the 5'-dRP terminus by dRPases to leave ligatable 3'-OH and 5'-P termini. A DNA polymerase then closes the gap and a DNA ligase seals the final nick.

Bacillus subtilis is a Gram⁺ spore-forming bacterium with a NHEJ system constituted by Ku (*BsuKu*) and LigD (*BsuLigD*) and whose genes are expressed in the developing spore (16). Deletion of those genes sensitizes *B. subtilis* cells to ionizing radiation in the stationary phase (10) and their spores to several DNA-damaging treatments that cause DSBs (16–18). *BsuKu* interacts functionally with and stimulates *BsuLigD* enabling it to generate synaptic intermediates to repair DSBs through the coordinated action of the polymerization and ligase activities (19). Unlike other bacterial LigDs, *BsuLigD* does not have nuclease activity as it lacks the PE domain. Therefore, in this case other bacterial DNA end-cleaning proteins could heal the 3'-ends. Besides its DNA-binding and *BsuLigD* recruitment roles, *BsuKu* is also provided with an AP/5'-dRP lyase activity that makes this protein able to process ends with near terminal AP sites during the NHEJ pathway (20). The presence of the AP lyase activity in the ortholog from the Gram⁻ bacterium *Pseudomonas aeruginosa* suggests that this activity could be a general feature of bacterial Ku (20), and similar to that of the eukaryotic homolog (21–23).

Although classically repair of AP sites has relied on the recognition and incision of the abasic site by the BER AP endonucleases and further release of the 5'-dRP moiety by the lyase activity of a specialized DNA polymerase, as the eukaryotic polymerases β (24), ι (25), λ (26) and θ (27), there is an increasing number of proteins provided with a 5'-dRP lyase activity that could participate in protecting cells against AP sites, a fact that could reflect the importance for processing such an abundant and deleterious DNA damage [reviewed in (28)]. Thus, in addition to the DNA repair polymerases mentioned above, the *Escherichia coli* DNA polymerase I has been shown to have a dRP-lyase activity although its biological significance has not been established (29). Proteins involved in the nucleotide excision repair (NER) pathway as UvrA, have also been demonstrated to interact with AP-sites, pointing to a potential role of NER as a back-up pathway of AP-sites repair in bacteria (30). Mammalian glycosylases NEIL-1, -2 and -3 are able to remove 5'-dRP lesions at a similar extent of Pol β , and can substitute for Pol β 5'-dRP lyase in an *in vitro* BER assay (31). The mammalian high mobility group proteins HMGA, which are chromatin architectural factors, efficiently remove 5'-dRP groups, protecting cells from DNA damaging agents that cause AP sites (32). Other proteins involved in regulation of the eukaryotic BER as PARP-1 and -2 also show a 5'-dRP lyase although much weaker than the one of Pol β , which is the main processor of 5'-dRP ends during eukaryotic BER (33,34).

Here we show that *BsuLigD*, besides its polymerization and ligase activities has an inherent and novel 5'-dRP lyase activity. This enables the protein to efficiently perform the gap-filling, 5'-dRP-release and final sealing on a DNA substrate containing an AP site previously incised by an AP

endonuclease. Altogether the results lead us to surmise that *BsuLigD* with a forespore AP endonuclease could constitute a new branch of the BER pathway to mend AP sites during spore germination.

MATERIALS AND METHODS

Proteins and reagents

Unlabeled nucleotides were purchased from GE Healthcare. [α ³²P]-Cordycepin (3'-dATP) and [γ ³²P]-ATP were obtained from Perkin Elmer Life Sciences. Substrates were radiolabeled at the 3' end with [α ³²P]-Cordycepin and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) or at the 5' end with [γ ³²P]-ATP and T4 polynucleotide kinase (T4PNK). TdT, T4PNK, human AP endonuclease I (*hAPE1*), *E. coli* Uracil DNA Glycosylase (UDG) and *E. coli* EndoIII, were from New England Biolabs. Thrombin was obtained from Novagen. *BsuLigD* was purified as described (19).

Preparation of the DNA substrates

To prepare a blunt DNA with an internal 2'-deoxyuridine, a 34-mer oligonucleotide containing 2'-deoxyuridine at position 16 (oligo 1: 5'-CTGCAGCTGATGCGCUGTACGG ATCCCCGGGTAC) was either 3'- or 5'-labeled, as indicated, and annealed to its complementary oligonucleotide (oligo 2: 5'-GTACCCGG GGATCCGTACGGCGCAT CAGCTGCAG). A gap-filled BER substrate mimicking the situation prior to 5'-dRP release was prepared by hybridizing a templating oligonucleotide (oligo 3: 5'-CCG TACTGCGCATCAGCTGATCACAGTGAGTAC) to a downstream 3'-labeled oligonucleotide (oligo 4: 5'-P-UAG CTGATGCGCAGTACGG) and either to the upstream oligonucleotide 5 (5'-GTACTCACTGTGATC) (hybrid A) or 6 (5'-GTACTCACTGTGATddC) (hybrid B). The 5'-flapped structures were obtained after hybridization of the templating oligonucleotide 7 (5'-CTGCAGCTGATGC GCGTACTCACTGTGATC) to upstream oligonucleotide 8 (5'-GATCACAGTGAGTAC) and either to the 3'-labeled 34-mer downstream oligonucleotide 9 (5'-GTACC CGGGATCCGTACUGCGCATCAGCTGCAG), that contains 2'-deoxyuridine at position 19 (hybrid C) or to the 3'-labeled 34-mer downstream oligonucleotide 10 (5'-GTACCCGGGGATCCGTACHGCGCATCAGC TGCAG), that harbors a THF (H) at position 19 (hybrid D). Templating oligonucleotide 3 was hybridized to the downstream 3'-labeled oligonucleotide 11 (5'-CTGUAGC TGATGCGCAGTACGG) and to the upstream oligonucleotide 5 to obtain another 5'-flapped structure (hybrid E). The 3'-labeled oligonucleotide 10 was annealed to its complementary oligonucleotide (oligo 12: 5'-CTGCAGC TGATGCGCAGTACGGATCCCCGGGTAC) to obtain a blunt substrate harboring a THF at position 19. To prepare the nicked molecule (hybrid F), a 28-mer templating oligonucleotide (oligo 13: 5'-ACTGGCCGTCTGTGATC TCACTGTGATC) was hybridized to the 5'-labeled 15-mer downstream oligonucleotide 8 and to a 13-mer upstream oligonucleotide (oligo 14: 5'-pAACGACGGCCAGT).

In vitro reconstitution of single-nucleotide BER

Oligonucleotide 1, 3' or 5'-radiolabeled was hybridized to oligonucleotide 2 to obtain a 34-mer double-stranded DNA substrate. Reactions (12.5 μ l) contained 0.53 nM of the hybrid, 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol (v/v), 27 nM *E. coli* UDG, 5 nM hAPE1, 0.64 mM MnCl₂ and the indicated concentration of the corresponding nucleotide. Reactions were initiated by adding 57 nM purified *Bsu*LigD, as indicated. Samples were incubated at 30°C for 30 min. After incubation freshly prepared NaBH₄ was added to a final concentration of 100 mM, and the reactions were further incubated for additional 20 min on ice. Stabilized (reduced) DNA products were ethanol-precipitated in the presence of 0.2 μ g/ml tRNA, resuspended in water and analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography.

5'-dRP lyase activity on gap-filled BER intermediates

A concentration of 0.96 nM of the indicated hybrid A (upstream primer DNA with a 3'-dCMP) or B (upstream primer DNA with a 3'-ddCMP) was treated with 27 nM *E. coli* UDG for 15 min at 37°C in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol. After incubation the mixture was supplemented with 3.5 nM of EndoIII or 60 nM of the indicated LigD or 228 nM of the *Bsu*LigDom in the absence or presence of 0.64 mM MnCl₂, as indicated. Samples were incubated at 30°C for 30 min and reactions were processed as described in the single-nucleotide BER assay.

Steady-state kinetic parameters of the dRP lyase reaction

To quantify the kinetic parameters of the 5'-dRP lyase activity, 5'-dRP release was measured as a function of 5'-dRP site concentration, as described in (35,36). Thus, increasing concentrations (0–2000 nM) of hybrid B (upstream primer DNA with a 3'-ddCMP) were treated extensively with *E. coli* UDG (as described above) to render the 5'-dRP group, and further incubated with 50 nM *Bsu*LigD. After incubation for 20 min at 30°C, reaction products were stabilized by incubation with 100 mM of freshly prepared NaBH₄ for 20 min on ice. Stabilized (reduced) DNA products were ethanol-precipitated in the presence of 0.2 μ g/ml tRNA, resuspended in water and analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. The k_{obs} (min⁻¹) was plotted against the DNA concentration. Michaelis–Menten constant K_m and k_{cat} were obtained by least-squares nonlinear regression to a rectangular hyperbola using Prism 5 software. The values plotted are the mean of three independent experiments.

NaBH₄ trapping assay

The 3' labeled-1/2 hybrid was treated with 27 nM *E. coli* UDG for 15 min at 37°C in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol. After incubation, the mixture was supplemented with 5 nM hAPE1 and 1 mM MnCl₂ and incubated at 37°C for 30 min. A concentration of 2.6 nM of the resulting DNA was incubated with 95 nM of purified *Bsu*LigD and 10 μ M of CTP during 2.5 min, forming a Schiff base intermediate which is trapped by the addition of 100 mM NaCl or freshly prepared NaBH₄. When indicated, *Bsu*LigD was pre-incubated with 0.05 U of Thrombin in its

reaction buffer for 1 h at 20°C in a total volume of 15 μ l. After incubation for 30 min on ice, samples were analyzed by 10% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining and autoradiography of the dried gel. When indicated 4.1 nM of the 3'-labeled hybrid E was used as substrate. The hybrid was treated with 27 nM *E. coli* UDG for 15 min at 37°C in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol. 4 nM of the resulting DNA was incubated with either 100 nM of purified *Bsu*LigD or *Pae*LigD or 147 nM of LigDom. Samples were processed as mentioned above.

AP lyase activity assay on 2'-deoxyuridine or THF containing substrates

A concentration of 0.53 nM of the 2'-deoxyuridine-containing hybrids C or D was treated with 27 nM *E. coli* UDG for 15 min at 37°C in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol. After incubation the mixture was supplemented with 3.5 nM of EndoIII, 5 nM hAPE1 or the indicated increasing concentrations of *Bsu*LigD. Samples were incubated at 30°C for 30 min and reactions were processed as described in the single-nucleotide BER assay

Cloning and overexpression of *P. aeruginosa* LigD (*Pae*LigD)

The *P. aeruginosa* gene PA2138 encoding *Pae*LigD was synthesized by the GenScript Corporation and cloned between the NdeI and BamHI of bacterial expression vector pET-16b that allows expression of the recombinant protein fused to a N-terminal (His)₁₀-tag followed by a thrombin target. *E. coli* BL21(DE3) cells were transformed with the recombinant expression plasmid pET-16*Pae*LigD and grown in LB medium at 37°C in the presence of ampicillin until the A₆₀₀ reached 0.6. Expression of the His-tagged *Pae*LigD protein was induced with 0.5 mM IPTG and further incubation for 20 h at 15°C, as described (37). Cells were thawed and ground with alumina at 4°C. The slurry was resuspended in Buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.7 M NaCl, 7 mM β -mercaptoethanol, 5% glycerol) and centrifuged for 5 min at 6506 \times g, at 4°C to remove alumina and intact cells. The recombinant *Pae*LigD protein was soluble under these conditions, since it remained in the supernatant after a new centrifugation for 20 min at 234306 \times g, to separate insoluble proteins from the soluble extract. The soluble extracts were loaded onto a Ni-NTA column (QIAGEN) pre-equilibrated with Buffer A (0.7 M NaCl, 4 mM imidazole). The bound protein was eluted with 200 mM imidazole in Buffer A (0.7 M NaCl) and further diluted with Buffer A (1 mM EDTA) without NaCl to get a final 0.3 M NaCl. The sample was applied to a phosphocellulose column pre-equilibrated with Buffer A (0.3 M NaCl, 1 mM EDTA). The bound protein was eluted with Buffer A (0.4 M NaCl, 1 mM EDTA). The purified protein was finally dialyzed against a buffer containing 0.25 M NaCl and 50% glycerol and stored at –20°C.

Overexpression of *Bsu*LigD Ligase domain (LigDom)

The recombinant expression plasmid pET28-*Bsu*LigD (19) was used as template to introduce a stop codon at position 320 with the QuikChange site-directed mutagenesis kit provided by Stratagene resulting in plasmid

pET28-LigDom. Cells, previously transformed with plasmid pET28-LigDom, were grown overnight in LB medium at 37°C in the presence of kanamycin. Cells were diluted into the same media and incubated at 30°C until the A_{600} reached 0.6. Then, IPTG (Sigma) was added to a final concentration of 0.5 mM and incubation was continued for 2 h at 30°C. Cells were thawed and ground with alumina at 4°C. The slurry was resuspended in Buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 7 mM β -mercaptoethanol, 5% glycerol) and centrifuged for 5 min at 6506 \times g, at 4°C to remove alumina and intact cells. The recombinant LigDom was soluble under these conditions, since it remained in the supernatant after a new centrifugation for 20 min at 234306 \times g, to separate insoluble proteins from the soluble extract. The soluble extracts were diluted with Buffer A without salt to a final 0.25 M NaCl concentration and further loaded onto a Ni-NTA column (QIAGEN) pre-equilibrated with Buffer A (0.25 M NaCl, 5 mM imidazole). The bound protein was eluted with 200 mM imidazole in Buffer A (0.25 M NaCl) and further dialyzed against Buffer A (0.3 M NaCl, 50% glycerol, 1 mM EDTA, 0.05% Tween) and stored at -20°C .

Ligation assay to a 5'-dRP end

3'-labeled hybrid 10/12 was treated with *h*APE1 for 30 min at 37°C in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol and 1 mM MnCl_2 . The resulting DNA was column purified and 0.53 nM of the nicked substrate was further treated either with *Bsu*LigD or T4 DNA ligase in the presence of 30 mM Hepes, pH 7.5, 4% glycerol. Different concentrations of MnCl_2 were assayed, in the absence or presence of 0.1 mM ATP. Samples were incubated at 30°C for 30 min and reactions were stopped by adding EDTA up to 10 mM and analyzed by 8M urea-20% PAGE and autoradiography.

Site-Directed mutagenesis of *Bsu*LigD

*Bsu*LigD mutants K24A, K189A, K206A, K208A and E184A were made by using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies). Plasmid pET28a-*Bsu*LigD containing the *Bsu*LigD gene was used as template for the reaction (19). The presence of the mutation and the absence of additional ones were determined by sequencing the entire gene. *Bsu*LigD mutants were expressed in *E. coli* SoluBL21TM cells (Genlantis) and further purified as described for the wild-type *Bsu*LigD (19).

Construction of *B. subtilis* strains expressing the *Bsu*LigD E184A mutant

*Bsu*LigD gene (*ykoU*) containing the mutation E184A was amplified from plasmid pET-*Bsu*LigD-E184A (see above) with a 5' primer containing an XmaI site and a 3' primer containing an EcoRV and XbaI sites. The amplified fragment was cloned into the XmaI-XbaI sites of a pUC18 plasmid. *ykoT* gene, placed downstream of *ykoU* was amplified from the *B. subtilis* chromosome with a 5' primer containing an XbaI and a SacII restriction sites, and a 3' primer with a PstI site. This gene was cloned into the above plasmid. The pUB110 derived neomycin resistant (Neo^{R}) gene *neo* (38) was amplified with a 5' primer containing an EcoRV and a

3' primer with a SacI site. The EcoRV-SacII digested *neo* gene was cloned between the *ykoU* (or *ykoUE184A*) and *ykoT* genes in the above pUC18 plasmid. Plasmid-borne *ykoU neo ykoT* or *ykoUE184A neo ykoT* operon was used to transform *B. subtilis* (strain BG214) competent cells, as previously described (38). Neo^{R} transformants were sequenced to select those with the chromosomal-encoded *neo* gene between wild type (wt) *ykoU* and *ykoT* genes (strain BC1000) or between *ykoUE184A* and *ykoT* genes (strain BC1001) (Supplementary Table S1). GP1502 DNA was used to transform BC1000 strain to render the BC1002 strain. Plasmid-borne *ykoUE184A neo ykoT* operon was used to transform the *B. subtilis* BC1002 strain (Δnfo) to get strain BC1003 (Supplementary Table S1).

Bacterial strains and spore preparation

All bacterial strains used in this study are derivatives of 168 strains and are listed in Supplementary Table S1. Spores were obtained by cultivation under vigorous aeration in double-strength liquid Schaeffer sporulation medium (39), and spores were purified and stored as described previously (18,40,41). When appropriate, chloramphenicol (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kanamycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), or erythromycin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the medium. Spore preparations consisted of single spores with no detectable clumps and were free (99%) of growing cells, germinated spores and cell debris, as seen with a phase-contrast microscope (18,40,41). The purified spores were resuspended in 5 ml of distilled water and stored until final usage at 4°C.

Assaying spore resistance to extreme dryness [ultrahigh vacuum (UHV)]

Spore samples consisted of air-dried spore monolayers immobilized on 7-mm in diameter stainless steel discs and were exposed 7 days to UHV produced by an ion-getter pumping system (400l/s; Varian SpA, Torino, Italy) reaching a final pressure of 3×10^{-6} Pa (18,41,42). The spores immobilized on quartz discs were recovered by 10% aqueous polyvinyl alcohol solution as described previously (18,42). The appropriate dilutions of treated and untreated spore samples were plated on NB agar plates in order to count CFUs as a measure of spore survival. The CFUs of untreated spore samples were represented as 100% survival. The UHV experiment was performed in triplicate. The CFUs of UHV-treated spores were divided with the average CFU-value of untreated spore samples in order to obtain the survival after UHV. The data presented are expressed as average values with standard deviations. The percentage of survivals of treated spores was compared statistically using Student's *t*-test and differences with *P*-values of ≤ 0.05 were considered statistically significant (18,41,42).

RESULTS

*Bsu*LigD removes 5'-dRP groups

Previous studies showed the ability of the *Bsu*LigD to accommodate to preformed short gaps 1–2 nt long achieving their efficient filling mediated by specific recognition of

the 5'-P group at the distal margin of the gap and further sealing of the resultant nick (19). *B. subtilis* AP endonucleases have been reported to be required to repair the AP sites that accumulate during spore dormancy (43–45). This fact suggests that BER should be active during spore germination and outgrowth, and consequently the 1-nt gaps resulting from the action of the AP endonucleases on the abasic sites should be filled by a polymerization activity to allow further sealing of the break. The expression of *BsuLigD* in the forespore (16) prompted us to gauge the competence of the enzyme to resume gap-filling in BER intermediates where the gap is flanked by a 3'-OH and a 5'-dRP group. To this end, a double-stranded oligonucleotide with a dUMP at position 16 of the ³²P-5'-labeled strand (see left panel in top of Figure 1, lane *a* in Figure 1A) was treated with *E. coli* UDG to render an AP site. Further incubation with *hApeI* released a nicked molecule with a 5'-dRP end (opposite to dGMP in the template strand, lane *b* in Figure 1A). As observed, *BsuLigD* catalyzed efficient template directed addition of both dCMP (lane *e*) and CMP (lane *f*), extending the 75% and 90% of the primer molecules, respectively, discriminating against ddCMP insertion (lane *d*; 29% of the primer molecules extended) as here the formation of the network of direct and water-mediated contacts between the protein and the ribose O2' and O3' is precluded (46). Intriguingly, besides the expected +1 (16-mer) elongation product, the enzyme gave rise to a 34-mer product with CTP (corresponding to the 33% of the primer molecules). Direct ligation of the 3'-OH and the 5'-dRP ends can be ruled out as no ligation products were detected in the absence of nucleotides (lane *c*), being tempting to speculate that *BsuLigD* could remove the 5'-dRP moiety and seal the resulting 5'-P with the 3'-OH group of the elongated primer strand. To test this hypothesis the 3'-end of the U-containing strand was labeled (see right panel in top of Figure 1, lane *a* in Figure 1B). The 5'-dRP end that resulted after treatment with *E. coli* UDG and *hApeI* remained stable throughout the assay (Figure 1B, lane *b*). As shown, once the gap is filled after insertion of either the deoxy- (lane *e*) or the ribonucleotide (lane *f*), *BsuLigD* removes 47% and the 68%, respectively, of the 5'-dRP groups as detected by the size reduction of the labeled substrate (19-mer 5'-P), in good agreement with the presence of a dRPase activity in the enzyme. In addition, filling with CTP allowed final ligation of the nick (49% of the 19-mer 5'-P molecules) to yield a repaired 35-mer long molecule (the 3'-labeling excludes that the 35-mer product is the outcome of the complete replication of the template by *BsuLigD*), reflecting a strong propensity of the enzyme for sealing nicks with a monoribonucleotide on the 3' end of the break, a functional signature of bacterial NHEJ ligases that distinguishes them from the other polynucleotide ligases (47,48). In this sense, it has been speculated that bacterial NHEJ ligases could be unable to distort the DNA 3'-OH terminus into the RNA-like A conformation observed in other ATP-dependent DNA ligases that do not discriminate between DNA and RNA in the 3'-OH strand (47). Such a distortion would not be required with a 3'-monoribonucleotide, facilitating productive ligation by bacterial LigDs (48).

Altogether the results imply that *BsuLigD* fills the gap restoring the original (repaired) nucleotide, disclosing a new activity of the protein, the ability to release the dangling 5'-dRP group to generate a canonical and ligatable nick with 3'-OH and 5'-P ends, further sealed by the inherent ligase activity of the enzyme. It is noteworthy that unlike other polymerases involved in gap-filling and 5'-dRP release during BER as eukaryotic polymerases β (24), ι (25), λ (26) and θ (27), *BsuLigD* is not able to act on the dRP-moiety directly on this substrate (see lane *c* in Figure 1B). The prior filling step requirement would indicate that the optimal substrate for this activity requires the upstream 3' end to be placed adjacent to the last phosphodiester bond of the downstream strand. In agreement with this hypothesis, the negligible 5'-dRP release observed in the presence of ddCTP (<9%; Figure 1B, lane *d*) would be due to the low primer extension activity observed with this nucleotide (Figure 1A, lane *d*).

Excision of 5'-dRP groups by *BsuLigD* proceeds through a β -elimination mechanism

In the above assays the requirement of Mn²⁺ ions for the gap-filling step prevented the analysis of the metal dependency of the 5'-dRP release by *BsuLigD*. Therefore, similar experiments were conducted using a DNA hybrid as substrate mimicking the situation previous to the dRP release, with the 3'-OH end of the upstream strand adjacent to the last phosphodiester bond between the penultimate 5' nucleotide and the terminal 5'-dRP group of the downstream strand (see scheme at the top of Figure 2). Under these conditions, the absence of divalent cations did not impede the release of the 5'-dRP group by *BsuLigD* (Figure 2, lane *c*), pointing to a metal independent dRP lyase activity. Although unnecessary, the addition of Mn²⁺ to the reaction improved the dRPase activity of *BsuLigD* (Figure 2, lane *d*). Maybe the presence of this metal ion (the preferred cation for both the polymerization and ligase activities of *BsuLigD* (19)) assists the stable/proper binding of the protein to the DNA substrate, as described for the 5'-dRP lyase activity of Pol β (24,36). As shown, further addition of alkali did not hydrolyze the 34-mer product, supporting the notion that the repaired DNA was not the result of a direct ligation of the upstream strand to the 5'-dRP group (Figure 2, lane *e*). Similar results were obtained with a substrate bearing a ddNMP at the 3' end of the upstream strand (see Figure 2, right panel). As expected, in this case no ligation products were observable. These results indicate that the dRP-release activity is not the result of an in-line attack of the last phosphodiester bond by the 3'-OH group that could mimic the mode of action of DNA ligases (47).

5'-dRP release by DNA polymerases β , ι , λ , θ and γ proceeds through β -elimination, a mechanism that involves generation of a Schiff-base intermediate and that allowed categorizing the activity as a 5'-dRP lyase (24–27,35). To elucidate whether this was also the case with *BsuLigD*, we took advantage of the ability of NaBH₄ to reduce a Schiff-base intermediate to form a covalent protein-DNA complex. Therefore, if the mechanism of catalysis of *BsuLigD* involves a Schiff-base intermediate, addition of NaBH₄ to the gap-filling reaction described above should permit trap-

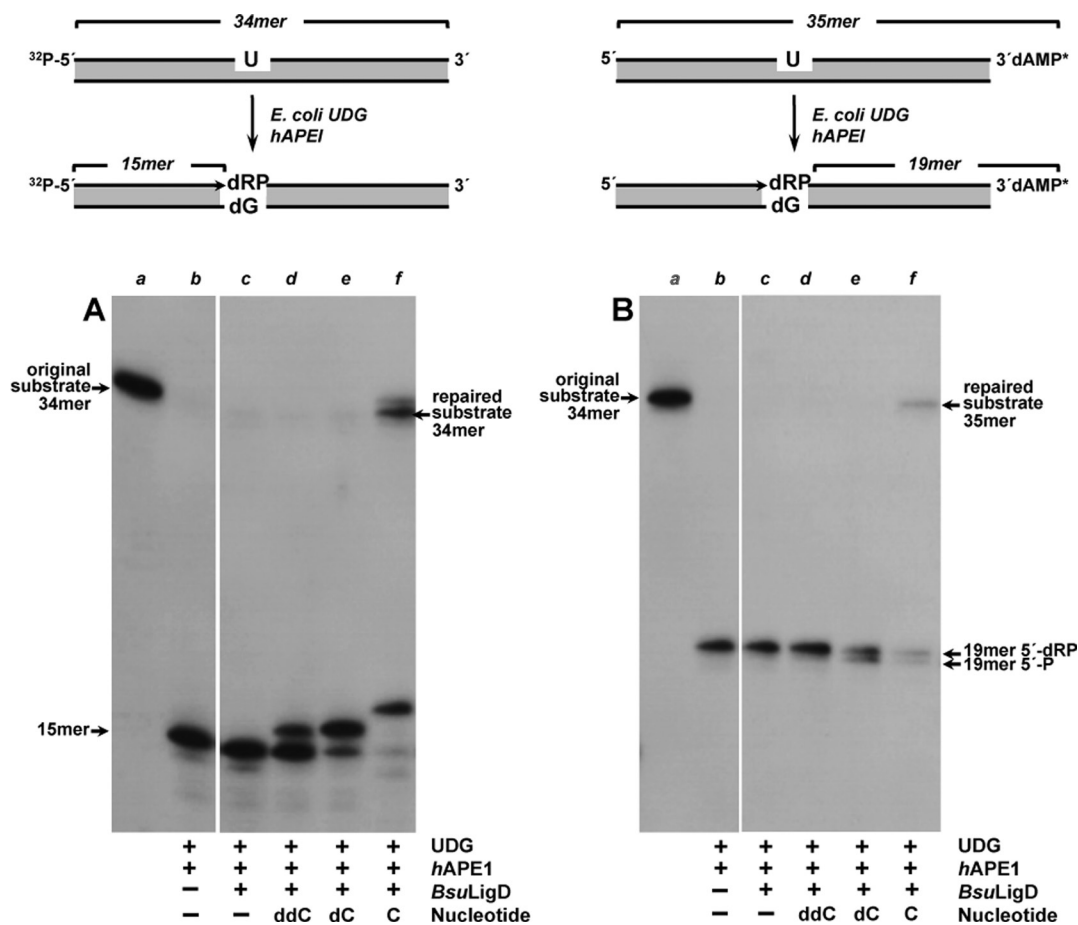


Figure 1. *BsuLigD* performs complete repair of a BER substrate. Top: schematic representation of the formation of a BER substrate indicating the lengths of the original substrate (^{32}P -5'-labeled in left panel or α ^{32}P -cordycepin-3' labeled in right panel) and products after incubation with *E. coli* UDG and *hAPE1*. Bottom: autodiagrams illustrating the ability of *BsuLigD* to repair a BER intermediate. Experiments were performed as described in Materials and Methods. When indicated reactions were incubated in the presence of 57 nM *BsuLigD* and either 300 μM ddCTP, 10 μM dCTP or 10 μM CTP. After incubation for 30 min at 30°C, samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated. The figure is a composite image made from different parts of the same experiment.

ping of a DNA-protein complex that would be detected by autoradiography after separation by SDS-PAGE. As shown in Figure 3A, *BsuLigD* forms a stable adduct with the 3' labeled 5'-dRP-containing 19-mer strand that was dependent on both, addition of NaBH_4 and presence of an AP site in the DNA (Figure 3B). These results indicate that the 5'-dRP removal activity of *BsuLigD* proceeds through β -elimination. Removal of the fused N-terminal His-tag from *BsuLigD* after incubation with thrombin gave rise to DNA-*BsuLigD* adducts whose faster migration paralleled the electrophoretic pattern of the purified protein, indicating that the 5'-dRP lyase activity is intrinsic to *BsuLigD* (Figure 3A) and ruling out the presence of a contaminant AP lyase from the expression bacteria *E. coli*.

The presence of nonenzymatic AP lyase activity has been described in basic cellular macromolecules such as polyamines or histones and in other basic molecules including tripeptides such as Lys-Trp-Lys and Lys-Tyr-Lys (49),

although cleavage generally occurs at a very low efficiency (50). To ascertain that the 5'-dRP lyase activity exhibited by LigD was indeed catalytic the activity was assayed under steady-state conditions as described in (35,36) on the above DNA hybrid. The apparent K_m for this DNA and the k_{cat} were $2 \pm 0.65 \mu\text{M}$ and $0.88 \pm 0.17 \text{ min}^{-1}$, respectively (see Supplementary Figure S1). Therefore, *BsuLigD* k_{cat} is 5-fold lower than that of Pol β assayed on preincised AP-DNA (4.5 min^{-1}) (36), but still 3-fold higher than the k_{cat} of the 5'-dRP lyase activity of Pol λ (0.26 min^{-1}) (35). These results, together with the coupling of the 5'-dRP lyase activity to polymerization and its improvement in the presence of Mn^{2+} ions, lead us to conclude that the 5'-dRP lyase of *BsuLigD* is catalytic.

The capacity of *BsuLigD* to release a 5'-dRP group led us to evaluate its ability to recognize and incise an internal AP site, as traditionally 5'-dRP lyases have been considered a subset of AP lyases (51). To this end, the flapped DNA

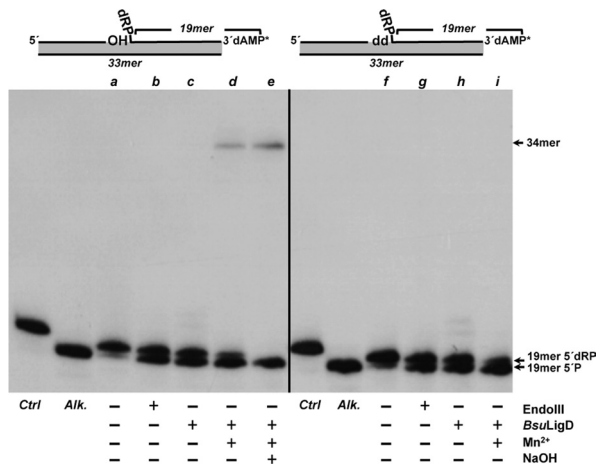


Figure 2. *BsuLigD* performs non-metal-dependent release of the 5'-dRP moiety. Top: schematic representation of the substrates used in the assay and corresponding to a filled gap with a dangling 5'-dRP group in the downstream strand and either a 3'-OH (left) or dideoxy (right) terminus. Bottom: autodiagrams showing the release of the 5'-dRP group by *BsuLigD*. Reactions were performed as described in Materials and Methods in the presence of either 3.5 nM EndoIII (lanes *b* and *g*) or 57 nM *BsuLigD* (lanes *c*, *d*, *e*, *h* and *i*). After incubation during 30 min at 30°C, samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated. Alk., alkaline hydrolysis of the 5'-dRP moiety. Lanes *a* and *f*, original substrate; lanes *c* and *h*, reactions performed in the absence of metal ions; lanes *d* and *i*, reactions performed in the presence of 0.64 mM MnCl₂; lane *e*, reaction carried out in the presence of 0.64 mM MnCl₂ and further incubation with alkali. Ctrl lane corresponds to a control of the initial DNA before starting the reaction. The figure is a composite image made from different parts of the same experiment.

structure depicted in left panel of Figure 4 and containing a 2'-deoxyuridine at position 19 of the 35-mer downstream oligonucleotide was used as substrate. This DNA was previously treated with *E. coli* UDG to get a natural AP site. Incubation of this substrate with *h*APE1 rendered a 16-mer product with a 5'-dRP end (Figure 4, left panel) as this enzyme is a metal-dependent AP endonuclease that hydrolyzes the phosphodiester bond 5' to the AP site [(52) and references therein]. Conversely, *E. coli* EndoIII incised at the 3' side by its AP lyase activity leaving a product that migrates faster due to the presence of a 5'-P [(52) and references therein]. As shown in Figure 4 (left panel), in the absence of divalent cations incubation of the AP site-containing DNA with increasing amounts of *BsuLigD* rendered a product with the same electrophoretic mobility to that produced by EndoIII, consistent with a cleavage at the 3' side to the AP site in a metal-independent manner. In this sense, the presence of the AP cleavage activity after incubating the protein overnight with up to 100 mM EDTA (see Supplementary Figure S2), allows us to rule out metal traces as responsible for such an activity, in agreement with the metal independent 5'-dRP lyase activity described above. These results lead us to infer the presence of an intrinsic AP lyase activity in *BsuLigD* that exerts its reaction through a β -elimination mechanism. In support of this, replacement of the AP site with tetrahydrofuran (THF), a stable AP ana-

log resistant to the β -elimination reaction (24,28) inhibited the *BsuLigD* activity (Figure 4, right panel).

The presence of a 5'-dRP lyase activity is conserved in other bacterial LigDs

The unforeseen presence of a 5'-dRP lyase activity in *BsuLigD* led us to analyze whether this activity is specific to the *B. subtilis* protein or, by the contrary if its presence can be extended to other bacterial LigDs. To this end, we purified the 94 kDa *Pseudomonas aeruginosa* LigD (*PaeLigD*; see Materials and Methods) since (i) it has been used as model for bacterial LigDs for years (3,4), (ii) shows a configuration different from *BsuLigD* because it contains an additional N-terminal PE domain and (iii) it comes from a Gram⁻ bacterium. As shown in Figure 5 (left panel), the purified *PaeLigD* possesses a non metal-dependent 5'-dRP lyase activity since it releases the 5'-dRP moiety from the 3'-labeled substrate yielding the 19-mer 5'-P product that is adenylated at some extent by the proportion of the AMP-*PaeLigD* complexes coming from the expression bacterium, as described (20,48,53). In the presence of Mn²⁺ ions *PaeLigD* rendered a repaired 34-mer ligation product. As shown in Supplementary Figure S3, purified *PaeLigD* is cross-linked to the DNA after reduction with NaBH₄. Altogether, the results allow us to widen the presence of a 5'-dRP lyase activity to other bacterial LigDs.

The 5'-dRP lyase activity of *BsuLigD* is located at the N-terminal ligase domain

Previous studies on ATP-dependent DNA ligases from bacteriophages T4 and T7 as well as from the human mitochondria showed that those enzymes were endowed with an intrinsic 5'-dRP lyase activity (54,55). As mentioned above, *BsuLigD* is a bimodular enzyme with an N-terminal ATP-dependent DNA ligase catalytic domain (residues 1–331) linked to a C-terminal polymerase domain (residues 332–611). Thus, it was reasonable to speculate that the *BsuLigD* 5'-dRP lyase activity could reside at the N-terminal portion of the enzyme. To test this hypothesis, the ligase domain of *BsuLigD* (LigDom) was cloned and purified (see Materials and Methods). As shown in Figure 5 (right panel), the LigDom released the 5'-dRP group from the substrate in a metal-independent manner, giving rise to a ligation product in the presence of Mn²⁺. As shown in Supplementary Figure S3, LigDom is also cross-linked to the DNA following reduction with NaBH₄. These results indicate that the catalytic site responsible for *BsuLigD* AP lyase activity is placed at the LigDom.

In contrast to T4 DNA ligase, *BsuLigD* is unable to seal the 3'-OH and 5'-dRP ends to regenerate an internal AP site (see Supplementary Figure S4, in this case, the substrate harbors a THF to prevent the β -elimination). It has been predicted that once regenerated, T4 DNA ligase could recognize the internal AP site and exert its AP lyase activity introducing an incision at the 3' side (54). As a consequence, the resulting 3'-phospho- α,β -unsaturated aldehyde end should be processed by additional nucleolytic activities to regenerate an elongatable 3'-OH group. Therefore, prevention of direct ligation by *BsuLigD* could represent an ad-

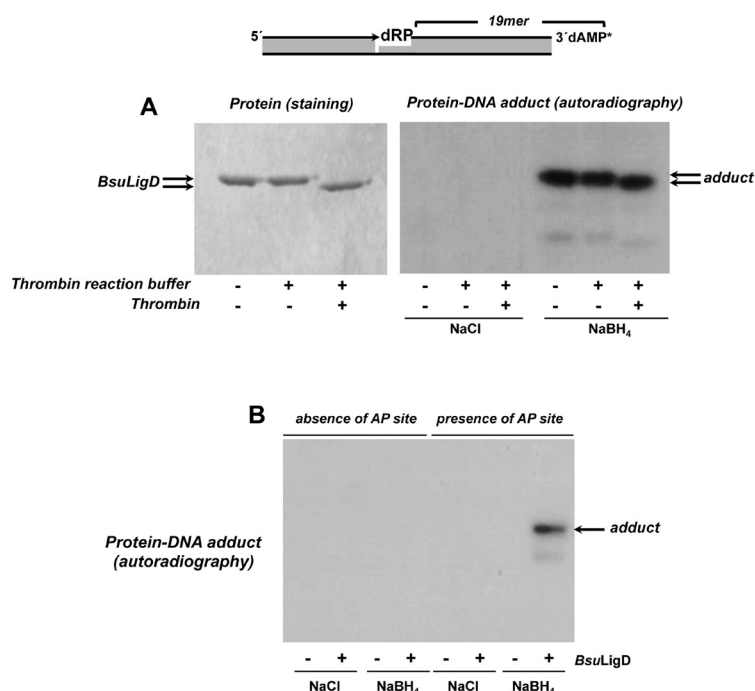


Figure 3. Formation of *BsuLigD*-DNA adducts. (A) Dependence of *BsuLigD*-DNA cross-link on NaBH₄. Reactions were performed as described in Materials and Methods, incubating 95 nM *BsuLigD* with 2.6 nM of the 3' [α^{32} P]3'-dAMP labeled DNA substrate depicted on top of the figure, in the presence of 10 μ M CTP, 0.64 mM MnCl₂ and either 100 mM NaBH₄ or NaCl (as indicated). Left panel: Coomassie blue staining after SDS-PAGE of purified *BsuLigD*. Right panel: autoradiography of corresponding protein-DNA adducts after the SDS-PAGE separation shown in left panel. When indicated, protein was previously incubated with 0.05 U of thrombin at 20°C for 60 min. (B) Adduct formation is dependent on the presence of an abasic site. Reactions were performed as in described in (A) but using as substrate 3.6 nM of the 3' [α^{32} P]3'-dAMP labeled oligonucleotide without removing the uracil (absence of AP site) or after treatment with *E. coli* UDG (presence of AP site), in the presence of either 100 mM NaBH₄ or NaCl (as indicated). Autoradiography of corresponding protein-DNA adduct after the SDS-PAGE separation is shown.

vantage as the enzyme is compelled to accomplish previous 5'-dRP release, precluding the need for additional activities.

The formation of a stable protein-DNA substrate adduct between *BsuLigD* and 5'-dRP-containing DNA in the presence of a reducing agent is consistent with the AP lyase active site lysine residue forming a Schiff base intermediate with the open-ring form of the abasic site. Thus, to determine whether the ligase and the lyase activities use the same active site we have changed into alanine the *BsuLigD* residues Lys24 (mutant K24A), Lys189 (mutant K189A), Lys206 (mutant K206A) and Lys208 (mutant K208A) as their homologous residues Lys481, Lys618, Lys635 and Lys637 of *Mycobacterium tuberculosis* LigD (*MtuLigD*) have been shown to form part of the ligation active site (56). In addition, *BsuLigD* Glu184, the counterpart of the metal ligand Glu613 of *MtuLigD*, one of the catalytic residues responsible for the ligation activity (56) was also mutated to alanine (mutant E184A). As shown in Supplementary Figure S5, all the mutant derivatives were deficient in the ligation activity, as expected, but retained a 5'-dRP lyase activity similar to that of the wild-type enzyme. These results led us to conclude that both activities are not sharing the same active site.

Spore resistance after UHV treatment depends on *BsuLigD* and Nfo

Previous studies showed that deletion of *B. subtilis* AP endonucleases sensitized spores to desiccation in agreement with the induction of single-stranded nicks (43). In addition, ultrahigh vacuum (UHV) desiccation also decreased the survivability of the Δ *ligD* mutant spores, which was consistent with the induction also of DSBs in DNA. In order to determine a potential relationship between *BsuLigD* and the BER pathway, *B. subtilis* mutant spores lacking *BsuLigD* (Δ *ligD*), the spore-specific AP endonuclease IV Nfo (Δ *nfo*) and Δ *ligD* Δ *nfo* were subjected to UHV desiccation treatment. As shown in Figure 6, Δ *ligD* single mutation caused a 4-fold reduction in spore survival. Similarly, deletion of the spore AP endonuclease Nfo caused a 2-fold increase of the sensitivity of the spores. These results indicate the involvement of both *B. subtilis* proteins in the DNA repair in spores after UHV exposure for 7 days. Interestingly, *B. subtilis* LigD and Nfo do not appear to contribute additively to spore resistance after UHV treatment as Δ *ligD* Δ *nfo* rendered spores with a sensitivity statistically similar to that displayed by the single mutant Δ *ligD*, suggesting a functional interaction between both repair proteins. Similar results were obtained after testing the effects of the ligase-inactivating *BsuLigD* E184A mu-

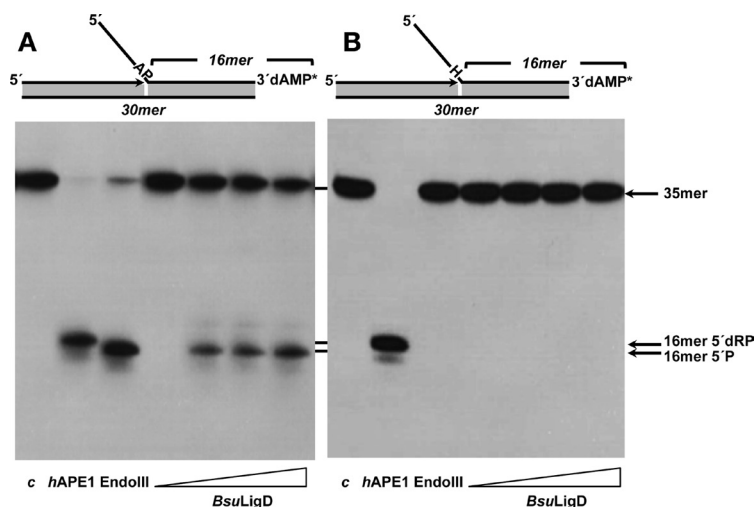


Figure 4. *BsuLigD* is endowed with an AP lyase activity. (A) Analysis of the capacity of *BsuLigD* to incise an internal natural abasic site. The [$\alpha^{32}\text{P}$]3'-labeled 2'-deoxyuridine-containing substrate was treated with 27 nM *E. coli* UDG (lane c), leaving an intact AP site. The resulting AP-containing DNA was incubated in the presence of either 5 nM *hAPE1* that cleaves 5' to the AP site, 3.5 nM *EndoIII* that incises 3' to the AP site, or increasing concentrations of *BsuLigD* (0, 29, 57 and 114 nM) for 1 h at 30°C, as described in Materials and Methods. After incubation samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated. (B) Analysis of the capacity of *BsuLigD* to incise an internal tetrahydrofuran (H). The 3' [$\alpha^{32}\text{P}$]3'-dAMP labeled oligonucleotide containing the lyase-resistant analogue tetrahydrofuran (H) was incubated in the presence of either *hAPE1*, *EndoIII* or increasing concentrations of *BsuLigD* as described above. Position corresponding to the products 16-mer 5'-dRP and 16-mer 5'-P is indicated. The figure is a composite image made from different parts of the same experiment.

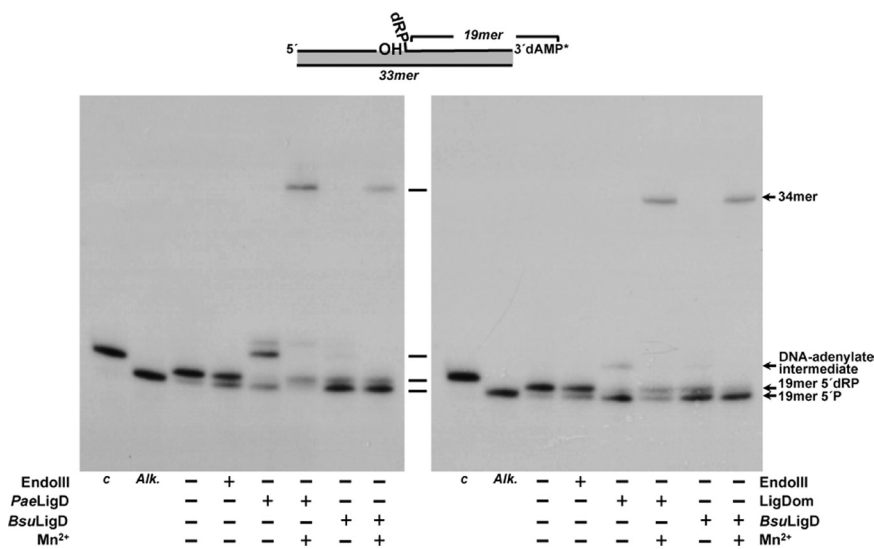


Figure 5. Left: *PaeLigD* is endowed with a 5'-dRP lyase activity. The assay was performed as indicated in Materials and Methods in the presence of either 3.5 nM of *EndoIII* or 60 nM of the indicated *LigD* in the absence (-) or presence (+) of 0.64 mM MnCl_2 . After incubation during 30 min at 30°C samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated. *Aik*, alkaline hydrolysis of the 5'-dRP moiety. Right: the 5'-dRP lyase activity of *BsuLigD* resides in the ligase domain. The assay was performed as in left panel in the presence of 216 nM *LigDom*. After incubation during 30 min at 30°C samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated. The figure is a composite image made from different parts of the same experiment.

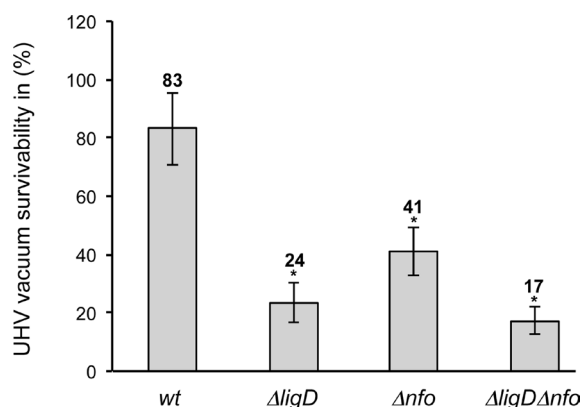


Figure 6. Survival of *B. subtilis* spores deficient in *BsuLigD* and/or *Nfo* AP endonuclease. The assay was performed as described in Materials and Methods. The CFUs of UHV-treated spores were divided with the average CFU-value of untreated spore samples in order to obtain the survival after UHV. The data presented are expressed as average values \pm SD, $N = 3$. Asterisks indicate UHV survival values that were significantly different (P -values ≤ 0.05) from values for wild-type (wt) spores.

tation on the repair efficiency of the UHV induced lesions (see Supplementary Figure S6). Altogether, the results support the presence of a spore specific BER pathway to repair abasic lesions during spore germination, in which *BsuLigD* plays a pivotal role.

DISCUSSION

B. subtilis spores are continuously exposed to environmental conditions that cause the accumulation of potentially lethal and mutagenic DNA lesions such as the spore photoproduct, strand breaks, cyclobutane pyrimidine dimers, altered bases and AP sites (57). In addition, AP sites can be also generated during spore germination and outgrowth either after removal of a damaged base by a specific glycosylase (58) or after spontaneous breakage of the *N*-glycosidic bond under physiological conditions (59). Therefore, the spore should be provided with the machinery required to recognize and repair those lesions during germination and outgrowth to prevent mutagenesis as well as potential stalling of the replication and transcriptional machineries that could lead to chromosome breakage (52). In this sense, *B. subtilis* gene *nfo*, which encodes for AP endonuclease IV (*Nfo*), is expressed under the control of the σ^G transcription factor late in sporulation (43) and the protein is present in mature spores. In addition, the levels of β -galactosidase from an *exoA-lacZ* translational fusion showed that expression of *exoA* which codes for AP endonuclease *ExoA* also takes place during sporulation (43), although in this case it remains to be determined whether the protein is present in the dormant spore. The absence of *ExoA* and/or *Nfo* in deletion mutant strains of *B. subtilis* sensitized the spores to treatments that damage spore DNA through generation of AP sites and strand breaks, suggesting that BER should be active to repair the lesions during spore germination and outgrowth that have accumulated during spore dormancy (43–45). The action of these AP endonucleases on AP sites

renders a gap flanked by 3'-OH and a 5'-dRP ends. Accomplishment of AP site repair would require a polymerization step to close the gap, a 5'-dRPase to render a ligatable 5'-P and a ligase activity to seal the final nick. *B. subtilis ykoU* gene codes for *BsuLigD* and forms part of a regulon under the control of both, the RNA-polymerase sigma factor σ^G and the DNA-binding protein *SpoVT*, and whose expression is turned on in the forespore (16). We have shown here that *BsuLigD* could potentially participate in BER since the enzyme (i) efficiently fills a single nucleotide gap on preincised AP-DNA, (ii) removes the 5'-dRP group by an intrinsic lyase activity rendering a nick with ligatable 3'-OH and 5'-P ends, (iii) seals the break and (iv) seems to participate together with the *B. subtilis* spore AP endonuclease *Nfo* in the repair of DNA lesions induced by UHV desiccation. The ability of *BsuLigD* to fill the gap prior to dRP-release, as well as its failure to seal 3'-OH and 5'-dRP ends would guarantee the repair of the lesion without loss of sequence information. The absence in our reconstitution assays of accessory factors indicates that the polymerization, dRP lyase and ligation functions of *BsuLigD* could be necessary and sufficient for 'short patch' BER of AP sites during spore germination and outgrowth together with the *B. subtilis* AP endonucleases *Nfo* and/or *ExoA*. Therefore, although *a priori* the bacterial *BsuLigD* complex had been exclusively involved in the repair of DSBs through the NHEJ pathway, the results presented here are suggestive of a potential participation of this protein in bacterial BER as well, a hypothesis that could be extended to the rest of bacteria in the light of the results obtained with the *LigD* from *P. aeruginosa*, and maybe to the recently reported archaeal NHEJ DNA *Lig* (60). Altogether, our observations suggest that the role of the ATP-dependent ligase domain is not restricted to the final strand closure, paving the way to future works aimed to decipher the *in vivo* and *in vitro* interplay with other DNA repair proteins of the BER pathway. Interestingly, recent results have implied a Ku-independent role of *Pseudomonas putida* *LigD* in stationary-phase mutagenesis that led authors to surmise the involvement of *LigD* in other DNA metabolism-related processes that use translesion synthesis and/or gap-filling on damaged DNA (61). A dual role of NHEJ protein factors has been also documented in eukaryotes where polymerases responsible for NHEJ contribute to a short-patch BER that repairs damage-associated chromosome breaks (62). Recently it has been shown how deletion of the mice *Ku70* or *Ku80* results in different sensitivities of cells to genotoxicants that provoke DNA lesions as alkylated and oxidized bases and single-strand breaks that are repaired by the BER pathway (63,64).

We have shown that the active site responsible for the AP lyase activity resides in the N-terminal ligase domain. The presence of a 5'-dRP lyase activity was previously described in the ATP-dependent DNA ligases from bacteriophages T4 and T7 (54) as well as from the human mitochondria (55). Evolutionary studies suggest that all ATP-dependent DNA ligases descend from a common ancestor and show six conserved sequence motifs (I, III, IIIa, IV, V-VI) that define a family of related nucleotidyltransferases [reviewed in (65)]. The occurrence of a 5'-dRP lyase activity in the ATP-dependent ligase domain of bacterial *LigD* led us to venture

the presence of an AP lyase activity as a general feature of at least the ATP-dependent DNA ligases.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to J.C. Alonso for critical reading of the manuscript, to J.M. Lázaro for his outstanding technical assistance during protein purification, to A. Schroeder for her excellent skillful technical assistance during the sample preparation and analyses and to Aidan J. Doherty and Fabian M. Commichau for their generous donation of the strains.

FUNDING

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [BFU2014-53791-P to M.V.]; German Aerospace Center [DLR-FuE-Projekt ISS-Nutzung in der Biodiagnostik, Programm RF-FuW, Teilprogramm 475 to R.M.]; German Research Foundation [DFG Paketantrag (PlasmaDecon PAK 728) (MO 2023/2-1) to R.M.]; Fundación Ramón Areces (Institutional Grant to the Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'). A.O. is a holder of a Formación de Personal Investigador fellowship (BES-2012-053642) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. Funding for open access charge: Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [BFU2014-53791-P to M.V.].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Lieber, M.R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 181–211.
- Kuzminov, A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 751–813.
- Shuman, S. and Glickman, M.S. (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 852–861.
- Pitcher, R.S., Brissett, N.C. and Doherty, A.J. (2007) Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu. Rev. Microbiol.*, **61**, 259–282.
- Aravind, L. and Koonin, E.V. (2001) Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res.*, **11**, 1365–1374.
- Doherty, A.J., Jackson, S.P. and Weller, G.R. (2001) Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS Lett.*, **500**, 186–188.
- Brissett, N.C., Pitcher, R.S., Juarez, R., Picher, A.J., Green, A.J., Dafforn, T.R., Fox, G.C., Blanco, L. and Doherty, A.J. (2007) Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science*, **318**, 456–459.
- Gong, C., Bongiorno, P., Martins, A., Stephanou, N.C., Zhu, H., Shuman, S. and Glickman, M.S. (2005) Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 304–312.
- Gong, C., Martins, A., Bongiorno, P., Glickman, M. and Shuman, S. (2004) Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria. *J. Biol. Chem.*, **279**, 20594–20606.
- Weller, G.R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L.M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S.K., Day, J.P., Wilkinson, A., d'Adda di Fagnano, F. et al. (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, **297**, 1686–1689.
- Zhu, H. and Shuman, S. (2005) Novel 3'-ribonuclease and 3'-phosphatase activities of the bacterial non-homologous end-joining protein, DNA ligase D. *J. Biol. Chem.*, **280**, 25973–25981.
- Zhu, H. and Shuman, S. (2006) Substrate specificity and structure-function analysis of the 3'-phosphoesterase component of the bacterial NHEJ protein, DNA ligase D. *J. Biol. Chem.*, **281**, 13873–13881.
- Aniukwu, J., Glickman, M.S. and Shuman, S. (2008) The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ depend on the structure of the broken DNA ends. *Genes Dev.*, **22**, 512–527.
- Wright, D., DeBeaux, A., Shi, R., Doherty, A.J. and Harrison, L. (2010) Characterization of the roles of the catalytic domains of *Mycobacterium tuberculosis* ligase D in Ku-dependent error-prone DNA end joining. *Mutagenesis*, **25**, 473–481.
- Almeida, K.H. and Sobol, R.W. (2007) A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst.)*, **6**, 695–711.
- Wang, S.T., Setlow, B., Conlon, E.M., Lyon, J.L., Imamura, D., Sato, T., Setlow, P., Losick, R. and Eichenberger, P. (2006) The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, **358**, 16–37.
- Lenhart, J.S., Schroeder, J.W., Walsh, B.W. and Simmons, L.A. (2012) DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **76**, 530–564.
- Moeller, R., Stackebrandt, E., Reitz, G., Berger, T., Rettberg, P., Doherty, A.J., Horneck, G. and Nicholson, W.L. (2007) Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J. Bacteriol.*, **189**, 3306–3311.
- de Vega, M. (2013) The minimal *Bacillus subtilis* nonhomologous end joining repair machinery. *PLoS One*, **8**, e64232.
- Ory, A., Zafra, O. and de Vega, M. (2014) Efficient processing of abasic sites by bacterial nonhomologous end-joining Ku proteins. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 13082–13095.
- Roberts, S.A., Strande, N., Burkhalter, M.D., Strom, C., Havener, J.M., Hasty, P. and Ramsden, D.A. (2010) Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature*, **464**, 1214–1217.
- Strande, N., Roberts, S.A., Oh, S., Hendrickson, E.A. and Ramsden, D.A. (2012) Specificity of the dRP/AP lyase of Ku promotes nonhomologous end joining (NHEJ) fidelity at damaged ends. *J. Biol. Chem.*, **287**, 13686–13693.
- Strande, N.T., Carvajal-Garcia, J., Hallett, R.A., Waters, C.A., Roberts, S.A., Strom, C., Kuhlman, B. and Ramsden, D.A. (2014) Requirements for 5' dRP/AP lyase activity in Ku. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 11136–11143.
- Matsumoto, Y. and Kim, K. (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, **269**, 699–702.
- Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E.G., McDonald, J.P., Prasad, R., Wilson, S.H., Woodgate, R. and Kunkel, T.A. (2001) 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. *Science*, **291**, 2156–2159.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A. and Blanco, L. (2001) Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34659–34663.
- Prasad, R., Longley, M.J., Sharief, F.S., Hou, E.W., Copeland, W.C. and Wilson, S.H. (2009) Human DNA polymerase theta possesses 5'-dRP lyase activity and functions in single-nucleotide base excision repair in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1868–1877.
- Khodyreva, S. and Lavrik, O.I. (2011) New players in recognition of intact and cleaved AP sites: implication in DNA repair in mammalian cells. In: Chen, C.C. (ed). *InSelected Topics in DNA Repair*. InTech, pp. 305–330.
- Pinz, K.G. and Bogenhagen, D.F. (2000) Characterization of a catalytically slow AP lyase activity in DNA polymerase gamma and other family A DNA polymerases. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12509–12514.
- Snowden, A., Kow, Y.W. and Van Houten, B. (1990) Damage repertoire of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease complex includes abasic sites, base-damage analogues, and lesions containing adjacent 5' or 3' nicks. *Biochemistry*, **29**, 7251–7259.

31. Grin, I.R., Khodyreva, S.N., Nevinsky, G.A. and Zharkov, D.O. (2006) Deoxyribose phosphate lyase activity of mammalian endonuclease VIII-like proteins. *FEBS Lett.*, **580**, 4916–4922.
32. Summer, H., Li, O., Bao, Q., Zhan, L., Peter, S., Sathiyathanan, P., Henderson, D., Klonsch, T., Goodman, S.D. and Droge, P. (2009) HMG2 exhibits dRP/AP site cleavage activity and protects cancer cells from DNA-damage-induced cytotoxicity during chemotherapy. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4371–4384.
33. Khodyreva, S.N., Ilina, E.S., Kutuzov, M.M., Sukhanova, M.V. and Lavrik, O.I. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 interaction with apurinic/aprimidinic sites. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **431**, 69–72.
34. Kutuzov, M.M., Ilina, E.S., Sukhanova, M.V., Pyshnaya, I.A., Pyshnyi, D.V., Lavrik, O.I. and Khodyreva, S.N. (2011) Interaction of poly(ADP-ribose) polymerase 1 with apurinic/aprimidinic sites within clustered DNA damage. *Biochemistry (Mosc)*, **76**, 147–156.
35. Longley, M.J., Prasad, R., Srivastava, D.K., Wilson, S.H. and Copeland, W.C. (1998) Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12244–12248.
36. Prasad, R., Beard, W.A., Strauss, P.R. and Wilson, S.H. (1998) Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, **273**, 15263–15270.
37. Zhu, H. and Shuman, S. (2005) A primer-dependent polymerase function of *Pseudomonas aeruginosa* ATP-dependent DNA ligase (LigD). *J. Biol. Chem.*, **280**, 418–427.
38. Maciag, I.E., Viret, J.F. and Alonso, J.C. (1988) Replication and incompatibility properties of plasmid pUB110 in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 232–240.
39. Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J.P. (1965) Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 704–711.
40. Nicholson, W.L. and Setlow, P. (1990) In: Harwood, C.R. and Cutting, S.M. (eds). *Molecular Biological Methods for Bacillus*. J. Wiley & Sons, Chichester, pp. 391–450.
41. Vlasic, I., Mertens, R., Seco, E.M., Carrasco, B., Ayora, S., Reitz, G., Commichau, F.M., Alonso, J.C. and Moeller, R. (2014) *Bacillus subtilis* RecA and its accessory factors, RecF, RecO, RecR and RecX, are required for spore resistance to DNA double-strand break. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 2295–2307.
42. Horneck, G. (1993) Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: results from experiments in space. *Orig. Life Evol. Biosph.*, **23**, 37–52.
43. Salas-Pacheco, J.M., Setlow, B., Setlow, P. and Pedraza-Reyes, M. (2005) Role of the Nfo (YqfS) and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in protecting *Bacillus subtilis* spores from DNA damage. *J. Bacteriol.*, **187**, 7374–7381.
44. Salas-Pacheco, J.M., Urtiz-Estrada, N., Martínez-Cadena, G., Yasbin, R.E. and Pedraza-Reyes, M. (2003) YqfS from *Bacillus subtilis* is a spore protein and a new functional member of the type IV apurinic/aprimidinic endonuclease family. *J. Bacteriol.*, **185**, 5380–5390.
45. Urtiz-Estrada, N., Salas-Pacheco, J.M., Yasbin, R.E. and Pedraza-Reyes, M. (2003) Forespore-specific expression of *Bacillus subtilis* yqfS, which encodes type IV apurinic/aprimidinic endonuclease, a component of the base excision repair pathway. *J. Bacteriol.*, **185**, 340–348.
46. Zhu, H., Nandakumar, J., Aniuoku, J., Wang, L.K., Glickman, M.S., Lima, C.D. and Shuman, S. (2006) Atomic structure and nonhomologous end-joining function of the polymerase component of bacterial DNA ligase D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 1711–1716.
47. Shuman, S. (2009) DNA ligases: progress and prospects. *J. Biol. Chem.*, **284**, 17365–17369.
48. Zhu, H. and Shuman, S. (2008) Bacterial nonhomologous end joining ligases preferentially seal breaks with a 3'-OH monoribonucleotide. *J. Biol. Chem.*, **283**, 8331–8339.
49. Bailly, V. and Verly, W.G. (1988) Possible roles of beta-elimination and delta-elimination reactions in the repair of DNA containing AP (apurinic/aprimidinic) sites in mammalian cells. *Biochem. J.*, **253**, 553–559.
50. Lindahl, T. and Andersson, A. (1972) Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **11**, 3618–3623.
51. Piersen, C.E., McCullough, A.K. and Lloyd, R.S. (2000) AP lyases and dRPases: commonality of mechanism. *Mutat. Res.*, **459**, 43–53.
52. Krwawicz, J., Arczewska, K.D., Speina, E., Maciejewska, A. and Grzesiuk, E. (2007) Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim. Pol.*, **54**, 413–434.
53. Zhu, H. and Shuman, S. (2007) Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* DNA ligases C and D. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3631–3645.
54. Bogenhagen, D.F. and Pinz, K.G. (1998) The action of DNA ligase at abasic sites in DNA. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7888–7893.
55. Pinz, K.G. and Bogenhagen, D.F. (1998) Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 1257–1265.
56. Akey, D., Martins, A., Aniuoku, J., Glickman, M.S., Shuman, S. and Berger, J.M. (2006) Crystal structure and nonhomologous end-joining function of the ligase component of *Mycobacterium* DNA ligase D. *J. Biol. Chem.*, **281**, 13412–13423.
57. Setlow, B. and Setlow, P. (1995) Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2787–2790.
58. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709–715.
59. Dalhus, B., Laerdahl, J.K., Backe, P.H. and Bjoras, M. (2009) DNA base repair—recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **33**, 1044–1078.
60. Bartlett, E.J., Brissett, N.C. and Doherty, A.J. (2013) Ribonucleolytic resection is required for repair of strand displaced nonhomologous end-joining intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, E1984–E1991.
61. Paris, U., Mikkil, K., Tavita, K., Saumaa, S., Teras, R. and Kivisaar, M. (2015) NHEJ enzymes LigD and Ku participate in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair (Amst.)*, **31**, 11–18.
62. Ramsden, D.A. (2011) Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 2509–2519.
63. Choi, Y.J., Li, H., Son, M.Y., Wang, X.H., Fornsglio, J.L., Sobol, R.W., Lee, M., Vijg, J., Imholz, S., Dolle, M.E. et al. (2014) Deletion of individual Ku subunits in mice causes an NHEJ-independent phenotype potentially by altering apurinic/aprimidinic site repair. *PLoS One*, **9**, e86358.
64. Li, H., Marple, T. and Hasty, P. (2013) Ku80-deleted cells are defective at base excision repair. *Mutat. Res.*, **745–746**, 16–25.
65. Martin, I.V. and MacNeill, S.A. (2002) ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol.*, **3**, reviews3005.

Supplementary Information

Identification of a Conserved 5'-dRP Lyase Activity in Bacterial DNA Repair Ligase D and Its Potential Role in Base Excision Repair

Ana de Ory¹, Katja Nagler², Begoña Carrasco³, Marina Raguse², Olga Zafra¹, Ralf Moeller^{2,*} and Miguel de Vega^{1,*}

¹Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid), Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain.

²Radiation Biology Department, German Aerospace Center (DLR), Institute of Aerospace Medicine, Linder Hoehe, D-51147 Cologne, Germany.

³Centro Nacional de Biotecnología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Darwin 3, 28049 Madrid, Spain.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 911964717; Fax: +34 911964420; Email: mdevega@cbm.csic.es. Correspondence may also be addressed to Tel: +49 2203 601 3145; Fax: +49 2203 61790; E-mail: ralf.moeller@dlr.de

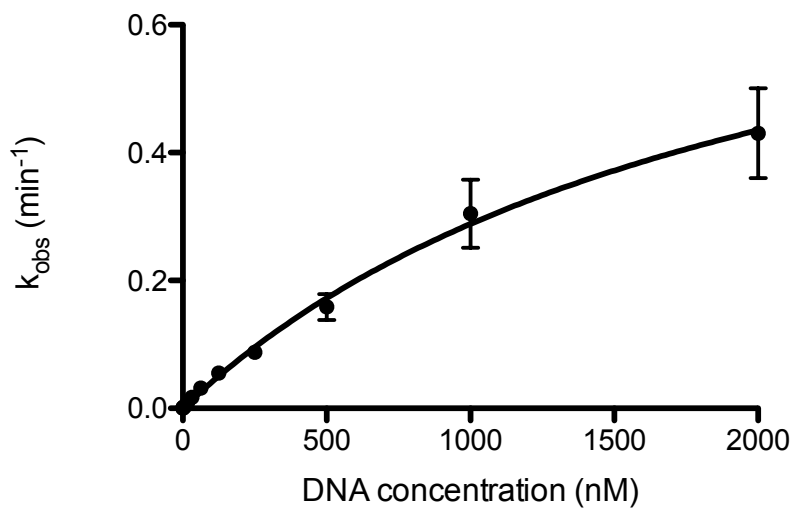
Table S1. Bacterial strains used in this study

Strain	Gene/mechanism	Genotype	Source/reference
168	wt	<i>trpC2</i>	Laboratory strain
BFS184	LigD [NHEJ]	+ <i>ykoU:erm^a</i>	(1)
GP1502	Nfo [EndoIV]	+ Δ <i>nfo:cat^b</i>	(2)
GP1502L	LigD Nfo	+ <i>ykoU:erm</i> Δ <i>nfo:cat^c</i>	GP1502 DNA transform BFS1845
BG214	wt	<i>trpCE metA5 amyE1 ytsJ1 rsbV37 xre1 xkdA1 att^{SPB} att^{ICEBs1}</i>	Laboratory strain
BC1000	wt	+ <i>neo^d</i>	This work
BC1001	LigDE184A	+ <i>ykoUE184A neo^d</i>	This work
BC1002	Nfo	+ Δ <i>nfo:cat^b neo^d</i>	This work
BC1003	LigDE184A Nfo	+ <i>ykoUE184A neo^d Δnfo:cat^b</i>	This work

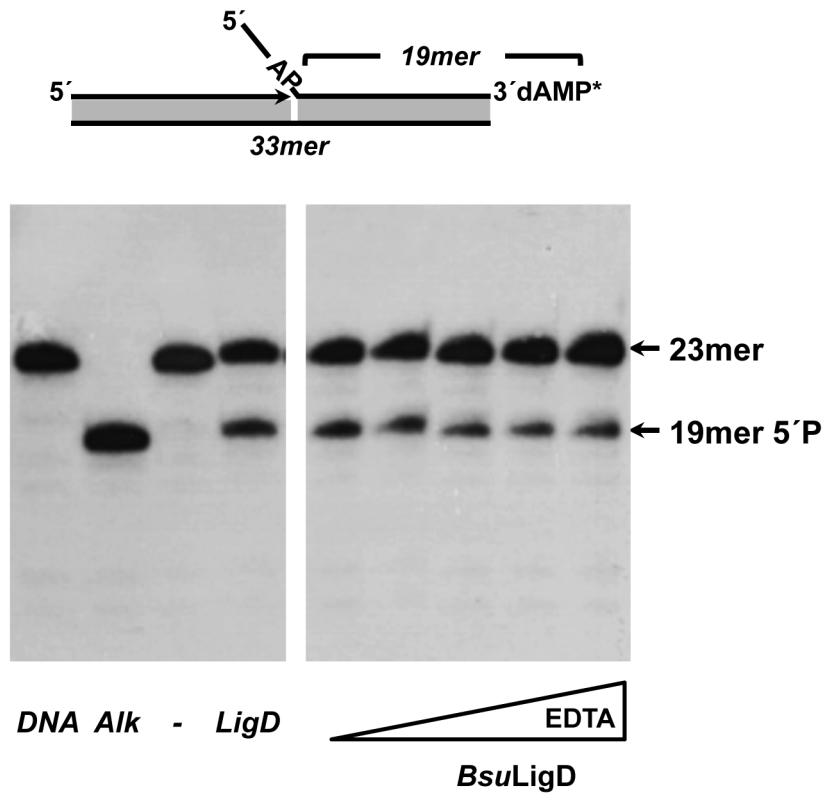
^aResistance to erythromycin (Erm^R, 2 µg/ml), ^bResistant to chloramphenicol (Cam^R, 5 µg/ml), ^cErm^R (2 µg/ml) and Cam^R (5 µg/ml), ^dResistant to neomycin^R (Neo^R, 5 µg/ml).

References

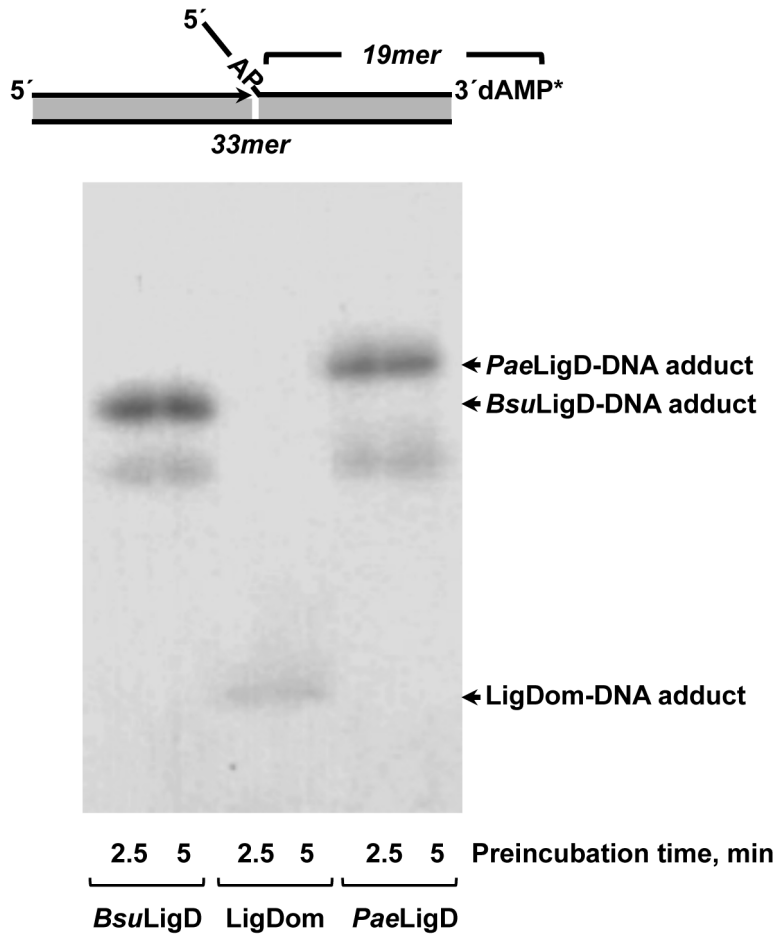
1. Weller GR, Kysela B, Roy R, Tonkin LM, Scanlan E, *et al.* (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* **297**(5587):1686-1689.
2. Gunka K, Tholen S, Gerwig J, Herzberg C, Stulke J, *et al.* (2012) A high-frequency mutation in *Bacillus subtilis*: requirements for the decryptification of the *gudB* glutamate dehydrogenase gene. *J Bacteriol* **194**(5):1036-1044.



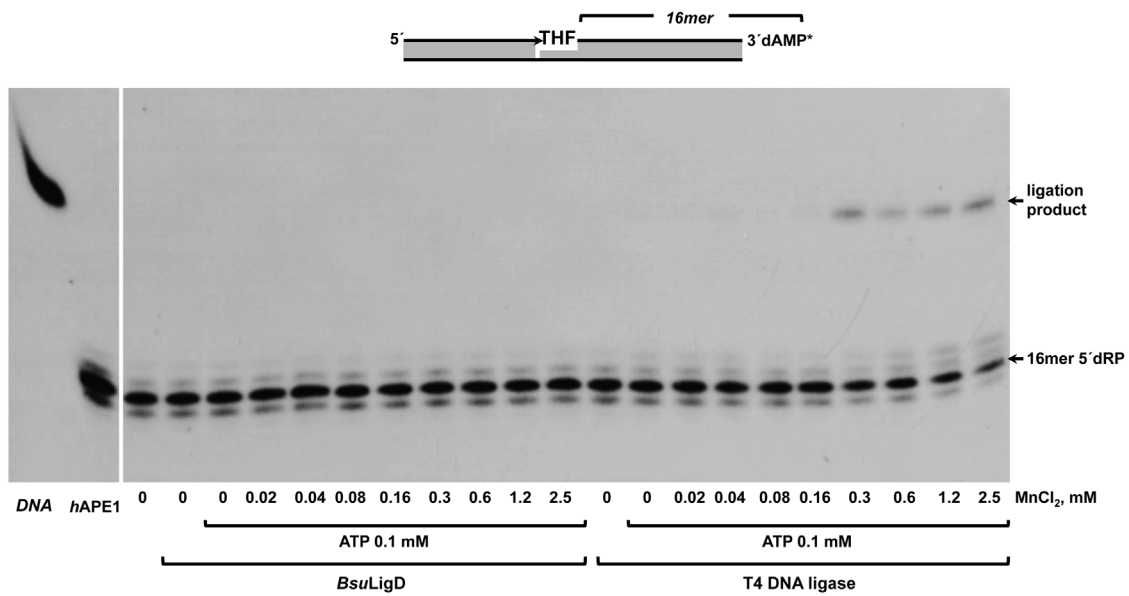
Supplementary Figure S1. Steady-state kinetic analysis of the 5'-dRP lyase activity of *BsuLigD*. The release of dRP from a 3' labeled 5'-dRP-containing DNA substrate was examined as a function of the indicated substrate concentration as described in Materials and Methods. Reactions contained 50 nM *BsuLigD* and were incubated at 30 °C for 20 min. Apparent activities were fitted to the Michaelis equation by least-squares nonlinear regression. The values plotted are the mean of three independent experiments.



Supplementary Figure S2. *BsuLigD* AP-lyase activity in the presence of EDTA. 0.83 nM of the [³²P]3'-labeled uracil-containing hybrid E depicted on top of the figure was treated with *E. coli* UDG, leaving an intact AP site (*DNA*). 57 nM *BsuLigD* was preincubated with increasing concentrations of EDTA (0, 12.5, 25, 50 and 100 mM). After overnight incubation at 4°C, both the EDTA-treated *BsuLigD* and 57 nM of fresh protein were incubated with the DNA substrate during 30 min or 30°C, as described in Materials and Methods. After incubation samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated. *Alk*, alkaline hydrolysis of the AP site.

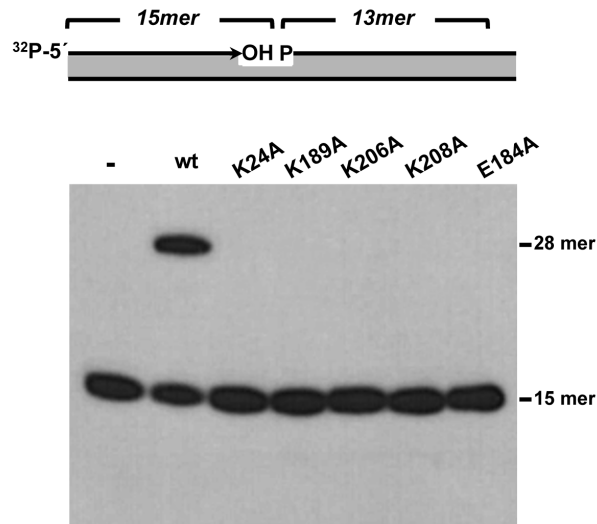


Supplementary Figure S3. Formation of protein-DNA adducts. The assay was performed as described in Materials and Methods by incubating 4 nM of the [32 P]3'-labeled uracil-containing oligonucleotide (depicted on top of the figure) pretreated with *E. coli* UDG to leave an intact AP site and further incubated with the indicated protein (100 nM *BsuLigD* or *PaeLigD*, 147 nM *LigDom*) for the indicated times in the presence of 0.64 mM MnCl_2 . After incubation samples were reduced by adding 100 mM NaBH_4 and further subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The mobility of the different protein-DNA adducts is indicated.

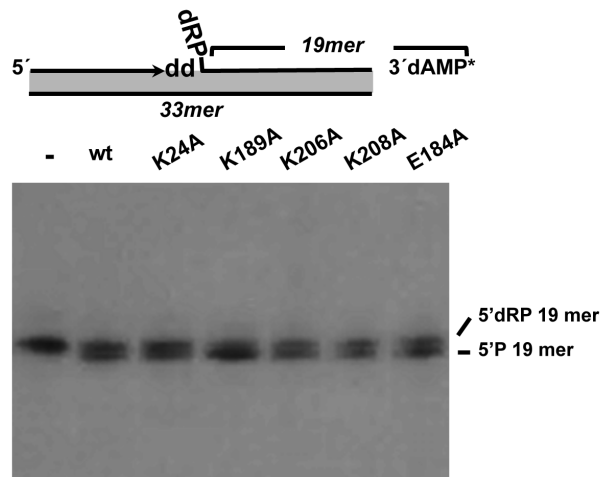


Supplementary Figure S4. *BsuLigD* does not seal 3'-OH and 5'-dRP ends. A 3'-end labeled (*) oligonucleotide containing a single synthetic AP (THF) site (lane *DNA*) was treated with *hAPE1* to insert a nick at the 5' side of the molecule (lane *hAPE1*). The assay was performed as described in Materials and Methods. Briefly, 0.53 nM of the nicked substrate was incubated with either 57 nM *BsuLigD* or 40 U of T4 DNA ligase with the indicated $MnCl_2$ concentrations and in the absence or presence of 0.1 mM ATP. After incubation for 30 min at 30°C, samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. Position of products is indicated.

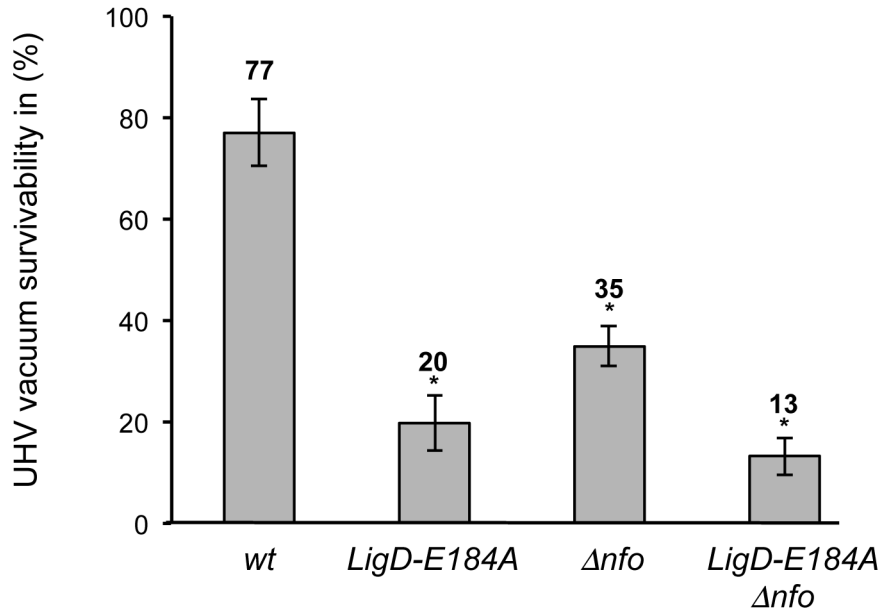
A Ligation activity



B 5' dRP lyase activity



Supplementary Figure S5. Analysis of dRP lyase and ligase activity of *BsuLigD* mutants K24A, K189A, K206A, K208A and E184A. (A) Ligase activity. The assay was performed by incubating 23 nM of the indicated protein with 1.2 nM of the nicked DNA hybrid F (depicted in top of the panel) in the presence of 5 μM MnCl_2 . After incubation for 30 min at 30°C, samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography. (B) dRP lyase activity. The assay was performed as described in Materials and Methods. Briefly, 50 nM of the DNA hybrid B was preincubated with *E. coli* UDG as described above, to render a 5'-dRP end (see scheme of the substrate on top of the panel). Reactions were initiated by adding 28 nM of the indicated protein in the presence of 0.64 mM MnCl_2 . After incubation for 20 min at 30 °C, reactions were stopped by addition of freshly prepared NaBH_4 . Samples were analyzed by 8 M urea-20% PAGE and autoradiography.



Supplementary Figure S6. Survival of *B. subtilis* spores expressing the *BsuLigD* ligase deficient mutant E184A and/or *Nfo* AP endonuclease. The assay was performed as described in Materials and Methods. The CFUs of UHV-treated spores were divided with the average CFU-value of untreated spore samples in order to obtain the survival after UHV. The data presented are expressed as average values \pm SD, $N=4$. Asterisks indicate UHV survival values that were significantly different (P -values ≤ 0.05) from values for wild-type (wt) spores.

