



*Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular*

*Función de la DNA polimerasa lambda  
en reparación de DNA y tumorigénesis*

*Gloria Terrados Aguado  
Madrid, 2010*









**Memoria presentada por Gloria Terrados Aguado, Licenciada en Bioquímica,  
para optar al Grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de  
Madrid.**

**El trabajo recogido en esta memoria ha sido llevado a cabo en el  
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM),  
bajo la dirección del Dr. Luis Blanco Dávila.**

**Para su realización se ha contado con la financiación del Programa de Formación  
de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia.**



## Abreviaturas

5FU	5-fluorouracilo
5FdUMP	5-fluorodeoxiuridinamonofosfato
5FdUTP	5-fluorodeoxiuridinatrifosfato
5FUMP	5-fluorouridinamonofosfato
5FUTP	5-fluorouridinatrifosfato
6mG	O <sup>6</sup> -metilguanina
8oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina
APE	endonucleasa apurínica
AraCTP	1-β-D-Arabinofuranosilcitosina-5'-trifosfato
AraCMP	1-β-D-Arabinofuranosilcitosina-5'-monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BER	reparación por escisión de base
BSA	albúmina de suero bovino
BRCT	Dominio BRCA1 C-terminal
Cf	<i>Crithidia fasciculata</i>
c.p.m.	cuentas por minuto
C-terminal	carboxilo terminal
dA	deoxiadenosina
dAMP	deoxiadenosina-5'-monofosfato
dATP	deoxiadenosina-5'-trifosfato
dC	deoxicitidina
DCTD	dCMP deaminasa
dCTP	deoxicitidina-5'-trifosfato
dG	deoxiguanosina
dGTP	deoxiguanosina-5'-trifosfato
DK	Doble Knock-out
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNMP	deoxinucleótido-5'-monofosfato
dNTP	deoxinucleótido-5'-trifosfato
dRP	deoxiribosa fosfato
DSB	roturas de doble cadena
dT	deoxitimidina
DTT	ditiotreitól
dTTP	deoxitimidina-5'-trifosfato
dU	deoxiuridina
dUMP	deoxiuridina-5'-monofosfato
EDTA	etilén diamino tetraacetato
EH	enfermedad de Huntington
FI	fracción insoluble
FS	fracción soluble
h	humana
HGu	hidrocloruro de guanidinio
hmdUrd	hidroximetildeoxiuridina
hPolβ	DNA polimerasa β humana

## ABREVIATURAS

---

hPol $\lambda$	DNA polimerasa lambda humana
hPol $\mu$	DNA polimerasa mu humana
Htt	proteína Huntingtina
HR	recombinación homóloga
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
KBrO <sub>3</sub>	Bromato potásico
kDa	kilodalton
KO	knock-out
Li	<i>Leishmania infantum</i>
LiPol $\beta$	DNA Polimerasa $\beta$ de <i>L. infantum</i>
MBD4	proteína 4 de unión a metil CpG
MEFs	fibroblastos embrionarios de ratón
MEM	Medio de Eagle
MMR	reparación de desapareamientos
MMS	metil-metano sulfonato
NER	reparación por escisión de nucleótido
NHEJ	reunión de extremos no homólogos
Ni-NTA	níquel-ácido nitroloacético
NLS	secuencia de localización nuclear
nt	nucleótido
N-terminal	amino terminal
OPRT	ororato fosforribosil transferasa
-P	fosfato
PAGE	electroforesis en gel de acrilamida
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCNA	antígeno de proliferación nuclear
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PHP	dominio fosfodiesterasa
PM	peso molecular
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
PNK	polinucleótido quinasa
Pol	polimerasa
PoliQ	poliglutaminas
RI	radiación ionizante
RPA	proteína de replicación A
rpm	revoluciones por minuto
RR	ribonucleótido reductasa
RT-PCR	Reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR
s	segundo
SB	Southern Blot
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SHM	hipermutación somática
SMUG1	uracil DNA glicosilasa monofuncional de cadena sencilla
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa
TDG	DNA glicosilasa de timina
TdT	deoxinucleotidil transferasa terminal
TLS	síntesis a través de lesiones
TP	timidín fosforilasa

TS	timidilato sintasa
U	uracilo
u	unidades
u.a.	unidades arbitrarias
UDG	uracil DNA glicosilasa
UK	uridín kinasa
UNG2	uracil glicosilasa nuclear
UP	uridín fosforilasa
V(D)J	recombinación específica de genes receptores de antígeno.
VPPA	Virus de la Peste Porcina Africana

### **Códigos de una y tres letras de los aminoácidos**

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V



## GLOSARIO DE TÉRMINOS

---

En esta memoria se ha tratado de evitar el uso de anglicismos. Sin embargo, en algunos casos se ha preferido mantener el término original, bien por no existir una correspondencia adecuada en castellano o bien por estar su uso muy generalizado en el lenguaje científico.

*Downstream*: aplicado a un oligonucleótido es la cadena de DNA que hibrida con la cadena molde y que contiene el extremo 5' de un *gap*.

*Flap*: extremo de cadena sencilla de DNA que se genera por desplazamiento del extremo 5' de un *gap* o por alineamiento incompleto de cadenas parcialmente complementarias.

*Gap*: hueco de longitud variable en el DNA, que supone una región de cadena sencilla embebida en un DNA de doble cadena.

*Upstream*: aplicado a un oligonucleótido es la cadena de DNA que hibrida con la cadena molde y que contiene el extremo 3' de un *gap*.

*wild-type*: tipo silvestre, sin modificación genética.

*Odds ratio*: Razón de probabilidades definido como el cociente entre la probabilidad de que un evento suceda y la probabilidad de que no suceda

*SNP*: De las siglas "*Single Nucleotide Polymorphism*" en inglés, con traducción al español: polimorfismo de un solo nucleótido. Se considera polimorfismo a una variación en la secuencia de DNA de un gen que afecta a una sola base y que genera una variante de la proteína representada en al menos un 1% de la población.

*SSCP*: De las siglas "*Single Strand Conformational Polymorphism*" en inglés, con traducción al español: polimorfismo conformacional de banda sencilla.

*Splicing*: Procesamiento del RNA mensajero que produce la omisión de uno o varios exones.

*RPA*: De las siglas "*Replication Protein A*" en inglés, con traducción al español: Proteína de replicación A

*RFLP*: De las siglas "*Restriction Fragment Length Polymorphism*" en inglés, con traducción al español: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

*wobble* : tambaleante

*hot spot*: punto de acumulación de mutaciones

---

## ***GLOSARIO DE TÉRMINOS***

*EST*: De las siglas “*Expressed Sequence Tags*” en inglés, con traducción al español: marcador de secuencia expresada.

*cross-links*: entrecruzamientos



# ***INDICE***



I-	SUMMARY.....	1
II-	INTRODUCCIÓN.....	5
	1- Las DNA polimerasas.....	7
	1.1 -DNA polimerasas replicativas humanas.....	9
	1.1.1 La Familia B.....	9
	1.1.2 La Familia A.....	10
	1.2 DNA polimerasas humanas implicadas en mecanismos de tolerancia al daño.....	10
	1.2.1 La Familia Y.....	11
	1.3 DNA polimerasas humanas implicadas en reparación.....	11
	1.3.1 La Familia X.....	12
	1.3.1.1 La DNA polimerasa $\beta$ .....	13
	• Propiedades bioquímicas.....	13
	• Organización estructural.....	14
	• Pol $\beta$ en el mecanismo de reparación por escisión de base (BER).....	16
	• Otras funciones.....	18
	• Homólogos a Pol $\beta$ en otras especies. LiPol $\beta$ .....	18
	• Variantes polimórficas de Pol $\beta$ humana asociadas al cáncer.....	18
	1.3.1.2 La TDT.....	19
	1.3.1.3 La DNA polimerasa $\mu$ .....	19
	1.3.1.4 La DNA polimerasa $\lambda$ .....	20
	• Organización estructural.....	21
	• Propiedades bioquímicas.....	21
	• Principales funciones propuestas para Pol $\lambda$ .....	22
	• Reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (NHEJ).....	24
III-	OBJETIVOS.....	27
IV-	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
	1- MATERIALES.....	33
	1.1 Enzimas.....	33
	1.2 Reactivos.....	33
	1.3 Nucleótidos.....	33
	2- MÉTODOS.....	33
	2.1 CULTIVOS CELULARES.....	33
	2.1.1 Cultivo celular del parásito <i>Leishmania infantum</i> .....	33
	2.1.2 Generación de líneas celulares que sobreexpresan distintas construcciones de hPol $\lambda$ .....	34
	2.1.3 Obtención de fibroblastos embrionarios a partir de embriones de ratón hermanos de camada (MEFs).....	34
	2.2 Mantenimiento de las colonias de ratones.....	35
	2.3 Derivación del modelo murino de deficiencia en Pol $\lambda$ de fondo mixto a fondo puro C57Black6.....	35
	2.4 Generación del modelo murino de deficiencia combinada en Pol $\lambda$ y Pol $\mu$ (DK).....	35
	2.5 Extracción de DNA genómico de cola de ratón.....	36

2.6 Extracción de DNA genómico de diferentes tejidos .....	36
2.7 Genotipado DNA por <i>southern blot</i> .....	36
2.8 Genotipado DNA por PCR.....	37
2.9 Ensayo de mutagénesis in vivo en células de mamífero.....	37
2.10 Experimentos de citotoxicidad-Ensayo clonogénico.....	37
2.11 Medición de actividad NHEJ in vivo.....	37
2.12 Análisis de cariotipos.....	38
2.13 Análisis de las distintas fases del ciclo celular de MEFs asincrónicos.....	38
2.14 Ensayo del cometa alcalino.....	38
2.15 Extractos totales celulares del parásito <i>L. infantum</i> .....	38
2.16 Preparación de extractos celulares totales a partir de tejidos y líneas celulares.....	39
2.17 Inmunodetección de proteínas en membrana ( <i>Western Blot</i> ).....	39
2.18 Determinación de repeticiones CAG.....	39
2.19 Reacción en cadena de Polimerasa (PCR)- Polimorfismo conformacional de banda sencilla (SSCP).....	40
2.20 Reacción en cadena de polimerasa-Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP).....	40
2.21 Análisis estadístico de los resultados de detección del SNP (R/W)438.....	42
2.22 Retrotranscripción in vitro (RT-PCR).....	42
2.23 Análisis comparativo de secuencias.....	42
2.24 Clonaje y Mutagénesis dirigida.....	43
2.24.1 Clonaje del cDNA de LiPol $\beta$ en el vector pQE32.....	43
2.24.2 Construcción del vector de expresión en <i>E. coli</i> que contiene el cDNA de las variantes de splicing hPol $\lambda\Delta 6$ y hPol $\lambda\Delta 67$ .....	43
2.24.3 Mutagénesis dirigida para la obtención de la construcción de hPol $\lambda$ W438-pRSETB.....	43
2.24.4 Generación de construcciones para transfecciones en células de mamífero.....	44
2.25 Sobreexpresión y purificación de proteínas.....	44
2.25.1 DNA Polimerasa beta de <i>Leishmania infantum</i> (LiPol $\beta$ ).....	44
2.25.2 Variante de splicing de la DNA polimerasa lambda humana (hPol $\lambda\Delta 6$ ).....	45
2.25.3 Variante polimórfica de la DNA polimerasa lambda humana (hPol $\lambda$ W).....	45
2.26 Sedimentación en gradientes de glicerol.....	46
2.27 Ensayo de relleno del gap de 5 nucleótidos. Estudio de fidelidad de síntesis.....	47
2.28 Ensayos de DNA polimerización.....	47
2.28.1 Análisis in situ de actividad DNA polimerasa en el ciclo del parásito <i>L. infantum</i> .....	47
2.28.2 Ensayo de actividad en DNA activado.....	47
2.28.3 Análisis de fidelidad en moléculas que contienen un gap de un nucleótido con un grupo fosfato en 5' .....	48
2.28.4 Análisis de procesividad de hPol $\lambda$ W438.....	48
2.28.5 Análisis de actividad en moléculas molde/iniciador, gap de uno y cinco nucleótidos.....	48
2.28.6 Ensayos de retraso en gel. Análisis de la afinidad	

de LiPol $\beta$ por DNA.....	49
2.29 Ensayos de Reparación por Escisión de base.....	49
2.29.1 Ensayo de actividad deoxirribosafato liasa (dRP liasa).....	49
2.29.2 Ensayo de reducción con NaBH <sub>4</sub> de los complejos covalentes LiPol $\beta$ /DNA.....	50
2.29.3 Reconstitución <i>in vitro</i> de la vía de Reparación por Escisión de Base (BER).....	50
2.29.5 Estudio de la capacidad de inserción frente a bases modificadas 8oxoG y 6mG y extensión desde pares cuya base molde está modificada.....	50
2.29.6 Estudio de la capacidad de inserción frente a bases modificadas 5FU y extensión desde pares cuya base molde está modificada.....	51
2.29.7 Estudio de la capacidad de inserción de 5FdUTP, 5FUTP y AraCTP.....	51
2.29.8 Estudio de capacidad de reparación de extractos totales de proteínas con molde marcado.....	51
 V- RESULTADOS.....	 53
 <b>1- Caracterización Bioquímica de la DNA polimerasa <math>\beta</math> de <i>Leishmania</i> <i>Infantum</i>.....</b>	 <b>55</b>
1.1- Actividad DNA Polimerasa asociada a LiPol $\beta$ .....	57
1.2- LiPol $\beta$ presenta una preferencia por moldes de tipo “gap” con un grupo -P en el extremo 5’.....	59
1.3- LiPol $\beta$ es capaz de unirse al extremo 5’ debido a un reconocimiento del grupo -P.....	60
1.4- LiPol $\beta$ incorpora preferentemente el nucleótido complementario a la base molde.....	61
1.5- Actividad dRP liasa asociada a LiPol $\beta$ .....	62
1.6- Reconstitución <i>in vitro</i> de la reparación por escisión de base por LiPol $\beta$ .....	65
1.7- LiPol $\beta$ presenta un patrón de expresión diferente en cada etapa del ciclo infectivo de <i>Leishmania infantum</i> .....	66
 <b>2- Dos Variantes de splicing en la DNA Polimerasa <math>\lambda</math> Humana.....</b>	 <b>69</b>
2.1. Identificación de variantes de <i>splicing</i> de la proteína Pol $\lambda$ humana.....	71
2.2. Construcción de vectores de expresión que contienen el cDNA de las variantes de <i>splicing</i> de la proteína Pol $\lambda$ humana.....	73
2.3. Sobreexpresión y solubilidad de hPol $\lambda\Delta 6$ y hPol $\lambda\Delta 67$ en células de <i>E. coli</i> .....	73
2.3. Purificación de la variante de <i>splicing</i> hPol $\lambda\Delta 6$ .....	77
2.4. Actividad DNA polimerasa de hPol $\lambda\Delta 6$ .....	77
 <b>3- Generación de modelos murinos carentes de las DNA polimerasas lambda y mu.....</b>	 <b>81</b>
3.1 Modelos murinos de deficiencia simple en Pol $\lambda$ y Pol $\mu$ .....	83

3.1.1 Modelo murino de deficiencia en Polλ (KOλ).....	83
3.1.2 Implicación de Polλ en la enfermedad de Huntington.....	85
3.1.2.1 Generación del modelo murino de estudio.....	86
3.1.2.3 Fenotipo de comportamiento línea R6/1-Polλ.....	87
3.1.2.3 Obtención de muestras y análisis de repeticiones CAG.....	87
3.2 Generación del modelo murino de deficiencia combinada en Polλ y Polμ (DK).....	90
<b>4- Polλ y Polμ en Reparación y Tolerancia al Daño.....</b>	<b>93</b>
4.1 Síntesis a través de lesiones: 5-fluorouracilo (5FU).....	95
4.1.1 Diversidad en comportamiento de inserción frente a 5FU de los miembros de la familia X de DNA polimerasas.....	97
4.1.2 Diversidad en comportamiento de extensión de pares de bases apareadas a 5FU de los miembros de la familia X de DNA polimerasas.....	100
4.1.3 Inserción de 5FdUTP en el DNA.....	101
4.1.4 Inserción de 5FrUTP en el DNA.....	102
4.2 Actividad DNA polimerización en presencia de AraCTP.....	103
4.3 Reparación por Escisión de Base (BER).....	105
4.3.1 Uracilo y 5FU en el DNA.....	105
4.3.1.1 Reconstitución <i>in vitro</i> de BER .....	106
4.3.1.2 Sensibilidad a 5FU de células deficientes en Polλ.....	107
4.3.1.3 Capacidad de reparación de extractos de testículo y cerebro del modelo de deficiencia en Polλ murino frente a la lesión 5FU.....	108
4.3.2 La familia X y el daño oxidativo.....	115
4.3.2.1 Reconstitución <i>in vitro</i> de la reparación por escisión de base de 8oxoG Polλ.....	116
4.3.2.2 Sensibilidad a Bromato potásico (KBrO <sub>3</sub> ) de células deficientes en Polλ.....	117
4.3.2.3 Capacidad de reparación de la lesión 8oxoG de extractos de testículo del modelo de deficiencia en Polλ murino frente a la .....	118
4.3.2.4 Implicación de Polλ en BER de pares de bases 8oxoG:A .....	123
<b>5- Un Polimorfismo Simple en la DNA Polimerasa λ Humana asociado a     cáncer de recto.....</b>	<b>125</b>
5.1 Variantes y polimorfismos en la familia X de DNA polimerasas.....	127
5.2. Identificación de un SNP en la región del genoma que codifica para la DNA polimerasa lambda humana.....	127
5.3. hPolλ W posee actividad DNA polimerasa.....	129
5.4. hPolλ W438 presenta un comportamiento distributivo en sustratos tipo molde/iniciador.....	132
5.5. Las variantes de hPolλ, W438 y R438, presentan una síntesis procesiva similar en un <i>gap</i> de pequeño tamaño.....	133

5.6. hPol $\lambda$ W438 posee actividad dRP liasa.....	134
5.7. Reconstitución <i>in vitro</i> de la Reparación por Escisión de Base (BER).....	136
5.8. Fidelidad de inserción de W438.....	137
5.9. Estructura tridimensional de la variante hPol $\lambda$ W438.....	138
5.10. Análisis de mutagenésis <i>in vivo</i> .....	139
5.11. La sobreexpresión de la variante hPol $\lambda$ W438 reduce la actividad celular de NHEJ .....	140
5.12. La expresión de la variante hPol $\lambda$ W438 conduce a la aparición de aberraciones cromosómicas.....	142
5.13. El fenotipo causado por W438 está asociado a la actividad DNA polimerasa de la enzima.....	143
5.14. Síntesis a través de lesiones.....	144
5.14.1. Inserción frente a 8oxoG y 6mG.....	144
5.14.2. Extensión de pares de bases con la base molde modificada 8oxoG y 6mG.....	146
5.14.3. Inserción frente a 5-fluorouracilo (5FU).....	147
5.14.4. Extensión de pares de bases 5FU:G y 5FU:A.....	150
5.14.5. Inserción de 5FdUTP.....	150
5.14.6. Inserción de AraCTP.....	153
5.15. Genotipado de los alelos R/W438 en diferentes poblaciones. Asociación del alelo W438 al riesgo de padecer cáncer de recto.....	151
VI- DISCUSIÓN.....	159
1- Evolución de los miembros de la Familia X de DNA polimerasas.....	161
2- LiPol $\beta$ , DNA polimerasa X tipo Pol $\beta$ , con función en BER nuclear y mitocondrial en el parásito <i>Leishmania infantum</i> .....	165
3- Modelos murinos carentes en las DNA polimerasas lambda y mu.....	167
4- hPol $\lambda$ , síntesis a través de lesiones y reparación.....	168
• Pol $\lambda$ y el daño oxidativo.....	169
• Pol $\lambda$ y el 5FU.....	173
5- Identificación de isoformas funcionales en el gen POLL que codifica para hPol $\lambda$ .....	173
VII- CONCLUSIONES.....	175
VIII- BIBLIOGRAFÍA.....	179
IX- ANEXO.....	207





# ***SUMMARY***



This Doctoral Thesis reports the purification of *Leishmania infantum* DNA polymerase beta (LiPol $\beta$ ), as well as its characterization as a DNA repair enzyme, with a metal preference for Mn<sup>2+</sup> over Mg<sup>2+</sup>. LiPol $\beta$  prefers gapped-DNA substrates having a 5'-P end, in agreement with its role in DNA repair reactions. Purified LiPol $\beta$  also displayed a 5'-deoxyribose-5-phosphate (dRP) lyase activity, consistent with a  $\beta$ -elimination mechanism. The concerted action of dRP lyase and DNA polymerization activities of LiPol $\beta$  on a uracil-containing DNA suggests its participation in "single-nucleotide" base excision repair (BER). Analysis of LiPol $\beta$  DNA polymerization activity at different stages of the *L. infantum* infective cycle supports a role for LiPol $\beta$  in parasite DNA repair, counteracting the oxidative damage occurring inside the macrophage.

DNA polymerase lambda (Pol $\lambda$ ), a recently described Family X DNA polymerase, has been also studied in this work regarding its *in vivo* role in DNA repair and tolerance of oxidative damage. Analysis of the BER activity in tissue extracts from "knock-out" lambda mice (KO $\lambda$ ) indicated that Pol $\lambda$  is not essential for the BER of 8oxoG:dC pairs. However, Pol $\lambda$  has a role in the correction of 8oxoG:dA to 8oxoG:dC, thus minimizing 8oxoG associated mutagenesis. Moreover, Pol $\lambda$  does not contribute to BER of either dU:dG or 5FU:dG pairs in adult testis. However, our analysis suggests its participation in the BER of 5FU:dG in brain. In agreement with the participation of Family X in translesion DNA synthesis (TLS) of 8oxoG and 6mG and the possible role in BER of 5FU, we demonstrated that hPol $\beta$ , hPol $\lambda$  and hPol $\mu$  are able to tolerate 5FU in DNA, mainly inserting dA in front of the lesion. Likewise, these three enzymes proficiently extended the pair 5FU:dA, comparable to normal pairs dT:dA y dU:dA, whereas they were very inefficient to extend the pair 5FU:dG. Moreover, they incorporated 5FdUTP opposite dA much better than opposite dG in the template.

We have carried out the identification of two hPol $\lambda$  splicing variants, that are highly expressed in different tumors. hPol $\lambda$   $\Delta$ 6 purification and enzymatic characterization suggests that the omission of exon 6 results in a poorly active variant, that could act as a dominant negative by sequestering NHEJ factors via interaction with its intact BRCT domain.

We have identified and characterized a single nucleotide polymorphism (SNP), of hPol $\lambda$ , having a C/T variation in the first base of codon 438, resulting in the amino acid change Arg to Trp. *In vitro* enzyme activity assays of the purified W438 Pol $\lambda$  variant revealed that it retained both DNA polymerization and dRP lyase activities, but had reduced base substitution fidelity. In agreement with this *in vitro* mutator phenotype, ectopic expression of the W438 hPol $\lambda$  variant in mammalian cells increased mutation frequency, affecting the DSB repair NHEJ pathway, and generating chromosome aberrations. All these phenotypes were dependent upon the catalytic activity of the W438 hPol $\lambda$ . RFLP analysis in normal versus cancer patients demonstrated an association of the W438 polymorphism and rectal cancer.



# ***INTRODUCCIÓN***



La información genética de la mayoría de los organismos vivos se encuentra almacenada dentro del genoma en forma de ácido desoxirribonucleico (DNA). Esta información ha de ser transmitida íntegramente de una generación a otra. Esta transmisión requiere que se produzca la duplicación del DNA libre de error, mediante un proceso denominado replicación. La estabilidad del genoma es mantenida mediante una maquinaria de reparación, tolerancia y control del daño generado en el DNA. En todos estos procesos es necesaria la actuación de enzimas denominadas DNA polimerasas.

### 1- Las DNA polimerasas

La principal característica de las DNA polimerasas es su capacidad de sintetizar DNA. El primer ejemplo conocido de esta clase de enzimas fue la DNA polimerasa I de *E. coli*, descubierta por el grupo de Arthur Kornberg (Lehman y cols., 1958) por lo que fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina en 1959. La demostración de su capacidad de catalizar la síntesis de DNA de acuerdo a las instrucciones de la cadena molde fue clave para comprender el modo en que el DNA se sintetiza en el interior de la célula y la base de numerosos estudios posteriores que comenzaron a desvelar el mecanismo de la replicación. Hasta el momento se han identificado y caracterizado numerosas enzimas de este tipo presentes en organismos muy diversos que no sólo intervienen en los procesos de replicación y reparación del DNA, sino también en otros mecanismos de tolerancia al daño, recombinación y mutagénesis.

Las DNA polimerasas poseen una serie de características básicas comunes. Llevan a cabo una reacción química consistente en la adición de un desoxinucleótido a un extremo 3' OH de una molécula que actúa como iniciador o iniciador y que puede ser DNA, RNA o incluso un aminoácido como serina o treonina (Salas, 1991). La reacción de polimerización implica la participación de 2 o 3 residuos carboxílicos, que actuando como ligandos de un par de iones metálicos divalentes, estabilizan y posicionan de manera adecuada para la catálisis al residuo OH del extremo 3' del iniciador (metal A) y los tres grupos fosfato del nucleótido entrante (metal B), que generalmente es seleccionado por complementariedad con cada base de la cadena molde. Uno de los metales hace disminuir la afinidad del 3' OH por el hidrógeno de forma que se origina un grupo 3' O<sup>-</sup> que lleva a cabo el ataque nucleofílico sobre el fosfato  $\alpha$  del nucleótido entrante. Una vez realizada la catálisis se libera el pirofosfato y el enzima puede disociarse del DNA, si se trata de una DNA polimerasa distributiva, o realizar un nuevo evento de polimerización, si se trata de un enzima procesivo. Este mecanismo general se encuentra conservado en todas las polimerasas estudiadas hasta el momento (revisado por Steitz, 1999).

Diversos estudios cristalográficos han revelado que las DNA polimerasas poseen una organización estructural común (revisado por Beard y Wilson, 2000). Presentan un plegamiento en forma de mano con tres subdominios denominados “dedos”, “palma” y “pulgar”, a excepción de la DNA polimerasa del virus de la peste porcina africana que carece de subdominio “dedos” (Oliveros y cols., 1997; Maciejewski y cols., 2001; Showalter y cols., 2001). Dentro del dominio “palma” hay residuos implicados en el contacto con el DNA, y los residuos implicados en la catálisis. En el dominio “dedos” y “pulgar” residen contactos con el DNA y el nucleótido entrante.

A pesar de estas características comunes, existe una gran diversidad de funciones entre las diferentes familias de DNA polimerasas. La gran complejidad y diversidad de los mecanismos en los que se hayan implicadas hacen que exista una variabilidad de características tanto a nivel estructural como bioquímico. Si bien conservan la organización estructural del sitio activo, es frecuente que las DNA polimerasas presenten dominios adicionales que les pueden conferir nuevas actividades enzimáticas suplementarias a la polimerización (como la actividad exonucleasa, actividad desoxirribosafosfato liasa, entre otras), o funciones no catalíticas (como dominios de interacción con otros factores protéicos o con el DNA). A nivel bioquímico, se pueden diferenciar por el número de nucleótidos que pueden polimerizar sin disociarse del DNA (distributivas: pocos nucleótidos; procesivas: de cientos a miles de nucleótidos), en la eficiencia con la que realizan la reacción de polimerización y en la preferencia por un tipo de sustrato (DNA con amplias cadenas sencillas como molde, DNA con pequeños huecos o *gaps*, DNA con lesiones, modificaciones...etc).

Por último, una de las diferencias fundamentales es la fidelidad de síntesis de cada DNA polimerasa (Kunkel, 2004). Las polimerasas replicativas poseen una gran fidelidad de inserción de nucleótidos, que va acompañada de la actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores lo que redundará en una elevadísima fidelidad de síntesis. En contraste, existen otras DNA polimerasas que poseen una gran propensión a cometer errores debido a que su función en la célula así lo requiere, como es el caso de las polimerasas implicadas en los fenómenos de generación de variabilidad en el desarrollo del sistema inmunológico.

Las distintas DNA polimerasas se han clasificado en familias, basándose en la homología de secuencia primaria de aminoácidos con las primeras DNA polimerasas identificadas en *E. coli* (Ito y Braithwaite, 1991; Braithwaite y Ito, 1993). Las DNA polimerasas homólogas a la PolII de *E. coli* se han englobado en la familia A, mientras que las enzimas similares a la subunidad catalítica de la PolIII de *E. coli* forman la familia B. La familia C está constituida por las DNA polimerasas homólogas a la PolIII de *E. coli*, no habiéndose encontrado ningún homólogo en eucariotas (Burgers y cols., 2001). La familia D está formada por una serie de DNA polimerasas presentes únicamente en arqueas (Cann y Ishino, 1999). La familia X y la familia Y engloban enzimas presentes tanto en eucariotas como en procariotas y arqueas. La familia X incluye DNA polimerasas implicadas fundamentalmente en procesos de reparación y generación de variabilidad. Por último, la familia Y incluye distintas DNA polimerasas capaces de replicar a través de lesiones en el DNA (Ohmori y cols., 2001; Prakash y cols., 2005). En la **tabla 1** se recoge los principales miembros de las diferentes familias de DNA polimerasas eucariotas.



**Tabla 1. Familias de DNA polimerasas humanas.**

Denominación griega	Denominación HUGO	Familia	Función propuesta
Pol $\gamma$ (gamma)	POLG	A	Replicación/Reparación DNA mitocondrial
Pol $\theta$ (theta)	POLQ	A	Síntesis a través de lesiones; SHM
Pol $\nu$ (nu)	POLN	A	Síntesis a través de lesiones; TLS
Pol $\alpha$ (alpha)	POLA	B	Replicación nuclear; HR
Pol $\delta$ (delta)	POLD1	B	Replicación nuclear; NER; MMR; HR
Pol $\epsilon$ (epsilon)	POLE	B	Replicación nuclear; NER; MMR; HR
Pol $\zeta$ (zeta)	POLZ	B	Síntesis a través de lesiones
Pol $\eta$ (eta)	POLH	Y	Síntesis a través de lesiones
Pol $\iota$ (iota)	POLI	Y	Síntesis a través de lesiones
Pol $\kappa$ (kappa)	POLK	Y	Síntesis a través de lesiones
	REV1	Y	Síntesis a través de lesiones
Pol $\beta$ (beta)	POLB	X	BER
Pol $\lambda$ (lambda)	POLL	X	Meiosis; BER; NHEJ; V(D)J
Pol $\mu$ (mu)	POLM	X	SHR; NHEJ; V(D)J
	TDT	X	V(D)J

SHM: Hipermutación somática; HR: recombinación homóloga; NER: reparación por escisión de nucleótido; MMR: reparación de desapareamientos; BER: reparación por escisión de base; NHEJ: reunión de extremos no homólogos; V(D)J: recombinación específica de genes receptores de antígeno.

## 1.1 -DNA polimerasas replicativas humanas

### 1.1.1 La Familia B

La replicación del DNA nuclear requiere la participación de un gran número de proteínas entre las que se encuentran las DNA polimerasas de esta familia (revisado por Garg y Burgers, 2005), a excepción de Pol $\zeta$  que está implicada en procesos de síntesis a través de lesiones en el DNA (Nelson y cols., 1996; revisado por Lawrence, 2004). Una vez que comienza la replicación con el desenrollamiento del DNA mediado por MCM2-7 (Johnson y cols., 2005), comienza la replicación con la actuación del complejo Pol $\alpha$ /primasa. La primasa sintetiza pequeños iniciadores de RNA (10 nucleótidos) en el origen de replicación de la hebra líder, y a lo largo de la hebra retrasada para dar origen a los fragmentos de Okazaki. Su actividad DNA polimerasa le permite extender estos iniciadores de RNA para dar lugar a pequeños fragmentos de DNA (20-30 nucleótidos) que servirán de iniciadores para las otras dos polimerasas implicadas en el proceso de replicación, Pol $\delta$  (cadena retrasada) y Pol $\epsilon$  (cadena adelantada). Ambas polimerasas interaccionan con el antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA), mejorando así su unión al DNA, y sintetizan DNA de manera procesiva (revisado por Kelman, 1997). Asimismo, Pol $\delta$  y Pol $\epsilon$  poseen una alta fidelidad de síntesis (Shcherbakova y cols., 2003; Fortune y cols., 2005), gracias a la alta selectividad de nucleótido en su centro activo, y a la actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores que poseen, lo que les permite llevar a cabo la replicación del DNA nuclear eficientemente y prácticamente libre de errores (revisado por McCulloch y Kunkel, 2008).

Por otro lado, las DNA polimerasas de esta familia también han sido implicadas en diferentes mecanismos de reparación que requieren la síntesis de fragmentos de DNA (revisado por Hübscher y cols., 2002). Tal es el caso del mecanismo de reparación por escisión de base (BER) de trecho largo, el mecanismo de reparación por escisión de nucleótido (NER), el mecanismo de reparación de bases desapareadas (MMR) y la recombinación homóloga (HR).

### **1.1.2 La Familia A**

El miembro mejor conocido de esta familia es Pol $\gamma$ , compuesto por dos subunidades: la subunidad mayor en la que residen sus actividades enzimáticas (polimerasa, exonucleasa 3'→5' y desoxirribosa-fosfato (dRP) liasa), y una subunidad menor de carácter accesorio que incrementa su afinidad por el DNA, estimula su actividad exonucleasa y aumenta su procesividad de síntesis (Carrodegua y cols., 2001; Lim y cols., 1999). Pol $\gamma$  es la única polimerasa conocida ubicada en las mitocondrias (revisado por Graziewicz y cols., 2006), por lo que es el enzima encargado de llevar a cabo tanto la replicación del DNA mitocondrial, como la reparación del mismo mediante el mecanismo de reparación por escisión de base (BER).

Recientemente se han descubierto dos nuevos miembros de esta familia, Pol $\theta$  (Sharief y cols., 1999; Seki y cols., 2003) y Pol $\nu$  (Marini y cols., 2003). Ambos enzimas parecen estar implicados en procesos de síntesis a través de lesiones (Seki y cols., 2004; Takata y cols., 2006), y Pol $\theta$  también parece tener un papel en procesos de hipermutación somática (Masuda y cols., 2005; Masuda y cols., 2006), así como de reparación de DNA (Yoshimura y cols., 2006).

## **1.2 DNA polimerasas humanas implicadas en mecanismos de tolerancia al daño**

El DNA celular está sometido a daño endógeno o exógeno, de una forma constante. Existen un gran número de sistemas de reparación que tratan de solventar estos daños. Pero si alguno de estos sistemas falla se produce un bloqueo en la replicación amenazando la viabilidad de la célula que se está replicando. Las lesiones no reparadas modifican la geometría normal de la doble cadena (sitios sin base nitrogenada o abásicos, enlaces covalentes entre bases contiguas, etc.) produciendo este eventual bloqueo de la parada de la horquilla de replicación. Sin embargo, existen estrategias que mitigan el efecto letal de la parada en replicación a costa de no eliminar la lesión del DNA. Estos procesos son denominados de “tolerancia al daño”. La síntesis a través de lesiones (TLS) es uno de los métodos de escape de la lesión tolerando el daño. En este proceso intervienen polimerasas con baja fidelidad de síntesis que son capaces de polimerizar a través de la lesión. Por tanto, no se trata de enzimas de reparación, sino de enzimas de tolerancia al daño, ya que permiten la supervivencia celular en presencia de daño en el DNA, que de otra manera produciría la muerte celular por parada de la maquinaria de replicación. Estas polimerasas se agrupan en la Familia Y, a excepción de Pol $\zeta$  que pertenece a la Familia B y que participa también en estos procesos.

### **1.2.1 La Familia Y**

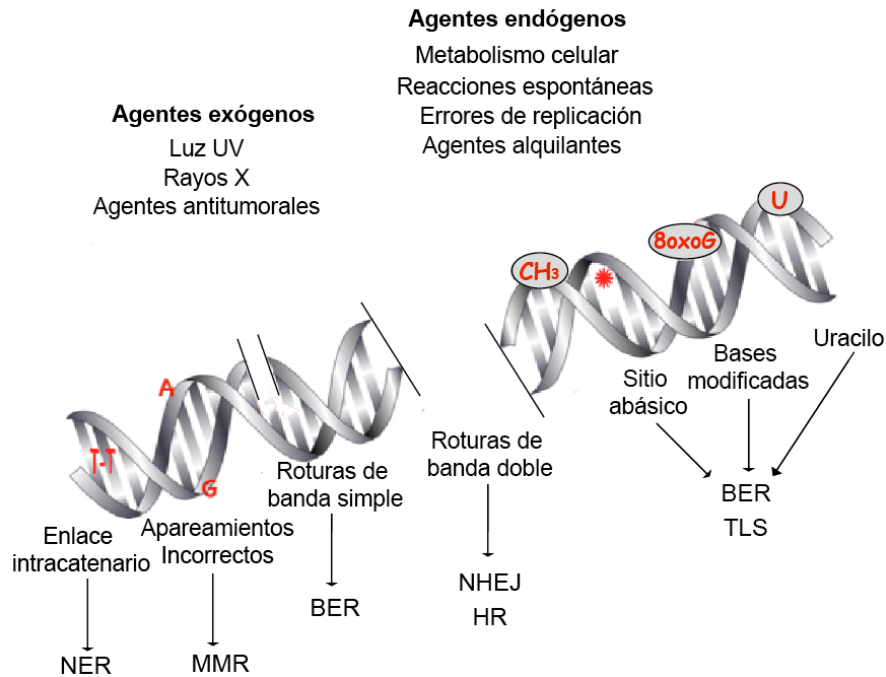
Los miembros de esta familia poseen una serie de características comunes: su modo de síntesis es distributivo, poseen una baja eficiencia catalítica, y poseen una baja fidelidad de inserción de nucleótido al sintetizar DNA frente a un molde no dañado (revisado por Kunkel, 2004). Su baja fidelidad viene dada por dos motivos fundamentales: la ausencia de actividad exonucleasa 3'→5' y la conformación de su centro activo, que les permite tener una baja selectividad por nucleótido. Asimismo, el centro activo de estas enzimas permite acomodar lesiones en la cadena molde debido al reducido tamaño de sus subdominios “dedos” y “pulgar”, así como a la ausencia de largas cadenas laterales cargadas que permitieran discriminar entre un DNA dañado y no dañado (revisado por Yang, 2005).

Los miembros de la Familia Y son: Pol $\eta$ , Pol $\iota$ , Pol $\kappa$  y REV1 (revisado por Prakash y cols., 2005). Algunas lesiones en el DNA pueden únicamente requerir una polimerasa que inserte un nucleótido frente a la lesión y que además lleve a cabo la subsiguiente extensión del par generado. Sin embargo, otras lesiones pueden necesitar dos polimerasas diferentes, cada una especializada en uno de los pasos. De igual forma, cada polimerasa parece ser específica de uno o varios tipos de lesiones concretas, lo cual vendría dado por especificidades a nivel estructural entre los miembros de esta familia.

Todos los miembros de la Familia Y interactúan con PCNA, lo que ha generado diferentes modelos para explicar el posible tráfico de proteínas (Pagés y Fuchs, 2002) y su regulación a nivel postraducciona mediante ubiquitinación y sumoilación (Hoege y cols., 2002; Ulrich, 2004).

## **1.2 DNA polimerasas humanas implicadas en reparación**

El genoma de las células eucarióticas está amenazado de forma continua por una gran variedad de agentes externos e internos que generan un gran número de lesiones (**Fig. 1**) entre las que se encuentran roturas de banda simple, roturas de banda doble, apareamientos incorrectos, modificaciones químicas de bases y azúcares y “*cross-links*” entre la misma o diferente cadena. En respuesta a estos daños generados y para evitar su acumulación las células han desarrollado múltiples sistemas en los que juegan un papel importante las DNA polimerasas.



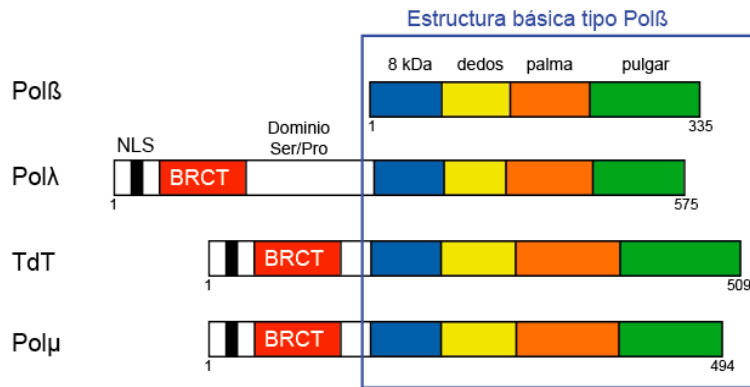
**Figura 1. Tipos de lesiones causadas en el DNA por diversos agentes y los mecanismos de reparación y tolerancia al daño.**

Las abreviaturas incluidas en la figura hacen referencia a los siguientes términos: BER, reparación por escisión de base; NER, reparación por escisión de nucleótido; MMR, reparación de apareamientos erróneos; HR, recombinación homóloga; NHEJ, mecanismo de unión de extremos no homólogos; TLS, síntesis a través de lesiones.

### 1.3.1 La Familia X

Esta familia posee 4 miembros (Pol $\beta$ , Pol $\lambda$ , Pol $\mu$  y TdT) implicados en diferentes procesos de reparación no asociados a replicación. Se trata de enzimas monoméricos, de relativo pequeño tamaño, carentes de actividad exonucleasa 3'→5' y cuyo modo de síntesis es distributivo, es decir, únicamente son capaces de incorporar unos pocos nucleótidos antes de disociarse del DNA.

Los miembros de esta familia se agrupan en torno a un núcleo conservado estructuralmente (Ruiz y cols., 2001; revisado por Bebenek y Kunkel, 2004) formado por el dominio de polimerización (“dedos”, “palma” y “pulgar”) y el dominio de 8 kDa. Adicionalmente, los miembros de esta familia pueden poseer dominios implicados en procesos de interacción proteína-proteína o proteína-DNA (**Fig. 2**).



**Figura 2. Organización estructural de los miembros humanos de la Familia X de DNA polimerasas.**

Sobre la estructura básica común de Polλ (dominio de 8 kDa y dominio de polimerización de 31 kDa formado por los subdominios “dedos”, “palma” y “pulgar”) se muestran los elementos estructurales adicionales presentes en cada caso (dominio rico en aminoácidos serina y prolina, secuencia de localización nuclear “NLS”, dominio de interacción proteína-proteína y proteína-DNA “BRCT”). Asimismo, se indica la longitud total de la secuencia aminoacídica de cada DNA polimerasa.

### 1.3.1.1 La DNA polimerasa β

Polβ fue el primer miembro identificado de esta familia. Se trata de un enzima monomérico de pequeño tamaño (39 kDa). La gran cantidad de datos estructurales y bioquímicos acumulados hasta la fecha han permitido implicar a esta polimerasa en numerosos procesos en los que se requiere una síntesis limitada de DNA (revisado por Beard y Wilson, 2000; revisado por Idriss y cols., 2002).

- *Propiedades bioquímicas*

Polβ es una nucleotidil transferasa dependiente de molde que sigue un mecanismo basado en la participación de dos iones metálicos, que se encuentra conservado en todas las DNA polimerasas (revisado por Steitz, 1999). Polβ posee un modo de síntesis distributivo en moléculas tipo molde/iniciador abierto (Abbotts y cols., 1988; Werneburg y cols., 1996) pasando a ser síntesis procesiva en moléculas tipo *gap* de pocos nucleótidos en las que haya un grupo fosfato en el extremo 5' del *gap* (Singhal y Wilson, 1993), siendo éste el sustrato idóneo de este enzima ya que su actividad se ve incrementada (Chagovetz y cols., 1997; Ahn y cols., 1998). Polβ carece de actividad 3'→5' exonucleasa correctora de errores por lo que su fidelidad de síntesis se aleja de la que muestran las polimerasas replicativas. En cuanto a errores de sustitución de base muestra una frecuencia de  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  (Kunkel, 1985; Ahn y cols., 1997; Osheroff y cols., 1999a). Por otro lado, su modo de acción distributiva favorece la propensión a cometer errores de delección mediados por deslizamiento (Kunkel, 1985; Werneburg y cols., 1996b; Osheroff y cols., 1999b), efecto que aumenta si la base molde posee algún tipo de lesión (Efrati y cols., 1997; Hashim y cols., 1997). En su sustrato idóneo, moléculas tipo *gap*, la fidelidad de síntesis de Polβ alcanza su nivel óptimo (Chagovetz y cols., 1997; Osheroff y cols., 1999b). Asimismo, la fidelidad de Polβ *in vivo* podría aumentar gracias a proteínas accesorias con actividad 3'→5' exonucleasa que corrigiesen los eventuales errores cometidos por Polβ (Shevelev y Hubscher, 2002).

- *Organización estructural*

Estructuralmente Pol $\beta$  está compuesta por dos dominios diferentes. El dominio de polimerización (31 kDa) en su extremo C-terminal, formado a su vez por los subdominios “dedos”, “palma” y “pulgar”, en donde reside su actividad polimerasa. En el extremo N-terminal se encuentra el dominio de 8 kDa, en donde reside la actividad desoxirribosa-fosfato (dRP) liasa, actividad enzimática fundamental para el mecanismo de reparación por escisión de base (BER). Ambos dominios se encuentran conectados por una región sensible a proteasas (Prasad y cols., 1998a).

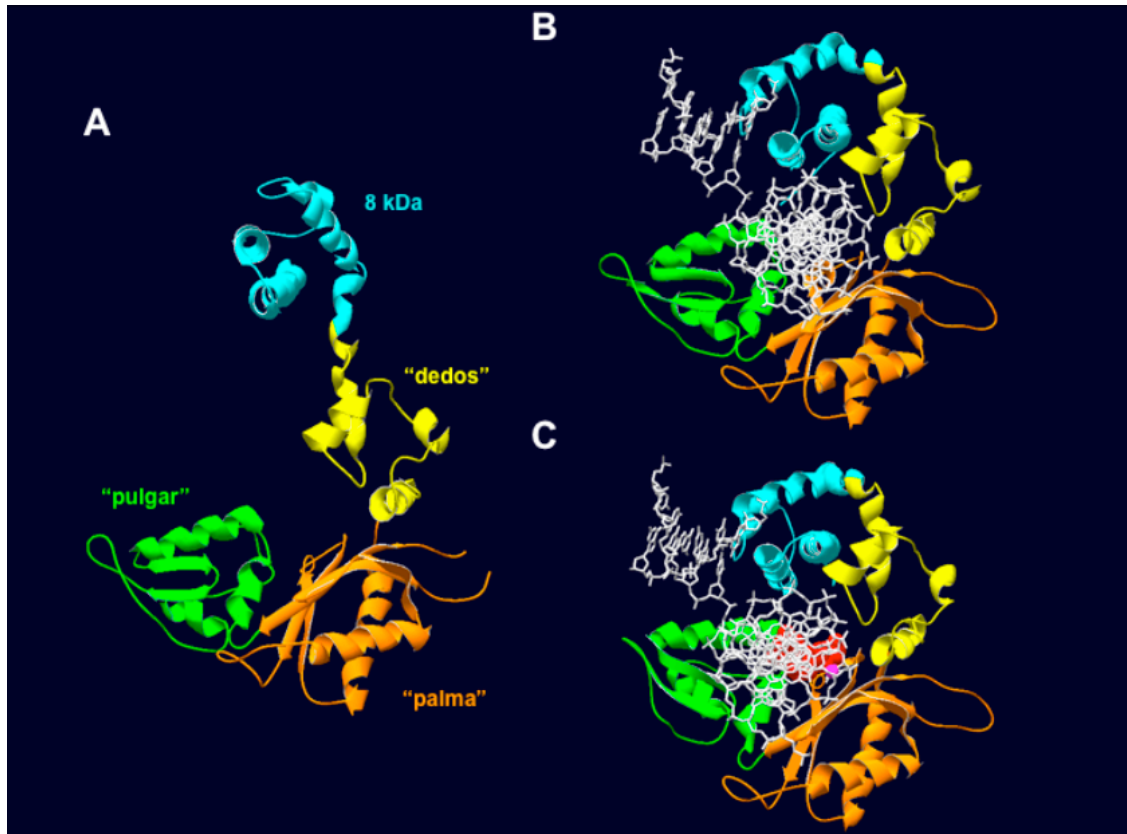
La resolución de la estructura cristalográfica de Pol $\beta$  como apoenzima (Sawaya y cols., 1994; Davies y cols., 1994) y formando un complejo con diferentes sustratos de DNA y nucleótido entrante (Pelletier y cols., 1994; Pelletier y Sawaya, 1996; Pelletier y cols., 1996a; Sawaya y cols., 1997) ha permitido dilucidar los detalles del mecanismo de polimerización de Pol $\beta$ .

En ausencia de DNA o en presencia de un DNA tipo molde/iniciador, Pol $\beta$  se encuentra en una conformación en la que el dominio de 8 kDa se sitúa alejado del dominio de polimerización y no interacciona con el DNA (Fig. 3A; Sawaya y cols., 1994; Pelletier y cols., 1994). En presencia de un DNA tipo *gap* de un nucleótido, el dominio de 8 kDa se pliega uniendo la zona final del *gap*, concretamente el grupo fosfato en posición 5' del *gap* (Fig. 3B; Sawaya y cols., 1997; Beard y Wilson, 1998). De esta forma se produce una interacción entre el extremo C-terminal del dominio de 8 kDa y el subdominio “pulgar” del dominio de polimerización, afianzando la unión al DNA.

La formación del complejo ternario por la unión del nucleótido provoca que el subdominio “pulgar” sufra un cambio conformacional encaminado a establecer las interacciones necesarias para la catálisis enzimática, dando lugar a un complejo “cerrado” (Fig. 3C; Sawaya y cols., 1997), que influye además decisivamente en el nivel de fidelidad de la reacción (revisado por Beard y Wilson, 2000; revisado por Kunkel y Bebenek, 2000; revisado por Kunkel, 2004). Además, el subdominio “dedos” a través de un motivo “hélice-horquilla-hélice” (HhH, Doherty y cols., 1996) interacciona con el iniciador contribuyendo al cierre del sitio de unión del nucleótido (Fig. 3C). Tras el evento de catálisis, el subdominio “pulgar” vuelve a su posición inicial (complejo “abierto”) facilitando la difusión del pirofosfato (Pelletier y cols., 1996a) y la traslocación o disociación del DNA según el caso.

Por último, Pol $\beta$  presenta un dominio llamado de 8 kDa. Este dominio situado en el extremo N-terminal de la proteína posee asociadas diversas actividades y funciones. En primer lugar, en él se sitúa el centro activo de la actividad dRP liasa, encargada de eliminar el residuo dRP generado durante la ruta de reparación por escisión de base (BER) (Matsumoto y Kim, 1995). Esta actividad se produce gracias a un mecanismo de  $\beta$ -eliminación a través de un intermediario en forma de base de Schiff y de manera independiente de metal (Prasad y cols., 1998a), a diferencia de la mayoría de las nucleasas, que utilizan un mecanismo asistido por metal. Se ha postulado que en este dominio reside otra actividad endonucleolítica denominada AP-liasa que produce la incisión de la cadena de DNA en el flanco 3' del sitio abásico. Cabe reseñar que esta actividad es 200 veces menos eficiente que la actividad dRP-liasa (Prasad y cols., 1998a).





**Figura 3. Estructura tridimensional de Polβ.**

La disponibilidad de diferentes cristales de Polβ ha permitido comprender la dinámica de la reacción de polimerización. (A) Apoenzima. En ausencia de DNA el dominio de 8 kDa (azul) se dispone alejado del dominio de polimerización, formado por los subdominios “dedos” (amarillo), “palma” (naranja) y “pulgar” (verde). (B) Complejo binario. La unión de un DNA tipo *gap* provoca el cierre del dominio de 8 kDa, que lleva a cabo la unión de la zona final del *gap*, concretamente el grupo fosfato en 5'. (C) Complejo ternario. La unión del nucleótido entrante (rojo) provoca cambios conformacionales en los subdominios “pulgar” y “dedos”, dando lugar a un complejo “cerrado” necesario para la catálisis enzimática. Los iones magnesio necesarios para coordinar la entrada del nucleótido y para la catálisis se representan en magenta. La figura se ha realizado empleando el programa Swiss PDB Viewer (Guex y cols., 1997; <http://www.expasy.com/spdbv/>). Las coordenadas cristalográficas empleadas corresponden a los archivos 1BPD (A), 1BPX (B) y 1BPY (C), de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>).

Por otro lado, el dominio de 8 kDa también posee una función de unión a DNA. Presenta una superficie de unión a DNA de cadena sencilla (Kumar y cols., 1990) a través de un motivo “hélice-horquilla-hélice” (HhH, Doherty y cols., 1996) y un sitio de unión para grupos fosfato situados en posición 5' de un *gap* de DNA (Prasad y cols., 1994). Ambas propiedades son cruciales para que Polβ lleve a cabo sus funciones *in vivo*.

El dominio de 8 kDa también ha sido objeto de estudio desde el punto de vista de la regulación de su actividad mediante modificación postraduccional. Se ha demostrado la acetilación de residuos de este dominio a través de la interacción específica entre Polβ y el coactivador transcripcional p300, lo que provoca la reducción de la actividad dRP-liasa, mientras que las actividades polimerasa y AP-liasa no se ven afectadas (Hasan y cols., 2002).

- *Polβ en el mecanismo de reparación por escisión de base (BER)*

Una de las principales funciones asociadas a Polβ es la participación en el mecanismo de reparación por escisión de base. Este mecanismo es el encargado de reparar la pérdida de bases en el DNA, la presencia de bases modificadas por fenómenos de alquilación, oxidación o desaminación, o la inserción de bases modificadas (dUTP, 8-oxo-dGTP) (revisado por Fortini y cols., 2003).

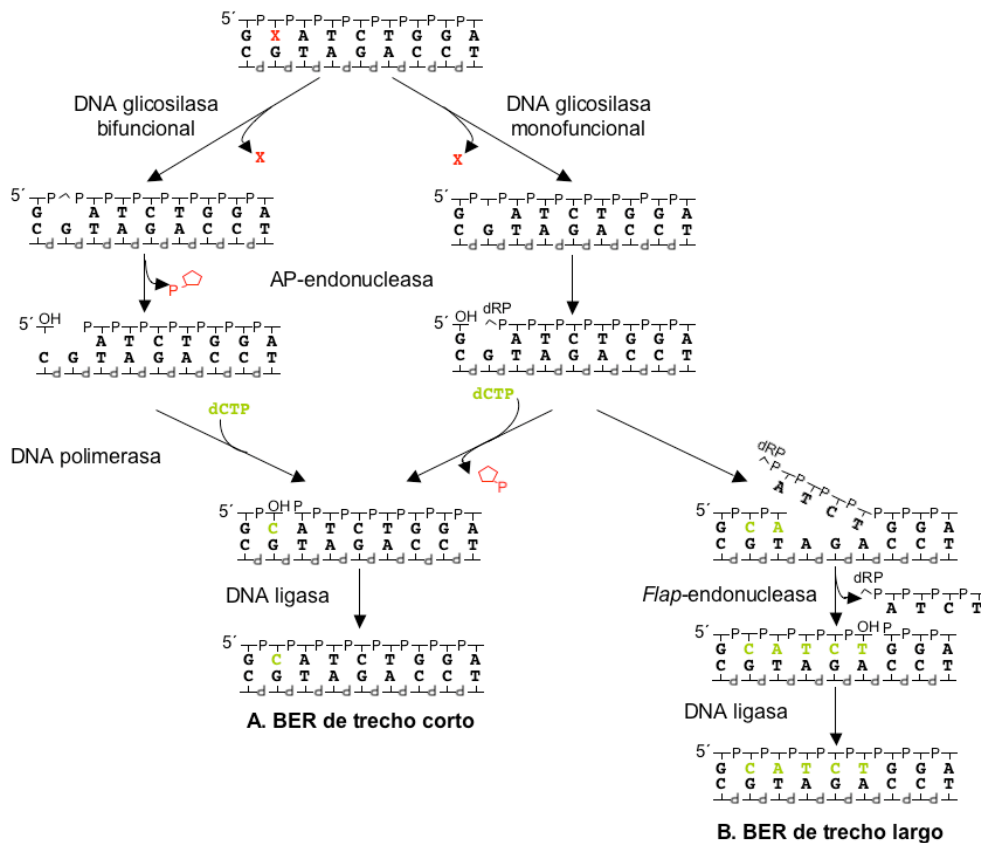
La ruta comienza con una DNA glicosilasa específica que reconoce y retira la base modificada, dejando un sitio abásico. A continuación una endonucleasa de sitios abásicos (AP endonucleasa) realiza un corte en posición 5' respecto al sitio abásico para generar un *nick* que deje un residuo 3'OH y un residuo desoxirribosa fosfato (dRP) en posición 5'. Este residuo en 5' se eliminará gracias a la actividad dRP-liasa presente en el dominio de 8 kDa de Polβ, generándose un *gap* de 1 nucleótido que será rellenado por la propia polimerasa (**Fig. 4**, parte derecha). Si la glicosilasa, u otro enzima, posee también actividad AP-liasa puede generarse una situación diferente: tras la retirada de la base se realiza un corte en posición 3' respecto al sitio abásico por la actividad AP-liasa y la AP-endonucleasa corta en posición 5' provocando la formación de un *gap* de 1 nucleótido. El enzima polinucleótido quinasa (PNK), gracias a sus actividades 5' DNA quinasa y 3' DNA fosfatasa, repondría el grupo OH en posición 3' y el fosfato en 5' si fuera necesario, siendo posteriormente rellenado el *gap* por la polimerasa (**Fig.4**, parte izquierda). Por último, en ambos casos se necesita la acción de una DNA ligasa para sellar la unión (DNA ligasa I o el complejo formado por XRCC1/DNA Ligasa III), completándose de esta forma la reparación por escisión de base de trecho corto (**Fig. 4A**). Si el residuo dRP está modificado (oxidado o reducido) y no puede ser eliminado por la actividad dRP-liasa (mecanismo de β-eliminación), se puede producir una síntesis (2 a 13 nucleótidos) asociada a desplazamiento de banda, generando un DNA de cadena sencilla de longitud equivalente que será cortado por la endonucleasa FEN1, generando un sustrato para la DNA ligasa. De esta forma se completaría la reparación por escisión de base de trecho largo (**Fig. 4B**).

La implicación de Polβ en el mecanismo de BER de trecho corto ha sido demostrada tanto *in vitro* (Kubota y cols., 1996) como *in vivo* (Sobol y cols., 1996). Asimismo, se ha demostrado la interacción específica de Polβ con las proteínas implicadas en esta ruta de reparación, como la AP-endonucleasa (Bennett y cols., 1997), la DNA ligasa I (Prasad y cols. 1996; Dimitriadis y cols., 1998), así como el heterodímero XRCC1/ADN Ligasa III (Caldecott y cols., 1996; Kubota y cols., 1996). Estas interacciones específicas puede que faciliten la coordinación secuencial entre los sucesivos pasos enzimáticos de este proceso (Wilson y Kunkel, 2000; Mol y cols., 2000).

Por último, Polβ posee también un papel significativo en el mecanismo de reparación por escisión de base de trecho largo (Dianov y cols, 1999; Horton y cols., 2000; Podlutzky y cols., 2001b; Prasad y cols, 2001), en el que está encargada de iniciar la síntesis de DNA y el desplazamiento de banda, como paso previo al acceso de las DNA polimerasas replicativas Polδ y Polε que continuarían la polimerización.

La regulación entre ambas rutas, trecho corto y trecho largo, podría estar dirigida por el grado de acetilación que sufriese el dominio de 8 kDa de Polβ, ya que si éste se acetilase se forzaría la ruta de trecho largo, dada la imposibilidad de eliminar el residuo dRP por la inactivación de la actividad dRP-liasa (Hasan y cols., 2002).





**Figura 4. Mecanismo de reparación por escisión de base (BER).**

(A) BER de trecho corto. (B) BER de trecho largo iniciado por una DNA glicosilasa monofuncional o bifuncional. En verde se señala el DNA de nueva síntesis. Figura modificada de Fortini y cols., (2003).

- *Otras funciones*

Aparte de su papel principal en el mecanismo de BER, Pol $\beta$  ha sido también implicada en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótido (Horton y cols., 1995; Oda y cols., 1996; Canitrot y cols., 2000), en replicación (Jenkins y cols., 1992; Sweasy y Loeb, 1992; Sweasy y cols., 1995), en recombinación (Nowak y cols., 1990), en meiosis (Plug y cols., 1997) y en fenómenos de neurogénesis, ya que los ratones carentes de Pol $\beta$  mueren al poco tiempo de nacer y muestran altos niveles de muerte celular por apoptosis en neuronas postmitóticas del sistema nervioso central y periférico en desarrollo (Sugo y cols., 2000).

- *Homólogos a Pol $\beta$  en otras especies. LiPol $\beta$*

Analizando la presencia de DNA polimerasas de la familia X, se han encontrado representantes de la misma en todos los taxones filogenéticos: *Eukaria*, *Bacteria* y *Archea* e incluso en virus DNA (Oliveros y cols., 1997). Si bien en mamíferos existen varios miembros de esta familia, en virus, procariontas, parásitos, levaduras y plantas se ha identificado un solo miembro. Incluso existen especies en las que no se ha descrito la presencia de proteínas de esta familia, como los organismos modelo *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Burgers y cols., 2001). Sin embargo, la Pol $\beta$ , como miembro central de esta familia, se encuentra representada en un gran número de

especies desde mamíferos hasta hongos pasando por parásitos como *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania infantum*. En *C. fasciculata* existe una única Pol $\beta$  de localización mitocondrial (Torri y cols., 1995) cuya expresión se encuentra regulada en las diferentes fases del ciclo del parásito (Li y Englund, 1997; Johnson y cols., 1998). Sin embargo, *T. brucei*, presenta dos polimerasas tipo Pol $\beta$  con localización mitocondrial al igual que su homólogo en *Crithidia* (Saxowsky y cols., 2003). Por último, en nuestro laboratorio se describió la presencia de una única polimerasa tipo Pol $\beta$  en *L. infantum* denominada LiPol $\beta$  y regulada en el ciclo del parásito pero de localización nuclear (Taladriz y cols., 2001), cuya caracterización es objeto de estudio en un capítulo de esta Tesis Doctoral.

- *Variantes polimórficas de Pol $\beta$  humana asociadas al cáncer.*

En el desarrollo del cáncer se han de dar alteraciones genéticas que conduzcan a la transformación de la célula normal sana (Hananan y Weinberg, 2000). Se ha descrito la relación entre numerosos genes implicados en reparación de DNA y el cáncer (Sweasy y cols., 2005; Kunkel, 2003; Ponamarev y cols., 2002). Entre los genes de DNA polimerasas se encuentra Pol $\beta$  (Bergoglio y cols., 2002). La Pol $\beta$  humana a su vez presenta variantes polimórficas, algunas de ellas asociadas a procesos tumorales (Sweasy y cols., 2005; Lang y cols., 2004 y Dalal y cols., 2005). Se ha descrito que estas variantes de Pol $\beta$  están presentes junto a la variante normal, en un 30% de los tumores analizados, sin embargo, no se encuentran en el tejido normal de los mismos pacientes. En concreto, las variantes I260M y K289M tiene una relación con la etiología del cáncer de colon y próstata respectivamente. La expresión de estas variantes en fibroblastos de ratón independientemente de la expresión de la Pol $\beta$  endógena provoca una transformación celular (Sweasy y cols., 2005; Lang y cols., 2004 y Dalal y cols., 2005). Estos autores demuestran que I260M y K289M presentan un defecto en el proceso de reparación por escisión de base (BER) por falta de discriminación entre el nucleótido correcto que ha de ser insertado tras la escisión de la base dañada (Dalal y cols., 2005 y Lang y cols., 2004).

### 1.3.1.2 La TdT

La “desoxinucleotidil Transferasa Terminal” o TdT, identificada en 1960, es un miembro muy especial de la Familia X, ya que su actividad polimerasa es llevada a cabo exclusivamente sobre extremos 3'OH de moléculas de DNA de cadena sencilla en ausencia de hebra molde que dirija la síntesis (Bollum, 1960; Kato y cols., 1967).

Mediante un alineamiento de secuencia de aminoácidos se observa que TdT y Pol $\beta$  posee un 22% de identidad a nivel del dominio catalítico. Aparte del núcleo catalítico tipo Pol $\beta$ , TdT posee en su parte N-terminal un dominio BRCT de interacción y una secuencia de localización nuclear (**Fig. 2**).

Su modo de síntesis es estrictamente independiente de molde, destacando la capacidad de incorporación tanto de dNTPs (2'H) como rNTPs (2'OH) *in vitro* (Roychoudhury y cols., 1972; Boule y cols., 2001), así como la de una gran cantidad de nucleósidos trifosfato no naturales (Semizarov y cols., 1997; Krayevsky y cols., 2000).

La expresión de TdT se encuentra prácticamente restringida a órganos linfoides primarios (timo y médula ósea) en los que se produce el reordenamiento de los genes de

las inmunoglobulinas (células B) y del receptor TCR (células T) mediante el proceso de recombinación V(D)J. El papel de TdT en este proceso es el de llevar a cabo las adiciones “N” entre los segmentos V, D y J, durante el proceso de reordenamiento, de cara a generar una variabilidad antigénica en el repertorio de receptores. El papel de TdT en este proceso fue demostrado *in vivo* gracias al empleo de ratones deficientes en TdT (Komori y cols., 1993; revisado por Gilfillan y cols., 1995), en los que las regiones variables de los receptores son más cortas y muestran un menor grado de diversidad que en los individuos silvestres.

### **1.3.1.3 La DNA polimerasa $\mu$**

Identificada junto a Pol $\lambda$  en nuestro laboratorio (Dominguez y cols., 2000), Pol $\mu$  es otro de los miembros de la Familia X. Tanto a nivel de secuencia de aminoácidos (42% de identidad) como estructuralmente, Pol $\mu$  presenta un gran parecido con TdT. Ambas polimerasas presentan, además del core catalítico tipo Pol $\beta$ , un dominio BRCT y una secuencia de localización nuclear en su extremo N-terminal (**Fig. 2**).

Entre sus características principales está la de ser una DNA polimerasa dependiente de molde pero que a su vez presenta actividad transferasa terminal (Dominguez y cols., 2000; Ruiz y cols., 2001). Pol $\mu$  presenta una fidelidad de síntesis baja debido a su capacidad de dislocación, es decir, es capaz de realizar síntesis de DNA dirigida por posiciones adyacentes alejadas del extremo iniciador (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004). Asimismo, Pol $\mu$  posee una baja discriminación a nivel del azúcar, insertando en el DNA tanto dNTPs como rNTPs (Ruiz y cols., 2003; Nick-McElhinny y Ramsden, 2003), lo que podría tener repercusión en momentos del ciclo celular en los que los niveles de dNTPs sean bajos (Nick-McElhinny y Ramsden, 2004), ya que los niveles de rNTPs se mantienen altos en todo momento (Bjursell y Skoog, 1980; McCormick y cols., 1983; Traut, 1994).

Pol $\mu$  presenta una expresión ubicua, aunque es preferencial en centros germinales de los órganos linfoides secundarios (Dominguez y cols., 2000), lo que apoya un papel de esta polimerasa en la diversificación del sistema inmune (Ruiz y cols., 2001). Así, se ha descrito la participación de Pol $\mu$  en la recombinación de los genes V y J de la cadena ligera k de las inmunoglobulinas durante el proceso de maduración de las células B en la médula osea (Bertocci y cols., 2003).

A su vez, el patrón de expresión y el fenotipo mutador asociado a Pol $\mu$ , junto a la sobreexpresión de Pol $\mu$  *in vivo* después de una inmunización, hizo pensar en un papel de esta DNA polimerasa en el proceso de hipermutación somática (Dominguez y cols., 2000; Ruiz y cols., 2001; Lucas y cols., 2005), mediante el que se introducen mutaciones en los genes V de las inmunoglobulinas para mejorar el nivel de afinidad por el antígeno. Estudios de sobreexpresión de Pol $\mu$  en células Ramos, en las que la hipermutación somática es constitutiva, apoyaron la hipótesis inicial, ya que se observó un aumento en las mutaciones somáticas de los genes V (Ruiz y cols., 2004). Sin embargo, estudios *in vivo* con ratones deficientes en Pol $\mu$  revelaron que la hipermutación somática se seguía produciendo, por lo que Pol $\mu$  no es imprescindible para este proceso (Bertocci y cols., 2002).

Estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que en este proceso intervienen varias DNA polimerasas (revisado por Gearhart y Wood, 2001; revisado por Díaz y

Casali, 2002), como ha sido evidenciado por diferentes estudios que implican en este proceso a Polt (Faili y cols, 2002), Polη (Rogozin y cols, 2001; Zeng y cols., 2001) y Polζ (Zan y cols, 2001; Díaz y cols., 2001).

Por otra parte, la ubicuidad de Polμ en todas las células del organismo sugirió un papel general de esta polimerasa. En primer lugar, se asoció su función a la reparación de roturas de doble cadena, concretamente mediante el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (NHEJ), proceso que comparte factores proteicos con el proceso de recombinación V(D)J y donde recientemente se ha demostrado que la Polμ es esencial para el desarrollo embrionario del sistema inmune participando en la reparación de roturas de doble cadena que se producen en este proceso y como consecuencia contribuyendo a la preservación de la estabilidad genómica de los precursores linfematomopoyéticos durante el desarrollo (Gozalbo-López y cols., 2009).

La similitud existente entre Polμ y TdT, que es reclutada a los extremos de una rotura a través de la interacción con el heterodímero Ku mediante su dominio BRCT (Mahajan y cols., 1999), hizo pensar en un papel de Polμ en NHEJ en tejidos no linfoides (Ruiz y cols., 2001). Esta hipótesis se apoya también en propiedades de Polμ, como la capacidad de relleno de pequeños *gaps*, la capacidad de dislocación de la hebra molde y su actividad transferasa terminal controlada que define el balance entre la precisión y la eficiencia en procesos de NHEJ (Andrade y cols., 2009), que serían muy útiles a la hora de reparar este tipo de roturas.

### 1.3.1.4 La DNA polimerasa λ

Polλ es el miembro de la familia X de DNA polimerasas que guarda mayor similitud con Polβ, presentando un 32% de identidad con la secuencia aminoacídica del core tipo Polβ (García-Díaz y cols., 2000; Aoufouchi y cols., 2000; Nagasawa y cols., 2000).

- *Organización estructural*

Con una organización estructural similar a Polβ, Polλ posee un dominio de polimerización de 31 kDa (formado por tres subdominios: “dedos”, “palma” y “pulgar”) y un dominio de 8 kDa. Adicionalmente, en su extremo N-terminal muestra un dominio BRCT, dispensable para la catálisis (Nagasawa y cols., 2000), que fue identificado por primera vez en la proteína BRCA1 y que está implicado en procesos de interacción entre proteínas y de proteínas con el DNA (Callebaut y Mornon, 1997; Bork y cols., 1997). A su vez, entre el dominio BRCT y el núcleo conservado tipo Polβ hay una región rica en aminoácidos serina, treonina y prolina, que podría constituir un dominio diana de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y glicosilaciones, que pudieran regular la actividad de Polλ (García-Díaz y cols., 2000) (**Fig. 2**).

- *Propiedades bioquímicas*

Polλ es una DNA polimerasa dependiente de molde, que carece de actividad 3'→5' exonucleasa y cuyo modo de síntesis es distributivo en moléculas tipo molde/iniciador, es decir, sólo es capaz de sintetizar unos pocos nucleótidos antes de disociarse del DNA (García-Díaz y cols., 2002). Sin embargo, al evaluar su capacidad de polimerización en moléculas con pequeños *gaps* se observó que su modo de síntesis

pasaba a ser procesivo, siendo capaz de rellenar todo el *gap* sin disociarse del DNA, siempre que en el extremo 5' del *gap* hubiese un grupo fosfato (García-Díaz y cols., 2002).

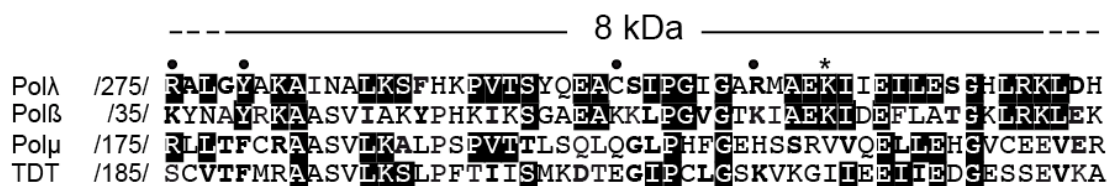
El metal divalente utilizado como cofactor por las DNA polimerasas influye de manera determinante en aspectos como la fidelidad de síntesis o la eficiencia catalítica, como ha sido descrito para Pol $\beta$  (Pelletier y cols., 1996b) y Pol $\mu$  (Domínguez y cols., 2000). De igual forma, el uso de Mn<sup>2+</sup> como metal activador de Pol $\lambda$  provoca un incremento en la capacidad de desplazamiento de banda (García-Díaz y cols., 2002).

Desde el punto de vista del nucleótido existen diferentes aspectos a destacar. Pol $\lambda$  posee una gran afinidad por nucleótido (baja Km), lo que le permite llevar a cabo la catálisis enzimática incluso cuando la concentración de dNTPs es muy baja (García-Díaz y cols., 2002). Por otro lado, Pol $\lambda$  es capaz de insertar tanto dNTPs (3'OH) como ddNTPs (3'H) debido a la baja discriminación a nivel de la posición 3' del azúcar que posee (García-Díaz y cols., 2002). Sin embargo, Pol $\lambda$  sí que es capaz de discriminar entre dNTPs y rNTPs, al contrario de lo que le sucede a Pol $\mu$  (Ruiz y cols., 2003; Nick-McElhinny y Ramsden, 2003).

Las DNA polimerasas de la Familia X, por carecer de actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores, no se caracterizan por una elevada fidelidad de síntesis (Domínguez y cols., 2000). Pol $\beta$  y Pol $\lambda$  cometen errores de sustitución de base con una frecuencia similar, sin embargo, Pol $\lambda$  posee una tendencia exacerbada a cometer errores de delección, convirtiéndose en el enzima con mayor tasa de error de este tipo de los estudiados hasta el momento, incluyendo a los miembros de la Familia Y, consideradas como polimerasas mutagénicas (Bebenek y cols., 2003).

El dominio de 8 kDa de Pol $\lambda$  es crucial para entender las peculiaridades funcionales de este enzima. Al igual que sucede con Pol $\beta$ , el dominio de 8 kDa es responsable de múltiples características básicas de Pol $\lambda$ . En primer lugar, se ha podido demostrar la existencia de una actividad dRP-liasa asociada a este dominio (García-Díaz y cols., 2001). Sin embargo, Pol $\lambda$  carece de actividad AP-liasa, a pesar del alto grado de similitud con el dominio de 8 kDa de Pol $\beta$ , lo que sugiere que quizá esta actividad resida en el dominio de polimerización de Pol $\beta$  (García-Díaz y cols., 2001).

Al igual que sucede con los residuos implicados en la actividad dRP-liasa, Pol $\lambda$  conserva los residuos del dominio de 8 kDa que han sido relacionados con la capacidad de unión al grupo fosfato en 5' en su homóloga Pol $\beta$  (**Fig. 5**), lo que explicaría el cambio de patrón de polimerización observado en moléculas tipo *gap* con grupo fosfato en 5' (García-Díaz y cols., 2002).



**Figura 5: Alineamiento de secuencia aminoacídica de los dominios de 8 kDa de las diferentes DNA polimerasas humanas de la Familia X.**

Los aminoácidos de Polλ idénticos a los de otras DNA polimerasas se muestran en blanco sobre fondo negro. Los residuos de Polλ conservados en otras DNA polimerasas se muestran en negrita. La numeración de los residuos se realiza tomando como origen la metionina del extremo N-terminal. Los residuos relevantes para la actividad dRP liasa se indican con un punto. El residuo responsable de la actividad dRP-liasa de Polλ (K312) y Polβ (K72) está señalado con un asterisco. Este alineamiento fue realizado con el programa Multalin ([www.toulouse.inra.fr/multalin.html](http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html)), y el resultado fue ajustado manualmente en base a los datos de las estructuras cristalinas disponibles de TdT (Delarue y cols., 2002) y Polβ (Pelletier y cols., 1994; Pelletier y Sawaya, 1996; Pelletier y cols., 1996a; Sawaya y cols., 1997).

- *Principales funciones propuestas para Polλ*

Debido a la expresión predominante de Polλ en testículo se propuso un papel para Polλ en procesos de reparación asociados a procesos de meiosis durante la espermatogénesis. Asimismo, la expresión se ve regulada en el tiempo y en el espacio, siendo la presencia de Polλ máxima en los espermatoцитos en fase Paquitene tardía, momento en que se produce la recombinación meiótica (García-Díaz y cols., 2000).

Gracias a la presencia de la actividad dRP-liasa asociada al dominio de 8 kDa de Polλ y a la capacidad de llevar a cabo la reacción de reparación por escisión de base (BER) *in vitro* con proteínas purificadas, se puede pensar que Polλ puede participar en esta ruta de reparación *in vivo* (García-Díaz y cols., 2001). Además, la presencia del dominio BRCT y la expresión tan abundante de Polλ en testículo, donde han sido descritos altos niveles de reparación por BER (Intano y cols., 2001; Olsen y cols., 2001), avaló la hipótesis de que Polλ podría estar asociada a eventos de reparación específicos no accesibles a Polβ (García-Díaz y cols., 2001). Asimismo, gracias a su capacidad de desplazamiento de banda en presencia de iones Mn<sup>2+</sup>, Polλ podría tener un papel relevante en la ruta de reparación BER de trecho largo (García-Díaz y cols., 2002; Parlanti y cols., 2003).

Por otro lado, Polλ podría ser la proteína implicada en diferentes eventos de síntesis de DNA asociados a procesos de reparación cuando en la célula los niveles de dNTPs fueran bajos, gracias a la gran afinidad que muestra por este sustrato (37 veces mayor que Polβ), lo que sería muy beneficioso para la célula en ciertas fases del ciclo celular, así como para las células que no se encuentran en proliferación (García-Díaz y cols., 2002).

La caracterización de su baja fidelidad de síntesis hizo pensar en un posible papel de Polλ en el proceso de hipermutación somática, ya que existe una opinión generalizada según la cual este proceso ha de involucrar DNA polimerasas propensas a cometer errores (revisado por Gearhart y Woods, 2001). Sin embargo, al obtener el



modelo murino deficiente en Pol $\lambda$  se observó un patrón de mutaciones normal desde el punto de vista cuantitativo (número de mutaciones), cualitativo (tipo de mutaciones) y de distribución a lo largo del gen estudiado (Bertocci y cols., 2002). De este trabajo se puede concluir que Pol $\lambda$  no es indispensable para este proceso, probablemente debido a una situación de redundancia entre distintas DNA polimerasas.

Por otro lado, la interacción específica entre Pol $\lambda$  y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, Maga y cols., 2002; Shimakazi y cols., 2002), implicaba a Pol $\lambda$  en nuevos procesos de reparación y de tolerancia al daño. Se ha descrito que en presencia de PCNA Pol $\lambda$  es capaz de sintetizar DNA teniendo como molde un sitio abásico (Maga y cols., 2002) gracias a un mecanismo de dislocación de la hebra molde que hace que la síntesis vaya dirigida por el siguiente nucleótido de la cadena (Blanca y cols., 2004). Pol $\lambda$  es capaz de tolerar la presencia de 8oxoG en el DNA (Picher y Blanco, 2007), siendo su comportamiento más fiel en presencia de PCNA y la proteína replicativa A (RPA) (Maga y cols., 2008). Recientemente se ha descrito la participación de Pol $\lambda$  en procesos de reparación de pares de bases dañadas en los que participa la glicosilasa MutY (van Loon y Hübscher, 2009).

Los primeros estudios sobre la DNA polimerasa IV de *Saccharomyces cerevisiae* en un principio aportaban pistas para un posible papel de Pol $\lambda$  en la ruta de reparación NHEJ ya que PolIV muestra un alto grado de identidad estructural y de secuencia aminoacídica con Pol $\lambda$ . Comparten el núcleo tipo Pol $\beta$  y también los dominios situados en la zona N-terminal, el dominio BRCT y el dominio Ser/Pro (García-Díaz y cols., 2000). PolIV ha sido implicada en la reparación por NHEJ (Wilson y Lieber, 1999), y se ha descrito su interacción con los componentes de la ruta (Tseng y Tomkinson, 2002). Otras razones por las que se le ha asignado a Pol $\lambda$  un papel en la reparación por NHEJ son su elevada propensión a cometer errores de delección que podría reflejar una capacidad intrínseca de esta polimerasa para utilizar sustratos de DNA que tuviesen apareamientos imperfectos, como los que probablemente se generen durante la reparación de roturas de doble cadena mediante el mecanismo NHEJ (Bebenek y cols., 2003). La presencia del dominio BRCT podría ser beneficiosa para la regulación de la participación de Pol $\lambda$  en este mecanismo, ya que podría regular el acceso de Pol $\lambda$  a la sinapsis de los extremos sólo cuando se produzcan cierto tipo de sustratos que requieran de su acción. Más recientemente se ha descrito de una forma más directa, la participación de Pol $\lambda$  en procesos de reparación por NHEJ gracias a las interacciones proteína-proteína mediadas por su dominio BRCT (Ma y cols., 2004; Lee y cols., 2004; Nick-McElhinny y cols., 2005; Capp y cols., 2006; Lieber y cols., 2010).

- *Reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (NHEJ).*

Las roturas de doble cadena (DSB) representan un tipo de daño extremadamente peligroso para la célula. Estas roturas pueden surgir como consecuencia de agentes químicos exógenos o por la exposición a radiación ionizante (Morgan y cols., 1996; Ward, 2000) así como consecuencia del metabolismo propio de la célula (Karanjawala y cols., 2002) que podrían introducir modificaciones químicas en el DNA, incluido modificaciones de las bases y el azúcar, aductos entre el DNA y proteínas y sitios abásicos. De igual manera las células eucarióticas producen DSB de una forma programada mediante la expresión controlada de endonucleasas específicas par su propio beneficio, tal y como ocurre en levaduras durante el cruce (Paques y cols., 1999),

el reordenamiento y posterior segregación correcta de los cromosomas durante la meiosis en todos los organismos eucariotas (Keeney y cols., 2006) así como en contextos V(D)J en células de vertebrados (Soulas-Sprauel y cols., 2007).

La reparación de estas roturas es esencial para mantener la estabilidad genómica. La reparación de roturas en los cromosomas de una célula en división es esencial para el reparto en igual proporción del material genético a las células hijas. Alteraciones o pérdidas de fragmentos de cromosomas pueden conducir por un lado, a una muerte programada de la célula por apoptosis, o por otro a procesos tumorales mediados por la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores. Por esta razón los organismos eucarióticos han desarrollado dos sistemas eficientes de reparación de roturas de doble cadena: la recombinación homóloga (HR) y la reunión de extremos no homólogos (NHEJ).

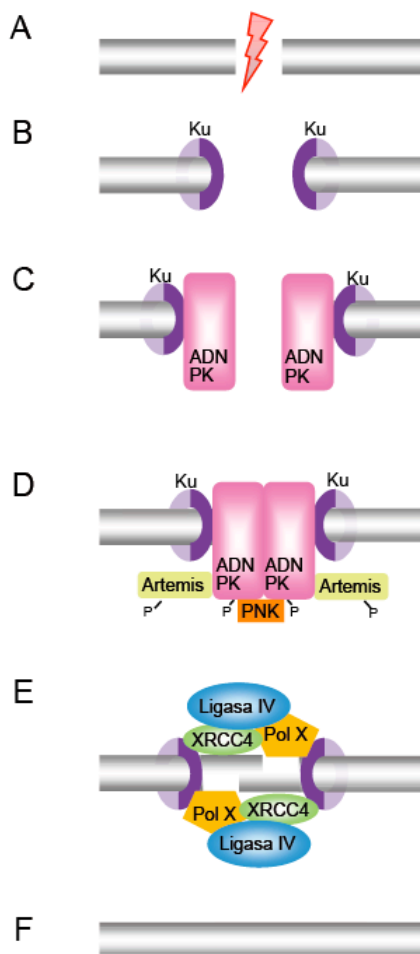
La recombinación homóloga se basa en la existencia de una segunda copia de la región a reparar, que sirve de molde para la síntesis de DNA, lo que permite restaurar la integridad del DNA dañado de manera fiel (revisado por West, 2003). Sin embargo, debido a la organización cromosómica y a la composición genómica, con gran cantidad de DNA repetido ( $\approx 40\%$ ), la búsqueda de complementariedad para reparar una rotura producida en una zona de DNA repetido sería un proceso lento y peligroso para la célula, ya que podría encontrarse complementariedad de secuencia en regiones de DNA repetido de cualquier cromosoma, pudiendo dar lugar a reordenamientos cromosómicos como translocaciones. Sólo durante las fases S tardía, G2 y M, la recombinación homóloga está activa ya que el posicionamiento adyacente de las cromátidas hermanas permite llevar a cabo el proceso sin riesgo para la célula. Durante las fases G0, G1 y S temprana, la recombinación homóloga se encuentra inactiva (Takata y cols., 1998).

Por su parte, el mecanismo de NHEJ reconoce los extremos de una rotura de doble cadena y, basándose en secuencias complementarias de pocos nucleótidos (1-4 nt, o incluso en ausencia total de complementariedad), restaura la integridad del DNA con escasas modificaciones en la secuencia. Esas modificaciones son producto del procesamiento necesario de los extremos por parte de la maquinaria de NHEJ para poder unir y sellar los extremos (Hefferin y Tomkinson, 2005; Ma y cols., 2005; Lieber, 2008) más económico desde el punto de vista mecánico, sobretodo considerando las necesarias remodelaciones de la cromatina. El primer paso de la ruta NHEJ es la sinapsis de los extremos de la rotura de doble cadena. El heterodímero Ku70/Ku86 reconoce los extremos de la rotura, y gracias a su estructura toroidal acomoda el dúplex de DNA en su interior, previniendo la posible degradación nucleolítica (Walker y cols., 2001). A continuación, la quinasa DNAPK se recluta (Dvir y cols., 1992; Gottlieb y Jackson, 1993), desplazando ligeramente al heterodímero Ku (Dynam y Yoo, 1998), y permitiendo que ambos extremos se acerquen gracias a interacciones proteína-proteína específicas (Yaneva y cols., 1997; Chen y cols., 2000; DeFazio y cols., 2002). El complejo DNA-PK formado recluta a su vez a las proteínas necesarias para un posible procesamiento y posterior ligación de los extremos. Artemis, una exonucleasa 3'→5' de cadena sencilla, se activa mediante fosforilación por DNA-PK mostrando también actividad endonucleasa en extremos tanto 3' como 5' protuberantes (Ma y cols., 2002). La polinucleótido quinasa PNK, que posee actividad 5' DNA quinasa y 3' DNA fosfatasa (Karimi-Busheri y cols., 1999), se encarga de procesar los extremos (Chappell y cols., 2002). Tras el procesamiento y alineamiento de las cadenas de DNA, es factible la aparición de huecos de pocos nucleótidos que tendrán que ser rellenados como paso



previo a la ligación. En este proceso se ha implicado tanto a Pol $\lambda$  como a Pol $\mu$  en función del grado de complementariedad existente entre los extremos (Mahajan y cols., 2002; Nick-McElhinny y cols., 2003; Ma y cols., 2004). Asimismo, Pol $\mu$  podría realizar una polimerización independiente de molde para promover la aparición de secuencias complementarias necesarias para el alineamiento (Ma y cols., 2004; Juárez y cols., 2006). Por último, el complejo formado por XRCC4/DNA ligasa IV sella la unión entre los extremos de la rotura (Grawunder y cols., 1997; Chen y cols., 2000) (**Fig. 6**).

Recientemente, se ha identificado en mamíferos un factor similar a la proteína XRCC4 denominado XLF (*XRCC4-like factor*) o Cernunnos, el cual interacciona con el complejo XRCC4/DNA ligasa IV promoviendo la ligación de los extremos (Ahnesorg y cols., 2006; Hentges y cols., 2006). En *S. cerevisiae*, el proceso de NHEJ requiere las proteínas Ku70/Ku80, el complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), la DNA ligasa 4 (Dnl4), XRCC4 (Lif1), Nej1 (homólogo de XLF) y *ScPolIV*. Curiosamente no se han identificado homólogos de DNA-PK y Artemis (Daley y cols., 2005). En *S. pombe* este proceso únicamente requiere las proteínas Ku70/Ku80, Xlf1, DNA ligasa 4 y probablemente *SpPolIV* (González-Barrera y cols., 2005). Sorprendentemente, *S. pombe* no presenta homólogos de XRCC4, ni de DNA-PK y Artemis (Manolis y cols., 2001; Prudden y cols., 2003; Hentges y cols., 2006; Cavero y cols., 2007). Estos datos sugieren que el núcleo fundamental de proteínas para el mecanismo de NHEJ en todos los organismos es Ku70/Ku80 y la DNA ligasa IV, mientras que hay organismos que requieren de otros factores adicionales como la DNA-PK, Artemis, XRCC4/Lif1 y el complejo MRN/MRX.



**Figura 6. Mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ).** Este sistema de reparación se encarga de reparar roturas de doble cadena que se generan en el DNA como consecuencia de un daño. (A) El heterodímero Ku70/Ku86 reconoce y se une a los extremos de la rotura. (B) A continuación se une la quinasas dependiente de DNA DNA-PK. (C) que recluta y activa por fosforilación a la nucleasa Artemis y a PNK (D), los cuales se encargan de procesar los extremos. Posteriormente se alinean los extremos, se rellenan los huecos generados (E) y se sella la rotura (F), proceso en el que intervienen DNA polimerasas de la familia X, XRCC4 y DNA ligasa IV.



# ***MATERIALES Y MÉTODOS***



## **1 MATERIALES**

### **1.1 Enzimas**

La polinucleótido quinasa de T4 (T4 PNK), uracil DNA glicosilasa (UDG) , glicosilasa 8 oxo guanina humana (hOGG1), glicosilasa de cadena sencilla monofuncional humana (SMUG1) y DNA ligasa de T4 se adquirieron en *New England Biolabs*; la glicosilasa MutY de *Trevigen*; *Pfu* DNA polimerasa se obtuvieron de *Promega*; las endonucleasas de restricción, fosfatasa alcalina de gamba, *Klenow* y *Taq Expand High Fidelity* fueron adquiridas en *Roche*; la hAPE fue cedida por el Dr S. H. Wilson (NIEHS, Research Triangle Park, NC). Las Pol $\lambda$  y Pol $\mu$  humanas purificadas se obtuvieron como se describió anteriormente (Domínguez *et al.*, 2000; García-Díaz *et al.*, 2002). El cocktail de inhibidores de proteasas fueron suministrados por Roche.

### **1.2 Reactivos**

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos, fueron suministrados por Merck, Sigma y Fluka.

### **1.3 Nucleótidos**

Se utilizaron desoxinucleótidos y ribonucleótidos ultrapuros no marcados adquiridos en Amershan Biosciences y los nucleótidos marcados radioactivamente; [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dGTP, [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dTTP (3000Ci/mmol) adquiridos en Amershan Biosciences y Perkin Elmer. Los oligonucleótidos sintéticos fueron obtenidos de Invitrogen e Isogen.

## **2 MÉTODOS**

### **2.1 CULTIVOS CELULARES**

#### **2.1.1 Cultivo celular del parásito *Leishmania infantum***

Los cultivos celulares se realizaron en colaboración con la Dra. Ana Alonso (CIB, Madrid). La cepa del parásito (MHOM/FR/80/LEM75) fue amablemente cedida por el Servicio de Parasitología, Majadahonda, Madrid. Los promastigotes, o forma extracelular, de *L. infantum* se crecieron a 26°C en RPMI-1640 (Gibco BRL, Scotland, UK) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Scotland, UK), penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ). El cultivo se inicia partiendo de  $10^6$  células y los Promastigotes se separan en sus fases logarítmica y estacionaria en función de su morfología y concentración celular como se define en (Zarley y cols., 1991). Los Promastigotes pasan de su estado no infectivo durante el crecimiento logarítmico a estado infectivo en su fase estacionaria. (Da Silva y cols., 1987).

La otra forma celular del parásito o amastigote (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89), fue amablemente cedida por la Dra. M. Colmenares Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid). Para obtener estos amastigotes se requiere cultivar los promastigotes

dando entre cuatro y seis pases a bajas diluciones (1:10–1:25) para adaptarlos al crecimiento en medio ácido. Una vez establecidos se valora su capacidad de crecimiento en el medio a 37°C (Armson y cols., 1999).

### **2.1.2 Generación de líneas celulares que sobreexpresan distintas construcciones de hPolλ**

Los vectores hPolλR438-pIRES y hPolλW438-pIRES, contruidos como se detalla más adelante, se transfectaron, mediante jetPEI (Qbiogen), células de ovario de hámster chino (CHO-DRA10), MRC5 y XRCC4<sup>KD</sup> para generar clones estables por selección con puromicina (5 μg/ml) (Invivogen). Estas células se generaron en colaboración con el grupo del Dr. Jean-Sebastien Hoffmann (Toulouse, Francia).

Las células CHO-DRA10 se cultivaron en medio Eagle (MEM) , 10% de suero fetal bobino (GIBCO BRL) y penicilina/estreptomicina (Sigma) . Los clones DRA10-R2, DRA10-R15 y DRA10-W14, DRA10-W15 se obtubieron por transfección estable de los vectores que contenían los cDNAs de R438 y W438 respectivamente. Para obtener el clon DRA10-WD14 con la Polλ inactiva, se realizó transfectando hPolλWD-pIRES con jet-PEI de igual manera que para las construcciones anteriores.

De igual manera se obtuvieron clones en las células MRC5 y células XRCC4KD Estas células fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco y Freeman, 1959), 10% suero fetal bobino (GIBCO BRL), penicilina/estreptomicina (Sigma) y aminoácidos no esenciales (Sigma).

### **2.1.3 Obtención de fibroblastos embrionarios a partir de embriones de ratón hermanos de camada (MEFs)**

El protocolo se realiza a partir de embriones de 14,5 días procedentes de un cruce entre ratones heterocigotos. Se sacrifica a la hembra por dislocación cervical y se interviene al animal en una cámara de flujo para mantener las condiciones de esterilidad. Se extrae el útero y se trasvasa a una placa p100 para lavarlo con PBS. Se realizan varios lavados en PBS. A continuación se extraen los embriones del útero con unas pinzas de disección, desechando las placentas. Los embriones se trasvasan a una placa p100 con medio de crecimiento sin suero de MEFs atemperado. Se eliminan las cabezas y las vísceras de cada embrión. Se lava el resto del embrión en medio fresco para MEFs sin suero y atemperado. Se transfiere cada embrión a un tubo con 1 ml de 0,05% tripsina, 0,02% EDTA. Se incuba en agitación suave 4 h a 4°C. Pasado ese tiempo se incuba a 37°C hasta obtener una mezcla homogénea, ayudando a la disgregación con la pipeta si fuera necesario. Posteriormente se diluye la mezcla con medio para fibroblastos hasta alcanzar los 5 ml por embrión. La mezcla se filtra 3 veces en gases estériles para desechar los restos de vísceras. A continuación, se centrifuga la mezcla 1000 rpm 5 min a temperatura ambiente y el sobrenadante de siembra en placa p100. Se mantiene el cultivo a 37°C. Cuando la placa llega a confluencia se divide para mantener en cultivo, congelar MEFs y extraer DNA genómico para realizar el genotipado.

## **2.2 Mantenimiento de las colonias de ratones**

Los ratones utilizados en los experimentos fueron mantenidos en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Se agruparon en un máximo de 5 animales por jaula con agua y comida (Harlan Iberica) *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h con encendido de luz a las 07:00 h. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas aprobadas por el comité ético del CSIC.

## **2.3 Derivación del modelo murino de deficiencia en Pol $\lambda$ de fondo mixto a fondo puro C57Black6.**

En el laboratorio poseemos dos modelos murinos de deficiencia en cada una de las DNA polimerasas que son objeto de estudio de nuestra investigación, Pol $\lambda$  y Pol $\mu$ . El modelo murino de deficiencia en Pol $\lambda$  se generó en colaboración con el laboratorio de Klaus Rajevski (Colonia, Alemania) El modelo de deficiencia en Pol $\mu$  fue generado en colaboración con el grupo del Dr. Antonio Bernad (CNIC, Madrid). Ambos modelos presentaban un fondo genético mixto debido a la procedencia de los progenitores. Para poder unificar el fondo genético decidimos derivar a un fondo puro C57Black6 ambas colonias de ratones. La derivación del modelo de deficiencia en Pol $\mu$  (knock out  $\mu$ , KO $\mu$ ) se realizó por el grupo del Dr. Antonio Bernad (CNIC, Madrid). En nuestro laboratorio llevamos a acabo la derivación del modelo murino de deficiencia en Pol $\lambda$  (knock-out  $\lambda$ , KO $\lambda$ ). Para ello se realiza un primer cruce del ratón entre un ratón KO $\lambda$  y un ratón silvestre C57Black6. De la 1ª generación (F1) resultan animales heterocigotos para Pol $\lambda$ . A continuación se cruza un ratón de F1 por un raton silvestre por un ratón silvestre C57Black6. La generación 2ª se genotipa para escoger un ratón heterocigoto y cruzarlo nuevamente por un ratón silvestre C57Black6. A continuación se genotipa la camada y se prosigue con los cruces entre ratones heterocigotos para Pol $\lambda$  y un ratones silvestres C57Black6 hasta que en el cruce 10º existe un porcentaje de 99,9% de fondo C57Black6.

## **2.4 Generación del modelo murino de deficiencia combinada en Pol $\lambda$ y Pol $\mu$ (DK)**

Una vez fueron derivados a fondo puro C57Black6 las dos colonias de modelos de deficiencia en Pol $\lambda$  y en Pol $\mu$  se decidió generar el modelo de deficiencia doble en Pol $\lambda$  y Pol $\mu$  (Doble Kock-out, DK). Para generarlo se realizó un primer curce entre ambas colonias. La 1ª generación son heterocigotos para ambos alelos de las polimerasas. Posteriormente se realiza un cruce entre ratones de esta 1ª generación y se genotipa para ambos alelos de cada polimerasa las camadas resultantes en donde existe 1/16 de probabilidad que nazca un ratón deficiente las dos polimerasas. Por esta baja probabilidad se repitió 3 veces el segundo cruce. Una vez que nacen dos ratones macho y hembra DK se cruzan para expandir la colonia en homocigosis.

### 2.5 Extracción de DNA genómico de cola de ratón

Se corta 0,5-1 cm de la cola del ratón a genotipar. Se digiere el tejido con 320  $\mu\text{g/ml}$  de Proteinasa K (Promega) en tampón de lisis (10 mM Tris HCl pH7,8, 5 mM EDTA pH8, 0,5% SDS) durante 6-8 h a 55°C. El tejido disgregado se somete a una extracción con fenól:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (v). Se precipita el DNA genómico de la fracción soluble con 120 mM de Acetato Sódico y etanol 100%. Tras la centrifugación y posterior lavado con etanol 70%, el sedimento con el DNA se resuspende en tampón TE 1X (10 mM TrisHCl pH 7,5, 1 mM EDTA) y se cuantifica por espectrometría a 260 nm de densidad óptica.

### 2.6 Extracción de DNA genómico de diferentes tejidos con Trizol

La homogenización se realiza en un potter vidrio-vidrio en 1ml de Trizol (Invitrogen) por 50-100 mg de tejido, siguiendo el protocolo que recomienda el fabricante. Tras añadir 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo las diferentes fases se separan por centrifugación (20 min, 12000g, 4°). Una vez retirada la fase superior con el RNA, se precipita el DNA con 300  $\mu\text{l}$  de Etanol 100 %, de la fase fenol-cloroformo y la interfase, para separarlo de las proteínas y se centrifuga (5 min, 2000 g, 4°). Posteriormente se realizan dos lavados con 0,1 M Citrato Sódico, 10 % Etanol de 5 min, y un tercer lavado con Etanol 75 %, centrifugando entre cada lavado (5 min, 2000g, 4°). Por último se deja secar el sedimento resultante del último lavado y se resuspende en la cantidad apropiada de H<sub>2</sub>O Mili Q.

### 2.7 Genotipado DNA por *southern blot* (SB)

Se digiere 20  $\mu\text{g}$  de DNA genómico de cola de ratón o procedente de MEFs, durante 5 h a 37°C, con la enzima *BamHI* ó *ScaI* para genotipar la presencia del alelo Pol lambda ó Pol mu respectivamente. El DNA digerido se separó en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). El gel se depurinizó parcialmente en HCl 0.25 N durante 10 min, se lavó con agua y se equilibró en el tampón de desnaturalización NaOH 0.4 N durante 30 min. A continuación se transfirió a una membrana de nylon cargada positivamente *Hybond-N+* (Amershan Biosciences). Las sondas que se utilizaron para el *Southern blot* se obtuvieron de la digestión del plásmido pUPT4-sondalambda con *XbaI* y *HindIII* para obtener la sonda para el alelo Pol lambda y por PCR sobre 250ng de DNA genómico de ratón con los oligonucleótidos T2ex7s (5'CTGCCCGGAGCCACTGTAC3') y T2ex10as (5'GAAGTTGCATGGAAAAC3') durante 35 ciclos de amplificación de 1min a 94°, 30 s a 55° y 30 s a 72°.

El plásmido digerido y el producto de PCR se separaron en un gel de agarosa al 0.8% (p/v), se cortó la banda deseada (400pb para el alelo Pol lambda y 997pb para la sonda del alelo Pol $\mu$ ) y se utilizó el sistema de extracción *QIAquick* (*Qiagen*) para su purificación.

Se marcó radiactivamente 200 ng de sonda utilizando [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP y la enzima *Klenow*, 1 h a 37°C. Se prehibridó la membrana 1 h a 65°C en la solución de hibridación (tampón fosfato sódico pH 7 0.5 M, SDS 7%). A continuación se añadió la sonda marcada y se hibridó toda la noche a 65°C. Se realizaron tres lavados con tampón de lavado SSC 2X (300 mM NaCl, 30 mM Citrato Sódico) y se analizó mediante autorradiografía.



## **2.8 Genotipado DNA por PCR**

Se realizan dos amplificaciones por separado con 2  $\mu$ g de DNA genómico, para detectar el alelo silvestre o el alelo con la delección de cada una de las DNA polimerasas lambda y mu. Para el alelo silvestre de Pol $\lambda$  se utilizaron los oligonucleótidos Pt29 (5'GGTCAAGGACACTAAGCTACATGGCTGTTTC3') y Seq9 (5'CTCTGGGAACCAAAGGAC3') con una T<sup>a</sup> de hibridación de 52° y un producto esperado es de 500 pb. En la amplificación del alelo KO lambda se utilizaron los oligonucleótidos Pt26 (5'GTGCTGATCACAGAAATGGAAGGACCTGGA3') y ScNeoR1 (5'GGGGCCACCAAAGAACGGAGC3') con una T<sup>a</sup> de hibridación de 52°. El producto esperado es de 600 pb. Para el alelo silvestre de Pol $\mu$  se utilizaron los oligonucleótidos Mu2486s (5'GGCCTGTACAGTGCAATAA3') y Mu3150as (5'GGCTCAGCTACCTGCAAAA3') con una T<sup>a</sup> de hibridación de 55° y un producto esperado de 700 pb. La amplificación del alelo KO mu se realizó con los oligonucleótidos Mu2486S (5'GGCCTGTACAGTGCAATAA3') y ScNeoR1 con una T<sup>a</sup> de hibridación de 56° y un producto esperado de 600 pb.

## **2.9 Ensayo de mutagénesis *in vivo* en células de mamífero**

Para determinar la mutagénesis espontánea en las diferentes células que sobreexpresan cada una de las variantes, se siembran 5x10<sup>5</sup> células en placa de cultivos celulares p100 (5 placas por experimento) y se exponen a 20  $\mu$ M de 6-thioguanina (6-TG). Pasados 8 días se fijan las células con Glutaraldehído 1%, se tiñen con cristal violeta 1% en PBS y se contabilizan las colonias generadas que son resistentes a 6-TG.

## **2.10 Experimentos de citotoxicidad- Ensayo clonogénico**

Los experimentos de citotoxicidad se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Jean-Sebastien Hoffmann (Toulouse, Francia). Se siembran 500 células por placa p100 y se deja durante la noche para que se adhieran a la placa. Se irradian las células a las dosis indicadas en medio de crecimiento (IBL 437C tipo H, Oris industries SA). Pasados seis días después del tratamiento, las colonias formadas (con más de 50 células) se fijan con 1% Glutaraldehído y se tiñen con 1% de Cristal violeta (Sigma). El porcentaje de supervivencia se expresa como la eficiencia de generación de colonias en las células tratadas frente a las no tratadas.

## **2.11 Medición de actividad NHEJ *in vivo***

La medición de la actividad de NHEJ se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Jean-Sebastien Hoffmann (Toulouse, Francia) tal y como se describe en Capp y cols., 2006. Se siembran 5x10<sup>5</sup> células y se incuban a 37°C durante una noche para que se adhieran. La expresión de la nucleasa *I-Sce-I* se hace por transfección transitoria del pánlido pCMV-*I-Sce-I* (Liang, 1998) usando jet-PEI como en casos anteriores. Pasadas 72 h, las células se lavan en PBS y se fijan en 2% de Paraformaldehído en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se tiñen las células con anti-H2Kd (1/30, de ratón, SF1-1.1, Pharmigen) , o con anti-CD4 (1/30, de rata, H129.19, Pharmigen) o anti-CD8 (53-6.7, Pharmigen) durante 30 min a temperatura ambiente en PBS, 0,5% BSA. Pasado ese tiempo se incuban las células con anti-ratón-FITC (1/530, de ratón, F-2761, Molecular Probes) durante 30 min a temperatura ambiente. La frecuencia de los eventos H2K nos permiten estimar la eficiencia de la transfección de

I-Sce-I y la actividad. Los eventos de NHEJ CD4 o CD8 se midieron por citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson).

### 2.12 Análisis de cariotipos

El análisis de cariotipos se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Jean-Sebastien Hoffmann (Toulouse, Francia). Tanto las células irradiadas (2 Gy) como las que no se incuban después del tratamiento con 10  $\mu$ M de Nocodazol durante 3 horas. Se recogen las células, se incuban en un medio hipotónico, se fijan con metanol y se tiñen los cromosomas con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma).

### 2.13 Análisis de las distintas fases del ciclo celular de MEFs asincrónicos

Se recogieron las células adheridas a la placa mediante tripsinización (1ml de tripsina/p100) y las células que permanecían en el medio. Se centrifugaron a 1800rpm, 5 min. A continuación se fijaron con 700 $\mu$ l de Etanol 100 % durante 1h a 4° y se lavaron 2 veces en PBS. Posteriormente, se marcaron con 25  $\mu$ g/ml de Ioduro de Propidio, 500 $\mu$ g/ml RNAsa en PBS, durante 1h, 37° protegidas de la luz. A continuación se pasaron las muestras por el citómetro FACScalibur (Becton Dickinson).

### 2.14 Ensayo del cometa alcalino

El procedimiento seguido para el análisis de cada muestra es el siguiente: cada portaobjetos se cubre con 150  $\mu$ L de agarosa NMA (*Normal Melting Agarose*) al 0,5% y se seca a 65°C. A continuación, se resuspenden las alícuotas de 20  $\mu$ l de cultivo (40.000 células) en 50  $\mu$ l de agarosa LMA (*Low Melting Agarose*) al 0,5%, se pipetea en los portaobjetos anteriormente preparados y se cubren con cubreobjetos de 24mm\_60mm. Se dejan solidificar a 4°C y se retira el cubreobjetos. Posteriormente, los portaobjetos se sumergen en tampón de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Tritón X-100, 1% Sarcocinato sódico, pH 10) y se mantienen durante 2h a 4°C en oscuridad. A partir de este punto, todo el proceso se realiza en oscuridad para evitar el daño adicional que podría producir la luz. Tras la lisis, los portas se sumergen en el tampón de electroforesis (1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH, pH 13,5) durante 40 min y, a continuación, se lleva a cabo la electroforesis (300 mA) en el mismo tampón durante otros 20. Por último, se lavan los portas dos veces con tampón de neutralización (0,4 M Tris, pH 7,5) durante 5 min, y se tiñen con bromuro de etidio (0,4  $\mu$ g/mL). La visualización se llevó a cabo en un Microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss), analizando 100 células por muestra.

### 2.15 Extractos totales celulares del parásito *L. infantum*

Los extractos celulares de cada una de las fases del ciclo de *L. infantum*, forma extracelular o promastigote (logarítmica y estacionaria) y forma intracelular o amastigote se realizaron como se describe en Johnson y cols., 1998. El sedimento resultante de la centrifugación de 10 ml de cultivo de cada una de las fases se lava en PBS (20 mM fosfato de sodio pH=7,5, 150 mM NaCl). Posteriormente se lisan las células en tampón de lisis (1 % NP-40, 200 mM TrisHCl pH:7,5, 25 mM NaCl, 20 mM EDTA, 4 mM PMSF, 4  $\mu$ g/ml leupeptina, 1  $\mu$ g/ml pepstatina A, 50  $\mu$ g/ml antipaina. Tras esa incubación, la fracción insoluble se precipitó por centrifugación (16000 g / 15 min / 4 °C). Se hicieron alícuotas del sobrenadante y se congelaron a -80 °C.

## **2.16 Preparación de extractos celulares totales a partir de tejidos y líneas celulares**

Los tejidos extraídos del modelo murino deficiente en Pol $\lambda$ , así como los tejidos control obtenidos de la cepa silvestre, fueron homogeneizados en tampón PBS (20 mM fosfato de sodio pH 7.5, 150 mM NaCl) hasta obtener una suspensión celular homogénea. El sedimento tras la centrifugación del homogenado fue resuspendido (10<sup>6</sup> células / 20  $\mu$ l) en Tampón I (10 mM Tris-HCl pH 7.8 y 200 mM KCl). Tras la adición de un volumen equivalente de Tampón II (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 200 mM KCl, 2 mM EDTA, 40% glicerol, 0.2% Nonidet P-40, 2 mM DTT e inhibidores de proteasas (Roche)), la suspensión celular se incubó a 4 °C durante una hora en rotación. Tras esa incubación, la fracción insoluble se precipitó por centrifugación (16000 g / 10 min / 4 °C). Se hicieron alícuotas del sobrenadante y se congelaron a -80 °C. Protocolo adaptado de Biade y cols., 1998.

## **2.17 Inmunodetección de proteínas en membrana (Western Blot)**

El *Western blot* de los extractos celulares se realizó como se describe en (Gonzalez-Aseguinolaza y cols., 1997). Tras separar las proteínas en geles SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) que se humedeció previamente en metanol para su activación. Para la transferencia se utilizó el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad en tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 19 mM y metanol 20%, aplicando durante 90 min una corriente de 250 mA.

La membrana se bloqueó en tampón de bloqueo (leche desnatada 5%, TrisHCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 1%) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo primario, una dilución 1:5000 en tampón de bloqueo de anticuerpo anti-LiPol $\beta$  (CIB, Madrid) o 1:5000 del anti-Pol $\lambda$  (García-Díaz y cols., 2000) o 1:5000 anti-actina AC-40 (Sigma), durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween 0.5% y se incubó con el anticuerpo secundario con actividad peroxidasa, una dilución 1:5000 en PBS-Tween de anticuerpo oveja anti-ratón (Amershan Life Science), durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.5%. La membrana se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL (Amershan Life Science).

## **2.18 Determinación de repeticiones CAG**

El número de repeticiones CAG fue determinado tal y como describen Mangiarini y cols. (1997) utilizando 8 ng/ $\mu$ l del oligonucleótido marcado con fluoresceína (FAM) S 5'ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC3' y del AS 5'GGCGGCTGAGGAAGCTGAGGA3'. La amplificación se realizó en 67 mM TrisHCl pH 8.8, 16,6 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.17 mg/ml de BSA (New England Biolabs), 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma), 10 % DMSO (Sigma), 200  $\mu$ M dNTPs y 0.5 u/ $\mu$ l Taq polimerasa (Promega). Las condiciones fueron: 90 s a 94°, 25 ciclos (30 s 94°, 30 s 65°, 90 s 72°) y 10 min 72°. Los productos resultantes se visualizaron en un gel 6% acrilamida-bisacrilamida. La amplificación fue analizada mediante un secuenciador ABI 377.

### 2.19 Reacción en cadena de Polimerasa (PCR)-Polimorfismo conformacional de banda sencilla (SSCP)

Para analizar posibles alteraciones genéticas del gen de Pol $\lambda$  se utilizó una colección de cDNAs de tejido normal y tumoral (Clontech) sobre la que se realizó la amplificación completa de distintos fragmentos del gen. Los oligonucleótidos utilizados fueron: hPol $\lambda$ ex1s: 5'TAGCTTGGCCAGTAGTCGACC; hPol $\lambda$ ex3as: 5'GAAGGGAGCTCAGCCACTC; hPol $\lambda$ ex2s: 5'ATACTTCAATGGATCCCAGGG; hPol $\lambda$ ex4as: TTGGGTGTTTGGTGCCCTC; hPol $\lambda$ ex4s: 5'GAGGCACCAAACACCCAA; hPol $\lambda$ ex5as: 5'TCCACTTGTCTCCCTGAACAC; hPol $\lambda$ ex5s: 5'TCCATAAGCCTGTCACCTCG; hPol $\lambda$ ex7as: 5'GGGCATACGTTCCAGGAAG. Cada cDNA fue diluido 5 veces previamente a la PCR. Cada muestra se amplificó en 10  $\mu$ l finales con 1  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0,25 mM de dNTPs, 10 mM Tris pH 8,5, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, gelatina, 0,2 mg/ml Seroalbúmina bobina (BSA) y 0,25 u de Taq polimerasa (Promega). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C, 15 s; 62°C, 30 s; 72°C, 15 s durante 35 ciclos. Los productos de la amplificación fueron sometidos a una electroforesis SSCP para analizar las posibles alteraciones tal y como se describe en (Tomka y cols., 1998).

Posteriormente se desarrolló una electroforesis en un gel de acrilamida (PAGE) no desnaturante al 8%. Las condiciones de electroforesis fueron a 20°C, con un voltaje de 30 mA en un tiempo de 14 a 16 h. Las bandas fueron reveladas con el método de tinción de plata. Se fijaron las bandas de DNA durante 15 min con 10 % Etanol, posteriormente se tiñeron 10 min con 1% HNO<sub>3</sub> y 30 min 0,2 % AgNO<sub>3</sub> en 1  $\mu$ l /1 ml formaldehído y revelado con 3,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 0,5  $\mu$ l/ml de formaldehído hasta que las bandas aparecen. Por último se fija con 10% de Ácido acético y se fotografía.

Los fragmentos que experimentaron una movilidad alterada se clonaron en el vector TA-cloning pCRII (Invitrogen) y se secuenciaron en un secuenciador ABI 373 (Applied Biosystems).

### 2.20 Reacción en cadena de polimerasa-Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

Como muestra para la amplificación de la zona del gen donde se encuentra el polimorfismo se utilizaron en un primer análisis 40 muestras de individuos españoles con buena salud (entre 30-65 años de edad; 55% mujeres/45% hombres) que fueron generosamente cedidas por la Dr. María J. Bullido (CBMSO, Madrid). Se amplifican 20-50 ng de DNA con los oligonucleótidos localizados en el exón 7 de la Pol $\lambda$ , Ex7S1 (5'GGCATGTGGTTCATACCGAC3') y Ex7AS1 (5'ACCCAGAGATGGAGCTTA3') durante 35: 94°C, 15 s; 62°C, 20 s; 72°C, 25 s. El producto de PCR de 166 pb se dializan 1 h contra agua desionizada en membranas de filtro de 0,22  $\mu$ m (Millipore). Posteriormente las muestras se digieren con *HaeIII* a 37°C durante 2 h y se resuelven los productos de la digestión en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con Bromuro de Etidio. Dos fragmentos de 84 y 76 pb indican la presencia del alelo R438, mientras que un fragmento de 166 pb sin digerir indica la presencia del alelo W438. El cambio de C a T de la primera base del codón 438 rompe la diana *HaeIII*.

En un siguiente estudio se utilizaron una colección de muestras tumorales y controles de cancer colorectal de Bellvitge. Esta colección esta compuesta por muestras

de pacientes de nuevo diagnóstico de adenocarcinoma colorectal recogidos entre Enero de 1996 y Diciembre de 1998 en el Hospital Universitario de Barcelona.

Una descripción más detallada de esta colección se define en Landi y cols. 2003. Esta colección se compone de 356 casos de individuos que fueron entrevistados y aportaron muestras de calidad suficiente para el análisis genético. Un 2% de los elegidos fueron rechazados, mientras que un 14% no pudo ser entrevistado o bien por fallecimiento o bien por otros impedimentos como enfermedad mental. Finalmente, un 12% fue entrevistado pero no aportó muestras biológicas y un 4% (32 casos) del material biológico de la colección se agotó para este análisis. Los casos analizados se distribuyen en tres partes: recto, colon derecho y colon izquierdo y la distribución de estadio Duke es A (7%), B (38%), C (35%), y D (20%).

Existe un seguimiento clínico de todos los pacientes con una media de 72 meses. Los controles (n=297, 62,6% de los elegidos) fueron personas al azar elegidas de entre los pacientes admitidos en el mismo hospital durante el mismo periodo de tiempo. Un 7% de los elegidos, rechazaron participar en el estudio, mientras que un 5% no pudieron ser entrevistados por varios impedimentos, incluidos mentales. Finalmente un 18,6% fueron entrevistados pero no aportaron muestra de sangre y un 6,8% (21 casos) no quedó muestra biológica para este análisis.

Para evitar la elección sesgada de los casos, se siguió como criterio elegir el caso por padecer otra enfermedad, previamente no diagnosticada. Se rechazaron los casos que padecían una enfermedad crónica que repetidamente ingresaron en el hospital y tuvieron que cambiar sus hábitos por causa de esa enfermedad. Desde el punto de vista genético, los casos controles elegidos suponen una población conjunto heterogénea que engloba individuos españoles de diversas enfermedades. El Comité Ético del hospital estudió el protocolo y todos los dieron su consentimiento por escrito para participar y que el estudio se llevara a cabo con sus muestras.

En este segundo estudio se realizó la amplificación de la región que incluye el polimorfismo con los oligonucleótidos Ex7S2 (5'TCACCTGTACCGCTCTCT3') y Ex7AS2 (5'CAAGGAGGCGGCTGAAGATA3'). Las condiciones de PCR en este caso fueron 30 ciclos de 92°C, 45 s; 62°C, 45 s; 72°C, 1 min. El producto resultante de 177 pb presenta un control interno de corte con la enzima *HaeIII* fuera de la zona de corte del polimorfismo. El cambio de C a T de la primera base del codón 438 rompe la diana *HaeIII*. Después de la digestión con *HaeIII* 1 h a 37°C los productos de la digestión se corren en un gel de poliacrilamida al 12% y se tiñe con Bromuro de Etidio. Un fragmento de 97 pb indica la presencia del alelo R438, mientras que un fragmento de 134 pb indica la presencia del alelo W438. Como control de digestión se produce un fragmento de 43 pb en ambos alelos. Para una serie de muestras con baja calidad de DNA, se necesitó una primera ronda de amplificación con los oligonucleótidos F (5'GGGCTTGCAGCAGGCATCTG3') y R (5'GACTGGAACTTCCTGAGGTTC3') de 15 ciclos (92°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min 30 s) previa a la amplificación descrita anteriormente con los oligonucleótidos Ex7S2 y Ex7AS2.

### 2.21 Análisis estadístico de los resultados de detección del SNP (R/W)438.

Los datos analizados del polimorfismo (R/W)438 se testaron para ver si estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. La asociación entre el polimorfismo y el cáncer colorectal fue evaluada mediante modelos de regresión logística multivariable. Se calculó la razón de probabilidades (Odds ratio, OR) y el intervalo de confianza 95% (95% CI) comparando los genotipos WW y WR respecto a RR en un modelo de codominancia. Asimismo se analizó un modelo dominante, RW frente a WW. Todos los análisis se ajustaron por edad y sexo. Nuestro estudio se dividió en cuatro intervalos de edad: 23-58, 58-67, 67-74 y 74-92. Fueron equilibrados el número total de individuos en cada grupo y la razón entre casos y controles en cada intervalo de edad (**Tabla 2**).

Tabla 2. Población estudiada (casos y controles) agrupada según edad

Intervalo de edad	(23.0, 58.0)	(58.0, 67.0)	(67.0, 74.2)	(74.2, 92.0)
Total	151 (23%)	170 (26%)	131 (20%)	201 (31%)
Controles	76 (26%)	82 (28%)	47 (16%)	92 (31%)
Casos	75 (21%)	88 (25%)	84 (24%)	109 (31%)

### 2.22 Retrotranscripción in vitro (RT-PCR)

Para la extracción de RNA total de las muestras de tejidos se disgregó 50-100 mg de tejido en 1ml de Trizol (Invitrogen) en un homogenizador de vidrio (Kontes). A continuación se añadió 200  $\mu$ l de cloroformo y se prosigue con la extracción fenólica. Después de precipitar el RNA de la fase soluble se cuantifica por espectrofotómetro. A continuación, se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) acoplada a una reacción de retro-transcripción (RT-PCR) con 5  $\mu$ g de cada RNA. En un primer paso se digiere el DNA genómico durante 40 min a 37°C con 1 u de DNAsa RQ (Promega) en tampón de reacción (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0,2 u/ $\mu$ l de Inhibidor de RNAsas (Promega). Posteriormente se precipita el RNA con 300 mM de Acetato sódico y 100% Etanol. Una vez resuspendido en tampón TE 1X (10 mM TrisHCl pH 7,5, 1 mM EDTA) se hace la retrotranscripción con 200u de retrotranscriptasa 1<sup>st</sup> strand (GIBCO), 25 ng/ $\mu$ l Oligonucleótido dT (16 mer), 10mM DTT, 0,5 mM dNTPs, 1 u/ $\mu$ l Inhibidor de RNAsa (Promega) durante 5 min a 70°C, 5 min a 4°C y 10 min a temperatura ambiente.

### 2.23 Análisis comparativo de secuencias

El análisis de secuencias se realizó mediante el uso de la aplicación BLAST (Altschul y cols., 1990). La secuencia codificante de la DNA polimerasa lambda humana se comparó con secuencias de este mismo gen de distintas bases de datos. Las diferentes secuencias encontradas se alinearon con el paquete informático Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>).



## 2.24 Clonaje y Mutagénesis dirigida

**Tabla 3. Oligonuclótidos utilizados en las diferentes estrategias de clonaje y mutagénesis dirigida empleadas en esta tesis doctoral.**

Nombre	Secuencia
5'POL <i>SphI</i>	5'GCGCGCATGCTCCGCCGGAAGTTC3'
3'POL <i>HindIII</i>	5'GCGCAAGCTTAAGGGTCGCGGTTCTC3'
Δ6S	5'CATAAGCCTGTCACCTCGTACCAGGGCTTCCGAAGTCTGGAAGACATC3'
Δ6AS	5'GATGTCTTCCAGACTTCGGAAGCCCTGGTACGAGGTGACAGGCTTATG3'
Δ67S	5'CATAAGCCTGTCACCTCGTACCAGGTCCAGAAAGCAGCCCAGGCCTTT3'
Δ67AS	5'AAAGGCCTGGGCTGCTTTCTGGACCTGGTACGAGGTGACAGGCTTATG3'
WS	5'CCCAGATGGCTGGTCCCACC3'
WAS	5'GGTGGGACCAGCCATCTGGG3'

### 2.24.1 Clonaje del cDNA de LiPolβ en el vector pQE32

La secuencia completa que codifica para LiPolβ (GenBank AF182167) se clonó por Taladriz y cols. (2001) en el vector pQE32 (Qiagen, Alemania) que permite la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a una secuencia de 6 Histidinas para su posterior purificación por columnas de afinidad con Ni<sup>2+</sup>. Los oligonucleótidos empleados fueron 5'POL*SphI* y 3'POL*HindIII* (Tabla 3). El producto final se transforma en la cepa de *E. coli* DH5α y se comprueba que no existan errores de secuencia por secuenciación. Posteriormente, se transforma la construcción en las diferentes bacterias de expresión de *E. coli*.

### 2.24.2 Construcción del vector de expresión en *E. coli* que contiene el cDNA de las variantes de splicing hPolλΔ6 y hPolλΔ67

La obtención de pRSETB-hPolλΔ6 y pRSETB-hPolλΔ67 se realizó mediante mutagénesis directa por recombinación homóloga (Malcom, 1999) sobre el plásmido pRSETB-hPolλ que contiene el cDNA completo que codifica la DNA polimerasa lambda humana (García-Díaz y cols., 2002). Este protocolo de PCR en dos pasos permite introducir deleciones de un modo muy eficiente (Malcom, 1999). En una 1ª ronda de amplificación de 10 ciclos (30 s, 95°C; 1 min, 55°C; 8 min, 68°C) se realiza una PCR con cada uno de los oligonucleótidos por separado (Δ6S y Δ6AS para la variante hPolλΔ6; Δ67S y Δ67AS para la variante hPolλΔ67; Tabla 3). Posteriormente, en la 2ª ronda de amplificación, se juntan en cantidades equimolares los productos de la 1ª ronda y se amplifica 15 ciclos más (1 min, 94°C; 30 s, 70°C; 12 min, 72°C). El producto final se transforma en la cepa de *E. coli* DH5α y se comprueba que no existan errores de secuencia por secuenciación. Posteriormente, se transforma las construcciones en las diferentes bacterias de expresión de *E. coli*.

### 2.24.3 Mutagénesis dirigida para la obtención de la construcción de hPolλW438-pRSETB.

Mediante mutagénesis dirigida sobre el vector de expresión en células procarióticas pRSETB que contenía el cDNA de la variante R438 de la DNA polimerasa lambda humana (hPolλ) se obtuvo la construcción con el cDNA de la

variante W438 para su posterior sobreexpresión en células de *E. coli*. Los oligonucleótidos empleados fueron WS y WAS (**Tabla 3**). El producto final se transforma en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se comprueba que no existan errores de secuencia por secuenciación. Posteriormente, se transforman las construcciones en las diferentes bacterias de expresión de *E. coli*.

### 2.24.4 Generación de construcciones para transfecciones en células de mamífero.

Los vectores hPol $\lambda$ R438-pIRES y hPol $\lambda$ W438-pIRES fueron construidos por PCR sobre los vectores pRSETB que contenían los cDNAs de cada una de las variantes. Los oligonucleótidos utilizados fueron un oligonucleótido hPol $\lambda$ *AgeI*ATGAS 5'CGCACCGGTACTTCAATGGATCCCAGGGGTATCTT3' que contiene la diana de restricción *AgeI* y el codon iniciador ATG; y hPol $\lambda$ *EcoRI*S: 5'CGGGAATTCACCAGTCCCGCTCAGCAGGTTCT3' que contiene la diana de restricción *EcoRI*. La PCR se realizó con la enzima *Pfu*. El producto de PCR se clonó en los sitios *AgeI* y *EcoRI* en el vector pIRES (Clontech).

## 2.25 Sobreexpresión y purificación de proteínas

### 2.25.1 DNA Polimerasa beta de *Leishmania infantum* (LiPol $\beta$ )

La sobre-expresión de LiPol $\beta$  se llevó a cabo en la cepa M15(pREP4) de *E. coli* (Qiagen, Alemania) en medio LB con Ampicilina 100  $\mu$ g/ml y Kanamicin 25  $\mu$ g/ml. La expresión se indujo con 0,1mM isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside (IPTG) durante 2h a 37°C. Pasado este tiempo las células se sedimentaron a 5000rpm durante 15 min. a 4°C. Se lisó el sedimento con 50 ml del tampón de lisis (1 M KCl, 60 mM imidazole-HCl pH 8.0, 1% Brij-58, 1 mM *p*-NH<sub>2</sub>-benzamidine, 10% glycerol) y posterior sonicación a 4°C. El extracto total obtenido se centrifugó a 17.500 rpm 30 min a 4°C separando la fracción soluble e insoluble. Los cuerpos de inclusión con LiPol $\beta$  agregada, se solubilizaron sonicando 1 min en 5 M Hidrocloruro de Guanidinio (HGu) y 20 mM Imidazol-HCl pH 8.0. La fracción soluble se separó por centrifugación a 15000 rpm, 15 min, 4°C y fue purificada gracias a una columna de Ni-IMAC a 4°C. Se equilibró una columna de Chelating Sepharose Fast-Flow de 10 ml con 100 ml de la solución A (5 M HGu, 20 mM Imidazole-HCl, 20 mM Hepes pH 8.0). La fracción soluble se pasó por la columna a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. Posteriormente se lavó con la solución A para posteriormente eluir la columna con un gradiente de 0 a 100% de la solución B (5 M HGu, 150 mM Imidazole-HCl pH 8.0) a 1.0 ml/min. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se determinaron las fracciones donde se encontró LiPol $\beta$ . El conjunto de las fracciones se diluyó a 0,1 mg/ml con 5 M HGu, 0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mM NH<sub>4</sub>-Ac pH 6.0, 1 mM ME, 1.2% CHAPS (Sigma) para su posterior renaturalización por diálisis a 4°C en 0.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>-Ac pH 6.0, 1 mM ME, 10% glicerol durante 24 h. Después de una centrifugación para la eliminación de precipitados durante la diálisis y posterior concentración en Amicon se determinó la concentración de LiPol $\beta$  a 0,8 mg/ml mediante medida de densidad óptica a 280 nm en 5 M HGu considerando el coeficiente de extinción molar de 17,760M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Para determinar la actividad específica de la fracción de LiPol $\beta$  se calculó a partir de la incorporación de dAMP de 31 fmolde dNMP incorporado min<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> mediante un ensayo de DNA polimerización en DNA activado como se describe posteriormente.



### 2.25.2 Variante de splicing de la DNA Polimerasa lambda humana (hPolλΔ6)

Para sobreexpresar la hPolλΔ6 se transformó el vector pRSETB-hPolλΔ6 en las cepas de expresión BL21-CodonPlus(DE3) y BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene), que contiene copias adicionales de los genes de tARN argU, ileY y leuW para facilitar la expresión en *E. coli* de proteínas eucarióticas. La sobreexpresión se hizo por dos métodos que permitieron obtener suficiente fracción soluble de la proteína para su posterior purificación.

En el primero de ellos se sobreexpresó la proteína en BL21-CodonPlus(DE3)-RIL en condiciones de mala aireación, es decir, se crecieron las células guardando la relación 1:1,25 (volumen cultivo: volumen matraz) a 20°C y baja agitación durante 10 h. Posteriormente, se recogieron las células, se pesaron y se congelaron a -80°C hasta la purificación.

El segundo método empleado fue la autoinducción que permite un crecimiento a altas densidades ópticas y una sobreexpresión de la proteína sin inducir con un plegamiento lento y por lo tanto posiblemente más correcto (Studier, 2005). Se realiza un preinoculo de las células BL21-CodonPlus (DE3) transformadas con el vector en 10 ml de LB con Ampicilina 100 μg/ml a 37°C durante 8 h. Se reinoculan a una dilución 10<sup>3</sup> del preinóculo en 100 ml de medio ZYP-5052 (10 g/l N-Z-amina AS, 5 g/l extracto de levadura, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01% Glicerol, 0,001% Glucosa, 0,004% α-lactosa, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en una proporción 1:25 (volumen de cultivo: volumen de matraz) y se mantiene el cultivo a 37°C, 8 h, a 300 rpm. Posteriormente, se recogieron las células, se pesaron y se congelaron a -80°C hasta su purificación.

Tras la lisis 50 mM, 1 M NaCl, 10 mM β-Mercaptoetanol y 15% de glicerol de las células inducidas por ambos procesos, en tampón fosfato, la fracción soluble de proteína se sometió a purificación mediante una columna de afinidad de Ni-NTA. La columna de Ni-NTA permitió obtener una fracción homogénea que se sometió a un gradiente de glicerol (15-30%) para eliminar el resto de contaminantes. Cada una de las fracciones obtenidas del gradiente se ensayó para diferentes actividades nucleolíticas. Y las fracciones limpias de estas actividades se reunieron en una mezcla homogénea que se cuantificó y fue reconocida específicamente por el anticuerpo anti-Polλ.

### 2.25.3 Variante polimórfica de la DNA Polimerasa lambda humana (hPolλW)

La sobreexpresión se llevó a cabo en la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL de *E. coli*. Las células transformadas con el plásmido de expresión se crecieron en medio LB a 28°C. La expresión de la Polλ se llevó a cabo induciendo un fermentador de 30 litros en fase de crecimiento exponencial con 1 mM IPTG. Tras 20 min de inducción, se añadió Rifampicina a una concentración de 120 mg/ml y se prosiguió con la incubación a 28°C durante dos horas. Posteriormente, se recogieron las células, se pesaron y se congelaron a -80°C.

Se lisaron 20 g empleando 5.5 veces su peso de alúmina (Sigma) y 1 volumen de tampón A (50 mM TrisHCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glicerol) con 1 M NaCl. El lisado se recogió con 4 volúmenes de tampón A con 1 M NaCl. Los restos celulares y la alúmina se sedimentaron por centrifugación (1.500 g durante 5 min), así

como el material insoluble (20.000 g durante 20 min). Se precipitó el DNA con 0.3% polietilenimina (PEI; conservada en solución al 10% en agua), y el complejo DNA-PEI se sedimentó por centrifugación (12.000 g durante 10 min). El sobrenadante se diluyó hasta una concentración de NaCl de 250 mM con tampón A, se precipitaron las proteínas con sulfato amónico al 65% de saturación para eliminar la PEI y se sedimentó este precipitado por centrifugación (20.000 g durante 20 min). El sedimento se resuspendió en 100 ml de tampón A con 50 mM NaCl y se cargó en una columna de fosfocelulosa de 3 ml, equilibrada previamente en el mismo tampón. Tras lavar exhaustivamente con tampón A con 100 mM NaCl, la Pol $\lambda$ W438 se eluyó con tampón A en presencia de 400 mM NaCl, como se determinó por análisis electroforético y tinción con azul de Coomassie. El eluido se diluyó a 100 mM de NaCl con tampón B (50 mM TrisHCl, pH 7.5; 10% glicerol) y se cargó en una segunda fosfocelulosa (1 ml) previamente equilibrada en tampón A con 100 mM NaCl. La proteína se eluyó con tampón NBB (20 mM tampón fosfato, pH 7.8; 500 mM NaCl; Invitrogen), y el eluido se cargó en una columna de Ni-NTA-agarosa (Invitrogen) equilibrada con tampón NBB. Tras varios pasos de lavado con tampón NBB conteniendo concentraciones crecientes de imidazol, la Pol $\lambda$ W438 se eluyó en presencia de 400 mM imidazol. Las fracciones en que eluyó la Pol $\lambda$ W438 se cargaron en una tercera fosfocelulosa (1 ml) y se eluyeron con tampón A con 500 mM NaCl. La fracción eluida fue sometida a un gradiente de glicerol tal y como se describe posteriormente. La concentración de proteína se estimó por densitometría de geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie, empleando patrones de concentración conocida. Para su conservación, se añadió glicerol (hasta el 50%) y BSA (a una concentración final de 0.1 mg/ml) a la fracción final y se congeló a -80°C.

### 2.26 Sedimentación en gradientes de glicerol

La fracción purificada de LiPol $\beta$  y hPol $\lambda$ W se sometió a una sedimentación en un gradiente de glicerol del 15 al 30%. Se generó un gradiente de glicerol de 5 ml en un tampón que contenía 20 mM TrisHCl (pH 7.5), 0.2 M NaCl, 1 mM DTT y 1 mM EDTA. Sobre este gradiente se añadieron 100 mg de proteína, y se centrifugó a 62.000 rpm (en un rotor Beckman SW.50) durante 26 h a 4°C. Se recogieron fracciones individuales de 200  $\mu$ l desde la parte superior del tubo, que se examinaron en geles de poliacrilamida-SDS y se analizaron en un ensayo de actividad DNA polimerasa en DNA activado. Como marcadores de sedimentación se sometieron a un gradiente de glicerol en las mismas condiciones que la fracción purificada de LiPol $\beta$ , un conjunto de proteínas de diferente peso molecular: 50  $\mu$ g de lisozima (14 kDa), el core $\beta$  de Pol $\lambda$  (39 kDa) y BSA (66 kDa).

En el caso de hPol $\lambda$ W se ensayaron las fracciones en cuanto a actividad nucleasa de DNA para descartar posibles contaminantes. Las fracciones libres de contaminantes se reunieron y cuantificaron antes de ser guardadas a -80°C.

### 2.27 Ensayo de relleno del *gap* de 5 nucleótidos. Estudio de fidelidad de síntesis.

Las reacciones (20  $\mu$ l) se llevaron a cabo en 50 mM TrisHCl (pH 8,5), 1 mM DTT, 4% glicerol, 2  $\mu$ g de BSA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,6 nM de DNA, 500  $\mu$ M de cada uno de los dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 400 U de Ligasa de T4 y 100 nM de cada

una de las enzimas (R438 y W438). Las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 h y se detuvieron con 10 mM MgCl<sub>2</sub>, tras lo que se purificó el producto ligado de un gel de agarosa por electroelución. Se electroporó en la cepa MC1061 de *E. coli* y se plaqueó en placas de medio mínimo junto con células CSH50 de *E. coli*. Tras incubar las placas o/n se analizaron los fenotipos de las placas de lisis para identificar las placas mutantes. Tras el análisis por secuenciación de una colección de mutantes, se calcularon las frecuencias de error para cada tipo de mutación observada. Para ello, se dividió el número de mutaciones concretas observadas, y se dividió por el número total de bases secuenciadas susceptibles de dar lugar a cada uno de los cambios concretos (Bebenek y Kunkel, 1995; Matsuda y cols., 2000).

### 2.28 Ensayos de DNA polimerización.

#### 2.28.1 Análisis *in situ* de actividad DNA polimerasa en el ciclo del parásito *L. infantum*.

El ensayo se llevó a cabo esencialmente como ha sido descrito en Karawya y cols., (1983). Los extractos totales de cada una de las fases del ciclo del parásito tanto extracelular promastigotes (logarítmica y estacionaria) como intracelular o amastigote, se sometieron a una electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS que contenía 1.5 mg/ml de DNA activado de timo de ternera (Pharmacia Biotech) como molde. Seguidamente, se incubó el gel en tampón de renaturalización (50 mM TrisHCl, pH 7.5, 6 mM (AcO)<sub>2</sub>Mg, 40 mM KCl, 16% glicerol, 0.01 mM EDTA, 1 mM DTT y 400 mg/ml BSA) durante tres horas a 4°C, para que tuviera lugar la renaturalización de las proteínas *in situ*. Tras la renaturalización, se incubó el gel en mezcla de reacción (tampón de renaturalización al que se añade 2 mM dNTPs y 1.2 nM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP) durante 12 h a 30°C. Tras lavar la radiactividad no incorporada y llevar a cabo una precipitación *in situ* con TCA al 5% y 1% pirofosfato sódico, se tiñó el gel con azul de Comassie para localizar la posición de las proteínas. Posteriormente, se secó el gel y las bandas de actividad se detectaron por autorradiografía.

#### 2.28.2 Ensayo de actividad en DNA activado.

El ensayo estándar (25  $\mu$ l) se llevó a cabo en presencia de 50 mM TrisHCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 13.3 nM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP para los ensayos con LiPol $\beta$  y hPol $\lambda$  $\Delta$ 6 y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dTTP para los ensayos con R438 y W438, 100 nM de cada (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) cuando se indica y conteniendo 625 ng de DNA activado de timo de ternera (Amersham Biosciences). En cada caso se indica el metal empleado en el ensayo. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de la fracción ó la DNA polimerasa indicada en cada caso. Tras la incubación de 10 min a 37°C, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 10 mM EDTA, y las muestras se filtraron por centrifugación a través de columnas de Sephadex G-50. La actividad DNA polimerasa es proporcional a la radiactividad presente en el volumen excluido, determinada por conteo de la radiación Cerenkov.

### 2.28.3 Análisis de fidelidad en moléculas que contienen un *gap* de un nucleótido con un grupo fosfato en 5'

El oligonucleótido SP1 (5'-GATCACAGTGAGTAC) se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (0.1  $\mu$ Ci) y T4 PNK (10 u). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con los siguientes oligonucleótidos T13N (5'AGAAGTGTATCTNGTACTCACTGTGATC), siendo N A,C,G ó T y Dg1P (5'AGATACACTTCT3' con un grupo -P en 5') en presencia de TrisHCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 20  $\mu$ l que contiene TrisHCl 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, las concentraciones indicadas de dNTPs, 4 nM del sustrato marcado en 5' y las cantidades indicadas de cada DNA polimerasa. Después de una incubación de 20 min a 37°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

### 2.28.4 Análisis de procesividad de hPol $\lambda$ W438

El oligonucleótido SP1 (5'GATCACAGTGAGTAC3') se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (0.1  $\mu$ Ci) y T4 PNK (10 u). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T18 (5'ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC3') en presencia de TrisHCl 50 mM pH 7.5 y NaCl 0.3 M.

La reacción de polimerización se realizó en una mezcla de incubación de 20  $\mu$ l que contiene TrisHCl 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 1 mM, glicerol 4%, BSA 0.1 mg/ml, 100  $\mu$ M de dNTPs, 4 nM del sustrato marcado en 5' y concentraciones de hPol $\lambda$  W438 decrecientes desde 150 hasta 15 nM. Después de una incubación de 30min a 37°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

### 2.28.5 Análisis de actividad en moléculas molde/iniciador, *gap* de uno y cinco nucleótidos

El oligonucleótido SP1 (5'GATCACAGTGAGTAC3') se marcó radioactivamente en su extremo 5' con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP (0.1  $\mu$ Ci) y T4 PNK (10 u). Tras una incubación a 37°C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90°C. Este oligonucleótido marcado se hibridó con los siguientes oligonucleótidos:

- T18 (5'ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC3') para formar un molde iniciador.
- T18 y Dg5OH (5'-AACGACGGCCAGT y Dg5P (Dg5 con un grupo fosfato en 5') para formar las moléculas *gap* de cinco nucleótidos con un grupo -OH o -P en 5'.

- T13T (5'AGAAGTGTATCTTGTACTCACTGTGATC3') y Dg1P (5'AGATACACTTCT3' con un grupo -P en 5') para formar un *gap* de 1 con un grupo -P en 5'.
- SP1c (5'GTACTCACTGTGATC3') para formar una molécula roma.

en presencia de 50 mM TrisHCl (pH 7.5) y 0.3 M NaCl. Las reacciones (20  $\mu$ l) se llevaron a cabo en 50 mM TrisHCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> o 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA y las concentraciones indicadas de cada DNA polimerasa indicadas en cada caso. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de uno o cada uno de los cuatro dNTPs, según se indique y se incubaron a 37°C por los tiempos indicados. Después de una incubación de 30 min a 37°C, se pararon las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0.1% y azul de bromofenol 0.1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

### 2.28. 6 Ensayos de retraso en gel. Análisis de la afinidad de LiPol $\beta$ por DNA

Las reacciones se llevaron a cabo en 12.5  $\mu$ l en presencia de 50 mM TrisHCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1% BSA, 4 nM del sustrato *gap* de un nucleótido marcado como se describe en ensayo de DNA polimerasa en sustratos definidos, y la concentración indicada de LiPol $\beta$  utilizada en cada caso (0.4-1.6  $\mu$ g). Tras una incubación de 10 min a 30°C, se añadió glicerol a las muestras hasta una concentración final del 10%, y a continuación se las sometió a una separación electroforética a 4°C en geles de poliacrilamida al 4%, en tampón de retraso (TAE 5X, 50 mM EDTA, pH 7.5) a 180 V durante 1 h y 30 min, y a 4°C. A continuación, el gel fue transferido a papel Whatman, secado y revelado mediante autorradiografía. Se analizó la unión LiPol $\beta$ :DNA densitometrando las bandas de retraso usando la aplicación informática Bio-Rad Quantity One.

### 2.29 Ensayos de Reparación por Escisión de base

#### 2.29.1 Ensayo de actividad deoxirribosafosfato liasa (dRP liasa)

E l o l i g o n u c l e ó t i d o P 6 - 1 , 5'CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTAC, con un uracilo en posición 16 se hibridó con un oligonucleótido complementario: T4, 5'GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG en presencia de 50 mM TrisHCl pH 7.5 y 300 mM NaCl. E híbrido P6-1/T4 se marcó en el extremo 3' empleando Klenow (2 u) y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (0,5  $\mu$ Ci). Este sustrato (500 nM) se incubó con hUDG (100 nM) a 37°C durante 20 min en 20  $\mu$ l de tampón compuesto de 50 mM Hepes (pH 7.5), 20 mM KCl y 2 mM DTT para eliminar el uracilo. Tras la incubación, se añadió MgCl<sub>2</sub> a una concentración final de 10 mM y 40 nM hAPE, para generar el sustrato de la actividad dRP liasa.

Las reacciones (10  $\mu$ l) contuvieron 50 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 2 mM DTT y 30 nM del sustrato descrito anteriormente. Las reacciones se iniciaron con la adición de las cantidades indicadas de cada DNA polimerasa y se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados. Tras la incubación, se añadió NaBH<sub>4</sub> a una concentración final de 340 mM y las reacciones se mantuvieron en hielo durante 20 min. Los productos estabilizados (reducidos) se precipitaron en presencia de etanol y 0.1  $\mu$ g/ml de tRNA, se resuspendieron en agua y se analizaron por electroforesis en un

gel de poliacrilamida al 16% en presencia de 8 M urea. Los productos se visualizaron autorradiografía.

### 2.29.2 Ensayo de reducción con $\text{NaBH}_4$ de los complejos covalentes LiPol $\beta$ /DNA.

Las reacciones (10  $\mu\text{l}$ ) contuvieron 50 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM KCl, 2 mM DTT y 100 nM del sustrato marcado empleado para los ensayos de dRP liasa. Las reacciones se iniciaron añadiendo la cantidad indicada de LiPol $\beta$  (0.8-3.2  $\mu\text{g}$ ) y 20 mM  $\text{NaBH}_4$  o 20 mM NaCl. Tras 30 min en hielo, las reacciones se resolvieron en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% y los complejos polimerasa/DNA se visualizaron empleando un Phosphorimager Storm 860.

### 2.29.3 Reconstitución *in vitro* de la vía de Reparación por Escisión de Base (BER)

Se emplearon los híbridos dG:dC, 8oxoG:dC, 8oxoG:dA, dU:dA, dU:dG, 5FU:dA, 5FU:dG como sustrato, en cada ensayo se indica el sustrato empleado. Las reacciones (25  $\mu\text{l}$ ), se llevaron a cabo en presencia de 250 nM sustrato, 50 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM ATP, 10 nM hUDG, 40 nM hAPE, 200 nM hLigasa I, cuando se indica, y 0.1 mM [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP. Las reacciones se iniciaron añadiendo la cantidad indicada de cada DNA polimerasa ó del extracto total empleado y se incubaron 20 min a 37°C. Las reacciones se detuvieron añadiendo tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA, 0,1% xilencianol, 0,1% azul de bromofenol) y se analizaron en un gel de poliacrilamida 8 M urea al 20 %, y se visualizaron por autorradiografía.

### 2.29.5 Estudio de la capacidad de inserción frente a bases modificadas 8oxoG y 6mG y extensión desde pares cuya base molde está modificada.

Los iniciadores Pber (5'CTGCAGCTGATGCGC3') y PberX (5'CTGCAGCTGATGCGCX 3', siendo X: A, C o T) fueron marcados radiactivamente en sus extremos 5' con [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (0.1  $\mu\text{Ci}$ ) y T4 PNK (10 u). La reacción de marcaje fue llevada a cabo a 37°C durante 45 min. Tras esa incubación, se produjo la inactivación de la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90 °C. Los oligonucleótidos marcados se hibridaron con el oligonucleótido T4X (5'GTACCCGGGATCCGTACXGCGCATCAGCTGCAG3', siendo X G, 8oxoG o 6mG) y cuando corresponda, el oligonucleótido *downstream* D8-P (5'GTACGGATCCCCGGGTAC3', con un grupo -P en 5') en presencia de 50 mM TrisHCl pH 7.5 y 0.3 M NaCl. Las reacciones (20  $\mu\text{l}$ ) se llevaron a cabo en 50 mM TrisHCl pH 7.5, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 5 nM DNA, la cantidad indicada de cada dNTP y 100 nM de cada una de las variantes de Pol $\lambda$  R438 y W438. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de cada dNTP y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras la incubación, las reacciones se detuvieron añadiendo tampón de carga (10 mM EDTA, 95% formamida, 0.1% xilencianol, 0.1% azul de bromofenol). Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes (20% poliacrilamida, 8 M urea) y autorradiografía.



### **2.29.6 Estudio de la capacidad de inserción frente a bases modificadas 5FU y extensión desde pares cuya base molde está modificada.**

Los iniciadores pFU (5'GTACCCGGGGATCCGTAC3') y pFUX (5'GTACCCGGGGATCCGTACX 3', siendo X: A o G) fueron marcados radiactivamente en sus extremos 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (0,1  $\mu$ Ci) y T4 PNK (10 u). La reacción de marcaje fue llevada a cabo a 37 °C durante 45 min. Tras esa incubación, se produjo la inactivación de la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90 °C. Los oligonucleótidos marcados se hibridaron con el oligonucleótido P6 (5'GTACCCGGGGATCCGTACXGCGCATCAGCTGCAG3', siendo X=T, U ó 5FU y cuando corresponda, el oligonucleótido *downstream* D5FU-P (5'GCGCATCAGCTGCAG3', con un grupo -P en 5') en presencia de 50 mM TrisHCl pH 7.5 y 0.3 M NaCl. Las reacciones (20  $\mu$ l) se llevaron a cabo en 50 mM TrisHCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 5 nM DNA, la cantidad indicada de cada dNTP y la cantidad indicada de cada una de las DNA polimerasas. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del dNTP indicado y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras la incubación, las reacciones se detuvieron añadiendo tampón de carga (10 mM EDTA, 95% formamida, 0.1% xilencianol, 0.1% azul de bromofenol). Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes (20% poliacrilamida, 8 M urea) y autorradiografía.

### **2.29.7 Estudio de la capacidad de inserción de 5FdUTP, 5FUTP y AraCTP**

El iniciador Pber (5'CTGCAGCTGATGCGC3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (0.1  $\mu$ Ci) y T4 PNK (10 unidades). La reacción de marcaje fue llevada a cabo a 37 °C durante 45 min. Tras esa incubación, se produjo la inactivación de la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 90 °C. Los oligonucleótidos marcados se hibridaron con el oligonucleótido T4X (5'GTACCCGGGGATCCGTACXGCGCATCAGCTGCAG3', siendo X=A y G y cuando corresponda, el oligonucleótido *downstream* D8-P (5'GTACGGATCCCCGGGTAC3', con un grupo -P en 5') en presencia de 50 mM TrisHCl pH 7.5 y 0.3 M NaCl. Las reacciones (20  $\mu$ l) se llevaron a cabo en 50 mM TrisHCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 5 nM DNA, la cantidad indicada de cada dNTP y de cada una de las DNA polimerasas. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del dNTP indicado y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras la incubación, las reacciones se detuvieron añadiendo tampón de carga (10 mM EDTA, 95% formamida, 0.1% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol). Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes (20% poliacrilamida, 8 M urea) y autorradiografía.

### **2.29.8 Estudio de capacidad de reparación de extractos totales de proteínas con molde marcado**

El ensayo consiste en suministrar a los extractos totales de proteína (10  $\mu$ g) un híbrido de cadena doble de DNA (34-mer) marcado radiactivamente con el isótopo <sup>32</sup>P en el extremo 5' de cada una de las cadenas (se indica con un asterisco la cadena marcada). De esta forma se puede visualizar lo que está ocurriendo en ambas cadenas del sustrato. La lesión se encuentra en posición no simétrica de los extremos por lo que mediante el tamaño de los productos se puede distinguir en que cadena esta ocurriendo. Los híbridos analizados se indican en cada caso.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

Las reacciones (20  $\mu$ l) se llevaron a cabo en 50 mM TrisHCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 5 nM DNA y 100 $\mu$ M del ddNTP indicado en cada caso. Las reacciones se iniciaron mediante la adición del dNTP indicado y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras la incubación, las reacciones se detuvieron añadiendo tampón de carga (10 mM EDTA, 95% formamida, 0.1% xilencianol, 0.1% azul de bromofenol). Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes (20% poliacrilamida-8 M urea) y autorradiografía.



# ***RESULTADOS***



***1***

**Caracterización Bioquímica de la DNA  
Polimerasa  $\beta$  de *Leishmania Infantum***

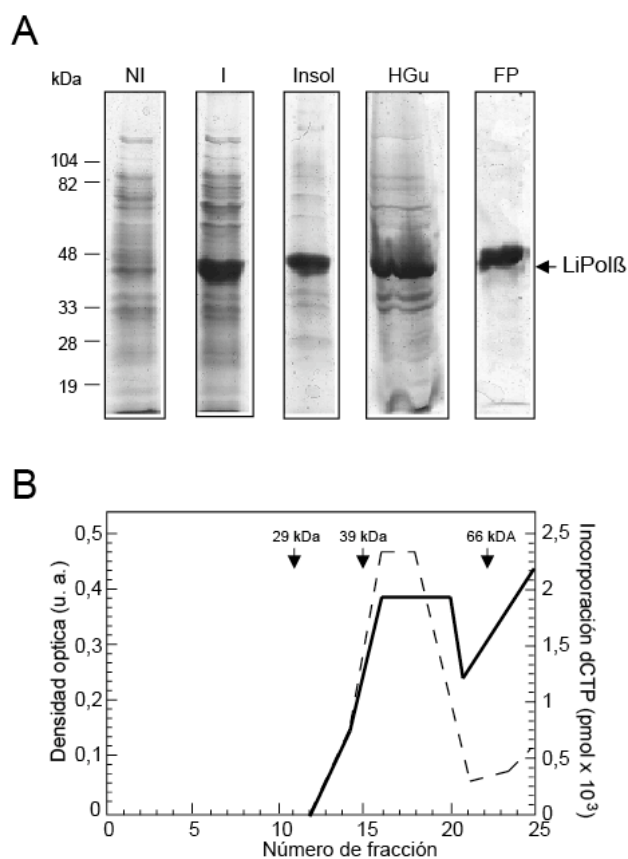


En el laboratorio del Dr. Luis Blanco estamos interesados en el estudio de las DNA polimerasas de la familia X de diferentes organismos. Las DNA Polimerasas de esta familia están presentes en los tres taxones monofiléticos: *Eucarya*, *Bacteria* y *Archaea*. En mamíferos existen cuatro proteínas diferentes de esta familia como ya se ha descrito anteriormente: Pol $\beta$ , Pol $\lambda$ , Pol $\mu$  y TdT. Sin embargo, en otros organismos no existe esta redundancia de polimerasas de la Familia X. Existen dos organismos modelo que no poseen ninguna de estas DNA polimerasas como *Caenorhaditis elegans* y *Drosophila melanogaster*. Otros organismos como el virus VPPA, bacterias (*Bacillus subtilis*) o levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) presentan una única polimerasa de la Familia X (Oliveros y cols., 1997; Wilson y cols., 1999; Gónzalez-Barrera y cols. 2005). Este es el caso a su vez de protozoos como *Crithidia fasciculata* (Torri y cols., 1994; Torri y cols., 1995) o *Leishmania infantum* (Taladriz y cols., 2001).

*Leishmania infantum* es un parásito de la especie humana, que parásito se transmite por la picadura de un mosquito y es el responsable de numerosas enfermedades endémicas en América, India, África del Sur y el área mediterránea. El género *Leishmania* se encuentra entre los más primitivos dentro de los organismos eucariotas. Pertenece al orden *Kinetoplastida*, característicos por poseer una única mitocondria denominada Kinetoplástido (Donelson y cols., 1999) localizada en la base del flagelo y responsable de ciertas funciones durante la transcripción del DNA celular. En colaboración con el grupo del Dr. Vicente Larraga (CIB, Madrid) se identificó una secuencia del genoma de *Leishmania infantum* (AF182167) que podía corresponder a la DNA Polimerasa de la familia X (Taladriz y cols., 2001). Esta proteína, denominada LiPol $\beta$ , presenta una localización nuclear en contraste con la localización mitocondrial de su homólogo en *Crithidia fasciculata*. Mediante alineamiento de secuencias se pudo identificar como una DNA polimerasa de la familia X pues conserva un core catalítico tipo  $\beta$  (dedos, palma, pulgar y dominio 8kDa) donde residen la mayoría de los residuos críticos para la actividad de polimerización, la unión a DNA y a nucleótidos, y para la eliminación de residuos desoxiribosa-fosfato (dRP-liasa) propios de esta familia de DNA polimerasas. LiPol $\beta$  presenta una expresión diferenciada en las distintas fases del ciclo infectivo del parásito en contraste con la expresión basal de su homólogo en humanos (Taladriz y cols., 2001).

## 1.1 Actividad DNA polimerasa asociada a LiPol $\beta$

Para la caracterización de la DNA polimerasa  $\beta$  de *L. infantum* (LiPol $\beta$ ), se clonó el cDNA correspondiente fusionado a una cola de seis histidinas en el vector pQE32 que permitió su expresión en células de *E. coli* y su posterior purificación tal y como se describe en Materiales y Métodos. Como se aprecia en la **figura 7A**, la inducción produjo un polipéptido del peso esperado para la fusión de LiPol $\beta$  con la cola de seis histidinas de 43 kDa.



**Figura 7. Sobreexpresión y purificación de LiPolβ en *E. coli*.** (A) Tinción azul de Coomassie tras la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de los diferentes extractos de células de *E. coli* transformadas con el plásmido recombinante pQE32 (Qiagen) no inducido control (NI) e inducido con IPTG (I), además de varios pasos sucesivos de purificación de la fracción insoluble (Insol) agregada en cuerpos de inclusión. LiPolβ (43 kDa/376 aminoácidos) fue resolubilizada con HGu y purificada en columnas de Ni<sup>2+</sup>-IMAC como se describe en Materiales y Métodos. En el carril FP se muestra la proteína purificada y resolubilizada. (B) Sedimentación de LiPolβ en gradiente de glicerol (15–30%). Las fracciones se numeraron de la 1 (parte superior del gradiente) a la 25 (parte inferior del gradiente). En línea discontinua se muestra la actividad de LiPolβ que cosedimenta con las fracciones de la proteína de peso esperado 43kDa (línea continua). Como controles de peso molecular se llevaron diferentes marcadores que se sometieron a las mismas condiciones de centrifugación que la muestra. Se ensayó la actividad DNA polimerasa de todas las fracciones con DNA activado como sustrato y se expresó como incorporación de dCMP en pmol. La cuantificación de la banda que corresponde a LiPolβ se llevó a cabo densitometrando la tinción del gel en el que se separan electroforéticamente las diferentes fracciones del gradiente (unidades arbitrarias [u.a.] de densidad óptica).

La fracción purificada presentó una actividad polimerasa significativa cuando fue ensayada sobre DNA activado tal y como se describe en Materiales y Métodos. Bajo estas particulares condiciones se estimó una actividad específica de 32 fmol de nucleótido incorporado por minuto de reacción y  $\mu\text{g}$  de enzima.

Para poder demostrar que la actividad polimerasa encontrada en la fracción purificada pertenecía a LiPolβ, descartando la contaminación de otras posibles polimerasas, se sometió a la fracción purificada a una sedimentación en gradiente de

glicerol. Las fracciones recogidas fueron ensayadas individualmente sobre DNA activado. Como se aprecia en la **figura 7B** la actividad DNA polimerasa sedimenta a un peso molecular de 42,7 kDa correspondiente a la forma monomérica del polipéptido LiPolβ, identificado después del análisis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción por Azul de Coomassie de cada una de las fracciones recogidas después del gradiente. De acuerdo con el perfil de actividad, aparecieron agregados de LiPolβ de alto peso molecular que parecen ser inactivos.

Como se ha descrito anteriormente para otros miembros de la Familia X de DNA polimerasas (Beckman y cols., 1985), LiPolβ es capaz de polimerizar usando  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  como metal activador. Es más, el uso del  $Mn^{2+}$  como metal activador incrementa en gran medida la eficiencia de polimerización. Estos resultados ratifican la preferencia por  $Mn^{2+}$  de LiPolβ como se describió anteriormente en ensayos de actividad *in situ* (Taladriz y cols., 2001; Karawya y cols., 1983).

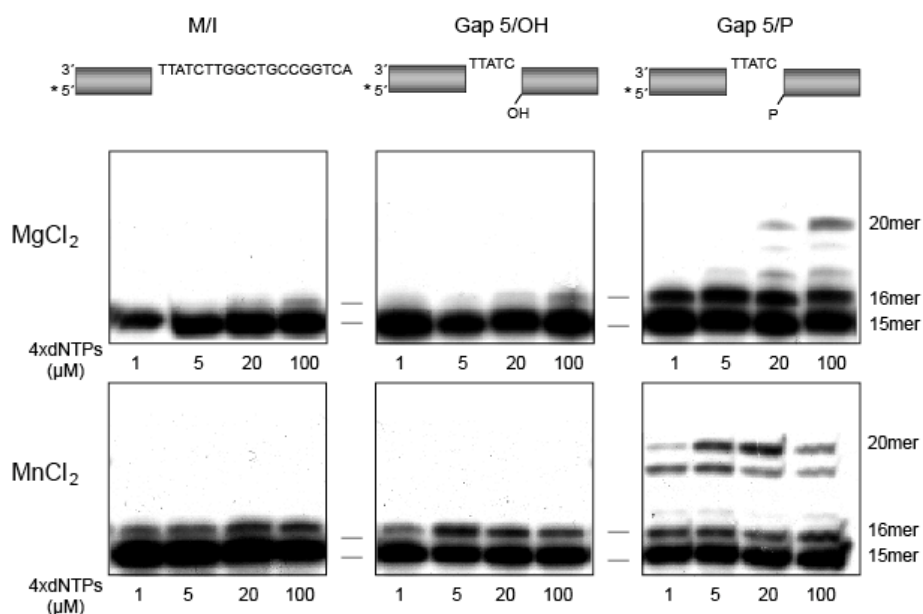
Por lo tanto, mientras no se indique lo contrario, la caracterización de LiPolβ fue realizada en presencia de manganeso como metal activador.

## 1.2 LiPolβ presenta una preferencia por moldes de tipo *gap* con un grupo -P en el extremo 5'.

Para evaluar la actividad de LiPolβ se utilizaron preferentemente moldes de DNA de banda doble del tipo molde/iniciador o *gap*. LiPolβ no presenta actividad sobre molde de cadena sencilla o moldes de cadena doble con extremos romos. Como se observa en la **figura 8**, LiPolβ presenta una actividad polimerasa poco eficiente sobre sustratos tanto de tipo molde/iniciador como sobre un *gap* con extremo 5'-OH, independientemente del metal activador empleado en la reacción. Sin embargo, se observa un incremento (5,3 veces para  $Mg^{2+}$  y 2,4 veces para  $Mn^{2+}$ ) en la eficiencia de reacción cuando un grupo 5'-P está presente en el sustrato tipo *gap*. Sobre este tipo de sustrato LiPolβ es capaz de insertar varios nucleótidos, llegando incluso a rellenar el *gap*, particularmente en presencia de  $Mn^{2+}$  como metal activador. Este comportamiento es similar al descrito para otros miembros de DNA polimerasas de la familia X como hPolβ y hPolλ en donde la presencia de un grupo -P en el extremo 5' del *gap* incrementa la procesividad durante el relleno del *gap*. (Prasad y cols., 1994; Garcia-Diaz y cols. 2002).

Por lo tanto, esta preferencia de LiPolβ la capacita para tener un papel en reparación de DNA como sus homólogas humanas.

Para analizar si LiPolβ es capaz de utilizar sustratos de reparación que requieren la adición de un solo nucleótido, se diseñaron moléculas tipo *gap* como se aprecia en la **figura 9A**. LiPolβ es capaz de polimerizar en este tipo de moléculas generando un producto de 16-mer, siendo más eficiente en presencia de un grupo -P en el extremo 5' del *gap*, al igual que ocurre en el *gap* de cinco nucleótidos. Asimismo, la presencia de  $Mn^{2+}$  como metal activador produce un incremento en la eficiencia de polimerización (**Fig. 9B**). La presencia del grupo -P en el extremo 5' produce un incremento de 1,38 y 5,40 veces en presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  respectivamente.



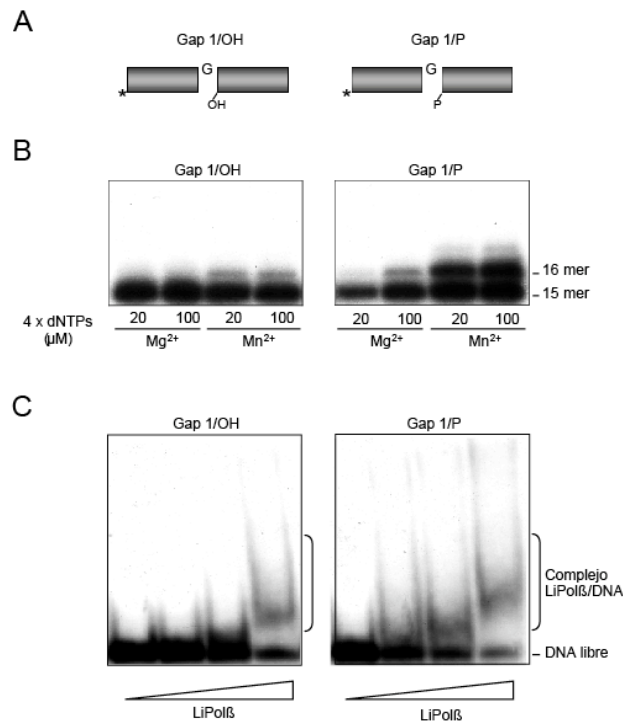
**Figura 8. Preferencia de sustrato de DNA de LiPolβ.** En la parte superior de la figura se muestran los diferentes sustratos empleados en el análisis: Molde/Iniciador (M/I), gap de cinco nucleótidos con un grupo -OH (*Gap-5/OH*) o un grupo -P (*Gap-5/P*) en su extremo 5'. Se incubó LiPolβ (0,3 μg) con diferentes concentraciones de dNTPs (1, 5, 20, 100 μM) como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 10 mM MgCl<sub>2</sub> o 1 mM MnCl<sub>2</sub>. Después de una incubación de 15 min a 37°C los productos de iniciador extendido fueron analizados por electroforesis en geles de Poliacrilamida al 20%, 8 M Urea y posterior visualización por autorradiografía.

### 1.3 LiPolβ es capaz de unirse al extremo 5' debido a un reconocimiento del grupo -P.

La procesividad es una característica propia de polimerasas de DNA, tales como las replicativas, implicadas en una síntesis extensiva de DNA gracias a una unión fuerte con el molde. Por el contrario, las polimerasas implicadas en reparación están diseñadas para la síntesis de fragmentos de menor longitud incorporando nucleótidos de una forma más lenta característica de una polimerización distributiva. La DNA hPolβ se une de forma inestable a moléculas del tipo molde/iniciador, pasando a un comportamiento más procesivo en el relleno de *gap* de pequeño tamaño (Pelletier y cols., 1996, Singhal y cols., 1993, Sawaya y cols., 1997).

Esta mejora en la unión está estructural y funcionalmente relacionada con el dominio N-terminal de 8-kDa, implicado en un fuerte contacto con el extremo 5'-P del *gap*. LiPolβ presenta al igual que su homólogo humano este dominio de 8-kDa. Para averiguar si la estimulación por el grupo -P venía determinada por una unión fuerte al DNA, paso previo a la unión al nucleótido entrante y a la catálisis, se realizaron ensayos de retardo en gel. Como se observa en la **figura 9C**, la formación de complejos LiPolβ/DNA se produce a concentraciones bajas de proteína cuando se trata de sustrato tipo *gap* con un grupo -P. Como valor medio de la estimulación en unión por la presencia de -P, se midió densitometrando la banda de retraso, dando como resultado una estimulación de 2,6 veces, tal y como se describe en Materiales y Métodos.



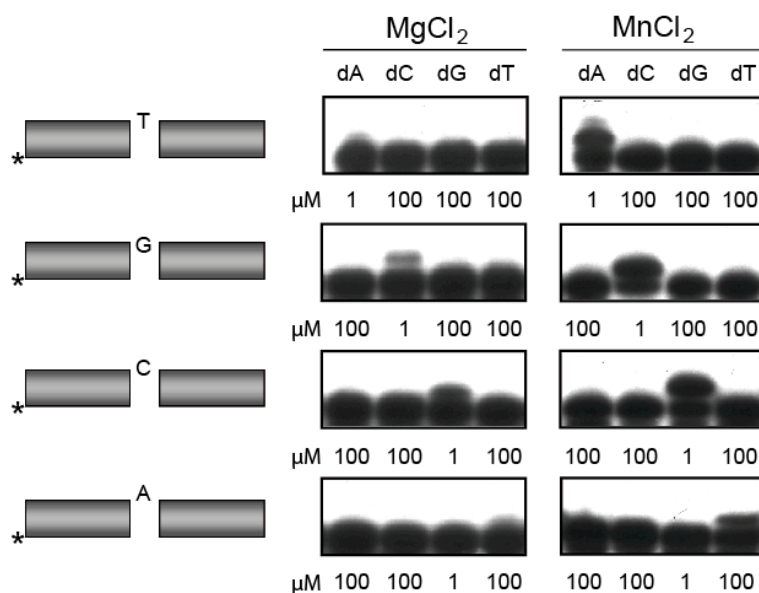


**Figura 9. Análisis de polimerización y unión en *gaps* de un nucleótido.** Los sustratos empleados se muestran en (A): *gap* de un nucleótido con un grupo -OH o un grupo -P en el extremo 5'. (B) Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 20 y 100  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  o 1mM  $\text{MnCl}_2$  como metal activador y 0,3  $\mu\text{g}$  de LiPol $\beta$ . Después de una incubación de 15 min a 37°C los productos de iniciador extendido fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 20%, 8 M Urea y posterior visualización por autorradiografía. (C) Análisis mediante ensayos de retraso en gel (ver Materiales y Métodos), de la capacidad de unión a los sustratos indicados en A. Los complejos LiPol $\beta$ /DNA son detectados como un retraso en la movilidad de la posición del sustrato marcado.

#### 1.4 LiPol $\beta$ incorpora preferentemente el nucleótido complementario a la base molde.

Como ensayo preliminar de fidelidad de síntesis de LiPol $\beta$ , se suministró por separado cada uno de los cuatro nucleótidos, a diferentes concentraciones, para cada uno de los cuatro sustratos distintos que aportan como molde cada una de las posibles bases, ya sea en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  (Fig. 10). En todos los casos, el iniciador solo es extendido por la base complementaria al molde y no así aun forzando 100 veces la concentración de los tres nucleótidos no complementarios. Sin embargo, bajo estas condiciones de ensayo no se puede estimar un valor de fidelidad. Aún así se puede estimar una eficiencia de inserción de T y A frente a sus complementarias menor que en el caso de las otras dos bases, C y G, frente a sus complementarias. Esta preferencia ocurre tanto en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  como de  $\text{Mn}^{2+}$  como metal activador. Se podría especular que LiPol $\beta$  al igual que su homólogo hPol $\beta$  preferentemente incorpore estas bases C y G, debido a su función en la reparación por escisión de base (BER) en deaminaciones de dC a dU y oxidaciones de dG muy frecuentes en el daño oxidativo. En cualquier caso estos resultados indican que LiPol $\beta$  es una DNA polimerasa,

dependiente de molde, que preferentemente inserta el deoxinucleótido correcto de acuerdo con los pares de bases de Watson y Crick.



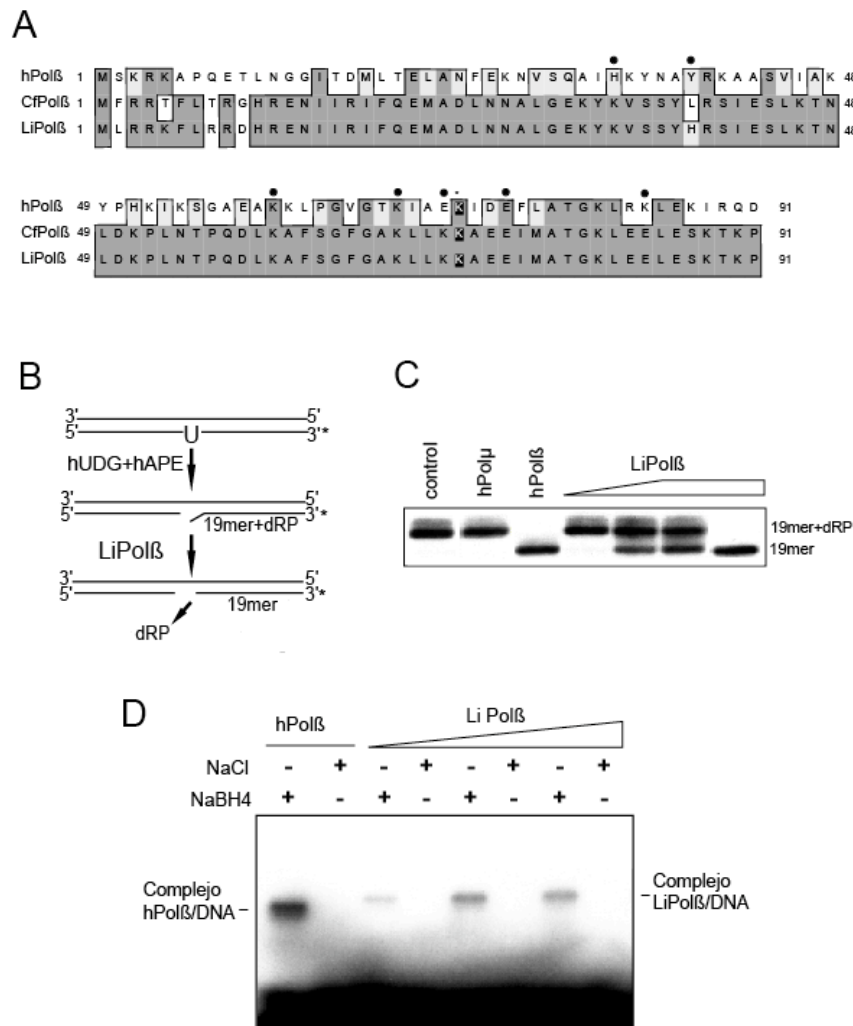
**Figura 10. LiPolβ es una DNA polimerasa dependiente de molde.** Las cuatro estructuras gap de un nucleótido utilizadas, que difieren únicamente en la primera base del molde, están esquematizadas en la parte izquierda. La inserción de nucleótidos en cada molécula de DNA marcada en el extremo 5' del iniciador en presencia de 10 mM MgCl<sub>2</sub> o 1 mM MnCl<sub>2</sub> se analizó añadiendo el nucleótido correcto (1 μM) y los incorrectos (100 μM) individualmente y 1,6 μg de LiPolβ, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Tras una incubación de 15 min a 37°C la extensión de la cadena marcada se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (20%)-urea (8M) y autorradiografía.

### 1.5 Actividad dRP liasa asociada a LiPolβ

El dominio de 8 kDa de hPolβ es responsable de la unión a DNA de cadena sencilla, del reconocimiento del extremo 5'-P y de la actividad dRP liasa (Beard y cols., 2000). Los residuos 1-91 de LiPolβ (**Fig. 11A**) alinean con los residuos de hPolβ que forman el dominio de 8 kDa. LiPolβ conserva la mayoría de los aminoácidos implicados en la catálisis de la actividad dRP liasa de hPolβ (Tyr<sup>39</sup>, Lys<sup>60</sup>, Lys<sup>68</sup>, Glu<sup>71</sup>, Lys<sup>72</sup> y Glu<sup>75</sup>) (Prasad y cols., 1998; Matsumoto y cols., 1998). En particular, la Lys72, que fue identificada como el nucleófilo en hPolβ responsable para la formación de la base de Schiff durante la β-eliminación del residuo dRP (Deterding y cols., 2000), está también presente en LiPolβ. Para investigar la posible presencia de una actividad dRP liasa en el dominio de 8 kDa de la LiPolβ, se empleó un sustrato de DNA de doble cadena de 34 pb que contenía un uracilo en posición 16. Como se describe en Materiales y Métodos, la cadena que contenía el uracilo se marcó en 3' utilizando [α-<sup>32</sup>P] ddATP (34 mer), se hibridó con su cadena complementaria, se trató con uracil DNA glicosilasa humana (hUDG) para eliminar la base del uracilo y, finalmente, con AP endonucleasa humana (hAPE1) para generar un sustrato dotado de un residuo dRP (19mer+dRP); (**Fig. 11A**). Como se puede observar en la parte C de la **figura 11**, cuando se incubaba este sustrato en presencia de LiPolβ, o hPolβ como control positivo, aparece un fragmento de menor

tamaño (19-mer) debido a la eliminación del residuo dRP por parte de LiPol $\beta$ . Como control negativo se llevó hPol $\mu$  que carece de los residuos implicados en esta eliminación (García-Díaz y cols., 2001).

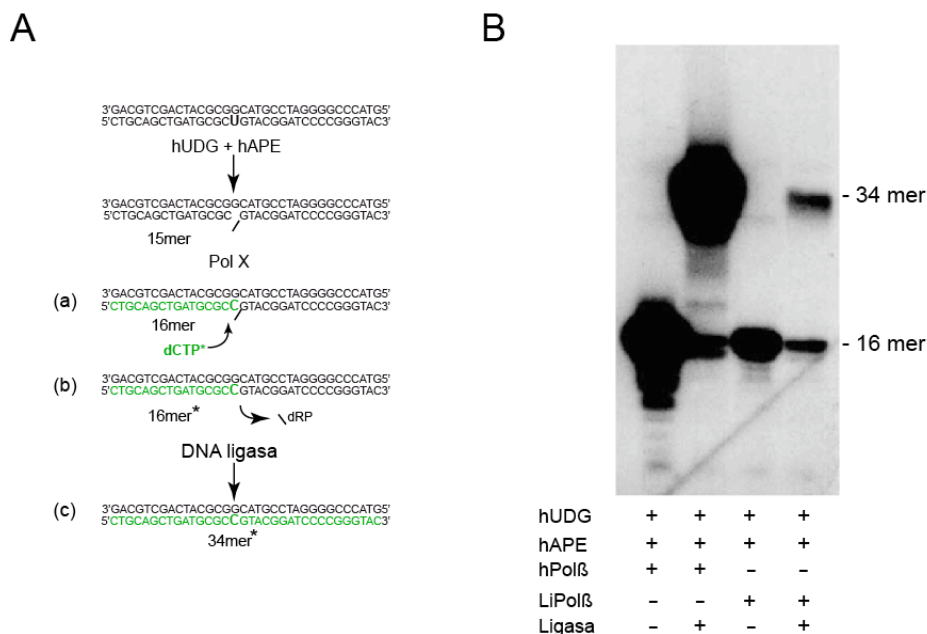
La actividad dRP liasa de hPol $\beta$  ocurre a través de un mecanismo de  $\beta$ -eliminación que implica la generación de un intermedio de base de Schiff (Bernad y cols., 1989). Para averiguar si en el caso de LiPol $\beta$  sucedía por un mecanismo similar, se utilizó borohidruro sódico, capaz de reducir el intermedio de base de Schiff para dar lugar a un complejo covalente proteína-DNA, detectable por autorradiografía tras la separación en un gel de poliacrilamida-SDS. Como puede verse en la parte D de la **figura 11**, en presencia de borohidruro sódico, se observa un solo fragmento de la longitud esperada y de movilidad inferior al DNA libre. La presencia de esta banda es dependiente de LiPol $\beta$  o hPol $\beta$  y borohidruro sódico. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la actividad dRP liasa de LiPol $\beta$  es llevada a cabo a través de un mecanismo de  $\beta$ -eliminación como sucede en el caso de su ortólogo humano y otras enzimas con actividad dRP liasa (Saxowsky y cols., 2002).



**Figura 11. LiPolβ presenta actividad desoxiribosa fosfato liasa.** (A) Alineamiento múltiple de la región N-terminal de la polimerasa β humana (hPolβ), y sus homólogos en *Crithidia fasciculata* (CfPolβ) y en *Leishmania infantum* (LiPolβ). Los residuos idénticos en LiPolβ están en cajas gris oscuro. Los cambios conservativos con respecto a LiPolβ se indican en cajas gris claro. La lisina en hPolβ responsable de actuar como base de Schiff durante la actividad dRP liasa se marca con un asterisco. Las lisinas equivalentes en las polimerasas alineadas se señalan en letra blanca con fondo negro. Otros residuos implicados en esta actividad se señalan con un punto. (B) Representación esquemática de la reacción dRP liasa. El esquema muestra un DNA de cadena doble que contiene un uracilo en la posición 16 de la cadena, todo ello marcado en el extremo 3' (\*). Después del tratamiento con UDG y hAPE, se obtiene un sustrato con un corte que contiene un residuo dRP (18-mer+dRP). (C) Como se muestra en la radiografía, el residuo dRP se puede eliminar por la acción de hPolβ (50 nM) (control positivo) y diferentes concentraciones de LiPolβ (0.08–0.8 μg) pero no por hPolμ (50 nM) (Control negativo). El producto de actividad dRP liasa (18-mer) se detecta después de una electroforesis desnaturante en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía. (D) Reducción de un complejo covalente entre LiPolβ y el DNA. Ensayo de reducción empleando borohidruro sódico (NaBH<sub>4</sub>). La reacción se lleva a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando hPolβ (20 nM) y diferentes concentraciones de LiPolβ (0.8–3.2 μg). Según se indica, se añadieron a las reacciones 20 mM NaBH<sub>4</sub> o NaCl, incubándose 30 min en hielo. Los complejos proteína-DNA se detectan por autorradiografía tras la separación en un gel de poliacrilamida-SDS.

## 1.6 Reconstitución *in vitro* de la reparación por escisión de base por LiPolβ

La eficiente polimerización de LiPolβ en moléculas *gap* de un solo nucleótido junto con su actividad intrínseca de eliminación de residuos dRP, sugieren que LiPolβ podría ser capaz de llevar a cabo la Reparación por Escisión de Base (BER) (**Fig. 6A**). Para comprobar si LiPolβ era capaz de participar en BER se utilizó el mismo sustrato que en caso de la actividad dRP liasa. Un DNA con un uracilo en posición 16 fue tratado con hUDG y hAPE para generar un sustrato en el que LiPolβ fue capaz de incorporar dCMP marcado radiactivamente y a su vez escindir el residuo dRP como puede observarse en la **figura 12B** al generarse un producto de 16 bases. La adición de ligasa origina un producto de 34 nucleótidos correspondiente la reparación completa del uracilo. Por lo tanto, como puede verse en la **figura 12**, LiPolβ es capaz de coordinar ambas actividades, inserción de dGTP y escisión del residuo dRP pasos que preceden a la acción de la ligasa, lo que sugiere un papel para LiPolβ en BER.



**Figura 12. Reconstitución *in vitro* de la reacción de BER de tramo corto con LiPolβ.** (A) Representación esquemática de la reacción. Se trata un oligonucleótido de cadena doble que contiene un uracilo en la posición 16 de la cadena con una DNA glicosilasa específica (UDG) que se encarga de eliminar la base dañada (uracilo). A continuación, una AP endonucleasa (hAPE) escinde el enlace fosfodiéster en 5' del sitio abásico, generando un residuo desoxirribosa fosfato (dRP). Posteriormente, una DNA polimerasa con actividad dRP liasa elimina el residuo dRP e inserta el nucleótido complementario a la base molde del hueco generado (dCTP frente a dG). Por último, una DNA ligasa restablece la unión entre ambos segmentos de DNA. (B) Al añadir en el sustrato tratado un nucleótido marcado ([ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP) y hPolβ (50 nM), o LiPolβ (50 nM), se obtienen dos productos marcados que pueden detectarse después de una electroforesis desnaturalizante (20% poliacrilamida, 8 M urea) y posterior autorradiografía: un producto de 16-mer originado por la adición de un único nucleótido en el 3' hidroxilo del sitio AP cortado en 5' y un producto de 34-mer que corresponde a la reparación completa de la cadena de DNA después de la acción de la ligasa.

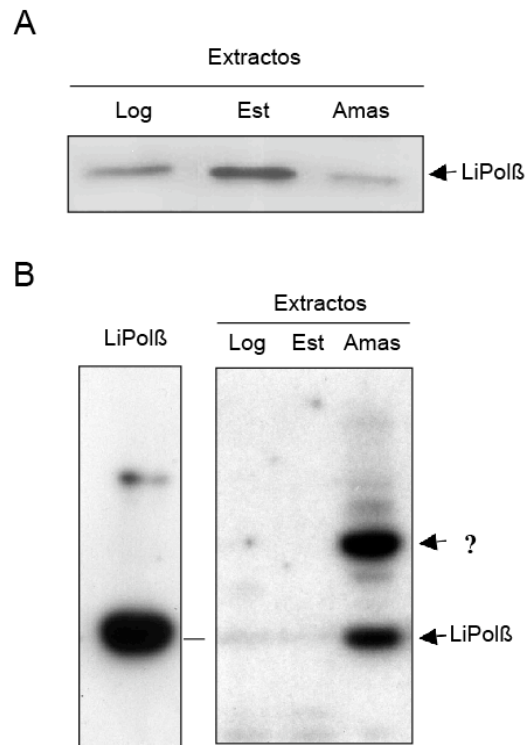
### 1.7 LiPol $\beta$ presenta un patrón de expresión diferente en cada etapa del ciclo infectivo de *Leishmania infantum*

Para evaluar si existen procesos de reparación específicos dentro de *L. infantum* en donde se requiera la actuación de LiPol $\beta$  analizamos el patrón de expresión de LiPol $\beta$  en las distintas fases del ciclo infectivo del parásito. El ciclo biológico de este parásito comprende esencialmente el paso alternativo de un hospedador vertebrado a otro invertebrado, y viceversa, con dos variantes morfológicas principales: la intracelular o amastigota en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado, y la forma extracelular o promastigota en el tracto intestinal del invertebrado.

Para realizar el análisis se obtuvieron extractos totales de proteína de las diferentes fases del ciclo infectivo y se examinó la expresión de LiPol $\beta$  por inmunodetección por anticuerpos en membrana o *Western Blot* tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Como se observa en la **figura 13A**, la expresión de LiPol $\beta$  fue mayor en la fase estacionaria de promastigote (Est) que en la fase atenuada logarítmica (Log) y en el amastigote (Amas). Sin embargo, la actividad de polimerización de LiPol $\beta$  de estos extractos, analizada *in situ* (ver Materiales y Métodos), alcanza su actividad máxima en la fase amastigote, siendo pobremente detectada a nivel de proteína (**Fig. 13B**). A su vez existe otra banda de actividad de menor peso molecular que podría corresponder a una versión modificada de la proteína no reconocida por el anticuerpo o bien a una DNA polimerasa replicativa necesaria para la replicación activa dentro del amastigote.

Como puede observarse con este resultado, la expresión de LiPol $\beta$  varía con el ciclo infectivo del parásito, siendo máxima en la fase intracelular amastigote. Esta fase intracelular reside dentro del fagolisosoma sufriendo el daño oxidativo generado por la propia defensa de la célula. Por lo tanto, la reparación del daño generado por la defensa de la célula hospedadora es esencial para la supervivencia del parásito. Por esta razón la máxima actividad de LiPol $\beta$  detectada dentro del macrófago es consistente con su papel en BER. Sin embargo, no se corresponde con la baja detección de cantidad de proteína, con máximos niveles en la fase estacionaria extracelular promastigote. Esto sugiere la existencia de una reserva de proteína previamente preparada para la protección posterior en la fase intracelular posterior. Sin embargo, una vez dentro de la célula, algún mecanismo regulatorio podría estar activando la enzima a través de un cambio de conformación que podría estar siendo disparado por un cambio brusco en el pH dentro del fagolisosoma.



**Figura 13. Expresión y actividad DNA polimerasa de LiPol $\beta$  en las diferentes fases del ciclo infectivo.** (A) Análisis por *Western Blot* (ver Materiales y Métodos) de los niveles de expresión de LiPol $\beta$  en las diferentes fases del ciclo infectivo del parásito, promastigote (logarítmica [Log] y estacionaria [Est]) y amastigote [Amas]. (B) Análisis de actividad DNA polimerasa *in situ* de los diferentes extractos de proteínas de las diferentes fases descritas en el apartado A. Proteína LiPol $\beta$  purificada fue llevada como control. La marca de interrogación indica la posición de una actividad DNA polimerasa que no se corresponde con el peso molecular de LiPol $\beta$ , sugiriendo la existencia de un enzima replicativo dentro de la fase amastigote.





# 2

*en la DNA Polimerasa  $\lambda$  Humana*  
*Dos Variantes de splicing*

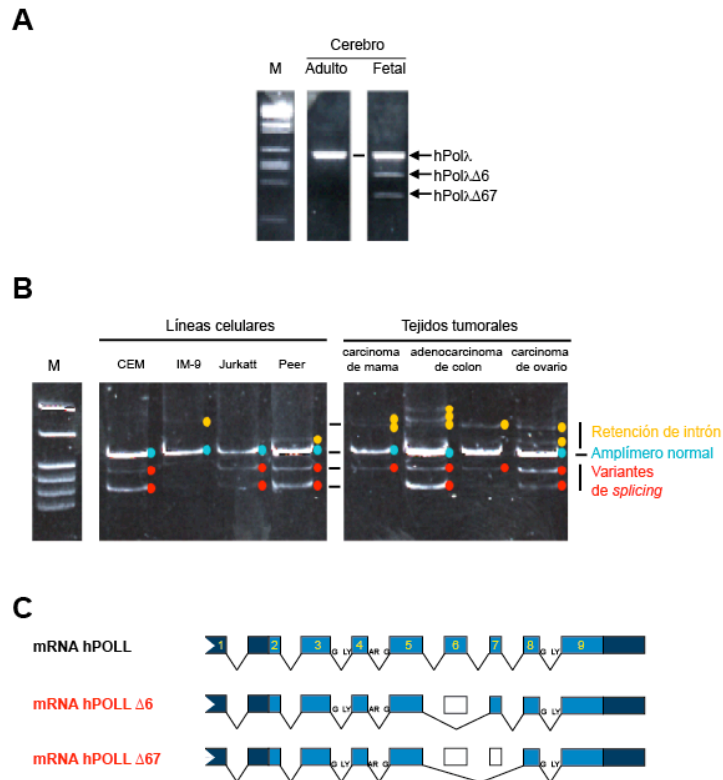


## 2.1. Identificación de variantes de splicing de la proteína Polλ humana

Para poder identificar distintas variantes de la DNA Polλ humana (hPolλ) se realizó un *blastn* con el cDNA del enzima frente al banco de datos de expresión “Expressed Sequence Tags (EST)”. Con las diferentes entradas encontradas se realizó un alineamiento gracias al programa *M u l t a l i n* (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). De la comparación de secuencias se identificaron varias entradas que representaban distintas deleciones en la secuencia de hPolλ. En concreto, la entrada del banco de datos de ESTs con número H11886 presentaba en su secuencia una deleción de los exones 6 y 7 que no alteraba la pauta de lectura del gen. Se podía definir, por tanto, como una variante de *splicing* no truncada. Esta entrada está descrita como un fragmento de cDNA de Polλ humana. La muestra procedía del cerebro de un paciente de corta edad que murió de cáncer cerebral.

En función de esta secuencia y para intentar identificar diferentes isoformas funcionales de Polλ se diseñaron parejas de oligonucleótidos en los exones 5 y 8 y se realizó un estudio de forma comparativa y semicuantitativa, mediante RT-PCR, en tejido adulto y fetal. Como puede observarse en la **figura 14A**, además del amplímero esperado para la secuencia completa de la hPolλ, se identificaron en la muestra fetal dos bandas de tamaño inferior. Estas bandas se purificaron mediante extracción en gel utilizando un Kit de Quiagen, y se secuenciaron. La secuenciación reveló que estas bandas representaban la deleción completa del exón 6 y del exón 6 y 7 (**Fig. 14C**).

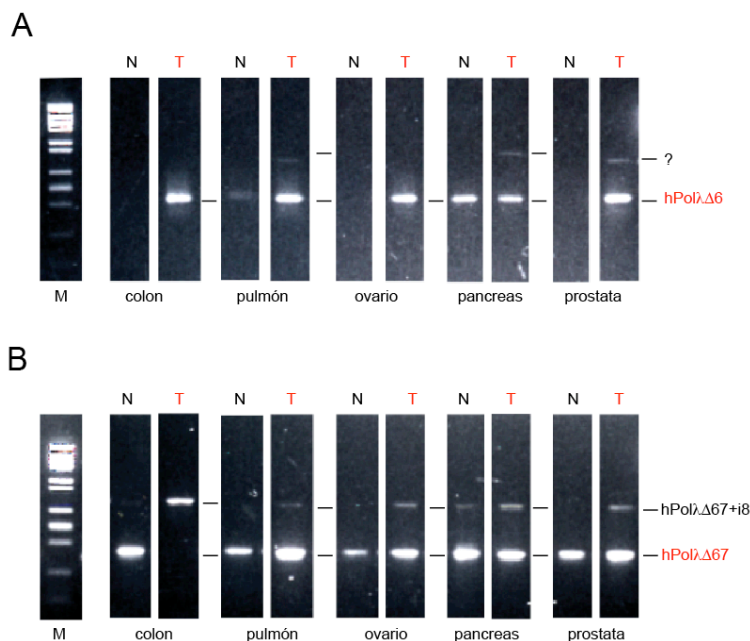
De igual manera se analizó la posible presencia de estas variantes de *splicing* en cDNA de diferentes líneas celulares y tejidos tumorales (Materiales y Métodos de la RT-PCR). Como se observa en la **figura 14B** nuevamente aparece el amplímero esperado correspondiente al tamaño de la hPolλ completa, pero a su vez aparecen en la mayoría de líneas celulares y en las muestras de tejidos tumorales bandas que se corresponden con los tamaños esperados para la deleción o bien del exón 6 o bien del exón 6 y 7 (**Fig. 14C**).



**Figura 14. Variantes de “splicing” identificadas en la Pol $\lambda$  humana**

Amplificación por RT-PCR de muestras de mRNA de tejido adulto y fetal humano (A) o procedente de diferentes tipos celulares y tejidos tumorales (B). (C) Representación esquemática de los diferentes exones de la hPol $\lambda$  y de las dos isoformas encontradas resultantes de un “splicing” alternativo.

Para analizar más concretamente la presencia de estas variantes se diseñaron parejas de oligonucleótidos con secuencia 5’**CCTCGTACCAGGGCTTCC**3’ y 5’GGAAGCCCTGGTACGAGG3’; 5’ **CACCTCGTACCAGGTCCAGA**3’ y 5’TCTGGACCTGGTACGAGGTG3’. En negrita se señala la zona que hibrida en la parte 5’ del exón 5 y en formato normal la parte 3’, en el exón 7 u 8 para las variantes hPol $\lambda$  $\Delta$ 6 y hPol $\lambda$  $\Delta$ 67 respectivamente. Se analizaron diferentes muestras de tejido normal y tumoral de diferentes pacientes. Como puede observarse en la figura 15A solo en muestras tumorales se observó un amplímero de un tamaño que correspondía a la omisión del exón 6, como luego se corroboró por secuenciación. En el caso de la 2ª pareja de oligonucleótidos, se observó un amplímero tanto en muestras normales como en la mayoría de las tumorales, que correspondía a la omisión del exón 7 (Fig. 15B) que igualmente se comprobó mediante secuenciación. A su vez se obtuvo un segundo amplímero de mayor tamaño en la mayoría de las muestras tumorales y alguna muestra normal, que correspondía a la omisión del exón 7 y la retención del intrón 8. Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de las isoformas se altera muy significativamente en muestras de tumores de diferentes tejidos. En la muestra tumoral de colon, estas alteraciones parecen muy significativas, ya que únicamente se observa la forma con retención del intrón.



**Figura 15. Amplificación específica de dos variantes de “splicing” de la Polλ humana.** Amplificación por RT-PCR de muestras de tejido normal (N) y tumoral (T) utilizando oligonucleótidos específicos para detectar la omisión del exón 6 (A) o de los exones 6 y 7 (B).

## 2.2. Construcción de vectores de expresión que contienen el cDNA de las variantes de *splicing* de la proteína Polλ humana

Para poder estudiar las diferentes variantes de *splicing* decidimos construir vectores de expresión con la secuencia que codifica para las variantes hPolλΔ6 y hPolλΔ67.

Esto se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida sobre el vector que contiene la secuencia completa del cDNA de la hPolλ fusionada a una cola de 6 histidinas (pRSETB-hPolλ), que permite la purificación mediante columnas de afinidad de Ni<sup>2+</sup>-NTA. Se diseñaron los oligonucleótidos  
 6S: CATAAGCCTGTCACCTCGTACCAGGGCTTCCGAAGTCTGGAAGACATC; 6AS: GATGTCTTCCAGACTTCGGAAGCCCTGGTACGAGGTGACAGGCTTATG; 67S: CATAAGCCTGTCACCTCGTACCAGGTCCAGAAAGCAGCCCAGGCCTTT y 67AS: AAAGGCCTGGGCTGCTTTCTGGACCTGGTACGAGGTGACAGGCTTATG que al hibridar sobre el molde crean un bucle con la parte de la secuencia que se quiere deletar. La reacción de PCR se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Después de sucesivas rondas de amplificación se obtuvieron las construcciones pRSETB-hPolλΔ6 y pRSETB-hPolλΔ67, construcciones que fueron comprobadas mediante secuenciación.

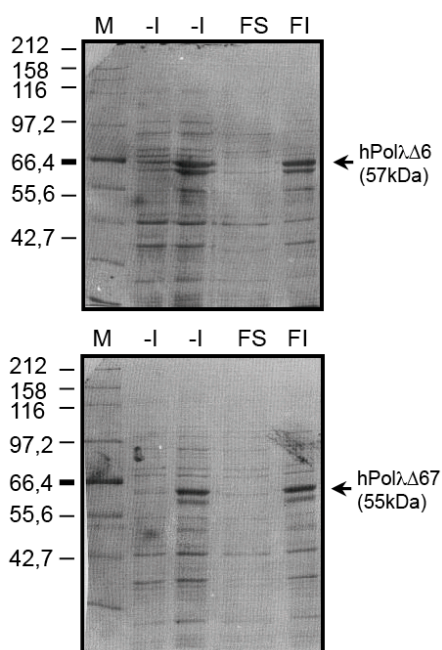
## 2.3. Sobreexpresión y solubilidad de hPolλΔ6 y hPolλΔ67 en células de *E. coli*

Para tratar de purificar las variantes de *splicing* se transformaron células de *E. coli* con las construcciones pRSETB-hPolλΔ6 y pRSETB-hPolλΔ67. La sobre-

## RESULTADOS

expresión se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Como se puede ver en la **figura 16**, tras la inducción con 0,5 mM de IPTG a 37° se induce la expresión de una proteína de tamaño 57 kDa o 55 kDa, que se corresponde con hPol $\lambda$  $\Delta$ 6 y hPol $\lambda$  $\Delta$ 67 respectivamente.

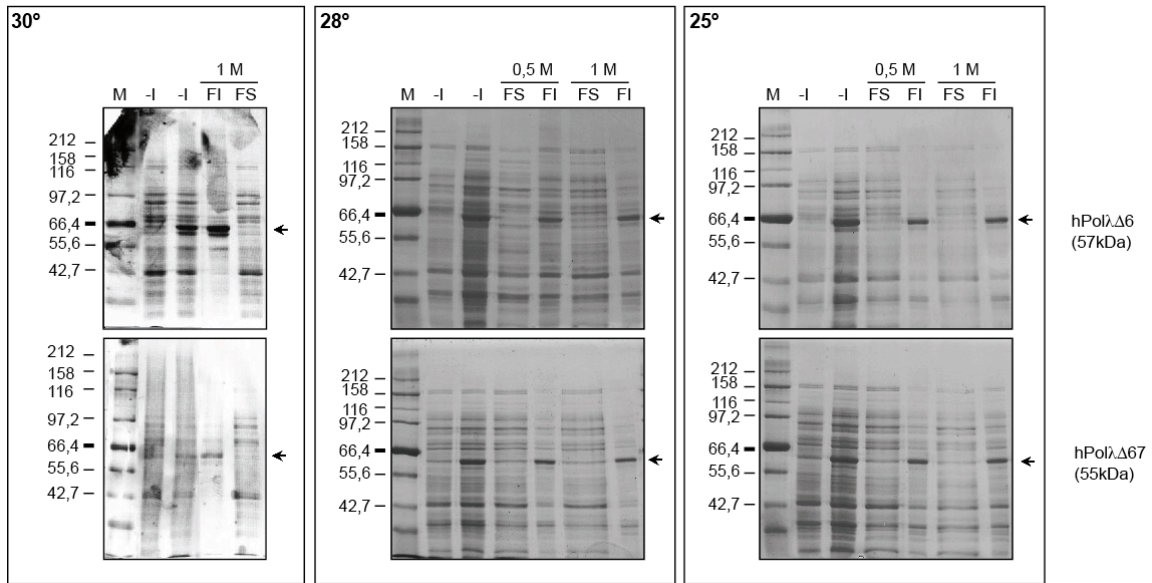
Para analizar la solubilidad de la proteína expresada, se resuspendió el sedimento de centrifugación en tampón L (50 mM TrisHCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 7 mM 2- $\beta$ -mercaptoetanol; 500 mM NaCl; 5% glicerol) y se lisaron las células por sonicación. El extracto se centrifugó a 15.000 g durante 20 min para separar las proteínas insolubles del extracto soluble. Las dos variantes de *splicing* expresadas resultaron insolubles en estas condiciones (FI, **Fig. 16**).



**Figura 16. Expresión de las variantes de *splicing* en células de *E. coli*.**

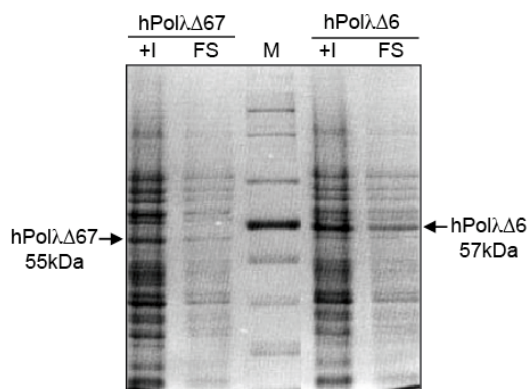
Tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética en geles del 10% de poliacrilamida-SDS de los diferentes extractos de células BL21 pRIL transformadas con el vector pRSETB-hPol $\lambda$  $\Delta$ 6 (A) y pRSETB-hPol $\lambda$  $\Delta$ 67 (B). La sobreexpresión se observa en el extracto inducido (+I), mientras que está ausente en el no inducido (-I) y fue compatible con el peso molecular de cada una de las variantes, 57kDa y 55kDa para hPol $\lambda$  $\Delta$ 6 y hPol $\lambda$  $\Delta$ 67 respectivamente. Tras la lisis, una elevada proporción de la proteína sobreproducida permaneció en el extracto insoluble (FI) en comparación con la fracción soluble (FS).

A continuación se llevaron a cabo diferentes aproximaciones para tratar de obtener una fracción soluble de ambas proteínas. Entre las condiciones probadas se evaluó la disminución de la temperatura (30°, 28° y 25°), para una inducción más lenta y quizás un plegamiento más correcto (**Fig. 17**), el aumento en la proporción de NaCl en el tampón de lisis para tratar de resolubilizar el máximo posible de proteína, así como una sobreexpresión en condiciones de mala aireación (**Fig. 18**). En estas últimas condiciones se somete al cultivo celular a un crecimiento con baja proporción de oxígeno de forma que las células crecen a baja velocidad. Debido a las características del promotor del vector empleado pRSETB la proteína se va expresando de forma lenta y con un plegamiento más correcto y por tanto mayor solubilidad. Como se observa en la **figura 18**, solo una porción de la variante hPol $\lambda$  $\Delta$ 6 permaneció en forma soluble.



**Figura 17. Sobreexpresión a diferentes temperaturas de las variantes de *splicing* en células de *E. coli*.**

Tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética en geles del 10% de poliacrilamida-SDS de los diferentes extractos de células BL21 pRIL transformadas con el vector pRSETB-hPol $\lambda$ Δ6 y pRSETB-hPol $\lambda$ Δ67. La sobreexpresión se realizó a 30°, 28° y 25°. La proteína expresada se observa en el extracto inducido (+I), mientras que está ausente en el no inducido (-I) y fue compatible con el peso molecular de cada una de las variantes, 57kDa y 55 kDa para hPol $\lambda$ Δ6 y hPol $\lambda$ Δ67 respectivamente. La posición de cada proteína se indica con una flecha. Tras la lisis en presencia de 0,5 M y 1 M de NaCl, una elevada porción de la proteína sobreproducida permaneció en el extracto insoluble (FI) en comparación con la fracción soluble (FS).

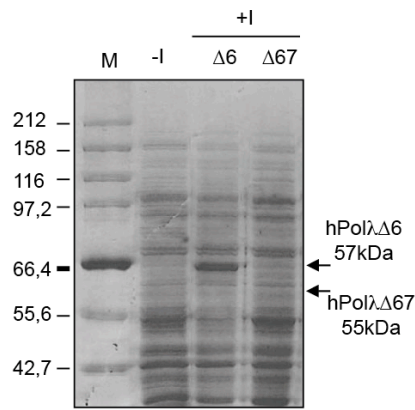


**Figura 18. Sobreexpresión de las variantes de *splicing* en células de *E. coli* en condiciones de incubación con mala aireación.**

Tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética en geles del 10% de poliacrilamida-SDS de los diferentes extractos de células BL21 pRIL transformadas con el vector pRSETB-hPol $\lambda$ Δ6 y pRSETB-hPol $\lambda$ Δ67 y que tras crecer en condiciones de mala aireación (ver Materiales y Métodos) sobreexpresan las diferentes proteínas (+I). En el extracto de fracción soluble (FS) obtenido tras la lisis se puede observar la proporción de proteína soluble resultante.

A continuación se probó la sobreexpresión por autoinducción (Studier, 2005), basada en unas condiciones similares de crecimiento ralentizado, una expresión por tanto lenta y no inducida de la proteína que permite un plegamiento más correcto. Como se observa en la **figura 19**, sólo la variante hPol $\lambda$ Δ6 se autoindujo.

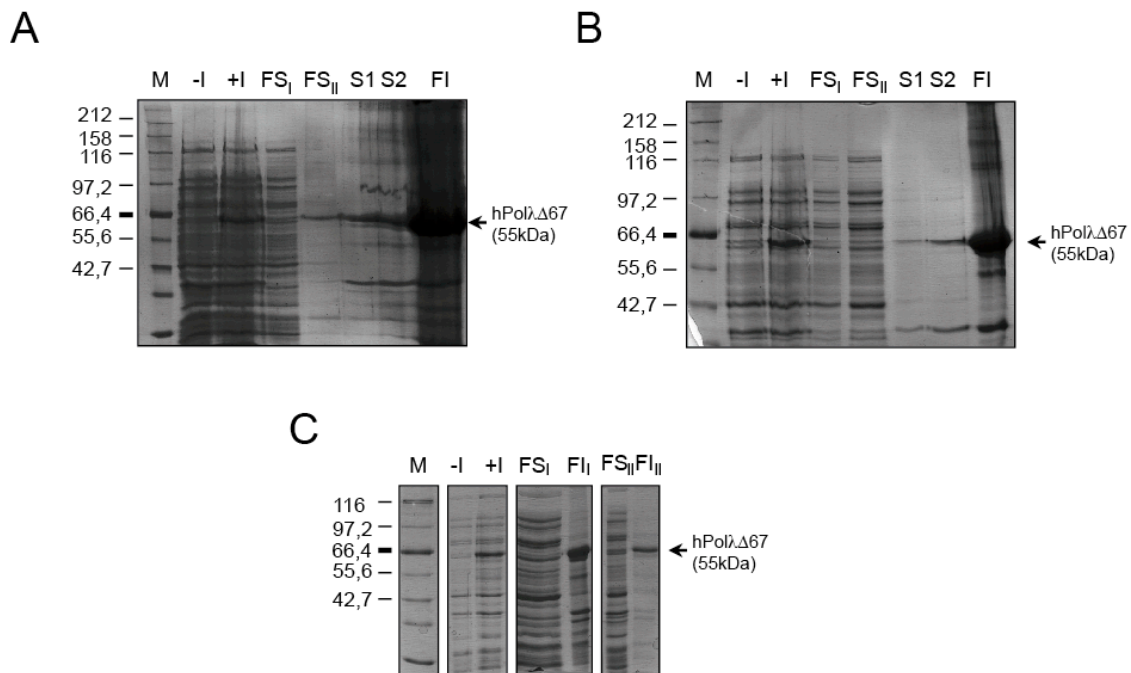




**Figura 19. Sobreexpresión de las variantes de *splicing* en células de *E. coli* mediante autoinducción.**

Tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética en geles del 10% de poliácridamida-SDS de los diferentes extractos inducidos (+I) de células BL21 pRIL transformadas con el vector pRSETB-hPolλΔ6 (Δ6), pRSETB-hPolλΔ67 (Δ67) o vector vacío (-I) mediante autoinducción tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Con la variante hPolλΔ67 se realizaron varios intentos de resolubilización de la fracción insoluble con agentes caotrópicos como la urea (**Fig. 20 A y B**) y el Hidrocloruro de Guanidinio (HGü) (**Fig. 20B**), que provoca la desnaturalización de la proteína para su posterior renaturalización. La proteína hPolλΔ67 nuevamente resultó completamente insoluble en las condiciones probadas, y no fue posible obtener una fracción purificada.



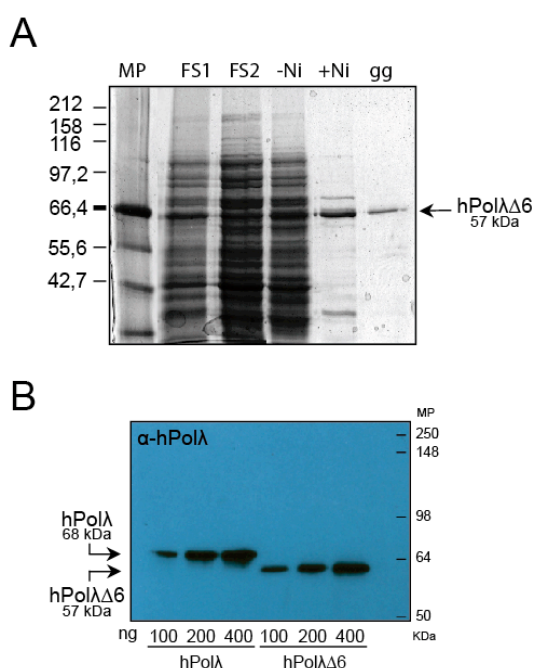
**Figura 20. Sobreexpresión de las variantes de *splicing* en células de *E. coli* y resolubilización mediante urea e hidrocloreuro de guanidinio.**

Tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética en geles del 10% de poliácridamida-SDS de los diferentes extractos inducidos (+I) de células BL21 pRIL transformadas con el vector pRSETB-hPolλΔ67. La fracción de proteína insoluble resultante separada de la fracción soluble (FS<sub>I</sub> y FS<sub>II</sub>) se resuspendió en presencia de 6M urea (**A**), 8M urea (**B**) e hidrocloreuro de guanidinio (HGü) (**C**), tal y como se describe en Materiales y Métodos. S1 y S2: fracción de proteínas resolubilizadas con Urea; FI: fracción insoluble final; FS<sub>II</sub>: fracción soluble tras la resolubilización con HGü y FI<sub>II</sub>: fracción insoluble final.



### 2.3. Purificación de la variante de *splicing* hPolλΔ6

Para su purificación, hPolλΔ6 fue sobreexpresada tanto bajo condiciones de mala aireación como por autoinducción tal y como se explica en Materiales y Métodos. Tras la lisis en tampón fosfato 50 mM, 1 M NaCl, 10 mM β-Mercaptoetanol y 15% de glicerol, obtuvimos una fracción soluble de proteína que se sometió a purificación mediante una columna de afinidad de Ni-NTA. La columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA permitió obtener una fracción homogénea que se sometió a un gradiente de glicerol (15-30%) para eliminar el resto de contaminantes (ver Materiales y Métodos). Cada una de las fracciones obtenidas del gradiente se ensayó para diferentes actividades nucleolíticas. Y las fracciones limpias de estas actividades se reunieron en una mezcla homogénea que se cuantificó y fue reconocida específicamente por el anticuerpo anti-Polλ (**Fig. 21**).



**Figura 21. Purificación de la variante de *splicing* hPolλΔ6**

(A) Tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética en gels del 10% de poliacrilamida-SDS de los diferentes extractos de células BL21 pRIL transformadas con el vector pRSETB-hPolλΔ6. La fracción de proteína soluble tras la sobreexpresión mediante el método de mala aireación (FS1) y por autoinducción (FS2) se purificó por cromatografía en columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA (+Ni) y gradiente de glicerol (gg) tal y como se describe en Materiales y Métodos. A la izquierda se muestra la migración electroforética de una colección de marcadores de peso molecular (PM). La fracción de proteína purificada con peso molecular esperado de 57 kDa fue reconocida específicamente por el anticuerpo anti-hPolλ (B).

### 2.4. Actividad DNA polimerasa de hPolλΔ6

De los alineamientos de secuencia se puede deducir que en estas isoformas, que no cambian la pauta de lectura, no se eliminan regiones críticas, lo que permitiría expresar variantes funcionales de la DNA polimerasa, en algún caso conteniendo el core catalítico reducido a un mínimo similar al de la ASFV Pol X (**Fig. 22**).

Por esta razón, el siguiente paso fue tratar de ver el nivel de actividad de hPolλΔ6 en comparación con la proteína completa, ya que aquella fue la única de las variantes que resultó lo suficiente soluble para poder ser purificada a homogeneidad. Para comprobar si la proteína purificada presentaba actividad de polimerización, se llevó a cabo un ensayo *in vitro*, empleando como molde DNA activado de timo de ternera y cada una de las polimerasas en presencia de Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> como metal activador, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

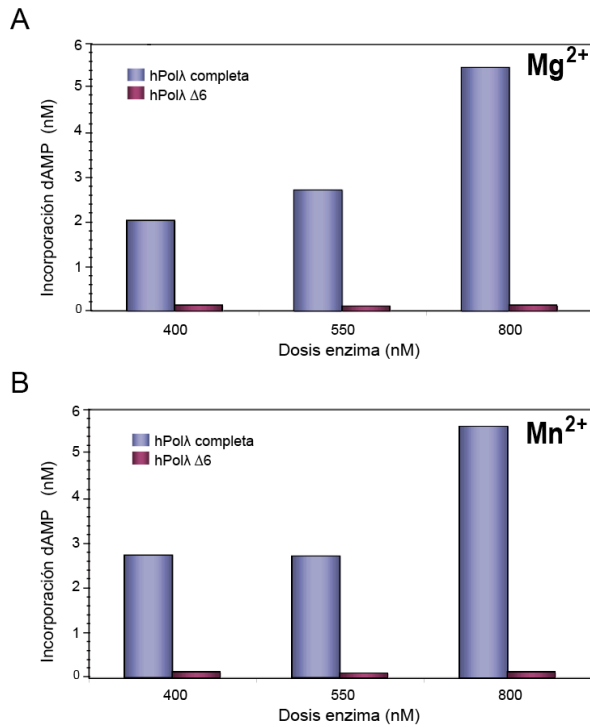
## RESULTADOS

Po1	$\lambda$ wt	1	MDPRGILKAFPKRQKIHADASSKVLAKIPRREEGEEAEFWLSSLRAHVVRTGIGRARAELF	61
Po1	$\lambda\Delta 6$	1	MDPRGILKAFPKRQKIHADASSKVLAKIPRREEGEEAEFWLSSLRAHVVRTGIGRARAELF	61
Po1	$\lambda\Delta 67$	1	MDPRGILKAFPKRQKIHADASSKVLAKIPRREEGEEAEFWLSSLRAHVVRTGIGRARAELF	61
Po1	$\lambda$ wt	62	EKQIVQHGGLCPAQGGPVTHIVVDEGMDYERALLRLPQLPPGAQLVKSAWLSLCLQER	122
Po1	$\lambda\Delta 6$	62	EKQIVQHGGLCPAQGGPVTHIVVDEGMDYERALLRLPQLPPGAQLVKSAWLSLCLQER	122
Po1	$\lambda\Delta 67$	62	EKQIVQHGGLCPAQGGPVTHIVVDEGMDYERALLRLPQLPPGAQLVKSAWLSLCLQER	122
Po1	$\lambda$ wt	123	RLVDVAGFSIFIPSRYLDPQSKAEQDASIPPGTHEALLQATALSPPPPTRPVSPQKAK	183
Po1	$\lambda\Delta 6$	123	RLVDVAGFSIFIPSRYLDPQSKAEQDASIPPGTHEALLQATALSPPPPTRPVSPQKAK	183
Po1	$\lambda\Delta 67$	123	RLVDVAGFSIFIPSRYLDPQSKAEQDASIPPGTHEALLQATALSPPPPTRPVSPQKAK	183
Po1	$\lambda$ wt	184	EAPNTQAQPI SDDEASDGEETQVSAADLEALISGHYPTSLEGDCESPAPAVLDKWVCAQ	244
Po1	$\lambda\Delta 6$	184	EAPNTQAQPI SDDEASDGEETQVSAADLEALISGHYPTSLEGDCESPAPAVLDKWVCAQ	244
Po1	$\lambda\Delta 67$	184	EAPNTQAQPI SDDEASDGEETQVSAADLEALISGHYPTSLEGDCESPAPAVLDKWVCAQ	244
Po1	$\lambda$ wt	245	SSQKATNHNHLHITEKLEVLAKAYSVQGDKWRALGYAKAINALKSFHKPVTSYQEACSIPI	305
Po1	$\lambda\Delta 6$	245	SSQKATNHNHLHITEKLEVLAKAYSVQGDKWRALGYAKAINALKSFHKPVTSYQ	298
Po1	$\lambda\Delta 67$	245	SSQKATNHNHLHITEKLEVLAKAYSVQGDKWRALGYAKAINALKSFHKPVTSYQ	298
Po1	$\lambda$ wt	306	GKRMAEKIIEILESGLRKLHDHISEVVPVLELFSNIWAGTKTAQMWWYQQGFRSLEDIRSQ	366
Po1	$\lambda\Delta 6$	299	-----GFRSLEDIRSQ	309
Po1	$\lambda\Delta 67$			
Po1	$\lambda$ wt	367	ASLTTQQAIGLKHYSDFLERMPREEATEIEQTVQKAAQAFNSGLLCVACGSYRRGKATCGD	427
Po1	$\lambda\Delta 6$	310	ASLTTQQAIGLKHYSDFLERMPREEATEIEQTVQKAAQAFNSGLLCVACGSYRRGKATCGD	370
Po1	$\lambda\Delta 67$	299	-----VQKAAQAFNSGLLCVACGSYRRGKATCGD	327
VPPA	polX	1	MLTLIQGKKIVNHLRSRLAFEYNGOLIKILS-KNIVAVGSLRREEKMLND	50
Po1	$\lambda$ wt	428	VDVLI THPDGRSHRGIFSRLLDSLROEGFLTDDLVSQEEENGQQQYLGVCRLPGPGRRHRR	488
Po1	$\lambda\Delta 6$	371	VDVLI THPDGRSHRGIFSRLLDSLROEGFLTDDLVSQEEENGQQQYLGVCRLPGPGRRHRR	431
Po1	$\lambda\Delta 67$	328	VDVLI THPDGRSHRGIFSRLLDSLROEGFLTDDLVSQEEENGQQQYLGVCRLPGPGRRHRR	388
VPPA	polX	51	VDLLIIVP---EKKLLKHVLPNIRIKGLSFSVKVCGE-----RKCVLFI EW---EKKTYQ	100
Po1	$\lambda$ wt	489	LDIIVVPYSEFACALLYFTGSAHFNRSMRALAKTKGMSLSEHALSTAVVRNTHGCKVGPGR	549
Po1	$\lambda\Delta 6$	432	LDIIVVPYSEFACALLYFTGSAHFNRSMRALAKTKGMSLSEHALSTAVVRNTHGCKVGPGR	492
Po1	$\lambda\Delta 67$	389	LDIIVVPYSEFACALLYFTGSAHFNRSMRALAKTKGMSLSEHALSTAVVRNTHGCKVGPGR	449
VPPA	polX	101	LDLFTALAEKPYAIFHFTGPVSYLIRIRAALKKNYKLNQYGLFKNQTLPV-----	150
Po1	$\lambda$ wt	550	VLPTPTEKDVFRLLGLPYREPAERDW	575
Po1	$\lambda\Delta 6$	493	VLPTPTEKDVFRLLGLPYREPAERDW	518
Po1	$\lambda\Delta 67$	450	VLPTPTEKDVFRLLGLPYREPAERDW	475
VPPA	polX	151	-LKITTEKELIKELGFTYRIPKKRL	174

**Figura 22.** Alineamiento múltiple de aminoácidos de las diferentes isoformas de hPol $\lambda$  junto a la DNA polimerasa del virus de la peste porcina africana (VPPA polX).

Los números indican la posición relativa al residuo N-terminal de cada proteína. Los residuos 36-126 señalados con letras blancas sobre fondo gris, constituye el BRCT. Los aminoácidos 241-575 constituyen el dominio tipo Pol $\beta$  conservado, incluyendo un dominio 8 kDa (240-325) (fondo violeta), dominio dedos (fondo azul), dominio palma (fondo rojo) y dominio pulgar (fondo verde). Los residuos esenciales para la DNA polimerización se señalan en amarillo.

Mientras que hPolλ completa presentó niveles normales de actividad, la variante hPolλΔ6 presentó un nivel casi nulo de actividad en presencia de ambos metales (**Fig. 23**). Por otro lado, usando como sustrato moléculas definidas tipo *gap* de un nucleótido, optimas para la actividad de hPolλ, se pudo asimismo observar que la variante hPolλΔ6 carece en estas condiciones de capacidad de polimerización (**Fig. 24**).

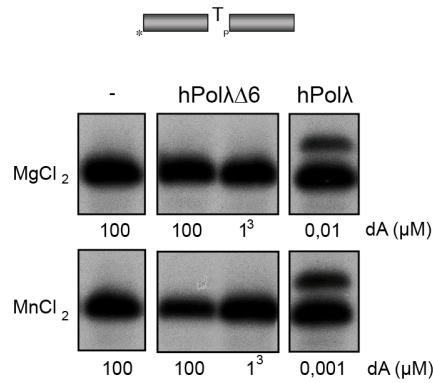


**Figura 23. Actividad de polimerización de DNA de hPolλΔ6 en DNA activado de timo de ternera.**

La actividad de polimerización sobre DNA activado de timo de ternera de la variante hPolλΔ6 fue medida como la incorporación de dAMP en el DNA activado (cpm), y se estimó en función de la cantidad de enzima en presencia de 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> o 1 mM MnCl<sub>2</sub> como metal activador.

Como puede deducirse del alineamiento de secuencia (**Fig. 22**), la región eliminada por el *splicing* en hPolλΔ6, contenía los residuos importantes para la actividad dRP liasa presentes en el dominio de 8 kDa. Como comprobación, se ensayó la actividad dRP liasa de hPolλΔ6 en comparación con la forma completa de hPolλ. Como era de esperar hPolλΔ6 no fue capaz de escindir el residuo dRP (**Fig. 25**).

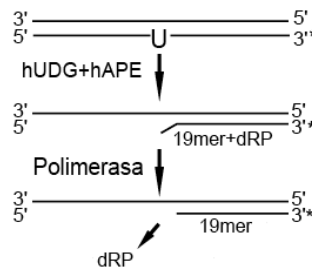
Es por tanto una isoforma inactiva de la proteína que podría tener un efecto dominante negativo interfiriendo o alterando los niveles de reparación de DNA por interacción improductiva con factores necesarios para estos procesos.



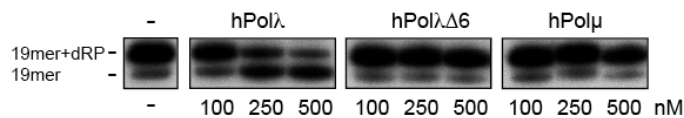
**Figura 24. Actividad de polimerización de DNA de hPolλΔ6 en sustrato definido.**

En el ensayo se utilizó un *gap* de 1 nt representado en el esquema. Las reacciones se llevaron a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos, empleando 100 nM de hPolλ completa, 700 nM de hPolλΔ6, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> o 10 mM MnCl<sub>2</sub> y la cantidad indicada de dATP en cada caso.

A



B



**Figura 25. Actividad dRP liasa de la hPolλΔ6**

(A) Representación esquemática de la reacción. Un oligonucleótido de doble cadena de 34 pb que contiene un uracilo en posición 16 en la cadena marcada (asterisco) es tratado con hUDG y hAPE para generar un sustrato que contiene un residuo dRP. El grupo dRP será posteriormente eliminado por una actividad dRP liasa. (B) Resultado del experimento llevado a cabo con hPolλ completa, hPolλΔ6 y hPolμ. Las reacciones, de 10 min, se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de 500 nM de hPolλ completa y hPolμ y 700 nM de hPolλΔ6.

# 3

*Generación de modelos murinos carentes  
de las DNA polimerasas lambda y mu.*



### 3.1 Modelos murinos de deficiencia simple en Polλ.

Una de las líneas de investigación del laboratorio es el estudio de dos DNA polimerasas de la familia X: Polλ y Polμ, que como ya se ha mencionado anteriormente en esta tesis doctoral están implicadas en reparación y que fueron descubiertas en nuestro laboratorio en 1999.

Tener un modelo murino de deficiencia en cada una de las polimerasas podía constituir una herramienta fundamental a la hora de entender las posibles funciones de estas enzimas. Por esta razón se decidió generar ambos modelos de deficiencia simple en Polλ y Polμ.

#### 3.1.1 Principales características del modelo murino de deficiencia en Polλ (KOλ)

El KOλ se generó en colaboración con el grupo del Dr. K. Rajewsky (Colonia, Alemania).

El modelo murino deficiente en Polλ es viable, fértil y muestra una longevidad similar a la colonia silvestre, tanto en fondo mixto (García-Ortiz, 2003.Tesis) como en su derivación a fondo puro C57Black6. En este último caso se hizo una comparación con los datos obtenidos para los ratones silvestres C57Black6 de *Jackson Laboratory* (Maine, EEUU) (**Tabla 4**) cuya vida media es de 866 días para los machos y 901 días para las hembras (Yuan y cols., 2009). Los datos obtenidos para el modelo KOλ fueron similares (media de 751±97 días para los machos y de 767±107 días para las hembras y la vida máxima de 930 días).

Otra característica en la que fueron similares es la baja incidencia de tumores en ratones, tanto jóvenes como de más de 18 meses. Así los ratones KOλ de más de 18 meses presentaron una baja incidencia de tumores (5 tumores de 66 ratones analizados). Cabe destacar el tamaño acrecentado de las vesículas seminales de varios de los ratones de más de 18 meses analizados en longevidad (4 vesículas grandes/ 19 ratones).

En lo que respecta al aspecto físico los KOλ son similares a la colonia silvestre en cuanto a color y peso y longitud. El análisis del peso de ratones machos entre 20-67 semanas revela un ligero incremento (2 g) para los KOλ (32,74 g ± 3,7 g) en comparación con un análisis de ratones de 20-67 semanas C57B16 silvestres de Jackson Laboratory (Maine, EEUU) (30,8 g ± 1,61 g).

**Tabla 4. Estudio comparativo cepas C57Black6 wt, KOλ, KOμ y DK.**

		C57Black6 wt	C57Black6 KOλ	C57Black6 KOμ	C57Black6 KOμ/ KOλ
<b>Esperanza de vida</b>	<b>Machos</b>	901 (n:19)	767± 96 (n:19)	N.D. <sup>2</sup>	613 (n:13) <sup>3</sup>
	<b>Hembras</b>	866 (n: 47)	757± 107 (n:47)		
<b>Vida máxima</b>		N.D. <sup>1</sup> .	930		900
<b>Crias por camada</b>		6.6	7.3	7,9	5 ±2
<b>% machos/hembras</b>		50,7 / 49,3	49,9 / 50,1	51,2 /48,8	58/ 42
<b>longitud</b>		8,75 cm	9,19 cm	9 cm	9.7 cm
<b>peso</b>		30,8 g ± 1,61 g	32,74 g ± 3,7 g	34 g ± 5,7 g	35 g ± 1 g

N.D.<sup>1</sup>. no disponible en el artículo por no haberse muerto el total de ratones seleccionados para el análisis. N.D.<sup>2</sup> Trabajo en colaboración pendiente de publicación; <sup>3</sup> Dato preliminar. El estudio de longevidad con los ratones de deficiencia combinada KOμ / KOλ sigue aun abierto.

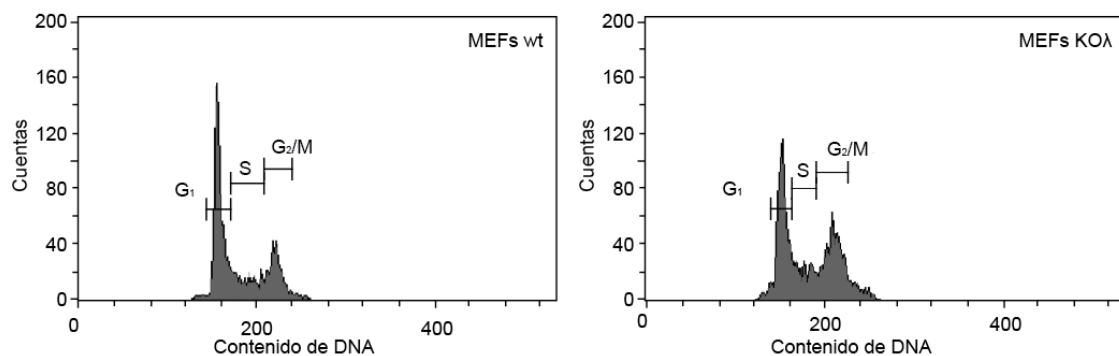
## RESULTADOS

El estudio inmunohistoquímico de los testículos de los ratones KO no reveló una sobreproducción compensatoria de Pol $\beta$  en respuesta a la ausencia de Pol $\lambda$  (García-Ortiz, 2003.Tesis). Sin embargo, sí que existe una deficiencia en el proceso de meiosis asociado a la diferenciación celular que se produce en este tejido, ya que en el día 18 post-natal se observa un déficit en células haploides (espermátidas redondas, elongadas y espermatozoides), lo que apoya el papel de Pol $\lambda$  en procesos de meiosis producidos durante el desarrollo post-natal de los testículos (García-Díaz y cols., 2000; García-Ortiz, 2003, Tesis).

Estudios sobre el patrón de hipermutación somática presente en los ratones KO, no han revelado diferencias significativas respecto a la variante silvestre (García-Ortiz, 2003). Sin embargo, diferencias en la longitud de las adiciones en los segmentos génicos V(D)J entre los ratones KO y silvestre, han demostrado un papel de Pol $\lambda$  en la recombinación de los segmentos génicos correspondientes a la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Bertocci y cols., 2006). Asimismo, se han detectado sutiles diferencias durante el desarrollo del sistema hematopoyético a nivel de las diferentes poblaciones celulares (García-Ortiz, 2003, Tesis).

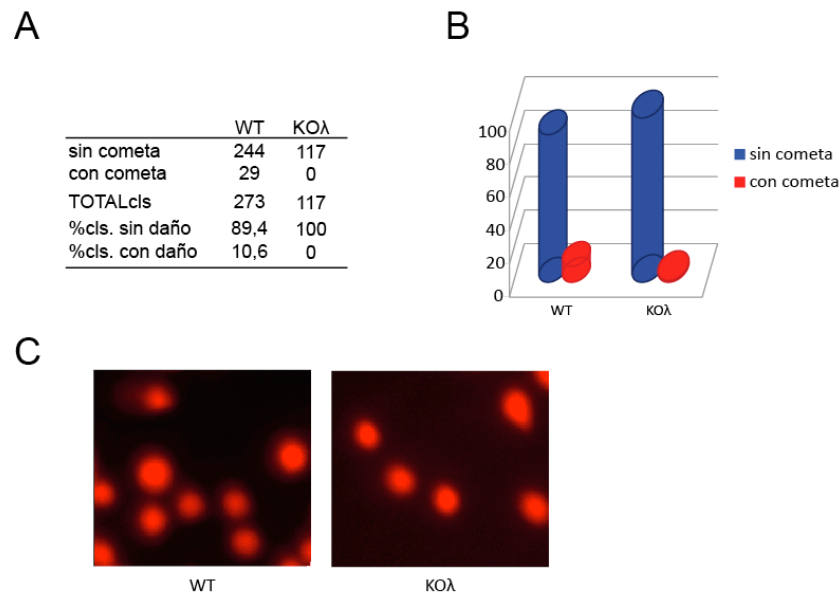
El aislamiento e immortalización de fibroblastos embrionarios (MEFs) permitió disponer de un modelo celular de estudio estandarizado. A partir de pase 20 los MEFs KO $\lambda$  tienen un desarrollo más lento que la variante silvestre, lo que podría indicar una acumulación de daño no reparado por la ausencia de Pol $\lambda$ , que provocase que llegado cierto punto, las células se divadiesen más lentamente (García-Ortiz y cols., 2003).

Analizamos mediante citometría de flujo las diferentes fases del ciclo de MEFs wt y KO $\lambda$  asincrónicas a partir de pase 20 (**Fig. 26**) El porcentaje de células en fase S de MEFs KO $\lambda$  es ligeramente superior (15,5% para los MEFs KO $\lambda$  frente a 12% de los MEFs wt) al compararlo con MEFs wt. Estos datos nos indican un ligero retraso en la fase S del ciclo celular. Las células podrían tener un número mayor de daño que reparar y por tanto tardar más en salir de fase S. A pesar de que no detectamos mediante el ensayo del cometa mayor presencia de daño endógeno en los ratones KO $\lambda$  que en los wt (**Fig. 27**), los datos del citómetro incitan a realizar un estudio más detallado de como afecta la falta de Pol $\lambda$  al ciclo normal de las células. Alternativamente la acumulación de daño no reparado, como 8oxoG, en el DNA requeriría la intervención de DNA polimerasas de tolerancia al daño, como es el caso de la coordinación descrita entre hPol $\lambda$  y MutY en la reparación de 8oxoG:A (van Loon y Hübscher, 2009).



**Figura 26. Análisis de las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo de MEFs wt y KO $\lambda$ .** Ejemplo representativo de un análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo de MEFs wt y MEFs KO $\lambda$  a partir de pase 20.





**Figura 27. Análisis de daño endógeno de MEFs wt y KOλ.**

Se realizó un ensayo de cometa con MEFs wt y KOλ como se detalla en Materiales y Métodos. Los datos obtenidos se muestra en (A) y representan en (B). (C) Ejemplos representativos al azar del ensayo de cometa.

### 3.1.2 Implicación de Polλ en la enfermedad de Huntington.

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa autosómica y dominante que suele manifestarse a mediana edad en la especie humana, causando la muerte entre 15 y 20 años más tarde del primer síntoma (Wexler y cols., 1991). El desencadenante genético de esta enfermedad es la presencia de una región inestable que se compone de repeticiones del trinucleótido CAG en el extremo 5' del gen que codifica para la proteína Huntingtina (Htt). La EH se produce por un aumento en el número de repeticiones dando lugar a una expansión de la cola de poliglutaminas (poliQ) en el extremo N-terminal de la proteína. Un individuo normal tiene entre 6-35 repeticiones, a partir de 40 repeticiones se desarrolla la enfermedad. La edad de comienzo y la severidad de la enfermedad dependen de la longitud de la expansión. La EH se caracteriza por disfunción motora, declive cognitivo y alteración psicológica (Ortega y cols., 2007).

Que la causa principal sea la expansión de una secuencia repetida ha llevado a investigar este mecanismo como una nueva forma de mutación en la que pueden estar implicadas DNA polimerasas de replicación o de reparación. De esta manera se ha podido relacionar a la DNA polimerasa β humana (hPolβ) con la expansión de tripletes mediante un mecanismo de deslizamiento (Petruska y cols., 1998). Por otro lado, se ha descrito que este tipo de expansiones se caracterizan por la formación de estructuras no canónicas del DNA que suelen ser reparadas durante la replicación o por recombinación (McMurray, 1999; Bacolla y Wells, 2004; Wells y cols., 2005). Si no se resuelven constituyen una de las principales causas de la expansión. Por otro lado, se ha descrito el papel esencial de proteínas implicadas en “*mismatch repair*” (Kovtun y cols., 2001; Manley y cols., 1999) si bien esto no explica la causa de la aparición de la enfermedad en función de la edad. Recientemente, se ha relacionado el daño oxidativo, descrito en numerosos trabajos como principal causa de envejecimiento (Stadtman, 1992; Cardozo-

Pelaez y cols., 1999), con el proceso de expansión de repeticiones en el cerebro (Kovtun y cols., 2007). OGG1, glicosilasa implicada en la reparación de 8oxoG, uno de los daños más frecuentes en el DNA causado por daño oxidativo, inicia la reparación de este daño en secuencias repetidas generando roturas que pueden determinar la expansión de tripletes (Kovtun y cols., 2007). En este sistema de reparación por escisión de base participa Pol $\beta$  (Matsumoto y cols., 1994) debido a su ya mencionada actividad dRP liasa. Alternativamente, el daño oxidativo puede dar como resultado un residuo dRP oxidado que Pol $\beta$  no sea capaz de eliminar (Matsumoto y cols., 1994) pasando a actuar junto con FEN1 un mecanismo denominado BER de trecho largo (Matsumoto y cols., 1994). De esta manera se ha descrito que la falta de coordinación entre Pol $\beta$  y FEN1 desemboca en la expansión de tripletes CAG (Liu y cols., 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, se ha descrito un posible papel de Pol $\lambda$  en reparación de daño oxidativo concretamente en la corrección del par mutagénico 8oxoG:A a 8oxoG:C (van Loon y cols., 2009). Trabajos anteriores realizados con MEFs deficientes en Pol $\lambda$  han descrito que estas células son hipersensibles a tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Braithwaite y cols., 2005a) y entran en estado de senescencia de forma prematura en condiciones de estrés oxidativo (20% O<sub>2</sub>; Bertocci y cols., 2006), aunque no muestran una sensibilidad especial a agentes alquilantes como el MMS (Braithwaite y cols., 2005b). Además, los MEFs deficientes en Pol $\lambda$  son hipersensibles a la incorporación en el DNA de 5-hidroximetil-desoxiuridina, lesión que se genera de manera fisiológica como consecuencia del estrés oxidativo (Braithwaite y cols., 2005b). Por otro lado, Pol $\lambda$  presenta una propensión alta a cometer errores de deslizamiento de pauta de lectura (Bebenek y cols., 2003). Es por estas dos características de la Pol $\lambda$  por la que nos planteamos estudiar la posible relación con la expansión de tripletes en la EH.

### 3.1.2.1 Generación del modelo murino de estudio

Para este análisis se necesitaba generar un modelo murino de estudio que asociase la falta de Pol $\lambda$  con la presencia de la enfermedad. Por ello se estableció una colaboración con el laboratorio del Dr. José J. Lucas (CBMSO, Madrid) con amplia experiencia en el estudio de enfermedades neurodegenerativas y más en concreto la EH.

El modelo de estudio se obtuvo mediante cruzamiento con el ratón R6/1. Este modelo de ratón es una de las 6 líneas generadas como modelo de estudio crónico de la enfermedad cada una de ellas con diferente rango de severidad de la enfermedad. Fueron generadas introduciendo un fragmento de 2 kb de la región 5' que se expande en el gen de la Htt humana junto con un fragmento de 1 kb que pertenece al exón 1 de la proteína (Sathasivam y cols., 1999). En el caso de la línea R6/1 presenta 115 repeticiones CAG.

En la generación del modelo se cruzaron ratones macho R6/1 con hembras KO $\lambda$ . Los ratones macho de esta 1<sup>a</sup> generación que resultaron transgénicos para la enfermedad y que a su vez eran heterocigotos para Pol $\lambda$ , se cruzaron con hembras heterocigotas para Pol $\lambda$ . Los ratones generados en el 2<sup>o</sup> cruce se genotiparon y se mantuvieron en el animalario para su posterior estudio a los 5-8 meses de edad.

### 3.1.2.3 Fenotipo de comportamiento línea R6/1-Pol $\lambda$

Previamente a la obtención de muestras se observó el fenotipo de comportamiento de los ratones a lo largo de los meses de crecimiento. Los ratones positivos para R6/1 presentaban síntomas característicos de la enfermedad a los 4-5 meses, con movimiento descontrolado e irregular al andar y temblores, así como tendencia a cerrarse sobre si mismos cuando se les sostiene sobre la cola (Sathasivam y cols., 1999). Físicamente sufrieron una pérdida de peso, característica usual de esta enfermedad. Es de destacar que no se obtuvieron diferencias fenotípicas entre los diferentes genotipos de  $Pol\lambda$  sobre el fondo R61(R 6/ $Pol\lambda$ +/+; R6/1- $Pol\lambda$ +/-; R6/1- $Pol\lambda$ -/-). Por lo que la falta de  $Pol\lambda$  no producía una mejoría en la enfermedad y por tanto no fue posible relacionar a  $Pol\lambda$  directamente con la generación de expansiones a este nivel.

### *3.1.2.3 Obtención de muestras y análisis de repeticiones CAG*

Pasadas 40 semanas se sacrificó a cada animal según el reglamento vigente de eutanasia y fueron extraídas las diferentes muestras de tejido del Sistema Nervioso Central (SNC): cortex, bulbo olfatorio, cerebelo y estriado. Asimismo se extrajo el hígado, corazón, riñón, bazo y cola.

De cada muestra se extrajo el DNA genómico (ver Materiales y Métodos). Sobre este DNA se realizó la amplificación del locus con las repeticiones CAG en colaboración con Gillian P. Bates y se analizó en un secuenciador ABI 377.

En el análisis de un ratón R6/1 se ha descrito que cada tejido presenta un perfil multimodal de distribución de repeticiones, es decir, varios picos con diferentes cantidades de repeticiones (Mangiarini y cols., 1997). Como se muestra en la **figura 28A**, uno de los picos varía muy poco su posición en función del tiempo (pico izdo.) y representa al alelo somáticamente estable. El alelo inestable varía su posición migrando en el gráfico hacia la derecha en función del incremento de las repeticiones (**Fig. 28A**). En la **figura 28B** se representa el perfil característico de dos ratones de la línea R6/1 utilizada en este análisis. Las repeticiones se analizaron a las 3 semanas para el DNA extraído de cola (**Fig. 28B**, parte superior) y 6 y 30 semanas de edad en los tejidos del Sistema Nervioso Central (SNC) y tejidos no cerebrales (corazón, riñón, hígado y bazo). Como se puede observar la inestabilidad a las 3 semanas es casi inexistente. De igual manera a las 6 semanas no se observa tampoco inestabilidad. Sin embargo, a las 30 semanas la mayoría de los tejidos analizados presentan el patrón característico de la expansión, destacando la expansión producida en el estriado y el hígado (**Fig. 28B**) (Mangiarini y cols., 1997).

En el caso de nuestro modelo murino se analizó el cortex, cerebelo, bulbo olfatorio, estriado e hígado. El DNA genómico extraído del estriado no presentó la calidad suficiente para realizar una buena amplificación y poder ver un perfil correcto de expansiones. Como puede observarse en la **figura 29**, tanto los perfiles de las repeticiones CAG de los diferentes cortex, como los obtenidos del cerebelo no mostraban diferencias entre los distintos genotipos para  $Pol\lambda$ . Todos los perfiles mostraban el pico del alelo somático estable.

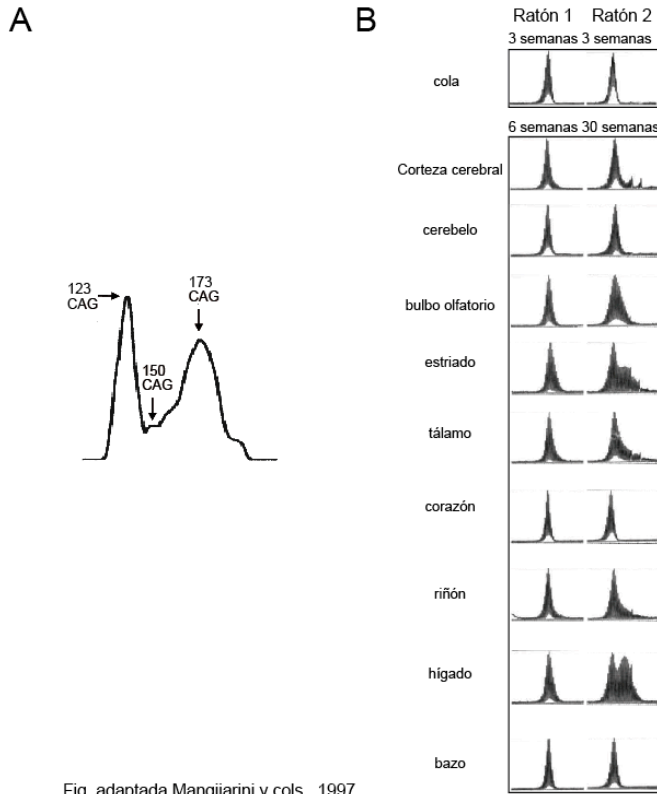
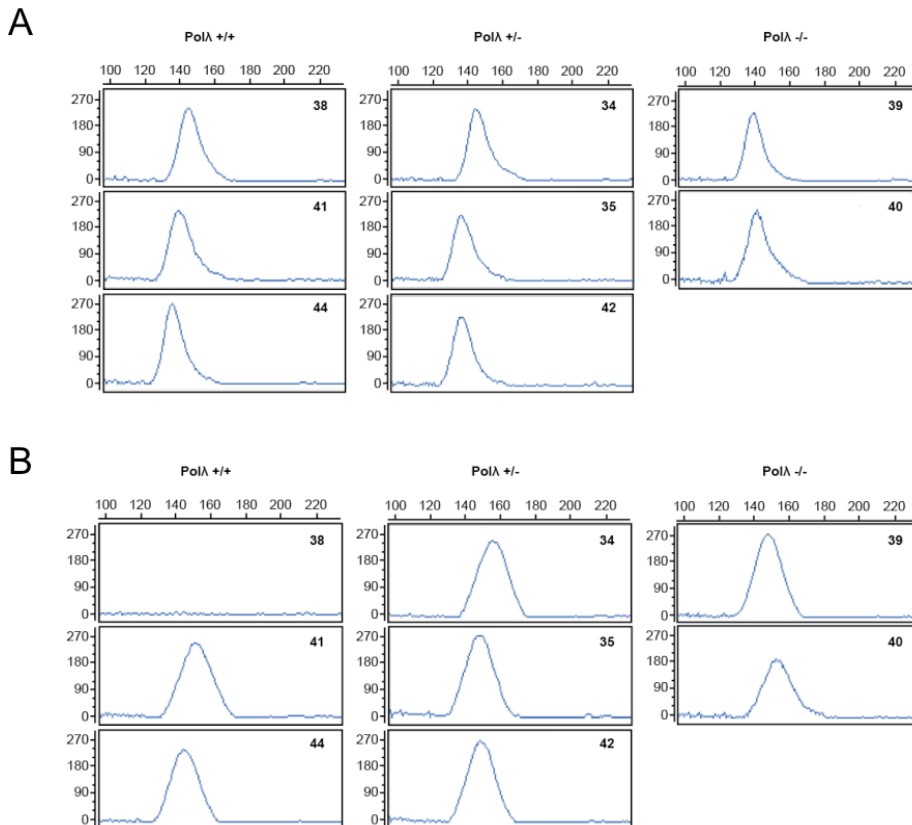


Fig. adaptada Mangiarini y cols., 1997

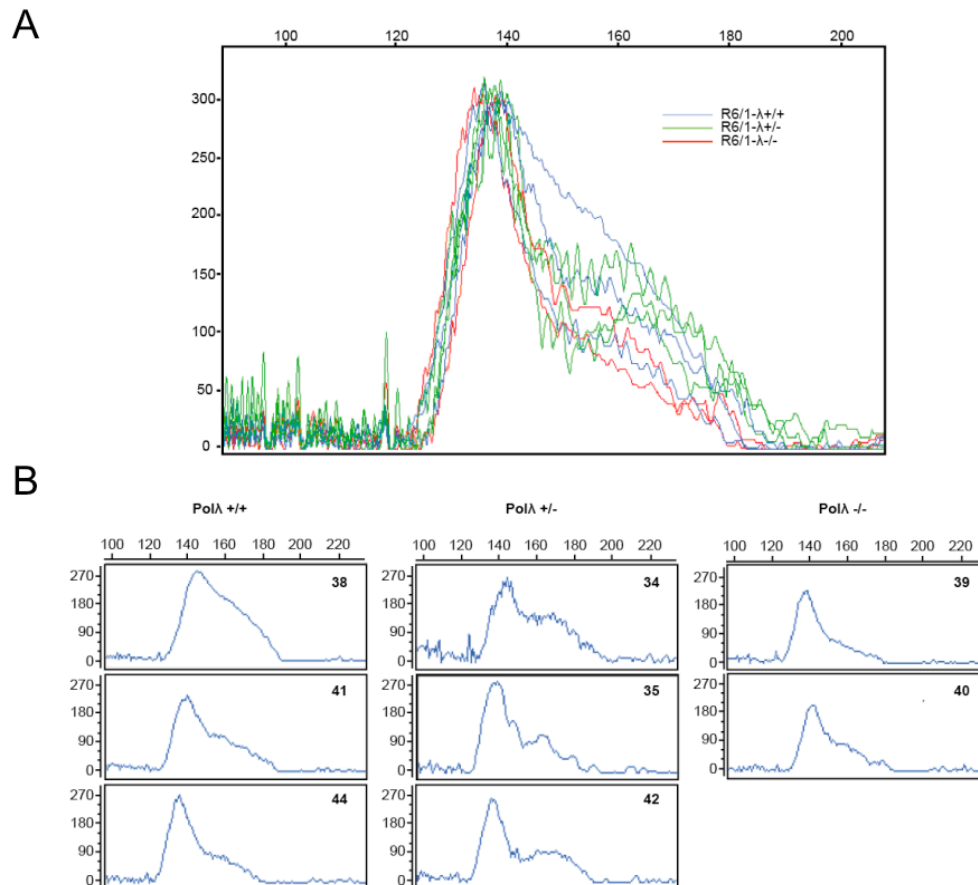
**Figura 28. Inestabilidad somática de repeticiones CAG en los ratones R6/1.**

(A) Patrón de picos de las posibles inestabilidades en repeticiones CAG. (B) Muestras representativas de la inestabilidad encontrada en nueve tejidos extraídos de dos ratones a la edad de 6 semanas (dcha.) y 30 semanas (izda.). El número basal de repeticiones se calcula por el número de repeticiones obtenido en el DNA genómico de cola a las 3 semanas de edad.



**Figura 29. Inestabilidad somática de repeticiones CAG en los ratones R6/1-λ+/, R6/1-λ+/- y R6/1-λ-/-.** Perfiles de repeticiones CAG de DNA genómico extraído de corteza cerebral (A) y cerebelo (B) de los ratones R6/1-λ+/+ 38, 41 y 44 (panel izdo.); R6/1-λ+/- 34, 35 y 42 (panel central) y R6/1-λ-/- 39 y 40 (panel dcho). Cada PCR de cada muestra se repitió tres veces para ver la reproducibilidad.

Cuando se analizó las repeticiones CAG que se producen en el bulbo olfatorio (**Fig. 30**) se observa que todos los tejidos presentan un pico desplazado correspondiente al alelo somático inestable. Sin embargo, solo se aprecian ligeras diferencias de menos inestabilidad en los ratones con la falta total de Pol $\lambda$  (ratones R6/1- $\lambda$ -/-).



**Figura 30. Inestabilidad somática de repeticiones CAG en los ratones R6/1- $\lambda$ +/+, R6/1- $\lambda$ +/- y R6/1- $\lambda$ -/-.**

(A) Superposición de los perfiles de repeticiones obtenidas en los bulbos olfatorios de los diferentes ratones: R6/1- $\lambda$ +/+ (azul), R6/1- $\lambda$ +/- (verde) y R6/1- $\lambda$ -/- (rojo). (B) Perfiles de repeticiones CAG de DNA genómico extraído de bulbo olfatorio de los ratones R6/1- $\lambda$ +/+ 38, 41 y 44 (panel izdo.); R6/1- $\lambda$ +/- 34, 35 y 42 (panel central) y R6/1- $\lambda$ -/- 39 y 40 (panel dcho). Cada PCR de cada muestra se repitió tres veces para ver la reproducibilidad.

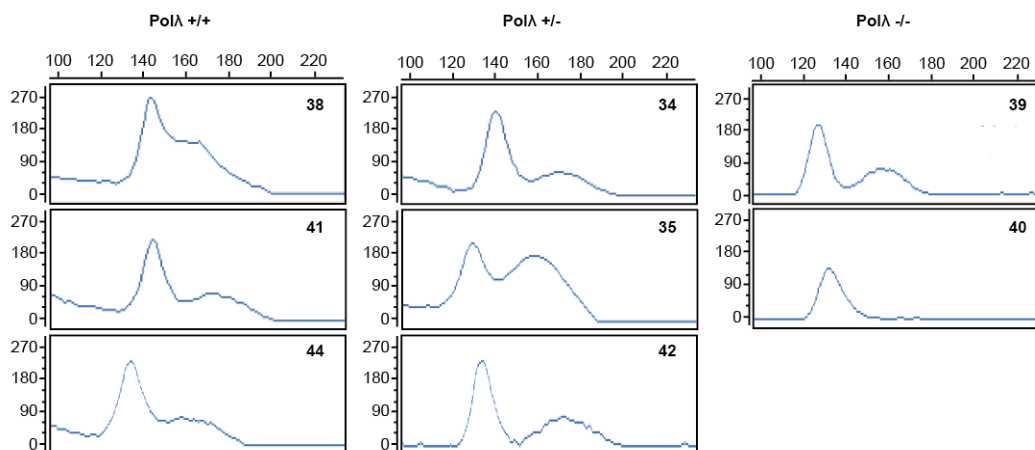
En contraste, los ratones R6/1- $\lambda$ +/- podrían presentar un pico de inestabilidad más pronunciado.

Por último, se analizó el patrón de inestabilidad que presentaban los ratones en el hígado (**Fig.31**). Si bien el ratón KO $\lambda$  n° 39 presentaba un perfil semejante a los ratones wt y  $\lambda$ +/-, el perfil del ratón KO $\lambda$  n° 40 no presentaba pico del alelo inestable, por lo que se podría pensar en una reducción de la inestabilidad por la falta de Pol $\lambda$ .

## RESULTADOS

Por lo que no queda claro el papel de Pol $\lambda$  en la inestabilidad de las repeticiones CAG.

Para poder afirmar el papel de Pol $\lambda$  en la inestabilidad de las repeticiones CAG se necesitaría ampliar el número de ratones R6/1- $\lambda$ -/-. Estos nuevos cruces se están realizando en el laboratorio.

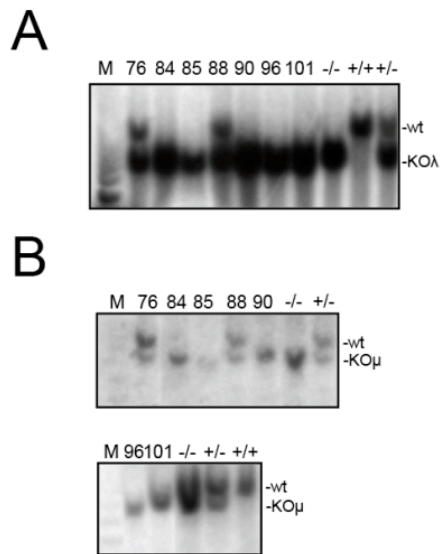


**Figura 31. Inestabilidad somática de repeticiones CAG en los ratones R6/1- $\lambda$ +/, R6/1- $\lambda$ +/- y R6/1- $\lambda$ -/-.**

Perfiles de repeticiones de DNA genómico extraído de Hígado de los ratones R6/1- $\lambda$ +/+ 38, 41 y 44 (panel izdo.); R6/1- $\lambda$ +/- 34, 35 y 42 (panel central) y R6/1- $\lambda$ -/- 39 y 40 (panel dcho.). Cada PCR de cada muestra se repitió tres veces para ver la reproducibilidad.

### 3.2 Generación del modelo murino de deficiencia combinada en Pol $\lambda$ y Pol $\mu$ (DK)

Una vez que las dos colonias de modelos de deficiencia individual en Pol $\lambda$  y en Pol $\mu$  fueron derivadas a fondo puro C57Black6 se decidió generar el modelo de deficiencia doble en Pol $\lambda$  y Pol $\mu$  (Doble Knock-out, DK). Para generarlo se realizó un primer cruce entre ambas colonias. La 1<sup>a</sup> generación son heterocigotos para ambos alelos de las polimerasas. Posteriormente se realizó un cruce entre ratones de la 1<sup>a</sup> generación y se genotiparon para ambos alelos de cada polimerasa mediante PCR y *Southern Blot* (SB) (Ver Materiales y Métodos) las camadas resultantes en donde existía 1/16 de probabilidad que naciera un ratón deficiente para las dos polimerasas. Por esta baja probabilidad se repitió 3 veces el segundo cruce. Una vez que nacieron varios ratones macho y hembra DK se cruzaron para expandir la colonia en homocigosis (**Fig. 32**). Las tres generaciones siguientes se genotiparon por PCR o SB y posteriormente se genotiparon cada 2-3 generaciones para comprobar que no existieran errores de cruces entre las distintas colonias con las que se trabaja en nuestro laboratorio.



**Figura 32. Genotipado de DNA genómico del modelo murino de deficiencia doble en Pol $\lambda$  y Pol $\mu$  por Southern Blot.**

Ejemplo de genotipado mediante *Southern Blot* (SB) de 20  $\mu$ g DNA genómico procedente de los ratones progenitores de la colonia deficiente en Pol $\lambda$  y Pol $\mu$ . Se realizaron dos SB para cada una de las polimerasas, Pol $\lambda$  (**A**) y Pol $\mu$  (**B**) tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los ratones progenitores 84, 85, 90, 96 y 101 están señalados con un asterisco.

El modelo murino de deficiencia doble en Pol $\mu$  y Pol $\lambda$  (DK) es viable, fértil y de aspecto físico similar a la colonia silvestre. Las características analizadas hasta el momento en comparación a la cepa silvestre previamente analizada por Jackson laboratory (Maine, EEUU) se resumen en la **Tabla 4**. Se puede concluir que los DK son ligeramente más grandes (9,7 cm DK vs 8,75 cm wt) y de mayor peso (35 g DK vs 30 g wt). Es reseñable que los ratones DK analizados en longevidad hasta el momento presentan una esperanza de vida menor que la de los ratones silvestre y KO $\lambda$ . El ratón KO $\mu$ , por el contrario, presenta una longevidad mayor acompañada de una mejor habilidad motora y de aprendizaje, así como de una resistencia al daño oxidativo (una de las causas principales en envejecimiento) en ratones de 18 meses, (Lucas y cols., en preparación).

Otra característica a destacar es el número de crías al destete, es decir el número de crías que sobreviven en el momento de hacer el destete. En los ratones DK el número de crías es de 5 frente a la media de 7 que tiene la colonia wt. Por otro lado, analizando el número y sexo de los ratones de esta colonia nacidos hasta el momento y que hayan sobrevivido después del destete, cabe señalar que presenta un porcentaje diferente de machos y hembras que la colonia wt (58 % de machos en el DK vs 50 % de machos en la colonia wt).

La generación y mantenimiento de estos modelos ha constituido una herramienta fundamental para estudios que se están llevando a cabo bien mediante colaboraciones externas (Gozalbo-López y cols., 2009, Lucas y cols., 2005; Lucas y cols., 2009) o bien en el laboratorio, tal como el estudio de la capacidad de reparar o tolerar daños de diversa índole mediante el empleo de extractos totales de proteína obtenidos de tejido de los modelos murinos así como de los MEFs derivados de estas colonias.





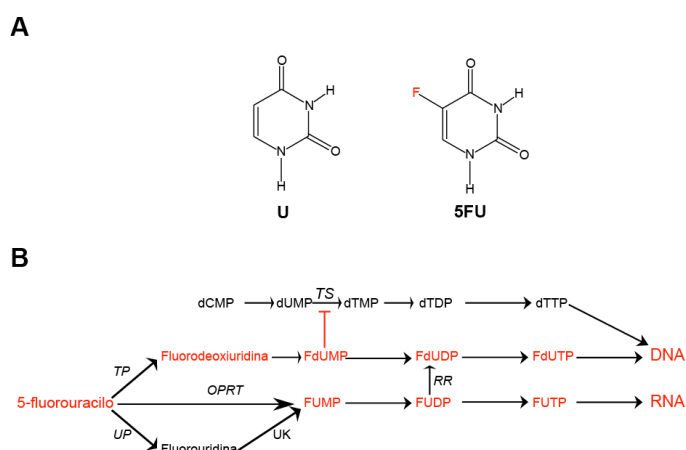
# 4

## *Pol lambda y Pol mu en Reparación y Tolerancia al Daño*



### 4.1 Síntesis a través de lesiones: 5-fluorouracilo (5FU)

5-fluorouracilo (5FU) es un derivado halogenado de nucleótido con un átomo de flúor en el carbono C-5 en lugar de un átomo de hidrógeno. Fue sintetizado en 1957 por Heidelberger y cols. (Heidelberger y cols., 1957) como agente antitumoral basándose en la observación de que en hepatomas de ratas la utilización de uracilo estaba alterada con respecto a tejidos sanos, indicando que el metabolismo del uracilo era una diana potencial de quimioterapia (Rutman y cols., 1954). En la actualidad se sigue utilizando en terapia antitumoral sólo o en combinación con otros fármacos (Pratt y cols., 1994; Kretschmar y cols., 2000; Wilke y cols., 2000; Kouroussis y cols., 2002; Kabbinavar y cols., 2003; Ohtsu y cols., 2003), siendo su acción principal la inhibición de la actividad de la Timidilato Sintasa (TS). La similitud estructural entre FU y el uracilo le permite entrar en las células utilizando los sistemas de entrada de bases pirimidínicas e incorporarse en las rutas metabólicas. 5FU es convertido dentro de la célula a 5-fluorodeoxiuridinamonofosfato (5FdUMP), un análogo de deoxiuridinamonofosfato (dUMP) que junto con el folato reducido y la TS, forman un complejo ternario estable que causa la inhibición (Santi y cols., 1974). Por otro lado, tanto el 5FdUMP como 5-fluorouridínamonofosfato (5FUMP), pueden ser fosforilados a 5-fluorodeoxiuridinatrifosfato (5FdUTP) y 5-fluorouridínatrifosfato (5FUTP) pudiendo ser incorporado al DNA y RNA (Tanaka y cols., 1981; Chaudhuri y cols., 1958). Tanto FdUTP como FUTP pueden ser incorporados en el DNA y RNA, respectivamente, por las polimerasas celulares (**Fig. 33**). Se ha demostrado la presencia de FU en todas las especies celulares de RNA (Parker y Cheng, 1990). La presencia de FU en el RNA inhibe la maduración de rRNA (Ghoshal y Jacob, 1994, Ghoshal y Jacob, 1997, Kanamaru y cols., 1986) y de tRNA (Randerath y cols., 1983, Santi y Hardy, 1987) y altera el procesamiento y la estructura secundaria de los precursores de mRNA (Carrico y Glazer, 1979, Doong y Dolnick, 1988, Lenz y cols., 1994, Patton, 1993, Samuelsson, 1991, Wu y Dolnick, 1993).

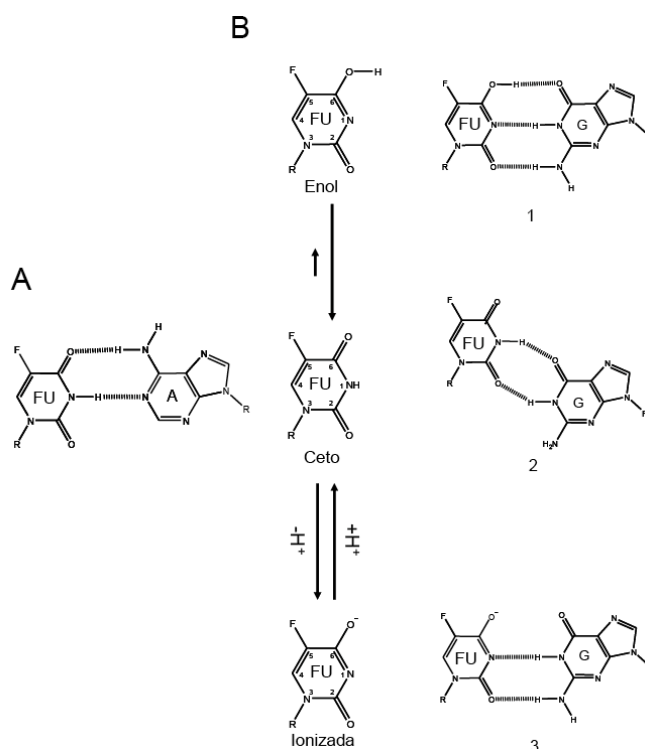


**Figura 33. Metabolismo del 5FU.** (A) Estructura química de 5-fluorouracilo (FU) y uracilo (U). (B) Metabolismo del 5fluorouracilo. En letra cursiva aparecen las abreviaturas de las enzimas implicadas. Las abreviaturas son: TP, timidín fosforilasa; UP, uridín fosforilasa; OPRF, ororato fosforribosil transferasa; UK, uridín kinasa; RR, ribonucleótido reductasa; DCTD, dCMP deaminasa; TS, timidilato sintasa. (-) Inhibición.

Otra de las principales razones por las que se emplea el 5FU como droga antitumoral es por su gran efecto mutagénico debido a apareamientos de bases

incorrectos inducidos por la presencia del grupo halógeno de estos análogos de nucleótido (Hopkins y Goodman, 1980). La capacidad mutagénica de los 5-halógenoderivados derivados sobre el DNA es debida al menos a dos efectos: alteraciones en los niveles de dNTPs, y apareamientos de bases incorrectos inducidos por la presencia del grupo halógeno de estos análogos de nucleótido (Hopkins y Goodman, 1980). De esta manera, la fuerte electronegatividad del átomo de flúor altera la densidad electrónica del anillo pirimidínico favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno con residuos de guanina (**Fig. 34**).

En consecuencia, los halogenoderivados del uracilo favorecen la aparición de transiciones durante la replicación del genoma celular del tipo G→A y C→T .



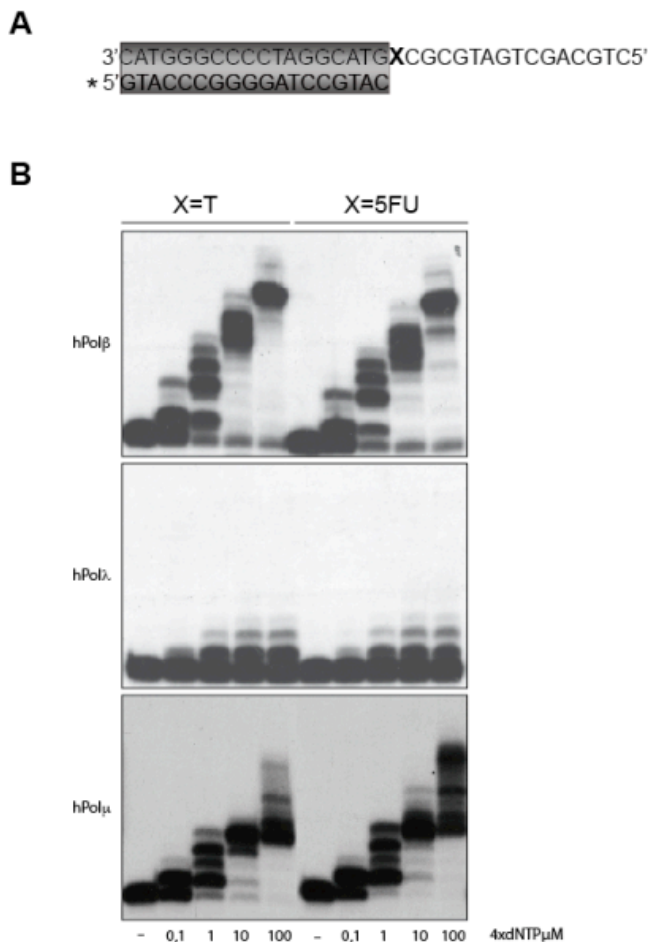
**Figura 34. Promiscuidad en el apareamiento de bases por 5FU.** (A) 5FU aparea con A con una estructura de tipo Watson-Crick. (B) La naturaleza del átomo de flúor permite teóricamente a 5FU varias posibilidades de apareamiento incorrecto con G. La alta electronegatividad del flúor altera la densidad electrónica del anillo de pirimidina induciendo eventualmente una carga positiva en la molécula, incrementando la probabilidad de perder un protón en la posición N-1, lo que conduce a la transformación de la forma cetónica (grupo=O en el C-6 del anillo) a la forma enólica (-OH) en un proceso independiente de pH. Con esta forma puede aparearse con G con una estructura de tipo Watson-Crick (1). 5FU en la forma cetónica (=O) puede aparearse con G con un apareamiento con estructura inestable denominada *wobble* o tambaleante (2). La forma cetónica (=O) puede pasar a la forma ionizada (O-) en un proceso dependiente de pH. 5FU en la forma ionizada puede aparearse con G en una estructura de tipo Watson-Crick (3). En estructuras de DNA y RNA solamente se han observado apareamientos de tipo 2 y 3 (Champe y Benzer, 1962, Sahasrabudhe y Gmeiner, 1997, Sahasrabudhe y cols., 1995, Sahasrabudhe y cols., 1996, Sowers y cols., 1988, Sowers y cols., 1989, Yu y cols., 1993). R, ribosa.

Se ha descrito la capacidad de Pol $\alpha$  y Pol $\beta$  de incorporar el 5FdUTP en el DNA (Tanaka y cols., 1981). Sin embargo, se desconoce hasta el momento la respuesta de las DNA polimerasas a la presencia de 5FU en el molde durante la síntesis. El

comportamiento en presencia de 5FU en el molde o como nucleótido a incorporar podría condicionar en gran medida la respuesta a tratamientos en los que se use este antimetabolito como droga antitumoral. Por esta razón nos interesó evaluar las DNA polimerasas de la familia X en cuanto a la capacidad de insertar 5FU y tolerar su presencia en el molde.

#### 4.1.1 Diversidad en comportamiento de inserción frente a 5FU de los miembros de la familia X de DNA polimerasas.

Analizamos la capacidad de síntesis de Pol $\beta$ , Pol $\lambda$  y Pol $\mu$  en un contexto de molde/iniciador abierto, donde la primera base molde a copiar es 5FU o su correspondiente control T. Las tres DNA polimerasas fueron capaces de tolerar la presencia de 5FU en el DNA, incorporando dNTPs sobre el molde con la lesión 5FU con la misma eficiencia con la que polimerizan sobre el molde control sin daño (**Fig. 35**). Sin embargo, se observa una diferencia relativa en la eficiencia de estas enzimas, que puede deberse a la diferente preferencia de sustrato por parte de cada polimerasa.



**Figura 35. Síntesis a través de 5FU.**

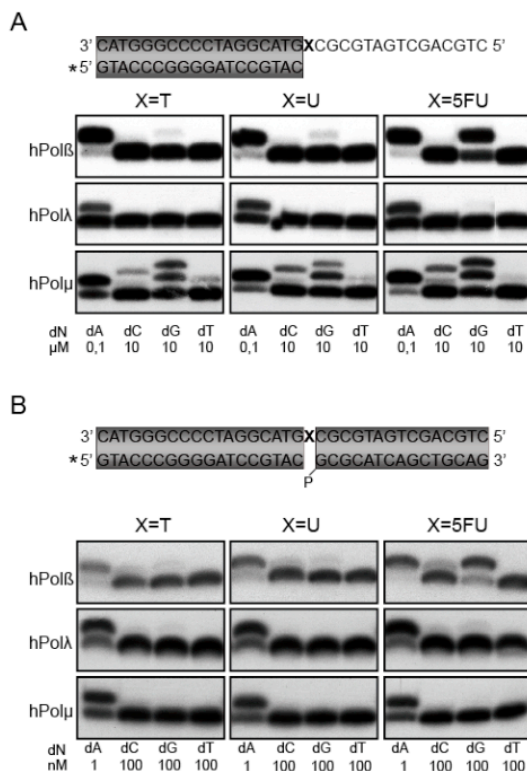
(A) Secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. (B) Ensayo de síntesis a través de la lesión 5FU por hPol $\lambda$ , hPol $\beta$  y hPol $\mu$ . Como control, se llevó a cabo la reacción sobre una molécula de DNA que contiene una T en la misma posición de la lesión (X). El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor es Mg<sup>2</sup>. La concentración de dNTPs es la indicada en cada caso.

Para analizar qué nucleótido era insertado frente a 5FU se realizaron ensayos de polimerización suministrando cada uno de los cuatro nucleótidos por separado. Así se evaluará únicamente la 1ª posición en el caso de dA, dC y dT, y la posible inserción de dos nucleótidos al suministrar dG, complementario también a la 2ª posición del molde. En este caso se llevaron dos controles, en los que la base molde era dU, o bien dT en lugar de 5FU. Como se observa en la **figura 36**, en un contexto molde/iniciador abierto,

## RESULTADOS

si bien las tres DNA polimerasas incorporan preferentemente el nucleótido correcto (dA) con aproximadamente la misma eficiencia frente a las tres bases analizadas, el comportamiento en la inserción de los otros nucleótidos es bien distinto. Si forzamos 100 veces la concentración de dG, hPol $\beta$  fue capaz de insertarlo erróneamente frente a dT y dU. De igual manera fue capaz de insertar dG frente a 5FU pero con mayor eficiencia que frente a los moldes control. Sin embargo, y a pesar de que la 2<sup>a</sup> base molde a copiar es también una dC, no se observa extensión del dG insertado. Esto nos indica que hPol $\beta$  podría no extender bien el par de bases recién formado, 5FU:dG, o bien que la inserción de dG podría estar ocurriendo mediante dislocación de la hebra molde, y dirección de la 2<sup>a</sup> base del mismo (dC).

hPol $\lambda$  presenta menos eficiencia en la inserción del correcto (dA) en los tres moldes analizados comparando con hPol $\beta$  y hPol $\mu$ , debido a su comportamiento menos eficiente en este tipo de moldes. Por esta razón no podemos afirmar que un exceso de 100 veces del nucleótido dG frente a dA, no llegase a producir error de inserción en los moldes dT y dU, en una proporción similar a la observada con hPol $\beta$ . Sin embargo, en el molde 5FU el nivel de actividad sigue siendo muy bajo con dG por lo que es muy probable que no ocurra inserción de dG frente a 5FU.



**Figura 36. Inserción frente a 5FU.**

La secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo se representa en la parte superior de cada apartado. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. Ensayo de inserción frente a la base 5FU por hPol $\lambda$ , hPol $\beta$  y hPol $\mu$  en molde/cebador abierto (A) y *gap* de un nucleótido (B). El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM de DNA y 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor fue Mg<sup>2+</sup>. La concentración de dNTPs fue la indicada en cada caso.

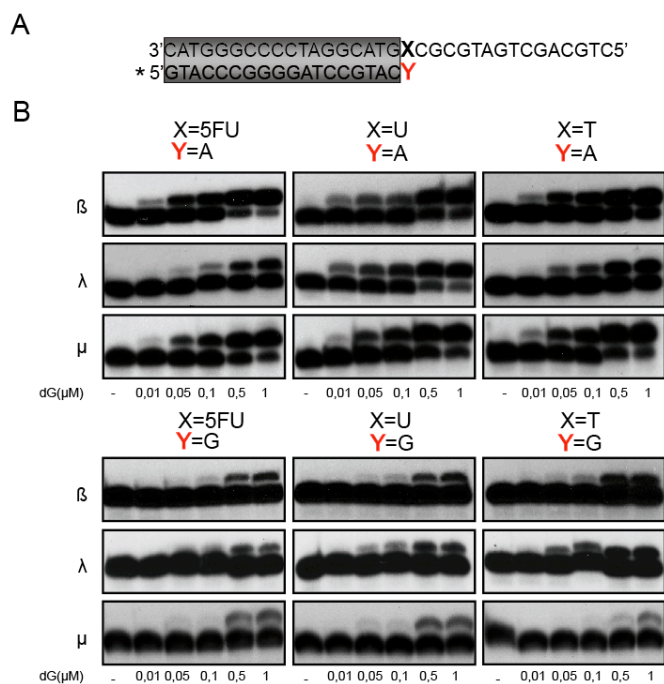
Por su parte, hPol $\mu$  además del correcto dA, incorpora dG cuando es forzado 100 veces, llegando hasta la posición +2 frente a cualquiera de los tres moldes analizados y con mayor eficiencia en el caso de 5FU en el molde. Según la secuencia del molde utilizado se podría insertar dG además de frente a 5FU posición +1 del molde, frente a la posición +2. Se ha descrito la capacidad de hPol $\mu$  de poder dislocar el molde (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004), de modo que la entrada del nucleótido venga dirigida por posiciones adyacentes en el molde alejadas del extremo del molde iniciador. Por esta razón es posible que hPol $\mu$  pueda estar insertando dG principalmente frente a la posición +2 del molde, saltándose la posición +1 como parece

ocurrir en cualquiera de los tres molde utilizados. Posteriormente puede que recoloque el molde sería recolocado de forma que se vuelva a insertar dG frente a la posición +2. Esta actividad de dislocación puede estar enmascarando la posible inserción frente a posición +1 de dG, por lo que no se puede descartar que en el ensayo se estén produciendo las dos reacciones. Por otro lado, hPol $\mu$  puede insertar dC, llegando incluso a formar un +2. Podría estar ocurriendo la inserción de dC frente a la base dG del molde en posición -1, por la capacidad de Pol $\mu$  de generar distorsiones en el iniciador (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004).

En un contexto de reparación, como en es el caso de un *gap* de pequeño tamaño, las tres DNA polimerasas nuevamente insertan de forma preferente el nucleótido correcto dA frente a cualquiera de las tres bases utilizadas como molde pero esta vez, con similar eficiencia. La cuantificación de la velocidad de inserción de dA frente a T o 5FU en el molde reveló que hPol $\lambda$ , hPol $\beta$  y hPol $\mu$  insertan el nucleótido correcto 1.4, 1.1 y 1.1 veces mejor frente a 5FU que frente a T, respectivamente. En este contexto, hPol $\beta$  es la única capaz de insertar el nucleótido incorrecto dG frente a 5FU si bien es necesario aportar un exceso de 100 veces en relación al nucleótido correcto (dA). hPol $\beta$  incorpora el nucleótido incorrecto frente a 5FU 7,3 veces mejor que frente a T como molde. La inserción de dG frente a 5FU de hPol $\beta$  es real, y no debida a dislocación, ya que en estas condiciones (*gap* de 1 nt) no se favorece la dislocación, cosa que queda clara al observar el patrón de hPol $\mu$  que es únicamente capaz de insertar dA.

### 4.1.2 Diferencias en la extensión de bases apareadas a 5FU de los miembros de la familia X de DNA polimerasas.

La extensión de los pares de bases generados tras la incorporación de un nucleótido frente a 5FU es un paso importante a la hora de la fijar las posibles mutaciones en el DNA y por tanto, del efecto de la droga antitumoral. La eficiencia en este paso determinará la fijación o no en función de cual sea el par que se extienda y por lo tanto las consecuencias que desencadene 5FU como droga antitumoral. Como se observa en la **figura 37** las tres DNA polimerasas extienden el par correcto 5FU:dA con la misma eficiencia que la extensión de los pares de bases usados como control dT:dA y dU:dA. Si bien, hPol $\lambda$  es más eficiente a la hora de extender el par formado por dU:dA. En cuanto a la extensión del par 5FU:dG, hPol $\beta$  extiende con menos eficiencia (aproximadamente 10 veces) que el par 5FU:dA. Este nivel de inserción es similar al de los pares incorrectos dT:dG y dU:dG.



**Figura 37. Extensión de los pares de bases 5FU:A y 5FU:G.**

(A) Secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. (B) Ensayo de extensión por hPol $\lambda$ , hPol $\beta$  y hPol $\mu$ , de los pares de base formados 5FU:A o 5FU:G en comparación a los pares de bases usados como control dT:dA o dT:dG y dU:dA o dU:dG. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM de DNA y 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor fue Mg<sup>2+</sup>. La concentración de dGTP fue la indicada en cada caso.

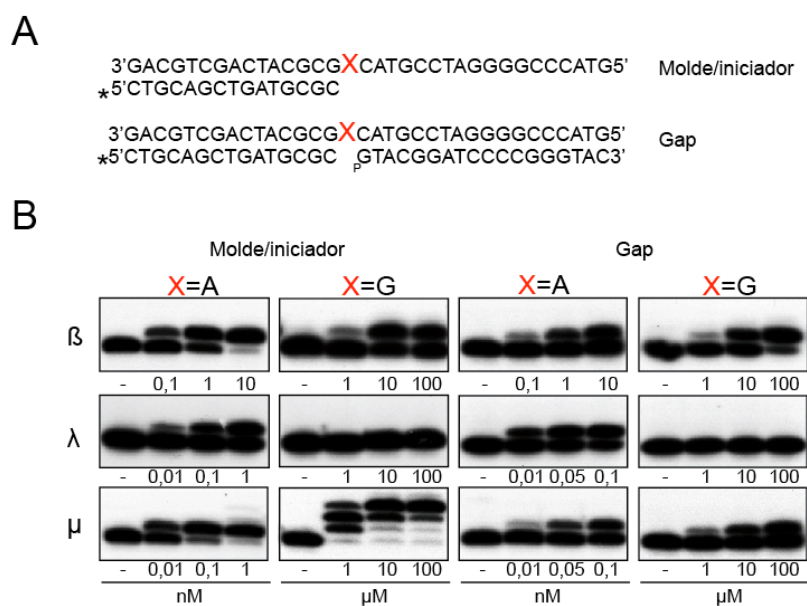
Por su parte, hPol $\lambda$  es la enzima que más eficientemente extiende estos tres desapareamientos debido a su capacidad ya descrita para la extensión de extremos desapareados (Picher y cols., 2006), alcanzando niveles de extensión del par 5FU:dG similares al par correcto 5FU:dA. hPol $\mu$  presentan una eficiencia menor en la extensión del par mutagénico 5FU:dG. Esta extensión, al igual que hPol $\beta$ , es similar a la de los otros dos desapareamientos dT:dG y dU:dG.

### 4.1.3 Inserción de 5FdUTP en el DNA

Como ya se ha mencionado anteriormente en esta tesis doctoral, el 5FU penetra en la célula de igual manera que el U. Una vez dentro puede ser fosforilado e incorporado en el DNA y el RNA (Fig. 26).

A continuación nos planteamos analizar la habilidad de inserción del 5FdUTP de estas tres DNA polimerasas de la familia X. Se diseñaron oligonucleótidos con las dos posibilidades de formar pares de bases con el 5FU. 5FdUTP puede ser insertado “correctamente” frente a dA o de una manera “mutagénica” frente a dG. El análisis se planteó en ambos contextos de secuencia, replicativo en un sustrato molde/iniciador abierto o en procesos de reparación con *gaps* de pequeño tamaño. El ensayo se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos.





**Figura 38. Inserción de 5FdUTP.**

(A) Secuencias de las moléculas de DNA utilizadas como sustrato en el ensayo. (B) Ensayo de inserción de 5FdUTP frente a las bases molde dA y dG por hPol $\lambda$ , hPol $\beta$  y hPol $\mu$ , en contexto molde/iniciador abierto (parte izda.) y gap de 1 nucleótido (parte dcha.). El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM de DNA y 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor fue Mg<sup>2+</sup>. La concentración de 5FdUTP fue la indicada en cada caso.

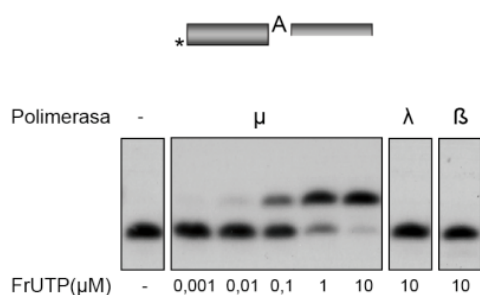
Tanaka y cols. Describieron, ya en 1981, la capacidad de Pol $\alpha$  y Pol $\beta$  de incorporar el 5FdUTP. Nuestros ensayos corroboran esta capacidad de Pol $\beta$ .

Las tres DNA polimerasas insertan 5FdUTP preferentemente frente a dA como molde. Si bien, hPol $\lambda$  lo hace algo menos eficientemente que hPol $\beta$  y hPol $\mu$  (Fig. 6). Sin embargo, la inserción de 5FdUTP frente a dG es solo llevada a cabo por hPol $\beta$  y hPol $\mu$ . Este comportamiento sugiere en una mejor respuesta a la droga antitumoral por parte de tumores que sobreexpresen hPol $\beta$  y hPol $\mu$ , ya que estos tumores insertaran con mayor efectividad el nucleótido frente a las dos posibilidades de molde, favoreciendo el efecto de la droga. Por el contrario, hPol $\lambda$  presenta una vez más un comportamiento libre de error, por lo que la respuesta ante la droga sería menos efectiva al participar en el 50% de las incorporaciones de 5FdUTP en el DNA.

#### 4.1.4 Inserción de 5FrUTP en el DNA

El 5FU podría ser convertido a su vez en 5FrUTP, pudiendo ser incorporado en el DNA. hPol $\mu$  es la única dentro de la familia X de DNA polimerasas capaz de incorporar ribonucleótidos (Ruiz y cols., 2003). Por esta razón nos planteamos la capacidad de inserción de 5FrUTP en el DNA.

Como se observa en la figura 39 solo hPol $\mu$  fue capaz de incorporar 5FrUTP frente a dA en el molde. hPol $\mu$  podría ser una de las enzimas responsables de la inserción de 5FU en el DNA.

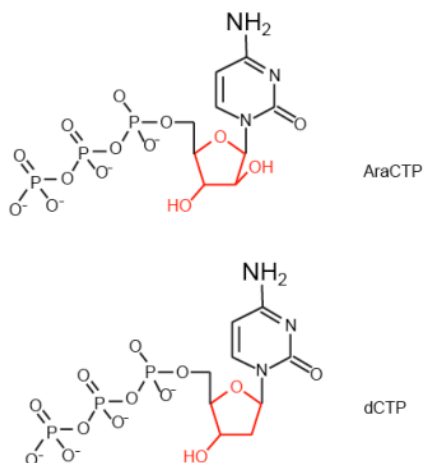


**Figura 39. Inserción de 5FrUTP.**

Ensayo de inserción de 5FrUTP frente a las bases molde dA por hPol $\mu$  y hPol $\lambda$ , hPol $\beta$ , en contexto molde/iniciador abierto. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM de DNA y 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor fue Mg<sup>2+</sup>. La concentración de 5FrUTP fue la indicada en cada caso.

#### 4.2 Actividad DNA polimerización en presencia de 1- $\beta$ -D-arabinofuranosilcitosina-5'-trifosfato (AraCTP).

A continuación quisimos probar AraCTP, otro análogo de nucleótido empleado como terapia antitumoral con gran éxito en leucemia mielógena (Freireich, 1987; Keating y cols. 1982; Mastrianni y cols., 1992). AraC es un análogo del nucleósido citosina, que posee arabinosa en lugar de la ribosa o la deoxirribosa (**Fig. 40**). El mecanismo de acción de AraC también denominada Citarabin, comienza una vez dentro de la célula donde es metabolizado a AraCMP que por sucesivas fosforilaciones pasa a AraCTP pudiendo ser introducido en el DNA (Cozzarelli y cols., 1977). Se ha descrito que AraC inhibe la proliferación celular y la replicación en células de mamífero (Graham y cols., 1970). Sin embargo, existen varias hipótesis acerca de cual es el mecanismo por el que media su efecto. Por un lado, se ha descrito la inhibición de la replicación porque AraCTP y dCTP compiten por el sitio de unión a la Pol $\alpha$  inhibiendo su actividad enzimática (Furth y Cohen, 1968). Por otro lado, otros autores atribuyen como causante de la inhibición de la replicación a la incorporación en el DNA (Kufe y cols., 1980; Major y cols, 1981). Existen estudios que describen que la incorporación en el DNA inhibe la iniciación de la síntesis de DNA (Bell y Fridland, 1980; Fridland y cols., 1977a y 1977b). Sin embargo, otros estudios describen que la presencia de AraCMP en el extremo 3' del DNA interfiere con la elongación del DNA que se está replicando y no con la iniciación de la síntesis (Mikita y Beardsley, 1988; Ohno y cols, 1988; Perrino y Mekosh, 1992). Bloquea por tanto el avance de la replicación del DNA, causando problemas en la viabilidad celular.

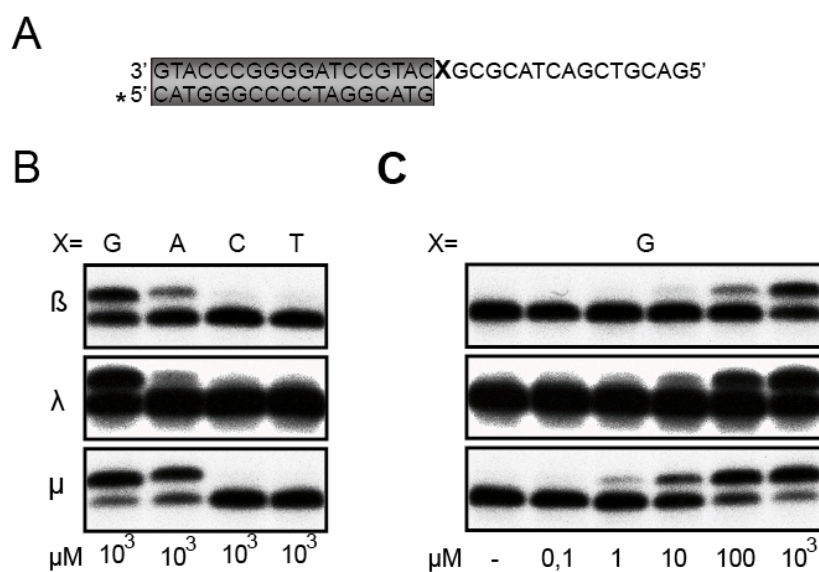


**Figura 40. Estructura química del AraCTP y dCTP.**

Se resalta en rojo el azúcar, arabinosa y deoxirribosa presentes en AraCTP y dCTP respectivamente.

Nos planteamos, por tanto, estudiar la capacidad de incorporar este análogo de dCTP, por los distintos miembros de la familia X de DNA polimerasas humanas, hPol $\beta$ , hPol $\lambda$  y hPol $\mu$ .

En primer lugar analizamos en un sustrato de molde/iniciador si la entrada de este análogo es dirigida por molde. Como se observa en la **figura 41** las tres DNA polimerasas podrían participar en el proceso de inserción de AraCTP. Así las tres enzimas prefieren insertar el análogo frente a dG como molde (**Fig. 41A**), siendo hPol $\mu$  la de mayor eficiencia (**Fig. 41B**). Por otro lado y en función de la secuencia molde utilizada, podría ocurrir un segundo evento de polimerización frente a la segunda base del molde (también dG), correspondiente a la elongación del AraCTP insertado. Como se observa en la **figura 41**, no existe un producto en posición +2. Se confirma por tanto, que el par dC:AraCTP no puede ser elongado. Además, las tres DNA polimerasas insertan AraCTP frente a dA como molde aunque con diferente eficiencia relativa ( $\mu > \lambda > \beta$ ) a su inserción frente a dG (**Fig. 41C**). Esto podría ser explicado por un proceso de dislocación de la hebra molde siendo la segunda base del molde (dG) la que dirigiese la inserción. Sin embargo, esta posible dislocación podría ocurrir igual en los otros dos moldes analizados, lo que confirma que las tres DNA polimerasas están insertando AraCTP frente a dA.



**Figura 41. Inserción de AraCTP.**

(A) Secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. (B) Ensayo de inserción de AraCTP por hPol $\lambda$ , hPol $\beta$  y hPol $\mu$  frente a las cuatro posibles bases molde en un contexto de molde/iniciador abierto. (C) Ensayo de inserción de AraCTP por hPol $\lambda$ , hPol $\beta$  y hPol $\mu$  frente a dG en función de la concentración de AraCTP. Los ensayos se realizaron tal y como se describe en Materiales y Métodos empleando 100 nM de cada polimerasa, 5 nM del sustrato, 2,5 mM de MgCl $_2$  como metal activador y la cantidad indicada de AraCTP en cada caso.

### 4.3 Reparación por Escisión de Base (BER)

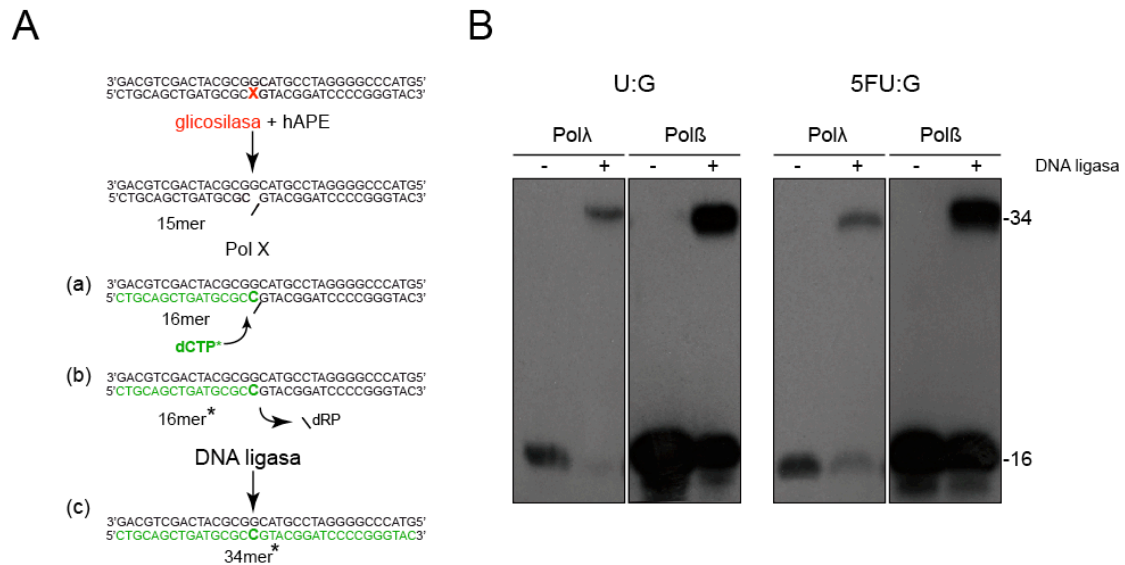
#### 4.3.1 Uracilo y 5FU en el DNA

El DNA genómico es de forma inherente inestable y se descompone espontáneamente por hidrólisis (Lindahl, 1993). A su vez, puede ser dañado por agentes externos del medio ambiente y/o por radiación. Ya se ha comentado con anterioridad que las especies reactivas de oxígeno son los mayores agentes que contribuyen a dañar el DNA. Un ejemplo es el 8oxoG ya mencionado anteriormente y que puede causar mutaciones por generación de transversiones G:C a T:A (Slupphaug y cols., 2003). Otra lesión que se produce en la célula con una frecuencia de 70-200 veces al día por célula es la deaminación de citosinas (Lindahl, 1993). El uracilo en el DNA produce transiciones G:C a A:T si no es detectado y reparado a tiempo. Este tipo de transición es la más común en el genoma de mamíferos, al igual que en las células tumorales. El uracilo en el DNA desencadena una serie de cascadas de señalización de daño, mientras que su presencia puede ser aceptada de forma normal en el RNA. En ausencia de un sistema que repare esta lesión y con la frecuencia que se produce podría llegar a ser letal para la célula. Es por ello que se han desarrollado sistemas de reparación en los que están implicadas DNA glicosilasas (Krokan y Slupphaug, 2002) que en colaboración con DNA polimerasas restablezcan la secuencia original. En mamíferos existen cinco uracil glicosilasas con funciones bien diferenciadas. La uracil DNA glicosilasa nuclear (UNG2) que contribuye a la reparación del U incorporado frente a una A una vez que ha pasado la replicación, y el uracilo de los pares de bases dU:G formado durante el proceso de hipermutación somática que contribuye a la generación de variabilidad en los genes de inmunoglobulinas (Imai y cols., 2003). La uracil DNA glicosilasa monofuncional de cadena sencilla (SMUG1) participa en la reparación de U:G (Nilsen y cols., 2001) y de análogos de uracilos (5-hidroximetiluracilo, 5FU, carboxiuracilo...) (An y cols., 2007; Kavli y cols., 2007). Aunque descrita como específica sobre DNA de cadena sencilla, Kavli y cols., describieron que la actividad en banda doble fuertemente estimulada por la presencia de la endonucleasa AP 1 (Kavli y cols., 2002). Esta glicosilasa está presente en vertebrados y en bacterias, y no tiene una actividad redundante con UNG2 (Pettersen y cols., 2007). La DNA glicosilasa de Timina (TDG) es una glicosilasa que repara el desapareamiento T:G (Neddermann y Jiricny, 1993) pero contribuye asimismo en la escisión de uracilos y 5FU (Cortazar y cols., 2007; Hardeland y cols., 2003; Hardeland y cols., 2000). La proteína 4 de unión a metil CpG (MBD4) contribuye a la reparación del par de bases formado por U:G en las islas CpG. Por último, UNG1 está encargada de la escisión del uracilo en el DNA mitocondrial (revisado por Visnes y cols., 2010).

##### 4.3.1.1 Reconstitución *in vitro* de BER

Se ha descrito que SMUG1 y la hPol $\lambda$  co-inmunoprecipitan (Braithwaite y cols., 2005), por lo que ambas enzimas podrían participar en la reparación de 5FU. Para analizar si hPol $\lambda$  era capaz de participar en la reparación de 5FU en el DNA en colaboración con SMUG1 realizamos la reconstitución *in vitro* de un ensayo de BER utilizando sustratos de DNA con 5FU apareado a dG. Como comparación realizamos la reconstitución *in vitro* de sustratos con un U apareado a dG en los que está implicada la UDG y Pol $\beta$  (Sobol y cols., 1996). Como se observa en la **figura 42**, tanto hPol $\lambda$  como hPol $\beta$  con mayor eficiencia, son capaces de reconstituir el mecanismo de reparación por

escisión de base en el que participa UDG sobre el molde conteniendo el par U:G. La polimerasa es capaz de introducir el [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP en sustitución del U y eliminar el residuo dRP, dando un producto de 16 pb. En presencia de la ligasa se finalizará la reparación resultando un producto de 34 pb. De igual manera ambas polimerasas son capaces de llevar a cabo los pasos de síntesis y dRP liasa asociados a la reparación por BER, iniciada por SMUG1, del par 5FU:G.



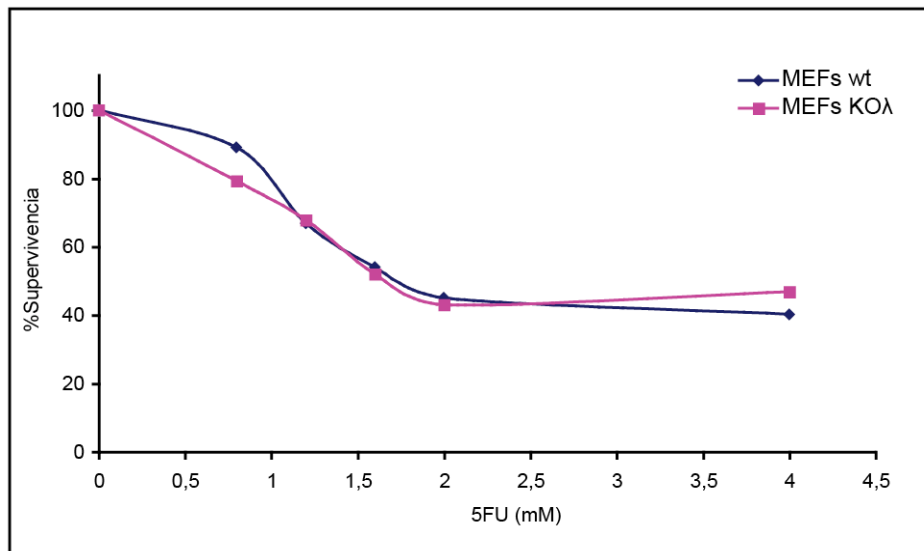
**Figura 42. Reconstitución in vitro de BER.**

(A) Representación esquemática de la reacción. Un oligonucleótido de doble cadena de 34 pb que contiene un U o un 5FU en posición 16 es tratado con las glicosilasas hUDG o hSMUG1 respectivamente, y hAPE para escindir la base dañada y generar el corte. La polimerasa es capaz de introducir el [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP en sustitución del U y 5FU (a) y eliminar el residuo dRP (b). En presencia de ligasa se finalizará la reparación dando un producto de 34 pb (c). (B) Reconstitución in vitro de la reparación por escisión de base (BER) por parte de hPol $\lambda$  y hPol $\beta$ . La reacción se hizo como se describe en Materiales y Métodos con 100 nM de cada enzima. Cuando se indica se añade DNA ligasa.

#### 4.3.1.2 Sensibilidad a 5FU de células deficientes en Pol $\lambda$

Otro de los efectos del 5FU es la bajada en la reserva de nucleótidos por bloqueo de la timidilato sintasa (TS) (Santi y cols., 1974). Por su parte Pol $\lambda$  es capaz de actuar en situaciones extremas de baja proporción de dNTPs por su baja Km (García-Díaz y cols., 2002). Por tanto, la falta de Pol $\lambda$  podría originar una hipersensibilidad a 5FU. Bajo estas dos premisas nos planteamos estudiar la posible sensibilidad a 5FU en fibroblastos embrionarios derivados del modelo de deficiencia en Pol $\lambda$  (MEFs KO $\lambda$ ).

Sorprendentemente, como se observa en la **figura 43**, los MEFs KO $\lambda$  presentaban una tendencia a ser igual de sensibles a 5FU que MEFs de la colonia silvestre.



**Figura 43. Sensibilidad a 5FU.**

Ensayo de sensibilidad de los MEFs wt y KOλ a 5FU. El ensayo se realizó como se detalla en Materiales y Métodos, sembrando 2000 células. Su viabilidad fue medida pasados 3 días en presencia de las cantidades indicadas de 5FU.

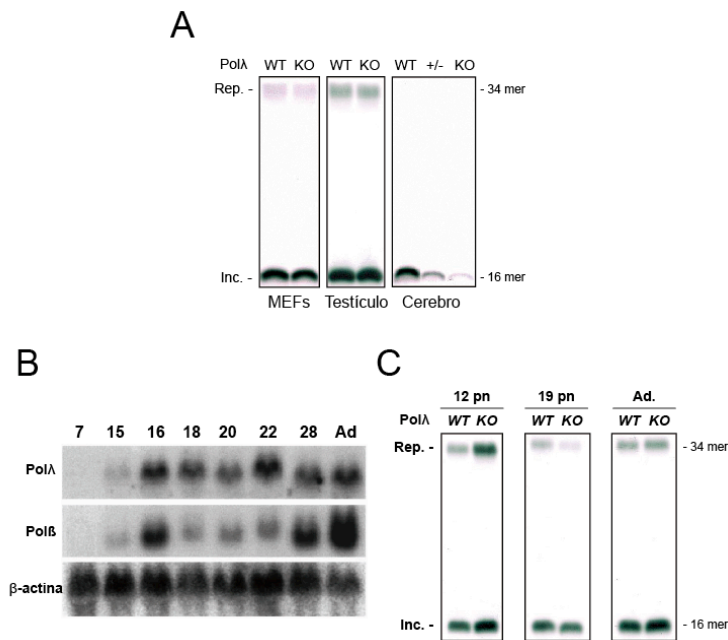
### 4.3.1.3 Capacidad de reparación utilizando extractos de testículo y cerebro derivados del modelo murino de deficiencia en Polλ de la lesión 5FU.

La capacidad de reparación de uracilo fue objeto de estudio de la tesis doctoral del Dr. Angel Picher donde se apoyó un papel de Polλ en BER en cerebro y en el desarrollo postnatal del testículo. Esta conclusión se basó en las diferencias encontradas en ensayos de reparación con extractos de tejido cerebral adulto y tejido de testículo en desarrollo (**Fig. 44**).

En relación a esta conclusión, nos propusimos evaluar la capacidad de reparación 5FU apareado frente a G como o frente a A utilizando extractos derivados del ratón KOλ. Como comparación llevamos los sustratos que presentaban un residuo de U, apareado frente a G o frente a A.

Se prepararon extractos totales de testículo adulto del modelo wt y deficiente en Polλ mediante el método basado en el descrito por Bialde y cols., (1998). Se eligió el testículo debido a la alta expresión de Polλ en este órgano y a las diferencias de expresión entre Polλ y Polβ encontradas durante el desarrollo (García-Díaz y cols., 2000).





**Figura 44. Estudio de la capacidad de reparación de los tejidos y células derivadas del modelo murino deficiente en Polλ.**

(A) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 15 μg para los MEFs, 10 μg para los extractos de testículo y 20 μg para los extractos de cerebro. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min. Figura tomada de Picher 2007, Tesis Doctoral. (B) Expresión génica en testículo de Polλ y Polβ. Detección mediante la técnica de Northern Blot del RNA mensajero de Polλ y Polβ durante el desarrollo post-natal en testículo. El análisis del RNAm de β-actina se muestra como control de carga. Figura tomada de García-Díaz y cols., 2000. (C) Análisis de la capacidad de reparación por BER de extractos celulares totales derivados de testículos de diferentes días de desarrollo post-natal. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 5 μg. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min. Figura tomada de Picher 2007, Tesis Doctoral.

El ensayo consiste en incubar los extractos con el sustrato de DNA (diferentes moléculas de doble cadena de 34 pb no marcado con Uracilo, 5FU u otros nucleótidos control en posición 16) y un nucleótido marcado radiativamente (Fig. 45A, ver Materiales y Métodos). En el caso de que se produzca la sustitución del U y del 5FU se obtendrá un producto de 16 pb correspondiente a la eliminación de la base dañada y posterior inserción del nucleótido marcado. Si posteriormente se produce ligación, obtendremos un producto de 34 pb.

Como se aprecia en la figura 45, tanto los extractos wt como los KOλ, presentaron actividad de reparación de niveles similares. Solo los sustratos en los que U o 5FU estaban apareados a G fueron reparados, como se deduce del marcaje radiactivo con dC, que entra en lugar de las bases anómalas. Probablemente el extracto no posea las enzimas necesarias para iniciar la reparación de los pares U:A y 5FU:A. En los otros casos que implica pares no dañados, tanto correctos como incorrectos no se detecta actividad significativa.

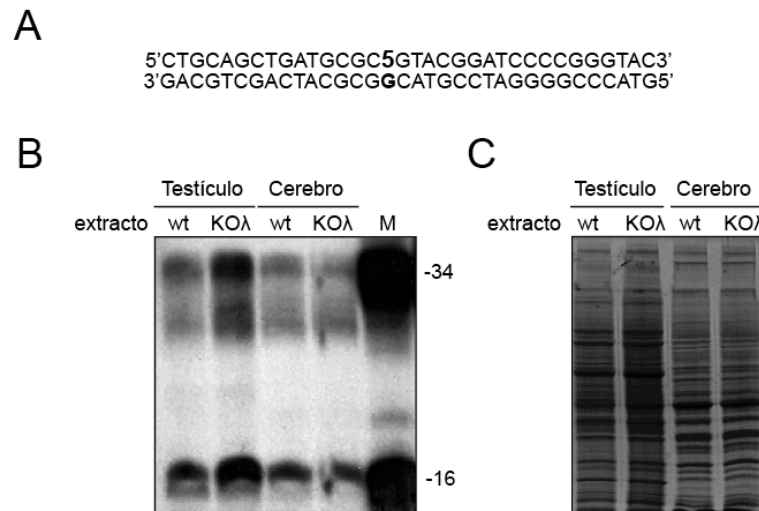


**Figura 45. Estudio de la capacidad de reparación utilizando extractos de testículo.**  
 (A) Secuencia de DNA de las moléculas empleadas como sustrato en el ensayo. El rectángulo representa el par de bases analizado en cada caso. (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 10 μg para los extractos de testículo, y 13.3 nM (0,1 μM) del [α-<sup>32</sup>P]dNTP empleado en cada caso. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

Analizando en más detalle, se puede observar que los extractos KOλ son ligeramente mejores en cuanto a la reparación de U:G y 5FU:G, pero con matices. En cuanto al par 5FU:G, no se aprecia diferencia entre ambos extractos en el producto de +16 resultante de la eliminación del 5FU, corte posterior de la AP endonucleasa e inserción del nucleótido marcado. Sin embargo, el paso de ligación final parece ser mas eficiente en lo extractos KOλ. En lo que respecta al par U:G, existe una proporción mayor tanto de producto de inserción (+16) como del producto ligado (+34) en los extractos KOλ respecto a los extractos wt. A pesar de esto, los resultados no permiten apoyar claramente una función directa de la Polλ en la reparación de 5FU en tejido adulto de testículo.

De igual manera, comparamos la reparación de 5FU:G en tejido de cerebro adulto. Como se aprecia en la **figura 46**, no se alcanzan los mismos niveles de reparación en extractos de cerebro que en extractos de testículo. En testículo se vuelve a apreciar una mejor reparación en el extracto KOλ, tanto en el paso de inserción (+16), como en el de reparación (+34). Sin embargo, en cerebro si se puede apreciar una ligera bajada del producto final reparado en los extractos de cerebro KOλ, sugiriendo un posible papel de Polλ en la reparación de 5FU:G en tejido cerebral adulto.





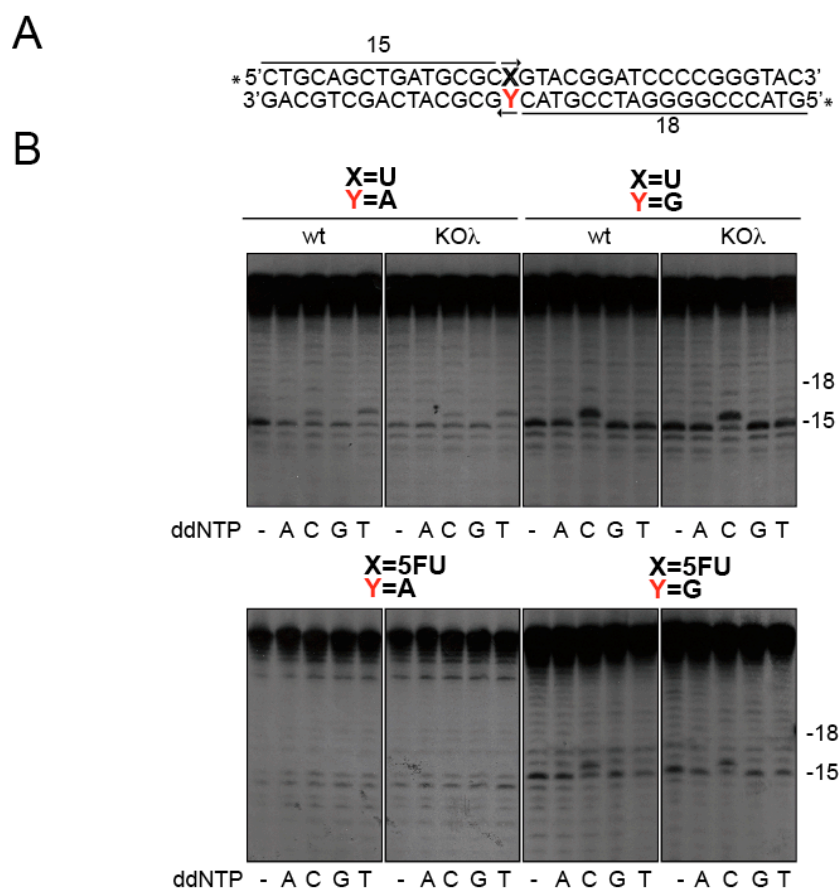
**Figura 46. Estudio de la capacidad de reparación de 5FU:G en testículo y cerebro adulto del modelo murino deficiente en Polλ .**

(A) Secuencia del híbrido empleado como sustrato en el ensayo. (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto celular total de 10 μg para los extractos de tejido adulto, y 13.3 nM (0,1 μM) del [α-<sup>32</sup>P]dNTP empleado en cada caso. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min. (C) Tinción con azul de Coomassie de las proteínas presentes en cada extracto.

A continuación quisimos comprobar la capacidad de reparación de lesiones por BER con extractos mediante el empleo de ddNTPs. La ventaja principal del uso de ddNTPs es que permite ver el paso de inserción de una forma clara (no es posible su elongación ni el paso de ligación) y por otro restringe la actividad únicamente a las polimerasas que son capaces de insertar este tipo de nucleótidos, como son las DNA polimerasas de la familia X.

El ensayo consiste en suministrar a los extractos un híbrido de DNA marcado radiactivamente con el isótopo <sup>32</sup>P en el extremo 5' de cada una de las cadenas. De esta forma se puede visualizar lo que está ocurriendo en ambas cadenas del sustrato. La lesión se encuentra en posición no simétrica respecto a los extremos por lo que el tamaño de los productos indica la cadena en la que está ocurriendo la inserción (**Fig. 47A**). A su vez se suministra cada ddNTP por separado.

Como se observa en la **figura 47B**, en la reparación de U:A aparece un producto de 15 nucleótidos que podría corresponder a la eliminación de la basa dañada ya que se observa también en el control sin ddNTPs. Este producto se extiende a +16 con ddT , lo que podría corresponder a la substitución del residuo de U. Se observa a su vez una extensión a +16 al añadir ddC que podría ser un apareamiento incorrecto ddC:dA tras la eliminación del U. Alternativamente, se podría tratar de una inserción correcta (ddC:dG) a partir de un producto de degradación de la cadena que no contiene el U.



**Figura 47. Estudio de la capacidad de reparación mediante el empleo de ddNTPs utilizando extractos derivados de testículo del modelo murino deficiente en Polλ.**

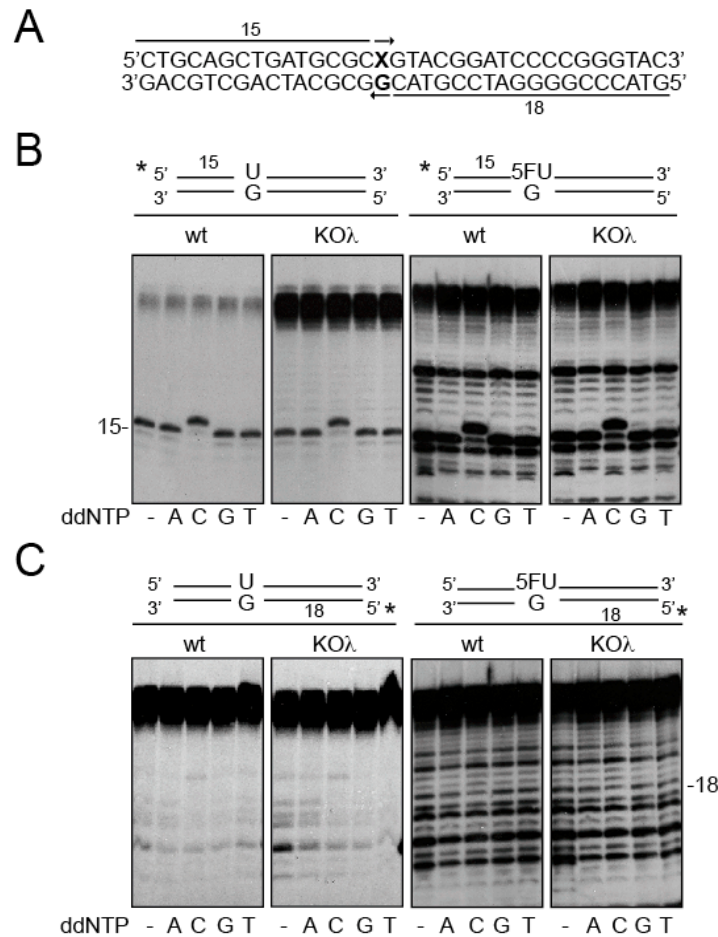
(A) Secuencia del híbrido empleado como sustrato en el ensayo. Cada cadena se encuentra marcada en su extremo 5' con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP. (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto celular total de 10  $\mu\text{g}$  para los extractos de tejido adulto, y 100  $\mu\text{M}$  de cada ddNTP por separado. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

Sin embargo, no se aprecia ninguna reparación en el molde 5FU:A. Podría ocurrir que este par de bases no fuera reconocido como un error y/o se necesite algún enzima no presente en nuestro extracto.

En el caso de U:G, se aprecia una fuerte inserción de ddC como consecuencia de la eficaz reparación del U por un proceso de BER. Al comparar la actividad de los extractos KOλ vemos que no existen diferencias en cuanto a la reparación en ausencia de Polλ. Por tanto, Polλ no sería esencial para la reparación de este tipo de lesiones en extractos de testículo adulto. Asimismo, se aprecia una clara inserción de ddC por reparación del 5FU apareado a G. De nuevo no se aprecia diferencia entre los extractos wt y KOλ. Por lo que tampoco Polλ sería esencial para la reparación del 5FU apareado a G en extractos de testículo adulto.

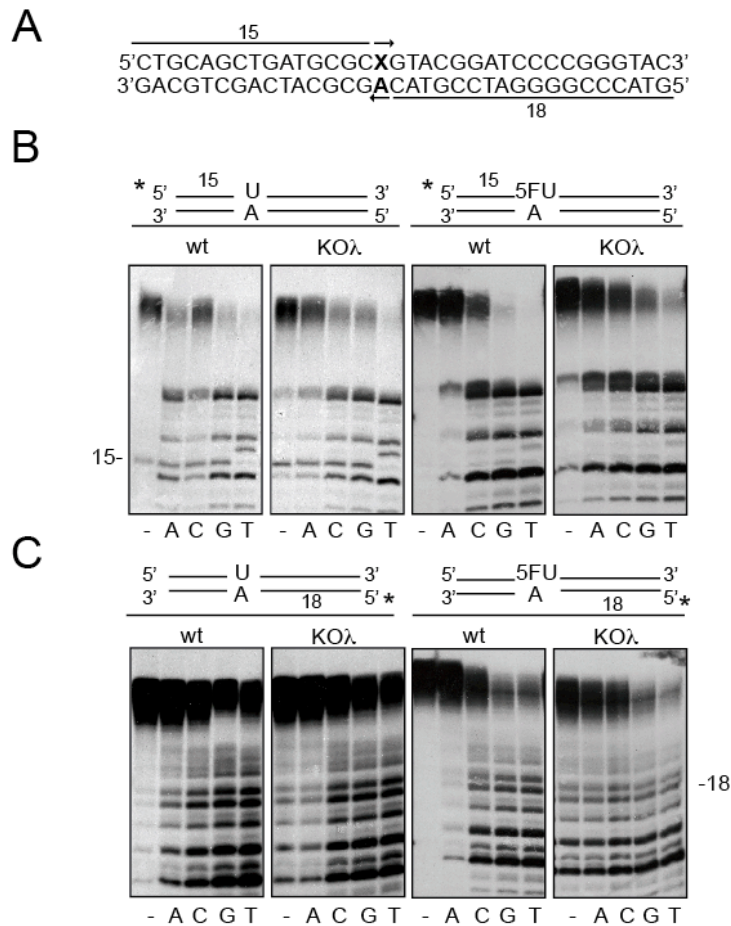
Para comprobar que las inserciones estaban ocurriendo en la cadena donde se encuentra la base dañada, decidimos realizar el mismo abordaje pero suministrando sustratos con una sola cadena marcada en el extremo 5' e hibridada a su complementaria fría.

Solo las cadenas con las bases dañadas, U y 5FU, eran las que presentaban inserción de ddC en el caso de la hibridación frente a G (**Fig. 48B**) y de ddT frente a A (**Fig. 49B**). Cabe destacar que la actividad de reparación de sustratos hibridados a A, tanto U como FU, es menos eficiente que la reparación de sustratos hibridados a G, y que en todos los casos la actividad de los extractos wt y KOλ fue similar.



**Figura 48. Estudio de la capacidad de reparación mediante el empleo de ddNTPs utilizando extractos de testículo.**

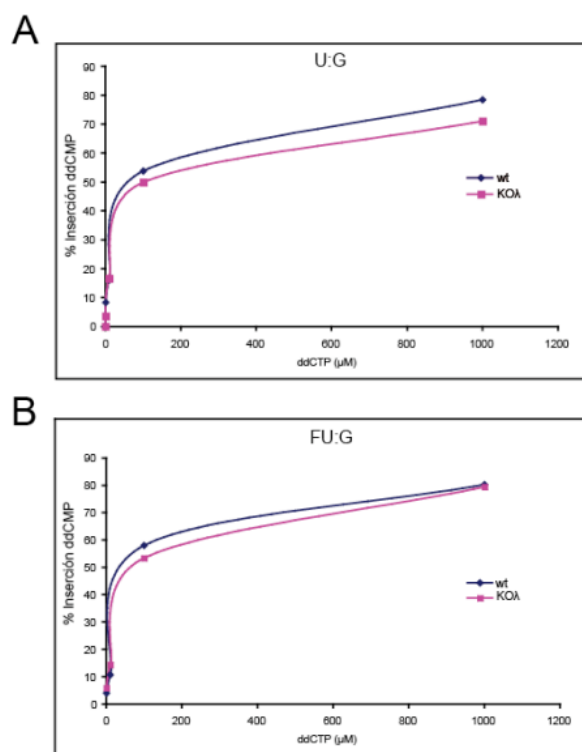
(A) Secuencia del híbrido empleado como sustrato en el ensayo. Sólo una de las cadenas, la cadena dañada (B) o la cadena complementaria (C), se encuentra marcada en su extremo 5' con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto celular total de 10  $\mu\text{g}$  para los extractos de tejido adulto, y 100  $\mu\text{M}$  de cada ddNTP por separado. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.



**Figura 49. Estudio de la capacidad de reparación mediante el empleo de ddNTPs utilizando extractos de testículo.**

(A) Secuencia del híbrido empleado como sustrato en el ensayo. Sólo una de las cadenas, la cadena dañada (B) o la cadena complementaria (C), se encuentra marcada en su extremo 5' con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de 10  $\mu$ g de extracto celular total de tejido adulto, y 100  $\mu$ M de cada ddNTP por separado. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

A continuación se realizó una cinética de la actividad mayoritaria de estos extractos correspondientes a la reparación de U:G y 5FU:G, para apreciar posibles diferencias en condiciones lineales de actividad. Como puede observarse en la **figura 50**, se comprueba que no existen diferencias en la reparación de los dos sustratos utilizando extractos wt y KO $\lambda$ . Esto apoya que Pol $\lambda$  no juega un papel para la reparación de U ni de 5FU apareados a G en testículo adulto.



**Figura 50. Cinética de la reparación de U:G y FU:G utilizando extractos de testículo, mediante el empleo de ddNTPs.**

Cinética de inserción de ddCTP como consecuencia de la reparación del par de bases U:G (A) y FU:G (B) por parte de extractos totales del modelo murino silvestre y de deficiencia en Polλ. El ensayo se realizó como se detalla en Materiales y Métodos empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto celular total de 10 μg para los extractos de tejido adulto, y (1-10<sup>3</sup>) μM ddCTP. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

#### 4.3.2 La Familia X y el daño oxidativo.

Varios grupos han tratado de asignar un papel para Polλ en la reparación del daño oxidativo. Trabajos anteriores realizados con MEFs deficientes en Polλ indicaban que estas células son hipersensibles a tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Braithwaite y cols., 2005a) y entran en estado de senescencia de forma prematura en condiciones de estrés oxidativo (20% O<sub>2</sub>; Bertocci y cols., 2006), aunque no muestran una sensibilidad especial a agentes alquilantes como el MMS (Braithwaite y cols., 2005b). Además, los MEFs deficientes en Polλ son hipersensibles a la incorporación en el DNA de 5-hidroximetil-desoxiuridina, lesión que se genera de manera fisiológica como consecuencia del estrés oxidativo.

Una de las lesiones relacionadas con daño oxidativo más comunes en la célula es la presencia de 8oxoG en el DNA. Es el resultado de la modificación de la base nitrogenada guanina a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8oxoG) que se produce entre 10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup> veces por célula y día (revisado por Beckman y Ames, 1997; Helbock y cols., 1998). Esta lesión es muy peligrosa para la célula, ya que tiene un carácter marcadamente mutagénico, produciendo mutaciones de transición G·C → T·A (Moriya, 1993).

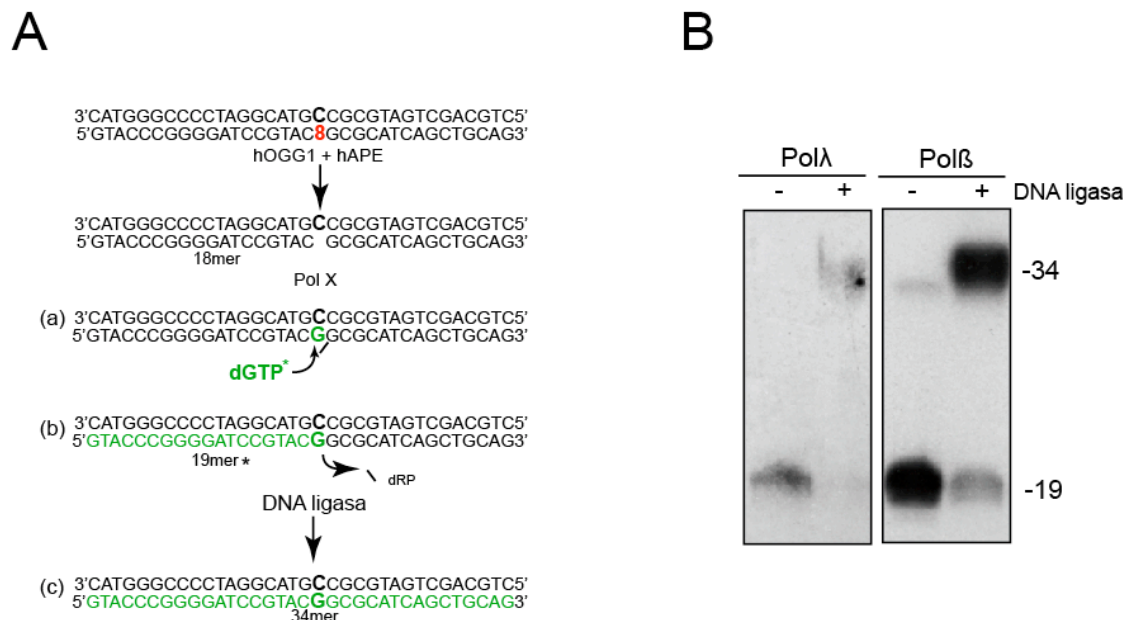
Por otro lado, estudios realizados *in vitro* en nuestro laboratorio con los diferentes miembros de DNA polimerasas de la familia X, determinan que Polλ es capaz de utilizar como molde la base 8oxoG, mostrando una inserción eficiente pero mutagénica, al ser capaz de insertar tanto el nucleótido correcto dC como el incorrecto dA (Picher y Blanco, 2007). Asimismo, Polλ es el enzima de los estudiados hasta la fecha con mayor eficiencia y fidelidad en el paso de extensión de los pares generados frente a 8oxoG al extender muy eficientemente el par correcto 8oxoG:C, por lo que se erige como el mejor candidato para el paso de extensión durante la síntesis a través de

esta lesión, sea en el contexto de la ruta *NHEJ* o en el de la síntesis a través de lesiones asociada a la replicación (Picher y Blanco, 2007).

### 4.3.2.1 Reconstitución *in vitro* de la reparación por escisión de base de 8oxoG Polλ

Se ha descrito la presencia de la actividad dRP liasa en el dominio de 8 kDa de la Polλ (García-Díaz y cols., 2001) que otorga un posible papel para Polλ en BER. Esta es una de las características presentes a su vez en Polβ, DNA polimerasa de la misma familia que ha sido considerada como el enzima de reparación principal en procesos de BER. En lo que respecta al BER que trata de escindir el 8oxoG apareado a dC, se ha descrito a Polβ como la polimerasas encargada de eliminar el residuo dRP después de la acción de OGG1 y colocar el nucleótido dG correcto para terminar la ligasa con la reparación final.

Nos planteamos si Polλ sería capaz de reconstituir el BER de 8oxoG:C en presencia de OGG1 (ver Materiales y Métodos). Como se aprecia en la **figura 51**, Polλ, al igual que Polβ, es capaz de participar *in vitro* del BER de 8oxoG:C.



**Figura 51. Reconstitución *in vitro* del BER**

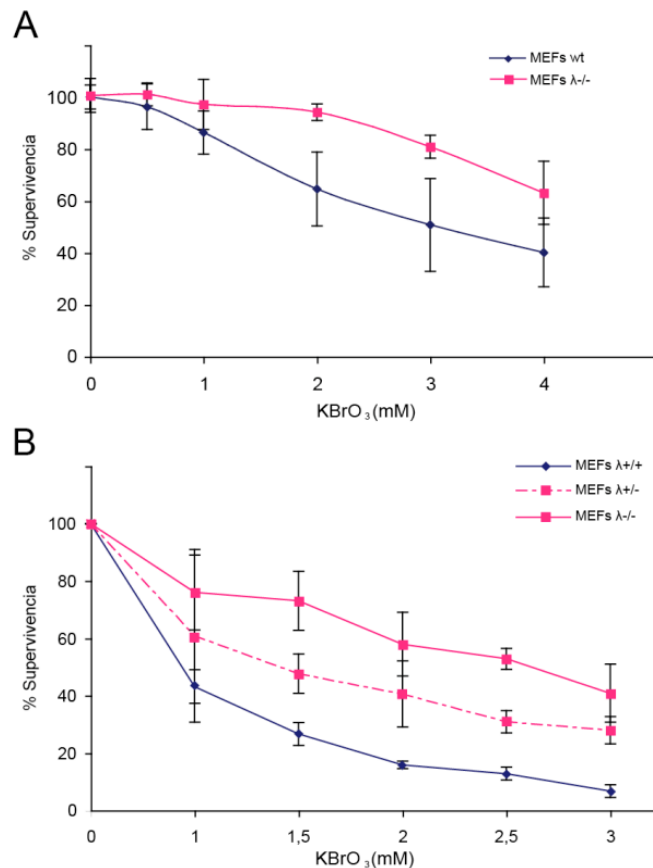
(A) Representación esquemática de la reacción. Un oligonucleótido de doble cadena de 34 pb que contiene un 8oxoG en posición 19 es tratado con OGG1 y hAPE para escindir la base dañada y generar el corte. La polimerasa es capaz de introducir el [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dGTP en sustitución del 8oxoG (a) y eliminar el residuo dRP (b). En presencia de ligasa se finalizará la reparación dando un producto de 34 pb (c). (B) Reconstitución *in vitro* de la reparación por escisión de base (BER) por parte de hPolλ y hPolβ. La reacción se hizo como se describe en Materiales y Métodos con 100 nM de cada enzima. Cuando se indica se añade DNA ligasa.



#### 4.3.2.2 Sensibilidad a bromato potásico (KBrO<sub>3</sub>) de células deficientes en Polλ

Nos planteamos por tanto, analizar el efecto *in vivo* de la presencia de 8oxoG en el DNA de la célula. Para ello analizamos la sensibilidad a KBrO<sub>3</sub>, agente genotóxico causante de roturas de doble cadena asociadas a daño oxidativo, mayoritariamente 8oxoG (Ballmaier y Epe, 2006).

Sorprendentemente, como puede observarse en la **figura 52**, los MEFs deficientes en Polλ presentan una tendencia a resistir el tratamiento con bromato potásico.



**Figura 52. Sensibilidad a bromato potásico (KBrO<sub>3</sub>)**

Ensayo de sensibilidad de los MEFs wt y KOλ a KBrO<sub>3</sub>. El ensayo se realizó como se detalla en Materiales y Métodos sometiendo a las células a las cantidades indicadas de KBrO<sub>3</sub> durante 1 h. Pasados 3 días de recuperación se mide viabilidad mediante el Kit Cell Titer AQ<sub>ueous</sub> (Promega) (A) o levantando las células con tripsina y contando en la cámara de Neubauer (B).

De igual manera, analizamos la sensibilidad en función de la dosis génica de Polλ. Es decir, se analizó el efecto de KBrO<sub>3</sub> en células wt (+/+), heterocigotas (+/-) y KO (-/-) para Polλ (**Fig. 52B**). Nuevamente se observó resistencia al tratamiento con KBrO<sub>3</sub>.

Estos resultados indican que Pol $\lambda$  no esta implicada directamente en la reparación de este tipo de daño, es más la presencia de Pol $\lambda$  hace que las células presenten una mayor sensibilidad.

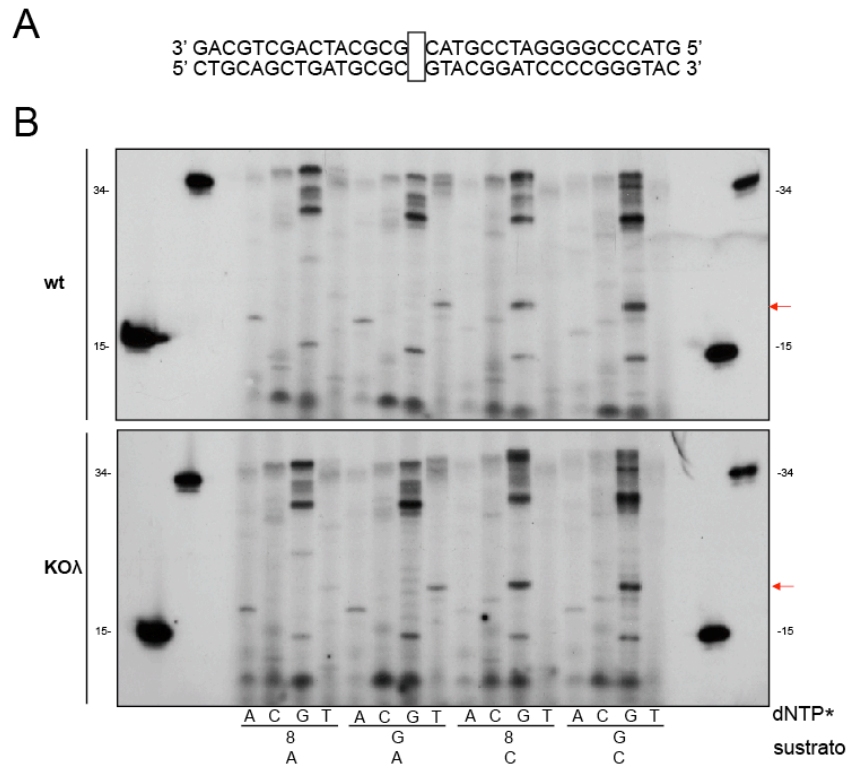
### 4.3.2.3 Capacidad de reparación de la lesión 8oxoG de extractos de testículo del modelo murino de deficiencia en Pol $\lambda$ .

Dada la resistencia a KBrO<sub>3</sub> presente en los MEFs que carecen de Pol $\lambda$ , nos interesó saber la capacidad de reparación por BER de 8oxoG utilizando extractos totales derivados de testículo del modelo murino deficiente en Pol $\lambda$ , utilizados previamente en el análisis de reparación de uracilo en el DNA.

Se realizaron ensayos de reparación *in vitro* suministrando a los extractos el sustrato de 34 pares de bases conteniendo el par 8oxoG:C en posición 19, y el nucleótido a insertar marcado radiactivamente con el isótopo <sup>32</sup>P en el carbono  $\alpha$ . Tras la eliminación de la base dañada gracias a la glicosilasa y el corte en el 5' del sitio abasico por una AP endonucleasa, una DNA polimerasa podrá insertar el nucleótido marcado. Posteriormente la actividad dRP liasa de la DNA polimerasa escindiré el residuo dRP sobrante y una DNA ligasa sellara la unión. Este tipo de ensayo tiene la ventaja de poder evaluar dos actividades enzimáticas diferentes en un mismo experimento. La banda marcada correspondiente a un oligonucleótido de 19 bases, refleja el paso de incorporación del nucleótido marcado por la actividad DNA polimerasa. Por otro lado, la señal correspondiente a un oligonucleótido de 34 bases refleja la acción de la actividad dRP liasa, paso limitante de la ruta e imprescindible para que se produzca la ligación.

Como se observa en la **figura 53**, aunque no de forma muy clara, solo se puede apreciar una reparación del par 8oxoG:C que se corresponde con la inserción de dGTP (+19) por eliminación del 8oxoG (flecha). Se observa a su vez el producto final reparado de +34. Sin embargo, no se aprecia una diferencia entre utilizar extractos wt y KO $\lambda$ . Por el contrario se aprecian numerosas bandas que, por comparación con los controles utilizados deben representar marcajes inespecíficos.





**Figura 53. Estudio de la capacidad de reparación en testículo adulto del modelo murino deficiente en Polλ .**

(A) Secuencia del híbrido empleado como sustrato en el ensayo. El rectángulo representa el par de bases analizado en cada caso. (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 10 μg para los extractos de testículo, y 13.3 nM (0,1 μM) del [α-<sup>32</sup>P]dNTP indicado en cada caso. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

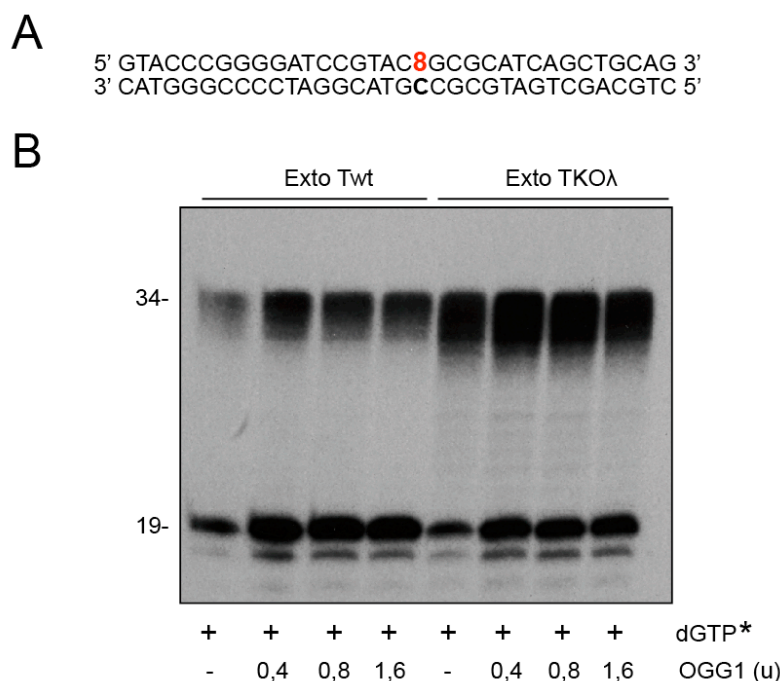
A continuación decidimos suministrar la glicosilasa OGG1 al extracto para facilitar el paso inicial del proceso de eliminación de 8oxoG del par 8oxoG:dC (Girard y cols., 1997; Björas y cols., 1997). El ensayo se realizó de la misma manera que en el caso anterior pero en presencia de concentraciones crecientes de OGG1.

Como se observa en la **figura 54**, en ausencia de OGG1 exógena aparece una banda marcada de 19 bases correspondiente a la incorporación de dG en lugar de 8oxoG, y que refleja el paso de inserción previo a la ligación. Este producto es igualmente visible cuando se utilizan extractos derivados del modelo KOλ. Por otra parte, se observa una banda marcada de 34 bases que corresponde al producto ya completamente reparado (inserción+ dRP-liasa+ligación). Este producto de 34 bases se obtiene de una forma mas eficiente cuando se utilizan los extractos KOλ, sugiriendo que la Polβ presente en el extracto se coordina de forma mas eficiente con la ligasa que participa en este tipo de reparación.

Por otra parte, cuando se suministra OGG1 purificada al extracto se produce un aumento global del proceso de reparación, que se manifiesta tanto en el paso de inserción (19-mer) como en el paso final de ligación (34-mer). Esto sugiere que la cantidad de OGG1 presente en el extracto es limitante, y quizás sea necesario que su

## RESULTADOS

expresión se active en respuesta al daño oxidativo para alcanzar los niveles idóneos. De nuevo, en estas condiciones el extracto KO $\lambda$  produjo una mayor cantidad de producto final reparado.



**Figura 54. Estudios de reparación de 8oxoG:C utilizando extractos de testículo adulto suplementados con OGG1.**

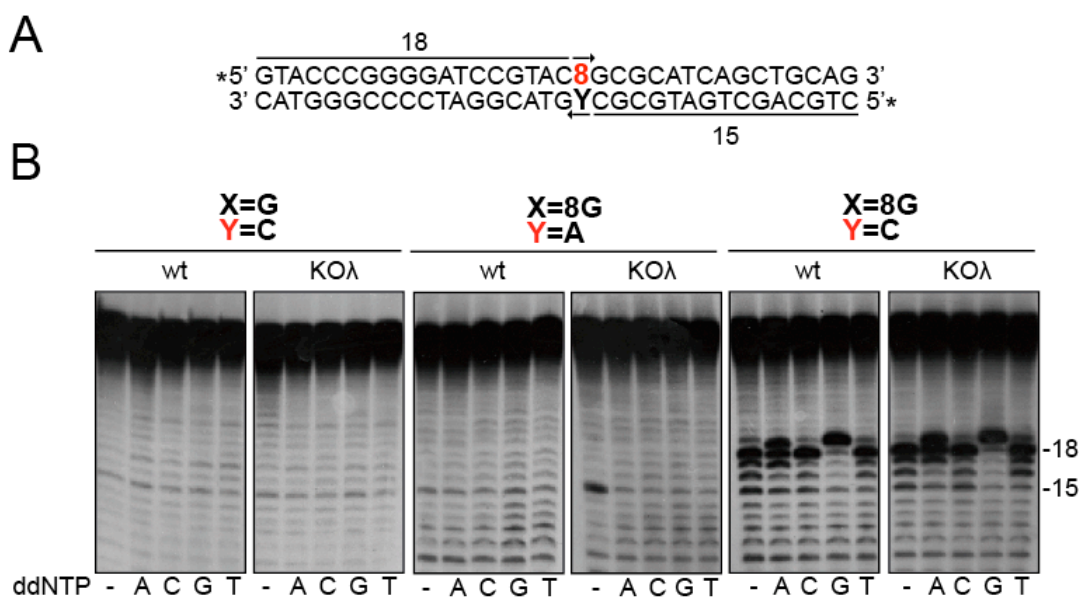
(A) Secuencia del sustrato empleado en el ensayo. 8 indica la base 8oxoG. (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto celular total de testículo de 10  $\mu$ g, 13.3 nM (0,1  $\mu$ M) de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dGTP, y la cantidad indicada de OGG1. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

A continuación analizamos la capacidad de reparación de lesiones por BER con extractos mediante el empleo de ddNTPs. Como se mencionó anteriormente, esto supone una ventaja debido a que el uso de ddNTPs permite ver únicamente el paso de inserción que es llevado a cabo por aquellas polimerasas que, como los miembros de la familia X, son capaces de insertar este tipo de nucleótidos.

El ensayo consiste en suministrar a los extractos un sustrato de DNA de doble cadena, conteniendo la lesión, marcado radiactivamente con el isótopo P $^{32}$  en el extremo 5' de cada una de las cadenas, y añadiendo cada ddNTP por separado. De esta forma se puede visualizar lo que está ocurriendo en ambas de forma simultánea. La lesión se encuentra en posición no simétrica respecto a los extremos por lo que el tamaño de los productos informa sobre la cadena en la que está ocurriendo el proceso.

Como puede observarse en la **figura 55**, no se aprecia inserción en el sustrato control (que contiene el par G:C en el lugar de la lesión), tal como era de esperar puesto que es un apareamiento correcto. En el caso de la lesión 8oxoG:A tampoco se observa inserción de ninguno de los ddNTPs, lo que sugiere que estos extractos de testículo (tanto los de tipo silvestre como los KO $\lambda$ ) no aportan el nivel suficiente de las

glicosilasas necesarias para la eliminación del 8oxoG (Nth1), o de la A (MutY) a partir del par 8oxoG:A. Se ha descrito que cuando se trata de 8oxoG apareado a una A, originado por un error de copia de la base 8oxoG, la glicosilasa que actúa es la MutY para tratar de eliminar dA (Hazra y cols., 2001; David y cols., 2007), dando una segunda oportunidad para que se inserte el nucleótido correcto dC frente a 8oxoG, lo que posteriormente se canalizaría a través del mecanismo de BER OGG1-dependiente, que conjuntamente repararía la lesión de una forma libre de error. Sin embargo, cuando el par 8oxoG:A se ha producido por inserción errónea de 8oxoGTP frente a A, la base lesionada 8oxoG es eliminada mediante la glicosilasa Nth1 (Matsumoto y cols., 2001).



**Figura 55. Reparación de la lesión 8oxoG utilizando extractos de testículo y ddNTPs.**

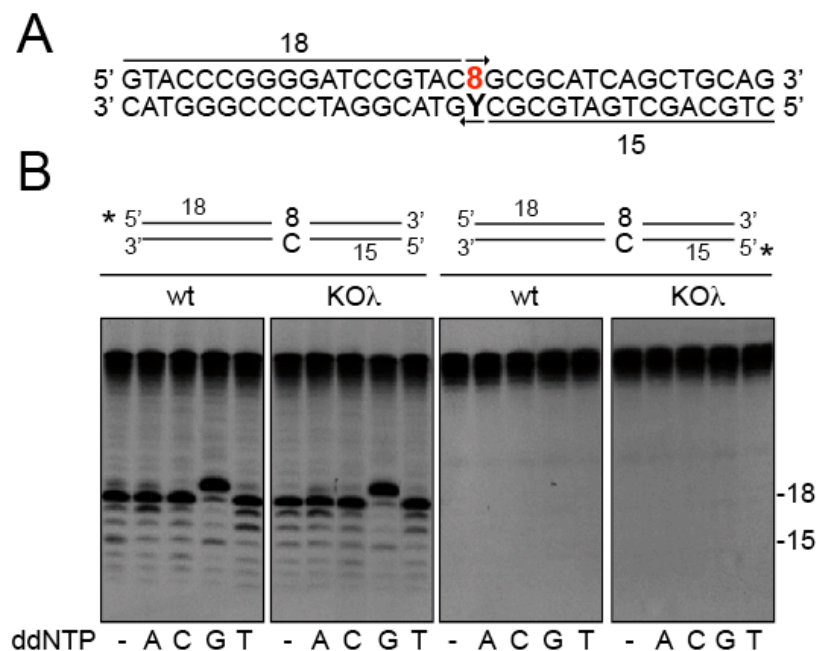
(A) Secuencia del sustrato empleado en el ensayo, dónde el par X:Y puede variar tal como se indica en la parte B. Cada cadena se encuentra marcada en su extremo 5' con <sup>32</sup>P. Se indica los tamaños de los intermedios de reparación resultantes de crear un nick (3-OH) vecino al par X:Y. La flecha indica el sentido de la polimerización en cada caso. (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto celular total de 10 μg para los extractos de tejido adulto, y 100 μM de cada ddNTP por separado. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min. 8 indica la base 8oxoG.

Por otro lado, en el caso del sustrato con la lesión 8oxoG:C sí se observa una inserción de ddA y ddG en posición 19. Teniendo en cuenta el tamaño del producto, la inserción de ddA parece corresponder a un evento de inserción frente a una T, en la cadena que no tiene la lesión. En cambio, la inserción de ddG se corresponde perfectamente con la eliminación de 8oxoG y la posterior inserción de ddG en posición 19 de la cadena con la lesión. El patrón de inserción de ddNTPs observado fué idéntico al utilizar extractos derivados de testículo KOλ.

Para comprobar en qué cadena se estaba produciendo cada una de estas inserciones, realizamos el mismo ensayo con el sustrato conteniendo la lesión 8oxoG:C, pero marcando cada cadena de forma independiente. La **figura 56** muestra que la inserción de ddG en posición 19 solo la vemos cuando marcamos la cadena de la lesión por lo que se confirma que la inserción de ddG sustituye al 8oxoG escindido por la

## RESULTADOS

glicosilasa OGG1 presente en el extracto. En este experimento no se observó la inserción de ddA en posición 19 en ninguna de las dos bandas de DNA.

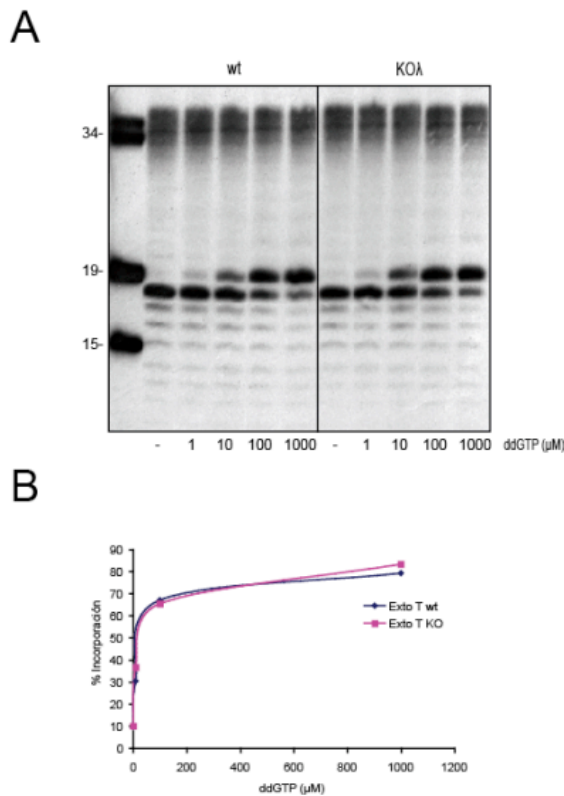


**Figura 56. Reparación de la lesión 8oxoG utilizando extractos de testículo y ddNTPs .**

(A) Secuencia del sustrato empleado en el ensayo. En este caso, solo una de las cadenas se encuentra marcada en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ , tal y como se especifica en los esquemas de la parte B. 8 indica la base 8oxoG. (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto celular total de 10  $\mu\text{g}$  para los extractos de tejido adulto, y 100  $\mu\text{M}$  de cada ddNTP por separado. Los componentes de la reacción se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.

Al igual que se observó en el anterior experimento marcando ambas cadenas de forma simultánea, no se apreciaron diferencias entre los extractos wt y KO $\lambda$  en ninguno de los sustratos utilizados, marcados de forma independiente.

Sin embargo, para descartar que la incorporación de ddGTP sobre el sustrato 8oxoG:C no estuviese ocurriendo en condiciones igualmente lineales en ambos extractos, realizamos un experimento variando la concentración de ddGTP, para limitar la velocidad de la reacción de inserción. Como puede observarse en la **figura 57**, en condiciones lineales de incorporación de ddGTP tampoco se ven diferencias de inserción de ddG entre ambos extractos wt y KO $\lambda$ , lo que fué confirmado por densitometría. Por tanto, se puede concluir que Pol $\lambda$  no interviene de forma directa en la eliminación de 8oxoG del par 8oxoG:C.



**Figura 57. Cinética de la reparación de 8oxoG:C utilizando extractos de testículo, mediante el empleo de ddNTPs.**

Cinética de inserción de ddGTP como consecuencia de la reparación del par de bases 8oxoG:C por parte de extractos wt y KOλ. (A) El ensayo se realizó como se detalla en Materiales y Métodos empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto total de testículo de 10 μg, y (1-10<sup>3</sup>) μM ddGTP. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min. (B) La gráfica representa los datos obtenidos al densitometrar el porcentaje de incorporación en función de la concentración de ddGTP.

#### 4.3.2.4 Implicación de Polλ en BER de pares de bases 8oxoG:A

El efecto genotóxico de la presencia de 8oxoG en el DNA viene determinado en parte por el comportamiento mutagénico de las DNA polimerasas cuando se enfrentan a esta lesión. En su mayoría, las polimerasas tienden a insertar dA frente a 8oxoG, si bien algunas de ellas como Polλ insertan a su vez el nucleótido correcto dC (Picher y Blanco, 2007). Se han realizado diversos estudios cinéticos en los que se evalúa la inserción frente a 8oxoG por diferentes DNA polimerasas. De la Familia B han sido estudiadas Polα de timo de ternera (Shibutani y cols., 1991), Polδ de timo de ternera, en presencia o ausencia de PCNA (Einolf y Guengerich, 2001), y Polζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003), que tienden a realizar la inserción mutagénica de dA, con la única excepción de Polδ acompañada de PCNA. En la Familia Y encontramos comportamientos dispares: Polκ humana con alta propensión a insertar dA frente a 8oxoG (Haracska y cols., 2002); Polι (Zhang y cols., 2000) y Polη de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000) que claramente tienden a realizar la inserción “correcta” de dC. Es especialmente llamativo el comportamiento de Polη humana, ya que no se comporta como su variante de levadura, sino que muestra un fenotipo parecido al descrito para Polλ (Picher y Blanco, 2007), ya que inserta con similar eficiencia dA y dC frente a 8oxoG. Por último, Polβ muestra mayor tendencia a insertar dC frente a 8oxoG, aunque la diferencia con la inserción dA es muy leve (Miller y cols., 2000). Recientemente se ha descrito un descenso en la inserción de dA por parte de Polλ en presencia de la proteína de replicación A (RPA) y el antígeno de proliferación nuclear (PCNA) (Maga y cols., 2008), lo que mejora su fidelidad en reacciones de tolerancia frente a 8oxoG.



El comportamiento mayoritariamente mutagénico de las polimerasas hace que sea necesario un mecanismo que repare los nucleótidos dA incorporados frente a 8oxoG. De no ser así se producirían transiciones G:C a T:A. Para ello existe MutY, una glicosilasa encargada de la eliminar dA del par 8oxoG:dA, dando la oportunidad de que se inserte dC en su lugar. Así, el producto resultante 8oxoG:dC sería sustrato de OGG1, que eliminaría el 8oxoG (Hazra y cols., 2001; David y cols., 2007). Recientemente se ha descrito la interacción funcional entre Pol $\lambda$  y MUTYH. Así, hPol $\lambda$  es reclutada junto a MutYH, PCNA, FEN1 y ligasas 1 y 3 a lesiones 8oxoG:A en el DNA, que proceden de errores de copia de la base 8oxoG (van Loon y Hübscher, 2009).

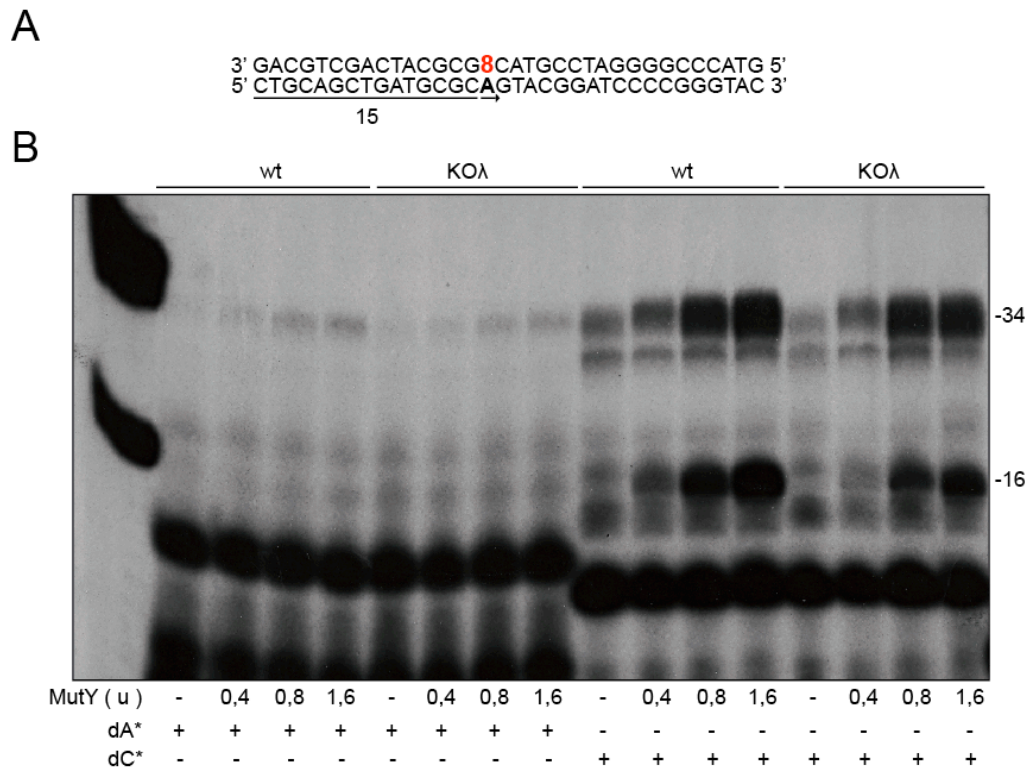
Por esta razón nos interesó evaluar la capacidad de nuestros extractos (wt y deficientes en Pol $\lambda$ ) en la reparación de 8oxoG:dA. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, suministrando el sustrato conteniendo la lesión 8oxoG:dA sin marcar, y aportando de forma independiente dATP y dCTP marcados en el fósforo alfa, para poder detectar su grado de inserción frente a la base 8oxoG.

Como puede observarse en la **figura 58 (parte B)**, el marcaje con dA no permite observar claramente ni el producto de inserción frente a 8oxoG, que tendría un tamaño esperado de 16 nucleótidos, ni el producto final de reparación, que tendría un tamaño de 34 nucleótidos. Esto ocurre tanto utilizando el extracto wt como el KO $\lambda$ . Para facilitar el primer paso de la reacción suplementamos ambos extractos con cantidades crecientes de MutY purificada. En estas condiciones sí fué posible observar un aumento paulatino en una banda de 34 bases, correspondiente al producto final ligado. Este producto parece no depender de la presencia de Pol $\lambda$  a juzgar por los niveles comparables de producto de 34 bases obtenido con los extractos KO $\lambda$  suplementados con MutY.

Sin embargo, cuando se utilizó dCTP marcado el resultado fué muy diferente (**Fig. 59B**). La adición de MutY exógena a los extractos permitió evidenciar claramente tanto el producto de inserción en posición 16, como el de reparación completa en posición 34. Esta especificidad de marcaje con dCTP demuestra que tras la acción de la glicosilasa MutY y de la AP endonucleasa presente en los extractos, la A que formaba parte del par 8oxoG:dA se sustituye muy preferencialmente por el nucleótido correcto dC, lo que podría estar indicando la participación de una DNA polimerasa muy específica presente en el extracto.

La fidelidad de esta reacción probablemente venga mediada por la actuación de factores como PCNA y RPA, presentes en el extracto, como ya se describió para Pol $\lambda$  y Pol $\delta$  (van Loon y Hübscher, 2009; Einolf y Guengerich, 2001) y por mecanismos de exclusión de algunas DNA polimerasas como Pol $\beta$  y quizás también Pol $\mu$ . Según los últimos datos publicados por el grupo de Ulie Hübscher, la conversión del par 8oxoG:dA en el par 8oxoG:dC sería llevada a cabo mayoritariamente por Pol $\lambda$ , debido a una interacción específica con MutY.

De acuerdo con sus resultados, y como muestra la **figura 59B**, tanto la incorporación de dCTP evidenciada en posición de inserción (16-mer) como de reparación (34-mer), se reducen significativamente al utilizar los extractos carentes de Pol $\lambda$  (KO $\lambda$ ).



**Figura 59. Conversión del par 8oxoG:A en el par 8oxoG:C utilizando extractos de testículo.**

(A) Secuencia del híbrido empleado como sustrato en el ensayo. (B) Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de DNA de 100 nM, una cantidad de extracto celular total de 10  $\mu$ g para los extractos de testículo, 13.3 nM (0,1  $\mu$ M) del [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (dC\*) o [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (dA\*) cuando se indica y la cantidad indicada de MutY. Los componentes de la reacción se incubaron a 37  $^{\circ}$ C durante 10 min.





# 5

*Un Polimorfismo Simple  
en la DNA Polimerasa  $\lambda$  Humana  
asociado a cáncer de recto*



## **5.1 Variantes y polimorfismos en la familia X de DNA polimerasas**

Entre las numerosas enzimas implicadas en reparación del DNA, las DNA polimerasas son las de mayor importancia en relación a su capacidad de restaurar la secuencia del DNA o bien producir mutaciones asociadas al proceso de reparación. Sin embargo, no existen muchas evidencias que hayan identificado y caracterizado variantes polimórficas o isoformas alteradas de las DNA polimerasas conocidas. Dentro de la familia X de polimerasas una de las más estudiadas es la DNA polimerasa β (Polβ). Se han descrito variantes de *splicing* de hPolβ (Chyan y cols., 1994), algunas de ellas asociadas a tumorigénesis (Bhattacharyya y cols., 1999a,b; Srivastava y cols., 1999; Wang y cols., 1992), aunque estudios posteriores descartan la posible relación de variantes de mRNA de hPolβ con carcinogénesis (Nowak y cols., 2000). Otros resultados sugieren que algunas variantes de *splicing* de hPolβ podrían actuar como dominantes negativos, favoreciendo una tasa elevada de mutaciones (Bhattacharyya y cols., 1997). Por otro lado, se han descrito alteraciones en el gen de hPolβ como mutaciones puntuales (cambios de un solo nucleótido, SNPs), deleciones o inserciones identificadas en numerosos tumores (Iwanaga y cols., 1999; Miyamoto y cols., 1999). Existen cuatro variantes polimórficas en hPolβ que producen un cambio no sinónimo en la proteína (dbSNP Build 129, GeneID:5423). Dos de estas variantes, Arg137Gln y Pro242Arg, están presentes con una frecuencia del 6% en la población de Asia del Este y del 2% en la población europea, respectivamente (Yamtich y Sweasy, 2009; Guo y cols., 2009; Sweasy y cols., 2006b). La variante Arg137Gln presenta un decaimiento en la actividad y se une de forma aberrante al PCNA, lo que hace que presente un defecto en BER (Guo y cols., 2009). Además de estas dos existen otras variantes que también presentan cambios en la secuencia de aminoácidos. Estas variantes presentan alteraciones en la actividad de polimerización, actividad dRP liasa o la fidelidad, y su expresión en cultivo puede inducir la transformación de la célula (Sweasy y cols., 2006a y b.). Si bien la posible actividad aberrante de estas variantes podría contribuir a la predisposición al cáncer, aun no se ha descrito una relación directa entre variantes de hPolβ y el cáncer.

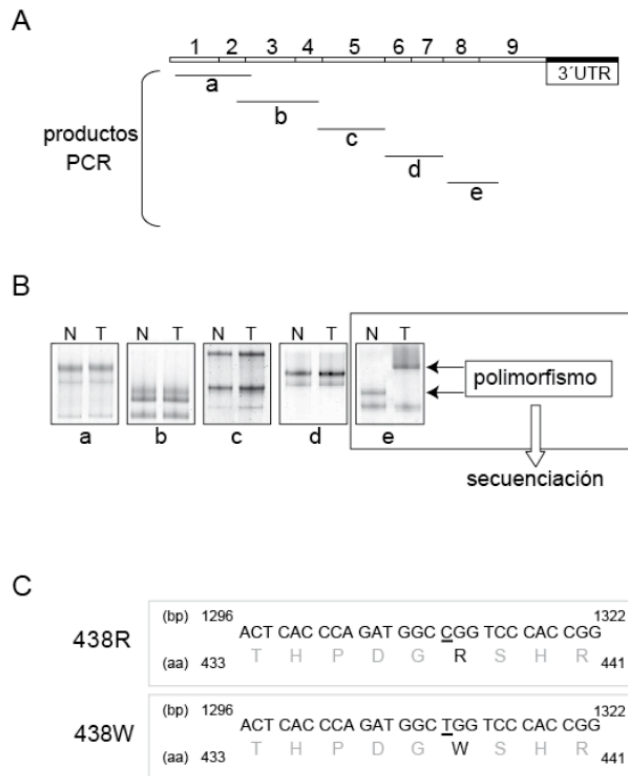
En la DNA polimerasa mu humana (hPolμ) se ha descrito un total de 5 polimorfismos simples (SNPs) con una frecuencia comprendida entre el 5-10% de la población estudiada en el “Environmental Genome Project”. Estas cinco variantes presentan un único cambio aminoacídico (no sinónimo) en la proteína resultante. Otra variante polimórfica presente en hPolμ, que produce el cambio de Asp a Glu en posición 107 mapea en el dominio BRCT y podría producir interacciones aberrantes con determinados factores incluidos los de NHEJ, resultando en alteraciones en la reparación de roturas de cadenas por este mecanismo.

## **5.2. Identificación de un SNP en la región del genoma que codifica para la DNA polimerasa lambda humana.**

Para analizar la presencia de variantes polimórficas en el gen de la DNA polimerasa lambda humana (hPolλ), que pudieran tener una relación con el cáncer, se analizó la presencia de posibles cambios en nucleótidos concretos (SNP) por SSCP en una colección de muestras normales y tumorales. La secuencia completa del gen de la hPolλ, que comprende nueve exones, se amplificó en cinco regiones solapantes,

## RESULTADOS

nombradas a-e (**Fig. 60A**). En la **figura 60B** se representa un ejemplo de varias de las muestras analizadas correspondientes a ovario normal y tumoral no pareadas. Como se puede observar en los fragmentos a, b, c, y d, que abarcan los siete primeros exones del gen, no se produce ningún cambio en la movilidad del fragmento analizado al comparar el tejido normal frente al tumoral. Se analizaron muestras de otros tejidos y tampoco se encontraron diferencias en los fragmentos a-d (no mostrado). Sin embargo, el análisis por SSCP del fragmento e, que abarca el exón ocho y la primera mitad del exón nueve, revela un patrón de movilidad diferente al comparar la muestra de tejido de ovario normal con la muestra de carcinoma de ovario GI-101 (**Fig. 60B**).



**Figura 60. Análisis por PCR/SSCP de la región que codifica para el gen de hPolλ.**

(A) Se amplificaron por PCR cinco fragmentos solapantes nombrados como a-e, que abarcan el gen entero, tal y como se describe en Materiales y Métodos. (B) Análisis por SSCP de los fragmentos a-e de las muestras normales [N] y tumorales [T] no pareadas. Sólo el fragmento e presenta un cambio en el patrón de movilidad (indicado por flechas). (C) La secuenciación de este fragmento presenta un cambio de un único nucleótido (C → T) en la posición 1311 de la secuencia del cDNA que produce el cambio de arginina presente en la variante más común a triptófano en posición 438 de la proteína.

El mismo cambio de movilidad se observó en el fragmento e, en otros tejidos de la colección normal y tumoral (no mostrado).

El análisis de la secuencia del fragmento e reveló la existencia de un SNP, debida a la sustitución de C a T en la posición 1311 del cDNA lo que produce un cambio de R a W en el codón 438 (Fig. 1C). Este SNP, que en la base de datos corresponde al número rs3730477 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3730477](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3730477)), fue en el momento de la identificación uno de los dos únicos SNPs que producían cambio en la secuencia de aminoácidos. En la actualidad se han identificado cuatro SNPs que alteran la secuencia codificante, tres de ellos producen un cambio en la secuencia, y otros dos provocan el truncamiento de la proteína. En la **figura 61** se puede observar un resumen de los diferentes SNPs identificados hasta el momento e introducidos en la base de datos.

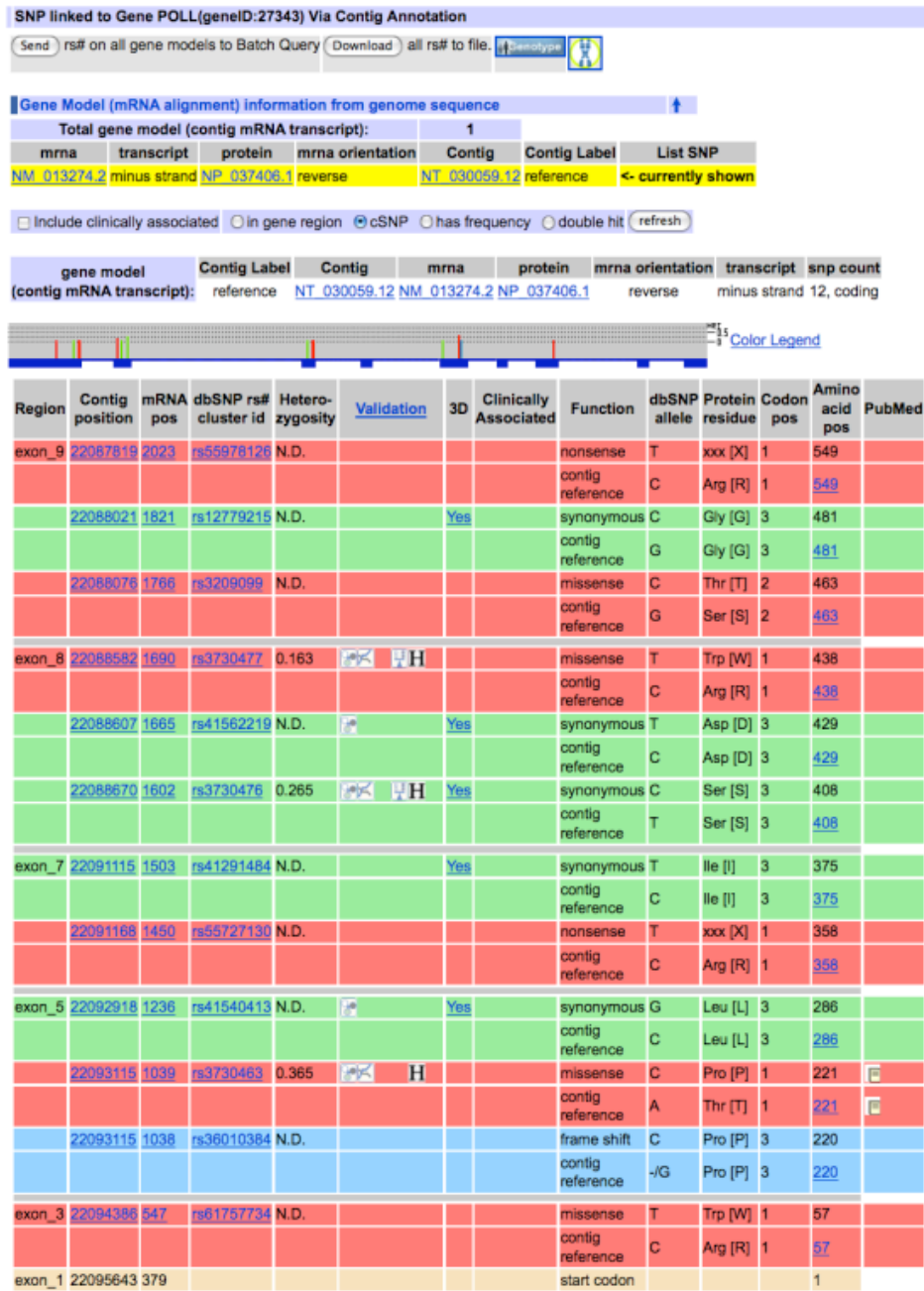


Figura 61. Polimorfismos asociados al gen POLL

Esquema de los diferentes polimorfismos asociados al gen de la hPolλ, realizado por alineamiento en “contig” y publicado en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>. En rojo se indican los polimorfismos que alteran la secuencia de aminoácidos, en verde aquellos que producen cambios sinónimos en la proteína y en azul los que producen cambio en la pauta de lectura de proteína (*frameshift*).

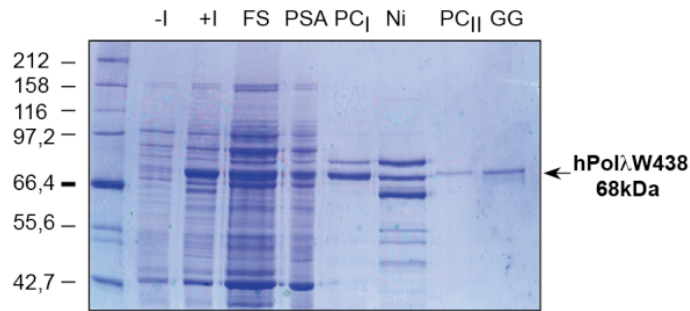
### 5.3. W438 posee actividad DNA polimerasa

Para caracterizar si el cambio R/W en la posición 438 afectaba a las actividades de hPolλ se realizó mutagénesis dirigida sobre el vector de expresión que contenía el cDNA de la Polλ humana, tal y como se describe en Materiales y Métodos. La construcción obtenida se sobreexpresó en células de *E. coli* y se purificó mediante columnas de afinidad mediante el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Fig. 62).

## RESULTADOS

Para comprobar si la proteína purificada W438 presentaba actividad de polimerización, se llevaron a cabo diferentes ensayos *in vitro*, empleando como molde DNA activado de timo de ternera o, alternativamente, una molécula homopolimérica (Ver Materiales y Métodos).

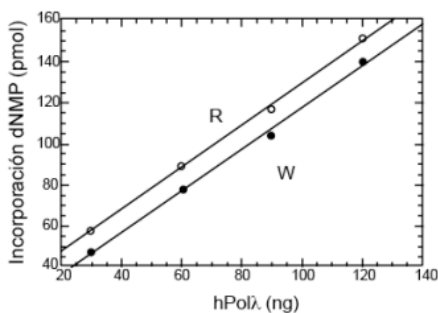
hPol $\lambda$ W presentó actividad DNA polimerasa como se deduce de los ensayos realizados sobre DNA de timo de ternera. Así, como puede observarse en la **figura 63**, ambas polimerasas presentan una capacidad de polimerización similar (**Fig. 63A**) y una afinidad similar por nucleótido (**Fig. 63B**).



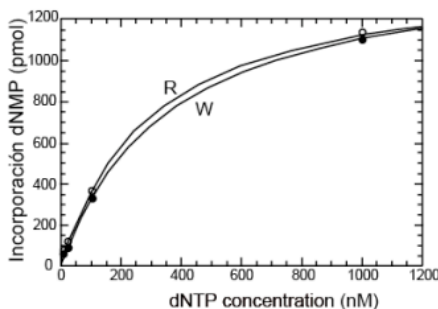
**Figura 62. Purificación de la proteína hPol $\lambda$ W en células de *E. coli***

Tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética en geles del 10% de poliacrilamida-SDS de los diferentes extractos de células BL21 pRIL transformadas con el vector pRSETB-hPol $\lambda$ W. La sobreexpresión de una especie con el peso esperado de 68 kDa, se observa en el extracto inducido (+I), mientras que está ausente en el no inducido (-I). Tras la lisis, una elevada proporción de la proteína sobreproducida permaneció en el extracto soluble (FS). Tras la precipitación del DNA con polietiliminina, hPol $\lambda$  se precipitó en presencia de sulfato amónico al 65% de saturación (PSA) y fue posteriormente purificada por cromatografía, empleando fosfoceulosa (PC), Ni-NTA (Ni) y gradiente de glicerol. A la izquierda se muestra la migración electroforética de una colección de marcadores de peso molecular (PM).

**A**



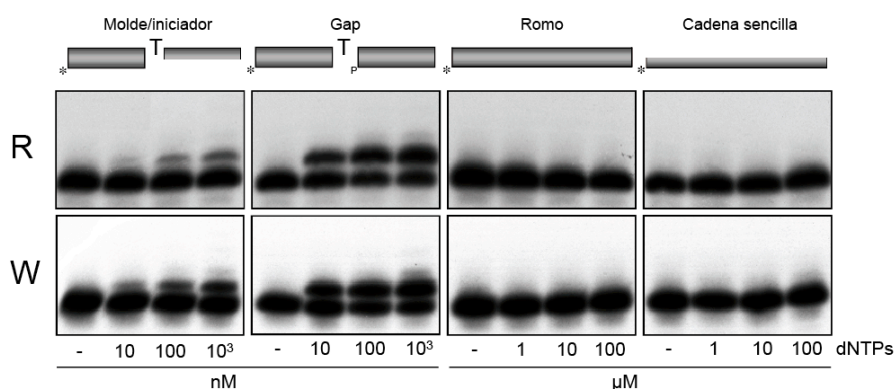
**B**



**Figura 63. Actividad de polimerización de DNA de las dos variantes alélicas de hPol $\lambda$**

La actividad de polimerización de DNA sobre DNA activado de timo de ternera de ambas variantes fue medida independientemente como la incorporación de dNMP en el DNA activado, y se estimó en función de la cantidad de enzima (**A**) o de la concentración de dNTP (**B**) como se describe en Materiales y Métodos. El primer experimento (**A**), en donde el único nucleótido suministrado fue dTTP (13 nM), demuestra que la polimerización fue lineal para ambas variantes en el intervalo (30-120 ng) de enzima utilizado. El segundo experimento, usando 60 ng de cada una de las enzimas, mide la incorporación de los cuatro dNTPs.

A continuación se compararon las dos variantes en cuanto a la preferencia de sustrato. Como ya se había descrito anteriormente en el laboratorio la variante normal con una Arg en posición 438 (hPolλ R438) es una DNA polimerasa dependiente de molde pese a que presente similitud con TdT y Polμ, dos enzimas con capacidad de polimerización en ausencia de un molde. Para analizar si hPolλ W438 está dotada de cierta capacidad de inserción en ausencia de molde, se prepararon distintos sustratos de secuencia definida (ver Materiales y Métodos). Mientras que hPolλ W438 fue capaz de polimerizar desoxinucleótidos en presencia de un molde y un iniciador, no se observó actividad alguna sobre un sustrato de cadena sencilla o un sustrato romo, lo que demuestra que hPolλ W438 es un enzima estrictamente dependiente de molde, al igual que ya se demostró para hPolλ R438 (García-Díaz y cols., 2002; Fig. 64).



**Figura 64. Actividad de polimerización sobre sustratos definidos**

En el ensayo se utilizaron las siguientes moléculas de DNA como sustratos marcadas en el extremo 5': molde/iniciador, *gap*-1nt, romo y cadena sencilla. Las reacciones se llevaron a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos, empleando 100 nM de cada una de las variantes, 2.5 mM de Mg<sup>2+</sup> como metal activador, 1.5 nM de cada DNA y la cantidad indicada de dNTP.

#### **5.4. hPolλ W438 presenta un comportamiento distributivo en sustratos de DNA tipo molde/iniciador**

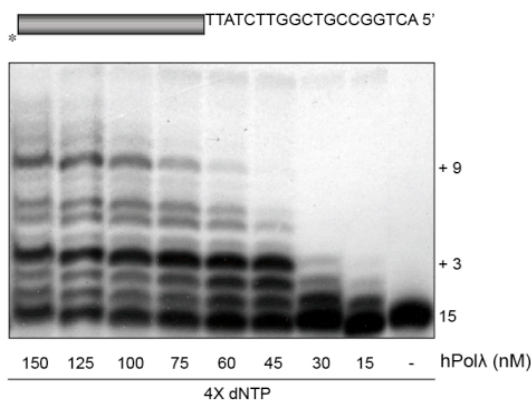
La procesividad, o la capacidad de llevar a cabo un elevado número de ciclos de reacción sin disociarse del molde, es una característica de las DNA polimerasas replicativas, capacitadas para llevar a cabo una síntesis extensiva y depende generalmente de una sólida interacción del enzima con el DNA, así como de una elevada velocidad de reacción.

Las DNA polimerasas de reparación suelen tener una reducida afinidad en sustratos de DNA de tipo molde/iniciador y una menor velocidad de reacción, por lo que frecuentemente llevan a cabo una síntesis distributiva, con frecuentes disociaciones del DNA. La polimerización distributiva es una característica común de las DNA polimerasas de la familia X como hPolβ (Chang, 1975), hPolλ (García-Díaz y cols., 2002), hPolμ (Ruiz y cols., 2003), TdT (Boulé y cols., 2001) y ScPol4 (Prasad y cols., 1993).

Para comparar la procesividad de las variantes de la hPolλ se ensayó su actividad de polimerización empleando un sustrato de DNA del tipo molde/iniciador y



varias concentraciones de enzima. En estas condiciones, la longitud de los productos de polimerización obtenidos será dependiente de la relación enzima/DNA para un enzima distributivo, e independiente para un enzima procesivo. En presencia de iones  $Mg^{2+}$  como metal activador, hPol $\lambda$  W438 presenta un comportamiento distributivo para este tipo de sustratos (**Fig. 65**). Como se observa en la **figura 65**, la longitud de los fragmentos extendidos disminuye de forma paralela a la relación enzima/DNA, de acuerdo con un patrón de polimerización distributiva, al igual que se describió para la variante R438 (no mostrado).



**Figura 65. Polimerización distributiva de hPol $\lambda$  W438.**

El esquema representa el sustrato de DNA molde/iniciador. El iniciador está marcado en su extremo 5' (\*) (ver Materiales y Métodos). La reacción de polimerización se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 2.5 mM de  $Mg^{2+}$ , usando 100  $\mu$ M dNTPs, y disminuyendo las cantidades de hPol $\lambda$  W438 desde 150 a 15 nM. Después de una incubación de 20 min a 37  $^{\circ}$ C, la extensión del iniciador se analizó en un gel de 20% poli(acrilamida-8 M urea) y posterior autorradiografía. La movilidad del iniciador no extendido (15) y de la extensión del nucleótido (+1), 3 nucleótidos (+3) y 9 nucleótidos (+9) se indica en la autorradiografía.

### 5.5. Las variantes de hPol $\lambda$ , R438 y W438, presentan una síntesis procesiva similar en un *gap* de pequeño tamaño.

Una de las características descritas para hPol $\lambda$  R438 es su síntesis procesiva en *gaps* de pequeño tamaño (García-Díaz y cols., 2002). La presencia de un extremo 5' -P en el *gap* hace que hPol $\lambda$  R438 lleve a cabo una síntesis procesiva frente a la distributiva en un molde/iniciador abierto. Se ha descrito el papel del dominio de 8 kDa como responsable de la estimulación por la presencia del grupo fosfato en 5' en otras polimerasas como hPol $\beta$ , hPol $\lambda$ , SpPol4, LiPol $\beta$  (Prasad y cols., 1994; Aravind & Koonin, 1999; Hübscher y cols., 2002, García-Díaz y cols., 2002; González-Barrera y cols., 2005, Alonso y cols. 2006). Esto se debe a diversos contactos entre este dominio y el extremo 5'-P del *gap*.

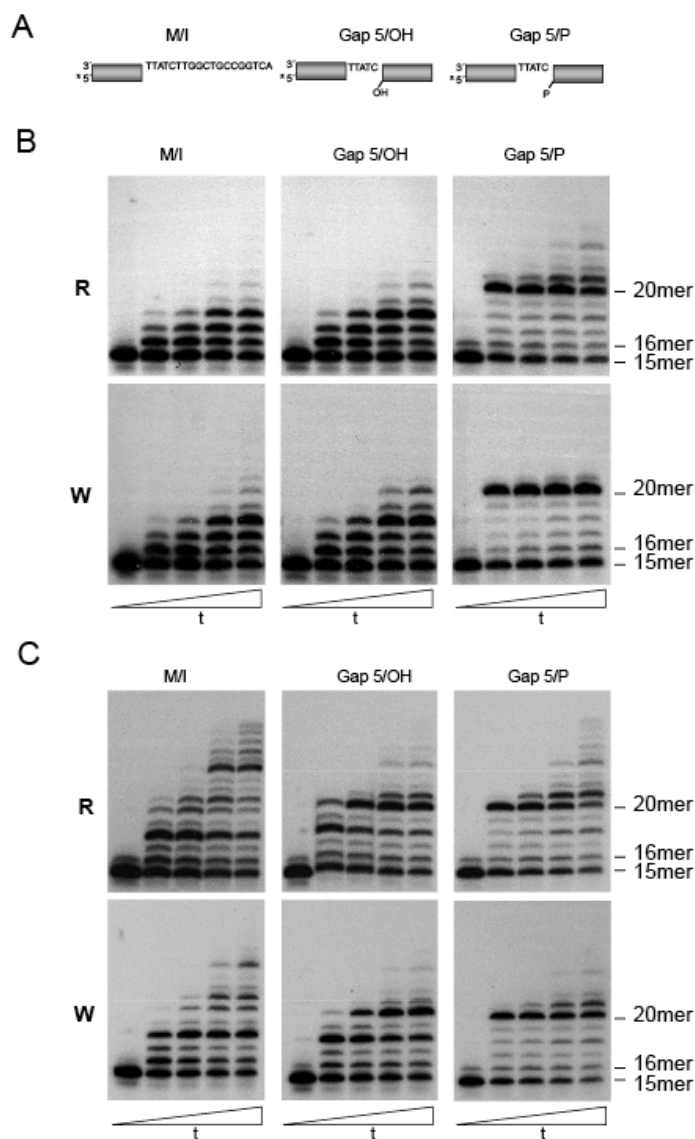
Para estudiar si el cambio R438W podría estar afectando a esta característica de hPol $\lambda$  R438, se compararon ambas polimerasas en sustratos tipo molde/iniciador y *gap* de 5 nucleótidos con o sin un grupo -P en su extremo 5' (**Fig. 66A**). Como puede observarse en la figura 7 ambas enzimas presentan un incremento de la procesividad en presencia de un grupo -P en su extremo 5' del *gap*.

Al sustituir los iones  $Mg^{2+}$  por iones  $Mn^{2+}$ , la síntesis de ambas polimerasas se vió fuertemente estimulada. Se ha descrito que en ocasiones se puede utilizar el  $Mn^{2+}$  como metal activador, aunque la síntesis dependiente de iones  $Mn^{2+}$  suele presentar unos parámetros de fidelidad de síntesis más reducidos (Beckman y cols., 1985;



Pelletier y cols.,1996). Además se ha propuesto que la Polλ puede estar adaptada para utilizar iones Manganeso *in vivo*, lo cual podría ser importante en su función de NHEJ (Blanca y cols., 2003).

Por otro lado, se puede observar cierta capacidad de desplazamiento de banda en ambas polimerasas, que se ve estimulada en presencia de Mn<sup>2+</sup>. En estas condiciones, la síntesis no parece estar condicionada en absoluto a los límites del *gap*, y los productos sintetizados son de tamaño similar a los obtenidos sobre el sustrato molde/iniciador, que carece de DNA en 3'.



**Figura 66. Actividad de hPolλ W438 y R438 en un sustrato tipo *gap*.**

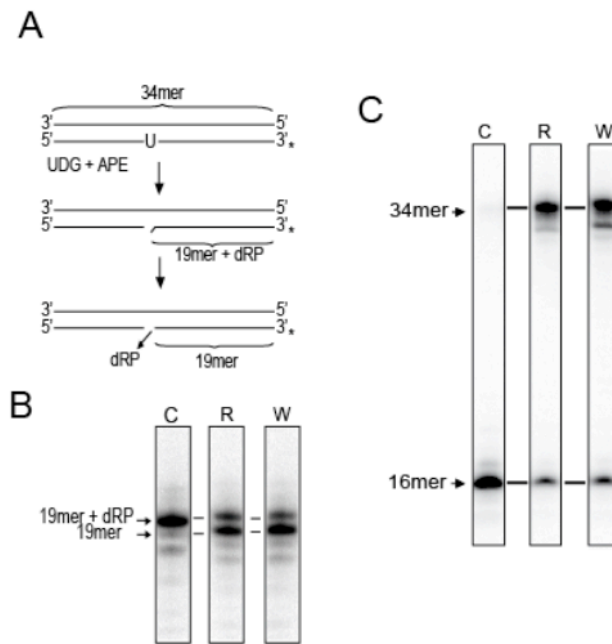
(A) Los distintos sustratos empleados en el ensayo fueron un híbrido molde/iniciador (M/I), un sustrato *gap* de 5 nucleótidos carente de grupo fosfato en posición 5' (Gap5-OH) y un sustrato *gap* de 5 nucleótidos con un grupo fosfato en posición 5' (Gap5-P). Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2.5 mM Mg<sup>2+</sup> (B) o 1 mM Mn<sup>2+</sup> (C), empleando los sustratos indicados y 100 nM de hPolλ R438 o W438 (R y W respectivamente). Tras incubar durante 2, 5, 15 y 30 min a 37°C, las muestras se analizaron por electroforesis en 20% poliacrilamida-8M urea y posterior autorradiografía.

### 5.6. hPol $\lambda$ W438 posee actividad dRP liasa.

Como ya se ha descrito anteriormente en esta tesis, diferentes estudios de mutagénesis en el dominio de 8 kDa de la hPol $\beta$  permitieron identificar una serie de aminoácidos importantes para las distintas actividades presentes en este dominio (Prasad y cols., 1998b; Matsumoto y cols., 1998). Una de esas actividades es la dRP liasa. La hPol $\lambda$  conserva, excepción de la Lys<sup>60</sup>, todos los residuos propuestos en estos estudios como participantes en la actividad dRP liasa (His<sup>34</sup>, Tyr<sup>39</sup>, Lys<sup>60</sup>, Lys<sup>68</sup>, Glu<sup>71</sup>, Lys<sup>72</sup> y Glu<sup>84</sup>), mientras que la mayor parte de estos residuos no están presentes en la TdT o la Pol $\mu$ . En concreto, la Lys<sup>72</sup>, identificada como el nucleófilo responsable de la formación de la base de Schiff durante la  $\beta$ -eliminación del residuo dRP (Deterding y cols., 2000), está presente en Pol $\lambda$  (Lys<sup>312</sup>).

El Dr. Miguel García-Díaz identificó en su tesis doctoral la presencia de la actividad dRP liasa en la hPol $\lambda$  (García-Díaz y cols., 2001), como se podía anticipar por la presencia de los aminoácidos implicados en esta actividad en la Pol $\beta$ . Esta actividad junto con la DNA polimerización permitió proponer a la Pol $\lambda$  como candidato a participar, al igual que Pol $\beta$ , en el proceso de reparación por escisión de base (BER) (García-Díaz y cols., 2000; Braithwaite y cols. 2005 a y 2005 b).

Para comprobar si el cambio de R a W en la posición 438 de hPol $\lambda$  podría afectar a su actividad dRP liasa, se empleó el mismo sustrato utilizado con LiPol $\beta$  descrito en el apartado 1 de resultados de esta tesis. Se trata de un sustrato de DNA de doble cadena de 34 pares de bases (pb) que contiene un uracilo en posición 16. Como se describe en Materiales y Métodos, la cadena que contiene el uracilo se marcó en 3' utilizando [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ddATP, se hibridó con su cadena complementaria, se trató con uracil DNA glicosilasa humana (hUDG) para eliminar la base del uracilo y, finalmente, con AP endonucleasa humana (hAPE1) para generar un sustrato dotado de un residuo dRP (**Fig. 67A**). Este sustrato se incubó en ausencia o presencia de ambas variantes de hPol $\lambda$ , R438 y W438. Como se muestra en **la figura 67B** la variante hPol $\lambda$  W438 conserva la capacidad para escindir el residuo dRP como puede observarse por la reducción en el tamaño del sustrato marcado, al igual que la variante R438 previamente descrita (García-Díaz y cols., 2001).



**Figura 67. Actividad dRP liasa de la hPolλ y reconstitución *in vitro* de BER**

(A) Representación esquemática de la reacción. Un oligonucleótido de doble cadena de 34 pb que contiene un uracilo en posición 16 en la cadena marcada (asterisco) es tratado con hUDG y hAPE para generar un sustrato que contiene un residuo dRP. El grupo dRP será posteriormente eliminado por una actividad dRP liasa. (B) Resultado del experimento llevado a cabo con las variantes de hPolλ R438 (R) y W438 (W). Las reacciones, de 10 min, se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de 60 nM de ambas variantes. (C) Reconstitución *in vitro* de la reparación por escisión de base (BER) por parte de hPolλ R438 (R) y W438 (W). Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

### 5.7. Reconstitución *in vitro* de la Reparación por Escisión de Base (BER)

La actividad dRP liasa junto con la actividad DNA polimerasa, presentes en ambas variantes de la Polλ, son esenciales para el BER (Krokan y Slupphaug, 1998; Lindahl y Wood, 1999). Esta ruta de reparación es la encargada de corregir diferentes lesiones que ocurren en el DNA como modificaciones de las bases (oxidaciones, alquilaciones,...), presencia de Uracilos o pérdida espontánea de bases.

El primer paso consiste en la eliminación de una única base dañada en el DNA por una glicosilasa seguida por la acción de una actividad AP endonucleasa, que realiza un corte en 5' al nucleótido abásico. Posteriormente, una DNA polimerasa contribuye a la reparación con dos actividades: la actividad de polimerización, que reemplaza el nucleótido dañado, y la actividad dRP liasa, que elimina el residuo dRP. Por último, la reacción se completa con la acción de una DNA ligasa.

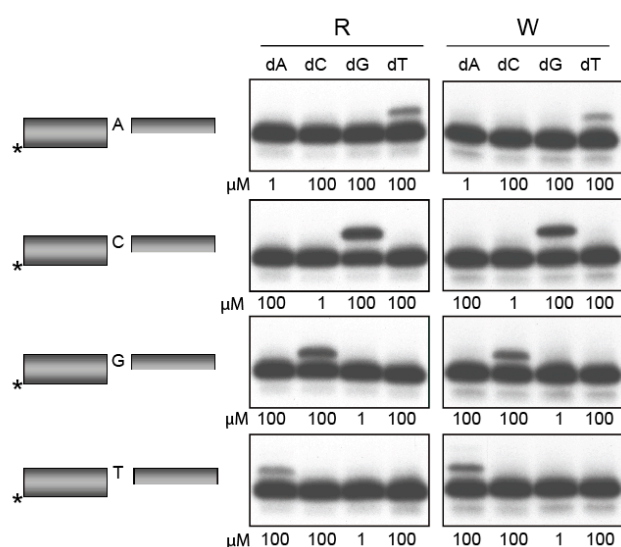
Como demuestra un ensayo de reconstitución *in vitro* de BER utilizando componentes purificados, la combinación de la DNA polimerización y de la actividad

dRP liasa presentes en la variante W438 permiten completar la reparación por BER *in vitro* de forma igualmente eficiente que la variante más común R438 (Fig. 67C).

### 5.8. Fidelidad de inserción de W438.

Una de las principales características de las DNA polimerasas durante la síntesis de DNA es la alta fidelidad de copia. Una reducción de la fidelidad de una polimerasa en particular puede conducir a numerosos efectos en la célula tales como cáncer, defectos genéticos e incluso muerte celular (Kunkel y cols., 2003; Ponamarev y cols., 2002).

Para determinar si la sustitución R438W afecta significativamente la fidelidad de hPol $\lambda$ , utilizamos un ensayo de incorporación *in vitro*. Así se comprobó que, al igual que la variante R438 y al contrario de lo que sucede con otras DNA polimerasas recientemente descritas como la Pol $\eta$  (Zhang y cols., 2000) o la Pol $\epsilon$  (Matsuda y cols., 2000; Johnson y cols., 2000), hPol $\lambda$  W438 no comete errores de sustitución de base con una eficiencia comparable a la de las distintas inserciones correctas. Así, como muestra la **figura 68**, cuando se analiza la formación de los 16 pares de bases posibles (considerando pares de bases correctos e incorrectos) en condiciones saturantes de enzima, solo se produce la extensión del iniciador en el caso de los pares de bases correctos (los cuatro pares Watson-Crick).



**Figura 68. Fidelidad de inserción de hPol $\lambda$  W438.**

El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando cuatro híbridos molde/iniciador distintos, que difieren entre sí en la primera base del molde. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 100 nM de las variantes de hPol $\lambda$  R438 (R) y W438 (W) empleando 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> como metal activador. La extensión de la banda marcada (\*) en presencia del nucleótido correcto (1  $\mu$ M) o incorrecto (100  $\mu$ M) se analizó por electroforesis en poliacrilamida al 20%-8M urea y posterior autorradiografía.

Sin embargo, al realizar un ensayo cuantitativo de la fidelidad de síntesis en colaboración con el grupo del Dr. Tomas Kunkel (NIEH, Carolina del Norte, USA) fue posible determinar con precisión los errores de sustitución de base y de inserción-delección de ambas variantes mediante el ensayo de reversión en M13mp2 (Osheroff y cols., 1999a y b, 2000) tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Se analizaron las mutaciones cometidas por ambas variantes de hPolλ al replicar *in vitro* distintos sustratos. Los errores de sustitución de base que revierten el codón de terminación TGA dan lugar a un fenotipo detectable.

La frecuencia de mutación observada para R438 y W438 fue  $9,0 \pm 4,4 \times 10^{-4}$  y  $31 \pm 12 \times 10^{-4}$ , respectivamente ( $p=0,0007$ ). El análisis de secuencias (**Tabla 5**) indicó que el mutante hPolλ W438 muestra un aumento de las sustituciones C-T y G-T cuatro y ocho veces superior, respectivamente, que hPolλ R438 ( $p=0,001$  y  $p=0,022$ ; respectivamente). Sin embargo, las frecuencias de inserción-delección fueron similares para ambas enzimas cuando se ensayó sobre un *gap* de seis nucleótidos que contenía una secuencia TTTT a continuación del *gap*.

**Tabla 5. Especificidad de las mutaciones de sustitución de base cometidas por la hPolλ W438 en un *gap* de 5 nucleótidos.**

Nucleótido molde	Par formado (molde/dNTP)	hPolλ R438 <sup>a</sup>		hPolλ W438 <sup>b</sup>		Polβ <sup>c</sup>
		Nº mutantes <sup>d</sup>	F.R. <sup>e</sup> x10 <sup>-4</sup>	Nº mutantes <sup>d</sup>	F.R. <sup>e</sup> x10 <sup>-4</sup>	F.R. x 10 <sup>-4</sup>
T	T • dGTP	6	<b>2.5</b>	26	<b>10</b>	29
	T • dCTP	0	≤ 0.4	0	≤ 0.4	1.8
	T • dTTP	0	≤ 0.4	0	≤ 0.4	≤ 0.9
G	G • dATP	0	≤ 0.4	9	<b>3.5</b>	1.8
	G • dGTP	0	≤ 0.4	0	≤ 0.4	1.8
A	A • dCTP	31	<b>13</b>	57	<b>22</b>	2.7
	A • dGTP	1	0.4	3	1.2	6.2
	A • dATP	1	0.4	0	≤ 0.4	0.9

<sup>a</sup> Frecuencia de mutación (hPolλ R438):  $9.8 \times 10^{-4}$

<sup>b</sup> Frecuencia de mutación (hPolλ W438):  $22.05 \times 10^{-4}$

<sup>c</sup> Datos de Osheroff y cols., 1999b

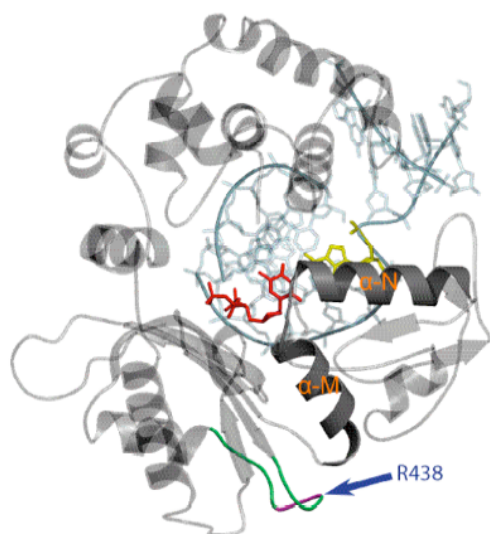
<sup>d</sup> Nº total de mutantes secuenciados: hPolλ R438: 42; hPolλ W438: 96

<sup>e</sup> Las frecuencias de error (F.E.) se calcularon en función de los datos de la secuenciación de los mutantes resultantes de dos reacciones diferentes con cada enzima y usando el promedio de las frecuencias de mutación de esos dos experimentos ( $9.8 \times 10^{-4}$  y  $22.05 \times 10^{-4}$  para hPolλ R438 y hPolλ W438, respectivamente).

## 5.9. Estructura tridimensional de la variante hPolλ W438

La estructura de hPolλ en complejo con el DNA molde y el nucleótido entrante ha sido resuelta recientemente (García-Díaz y cols. 2005). En esta estructura, se observa que el aminoácido R438 es un residuo de la superficie localizado en un bucle dentro del subdominio palma (**Fig. 69**). Sin embargo, la estructura en este bucle aparece parcialmente desordenada, y de hecho, no es suficiente para determinar la posición completa de la cadena lateral del aminoácido R438. Para intentar dilucidar el efecto del cambio R438W hemos determinado la estructura, en colaboración con el grupo del Dr. Tomas Kunkel, tridimensional del dominio de 39 kDa de la variante hPolλ W438, bajo las mismas condiciones en las que se realizó la cristalización de hPolλ R438. Los cristales obtenidos (resolución de 2,8 Å) indican que la estructura global de la variante hPolλ W438 es idéntica a la de la proteína R438, indicando que el cambio R438W no causa grandes cambios conformacionales. Sin embargo, el bucle donde se encuentra el residuo 438 muestra un alto grado de desorden y no se observa densidad para la cadena

lateral del residuo W438 (**Fig. 69**), sugiriendo el cambio R438W podría resultar en una alteración estructural local.



**Figura 69. Localización del residuo R438 en el cristal de la estructura de hPolλ.**

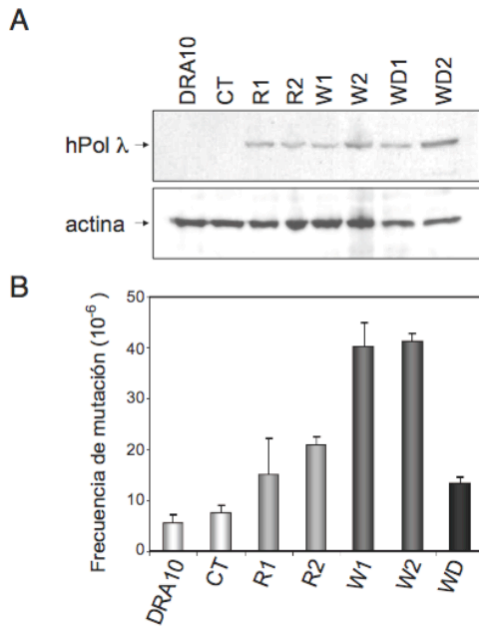
Representación del complejo ternario precatálítico de hPolλ (PDBid 1XSN). El residuo R438 (magenta) se localiza en un bucle (verde) en el subdominio palma. Este bucle está próximo al extremo N-terminal y a la hélice  $\alpha$  M. Ambas  $\alpha$ -hélices M y N (gris oscuro) son críticas para el posicionamiento del sustrato y el ensamblaje del apareamiento de bases nascente. El molde/iniciador de DNA se muestra en azul claro, la base molde en amarillo y el ddTTP entrante en rojo.

### 5.10. Análisis de mutagenesis *in vivo*

Para investigar si la sobreexpresión de la variante hPolλ W438 pudiera afectar la frecuencia de mutación *in vivo* se llevó a cabo una colaboración con el laboratorio del Dr. Jean- Sebastien Hoffmann (CNRS, Toulouse, Francia).

Se transfectaron células CHO con plásmidos que contenían el gen de hPolλ R438 o con el cambio W438. Se obtuvieron dos líneas isogénicas de células transfectadas con hPolλ R438 (R1 y R2), y dos transfectadas con hPolλ W438 (W1 y W2). En todas ellas, el nivel de sobreexpresión de Polλ detectado mediante *Western Blot* fue similar (**Fig. 70**). A continuación, se midió la frecuencia de mutaciones espontáneas de estos clones celulares tal y como se describe en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos. Los resultados indican (**Fig. 70**) que la frecuencia de mutación de los clones R1 y R2 fue de dos a tres veces superior que en las líneas celulares control. Este resultado concuerda con el aumento de frecuencia de mutación que ocurre durante la sobreexpresión de hPolβ medido con el mismo ensayo (Canitrot y cols., 1998). Además, de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro*, la sobreexpresión de la variante hPolλ W438 en las células (clones W1 y W2) produjo un aumento de hasta ocho veces en la frecuencia de mutación (**Fig. 70**). Estos resultados, junto con el hecho de que las células transfectadas con una variante inactiva de Polλ W438 (clon WD, ver Materiales y Métodos) no mostraron incremento en la frecuencia de error, indican por tanto, que la actividad DNA polimerasa de la variante hPolλ W438 es necesaria para que se produzca el fenotipo mutador.





**Figura 70. hPolλ W438 incrementa la mutagénesis *in vivo***

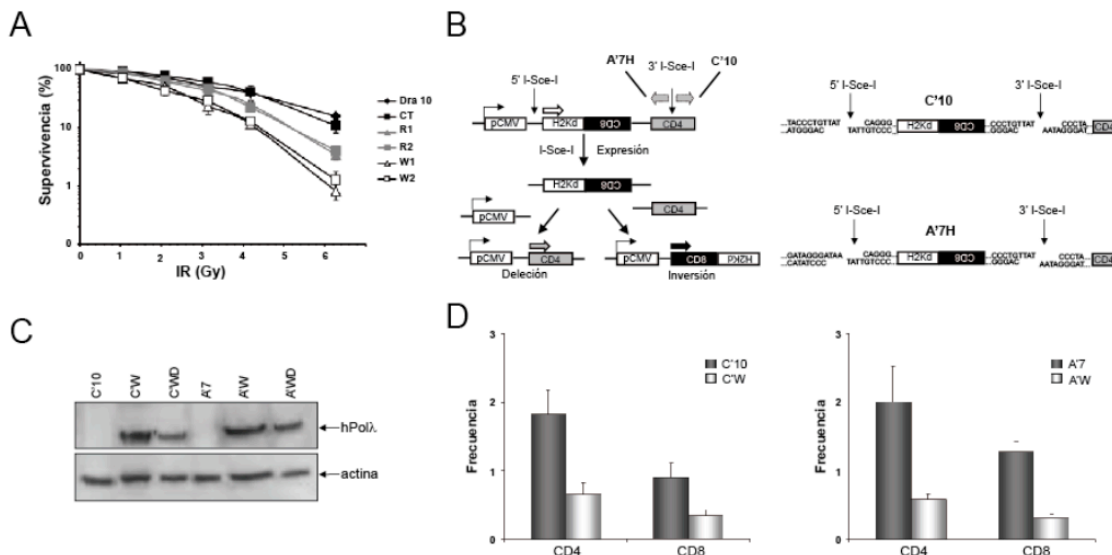
(A) Niveles de expresión de hPolλ medidos por Western blot de extractos totales de líneas celulares que sobreexpresan hPolλ R438 (R1 y R2) y W438 (W1, W2 y la forma catalíticamente inactiva WD) en comparación con las células usadas como control CHO-Dra10 y CT (transfectadas con el vector vacío). La normalización se realizó en función de los niveles de actina, debido a que los niveles basales de expresión en estas células no son detectables por el anticuerpo. (B) Frecuencia de mutación de las células que sobreexpresan hPolλ. Para determinar la mutagénesis espontánea, se sembraron 10<sup>6</sup> células y se midió la aparición de mutantes de HPRT después de la exposición a 20 μM de 6-thioguanina (6-TG). Después de una semana adicional se contabilizan las colonias formadas y se calculan las frecuencias de mutación corregidas por la eficiencia de plaqueo. El dato representado es la media de tres experimentos independientes. Los valores p relativos al control CT son 0.019, 4.6x10<sup>-3</sup>, 3.1x10<sup>-3</sup>, 1.3x10<sup>-4</sup> y 0.045 para R1, R2, W1, W2 y WD, respectivamente.

### 5.11. La sobreexpresión de la variante hPolλ W438 reduce la actividad celular de NHEJ

Teniendo en cuenta el papel propuesto para hPolλ en la reparación de roturas de doble cadena (DSB), decidimos investigar la supervivencia celular a la radiación ionizante (RI) utilizando los distintos clones celulares obtenidos en células CHO. La expresión de la variante W438 confirmó una mayor sensibilidad a RI respecto a las células control y a células que expresaron hPolλ R438 (**Fig. 71A**). De igual manera, se transfectaron MRC5 humanos y células defectivas en NHEJ (XRCC4<sup>KD</sup>), con las mismas construcciones utilizadas en el caso de CHO. Nuevamente, se observó un significativo incremento en la sensibilidad a RI en las células que expresaban W438 con respecto a las células control que expresaban R438. De manera interesante, la hipersensibilidad a HPRT inducida por la presencia de W438 no se observó en células XRCC4<sup>KD</sup> (**Fig. 72**), sugiriendo que la presencia de hPolλ W438 podría resultar en un defecto en NHEJ. Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto de las dos isoformas de hPolλ en la actividad celular de NHEJ. Para ello, las líneas celulares C'10 y A'7, en las que se encuentran establemente integrados sustratos de NHEJ (Capp y cols. 2006; Guirouilh-Barbaty cols. 2004 y Figura 12B), fueron transfectadas con plásmidos que codifican ambas isoformas (variantes R438 y W438). Se obtuvieron los clones celulares C'R, C'W, A'R y A'W que expresaron los mismos niveles de proteína medidos por *Western Blot* (**Fig. 71C**). El efecto causado por cada una de las variantes en la actividad NHEJ se midió calculando la cantidad de expresión de CD4 o CD8 (ver Materiales y Métodos). La sobre-expresión de hPolλ R438 no afectó a la generación de deleciones ni de inversiones respecto a los datos obtenidos previamente con células control (Capp y

## RESULTADOS

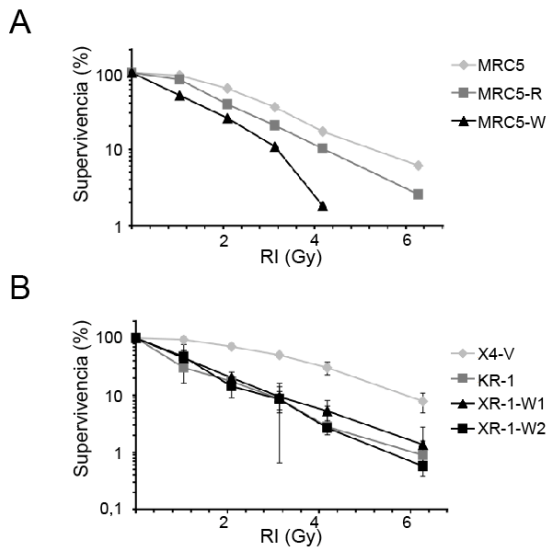
cols. 2006). Sin embargo, la expresión de la variante W438 (clon C'W) produjo un descenso de 2,5 y 3 veces, respectivamente, en las frecuencias de inversión y deleción con respecto a las células control (**Fig. 71D**). Estos resultados fueron confirmados utilizando la línea A'7. De nuevo, mientras que la expresión de la proteína R438 no afectó la generación de deleciones o inversiones en las células, la expresión de la variante W438 produjo una reducción significativa en la generación de eventos de deleción e inversión (3 y 4 veces, respectivamente) respecto a las células control. Estos datos demuestran que la expresión de la variante polimórfica W438 reduce la actividad NHEJ, probablemente interfiriendo con la maduración de los extremos no complementarios, y en menor medida, de los extremos complementarios de DNA durante la reparación de DSB generados por I-Sce-I.



**Figura 71. Las células que sobreexpresan hPolλ W 438 presentan un defecto en NHEJ.**

(A) Sensibilidad a radiación ionizante (RI) de las células que sobreexpresan hPolλ R438 (R1 y R2) y W438 (W1, W2 y la forma catalíticamente inactiva WD) en comparación con las células usadas como control CHO-Dra10 y CT (transfectadas con el vector vacío). (B) Sustratos utilizados para medir la actividad de NHEJ (parte izquierda) y representación de las secuencias que presentan sitio de restricción para *I-Sce-I* en las células C'10 y A'7 (parte derecha). (C) Niveles de expresión de hPolλ medidos por Western blot de extractos totales de líneas celulares que sobreexpresan hPolλ W438 y su forma inactiva en células C'10 (C'W, C'WD) y A'7 (A'W, A'WD). (D) Evaluación de los eventos de deleción (CD4) o inversión (CD8) en células C'10 (izquierda) y A'7 (derecha) por sobreexpresión de hPolλ W438 (barras grises) frente al vector vacío (barras blancas). El dato representado es la media de tres experimentos independientes.





**Figura 72. Sensibilidad a radiación ionizante (RI).**

(A) Sensibilidad a RI de células MRC5 control (MRC5) o que sobreexpresan cada una de las variantes (MRC5-R y MRC5-W). (B) Sensibilidad a RI de las células defectivas en NHEJ (defectivas en XRCC4) control (X4-1), expresando XRCC4 (X4-V) o la variante W438 (X4-1-W1 y X4-1-W2).

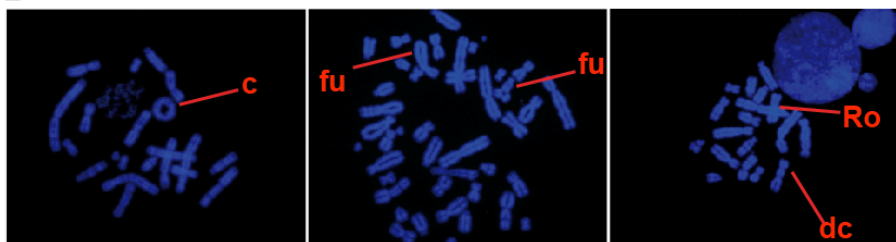
### 5.12. La expresión de la variante hPol $\lambda$ W438 conduce a la aparición de aberraciones cromosómicas

Ya que está descrito que un defecto en la ruta de NHEJ conduce a la acumulación de aberraciones cromosómicas ocasionadas espontáneamente o tras tratamiento con IR (Karanjawla y cols., 1999; Ferguson y cols., 2000), decidimos realizar un análisis cariotípico de las diferentes líneas celulares descritas en el apartado anterior. El examen de la dispersión cromosómica de metafases (**Fig. 73A**) mostró una mucha mayor generación de aberraciones tanto originadas espontáneamente, como inducidas por IR, en las células que expresaron la variante hPol $\lambda$  W438 con respecto a las células control, o las que expresaron la variante R438. Las aberraciones cromosómicas encontradas con más frecuencia fueron las características de un defecto celular en NHEJ: cromosomas dicéntricos y cromosomas fusionados por alguno de los extremos. También se observaron estructuras de cromátida circular, trirradiada y con roturas (en la **figura 73B** se muestran como ejemplo algunas de estas aberraciones cromosómicas). El nivel de aneuploidía inducida por IR o espontánea, también aumentó significativamente en las células que sobreexpresaron hPol $\lambda$  W438 con respecto a las células control, o que sobreexpresaron hPol $\lambda$  R438. Así, tras tratamiento con RI, el 85% de las células que sobreexpresaban la variante hPol $\lambda$  W438 mostraron aneuploidía (**Fig. 73A**). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la expresión de la variante hPol $\lambda$  W438 induce un incremento de la inestabilidad cromosómica.

A

	Número de metafases		Células con Aneuploidias (%)		Células con aberraciones (%)		Dicentricas/ Fusiones (%)		Roturas (%)	
	NT	RI	NT	RI	NT	RI	NT	RI	NT	RI
DRA10	104	105	39.4	35.0	1.9	8.6	1.9	7.7	0.0	1.0
CT	103	107	33.0	32.7	1.0	8.4	1.0	6.5	0.0	1.9
R1	104	122	38.5	54.9	2.9	19.7	1.9	16.4	1.0	3.3
R2	101	115	41.6	56.5	3.0	19.1	1.0	17.3	2.0	1.7
W1	111	108	55.9	84.3	9.0	43.5	8.1	37.9	0.9	5.6
W2	107	120	68.2	85.8	16.8	43.0	16.8	38.3	0.9	6.7

B



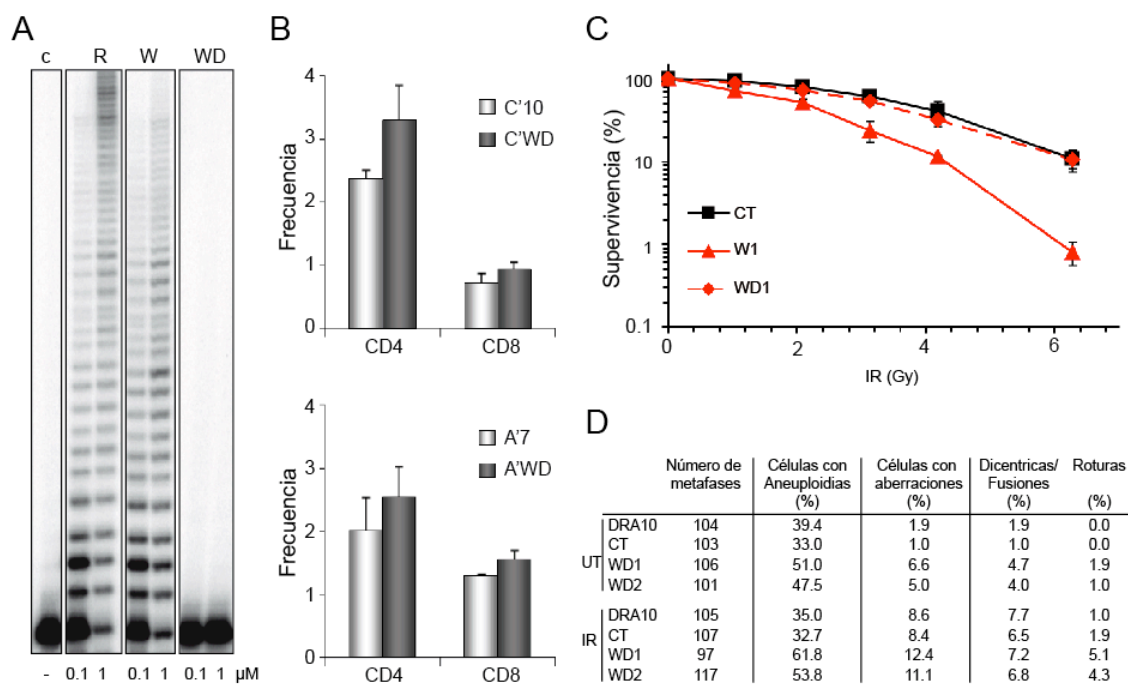
**Figura 73. Cariotipo de las células que sobreexpresan hPolλ W 438.**

(A) Análisis de metafases de células tratadas o no tratadas con 2 Gy de RI de las células que sobreexpresan hPolλ R438 (R1 y R2) y W438 (W1, W2 y con la forma catalíticamente inactiva WD) en comparación con las células usadas como control CHO-Dra10 y CT (transfectadas con el vector vacío). (B) Ejemplos de aberraciones cromosómicas encontradas en células que sobreexpresan hPolλ W 438.

### 5.13. El fenotipo causado por W438 está asociado a la actividad DNA polimerasa de la enzima

Para comprobar que los efectos fenotípicos descritos asociados a la variante W438 se debían a la actividad DNA polimerasa de la enzima, se construyó un nuevo mutante a partir de Polλ W438 en donde se sustituyeron dos de los aspárticos catalíticos (D427 y D429) por alaninas mediante mutagénesis dirigida en el plásmido de expresión pRSETB, según se describe en Materiales y Métodos. A partir de este plásmido se expresó y purificó una variante inactiva de hPolλ W438 (denominada WD) como se ha descrito anteriormente (García-Díaz y cols., 2001). Así, la actividad enzimática de WD en un ensayo de polimerización fue indetectable (**Fig. 74**). Se transfirió el correspondiente cDNA al vector pIRES y se transfectaron células DRA10 para obtener el clon mutante WD, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Como se muestra en la **figura 74**, todos los fenotipos asociados a la sobreexpresión de la variante hPolλ W438 desaparecieron cuando el mutante inactivo WD se sobreexpresó. Así, el mutante WD mostró niveles de actividad NHEJ, sensibilidad a IR, o análisis de cariotipo similares a los observados en las células control.

Todos estos resultados indican que el fenotipo observado en el caso del mutante hPolλ W438 depende intrínsecamente de la capacidad de polimerización de la enzima y no indirectamente de otros factores implicados en NHEJ.



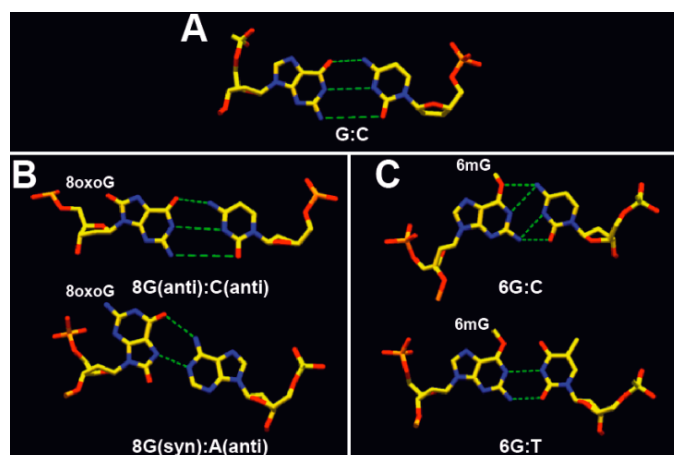
**Figura 74. El fenotipo asociado a la sobreexpresión de hPol $\lambda$  W438 depende de su actividad intrínseca.**

(A) Actividad de polimerización de DNA (ver Materiales y Métodos). (B-D) La sobreexpresión del mutante catalítico WD presenta una actividad normal en NHEJ (B), una sensibilidad normal a RI (C) y un análisis de cariotipo normal (D).

## 5.14. Síntesis a través de lesiones

### 5.14.1. Inserción frente a 8oxoG y 6mG.

A continuación nos interesó evaluar el papel en la síntesis a través de lesiones de la variante W438, al igual que se realizó con la variante R438 (Picher y Blanco, 2007). Para ello se realizaron estudios frente a dos posibles modificaciones químicas de la base nitrogenada guanina, la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8oxoG) y la O<sup>6</sup>-metilguanina (6mG), dos de las modificaciones más habituales en la célula y de gran importancia desde el punto de vista de la mutagénesis, debido a los diferentes apareamientos que pueden formar ambas bases nitrogenadas (**Fig. 75A**). En concreto cuando se produce la modificación a 8oxoG, esta base podría aparearse tanto con la base nitrogenada citosina (configuración anti) como con la base adenina (configuración syn), produciendo en este último caso mutaciones de transversión G·C → T·A (Moriya, 1993). Por su parte, la modificación 6mG preferentemente aparece con la base nitrogenada timina en vez de con la base citosina, produciendo un efecto mutagénico con la aparición de transiciones G·C → A·T (**Fig. 75B**). Esto es debido a la orientación del grupo metilo unido covalentemente al oxígeno 6 de la base guanina.



**Figura 75: Estructura de los apareamientos posibles teniendo como molde las bases modificadas 8oxoG y 6mG.**

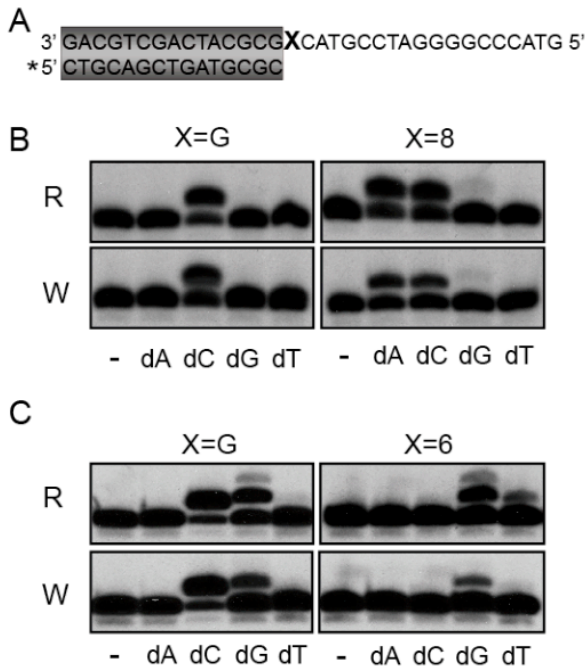
(A) Apareamiento de Watson y Crick entre las bases dG y dC. Los puentes de hidrógeno entre las bases se representan como líneas de puntos. (B) Estructura del apareamiento entre las bases 8oxoG y dC (PDB: 1U48) y del apareamiento entre las bases 8oxoG y dA (PDB: 178D). (C) Estructura del apareamiento entre las bases 6mG y dC (PDB: 1D24) y del apareamiento entre las bases 6mG y dT (PDB: 1D27). La figura se ha realizado empleando el programa Swiss PDB Viewer (Guex y cols., 1997; <http://www.expasy.com/spdbv/>). Las coordenadas cristalográficas empleadas han sido obtenidas de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>).

Como se observa en la **figura 76** tanto R438 como W438 realizan la inserción dirigida por la primera base del molde dG ensayando como control de actividad de polimerización. Sin embargo ambas variantes llevan a cabo la inserción de dA y dC frente a 8oxoG de manera muy eficiente, alcanzando niveles de inserción similares a los obtenidos frente a la base no modificada dG.

Por otro lado, la inserción frente a la base 6mG requirió iones  $Mn^{2+}$  como cofactor para ambas variantes como ya se había descrito anteriormente para R438 en nuestro laboratorio (Picher y Blanco, 2007). Sobre el molde control se aprecia la inserción de dC y dG. El uso del  $Mn^{2+}$  facilita la inserción errónea de dG que probablemente ocurre por un método de dislocación por el que se utiliza como molde la 2ª base disponible. Esta reacción ocurre con similar eficiencia para ambas variantes. En el molde con 6mG además de la adición de dG mediado por dislocación, se aprecia leve inserción del nucleótido dT.

Estos resultados corroboran los obtenidos para las distintas polimerasas de la familia X y otras DNA polimerasas que insertan preferentemente dT frente a 6mG (Picher y Blanco, 2007; Haracska y cols., 2003; Haracska y cols., 2002 y Singh y cols., 1996).

Se puede concluir por tanto que la mutación W438 no altera la capacidad de inserción de hPol $\lambda$  frente a las bases dañadas 8oxoG o 6mG.



**Figura 76. Inserción frente a una base nitrogenada modificada.**

(A) Secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. Ensayo de inserción frente a las bases 8oxoG (B) y 6mG (C) por hPol $\lambda$  R438 y W438. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor es Mg<sup>2+</sup>, salvo en el caso de la inserción frente a 6mG, en el que se utilizó Mn<sup>2+</sup>. La concentración de dNTPs es de 1  $\mu$ M en todos los casos.

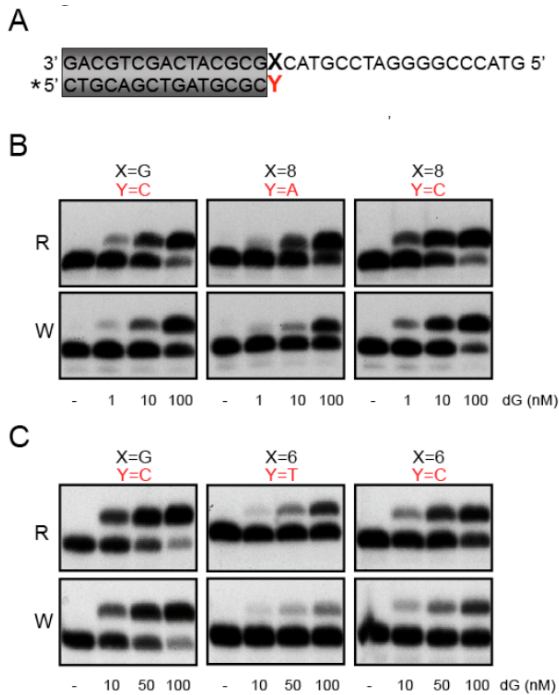
#### 5.14.2. Extensión de pares de bases con la base molde modificada 8oxoG y 6mG.

El siguiente paso en la síntesis a través de lesiones es la extensión del nucleótido incorporado frente a la lesión. La extensión es un paso crucial a la hora de una posible fijación de mutaciones. Si el par generado durante la inserción frente a la lesión es correcto interesará que el paso de extensión sea lo más eficiente posible. Por el contrario, si frente a la lesión se insertó un nucleótido incorrecto, y la extensión fuera poco eficiente se dispondría de una oportunidad para que la adición mutagénica sea corregida. Por esta razón será relevante, tanto la fidelidad de extensión del par correcto frente al mutagénico determinada como la eficiencia de extensión, eficiencia relativa de extensión de los pares mutagénicos y no mutagénicos frente a la extensión de pares de bases no dañadas.

En la **figura 77** se puede observar que ambas polimerasas son capaces de extender el par G:C no dañado con eficiencia similar. En cuanto a los pares de bases con alguna base dañada y como ya se describió para la variante R438 (Picher y Blanco, 2007) la extensión del par no mutagénico 8oxoG:dG es más eficiente que la del para mutagénico 8oxoG:dA por parte de ambas variantes.

De igual manera, ambas polimerasas extienden con mayor eficiencia el par no mutagénico 6mG:dC frente al mutagénico 6mG:dT aunque con menor eficiencia que frente al par no dañado dG:dC.

Ambas polimerasas por tanto, presentan un comportamiento fiel en cuanto a la extensión de pares de bases con alguna base dañada como 8oxoG o 6mG.



**Figura 77. Extensión desde pares con la base 8oxoG o 6mG como molde.**

(A) Secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. Ensayo de extensión de los posibles pares formados con 8oxoG (B) o 6mG (C) como base molde por hPolλ R438 y W438. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM DNA y 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor es Mg<sup>2+</sup>. Las concentraciones utilizadas de dGTP se detallan en la figura.

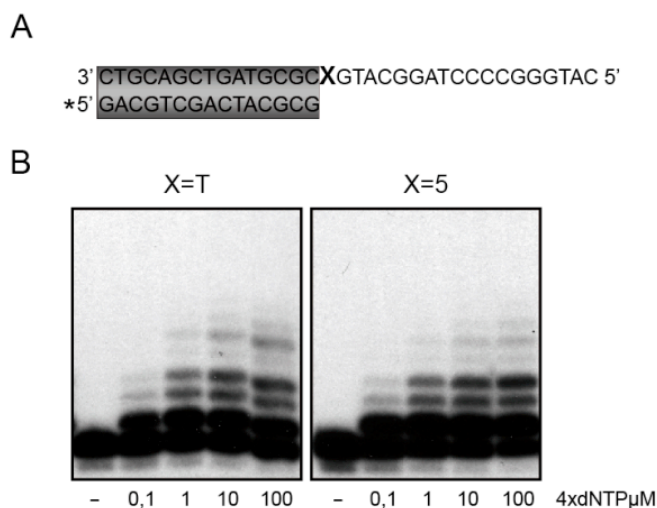
### 5.14.3. Inserción frente a 5FU

Como se ha descrito anteriormente en esta tesis doctoral, el 5FU es un análogo de nucleótido ampliamente usado, individualmente o en combinación con otros agentes antitumorales, para una infinidad de tumores sólidos (Pratt y cols., 1994). La capacidad mutagénica de los 5-halogenoderivados derivados sobre el DNA es debida al menos a dos efectos, alteraciones en los niveles de dNTPs, y apareamientos de bases incorrectos inducidos por la presencia del grupo halógeno de estos análogos de nucleótido (Hopkins y Goodman, 1980). De esta manera, la fuerte electronegatividad del átomo de flúor altera la densidad electrónica del anillo pirimidínico favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno con residuos de guanina (Fig. 34. Capítulo).

Dado el efecto mutagénico provocado por la sobreexpresión de la variante W438 de la hPolλ en células CHO anteriormente presentado en el apartado 5.9, nos planteamos el estudio *in vitro* del comportamiento de la variante frente a 5FU.

Como puede observarse en la figura 78, hPolλ W438 es capaz de tolerar 5FU de forma similar a la presencia de dT en el molde, al igual que la variante R438.

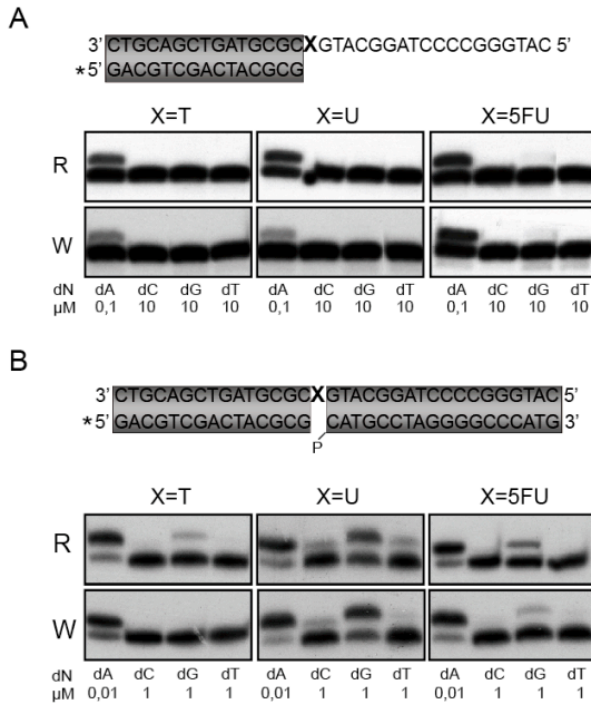




**Figura 78. Síntesis a través de 5-fluorouracilo (5FU).**

(A) Secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. (B) Ensayo de síntesis a través de la lesión 5FU por hPolλ W438. Como control, se llevó a cabo la reacción sobre una molécula de DNA que contiene una T en la misma posición de la lesión (X). El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor es Mg<sup>2</sup>. La concentración de dNTPs es la indicada en cada caso.

De igual manera, ambas variantes de hPolλ presentaron la misma preferencia de inserción de nucleótido frente a 5FU (**Fig. 79**). En un molde/iniciador que simula un intermedio de replicación, ambas polimerasas presentan un comportamiento no mutagénico insertando preferentemente dA frente a 5FU, al igual que frente a dT usado como control, y algo más eficiente que en el caso de encontrarse U en el sustrato. Por otro lado, si la lesión se localiza en *gaps* de pequeño tamaño ambas polimerasas, insertaron de nuevo preferentemente dA frente a T, U y 5FU como molde con una eficiencia mayor que en el caso del sustrato molde iniciador abierto por la presencia del grupo fosfato en el extremo 5'. Al realizar una comparación mas precisa de la incorporación de dA (**Fig. 80A**) el densitometrado de las bandas que correspondían a la inserción de dA reveló que ambas polimerasas insertaban con mayor eficiencia dA frente a 5FU con respecto a la inserción frente a T como molde, con un factor de 1,4 y 1,1 veces para R438 y W438, respectivamente.

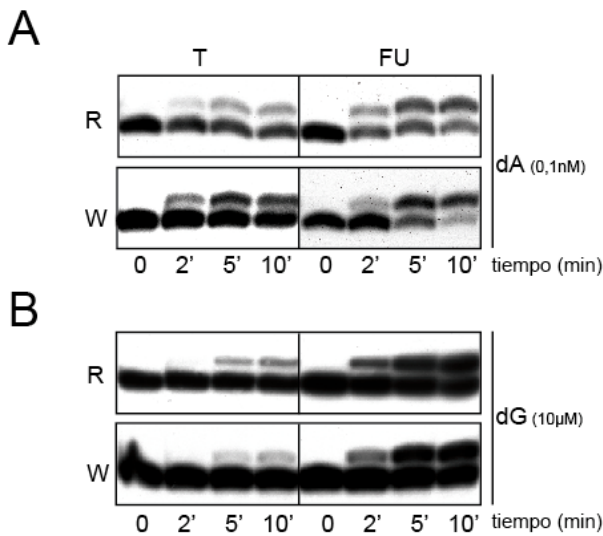


**Figura 79. Inserción frente a 5-fluorouracilo (5FU).**

La secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo se representa en la parte superior de cada apartado. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. Ensayo de inserción frente a la base 5FU por hPol $\lambda$  R438 y W438 en molde/iniciador abierto (A) y gap de un nucleótido (B). En ambos casos se utilizaron dos moléculas control en las que la base 5FU fue substituida por T o U. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM de DNA y 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor fue Mg<sup>2+</sup>. La concentración de dNTPs fue la indicada en cada caso.

En la **figura 79B** podemos observar una leve inserción incorrecta de dG por parte de R438 frente a T. Sin embargo, forzando la incorporación de dG respecto a la de dA 10<sup>4</sup> veces en ambas polimerasas, se logra ver inserción. El densitometrado de las bandas correspondientes a la inserción de dG que se muestra en la **figura 80B**, reveló que ambas polimerasas cometían el error de inserción de dG frente a FU con una eficiencia similar (4,2 y 3,9 veces para R438 y W438 respectivamente).

Se pondría concluir que las variantes R438 y W438 de hPol $\lambda$  presentan un nivel de tolerancia similar con comportamiento fiel en presencia de 5FU como molde.



**Figura 80. R438 y W438 presentan un comportamiento fiel frente a 5FU.**

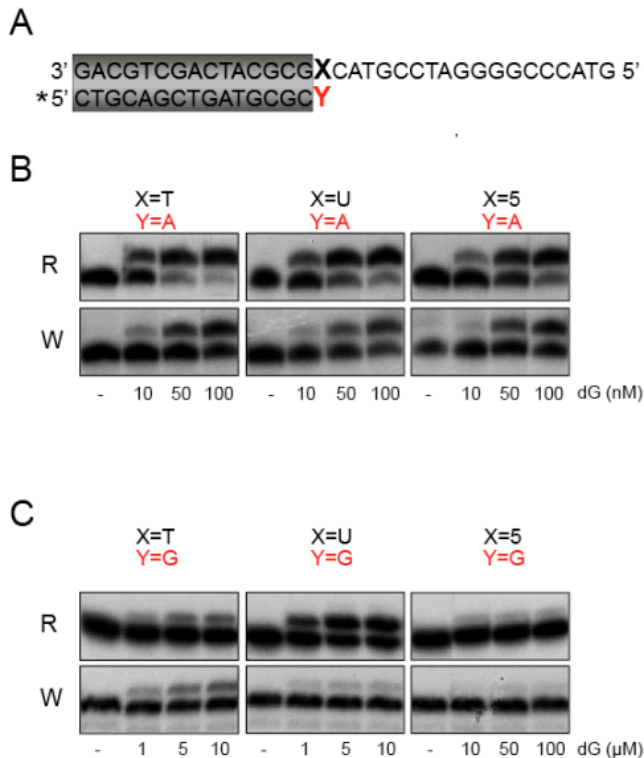
Cinética de inserción frente a tiempo, del nucleótido correcto dA (A) y el incorrecto dG (B) en presencia de T y 5FU como molde. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM de DNA y 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor fue Mg<sup>2+</sup>. La concentración de dNTPs fue la indicada en cada caso.



5.14.4. Extensión de pares de bases 5FU:G y 5FU:A.

A continuación analizamos la extensión de pares de bases generados por la inserción frente a 5FU. De igual manera que ocurre con la extensión del par con la lesión en las que una de ellas esta modificada, como el caso de 8oxoG o 6mG, la extensión de pares de bases es el paso importante para la fijación o no de la mutación. Como ya se ha explicado anteriormente la eficiencia en este paso determinará la fijación o no en función de cual sea el par que se extienda, y por lo tanto, en las consecuencias que desencadene 5FU como droga antitumoral. En este sentido se pueden hacer varias interpretaciones. Si el par mas eficientemente extendido es el “correcto” se podría pensar en una peor respuesta al tratamiento puesto que no se fijarían mutaciones. Sin embargo, si el par extendido es el mutagénico esperaríamos una mejor respuesta puesto que se fijarían mutaciones que si ocurren en genes esenciales podrían desencadenar la muerte de la célula tumoral.

En primer lugar comprobamos que ambas variantes de la polimerasa son capaces de extender de forma eficiente el par de bases T:A. De igual manera, ambas variantes extienden de forma eficiente los pares de bases U:A y 5FU:A. Sin embargo, fueron mucho menos eficientes en cuanto a la extensión de los pares incorrectos T:G y U:G, pero sobretodo del par de bases mutagénico 5FU:G (**Fig. 81**). En este sentido, es reseñable que la variante W438 es la de menor eficiencia cuando se trata del par de bases U:G y 5FU:G.

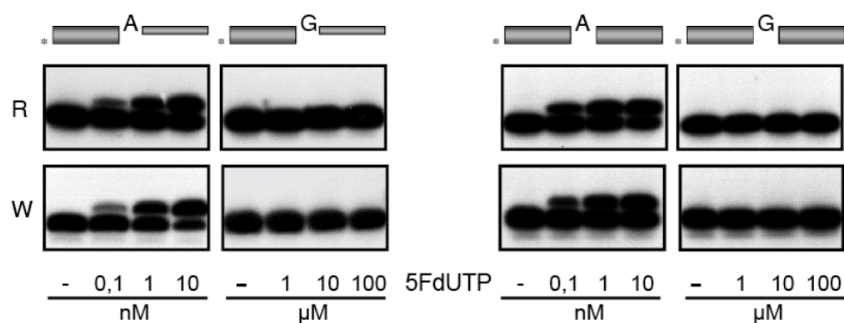


**Figura 81. Extensión de los pares de bases 5FU:A y 5FU:G.**

(A) Secuencia de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. (B-C) Ensayo de extensión por hPolλ R438 y W438, de los pares de base formados 5FU:A o 5FU:G en comparación a los pares de bases usados como control T:A o T:G. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM de DNA y 200 nM de cada DNA polimerasa, salvo en el caso de la extensión de los molde apareado a dG en el que se usó 300 nM de W438. El metal utilizado como cofactor fue Mg<sup>2+</sup>. La concentración de dGTP fue la indicada en cada caso.

### 5.14.5. Inserción de 5FdUTP

De la misma manera que se realizó para el caso de la variante R438 de hPol $\lambda$  junto a hPol $\beta$  y hPol $\mu$ , analizamos a continuación la capacidad de inserción del análogo de nucleótido 5FdUTP frente a los dos bases dA o dG en la cadena molde. Como se observa en la **figura 82** ambas polimerasas presentan el mismo comportamiento no mutagénico e insertan 5FdUTP únicamente y de forma muy eficiente solo frente a dA tanto en sustratos tipo intermedio de replicación como en *gaps* de pequeño tamaño.



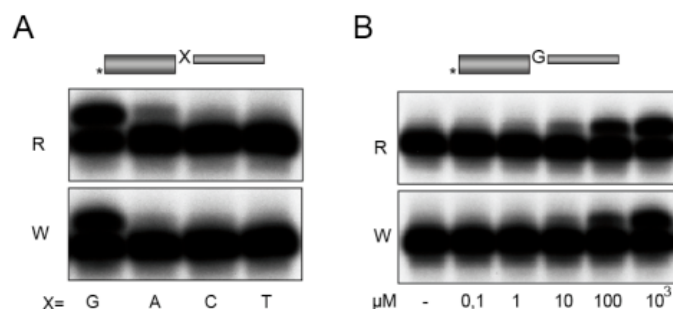
**Figura 82. Inserción de 5FdUTP.**

Ensayo de inserción de 5FdUTP frente a las bases molde dA y dG por hPol $\lambda$  R438 y W438, en contexto molde/iniciador y *gap* de 1 nt. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM de DNA y 100 nM de cada DNA polimerasa. El metal utilizado como cofactor fue Mg<sup>2+</sup>. La concentración de 5FdUTP fue la indicada en cada caso.

### 5.14.6. Inserción de AraCTP

De igual forma que para el 5FU analizamos el comportamiento de la variante W438 frente al análogo de nucleótido AraCTP, anteriormente analizado en esta tesis doctoral. Como ya se mencionó, AraCTP es un análogo de nucleótido que al igual que el 5FU está ampliamente usado como terapia antitumoral actuando como un terminador de cadena.

Como se observa en la **figura 83**, ambas polimerasas son capaces de insertar AraCTP preferentemente frente a dG como molde (**Fig. 83A**), presentando la misma eficiencia de inserción (**Fig. 83B**) de este sustrato.



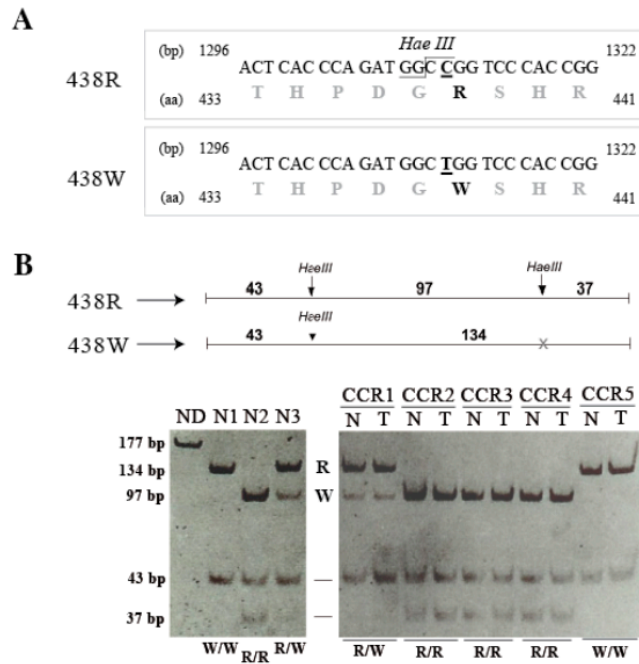
**Figura 83. Inserción de AraCTP.**

(A) Ensayo de inserción de AraCTP por hPol $\lambda$  R438 y W438 frente a las cuatro posibles bases molde en un contexto de molde/iniciador abierto. (B) Ensayo de inserción de AraCTP por hPol $\lambda$  R438 y W438 frente a dG en función de la concentración de AraCTP. En la parte superior de A y B se muestra el esquema de la molécula de DNA utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. Los ensayos se realizaron tal y como se describe en Materiales y Métodos empleando 100 nM de cada polimerasa, 5 nM del sustrato, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> como metal activador y la cantidad indicada de AraCTP en cada caso.

### 5.15. Genotipado de los alelos R/W438 en diferentes poblaciones. Asociación del alelo W438 al riesgo de padecer cáncer de recto

Mediante el desarrollo de un RFLP de la secuencia que contiene el polimorfismo se pudo realizar el análisis de la frecuencia de los dos alelos en diferentes poblaciones (ver Materiales y Métodos). El producto resultante de la digestión con *Hae III* es de 97 pb en el alelo R438 para individuos homocigotos (R/R). Por el producto no digerido de 134 pb revela la presencia del alelo W438 (W/W) ya que el polimorfismo elimina la diana de restricción. La digestión en muestras de individuos heterocigotos R/W daría como resultado la presencia de ambos productos (Fig. 84).

Inicialmente, se analizó por RFLP una población española de 40 individuos sanos. La frecuencia del alelo W438 fue 0.27, estando en equilibrio de *Hardy-Weinberg*. La frecuencia del alelo W438 es la misma que la que se recoge en el estudio de la población Caucásica en el HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>).



**Figura 84. Identificación de un polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de hPolλ.**

(A) Un único cambio en el nucleótido 1311 de la secuencia del cDNA (C a T) produce que el aminoácido 438 de Arginina (R) pase a Triptófano (W). Se indica la posición de la diana para el enzima de restricción *HaeIII* que está presente en R438 y no en W438. (B) Esquema y PCR-RFLP análisis del cambio C a T después de la digestión con *HaeIII* en tres muestras de individuos sanos (líneas N1-3) y de cinco pacientes de cáncer colorectal (líneas CCR1-5). El tamaño esperado después de digerir con *HaeIII* se indica en el esquema. El control de no digerido (ND) (177pb) se incluye en la figura. Los alelos se indican a la izquierda y los ejemplos de genotipado se indican en la parte inferior (R/R, R/W, W/W). N:normal, T:tumoral.

Lo siguiente que nos planteamos fue investigar la posible asociación del polimorfismo R438W y la susceptibilidad a padecer cáncer y su valor pronóstico. Estos análisis se hicieron en colaboración con el grupo del Dr. Alberto Villanueva (Institut Català d'Oncologia-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). Se analizaron por RFLP una colección de muestras de una población muy bien caracterizada casos-control de pacientes españoles de cáncer de colon. Se trata de una población con 356 pacientes con cáncer colorectal esporádico y 297 controles. Como puede observarse en la **tabla 6**, las frecuencias obtenidas para el alelo W438 fueron 0.25 para los controles y 0.28 para los casos. En los controles, las frecuencias se encuentran en equilibrio de *Hardy-Weinberg*. En un modelo de codominancia, es decir teniendo en cuenta los tres genotipos, la asociación del polimorfismo R438W con el cáncer colorectal no fue significativa. Sin embargo, en el modelo dominante que combina los genotipos R/W y W/W, el alelo W438 presenta una tendencia a incrementar el riesgo (P=0.043;OR 1.54; 95%CI, 1.01-2.33; ver **Tabla 6**).

**Tabla 6. Frecuencias del genotipaje. Asociación de hPolλ R438W con el cáncer colorectal**

Genotipo	Controles (n=297)		Casos (n=356)		OR <sup>a</sup>	(95% CI)	P-value
	n	%	n	%			
<b>Modelo codominante</b>							
R/R	168	56.6	181	50.8	1		0.33
R/W	109	36.7	151	42.4	1.28	(0.92 - 1.77)	
W/W	20	6.7	24	6.7	1.14	(0.61 - 2.16)	
<b>Modelo dominante</b>							
R/R	168	56.6	181	50.8	1		0.15
R/W-W/W	129	43.4	175	49.2	1.26	(0.92 - 1.71)	

n, número de casos; OR, Odds ratio; 95% CI, 95% intervalo de confianza

<sup>a</sup>OR ajustado por edad y sexo.

Modelo recesivo que combina los alelos R/R y R/W : OR, 1.03; 95% CI, 0.56-1.92, P=0.92

En un análisis más exhaustivo (**Tabla 7**), los 356 casos de cáncer colorectal se separaron en dos poblaciones que correspondían en 129 casos de cáncer de recto y 227 casos de cáncer de colon. Odds ratio (OR) muestran una asociación significativamente relevante del alelo W438 y el cáncer de recto en el modelo dominante (P=0.043; OR, 1.54; 95% CI=0.79-1.59), mientras que no fue significativa para los casos de cáncer de colon (P=0.53; OR, 1.12; 95% CI=0.79-1.59).

**Tabla 7. Genotipaje y asociación del polimorfismo R438W con el riesgo de padecer cáncer colorectal.**

Genotipo	Controles (n=297)		Cáncer de recto (n=129)				Cáncer de colon (n=227)					
	n	%	n	%	OR <sup>a</sup>	95% CI	P value	n	%	OR <sup>a</sup>	(95% CI)	P value
<b>Modelo codominante</b>												
R/R	168	56.6	59	45.7	1		0.094	122	53.7	1		0.59
R/W	109	36.7	61	47.3	1.58	(1.03 - 2.44)		90	39.6	1.13	(0.78 - 1.63)	
W/W	20	6.7	9	6.9	1.29	(0.56 - 3)		15	6.6	1.97	(0.52 - 2.19)	
<b>Modelo dominante</b>												
R/R	168	56.6	59	45.7	1		0.043	122	53.7	1		0.53
R/W-W/W	129	43.4	70	54.3	1.54	(1.01 - 2.33)		105	46.3	1.12	(0.79 - 1.59)	

<sup>a</sup>OR ajustado por edad y sexo.

n, número de casos; OR, Odds ratio; 95% CI, 95% intervalo de confianza.

Tal como muestra la **tabla 8**, cuando se ajusta un modelo de regresión logarítmico para hombres y mujeres, se observa una fuerte asociación del genotipo W438 en cáncer de recto en las muestras masculinas (P=0.019 en modelo dominante), mientras que no se ve en los casos femeninos (P=0.68 en modelo dominante). En el caso de los pacientes de cáncer de colon, no existe un efecto significativo de asociación, pero es de destacar los valores P bajos para los caso masculinos frente a los valores en los femeninos.

Con respecto a la edad, se ha descrito algún polimorfismo de genes de reparación de DNA con una fuerte asociación a la edad (Moreno y cols. 2006; Abdel-

## RESULTADOS

Rahman y cols., 2000). En nuestro estudio no existe una clara asociación con la edad del alelo W438.

**Tabla 8. Genotipo y asociación del polimorfismo R438W con el riesgo de padecer cáncer colorectal.**

Genotipo	Hombres											
	Controles (n = 158)		Cáncer de recto (n = 76)					Cáncer de colon (n = 141)				
	n	%	n	%	OR	95% CI	P value	n	%	OR	95% CI	P value
<b>Modelo codominante</b>												
R/R	96	60.8	34	44.7	1		0.060	73	51.8			0.27
R/W	52	32.9	36	47.4	2.01	(1.12, 3.59)		60	42.6	1.48	(0.92, 2.40)	
W/W	10	6.3	6	7.9	1.68	(0.57, 5.01)		8	5.7	1.06	(0.39, 2.82)	
<b>Modelo dominante</b>												
R/R	96	60.8	34	44.7	1		0.019	73	51.8			0.14
R/W + W/W	62	39.2	42	55.3	1.95	(1.12, 3.41)		68	48.2	1.41	(0.89, 2.24)	

Genotype	Mujeres											
	Controles (n = 139)		Cáncer de recto (n = 53)					Cáncer de colon (n = 86)				
	n	%	n	%	OR	95% CI	P value	n	%	OR	95% CI	P value
<b>Modelo codominante</b>												
R/R	72	51.8	25	47.2	1		0.81	49	57.0			0.65
R/W	57	41.0	25	47.2	1.20	(0.62, 2.32)		30	34.9	0.77	(0.44, 1.37)	
W/W	10	7.2	3	5.7	0.85	(0.22, 3.38)		7	8.1	1.03	(0.37, 2.89)	
<b>Modelo dominante</b>												
R/R	72	51.8	25	47.2	1		0.68	49	57.0			0.45
R/W + W/W	67	48.2	28	52.8	1.15	(0.60, 2.17)		37	43.0	0.81	(0.47, 1.39)	

<sup>a</sup>OR ajustado por edad (categorías de edad: < 55, [55, 70), ≥ 70).

n, número de casos; OR, Odds ratio; 95% CI, 95% intervalo de confianza.

Por otro lado, con relación a la prognosis, no se observa una asociación con la supervivencia tanto si se consideran o no las subpoblaciones masculino-femenino o edad por separado (Tabla 9).

**Tabla 9. Modelo Cox de una variable para los genotipos R/W asociado a prognosis**

	Supervivencia global						Supervivencia libre de enfermedad					
	Casos, n	%	Decesos, n	HR <sup>a</sup>	95% CI	P	Casos, n	%	Decesos, n	HR <sup>a</sup>	95% CI	P
<b>Modelo codominante</b>												
R/R	177	50.6	57	1		0.73	137	50.9	27	1		0.55
R/W	149	42.6	56	1.13	(0.78 - 1.64)		114	42.4	28	1.34	(0.79 - 2.28)	
W/W	24	6.9	10	0.92	(0.47 - 1.8)		18	6.7	4	1.11	(0.39 - 3.19)	
<b>Modelo dominante</b>												
R/R	177	50.6	57	1		0.62	137	50.9	27	1		0.30
R/W-W/W	173	49.4	66	1.09	(0.76 - 1.56)		132	49.1	32	1.31	(0.78 - 2.19)	

n, número de casos; HR, Razón Hazard; 95% CI, 95% intervalo de confianza.

<sup>a</sup>HR ajustados por edad, sexo y estadio de Duke.

# *DISCUSIÓN*





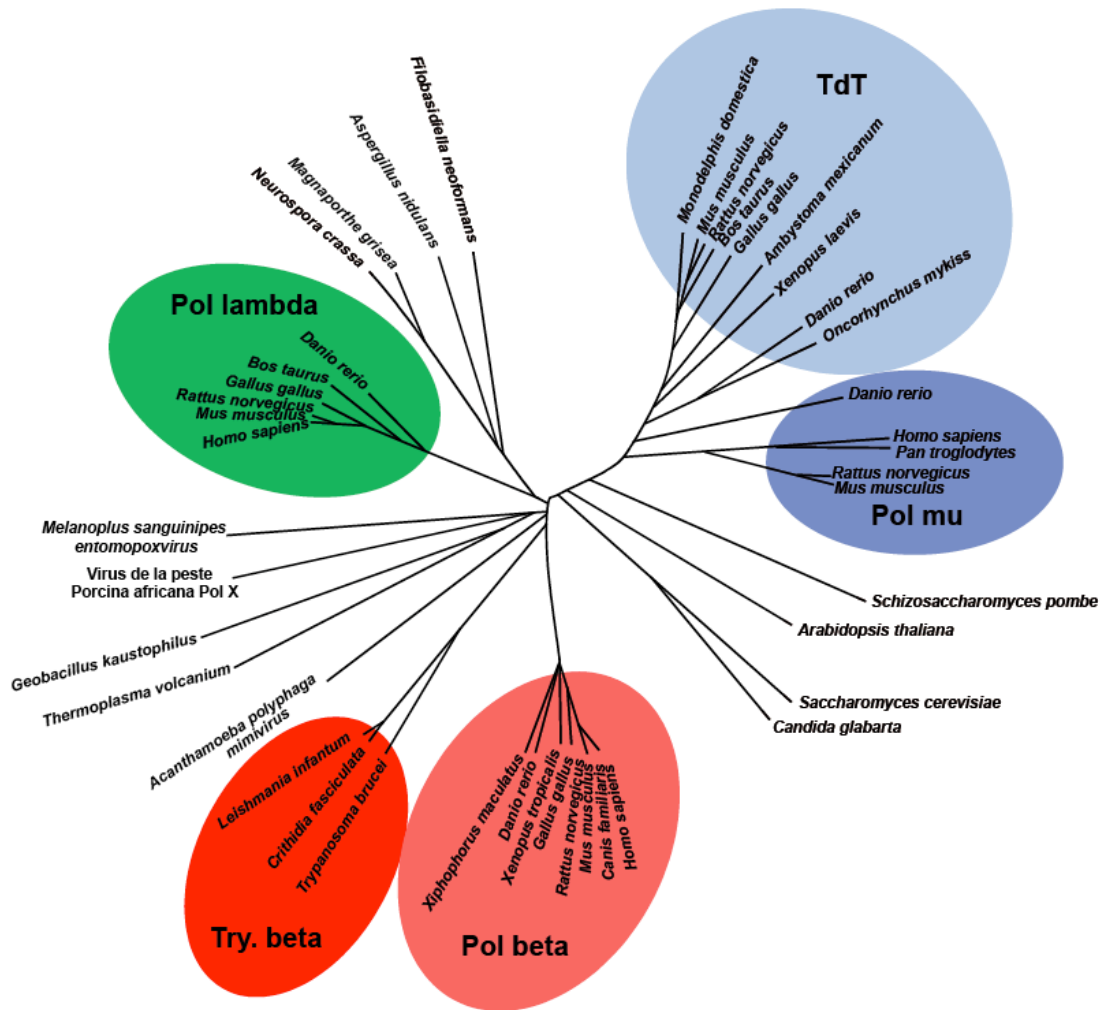
El genoma de las células eucarióticas está amenazado de forma continua por una gran variedad de agentes externos e internos que generan un gran número de lesiones entre las que se encuentran roturas de banda simple, roturas de banda doble, apareamientos incorrectos, modificaciones químicas de bases y azúcares y entrecruzamientos entre la misma o diferente cadena. En respuesta a estos daños generados, y para evitar su acumulación, las células han desarrollado múltiples sistemas de reparación que implican en su gran mayoría pasos de síntesis de DNA. Así, según el tipo de sustrato generado serán necesarias unas propiedades enzimáticas concretas para realizar los procesos de una manera precisa y eficiente y, dentro de lo posible, libre de error. Por tanto, en todos estos procesos tienen un papel importante las DNA polimerasas.

Actualmente se han identificado cinco polimerasas en *E. coli* y al menos ocho en *S. cerevisiae*, nueve en *S. pombe* y catorce en humanos (Burgers y cols., 2001; Hübscher y cols., 2002; Bebenek y Kunkel, 2004; Pavlov y cols., 2006). Basándose en la estructura primaria de las subunidades catalíticas, las DNA polimerasas se han clasificado en diferentes familias. Los organismos eucariotas presentan cuatro familias: la familia A (Pol $\gamma$ , Pol $\theta$  y Pol $\nu$ ), la familia B (Pol $\alpha$ , Pol $\delta$ , Pol $\epsilon$  y Pol $\zeta$ ), la familia X (Pol $\beta$ , Pol $\lambda$ , Pol $\mu$  y TdT) y la familia Y (Pol $\eta$ , Pol $\iota$ , Pol $\kappa$  y Rev1). Cabe destacar el descubrimiento, en la última década, de una nueva familia de DNA polimerasas, la familia Y (Ohmori y cols., 2001), cuyos miembros están involucrados en la replicación a través de lesiones en el DNA. Otro hecho significativo fue el descubrimiento de Pol $\lambda$  (García-Díaz y cols., 2000) y Pol $\mu$  (Domínguez y cols., 2000), con las cuales se dobló el número de enzimas conocidas de la familia X de DNA polimerasas y cuyos miembros están involucrados en procesos de reparación y variabilidad del DNA.

## **Evolución de los miembros de la Familia X de DNA polimerasas**

Los miembros de esta familia están presentes en gran cantidad de organismos. Se han encontrado miembros de esta familia en todos los taxones monofiléticos: *Eukaria*, *Bacteria* y *Archea*, e incluso en virus cuyo genoma es DNA (Oliveros y cols., 1997). El alto grado de conservación estructural a nivel global y a nivel de secuencia aminoacídica entre las DNA polimerasas de la Familia X parece indicar que derivan de un ancestro común.

A diferencia de lo que ocurre en virus, procariotas y levaduras, los eucariotas superiores poseen más de un miembro de la Familia X. Sin embargo, existen especies en las que no se ha descrito ningún miembro de esta familia, como los organismos modelo *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Burgers y cols., 2001), por lo que se convierten en organismos de especial interés para conocer como han solventado la ausencia de este tipo de DNA polimerasas en los procesos de reparación del DNA.

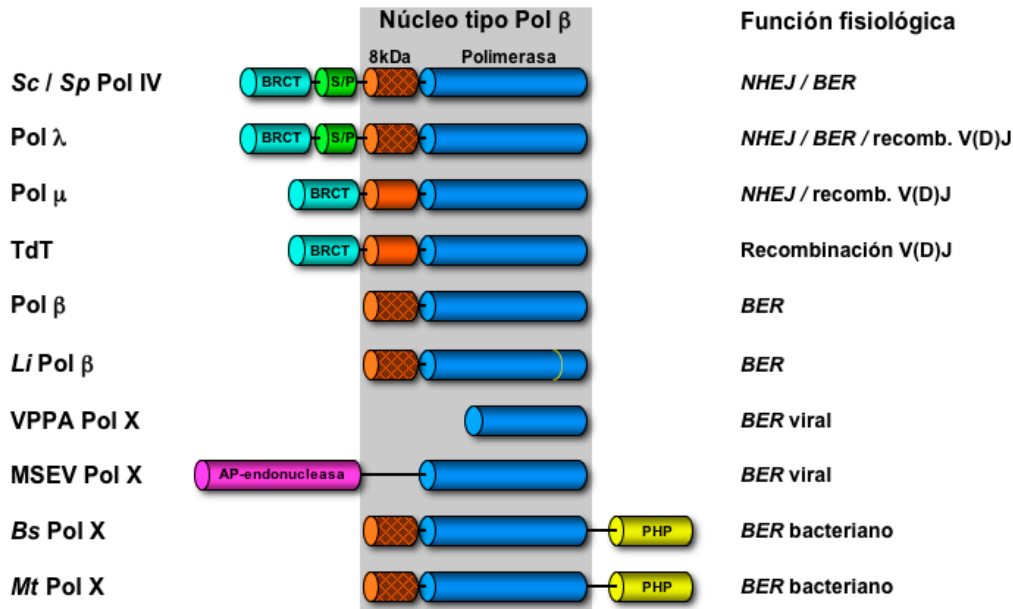


**Figura 85. Relación evolutiva de los miembros de la familia X de DNA polimerasas.** Árbol filogenético realizado empleando un segmento conservado perteneciente al dominio catalítico. Las diferentes DNA polimerasas se agrupan en subfamilias: Pol lambda Pol mu, Pol beta, TdT y Pol beta de Tripanosomas. Figura tomada de García-Díaz y cols.,(2005).

La **figura 85** muestra las relaciones filogenéticas entre los miembros conocidos de la Familia X de DNA polimerasas pertenecientes a diferentes organismos. El árbol filogenético fue realizado empleando un segmento corto y muy conservado del sitio activo de polimerización, con el fin de evitar que la presencia de dominios accesorios o pequeñas inserciones o deleciones interfiriesen en el análisis. Los resultados sugieren que las distintas subfamilias que se pueden identificar dentro de la Familia X (Pol $\beta$ , Try. Pol $\beta$ , Pol $\lambda$ , Pol $\mu$  y TdT) han evolucionado a partir de un ancestro común, quizá para adaptarse a los diferentes requerimientos funcionales. La evolución de los organismos mas complejos parece determinar la especialización de los miembros de la Familia X con el fin de aumentar la eficiencia de los procesos de síntesis de DNA en los que están implicados.

La organización modular de diferentes miembros de la Familia X desde virus a eucariotas señala la existencia de un núcleo conservado tipo Pol $\beta$  (**Fig. 86**), cuya mínima versión se encuentra en la Pol X del virus de la peste porcina africana (VPPA), que únicamente presenta los subdominios palma y pulgar del dominio polimerasa (Oliveros y cols., 1997). La ausencia de dominio de 8 kDa tanto en Pol X de VPPA

como de MSEV (*Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*), puede reflejar la existencia de otras proteínas codificadas por el genoma viral que aporten las propiedades catalíticas (dRP liasa) y/o de unión a DNA que residen en este dominio en la mayoría de las DNA polimerasas de la Familia X. A pesar del reducido tamaño de Pol X de VPPA, posee una segunda actividad enzimática asociada, la actividad AP-liasa, que indica un posible papel en la ruta *BER* viral (García-Escudero y cols., 2003).



**Figura 86. Organización modular de los miembros de la Familia X de DNA polimerasas.** Representación esquemática de los dominios presentes en miembros de la familia desde virus a eucariotas superiores, así como la función propuesta para cada uno de dichos miembros. Los dominios de 8 kDa carentes de actividad dRP liasa se representan en color liso, mientras que los que poseen dicha actividad se representan rayados. *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Sp*: *Schizosaccharomyces pombe*; *Li*: *Leishmania infantum*; VPPA: virus de la peste porcina africana; MSEV: *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*; *Bs*: *Bacillus subtilis*; *Mt*: *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

La divergencia evolutiva de los miembros de la Familia X ha ocurrido en gran parte por adquisición de dominios adicionales con propiedades reguladoras y/o actividades enzimáticas.

Por su parte, PolX de MSEV posee asociada en el mismo polipéptido una AP endonucleasa (**Fig. 86**), lo que conforma una pareja idónea para tomar parte en la ruta *BER* viral. Miembros de la Familia X de eubacterias (*Bacillus subtilis*) y arqueobacterias (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) muestran la fusión de su núcleo conservado tipo Polβ a un dominio fosfodiesterasa (PHP, **Fig. 86**), con el fin de poseer en un mismo polipéptido las actividades DNA polimerasa y nucleasa, lo que podría constituir un gran beneficio funcional para la célula de cara a llevar a cabo procesos de reparación por la ruta *BER*.

En eucariotas existen miembros de esta familia desde protozoos (*Leishmania infantum*) hasta mamíferos (**Fig. 86**). Sin embargo, existen grandes diferencias en

cuanto a los dominios accesorios que presentan y que guardan una relación muy estrecha con su función fisiológica. El porcentaje de similitud a nivel de secuencia de aminoácidos del core tipo Pol $\beta$  entre los diferentes miembros de esta familia varía desde 91% entre las enzimas Pol $\beta$  de *Crithidia* y *Leishmania*, y 42% entre Pol $\mu$  y TdT, hasta un 19% de identidad entre LiPol $\beta$  y TdT (Taladriz y cols., 2001). LiPol $\beta$  presenta un porcentaje de identidad con la Pol $\beta$  de mamíferos de 31%, cercano al 32% entre Pol $\beta$  y Pol $\lambda$ . Es interesante resaltar que tanto LiPol $\beta$  como la Pol $\beta$  de *Crithidia* presentan inserciones dentro del núcleo tipo Pol $\beta$  que le permiten mediar interacciones proteína-proteína y proteína-DNA (**Fig. 86**).

Contrariamente a mamíferos, las levaduras presentan una única DNA polimerasa de la familia X, denominada Pol4. Tanto la Pol4 de *S. cerevisiae* como la de *S. pombe* posee en su extremo N-terminal dos dominios adicionales: un dominio de regulación Ser/Pro (S/P) y un dominio de interacción BRCT (**Fig. 86**). Además, ambas presentan la actividad dRP liasa asociada a su dominio de 8 kDa lo que sugiere un papel de las Pol4 de levaduras en procesos de reparación por BER (Bebenek y cols., 2005; González-Barrera y cols., 2005). A pesar de que ambas Pol4 presentan una organización estructural común presentan diferencias en cuanto a la similitud de secuencia con sus homólogas humanas. Mientras *ScPol4* es más parecida a Pol $\lambda$  en cuanto a la composición de la estructura básica tipo Pol $\beta$ , 25% de identidad (Bebenek y cols., 2005), *SpPol4* está más cerca evolutivamente de Pol $\mu$  (27% de identidad) seguida de Pol $\lambda$  (24% de identidad). Basándonos en la similitud de secuencia se puede especular que *SpPol4* es el ortólogo en levaduras de la Pol $\mu$  humana, mientras que *ScPol4* sería el ortólogo de la Pol $\lambda$  humana.

La presencia de dominios de interacción BRCT tanto en Pol IV como en Pol $\lambda$ , Pol $\mu$  y TdT, guarda relación con el papel que este dominio juega en procesos como la recombinación V(D)J y la reparación por *NHEJ*. El dominio BRCT de Pol IV permite la interacción con los factores implicados en la ruta *NHEJ* y la participación de esta DNA polimerasa en los eventos de síntesis de DNA producidos durante la reparación de una rotura de doble cadena (Tseng y Tomkinson, 2002; Tseng y Tomkinson, 2004). De igual modo, en eucariotas superiores el dominio BRCT de Pol $\lambda$ , Pol $\mu$  y TdT, permite que estas proteínas participen tanto en la reparación por *NHEJ* como en la recombinación V(D)J. Es posible que sutiles diferencias en la secuencia aminoacídica de los dominios BRCT de las tres DNA polimerasas tengan gran importancia a la hora de regular el acceso de cada DNA polimerasa a un determinado sustrato o proteína de la ruta.

Por último, la versión eucariótica de Pol $\beta$  habría evolucionado perdiendo dominios accesorios, consiguiendo así una especialización crucial para la célula, ya que protege frente a la gran cantidad de daño oxidativo presente como consecuencia del metabolismo aerobio. La conservación del dominio polimerasa y del dominio de 8 kDa (**Fig. 86**), donde reside la actividad dRP-liasa, resulta idónea para la participación en la ruta *BER*.

La similitud entre Pol $\lambda$  y Pol IV, que muestran los mismos dominios adicionales (**Fig. 86**), junto con la extraordinaria conservación evolutiva de Pol $\lambda$ , presente en diversos eucariotas superiores pero también presente en plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Glicinia maxima*, *Oryza sativa*), parece indicar que Pol $\lambda$  es el miembro de la Familia X más parecido al ancestro común del que derivan todos los miembros de la familia. Este

hecho podría justificar las múltiples funciones de Pol $\lambda$ , ya que el ancestro común del que deriva podría llevar a cabo diversos procesos de síntesis de DNA. En este sentido, tiene especial relevancia la presencia del dominio S/P, que podría regular la participación de Pol $\lambda$  en los diferentes procesos en los que puede tomar parte, como son la reparación por *BER*, por *NHEJ* y la recombinación V(D)J.

En resumen, los miembros de la Familia X de DNA polimerasas humanas se han especializado en diferentes procesos de síntesis de DNA asociados a reparación. Tales procesos son básicamente tres: la reparación por escisión de base (*BER*), llevada a cabo fundamentalmente por Pol $\beta$ , aunque también Pol $\lambda$  parece tener un papel relevante en situaciones concretas; la reunión de extremos no homólogos (*NHEJ*), en la que según el tipo de sustrato generado han de participar tanto Pol $\lambda$ , como Pol $\mu$ ; y la recombinación V(D)J, en la que participan Pol $\lambda$ , Pol $\mu$  y TdT, ejerciendo diversos papeles. Sutiles diferencias en las propiedades bioquímicas de los miembros de la Familia X podrían resultar cruciales a la hora de llevar a cabo los procesos en los que participan de manera conjunta. Por tanto, los miembros de esta familia se han diversificado para poder llevar a cabo tareas no redundantes, alcanzando de esta forma un alto grado de especialización que ha tenido como consecuencia un alto grado de eficiencia y especificidad en los procesos en los que toman parte.

### **LiPol $\beta$ , DNA polimerasa X tipo Pol $\beta$ , con función en BER nuclear y mitocondrial en el parásito *Leishmania infantum*.**

La presencia de una polimerasa de la familia X en el parásito *L. infantum*, con una expresión diferenciada en las distintas fases del ciclo infectivo del parásito en contraste con la expresión basal de su homólogo en humanos (Taladriz y cols., 2001) hizo interesante el estudio de sus principales funciones.

*L. infantum* es un parásito que transmitido por la picadura de un mosquito, es el responsable de numerosas enfermedades endémicas en América, India, África del Sur y el área mediterránea. El género *Leishmania* se encuentra entre los más primitivos dentro de los organismos eucariotas. Pertenece al orden *Kinetoplastida*, característicos por poseer una única mitocondria gigante, denominada Kinetoplastido (Donelson y cols., 1999) que contiene numerosas moléculas de DNA formando maxicírculos y minicírculos entrelazados, localizada en la base del flagelo y responsable de ciertas funciones durante la transcripción del DNA celular. En colaboración con el grupo del Dr. Vicente Larraga (CIB, Madrid) se identificó una secuencia del genoma de *L. infantum* (AF182167), correspondiente a la DNA Polimerasa de la familia X (Taladriz y cols., 2001). Esta proteína, denominada LiPol $\beta$ , presenta una localización nuclear en contraste con la localización mitocondrial de su homólogo en *Crithidia fasciculata*. Mediante alineamiento de secuencias se pudo identificar como una DNA polimerasa de la familia X pues conserva un core catalítico tipo  $\beta$  (dedos, palma, pulgar y dominio 8 kDa) donde residen la mayoría de los residuos críticos para la actividad de polimerización, para la unión a DNA y a nucleótidos, y para la eliminación de residuos ribosa-fosfato (dRP liasa) propios de esta familia de DNA polimerasas (Taladriz y cols., 2001).

La sobreexpresión de LiPol $\beta$  en *E. coli* resultó en la formación de cuerpos de inclusión que posteriormente pudieron ser disgregados. La proteína pudo ser resolubilizada y purificada a homogeneidad para su caracterización. Las diferentes propiedades bioquímicas descritas en esta Tesis permiten afirmar que LiPol $\beta$ , como se predecía de su secuencia de aminoácidos en comparación con hPol $\beta$ , es una DNA polimerasa de la Familia X dependiente de DNA que al igual que los demás miembros de su familia, carece de actividad 3'→5' correctora de errores. LiPol $\beta$  presenta una preferencia para usar Mn<sup>2+</sup> como metal activador. Es ampliamente aceptado que el Mg<sup>2+</sup> es el metal usado preferentemente por las DNA polimerasas en la catálisis *in vivo*, mientras que el Mn<sup>2+</sup> se considera menos fisiológico, ya que aunque produce un aumento en la actividad, va acompañada de un descenso en la fidelidad. Sin embargo, LiPol $\beta$  presenta una preferencia por Mn<sup>2+</sup> sin perder fidelidad en su polimerización. Asimismo, comparte con su homólogo hPol $\beta$  el ser una enzima monomérica esencialmente diseñada para trabajar en sustratos con *gaps* de pequeño tamaño. La unión a estos sustratos se ve fortalecida por la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' del gap, al cual LiPol $\beta$  se une de forma estable. Esta unión viene determinada por la presencia, al igual que en hPol $\beta$ , de un dominio de 8 kDa donde se localizan determinados residuos cargados positivamente, esenciales para este contacto.

En este dominio, a su vez, se localizan los residuos clave para la actividad dRP liasa. LiPol $\beta$  conserva, como se deduce de su alineamiento, la Lys (Lys<sup>72</sup> en hPol $\beta$ ) que fue identificada como el nucleófilo responsable para la formación de la base de Schiff durante la  $\beta$ -eliminación del residuo dRP (Deterding y cols., 2000). Estos residuos se encuentran igualmente presentes en las DNA polimerasas tipo  $\beta$  ya descritas, de otros tripanosomátidos como *C. fasciculata* (Cf) (Torri y cols., 1994; Torri y cols., 1995) o *Trypanosoma brucei* (Tb) (Taladriz y cols., 2001). LiPol $\beta$  presenta, al igual que sus homólogos del mismo orden (Saxowsky y cols., 2003; Saxowsky y cols., 2002), actividad dRP liasa mediada por un mecanismo de  $\beta$ -eliminación que la capacita para participar en la reparación por escisión de base (BER). Gracias a esta actividad, LiPol $\beta$ , en presencia de hUDG, hAPE y DNA ligasa, es capaz de catalizar el paso de inserción de dCTP asociado a la reparación por BER del par dU:dG, en el que el residuo de dU procede de la deaminación espontánea de un residuo de dC.

LiPol $\beta$  presenta localización nuclear (Taladriz y cols., 2001) en contraste con la localización mitocondrial de sus homólogas CfPol $\beta$  y TpPol $\beta$ . Sin embargo, presenta señal de localización mitocondrial. Por esta razón podría estar implicada en una doble función de reparación por BER dentro del núcleo y de la mitocondria. Por otro lado, como ya se ha mencionado, la expresión diferencial de LiPol $\beta$  durante el ciclo infectivo del parásito, hace pensar que la función del enzima ha de desarrollarse en una fase concreta.

El ciclo biológico de este parásito comprende esencialmente el paso alternativo de un hospedador vertebrado a otro invertebrado, y viceversa, con dos variantes morfológicas principales: la intracelular de amastigota en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado, y la forma extracelular o promastigota en el tracto intestinal del invertebrado. LiPol $\beta$  presenta su máxima actividad en la fase amastigote, que es cuando el parásito se encuentra en el interior del fagolisosoma del hospedador. El fagolisosoma genera como defensa una gran cantidad de daño oxidativo (radicales superóxido, NO...) que daña el DNA del parásito. Por lo tanto, la reparación de ese daño es esencial para la supervivencia del organismo dentro



de la célula hospedadora. La máxima actividad detectada de LiPol $\beta$  en la fase amastigote es compatible con una función de reparación mediante el mecanismo de BER que permita la supervivencia en un ambiente hostil.

Sin embargo, la cantidad de proteína detectada mediante Western Blot (WB) es mayor en la fase extracelular de promastigote. Esta expresión diferencial, que no sigue el mismo patrón que la actividad, sugiere que deben existir mecanismos que activen a LiPol $\beta$  justo en el momento que se necesite. LiPol $\beta$  podría expresarse en gran medida en el promastigote como una reserva previa al momento de la infección. Una vez que la infección se ha producido, LiPol $\beta$  sería activada quizá por un cambio conformacional provocado por un cambio drástico de pH dentro del fagolisosoma.

Por lo tanto, se podría concluir que LiPol $\beta$  es una DNA polimerasa de la Familia X con una función en reparación del daño oxidativo, mediado por BER, y por tanto por su actividad dRP liasa, que contrarresta las defensas de la célula hospedadora en el organismo infectado.

### **Modelos murinos carentes en las DNA polimerasas lambda y mu**

El estudio de las propiedades y funciones de DNA polimerasas de la familia X desarrollado en el laboratorio nos llevó a la generación de modelos murinos de deficiencia simple en Pol $\lambda$  y Pol $\mu$  (Knock-out lambda, KO $\lambda$  y Knock-out mu, KO $\mu$ ), y de la deficiencia combinada en ambas DNA polimerasas, mediante la obtención del ratón doble knock-out (DK).

Afortunadamente, los ratones fueron viables y fértiles. Esto nos permitió el mantenimiento de una colonia en la que realizar estudios que nos ayudarán a revelar el la función y grado de redundancia de estas DNA polimerasas.

El ratón KO $\lambda$  no presentan diferencias significativas en cuanto a aspectos físicos. En lo que respecta a la fertilidad, sí que existe una deficiencia en el proceso de meiosis asociado a la diferenciación celular que se produce en este tejido, ya que en el día 18 post-natal se observa un déficit en células haploides (espermátidas redondas, elongadas y espermatozoides), lo que apoya el papel de Pol $\lambda$  en reparación asociada a procesos de meiosis producidos durante el desarrollo post-natal de los testículos (García-Ortiz, Tesis, 2003). Es en este tipo de células donde se hace mas importante el papel de reparación de las posibles roturas de doble cadena por NHEJ, puesto que las células son ya haploides y no es posible la recombinación homóloga. Por otro lado, un número significativo de ratones KO $\lambda$  derivados a fondo puro presentaron una inflamación anormal en las vesículas seminales, lo que denota un problema en este órgano, y que desemboca en una inflamación. Por esta razón sería interesante un estudio en profundidad a nivel histológico de estas zonas concretas del aparato reproductor masculino del ratón en comparación con las colonias silvestre, KO $\mu$  y DK.

Los ratones KO $\lambda$  podrían presentar una longevidad algo menor que en la colonia silvestre (media de 751 $\pm$ 97 días para los machos y de 767 $\pm$ 107 días para las hembras frente a los 901 en los machos y 866 en las hembras de la colonia silvestre de Jackson Laboratories). Esta característica es aun más acusada en los DK con 613 días de vida

media, aunque el estudio sigue abierto. El ratón  $KO\mu$ , por el contrario, presenta una longevidad mayor acompañada de una mejor habilidad motora y de aprendizaje, así como de una mayor resistencia al daño oxidativo (una de las causas principales en envejecimiento) en ratones de 18 meses, (Lucas y cols., en preparación). Se está llevando a cabo estudios de sensibilidad a daño oxidativo en los ratones  $KO\lambda$ , los que quizás deberían presentar una sensibilidad mayor que en el caso del  $KO\mu$ . Se sabe que MEFs derivados de este ratón son hipersensibles a tratamientos con  $H_2O_2$  (Braithwhite y cols., 2005a) y entran en estado de senescencia prematura en condiciones de estrés oxidativo (20%,  $O_2$ ; Bertocci y cols., 2006). Asimismo, los MEFs  $KO\lambda$  a partir de pase 20 tienen un desarrollo más lento que la variante silvestre, lo que podría indicar una acumulación de daño no reparado por la ausencia de  $Pol\lambda$ , que llegado cierto punto, provoque que las células se dividiesen más lentamente (García-Ortiz, Tesis, 2003), lo que guarda relación con la acumulación de células en fase S del ciclo celular en estos MEFs  $KO\lambda$ . En un análisis más exhaustivo se pretende estudiar el efecto en ciclo celular de compuestos que generen daño oxidativo ( $H_2O_2$ , FOA...), tratando de revelar que la deficiencia de reparación del daño oxidativo, concretamente durante la reparación de 8oxoG:A en el DNA, lo que provoca el retraso en la salida de fase S.

El ratón DK debería tener un fenotipo más dramático que la suma de los efectos de las colonias  $KO\lambda$  y  $KO\mu$  de forma independiente, ya que en el ratón DK se podría provocar un efecto acumulativo donde la falta de ambas polimerasas causaría una hipersensibilidad al daño oxidativo y por tanto una longevidad menor. Este análisis habría que hacerlo de una forma más comparable con ratones  $KO\lambda$  y DK con los de la colonia silvestre estabulados dentro del mismo animalario de forma que estén en igualdad de condiciones ambientales y de cría, al igual que se hizo con los ratones  $KO\mu$ .

Por otro lado, sería interesante analizar el fenotipo que pudieran presentar colonias generadas del cruce entre los ratones deficientes en la superóxido dismutasa (SOD), enzima que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno y cada una de nuestras colonias.

Estos estudios *in vivo* avalarían el papel de estas polimerasas en el daño oxidativo de una forma directa tal y como se ha podido relacionar con experimentos *in vitro*.

### **hPol $\lambda$ , síntesis a través de lesiones y reparación**

Como ya se comentó anteriormente en esta Tesis, las células están constantemente expuestas a agentes endógenos y medioambientales capaces de producir modificaciones químicas en las bases del DNA que en gran parte son reparadas por la ruta de reparación por escisión de base (*BER*). Se ha demostrado en numerosos artículos que la polimerasa principal en *BER* en la eliminación de numerosas lesiones en el DNA, es  $Pol\beta$  tanto en su paso de síntesis de DNA (Sobol y cols., 1996; Nealon y cols., 1996; Fortini y cols., 1998; Ochs y cols., 1999), como en su paso de eliminación del grupo dRP (Sobol y cols., 2000; Podlutzky y cols., 2001a). Sin embargo, la presencia de la actividad dRP-liasa asociada al dominio de 8 kDa de  $Pol\lambda$ , así como la capacidad de llevar a cabo la reacción *BER in vitro* con proteínas purificadas, hizo pensar que  $Pol\lambda$  pudiera participar en esta ruta de reparación *in vivo* (García-Díaz y cols., 2001).



- *Polλ y el daño oxidativo*

Uno de los daños más frecuentes en la célula, ya sea de origen exógeno o bien generado por el propio metabolismo celular, es el daño oxidativo, que produce lesiones tan frecuentes como 8oxoG.

De los resultados obtenidos en esta tesis doctoral (Capítulo 4 de resultados) se puede deducir que Polλ no participa en la reparación por BER del par 8oxoG:dC. Polβ es la encargada de finalizar este proceso, resituyendo el residuo de dG en sustitución de la lesión 8oxoG eliminada por la glicosilasa OGG1, tras reconocer el par 8oxoG:dC (Thomas y cols., 1997; Girard y cols., 1997; Björas y cols., 1997). Aunque no participe en la reparación Polλ sí participa en la tolerancia al 8oxoG (Picher y Blanco, 2007). Recientemente se ha descrito que Polλ inserta preferentemente dC frente a 8oxoG en presencia de la proteína de replicación A (RPA) y el antígeno de proliferación nuclear (PCNA) (Maga y cols., 2008).

Por otro lado, cuando se trata del par 8oxoG:dA, producido por un error de copia del 8oxoG, la glicosilasa que actúa es la MutY par tratar de eliminar dA (Hazra y cols., 2001; David y cols., 2007), dando una nueva oportunidad a que se polimerice el nucleótido correcto dC frente a 8oxoG, y que posteriormente se produzca el BER dependiente de OGG1 que repararía la lesión de una forma libre de error. Es en este proceso en el que se produce la interacción entre Polλ y MUTYH. hPolλ es reclutada, junto a MutYH, PCNA, FEN1 y ligasas 1 y 3, a las lesiones 8oxoG:dA producidas por otras DNA polimerasas en el DNA (van Loon y Hübscher, 2009). Los resultados obtenidos concuerdan con lo publicado por el grupo de Ulrich Hübscher, puesto que los extractos solo incorporan el nucleótido correcto dC en experimentos de reparación *in vitro* utilizando extractos celulares, y además esta capacidad está significativamente reducida en los extractos KOλ.

Como ya se mencionó anteriormente en esta tesis doctoral quisimos averiguar la relación entre hPolλ y la enfermedad de Huntington. La causa principal de esta enfermedad es una expansión de tripletes CAG en los que ha relacionado la participación de polimerasas como hPolβ (Petruska y cols., 1998) así como otras posibles causas como generaciones de roturas debidas a daño oxidativo que desencadenan procesos de reparación, en los que intervienen enzimas como OGG1 y FEN1, que desembocan en la expansión (Kovtum y cols., 2007; Liu y cols., 2009). Debido al posible papel de hPolλ en la reparación del daño oxidativo, concretamente en la corrección del par mutagénico 8oxoG:A a 8oxoG:C (van Loon y Hübscher, 2009), y a su alta propensión a cometer errores de deslizamiento de pauta de lectura (Bebenek y cols., 2003), podría participar en el desarrollo de este tipo de expansiones. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral son alentadores puesto que el análisis en la expansión del modelo murino que padece la enfermedad y a su vez es deficiente en Polλ presentó una disminución en el número de repeticiones en el hígado, órgano descrito como uno de los más propensos a presentar inestabilidad en las repeticiones. Por esta razón, se está realizando un estudio más amplio en cuanto a número de ratones para así poder sacar resultados más concluyentes.

- *Polλ y el 5FU*

Otra de las lesiones frecuentes en el DNA es la presencia de uracilos en el DNA por deaminación de citosinas. Se sabe que es Polβ la que participa en la reparación de estos uracilos (Sobol y cols., 1995). En nuestro laboratorio comprobamos que Polλ no participaba de manera directa (Picher, 2007, Tesis doctoral). Sin embargo, la descripción de que Polλ inmunoprecipitaba con SMUG1, enzima que participa en la reparación de Uracilos y análogos de Uracilo (Braithwaite y cols., 2005b; An y cols., 2007; Kavli y cols., 2007) nos hizo replantearnos el papel de hPolλ, hPolβ y hPolμ en el efecto mutagénico del análogo de nucleótido 5FU.

5FdUTP puede ser incorporado en el DNA tanto frente a dA como a dG (**Fig. 87A**). Una vez incorporado frente a dA, para su eliminación tendría que ocurrir un proceso de BER que supusiera el reconocimiento del par 5FU:dA, la excisión de 5FU y la posterior inserción de dT para recuperar la secuencia libre de error. De no haber reparación, en una 2ª ronda de replicación la cadena con dA se replicaría normalmente, mientras que la cadena con la lesión 5FU podría dictar la inserción de dA (de forma correcta) o dG (incorrecta) frente a la lesión. Posteriormente se podría fijar la mutación (dA:dT → dG:dC), tanto por una nueva ronda de replicación, como por un mecanismo de BER que escindiera el 5FU del par 5FU:dG y lo sustituyera por dC.

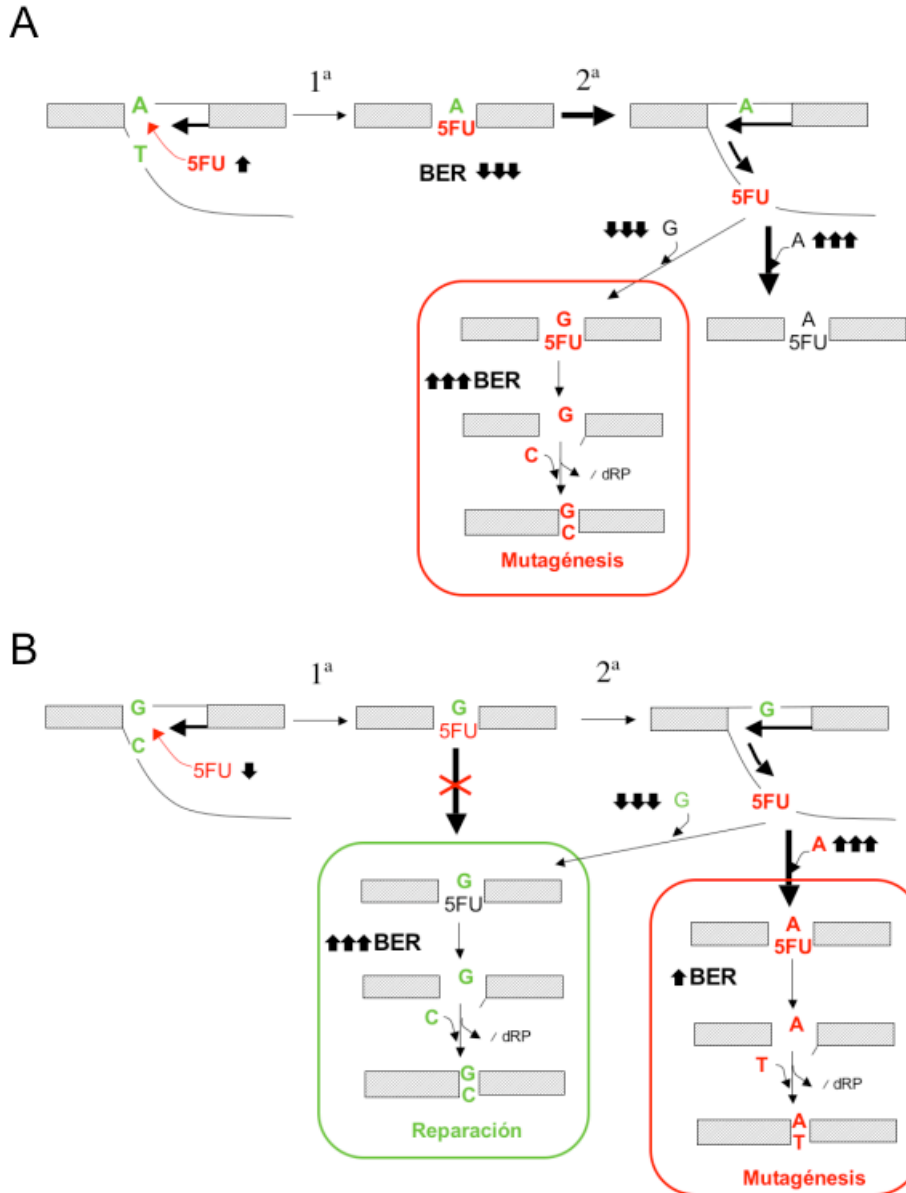
Si inicialmente el 5FdUTP se incorpora frente a dG (**Fig. 87B**). Este par de bases puede ser reconocido por el BER y restaurar la secuencia escindiendo el 5FU incorporado. Pero si algo fallara en el BER, y ocurriera otra ronda de replicación, podría formarse el par 5FU:dA quedando así fijada una mutación en el DNA.

Los resultados obtenidos al analizar la inserción frente a 5FU, demuestran que hPolβ, hPolλ y hPolμ son capaces de tolerar la presencia de 5FU en el molde tal y como si se tratara de dT. Al analizar cual era la preferencia de nucleótido a insertar, las tres DNA polimerasas insertaron con gran eficiencia dA. Si bien el comportamiento con los otros dNTPs fue diferente. hPolβ fue capaz de insertar dG frente a 5FU, aunque con una eficiencia mucho menor que al tratarse de dA. hPolλ solo fue capaz de insertar dA. Y por su parte hPolμ es capaz de dislocar copiando la siguiente base del molde, evitando así la inserción frente a 5FU en un contexto molde/iniciador. Al no ser posible la dislocación en contextos tipo gap, hPolμ solo fué capaz de insertar dA frente a 5FU.

hPolλ podría encontrarse 5FU como molde cuando se produzca una parada en la horquilla de replicación y las polimerasas replicativas dejen espacio para que actúen las polimerasas que realizan síntesis a través de lesiones. hPolλ insertaría dA, que sería además fácilmente extendido por la misma polimerasa. Por otro lado, hPolλ y hPolμ podrían encontrarse al 5FU en el molde en un contexto de gap resultante de un proceso de NHEJ. En este caso ambas polimerasas tolerarían el 5FU insertando con gran facilidad dA. Sin embargo, si el 5FU se encontrara en un gap algo más grande que permitiera a hPolμ la inserción podría desencadenar procesos de reparación más complicados que no fueran bien procesados y produjeran roturas en el DNA. Se sabe que, en ocasiones, la reparación del 5FU produce roturas en el DNA letales para la célula (Longley y cols., 2003).

En cuanto a la extensión, las tres DNA polimerasas extienden el par 5FU:A con la misma eficiencia con la que extienden los pares control T:A y U:A. El par de bases

5FU:G, por el contrario, supone más problema y es extendido menos eficientemente por las tres enzimas. De ellas, es la hPol $\lambda$  la que presenta mayor eficiencia, quizás debido a su gran capacidad de extensión de desapareamientos (Picher y cols., 2006). Por tanto, cuando ocurre una inserción frente a dG, será difícilmente extendida por estas polimerasas. No podemos descartar la participación de otras polimerasas de TLS que sean capaces de realizar esta extensión favoreciendo el efecto mutagénico.



**Figura 87. Representación esquemática de la incorporación en el DNA de 5FdUTP.**

Incorporación de 5FdUTP frente a dA (A) ó frente a dG (B) y sus consecuencias. El color verde representa procesos en los que no se produce cambio en la secuencia. En color rojo se representan cambios que producen mutaciones en la secuencia. El grosor de las flechas refleja el grado de probabilidad de que se produzca esa ruta. Las aspas rojas representan un posible bloqueo en el desarrollo de la ruta.

Tanaka y cols., en 1981, describieron la capacidad de Pol $\alpha$  y Pol $\beta$  de incorporar 5FdUTP en el DNA. Pero nada más se sabía desde entonces acerca de la influencia de las polimerasas en el efecto mutagénico de esta droga antitumoral. hPol $\beta$ , hPol $\lambda$  y hPol $\mu$  son capaces de incorporar 5FdUTP en el DNA, pero con diferente eficiencia en función de la base que se encuentren como molde. hPol $\beta$  es capaz de incorporar 5FdUTP tanto frente a dA como frente a dG. Por su parte hPol $\lambda$  solo lo incorpora frente a dA. Por último, hPol $\mu$  es capaz de incorporarlo frente a dA pero cuando se encuentra dG en un sustrato de DNA molde/iniciador y la secuencia se lo permite, es capaz de realizar varias adiciones de 5FdUTP probablemente mediadas por mecanismos de dislocación que quedan anulados en un contexto de gap. De estos resultados se puede deducir que existe una predisposición general entre las DNA polimerasas de la Familia X a la inserción de 5FdUTP frente a dA en el molde, siendo la inserción frente a dG muy poco eficiente, aunque similar, en el caso de hPol $\beta$  y hPol $\mu$ . Esta inserción frente a dG acompañada de un defecto del BER pueden contribuir al efecto mutagénico de 5FU (**Fig. 87B**) puesto que si no se reparara a tiempo y ocurriera la replicación, las DNA polimerasas insertarían muy eficientemente dA frente a 5FU, que al ser reparado fijaría la mutación (G:C  $\rightarrow$  A:T).

Es clave saber la capacidad de inserción de 5FdUTP por las polimerasas replicativas (Pol $\gamma$ , Pol $\delta$  y Pol $\epsilon$ ), y la relación de inserción de 5FdUTP frente a dA y frente a dG. Si la inserción más favorable fuese frente a dA, y dado que el sistema de reparación de 5FU:dA parece poco eficiente, el 5FU puede permanecer en el DNA y nunca ser detectado para su reparación, dando opción a que actúe como molde, y esporádicamente provocar la inserción de dG. Una vez formado el par 5FU:dG, la mutación se fijaría rápidamente ya que el sistema de BER que reconoce este par y elimina el 5FU es mucho más eficiente. Si 5FdUTP se introdujera inicialmente frente a dG, el sistema de reparación por BER actuaría muy eficientemente, restableciendo la secuencia. Pero si existiera un defecto en la reparación de 5FU:dG, el 5FU pasaría a ser molde en el que con toda probabilidad se insertaría dA, produciendo la mutación.

De los resultados obtenidos con los extractos de tejido expuestos en esta tesis (Capítulo 4 de resultados) podemos deducir que hPol $\lambda$  no es imprescindible para la reparación de 5FU:dG a dC:dG. Asimismo, se podría afirmar que al menos en nuestro contexto biológico, la reparación del 5FU:dA es mucho menos eficiente que la del par 5FU:dG.

En mamífero se ha descrito la participación de glicosilasas en la reparación de 5FU. Algunas de ellas, como TDG, pueden escindir el 5FU apareado a dA (Cortazar y cols., 2007; Hardeland y cols., 2003; Hardeland y cols., 2000). Durante este proceso se generan productos que bloquean el procesamiento final en el BER desencadenando el efecto citotóxico del 5FU. Fibroblastos embrionarios que presentan inactivada TDG resisten la presencia de 5FU en el medio, siendo los extractos derivados de estas células poco eficientes en reparación de 5FU:dA (Kunz y cols., 2009). Nuestros MEFs, tanto silvestres como KO $\lambda$ , presentan una similar sensibilidad a 5FU. Sería interesante saber los niveles de expresión de TDG en nuestras condiciones de estudio.

## Identificación de isoformas funcionales en el gen POLL que codifica para hPolλ.

El mantenimiento de la integridad del genoma depende no solamente de la fidelidad en la replicación del material genético, sino también de numerosos mecanismos de reparación del DNA (Hoeijmakers, 2001). La magnitud del genoma y la constante exposición a daño provocado por agentes endógenos y medioambientales enfatizan aún más la importancia de estos procesos. Estos mecanismos requieren la participación de numerosas enzimas entre las que podemos destacar las DNA polimerasas. El hecho de que las células eucarióticas presenten un número muy elevado de DNA polimerasas, algunas de ellas descubiertas muy recientemente, hace que aumente nuestra percepción de la complejidad de funciones para las que están diseñadas. La función de estas nuevas polimerasas es aún incierta pero existe una relación entre su regulación, organización y coordinación con la función principal del mantenimiento de la integridad del genoma (Shcherbakova y cols., 2003). Junto a las polimerasas participan numerosos genes de reparación, para los que se han descrito variantes polimórficas que pueden alterar sustancialmente la capacidad de reparación. Por ejemplo, la variante polimórfica S326C de la glicosilasa OGG1 presenta una bajada en la eficiencia de reparación (Yamane y cols., 2009) asociada con un riesgo moderado a padecer cáncer colorectal (Moreno y cols., 2006). Sin embargo, existen pocos artículos que identifiquen y caractericen variantes polimórficas e isoformas alteradas en las DNA polimerasas conocidas, a excepción de Polι y hPolβ (Shah y cols., 2001; Dobashi y cols., 1995; Bhattacharyya y cols., 1997; Lang y cols., 2004; Sweasy y cols., 2005).

En el capítulo 2 de resultados de esta tesis doctoral se describe la identificación de dos variantes de splicing en el gen POLL que codifica para la Polλ humana. Estas variantes se correspondían con la omisión del exón 6 (hPolλΔ6), y la otra con la omisión simultánea de los exones 6 y 7 (hPolλΔ67). En estas variantes no se cambia la pauta de lectura, ni se eliminan regiones críticas. Un análisis de la actividad *in vitro* reveló que hPolλΔ6 es una isoforma inactiva de la proteína que podría tener un efecto dominante negativo interfiriendo o alterando los niveles de reparación de DNA por interacción improductiva con factores necesarios para estos procesos.

Por otro lado, en el capítulo 5 de resultados de esta tesis doctoral se describe la identificación de una variante polimórfica simple (SNP) identificada en el gen POLL que codifica para la DNA polimerasa lambda humana. Identificada en el exón 8 de hPolλ, produce un cambio en la secuencia codificante de Arg a Trp en posición 438. Este SNP, que en la base de datos corresponde al número rs3730477 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3730477](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3730477)), fue en el momento de la identificación uno de los dos únicos SNPs que producían cambio en la secuencia de aminoácidos. En la actualidad se han identificado otros cinco SNPs que alteran la secuencia codificante, dos de ellos producen un cambio en la secuencia, y otros dos provocan el truncamiento de la proteína. Sin embargo, nada se sabe acerca del efecto que produce alguno de estos cambios en la proteína. Únicamente, se ha especulado que el cambio Thr a Pro en posición 221, que mapea en el dominio BRCT, podría afectar a la interacción de Polλ con factores de reparación provocando así un defecto en NHEJ (revisado por Sweasy y cols., 2006 y Yamtich y Sweasy, 2009).

La caracterización realizada en el capítulo 5 demuestra que la substitución por W no supone ningún defecto en cuanto a la eficiencia catalítica. hPol $\lambda$  W438 es una DNA polimerasa dependiente de molde que carece de actividad 3'→5' correctora de errores con una capacidad de polimerización y una afinidad por nucleótido similar a la variante más común R438. Asimismo, ambas variantes presentan un comportamiento distributivo en sustratos molde/iniciador abiertos, volviéndose procesivas en gaps de pequeño tamaño.

De igual manera, la mutación a W no afecta a su actividad dRP liasa, por lo que al igual que la variante más común R438, W438 podría participar en BER.

Los resultados presentados tampoco muestran diferencias en cuanto al papel de W438 en la tolerancia al daño. Ambas polimerasas presentan la misma capacidad de tolerar la presencia de 8oxoG y 6mG en el DNA, con similar eficiencia catalítica de inserción frente a la lesión y de extensión del par de bases generado. Asimismo, la mutación W438 no afecta al posible papel de Pol $\lambda$  en cuanto a la participación en el efecto mutagénico de 5FU, análogo de nucleótido ampliamente utilizado en tumorigénesis. Ambas variantes son capaces de tolerar de forma fiel la presencia de 5FU en el DNA y de extender los pares de bases generados, así como la inserción de 5FdUTP en el DNA.

La característica más afectada es la fidelidad de síntesis al copiar DNA no dañado. Como se describe en el apartado 5, W438 presenta una bajada en su fidelidad cometiendo una frecuencia de errores C:T y G:T, 4 y 8 veces mayor, que la variante R438.

En cuanto a la estructura, el aminoácido 438 se encuentra en un bucle en el subdominio palma. Este bucle en la variante R438 se encuentra parcialmente desordenado. La estructura global de la W438 no varía por lo que el cambio a W no está afectando de manera global. Sin embargo, la gran flexibilidad del bucle se puede relacionar con un cambio conformacional necesario para formar el complejo ternario enzima-sustrato-dNTP que podría estar alterado por la presencia del W y que sin embargo afecta a la fidelidad de la proteína. De forma interesante, este bucle se localiza próximo al extremo N-terminal de la  $\alpha$ -hélice M en Pol $\lambda$ . Se sabe que una mutación en esta  $\alpha$ -hélice en Pol $\beta$  afecta de forma severa la fidelidad de Pol $\beta$  (Shah y cols., 2001). Por esta razón, el cambio W438 sí podría afectar a la fidelidad como en el caso de Pol $\beta$ . Por otro lado, si realizamos un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la zona cercana al residuo 438, podemos observar que la Arg no es un aminoácido muy conservado entre las diferentes especies (**Fig. 88**). Entre los aminoácidos encontrados podemos ver Lys, Gln e incluso Ala, pero no es frecuente la aparición de Trp. Por lo que el efecto observado en la estructura podría venir determinado por la presencia del grupo aromático de gran volumen en la variante W438.

Estos cambios en la fidelidad de W438 podrían estar contribuyendo a los efectos encontrados al sobreexpresar la variante en células de mamífero (CHO y MRC5). Como se describe en el capítulo 5, la sobreexpresión de W438 incrementa la frecuencia de mutagénesis en 8 veces respecto a la variante R438, que presenta un aumento de 2-3 veces con respecto a las células control.



<i>Homo sapiens</i>	/422/ KATCGDVDVLITHP---DGR <b>SH</b> RGIFSRLLDSLROEGFLTDDL
<i>Macaca mulata</i>	/422/ KATCGDVDVLITHP---DGRSHRGIFSRLLDSLROEGFLTDDL
<i>Mus musculus</i>	/420/ KMTCGDVDVLITHP---DGRSHRGIFSCLLDSLROEGFLTDDL
<i>Rattus norvegicus</i>	/420/ KVTCTGDVDVLITHP---DGRSHOGIFSPLLDSLROEGFLTDDL
<i>Monodelphis domestica</i>	/411/ KATCGDVDVLVTHP---DGRSHOGIFSQLLDALRKRGFFLTDDL
<i>Gallus gallus</i>	/422/ KATCGDVDVLVTHP---DGRSHRGLFSKLLDSLHESGFLTDDL
<i>Danio rerio</i>	/414/ RSTCGDVDVLITHP---DGRSHKGVFSKILHLLHQSGFLTDDL
<i>Coprinopsis cinerea</i>	/640/ KATCGDIDILITRP---TDDGKTHAGVLRGLIQELHÄVGVLTEDLA
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	/514/ AKDSGDIDMIITCPDTPLAAMRTTVFEVLVPHLYKTGFLLKASLA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	/372/ KATCGDLIDVVTHP---DGRSHKGFLLTKFVKRLKEMNFLREDLI

**Figura 88. Alineamiento de secuencia aminoacídica de la región que comprende el polimorfismo R438W de Polλ humana en las diferentes especies.**

Los números corresponden a la posición relativa de los residuos en relación al extremo N-terminal. El rectángulo rojo indica la posición del polimorfismo R438W (negrita) en humanos y la diferente conservación en las distintas especies.

Además, esta sobreexpresión hace que las células sean más sensibles a radiación ionizante (RI). De forma interesante, la sobre-expresión en células deficientes en NHEJ presentaban una sensibilidad a RI similar a la sobre-expresión de la variante R438, por lo que el efecto de W438 podría venir determinado por un defecto en NHEJ. Este defecto se confirmó al realizar los ensayos de NHEJ *in vivo* donde se vio una bajada general en la capacidad de reunión de extremos. A su vez, esta sobreexpresión de la variante W438 provoca la formación de aberraciones cromosómicas de forma normal o inducida por RI. Se ha descrito que una de las consecuencias de un defecto en NHEJ es la generación de aberraciones cromosómicas de forma espontánea o inducida por RI (Karanjawala y cols., 1999; Ferguson y cols., 2000). De forma interesante, demostramos que el fenotipo encontrado es dependiente de la actividad polimerasa de W438, lo que corrobora que el fenotipo se debe a un efecto directo de la acción del enzima, y no por una titulación de los factores que intervienen en el proceso de NHEJ. Por esta razón, podríamos afirmar que la sobreexpresión de la W438 provoca un defecto en la reparación de roturas de doble cadena por NHEJ.

Pero, ¿cómo se relaciona una bajada en la fidelidad con un defecto en NHEJ y en la inestabilidad cromosómica? A pesar de que los efectos observados en la eficiencia de NHEJ y en la inestabilidad cromosómica son dramáticos, no es obvio pensar en que son debidos únicamente a una bajada de 3-8 veces en la fidelidad de inserción de nucleótido. Sin embargo, es importante enfatizar que aunque siempre hablamos de valores medios en lo que respecta al efecto global a la fidelidad, si se consideran los apareamientos incorrectos por separado se agudizaría este defecto, que a su vez es mayor si se consideran zonas con gran propensión a cometerse errores (zonas *hot spot*). Por otro lado, una reducción en la precisión en la polimerización es más significativa si ocurre durante un proceso de NHEJ, debido a que los errores introducidos pueden dificultar la ligación, paso final en la reparación de roturas de doble cadena. Alternativamente no podemos descartar la posibilidad de que la presencia de la variante W438 afecte a las interacciones directas con factores que intervienen en NHEJ.

Por otro lado, la importancia funcional de esta variante se refuerza por los datos obtenidos del análisis de RFLP en 300 casos-control, provenientes de una colección de cáncer colorectal. Existen diferencias entre los carcinomas de colon y recto con respecto a la edad y género del paciente así como la progresión y el tratamiento empleado, aunque se sigue debatiendo si ha de considerarse los dos como un conjunto o como dos entidades distintas (Frattini y cols., 2004). El análisis de esta colección indicó que la variante W438, con una frecuencia alélica de 0,27 en la población caucásica, está

asociada al cáncer de recto en hombres (efecto no observado en mujeres). Estos resultados, junto con su bajada en la fidelidad de síntesis, así como el efecto drástico encontrado *in vivo*, sugieren que W438 tendría un papel importante en la tumorigénesis del recto.

En relación a la prognosis, existen evidencias de variantes encontradas en genes de reparación, que presentan valores pronóstico para el cáncer colorectal (Moreno y cols., 2006). Nuestros datos indican que no existe una asociación en cuanto a la prognosis y el cáncer colorectal. Sin embargo, no podemos descartar que una sobreexpresión de W438 pueda estar asociada con la agresividad del tumor, de acuerdo con la alta frecuencia de mutación observada *in vivo* al sobreexpresar esta variante.

Existen evidencias que nos indican que en tumores humanos suele ocurrir la sobreexpresión de DNA polimerasas, entre ellas hPol $\beta$  y hPol $\lambda$  (Albertella y cols., 2005). Cuando analizamos la población heterocigota R/W pudimos ver que ambos alelos se encuentran con la misma frecuencia en la colección de cáncer colorectal. Esto nos indica que la expresión de W438 no afecta la capacidad global de reparación de roturas de doble cadena en los individuos heterocigotos en situaciones normales. Pero podría predisponer a las células, probablemente por la baja fidelidad mostrada por parte de W438, a una acumulación de aberraciones cromosómicas debido a un exceso de mutaciones asociadas a roturas de doble cadena como se ha visto en tejidos con hiperplasia pre-cancerígena (Gorgoulis y cols., 2005), o cuando algún otro factor que interviene en la reparación de roturas de doble cadena está también alterado.

A pesar de su papel en reparación de DNA, no existen artículos que describan variantes polimórficas de DNA polimerasas, a excepción de las numerosas alteraciones genéticas encontradas para Pol $\alpha$  y Pol $\beta$  (Shah y cols., 2001; Dobashy cols., 1997; Bhattacharyya y cols., 1997; Lang y cols., 2004; Miyamoto y cols., 1999; Wang y cols., 1992). Recientemente se ha descrito una asociación entre formas alteradas de Pol $\beta$  y una alteración en la capacidad de reparación que culmina con una transformación celular (Sweasy y cols., 2003; Dalal y cols., 2005). La identificación de que cambios son las bases genéticas de estas transformaciones constituye un reto. En este sentido, la gran información obtenida del proyecto genoma es solo una ayuda a establecer la relación entre las variaciones de secuencia y la susceptibilidad a padecer una enfermedad. Por lo que la caracterización de polimorfismos con funciones alteradas que establezcan las causas de una enfermedad es de gran importancia. Aunque los resultados obtenidos relacionan a W438 con el riesgo a padecer cáncer de recto, no se puede pensar que esta sola mutación sea causa de la oncogénesis pero puede estar contribuyendo a la inestabilidad genómica que es uno de los factores determinantes más importantes en cáncer. Como proponen Hanahan y Weinberg (2000) una variante en un gen de reparación de DNA, como puede ser W438 caracterizada en esta tesis doctoral, podría acelerar la carcinogénesis incrementando la inestabilidad genómica a nivel de nucleótido y de cromosoma lo que confiere una ventaja de crecimiento durante la evolución de una célula a cáncer.



# ***CONCLUSIONES***



1. LiPol $\beta$  es una DNA polimerasa de la Familia X, dependiente de DNA, cuyo sustrato óptimo es un gap de pequeño tamaño con un grupo fosfato en el extremo 5', y que utiliza preferentemente Mn<sup>2+</sup> como metal activador sin perder fidelidad de polimerización.
2. LiPol $\beta$  presenta actividad dRP liasa mediada por un mecanismo de  $\beta$ -eliminación que, junto con su actividad de DNA polimerización, la capacita para participar en la reparación por escisión de base (BER).
3. La actividad de LiPol $\beta$  es máxima en la fase amastigote, lo que es compatible con una función de reparación mediante el mecanismo de BER que permita la supervivencia del parásito *Leishmania infantum* en el ambiente hostil generado por el hospedador.
4. Se han identificado dos variantes de splicing en el gen POLL que se corresponden con la omisión del exón 6 (hPol $\lambda\Delta 6$ ), y de los exones 6 y 7 (hPol $\lambda\Delta 6/7$ ). En estas variantes no se cambia la pauta de lectura, ni se eliminan regiones críticas. Sin embargo, un análisis de la actividad *in vitro* reveló que hPol $\lambda\Delta 6$  es una isoforma inactiva de la proteína. La expresión de ambas isoformas se altera muy significativamente en muestras de tumores de diferentes tejidos.
5. Pol $\lambda$  no participa en la reparación por BER de la lesión 8oxoG a partir del par 8oxoG:dC. Por el contrario, Pol $\lambda$  lleva a cabo el paso de síntesis necesario para la corrección del par 8oxoG:dA a 8oxoG:dC.
6. Pol $\lambda$  no participa en la reparación por BER de U ni de 5FU apareados a dG, en testículo adulto. Sin embargo, la menor capacidad de reparación detectada en el modelo KO $\lambda$  sugiere un posible papel de Pol $\lambda$  en la reparación del apareamiento 5FU:dG en tejido cerebral adulto.
7. Las tres DNA polimerasas humanas hPol $\beta$ , hPol $\lambda$  y hPol $\mu$  son capaces de tolerar la presencia de 5FU en el molde, insertando preferentemente dA. Asimismo, las tres DNA polimerasas extienden el par 5FU:dA con la misma eficiencia con la que extienden los pares control dT:dA y dU:dA, y mucho más eficientemente que el par 5FU:dG. Por otra parte, las tres DNA polimerasas son capaces de insertar 5FdUTP frente a dA en el molde, siendo su inserción errónea frente a dG muy poco eficiente, aunque detectable en el caso de hPol $\beta$  y hPol $\mu$ .
8. Se ha identificado una variante polimórfica simple (SNP) en el exón 8 del gen POLL que produce el cambio de Arg a Trp en la posición 438 (W438) de la secuencia codificante de la hPol $\lambda$ . La caracterización bioquímica ha demostrado que esta variante natural tiene una reducida fidelidad de síntesis.
9. La expresión de W438 en células de mamífero incrementa la frecuencia de mutación y compromete la reparación de roturas de doble cadena por NHEJ, resultando en una hipersensibilidad a radiación ionizante e inestabilidad cromosómica.
10. El análisis mediante RFLP de 300 casos-control indicó que W438 está asociada al desarrollo de cáncer de recto en hombres. Sin embargo, no existe una asociación entre este polimorfismo y la prognosis del cáncer colorectal.



# ***BIBLIOGRAFÍA***



- Abbotts, J., SenGupta, D. N., Zmudzka, B., Widen, S. G., Notario, V., & Wilson, S. H. (1988). Expression of human DNA polymerase beta in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry*, *27*(3), 901-909.
- Abdel-Rahman, S. Z., Soliman, A. S., Bondy, M. L., Omar, S., El-Badawy, S. A., Khaled, H. M., et al. (2000). Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett*, *159*(1), 79-86.
- Ahn, J., Werneburg, B. G., & Tsai, M. D. (1997). DNA polymerase beta: structure-fidelity relationship from Pre-steady-state kinetic analyses of all possible correct and incorrect base pairs for wild type and R283A mutant. *Biochemistry*, *36*(5), 1100-1107.
- Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, *124*(2), 301-313.
- Albertella, M. R., Lau, A., & O'Connor, M. J. (2005). The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer. *DNA Repair (Amst)*, *4*(5), 583-593.
- Alonso, A., Terrados, G., Picher, A. J., Giraldo, R., Blanco, L., & Larraga, V. (2006). An intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in DNA polymerase beta from *Leishmania infantum* supports a role in DNA repair. *DNA Repair (Amst)*, *5*(1), 89-101.
- An, Q., Robins, P., Lindahl, T., & Barnes, D. E. (2007). 5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the Smug1 DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity. *Cancer Res*, *67*(3), 940-945.
- Andrade, P., Martin, M. J., Juarez, R., Lopez de Saro, F., & Blanco, L. (2009). Limited terminal transferase in human DNA polymerase mu defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(38), 16203-16208.
- Aoufouchi, S., Flatter, E., Dahan, A., Faili, A., Bertocci, B., Storck, S., et al. (2000). Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res*, *28*(18), 3684-3693.
- Aravind, L., & Koonin, E. V. (1999). DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Res*, *27*(7), 1609-1618.
- Armson, A., Sargent, K., MacDonald, L. M., Finn, M. P., Thompson, R. C., & Reynoldson, J. A. (1999). A comparison of the effects of two dinitroanilines against *Cryptosporidium parvum* in vitro and in vivo in neonatal mice and rats. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *26*(2), 109-113.
- Bacolla, A., & Wells, R. D. (2004). Non-B DNA conformations, genomic rearrangements, and human disease. *J Biol Chem*, *279*(46), 47411-47414.
- Ballmaier, D., & Epe, B. (2006). DNA damage by bromate: mechanism and consequences. *Toxicology*, *221*(2-3), 166-171.
- Beard, W. A., & Wilson, S. H. (2000). Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase beta. *Mutat Res*, *460*(3-4), 231-244.
- Bebenek, K., Garcia-Diaz, M., Blanco, L., & Kunkel, T. A. (2003). The frameshift infidelity of

- human DNA polymerase lambda. Implications for function. *J Biol Chem*, 278(36), 34685-34690.
- Bebenek, K., Garcia-Diaz, M., Patishall, S. R., & Kunkel, T. A. (2005). Biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase IV. *J Biol Chem*, 280(20), 20051-20058.
- Bebenek, K., & Kunkel, T. A. (1995). Analyzing fidelity of DNA polymerases. *Methods Enzymol*, 262, 217-232.
- Bebenek, K., & Kunkel, T. A. (2004). Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*, 69, 137-165.
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, 272(32), 19633-19636.
- Beckman, R. A., Mildvan, A. S., & Loeb, L. A. (1985). On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*, 24(21), 5810-5817.
- Bell, D. E., & Fridland, A. (1980). Mode of action of 9-beta-D-arabinosyladenine and 1-beta-D-arabinosylcytosine on DNA synthesis in human lymphoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 606(1), 57-66.
- Bennett, R. A., Wilson, D. M., 3rd, Wong, D., & Demple, B. (1997). Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(14), 7166-7169.
- Bergoglio, V., Pillaire, M. J., Lacroix-Triki, M., Raynaud-Messina, B., Canitrot, Y., Bieth, A., et al. (2002). Deregulated DNA polymerase beta induces chromosome instability and tumorigenesis. *Cancer Res*, 62(12), 3511-3514.
- Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G., & Salas, M. (1989). A conserved 3'----5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*, 59(1), 219-228.
- Bertocci, B., De Smet, A., Berek, C., Weill, J. C., & Reynaud, C. A. (2003). Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity*, 19(2), 203-211.
- Bertocci, B., De Smet, A., Flatter, E., Dahan, A., Bories, J. C., Landreau, C., et al. (2002). Cutting edge: DNA polymerases mu and lambda are dispensable for Ig gene hypermutation. *J Immunol*, 168(8), 3702-3706.
- Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J. C., & Reynaud, C. A. (2006). Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity*, 25(1), 31-41.
- Bhattacharyya, N., & Banerjee, S. (1997). A variant of DNA polymerase beta acts as a dominant negative mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10324-10329.
- Bhattacharyya, N., Chen, H. C., Comhair, S., Erzurum, S. C., & Banerjee, S. (1999). Variant forms of DNA polymerase beta in primary lung carcinomas. *DNA Cell Biol*, 18(7), 549-554.
- Bhattacharyya, N., Chen, H. C., Grundfest-Broniatowski, S., & Banerjee, S. (1999). Alteration of hMSH2 and DNA polymerase beta genes in breast carcinomas and fibroadenomas.



- Biochem Biophys Res Commun*, 259(2), 429-435.
- Biade, S., Sobol, R. W., Wilson, S. H., & Matsumoto, Y. (1998). Impairment of proliferating cell nuclear antigen-dependent apurinic/apyrimidinic site repair on linear DNA. *J Biol Chem*, 273(2), 898-902.
- Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T., et al. (1997). Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J*, 16(20), 6314-6322.
- Bjursell, G., & Skoog, L. (1980). Control of nucleotide pools in mammalian cells. *Antibiot Chemother*, 28, 78-85.
- Blanca, G., Villani, G., Shevelev, I., Ramadan, K., Spadari, S., Hubscher, U., et al. (2004). Human DNA polymerases lambda and beta show different efficiencies of translesion DNA synthesis past abasic sites and alternative mechanisms for frameshift generation. *Biochemistry*, 43(36), 11605-11615.
- Bollum, F. J. (1960). Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem*, 235, PC18-20.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A. F., Altschul, S. F., & Koonin, E. V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J*, 11(1), 68-76.
- Boule, J. B., Rougeon, F., & Papanicolaou, C. (2001). Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *J Biol Chem*, 276(33), 31388-31393.
- Braithwaite, D. K., & Ito, J. (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, 21(4), 787-802.
- Braithwaite, E. K., Kedar, P. S., Lan, L., Polosina, Y. Y., Asagoshi, K., Poltoratsky, V. P., et al. (2005a). DNA polymerase lambda protects mouse fibroblasts against oxidative DNA damage and is recruited to sites of DNA damage/repair. *J Biol Chem*, 280(36), 31641-31647.
- Braithwaite, E. K., Prasad, R., Shock, D. D., Hou, E. W., Beard, W. A., & Wilson, S. H. (2005b). DNA polymerase lambda mediates a back-up base excision repair activity in extracts of mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, 280(18), 18469-18475.
- Burgers, P. M., Koonin, E. V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K. C., Christman, M. F., et al. (2001). Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem*, 276(47), 43487-43490.
- Caldecott, K. W., Aoufouchi, S., Johnson, P., & Shall, S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*, 24(22), 4387-4394.
- Callebaut, I., & Mornon, J. P. (1997). From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett*, 400(1), 25-30.
- Canitrot, Y., Cazaux, C., Frechet, M., Bouayadi, K., Lesca, C., Salles, B., et al. (1998). Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a

- decreased sensitivity to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(21), 12586-12590.
- Canitrot, Y., Hoffmann, J. S., Calsou, P., Hayakawa, H., Salles, B., & Cazaux, C. (2000). Nucleotide excision repair DNA synthesis by excess DNA polymerase beta: a potential source of genetic instability in cancer cells. *FASEB J.*, 14, 1765-1774.
- Cann, I. K., & Ishino, Y. (1999). Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics*, 152(4), 1249-1267.
- Capp, J. P., Boudsocq, F., Bertrand, P., Laroche-Clary, A., Pourquier, P., Lopez, B. S., et al. (2006). The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 34(10), 2998-3007.
- Cardozo-Pelaez, F., Song, S., Parthasarathy, A., Hazzi, C., Naidu, K., & Sanchez-Ramos, J. (1999). Oxidative DNA damage in the aging mouse brain. *Mov Disord*, 14(6), 972-980.
- Carrico, C. K., & Glazer, R. I. (1979). Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver. *Cancer Res*, 39(9), 3694-3701.
- Carrodeguas, J. A., Theis, K., Bogenhagen, D. F., & Kisker, C. (2001). Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer. *Mol Cell*, 7(1), 43-54.
- Cavero, S., Chahwan, C., & Russell, P. (2007). Xlf1 is required for DNA repair by nonhomologous end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*, 175(2), 963-967.
- Chagovetz, A. M., Sweasy, J. B., & Preston, B. D. (1997). Increased activity and fidelity of DNA polymerase beta on single-nucleotide gapped DNA. *J Biol Chem*, 272(44), 27501-27504.
- Champe, S. P., & Benzer, S. (1962). Reversal of mutant phenotypes by 5-fluorouracil: an approach to nucleotide sequences in messenger-RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48, 532-546.
- Chang, L. M. (1975). The distributive nature of enzymatic DNA synthesis. *J Mol Biol*, 93(2), 219-235.
- Chappell, C., Hanakahi, L. A., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., & West, S. C. (2002). Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *EMBO J*, 21(11), 2827-2832.
- Chaudhuri, N. K., Montag, B. J., & Heidelberger, C. (1958). Studies on fluorinated pyrimidines. III. The metabolism of 5-fluorouracil-2-C14 and 5-fluoroorotic-2-C14 acid in vivo. *Cancer Res*, 18(3), 318-328.
- Chen, L., Trujillo, K., Sung, P., & Tomkinson, A. E. (2000). Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 275(34), 26196-26205.
- Chyan, Y. J., Ackerman, S., Shepherd, N. S., McBride, O. W., Widen, S. G., Wilson, S. H., et al. (1994). The human DNA polymerase beta gene structure. Evidence of alternative

- splicing in gene expression. *Nucleic Acids Res*, 22(14), 2719-2725.
- Cortazar, D., Kunz, C., Saito, Y., Steinacher, R., & Schar, P. (2007). The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)*, 6(4), 489-504.
- Cozzarelli, N. R. (1977). The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, 46, 641-668.
- da Silva, R., & Sacks, D. L. (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun*, 55(11), 2802-2806.
- Dalal, S., Hile, S., Eckert, K. A., Sun, K. W., Starcevic, D., & Sweasy, J. B. (2005). Prostate-cancer-associated I260M variant of DNA polymerase beta is a sequence-specific mutator. *Biochemistry*, 44(48), 15664-15673.
- Daley, J. M., Laan, R. L., Suresh, A., & Wilson, T. E. (2005). DNA joint dependence of pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *J Biol Chem*, 280(32), 29030-29037.
- David, S. S., O'Shea, V. L., & Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941-950.
- Davies, J. F., 2nd, Almassy, R. J., Hostomska, Z., Ferre, R. A., & Hostomsky, Z. (1994). 2.3 A crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase beta. *Cell*, 76(6), 1123-1133.
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., & Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J*, 21(12), 3192-3200.
- Deterding, L. J., Prasad, R., Mullen, G. P., Wilson, S. H., & Tomer, K. B. (2000). Mapping of the 5'-2-deoxyribose-5-phosphate lyase active site in DNA polymerase beta by mass spectrometry. *J Biol Chem*, 275(14), 10463-10471.
- Dianov, G. L., Prasad, R., Wilson, S. H., & Bohr, V. A. (1999). Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem*, 274(20), 13741-13743.
- Diaz, M., & Casali, P. (2002). Somatic immunoglobulin hypermutation. *Curr Opin Immunol*, 14(2), 235-240.
- Diaz, M., Verkoczy, L. K., Flajnik, M. F., & Klinman, N. R. (2001). Decreased frequency of somatic hypermutation and impaired affinity maturation but intact germinal center formation in mice expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *J Immunol*, 167(1), 327-335.
- Dimitriadis, E. K., Prasad, R., Vaske, M. K., Chen, L., Tomkinson, A. E., Lewis, M. S., et al. (1998). Thermodynamics of human DNA ligase I trimerization and association with DNA polymerase beta. *J Biol Chem*, 273(32), 20540-20550.
- Dobashi, Y., Kubota, Y., Shuin, T., Torigoe, S., Yao, M., & Hosaka, M. (1995). Polymorphisms in the human DNA polymerase beta gene. *Hum Genet*, 95(4), 389-390.
- Doherty, A. J., Serpell, L. C., & Ponting, C. P. (1996). The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res*, 24(13), 2488-2497.

- Dominguez, O., Ruiz, J. F., Lain de Lera, T., Garcia-Diaz, M., Gonzalez, M. A., Kirchhoff, T., et al. (2000). DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J*, 19(7), 1731-1742.
- Donelson, J. E., Gardner, M. J., & El-Sayed, N. M. (1999). More surprises from Kinetoplastida. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 2579-2581.
- Doong, S. L., & Dolnick, B. J. (1988). 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing in vitro. *J Biol Chem*, 263(9), 4467-4473.
- Dulbecco, R., & Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8(3), 396-397.
- Dvir, A., Peterson, S. R., Knuth, M. W., Lu, H., & Dynan, W. S. (1992). Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(24), 11920-11924.
- Dynan, W. S., & Yoo, S. (1998). Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 26(7), 1551-1559.
- Efrati, E., Tocco, G., Eritja, R., Wilson, S. H., & Goodman, M. F. (1997). Abasic translesion synthesis by DNA polymerase beta violates the "A-rule". Novel types of nucleotide incorporation by human DNA polymerase beta at an abasic lesion in different sequence contexts. *J Biol Chem*, 272(4), 2559-2569.
- Einolf, H. J., & Guengerich, F. P. (2001). Fidelity of nucleotide insertion at 8-oxo-7,8-dihydroguanine by mammalian DNA polymerase delta. Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis. *J Biol Chem*, 276(6), 3764-3771.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Gueranger, Q., Reynaud, C. A., & Weill, J. C. (2002). Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature*, 419(6910), 944-947.
- Ferguson, D. O., Sekiguchi, J. M., Chang, S., Frank, K. M., Gao, Y., DePinho, R. A., et al. (2000). The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6630-6633.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V., & Dogliotti, E. (2003). 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res*, 531(1-2), 127-139.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R. W., Wilson, S. H., & Dogliotti, E. (1998). Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, 37(11), 3575-3580.
- Fortune, J. M., Pavlov, Y. I., Welch, C. M., Johansson, E., Burgers, P. M., & Kunkel, T. A. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta: high fidelity for base substitutions but lower fidelity for single- and multi-base deletions. *J Biol Chem*, 280(33), 29980-29987.
- Freireich, E. J. (1987). Arabinosyl cytosine: a 20-year update. *J Clin Oncol*, 5(4), 523-524.
- Fridland, A. (1977a). Effect of cytosine arabinoside on replicon initiation in human

- lymphoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 74(1), 72-78.
- Fridland, A. (1977b). Inhibition of deoxyribonucleic acid chain initiation: a new mode of action for 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in human lymphoblasts. *Biochemistry*, 16(24), 5308-5312.
- Furth, J. J., & Cohen, S. S. (1968). Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9-beta-d-arabinofuranoxyladenine. *Cancer Res*, 28(10), 2061-2067.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J. M., Kunkel, T. A., & Pedersen, L. C. (2005). A closed conformation for the Pol lambda catalytic cycle. *Nat Struct Mol Biol*, 12(1), 97-98.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. A., & Blanco, L. (2001). Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair. *J Biol Chem*, 276(37), 34659-34663.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Sabariego, R., Dominguez, O., Rodriguez, J., Kirchhoff, T., et al. (2002). DNA polymerase lambda, a novel DNA repair enzyme in human cells. *J Biol Chem*, 277(15), 13184-13191.
- Garcia-Diaz, M., Dominguez, O., Lopez-Fernandez, L. A., de Lera, L. T., Saniger, M. L., Ruiz, J. F., et al. (2000). DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol*, 301(4), 851-867.
- Garcia-Escudero, R., Garcia-Diaz, M., Salas, M. L., Blanco, L., & Salas, J. (2003). DNA polymerase X of African swine fever virus: insertion fidelity on gapped DNA substrates and AP lyase activity support a role in base excision repair of viral DNA. *J Mol Biol*, 326(5), 1403-1412.
- García-Ortiz, M. J. (2003). *Estudio de la expresión de la ADN polimerasa lambda en el ratón adulto, el desarrollo embrionario y las consecuencias biológicas de su deficiencia.*, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Garg, P., & Burgers, P. M. (2005). DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 40(2), 115-128.
- Gearhart, P. J., & Wood, R. D. (2001). Emerging links between hypermutation of antibody genes and DNA polymerases. *Nat Rev Immunol*, 1(3), 187-192.
- Ghoshal, K., & Jacob, S. T. (1994). Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res*, 54(3), 632-636.
- Ghoshal, K., & Jacob, S. T. (1997). An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem Pharmacol*, 53(11), 1569-1575.
- Gilfillan, S., Benoist, C., & Mathis, D. (1995). Mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase: adult mice with a fetal antigen receptor repertoire. *Immunol Rev*, 148, 201-219.
- Girard, P. M., Guibourt, N., & Boiteux, S. (1997). The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. *Nucleic Acids Res*, 25(16), 3204-3211.

- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Almazan, F., Rodriguez, J. F., Marquet, A., & Larraga, V. (1997). Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential post-translational modifications correlated with different infective forms. *Biochim Biophys Acta*, 1361(1), 92-102.
- Gonzalez-Barrera, S., Sanchez, A., Ruiz, J. F., Juarez, R., Picher, A. J., Terrados, G., et al. (2005). Characterization of SpPol4, a unique X-family DNA polymerase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, 33(15), 4762-4774.
- Gorgoulis, V. G., Vassiliou, L. V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 434(7035), 907-913.
- Gottlieb, T. M., & Jackson, S. P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72(1), 131-142.
- Gozalbo-Lopez, B., Andrade, P., Terrados, G., de Andres, B., Serrano, N., Cortegano, I., et al. (2009). A role for DNA polymerase mu in the emerging DJH rearrangements of the postgastrulation mouse embryo. *Mol Cell Biol*, 29(5), 1266-1275.
- Graham, F. L., & Whitmore, G. F. (1970). The effect of beta-D-arabinofuranosylcytosine on growth, viability, and DNA synthesis of mouse L-cells. *Cancer Res*, 30(11), 2627-2635.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., et al. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388(6641), 492-495.
- Graziewicz, M. A., Longley, M. J., & Copeland, W. C. (2006). DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev*, 106(2), 383-405.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., et al. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell*, 14, 611-623.
- Guo, Z., Zheng, L., Dai, H., Zhou, M., Xu, H., & Shen, B. (2009). Human DNA polymerase beta polymorphism, Arg137Gln, impairs its polymerase activity and interaction with PCNA and the cellular base excision repair capacity. *Nucleic Acids Res*, 37(10), 3431-3441.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Haracska, L., Prakash, L., & Prakash, S. (2002). Role of human DNA polymerase kappa as an extender in translesion synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25), 16000-16005.
- Haracska, L., Prakash, S., & Prakash, L. (2000). Replication past O(6)-methylguanine by yeast and human DNA polymerase eta. *Mol Cell Biol*, 20(21), 8001-8007.
- Haracska, L., Prakash, S., & Prakash, L. (2003). Yeast DNA polymerase zeta is an efficient extender of primer ends opposite from 7,8-dihydro-8-Oxoguanine and O6-methylguanine. *Mol Cell Biol*, 23(4), 1453-1459.
- Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J., & Schar, P. (2000). Separating substrate recognition from base hydrolysis in human thymine DNA glycosylase by mutational analysis. *J Biol Chem*, 275(43), 33449-33456.



- Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J., & Schar, P. (2003). The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, *Drosophila* and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res*, *31*(9), 2261-2271.
- Hasan, S., El-Andaloussi, N., Hardeland, U., Hassa, P. O., Burki, C., Imhof, R., et al. (2002). Acetylation regulates the DNA end-trimming activity of DNA polymerase beta. *Mol Cell*, *10*(5), 1213-1222.
- Hashim, M. F., Schnetz-Boutaud, N., & Marnett, L. J. (1997). Replication of template-primers containing propanodeoxyguanosine by DNA polymerase beta. Induction of base pair substitution and frameshift mutations by template slippage and deoxynucleoside triphosphate stabilization. *J Biol Chem*, *272*(32), 20205-20212.
- Hazra, T. K., Hill, J. W., Izumi, T., & Mitra, S. (2001). Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in vivo functions. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, *68*, 193-205.
- Hefferin, M. L., & Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*, *4*(6), 639-648.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., et al. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature*, *179*(4561), 663-666.
- Helbock, H. J., Beckman, K. B., Shigenaga, M. K., Walter, P. B., Woodall, A. A., Yeo, H. C., et al. (1998). DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(1), 288-293.
- Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R. S., Bruce, C. K., Kysela, B., Green, A. J., et al. (2006). Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J Biol Chem*, *281*(49), 37517-37526.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, *419*(6903), 135-141.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, *411*(6835), 366-374.
- Hopkins, R. L., & Goodman, M. F. (1980). Deoxyribonucleotide pools, base pairing, and sequence configuration affecting bromodeoxyuridine- and 2-aminopurine-induced mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(4), 1801-1805.
- Horton, J. K., Prasad, R., Hou, E., & Wilson, S. H. (2000). Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair. *J Biol Chem*, *275*(3), 2211-2218.
- Horton, J. K., Srivastava, D. K., Zmudzka, B. Z., & Wilson, S. H. (1995). Strategic down-regulation of DNA polymerase beta by antisense RNA sensitizes mammalian cells to specific DNA damaging agents. *Nucleic Acids Res*, *23*(19), 3810-3815.
- Hubscher, U., Maga, G., & Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*, *71*, 133-163.
- Idriss, H. T., Al-Assar, O., & Wilson, S. H. (2002). DNA polymerase beta. *Int J Biochem Cell*

- Biol*, 34(4), 321-324.
- Imai, K., Slupphaug, G., Lee, W. I., Revy, P., Nonoyama, S., Catalan, N., et al. (2003). Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol*, 4(10), 1023-1028.
- Intano, G. W., McMahan, C. A., Walter, R. B., McCarrey, J. R., & Walter, C. A. (2001). Mixed spermatogenic germ cell nuclear extracts exhibit high base excision repair activity. *Nucleic Acids Res*, 29(6), 1366-1372.
- Ito, J., & Braithwaite, D. K. (1991). Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic Acids Res*, 19(15), 4045-4057.
- Iwanaga, A., Ouchida, M., Miyazaki, K., Hori, K., & Mukai, T. (1999). Functional mutation of DNA polymerase beta found in human gastric cancer--inability of the base excision repair in vitro. *Mutat Res*, 435(2), 121-128.
- Jenkins, T. M., Saxena, J. K., Kumar, A., Wilson, S. H., & Ackerman, E. J. (1992). DNA polymerase beta and DNA synthesis in *Xenopus* oocytes and in a nuclear extract. *Science*, 258(5081), 475-478.
- Johnson, A., & O'Donnell, M. (2005). Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem*, 74, 283-315.
- Johnson, C. E., & Englund, P. T. (1998). Changes in organization of *Crithidia fasciculata* kinetoplast DNA replication proteins during the cell cycle. *J Cell Biol*, 143(4), 911-919.
- Johnson, R. E., Washington, M. T., Prakash, S., & Prakash, L. (2000). Fidelity of human DNA polymerase eta. *J Biol Chem*, 275(11), 7447-7450.
- Juarez, R., Ruiz, J. F., Nick McElhinny, S. A., Ramsden, D., & Blanco, L. (2006). A specific loop in human DNA polymerase mu allows switching between creative and DNA-instructed synthesis. *Nucleic Acids Res*, 34(16), 4572-4582.
- Kabbinavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Meropol, N. J., Novotny, W. F., Lieberman, G., et al. (2003). Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21(1), 60-65.
- Kanamaru, R., Kakuta, H., Sato, T., Ishioka, C., & Wakui, A. (1986). The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, 17(1), 43-46.
- Karanjawala, Z. E., Grawunder, U., Hsieh, C. L., & Lieber, M. R. (1999). The nonhomologous DNA end joining pathway is important for chromosome stability in primary fibroblasts. *Curr Biol*, 9(24), 1501-1504.
- Karanjawala, Z. E., Murphy, N., Hinton, D. R., Hsieh, C. L., & Lieber, M. R. (2002). Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. *Curr Biol*, 12(5), 397-402.
- Karawya, E., Swack, J. A., & Wilson, S. H. (1983). Improved conditions for activity gel analysis of DNA polymerase catalytic polypeptides. *Anal Biochem*, 135(2), 318-325.
- Karimi-Busheri, F., Daly, G., Robins, P., Canas, B., Pappin, D. J., Sgouros, J., et al. (1999).



- Molecular characterization of a human DNA kinase. *J Biol Chem*, 274(34), 24187-24194.
- Kato, K. I., Goncalves, J. M., Houts, G. E., & Bollum, F. J. (1967). Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal deoxynucleotidyltransferase. *J Biol Chem*, 242(11), 2780-2789.
- Kavli, B., Otterlei, M., Slupphaug, G., & Krokan, H. E. (2007). Uracil in DNA--general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)*, 6(4), 505-516.
- Keating, M. J., McCredie, K. B., Bodey, G. P., Smith, T. L., Gehan, E., & Freireich, E. J. (1982). Improved prospects for long-term survival in adults with acute myelogenous leukemia. *JAMA*, 248(19), 2481-2486.
- Keeney, S., & Neale, M. J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 4), 523-525.
- Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629-640.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., & Alt, F. W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*, 261(5125), 1171-1175.
- Kouroussis, C., Souglakos, J., Mavroudis, D., Papadouris, S., Kakolyris, S., Agelaki, S., et al. (2002). Oxaliplatin with high-dose leucovorin and infusional 5-fluorouracil in irinotecan-pretreated patients with advanced colorectal cancer (ACC). *Am J Clin Oncol*, 25(6), 627-631.
- Kovtun, I. V., & McMurray, C. T. (2001). Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nat Genet*, 27(4), 407-411.
- Krayevsky, A. A., Victorova, L. S., Arzumanov, A. A., & Jasko, M. V. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase. catalysis of DNA (oligodeoxynucleotide) phosphorylation. *Pharmacol Ther*, 85(3), 165-173.
- Kretzschmar, A., Reichardt, P., Thuss-Patience, P. C., Hohenberger, P., Benter, T., Dorken, B., et al. (2000). Weekly 24-hour infusion of high-dose 5-fluorouracil plus folinic acid in combination with mitomycin C for the treatment of advanced gastric cancer. *Oncology*, 59(1), 14-17.
- Krokan, H. E., & Slupphaug, G. (1998). [DNA repair enzymes and their genes]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 118(13), 2037-2042.
- Kubota, Y., Nash, R. A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D. E., & Lindahl, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J*, 15(23), 6662-6670.
- Kufe, D. W., Major, P. P., Egan, E. M., & Beardsley, G. P. (1980). Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA. *J Biol Chem*, 255(19), 8997-8900.
- Kumar, A., Widen, S. G., Williams, K. R., Kedar, P., Karpel, R. L., & Wilson, S. H. (1990). Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase beta. Identification of a discrete template binding domain. *J Biol Chem*, 265(4), 2124-2131.

- Kunkel, T. (2003). Considering the cancer consequences of altered DNA polymerase function. *Cancer Cell*, 3, 105-110.
- Kunkel, T. A. (1985). The mutational specificity of DNA polymerases-alpha and -gamma during in vitro DNA synthesis. *J Biol Chem*, 260(23), 12866-12874.
- Kunkel, T. A. (2004). DNA replication fidelity. *J Biol Chem*, 279(17), 16895-16898.
- Kunkel, T. A., & Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem*, 69, 497-529.
- Kunz, C., Focke, F., Saito, Y., Schuermann, D., Lettieri, T., Selfridge, J., et al. (2009). Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. *PLoS Biol*, 7(4), e91.
- Landi, S., Moreno, V., Gioia-Patricola, L., Guino, E., Navarro, M., de Oca, J., et al. (2003). Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res*, 63(13), 3560-3566.
- Lang, T., Maitra, M., Starcevic, D., Li, S. X., & Sweasy, J. B. (2004). A DNA polymerase beta mutant from colon cancer cells induces mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(16), 6074-6079.
- Lawrence, C. W. (2004). Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv Protein Chem*, 69, 167-203.
- Lee, J. W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. A., et al. (2004). Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem*, 279(1), 805-811.
- Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., & Kornberg, A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 233(1), 163-170.
- Lenz, H. J., Manno, D. J., Danenberg, K. D., & Danenberg, P. V. (1994). Incorporation of 5-fluorouracil into U2 and U6 snRNA inhibits mRNA precursor splicing. *J Biol Chem*, 269(50), 31962-31968.
- Li, C., & Englund, P. T. (1997). A mitochondrial DNA primase from the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem*, 272(33), 20787-20792.
- Lieber, M. R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N., & Tsai, A. G. Nonhomologous DNA End Joining (NHEJ) and Chromosomal Translocations in Humans. *Subcell Biochem*, 50, 279-296.
- Lim, S. E., Longley, M. J., & Copeland, W. C. (1999). The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *J Biol Chem*, 274(53), 38197-38203.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), 709-715.
- Lindahl, T., & Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*, 286(5446), 1897-

1905.

- Liu, Y., Prasad, R., Beard, W. A., Hou, E. W., Horton, J. K., McMurray, C. T., et al. (2009). Coordination between polymerase beta and FEN1 can modulate CAG repeat expansion. *J Biol Chem*, 284(41), 28352-28366.
- Livingston, A. L., O'Shea, V. L., Kim, T., Kool, E. T., & David, S. S. (2008). Unnatural substrates reveal the importance of 8-oxoguanine for in vivo mismatch repair by MutY. *Nat Chem Biol*, 4(1), 51-58.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 330-338.
- Lucas, D., Escudero, B., Ligos, J. M., Segovia, J. C., Estrada, J. C., Terrados, G., et al. (2009). Altered hematopoiesis in mice lacking DNA polymerase mu is due to inefficient double-strand break repair. *PLoS Genet*, 5(2), e1000389.
- Lucas, D., Lain de Lera, T., Gonzalez, M. A., Ruiz, J. F., Dominguez, O., Casanova, J. C., et al. (2005). Polymerase mu is up-regulated during the T cell-dependent immune response and its deficiency alters developmental dynamics of spleen centroblasts. *Eur J Immunol*, 35(5), 1601-1611.
- Ma, Y., Lu, H., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2005). Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle*, 4(9), 1193-1200.
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., et al. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell*, 16(5), 701-713.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108(6), 781-794.
- Maciejewski, M. W., Shin, R., Pan, B., Marintchev, A., Denninger, A., Mullen, M. A., et al. (2001). Solution structure of a viral DNA repair polymerase. *Nat Struct Biol*, 8(11), 936-941.
- Maga, G., Crespan, E., Wimmer, U., van Loon, B., Amoroso, A., Mondello, C., et al. (2008). Replication protein A and proliferating cell nuclear antigen coordinate DNA polymerase selection in 8-oxo-guanine repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52), 20689-20694.
- Maga, G., Villani, G., Ramadan, K., Shevelev, I., Tanguy Le Gac, N., Blanco, L., et al. (2002). Human DNA polymerase lambda functionally and physically interacts with proliferating cell nuclear antigen in normal and translesion DNA synthesis. *J Biol Chem*, 277(50), 48434-48440.
- Mahajan, K. N., Gangi-Peterson, L., Sorscher, D. H., Wang, J., Gathy, K. N., Mahajan, N. P., et al. (1999). Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(24), 13926-13931.
- Mahajan, K. N., Nick McElhinny, S. A., Mitchell, B. S., & Ramsden, D. A. (2002). Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, 22(14), 5194-5202.

- Major, P. P., Egan, E. M., Beardsley, G. P., Minden, M. D., & Kufe, D. W. (1981). Lethality of human myeloblasts correlates with the incorporation of arabinofuranosylcytosine into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(5), 3235-3239.
- Malcom, B. A. (1999). Method of constructing vectors for homologous recombination directed mutagenesis. *BioTechniques*, 26(4).
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Mahal, A., Mott, R., Seller, M., & Bates, G. P. (1997). Instability of highly expanded CAG repeats in mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Nat Genet*, 15(2), 197-200.
- Manley, K., Pugh, J., & Messer, A. (1999). Instability of the CAG repeat in immortalized fibroblast cell cultures from Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res*, 835(1), 74-79.
- Manolis, K. G., Nimmo, E. R., Hartsuiker, E., Carr, A. M., Jeggo, P. A., & Allshire, R. C. (2001). Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J*, 20(1-2), 210-221.
- Mastrianni, D. M., Tung, N. M., & Tenen, D. G. (1992). Acute myelogenous leukemia: current treatment and future directions. *Am J Med*, 92(3), 286-295.
- Masuda, K., Ouchida, R., Hikida, M., Nakayama, M., Ohara, O., Kurosaki, T., et al. (2006). Absence of DNA polymerase theta results in decreased somatic hypermutation frequency and altered mutation patterns in Ig genes. *DNA Repair (Amst)*, 5(11), 1384-1391.
- Masuda, K., Ouchida, R., Takeuchi, A., Saito, T., Koseki, H., Kawamura, K., et al. (2005). DNA polymerase theta contributes to the generation of C/G mutations during somatic hypermutation of Ig genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(39), 13986-13991.
- Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F., & Kunkel, T. A. (2000). Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase-eta. *Nature*, 404(6781), 1011-1013.
- Matsumoto, Y., & Kim, K. (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, 269(5224), 699-702.
- Matsumoto, Y., Kim, K., & Bogenhagen, D. F. (1994). Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol*, 14(9), 6187-6197.
- Matsumoto, Y., Kim, K., Katz, D. S., & Feng, J. A. (1998). Catalytic center of DNA polymerase beta for excision of deoxyribose phosphate groups. *Biochemistry*, 37(18), 6456-6464.
- Matsumoto, Y., Zhang, Q. M., Takao, M., Yasui, A., & Yonei, S. (2001). *Escherichia coli* Nth and human hNTH1 DNA glycosylases are involved in removal of 8-oxoguanine from 8-oxoguanine/guanine mispairs in DNA. *Nucleic Acids Res*, 29(9), 1975-1981.
- McCormick, P. J., Danhauser, L. L., Rustum, Y. M., & Bertram, J. S. (1983). Changes in ribo- and deoxyribonucleoside triphosphate pools within the cell cycle of a synchronized mouse fibroblast cell line. *Biochim Biophys Acta*, 756(1), 36-40.
- McCulloch, S. D., & Kunkel, T. A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic

- replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res*, 18(1), 148-161.
- McMurray, C. T. (1999). DNA secondary structure: a common and causative factor for expansion in human disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5), 1823-1825.
- Mikita, T., & Beardsley, G. P. (1988). Functional consequences of the arabinosylcytosine structural lesion in DNA. *Biochemistry*, 27(13), 4698-4705.
- Miller, H., Prasad, R., Wilson, S. H., Johnson, F., & Grollman, A. P. (2000). 8-oxodGTP incorporation by DNA polymerase beta is modified by active-site residue Asn279. *Biochemistry*, 39(5), 1029-1033.
- Miyamoto, H., Miyagi, Y., Ishikawa, T., Ichikawa, Y., Hosaka, M., & Kubota, Y. (1999). DNA polymerase beta gene mutation in human breast cancer. *Int J Cancer*, 83(5), 708-709.
- Mol, C. D., Izumi, T., Mitra, S., & Tainer, J. A. (2000). DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected]. *Nature*, 403(6768), 451-456.
- Moreno, V., Gemignani, F., Landi, S., Gioia-Patricola, L., Chabrier, A., Blanco, I., et al. (2006). Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 12(7 Pt 1), 2101-2108.
- Morgan, W. F., Day, J. P., Kaplan, M. I., McGhee, E. M., & Limoli, C. L. (1996). Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res*, 146(3), 247-258.
- Moriya, M. (1993). Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(3), 1122-1126.
- Nagasawa, K., Kitamura, K., Yasui, A., Nimura, Y., Ikeda, K., Hirai, M., et al. (2000). Identification and characterization of human DNA polymerase beta 2, a DNA polymerase beta-related enzyme. *J Biol Chem*, 275(40), 31233-31238.
- Nealon, K., Nicholl, I. D., & Kenny, M. K. (1996). Characterization of the DNA polymerase requirement of human base excision repair. *Nucleic Acids Res*, 24(19), 3763-3770.
- Neddermann, P., & Jiricny, J. (1993). The purification of a mismatch-specific thymine-DNA glycosylase from HeLa cells. *J Biol Chem*, 268(28), 21218-21224.
- Nelson, J. R., Lawrence, C. W., & Hinkle, D. C. (1996). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science*, 272(5268), 1646-1649.
- Nick McElhinny, S. A., Havener, J. M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., et al. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell*, 19(3), 357-366.
- Nick McElhinny, S. A., & Ramsden, D. A. (2003). Polymerase mu is a DNA-directed DNA/RNA polymerase. *Mol Cell Biol*, 23(7), 2309-2315.
- Nick McElhinny, S. A., & Ramsden, D. A. (2004). Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair. *Immunol Rev*, 200, 156-164.
- Nilsen, H., Haushalter, K. A., Robins, P., Barnes, D. E., Verdine, G. L., & Lindahl, T. (2001).

- Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO J*, 20(15), 4278-4286.
- Nowak, R., Bieganski, P., Konopinski, R., & Siedlecki, J. A. (2000). Alternative forms of beta-pol mRNA are not tumor-specific and are not the result of mutations in the DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 268(1), 1.
- Nowak, R., Woszczyński, M., & Siedlecki, J. A. (1990). Changes in the DNA polymerase beta gene expression during development of lung, brain, and testis suggest an involvement of the enzyme in DNA recombination. *Exp Cell Res*, 191(1), 51-56.
- Ochs, K., Sobol, R. W., Wilson, S. H., & Kaina, B. (1999). Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage. *Cancer Res*, 59(7), 1544-1551.
- Oda, N., Saxena, J. K., Jenkins, T. M., Prasad, R., Wilson, S. H., & Ackerman, E. J. (1996). DNA polymerases alpha and beta are required for DNA repair in an efficient nuclear extract from *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 271(23), 13816-13820.
- Ohmori, H., Friedberg, E. C., Fuchs, R. P., Goodman, M. F., Hanaoka, F., Hinkle, D., et al. (2001). The Y-family of DNA polymerases. *Mol Cell*, 8(1), 7-8.
- Ohno, Y., Spriggs, D., Matsukage, A., Ohno, T., & Kufe, D. (1988). Effects of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine incorporation on elongation of specific DNA sequences by DNA polymerase beta. *Cancer Res*, 48(6), 1494-1498.
- Ohtsu, A., Boku, N., Yoshioka, T., Hyodo, I., Shirao, K., Shimada, Y., et al. (2003). A Phase II study of irinotecan in combination with 120-h infusion of 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal carcinoma: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9703). *Jpn J Clin Oncol*, 33(1), 28-32.
- Oliveros, M., Yanez, R. J., Salas, M. L., Salas, J., Vinuela, E., & Blanco, L. (1997). Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *J Biol Chem*, 272(49), 30899-30910.
- Olsen, A. K., Bjortuft, H., Wiger, R., Holme, J., Seeberg, E., BJORAS, M., et al. (2001). Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic Acids Res*, 29(8), 1781-1790.
- Ortega, Z., Diaz-Hernandez, M., & Lucas, J. J. (2007). Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell Mol Life Sci*, 64(17), 2245-2257.
- Osheroff, W. P., Beard, W. A., Wilson, S. H., & Kunkel, T. A. (1999a). Base substitution specificity of DNA polymerase beta depends on interactions in the DNA minor groove. *J Biol Chem*, 274(30), 20749-20752.
- Osheroff, W. P., Jung, H. K., Beard, W. A., Wilson, S. H., & Kunkel, T. A. (1999b). The fidelity of DNA polymerase beta during distributive and processive DNA synthesis. *J Biol Chem*, 274(6), 3642-3650.
- Osheroff, W. P., Beard, W. A., Yin, S., Wilson, S. H., & Kunkel, T. A. (2000). Minor groove interactions at the DNA polymerase beta active site modulate single-base deletion error rates. *J Biol Chem*, 275(36), 28033-28038.
- Pages, V., & Fuchs, R. P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells?



- Oncogene*, 21(58), 8957-8966.
- Paques, M., Chastang, C., Mathis, A., Sahel, J., Massin, P., Dosquet, C., et al. (1999). Effect of autologous platelet concentrate in surgery for idiopathic macular hole: results of a multicenter, double-masked, randomized trial. Platelets in Macular Hole Surgery Group. *Ophthalmology*, 106(5), 932-938.
- Parker, W. B., & Cheng, Y. C. (1990). Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol. Ther.*, 48(3), 381-395.
- Parlanti, E., Pascucci, B., Terrados, G., Blanco, L., & Dogliotti, E. (2004). Aphidicolin-resistant and -sensitive base excision repair in wild-type and DNA polymerase beta-defective mouse cells. *DNA Repair (Amst)*, 3(7), 703-710.
- Patton, J. R. (1993). Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear RNA containing 5-fluorouridine. *Biochemistry*, 32(34), 8939-8944.
- Pavlov, Y. I., Frahm, C., Nick McElhinny, S. A., Niimi, A., Suzuki, M., & Kunkel, T. A. (2006). Evidence that errors made by DNA polymerase alpha are corrected by DNA polymerase delta. *Curr Biol*, 16(2), 202-207.
- Pelletier, H., & Sawaya, M. R. (1996). Characterization of the metal ion binding helix-hairpin-helix motifs in human DNA polymerase beta by X-ray structural analysis. *Biochemistry*, 35(39), 12778-12787.
- Pelletier, H., Sawaya, M. R., Kumar, A., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1994). Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, 264(5167), 1891-1903.
- Pelletier, H., Sawaya, M. R., Wolfle, W., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1996a). A structural basis for metal ion mutagenicity and nucleotide selectivity in human DNA polymerase beta. *Biochemistry*, 35(39), 12762-12777.
- Pelletier, H., Sawaya, M. R., Wolfle, W., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1996b). Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity. *Biochemistry*, 35(39), 12742-12761.
- Perrino, F. W., & Mekosh, H. L. (1992). Incorporation of cytosine arabinoside monophosphate into DNA at internucleotide linkages by human DNA polymerase alpha. *J Biol Chem*, 267(32), 23043-23051.
- Petruska, J., Hartenstine, M. J., & Goodman, M. F. (1998). Analysis of strand slippage in DNA polymerase expansions of CAG/CTG triplet repeats associated with neurodegenerative disease. *J Biol Chem*, 273(9), 5204-5210.
- Pettersen, H. S., Sundheim, O., Gilljam, K. M., Slupphaug, G., Krokan, H. E., & Kavli, B. (2007). Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res*, 35(12), 3879-3892.
- Picher, A. J. (2007). *Papel de la ADN polimerasa lambda humana en reparación de daño oxidativo y roturas de doble cadena en el ADN*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Picher, A. J., & Blanco, L. (2007). Human DNA polymerase lambda is a proficient extender of primer ends paired to 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *DNA Repair (Amst)*, 6(12), 1749-

1756.

- Plug, A. W., Clairmont, C. A., Sapi, E., Ashley, T., & Sweasy, J. B. (1997). Evidence for a role for DNA polymerase beta in mammalian meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(4), 1327-1331.
- Podlutzky, A. J., Dianova, II, Podust, V. N., Bohr, V. A., & Dianov, G. L. (2001a). Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *EMBO J*, *20*(6), 1477-1482.
- Podlutzky, A. J., Dianova, II, Wilson, S. H., Bohr, V. A., & Dianov, G. L. (2001b). DNA synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry*, *40*(3), 809-813.
- Ponamarev, M. V., Longley, M. J., Nguyen, D., Kunkel, T. A., & Copeland, W. C. (2002). Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis. *J Biol Chem*, *277*(18), 15225-15228.
- Prakash, S., Johnson, R. E., & Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem*, *74*, 317-353.
- Prasad, R., Beard, W. A., Strauss, P. R., & Wilson, S. H. (1998a). Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem*, *273*(24), 15263-15270.
- Prasad, R., Beard, W. A., Chyan, J. Y., Maciejewski, M. W., Mullen, G. P., & Wilson, S. H. (1998b). Functional analysis of the amino-terminal 8-kDa domain of DNA polymerase beta as revealed by site-directed mutagenesis. DNA binding and 5'-deoxyribose phosphate lyase activities. *J Biol Chem*, *273*(18), 11121-11126.
- Prasad, R., Beard, W. A., & Wilson, S. H. (1994). Studies of gapped DNA substrate binding by mammalian DNA polymerase beta. Dependence on 5'-phosphate group. *J Biol Chem*, *269*(27), 18096-18101.
- Prasad, R., Lavrik, O. I., Kim, S. J., Kedar, P., Yang, X. P., Vande Berg, B. J., et al. (2001). DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J Biol Chem*, *276*(35), 32411-32414.
- Prasad, R., Singhal, R. K., Srivastava, D. K., Molina, J. T., Tomkinson, A. E., & Wilson, S. H. (1996). Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J Biol Chem*, *271*(27), 16000-16007.
- Prasad, R., Widen, S. G., Singhal, R. K., Watkins, J., Prakash, L., & Wilson, S. H. (1993). Yeast open reading frame YCR14C encodes a DNA beta-polymerase-like enzyme. *Nucleic Acids Res*, *21*(23), 5301-5307.
- Pratt, C. B., Meyer, W. H., Howlett, N., Douglass, E. C., Bowman, L. C., Poe, D., et al. (1994). Phase II study of 5-fluorouracil/leucovorin for pediatric patients with malignant solid tumors. *Cancer*, *74*(9), 2593-2598.
- Prudden, J., Evans, J. S., Hussey, S. P., Deans, B., O'Neill, P., Thacker, J., et al. (2003).



- Pathway utilization in response to a site-specific DNA double-strand break in fission yeast. *EMBO J*, 22(6), 1419-1430.
- Randerath, K., Tseng, W. C., Harris, J. S., & Lu, L. J. (1983). Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the 5 position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids. *Recent Results Cancer Res*, 84, 283-297.
- Rogozin, I. B., Pavlov, Y. I., Bebenek, K., Matsuda, T., & Kunkel, T. A. (2001). Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase eta error spectrum. *Nat Immunol*, 2(6), 530-536.
- Roychoudhury, R. (1972). Enzymic synthesis of polynucleotides. Oligodeoxynucleotides with one 3'-terminal ribonucleotide as primers for polydeoxynucleotide synthesis. *J Biol Chem*, 247(12), 3910-3917.
- Ruiz, J. F., Dominguez, O., Lain de Lera, T., Garcia-Diaz, M., Bernad, A., & Blanco, L. (2001). DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1405), 99-109.
- Ruiz, J. F., Juarez, R., Garcia-Diaz, M., Terrados, G., Picher, A. J., Gonzalez-Barrera, S., et al. (2003). Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res*, 31(15), 4441-4449.
- Ruiz, J. F., Lucas, D., Garcia-Palomero, E., Saez, A. I., Gonzalez, M. A., Piris, M. A., et al. (2004). Overexpression of human DNA polymerase mu (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. *Nucleic Acids Res*, 32(19), 5861-5873.
- Rutman, R. J., Cantarow, A., & Paschkis, K. E. (1954). Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. *Cancer Res*, 14(2), 119-123.
- Sahasrabudhe, P. V., & Gmeiner, W. H. (1997). Solution structures of 5-fluorouracil-substituted RNA duplexes containing G-U wobble base pairs. *Biochemistry*, 36(20), 5981-5991.
- Sahasrabudhe, P. V., Pon, R. T., & Gmeiner, W. H. (1995). Effects of site-specific substitution of 5-fluorouridine on the stabilities of duplex DNA and RNA. *Nucleic Acids Res*, 23(19), 3916-3921.
- Sahasrabudhe, P. V., Pon, R. T., & Gmeiner, W. H. (1996). Solution structures of 5-fluorouracil-substituted DNA and RNA decamer duplexes. *Biochemistry*, 35(42), 13597-13608.
- Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem*, 60, 39-71.
- Samuelsson, T. (1991). Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases with RNAs substituted with fluorouracil. *Nucleic Acids Res*, 19(22), 6139-6144.
- Santi, D. V., & Hardy, L. W. (1987). Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5) methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry*, 26(26), 8599-8606.
- Santi, D. V., McHenry, C. S., & Sommer, H. (1974). Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*, 13(3), 471-481.
- Sathasivam, K., Hobbs, C., Mangiarini, L., Mahal, A., Turmaine, M., Doherty, P., et al. (1999).

- Transgenic models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1386), 963-969.
- Sawaya, M. R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1994). Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism. *Science*, 264(5167), 1930-1935.
- Sawaya, M. R., Prasad, R., Wilson, S. H., Kraut, J., & Pelletier, H. (1997). Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, 36(37), 11205-11215.
- Saxowsky, T. T., Choudhary, G., Klingbeil, M. M., & Englund, P. T. (2003). Trypanosoma brucei has two distinct mitochondrial DNA polymerase beta enzymes. *J Biol Chem*, 278(49), 49095-49101.
- Saxowsky, T. T., Matsumoto, Y., & Englund, P. T. (2002). The mitochondrial DNA polymerase beta from Crithidia fasciculata has 5'-deoxyribose phosphate (dRP) lyase activity but is deficient in the release of dRP. *J Biol Chem*, 277(40), 37201-37206.
- Seki, S., Tribulova, N., Manoach, M., & Mochizuki, S. (2003). Modulation of intracellular Ca(2+) concentration by tedisamil, a class III antiarrhythmic agent, in isolated heart preparation. *Life Sci*, 73(14), 1805-1811.
- Semizarov, D. G., Arzumanov, A. A., Dyatkina, N. B., Meyer, A., Vichier-Guerre, S., Gosselin, G., et al. (1997). Stereoisomers of deoxynucleoside 5'-triphosphates as substrates for template-dependent and -independent DNA polymerases. *J Biol Chem*, 272(14), 9556-9560.
- Shah, A. M., Conn, D. A., Li, S. X., Capaldi, A., Jager, J., & Sweasy, J. B. (2001). A DNA polymerase beta mutator mutant with reduced nucleotide discrimination and increased protein stability. *Biochemistry*, 40(38), 11372-11381.
- Sharief, F. S., Vojta, P. J., Ropp, P. A., & Copeland, W. C. (1999). Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. *Genomics*, 59(1), 90-96.
- Shcherbakova, P. V., Bebenek, K., & Kunkel, T. A. (2003). Functions of eukaryotic DNA polymerases. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2003(8), RE3.
- Shevelev, I. V., Ramadan, K., & Hubscher, U. (2002). The TREX2 3'-->5' exonuclease physically interacts with DNA polymerase delta and increases its accuracy. *ScientificWorldJournal*, 2, 275-281.
- Shibutani, S., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349(6308), 431-434.
- Shimazaki, N., Yazaki, T., Kubota, T., Sato, A., Nakamura, A., Kurei, S., et al. (2005). DNA polymerase lambda directly binds to proliferating cell nuclear antigen through its confined C-terminal region. *Genes Cells*, 10(7), 705-715.
- Shimazaki, N., Yoshida, K., Kobayashi, T., Toji, S., Tamai, K., & Koiwai, O. (2002). Over-expression of human DNA polymerase lambda in E. coli and characterization of the recombinant enzyme. *Genes Cells*, 7(7), 639-651.
- Shirasaka, T., Kavlick, M. F., Ueno, T., Gao, W. Y., Kojima, E., Alcaide, M. L., et al. (1995).

- Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(6), 2398-2402.
- Showalter, A. K., Byeon, I. J., Su, M. I., & Tsai, M. D. (2001). Solution structure of a viral DNA polymerase X and evidence for a mutagenic function. *Nat Struct Biol*, 8(11), 942-946.
- Singhal, R. K., & Wilson, S. H. (1993). Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *J Biol Chem*, 268(21), 15906-15911.
- Slupphaug, G., Kavli, B., & Krokan, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 531(1-2), 231-251.
- Sobol, R. W., Horton, J. K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R. K., Prasad, R., et al. (1996). Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*, 379(6561), 183-186.
- Sobol, R. W., Prasad, R., Evenski, A., Baker, A., Yang, X. P., Horton, J. K., et al. (2000). The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*, 405(6788), 807-810.
- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., et al. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene*, 26(56), 7780-7791.
- Sowers, L. C., Eritja, R., Kaplan, B., Goodman, M. F., & Fazakerly, G. V. (1988). Equilibrium between a wobble and ionized base pair formed between fluorouracil and guanine in DNA as studied by proton and fluorine NMR. *J Biol Chem*, 263(29), 14794-14801.
- Sowers, L. C., Goodman, M. F., Eritja, R., Kaplan, B., & Fazakerley, G. V. (1989). Ionized and wobble base-pairing for bromouracil-guanine in equilibrium under physiological conditions. A nuclear magnetic resonance study on an oligonucleotide containing a bromouracil-guanine base-pair as a function of pH. *J Mol Biol*, 205(2), 437-447.
- Srivastava, D. K., Husain, I., Arteaga, C. L., & Wilson, S. H. (1999). DNA polymerase beta expression differences in selected human tumors and cell lines. *Carcinogenesis*, 20(6), 1049-1054.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220-1224.
- Steitz, T. A. (1999). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem*, 274(25), 17395-17398.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, 41(1), 207-234.
- Sugo, N., Aratani, Y., Nagashima, Y., Kubota, Y., & Koyama, H. (2000). Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase beta. *EMBO J*, 19(6), 1397-1404.
- Sweasy, J. B., Chen, M., & Loeb, L. A. (1995). DNA polymerase beta can substitute for DNA polymerase I in the initiation of plasmid DNA replication. *J Bacteriol*, 177(10), 2923-2925.
- Sweasy, J. B., Lang, T., & DiMaio, D. (2006a). Is base excision repair a tumor suppressor

- mechanism? *Cell Cycle*, 5(3), 250-259.
- Sweasy, J. B., Lang, T., Starcevic, D., Sun, K. W., Lai, C. C., Dimaio, D., et al. (2005). Expression of DNA polymerase {beta} cancer-associated variants in mouse cells results in cellular transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40), 14350-14355.
- Sweasy, J. B., Lauper, J. M., & Eckert, K. A. (2006b). DNA polymerases and human diseases. *Radiat Res*, 166(5), 693-714.
- Sweasy, J. B., & Loeb, L. A. (1992). Mammalian DNA polymerase beta can substitute for DNA polymerase I during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 267(3), 1407-1410.
- Takata, K., Shimizu, T., Iwai, S., & Wood, R. D. (2006). Human DNA polymerase N (POLN) is a low fidelity enzyme capable of error-free bypass of 5S-thymine glycol. *J Biol Chem*, 281(33), 23445-23455.
- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., et al. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*, 17(18), 5497-5508.
- Taladriz, S., Hanke, T., Ramiro, M. J., Garcia-Diaz, M., Garcia De Lacoba, M., Blanco, L., et al. (2001). Nuclear DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*. Cloning, molecular analysis and developmental regulation. *Nucleic Acids Res*, 29(18), 3822-3834.
- Tanaka, M., Yoshida, S., Saneyoshi, M., & Yamaguchi, T. (1981). Utilization of 5-fluoro-2'-deoxyuridine triphosphate and 5-fluoro-2'-deoxycytidine triphosphate in DNA synthesis by DNA polymerases alpha and beta from calf thymus. *Cancer Res*, 41(10), 4132-4135.
- Thomas, D., Scot, A. D., Barbey, R., Padula, M., & Boiteux, S. (1997). Inactivation of OGG1 increases the incidence of G . C-->T . A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol Gen Genet*, 254(2), 171-178.
- Tomka, M., Kirchhoff, T., Kulcsar, L., Stevurkova, V., & Zajac, V. (1998). The combination of heteroduplex analysis and protein truncation test for exact detection of the APC gene mutations. *Neoplasma*, 45(6), 345-348.
- Torri, A. F., & Englund, P. T. (1995). A DNA polymerase beta in the mitochondrion of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem*, 270(8), 3495-3497.
- Torri, A. F., Kunkel, T. A., & Englund, P. T. (1994). A beta-like DNA polymerase from the mitochondrion of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem*, 269(11), 8165-8171.
- Traut, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol Cell Biochem*, 140(1), 1-22.
- Tseng, H. M., & Tomkinson, A. E. (2002). A physical and functional interaction between yeast Pol4 and Dnl4-Lif1 links DNA synthesis and ligation in nonhomologous end joining. *J Biol Chem*, 277(47), 45630-45637.
- Tseng, H. M., & Tomkinson, A. E. (2004). Processing and joining of DNA ends coordinated by

- interactions among Dnl4/Lif1, Pol4, and FEN-1. *J Biol Chem*, 279(46), 47580-47588.
- Ulrich, H. D. (2004). How to activate a damage-tolerant polymerase: consequences of PCNA modifications by ubiquitin and SUMO. *Cell Cycle*, 3(1), 15-18.
- van Loon, B., & Hubscher, U. (2009). An 8-oxo-guanine repair pathway coordinated by MUTYH glycosylase and DNA polymerase lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(43), 18201-18206.
- Visnes, T., Doseth, B., Pettersen, H. S., Hagen, L., Sousa, M. M., Akbari, M., et al. (2009). Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1517), 563-568.
- Walker, J. R., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), 607-614.
- Wang, L., Patel, U., Ghosh, L., & Banerjee, S. (1992). DNA polymerase beta mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res*, 52(17), 4824-4827.
- Ward, J. F. (2000). Complexity of damage produced by ionizing radiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65, 377-382.
- Wells, R. D., Dere, R., Hebert, M. L., Napierala, M., & Son, L. S. (2005). Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases. *Nucleic Acids Res*, 33(12), 3785-3798.
- Werneburg, B. G., Ahn, J., Zhong, X., Hondal, R. J., Kraynov, V. S., & Tsai, M. D. (1996). DNA polymerase beta: pre-steady-state kinetic analysis and roles of arginine-283 in catalysis and fidelity. *Biochemistry*, 35(22), 7041-7050.
- West, S. C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(6), 435-445.
- Wexler, N. S., Rose, E. A., & Housman, D. E. (1991). Molecular approaches to hereditary diseases of the nervous system: Huntington's disease as a paradigm. *Annu Rev Neurosci*, 14, 503-529.
- Wilke, H., Stahl, M., Koster, W., & Vanhofer, U. (2000). [Infusiontherapy with 5-fluorouracil ("infusional" 5-FU) in solid tumors]. *Med Klin (Munich)*, 95 Suppl 1, 3-8.
- Wilson, S. H., & Kunkel, T. A. (2000). Passing the baton in base excision repair. *Nat Struct Biol*, 7(3), 176-178.
- Wilson, T. E., & Lieber, M. R. (1999). Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase beta (Pol4)-dependent pathway. *J Biol Chem*, 274(33), 23599-23609.
- Wu, X. P., & Dolnick, B. J. (1993). 5-Fluorouracil alters dihydrofolate reductase pre-mRNA splicing as determined by quantitative polymerase chain reaction. *Mol Pharmacol*, 44(1), 22-29.
- Yamane, A., Kohno, T., Ito, K., Sunaga, N., Aoki, K., Yoshimura, K., et al. (2004). Differential ability of polymorphic OGG1 proteins to suppress mutagenesis induced by 8-hydroxyguanine in human cell in vivo. *Carcinogenesis*, 25(9), 1689-1694.
- Yamitch, J., & Sweasy, J. B. (2009). DNA polymerase Family X: Function, structure, and

cellular roles. *Biochim Biophys Acta*.

- Yaneva, M., Kowalewski, T., & Lieber, M. R. (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J*, 16(16), 5098-5112.
- Yang, W. (2005). Portraits of a Y-family DNA polymerase. *FEBS Lett*, 579(4), 868-872.
- Yoshimura, M., Kohzaki, M., Nakamura, J., Asagoshi, K., Sonoda, E., Hou, E., et al. (2006). Vertebrate POLQ and POLbeta cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage. *Mol Cell*, 24(1), 115-125.
- Yu, H., Eritja, R., Bloom, L. B., & Goodman, M. F. (1993). Ionization of bromouracil and fluorouracil stimulates base mispairing frequencies with guanine. *J. Biol. Chem.*, 268(21), 15935-15943.
- Yuan, R., Tsaih, S. W., Petkova, S. B., Marin de Evsikova, C., Xing, S., Marion, M. A., et al. (2009). Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. *Aging Cell*, 8(3), 277-287.
- Zan, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M. F., et al. (2001). The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation. *Immunity*, 14(5), 643-653.
- Zarley, J. H., Britigan, B. E., & Wilson, M. E. (1991). Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani* chagasi promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. *J Clin Invest*, 88(5), 1511-1521.
- Zeng, X., Winter, D. B., Kasmer, C., Kraemer, K. H., Lehmann, A. R., & Gearhart, P. J. (2001). DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol*, 2(6), 537-541.
- Zhang, Y., Wu, X., Yuan, F., Xie, Z., & Wang, Z. (2001). Highly frequent frameshift DNA synthesis by human DNA polymerase mu. *Mol Cell Biol*, 21(23), 7995-8006.
- Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., & Wang, Z. (2000). Preferential incorporation of G opposite template T by the low-fidelity human DNA polymerase iota. *Mol Cell Biol*, 20(19), 7099-7108.