

ÍNDICE

Abreviaturas.....	3
Glosario de términos no españoles incluidos en esta Tesis.....	5
Summary.....	6

INTRODUCCIÓN

1. Replicación del DNA.....	9
2. DNA polimerasas	11
2.1. Clasificación de las DNA polimerasas	11
2.2. Estructura general de las DNA polimerasas	16
2.3. Mecanismo de polimerización.....	18
2.4. Fidelidad de síntesis.....	20
3. Mecanismo de replicación primado por proteína terminal.....	24
3. 1. Replicación del DNA del bacteriófago Φ 29.....	24
3.2. DNA polimerasa del bacteriófago Φ 29	26
3.3. Estructura de la DNA polimerasa de Φ 29	27
3.4. Estructura del heterodímero formado por la DNA polimerasa y la proteína terminal de Φ 29	30
OBJETIVOS	33

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Nucleótidos.....	35
2. Proteínas	35
3. Sustratos de DNA.....	35

MÉTODOS

1. Mutagénesis dirigida y expresión de las DNA polimerasas mutantes de Φ 29.....	36
2. Construcción, expresión y purificación de las distintas variantes de las TPs de Φ 29 y GA-1	36
3. Balance de las actividades de polimerización y exonucleolisis 3'-5'	38
4. Medida de la afinidad por nucleótido de las DNA polimerasas mutantes.....	39
5. Ensayos de la actividad exonucleasa 3'-5'	39
6. Ensayo de interacción DNA polimerasa-sustrato de DNA	40

7. Ensayo de la fidelidad <i>in vitro</i>	40
8. Ensayo de síntesis procesiva acoplada al desplazamiento de banda (replicación de DNA de M13).....	41
9. Ensayo de iniciación de la replicación (formación del complejo TP-dAMP).....	41
10. Ensayo de replicación del TP-DNA de Φ 29.....	42
11. Ensayo de amplificación del TP-DNA de Φ 29	43
12. Ensayo de interferencia	43
13. Modelado estructural de proteínas.....	44

RESULTADOS

Capítulo I

Estabilización del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo exonucleasa 3'-5' de la DNA polimerasa de Φ 29.....	45
--	----

Capítulo II

Papel del subdominio <i>thumb</i> de la DNA polimerasa de Φ 29 en la coordinación de las actividades de síntesis y degradación durante la replicación.....	57
---	----

Capítulo III

El centro activo de polimerización de la DNA polimerasa de Φ 29. Identificación de dos posibles nuevos ligandos de metal.....	65
--	----

Capítulo IV

Implicación de los diferentes subdominios de la TP de Φ 29 en la interacción y reconocimiento específico de la DNA polimerasa.....	79
---	----

DISCUSIÓN

1. Coordinación de las actividades de polimerización y exonucleolisis.....	91
2. Papel de los residuos Val250 y Glu486 de la DNA polimerasa de Φ 29 como ligandos de iones metálicos en el centro activo de polimerización	99
3. Implicación de los subdominios de la TP del bacteriófago Φ 29 en conferir especificidad durante la iniciación de la replicación primada por proteína terminal ...	104

CONCLUSIONES	111
--------------------	-----

Bibliografía.....	113
-------------------	-----

Abreviaturas

ATP: adenosina-5'-trifosfato.

BSA: seroalbúmina bovina.

cm: centímetro

C-terminal: carboxilo terminal.

DBP: proteína de unión a DNA de cadena doble.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

dAMP: 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato

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

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

dNMP: 2'-desoxirribonucleósido-5'-monofosfato

dNTP: 2'-desoxirribonucleósido-5'-trifosfato

dsDNA: DNA de doble cadena

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetrácetico.

h: hora.

kDa: kilodalton

mer: número de nucleótidos de un oligomero.

min: minuto.

nt: nucleótido.

N-terminal: amino terminal.

p: peso.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.

pb: par de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PPi: pirofosfato inorgánico

RNA: ácido ribonucleico.

RT: transcriptasa reversa

s: segundo.

SDS: dodecil sulfato sódico.

SSB: proteína de unión a DNA de cadena sencilla.

ssDNA: DNA de cadena sencilla

TP: proteína terminal.

TP-dAMP: complejo de iniciación formado por la TP y el nucleótido iniciador dAMP
TP-DNA de $\Phi 29$: DNA del bacteriófago $\Phi 29$ con una molécula de proteína terminal unida covalentemente a cada uno de sus extremos 5'.

Tris: trihidroximetil aminometano.

V: voltio

v: volumen.

wt: *wild-type* (tipo salvaje)

Glosario de términos no españoles incluidos en esta Tesis

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

β-hairpin: motivo estructural compuesto por lámina β-giro-lámina β.

Clamp-loader: complejo proteico encargado de ensamblar el factor de procesividad en extremos 3' recesivos del DNA usando la energía derivada de la hidrólisis del ATP.

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

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

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

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

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

Sliding-back: término empleado para describir el mecanismo mediante el cual se produce una translocación en sentido opuesto del complejo TP-dAMP tras la reacción de iniciación que utiliza la segunda base de la cadena molde por parte de la DNA polimerasa de Φ29.

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

Wild-type: tipo salvaje, sin modificaciones genéticas. Término empleado para referirse a la DNA polimerasa de Φ29, utilizada como control en los estudios de mutagénesis.

Summary

Bacteriophage $\Phi 29$ encodes a protein-primed DNA polymerase belonging to the eukaryotic-type family of DNA polymerases, being the only enzyme responsible for the viral genome replication. It initiates DNA replication using a terminal protein (TP) as a primer, catalyzing the addition of the first dAMP onto the hydroxyl group of Ser232 of the TP. The same DNA polymerase accomplishes the elongation in a processive manner, coupling polymerization to strand displacement without the need of helicase-like proteins and processivity factors. Additionally, it also contains a proofreading 3'-5' exonuclease activity, whose active site is spatially separated from the polymerization one. As a consequence, a very precise functional coupling of such activities is needed to perform an effective and accurate DNA replication.

In this work, we have studied the functional role of several residues that appear to be making interactions with ssDNA at the exonuclease active site: Pro129, belonging to the (S/T)LX₂h motif; Tyr148 from the KX₂h motif and Leu567 from the *thumb* subdomain. We found that Tyr148 and Leu567 play a role in the stabilization and correct positioning of the 3' terminus of the primer strand at the catalytic active site and, as a consequence, in DNA replication fidelity.

Crystallographic resolution of $\Phi 29$ DNA polymerase ternary complex shows that Val250 participates in the coordination of the catalytic metals. This residue, together with Asn251 (both belonging to the DX₂SLYP motif) are conserved in protein-primed DNA polymerases. We also identified residue Glu486 of $\Phi 29$ DNA polymerase, conserved in family B DNA polymerases, as the homolog counterpart of the RB69 DNA polymerase Glu686, proposed to be a metal ion ligand during polymerization. We have studied the role of these residues in the interaction with the incoming nucleotide and in the metal requirements of the DNA polymerase. Residues Val250 and Glu486 appeared to be involved in the indirect binding of the incoming dNTP at the polymerization active site, by coordinating catalytic metal B in the case of Val250 and a non-catalytic metal C in the case of Glu486.

Also, we have studied the role of putative DNA-ligand residues, placed in the *thumb* subdomain, in the stabilization of the DNA substrate at the polymerization and exonuclease active sites. Our results allow us to propose a central role of $\Phi 29$ DNA polymerase *thumb* subdomain in coordinating both polymerization and exonuclease activities.

On the other hand, recent crystallographic resolution of the Φ 29 DNA polymerase-TP heterodimer structure shows TP folded into three domains. By means of chimerical TPs, we have shown the TP intermediate domain as the one main responsible for the specific interaction with the DNA polymerase. Additionally, we propose that the interaction between DNA polymerase and TP N-terminal portion could promote DNA polymerase conformational changes to allow the TP priming domain to be properly bound at the polymerization active site.

La información genética de la mayoría de los organismos vivos se encuentra almacenada en forma de ácido desoxirribonucleico (DNA). La transmisión de dicha información es vital para la supervivencia de todas las especies conocidas y requiere la duplicación del DNA durante el proceso denominado replicación, así como el mantenimiento de la integridad del mismo mediante diferentes mecanismos de reparación. La replicación del DNA requiere la acción combinada de diversas enzimas, siendo las DNA polimerasas las encargadas de replicar el genoma de manera precisa. Debido al carácter esencial de su actividad, el mecanismo por el cual todas las DNA polimerasas cumplen su función ha de ser simple y universalmente conservado, pudiendo ser incluso una de las primeras actividades enzimáticas en aparecer en la evolución (revisado en Steitz, 1999).

1. Replicación del DNA

La replicación del DNA es un proceso complejo que implica la acción secuencial y coordinada de diversas proteínas que se organizan dando lugar a una estructura dinámica denominada replisoma (revisado en Baker y Bell, 1998; Johnson y O'Donnell, 2005; Pomerantz y O'Donnell, 2007) (Figura 1).

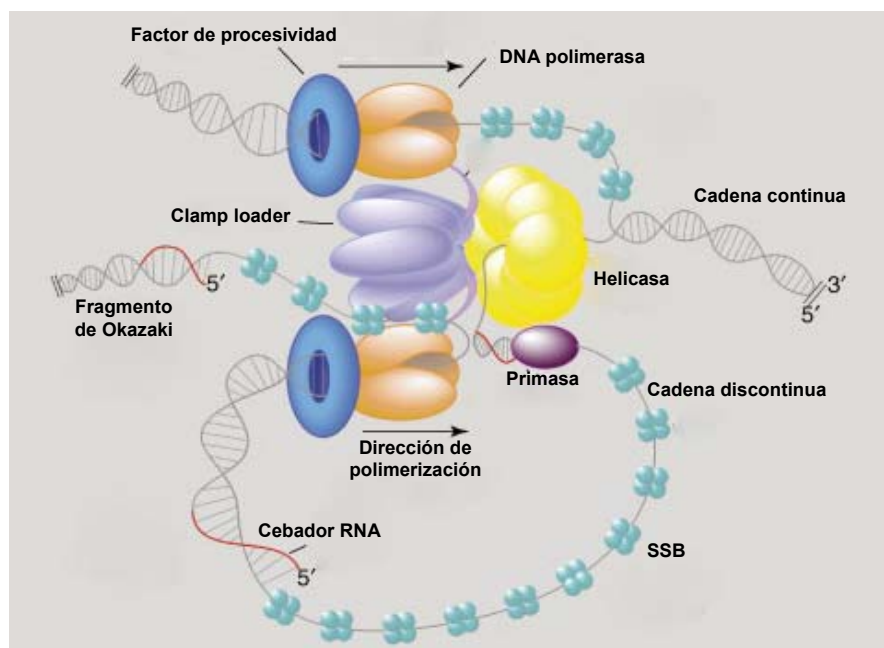


Figura 1. Modelo de replisoma bacteriano. La figura muestra un esquema del replisoma de *Escherichia coli* que es una estructura dinámica formada por diversas proteínas, cada una de ellas especializada en una función concreta de la replicación del DNA: DNA polimerasa, helicasa, primasa, proteína de unión a DNA de banda simple (SSB), factor de procesividad y *clamp loader* (Pomerantz y O'Donnell, 2007).

La replicación comienza con el reconocimiento de uno (en el caso de procariotas) o varios (en eucariotas) orígenes de replicación por parte de proteínas que se unen a secuencias específicas dentro de estos orígenes (Fuller et al., 1984; Matsui et al., 1985). Una vez unidas al DNA, cumplen dos funciones fundamentales para dar lugar al comienzo de la replicación: 1) facilitan la apertura de la doble cadena de DNA creando una distorsión en su estructura que provoca la desnaturalización en regiones adyacentes ricas en A-T, dando lugar a DNA de cadena sencilla (ssDNA), y 2) reclutar otra serie de proteínas necesarias para la replicación. De entre estas proteínas destacaríamos a las **helicosas**, proteínas generalmente multiméricas y con forma anular encargadas de desnaturalizar la doble hélice de DNA en un proceso dependiente de ATP, avanzando junto con la horquilla de replicación. El ssDNA generado es inmediatamente recubierto por las **SSBs**, cuya función es protegerlo de modificaciones químicas y de la acción de nucleasas, así como evitar la formación de estructuras secundarias que impidan el avance de la horquilla de replicación (Wold, 1997).

Las DNA polimerasas, al contrario que las RNA polimerasas, no son capaces de iniciar la síntesis del DNA *de novo* (Kornberg, 1988), por lo que necesitan un extremo 3'-OH que por lo general, tanto en procariotas como en eucariotas, es un iniciador de RNA de aproximadamente 12 nucleótidos sintetizado por una RNA polimerasa dependiente de DNA llamada **primasa** (revisado en Frick y Richardson, 2001).

Los **factores de procesividad** son proteínas que interaccionan con la DNA polimerasa estabilizando su unión al DNA y confiriendo, de este modo, una alta procesividad al proceso de replicación. Los diferentes factores de procesividad, tanto de eucariotas como de procariotas, no presentan homología de secuencia, pero en general tienen una estructura común en forma de anillo a través del cual pasa el DNA de doble cadena (dsDNA) (Kong et al., 1992). La cara interna, en contacto con el dsDNA, presenta cierto carácter electropositivo (al contrario que el resto de la proteína que es fuertemente electronegativa), mientras que la cara externa interacciona con múltiples proteínas implicadas en procesos de replicación y reparación del DNA (López de Saro y O'Donnell, 2001), comportándose como una plataforma móvil a lo largo del DNA. Estos factores son colocados preferentemente en extremos 3' recesivos por otras proteínas, **clamp loaders**, mediante un proceso dependiente de ATP (Bowman et al., 2005).

Las **DNA polimerasas replicativas** poseen una gran fidelidad de síntesis y son las encargadas de sintetizar el DNA en sentido 5'-3'. El carácter antiparalelo del DNA

implica que el replisoma sea una unidad funcionalmente asimétrica, en la cual una de las cadenas es sintetizada de forma continua, mientras que la otra es copiada de forma discontinua, en sentido opuesto al avance de la horquilla de replicación, mediante la síntesis de múltiples RNAs iniciadores sintetizados por la primasa que, una vez elongados por la DNA polimerasa, generan los fragmentos de Okazaki (1.000-2.000 pb), los cuales son unidos posteriormente por la acción de una **ligasa**.

2. DNA polimerasas

Las DNA polimerasas poseen una serie de características básicas comunes. Llevan a cabo una reacción química, dirigida normalmente por un molde, consistente en la adición secuencial de dNMPs, a partir de dNTPs, liberando PPi una vez que se ha incorporado el dNMP. Esta síntesis se produce en una única dirección y requiere la presencia de un extremo 3'-OH sobre el que actuar, el cual puede ser DNA o RNA. En algunos organismos cuyo genoma es un DNA lineal de doble cadena, el grupo -OH es donado por un residuo específico de serina, treonina o tirosina de una proteína, llamada proteína terminal (TP), que es utilizada por la DNA polimerasa para comenzar la síntesis del DNA desde ambos extremos del genoma, quedando dicha TP covalentemente unida a los dos extremos 5' (revisado en Salas, 1991).

Las DNA polimerasas participan en diversos procesos biológicos y han de ser capaces de llevar a cabo diferentes tipos de síntesis durante la replicación y la reparación del DNA; por ello, la célula ha desarrollado una gran variedad de DNA polimerasas con distintas propiedades, adaptadas y especializadas cada una de ellas para llevar a cabo funciones concretas relacionadas con el mantenimiento de la estabilidad del DNA (revisado en Bebenek y Kunkel, 2004).

2.1. Clasificación de las DNA polimerasas

En base a homología en su secuencia primaria (Delarue et al., 1990), a su sensibilidad a drogas o inhibidores y a su estructura cristalográfica (Joyce y Steitz, 1994), las DNA polimerasas han sido clasificadas en siete familias diferentes: A, B, C, D, X, Y y RT (revisado en Rothwell y Waksman, 2005):

Familia A

La familia A comprende DNA polimerasas replicativas y de reparación. También conocidas como DNA polimerasas de tipo I o procariotas, por su homología con la

DNA polimerasa I de *E. coli*. Algunos ejemplos de DNA polimerasas replicativas de esta familia son las polimerasas de los bacteriófagos T3, T5 y T7, las cuales interaccionan con otras proteínas para llevar a cabo la replicación del DNA.

A esta familia también pertenece la Pol γ , la única DNA polimerasa ubicada en las mitocondrias (Graziewicz et al., 2006), encargada de llevar a cabo tanto la replicación como la reparación del DNA mitocondrial. También se piensa que la replicación del DNA de cloroplastos es llevada a cabo por DNA polimerasas de esta familia (Heinhorst et al., 1990).

Dentro del grupo de DNA polimerasas de la familia A implicadas en mecanismos de reparación encontramos la DNA polimerasa I de *E. coli* (Pol I), la Pol I de *Thermus aquaticus* y la Pol I de *Bacillus stearothermophilus*.

Algunas de las DNA polimerasas de esta familia presentan una actividad exonucleasa 5'-3' implicada en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki y en procesos de reparación, así como una actividad exonucleasa 3'-5' que elimina, durante la síntesis del DNA, los nucleótidos incorporados erróneamente. La DNA polimerasa γ posee también actividad 5'-desoxirribosa fosfato-liasa (dRP-liasa), implicada en los procesos de reparación por escisión de bases (BER) en las mitocondrias (Bogenhagen et al., 2001; Longley et al., 1998).

Se han identificado dos nuevas DNA polimerasas pertenecientes a esta familia: Pol θ (Seki et al., 2003; Sharief et al., 1999) y Pol ν (Marini et al., 2003), probablemente implicadas en fenómenos de reparación y/o síntesis translesiva, aunque sus funciones concretas no se han identificado todavía.

Familia B

También conocidas como DNA polimerasas tipo II por su homología con la Pol II de *E. coli*. Este grupo está formado por DNA polimerasas de organismos procariontes y eucariotes incluyendo las DNA polimerasas replicativas de virus, arqueobacterias, bacteriófagos como RB69 (la primera DNA polimerasa de esta familia cuya estructura cristalográfica ha sido resuelta tanto en el caso de la apoenzima como del complejo ternario (Franklin et al., 2001; Wang et al., 1996)) y T4, así como DNA polimerasas codificadas por plásmidos mitocondriales de plantas y hongos. También pertenecen a este grupo las DNA polimerasas eucarióticas α , δ y ϵ (revisado en Hübscher et al., 2002), de ahí que a las DNA polimerasas de esta familia también se las conozca como de tipo eucariótico. Pol α posee además actividad primasa que le permite sintetizar

pequeños cebadores de RNA, que son extendidos por su propia actividad polimerasa para dar lugar a pequeños fragmentos de DNA (20-30 nucleótidos) que servirán de iniciadores para las otras dos DNA polimerasas implicadas en el proceso de replicación del DNA: Pol δ y Pol ϵ . Ambas polimerasas interaccionan con el antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA) mejorando, de esta manera, su unión al DNA y aumentando su procesividad (Kelman, 1997). Pol δ y Pol ϵ , además de poseer una elevada fidelidad de incorporación de nucleótidos que les permite llevar a cabo la replicación fiel del DNA nuclear, tienen en la misma cadena polipeptídica una actividad exonucleasa 3'-5' que puede llegar a ser hasta 1000 veces mayor que la descrita para las DNA polimerasas de la familia A, aumentando en más de dos órdenes de magnitud la fidelidad de la síntesis del DNA (Capson et al., 1992; Lin et al., 1994). En células eucarióticas, las DNA polimerasas replicativas de la familia B suelen formar complejos multiproteicos con diferentes subunidades que, a su vez, son ayudados por otras proteínas accesorias para ensamblar el replisoma y llevar a cabo la replicación del DNA.

A esta familia pertenece el subgrupo de DNA polimerasas mencionado anteriormente capaces de comenzar la síntesis del DNA a partir de un grupo hidroxilo perteneciente a un aminoácido de una proteína. Dentro de este subgrupo se encuentran las DNA polimerasas de diversos organismos como los bacteriófagos Φ 29, PRD1 y Cp-1, algunos virus eucariotas como adenovirus y hepadnavirus, cromosomas lineales de bacterias como *Streptomyces lividans* (revisado en Salas, 1991) y halovirus (Bamford et al., 2005).

También es miembro de esta familia Pol ξ implicada en síntesis translesiva (Nelson et al., 1996).

Familia C

Esta familia agrupa a las DNA polimerasas encargadas de replicar el cromosoma bacteriano (Kornberg, 1988). Presentan homología con la Pol III de *E. coli*. Como ocurre con otras DNA polimerasas replicativas, interaccionan también con una serie de proteínas accesorias formando grandes complejos multiproteicos. Esta familia incluye a la DNA polimerasa III de *E. coli*, cuya subunidad α , que contiene la actividad de polimerización, está asociada a la subunidad ϵ , responsable de la actividad exonucleasa 3'-5' (Scheuermann y Echols, 1984; revisado en Kelman y O'Donnell, 1995).

Familia D

Esta familia incluye DNA polimerasas de arqueas. La caracterización de la DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* ha demostrado que estas enzimas son heterodiméricas y que poseen actividad polimerasa y exonucleasa 3'-5', cualidades que sugieren su implicación en la replicación del genoma de estos organismos (Uemori et al., 1997).

Familia X

Esta familia se compone de una serie de miembros fundamentalmente implicados en fenómenos de reparación no asociados a la replicación. Son enzimas monoméricas y relativamente pequeñas que muestran un patrón de polimerización distributivo en DNAs con estructura molde/iniciador. A diferencia de las DNA polimerasas replicativas, carecen de actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores.

Miembros de esta familia son la DNA polimerasa β (Pol β) (Abbotts et al., 1988), la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Bollum, 1960), la polimerasa σ (Burgers et al., 2001), la polimerasa μ (Domínguez et al., 2000), la polimerasa λ (García-Díaz et al., 2000), la polimerasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* (Prasad et al., 1993) y la polimerasa X del Virus de la Peste Porcina Africana (Oliveros et al., 1997). Homólogos a estas proteínas han sido identificados en otros organismos como arqueas, protozoos, virus y bacterias (revisado en García-Díaz et al., 2005).

Las DNA polimerasas de esta familia presentan preferencia por sustratos de DNA con *gaps*, los cuales son capaces de rellenar de manera procesiva. Tienen una organización estructural que consiste en un dominio N-terminal de 8 kDa conectado a un dominio C-terminal (31 kDa) de polimerización mediante una región sensible a proteasas. El primero sólo está presente en las polimerasas de esta familia e interacciona con el grupo 5' fosfato *downstream* de un *gap*, permitiendo la óptima localización sobre este tipo de sustratos (Pelletier et al., 1994; Sawaya et al., 1997). En algunas DNA polimerasas, este dominio contiene además la actividad dRP-liasa capaz de eliminar el grupo 5'-dRP generado durante el mecanismo de BER.

Algunos miembros de esta familia tienen dominios adicionales como el dominio BRCT (BRCA1 C-terminal) que desempeña un papel en interacción proteína-proteína o proteína-DNA (Bork et al., 1997; Pelletier et al., 1994).

Familia Y

Las DNA polimerasas de esta familia son capaces de sintetizar DNA utilizando moldes que contienen diferentes tipos de lesiones que distorsionan la geometría de la doble hélice y que bloquean los procesos llevados a cabo por las DNA polimerasas replicativas. Por este motivo, también se las conoce como DNA polimerasas de síntesis translesiva. Las DNA polimerasas de la familia Y están presentes en bacterias, eucariotas y arqueas y sus características fundamentales son baja eficiencia catalítica y baja fidelidad de síntesis debido a la conformación de su centro activo, el cual es más abierto y accesible al solvente que el de otras DNA polimerasas, permitiéndoles acomodar lesiones. Como consecuencia, la fidelidad sobre un DNA no dañado es más reducida, pudiendo provocar mutaciones en secuencias adyacentes a la que contiene el daño. Por otra parte, carecen de actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores (Zhou et al., 2001). Son enzimas que funcionan de manera distributiva, siendo desplazadas por las DNA polimerasas replicativas una vez que la Pol Y ha llevado a cabo la síntesis translesiva, disminuyendo así su potencial mutagénico (McCulloch et al., 2004).

Los miembros de esta familia poseen un dominio flexible denominado *little finger* implicado en la interacción con el dúplex DNA. Dicha interacción enzima-DNA determina la fidelidad, la procesividad y el tipo de lesión sobre el que va a actuar cada DNA polimerasa de esta familia (Boudsocq et al., 2004; revisado en Yang, 2005).

Además, todos los miembros de la familia Y interaccionan y son estimulados por los factores de procesividad de la célula, siendo esta interacción fundamental para su función *in vivo* (Dionne et al., 2003; Haracska et al., 2001; Indiani et al., 2005).

En humanos se han descrito cuatro DNA polimerasas de esta familia: Pol η , Pol ι , Pol κ y REV1 (revisado en Prakash et al., 2005).

Familia de las Transcriptasas Reversas (RTs)

Esta familia incluye las RTs de los retrovirus y las telomerasas eucarióticas. Interaccionan con una gran variedad de sustratos (RNA/RNA, DNA/RNA, RNA/DNA, DNA/DNA) para convertir un RNA de cadena sencilla en un DNA de doble cadena (Gotte et al., 1999). Dentro de esta familia se han identificado polimerasas monoméricas como la del Virus de la Leucemia Murina de Moloney (MuLV) y diméricas como la del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV). Ambos tipos de RTs poseen un dominio polimerasa y un dominio RNasa H encargado de degradar el RNA viral durante la síntesis de DNA (Moelling et al., 1971).

2.2. Estructura general de las DNA polimerasas

Gracias a la resolución de las estructuras cristalográficas de varias DNA polimerasas pertenecientes a diferentes familias se sabe que sus actividades de síntesis y de degradación residen en dominios estructuralmente separados. A pesar de la baja homología entre ellas, el dominio de polimerización presenta una conformación que se asemeja a una mano derecha ligeramente abierta (excepto en las DNA polimerasas de la familia X en las que se asemeja a una mano izquierda), diferenciándose tres subdominios llamados: *palm*, *fingers* y *thumb* (siguiendo dicha analogía) (revisado en Joyce y Steitz, 1994; Joyce y Steitz, 1995) (ver Figura 2).

El subdominio *palm*, formado principalmente por láminas- β , es estructuralmente el más conservado, excepto en las DNA polimerasas de las familias C y X (Bailey et al., 2006; Beard y Wilson, 2000; Lamers et al., 2006). Contiene los residuos que coordinan los dos iones metálicos divalentes responsables de la catálisis de la actividad de polimerización, así como los residuos implicados en la unión del extremo 3' de la cadena iniciadora y del fosfato α del dNTP entrante (revisado en Joyce y Steitz, 1995).

Los subdominios *fingers* y *thumb* presentan una menor conservación estructural (Brautigam y Steitz, 1998), pero las mismas funciones en diferentes DNA polimerasas. El subdominio *fingers*, formado generalmente por hélices- α , contiene una serie de residuos básicos que interactúan electrostáticamente con los fosfatos del dNTP entrante correcto. La unión de éste al complejo DNA polimerasa-DNA promueve un cambio conformacional en el subdominio *fingers*, el cual rota hacia el *palm* completando la formación de un bolsillo hidrofóbico estructuralmente complementario a un par de bases naciente con geometría canónica Watson-Crick (Kunkel y Wilson, 1998; Patel et al., 2001b; Yin y Steitz, 2004). De hecho, varios residuos pertenecientes al subdominio *fingers* están implicados, junto con otros del *palm*, en la fidelidad de inserción (Nick McElhinny et al., 2007; Patel et al., 2001a; Pursell et al., 2007; Saturno et al., 1995; Shinkai y Loeb, 2001; Truniger et al., 2003; Yang et al., 1999). También interactúa con la cadena molde, reorientándola en el centro activo de polimerización de forma adecuada para el correcto apareamiento con la base del dNTP entrante (Jacobo-Molina et al., 1993; Kohlstaedt et al., 1992; Wang et al., 1997).

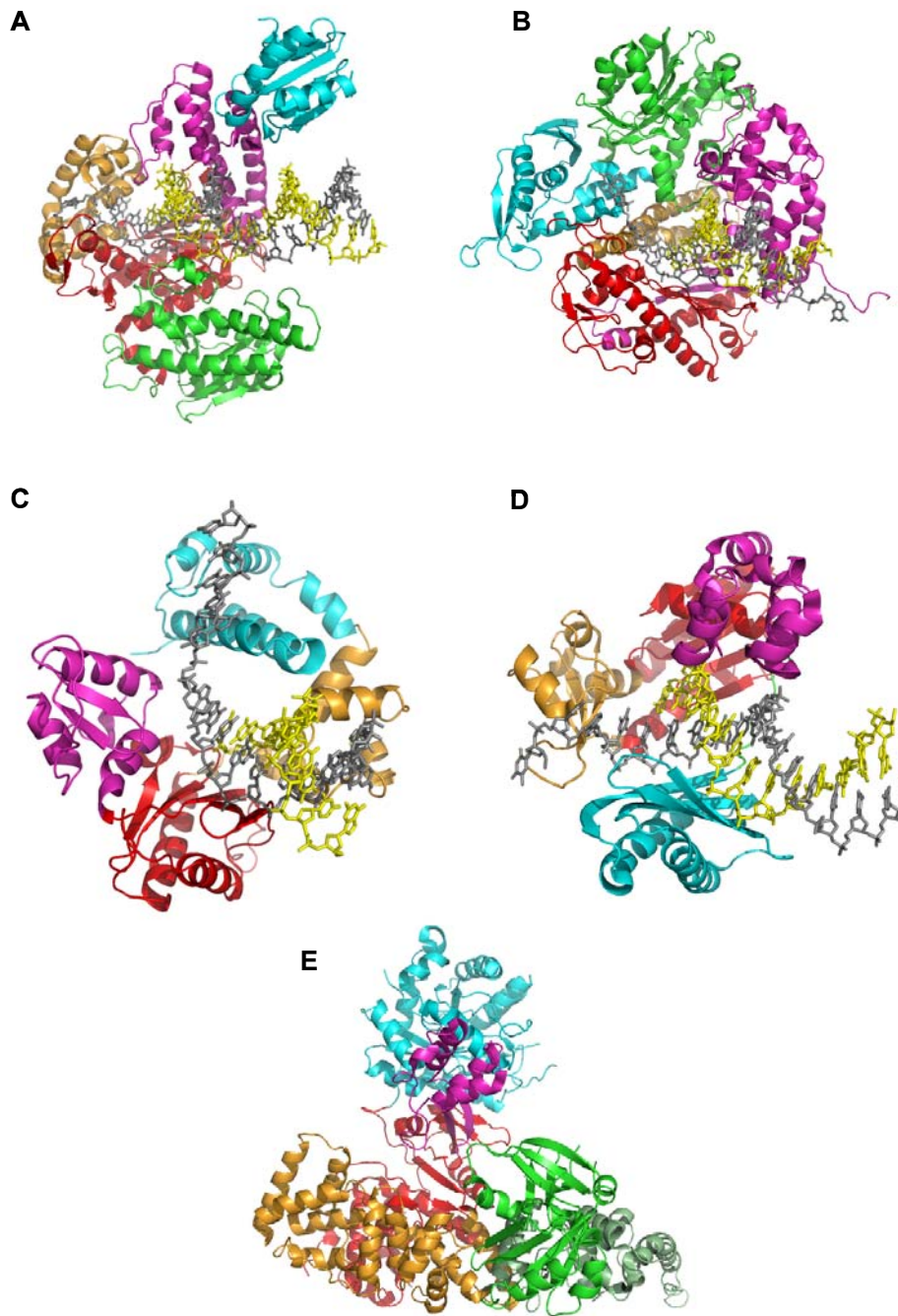


Figura 2. Representación de la estructura de DNA polimerasas pertenecientes a diferentes familias. (A) DNA polimerasa de T7 (familia A, PDB 1T7P). (B) DNA polimerasa de RB69 (familia B, PDB 1IG9). (C) DNA polimerasa β (familia X, PDB 1BPY), (D) DNA polimerasa Dpo4 (familia Y, PDB 1JX4) y (E) subunidad α de la DNA pol III de *E.coli* (familia C, PDB 2HQA). Las cadenas molde e iniciadora del DNA se muestran en gris y amarillo, respectivamente. Los subdominios *palm*, *fingers* y *thumb* se muestran en rojo, naranja y rosa, respectivamente, y el dominio de exonucleasa 3'-5' en verde. Asimismo se muestran otra serie de dominios o factores accesorios particulares de cada DNA polimerasa en color azul: tiorredoxina (factor de procesividad) en (A), dominio N-terminal en (B), dominio 8kDa en (C), dominio *little finger* en (D) y dominio PHP en (E). La figura se hizo utilizando el software Pymol (<http://www.pymol.org>).

El subdominio *thumb*, generalmente de carácter helicoidal, cambia su conformación al producirse la unión al DNA, rotando hasta casi abrazar a éste por completo a través de su surco menor y estableciendo múltiples contactos inespecíficos con el esqueleto azúcar-fosfato del DNA *upstream* (Doublie et al., 1998; Eom et al., 1996; Jacobo-Molina et al., 1993; Kiefer et al., 1998). Esta interacción aumenta la estabilidad de unión de la DNA polimerasa al DNA, así como la procesividad de la enzima (Doublie et al., 1998; Goodrich et al., 1997; Minnick et al., 1996; Patel et al., 1995; Truniger et al., 2004a). También es el responsable de la coordinación entre las actividades de síntesis y degradación en las DNA polimerasas con actividad exonucleasa 3'-5' (Franklin et al., 2001).

2.3. Mecanismo de polimerización

Las DNA polimerasas catalizan la incorporación secuencial de dNMPs sobre la cadena iniciadora del DNA dúplex, atendiendo a su complementariedad con la base que se encuentra en la cadena molde (Kornberg, 1988). A pesar de la diversidad encontrada entre las diferentes DNA polimerasas, se ha descrito un mecanismo de acción común a todas ellas catalizado por dos iones metálicos divalentes (revisado en Steitz et al., 1994).

El primer paso implica la asociación de la DNA polimerasa con el dúplex molde/iniciador durante la cual el subdominio *thumb* cambia su conformación rotando sobre el eje del DNA hasta que éste está casi rodeado por completo, reforzando la interacción DNA polimerasa/DNA (Doublie et al., 1998; Eom et al., 1996; Shamooy y Steitz, 1999; Steitz y Yin, 2004).

El siguiente paso es crucial en cualquier ciclo de polimerización dependiente de molde y consiste en la unión del dNTP correcto. Esta unión induce cambios conformacionales tanto en el DNA dúplex como en la DNA polimerasa, gracias a los cuales se ensambla el centro activo en la correcta geometría para que se lleve a cabo la catálisis.

La comparación entre estructuras cristalográficas del complejo binario DNA polimerasa-DNA y el ternario DNA polimerasa-DNA-dNTP demuestra que la unión del dNTP correcto en su sitio de inserción induce un cambio conformacional en el subdominio *fingers* que pasa de una forma abierta a otra cerrada (Doublie et al., 1998; Pelletier et al., 1994; Sawaya et al., 1994) (ver Figura 3). En esta conformación se establecen contactos entre las cadenas básicas de residuos de Lys y Arg del subdominio *fingers* y los fosfatos del dNTP, el cual está formando puentes de hidrógeno con la base

molde e interaccionando con los dos iones metálicos, unidos, a su vez, por dos Asp del subdominio *palm* (Sawaya et al., 1997). A su vez, este movimiento del subdominio *fingers* termina por definir un bolsillo formado por residuos de los subdominios *fingers*, *palm* y por el par de bases precedente, cuyas dimensiones sólo pueden alojar un par de bases correcto Watson-Crick. Este complejo es termodinámicamente más estable y presenta los residuos del centro activo alineados y preparados para la catálisis (revisado en Joyce y Benkovic, 2004; Showalter y Tsai, 2002).

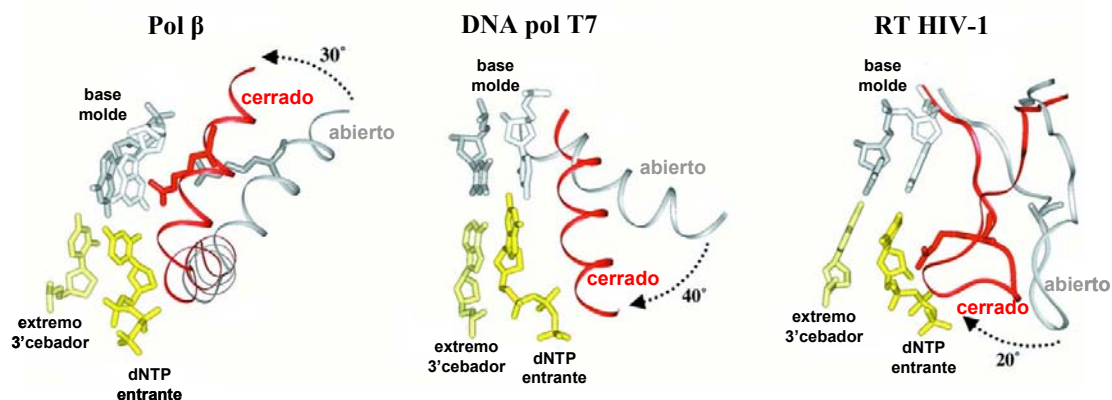


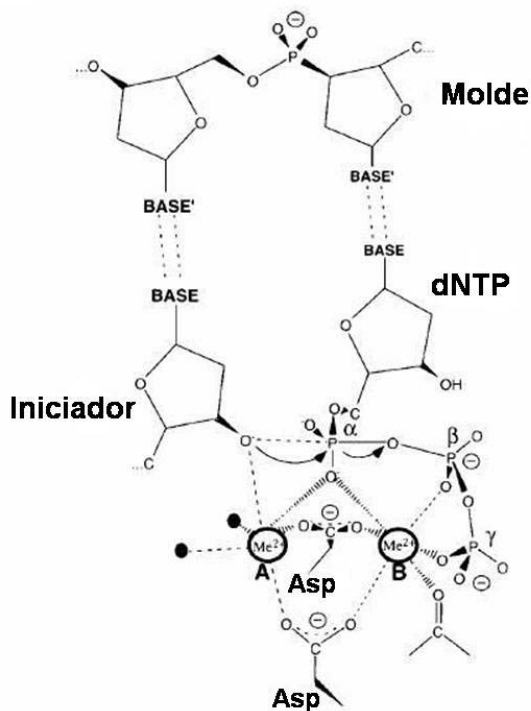
Figura 3. Movimiento del subdominio *fingers* de las DNA polimerasas. En la figura se representa el cambio conformacional que sufre el subdominio *fingers* inducido por la unión del dNTP entrante en la DNA polimerasa β, en la DNA polimerasa del bacteriófago T7 y en la retrotranscriptasa de HIV-1. Este movimiento provoca la formación de un bolsillo hidrofóbico en el cual se va a alojar el par de bases naciente (Kunkel y Bebenek, 2000).

Los cambios conformacionales de los diferentes subdominios están estrechamente coordinados unos con otros para llevar a cabo el proceso de replicación. Estudios teóricos indican que estos cambios conformacionales contribuyen a la fidelidad de síntesis de las DNA polimerasas (Beckman y Loeb, 1993). De hecho, no se han observado dichos cambios en DNA polimerasas con baja fidelidad como las pertenecientes a la familia Y (Beard y Wilson, 2003).

Estudios estructurales, así como comparaciones de secuencia entre diferentes DNA polimerasas sugieren que la reacción de polimerización está catalizada por un mecanismo de dos iones metálicos (Beese y Steitz, 1991; Derbyshire et al., 1991; Steitz et al., 1994).

El centro activo de las diferentes DNA polimerasas está formado por tres residuos carboxílicos, dos de los cuales están completamente conservados y unen, mediante su cadena lateral, dos iones metálicos divalentes (A y B). El papel del tercer residuo carboxílico no está claro, aunque en las estructuras cristalográficas de DNA

polimerasas pertenecientes a diferentes familias se ha observado cómo éste interacciona indirectamente con el extremo 3'-OH de la cadena iniciadora (Doublie et al., 1998; Franklin et al., 2001). El metal A es coordinado por el extremo 3'-OH iniciador, por el grupo α -fosfato del dNTP entrante y por los dos residuos carboxílicos. La interacción del metal A con el extremo 3'-OH disminuye el pK_a del grupo hidroxilo, promoviendo su desprotonación y generando un oxoanión 3'-O⁻. De esta manera, el metal A coordina los dos grupos reactivos aproximándolos entre sí y facilitando el ataque nucleofílico por parte del grupo 3'-O⁻ sobre el fosfato α del dNTP entrante. El metal B está coordinado por los dos residuos carboxílicos y por los fosfatos del dNTP entrante y está involucrado en la liberación del PPi (fosfatos β y γ del dNTP) generado tras la reacción. Ambos iones estabilizan tanto la estructura como la carga del estado de transición pentacovalente formado durante el curso de la reacción (Joyce y Steitz, 1995) (ver Figura 4). Los productos de dicha reacción son una cadena de DNA elongada un nucleótido y una molécula de PPi.



nucleótido y una molécula de PPi. Análisis de diferentes estructuras del fragmento Klenow de la Pol I de *E. coli* indican que después de la incorporación del nucleótido, la polimerasa adopta de nuevo una conformación abierta, translocando la cadena molde y liberando la molécula de PPi (Beese et al., 1993b; Yin y Steitz, 2004).

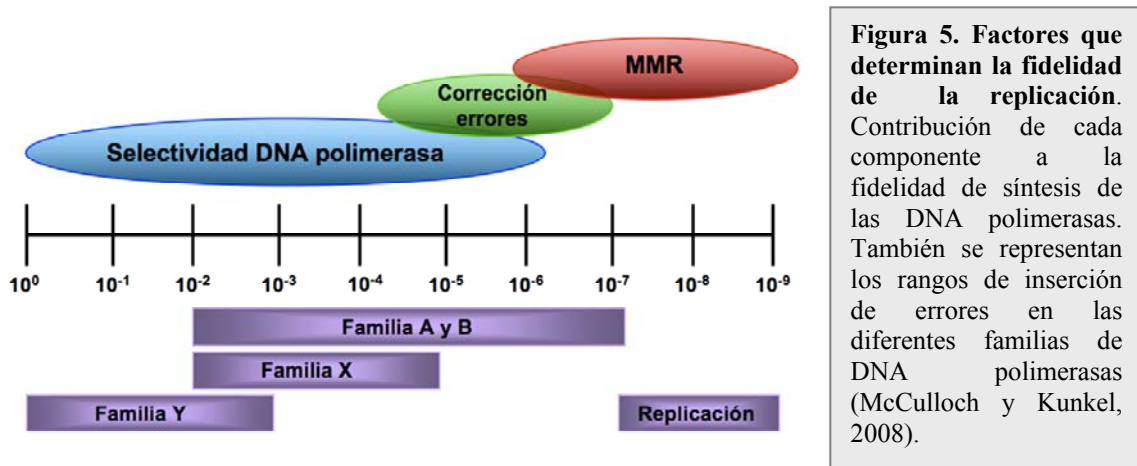
Figura 4. Mecanismo de transferencia de nucleótido. Dos metales divalentes estabilizan el estado de transición generado durante la reacción. El metal A facilita el ataque nucleofílico del 3'-O⁻ iniciador al fosfato α del dNTP entrante. El metal B facilita la salida de la molécula de PPi (fosfatos β y γ del dNTP incorporado) (Steitz, 1999).

2.4. Fidelidad de síntesis

La mayoría de las DNA polimerasas replicativas han desarrollado diferentes mecanismos para favorecer la incorporación del nucleótido correcto durante la síntesis de DNA. Además, estas DNA polimerasas presentan una actividad exonucleasa 3'-5' encargada de corregir los errores introducidos durante la polimerización. En el caso de

que un error escapara a esta actividad correctora, existen mecanismos de reparación post-replicativos (Mismatch Repair, MMR) que sondean el DNA y son capaces de escindir el error y re-sintetizar el DNA correctamente. En total, los diferentes pasos de discriminación resultan en una tasa de mutación *in vivo* de una base errónea por cada 10^9 bases incorporadas (revisado en McCulloch y Kunkel, 2008).

De entre los factores mencionados anteriormente, la mayor contribución a la fidelidad es la alta selectividad de la DNA polimerasa por el nucleótido correcto (fidelidad de síntesis). De hecho, DNA polimerasas a las que se les ha eliminado la actividad exonucleasa 3'-5' introducen un error cada 10^3 - 10^6 bases replicadas, dependiendo de la DNA polimerasa y de la secuencia (Bebenek y Kunkel, 1995).



La fidelidad de síntesis podría ser diseccionada en tres pasos: 1) Unión del dNTP para formar un complejo de polimerización competente. La DNA polimerasa presenta una afinidad por el dNTP correcto 10^2 - 10^3 veces mayor que por el incorrecto. Esta alta selectividad es alcanzada mediante el apareamiento entre el dNTP entrante y la base molde y depende fundamentalmente de la geometría de este par de bases (Goodman, 1997). Además, la DNA polimerasa aumenta las diferencias de energía libre entre el dNTP correcto y el incorrecto excluyendo las moléculas de agua unidas a éstos del centro activo de polimerización, aumentando las diferencias de entalpía y mejorando así la fidelidad (Petruska et al., 1986). 2) Una vez apareado con la base molde, el dNTP entrante induce cambios conformacionales en el subdomino *fingers* que pasa de una conformación abierta a otra cerrada para interactuar con el dNTP y la base molde y crear un complejo catalíticamente competente. En las DNA polimerasas este cambio conformacional, previo a la reacción química, es uno de los pasos limitantes en la

inserción de nucleótidos y depende también de la geometría entre el par de bases naciente y del bolsillo hidrofóbico que se forma en el centro activo de polimerización, diseñado exclusivamente para acomodar pares de bases con geometría Watson-Crick. La unión de un dNTP incorrecto enlentece este cambio conformacional hasta 10^4 veces, favoreciendo la disociación de dicho nucleótido (Johnson, 1993; Post y Ray, 1995; revisado en Kunkel y Bebenek, 2000). 3) Inmediatamente después de esta reorganización, se produce el correcto alineamiento de los reactivos en el centro activo de polimerización para dar lugar a la catálisis y a la formación del enlace fosfodiéster entre el extremo de la cadena iniciadora y el dNTP entrante. La presencia de un par de bases incorrecto hace que la K_{pol} disminuya entre 10^3 - 10^4 veces, favoreciendo la disociación del dNTP incorrecto antes de su incorporación a la cadena iniciadora.

En general, la fidelidad de inserción hace que las DNA polimerasas replicativas muestren una preferencia de hasta 10^6 - 10^7 veces por el dNTP correcto.

La DNA polimerasa posee residuos específicos encargados de comprobar que el nuevo par de bases formado presenta una estructura Watson-Crick mediante interacciones con el dúplex molde/iniciador a través de su surco menor (Doublíé et al., 1998; Franklin et al., 2001; Li et al., 1998). La incorporación de un dNMP incorrecto en la cadena de DNA naciente causa alteraciones geométricas en el centro activo de la DNA polimerasa y desestabiliza la doble hélice, disminuyendo la velocidad de síntesis de DNA hasta 10^4 veces, incluso si el error introducido se encuentra a una distancia de cuatro pares de bases del lugar de inserción del nuevo dNTP (Johnson y Beese, 2004). Esta parada en la polimerización permite al extremo 3' de la cadena iniciadora moverse hacia el centro activo exonucleasa 3'-5', guiado probablemente por residuos pertenecientes al subdominio *thumb* (Franklin et al., 2001; Shamoo y Steitz, 1999), donde el error es eliminado (revisado en Kunkel y Bebenek, 2000; Steitz, 1999). El centro activo exonucleasa 3'-5' está universalmente conservado en las DNA polimerasas de las familias A, B y C (Bernad et al., 1989), compartiendo todas ellas un mecanismo de excisión de nucleótido catalizado por dos iones metálicos coordinados por tres Asp y un Glu pertenecientes a los motivos conservados Exo I, Exo II y Exo III del centro activo de exonucleolisis (Beese y Steitz, 1991; Bernad et al., 1989; Freemont et al., 1988).

El equilibrio entre extensión y excisión del error incorporado es determinante para la fidelidad de síntesis de la DNA polimerasa, por lo que se requiere una perfecta coordinación entre ambas actividades (Kunkel y Bebenek, 2000; Wong et al., 1991);

revisado en Kunkel y Bebenek, 2000). El equilibrio dinámico entre dichas actividades depende de la velocidad y procesividad intrínsecas de éstas y de la fuerza con la que el DNA se une a cada centro activo (Garmendia et al., 1992).

El proceso de corrección de errores también puede llevarse a cabo mediante la acción de una exonucleasa independiente a la DNA polimerasa como sucede en el caso de la actividad exonucleasa 3'-5' de Pol δ que corrige los errores cometidos por Pol α , en un proceso denominado exonucleolisis extrínseca (revisado en McCulloch y Kunkel, 2008). Otro ejemplo de este tipo de exonucleolisis es el llevado a cabo por la subunidad ϵ de la DNA polimerasa III de *E. coli* que actúa en *trans* para corregir los errores que comete la subunidad α en la que reside la actividad de polimerización (Scheuermann y Echols, 1984).

Diversos estudios *in vitro* han demostrado cómo la actividad exonucleasa correctora de errores mejora la fidelidad de la replicación con factores que varían desde unas pocas hasta varios cientos de veces, dependiendo del error introducido, de la secuencia y de la DNA polimerasa (Bebenek y Kunkel, 1995).

Durante la síntesis del DNA pueden aparecer también inserciones y deleciones de nucleótidos que suelen producirse en secuencias repetitivas debido a apareamientos imperfectos de las cadenas molde e iniciadora en el centro activo de la DNA polimerasa (Streisinger et al., 1966). Estos desalineamientos suelen producirse durante la translocación de la DNA polimerasa o en ciclos de asociación/disociación de ésta con el dúplex molde/iniciador (revisado en Pavlov et al., 2006). De este modo, una DNA polimerasa no procesiva que se disocia del DNA durante la polimerización es propensa a cometer este tipo de errores. El subdominio *thumb* parece tener un papel importante para evitar esta clase de mutaciones ya que proporciona estabilidad al complejo DNA polimerasa-DNA mediante interacciones con el dúplex molde/iniciador confiriendo, a su vez, procesividad a la enzima (Minnick et al., 1996).

Otras proteínas accesorias parecen modular también la fidelidad de síntesis del DNA, aunque la aportación de éstas es muy pequeña en comparación con la fidelidad intrínseca de la DNA polimerasa (Bebenek et al., 2002).

3. Mecanismo de replicación primado por proteína terminal

3. 1. Replicación del DNA del bacteriófago Φ29

El genoma del bacteriófago Φ29 consiste en una cadena de DNA lineal de doble banda de 19.285 pb (Vlcek y Paces, 1986), siendo el primer caso descubierto de un DNA que contenía una proteína unida covalentemente a sus dos extremos 5' (Salas et al., 1978). La Figura 6 muestra un resumen de este mecanismo de replicación, el cual depende absolutamente de las proteínas codificadas por los genes 2 (DNA polimerasa), 3 (TP), 5 (SSB) y 6 (DBP) del bacteriófago (revisado en Salas, 1999).

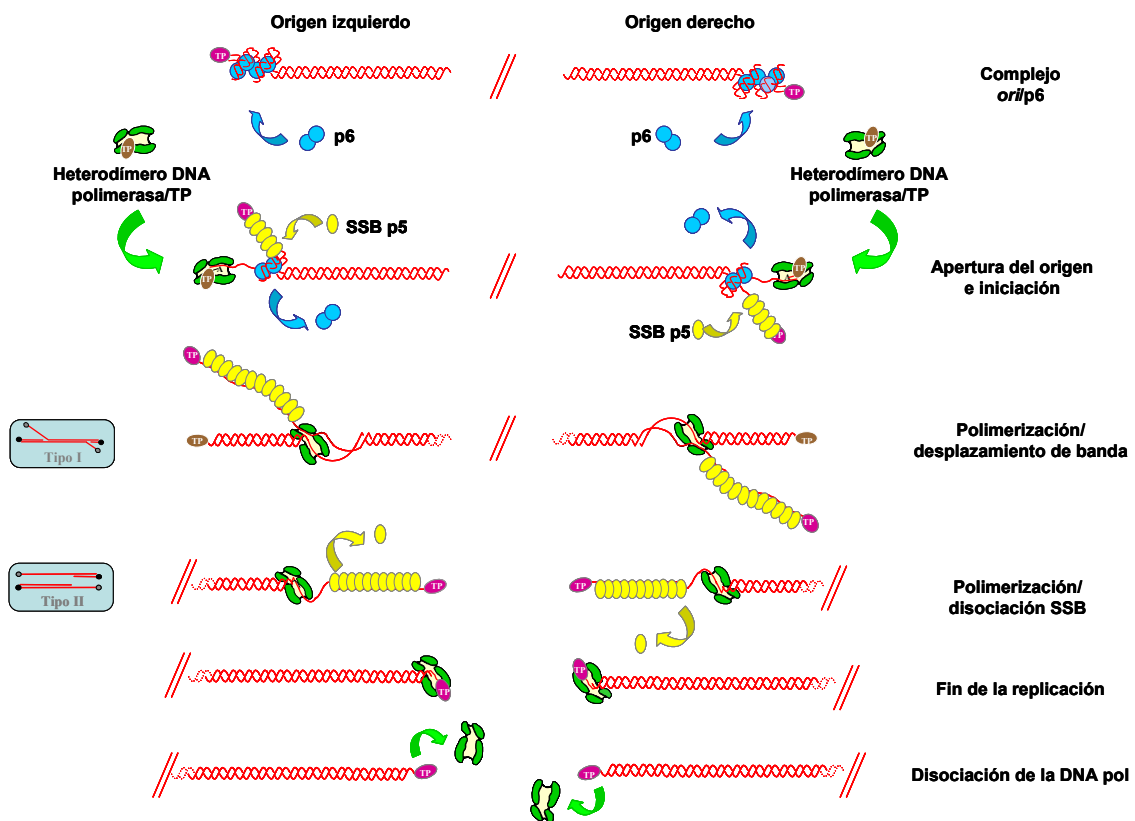


Figura 6. Representación esquemática de la replicación del genoma del bacteriófago Φ29.

El proceso de replicación comienza con la formación de un complejo nucleoproteico entre la proteína p6 (DBP) y los extremos del DNA promoviendo la apertura local de estos últimos (Serrano et al., 1994; Serrano et al., 1990). En dichos extremos del DNA se localizan los orígenes de replicación, formados por una secuencia específica y por una TP unida al extremo 5' de la cadena complementaria a la molde (TP paterna). Dichos orígenes son reconocidos por el heterodímero formado por la DNA polimerasa y una TP libre, el cual es estabilizado por iones NH_4^+ (Blanco et al.,

1987). Una vez que el heterodímero DNA polimerasa/TP se ha situado en los orígenes de replicación, la DNA polimerasa cataliza la adición del nucleótido iniciador dAMP al grupo -OH de la Ser232 de la TP (reacción de iniciación). La formación del complejo covalente TP-dAMP, estimulada por p6 debido a una disminución de la K_m por el nucleótido iniciador dATP (Blanco et al., 1986), está dirigida por el segundo nucleótido de la secuencia repetida del extremo 3' (3'TTT...5') de la cadena molde. Una vez formado el complejo TP-dAMP, éste retrocede y aparea con el primer nucleótido de la cadena molde, recuperando la información del nucleótido terminal y manteniendo la integridad del extremo (revisado en Salas, 1999). Este mecanismo se ha denominado "*sliding-back*" y se piensa que puede garantizar la fidelidad de la reacción de iniciación, ya que la DNA polimerasa forma el complejo correcto TP-dAMP sólo 10^2 - 10^3 veces más eficientemente que cualquiera de los otros complejos posibles (Esteban et al., 1993). Después, la DNA polimerasa (todavía unida a la TP) sintetiza un producto de elongación de 5 nucleótidos. El heterodímero sufre varios cambios conformacionales durante la incorporación de los nucleótidos 6-9 (transición) produciéndose la disociación de la DNA polimerasa de la TP tras la incorporación del décimo nucleótido (Méndez et al., 1997). Por último, esta misma DNA polimerasa continúa elongando la cadena de DNA con una alta procesividad, acoplando la polimerización al desplazamiento de la banda que no está siendo copiada, sin requerir factores de procesividad ni helicasas (Blanco et al., 1989; Blanco y Salas, 1985b).

Este mecanismo de replicación genera intermedios replicativos de tipo I que consisten en moléculas de DNA de doble cadena con una o más colas de DNA de cadena sencilla protegidas por la proteína p5 (SSB) (Gutiérrez et al., 1991; Martín et al., 1989). Cuando dos horquillas de replicación que se han iniciado en ambos extremos del genoma se encuentran, las dos cadenas paternas se separan dando lugar a intermedios replicativos de tipo II (Gutiérrez et al., 1991; Inciarte et al., 1980). La elongación en estas moléculas ocurre sin desplazamiento de banda con la disociación de la SSB conforme avanza la replicación. Una vez que la DNA polimerasa alcanza el extremo opuesto se produce la terminación de la replicación dando lugar a dos moléculas de DNA de $\Phi 29$.

Virus eucariotas como adenovirus y poliovirus, así como los bacteriófagos PRD1 (Caldentey et al., 1993; Caldentey et al., 1992), Cp-1 (Martín et al., 1996), GA-1 (Illana et al., 1996; Longás et al., 2006) y Nf (González-Huici et al., 2000a; Longás et al., 2006) utilizan un mecanismo similar de replicación de su DNA, utilizando también

una proteína como iniciadora. Estudios preliminares revelaron que, a pesar de la homología existente entre las proteínas de algunos de estos fagos con las de $\Phi 29$, se requiere un alto grado de especificidad en las interacciones entre la DNA polimerasa, la TP y los orígenes de replicación (González-Huici et al., 2000a; Longás et al., 2006).

3.2. DNA polimerasa del bacteriófago $\Phi 29$

La DNA polimerasa de $\Phi 29$ es una enzima monomérica de 66 kDa perteneciente a la familia B (Bernad et al., 1987) encargada de llevar a cabo la replicación del DNA viral (Blanco y Salas, 1985b). Una peculiaridad de esta enzima reside en su capacidad para llevar a cabo la iniciación de la replicación del DNA de $\Phi 29$ utilizando la TP como iniciador (Blanco y Salas, 1984), y la posterior elongación, primada por DNA, hasta completar la replicación del genoma (Blanco et al., 1989; Blanco y Salas, 1985b). Además, esta DNA polimerasa posee dos características funcionales únicas que la distinguen del resto: 1) una extremadamente alta procesividad (>70 kb) que le permite la replicación del genoma completo a partir de un único evento de asociación al DNA sin la asistencia de ningún factor de procesividad, y 2) capacidad de acoplar la síntesis de DNA al desplazamiento de banda, sin la intervención de proteínas tipo helicasas (Blanco et al., 1989).

La DNA polimerasa cataliza además dos reacciones degradativas: la pirofosforólisis, o inversa de la replicación, consistente en la liberación de dNTPs del extremo 3' de una estructura molde/iniciador mediante la adición de PPi como sustrato en presencia de iones divalentes, posiblemente jugando un papel en fidelidad (Blasco et al., 1991). El hecho de que mutantes de la DNA polimerasa en los residuos catalíticos de polimerización estén también afectados en esta actividad indica que ambas actividades comparten el mismo centro activo (Blasco et al., 1991). Como otras replicasas, también posee actividad exonucleasa 3'-5', la cual requiere iones divalentes para liberar dNMPs del extremo 3' de una cadena de DNA (Blanco y Salas, 1985a). De acuerdo con su papel en la reparación de errores cometidos durante la replicación, la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ degrada preferentemente extremos desapareados frente a extremos apareados (Garmendia et al., 1992). Además, esta actividad degrada procesivamente sustratos mayores de 6 nucleótidos y distributivamente sustratos de menor longitud (Garmendia et al., 1992) con una constante catalítica de 500 s^{-1} (Esteban et al., 1994).

3.3. Estructura de la DNA polimerasa de $\Phi 29$

Como se puede ver en la Figura 7, la reciente resolución de la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Kamtekar et al., 2004) muestra un plegamiento bimodular muy similar al mostrado por otras DNA polimerasas de la familia B cristalizadas hasta la fecha, consistente en un dominio N-terminal que contiene la actividad exonucleasa 3'-5' (residuos 1-189), y un dominio C-terminal de polimerización (residuos 190-575). La separación entre los centros activos de polimerización y exonucleolisis (30-40 Å) permite una perfecta coordinación entre ambas actividades, conectadas estructural y funcionalmente por el motivo YxG(G/A), conservado en las DNA polimerasas de tipo eucariótico e implicado en la unión del DNA y de la TP (Truniger et al., 1996).

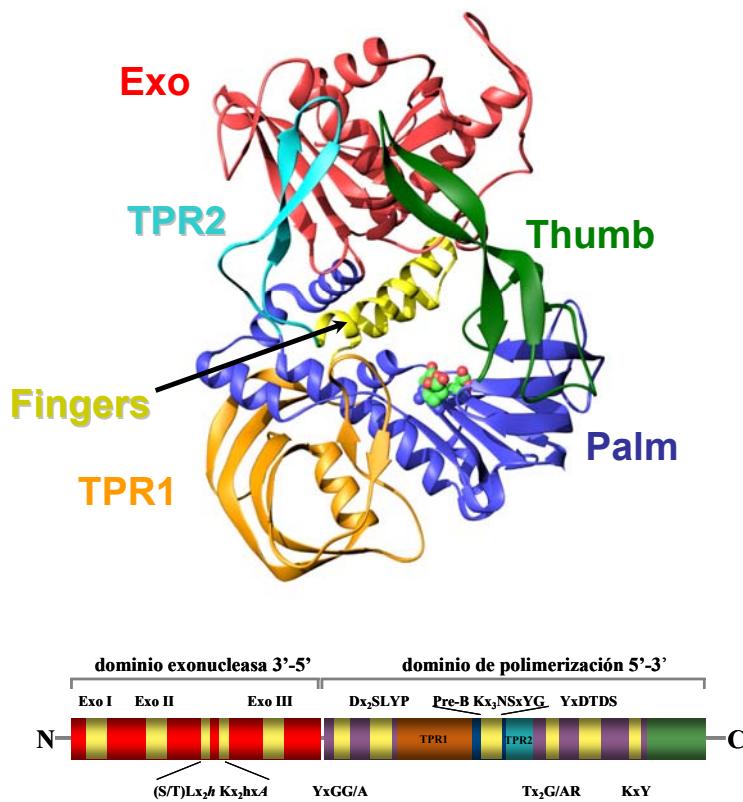


Figura 7. Estructura tridimensional de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. El dominio exonucleasa se muestra en rojo, el subdominio *palm* en azul, el *fingers* en amarillo y el *thumb* en verde. Las dos inserciones específicas de las DNA polimerasas que inician la replicación con proteína terminal, TPR1 y TPR2, se muestran en naranja y azul claro, respectivamente. En el subdominio *palm* se representan los Asp catalíticos del dominio de polimerización. En la parte inferior de la figura se muestra también la disposición de los diferentes dominios, subdominios y motivos conservados en la estructura primaria de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (adaptado de Kamtekar et al., 2004).

El dominio exonucleasa de la DNA polimerasa de $\Phi 29$, evolutivamente conservado en las DNA polimerasas de las familias A, B y C (Bernad et al., 1989), confirma las comparaciones de secuencias y los estudios mutacionales anteriores que indicaban a los residuos Asp12 y Glu14 (Exo I), Asp66 (Exo II) y Asp169 (Exo III)

como los catalíticos (Bernad et al., 1989; Soengas et al., 1992). Del mismo modo, corroboró el papel auxiliar en catálisis de los residuos Tyr165 (Exo III) (Esteban et al., 1994; Soengas et al., 1992) y Lys143 (perteneciente al motivo Kx_2h ,) (de Vega et al., 1997). La estructura de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ unida a un oligonucleótido de 5mer muestra cómo el dominio exonucleasa contacta sólo con los últimos 3 nucleótidos del extremo 3' del DNA, permitiendo corroborar el papel propuesto para los residuos Thr15, Asn62 y Phe65 en la estabilización del DNA de banda simple en el centro activo de exonucleolisis (de Vega et al., 1996; de Vega et al., 1998b).

El dominio de polimerización presenta los subdominios universalmente conservados *palm*, *fingers* y *thumb*. La estructura del complejo ternario de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Berman et al., 2007) confirma en el subdominio *palm* los residuos Asp249 y Asp458 como los aminoácidos encargados de coordinar los metales catalíticos (Bernad et al., 1990; Blasco et al., 1993a), así como muestra un tercer residuo también implicado en esta coordinación, la Val250.

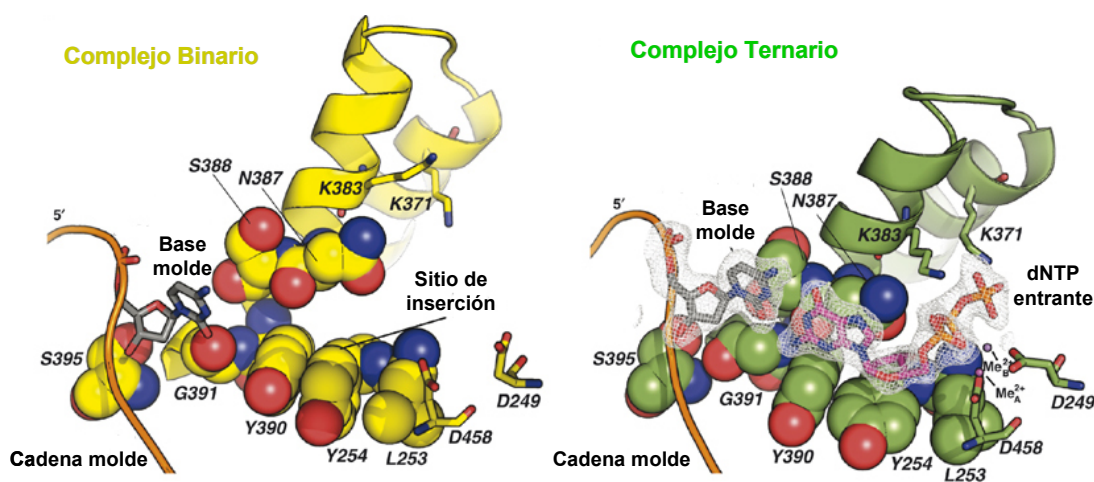


Figura 8. Comparación de los complejos binario y ternario de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. El complejo binario se muestra en amarillo y el ternario en verde. Se observa el movimiento del subdominio *fingers*, el cual rota 14° tras la unión del dNTP. Los residuos conservados Tyr390 (motivo B) y Tyr254 (Dx_2SLYP) ocupan el sitio de inserción del dNTP en el complejo binario y lo abandonan tras la rotación del subdominio *fingers*, pasando a formar parte del bolsillo hidrofóbico que va a alojar el par de bases naciente, permitiendo el alojamiento del dNTP entrante. En el complejo ternario se muestra cómo la Lys383 (motivo B) y la Lys371 (motivo pre-B) interaccionan con los fosfatos del dNTP entrante y estabilizan este complejo (Berman et al., 2007).

Como se puede observar en la Figura 8, el subdominio *fingers*, al igual que en otras DNA polimerasas de la familia B, está formado por dos hélices- α antiparalelas y se encuentra en conformación abierta en ausencia de dNTP y en conformación cerrada

en presencia de éste (Berman et al., 2007). Se confirma el papel de los residuos Lys379 y Lys383, pertenecientes al motivo B (conservado en las DNA polimerasas dependientes de DNA), los cuales interaccionan con el fosfato γ en el caso del primero y con los fosfatos α y γ del dNTP en el caso del segundo (Saturno et al., 1997; Truniger et al., 2004b), así como el del residuo Lys371 del motivo pre-B en su interacción con el fosfato γ (Truniger et al., 2002).

También se han identificado otros dos residuos Tyr390 (motivo B) (Blasco et al., 1992; Saturno et al., 1995) y Tyr254 (Dx₂SLYP) (Blasco et al., 1992; Bonnin et al., 1999; Saturno et al., 1995) que cambian su posición si comparamos los complejos binario y ternario de la DNA polimerasa, pasando de ocupar el sitio de inserción del dNTP en el complejo binario a abandonarlo para permitir la unión de éste, formando parte del bolsillo hidrofóbico para el par de bases naciente en el complejo ternario. Dicho movimiento se ha propuesto como el responsable de la translocación de la DNA polimerasa a lo largo del DNA. Además, la Tyr254 es la encargada de discriminar contra el grupo 2'-OH de los ribonucleótidos (Bonnin et al., 1999).

El subdominio *thumb* es pequeño y presenta una estructura inusual formado por un elemento β -giro- β (*β -hairpin*), mientras que en otras DNA polimerasas este subdominio presenta carácter básicamente helicoidal.

La principal diferencia entre esta DNA polimerasa y otras de la familia B es la presencia de dos subdominios, ambos correspondientes a inserciones de secuencia conservadas en el subgrupo de las DNA polimerasas que utilizan una proteína como iniciador, llamados Terminal Protein Region (TPR) 1 y 2 (Blasco et al., 1990; Dufour et al., 2000). El subdominio TPR1 se encuentra situado junto al *palm* y contacta con el dsDNA y con la TP (Berman et al., 2007; Kamtekar et al., 2006), confirmando el papel que le fue adjudicado previamente como ligando de ambos (Dufour et al., 2000; Dufour et al., 2003).

El TPR2, con una estructura también de *β -hairpin*, forma, junto a los subdominios *thumb*, *palm* y TPR1, una estructura anular que rodearía por completo al DNA *upstream*, estabilizando la unión de la DNA polimerasa al sustrato requerida para llevar a cabo la replicación de manera procesiva (Berman et al., 2007; Rodríguez et al., 2005). Asimismo, el TPR2 participa junto con los subdominios *fingers*, *palm* y el dominio exonucleasa en la formación de un canal estrecho por el que pasa la cadena molde para acceder al centro activo de polimerización durante la replicación, forzando la separación de las dos cadenas del dsDNA (Kamtekar et al., 2004), actuando de

manera análoga a como lo haría una helicasa y proporcionando a la polimerasa su capacidad de acoplar la polimerización al desplazamiento de banda (Berman et al., 2007; Kamtekar et al., 2004; Rodríguez et al., 2005).

3.4. Estructura del heterodímero formado por la DNA polimerasa y la proteína terminal de $\Phi 29$

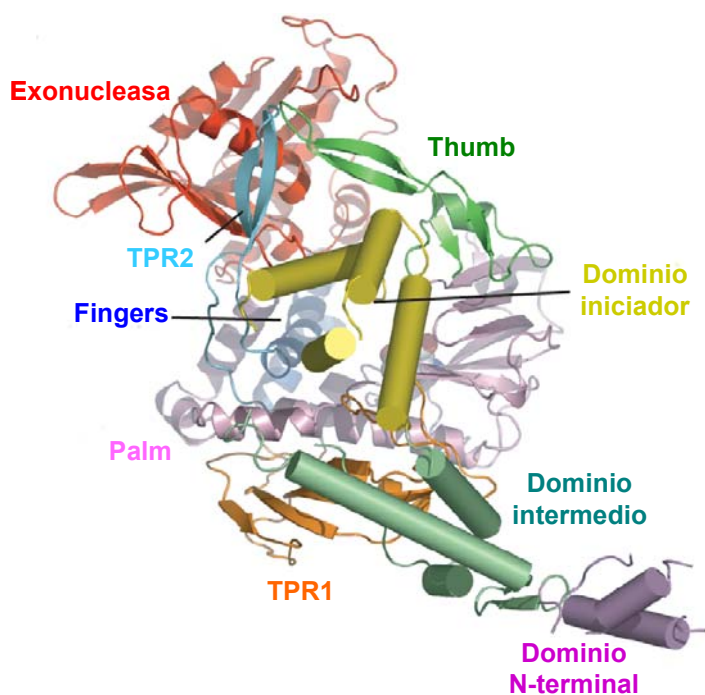


Figura 9. Estructura tridimensional del heterodímero de DNA polimerasa/TP de $\Phi 29$. Se muestran los tres dominios que forman la TP: en amarillo el dominio iniciador que contiene la Ser232, en verde el dominio intermedio que interacciona con la región TPR1 de la DNA polimerasa (en naranja) y en morado el dominio N-terminal. Se muestran también los diferentes dominios de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ con diferentes colores: en rojo el dominio exonucleasa, en malva el subdominio *palm*, en verde el *thumb*, en azul oscuro el *fingers* y el TPR2 en azul claro (Kamtekar et al., 2006).

En la estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP (Kamtekar et al., 2006) (Figura 9) se puede observar cómo la TP se encuentra plegada en tres dominios: el dominio N-terminal (residuos 1-73), el cual no interacciona con la DNA polimerasa; el dominio intermedio (residuos 74-172), formado principalmente por dos hélices- α , que interacciona con la región TPR1 de la DNA polimerasa y está conectado por una región flexible al dominio iniciador (residuos 173-266), compuesto por cuatro hélices- α de fuerte carácter electronegativo y que se sitúa ocupando el túnel de unión de DNA anteriormente mencionado formado por los subdominios *palm*, *thumb* y TPR2, estableciendo múltiples contactos con la DNA polimerasa. La Ser232, que proporciona el grupo -OH iniciador para la síntesis del DNA, se encuentra en un *loop* al final del dominio iniciador, situándose en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa. Este dominio debe abandonar dicho centro activo a medida que el nuevo DNA es sintetizado manteniéndose la interacción DNA polimerasa/TP a través de otros

contactos hasta la adición de los primeros 8-9 nucleótidos. Tras la incorporación del décimo nucleótido, la TP se disocia completamente de la DNA polimerasa (Kamtekar et al., 2006; Méndez et al., 1997).

La conformación de la DNA polimerasa de Φ 29 formando un complejo con la TP es muy similar a la de la apoenzima; la principal diferencia estructural está restringida a los residuos 304-315 del subdominio TPR1. Estos residuos forman un *loop* con un alto grado de flexibilidad en el apoenzima y que, por el contrario, se encuentra plegado hacia fuera en el heterodímero, permitiendo el acceso del dominio iniciador de la TP al centro activo de la DNA polimerasa.

Objetivos

En el comienzo de esta Tesis únicamente se disponía de la estructura cristalográfica de la apoenzima de la DNA polimerasa de $\Phi 29$, así como del complejo formado por un ssDNA unido en el centro activo exonucleasa 3'-5'. Esto nos permitió identificar dos residuos pertenecientes al dominio exonucleasa, así como otro perteneciente al subdominio *thumb*, los cuales parecían interactuar con dicho ssDNA. Este hecho nos llevó a plantearnos el siguiente objetivo:

1.- Determinación del papel funcional de los residuos Pro129 y Tyr148, pertenecientes al dominio N-terminal, y del residuo Leu567, perteneciente al dominio C-terminal, en la unión y estabilización de un ssDNA en el centro activo de exonucleolisis, mediante el análisis bioquímico de derivados mutantes en esas posiciones.

Basándonos en el modelado del DNA procedente del complejo ternario de la DNA polimerasa de RB69 sobre la estructura de la apoenzima de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ identificamos una serie de residuos electropositivos y polares pertenecientes al subdominio *thumb*, algunos de ellos evolutivamente conservados que, por su posición y orientación, podrían ser importantes para la unión del DNA. Así, el siguiente objetivo fue:

2.- Análisis y determinación del papel funcional de residuos pertenecientes al subdominio *thumb* en la unión y estabilización de las cadenas iniciadora y molde del dúplex DNA unido al centro activo de polimerización de la DNA polimerasa. Implicación de dicho subdominio en la coordinación de las actividades de síntesis y de degradación de la DNA polimerasa de $\Phi 29$.

Alineamientos de secuencia de DNA polimerasas de la familia B nos permitieron identificar en el subdominio *palm* un residuo conservado en dicha familia, así como otros dos residuos conservados en aquellas DNA polimerasas que utilizan una proteína como iniciador de la replicación. Posteriormente, la resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ mostró cómo uno de estos últimos estaba implicado en la formación del bolsillo que aloja al dNTP entrante. Por ello, el siguiente objetivo de esta Tesis fue:

3.- Análisis funcional de los residuos Val250, Asn251 y Glu486, evolutivamente conservados en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa de $\Phi 29$.

Durante el desarrollo del trabajo expuesto en esta Tesis se obtuvo también la estructura tridimensional del heterodímero DNA polimerasa/TP de $\Phi 29$. Así, nuestro siguiente objetivo fue:

4.- Estudio de las bases estructurales responsables del reconocimiento específico entre la DNA polimerasa y la TP, mediante la construcción de TPs quiméricas de los bacteriófagos $\Phi 29$ y GA-1.

MATERIALES

1. Nucleótidos

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

2. Proteínas

La DNA polimerasa *wild-type* del bacteriófago Φ 29 se purificó a partir de células de *E. coli* NF2690 que portaban el plásmido pJLPM (un derivado de PT7-4w2), como se describe en Lázaro et al. (1995). Los mutantes de la DNA polimerasa de Φ 29 que se describen en esta memoria se purificaron básicamente como se describe para la DNA polimerasa *wild-type*, a partir de células de *E. coli* BL21(DE3) que portaban los diferentes plásmidos recombinantes.

Las TPs *wild-type* de Φ 29 y GA-1 se purificaron como se describe en Zaballos et al. (1989).

La SSB y la DBP, obtenidas a partir de células de *B. subtilis* infectadas con el bacteriófago Φ 29, fueron purificadas como se describe en Martín et al. (1989) y Pastrana et al. (1985), respectivamente.

La polinucleótido kinasa de T4 se compró a Boehringer Mannheim. Las diferentes endonucleasas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs.

3. Sustratos de DNA

Todos los oligonucleótidos fueron comprados a Isogen y purificados a partir de geles de poliacrilamida al 20%-8 M urea. El oligonucleótido sp1 (5' GATCACAGTGAGTAC), marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P]ATP y polinucleótido kinasa de T4, fue hibridado con el oligonucleótido sp1c+6 (5' TCTATTGTACTCACTGTGATC) en presencia de 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 0.2 M NaCl, obteniéndose una molécula híbrida de tipo iniciador/molde para ser utilizada en los diferentes ensayos en los que se emplea un dsDNA como sustrato.

Los genomas de los bacteriófagos Φ 29 y GA-1 con la TP unida a sus dos extremos 5' (TP-DNA de Φ 29 y de GA-1) fueron obtenidos por tratamiento de las partículas virales con proteinasa K en presencia de SDS (Inciarte et al., 1976), posterior extracción con fenol, y precipitación con etanol.

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

MÉTODOS

1. Mutagénesis dirigida y expresión de las DNA polimerasas mutantes de $\Phi 29$

Las DNA polimerasas mutantes de $\Phi 29$ fueron obtenidas empleando el *kit* comercial de mutagénesis dirigida QuickChange® de Amersham Pharmacia. El plásmido pJLPM (que contiene el gen de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ bajo el control del promotor $\Phi 10$, específico de la RNA polimerasa del bacteriófago T7) se utilizó como sustrato molde para la DNA polimerasa *Pfu* Turbo en la reacción de mutagénesis. Los oligonucleótidos complementarios diseñados hibridan con las cadenas opuestas del plásmido en las regiones flanqueantes a la mutación. Después de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el posterior tratamiento con la endonucleasa *DpnI*, el DNA sintetizado se transformó en células competentes *E. coli* XL1-Blue. La presencia de las mutaciones deseadas, así como la ausencia de otros cambios, se confirmó en todos los casos mediante la secuenciación del gen completo de la DNA polimerasa.

La expresión de los mutantes se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por IPTG (Studier y Moffatt, 1986).

2. Construcción, expresión y purificación de las distintas variantes de las TPs de $\Phi 29$ y GA-1.

Oligonucleótidos utilizados en las diferentes construcciones de las variantes de las TPs de $\Phi 29$ y GA-1:

Oligo 1: 5'CGCGGAATTCTGAAAGGAGATAACG

Oligo 2: 5'TCTTCTAAGGCTTTCCTCGTAATACTGAGGGTCTGTTCTCATCTC

Oligo 3: 5'CGCGGAATTCAAAGGGGATGAAAT

Oligo 4: 5'CTGTATCATTTTCTTTTCATAATATGCTTCTTGACTTCTTTTCTT

Oligo 5: 5'TATTATGAAAAGAAAATGATACAG

Oligo 6: 5'CGCGGGATCCGGAGCCTAGAACC

Oligo 7: 5'TATTACGAGGAAAGCCTTAGAAGA

Oligo 8: 5'CGCGGGATCCCTACATCAGAAAC

Oligo 9: 5'TAACGCACCATGGCGAGAAGTCCACGTATACGCATTAAGG

Oligo 10: 5'CTTTTCAGCGGCCGCAGGGTCTGTTCTCATCTCCATGCTT

Oligo 11: 5'GCGCGCATATGTATTATGAAAAGAAAATG

Oligo 12: 5'CGCGGGATCCGGAGCCTAGAACC

Oligo 13: 5'CGGCAGCCATATGCGTTATCAGTTCG

Oligo 14: 5'CGCGGGATCCGGAGCCTAGAACC

Construcción de las quimeras de TP N-Φ y N-G

Para construir las quimeras N-Φ y N-G se amplificaron mediante PCR las secuencias comprendidas entre los residuos 1-173 de las TPs de Φ29 y GA-1 usando como molde el plásmido pT7-3, en el que se encuentran clonados los genes de las TPs de Φ29 ó GA-1, y los oligos 1 y 2 (en el caso de la quimera N-Φ) y los oligos 3 y 4 (en el caso de la quimera N-G) que incorporan en el extremo 5' de la ORF de la TP la secuencia reconocida por la endonucleasa *EcoRI* dando lugar a los fragmentos I y II, respectivamente. En paralelo, se amplificó también la secuencia de la TP de Φ29 comprendida entre los residuos 174-266 con los oligos 5 y 6 (fragmento III) y la secuencia de la TP de GA-1 comprendida entre los residuos 174-265 con los oligos 7 y 8 (fragmento IV), introduciendo en el extremo 3' de ambos fragmentos una diana para la endonucleasa *BamHI*. Gracias al solapamiento entre el extremo 3' del fragmento I y el 5' del fragmento IV (así como entre el extremo 3' del fragmento II y el 5' del fragmento III) se llevó a cabo un segundo ciclo de PCR mezclando cantidades equimolares de los fragmentos I y IV por un lado, y de los fragmentos II y III por otro, siendo estos utilizados como molde para la nueva reacción de amplificación, dando lugar a los fragmentos de DNA quiméricos con las dianas de restricción *EcoRI-BamHI*. Ambos DNAs fueron digeridos con dichas enzimas de restricción, purificados y clonados en el vector pT7-3 digerido previamente con las mismas enzimas.

Construcción de las TPs truncadas Φ29-Ct, Φ29-Nt y Φ29ΔN

Las regiones N-terminal (Φ29-Nt, residuos 1-173), C-terminal (Φ29-Ct, residuos 174-266) y el gen completo menos los 73 primeros residuos (Φ29ΔN, residuos 74-266) de la TP de Φ29 fueron amplificados mediante PCR utilizando como sustrato el plásmido pT7-3 que contiene el gen de la TP del bacteriófago Φ29 y los oligos 9 y 10 para el caso de Φ29-Nt, 11 y 12 para Φ29-Ct y 13 y 14 para Φ29ΔN, complementarios a las regiones adyacentes introduciendo secuencias reconocidas por las endonucleasas

NdeI y *BamHI*. Los productos de PCR fueron digerido con estas enzimas, purificados y clonados en el vector de expresión pET-28b(+) digerido previamente con las mismas enzimas. Los vectores recombinantes se transformaron en células competentes *E. coli* XL1-Blue. La presencia de las mutaciones deseadas, así como la ausencia de otros cambios, se confirmó en todos los casos mediante la secuenciación del gen completo de la proteína terminal.

La expresión de las proteínas mutantes se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5* inducible por IPTG (Studier y Moffatt, 1986). Las TPs quiméricas y el fragmento $\Phi 29$ -Nt fueron purificadas esencialmente como se describe para la TP *wild-type* de $\Phi 29$ en Zaballos et al. (1989). Las TPs truncadas $\Phi 29$ -Ct y $\Phi 29\Delta N$ (las cuales contienen un His₍₆₎-tag en su extremo N-terminal) fueron purificadas utilizando columnas de resina de Ni²⁺-NTA. El His-tag fue eliminado posteriormente mediante digestión con trombina utilizando el *kit* Thrombin Cleavage Capture® (Novagen, Merck Biosciences). La digestión completa de las proteínas fue confirmada mediante electroforesis en gel de Tris-tricina-SDS. La trombina biotinilada usada para la digestión del His₍₆₎-tag fue eliminada usando una columna de estreptavidina-agarosa proporcionada con el *kit*. Finalmente, las proteínas purificadas fueron dializadas contra un buffer que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 7 mM β -mercaptoetanol, 1mM EDTA, 200 mM NaCl y 50% glicerol.

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

La molécula híbrida sp1/sp1c+6 (iniciador/molde) contiene un extremo 5' protuberante de 6 nucleótidos de longitud, de forma que el oligonucleótido sp1 puede ser sustrato tanto de la actividad exonucleasa 3'-5' como de la de polimerización dependiente de DNA. Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 μ l que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂ ó 1 mM MnCl₂ según se indique, 1mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 1.2 nM de sustrato de DNA y 30.3 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante, así como las concentraciones de dNTPs indicadas en casa caso. Después de una incubación de 5 min a 25 °C, las reacciones se detuvieron añadiendo 10 mM EDTA. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8M urea y posterior autorradiografía. Las actividades de polimerización y exonucleasa 3'-5' se detectaron por incremento o disminución, respectivamente, de la longitud del sustrato original (sp1, 15 mer).

4. Medida de la afinidad por nucleótido de las DNA polimerasas mutantes

El cálculo de la K_m aparente para el nucleótido correcto (dATP) e incorrecto (dCTP), usando sp1/sp1c+6 como molde y Mg^{2+} o Mn^{2+} como metal activador, se llevó a cabo como se describe en Saturno et al. (1995). La cantidad de producto elongado fue representada frente a la concentración de dATP o dCTP en cada caso. Los valores para la K_m por nucleótido se obtuvieron usando el software Kaleidagraph 3.6.4.

5. Ensayos de la actividad exonucleasa 3'-5'

Actividad exonucleasa 3'-5' sobre DNA

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 μ l que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 4% (v/v) glicerol y 0.1 mg/ml BSA. Como sustrato de ssDNA se utilizó 1.2 nM de oligonucleótido sp1 marcado radiactivamente. Como sustrato de dsDNA se utilizó 1.2 nM del híbrido sp1/sp1c+6. La cantidad de proteína (6 nM) se ajustó para conseguir condiciones lineales de reacción. Las mezclas se incubaron a 25 °C durante los tiempos indicados en cada caso y las reacciones fueron paradas añadiendo 10 mM EDTA. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 20%-8M urea, con la posterior densitometría de las autorradiografías obtenidas. La degradación total se obtuvo calculando el número de eventos catalíticos que dieron lugar a los diferentes productos de degradación. A partir de esos datos pudimos calcular la eficiencia catalítica de cada polimerasa mutante y relativizarla a la de la proteína *wild-type* (100%).

Hidrólisis de 5'-p-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (pNP-TMP)

El sustrato 5'-p-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (pNP-TMP) fue comprado a Sigma.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 300 μ l que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM $MnCl_2$, 3 mM pNP-TMP (disuelto en 50 mM Tris-HCl, pH 8 y 150 mM NaCl) y 17 μ M de cada DNA polimerasa *wild-type* o mutante. La hidrólisis se analizó monitorizando la producción de p-nitrofenol a una longitud de onda de 420 nm con un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a 25 °C, como se describe en Hamdan et al. (2002), a los tiempos indicados.

6. Ensayo de interacción DNA polimerasa-sustrato de DNA

Para analizar la interacción de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes con ssDNA se utilizó el oligonucleotido sp1 marcado en su extremo 5', mientras que para la interacción con dsDNA se empleó como sustrato el híbrido sp1/sp1c+6, en el cual el sp1 se encuentra radiactivamente marcado en su extremo 5'. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl que contenía 12 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, 0.7 nM de sp1/sp1c+6, 10 mM MgCl₂ como metal activador y 1.9 nM de DNA polimerasa. El estudio de la unión a ssDNA se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas para dsDNA, en ausencia de MgCl₂, y usando 1.4 nM sp1 y 0.5 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Después de la incubación durante 5 min a 4 °C, las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (80:1 monómero:bis) al 4% (p/v) que contenía 12 mM Tris-acetato, pH 7.5. Tras la electroforesis, llevada a cabo a 4 °C y en el mismo tampón a 8 V/cm (Carthew et al., 1985), los complejos DNA polimerasa/DNA se detectaron en las autorradiografías como un retraso en la movilidad del sustrato marcado. La cuantificación de la capacidad de interacción con el DNA de la enzima *wild-type versus* sus derivados mutantes se llevó a cabo por densitometría de la banda retrasada.

7. Ensayo de la fidelidad *in vitro*

Las condiciones son esencialmente las mismas que las descritas para el ensayo de balance Exo/pol anteriormente descrito, utilizando como sustrato la molécula híbrida sp1/sp1c+6 y concentraciones crecientes de dATP como único nucleótido, el cual es complementario a las posiciones 1, 2, 4 y 6 de la cadena molde. Con objeto de prevenir la degradación exonucleolítica del extremo 3' del sp1 se utilizó 20 µM dCTP. Tras incubar las mezclas durante 5 min a 30 °C, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-8M urea. Después de obtener la autorradiografía de los mismos, se pudo detectar la incorporación errónea del dAMP en posiciones no complementarias al molde, por la aparición de productos de longitud superior a 17 mer. La incorporación errónea producida en cada caso, expresada como la relación 18mer+19mer+20mer/17mer+18mer+19mer+20mer, se determinó a partir de la densitometría de las autorradiografías.

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

Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ l que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 40 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μ Ci de [α -³²P]dATP, 4.2 nM de ssDNA M13mp18 hibridado al iniciador universal de 17mer y 16.8 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Cuando se indica, se añadió 30 μ M de la SSB de Φ 29. Después de incubar durante los tiempos indicados a 30 °C, las reacciones se pararon con 10 mM EDTA y 0.1% SDS. Las muestras fueron filtradas por centrifugación a través de columnas de Sephadex G-50 en presencia de 0.1% SDS con objeto de eliminar los dNTPs no incorporados. La actividad relativa de las DNA polimerasas mutantes respecto a la enzima *wild-type* se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido de cada muestra después del filtrado. El análisis de los tamaños se llevó a cabo mediante la desnaturalización del DNA sintetizado con 0.7 M NaOH y posterior electroforesis en gel de agarosa alcalino al 0.7% (McDonnell et al., 1977). Después de la electroforesis, la posición de la unidad de longitud correspondiente al M13mp18 se detectó por tinción con bromuro de etidio del gel, el cual fue posteriormente secado y autorradiografiado.

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

El cálculo de la concentración óptima de MnCl₂ para este tipo de ensayo se llevó a cabo en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, en presencia de SSB, y usando un rango de concentraciones de metal desde 0.2 hasta 3.2 mM.

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

La mezcla de reacción contenía, en 25 μ l, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂ ó 1 mM MnCl₂ según se indique, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 0.1 μ M dATP, 1 μ Ci de [α -³²P]dATP, 1.6 nM de TP-DNA de Φ 29 y las cantidades indicadas en cada ensayo de DNA polimerasa *wild-type* o mutante y de TP *wild-type* o mutante. En los ensayos con el mutante de TP Φ 29 Δ N se añadió 35 μ M de DBP cuando se indica. Las muestras se incubaron a 30 °C durante los tiempos indicados. En el caso de los ensayos de iniciación independiente de molde (deoxinucleotidilación de la TP) se empleó 1mM MnCl₂ como metal activador en lugar

de MgCl₂, y las cantidades indicadas en cada ensayo de DNA polimerasa *wild-type* o mutante y de TP *wild-type* o mutante. Posteriormente, las muestras se incubaron a 30 °C durante el tiempo indicado en cada caso. Las reacciones se detuvieron añadiendo 10 mM EDTA y 0.1% SDS, se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50 y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%-0.1% SDS. En el caso de las reacciones de iniciación con los mutantes Φ29-Ct y Φ29-Nt de la TP las muestras se analizaron en geles de Tris-tricina-SDS. La cuantificación fue realizada mediante densitometría de las bandas correspondientes al complejo TP-dAMP, detectadas por autorradiografía.

El cálculo de la K_m aparente para el nucleótido iniciador se llevó a cabo como se describe (Dufour et al., 2000) utilizando cantidades crecientes de dATP. Las reacciones se detuvieron y analizaron como se ha descrito anteriormente. La formación del producto fue representada frente a la concentración de dAMP. Los valores para la K_m de incorporación de nucleótido se obtuvieron usando el software Kaleidagraph 3.6.4.

10. Ensayo de replicación del TP-DNA de Φ29

La mezcla de reacción contenía, en 25 µl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂ ó 1 mM MnCl₂ según se indique, 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 20 µM de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 µCi de [α -³²P]dATP, 1.6 nM de TP-DNA de Φ29 y las cantidades indicadas en cada ensayo de DNA polimerasa *wild-type* o mutante y de TP *wild-type* o mutante. En los ensayos con el mutante de TP Φ29ΔN se añadió 35 µM de DBP cuando se indica. Después de la incubación a 30 °C durante los tiempos indicados, las reacciones se detuvieron añadiendo 10 mM EDTA y 0.1% SDS. Posteriormente las muestras se filtraron a través de columnas de Sephadex G-50. La actividad relativa se calculó a partir de la radiación Cerenkov correspondiente al volumen excluido. El análisis de los tamaños se llevó a cabo mediante la desnaturalización del DNA sintetizado con 0.7M NaOH y posterior electroforesis en gel de agarosa alcalino al 0.7% (McDonell et al., 1977). Después de la electroforesis, la posición de la molécula unidad correspondiente al TP-DNA de Φ29 (19.285 pb) se detectó por tinción con bromuro de etidio del gel, el cual fue posteriormente secado y autorradiografiado. La tasa de elongación relativa de cada mutante analizado con respecto a la enzima *wild-type* se infirió a partir de los tamaños de los productos de elongación obtenidos.

El cálculo de la concentración óptima de MnCl_2 para este tipo de ensayos se llevó a cabo en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, usando un rango de concentraciones de metal desde 0.1 hasta 3.2 mM.

11. Ensayo de amplificación del TP-DNA de $\Phi 29$

La mezcla de reacción contenía, en 25 μl , 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 20 mM sulfato amónico, 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 80 μM de cada uno de los cuatro dNTPs, 1 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$, 16 pM de TP-DNA de $\Phi 29$, 30 nM de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ *wild-type*, 30 μM de SSB de $\Phi 29$, 35 μM de DBP de $\Phi 29$ y las cantidades indicadas de TP *wild-type* o delecionada. Después de la incubación durante 45 min a 30 °C, las reacciones se detuvieron con 10 mM EDTA-0.1% SDS. El procesamiento de las muestras fue análogo al descrito para el ensayo de replicación de TP-DNA de $\Phi 29$.

12. Ensayo de interferencia

Con este ensayo se estudió la eficiencia de unión de las TPs mutantes con respecto a la TP *wild-type*, añadiendo simultáneamente ambas TPs para competir por una cantidad limitante de DNA polimerasa *wild-type*. Las reacciones se llevaron a cabo esencialmente como se describe para el ensayo de iniciación de la replicación en presencia de TP-DNA como molde, pero usando una cantidad limitante de DNA polimerasa y diferentes proporciones de TPs *wild-type* y mutantes. Por lo tanto, se incubaron 60 nM de la DNA polimerasa *wild-type* de $\Phi 29$ con 120 nM de TP *wild-type* de $\Phi 29$, 1 mM MnCl_2 y cantidades crecientes de quimera N- Φ (120, 240, 480, 960 y 1920 nM). De igual manera se incubaron 60 nM de la DNA polimerasa *wild-type* de GA-1 con 120 nM de TP *wild-type* de GA-1, 1 mM MnCl_2 y cantidades crecientes de quimera N-G (120, 240, 480, 960 y 1920 nM). Para analizar la capacidad del mutante $\Phi 29\text{-Ct}$ de interferir en la unión entre la TP *wild-type* de $\Phi 29$ y la quimera N- Φ , se incubaron 60 nM de DNA polimerasa *wild-type* de $\Phi 29$ con 120 nM de TP quimérica N- Φ , 1 mM MnCl_2 y cantidades crecientes de la TP $\Phi 29\text{-Ct}$ (120, 240, 480, 960 y 1920 nM). En todos los casos, la incubación fue de 10 min a 30 °C. Después, las muestras fueron procesadas como se indica en el ensayo de iniciación de la replicación.

13. Modelado estructural de proteínas

Las coordenadas de las estructuras tridimensionales se obtuvieron del banco de datos de proteínas Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Las diferentes estructuras de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ utilizadas fueron: 1XHX (correspondiente a la apoenzima), 1XHZ (correspondiente al complejo formado por la DNA polimerasa con un pentanucleótido), 2EX3 (correspondiente al heterodímero DNA polimerasa/TP), 2PZS (correspondiente al complejo binario) y 2PYL (correspondiente al complejo ternario de la DNA polimerasa). También se utilizó la estructura del complejo ternario de RB69 (IG9) para modelar el DNA perteneciente a este complejo sobre la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$.

Las estructuras tridimensionales de la DNA polimerasa y de la TP de $\Phi 29$ se representaron utilizando los programas SwissPDBViewer (<http://www.expasy.ch/spdbv>) y Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

El modelado de la TP de GA-1 fue proporcionado por el servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>) (Guex y Peitsch, 1997; Schwede et al., 2003), usando como molde la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ unida a su TP (PDB 2EX3).

La resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ con un oligonucleótido de 5mer unido al centro activo de exonucleolisis mostró cómo los tres últimos nucleótidos de éste se encuentran situados en un surco de dimensiones diseñadas para unir ssDNA (Kamtekar et al., 2004). Esta estructura cristalográfica corroboró el papel de los residuos Asp12, Glu14, Asp66 y Asp169 como ligandos de los metales catalíticos, previamente asignado a partir de comparaciones de secuencia y estudios mutacionales (Bernad et al., 1989; Esteban et al., 1994; Soengas et al., 1992), así como el papel asignado a los residuos Thr15 (motivo Exo I) y Asn62 y Phe65 (motivo Exo II) como ligandos del ssDNA en el centro activo de exonucleolisis (de Vega et al., 1996; de Vega et al., 1998b). Gracias a esta estructura cristalográfica, se identificaron otros dos residuos que también parecían interactuar con el extremo 3' de la cadena iniciadora (ver Figura 10). Estos residuos son la Tyr148, perteneciente al motivo Kx_2h , altamente conservado en todas las DNA polimerasas de la familia B con actividad exonucleasa (de Vega et al., 1997), que interacciona con la última base 3' del ssDNA y la Leu567, perteneciente al subdominio *thumb*, la cual se encontraría contactando con las dos últimas bases del extremo 3' del ssDNA.

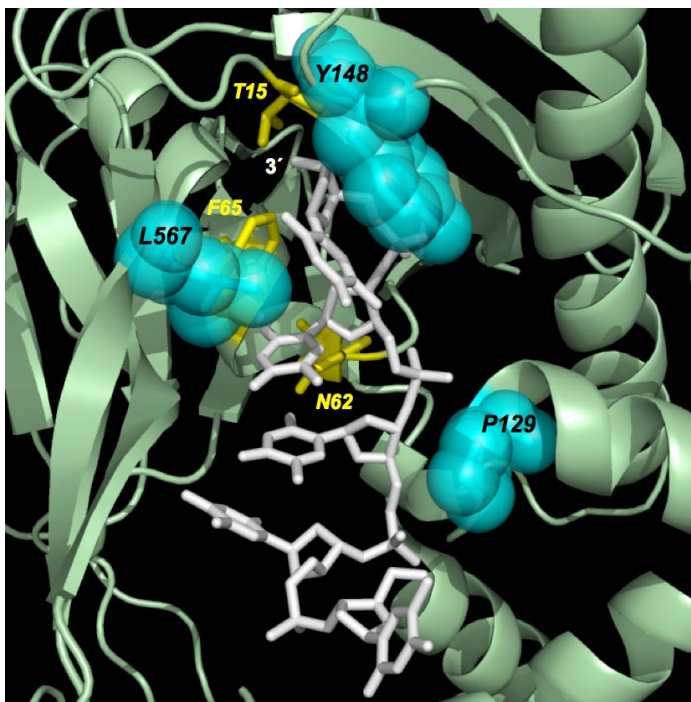


Figura 10. Estabilización de un ssDNA en el centro activo de exonucleolisis de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. En la figura se muestra un pentanucleótido (en rosa) unido en el centro activo de exonucleolisis de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (PDB 1XHZ). Se observan los residuos responsables de la estabilización del extremo 3' de la cadena iniciadora en este centro activo: Thr15 (Exo I), Asn62 y Phe65 (Exo II) en amarillo y los propuestos Pro129 ((S/T)Lx₂h), Tyr148 (Kx₂h) y Leu567 (*thumb*) en azul. La figura se hizo utilizando el software Pymol (<http://www.pymol.org>).

Además, se ha identificado un tercer residuo que podría actuar como ligando de ssDNA; la Pro129 (Kamtekar et al., 2004), un residuo no conservado perteneciente al motivo (S/T)Lx₂h, presente en las DNA polimerasas con actividad exonucleasa 3'-5' (de Vega et al., 1998a; de Vega et al., 1998b). Sin embargo, posteriores resoluciones

cristalográficas de complejos DNA polimerasa/ssDNA parecían descartar su papel como ligando de ssDNA (Berman et al., 2007).

En este capítulo analizaremos el papel de los residuos Tyr148 y Leu567 de la DNA polimerasa de Φ 29 en la estabilización del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleolisis y su contribución a la fidelidad durante el proceso de replicación. De la misma manera, estudiaremos la función de la Pro129 para determinar si juega un papel en la actividad exonucleasa 3'-5', con el fin de dilucidar la controversia funcional respecto a este residuo anteriormente mencionada.

Mutagénesis dirigida en los residuos Pro129, Tyr148 y Leu567 de la DNA polimerasa de Φ 29

Con objeto de estudiar el papel fisiológico de estos residuos, llevamos a cabo mutagénesis dirigida en dichas posiciones de la DNA polimerasa. La Pro129 fue sustituida tanto por Ala como por Gly (P129A y P129G). La Tyr148 fue sustituida por Phe (Y148F) para conservar el grupo aromático, y por Ala (Y148A) para eliminarlo. Por otra parte, la Leu567 fue sustituida por una Ala con el fin de acortar la cadena lateral (L567A). Las DNA polimerasas mutantes fueron sobreexpresadas y purificadas (ver Materiales y Métodos) para su posterior análisis bioquímico mediante una serie de ensayos *in vitro*.

Actividad exonucleasa 3'-5'

Debido a la ubicación en el centro activo exonucleasa 3'-5' de los residuos anteriormente mencionados, determinamos si las mutaciones introducidas afectaban a la degradación exonucleolítica de un ssDNA (sp1, 15mer), que es el sustrato óptimo desde el punto de vista enzimático de dicha actividad (Garmendia et al., 1992).

Como se observa en la Figura 11, la DNA polimerasa *wild-type* degrada dicho oligonucleótido de manera procesiva hasta que la longitud del sustrato es reducida a 5/6 nucleótidos, procediendo de manera distributiva a partir de esa longitud (Garmendia et al., 1992). Los mutantes P129A, P129G y Y148F presentan un patrón de degradación muy similar al generado por la proteína *wild-type*, siendo su eficiencia de degradación del 107, 71 y 82%, respectivamente (ver Tabla I). El mutante Y148A, si bien fue muy eficiente en la degradación del sustrato original, muestra un patrón de degradación significativamente diferente al de la enzima *wild-type*, comenzando la degradación distributiva desde la posición de 9mer, dando lugar a una eficiencia catalítica del 60%.

Por otra parte, el mutante L567A muestra una reducida eficiencia en la degradación inicial del sustrato (14%), así como un cambio en la procesividad de la degradación del oligonucleótido, similar al descrito para el mutante Y148A (ver Figura 11).

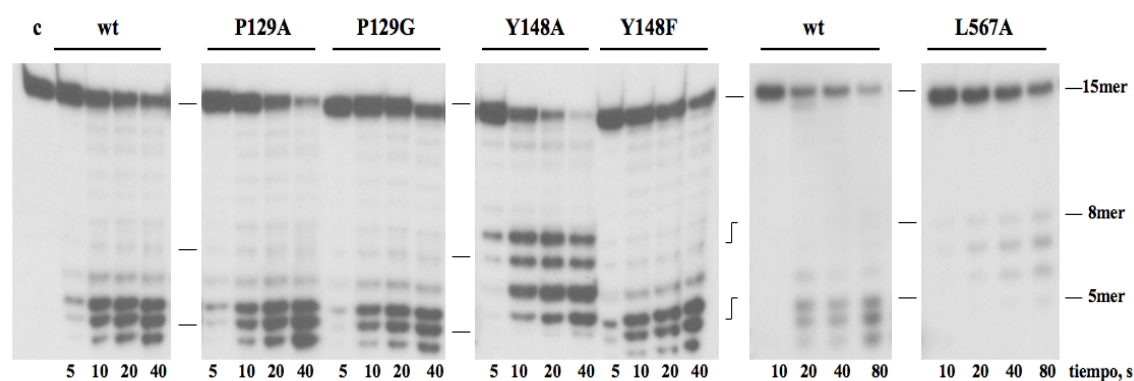


Figura 11. Actividad exonucleasa 3'-5' de las DNA polimeras *wild-type* y mutantes de $\Phi 29$ sobre ssDNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos utilizando 1.2 nM de sp1 en presencia de 6 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Después de incubar a 25 °C durante los tiempos indicados, se analizó la degradación del sustrato en geles de poliácridamida 20%-8M urea. La degradación total se calculó como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose los valores que se indican en la Tabla I.

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

Actividad ensayada	Sustrato(s)	DNA polimerasa de $\phi 29^a$					
		wt	P129A	P129G	Y148A	Y148F	L567A
Exonucleasa 3'-5'	ssDNA (sp1)	100	107	71	70	82	14
	dsDNA (sp1/sp1c+6)	100	136	73	14	75	9
Unión DNA ^b	sp1	100	76	95	22	117	3
Balance exo/pol ^c	sp1/sp1c+6, dNTPs	25/50	25/50	25/50	3.1/6.25	25/50	6.25/12.5
Iniciación TP-DNA $\phi 29$	TP-DNA, TP, dATP, Mg ²⁺ /Mn ²⁺	100/100	89/68	44/74	82/86	102/104	62/112

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

^b Estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleólisis 3'-5', definido mediante retraso en gel.

^c Los números indican la concentración de dNTPs (en nM) requerida para elongar la cadena iniciadora (15mer) hasta la longitud de 20mer.

La diferencia en el límite de degradación observada con los mutantes Y148A y L567A sugiere un papel importante para los residuos Tyr148 y Leu567 en la estabilización del extremo 3' en el centro activo exonucleasa, siendo especialmente críticos con sustratos cortos, condiciones en las cuales la interacción dependerá

exclusivamente de residuos específicos del centro activo implicados en la estabilización del extremo 3' del oligonucleótido, como se ha sugerido anteriormente (de Vega et al., 1996; de Vega et al., 1998b).

Hidrólisis de 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (*p*NP-TMP)

La actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores de las DNA polimerasas se ha estudiado históricamente sobre sustratos DNA, pero recientemente varios grupos han desarrollado otro método para analizar la integridad del centro activo de exonucleolisis mediante el uso del análogo de nucleósido 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (Hamdan et al., 2002; Kumar et al., 2004) (Figura 12). La hidrólisis de este pequeño sustrato depende exclusivamente de los residuos catalíticos responsables de la actividad exonucleasa, así como de aquellos implicados en la estabilización del nucleótido 3' del ssDNA, permitiendo el estudio de éstos independientemente de otra serie de interacciones que tengan lugar con sustratos de DNA más largos.

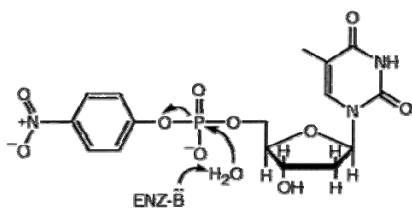


Figura 12. Estructura del *p*-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (*p*NP-TMP).

La hidrólisis de este sustrato se mide de manera continua en un espectrofotómetro, es dependiente de metal e inhibida por el producto de la reacción (TMP). Como se muestra en la Figura 13, las DNA polimerasas mutantes P129A y P129G mostraron una velocidad de degradación ligeramente afectada, siendo su eficiencia catalítica de 0.14 y 0.16 s⁻¹, respectivamente, en comparación con 0.28 s⁻¹ de la enzima *wild-type*. Sin embargo, los mutantes que mostraron mayores defectos en la degradación de ssDNA (Y148A y L567A) e incluso el mutante Y148F, aparentemente con un fenotipo *wild-type* sobre este tipo de sustratos, presentaron una reducida capacidad para hidrolizar el *p*NP-TMP. Así, las eficiencias catalíticas de los mutantes Y148F, Y148A y L567A fueron de 0.038, 0.010 y 0.006 s⁻¹, respectivamente. Este resultado está de acuerdo con un papel en la estabilización del nucleótido 3' terminal en el centro activo exonucleasa para los residuos Tyr148 y Leu567.

El hecho de que la proteína a la que se le ha introducido un cambio conservativo en el residuo Tyr148 (Y148F) no muestre un defecto en la degradación de sustratos de tipo DNA, pero sí en la hidrólisis del análogo de nucleósido pone de manifiesto la importancia de este residuo en ausencia de otros contactos adicionales en el centro

activo de exonucleolisis. La mutación de este residuo puede ser superada si el cambio realizado es por un aminoácido que contenga en su cadena lateral un grupo aromático, pero sólo en presencia de otra serie de interacciones que estabilicen el complejo DNA polimerasa/ssDNA.

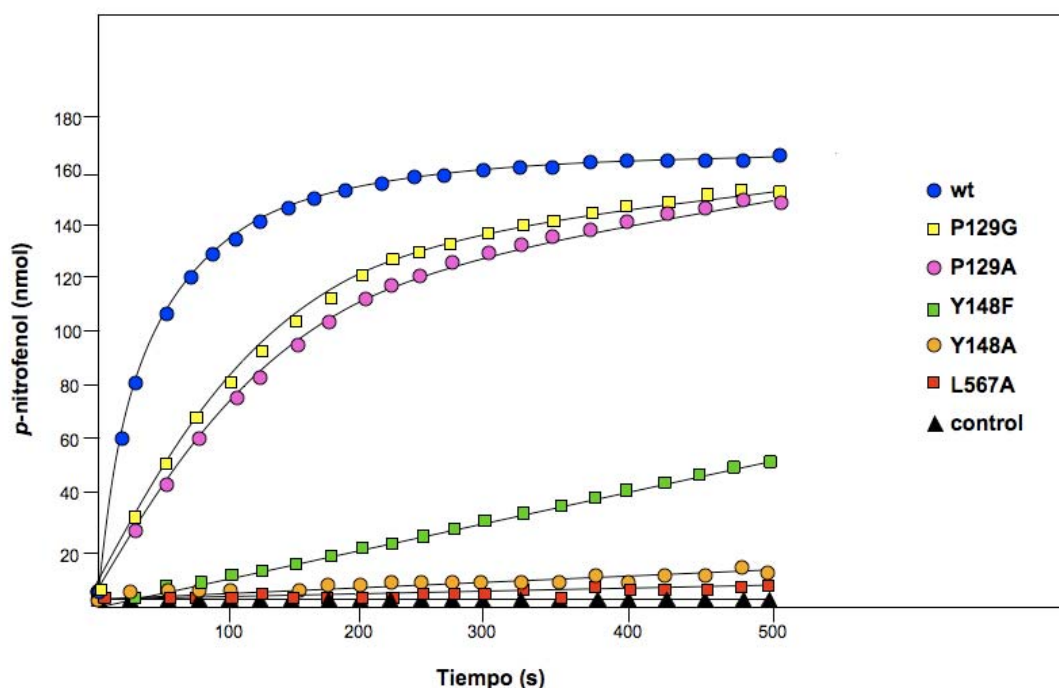


Figura 13. Hidrólisis de 5'-*p*-nitrofenil éster de timidina 5'-monofosfato (*p*NP-TMP). El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 17 μ M de la DNA polimerasa *wild-type* o mutante y 3 mM de *p*NP-TMP como sustrato a 25 °C. La eficiencia catalítica de las DNA polimerasas se determinó espectrofotométricamente monitorizando la producción de *p*-nitrofenol a 420 nm a los tiempos indicados, con el posterior ajuste mediante regresión lineal de los puntos correspondientes a los primeros tiempos de reacción. La hidrólisis no enzimática de *p*NP-TMP fue también monitorizada (triángulos negros).

Capacidad de unión a ssDNA

Para corroborar el papel de los residuos Tyr148 y Leu567 como ligandos de DNA en el centro activo exonucleasa, llevamos a cabo un ensayo de retraso en gel (ver Materiales y Métodos), utilizando como sustrato el oligonucleótido sp1 de 15 nucleótidos de longitud, en ausencia de iones metálicos para evitar su degradación exonucleolítica, condiciones en las que la unión al ssDNA depende directamente de residuos particulares de la enzima.

Como puede observarse en la Figura 14, la DNA polimerasa *wild-type* dio lugar a una única banda retrasada correspondiente a la formación de un complejo estable DNA polimerasa/DNA en el centro activo de exonucleolisis. Los mutantes P129A y

P129G presentan un comportamiento muy similar al de la proteína *wild-type*. El mutante Y148F fue capaz de producir retraso del oligonucleótido, incluso más eficientemente que la enzima *wild-type*. El mutante Y148A presentó una reducida interacción con el sustrato (Figura 14 y Tabla I). Además, el complejo Y148A/ssDNA presentó una diferente movilidad electroforética respecto al generado por la enzima *wild-type*, que podría ser un reflejo de una unión anómala probablemente causada por un cambio en la orientación y/o estabilización del extremo 3' del sustrato. El mutante L567A no fue capaz de producir ningún tipo de retraso del DNA (Figura 14). La unión inestable y/o defectuosa del ssDNA mostrada por los mutantes Y148A y L567A permiten justificar sus defectos en la actividad exonucleasa 3'-5', demostrando un papel de los residuos Tyr148 y Leu567 en la estabilización y el correcto posicionamiento de la cadena iniciadora cuando ésta se encuentra en el centro activo de exonucleolisis.

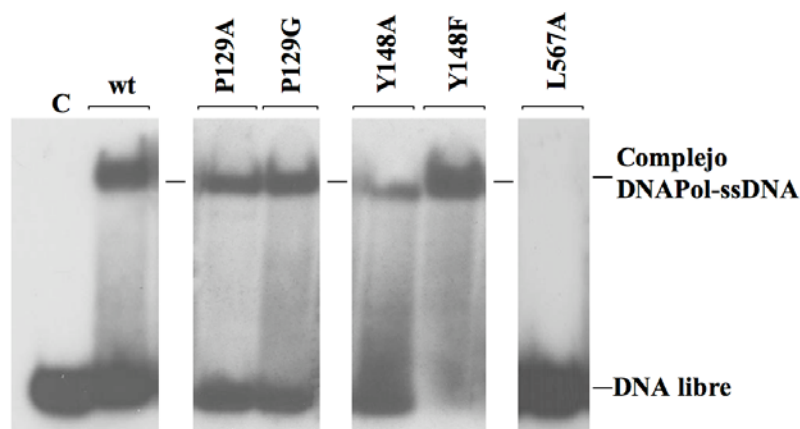


Figura 14. Interacción de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes con DNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando como sustrato el oligonucleótido sp1 marcado radiactivamente en su extremo 5', en ausencia de metal activador y en presencia de 0.5 nM de DNA polimerasa. Tras incubar 5 min a 4 °C, las bandas correspondientes a DNA libre y el complejo DNA polimerasa/DNA se detectaron por autorradiografía del gel de poliacrilamida a 4 °C.

Equilibrio Exo/pol sobre un sustrato de DNA de tipo iniciador/molde de las DNA polimerasas mutantes en los residuos Pro129, Tyr148 y Leu567

Si bien desde un punto de vista enzimático el sustrato óptimo de la actividad exonucleasa es ssDNA, el sustrato fisiológico de dicha actividad es un dsDNA con un desapareamiento en el extremo 3' de la cadena iniciadora, requiriendo una deshíbridación adicional que permita a dicho extremo alcanzar el centro activo de exonucleolisis. En estas condiciones, la fuerza de unión en dicho centro activo debe ser suficiente para competir la estabilización del extremo 3' en el centro activo de

polimerización, la cual es contribuida por el propio apareamiento de bases y por residuos específicos de la DNA polimerasa. Así pues, sería esperable que la importancia de los residuos implicados en la unión del ssDNA en el centro activo exonucleasa fuera más evidente cuando dicha actividad se ensayara sobre un sustrato tipo iniciador/molde (de Vega et al., 1996).

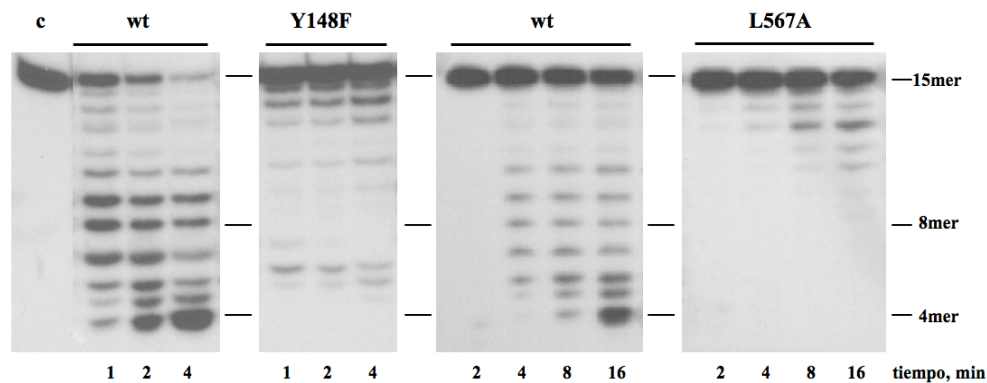


Figura 15. Actividad exonucleasa 3'-5' de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes de Φ 29 sobre dsDNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos utilizando 1.2 nM del híbrido sp1/sp1c+6 en presencia de 6 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Después de incubar a 25 °C durante los tiempos indicados, se analizó la degradación del sustrato en geles de poliacrilamida 20%-8M urea. La degradación total se calculó como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose los valores que se indican en la Tabla I.

De acuerdo con esta hipótesis, mientras que los mutantes Y148A y L567A mostraron una actividad exonucleasa sobre ssDNA reducida 1.4 y 7.1 veces, respectivamente, en comparación con la enzima *wild-type*, su actividad se redujo 7.1 y 11 veces sobre una estructura iniciador/molde (sp1/sp1c+6) (ver Figura 15, Tabla I).

Para analizar la importancia de los residuos Pro129, Tyr148 y Leu567 de la DNA polimerasa de Φ 29 en la degradación del extremo 3' de la cadena iniciadora en condiciones de polimerización se llevó a cabo un ensayo de competición de las actividades de síntesis y degradación (Exo/pol, ver Materiales y Métodos). Este ensayo permite el estudio del equilibrio dinámico entre las actividades de polimerización y de exonucleolisis, ya que la molécula empleada (sp1/sp1c+6) es sustrato de ambas. El balance entre dichas actividades depende de las velocidades relativas de las dos reacciones y de la afinidad de ambos centros activos por el extremo 3' de la cadena iniciadora (Garmendia et al., 1992). En ausencia de nucleótidos, los únicos productos detectados provienen de la actividad exonucleasa 3'-5'. Según se aumenta la concentración de nucleótidos, la exonucleolisis es competida progresivamente

Resultados

favoreciéndose la polimerización. La concentración de nucleótidos requerida para obtener una elongación eficiente puede usarse para definir la relación Exo/pol, la cual es independiente de la cantidad de complejos DNA polimerasa/DNA formados. Así pues, si la actividad exonucleasa 3'-5' estuviera específicamente afectada, dicho equilibrio estaría desplazado hacia la polimerización (baja relación Exo/pol), mientras que si la afectada fuera la actividad de polimerización, dicho equilibrio estaría desplazado hacia la actividad exonucleasa (alta relación Exo/pol).

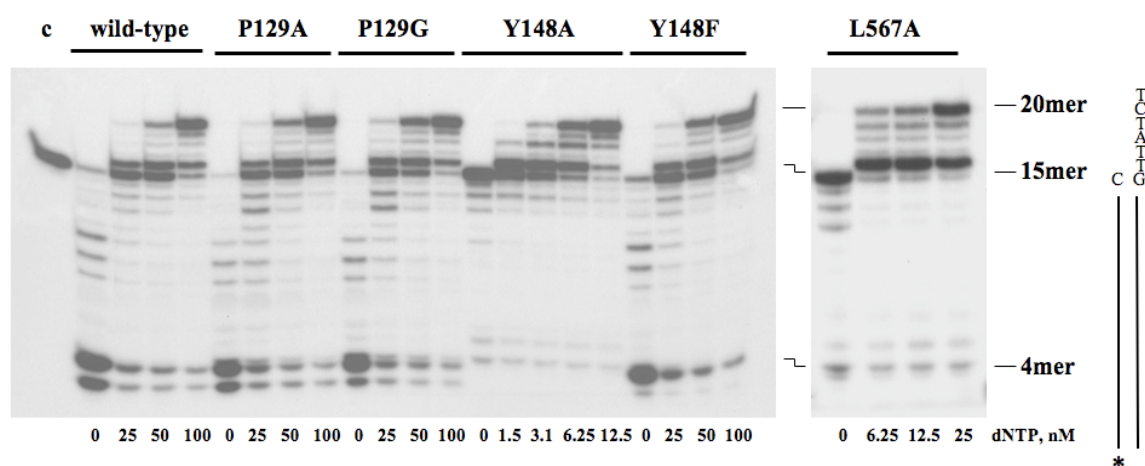


Figura 16. Balance Exo/pol de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, usando la molécula híbrida sp1/sp1c+6 como DNA iniciador/molde y las concentraciones indicadas de dNTPs. La actividad de polimerización o exonucleolisis se detectó como un aumento o disminución, respectivamente, en la longitud de la cadena iniciadora (15mer) marcada radiactivamente en su extremo 5'. La relación Exo/pol productiva se indica en la Tabla I.

Como muestra la Figura 16, los mutantes P129A, P129G y Y148F presentaron un requerimiento nucleotídico similar al de la DNA polimerasa *wild-type* (25/50 nM) para obtener una elongación eficiente de la cadena iniciadora. Sin embargo, los mutantes Y148A y L567A requirieron una concentración de dNTPs 8 y 4 veces menor, respectivamente (ver Tabla I). Como se esperaba, los residuos Pro129, Tyr148 y Leu567 no están implicados en la capacidad de polimerización de la DNA polimerasa. Por el contrario, la mejor polimerización observada por los mutantes Y148A y L567A pone de nuevo de manifiesto su importancia en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleolisis.

Las mutaciones Y148F y L567A producen un fenotipo mutador

Con el fin de determinar si la reducida actividad exonucleasa de estos mutantes afecta a la fidelidad de polimerización, realizamos un ensayo para estudiar su capacidad de incorporar y elongar un nucleótido erróneo durante la polimerización. Para ello, utilizamos la misma molécula sp1/sp1c+6 como sustrato y cantidades crecientes de dATP como único nucleótido para analizar la incorporación en posiciones no complementarias al molde. Como control de máxima incorporación errónea de dAMP llevamos en paralelo el mutante D12A/D66A que carece de actividad exonucleasa (Bernad et al., 1989) y que es capaz de elongar el sustrato hasta una longitud de 20mer, lo cual indica la incorporación de dAMP de manera no complementaria a la adenina y a la citosina de las posiciones 18 y 20, respectivamente.

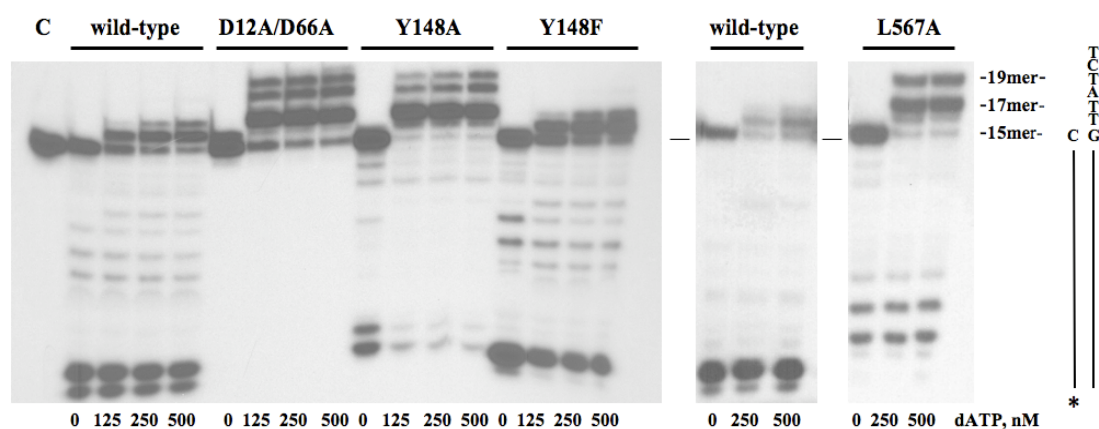


Figura 17. Inserción errónea de nucleótido durante la replicación del DNA por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, utilizando como sustrato la molécula sp1/sp1c+6, 30.3 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante y las concentraciones indicadas de dATP. Después de una incubación de 5 min a 25 °C, los productos de la reacción se analizaron en geles de poliacrilamida 20%-8M urea. A la derecha de la figura se indica la posición del iniciador no extendido (15mer) y extendido (17 y 19mer).

Como se muestra en la Figura 17, la DNA polimerasa *wild-type* prácticamente no produce incorporación estable del nucleótido erróneo, con la inserción de dAMP fundamentalmente en las posiciones complementarias 16 y 17. Sin embargo, los mutantes Y148A y L567A se comportan de manera similar al mutante D12A/D66A. La reducida fidelidad de síntesis de DNA de estos mutantes (13 veces menos que la enzima *wild-type* en ambos casos) demuestra la importancia de la estabilización del ssDNA en el centro activo exonucleasa en el mantenimiento de la fidelidad de la polimerización.

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

Como se ha mencionado anteriormente, la DNA polimerasa de $\Phi 29$ acopla el desplazamiento de banda a la síntesis procesiva de DNA en ausencia de proteínas accesorias (Blanco et al., 1989). Se había demostrado previamente que las mutaciones introducidas específicamente en los residuos catalíticos de los motivos Exo I, Exo II, Exo III y, en menor medida, del Kx_2h (de Vega et al., 1997; Esteban et al., 1994; Soengas et al., 1992) afectaban severamente a la síntesis de DNA acoplada al desplazamiento de banda, permitiendo proponer una implicación directa del centro activo de exonucleolisis en dicha capacidad de la DNA polimerasa.

Para determinar si los mutantes presentaban defectos para llevar a cabo esta reacción realizamos dos ensayos de replicación diferentes: replicación del ssDNA de M13 y replicación del TP-DNA de $\Phi 29$. En el primer ensayo, como sustrato de la replicación, se utiliza el ssDNA circular del bacteriófago M13 al cual se le hibrida un oligonucleótido específico cuyo extremo 3'-OH es utilizado por la DNA polimerasa como iniciador de la replicación. La primera ronda no requiere desplazamiento de banda, pero una vez completada, la DNA polimerasa se encuentra con el extremo 5' de la cadena iniciadora, necesitando acoplar la polimerización procesiva al desplazamiento del DNA recién sintetizado para poder continuar con la replicación del DNA (Blanco et al., 1989).

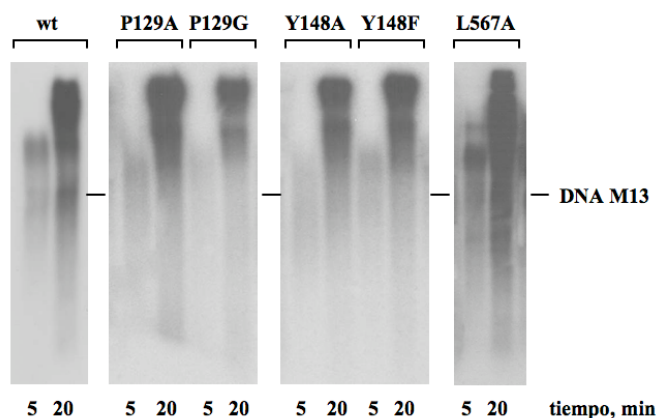


Figura 18. Desplazamiento de banda acoplado a la replicación del DNA de M13 por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. La replicación del DNA de M13 primado se llevó a cabo empleando 40 μ M dNTPs y 16.8 nM de DNA polimerasa. Después de una incubación durante los tiempos indicados a 30 $^{\circ}$ C, la longitud de los productos sintetizados fue analizada por electroforesis en gel de agarosa alcalino. La posición de la molécula unidad se indica a la derecha.

Como se observa en la Figura 18, todos los mutantes ensayados fueron capaces de replicar este sustrato con una eficiencia similar a la mostrada por la enzima *wild-type*, lo que nos llevó a descartar defectos en el acoplamiento de la polimerización al desplazamiento de banda.

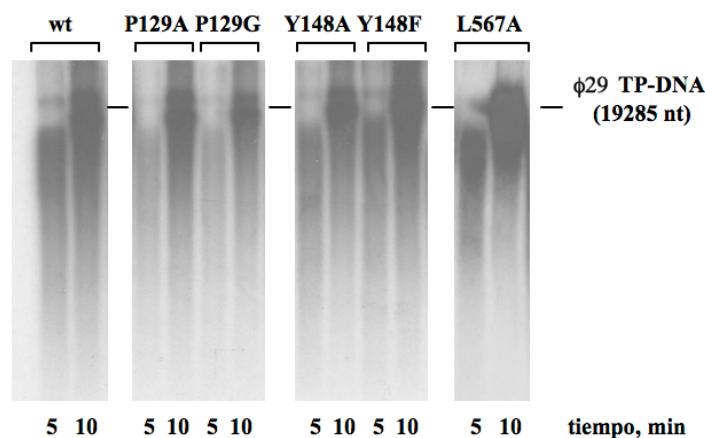


Figura 19. Replicación del TP-DNA de Φ 29 por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 13 nM de TP y 3 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Después de la incubación durante 5 y 10 min a 30 °C, la longitud de los productos sintetizados fue analizada por electroforesis en gel de agarosa alcalino. Se indica la posición a la que migra la molécula unidad del TP-DNA de Φ 29.

Como se ha explicado en la Introducción, la replicación del genoma de Φ 29 se inicia con la formación de un complejo covalente entre dAMP y el grupo -OH de la Ser 232 de la TP, siendo dicha reacción catalizada por la DNA polimerasa y dirigida por un molde. Dicho complejo de iniciación es posteriormente elongado, de manera acoplada al desplazamiento de banda, para finalmente dar lugar a una nueva molécula de Φ 29 TP-DNA (Salas, 1991).

Como se puede observar en la Figura 19, todas las DNA polimerasas mutantes fueron capaces de llevar a cabo la replicación completa del DNA de Φ 29 con una eficiencia similar a la mostrada por la enzima *wild-type*. Tampoco se detectó ningún defecto en la iniciación de la replicación (Tabla I).

Los resultados mostrados en este capítulo ponen de manifiesto la importancia de los residuos Tyr148 y Leu567 de la DNA polimerasa de Φ 29 para la estabilización específica y el correcto posicionamiento del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleolisis. Mutaciones en estas posiciones afectan directamente a

Resultados

dicha actividad y, como consecuencia, a la fidelidad de la replicación. Por otra parte, validan las últimas estructuras cristalográficas de la DNA polimerasa unida a un ssDNA en la que no se sugería una implicación, al menos directa, del residuo Pro129 en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo exonucleasa (Berman et al., 2007).

Poco tiempo después de comenzar esta Tesis Doctoral, se publicó la resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Kamtekar et al., 2004) que mostraba cómo el subdominio TPR2, presente específicamente en DNA polimerasas que inician la replicación utilizando una proteína como iniciador, participa en la formación de dos túneles con carácter electropositivo en el dominio de polimerización que convergerían en el centro activo. Uno de ellos, también formado por el dominio exonucleasa y los subdominios *fingers* y *palm*, es estrecho ($<10\text{\AA}$) y a su través se une exclusivamente la cadena molde *downstream*, siendo la base estructural del desplazamiento de banda de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Kamtekar et al., 2004; Rodríguez et al., 2005) (ver Figura 20A). El TPR2, junto con los subdominios *palm*, *thumb* y TPR1 forman los bordes de una segunda abertura anular que rodearía el producto dsDNA *upstream*, confiriendo procesividad a la enzima (Rodríguez et al., 2005) (Figura 20A).

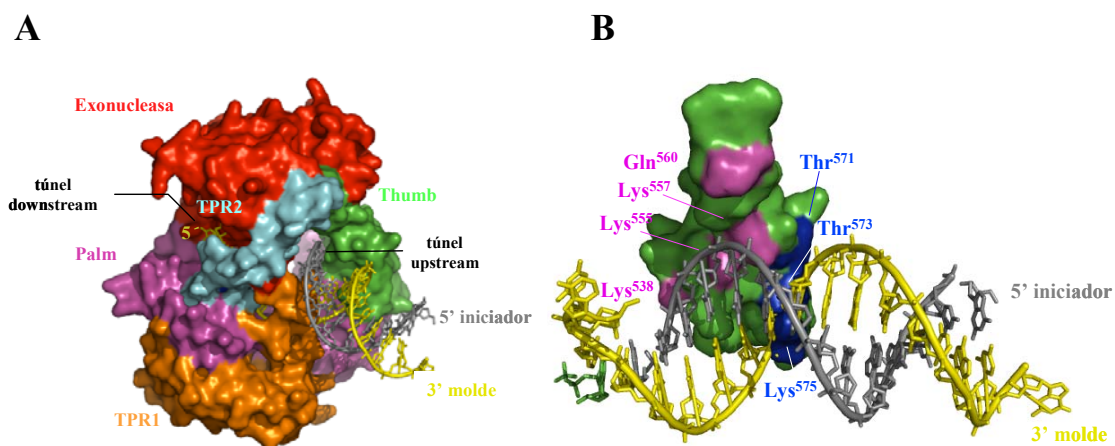


Figura 20. Subdominio *thumb* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. (A) Modelado de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (PDB 1XHX) con el DNA procedente del complejo ternario de RB69 (PDB IG9) (Franklin et al., 2001). Se muestra el dominio exonucleasa en rojo, los subdominio *palm*, *thumb* y TPR1 en morado, verde y naranja, respectivamente. Las cadenas iniciadora y molde del DNA se indican en gris y amarillo, respectivamente. (B) El subdominio *thumb* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ interacciona con el DNA a través del surco menor de este último. Se muestran los residuos propuestos como ligandos del DNA, mostrándose en violeta los que interaccionarían con la cadena iniciadora y en azul los que lo harían con la cadena molde.

Mediante la superposición de los subdominios *palm* de las DNA polimerasas de $\Phi 29$ y RB69, modelamos el DNA del complejo ternario de esta última (Franklin et al., 2001) sobre la estructura de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. El estudio detallado de este modelado, nos permitió identificar los residuos electropositivos y polares Lys538, Lys555, Lys557, Gln560, Thr571, Thr573 y Lys575, todos ellos pertenecientes al subdominio *thumb* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (el cual tiene una estructura inusual de β -hairpin), situados lo suficientemente cerca del DNA como para establecer

contactos con éste a través de su surco menor. Como se muestra en la Figura 20B estos residuos podrían ser agrupados en dos grupos: Lys538, Lys555, Lys557 y Gln560, los cuales contactarían con la cadena iniciadora, y Thr571, Thr573 y Lys575 que lo harían con la cadena molde, sugiriendo una división funcional de los residuos del subdominio *thumb* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. Su posición en la DNA polimerasa, así como resultados previos en los que la delección de los últimos 13 residuos pertenecientes a este subdominio afectaba a la procesividad y a la capacidad de unión al DNA de la enzima (Truniger et al., 2004a), nos indujeron a proponer un papel como ligandos de DNA para estos residuos.

La ausencia de homología de secuencia de este subdominio entre diferentes DNA polimerasas no permite un alineamiento múltiple de esta región, quedando restringido únicamente al subgrupo de DNA polimerasas de la familia B que utilizan una proteína como iniciador de la replicación. En base a este alineamiento, se vio que los residuos Lys555 y Lys575 están conservados en todos los miembros de este subgrupo, mientras que Lys538, Lys557, Gln560 y Thr573 sólo lo están en las DNA polimerasas de los fagos relacionados con $\Phi 29$.

Mutagénesis dirigida en los residuos Lys538, Lys555 y Lys557, Gln560, Thr571, Thr573 y Lys575 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$

Con el fin de estudiar el papel fisiológico de los residuos descritos anteriormente llevamos a cabo mutagénesis dirigida en dichos residuos. Todos ellos fueron cambiados a Ala para eliminar la carga positiva de las Lys y el grupo polar de la Thr y de la Gln (K538A, K555A, K557A, Q560A, T571A, T573A y K575A). Estas DNA polimerasas mutantes, sobreexpresadas y purificadas como está descrito en Materiales y Métodos (Lázaro et al., 1995), fueron analizadas mediante ensayos *in vitro*.

Actividad exonucleasa 3'-5'

La actividad exonucleolítica de los mutantes se determinó utilizando el mismo tipo de ensayos que los descritos en el capítulo anterior, empleando como sustrato de banda simple el oligonucleótido spl1 (ver Materiales y Métodos). Todos los mutantes presentaron un patrón de degradación muy semejante al generado por la enzima *wild-type*, con una eficiencia de degradación mayor (K538A), similar (K555A, K557A, T571A, T573A y K575A) o menor (Q560A) (ver Tabla II).

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

Actividad ensayada	Sustrato(s)	DNA polimerasa de $\phi 29^a$							
		wt	K538A	K555A	K557A	Q560A	T571A	T573A	K575A
Exonucleasa 3'-5'	ssDNA (sp1)	100	164	77	73	22	68	67	88
	dsDNA (sp1/sp1c+6)	100	264	44	82	49	157	115	164
Balance exo/pol ^b	sp1/sp1c+6, dNTP	25/50	1000	25	25/50	25/50	25/50	1000	100/200
Unión DNA	Exo ^c sp1	100	155	110	75	7	144	72	79
	Pol ^d sp1/sp1c+6	100	<2	80	23	13	110	6	55
Replicación TP-DNA $\phi 29$	TP-DNA $\phi 29$, dNTP	100	n.d.	37	56	43	130	8	91
Iniciación TP-DNA $\phi 29$	Mg ²⁺ TP-DNA $\phi 29$, TP, dATP	100	62	74	51	57	112	76	83
	Mn ²⁺ TP-DNA $\phi 29$, TP, dATP	100	106	82	95	50	122	97	110

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

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

^c Estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleólisis 3'-5', definido mediante retraso en gel.

^d Estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización, definido por retraso en gel de una estructura molde/iniciador.

Curiosamente, cuando se ensayó esta actividad en presencia de dsDNA (sp1/sp1c+6), la actividad de los mutantes K538A, Q560A, T571A, T573A y K575A fue mayor que en el ensayo en el que se utilizó ssDNA como sustrato, siendo en la mayoría de ellos (excepto el mutante Q560A) incluso mayor que la mostrada por la enzima *wild-type* (ver Tabla II).

Estos resultados sugerían un defecto específico en la estabilización del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización en el caso de estos mutantes, favoreciendo la degradación del sustrato. Por el contrario, como se puede ver en la Figura 21, el mutante K555A mostró una menor actividad exonucleasa sobre dsDNA que sobre ssDNA.

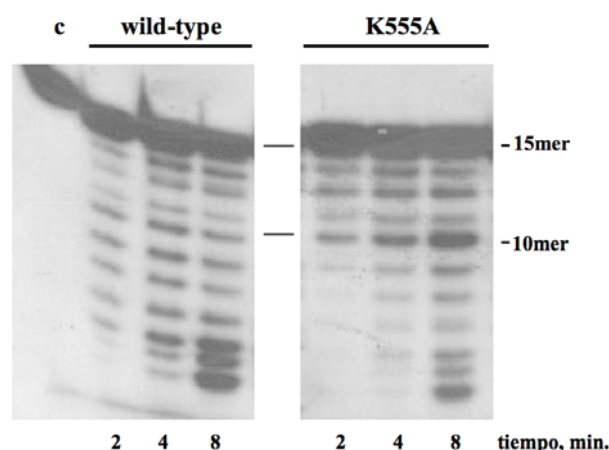


Figura 21. Actividad exonucleasa 3'-5' del mutante K555A de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, utilizando 1.2 nM de sp1/sp1c+6, en presencia de 6 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Después de incubar a 25 °C durante los tiempos indicados, se analizó la degradación del sp1 (15mer) en geles de poliacrilamida 20%-8M urea. La degradación total se calculó como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose los valores que se indican en la Tabla II.

Intercambio del extremo 3' de la cadena iniciadora entre los centros activos de polimerización y exonucleolisis en las DNA polimerasas mutantes

Como se describió en el capítulo anterior, la molécula sp1/sp1c+6 es útil para evaluar la capacidad de polimerización en función de la concentración de nucleótidos (balance Exo/pol). Como se muestra en la Tabla II, las DNA polimerasas mutantes K557A, Q560A y T571A presentaron el mismo requerimiento nucleotídico (25/50 nM dNTPs) que la enzima *wild-type* para conseguir un balance de polimerización neto, por lo que podemos concluir que estas mutaciones no afectan a la actividad polimerasa de la enzima, al menos bajo condiciones en las que la cadena iniciadora es DNA.

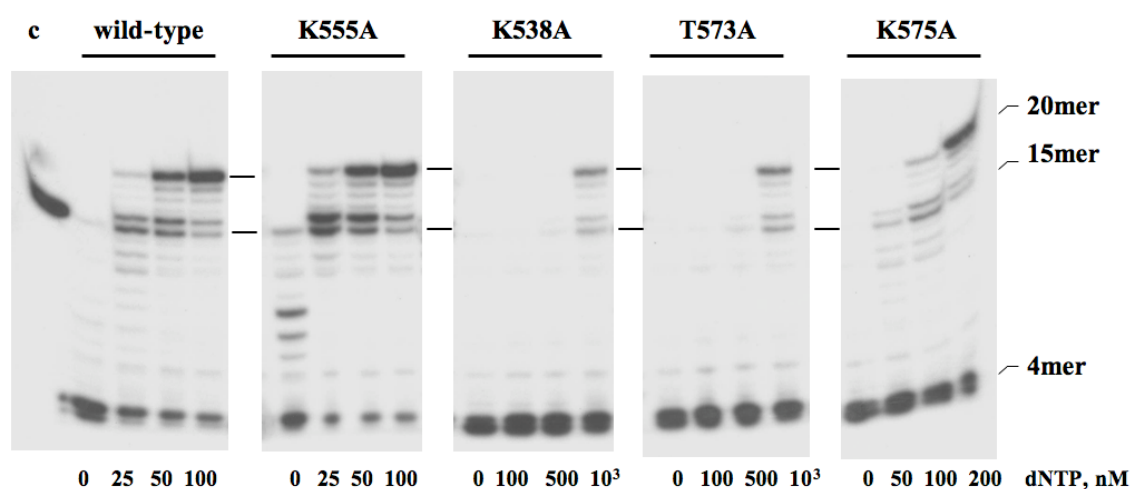


Figura 22. Balance Exo/pol de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, usando la molécula híbrida sp1/sp1c+6 como DNA iniciador/molde y las concentraciones indicadas de dNTPs. La actividad de polimerización o exonucleolisis se detectó como un aumento o disminución, respectivamente, en la longitud de la cadena iniciadora (15 mer) marcada radiactivamente en su extremo 5'. La relación Exo/pol productiva se indica en la Tabla II.

Sin embargo, como se puede ver en la Figura 22, los mutantes K538A, T573A y K575A requirieron una concentración 20 (en el caso de los dos primeros) y 4 veces (en el caso del último) superior a la requerida por la enzima *wild-type*, mostrando una fuerte actividad exonucleasas 3'-5' sobre un dsDNA (Figura 22). La baja actividad de polimerización mostrada por estos mutantes podría ser una consecuencia de un defecto en la estabilización y/u orientación del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización que diera lugar a una mayor actividad exonucleasa. Debido a la relación Exo/pol *wild-type* del mutante T571A, su mayor actividad exonucleasa 3'-5' sobre dsDNA (descrita en el apartado anterior) no puede ser explicada por una

interacción defectuosa en el centro activo de polimerización, sino por una mayor estabilización del complejo DNA polimerasa/DNA. Por el contrario, el mutante K555A requirió una concentración de dNTPs dos veces menor para conseguir una polimerización neta (Figura 22). Este resultado indica que este residuo no está implicado en la actividad de polimerización de la DNA polimerasa y que la mejor polimerización observada puede ser justificada por su menor actividad exonucleasa 3'-5', debido probablemente a un defecto en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleolisis.

La mutación K555A produce un fenotipo mutador

Era lógico pensar que la reducida actividad exonucleasa del mutante K555A tendría que afectar de alguna manera a la fidelidad de polimerización. Para estudiar este aspecto, realizamos el ensayo de fidelidad descrito en el capítulo anterior, provocando la incorporación de dATP en posiciones no complementarias al molde. Para ello utilizamos la molécula sp1/sp1c+6 y cantidades crecientes de dATP. Como puede observarse en la Figura 23, el mutante K555A fue capaz de insertar, y posteriormente elongar, nucleótidos no complementarios al molde, dando lugar a una banda tenue en posición 19, mostrando una reducción de cuatro veces en su fidelidad respecto a la enzima *wild-type*, como consecuencia de su baja relación Exo/pol. Como control de máxima incorporación estable de dATP ensayamos en paralelo el mutante D12A/D66A (Bernad et al., 1989).

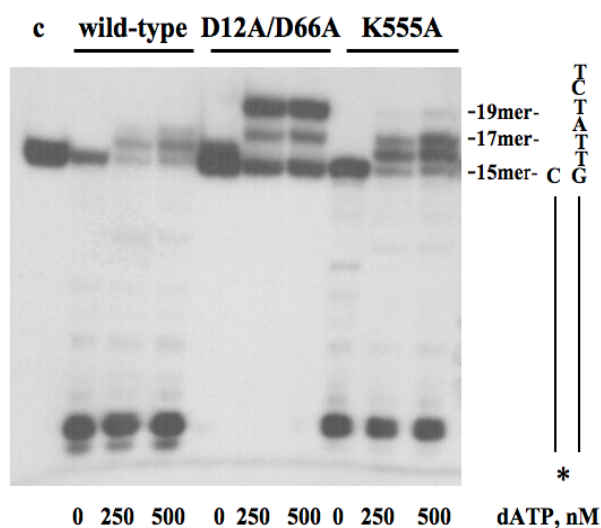


Figura 23. Inserción errónea de nucleótido durante la replicación del DNA por la DNA polimerasa mutante K555A. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, utilizando como sustrato la molécula sp1/sp1c+6, 30.3 nM DNA polimerasa *wild-type* o mutante y las concentraciones indicadas de dATP. Después de una incubación de 5 min a 25 °C, los productos de la reacción se analizaron en geles de poliacrilamida 20%-8 M urea. A la derecha de la figura se indica la posición del iniciador no extendido (15mer), extendido (17 y 19mer) o degradado (3mer).

Las mutaciones en los residuos Lys538, Gln560 y Thr573 dificultan la unión de moléculas dsDNA tipo molde/iniciador en el centro activo de polimerización de la DNA polimerasa de $\Phi 29$

Para estudiar la capacidad de las enzimas mutantes de reconocer eficientemente la estructura del DNA dúplex, llevamos a cabo ensayos de retraso en gel usando la molécula iniciador/molde sp1/sp1c+6 y Mg^{2+} como metal activador. Bajo tales condiciones, la enzima *wild-type* forma un complejo estable competente para la polimerización, dando lugar a una banda retrasada cuya intensidad es dependiente de la cantidad de enzima presente en el ensayo.

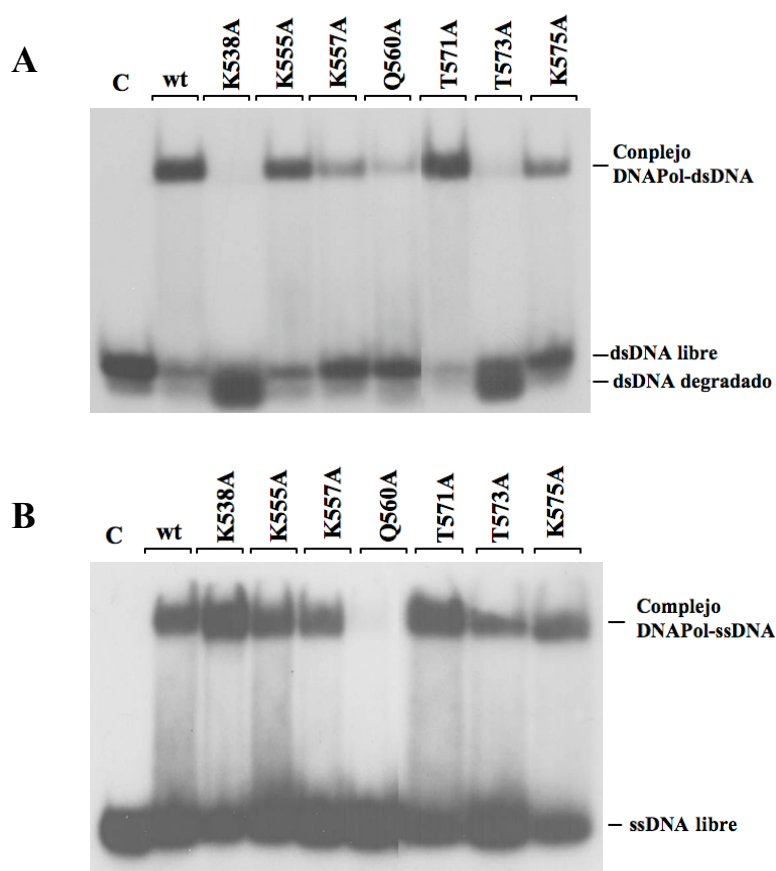


Figura 24. Interacción de las DNA polimerasas mutantes con DNA. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando como sustrato la molécula híbrida sp1/sp1c+6 en presencia de Mg^{2+} en (A) y el oligo sp1 marcado radiativamente en su extremo 5', en ausencia de metal activador en (B). Las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida a 4 °C. Las bandas corresponden al DNA libre, al complejo DNA polimerasa/DNA y al DNA degradado, como se indica a la derecha de la figura.

Como se observa en la Figura 24A, el mutante K555A fue capaz de llevar a cabo una interacción estable con el DNA a un nivel similar al que presenta la enzima *wild-type*. Sin embargo, en dichas condiciones, no se detectó una interacción estable con el

sustrato en el caso de las DNA polimerasas mutantes K538A y T573A, indicando un defecto de unión al centro activo de polimerización. Como consecuencia de esta interacción deficiente, la mayor parte del sustrato fue degradado por la actividad exonucleasa 3'-5'. Por otra parte, los mutantes K557A, Q560A y K575A presentaron también una disminución en la eficiencia de unión, detectándose una banda retrasada de menor intensidad. Al contrario de lo que sucede con los mutantes anteriormente mencionados, el mutante T571A es capaz de unir el dsDNA de manera incluso más eficiente que la DNA polimerasa *wild-type*. Este resultado está de acuerdo con la mayor actividad exonucleasa 3'-5' sobre dsDNA y con su relación Exo/pol *wild-type*.

Cuando se utilizó como sustrato ssDNA (Figura 24B) todas las polimerasas mutantes fueron capaces de llevar a cabo una interacción estable con el DNA a un nivel similar al que presenta la enzima *wild-type*, excepto el mutante Q560A en el cual no se detectó interacción. El hecho de que este mutante presente defectos al unir tanto ssDNA como dsDNA parece indicar que el residuo Gln560 podría ser un ligando de la cadena iniciadora en ambos centros activos de la DNA polimerasa.

Capacidad de desplazamiento de banda de las DNA polimerasas mutantes

Utilizando el sistema mínimo de replicación, basado en TP-DNA, TP y DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Blanco et al., 1989) estudiamos esta capacidad de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes.

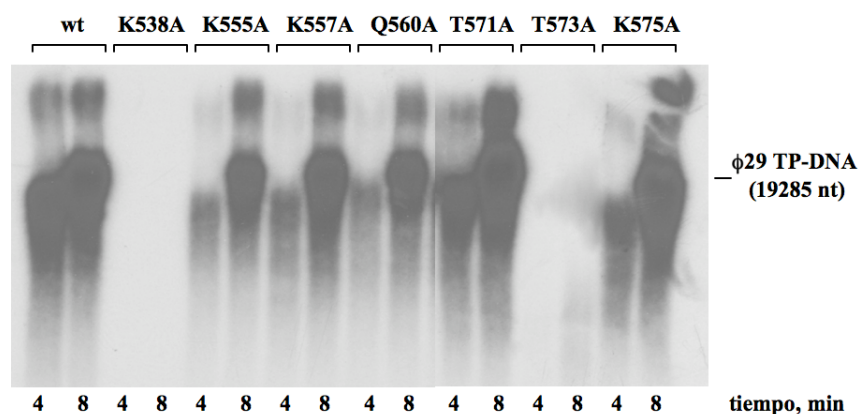


Figura 25. Replicación del TP-DNA de $\Phi 29$ por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 13 nM de TP y 3 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Después de la incubación durante 4 y 8 min a 30 °C se calcularon los valores de actividad relativa (ver Tabla II) y la longitud de los productos sintetizados fue analizada por electroforesis en gel de agarosa alcalino. Se indica la posición a la que migra la molécula unidad del TP-DNA de $\Phi 29$.

Las DNA polimerasas mutantes K555A, K557A, Q560A, T571A, T573A y K575A fueron capaces de sintetizar la molécula completa de TP-DNA, lo que nos llevó a descartar defectos en el desplazamiento de banda (Figura 25). Sin embargo, los mutantes K538A y T573A presentaron una actividad fuertemente reducida con respecto a la enzima *wild-type*. Este defecto en la replicación del TP-DNA no era debido a una iniciación deficiente o a una pobre interacción con la TP ya que todos los mutantes fueron capaces de iniciar con unos niveles similares a los de la enzima *wild-type* (ver Tabla II) y tampoco eran debidos a defectos en la procesividad ni el desplazamiento de banda (demostrado por ensayos de replicación del DNA de M13 no mostrados), sino que reflejaban defectos específicos en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización.

El estudio bioquímico de las actividades de síntesis y de degradación, así como la coordinación de dichas actividades de mutantes puntuales en los residuos Lys538, Lys555, Lys557, Gln560, Thr571, Thr573 y Lys575 de la DNA polimerasa de Φ 29 nos permite proponer un papel en la estabilización del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización para los residuos Lys538, Thr573 y Lys575, un papel como ligando de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleolisis para la Lys555 y, por último, un papel general de unión a DNA y estabilización de éste en ambos centros activos para la Gln560.

Estos resultados sugieren un papel central del subdominio *thumb* en la coordinación de las actividades de síntesis y degradación de la DNA polimerasa de Φ 29.

El motivo Dx₂SLYP, presente en las DNA polimerasas de tipo eucariótico, contiene un Asp catalítico absolutamente conservado y un residuo de Tyr encargado de discriminar contra ribonucleótidos (Asp249; Blasco et al., 1993b y Tyr254; Bonnin et al., 1999, en la DNA polimerasa de Φ 29, respectivamente). Como se puede ver en el alineamiento mostrado en la Figura 26 y en Blanco et al. (1991), las DNA polimerasas que utilizan una proteína terminal como iniciador presentan un residuo de Val y otro de Asn situados de manera inmediatamente posterior en la secuencia a dicho Asp catalítico, estando ambos residuos específicamente conservados en este subgrupo de DNA polimerasas.

		<u>Dx₂SLYP</u>
Adenovirus	/540/	YVYD [●] ICGM [●] Y-AS
pSKL	/637/	IVAD [●] VV [●] SLYP [●] SA
pGKL-2	/633/	VYAD [●] VV [●] SLYP [●] SA
pAI-2	/819/	HSYD [●] INS [●] LYP [●] SA
kalilo	/631/	KSYD [●] VNS [●] LYP [●] EFA
maranhar	/625/	FSFD [●] EN [●] SLYP [●] TA
Gelasinospora	/648/	KSYD [●] VNS [●] LYP [●] FC
S1	/494/	YYD [●] VNS [●] LYP [●] PSS
<i>B. napus</i>	/554/	NYD [●] VNS [●] LYP [●] PYV
<i>F. velutipes</i>	/542/	YRYD [●] VNS [●] LYP [●] PAV
pMC3-2	/530/	KSYD [●] CNS [●] IYP [●] YC
pAL2-1	/671/	RYD [●] VNS [●] LYP [●] FEV
pCLK-1	/668/	YYD [●] VNS [●] LYP [●] EFA
<i>P. kluveri</i>	/701/	YYD [●] VNS [●] FYP [●] PAV
pEM	/441/	YHYD [●] MNS [●] OYP [●] YA
<i>P. purpurea</i>	/257/	FHYD [●] ENS [●] HYP [●] PSS
pGKL-1	/646/	LCLD [●] VK [●] SLYP [●] PAS
PRD1	/217/	KVYD [●] VNS [●] MY [●] PHA
CP1	/244/	DIYD [●] INS [●] MY [●] PAT
GA1	/246/	MVFD [●] VNS [●] MY [●] PAM
M2	/243/	MVFD [●] VNS [●] LYP [●] SQ
B103	/243/	MVFD [●] VNS [●] LYP [●] SQ
PZA	/243/	MVFD [●] VNS [●] LYP [●] PAQ
NF	/243/	MVFD [●] VNS [●] LYP [●] SQ
ϕ 29	/246/	MVFD [●] VNS [●] LYP [●] PAQ

Figura 26. Alineamiento múltiple del motivo Dx₂SLYP de las DNA polimerasas que utilizan una proteína como iniciador. La secuencia y nomenclatura de las DNA polimerasas se muestran como fueron recopiladas en Braithwaite e Ito (1993), con la excepción de las DNA polimerasas de plásmidos lineales de mitocondrias de *Gelasinospora sp* (número de acceso S62752), *Brassica napus* (NP862323), *Flammolives velutipes* (BAB13499), *Pichia kluveri* (T28426) y *Porphyra purpurea* (NP049297); y de las DNA polimerasas de los bacteriófagos Nf (González-Huici, 2001), PZA (PO6950), B103 (CAA67649) y Cp1 (Q37989). Los números entre barras indican el número de aminoácidos existente entre el extremo N-terminal de cada DNA polimerasa y el primer aminoácido alineado. Los residuos de Val y Asn se muestran en verde y amarillo sobre fondo negro, respectivamente. El Asp catalítico y la Tyr encargada de discriminar contra ribonucleótidos (Bonnin et al., 1999) aparecen en azul y rosa, respectivamente. Otros residuos altamente conservados aparecen en letras blancas sobre fondo negro. Los círculos negros indican los residuos Val250 y Asn251 de la DNA polimerasa de Φ 29.

Resultados

La reciente resolución cristalográfica del complejo ternario de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Berman et al., 2007) muestra cómo la Val250 forma parte del bolsillo encargado de acomodar el dNTP entrante y participa, junto con los fosfatos α y γ de éste y con los residuos catalíticos Asp249 y Asp458, en la coordinación del metal B durante la catálisis de la actividad de polimerización (Figura 27A).

Por otra parte, alineamientos múltiples de secuencias de las DNA polimerasas de la familia B, permitieron identificar el motivo conservado LExE en el centro activo de polimerización (Braithwaite e Ito, 1993), situado en la proximidad del motivo YxDTDS que contiene el segundo Asp catalítico en estas DNA polimerasas.

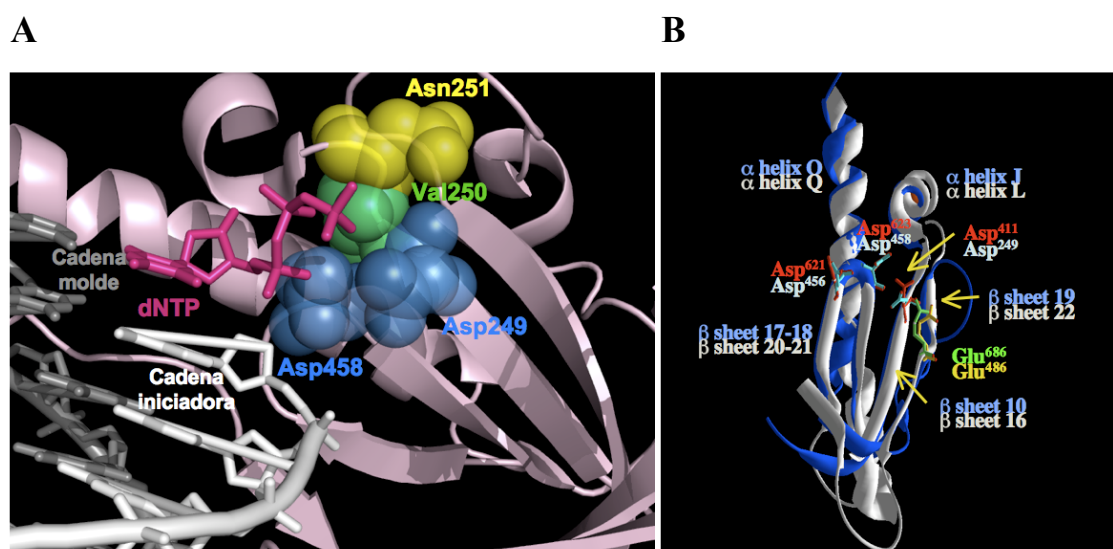


Figura 27. Identificación de residuos conservados pertenecientes al subdominio *palm* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. (A) Val250 y Asn251 (en verde y amarillo, respectivamente) pertenecientes al motivo Dx₂SLYP del subdominio *palm* (en rosa). El primero parece participar en la coordinación del metal B, junto a los Asp catalíticos que se representan en azul en la figura. También se muestra el dNTP entrante en color fucsia y las cadenas iniciadora (en blanco) y molde (en gris) del DNA dúplex unido al centro activo de polimerización. (B) La superposición de los subdominios *palm* de las DNA polimerasas de $\Phi 29$ (en blanco) y RB69 (en azul) nos ha permitido identificar en la de $\Phi 29$ el residuo Glu486 (en amarillo), homólogo al Glu686 (en verde) de RB69, implicado en la unión de metal. En la figura se señalan también los Asp catalíticos de ambas DNA polimerasas (en rojo los de RB69 y en azul celeste los de $\Phi 29$). La figura se hizo utilizando el software Pymol (<http://www.pymol.org>) en (A) y SwissPDBViewer (<http://www.expasy.ch/spdbv>) en (B).

La resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de RB69 permitió proponer un papel para el residuo Glu686 (correspondiente al segundo Glu del motivo LExE) en la unión indirecta del fosfato γ y del dNTP entrante a través de la coordinación de un tercer ión metálico no catalítico y una molécula de agua en el centro activo de polimerización (Zakharova et al., 2004). Gracias a dicho alineamiento y a la

superposición de los subdominios *palm* de las DNA polimerasas de RB69 y de $\Phi 29$ identificamos el residuo Glu486 de esta última como el homólogo del Glu686 de RB69 (Figura 27B).

Mutagénesis dirigida en los residuos Val250, Asn251 y Glu486 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$

Con objeto de estudiar el papel fisiológico de los residuos de Val, Asn y Glu anteriormente mencionados, llevamos a cabo mutagénesis dirigida de los residuos Val250, Asn251 y Glu486 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. De esta forma, la Val250 fue sustituida por Ala (V250A), la Asn251 fue sustituida por Asp (N251D) introduciendo una carga negativa y el Glu486 fue sustituido tanto por Asp para conservar la carga negativa (E486D) como por Ala para eliminarla (E486A). Estas DNA polimerasas mutantes fueron sobreexpresadas y purificadas (ver Materiales y Métodos) para su análisis bioquímico mediante una serie de ensayos *in vitro*.

Interacción de las DNA polimerasas mutantes con dsDNA

La capacidad de estos mutantes de interaccionar con un DNA de estructura iniciador/molde fue estudiada mediante un ensayo de retraso en gel utilizando la molécula sp1/sp1c+6, en presencia de Mg^{2+} (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 28, la DNA polimerasa *wild-type* dio lugar a una única banda retrasada, que correspondería a un complejo estable DNA polimerasa-dsDNA en el cual el extremo de la cadena iniciadora se encuentra perfectamente estabilizado en el centro activo de polimerización (Méndez et al., 1994). Como se puede observar, los mutantes ensayados mostraron unos niveles de interacción iguales (en el caso de los mutantes E486A y E486D) o ligeramente inferiores (V250A y N251D) a los mostrados por la enzima *wild-type*.

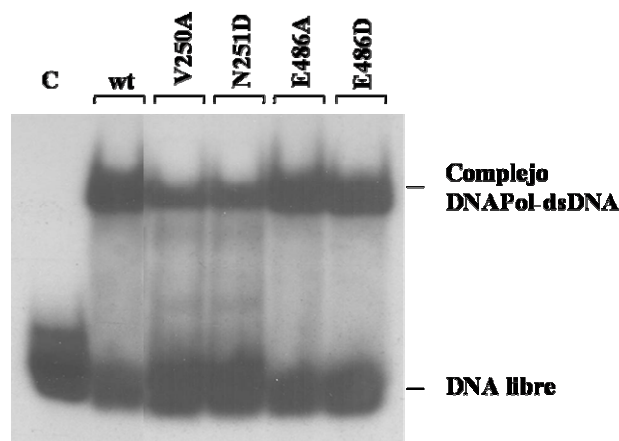


Figura 28. Ensayo de retraso en gel de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, utilizando como sustrato 0.7 nM de la molécula sp1/sp1c+6 y 1.9 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. Las bandas correspondientes a los complejos DNA polimerasa/dsDNA y dsDNA libre se indican a la derecha de la figura.

Balance de las actividades de polimerización y exonucleolisis de las DNA polimerasas mutantes en el subdominio *palm*

Inicialmente estudiamos la actividad exonucleasa 3'-5' de las DNA polimerasas mutantes, analizando la capacidad de degradar dsDNA (sp1/sp1c+6; ver Materiales y Métodos). Todos los mutantes mostraron un patrón de degradación similar al de la enzima *wild-type*, indicando que ninguno de ellos estaba específicamente afectado en esta actividad (ver Tabla III), como era de esperar por su ubicación en el centro activo de polimerización.

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

Actividad ensayada	Sustrato(s)	DNA polimerasa de ϕ 29 ^a				
		wt	V250A	N251D	E486A	E486D
Unión DNA ^b	sp1/sp1c+6	100	81	82	98	96
Exonucleasa 3'-5'	dsDNA (sp1/sp1c+6)	100	72	73	82	100
Balance exo/pol ^c	sp1/sp1c+6, dNTPs	25/50	12.2/25	12.5/25	>100	100
Replicación M13	DNA M13 primado, dNTPs	100	95	96	25	29
Replicación TP-DNA ϕ 29	TP-DNA ϕ 29, dNTPs	100	128	124	1	5

^a Los números indican el porcentaje medio de actividad relativo a la enzima *wild-type* obtenido de varios experimentos. En todos los casos se utilizó Mg²⁺ como metal activador.

^b Estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización, definido mediante retraso en gel de una estructura molde/iniciador.

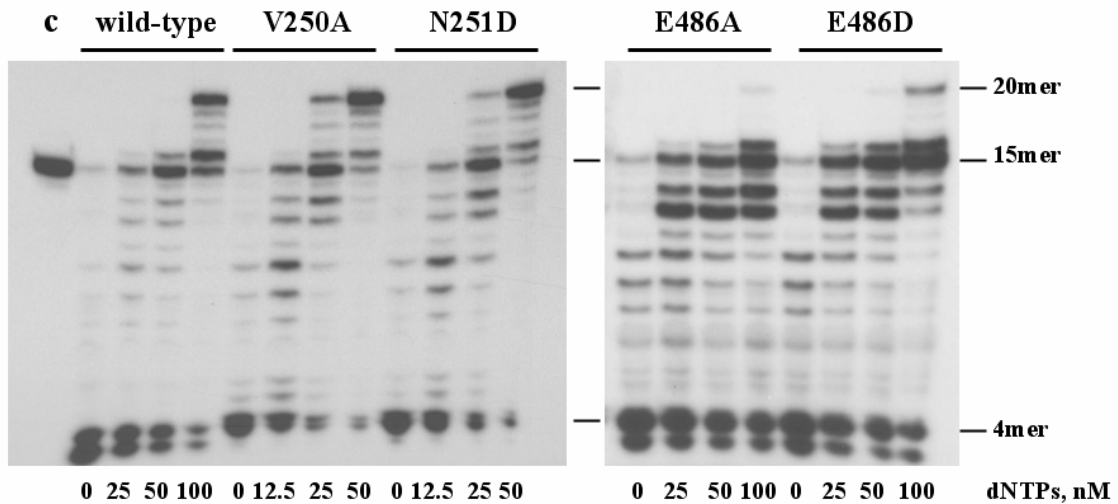
^c Los números indican la concentración de dNTPs (en nM) requerida para elongar la cadena iniciadora (15mer) hasta la longitud de 20mer.

El efecto de las mutaciones introducidas en la capacidad de la enzima para llevar a cabo la polimerización se analizó sobre la molécula híbrida sp1/sp1c+6 (ver Materiales y Métodos). Como se ha comentado en el capítulo anterior, esta molécula es sustrato tanto de la actividad de polimerización como de la actividad exonucleasa 3'-5', lo cual nos permite estudiar el equilibrio dinámico entre ambas actividades.

Como se observa en la Figura 29A, las DNA polimerasas mutantes V250A y N251D requirieron una concentración de nucleótidos menor (25-50 nM) que la enzima *wild-type* (100 nM) para dar lugar a la polimerización neta del sustrato. Debido a que su actividad exonucleasa 3'-5' hidroliza este sustrato de manera similar a como lo hace la

enzima *wild-type* (ver Tabla III), la mejor polimerización observada podría ser debido a una mejor unión del dNTP al centro activo de polimerización.

A



B

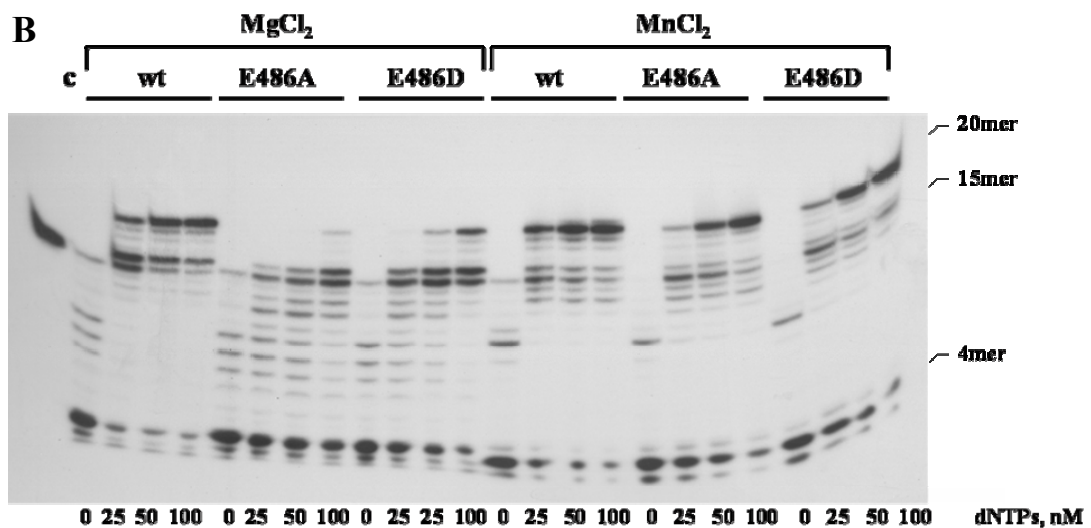


Figura 29. Balance Exo/pol de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. (A) El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, usando la molécula híbrida sp1/sp1c+6 como DNA iniciador/molde, 30.3 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante, 10 mM MgCl₂ y las concentraciones indicadas de dNTPs. (B) El ensayo se llevó a cabo como está descrito en (A) en presencia de 10 mM MgCl₂ ó 1 mM MnCl₂. Después de incubar las muestras durante 5 min a 30 °C, éstas se analizaron en un gel de poliacrilamida 20%-8M urea. Las actividades polimerasa y exonucleasa se detectaron como un incremento o una disminución, respectivamente, en el tamaño del oligonucleótido sp1 (15mer).

Por el contrario, los mutantes E486A y E486D mostraron un fenotipo totalmente opuesto ya que ambos presentaban una deficiente actividad de polimerización en presencia de Mg^{2+} . Este defecto no podía ser debido a una mayor actividad exonucleasa 3'-5', ya que ambos mutantes presentaban niveles parecidos a la enzima *wild-type*. Asimismo, el fenotipo *wild-type* en la capacidad de estos mutantes a la hora de estabilizar el extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización (ver Figura 28 y Tabla III) sugería que la pobre polimerización mostrada por estos mutantes podría ser debido a una disminuida afinidad por el dNTP entrante.

Debido al papel propuesto para el residuo Glu686 de la DNA polimerasa de RB69 como ligando de metal que coordina el fosfato γ del dNTP entrante (Zakharova et al., 2004), decidimos realizar el mismo experimento en presencia de Mn^{2+} como metal activador, observándose una recuperación de la actividad de los mutantes, dando lugar a un patrón de polimerización similar al de la enzima *wild-type*, apoyando el papel propuesto para este residuo como ligando de metal (ver Figura 29B).

Afinidad por nucleótido de las DNA polimerasas mutantes

Como ya hemos mencionado, los mutantes V250A y N251D no mostraron defectos significativos en su actividad exonucleasa 3'-5', por lo que la mejor polimerización observada podría ser debido a una mayor afinidad por nucleótido. Por lo tanto, calculamos la afinidad por nucleótido correcto e incorrecto de ambas proteínas mutantes como se ha descrito para DNA polimerasas procesivas con actividad exonucleasa 3'-5' (Saturno et al., 1995).

La K_m por el nucleótido correcto (dATP) (K_m^c) e incorrecto (dCTP) (K_m^i) se midió a diferentes concentraciones de ambos, usando como sustrato la molécula sp1/sp1c+6 y Mg^{2+} como metal activador (ver Materiales y Métodos). Como se puede ver en el panel izquierdo de la Figura 30, se confirma la mayor afinidad por nucleótido de estos mutantes ya que ambos presentan una K_m por el nucleótido correcto 3 veces más baja que la mostrada por la DNA polimerasa *wild-type*.

En el caso de la incorporación del nucleótido incorrecto, la K_m también se redujo con respecto a la de la enzima *wild-type*, 2.3 veces en el caso del mutante V250A y 3.5 veces en el caso de N251D (panel derecho de la Figura 30). Pero el parámetro relevante para estudiar la fidelidad de una DNA polimerasa es el F_{dis} , calculado como el cociente de la K_m^i/K_m^c . Igualmente, existe otro parámetro que es el F_{rel} calculado como el cociente $F_{dis}^{mut}/F_{dis}^{wt}$. Así, los mutantes V250A y N251D mostraron una fidelidad de

síntesis ligeramente mayor o similar ($F_{rel}=1.5$ y $F_{rel}=0.8$, respectivamente) a la de la enzima *wild-type* ($F_{rel}=1$).

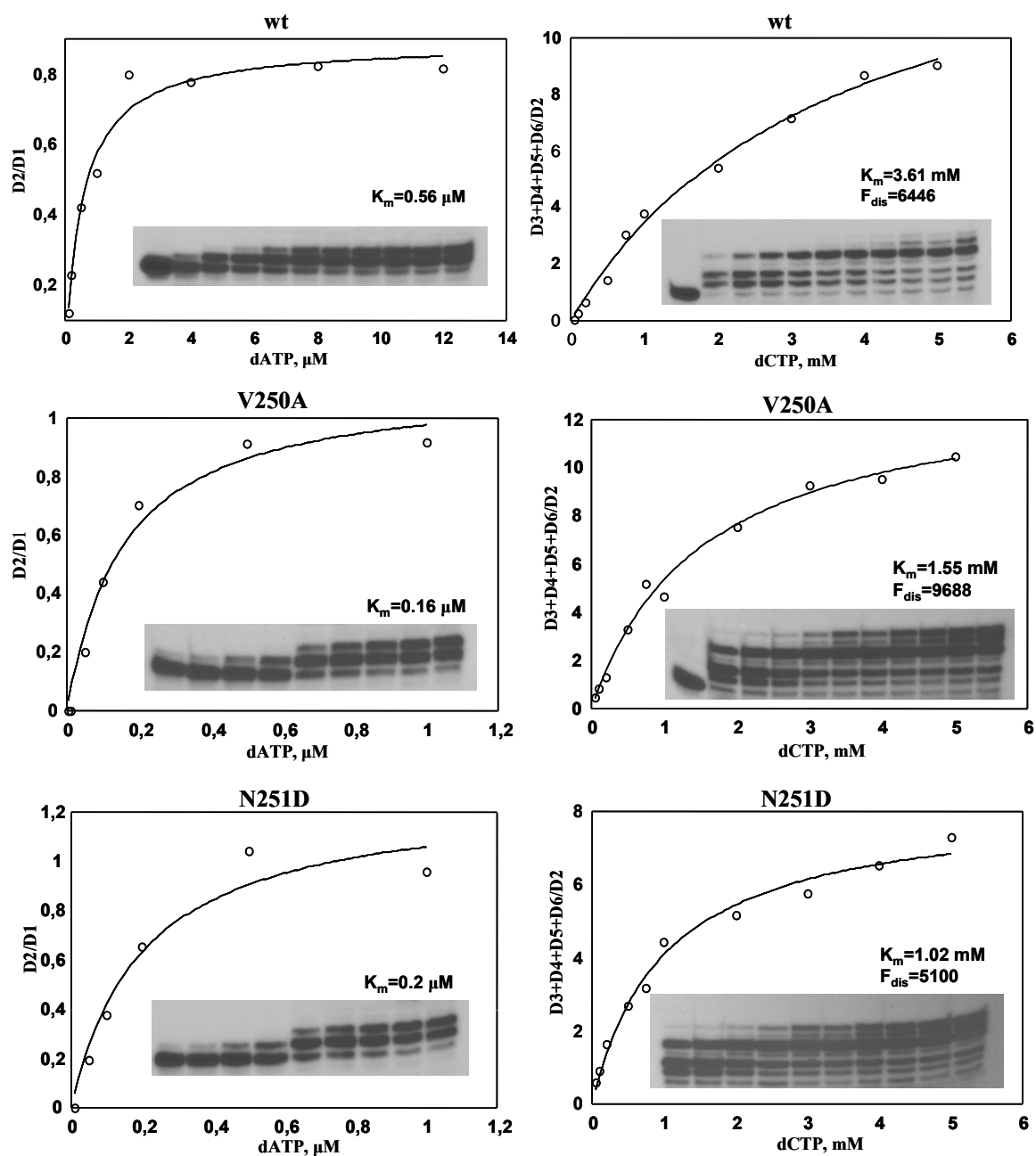


Figura 30. Cálculo de la afinidad por nucleótido de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes V250A y N251D. El ensayo se realizó como se describe en (Saturno et al., 1995), usando sp1/sp1c+6 como molde, 30.3 nM de DNA polimerasa y las concentraciones indicadas de dATP y dCTP en presencia de 10 mM MgCl₂ como metal activador. Las muestras se incubaron durante 3 min a 25 °C. La cantidad de producto formado se representó frente a la concentración de dNTP. Los datos se ajustaron a una hipérbola rectangular mediante regresión lineal por mínimos cuadrados. F_{dis} (factor de discriminación) calculado como el cociente K_m^i/K_m^c , siendo K_m^c y K_m^i las constantes de afinidad por el nucleótido correcto e incorrecto, respectivamente.

Resultados

También se midió la afinidad por nucleótido de las DNA polimerasas mutantes en el residuo Glu486, en presencia tanto de iones Mg^{2+} como de Mn^{2+} . En los ensayos realizados con Mg^{2+} como metal activador (Figura 31), los mutantes E486A y E486D mostraron una menor afinidad tanto por el nucleótido correcto (11 y 3 veces, respectivamente) como por el incorrecto (2 y 1.5 veces, respectivamente) que la enzima *wild-type*, con una capacidad de discriminación disminuida 6 veces para el E486A ($F_{rel}=0.15$) y 2 veces para el E486D ($F_{rel}=0.5$) en comparación con la DNA polimerasa *wild-type* ($F_{rel}=1$), sugiriendo un papel para el residuo Glu486 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ no sólo en la interacción con el dNTP, sino también en el mantenimiento de la fidelidad de síntesis del DNA.

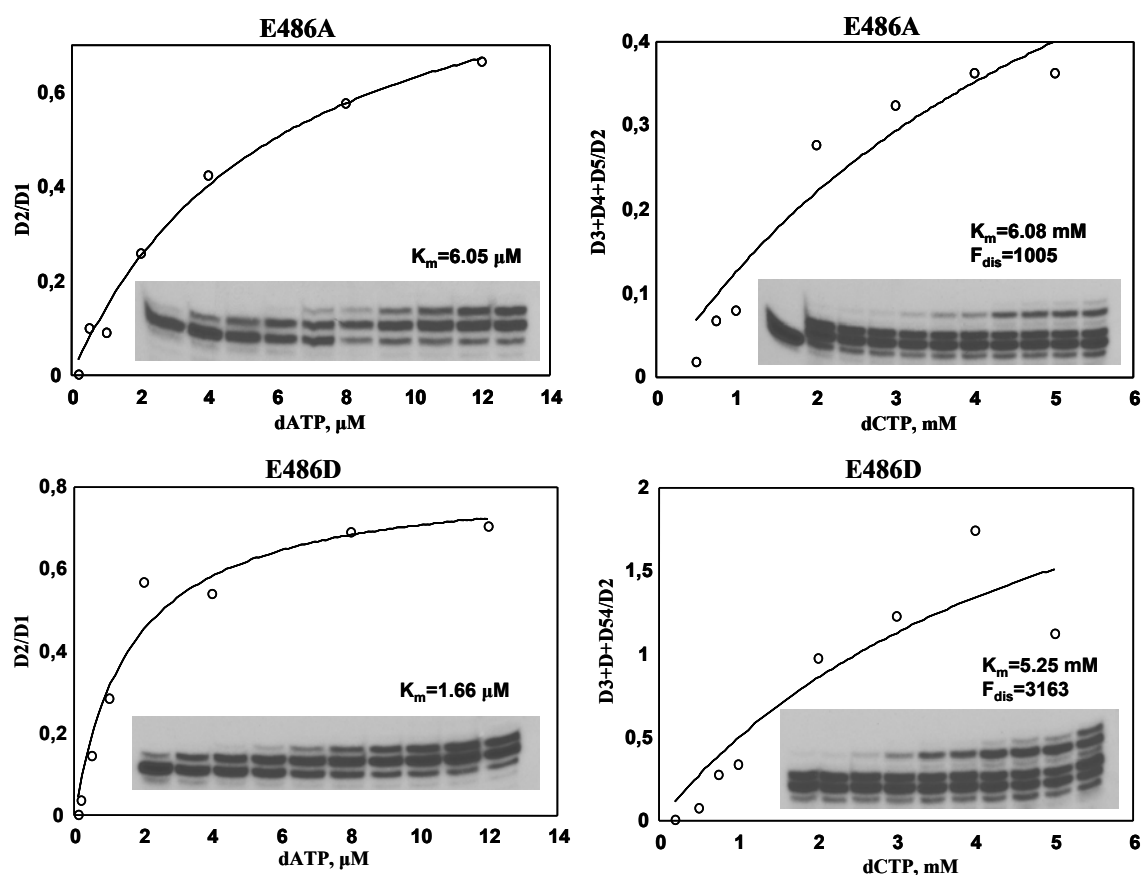


Figura 31. Cálculo de la afinidad por nucleótido de las DNA polimerasas mutantes E486A y E486D en presencia de Mg^{2+} . El ensayo se realizó como se describe en (Saturno et al., 1995), usando sp1/sp1c+6 como molde, 30.3 nM de DNA polimerasa y las concentraciones indicadas de dATP y dCTP en presencia de 10 mM $MgCl_2$ como metal activador. Las muestras se incubaron durante 3 min a 25 °C. La cantidad de producto formado se representó frente a la concentración de dNTP. Los datos se ajustaron a una hipérbola rectangular mediante regresión lineal por mínimos cuadrados. F_{dis} (factor de discriminación) calculado como el cociente K_m^i/K_m^c , siendo K_m^c y K_m^i las constantes de afinidad por el nucleótido correcto e incorrecto, respectivamente.

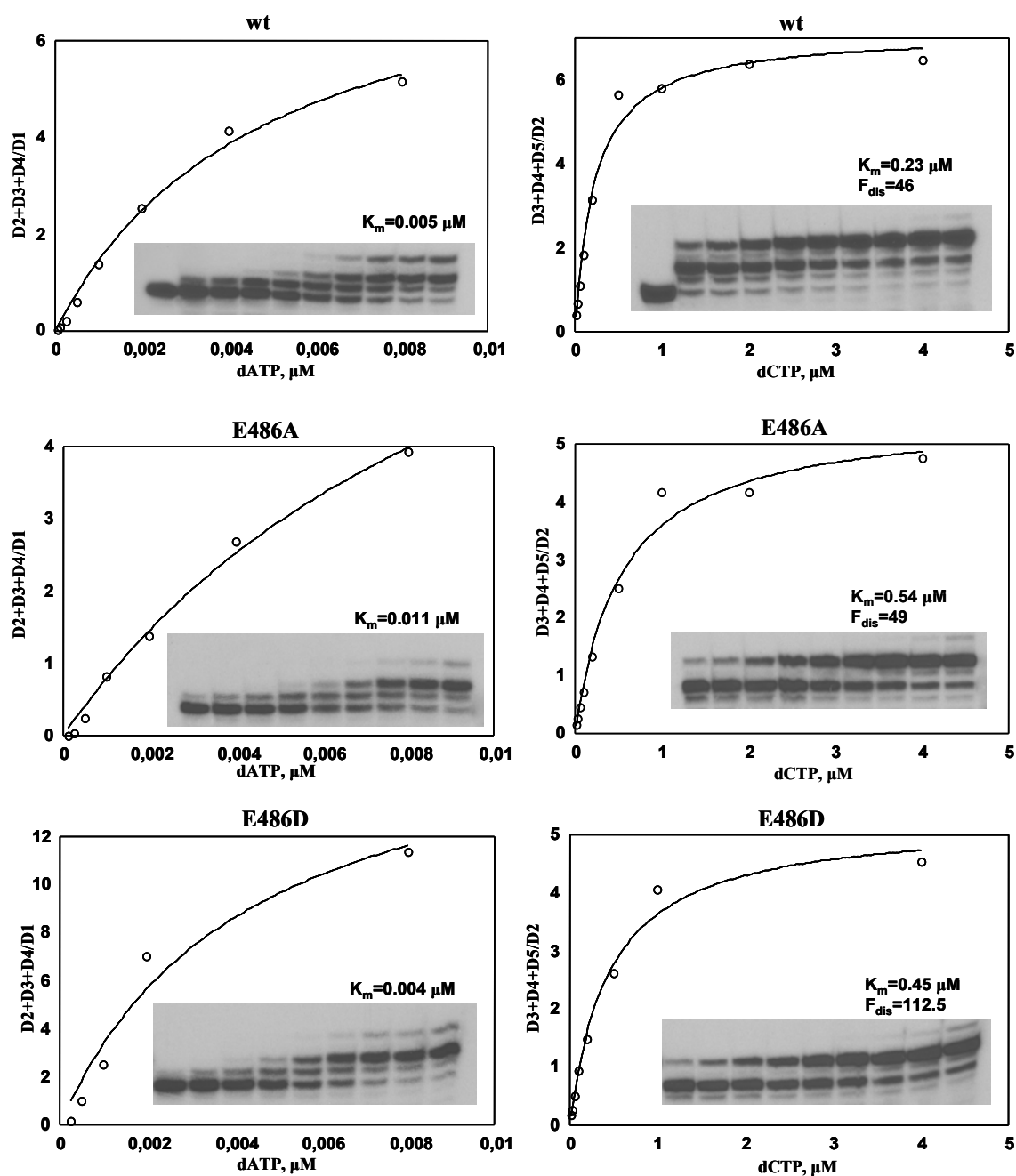


Figura 32. Cálculo de la afinidad por nucleótido de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes E486A y E486D en presencia de Mn^{2+} . El ensayo se realizó como se describe en (Saturno et al., 1995), usando sp1/sp1c+6 como molde, 30.3 nM de DNA polimerasa y las concentraciones indicadas de dATP y dCTP en presencia de 1 mM MnCl_2 como metal activador. Las muestras se incubaron durante 3 min a 25 °C. La cantidad de producto formado se representó frente a la concentración de dNTP. Los datos se ajustaron a una hipérbola rectangular mediante regresión lineal por mínimos cuadrados. F_{dis} (factor de discriminación) calculado como el cociente $K_m^{\text{i}}/K_m^{\text{c}}$, siendo K_m^{i} y K_m^{c} las constantes de afinidad por el nucleótido correcto e incorrecto, respectivamente.

En presencia de iones Mn^{2+} (Figura 32), los mutantes E486D y E486A mostraron una afinidad por dATP similar o sólo 2 veces inferior a la de la enzima *wild-type*, respectivamente. Ambos mutantes mostraron una afinidad por el nucleótido incorrecto 2

veces inferior a la de la enzima *wild-type* (Figura 32). Estos datos reflejaban una $F_{rel}=1$ para el mutante E486A y, por tanto, una fidelidad de inserción similar a la mostrada por la enzima *wild-type*. En el caso del mutante E486D ($F_{rel}=2.2$), la presencia de Mn^{2+} hizo que se recuperara bastante la actividad respecto a la mostrada con Mg^{2+} , superándose incluso los niveles de discriminación contra el dNTP incorrecto mostrados por la proteína *wild-type*.

La baja eficiencia de incorporación de nucleótido en presencia de Mg^{2+} y la recuperación en presencia de Mn^{2+} por parte de los mutantes E486A y E486D está de acuerdo con un posible papel como ligando de metal para el residuo Glu486 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. Así, las mutaciones introducidas podrían estar provocando una distorsión en la geometría del centro activo, defecto que es solventado cuando el metal activador es Mn^{2+} , debido probablemente a su mayor radio iónico en comparación con el del Mg^{2+} .

Capacidad de síntesis procesiva de las DNA polimerasas mutantes

Para llevar a cabo la replicación del DNA de M13 primado se requiere la procesividad intrínseca de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Blanco et al., 1989). La enzima *wild-type* es capaz de replicar el DNA de M13 procesivamente y, gracias a su capacidad para desplazar banda, dar lugar a moléculas de mayor longitud que el tamaño unidad de M13 (mecanismo de replicación por círculo rodante). Como se observa en la Figura 33A, en presencia de Mg^{2+} , los mutantes V250A y N251D fueron capaces de replicar este sustrato con la misma eficiencia que la presentada por la enzima *wild-type*, indicando que ninguno de los dos está afectado en la capacidad de síntesis acoplada al desplazamiento de banda.

Como era de esperar, los mutantes E486A y E486D mostraron una reducida actividad frente a la DNA polimerasa *wild-type* en presencia de Mg^{2+} (4 y 3 veces menor respectivamente; ver Tabla III). Al igual que ocurría cuando utilizábamos sp1/sp1c+6 como sustrato, la actividad de estos mutantes se recuperó hasta niveles *wild-type* usando Mn^{2+} como metal activador (Figura 33B). De hecho, bajo estas condiciones, en el tiempo de 5 minutos, ambos mutantes presentaron incluso una mejor actividad que la enzima *wild-type*.

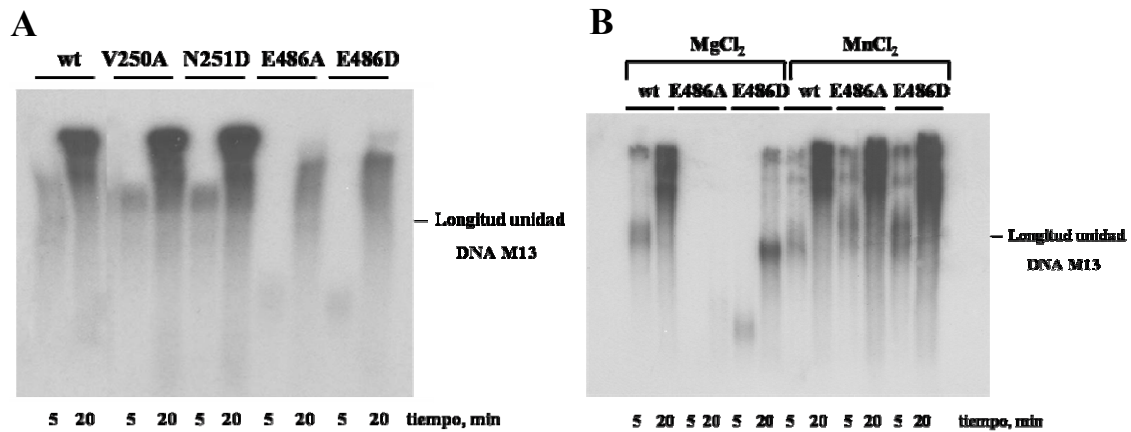


Figura 33. Replicación del DNA de M13 acoplado al desplazamiento de banda por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. (A) La replicación del DNA de M13 se llevó a cabo en las condiciones que se describen en Materiales y Métodos utilizando 16.8 nM de cada una de las DNA polimerasas indicadas, en presencia de 10 mM MgCl₂ como metal activador. (B) Se realizó el ensayo en las mismas condiciones descritas para (A) con la DNA polimerasa *wild-type* y los mutantes E486A y E486D, usando 10 mM MgCl₂ ó 1 mM MnCl₂ como metales activadores. Después de incubar a 30 °C durante los tiempos indicados, los productos de replicación se analizaron en un gel de agarosa alcalino. A la derecha de la figura se indica la posición del tamaño unidad del DNA de M13.

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

El siguiente paso fue analizar la capacidad de estos mutantes de llevar a cabo la replicación del genoma viral. Para ello, utilizamos el sistema mínimo de replicación formado por TP-DNA, TP y DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Blanco et al., 1989).

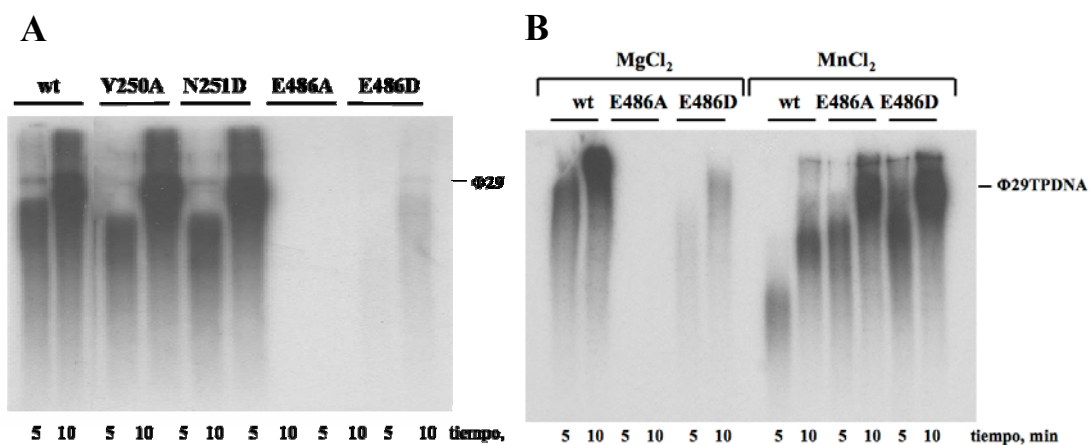


Figura 34. Replicación del TP-DNA de $\Phi 29$ por las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 10 mM MgCl₂, 1.6 nM de TP-DNA, 13 nM de TP y 3 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante. (B) Se realizó el ensayo en las mismas condiciones descritas para (A) con la DNA polimerasa *wild-type* y los mutantes E486A y E486D, usando 10 mM MgCl₂ ó 1 mM MnCl₂ como metales activadores. Después de incubar a 30 °C durante los tiempos indicados, la longitud del DNA sintetizado se analizó por electroforesis en gel de agarosa alcalino. A la derecha de la figura se indica la posición del tamaño unidad del TP-DNA de $\Phi 29$.

El resultado fue esencialmente el mismo que el obtenido para el ensayo de replicación del DNA de M13 (Figura 33A). Como se puede observar en la Figura 34, los mutantes V250A y N251D mostraron una actividad *wild-type*, mientras que los mutantes en el residuo Glu486 no fueron capaces de replicar el TP-DNA de $\Phi 29$ en presencia de Mg^{2+} , pero sí lo hicieron cuando se utilizó Mn^{2+} como metal activador. De hecho, no sólo recuperaron la actividad, sino que ambos fueron capaces de replicar el TP-DNA de $\Phi 29$ con una eficiencia mayor que la observada para la DNA polimerasa *wild-type* (ver Figura 34B).

Cálculo de la concentración óptima de Mn^{2+} para la polimerización procesiva de las DNA polimerasas mutantes E486A y E486D

Se ha propuesto que diferentes metales pueden actuar como activadores de las actividades sintéticas de las DNA polimerasas, siendo diferente la concentración óptima empleada, así como la eficiencia de la reacción (Sirover y Loeb, 1976). En la DNA polimerasa de $\Phi 29$ se han observado diferentes requerimientos metálicos y diferentes concentraciones óptimas cuando se comparan las distintas actividades llevadas a cabo por esta enzima (Esteban et al., 1992).

Se estudió el requerimiento de Mn^{2+} de la DNA polimerasa *wild-type* y de los mutantes E486A y E486D en un ensayo de síntesis procesiva para intentar explicar la mayor eficiencia de estos últimos para replicar el TP-DNA de $\Phi 29$. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, usando diferentes concentraciones de $MnCl_2$. Para la DNA polimerasa *wild-type* se observó que la concentración óptima de Mn^{2+} era de 0.4 mM, inhibiéndose la reacción a concentraciones mayores, de acuerdo con resultados previos (Esteban et al., 1992). Por el contrario, el mutante E486A muestra un óptimo de Mn^{2+} de 0.8 mM, mientras que el mutante E486D tuvo la máxima actividad en un rango de 0.4-1.6 mM (Figura 35A).

Este resultado muestra una diferencia en el óptimo de metal como consecuencia de la mutación introducida en el residuo Glu486, apoyando la hipótesis de su implicación en la interacción con el metal en el centro activo de polimerización. Como se puede observar en la Figura 35A, la concentración de 1 mM $MnCl_2$ a la que fue realizado el ensayo mostrado en la Figura 34B era subóptima para la enzima *wild-type*, pero óptima para los mutantes, explicando así la mejor actividad de éstos en la replicación de TP-DNA de $\Phi 29$ anteriormente mencionada. Sin embargo, como era esperable, tanto la enzima *wild-type* como las DNA polimerasas mutantes mostraron el

mismo fenotipo cuando el experimento de replicación de TP-DNA de $\Phi 29$ se llevó a cabo utilizando las concentraciones óptimas de Mn^{2+} para cada una de ellas (Figura 35B).

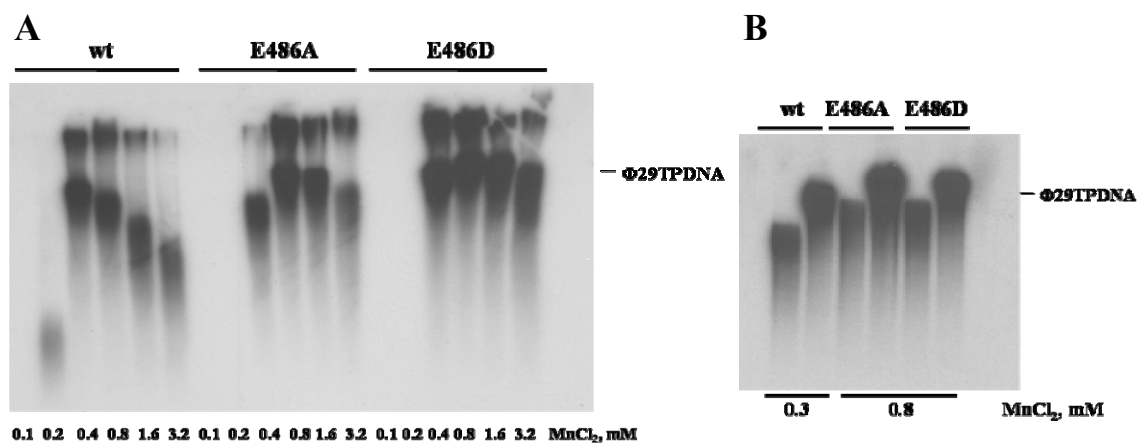


Figura 35. Efecto de la concentración de Mn^{2+} en la actividad de polimerización de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes en el residuo Glu486. (A) El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 1.6 nM de TP-DNA, 13 nM de TP y 3 nM de DNA polimerasa *wild-type* o mutante y las cantidades indicadas en cada caso de Mn^{2+} como metal activador. (B) Ensayo realizado en las mismas condiciones descritas en el apartado (A) utilizando la concentración óptima de Mn^{2+} para cada una de las DNA polimerasas *wild-type* y mutantes indicados. Después de incubar durante 5 y 10 min a 30 °C, el tamaño de los productos sintetizados se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa alcalino. A la derecha de la figura se indica la posición del tamaño unidad del TP-DNA de $\Phi 29$.

Se calculó también el óptimo de metal para el ensayo de replicación del DNA de M13, el cual mostró que la concentración de 1 mM $MnCl_2$ utilizada es óptima para los mutantes y subóptima para la proteína *wild-type* (datos no mostrados), justificando la mayor actividad mostrada por los mutantes en el tiempo más corto de reacción (5 min, Figura 33B) y confirmando los datos obtenidos para el ensayo de replicación de TP-DNA de $\Phi 29$, lo cual nos permitió generalizar dichos óptimos de $MnCl_2$ para la síntesis procesiva del DNA, independientemente del sustrato utilizado.

En este capítulo se ha descrito el papel de tres residuos evolutivamente conservados del subdominio *palm* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$, Val250, Asn251 y Glu486. Nuestros datos bioquímicos, así como los datos cristalográficos, apoyan el papel de estos residuos en la interacción indirecta con el dNTP, probablemente mediada por metales del centro activo de polimerización.

Como ya se ha mencionado anteriormente, extensos análisis de replicación *in vitro*, fundamentalmente llevados a cabo con el bacteriófago $\Phi 29$, han sentado las bases del llamado mecanismo de replicación primado por TP, compartido por otros virus procariotas y eucariotas, así como por plásmidos lineales de bacterias, hongos, plantas y levaduras (Salas, 1991). En estos casos la iniciación de la replicación requiere la formación previa de un complejo DNA polimerasa/TP iniciadora que posteriormente reconoce los orígenes de replicación constituidos por la TP paterna y una secuencia específica (González-Huici et al., 2000b). Una vez reconocidos dichos orígenes, la DNA polimerasa cataliza la adición de un dNMP específico al grupo –OH iniciador de la TP, en una reacción dirigida por un dNMP interno de la cadena molde (reacción de iniciación) (Salas, 1999).

Sistemas de replicación desarrollados con proteínas purificadas y TP-DNAs de los bacteriófagos GA-1 y Nf, relacionados con $\Phi 29$, han mostrado que las reacciones catalizadas por estos tres sistemas son similares. Sin embargo, a pesar de su homología, las DNA polimerasas, las TPs y los TP-DNAs no pueden ser intercambiados individualmente, debido a la gran especificidad de las interacciones proteína-proteína (González-Huici et al., 2000a; Longás et al., 2006).

La reciente determinación de la estructura cristalográfica del complejo DNA polimerasa/TP (Kamtekar et al., 2006) (Figura 36) muestra la TP plegada en tres dominios (N-terminal, intermedio e iniciador) siendo los dos últimos los responsables de establecer contactos con la DNA polimerasa. El dominio N-terminal (residuos 1-73) presenta una estructura desordenada y no interacciona con la DNA polimerasa. El dominio intermedio (residuos 74-172), de carácter helicoidal, interacciona con el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa. En la superficie de contacto hay múltiples residuos cargados generándose dos puentes salinos entre dos Arg del dominio intermedio de la TP y dos Glu del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa. El dominio intermedio está conectado mediante una región flexible al dominio iniciador (residuos 173-266) formado por 4 hélices- α el cual, debido a su carga negativa y a sus dimensiones, interacciona con el dominio de polimerización de la DNA polimerasa de manera análoga a como lo hace un dsDNA, ocupando ambos el mismo sitio de unión de manera secuencial. El *loop* entre las dos últimas hélices- α de este dominio contiene la Ser232 cuyo grupo –OH es el utilizado por la DNA polimerasa como iniciador de la replicación del DNA del bacteriófago (Figura 36).

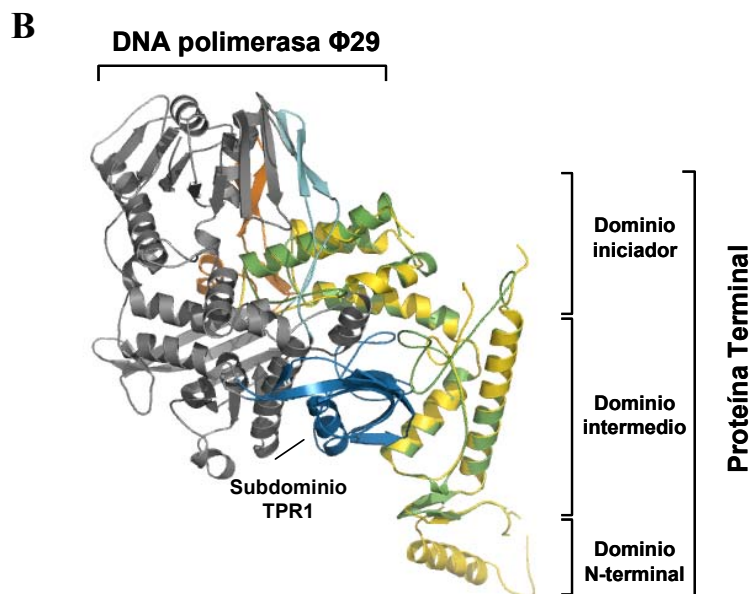
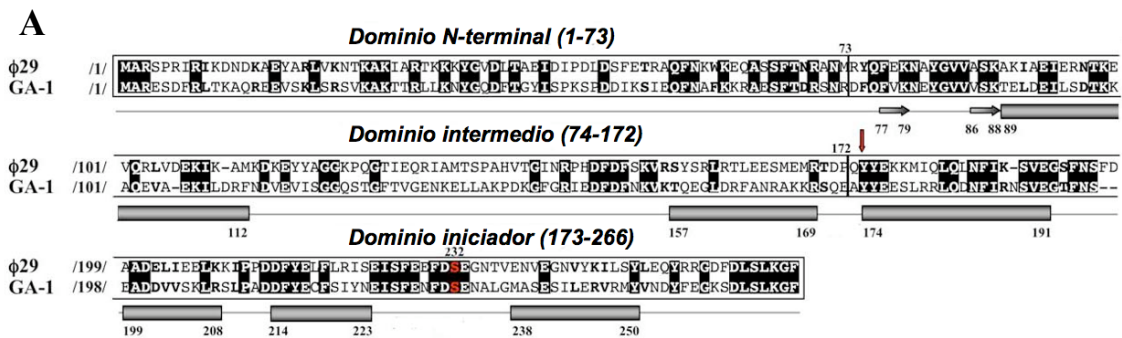


Figura 36. (A) Alineamiento de las secuencias de las TPs de Φ 29 y GA-1. Los números indican la posición relativa de los aminoácidos desde el extremo N-terminal de cada TP. Los residuos idénticos se muestran en color blanco sobre fondo negro. La Ser232 iniciadora aparece en rojo. Los diferentes motivos estructurales se muestran debajo de la secuencia, esquematizándose las láminas- β como cilindros y las hélices- α como flechas. La flecha roja indica el residuo N-terminal de los dominios iniciadores, intercambiados en las quimeras de TP. **(B) Modelado de la TP de GA-1 sobre la estructura tridimensional del heterodímero DNA polimerasa-TP de Φ 29.** En la figura se muestra la TP de Φ 29 en amarillo, la DNA polimerasa de Φ 29 en gris y la TP de GA-1 modelada en verde. El modelado de la TP de GA-1 fue proporcionado por el servidor Swiss-Model, usando como molde la estructura cristalográfica de la TP de Φ 29 (PDB 2EX3). Los subdominios TPR1, TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa aparecen en azul oscuro, azul claro y naranja, respectivamente. Se indican también los diferentes dominios de ambas TPs.

Modelado de la TP de GA-1. Construcción de TPs quiméricas.

La TP del bacteriófago GA-1 (265 aminoácidos) tiene una identidad de secuencia del 40% con respecto a la TP de Φ 29 (Illana et al., 1996). Gracias a este alto grado de identidad, el servidor Swiss-Model nos proporcionó un modelado para la TP de GA-1 (de color verde en la Figura 36B) utilizando la estructura cristalográfica de la TP de Φ 29 como molde (en amarillo en Figura 36B). La estructura predicha mostraba

los dominios intermedio e iniciador plegados como en la TP de $\Phi 29$, permitiéndonos modelar la TP de GA-1 unida a la DNA polimerasa de $\Phi 29$. La ausencia de modelado del dominio N-terminal de GA-1 es debido a que las 2 hélices- α de esta región de la TP de $\Phi 29$ fueron originalmente construidas como polialanina. El dominio intermedio de la TP de GA-1 se ajustaba estructuralmente a la región TPR1 de la DNA polimerasa y el dominio iniciador quedaba rodeado por los subdominios TPR1, TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa.

Para dilucidar la importancia de los diferentes subdominios de la TP en la interacción específica con la DNA polimerasa y en el reconocimiento de los orígenes de replicación, se construyeron quimeras de las TPs de $\Phi 29$ y GA-1 intercambiando los dominios iniciadores de ambas. La secuencia conservada “YYE” al principio de la primera hélice- α del dominio iniciador de ambas TPs (la primera Tyr se indica con una flecha roja en la Figura 36A) marca el límite de las regiones intercambiadas para conservar y garantizar el correcto plegamiento de las proteínas quiméricas.

Como se muestra en la Figura 37, se construyeron las proteínas quiméricas N- Φ [la cual posee la región N-terminal que engloba los dominios N-terminal e intermedio

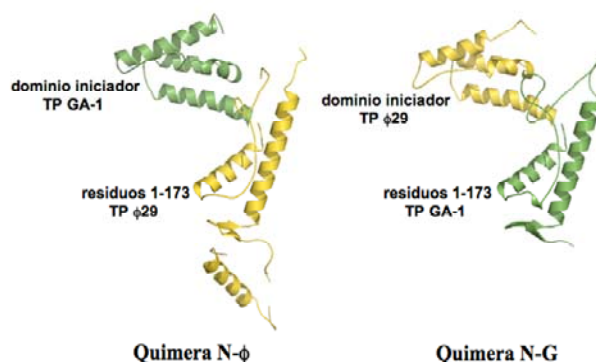


Figura 37. Representación esquemática de las TPs quiméricas. Las regiones de la TP de $\Phi 29$ se representan en amarillo y las de la TP de GA-1 en verde.

(residuos 1-173) de la TP de $\Phi 29$ y el dominio iniciador de GA-1] y N-G (región N-terminal de GA-1 y dominio iniciador de $\Phi 29$). Las quimeras fueron sobreexpresadas y purificadas (ver Materiales y Métodos) para, posteriormente, ser analizadas mediante una serie de ensayos *in vitro* correspondientes a las diferentes etapas del mecanismo de replicación iniciado con proteína terminal.

La parte N-terminal de la TP especifica la interacción con la DNA polimerasa.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la replicación del TP-DNA de $\Phi 29$ y GA-1 comienza en ambos orígenes del genoma mediante la incorporación, catalizada por la correspondiente DNA polimerasa y dirigida por molde, de un dAMP al grupo -OH de la Ser232 de la TP de $\Phi 29$ y, probablemente, a la Ser231 de la TP de

Resultados

GA-1, con la posterior elongación del complejo TP-dAMP para completar la síntesis de la molécula de TP-DNA (Salas, 1991).

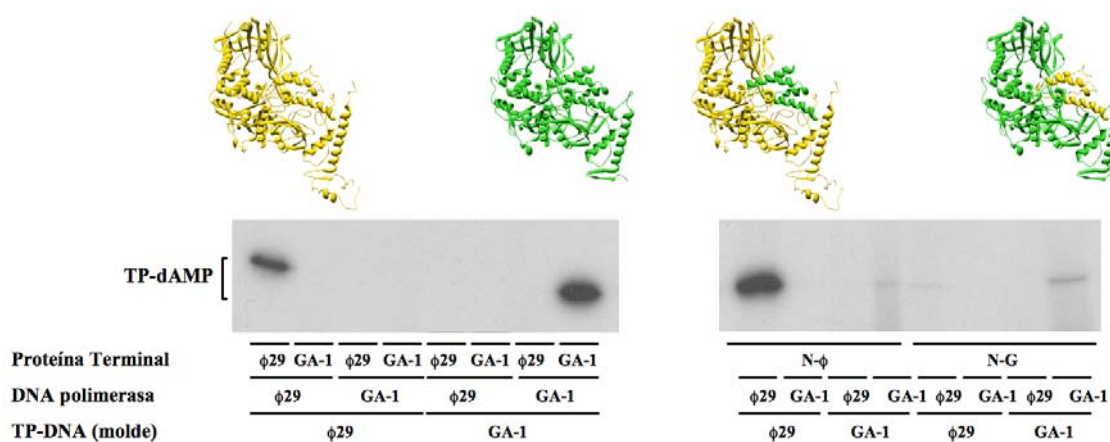


Figura 38. Formación del complejo TP-dAMP. La reacción se realizó en presencia de 1 mM $MnCl_2$, 1.6 nM de TP-DNA, 15 nM de DNA polimerasa y 30 ó 120 nM de TP *wild-type* o quimérica. Después de 1 (para las TPs *wild-type*) y 10 min (para las quimeras) a 30 °C, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y posterior autorradiografía. Se indican los diferentes TP-DNAs, DNA polimerasas y TPs, así como la movilidad de los complejos TP-dAMP. En la parte superior de la figura, se esquematizan los diferentes complejos mostrándose en amarillo la DNA polimerasa y la TP de $\Phi 29$ y en verde las proteínas homólogas de GA-1. Las diferentes partes de las TPs quiméricas están coloreadas de acuerdo a dicho código de color.

Como se muestra en la Figura 38, cada TP *wild-type* es capaz de generar productos de iniciación exclusivamente en la reacción catalizada por la DNA polimerasa homóloga, siendo únicamente dirigida por su TP-DNA homólogo. Las reacciones primadas por las TPs quiméricas fueron menos eficientes que las de las TPs *wild-type*, siendo necesarias mayores dosis de proteína, tiempos de incubación más largos y Mn^{2+} como metal activador, indicando que la especificidad entre la DNA polimerasa y la TP depende tanto del dominio iniciador como de la región N-terminal de ésta. No obstante, la quimera N- Φ , que contiene la región N-terminal de $\Phi 29$ (dominios N-terminal e intermedio) y el dominio iniciador de GA-1, es capaz de primar específicamente la reacción de iniciación llevada a cabo por la DNA polimerasa de $\Phi 29$ cuando el molde es TP-DNA de $\Phi 29$. Se observa una señal muy tenue cuando se usan la DNA polimerasa y el TP-DNA de GA-1. Este resultado sugiere que el reconocimiento específico entre la DNA polimerasa y la TP es fundamentalmente a través de la parte N-terminal de esta última y que el dominio iniciador de la TP no está implicado en el reconocimiento de la TP paterna. Además, la DNA polimerasa de $\Phi 29$ parece ser permisiva a la hora de acoplar y orientar el dominio iniciador de la TP de GA-1 en su

centro activo para dar lugar a un complejo catalíticamente activo. Este argumento se ve apoyado por el hecho de que la K_m aparente por el nucleótido iniciador de la quimera N- Φ es sólo ligeramente mayor que la de la TP *wild-type* de $\Phi 29$ (0.9 μM frente a 0.6 μM).

En el caso de la quimera N-G (la cual contiene la región N-terminal de la TP de GA-1), aunque el producto de iniciación es mucho menor que el generado por la quimera N- Φ , se puede observar el mismo patrón con respecto a la especificidad, ya que esta quimera es activa principalmente con la DNA polimerasa y el TP-DNA de GA-1, aunque también se aprecia una banda muy débil con el sistema de $\Phi 29$. En el caso de esta quimera, mientras que la parte N-terminal de la TP de GA-1 confiere especificidad a la interacción con la DNA polimerasa, esta última parece ser más restrictiva en la unión del dominio iniciador no homólogo de la TP de $\Phi 29$. De hecho, la TP quimérica N-G muestra un aumento de 14 veces en la K_m aparente por el nucleótido iniciador dAMP (10 μM de la quimera N-G frente a 0.7 μM de la TP de GA-1). Este resultado sugiere que la interacción DNA polimerasa/TP de GA-1 muestra una mayor dependencia del dominio iniciador de la TP que el heterodímero de $\Phi 29$.

Los resultados expuestos nos permiten concluir que la interacción entre el dominio intermedio de la TP y la región TPR1 de la DNA polimerasa es la responsable del reconocimiento específico entre ambas proteínas ya que la DNA polimerasa sólo es capaz de formar un heterodímero catalíticamente activo con la quimera de TP que contiene la región N-terminal (residuos 1-173) perteneciente al sistema homólogo.

Las diferencias de K_m por el nucleótido iniciador entre las dos quimeras podrían justificar la actividad relativa entre ellas. Sin embargo, no son suficientes para explicar la baja actividad de éstas respecto a las TPs *wild-type*, por lo que las quimeras podrían presentar también algún defecto en la interacción o en la estabilidad de unión con la DNA polimerasa correspondiente. Para estudiar esta interacción, llevamos a cabo un ensayo de interferencia en el cual, por una parte la TP de $\Phi 29$ y la quimera N- Φ , y por otra la TP de GA-1 y la quimera N-G, competían por una cantidad limitante de DNA polimerasa de $\Phi 29$ y GA-1, respectivamente (ver Materiales y Métodos).

En la Figura 39 se observa como ninguna de las TPs *wild-type* son competidas por la correspondiente TP quimérica, ni siquiera a las dosis más altas de esta última (1920 nM). Este resultado confirma la débil interacción existente entre las DNA polimerasas y las quimeras, indicando la importancia de ambos dominios (iniciador y región N-terminal) en la interacción con la DNA polimerasa.

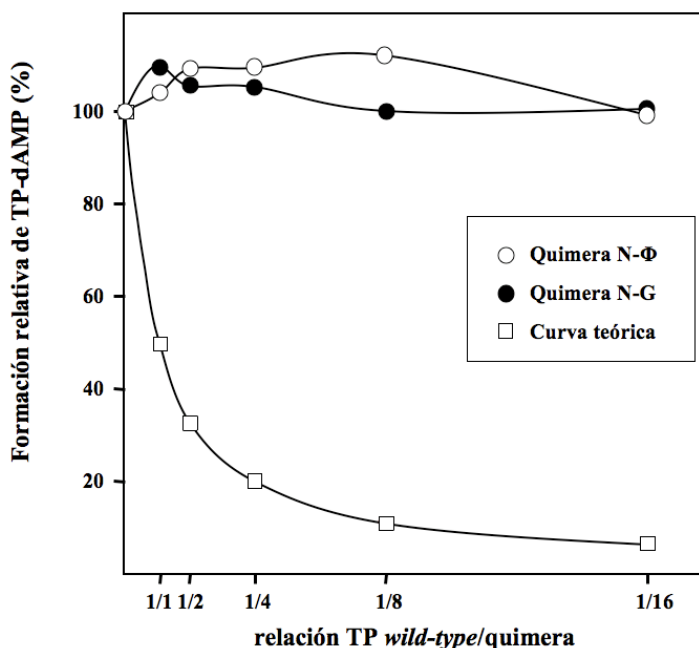


Figura 39. Ensayo de interferencia por la unión con la DNA polimerasa de las TPs *wild-type* y quiméricas. Las reacciones de formación del complejo TP-dAMP para los heterodímeros de $\Phi 29$ y GA-1 se llevaron a cabo en presencia de cantidades crecientes de las quimeras N- Φ y N-G respectivamente (ver Materiales y Métodos). Las reacciones se iniciaron con 1 mM $MnCl_2$ y, después de una incubación de 10 min a 30 °C, se analizaron como se indica para el ensayo de iniciación de la replicación. En la gráfica se indican el TP-dAMP formado en las diferentes condiciones de competición con respecto al formado en ausencia de competición (100%), así como la curva teórica de inhibición que se obtendría si las TPs quiméricas mostraran una afinidad por la DNA polimerasa similar a la de las TPs *wild-type*.

La segunda fase de la replicación del DNA del bacteriófago $\Phi 29$ consiste en la elongación del producto de iniciación hasta completar la síntesis de la nueva molécula de TP-DNA. Para analizar si los productos TP quimérica-dAMP formados en la reacción de iniciación pueden ser elongados, utilizamos el sistema mínimo de replicación *in vitro* (Blanco et al., 1989) utilizando las TPs *wild-type* o quiméricas (ver Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 40, cada DNA polimerasa *wild-type* fue capaz de generar productos de replicación en presencia de sus TP y TP-DNA homólogos. En el ensayo realizado con las TPs quiméricas, las DNA polimerasas de $\Phi 29$ y GA-1 fueron capaces de elongar los productos (N- Φ)-dAMP y (N-G)-dAMP respectivamente, siempre usando su TP-DNA homólogo como molde, dando lugar al tamaño unidad con una eficiencia parecida a la de la reacción de iniciación. El ensayo de replicación de TP-DNA confirma la especificidad entre la región N-terminal de la TP y el TPR1 de la DNA polimerasa observada en el ensayo de iniciación. La ausencia de

productos de replicación con la DNA polimerasa de $\Phi 29$ en ausencia de TP garantiza que los productos observados son fruto de la replicación genuina del TP-DNA.

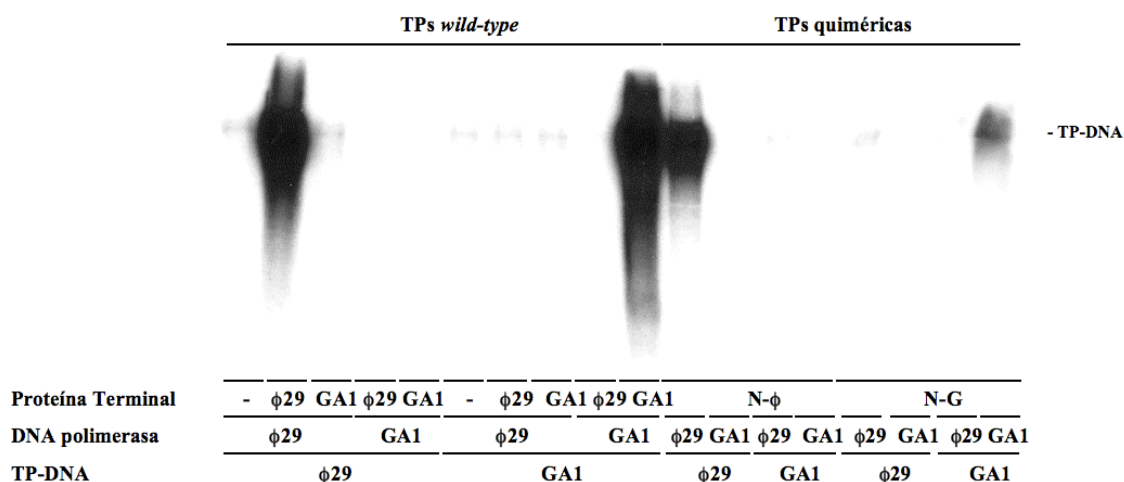


Figura 40. Replicación de TP-DNA *in vitro*. La reacción se llevó a cabo en presencia de 1 mM $MnCl_2$, 60 nM de la DNA polimerasa indicada, 120 nM de la TP *wild-type* o quimérica y 80 μM de dNTPs. Después de incubar durante 8 (TPs *wild-type*) y 30 min (TPs quiméricas) a 30 °C, las reacciones fueron procesadas como se describe en Materiales y Métodos. El DNA marcado fue desnaturalizado y sometido a electroforesis en un gel de agarosa alcalino para determinar la longitud del producto sintetizado. Se indica la posición de la longitud unidad de la molécula de TP-DNA.

La parte N-terminal de la TP de $\Phi 29$ es requerida para permitir al dominio iniciador de la TP primar la iniciación de la replicación

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que la DNA polimerasa no es capaz de acomodar el dominio iniciador de la TP homóloga si no existe complementariedad estructural entre la región N-terminal de la TP y la región TPR1 de la DNA polimerasa. Para determinar si el emplazamiento del dominio iniciador de la TP en una forma catalíticamente competente depende de la parte N-terminal de la TP, decidimos clonar de manera independiente el dominio iniciador de la TP de $\Phi 29$ (residuos 174-266) ($\Phi 29Ct$) y la región N-terminal (dominios N-terminal e intermedio, residuos 1-173) ($\Phi 29Nt$) (ver Materiales y Métodos).

Como se muestra en la Figura 41A, el $\Phi 29-Ct$ no fue capaz de servir como iniciador para la DNA polimerasa de $\Phi 29$ en la reacción de iniciación con molde ni a las concentraciones más altas empleadas (400 nM). Sin embargo, en un ensayo de interferencia, similar al descrito anteriormente, en el que la quimera N- Φ y el $\Phi 29-Ct$ compiten por la DNA polimerasa de $\Phi 29$, se observa como, a las dosis más altas de dominio iniciador, se consigue interferir la unión de la DNA polimerasa con la TP

Resultados

quimérica (Figura 41B), por lo que la falta de actividad del $\Phi 29$ -Ct a dichas dosis es debida a una unión no productiva del dominio iniciador a la DNA polimerasa. Este resultado nos llevó a hipotetizar que la región N-terminal de la TP asistiría de alguna forma la orientación del dominio iniciador mediante algún cambio conformacional en la DNA polimerasa.

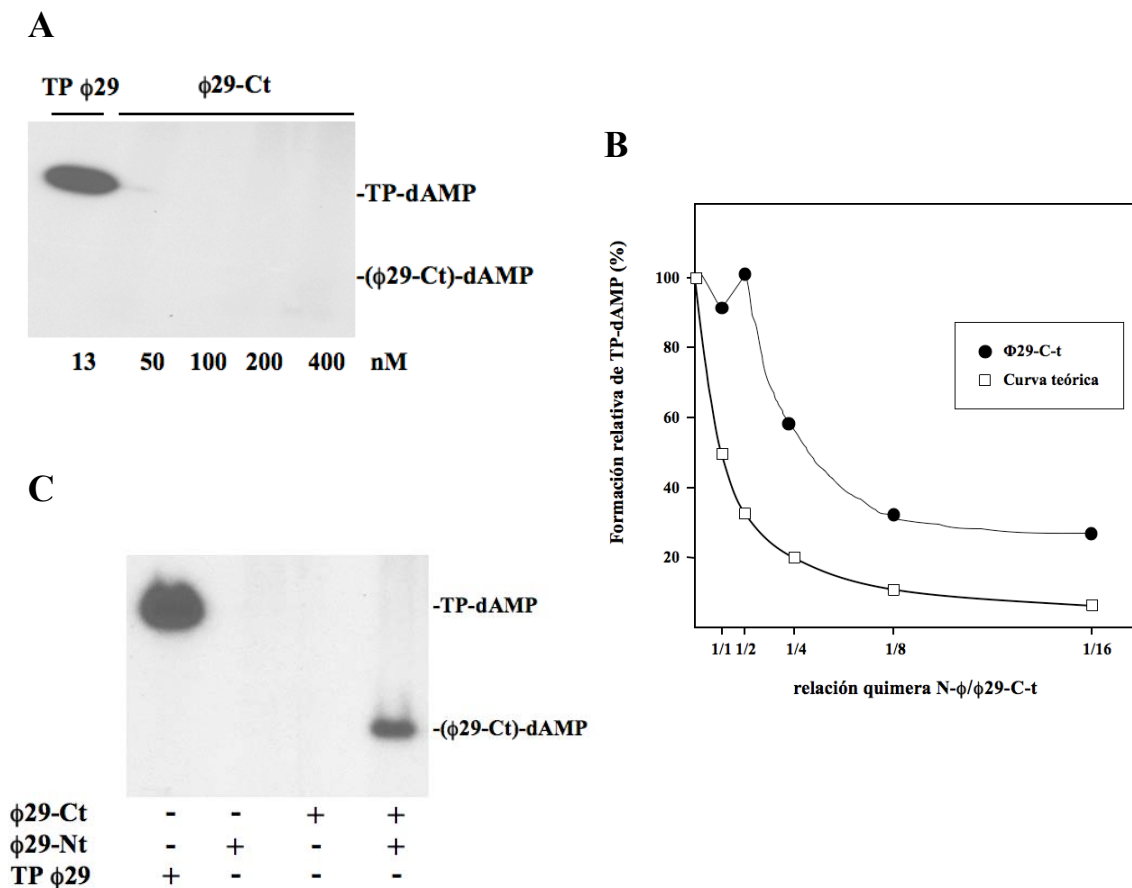


Figura 41. La interacción entre la región N-terminal de la TP y la DNA polimerasa de $\Phi 29$ es requerida para que el dominio iniciador de la TP prime la reacción de iniciación. (A) El dominio iniciador de la TP no puede primar la formación del TP-dAMP. La reacción se llevó a cabo en presencia de 1 mM $MnCl_2$, 1.6 nM de TP-DNA de $\Phi 29$, 60 nM de DNA polimerasa de $\Phi 29$ y las cantidades indicadas de proteína TP de $\Phi 29$ *wild-type* o de la variante $\Phi 29$ -Ct. La incubación fue de 10 min a 30 °C. **(B) El dominio iniciador de la TP de $\Phi 29$ se une de forma no catalítica.** La formación del producto de iniciación TP-dAMP se llevó a cabo en presencia de 1 mM $MnCl_2$, 60 nM de DNA polimerasa de $\Phi 29$, 120 nM de quimera N- Φ y cantidades crecientes de la proteína truncada $\Phi 29$ -Ct. En la gráfica se indican el TP-dAMP formado en las diferentes condiciones de competición con respecto al formado en ausencia de competición (100%), así como la curva teórica que correspondería a una unión *wild-type* del $\Phi 29$ -Ct. **(C) La región N-terminal de la TP asiste al dominio iniciador para actuar como tal.** El ensayo se realizó en presencia de 1 mM $MnCl_2$, 60 nM de DNA polimerasa de $\Phi 29$ y 150 nM de las proteínas truncadas $\Phi 29$ -Nt, $\Phi 29$ -Ct o de ambas. Se incubaron 30 min a 30 °C. Como control se llevó a cabo la reacción con 15 nM de DNA polimerasa *wild-type* y 30 nM de TP *wild-type* de $\Phi 29$, incubando 1 min a 30 °C. Las muestras se procesaron posteriormente como se describe en Materiales y Métodos.

Así, el ensayo de iniciación mostrado en la figura 41C muestra que la adición de la variante $\Phi 29$ -Nt permitió al dominio iniciador ($\Phi 29$ -Ct) actuar como iniciador dando lugar a una banda radiactiva que migra en la posición correspondiente al peso molecular del $\Phi 29$ -Ct.

Papel del dominio N-terminal de la TP de $\Phi 29$ durante la replicación *in vitro* del TP-DNA de $\Phi 29$

La estructura cristalográfica de la TP de $\Phi 29$ muestra el dominio N-terminal (residuos 1-73) como una región desordenada y que, al contrario que el resto de la proteína, no interacciona con la DNA polimerasa (Kamtekar et al., 2006). Para determinar el papel que este dominio pudiera estar desempeñando durante la replicación *in vitro* del TP-DNA de $\Phi 29$, se sobreexpresó y purificó el mutante de delección $\Phi 29\Delta N$ carente de los residuos 1-73 (ver Materiales y Métodos) para ensayar su actividad en las diferentes etapas de la replicación del TP-DNA de $\Phi 29$.

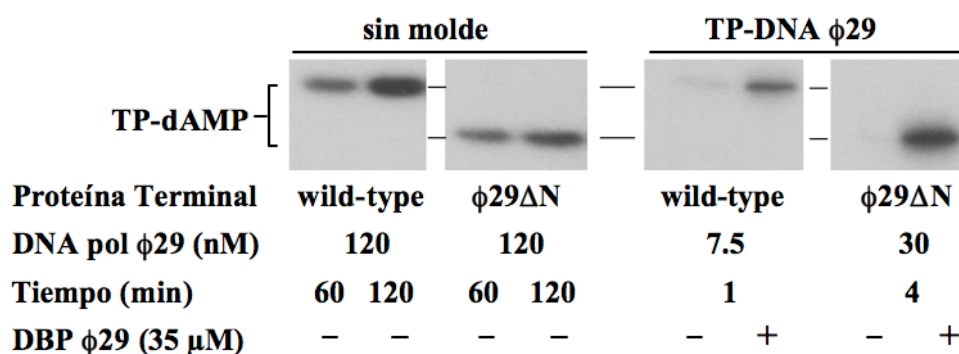


Figura 42. Formación del complejo TP-dAMP con la TP *wild-type* y mutante $\Phi 29\Delta N$. La reacción en ausencia de molde se llevó a cabo en presencia de 1 mM $MnCl_2$, 240 nM de TP *wild-type* o mutante. En la reacción en presencia de molde, se usaron 1.6 nM de TP-DNA de $\Phi 29$, 10 mM $MgCl_2$ y 60 nM de TP *wild-type* o mutante, en presencia (+) o ausencia (-) de la DBP de $\Phi 29$. Después de incubar durante los tiempos indicados a 30 °C, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y autorradiografía.

Lo primero que hicimos fue evaluar la capacidad de la TP mutante de interaccionar con la DNA polimerasa gracias a la habilidad de ésta de catalizar la deoxinucleotidilación de la TP en ausencia de molde (Blanco et al., 1992). Bajo estas condiciones, la actividad del mutante $\Phi 29\Delta N$ fue de un 50% con respecto a la TP *wild-type* (Figura 42), por lo que podemos concluir que la delección del dominio N-terminal no impide la interacción con la DNA polimerasa. Sin embargo, cuando se analiza la reacción de iniciación dirigida por TP-DNA, este mutante requiere la presencia de la

Resultados

DBP de $\Phi 29$, la cual aumenta su actividad unas 100 veces, en comparación con una estimulación de 10 veces en el caso de la TP *wild-type*. Aunque de este resultado no se podría descartar una interacción deficiente de la DNA polimerasa con el mutante de delección, los resultados sugieren que éste tiene afectada la capacidad de apertura de los orígenes de replicación.

Los mismos resultados se obtuvieron cuando se ensayó la capacidad de este mutante de replicar el TP-DNA de $\Phi 29$ usando el sistema mínimo de replicación en presencia y ausencia de DBP (Figura 43). Sólo se observan productos de replicación en presencia de la DBP, siendo la actividad de un 34% con respecto a la *wild-type*, de manera análoga a lo que ocurre durante la iniciación, con una velocidad de replicación igual para ambas, indicando que este dominio no juega ningún papel durante la transición de la iniciación primada por proteína a la elongación primada por DNA.

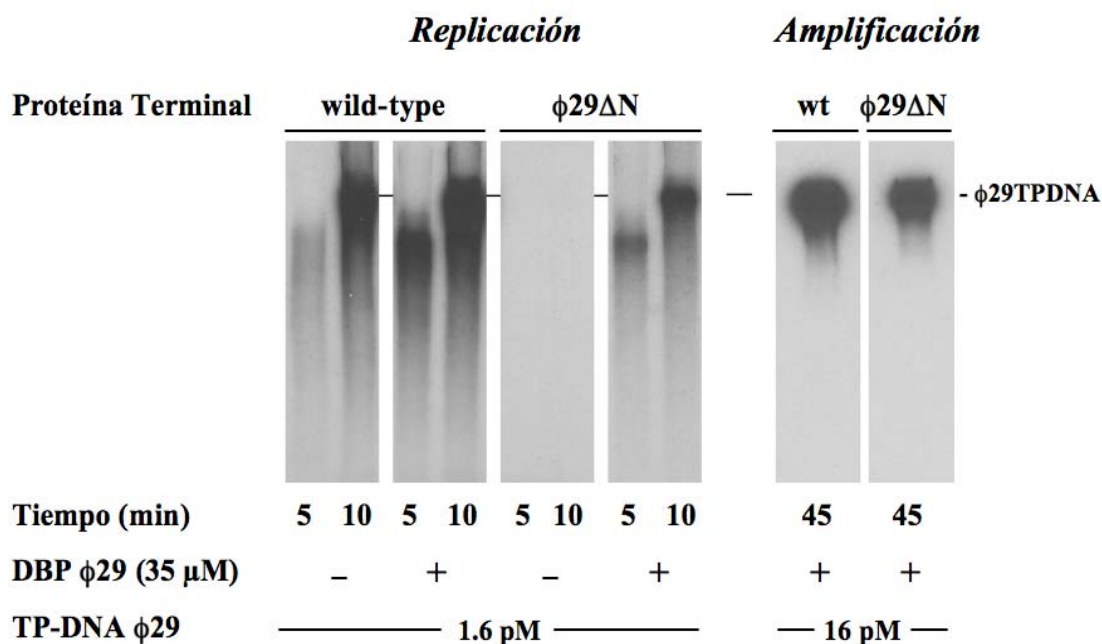


Figura 43. Replicación y amplificación del TP-DNA de $\Phi 29$ con la TP *wild-type* y el mutante $\Phi 29\Delta N$. La reacción de replicación se llevó a cabo en presencia de 10 mM $MgCl_2$, 60 nM de TP *wild-type* o mutante, 15 nM DNA polimerasa de $\Phi 29$ y 20 μ M dNTPs, en presencia (+) o ausencia (-) de DBP de $\Phi 29$. Después de incubar durante el tiempo indicado, la longitud del producto sintetizado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa alcalino. La reacción de amplificación se realizó en presencia de 10 mM $MgCl_2$, 120 nM de TP *wild-type* o mutante, 30 nM DNA polimerasa de $\Phi 29$, 80 μ M dNTPs, 35 μ M de DBP y 30 μ M de SSB de $\Phi 29$. Después de 45 min de incubación a 30 °C, las reacciones se pararon con 10 mM EDTA y se analizaron en gel de agarosa alcalino. Se indica la posición a la que migra la molécula de TP-DNA de $\Phi 29$.

Durante el ensayo de replicación de TP-DNA tiene lugar una única ronda de replicación, por lo tanto, este ensayo no nos permite estudiar los posibles defectos del $\Phi 29\Delta N$ en su función como TP paterna. Para ello, realizamos un ensayo de amplificación *in vitro* en el cual se utilizan cantidades más fisiológicas de todas las proteínas implicadas en la replicación: TP, DNA polimerasa, DBP y SSB para amplificar una cantidad limitada de moléculas de TP-DNA (Blanco et al., 1994) (ver Materiales y Métodos). En esta reacción de amplificación, la TP iniciadora acaba covalentemente unida a los extremos 5' del DNA recién sintetizado, actuando como TP paterna en la siguiente ronda de replicación. El nivel relativo de amplificación del mutante con respecto a la TP *wild-type* (39%) fue muy similar al obtenido en la reacción de iniciación y replicación (ver Figuras 42 y 43), indicando que el dominio N-terminal (residuos 1-73) de la TP paterna no se requiere para interactuar con el complejo DNA polimerasa/TP durante el reconocimiento inicial de los orígenes de replicación.

Los resultados expuestos en este capítulo nos permiten concluir que el dominio intermedio de la TP de $\Phi 29$ es el principal responsable del reconocimiento específico de la DNA polimerasa y que esta interacción es fundamental para producir el cambio conformacional necesario que permite al dominio iniciador de la TP acceder al centro activo de polimerización. También podemos afirmar que el dominio N-terminal de la TP no está implicado en la interacción con la DNA polimerasa ni en el reconocimiento específico entre el complejo DNA polimerasa/TP y la TP paterna del origen de replicación.

1. Coordinación de las actividades de polimerización y exonucleolisis

Las DNA polimerasas dependientes de DNA con capacidad correctora de errores pertenecientes a las familias A y B contienen un centro activo de polimerización 5'-3' y un centro activo exonucleasa 3'-5'. Ambos centros catalíticos están separados físicamente por una distancia de 30-40 Å (Hopfner et al., 1999; Kamtekar et al., 2004; Rodríguez et al., 2000; Wang et al., 1997). Como consecuencia, se necesita un perfecto acoplamiento de dichas actividades y un movimiento efectivo del extremo 3' de la cadena iniciadora de un centro activo al otro para llevar a cabo la replicación del DNA de manera eficiente y fiel.

Existe un equilibrio definido por la estabilidad del extremo de la cadena iniciadora en cada centro activo. El equilibrio entre ambas actividades depende directamente de la constante catalítica de cada actividad, la cual puede ser regulada *in vitro* en función de la concentración de dNTPs (Blanco et al., 1994) o por la inactivación total o parcial de residuos del centro activo (Blanco y Salas, 1995). En presencia de un balance adecuado de los cuatro nucleótidos y de condiciones constantes de temperatura y sal, el factor principal que controla este equilibrio es la estabilidad relativa del extremo de la cadena iniciadora en cada centro activo, uniéndose preferentemente al de polimerización para dar lugar a la elongación neta de la cadena de DNA. Los factores más importantes que reducen la estabilidad del extremo iniciador en dicho centro activo son: alta temperatura, baja fuerza iónica y sobre todo, la presencia de un extremo desapareado que provoca la disminución de la velocidad de polimerización, favoreciendo la unión del extremo 3' en el centro activo de exonucleolisis.

Si durante el proceso de replicación la DNA polimerasa incorpora un nucleótido erróneo, éste ha de ser eliminado en el centro activo exonucleasa 3'-5'. Así, el extremo 3' desapareado provoca una disminución en la tasa de polimerización y el par de bases erróneo formado hace que se rompan interacciones entre la DNA polimerasa y el surco menor del DNA. Como consecuencia, este DNA está menos estabilizado en el centro activo de polimerización, teniendo la oportunidad de dirigirse al centro activo exonucleasa 3'-5' para que el nucleótido erróneo sea eliminado (Donlin et al., 1991; Franklin et al., 2001; Johnson, 1993). En la DNA polimerasa de RB69 se ha observado que este movimiento va acompañado de la apertura del subdominio *fingers* y de la rotación del subdominio *thumb* alejándose del *palm* (Shamoo y Steitz, 1999). Una vez que el ssDNA se encuentra en el centro activo exonucleasa 3'-5', ha de ser estabilizado

en dicho centro activo mediante la interacción con residuos específicos. Se han identificado una serie de residuos de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ especializados en dicha función como son Thr15, Asn62 y Phe65 (de Vega et al., 1996; de Vega et al., 1998b). Una vez que el ssDNA se encuentra estabilizado en el centro activo se procede a la ruptura del último enlace fosfodiéster mediante un mecanismo de catálisis de dos iones metálicos (Beese y Steitz, 1991). Este mecanismo es universal, está evolutivamente conservado en todas las DNA polimerasas con dicha actividad correctora de errores (Bernad et al., 1989) y es llevado a cabo por cuatro residuos catalíticos pertenecientes a motivos de secuencia conservados presentes en el dominio exonucleasa 3'-5'. Así, en la DNA polimerasa de $\Phi 29$ estos residuos serían Asp12 y Glu14 del motivo Exo I, Asp66 del Exo II y Asp169 del Exo III (Bernad et al., 1989). Asimismo, otros dos residuos conservados juegan un papel secundario en la catálisis como son la Lys143 del motivo Kx_2h (de Vega et al., 1997) y la Tyr165 del Exo III (Esteban et al., 1994).

Gracias a la resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ formando un complejo con un oligonucleótido unido a su centro activo exonucleasa 3'-5' (Kamtekar et al., 2004) se pudieron identificar tres residuos adicionales como posibles ligandos de ssDNA en dicho centro activo. La Pro129 es un residuo no conservado que pertenece al motivo (S/T) Lx_2h , presente en las DNA polimerasas que poseen actividad exonucleasa 3'-5' y que contiene residuos implicados en la unión del DNA y de la TP (de Vega et al., 1998a; de Vega et al., 1998b; Rodríguez et al., 2003). Esta Pro parecía contactar con la antepenúltima base 3' en el centro activo exonucleasa. La Tyr148 pertenece al motivo Kx_2h , en el cual se encuentra absolutamente conservado un residuo de Lys que desempeña un papel auxiliar en la catálisis de la reacción de exonucleolisis en las DNA polimerasas de la familia B (de Vega et al., 1997), como se ha comentado anteriormente. Esta Tyr contactaría con la base 3' terminal del ssDNA. También hemos analizado el papel de un residuo perteneciente al subdominio *thumb*, la Leu567, la cual interacciona con las dos últimas bases 3' del ssDNA cuando éste se encuentra en el centro activo de exonucleolisis (Kamtekar et al., 2004).

Por otra parte, el modelado del DNA perteneciente al complejo ternario de RB69 (Franklin et al., 2001) sobre la estructura cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ (Kamtekar et al., 2004) nos sirvió para identificar los residuos Lys538, Lys555, Lys557, Gln560, Thr571, Thr573 y Lys575 situados en una región electropositiva del subdominio *thumb*, los cuales, debido a su proximidad y orientación con respecto al

surco menor del DNA, podrían estar actuando como ligandos de un dúplex DNA unido al centro activo de polimerización.

Estabilización y/o correcto posicionamiento del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo exonucleasa

Los mutantes L567A y Y148A de la DNA polimerasa de Φ 29 mostraron una reducida actividad exonucleasa 3'-5' sobre ssDNA, directamente relacionada con los resultados del ensayo de retraso en gel donde se observaba una pobre estabilización de este sustrato en el centro activo exonucleasa. Una fuerte reducción en la unión a ssDNA había sido también descrita para los mutantes T15I, en el residuo Thr15 del motivo conservado Exo I (de Vega et al., 1996), y F65S, en el residuo Phe65 del motivo Exo II (de Vega et al., 1998b), ambos identificados como ligandos de ssDNA en el centro activo exonucleasa. Además, y al igual que estaba descrito para el mutante N62D en el residuo invariante Asn62 del motivo Exo II y esencial para la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleolisis 3'-5' (de Vega et al., 1996), la sustitución de Tyr148 y Leu567 por Ala no permitía la degradación de sustatos de DNA menores de 6/7 nucleótidos. El defecto en la actividad exonucleasa 3'-5' de estos mutantes fue incluso más evidente cuando se utilizó como sustrato un dsDNA. Bajo estas condiciones, la fuerza de unión al centro activo exonucleasa no es suficiente para competir con la unión al centro activo de polimerización, contribuida por el apareamiento Watson-Crick de las bases y por ligandos de DNA específicos de la enzima en dicho centro activo. Como consecuencia de la disminución de la actividad exonucleasa, se observó un aumento de la tasa de polimerización relativa de los mutantes Y148A y L567A de dos y cuatro veces, respectivamente, que condujo, en ambos casos, a un incremento en la incorporación estable de nucleótidos erróneos. La caracterización bioquímica de los mutantes Y148A y L567A demuestra la importancia de los residuos Tyr148 y Leu567 en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo exonucleasa 3'-5' (ver Figura 10 del capítulo I de Resultados).

El residuo Lys555 fue estudiado mediante el análisis bioquímico del mutante K555A. Este mutante mostró una reducción de 2.3 veces en su actividad exonucleasa sobre dsDNA y una disminución de su balance Exo/pol con respecto a la enzima *wild-type*, lo que conllevó un aumento de cuatro veces en la tasa de incorporación estable de nucleótidos erróneos. A diferencia de los mutantes anteriormente comentados, y a la

vista del ensayo de retraso en gel, en este caso los defectos en la actividad exonucleasa 3'-5' no se pueden relacionar con defectos en la estabilización del ssDNA en el centro activo exonucleasa 3'-5'. La posterior resolución del complejo ternario de la DNA polimerasa de Φ 29 (Berman et al., 2007) mostró cómo efectivamente la cadena lateral de la Lys555 contacta con la quinta base de la cadena iniciadora a través de una molécula de agua (ver Figura 44). Teniendo en cuenta su localización y los resultados bioquímicos obtenidos con el mutante K555A se pueden proponer dos posibles papeles para el residuo Lys555. Por una parte, podría estar implicado en el movimiento del extremo 3' de la cadena iniciadora de un centro activo a otro para eliminar nucleótidos erróneos incorporados durante la replicación. Por otra parte, podría estar implicado en la correcta orientación del extremo de dicha cadena en el centro activo exonucleasa sin contribuir a la estabilidad general de unión del ssDNA.

Hemos demostrado la importancia funcional de los residuos Tyr148 y Leu567 en establecer contactos con el ssDNA y estabilizarlo, así como de orientar el extremo de la cadena iniciadora de manera eficiente para llevar a cabo la reacción de exonucleolisis. La importancia de estos residuos se hace más evidente a medida que el sustrato se va degradando y se pierden otra serie de contactos adicionales que confieren estabilidad al complejo DNA polimerasa-DNA. De esta manera, si eliminamos estos residuos cambia el patrón de degradación procesiva de la enzima y se convierte en un patrón más distributivo, ya que al eliminar contactos entre la DNA polimerasa y el DNA, la estabilidad de este complejo depende exclusivamente de los residuos presentes en el centro activo.

Así, el espectro de interacciones que tienen lugar en el centro activo exonucleasa con el ssDNA, y que participan en la estabilización de éste, estaría formado por los residuos Thr15 y Tyr148 que interaccionan con la última base de la cadena iniciadora. La Thr15 forma un puente de hidrógeno con el extremo 3' OH a través de su grupo amida (de Vega et al., 1996). Por otra parte, tanto la Asn62 como la Phe65 establecen contactos con el penúltimo nucleótido (de Vega et al., 1996; de Vega et al., 1998b). La Asn forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno 4' a través de su grupo δ -amino y la Phe65 forma contactos de van der Waals con la desoxirribosa 3' y con el azúcar adyacente. Por último, la Leu567 se ubicaría entre las dos últimas bases 3' de este ssDNA.

Las mutaciones introducidas en el residuo Pro129 no alteraron la actividad exonucleolítica de la enzima, por lo que podemos descartar un papel de este residuo en

dicha actividad. Este resultado apoya las últimas estructuras cristalográficas de la DNA polimerasa unida a un ssDNA (Berman et al., 2007), en las cuales no se aprecia interacción entre la Pro129 y este sustrato.

Estabilización del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización

Como se ha comentado anteriormente, la perfecta coordinación entre las actividades de síntesis y degradación depende, entre otros factores, de la estabilización del extremo 3' de la cadena iniciadora en ambos centros activos. Así, además de la presencia de desapareamientos en el extremo, mutaciones en residuos implicados en la unión y estabilización del DNA en el centro activo de polimerización favorecerían también la degradación exonucleolítica de dicho extremo, incluso encontrándose éste perfectamente apareado, siendo necesaria una mayor concentración de dNTPs para contrarrestar el defecto de unión y producir una síntesis neta del DNA.

El análisis bioquímico de los mutantes de la DNA polimerasa de Φ 29 K538A, T573A y K575A mostró que estos mutantes tenían una mayor actividad exonucleasa sobre dsDNA que sobre ssDNA. Como consecuencia, presentaban un mayor balance Exo/pol, principalmente en el caso de los mutantes K538A y T573A. Esto podía ser debido a una mala estabilización del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización, como se deduce de los ensayos de retraso en gel.

Posteriormente, la resolución cristalográfica del complejo ternario de la DNA polimerasa de Φ 29 (Berman et al., 2007) mostró cómo la Lys538 interaccionaba con el enlace fosfodiéster entre la antepenúltima y penúltima base de la cadena iniciadora, así como la Thr573 interaccionaba con los enlaces entre las bases quinta, sexta y séptima y la Lys575 lo hacía con los enlaces entre las bases cuarta, quinta y sexta de la cadena molde. Todas estas interacciones se producen entre el residuo aminoacídico y el esqueleto azúcar-fosfato del DNA. En base a estas estructuras y a los resultados bioquímicos obtenidos con los mutantes K538A, T573A y K575A, podríamos atribuir al residuo Lys538 un papel en la estabilización de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización, mientras que los residuos Thr573 y Lys575 podrían desempeñar un papel más sutil de colocación y/u orientación de la cadena molde en dicho centro activo (ver Figura 44). Los defectos en la unión de la cadena molde del DNA mostrados por las DNA polimerasas mutantes también dificultarían la inserción estable del dNTP

entrante en la cadena iniciadora debido a la imposibilidad de formar un par de bases con el dNMP molde orientado incorrectamente.

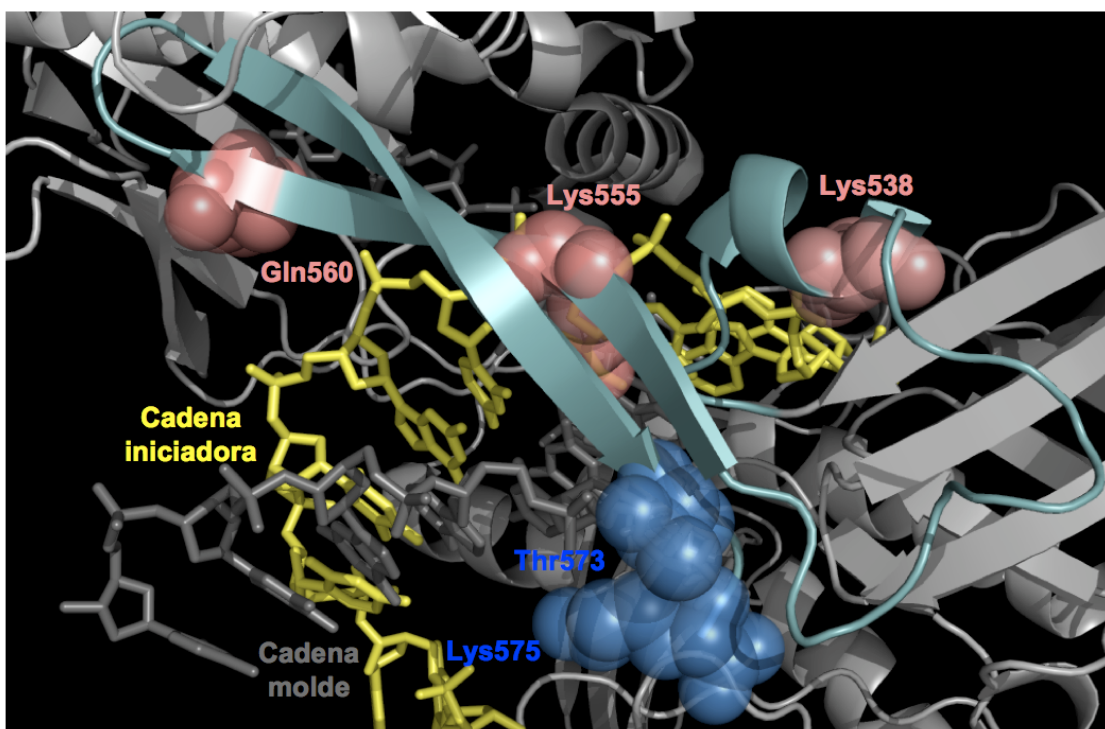


Figura 44. Subdominio *thumb* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. En la figura se muestra el subdominio *thumb* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ unida a un dúplex DNA (PDB 2PZS) donde se observan los residuos Lys538, Lys555 y Gln560 (en rosa), los cuales interaccionan con la cadena iniciadora (en amarillo) y los residuos Thr573 y Lys575 (en azul) que lo hacen con la cadena molde (en gris) del DNA. La figura se hizo utilizando el software Pymol (<http://www.pymol.org>).

Estos resultados se suman a todos los estudios anteriores de residuos pertenecientes a la DNA polimerasa de $\Phi 29$ implicados en la estabilización del extremo de la cadena iniciadora en el centro activo de polimerización. Mediante múltiples alineamientos de secuencia se identificaron diferentes residuos, absoluta o altamente conservados en el dominio C-terminal de las DNA polimerasa de la familia B, implicados en dicha estabilización. Estos residuos pertenecen a los motivos Dx_2SLYP (Blasco et al., 1993a), $Tx_2(G/A)R$ (Méndez et al., 1994) y KxY (Blasco et al., 1995) del subdominio *palm*, al motivo KLx_2NSxYG (motivo B) del *fingers* (Blasco et al., 1993b) y al subdominio TPR1 (Dufour et al., 2003). Por otra parte, mediante mutagénesis dirigida de la DNA polimerasa de $\Phi 29$, se había demostrado que el motivo conservado $YxG(G/A)$, localizado entre los dominios de polimerización y exonucleolisis de las DNA polimerasas de la familia B, estaba implicado en la estabilización de la cadena

molde en ambos centros activos, adjudicándole un papel en la coordinación funcional y estructural de las actividades de síntesis y degradación (Truniger et al., 1996).

Sorprendentemente, aunque el mutante Q560A mostró una reducción en su actividad exonucleasa sobre dsDNA parecida a la mostrada por el K555A, ésta no conllevó una disminución de su balance Exo/pol. De hecho, la pobre interacción de este mutante tanto con ssDNA como con dsDNA sugería un papel de este residuo como ligando del extremo de la cadena iniciadora en los dos centros activos de la DNA polimerasa, al igual que ha sido descrito para otros residuos del subdominio *thumb* en otras DNA polimerasas pertenecientes a las familias A y B (Doublie et al., 1998; Eom et al., 1996; Franklin et al., 2001; Li et al., 1998).

El papel como ligandos de DNA de los residuos pertenecientes al subdominio *thumb* presentados en esta Tesis está de acuerdo con el estudio anterior de un mutante de la DNA polimerasa de Φ 29 al que se le delecionaron los 13 últimos aminoácidos de su región C-terminal. La pérdida de residuos de dicho subdominio encargados de actuar como ligandos de DNA provocó que este mutante estuviera severamente afectado en la unión tanto a ssDNA como a dsDNA, así como en la procesividad (Truniger et al., 2004a).

Papel del subdominio thumb en la coordinación entre las actividades de polimerización 5'-3' y exonucleasa 3'-5'

A pesar de la ausencia de homología de secuencia entre los subdominios *thumb* de diferentes polimerasas, se ha podido encontrar una función común a todos ellos, demostrándose su implicación en la unión al DNA proporcionando estabilidad y procesividad a la DNA polimerasa (Goodrich et al., 1997; Minnick et al., 1996; Patel et al., 2001a; Truniger et al., 2004a).

La comparación de las estructuras cristalográficas de la DNA polimerasa del bacteriófago RB69 con el extremo de la cadena iniciadora unido al centro activo de polimerización y al de exonucleólisis ha permitido identificar los cambios conformacionales que se producen durante este movimiento (Shamoo y Steitz, 1999), sugiriendo que sea el subdominio *thumb* el encargado de guiar el extremo de la cadena iniciadora de un centro activo a otro (Franklin et al., 2001). El subdominio *thumb* de esta DNA polimerasa está subdividido en una serie de microdominios. El microdominio situado en el ápice contiene una serie de residuos cargados que establecen contactos con los fosfatos de la cadena iniciadora cuando ésta se encuentra tanto en el centro activo de

polimerización como en el de exonucleasa. El traslado de la cadena iniciadora entre ambos centros activos se produce gracias a la rotación de dicho microdominio. Mientras tanto, la base del *thumb* permanece inmóvil, garantizando la estabilidad entre la DNA polimerasa y el DNA.

El subdominio *thumb* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ es pequeño y presenta una estructura inusual en forma de β -*hairpin* (Kamtekar et al., 2004), a diferencia del resto de DNA polimerasas, en las que este subdominio tiene un claro carácter helicoidal. El subdominio *thumb* de $\Phi 29$, como ocurre en otras DNA polimerasas de la familia B, está formando una de las paredes de la hendidura en forma de túnel en la que se acomodan los tres últimos nucleótidos 3' del ssDNA en el centro activo exonucleasa (Hopfner et al., 1999; Kamtekar et al., 2004; Wang et al., 1997). En la resolución cristalográfica de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ con un pentanucleótido unido a dicho centro activo se ha observado cómo el residuo Leu567, situado en el ápice del subdominio *thumb*, interacciona con las dos últimas bases 3' del ssDNA. En estas condiciones, el *thumb* también establece contactos con el subdominio TPR2, formando una estructura en forma de anillo cuyo papel parece ser el de anclar el DNA durante la polimerización (Kamtekar et al., 2004). Como ya hemos comentado en la Introducción de esta Tesis, cuando las DNA polimerasas se unen al dúplex DNA, el subdominio *thumb* sufre un cambio conformacional hasta casi rodear al DNA por completo, estableciendo interacciones entre residuos polares o cargados de este subdominio y el esqueleto azúcar-fosfato de nucleótidos pertenecientes tanto a la cadena molde como a la iniciadora (Beese et al., 1993a; Li et al., 1998). La ausencia de microdominios estructuralmente diferentes y de una región flexible entre la base y el ápice de dicho subdominio de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ implicaría que éste habría de rotar en su totalidad o no hacerlo en absoluto. La comparación de las estructuras de la apoenzima y del complejo binario de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ no muestran ningún cambio conformacional del subdominio *thumb* después de la unión del dsDNA. Estas observaciones, junto con el hecho de la ausencia de efecto en el balance Exo/pol de un mutante de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ que contiene un puente disulfuro entre los ápices de los subdominios *thumb* y TPR2 (I. Rodríguez, resultados no publicados) nos permiten especular con un modelo en el cual el movimiento del extremo de la cadena iniciadora entre ambos centros activos se produjera mediante difusión pasiva, rompiéndose interacciones específicas entre el extremo desapareado y residuos de la DNA polimerasa pertenecientes al centro activo de polimerización y creándose nuevas

interacciones con residuos especializados en unir ssDNA en/hacia el centro activo exonucleasa, mientras que otras interacciones se mantendrían constantes.

La presencia de residuos de unión al DNA, específicamente especializados en estabilizar el extremo de la cadena iniciadora en uno o en ambos centros activos de la DNA polimerasa convierte al subdominio *thumb* en el principal responsable de la comunicación entre las actividades de síntesis y de degradación durante el proceso de replicación. La coordinación de ambas actividades es un requisito fundamental para que la información genética sea copiada de manera fiel, especialmente para una DNA polimerasa procesiva como la de $\Phi 29$, la cual lleva a cabo este proceso en ausencia de proteínas accesorias.

2. Papel de los residuos Val250 y Glu486 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ como ligandos de iones metálicos en el centro activo de polimerización

En general, el dominio de polimerización de las DNA polimerasas está constituido por tres subdominios: *palm*, *fingers* y *thumb*, los cuales contribuyen a la unión de un DNA tipo molde/iniciador y del dNTP entrante. En ausencia del dNTP, tanto la apoenzima como el complejo binario DNA polimerasa/DNA están en una conformación abierta. La unión del dNTP induce un cambio conformacional en la DNA polimerasa consistente principalmente en la rotación del subdominio *fingers* hacia el *palm* produciendo el ensamblaje del centro activo, formando el bolsillo hidrofóbico que albergará al par de bases naciente. La superficie de este bolsillo está determinada por residuos que interactúan con el surco menor del nuevo par de bases y con el azúcar, base y fosfatos del dNTP entrante, así como por el par de bases precedente. Se ha establecido que la alta fidelidad conseguida por las DNA polimerasas se debe a la complementariedad de tamaño y forma entre el par de bases naciente y este bolsillo hidrofóbico, más que debido a los enlaces que se producen entre ambas bases; de este modo, sólo un par de bases Watson-Crick encaja perfectamente en dicho bolsillo (Bebenek y Kunkel, 2004; Steitz, 1998). La interacción específica de residuos pertenecientes al centro activo mencionados anteriormente con el nuevo par de bases a través del surco menor de éste es también muy importante para la selectividad y fidelidad de la DNA polimerasa (Minnick et al., 1999; Osheroff et al., 1999).

Estudios de comparación de secuencia sugerían la existencia de tres residuos carboxílicos del subdominio *palm* conservados en el centro activo de todas las DNA polimerasas, los cuales jugarían un papel catalítico en la reacción de polimerización. Sin

embargo, la resolución de estructuras cristalográficas de diferentes complejos ternarios de DNA polimerasas demostraron que sólo dos de estos Asp estaban implicados en la red de interacciones establecidas con los metales A y B. En el caso de las DNA polimerasas de la familia B, estos Asp pertenecen a los motivos A (**D**_{x2}SLYP) y C (YxDT**D**S), siendo los encargados de coordinar los metales catalíticos esenciales para la reacción de polimerización (Joyce y Steitz, 1995). Alineamientos múltiples de secuencias y análisis mutacionales y cristalográficos permitieron identificar los Asp249 (motivo A) y Asp458 (motivo C) como los correspondientes aspárticos catalíticos en la DNA polimerasa de Φ 29 (Bernad et al., 1990; Blasco et al., 1993a; Kamtekar et al., 2004).

Gracias a alineamientos múltiples de secuencia de motivos presentes en el dominio de polimerización de las DNA polimerasas de la familia B, identificamos la presencia de un residuo de Val y otro de Asn, pertenecientes ambos al motivo D_{x2}SLYP y específicamente conservados en las DNA polimerasas que utilizan una proteína como iniciador de la replicación, permitiéndonos proponer para este tipo de DNA polimerasas la secuencia consenso DVNSLYP. Por otra parte, a 18-59 residuos de distancia del motivo C (YxDTDS) de las DNA polimerasas de la familia B se encuentra otro motivo caracterizado por la secuencia LExE, donde el segundo Glu se encuentra invariante en todas las DNA polimerasas de la familia B de secuencia conocida (Braithwaite e Ito, 1993). Resultados cristalográficos de la DNA polimerasa de RB69 previos a esta Tesis mostraron cómo el Glu686 (segundo Glu del motivo LExE) estaba implicado en la unión indirecta del fosfato γ del dNTP entrante a través de la coordinación de un tercer ión metálico no catalítico y una molécula de agua (Zakharova et al., 2004).

Para analizar el papel de los residuos anteriormente mencionados llevamos a cabo mutagénesis dirigida de los correspondientes Val250, Asn251 (motivo D_{x2}SLYP) y Glu486 (motivo LExE) de la DNA polimerasa de Φ 29.

Los resultados presentados en esta Tesis mostraron que los mutantes V250A y N251D, como era de esperar, no estaban afectados en la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa. Cuando se ensayaron en reacciones cortas de polimerización y en condiciones limitantes de dNTPs, ambos mutantes mostraron una mejor actividad con respecto a la de la enzima *wild-type*. Este aumento de la actividad no era debido a una mayor estabilidad de unión de la DNA polimerasa al DNA, como se comprobó mediante ensayos de retraso en gel, sino a una mayor afinidad tanto por el dNTP correcto como por el incorrecto. Mientras que el mutante N251D no se vio apenas

afectado en su factor de discriminación, el V250A mostró incluso una mayor capacidad para discriminar el dNTP incorrecto en comparación con la de la enzima *wild-type*. Estos resultados sugieren que ambos residuos en general, y la Val250 en particular, podrían estar formando parte del conjunto de interacciones que se producen en el centro activo de polimerización con el dNTP entrante.

Gracias a estudios bioquímicos y cristalográficos de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ se ha podido determinar que el dNTP entrante establece interacciones con una gran cantidad de residuos de la DNA polimerasa, las cuales garantizan la estabilidad de éste en el centro activo de polimerización. Los fosfatos del dNTP entrante interaccionan, además de con los Asp249 y Asp458 a través de los metales A y B, con las cadenas básicas de los residuos Lys371 y Lys383 pertenecientes al subdominio *fingers*. Así, el residuo absolutamente conservado Lys383 del motivo B, implicado en la unión y selección del dNTP correcto y cuya secuencia consenso en las DNA polimerasas de la familia B es KLX_3SxYG , interacciona con los fosfatos α y γ (Berman et al., 2007; Saturno et al., 1997) y el residuo prácticamente invariable Lys371, perteneciente al motivo pre-B, también involucrado en la unión del dNTP, lo hace con el fosfato γ del dNTP entrante (Berman et al., 2007; Truniger et al., 2002). Por otra parte, el residuo Lys379 (perteneciente al motivo pre-B) también establece interacciones con el fosfato γ del dNTP entrante a través de una red de moléculas de agua (Berman et al., 2007; Truniger et al., 2004b) (ver Figura 45).

Los datos bioquímicos obtenidos con los mutantes V250A y N251D sugieren la implicación de la Val250 y, en menor medida, de la Asn251 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ en la unión del dNTP entrante. Contrariamente a lo que suele suceder en los estudios de mutagénesis dirigida, en los que se deduce el papel que desempeña un residuo por la pérdida de función de un mutante en dicho residuo, en este caso, la función como ligandos de dNTP de los residuos estudiados se dedujo por un aumento en la afinidad por dNTP.

Los recientes datos cristalográficos del complejo ternario de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ mostraron cómo los fosfatos α y γ del dNTP entrante, así como los residuos catalíticos D249 y D458, coordinaban los dos metales catalíticos (Berman et al., 2007) (ver Figura 45). Fue muy interesante observar que en la DNA polimerasa de $\Phi 29$, el grupo carbonilo del enlace peptídico de la Val250 participaba también en la interacción con el fosfato γ del dNTP entrante a través de la coordinación del metal B. El hecho de reducir la cadena lateral del residuo Val250 a Ala, podría hacer que el quelato $Me^{2+}B-$

dNTP encontrara menos restricciones espaciales, haciendo que se acomodara mejor en el centro activo de polimerización, justificando así la menor K_m por nucleótido mostrada por el mutante V250A.

En el caso de la DNA polimerasa de RB69, la posición que ocupa la Val250 de $\Phi 29$ en el motivo Dx₂SLYP está ocupada por la Leu412. Si bien este residuo no está conservado en ambas DNA polimerasas, sí lo está la función que desempeña, pues se ha observado en diferentes estructuras tridimensionales de la DNA polimerasa de RB69 cómo la Leu412, al igual que la Val250, participa en la coordinación del metal B a través del grupo carbonilo (Franklin et al., 2001; Zakharova et al., 2004).

En la mayoría de DNA polimerasas de la familia B que no pertenecen al subgrupo de las que utilizan una proteína como iniciador, el residuo correspondiente a la Val250 es una Phe o Tyr. El hecho de que dentro de este subgrupo esta posición esté ocupada por un residuo menos voluminoso (Val/Ile) puede tener relación con la capacidad de estas DNA polimerasas de acomodar una proteína en el centro activo de polimerización, de tal manera que la presencia de un grupo aromático podría causar impedimentos estéricos para que la TP iniciadora se una adecuadamente.

En diversas estructuras cristalográficas de DNA polimerasas de la familia A, el residuo equivalente a la Val250 también aparece coordinando el metal B. En el caso de la Pol I de *T. aquaticus* y la DNA polimerasa del bacteriófago T7 se observa cómo, al igual que sucede en $\Phi 29$, el grupo carbonilo del residuo equivalente a la Val250 (Tyr611 y Ala476, respectivamente) es el encargado de interaccionar con este metal catalítico (Doublie et al., 1998; Li et al., 1998; Patel et al., 2001b). Todos estos datos nos llevan a proponer un papel universal de este residuo en ambas familias de DNA polimerasas.

En el caso del residuo Asn251, no se ha visto interacción ni con el metal ni con el dNTP en las estructuras cristalográficas obtenidas, por lo que el aumento en la afinidad por nucleótido observado en el mutante N251D podría ser explicado como un efecto indirecto sobre el residuo vecino Val250.

Los mutantes en el residuo Glu486 mostraron muy baja actividad de polimerización cuando se utilizaba Mg^{2+} como metal activador. Estudios de afinidad por dNTP en presencia de dicho metal mostraron como ésta estaba severamente afectada, así como la discriminación entre el dNTP correcto y el incorrecto había disminuido seis y dos veces en relación con la enzima *wild-type* para los mutantes E486A y E486D, respectivamente. Sin embargo, cuando los mismos experimentos se repitieron en

presencia de Mn^{2+} , observamos como se recuperaba la actividad de polimerización de estos mutantes hasta alcanzar niveles similares a los de la enzima *wild-type*. Dicha recuperación podría ser debida al mayor radio iónico del Mn^{2+} (0.8 Å) frente al del Mg^{2+} (0.66 Å) y a las diferentes interacciones que tienen lugar en el centro activo ya que, como se ha visto que ocurre en Pol β, mientras que el Mg^{2+} interacciona con los fosfatos β- y γ- del dNTP entrante, el Mn^{2+} lo hace con los fosfatos α- y γ- (Pelletier et al., 1996).

La recuperación de la actividad de polimerización de los mutantes E486A y E486D de la DNA polimerasa de Φ29 está a favor de un papel dependiente de ión metálico en la reacción de polimerización. Asimismo, los datos cinéticos obtenidos con $MnCl_2$ y las diferencias de óptimos de metal mostrados por dichos mutantes, sugieren que el residuo Glu486 podría estar implicado en la coordinación, de manera directa o indirecta, del metal en el centro activo de polimerización (ver Figura 45).

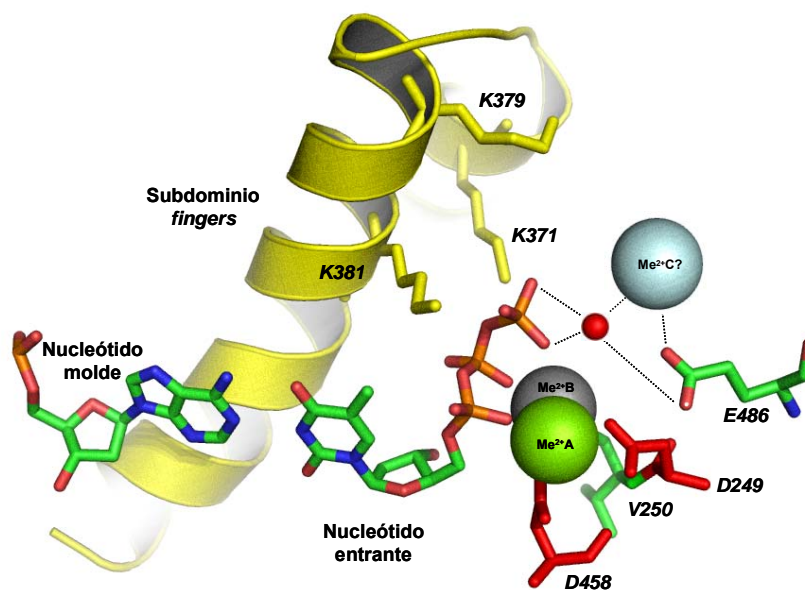


Figura 45. Centro activo de polimerización de la DNA polimerasa de Φ29. En la figura se muestra la estructura cristalográfica del centro activo de polimerización de la DNA polimerasa de Φ29 (PDB 2PYL). En ella se observa el subdominio *fingers* (en amarillo), el dNTP molde, el dNTP entrante y los residuos catalíticos Asp249 y Asp458, así como los residuos pertenecientes al subdominio *palm* estudiados en esta Tesis, Val250 y Glu486. También se pueden ver los dos metales catalíticos y un tercer metal no catalítico modelado según Zakharova et al. (2004). La figura se hizo utilizando el software Pymol (<http://www.pymol.org>).

La resolución cristalográfica del complejo ternario de la DNA polimerasa del bacteriófago RB69 muestra cómo el residuo Glu686 (homólogo del residuo Glu486 de la DNA polimerasa de Φ29) se encuentra a una distancia considerable de los lugares de

unión de los metales A y B, pero a 2.5 Å de un tercer metal no catalítico (metal C). Dicho metal interacciona indirectamente con el fosfato γ del dNTP entrante a través de una molécula de agua, ayudando al correcto posicionamiento de éste en el centro activo de polimerización (Zakharova et al., 2004). De hecho, el mutante E686A de RB69 mostraba un fenotipo muy parecido a los mutantes del residuo Glu486 de Φ 29, con una K_{pol} muy reducida en presencia de Mg^{2+} que se recuperaba en presencia de Mn^{2+} (Zakharova et al., 2004).

La estructura tridimensional de la DNA polimerasa de *Thermococcus gorgonarius* (perteneciente a la familia B) también confirma el papel del segundo Glu del motivo LExE como ligando de metal (Hopfner et al., 1999). De hecho, en este caso los dos Glu (Glu578 y Glu580) de este motivo forman un inusual lugar de unión para diferentes metales. La proximidad del Asp404 catalítico (motivo A) y del fosfato γ del dNTP entrante a estos Glu apoya la idea de que tengan un papel auxiliar en la unión del dNTP y/o en la catálisis.

Todos estos datos bioquímicos junto con las resoluciones cristalográficas de complejos ternarios de diferentes DNA polimerasas permitieron proponer un papel para este residuo como ligando de un metal C, aunque no se puede excluir una implicación en la coordinación del metal B, ya que éste también está ligado al fosfato γ del dNTP entrante. Nuestros datos, así como la absoluta conservación de este residuo en las DNA polimerasas de la familia B, nos permite extrapolar el papel del Glu486 de la DNA polimerasa de Φ 29 en la coordinación del metal en el centro activo de polimerización al resto de DNA polimerasas de tipo eucariótico.

3. Implicación de los subdominios de la TP del bacteriófago Φ 29 en conferir especificidad durante la iniciación de la replicación primada por proteína terminal

La replicación del genoma del bacteriófago Φ 29 sucede mediante un mecanismo de replicación iniciado por TP (revisado en Salas, 1991). En primer lugar, la DNA polimerasa replicativa y la TP forman un heterodímero que reconoce los orígenes de replicación en ambos extremos del genoma lineal (Blanco et al., 1987), constituidos por una secuencia de DNA específica y una TP covalentemente unida a ambos extremos 5' (González-Huici et al., 2000b). La DNA polimerasa cataliza tanto la formación del complejo de iniciación TP-dAMP, como la posterior elongación de éste, acoplado a la síntesis al desplazamiento de banda (Blanco et al., 1989). De manera análoga, la replicación del TP-DNA de los bacteriófagos PRD1 (Caldentey et al., 1993; Caldentey

et al., 1992), Cp-1 (Martín et al., 1996), GA-1 (Illana et al., 1996; Longás et al., 2006) y Nf (González-Huici et al., 2000a; Longás et al., 2006) ocurre por un mecanismo similar, implicando a sus correspondientes DNA polimerasa y TP. Resultados previos obtenidos mediante el intercambio de las DNA polimerasas, las TPs y los TP-DNAs de los bacteriófagos relacionados $\Phi 29$, GA-1 y Nf revelaron la existencia de una gran especificidad entre la DNA polimerasa, la TP y el origen de replicación (Freire et al., 1996; González-Huici et al., 2000a; Longás et al., 2006).

Papel del dominio intermedio de la TP de $\Phi 29$ en el reconocimiento específico de la DNA polimerasa durante la iniciación de la replicación

Como ya se ha mencionado anteriormente, la iniciación de la replicación del DNA del bacteriófago $\Phi 29$ requiere la formación de un complejo DNA polimerasa-TP iniciadora que posteriormente reconoce los orígenes de replicación constituidos por la TP paterna y una secuencia específica en el DNA (González-Huici et al., 2000a). El mismo mecanismo es utilizado por el bacteriófago relacionado GA-1 (Illana et al., 1996). La formación de un heterodímero estable entre la DNA polimerasa y la TP es un requisito fundamental para la replicación del genoma del fago. Esta interacción es muy compleja y, como se ha visto en la estructura cristalográfica del heterodímero de $\Phi 29$, existen múltiples residuos de ambas proteínas implicados en ella (dominios exonucleasa, TPR1, TPR2 y *thumb* de la DNA polimerasa y dominios intermedio e iniciador de la TP) (Kamtekar et al., 2006).

Debido al alto grado de identidad de secuencia entre las TPs de los bacteriófagos $\Phi 29$ y GA-1 (Illana et al., 1996), el servidor Swiss-Model nos proporcionó un modelado para esta última utilizando la estructura cristalográfica de la primera como molde. La estructura predicha mostraba los dominios intermedio e iniciador plegados como en la TP de $\Phi 29$, permitiéndonos modelar la TP de GA-1 unida a la DNA polimerasa de $\Phi 29$ y la construcción y el posterior análisis bioquímico de TPs quiméricas a las que se les intercambió el dominio iniciador de ambas TPs. De este modo, se ha identificado la interacción entre el dominio intermedio de la TP y el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa como la principal responsable de la especificidad en el reconocimiento entre ambas proteínas, ya que la DNA polimerasa sólo es capaz de formar un complejo activo con la TP quimérica que contiene la región N-terminal (dominios N-terminal e intermedio; residuos 1-173) de su TP homóloga. Puesto que la delección del dominio N-terminal de la TP no impide la interacción entre ambas proteínas, podemos afirmar que

es el dominio intermedio el verdadero responsable de este reconocimiento específico. Este dominio encaja estructuralmente y establece una superficie de contacto de 575 \AA^2 con el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa. Esta interacción está estabilizada fundamentalmente por dos puentes salinos entre los residuos Arg158 y Arg169 del dominio intermedio de la TP y Glu291 y Glu322 del subdominio TPR1 de la DNA polimerasa (Kamtekar et al., 2006), estando sólo la segunda interacción conservada en el caso de GA-1. Además, el modelado de la interacción entre el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ y el dominio intermedio de la TP de GA-1 muestra la presencia de numerosos impedimentos estéricos, los cuales dificultarían aun más la formación de este heterodímero. Este hecho apoya la hipótesis de que la especificidad entre la DNA polimerasa y la TP requiere una perfecta complementariedad estructural entre los dominios TPR1 e intermedio.

Aunque las DNA polimerasas de $\Phi 29$ y GA-1 son capaces de catalizar la iniciación de la replicación con las quimeras N- Φ y N-G respectivamente, esta actividad es bastante menor que la mostrada con las TPs *wild-type*, lo que indica la importancia de la complementariedad estructural entre la DNA polimerasa y el dominio iniciador de la TP para contribuir a la afinidad y especificidad, aunque en menor grado que el dominio intermedio, ya que ambas DNA polimerasas pueden alojar el dominio iniciador de la TP no homóloga.

La estructura cristalográfica del heterodímero DNA polimerasa/TP de $\Phi 29$ muestra una interacción laxa entre la región C-terminal de una hélice- α del dominio iniciador de la TP y el subdominio TPR2 de la DNA polimerasa, en la que se establecen contactos entre los residuos Glu252, Gln253 y Arg256 de la TP y los residuos Leu416, Gly417 y Glu419 de la DNA polimerasa (Kamtekar et al., 2006). El modelado del dominio iniciador de la TP de GA-1 sobre la estructura del heterodímero de $\Phi 29$ muestra que estos residuos no están conservados ni en la DNA polimerasa ni en la TP de GA-1, observándose sólo ligeros impedimentos estéricos. Este hecho podría explicar la mejor tolerancia por parte de la DNA polimerasa para acomodar el dominio iniciador, en comparación con la poca tolerancia para unir el dominio intermedio de la TP no homóloga.

El modelado de la TP de GA-1 sobre la estructura del heterodímero de $\Phi 29$ muestra también cómo la parte C-terminal de otra hélice- α del dominio iniciador de la TP contacta con el subdominio *thumb* de la DNA polimerasa. El hecho de que la DNA polimerasa de GA-1 acomode peor el dominio iniciador heterólogo que la DNA

polimerasa de $\Phi 29$ puede ser debido a que esta hélice- α de la TP de GA-1 contiene dos residuos menos que la de $\Phi 29$, existiendo menos impedimentos estructurales entre la DNA polimerasa de $\Phi 29$ y el dominio iniciador de GA-1 que entre la DNA polimerasa de GA-1 y el dominio iniciador de $\Phi 29$.

Aparte de estas diferencias estructurales, la DNA polimerasa de GA-1 muestra una sorprendente exclusividad a la hora de utilizar sólo su propia TP como iniciador, siendo incapaz de actuar sobre un iniciador DNA (Longás et al., 2006), a diferencia de la DNA polimerasa de $\Phi 29$. Esta exclusividad podría explicar en parte que esta DNA polimerasa no sea muy eficiente para acomodar el dominio iniciador de la TP de $\Phi 29$.

La parte N-terminal de la TP es necesaria para que el dominio iniciador sea capaz de primar la iniciación de la replicación

En esta Tesis hemos estudiado también cómo el dominio iniciador de la TP de $\Phi 29$ no es capaz por sí solo de actuar como iniciador de la replicación, probablemente debido a una unión no productiva al dominio de polimerización de la DNA polimerasa. Sin embargo, la adición de la región N-terminal de la TP asistió la función del dominio iniciador durante la reacción de iniciación. El hecho de que ambos dominios no estuvieran estructuralmente unidos nos condujo a proponer que la parte N-terminal de la TP induciría un cambio conformacional en la DNA polimerasa que permitiera el alojamiento en su centro activo del dominio iniciador en una conformación catalíticamente competente.

La comparación de la estructura de la DNA polimerasa (Kamtekar et al., 2004) y la del heterodímero formado por ésta y la TP (Kamtekar et al., 2006) muestra que la única diferencia estructural entre ambas reside en un *loop* perteneciente al subdominio TPR1 (residuos 304-315) que presenta un alto grado de flexibilidad, el cual aparece plegado hacia afuera si la DNA polimerasa está unida a la TP. Este hecho, junto con nuestros resultados experimentales, nos lleva a proponer un modelo para la interacción DNA polimerasa/TP (Figura 46). El dominio intermedio reconocería e interaccionaría específicamente con la región TPR1 de la DNA polimerasa, provocando el cambio conformacional del *loop* del TPR1 de una conformación flexible (dibujado en morado en la Figura 46) a una conformación curvada hacia afuera (en naranja en la Figura 46) que permitiría el alojamiento adecuado del dominio iniciador.

Este discreto cambio conformacional, provocado por la interacción entre el TPR1 y el dominio intermedio, parece ser estrictamente necesario para que el dominio iniciador de la TP se sitúe en el centro activo de polimerización de una manera catalíticamente competente.

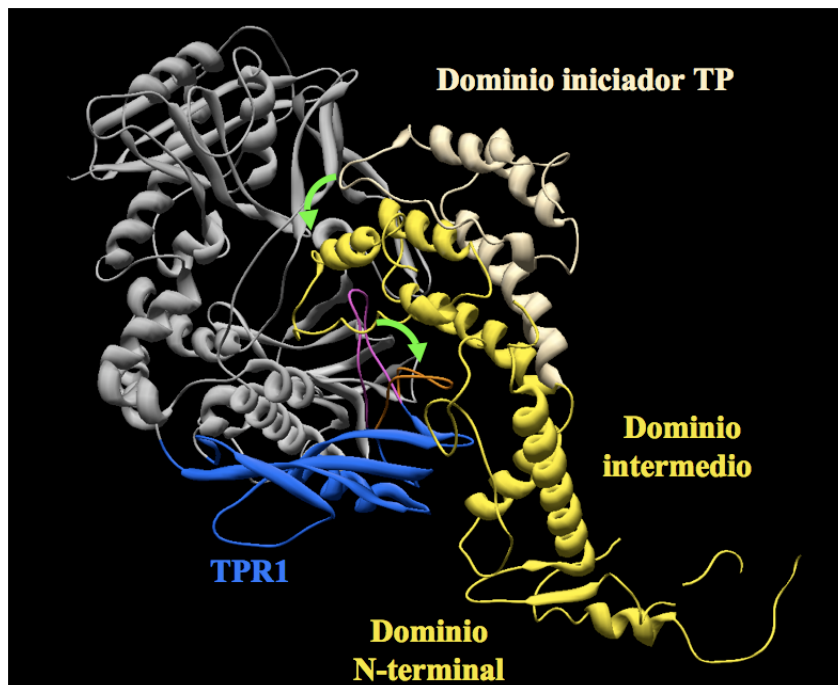


Figura 46. Cambios conformacionales propuestos durante la formación del heterodímero DNA polimerasa/TP de $\Phi 29$. La DNA polimerasa de $\Phi 29$ se presenta en gris y el subdominio TPR1 en azul. La orientación flexible del *loop* del subdominio TPR1 en la apoenzima (PDB 1XHX) y su conformación estable y curvada hacia fuera mostrada en el complejo DNA polimerasa/TP (PDB 2EX3) se muestran en morado y naranja, respectivamente. La TP aparece en amarillo (el dominio iniciador de la TP en una orientación no productiva en un color más claro). Las flechas verdes indican los movimientos propuestos tanto para el subdominio TPR1 como para el dominio iniciador de la TP para formar un heterodímero estable.

Papel del dominio N-terminal de la TP de $\Phi 29$ durante la replicación del TP-DNA

Por otra parte, hemos estudiado el papel del dominio N-terminal de la TP (residuos 1-73) mediante la construcción de un mutante de delección en dicho dominio. Este mutante no estaba afectado en la interacción con la DNA polimerasa, como era de esperar en base a los datos cristalográficos, ya que era capaz de llevar a cabo la reacción de iniciación tanto en presencia como en ausencia de molde. De igual manera, fue capaz de replicar y amplificar el TP-DNA, por lo que podemos descartar que este dominio esté implicado en el reconocimiento de los orígenes de replicación. Como ya hemos comentado, el hecho de que este mutante sólo sea activo en presencia de la DBP indica algún defecto en la apertura de dichos orígenes para iniciar la replicación del TP-DNA.

No se puede excluir que, en ausencia de DBP, la iniciación sea más dependiente de algún tipo de reconocimiento entre el dominio N-terminal de la TP iniciadora y la TP paterna.

Dos proteínas tempranas codificadas por el bacteriófago, p1 y p16.7, parecen implicadas en la compartimentalización y organización de la maquinaria de replicación en la membrana del huésped (Bravo et al., 2000; Meijer et al., 2000; Serna-Rico et al., 2003; Serrano-Heras et al., 2003). p1 localiza el complejo DNA polimerasa/TP en la membrana a través de la interacción de la región N-terminal de la p1 con la TP. Por otra parte, p16.7 también está implicada en la organización de la replicación del DNA de $\Phi 29$ en la membrana del huésped y es capaz de interactuar con el DNA y con la TP, pero no es capaz de hacerlo con el complejo DNA polimerasa/TP. En ambos casos, parece que la región de la TP que interactúa con dichas proteínas podría solapar con las regiones de la TP encargadas de interactuar con la DNA polimerasa, aunque no se puede descartar que el dominio N-terminal de la TP también esté implicado en dicha interacción *in vivo*.

Conclusiones

1.- El residuo Tyr148, perteneciente al motivo Kx_2h de la DNA polimerasa de $\Phi 29$, está implicado en la estabilización específica y el correcto posicionamiento del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo de exonucleolisis, siendo importante para esta actividad y para la fidelidad de la replicación.

2.- El subdominio *thumb* de la DNA polimerasa de $\Phi 29$ contiene residuos especializados en la unión del extremo iniciador tanto en el centro activo de polimerización como en el de exonucleolisis, siendo el principal subdominio responsable de la coordinación de ambas actividades. Así, los residuos Lys555 y Leu567 están implicados en la estabilización y/u orientación del extremo 3' de la cadena iniciadora en el centro activo exonucleasa, los residuos Lys538, Thr573 y Lys575 participan en la estabilización de dicho extremo en el centro activo de polimerización y el residuo Gln560 desempeña un papel general de unión del extremo iniciador en ambos centros activos.

3.- El residuo Val250, perteneciente al motivo Dx_2SLYP y evolutivamente conservado en las DNA polimerasas que utilizan una proteína como iniciador, juega un papel importante en la unión del nucleótido, así como en la afinidad de la DNA polimerasa por éste, de acuerdo con un papel como ligando del metal B.

4.- El residuo Glu486 de la DNA polimerasa de $\Phi 29$, perteneciente al motivo LExE y evolutivamente conservado en las DNA polimerasas de la familia B, está implicado en la unión del nucleótido en el centro activo de polimerización. Su dependencia respecto al tipo y óptimo de metal sugieren un papel como ligando de éste en el centro activo de las DNA polimerasas de la familia B.

5.- La construcción de TPs quiméricas mediante el intercambio de los dominios iniciadores de las TPs de los bacteriófagos $\Phi 29$ y GA-1 nos ha permitido demostrar que la DNA polimerasa sólo puede formar complejos funcionalmente activos con aquellas quimeras que tengan el dominio intermedio de la TP homóloga, sugiriendo que este dominio es el principal responsable del reconocimiento específico entre ambas proteínas a través de su interacción con el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa.

6.- La baja actividad y estabilidad de las DNA polimerasas con las TPs quiméricas que poseen un dominio de iniciación no homólogo sugiere la necesidad de una perfecta complementación estructural entre la DNA polimerasa y el dominio iniciador de la TP.

7.- Gracias a la expresión individual del dominio iniciador y de la región N-terminal de la TP de $\Phi 29$ hemos demostrado cómo esta última asiste la función del primero. De este modo, proponemos un modelo en el cual la interacción entre la región N-terminal de la TP y el subdominio TPR1 de la DNA polimerasa promueve cambios conformacionales en esta última que permitirían el acoplamiento en una conformación catalíticamente competente del dominio iniciador de la TP en el centro activo de polimerización.

8.- El dominio N-terminal de la TP de $\Phi 29$ no está implicado en la interacción con la DNA polimerasa. En ausencia de DBP, la cual produce la apertura de los orígenes, este dominio de la TP puede ser importante para llevar a cabo la iniciación, debido a una contribución en la apertura de los orígenes o a una interacción directa con la TP paterna.

Bibliografía

- Abbotts, J., SenGupta, D.N., Zmudzka, B., Widen, S.G., Notario, V. y Wilson, S.H. (1988) Expression of human DNA polymerase β in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry*, **27**, 901-909.
- Bailey, S., Wing, R.A. y Steitz, T.A. (2006) The structure of *T. aquaticus* DNA polymerase III is distinct from eukaryotic replicative DNA polymerases. *Cell*, **126**, 893-904.
- Baker, T.A. y Bell, S.P. (1998) Polymerases and the replisome: machines within machines. *Cell*, **92**, 295-305.
- Bamford, D.H., Ravantti, J.J., Ronnholm, G., Laurinavicius, S., Kukkaro, P., Dyall-Smith, M., Somerharju, P., Kalkkinen, N. y Bamford, J.K. (2005) Constituents of SH1, a novel lipid-containing virus infecting the halophilic euryarchaeon *Haloarcula hispanica*. *J. Virol.*, **79**, 9097-9107.
- Beard, W.A. y Wilson, S.H. (2000) Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase β . *Mutat. Res.*, **460**, 231-244.
- Beard, W.A. y Wilson, S.H. (2003) Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure*, **11**, 489-496.
- Bebenek, A., Carver, G.T., Dressman, H.K., Kadyrov, F.A., Haseman, J.K., Petrov, V., Konigsberg, W.H., Karam, J.D. y Drake, J.W. (2002) Dissecting the fidelity of bacteriophage RB69 DNA polymerase: site-specific modulation of fidelity by polymerase accessory proteins. *Genetics*, **162**, 1003-1018.
- Bebenek, K. y Kunkel, T.A. (1995) Analyzing fidelity of DNA polymerases. *Methods Enzymol.*, **262**, 217-232.
- Bebenek, K. y Kunkel, T.A. (2004) Functions of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.*, **69**, 137-165.
- Beckman, R.A. y Loeb, L.A. (1993) Multi-stage proofreading in DNA replication. *Q. Rev. Biophys.*, **26**, 225-331.
- Beese, L.S., Derbyshire, V. y Steitz, T.A. (1993a) Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science*, **260**, 352-355.
- Beese, L.S., Friedman, J.M. y Steitz, T.A. (1993b) Crystal structures of the Klenow fragment of DNA polymerase I complexed with deoxynucleoside triphosphate and pyrophosphate. *Biochemistry*, **32**, 14095-14101.

- Beese, L.S. y Steitz, T.A. (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.*, **10**, 25-33.
- Berman, A.J., Kamtekar, S., Goodman, J.L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. y Steitz, T.A. (2007) Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J.*, **26**, 3494-3505.
- Bernad, A., Blanco, L., Lázaro, J.M., Martín, G. y Salas, M. (1989) A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, **59**, 219-228.
- Bernad, A., Blanco, L. y Salas, M. (1990) Site-directed mutagenesis of the YCDTDS amino acid motif of the Φ 29 DNA polymerase. *Gene*, **94**, 45-51.
- Bernad, A., Zaballos, A., Salas, M. y Blanco, L. (1987) Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *EMBO J.*, **6**, 4219-4225.
- Blanco, L., Bernad, A., Blasco, M.A. y Salas, M. (1991) A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. *Gene*, **100**, 27-38.
- Blanco, L., Bernad, A., Esteban, J.A. y Salas, M. (1992) DNA-independent deoxynucleotidylation of the Φ 29 terminal protein by the Φ 29 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1225-1230.
- Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J.M., Martín, G., Garmendia, C. y Salas, M. (1989) Highly efficient DNA synthesis by the phage Φ 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8935-8940.
- Blanco, L., Gutiérrez, J., Lázaro, J.M., Bernad, A. y Salas, M. (1986) Replication of phage Φ 29 DNA *in vitro*: role of the viral protein p6 in initiation and elongation. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4923-4937.
- Blanco, L., Lázaro, J.M., de Vega, M., Bonnín, A. y Salas, M. (1994) Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 12198-12202.
- Blanco, L., Prieto, I., Gutiérrez, J., Bernad, A., Lázaro, J.M., Hermoso, J.M. y Salas, M. (1987) Effect of NH_4^+ ions on Φ 29 DNA-protein p3 replication: formation of a complex between the terminal protein and the DNA polymerase. *J. Virol.*, **61**, 3983-3991.

- Blanco, L. y Salas, M. (1984) Characterization and purification of a phage Φ 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 5325-5329.
- Blanco, L. y Salas, M. (1985a) Characterization of a 3'-5' exonuclease activity in the phage Φ 29-encoded DNA polymerase. *Nucleic Acids. Res.*, **13**, 1239-1249.
- Blanco, L. y Salas, M. (1985b) Replication of phage Φ 29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase: synthesis of full-length Φ 29 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 6404-6408.
- Blanco, L. y Salas, M. (1995) Mutational analysis of bacteriophage Φ 29 DNA polymerase. *Methods Enzymol.*, **262**, 283-294.
- Blasco, M.A., Bernad, A., Blanco, L. y Salas, M. (1991) Characterization and mapping of the pyrophosphorolytic activity of the phage Φ 29 DNA polymerase. Involvement of amino acid motifs highly conserved in α -like DNA polymerases. *J. Biol. Chem.*, **266**, 7904-7909.
- Blasco, M.A., Blanco, L., Parés, E., Salas, M. y Bernad, A. (1990) Structural and functional analysis of temperature-sensitive mutants of the phage Φ 29 DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4763-4770.
- Blasco, M.A., Lázaro, J.M., Bernad, A., Blanco, L. y Salas, M. (1992) Φ 29 DNA polymerase active site. Mutants in conserved residues Tyr254 and Tyr390 are affected in dNTP binding. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19427-19434.
- Blasco, M.A., Lázaro, J.M., Blanco, L. y Salas, M. (1993a) Φ 29 DNA polymerase active site. Residue Asp249 of conserved amino acid motif "DX₂SLYP" is critical for synthetic activities. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24106-24113.
- Blasco, M.A., Lázaro, J.M., Blanco, L. y Salas, M. (1993b) Φ 29 DNA polymerase active site. The conserved amino acid motif "KX₃NSxYg" is involved in template-primer binding and dNTP selection. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16763-16770.
- Blasco, M.A., Méndez, J., Lázaro, J.M., Blanco, L. y Salas, M. (1995) Primer terminus stabilization at the Φ 29 DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif KxY. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2735-2740.
- Bogenhagen, D.F., Pinz, K.G. y Perez-Jannotti, R.M. (2001) Enzymology of mitochondrial base excision repair. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.*, **68**, 257-271.
- Bollum, F.J. (1960) Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J. Biol. Chem.*, **235**, PC18-20.

- Bonnin, A., Lázaro, J.M., Blanco, L. y Salas, M. (1999) A single tyrosine prevents insertion of ribonucleotides in the eukaryotic-type Φ 29 DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **290**, 241-251.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F. y Koonin, E.V. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.*, **11**, 68-76.
- Boudsocq, F., Kokoska, R.J., Plosky, B.S., Vaisman, A., Ling, H., Kunkel, T.A., Yang, W. y Woodgate, R. (2004) Investigating the role of the little finger domain of Y-family DNA polymerases in low fidelity synthesis and translesion replication. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32932-32940.
- Bowman, G.D., Goedken, E.R., Kazmirski, S.L., O'Donnell, M. y Kuriyan, J. (2005) DNA polymerase clamp loaders and DNA recognition. *FEBS Lett.*, **579**, 863-867.
- Braithwaite, D.K. e Ito, J. (1993) Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 787-802.
- Brautigam, C.A. y Steitz, T.A. (1998) Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 54-63.
- Bravo, A., Illana, B. y Salas, M. (2000) Compartmentalization of phage Φ 29 DNA replication: interaction between the primer terminal protein and the membrane-associated protein p1. *EMBO J.*, **19**, 5575-5584.
- Burgers, P.M., Koonin, E.V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K.C., Christman, M.F., Copeland, W.C., Friedberg, E.C., Hanaoka, F., Hinkle, D.C., Lawrence, C.W., Nakanishi, M., Ohmori, H., Prakash, L., Prakash, S., Reynaud, C.A., Sugino, A., Todo, T., Wang, Z., Weill, J.C. y Woodgate, R. (2001) Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.*, **276**, 43487-43490.
- Caldentey, J., Blanco, L., Bamford, D.H. y Salas, M. (1993) *In vitro* replication of bacteriophage PRD1 DNA. Characterization of the protein-primed initiation site. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3725-3730.
- Caldentey, J., Blanco, L., Savilahti, H., Bamford, D.H. y Salas, M. (1992) *In vitro* replication of bacteriophage PRD1 DNA. Metal activation of protein-primed initiation and DNA elongation. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3971-3976.

- Capson, T.L., Peliska, J.A., Kaboord, B.F., Frey, M.W., Lively, C., Dahlberg, M. y Benkovic, S.J. (1992) Kinetic characterization of the polymerase and exonuclease activities of the gene 43 protein of bacteriophage T4. *Biochemistry*, **31**, 10984-10994.
- Carthew, R.W., Chodosh, L.A. y Sharp, P.A. (1985) An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell*, **43**, 439-448.
- de Vega, M., Blanco, L. y Salas, M. (1998a) Φ 29 DNA polymerase residue Ser122, a single-stranded DNA ligand for 3'-5' exonucleolysis, is required to interact with the terminal protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28966-28977.
- de Vega, M., Ilyina, T., Lázaro, J.M., Salas, M. y Blanco, L. (1997) An invariant lysine residue is involved in catalysis at the 3'-5' exonuclease active site of eukaryotic-type DNA polymerases. *J. Mol. Biol.*, **270**, 65-78.
- de Vega, M., Lázaro, J.M., Salas, M. y Blanco, L. (1996) Primer-terminus stabilization at the 3'-5' exonuclease active site of Φ 29 DNA polymerase. Involvement of two amino acid residues highly conserved in proofreading DNA polymerases. *EMBO J.*, **15**, 1182-1192.
- de Vega, M., Lázaro, J.M., Salas, M. y Blanco, L. (1998b) Mutational analysis of Φ 29 DNA polymerase residues acting as ssDNA ligands for 3'-5' exonucleolysis. *J. Mol. Biol.*, **279**, 807-822.
- Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. y Argos, P. (1990) An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.*, **3**, 461-467.
- Derbyshire, V., Grindley, N.D. y Joyce, C.M. (1991) The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction. *EMBO J.*, **10**, 17-24.
- Dionne, I., Nookala, R.K., Jackson, S.P., Doherty, A.J. y Bell, S.D. (2003) A heterotrimeric PCNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Cell*, **11**, 275-282.
- Domínguez, O., Ruiz, J.F., Laín de Lera, T., García-Díaz, M., González, M.A., Kirchhoff, T., Martínez, A.C., Bernad, A. y Blanco, L. (2000) DNA polymerase mu (Pol μ), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J.*, **19**, 1731-1742.

- Donlin, M.J., Patel, S.S. y Johnson, K.A. (1991) Kinetic partitioning between the exonuclease and polymerase sites in DNA error correction. *Biochemistry*, **30**, 538-546.
- Doublié, S., Tabor, S., Long, A.M., Richardson, C.C. y Ellenberger, T. (1998) Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution. *Nature*, **391**, 251-258.
- Dufour, E., Méndez, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L. y Salas, M. (2000) An aspartic acid residue in TPR-1, a specific region of protein-priming DNA polymerases, is required for the functional interaction with primer terminal protein. *J. Mol. Biol.*, **304**, 289-300.
- Dufour, E., Rodríguez, I., Lázaro, J.M., de Vega, M. y Salas, M. (2003) A conserved insertion in protein-primed DNA polymerases is involved in primer terminus stabilisation. *J. Mol. Biol.*, **331**, 781-794.
- Eom, S.H., Wang, J. y Steitz, T.A. (1996) Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature*, **382**, 278-281.
- Esteban, J.A., Bernad, A., Salas, M. y Blanco, L. (1992) Metal activation of synthetic and degradative activities of Φ 29 DNA polymerase, a model enzyme for protein-primed DNA replication. *Biochemistry*, **31**, 350-359.
- Esteban, J.A., Salas, M. y Blanco, L. (1993) Fidelity of Φ 29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J. Biol. Chem.*, **268**, 2719-2726.
- Esteban, J.A., Soengas, M.S., Salas, M. y Blanco, L. (1994) 3'-5' exonuclease active site of Φ 29 DNA polymerase. Evidence favoring a metal ion-assisted reaction mechanism. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31946-31954.
- Franklin, M.C., Wang, J. y Steitz, T.A. (2001) Structure of the replicating complex of a pol α family DNA polymerase. *Cell*, **105**, 657-667.
- Freemont, P.S., Friedman, J.M., Beese, L.S., Sanderson, M.R. y Steitz, T.A. (1988) Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 8924-8928.
- Freire, R., Serrano, M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1996) Activation of replication origins in Φ 29-related phages requires the recognition of initiation proteins to specific nucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31000-31007.
- Frick, D.N. y Richardson, C.C. (2001) DNA primases. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 39-80.

- Fuller, R.S., Funnell, B.E. y Kornberg, A. (1984) The dnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell*, **38**, 889-900.
- García-Díaz, M., Bebenek, K., Gao, G., Pedersen, L.C., London, R.E. y Kunkel, T.A. (2005) Structure-function studies of DNA polymerase λ . *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1358-1367.
- García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernández, L.A., de Lera, L.T., Saniger, M.L., Ruiz, J.F., Párraga, M., García-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., Bernad, A. y Blanco, L. (2000) DNA polymerase lambda (Pol λ), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J. Mol. Biol.*, **301**, 851-867.
- Garmendia, C., Bernad, A., Esteban, J.A., Blanco, L. y Salas, M. (1992) The bacteriophage Φ 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2594-2599.
- González-Huici, V. (2001) Reconocimiento del origen de replicación del DNA del bacteriófago Φ 29. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid.
- González-Huici, V., Lázaro, J.M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (2000a) Specific recognition of parental terminal protein by DNA polymerase for initiation of protein-primed DNA replication. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14678-14683.
- González-Huici, V., Salas, M. y Hermoso, J.M. (2000b) Sequence requirements for protein-primed initiation and elongation of phage Φ 29 DNA replication. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40547-40553.
- Goodman, M.F. (1997) Hydrogen bonding revisited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 10493-10495.
- Goodrich, L.D., Lin, T.C., Spicer, E.K., Jones, C. y Konigsberg, W.H. (1997) Residues at the carboxy terminus of T4 DNA polymerase are important determinants for interaction with the polymerase accessory proteins. *Biochemistry*, **36**, 10474-10481.
- Gotte, M., Li, X. y Wainberg, M.A. (1999) HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 199-210.
- Graziewicz, M.A., Longley, M.J. y Copeland, W.C. (2006) DNA polymerase γ in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem. Rev.*, **106**, 383-405.

- Guex, N. y Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Gutiérrez, C., Sogo, J.M. y Salas, M. (1991) Analysis of replicative intermediates produced during bacteriophage Φ 29 DNA replication *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, **222**, 983-994.
- Hamdan, S., Bulloch, E.M., Thompson, P.R., Beck, J.L., Yang, J.Y., Crowther, J.A., Lilley, P.E., Carr, P.D., Ollis, D.L., Brown, S.E. y Dixon, N.E. (2002) Hydrolysis of the 5'-*p*-nitrophenyl ester of TMP by the proofreading exonuclease (ϵ) subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III. *Biochemistry*, **41**, 5266-5275.
- Haracska, L., Kondratick, C.M., Unk, I., Prakash, S. y Prakash, L. (2001) Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase η function. *Mol. Cell*, **8**, 407-415.
- Heinhorst, S., Cannon, G.C. y Weissbach, A. (1990) Chloroplast and Mitochondrial DNA Polymerases from Cultured Soybean Cells. *Plant Physiol.*, **92**, 939-945.
- Hopfner, K.P., Eichinger, A., Engh, R.A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R. y Angerer, B. (1999) Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from *Thermococcus gorgonarius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 3600-3605.
- Hübscher, U., Maga, G. y Spadari, S. (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 133-163.
- Illana, B., Blanco, L. y Salas, M. (1996) Functional characterization of the genes coding for the terminal protein and DNA polymerase from bacteriophage GA-1. Evidence for a sliding-back mechanism during protein-primed GA-1 DNA replication. *J. Mol. Biol.*, **264**, 453-464.
- Inciarte, M.R., Lázaro, J.M., Salas, M. y Viñuela, E. (1976) Physical map of bacteriophage Φ 29 DNA. *Virology*, **74**, 314-323.
- Inciarte, M.R., Salas, M. y Sogo, J.M. (1980) Structure of replicating DNA molecules of *Bacillus subtilis* bacteriophage Φ 29. *J. Virol.*, **34**, 187-199.
- Indiani, C., McInerney, P., Georgescu, R., Goodman, M.F. y O'Donnell, M. (2005) A sliding-clamp toolbelt binds high- and low-fidelity DNA polymerases simultaneously. *Mol. Cell*, **19**, 805-815.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Jr., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, P. y et al. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase

- complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 6320-6324.
- Johnson, A. y O'Donnell, M. (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 283-315.
- Johnson, K.A. (1993) Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 685-713.
- Johnson, S.J. y Beese, L.S. (2004) Structures of mismatch replication errors observed in a DNA polymerase. *Cell*, **116**, 803-816.
- Joyce, C.M. y Benkovic, S.J. (2004) DNA polymerase fidelity: kinetics, structure, and checkpoints. *Biochemistry*, **43**, 14317-14324.
- Joyce, C.M. y Steitz, T.A. (1994) Function and structure relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 777-822.
- Joyce, C.M. y Steitz, T.A. (1995) Polymerase structures and function: variations on a theme? *J. Bacteriol.*, **177**, 6321-6329.
- Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. y Steitz, T.A. (2004) Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage $\Phi 29$. *Mol. Cell*, **16**, 609-618.
- Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. y Steitz, T.A. (2006) The $\Phi 29$ DNA polymerase:protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition. *EMBO J.*, **25**, 1335-1343.
- Kelman, Z. (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, **14**, 629-640.
- Kelman, Z. y O'Donnell, M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 171-200.
- Kiefer, J.R., Mao, C., Braman, J.C. y Beese, L.S. (1998) Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature*, **391**, 304-307.
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. y Steitz, T.A. (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, **256**, 1783-1790.
- Kong, X.P., Onrust, R., O'Donnell, M. y Kuriyan, J. (1992) Three-dimensional structure of the β subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell*, **69**, 425-437.

- Kornberg, A. (1988) DNA replication. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1-4.
- Kumar, J.K., Chiu, E.T., Tabor, S. y Richardson, C.C. (2004) A unique region in bacteriophage t7 DNA polymerase important for exonucleolytic hydrolysis of DNA. *J. Biol. Chem.*, **279**, 42018-42025.
- Kunkel, T.A. y Bebenek, K. (2000) DNA replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 497-529.
- Kunkel, T.A. y Wilson, S.H. (1998) DNA polymerases on the move. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 95-99.
- Lamers, M.H., Georgescu, R.E., Lee, S.G., O'Donnell, M. y Kuriyan, J. (2006) Crystal structure of the catalytic α subunit of *E. coli* replicative DNA polymerase III. *Cell*, **126**, 881-892.
- Lázaro, J.M., Blanco, L. y Salas, M. (1995) Purification of bacteriophage Φ 29 DNA polymerase. *Methods Enzymol.*, **262**, 42-49.
- Li, Y., Korolev, S. y Waksman, G. (1998) Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *EMBO J.*, **17**, 7514-7525.
- Lin, T.C., Karam, G. y Konigsberg, W.H. (1994) Isolation, characterization, and kinetic properties of truncated forms of T4 DNA polymerase that exhibit 3'-5' exonuclease activity. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19286-19294.
- Longás, E., de Vega, M., Lázaro, J.M. y Salas, M. (2006) Functional characterization of highly processive protein-primed DNA polymerases from phages Nf and GA-1, endowed with a potent strand displacement capacity. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6051-6063.
- 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 γ and its role in mitochondrial base excision repair *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 12244-12248.
- López de Saro, F.J. y O'Donnell, M. (2001) Interaction of the β sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 8376-8380.
- Marini, F., Kim, N., Schuffert, A. y Wood, R.D. (2003) POLN, a nuclear PolA family DNA polymerase homologous to the DNA cross-link sensitivity protein Mus308. *J. Biol. Chem.*, **278**, 32014-32019.

- Martín, A.C., Blanco, L., García, P., Salas, M. y Méndez, J. (1996) *In vitro* protein-primed initiation of pneumococcal phage Cp-1 DNA replication occurs at the third 3' nucleotide of the linear template: a stepwise sliding-back mechanism. *J. Mol. Biol.*, **260**, 369-377.
- Martín, G., Lázaro, J.M., Méndez, E. y Salas, M. (1989) Characterization of the phage Φ 29 protein p5 as a single-stranded DNA binding protein. Function in Φ 29 DNA-protein p3 replication. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3663-3672.
- Matsui, M., Oka, A., Takanami, M., Yasuda, S. y Hirota, Y. (1985) Sites of dnaA protein-binding in the replication origin of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Mol. Biol.*, **184**, 529-533.
- McCulloch, S.D., Kokoska, R.J. y Kunkel, T.A. (2004) Efficiency, fidelity and enzymatic switching during translesion DNA synthesis. *Cell Cycle*, **3**, 580-583.
- McCulloch, S.D. y Kunkel, T.A. (2008) The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.*, **18**, 148-161.
- McDonell, M.W., Simon, M.N. y Studier, F.W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.*, **110**, 119-146.
- Meijer, W.J., Lewis, P.J., Errington, J. y Salas, M. (2000) Dynamic relocalization of phage Φ 29 DNA during replication and the role of the viral protein p16.7. *EMBO J.*, **19**, 4182-4190.
- Méndez, J., Blanco, L., Lázaro, J.M. y Salas, M. (1994) Primer-terminus stabilization at the Φ 29 DNA polymerase active site. Mutational analysis of conserved motif TX₂GR. *J. Biol. Chem.*, **269**, 30030-30038.
- Méndez, J., Blanco, L. y Salas, M. (1997) Protein-primed DNA replication: a transition between two modes of priming by a unique DNA polymerase. *EMBO J.*, **16**, 2519-2527.
- Minnick, D.T., Astatke, M., Joyce, C.M. y Kunkel, T.A. (1996) A thumb subdomain mutant of the large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I with reduced DNA binding affinity, processivity, and frameshift fidelity. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24954-24961.
- Minnick, D.T., Bebenek, K., Osheroff, W.P., Turner, R.M., Jr., Astatke, M., Liu, L., Kunkel, T.A. y Joyce, C.M. (1999) Side chains that influence fidelity at the polymerase active site of *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment). *J. Biol. Chem.*, **274**, 3067-3075.

- Moelling, K., Bolognesi, D.P. y Bauer, H. (1971) Polypeptides of avian RNA tumor viruses. 3. Purification and identification of a DNA synthesizing enzyme. *Virology*, **45**, 298-302.
- Nelson, J.R., Lawrence, C.W. y Hinkle, D.C. (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase ζ . *Science*, **272**, 1646-1649.
- Nick McElhinny, S.A., Stith, C.M., Burgers, P.M. y Kunkel, T.A. (2007) Inefficient proofreading and biased error rates during inaccurate DNA synthesis by a mutant derivative of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.*, **282**, 2324-2332.
- Oliveros, M., Yáñez, R.J., Salas, M.L., Salas, J., Viñuela, E. y Blanco, L. (1997) Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30899-30910.
- Osheroff, W.P., Beard, W.A., Wilson, S.H. y Kunkel, T.A. (1999) Base substitution specificity of DNA polymerase β depends on interactions in the DNA minor groove. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20749-20752.
- Pastrana, R., Lázaro, J.M., Blanco, L., García, J.A., Méndez, E. y Salas, M. (1985) Overproduction and purification of protein p6 of *Bacillus subtilis* phage $\Phi 29$: role in the initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3083-3100.
- Patel, P.H., Jacobo-Molina, A., Ding, J., Tantillo, C., Clark, A.D., Jr., Raag, R., Nanni, R.G., Hughes, S.H. y Arnold, E. (1995) Insights into DNA polymerization mechanisms from structure and function analysis of HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry*, **34**, 5351-5363.
- Patel, P.H., Kawate, H., Adman, E., Ashbach, M. y Loeb, L.A. (2001a) A single highly mutable catalytic site amino acid is critical for DNA polymerase fidelity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5044-5051.
- Patel, P.H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A. y Loeb, L.A. (2001b) Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and "base flipping" mechanism for nucleotide selection. *J. Mol. Biol.*, **308**, 823-837.
- Pavlov, Y.I., Shcherbakova, P.V. y Rogozin, I.B. (2006) Roles of DNA polymerases in replication, repair, and recombination in eukaryotes. *Int. Rev. Cytol.*, **255**, 41-132.
- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H. y Kraut, J. (1994) Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase β , a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, **264**, 1891-1903.

- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Wolfle, W., Wilson, S.H. y Kraut, J. (1996) A structural basis for metal ion mutagenicity and nucleotide selectivity in human DNA polymerase β . *Biochemistry*, **35**, 12762-12777.
- Petruska, J., Sowers, L.C. y Goodman, M.F. (1986) Comparison of nucleotide interactions in water, proteins, and vacuum: model for DNA polymerase fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 1559-1562.
- Pomerantz, R.T. y O'Donnell, M. (2007) Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine. *Trends Microbiol.*, **15**, 156-164.
- Post, C.B. y Ray, W.J., Jr. (1995) Reexamination of induced fit as a determinant of substrate specificity in enzymatic reactions. *Biochemistry*, **34**, 15881-15885.
- Prakash, S., Johnson, R.E. y Prakash, L. (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 317-353.
- Prasad, R., Widen, S.G., Singhal, R.K., Watkins, J., Prakash, L. y Wilson, S.H. (1993) Yeast open reading frame YCR14C encodes a DNA β -polymerase-like enzyme. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 5301-5307.
- Pursell, Z.F., Isoz, I., Lundstrom, E.B., Johansson, E. y Kunkel, T.A. (2007) Regulation of B family DNA polymerase fidelity by a conserved active site residue: characterization of M644W, M644L and M644F mutants of yeast DNA polymerase ϵ . *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3076-3086.
- Rodríguez, A.C., Park, H.W., Mao, C. y Beese, L.S. (2000) Crystal structure of a pol α family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. 9 degrees N-7. *J. Mol. Biol.*, **299**, 447-462.
- Rodríguez, I., Lázaro, J.M., Blanco, L., Kamtekar, S., Berman, A.J., Wang, J., Steitz, T.A., Salas, M. y de Vega, M. (2005) A specific subdomain in Φ 29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 6407-6412.
- Rodríguez, I., Lázaro, J.M., Salas, M. y de Vega, M. (2003) Φ 29 DNA polymerase residue Phe128 of the highly conserved (S/T)Lx₂H motif is required for a stable and functional interaction with the terminal protein. *J. Mol. Biol.*, **325**, 85-97.
- Rothwell, P.J. y Waksman, G. (2005) Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.*, **71**, 401-440.
- Salas, M. (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 39-71.

- Salas, M. (1999) Mechanisms of initiation of linear DNA replication in prokaryotes. *Genet. Eng. (NY)*, **21**, 159-171.
- Salas, M., Mellado, R.P. y Viñuela, E. (1978) Characterization of a protein covalently linked to the 5' termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage Φ 29. *J. Mol. Biol.*, **119**, 269-291.
- Saturno, J., Blanco, L., Salas, M. y Esteban, J.A. (1995) A novel kinetic analysis to calculate nucleotide affinity of proofreading DNA polymerases. Application to Φ 29 DNA polymerase fidelity mutants. *J. Biol. Chem.*, **270**, 31235-31243.
- Saturno, J., Lázaro, J.M., Esteban, F.J., Blanco, L. y Salas, M. (1997) Φ 29 DNA polymerase residue Lys383, invariant at motif B of DNA-dependent polymerases, is involved in dNTP binding. *J. Mol. Biol.*, **269**, 313-325.
- Sawaya, M.R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S.H. y Kraut, J. (1994) Crystal structure of rat DNA polymerase β : evidence for a common polymerase mechanism. *Science*, **264**, 1930-1935.
- Sawaya, M.R., Prasad, R., Wilson, S.H., Kraut, J. y Pelletier, H. (1997) Crystal structures of human DNA polymerase β complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, **36**, 11205-11215.
- Scheuermann, R.H. y Echols, H. (1984) A separate editing exonuclease for DNA replication: the ϵ subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 7747-7751.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. y Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3381-3385.
- Seki, M., Marini, F. y Wood, R.D. (2003) POLQ (Pol θ), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6117-6126.
- Serna-Rico, A., Muñoz-Espín, D., Villar, L., Salas, M. y Meijer, W.J. (2003) The integral membrane protein p16.7 organizes *in vivo* Φ 29 DNA replication through interaction with both the terminal protein and ssDNA. *EMBO J.*, **22**, 2297-2306.
- Serrano-Heras, G., Salas, M. y Bravo, A. (2003) *In vivo* assembly of phage Φ 29 replication protein p1 into membrane-associated multimeric structures. *J. Biol. Chem.*, **278**, 40771-40777.
- Serrano, M., Gutiérrez, C., Freire, R., Bravo, A., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1994) Phage Φ 29 protein p6: a viral histone-like protein. *Biochimie*, **76**, 981-991.

- Serrano, M., Salas, M. y Hermoso, J.M. (1990) A novel nucleoprotein complex at a replication origin. *Science*, **248**, 1012-1016.
- Shamoo, Y. y Steitz, T.A. (1999) Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell*, **99**, 155-166.
- Sharief, F.S., Vojta, P.J., Ropp, P.A. y Copeland, W.C. (1999) Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase θ (POLQ), the eighth human DNA polymerase. *Genomics*, **59**, 90-96.
- Shinkai, A. y Loeb, L.A. (2001) *In vivo* mutagenesis by *Escherichia coli* DNA polymerase I. Ile709 in motif A functions in base selection. *J. Biol. Chem.*, **276**, 46759-46764.
- Showalter, A.K. y Tsai, M.D. (2002) A reexamination of the nucleotide incorporation fidelity of DNA polymerases. *Biochemistry*, **41**, 10571-10576.
- Sirover, M.A. y Loeb, L.A. (1976) Metal activation of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 812-817.
- Soengas, M.S., Esteban, J.A., Lázaro, J.M., Bernad, A., Blasco, M.A., Salas, M. y Blanco, L. (1992) Site-directed mutagenesis at the Exo III motif of Φ 29 DNA polymerase; overlapping structural domains for the 3'-5' exonuclease and strand-displacement activities. *EMBO J.*, **11**, 4227-4237.
- Steitz, T.A. (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature*, **391**, 231-232.
- Steitz, T.A. (1999) DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17395-17398.
- Steitz, T.A., Smerdon, S.J., Jager, J. y Joyce, C.M. (1994) A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science*, **266**, 2022-2025.
- Steitz, T.A. y Yin, Y.W. (2004) Accuracy, lesion bypass, strand displacement and translocation by DNA polymerases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **359**, 17-23.
- Streisinger, G., Okada, Y., Emrich, J., Newton, J., Tsugita, A., Terzaghi, E. y Inouye, M. (1966) Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **31**, 77-84.

- Studier, F.W. y Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Truniger, V., Lázaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L. y Salas, M. (2003) Φ 29 DNA polymerase residue Leu384, highly conserved in motif B of eukaryotic type DNA replicases, is involved in nucleotide insertion fidelity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 33482-33491.
- Truniger, V., Lázaro, J.M., Esteban, F.J., Blanco, L. y Salas, M. (2002) A positively charged residue of Φ 29 DNA polymerase, highly conserved in DNA polymerases from families A and B, is involved in binding the incoming nucleotide. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1483-1492.
- Truniger, V., Lázaro, J.M. y Salas, M. (2004a) Function of the C-terminus of Φ 29 DNA polymerase in DNA and terminal protein binding. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 361-370.
- Truniger, V., Lázaro, J.M. y Salas, M. (2004b) Two positively charged residues of Φ 29 DNA polymerase, conserved in protein-primed DNA polymerases, are involved in stabilisation of the incoming nucleotide. *J. Mol. Biol.*, **335**, 481-494.
- Truniger, V., Lázaro, J.M., Salas, M. y Blanco, L. (1996) A DNA binding motif coordinating synthesis and degradation in proofreading DNA polymerases. *EMBO J.*, **15**, 3430-3441.
- Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H. y Ishino, Y. (1997) A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells*, **2**, 499-512.
- Vlcek, C. y Paces, V. (1986) Nucleotide sequence of the late region of *Bacillus* phage Φ 29 completes the 19.285-bp sequence of Φ 29 genome. Comparison with the homologous sequence of phage PZA. *Gene*, **46**, 215-225.
- Wang, J., Sattar, A.K., Wang, C.C., Karam, J.D., Konigsberg, W.H. y Steitz, T.A. (1997) Crystal structure of a pol α family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69. *Cell*, **89**, 1087-1099.
- Wang, J., Yu, P., Lin, T.C., Konigsberg, W.H. y Steitz, T.A. (1996) Crystal structures of an NH₂-terminal fragment of T4 DNA polymerase and its complexes with single-stranded DNA and with divalent metal ions. *Biochemistry*, **35**, 8110-8119.

- Wold, M.S. (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 61-92.
- Wong, I., Patel, S.S. y Johnson, K.A. (1991) An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry*, **30**, 526-537.
- Yang, G., Lin, T., Karam, J. y Konigsberg, W.H. (1999) Steady-state kinetic characterization of RB69 DNA polymerase mutants that affect dNTP incorporation. *Biochemistry*, **38**, 8094-8101.
- Yang, W. (2005) Portraits of a Y-family DNA polymerase. *FEBS Lett.*, **579**, 868-872.
- Yin, Y.W. y Steitz, T.A. (2004) The structural mechanism of translocation and helicase activity in T7 RNA polymerase. *Cell*, **116**, 393-404.
- Zaballos, A., Lázaro, J.M., Méndez, E., Mellado, R.P. y Salas, M. (1989) Effects of internal deletions on the priming activity of the phage Φ 29 terminal protein. *Gene*, **83**, 187-195.
- Zakharova, E., Wang, J. y Konigsberg, W. (2004) The activity of selected RB69 DNA polymerase mutants can be restored by manganese ions: the existence of alternative metal ion ligands used during the polymerization cycle. *Biochemistry*, **43**, 6587-6595.
- Zhou, B.L., Pata, J.D. y Steitz, T.A. (2001) Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol. Cell*, **8**, 427-437.