



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Papel de la ADN polimerasa λ humana
en reparación de daño oxidativo y
roturas de doble cadena en el ADN**

TESIS DOCTORAL

Ángel J. Picher Serantes

Madrid, 2007

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.

A mis padres

A Bea

Agradecimientos

Es difícil plasmar en un trozo de papel la gran cantidad de sentimientos de agradecimiento que albergo al escribir la última página de esta Tesis doctoral. Son muchos los años desde que se inició y muchas las personas que han influido en mí durante este tiempo. Sin embargo, intentaré expresar en pocas palabras lo mucho que han significado para mí y su gran influencia sobre la evolución de este trabajo y sobre todo del doctorando que lo defiende.

En primer lugar, quiero mostrar mi más sincero agradecimiento al director de esta Tesis, Luis Blanco, por la oportunidad que me brindó de formar parte de su grupo de investigación, por su excelente y reconocida calidad científica, pero sobre todo por su gran calidad humana, que en conjunto hacen que la investigación científica a su lado se convierta en una aventura inigualable.

En segundo lugar, quiero agradecer especialmente a Miguel que me iniciase en el trabajo experimental cuando yo era un “pobre estudiante” de 4º de Bioquímica. Gracias por tu amistad, por tu disponibilidad a pesar de la distancia y por tu ayuda tanto científica como personal.

No me gustaría olvidar a las personas que me animaron a iniciar el sendero de la investigación. Gracias a mis compañeros y amigos de la Facultad (que lejos y difícil parecía este momento entonces), especialmente a Ruth, Ana e Isma. Gracias a mis profesores del “Paquito” por ser mucho más que eso, en especial a Ana Bonnin y Julián (sin nuestras conversaciones las cosas podrían haber ido por otros derroteros).

También quiero mostrar mi agradecimiento a mis compañeros y amigos del laboratorio, a los que están (Gloria, Arancha, Raquel, Paula, Francisco, María José y Ana) y a los que estuvieron (Miguel, Esther, Charo, Thomas, Jose, Toni, Ana Alonso, Sergio y Sandra). Gracias a todos por enseñarme, aguantarme y sobre todo por ofrecerme vuestra amistad, espero que os haya correspondido como os merecéis.

A Antonio Bernad y su grupo, por su ayuda científica e interesantes estudios con Pol λ y Pol μ .

A José Mari Lázaro, experto purificador, por su inestimable ayuda a la hora de solucionar pequeños/grandes problemas en la cámara fría.

A José Antonio Tercero, compañero incansable de comidas en el CNB, gracias por tus siempre sabios consejos.

Fuera del ámbito científico tengo que agradecer muy especialmente su apoyo a mis amigos “de siempre” (Rafa, Lara, Lourdes y Alberto... el orden de los factores no altera el producto), por estar siempre ahí, por los buenos y malos momentos vividos, pero siempre juntos. Sin vosotros no habría llegado hasta aquí.

A Fátima y Jose, gracias por acogerme en vuestra familia como uno más.

A mi primo Juan, que en el tiempo transcurrido durante el desarrollo de esta Tesis ha conseguido convertirse en veterinario. Muchas gracias, para mí siempre has sido como un hermano.

A mis padres, vuestro ejemplo ha sido siempre el espejo en el que he querido verme reflejado. Gracias por todo.

Por último, a Bea, gracias por compartir tu vida conmigo, por tu apoyo y comprensión, por tu confianza y amistad, por los tiempos vividos y por el futuro... sin ti no sería lo que soy (t.m.c.).

ÍNDICE

Abreviaturas	v
Glosario de términos no castellanos	viii
Summary	ix
1. Introducción	1
1.1. Las ADN polimerasas.....	3
1.1.1. ADN polimerasas replicativas humanas.....	4
1.1.1.1. La Familia B.....	4
1.1.1.2. La Familia A.....	5
1.1.2. ADN polimerasas humanas implicadas en mecanismos de tolerancia al daño.....	5
1.1.2.1. La Familia Y.....	6
1.1.3. ADN polimerasas humanas implicadas en reparación.....	6
1.1.3.1. La Familia X.....	7
1.1.3.1.1. ADN polimerasa β	7
1.1.3.1.1.1. Propiedades bioquímicas.....	7
1.1.3.1.1.2. Organización estructural.....	8
1.1.3.1.1.3. Dominio de 8 kDa.....	9
1.1.3.1.1.4. Mecanismo de reparación por escisión de base (<i>BER</i>).....	10
1.1.3.1.1.5. Otras funciones.....	11
1.1.3.1.2. TdT.....	12
1.1.3.1.3. ADN polimerasa μ	12
1.1.3.1.3.1. Reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (<i>NHEJ</i>).....	13
1.1.3.1.3.2. Generación de variabilidad en el sistema inmune.....	15
1.1.3.1.3.2.1. Recombinación V(D)J.....	15
1.1.3.1.3.2.2. Hipermutación somática.....	17
1.1.3.1.4. ADN polimerasa λ	18
1.1.3.1.4.1. Organización estructural.....	18
1.1.3.1.4.2. Propiedades bioquímicas.....	18
1.1.3.1.4.3. Funciones propuestas al inicio de esta Tesis doctoral.....	20
2. Objetivos	23

3. Materiales y Métodos	27
3.1. Materiales.....	29
3.2. Sobre-expresión y purificación de Pol λ	29
3.3. Preparación de extractos celulares totales a partir de tejidos y células.....	30
3.4. Ensayos de reparación por escisión de base (<i>BER</i>).....	30
3.5. Ensayos de acetilación <i>in vitro</i>	30
3.6. Ensayos de retraso en gel (<i>EMSA</i>). Análisis del efecto de la acetilación en la capacidad de unión estable de Pol λ a un ADN tipo <i>gap</i>	30
3.7. Ensayos de actividad dRP-liasa. Análisis del efecto de la acetilación en la actividad dRP-liasa de Pol λ y Pol β	31
3.8. Ensayos de actividad ADN polimerasa en ADN activado. Análisis del efecto de la acetilación en la actividad ADN polimerasa de Pol λ y Pol β	31
3.9. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto y <i>gap</i> de un nucleótido. Análisis del efecto de la acetilación en la actividad ADN polimerasa de Pol λ y Pol β	31
3.10. Espectroscopía de masas: Identificación de las dianas del proceso de acetilación de Pol λ y Pol β	32
3.11. Ensayos de retraso en gel (<i>EMSA</i>). Caracterización de las propiedades de unión a ADN de Pol λ	32
3.12. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo <i>gap</i> de uno y dos nucleótidos. Implicaciones en la ruta de <i>NHEJ</i>	33
3.13. Ensayos de reparación por <i>NHEJ</i> con extractos celulares totales.....	33
3.14. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto. Estudio de la capacidad de extensión de desapareamientos de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas.....	34
3.15. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto y <i>gap</i> de un nucleótido con grupo fosfato en 5'. Estudio de la capacidad de extensión de desapareamientos de Pol λ en condiciones de estado estacionario.....	34
3.16. Cristalización de Pol λ . Recolección de datos, procesamiento de los mismos y refinamiento de la estructura.....	35
3.17. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto. Estudio de la capacidad de inserción frente a bases modificadas (8oxoG y 6mG) y extensión desde pares cuya base molde está modificada.....	36

3.18. Ensayos de retraso en gel (<i>EMSA</i>). Análisis del efecto de la presencia de bases modificadas en la capacidad de unión estable de Pol λ a un ADN tipo molde/cebador abierto.....	37
3.19. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto. Estudio de la capacidad de inserción frente a una base modificada (8oxoG o 6mG) y extensión desde pares cuya base molde esté modificada por Pol λ en condiciones de estado estacionario.....	37
RESULTADOS	39
4. Reparación por escisión de base	41
4.1. La sobre-expresión de Pol λ en la línea celular NIH3T3 provoca un aumento en los niveles de reparación por <i>BER</i>	44
4.2. Estudio del efecto de la depleción de Pol λ en extractos derivados de la línea celular NIH3T3.....	47
4.3. Reparación con extractos derivados de los tejidos obtenidos del modelo murino deficiente (<i>KO</i>) en Pol λ	49
4.4. Evaluación de la capacidad de Pol λ de participar en la ruta <i>BER</i> de trecho largo.....	52
5. Acetilación de Pol λ y Pol β	55
5.1. Pol λ es acetilable <i>in vitro</i>	57
5.2. Pol λ conserva intacta su actividad dRP-liasa a pesar del proceso de acetilación.....	60
5.3. Efecto de la acetilación sobre la actividad ADN polimerasa de Pol λ y Pol β	61
5.4. Identificación de los residuos de Pol λ y Pol β implicados en el proceso de acetilación.....	66
6. Propiedades de unión a ADN	71
6.1. Afinidad de Pol λ por diferentes sustratos de ADN.....	73
6.2. Capacidad de unión de Pol λ a moléculas semejantes a intermedios de procesos replicativos.....	75
6.3. Capacidad de unión de Pol λ a moléculas análogas a las generadas durante diferentes procesos de reparación del ADN.....	79
6.4. Capacidad de unión en ausencia de cebador y su implicación en la ruta de reparación <i>NHEJ</i>	83
7. Pol λ y <i>NHEJ</i>	87
7.1. Influencia de la presencia de grupos fosfato en 5' de un <i>gap</i> sobre la	

actividad ADN polimerasa de Pol λ	89
7.2. Patrón de síntesis de Pol λ y Pol μ en un <i>gap</i> de dos nucleótidos, y su implicación en la ruta de reparación <i>NHEJ</i>	93
7.3. Reparación por <i>NHEJ</i> con extractos derivados de los tejidos obtenidos del modelo murino deficiente (<i>KO</i>) en Pol λ	97
8. Extensión de desapareamientos	101
8.1. Diversidad funcional de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas.....	103
8.2. Análisis en condiciones de estado estacionario de la capacidad de Pol λ para extender extremos desapareados.....	105
8.3. La presencia de un oligonucleótido <i>downstream</i> con un grupo fosfato en 5' permite a Pol λ llevar a cabo la extensión de los 12 desapareamientos posibles de manera eficiente.....	107
8.4. Mecanismos de Pol λ , alternativos a la extensión directa, para polimerizar desde extremos desapareados.....	108
8.5. Análisis estructural de la capacidad de extensión de desapareamientos de Pol λ	112
8.6. Pol λ extiende preferentemente desapareamientos tipo ADN/ARN.....	115
9. Síntesis a través de lesiones	121
9.1. Diversidad funcional de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas en el paso de inserción frente a una base nitrogenada modificada.....	125
9.2. Mecanismos alternativos a la síntesis frente a una base nitrogenada dañada..	128
9.3. Caracterización cinética en condiciones de estado estacionario de la capacidad de inserción frente a 8oxoG de Pol λ	130
9.4. Diversidad funcional de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas en el paso de extensión desde pares cuya base molde está modificada.....	133
9.5. Caracterización cinética en condiciones de estado estacionario de la capacidad de extensión de pares cuya base molde es 8oxoG o 6mG por Pol λ	135
10. Discusión	141
10.1 Pol λ y la reparación del daño oxidativo en el ADN.....	143
10.2 Reparación por <i>NHEJ</i> y los miembros de la Familia X.....	148
10.3 <i>NHEJ versus</i> recombinación V(D)J.....	152
10.4 Evolución de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas.....	153
11. Conclusiones	157
12. Bibliografía	161

ABREVIATURAS

6mG: O⁶-metilguanina
8oxoG: 7,8-dihidro-8-oxoguanina
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADN-PK: quinasa dependiente de ADN
AID: desoxicitidín desaminasa
AP:apurínico/apirimidínico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ARNt: ácido ribonucleico de transferencia
BER: reparación por escisión de base
BRCT: dominio BRCA1 C-terminal
Bs: Bacillus subtilis
BSA: albúmina de suero bovino
CBP: proteína de unión a Creb
cdADN: ADN de cadena doble
CG: centro germinal
cpm: cuentas por minuto
csADN: ADN de cadena sencilla
CSR: recombinación de cambio de isotipo
C-terminal: carboxilo terminal
ATP: adenosina 5' trifosfato
dATP: 2' desoxiadenosina 5' trifosfato
ddATP: 2'-3' didesoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP: 2' desoxicitidina 5' trifosfato
dGTP: 2' desoxiguanosina 5' trifosfato
dNTP: desoxinucleótido
dRP: desoxirribosa-fosfato
DTT: ditioneitol
dTTP: 2' desoxitimidina 5' trifosfato
EDTA: ácido etilen-diamino-tetra acético
EMSA: ensayo de retraso en gel
FEN1: *flap*-endonucleasa
GC: conversión génica
GST: glutatión S transferasa
HAT: histona acetil transferasa

HhH: motivo hélice-horquilla-hélice
HMG: grupo de proteínas de alta movilidad
HR: recombinación homóloga
Ig: inmunoglobulina
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido
kDa: kilodalton
KO: *knock out*
LB: Luria Bertani
Li: Leishmania infantum
M/C: ADN tipo molde / cebador abierto
MEF: fibroblasto embrionario de ratón
min: minuto
MMR: reparación de desapareamientos
MMS: metil-metano sulfonato
MPD: 2-metil-2,4-pentanodiol
Mt: Methanobacterium thermoautotrophicum
MSEV: Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus
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
P: grupo fosfato
PA: poliacrilamida
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
pb: par de bases
PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PEI: polietilenimina
PHP: dominio fosfodiesterasa
pn: post-natal
PNK: polinucleótido quinasa
Pol: polimerasa
PRMT: arginina metil transferasa
RFC: factor de replicación C
rNTP: ribonucleótido

RSS: señal de reconocimiento de recombinación

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

Sp: *Schizosaccharomyces pombe*

SDS: dodecil sulfato sódico

SHM: hipermutación somática

TAE: tris-acético-etanol

TCR: receptor de células T

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal

UDG: uracil ADN glicosilasa

V: voltio

VPPA: virus de la peste porcina africana.

WT: *wild type*

GLOSARIO DE TÉRMINOS NO CASTELLANOS

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.

Antisense: fragmento de ácido ribonucleico de longitud variable, cuya secuencia es complementaria a la de un determinado ARNm.

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

Flap: extremo de cadena sencilla de ADN 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 ADN, que supone una región de cadena sencilla embebida en un ADN de doble cadena.

Knock-out: animal al que se le han inactivado las dos copias de un determinado gen.

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

Nick: rotura de un enlace fosfodiéster de una de las cadenas de la doble hélice de ADN.

Pellet: material insoluble precipitado tras una centrifugación.

Sense: fragmento de ácido ribonucleico de longitud variable, cuya secuencia es idéntica a la de un determinado ARNm.

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

Wild-type: silvestre.

SUMMARY

Pol λ , a recently described Family X DNA polymerase, is studied in this work. This enzyme shares 32% amino acid identity with Pol β , an enzyme involved in nuclear DNA repair in eukaryotic cells. Early studies revealed that Pol λ possesses both DNA polymerase and dRP lyase activities, consistent with a possible role in the base excision repair (BER) pathway. Unlike Pol β , Pol λ contains a BRCT domain and a Serine/Proline rich domain in its N-terminal region. Pol λ is a distributive and template dependent DNA polymerase, which lacks proofreading activity and shows high affinity for dNTPs.

In this work we performed studies that suggest a role of Pol λ in base excision repair *in vivo*. Evaluation of the base excision repair activity in extracts derived from a variety of tissues and mouse embryonic fibroblasts representing wild-type and null genotypes for Pol λ , and also from a cell line overproducing Pol λ , supported a role of Pol λ in testis BER during post-natal development and in brain from adult animals. Moreover, over-production of Pol λ produces an increase in overall BER levels in NIH-3T3 cells.

The post-translational regulation of the dRP lyase activity of Pol β has been previously demonstrated. Pol β is acetylated by p300 and this process provokes the specific inhibition of Pol β dRP lyase activity. In order to explore the regulation of Pol β and Pol λ during BER, we examined and demonstrated the acetylation of Pol λ by p300. However, unlike Pol β , the acetylation of Pol λ does not inactivate its dRP lyase activity, suggesting that acetylation acts as a regulatory mechanism affecting the activity balance of both DNA polymerases during BER.

To further study the implication of Pol λ in various DNA repair mechanisms, we evaluated the affinity of Pol λ for different DNA substrates mimicking intermediates of various DNA synthesis events. Pol λ was able to stably bind “open” template/primer molecules, suggesting a role in processes related to DNA replication. In the same manner, Pol λ bound gapped molecules with high affinity, consistent with its role in BER, being critical the presence of a phosphate group at the 5′ end of the gap. Finally, Pol λ was able to bind template/downstream molecules with a 5′ phosphate group, a substrate related to the non-homologous end joining (NHEJ) repair pathway.

We have studied the effect on Pol λ polymerase activity of the presence of a phosphate group at the 5′ end of a gap. Pol λ increased its activity in presence of a phosphate group. Site directed mutagenesis allowed us to identify important residues for recognition of the phosphate group located at the 5′ end of a gap.

The observation that Pol λ has an extraordinary ability to generate frameshift errors suggested an ability to use DNA intermediates generated during NHEJ repair pathway. Moreover, gap-filling synthesis during NHEJ may require extending misaligned substrates that could include mismatched primer-termini. Here, we demonstrated that Pol λ efficiently extends DNA/DNA and DNA/RNA mismatches, either on “open” template/primer substrates, or on its preferred substrate, a 1-nucleotide gapped-DNA molecule having a 5′ phosphate. A crystal structure of Pol λ in complex with a single-nucleotide gap containing a dG·dGMP mismatch at the primer terminus suggested that, at least for certain mispairs, Pol λ is unable to differentiate between matched and mismatched termini during the DNA binding step. This property of Pol λ

suggested a potential role as a “mismatch extender” during NHEJ and possibly during translesion DNA synthesis (TLS).

Finally, the reported interaction between Pol λ and PCNA, together with the mismatch extension ability of Pol λ , suggests a possible role of Pol λ in TLS. Here, we demonstrated that Pol λ is able to replicate efficiently through 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8oxoG), inserting dC and dA with similar frequency and extending proficiently from the error-free pair 8oxoG-dCMP, showing the highest efficiency and fidelity of DNA polymerases studied to date. Moreover, Pol λ also extends more efficiently the error-free pair formed by the lesion O⁶-methylguanine (6mG) and dC. These results suggest a possible role of Pol λ in error-free TLS, as well as in NHEJ repair reactions that involve modified bases.

1

Introducción

La información genética de cualquier organismo vivo se encuentra almacenada en forma de ácido desoxirribonucleico (ADN). La transmisión de dicha información genética requiere la duplicación del ADN durante el proceso denominado replicación, así como el mantenimiento de la integridad del mismo mediante múltiples mecanismos de reparación. De esta forma se asegura la transmisión de la información genética a las células hijas de manera estable y sin sufrir modificaciones. En ambos procesos, replicación y reparación, tienen un papel especialmente relevante las ADN polimerasas.

1.1. Las ADN polimerasas

Las ADN polimerasas poseen un papel crucial durante los procesos de replicación y reparación del ADN. El descubrimiento durante los últimos años de gran cantidad de ADN polimerasas no ha hecho sino aumentar la noción sobre la complejidad de los mecanismos implicados en la replicación y reparación del ADN.

Las ADN 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 cebador y que puede ser ADN, ARN o incluso un aminoácido como serina o treonina (Salas, 1991). La reacción de polimerización implica la participación de 2 o 3 residuos carboxílicos, que gracias a la presencia de dos iones metálicos divalentes, estabilizan y posicionan de manera adecuada para la catálisis al residuo OH del extremo 3' del cebador y los tres grupos fosfato del nucleótido entrante, 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⁻ que lleva a cabo el ataque nucleofílico sobre el fosfato α del nucleótido entrante. Una vez realizada la catálisis se libera el pirofosfato y el enzima puede disociarse del ADN, caso de las ADN polimerasas distributivas, o realizar un nuevo evento de polimerización, si se trata de un enzima procesivo. Este mecanismo se encuentra conservado en todas las polimerasas estudiadas hasta el momento (revisado por Steitz, 1999).

Diversos estudios cristalográficos han revelado que las ADN polimerasas poseen una organización estructural común (revisado por Beard y Wilson, 2003). Todas se pliegan en forma de mano y poseen tres subdominios denominados “dedos”, “palma” y “pulgar”, con la única excepción conocida de la polimerasa X del virus de la peste porcina africana que carece del subdominio “dedos” (Maciejewski y cols., 2001; Showalter y cols., 2001). El subdominio “palma”, formado principalmente por láminas β , constituye la base de contacto con el ADN y posee los aminoácidos catalíticos. Los subdominios “dedos” y “pulgar” regulan la interacción con el ADN y el nucleótido entrante.

Sin embargo, la diversidad funcional que existe entre todas las ADN polimerasas es reflejo de múltiples, y a veces sutiles diferencias a nivel bioquímico y estructural. A nivel estructural, las ADN polimerasas se diferencian en los diversos dominios accesorios presentes, pudiendo estos conferir nuevas actividades enzimáticas a la proteína, o teniendo funciones no catalíticas, como por ejemplo, de interacción con otros factores. A nivel bioquímico, las ADN polimerasas se diferencian en el número de nucleótidos que añaden a un extremo 3'OH sin disociarse del ADN (distributivas: pocos nucleótidos; procesivas: de cientos a miles de nucleótidos), en la eficiencia con la que realizan la reacción de polimerización, en la preferencia

ADN polimerasa lambda

por un tipo de sustrato (ADN con amplias regiones de cadena sencilla como molde, ADN con pequeños huecos o *gaps*, ADN con lesiones o modificaciones, etc.).

Por último, una de las diferencias fundamentales es la fidelidad de síntesis de cada ADN polimerasa (revisado por Kunkel, 2004). La propensión a cometer errores durante la polimerización difiere mucho de unas polimerasas a otras, así como el tipo de error cometido en cada caso. Las polimerasas replicativas poseen una gran fidelidad de síntesis, que acompañada de una actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores, les permite mantener la información genética inalterada de generación en generación, evitando así la aparición de mutaciones que pudieran promover o desembocar en enfermedades neurodegenerativas y/o cáncer. Por el contrario, otras polimerasas poseen una gran propensión a cometer errores debido a que su función en la célula así lo requiere. Éste es el caso de las polimerasas implicadas en los fenómenos de generación de variabilidad, fundamentales para el desarrollo del sistema inmunológico.

Hasta la fecha se conocen 15 ADN polimerasas en humanos (revisado por Bebenek y Kunkel, 2004; Tabla 1.I), que se clasifican en 4 grandes familias (A, B, X, e Y) en base a la identidad de la secuencia aminoacídica de sus subunidades catalíticas (Burgers y cols., 2001).

Denominación griega	Denominación HUGO	Familia	Función propuesta
Pol γ (gamma)	POLG	A	Replicación/Reparación ADN mitocondrial
Pol θ (theta)	POLQ	A	Síntesis a través de lesiones; <i>SHM</i>
Pol ν (nu)	POLN	A	Síntesis a través de lesiones
Pol α (alpha)	POLA	B	Replicación nuclear; <i>HR</i>
Pol δ (delta)	POLD1	B	Replicación nuclear; <i>NER</i> ; <i>MMR</i> ; <i>HR</i>
Pol ε (epsilon)	POLE	B	Replicación nuclear, <i>NER</i> ; <i>BER</i> ; <i>MMR</i> ; <i>HR</i>
Pol ζ (zeta)	POLZ	B	Síntesis a través de lesiones; <i>HR</i>
Pol η (eta)	POLH	Y	Síntesis a través de lesiones
Pol ι (iota)	POLI	Y	Síntesis a través de lesiones
Pol κ (kappa)	POLK	Y	Síntesis a través de lesiones
	REV1	Y	Síntesis a través de lesiones
Pol β (beta)	POLB	X	<i>BER</i>
Pol λ (lambda)	POLL	X	Meiosis; <i>BER</i> ; <i>NHEJ</i> ; V(D)J
Pol μ (mu)	POLM	X	<i>SHM</i> ; <i>NHEJ</i> ; V(D)J
	TDT	X	V(D)J

Tabla 1.I: ADN polimerasas humanas. *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.

1.1.1. ADN polimerasas replicativas humanas

1.1.1.1. La Familia B

Los miembros de la Familia B son los encargados de llevar a cabo el proceso de replicación del ADN nuclear (revisado por Garg y Burgers, 2005), a excepción de Pol ζ que está

implicada en procesos de síntesis a través de lesiones en el ADN (Nelson y cols., 1996a; revisado por Lawrence, 2004). Pol α posee una actividad primasa que le permite sintetizar pequeños cebadores de ARN (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 ADN polimerasa le permite extender estos cebadores de ARN para dar lugar a pequeños fragmentos de ADN (20-30 nucleótidos) que servirán de iniciadores para las otras dos polimerasas implicadas en el proceso de replicación, Pol δ y Pol ϵ . Ambas polimerasas interactúan con el antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA), mejorando así su unión al ADN, y sintetizan ADN de manera procesiva (revisado por Kelman, 1997). Asimismo, Pol δ y Pol ϵ 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 ADN nuclear eficientemente y libre de errores.

Por otro lado, las ADN polimerasas de esta familia también han sido implicadas en diferentes mecanismos de reparación que llevan asociados pasos de síntesis de ADN (revisado por Hubscher y cols., 2004). 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*).

1.1.1.2. La Familia A

El miembro mejor conocido de esta familia es Pol γ , 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 ADN, estimula su actividad exonucleasa y aumenta su procesividad de síntesis (Carrodegua y cols., 2001; Lim y cols., 1999). Pol γ 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 ADN 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 θ (Sharief y cols., 1999; Seki y cols., 2003) y Pol ν (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 θ también parece tener un papel en procesos de hipermutación somática (Masuda y cols., 2005; Masuda y cols., 2006), así como de reparación de ADN (Yoshimura y cols., 2006).

1.1.2. ADN polimerasas humanas implicadas en mecanismos de tolerancia al daño

Los sistemas de reparación no son infalibles. Este hecho sumado a la posibilidad de que se produzcan diferentes lesiones en el ADN durante la fase S del ciclo celular que no puedan ser reparadas antes de que se encuentren con la maquinaria de replicación, hace necesaria la existencia de mecanismos que permitan solventar el eventual bloqueo de la horquilla de replicación producido por lesiones no reparadas que modifican la geometría normal de la doble cadena (sitios sin base nitrogenada o abásicos, enlaces covalentes entre bases contiguas, etc.). Estas alteraciones provocan la parada inexorable de las ADN polimerasas replicativas, Pol δ y Pol ϵ , debido al requerimiento estricto por parte de estas enzimas de una geometría correcta en

ADN polimerasa lambda

el apareamiento de las bases para ejercer su acción de forma eficiente y fiel. Para superar la barrera que supondrían este tipo de lesiones, la célula posee una serie de ADN polimerasas que son capaces de sintetizar ADN teniendo como molde diferentes tipos de lesiones, evitando así el bloqueo de la replicación, pero necesitando a su vez de posteriores fenómenos de reparación para solventar dichas lesiones. 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 ADN, 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 ζ que pertenece a la Familia B y que participa también en estos procesos.

1.1.2.1. 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 ADN 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 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 ADN dañado y no dañado (revisado por Yang, 2005).

Los miembros de la Familia Y son: Pol η, Pol ι, Pol κ y REV1 (revisado por Prakash y cols., 2005). Algunas lesiones en el ADN 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).

1.1.3. ADN polimerasas humanas implicadas en reparación

El metabolismo celular y la exposición a agentes genotóxicos externos produce diferentes tipos de modificaciones químicas en el ADN, así como pérdida de las bases nitrogenadas, y roturas de cadena sencilla y doble. En las células existen múltiples rutas de reparación que dan solución específica a cada tipo de daño producido. La mayoría de estos procesos requieren pasos de síntesis de ADN que serán llevados por ADN polimerasas específicas según el mecanismo de reparación llevado a cabo.

1.1.3.1. La Familia X

Esta familia posee 4 miembros (Pol β , Pol λ , Pol μ y TdT) implicados en diferentes procesos de reparación no asociados a replicación. Se trata de enzimas monoméricas, de relativo

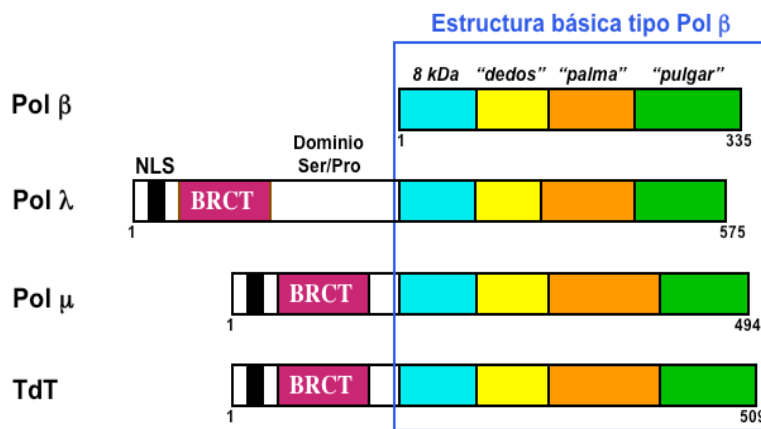


Figura 1.1: Organización estructural de los miembros humanos de la Familia X de ADN polimerasas. Sobre la estructura básica común de Pol β (dominio de 8 kDa y dominio de polimerización de 31 kDa formado por los subdominios “dedos”, “palma” y “pulgar”) se muestran los elementos estructurales adicionales presentes en cada caso (dominio rico en aminoácidos serina y prolina, secuencia de localización nuclear “NLS”, dominio de interacción proteína-proteína y proteína-ADN “BRCT”). Asimismo, se muestra la longitud total de la secuencia aminoacídica de cada ADN polimerasa.

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 ADN.

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-ADN (Figura 1.1).

1.1.3.1.1. ADN polimerasa β

Pol β 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 una gran cantidad de procesos (revisado por Beard y Wilson, 2000; revisado por Idriss y cols., 2002).

1.1.3.1.1.1. Propiedades bioquímicas

Pol β basa su actividad nucleotidil transferasa dependiente de molde en un mecanismo basado en la participación de dos iones metálicos, que se encuentra conservado en todas las ADN polimerasas (revisado por Steitz, 1999).

Pol β posee un modo de síntesis distributivo en moléculas tipo molde/cebador abierto (Abbotts y cols., 1988; Werneburg y cols., 1996). Sin embargo, la síntesis pasa a ser 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).

Pol β 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., 1999). Por otro lado, su modo de acción distributiva favorece la propensión a cometer errores de delección mediados por deslizamiento (Kunkel, 1985; Werneburg y cols., 1996; Osheroff y cols., 1999), 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 Pol β alcanza su nivel óptimo (Chagovetz y cols., 1997; Osheroff y cols., 1999). Asimismo, la fidelidad de Pol β *in vivo* podría aumentar gracias a proteínas accesorias con actividad 3'→5' exonucleasa que corrigiesen los eventuales errores cometidos por Pol β (Shevelev y Hubscher, 2002).

1.1.3.1.1.2. Organización estructural

Pol β está compuesta por dos dominios diferentes. En su extremo C-terminal se encuentra el dominio de polimerización (31 kDa), 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 β como apoenzima (Sawaya y cols., 1994; Davies y cols., 1994) y formando un complejo con diferentes sustratos de ADN 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 β .

En ausencia de ADN o en presencia de un ADN tipo molde/cebador, Pol β 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 ADN (Figura 1.2, parte A; Sawaya y cols., 1994; Pelletier y cols., 1994). En presencia de un ADN tipo *gap* de un nucleótido, el dominio de 8kDa se pliega uniendo la zona final del *gap*, concretamente el grupo fosfato en posición 5' del *gap* (Figura 1.2, parte B; 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 ADN.

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” (Figura 1.2, parte C; 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 cebador contribuyendo al cierre del sitio de unión del nucleótido (Figura 1.2, parte C).

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 ADN según el caso.

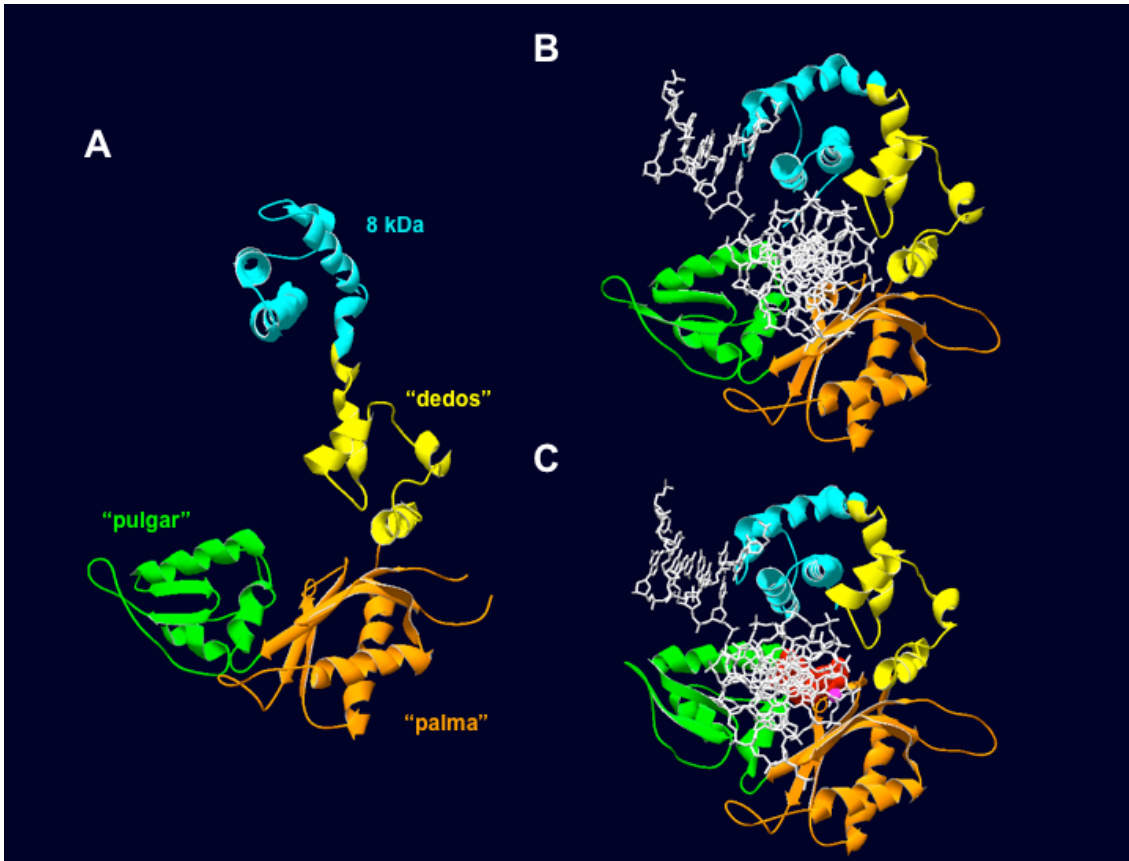


Figura 1.2: Estructura tridimensional de Pol β . La disponibilidad de diferentes cristales de Pol β ha permitido comprender la dinámica de la reacción de polimerización. **A.** Apoenzima. En ausencia de ADN el dominio de 8 kDa (azul) se dispone alejado del dominio de polimerización, formado por los subdominios “dedos” (amarillo), “palma” (naranja) y “pulgar” (verde). **B.** Complejo binario. La unión de un ADN 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>).

1.1.3.1.1.3. Dominio 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 β -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 ADN 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).

Por otro lado, el dominio de 8 kDa también posee una función de unión a ADN. Posee una superficie de unión a ADN de cadena sencilla (Kumar y cols., 1990) a través de un motivo

ADN polimerasa lambda

“hélice-horquilla-hélice” (HhH, Doherty y cols., 1996) y un sitio de unión para grupos fosfato situados en posición 5' de un *gap* de ADN (Prasad y cols., 1994). Ambas propiedades son cruciales para que Pol β 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 Pol β 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).

1.1.3.1.1.4. Mecanismo de reparación por escisión de base (BER)

Este mecanismo es el encargado de reparar la pérdida de bases en el ADN, 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).

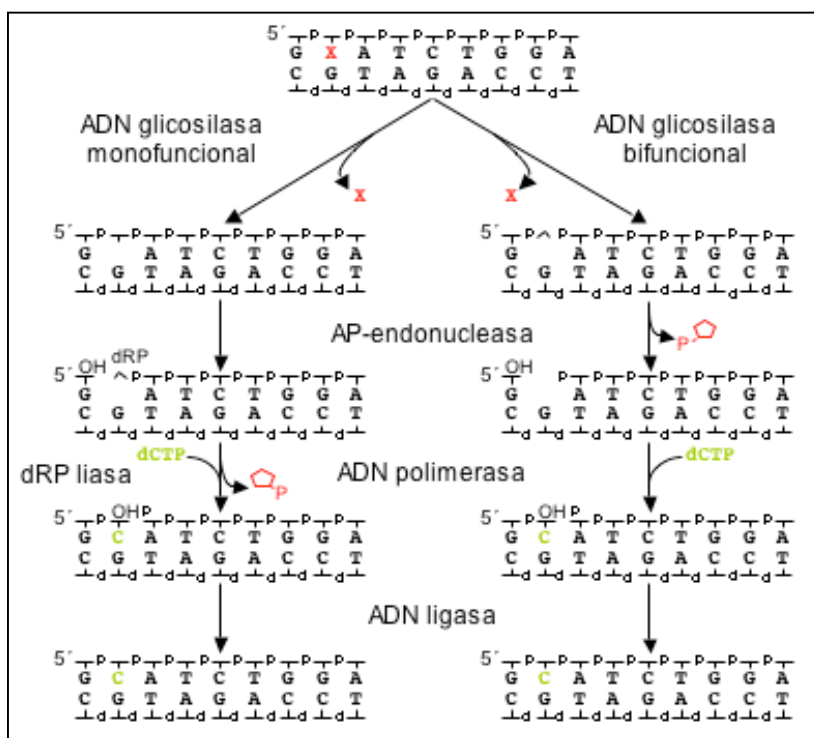


Figura 1.3: Mecanismo de reparación por escisión de base (I). Variante de trecho corto de la ruta de reparación BER iniciada por una ADN glicosilasa monofuncional o bifuncional. En verde se señala el ADN de nueva síntesis. Figura adaptada de Fortini y cols., 2003.

de 1 nucleótido que será relleno por la propia polimerasa (Figura 1.3, parte izquierda). 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'ADN quinasa y 3'ADN fosfatasa, repondría el grupo OH en posición 3' y el fosfato en 5' si fuera necesario, siendo posteriormente relleno el *gap* por la polimerasa (Figura 1.3, parte derecha). Por último, en ambos casos se necesita la acción de una ADN ligasa para sellar la unión (ADN ligasa I o el complejo formado por XRCC1/ADN Ligasa III), completándose de

La ruta comienza con una ADN 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 de 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 Pol β , generándose un *gap*

esta forma la reparación por escisión de base de trecho corto (Figura 1.3). 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 ADN de cadena sencilla de longitud equivalente que será cortado por la endonucleasa FEN1, generando un sustrato para la ADN ligasa. De esta forma se completaría la reparación por escisión de base de trecho largo (Figura 1.4).

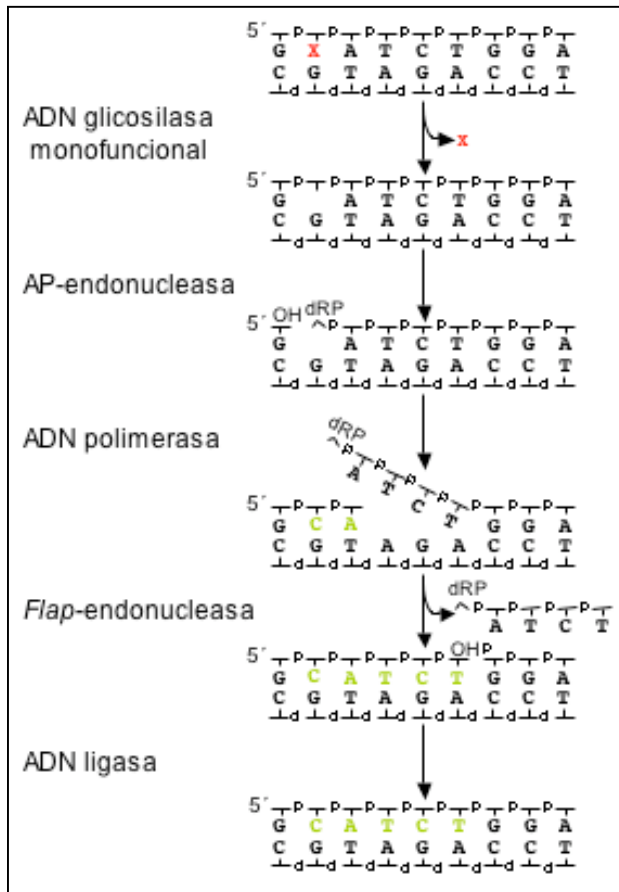


Figura 1.4: Mecanismo de reparación por escisión de base (II). Variante de trecho largo de la ruta de reparación. En verde se señala el ADN de nueva síntesis. Figura adaptada de Fortini y cols., 2003.

está encargada de iniciar la síntesis de ADN y el desplazamiento de banda, como paso previo al acceso de las ADN polimerasas replicativas Pol δ y Pol ϵ que continuarían con 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 Pol β , 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).

1.1.3.1.1.5. Otras funciones

Aparte de su papel principal en el mecanismo de reparación por escisión de base, Pol β 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 reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (Wilson y Lieber, 1999); en

La implicación de Pol β en el mecanismo de reparación por escisión de base 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 Pol β con las proteínas implicadas en esta ruta de reparación, como la AP-endonucleasa (Bennet y cols., 1997), la ADN 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, Pol β 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

ADN polimerasa lambda

replicación (Jenkins y cols, 1992; Sweasy y Loeb, 1992, Sweasy y cols., 1995); en recombinación (Nowak y cols., 1990), y en meiosis (Plug y cols., 1997); así como en fenómenos de neurogénesis, ya que los ratones carentes de Pol β 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).

1.1.3.1.2. TdT

La “desoxinucleotidil Transferasa Terminal” o TdT 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 ADN de cadena sencilla en ausencia de hebra molde que dirija la síntesis (Bollum y cols., 1960; Kato y cols., 1967).

TdT posee un 22% de identidad de secuencia aminoacídica con Pol β . Aparte del núcleo catalítico tipo Pol β , TdT posee en su parte N-terminal un dominio BRCT de interacción y una secuencia de localización nuclear (Figura 1.1).

En su modo de síntesis independiente de molde, cabe destacar 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 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.

1.1.3.1.3. ADN polimerasa μ

Pol μ es un miembro de la Familia X recientemente identificado (Domínguez y cols., 2000), que muestra un gran parecido con TdT tanto a nivel de secuencia (42% de identidad) como estructuralmente, ya que ambas poseen un dominio BRCT y una secuencia de localización nuclear en su extremo N-terminal, además del núcleo tipo Pol β característico de todos los miembros de la Familia X (Figura 1.1).

Pol μ es una ADN polimerasa ADN dependiente, aunque también posee actividad transferasa terminal (Domínguez y cols, 2000; Ruiz y cols., 2001). Pol μ posee una fidelidad de síntesis muy baja, cometiendo errores de manera muy frecuente gracias a un mecanismo de dislocación de la cadena molde que permite que la entrada de nucleótido venga dirigida por posiciones adyacentes alejadas del extremo del cebador (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004). Asimismo, Pol μ posee una baja discriminación a nivel del azúcar, insertando en el ADN 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 cols., 1980; McCormick y cols., 1983; Traut, 1994).

La expresión de Pol μ es ubicua, aunque sus niveles son mayores en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios (Domínguez y cols, 2000), lo que hizo proponer un papel de esta polimerasa en la diversificación del sistema inmune (Ruiz y cols., 2001). Recientemente, se ha demostrado la participación de Pol μ en la recombinación de los genes V y J de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas durante el proceso de maduración de las células B en la médula ósea (Bertocci y cols., 2003). Este estudio, realizado en ratones deficientes en Pol μ , muestra la existencia de deleciones en las zonas de unión de estos genes.

De igual modo, el patrón de expresión asociado a los centros germinales y el fenotipo fuertemente mutador de Pol μ , hizo pensar en un papel de esta ADN polimerasa en el proceso de hipermutación somática (Domínguez y cols, 2000; Ruiz y cols., 2001), mediante el que se introducen mutaciones en los genes V de las inmunoglobulinas para mejorar el nivel de afinidad por el antígeno. Estudios de sobre-expresión de Pol μ 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 μ revelaron que la hipermutación somática se seguía produciendo, por lo que Pol μ no es imprescindible para este proceso (Bertocci y cols., 2002). Estos resultados parecen apoyar la hipótesis de que en este proceso intervienen varias ADN 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 Pol ι (Faili y cols, 2002), Pol η (Rogozin y cols, 2001; Zeng y cols., 2001) y Pol ζ (Zan y cols, 2001; Díaz y cols., 2001).

Por otra parte, la ubicuidad de Pol μ 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. La similitud existente entre Pol μ y TdT, que es reclutado 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 Pol μ en *NHEJ* en tejidos no linfoides (Ruiz y cols., 2001). Esta hipótesis se apoya también en propiedades de Pol μ , como la capacidad de relleno de pequeños *gaps* y la capacidad de dislocación de la hebra molde, que serían muy útiles a la hora de reparar este tipo de roturas.

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

Las roturas de ADN de doble cadena representan un tipo de daño muy peligroso para la célula. Estas roturas pueden ser causadas por agentes químicos exógenos o por la exposición a radiación ionizante (Morgan y cols., 1996; Ward, 2000), así como ser consecuencia de los productos del metabolismo oxidativo de la célula (Karanjawala y cols., 2002). Asimismo, se pueden producir durante procesos como la replicación del ADN o la meiosis (Michel y cols., 1997; Shinohara y Ogawa, 1995). Si estas roturas no son reparadas de manera rápida y eficiente

ADN polimerasa lambda

pueden dar lugar a la pérdida de información genética y muerte celular, o a reordenamientos genómicos que pudieran desembocar en tumorigénesis (revisado por Mills y cols., 2003).

Existen dos mecanismos para reparar 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 ADN, lo que permite restaurar la integridad del ADN dañado de manera fiel (revisado por West, 2003). Sin embargo, debido a la organización cromosómica y a la composición genómica, con gran cantidad de ADN repetido ($\approx 40\%$), la búsqueda de complementariedad para reparar una rotura producida en una zona de ADN repetido sería un proceso lento y peligroso para la célula, ya que podría encontrarse complementariedad de secuencia en regiones de ADN 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).

Estas peculiaridades hacen necesario otro mecanismo capaz de lidiar con este tipo de roturas para mantener la viabilidad a lo largo de todo el ciclo celular. El mecanismo de reparación por reunión de extremos no homólogos (*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 ADN con escasas modificaciones a nivel de secuencia. Esas modificaciones son producto del procesamiento necesario de los extremos por parte de la maquinaria de *NHEJ* para poder reunir y sellar los extremos (revisado por Lieber y cols., 2003; revisado por Hefferin y Tomkinson, 2005; revisado por Ma y cols., 2005).

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 duplex de ADN en su interior, previniendo la posible degradación nucleolítica (Walker y Corpina, 2001). A continuación, la quinasa ADN-PK es reclutada (Dvir y cols., 1992; Gottlieb y Jackson, 1993), desplazando ligeramente al heterodímero Ku (Dyran 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 ADN-PK formado recluta a su vez a las proteínas necesarias para un posible procesamiento y la posterior ligación de los extremos. Artemis, una exonucleasa 3'→5' de cadena sencilla, es activada mediante fosforilación por ADN-PK mostrando también actividad endonucleasa en extremos tanto 3' como 5' protuberantes (Ma y cols., 2002). La polinucleótido quinasa PNK, que posee actividad 5'ADN quinasa y 3'ADN 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 ADN, es factible la aparición de *gaps* de pocos nucleótidos que habrán de ser rellenados como paso ineludible previo a la ligación. Pol μ ha sido implicada en este proceso (Mahajan y cols., 2002; Ma y cols., 2004). Asimismo, Pol μ 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/ADN ligasa IV sella la

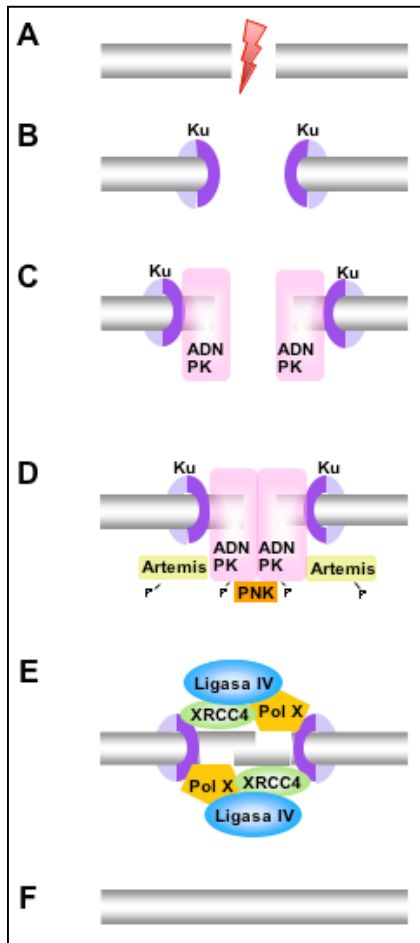


Figura 1.5: Mecanismo de reparación por reunión de extremos no homólogos (NHEJ). Este sistema de reparación se encarga de reparar roturas de doble cadena que se generan en el ADN como consecuencia de un daño (A). El heterodímero Ku70/Ku86 reconoce y se une a los extremos de la rotura (B). A continuación se une la quinasa dependiente de ADN ADN-PK (C) que recluta y activa por fosforilación a la nucleasa Artemis y a PNK (D), que procesan los extremos. Posteriormente se alinean los extremos, se rellenan los *gaps* generados (E) y se sella la rotura (F), proceso en el que intervienen ADN polimerasas de la Familia X, XRCC4 y ADN ligasa IV.

unión entre los extremos de la rotura (Grawunder y cols., 1997; Chen y cols., 2000) (Figura 1.5).

1.1.3.1.3.2. Generación de variabilidad en el sistema inmune

La generación de variabilidad en el sistema inmune es un proceso fundamental para que su función protectora se realice de manera eficiente y efectiva. El reconocimiento de los posibles antígenos por parte de las células B y T se produce a través del dominio variable de los receptores antígenicos (inmunoglobulinas en células B y TCR en células T). La variabilidad de dichas regiones será la que determine el abanico de posibles antígenos que

podrá llegar a reconocer el sistema inmunológico de un determinado individuo.

El sistema inmune ha desarrollado diferentes mecanismos y estrategias para potenciar la variabilidad de sus receptores.

1.1.3.1.3.2.1. Recombinación V(D)J

La región variable de los receptores antígenicos que se expresan en las células B y T son generados por reordenamientos de los múltiples segmentos génicos presentes en la célula (revisado por Tonegawa, 1983). Estos genes se agrupan en tres categorías: genes variables (V), de diversidad (D) y de unión (J), y el proceso por el cual se reordenan se denomina recombinación V(D)J. La presencia de un gran número de segmentos génicos reordenables, así como el hecho de que la elección de uno u otro dentro de cada categoría se produzca de manera aleatoria, da lugar a una variabilidad que resulta fundamental para que el sistema inmunológico funcione de manera eficiente. Además, durante el proceso de reordenamiento se producen eventos de síntesis de ADN entre los segmentos génicos que provocan un aumento en la variabilidad del receptor.

Durante el proceso de maduración de las células B se originan los exones que darán lugar a la región variable de las inmunoglobulinas. Estos receptores están formados por dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (κ y λ), y el exón que codifica para la región variable de cada cadena se origina de la fusión mediante recombinación de los segmentos génicos V_H , D y J_H para las 2 cadenas pesadas; V_κ y J_κ para la cadena ligera κ ; y V_λ y J_λ para la cadena ligera λ (Figura 1.6). Por su parte, las células T originan su receptor TCR por recombinación de los

ADN polimerasa lambda

segmentos V_α y J_α para la cadena α ; y V_β , D_β y J_β , para la cadena β , dando lugar al TCR tipo $\alpha\beta$. Un proceso similar se produce para dar lugar al TCR tipo $\gamma\delta$.

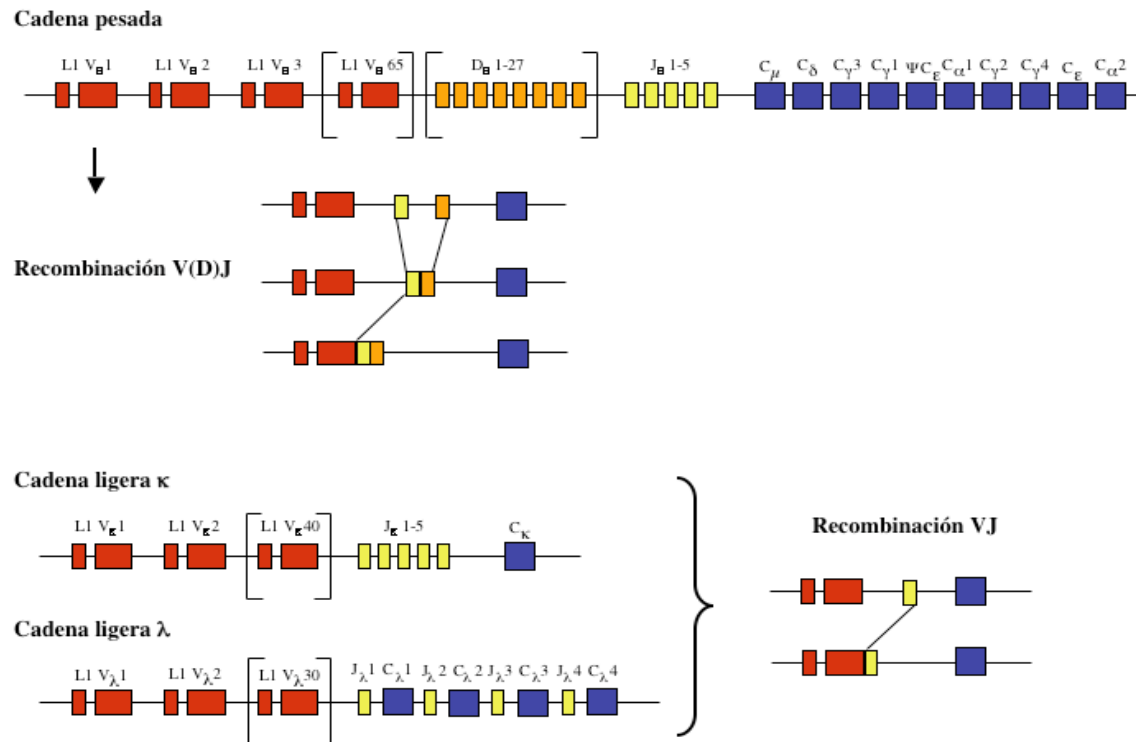


Figura 1.6: Organización de los segmentos génicos de los receptores de células B. En rojo se representan los segmentos génicos V, en naranja los D y en amarillo los J. Los segmentos que codifican para las diversas regiones constantes se representan en azul. Como se observa en la figura, la región variable de las cadenas pesadas se forma por recombinación de los segmentos V, D y J, mientras que la región variable de las cadenas ligeras se forma únicamente por recombinación de segmentos V y J.

Desde el punto de vista molecular, la recombinación V(D)J se inicia con la acción de dos endonucleasas específicas de tejido linfóide, Rag1 y Rag2, que realizan un corte de doble cadena en unas secuencias específicas de recombinación (*RSS*) que flanquean los segmentos génicos a recombinar (revisado por Gellert, 2002). Las secuencias *RSS* están formadas por un heptámero y un nonámero de secuencia conservada, separados por 12 ó 23 pares de bases. La recombinación se produce entre una secuencia *RSS* de 12 pares de bases y otra de 23, según la denominada regla 12/23. El corte de Rag1 y Rag2 da lugar a dos extremos romos fosforilados y dos extremos codificantes cerrados covalentemente en forma de horquilla. A continuación, entra en escena la maquinaria de reparación de roturas de doble cadena mediante el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (*NHEJ*) (revisado por Lieber y cols., 2004). El heterodímero Ku70/Ku86 reconoce y se une a los extremos, reclutando a la quinasa dependiente de ADN ADN-PK. Este complejo fosforila a la nucleasa Artemis, que una vez activa abre la horquilla y elimina nucleótidos de los extremos codificantes, generando segmentos de cadena sencilla (Ma y cols., 2002). Estos segmentos pueden ser sustratos para TdT, que reclutada por el complejo Ku/ADN-PK (Mahajan y cols., 1999), puede añadir nucleótidos (adiciones "N") que provocan un aumento en la variabilidad de las zonas de unión de los segmentos génicos V(D)J (Desiderio y cols., 1984). Llegado este punto se hace necesaria la aparición de fenómenos de síntesis de ADN dependiente de molde para que, por último, el complejo formado por XRCC4 y ADN

Ligasa IV, reclutado vía ADN-PK, pueda sellar los extremos codificantes (Grawunder y cols., 1997; Chen y cols., 2000) (Figura 1.7).

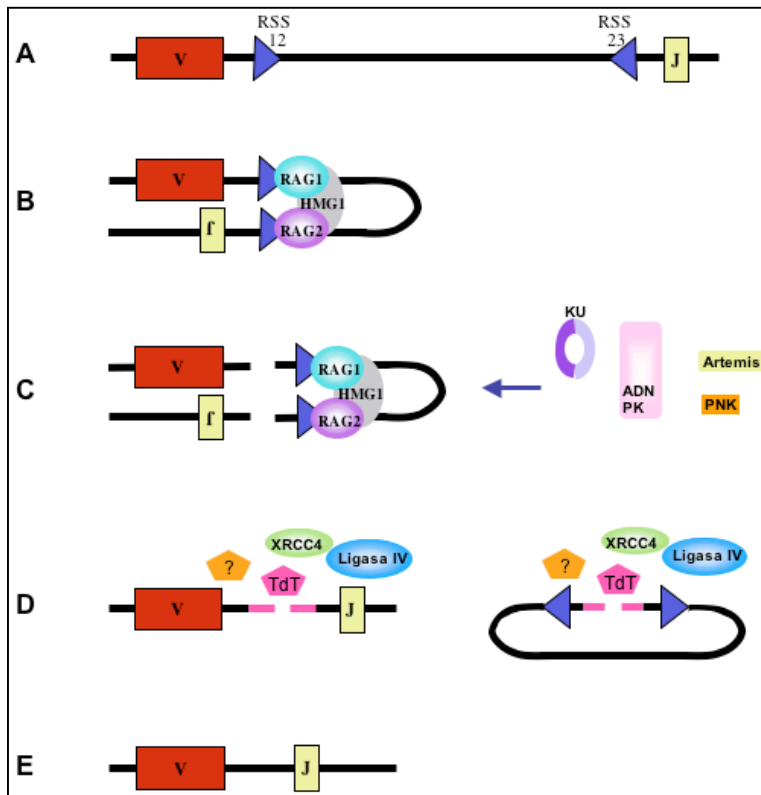


Figura 1.7: Mecanismo molecular del proceso de recombinación V(D)J. Las secuencias señal RSS que flanquean los segmentos génicos a recombinar (A), son reconocidas por el complejo Rag1 / Rag2 / HMG1 (B), que produce una doble rotura en el ADN (C). Dicha rotura recluta la maquinaria de reparación por el mecanismo NHEJ (C y D). La reparación actúa sobre ambas moléculas de ADN produciendo que los segmentos V y J queden situados adyacentes en un caso (E), y que el ADN escindido que incluye las secuencias RSS forme un ADN circular cerrado de forma covalente.

1.1.3.1.3.2.2. Hipermutación somática

Todos los linfocitos B que completan de manera exitosa el proceso de recombinación V(D)J expresan en su superficie IgM y migran a los órganos linfoides secundarios (nódulos linfáticos, bazo, tejidos linfoides), donde son activados por la unión de los antígenos y proliferan estructurándose en formas foliculares denominadas centros germinales (CG, revisado por MacLennan, 1994).

La estimulación por antígeno provoca la activación de tres procesos diferentes: la conversión génica (GC), la hipermutación somática (SHM) y la recombinación de cambio de isotipo (CSR).

La recombinación de cambio de isotipo reemplaza el gen constante expresado de la cadena pesada (C_{μ}) por cualquiera de los demás genes C posibles (C_{α} , C_{ϵ} o C_{γ}), resultando en el cambio de isotipo del receptor de IgM a IgA, IgE o IgG, sin cambio en la especificidad del receptor.

La hipermutación somática es un proceso encaminado a mejorar la afinidad de los receptores por un antígeno determinado. Esta meta se consigue gracias a la introducción de mutaciones puntuales (sustituciones de base) en los genes V tanto de las cadenas pesadas (V_H) como ligeras (V_{λ} y V_{κ}), de forma que se genere una variabilidad que influya en la afinidad por el antígeno (Papavasiliou y Schatz, 2002). Los receptores que presenten mayor grado de afinidad serán seleccionados positivamente y las células B se diferenciarán en células plasmáticas o células B de memoria.

El mecanismo molecular de este proceso no ha podido ser definido todavía con claridad. En este momento hay dos corrientes de opinión al respecto (revisado por Lee y cols., 2004).

ADN polimerasa lambda

Existe una primera hipótesis según la cual una desoxicitidín desaminasa (*AID*), asociada a un cofactor específico, editaría un pre-ARNm de forma que ciertas citosinas pasarían a ser uracilo (revisado por Honjo y cols., 2004). Esto se basa en la alta homología de *AID* con el enzima editora de ARN APOBEC-1 (Muramatsu y cols., 2000; Honjo y cols., 2002). El ARNm editado daría lugar a una endonucleasa capaz de realizar cortes de cadena sencilla en los genes V durante la transcripción de estos. Estas lesiones serían reparadas por diferentes rutas de forma propensa al error con la intervención de ADN polimerasas de baja fidelidad de síntesis, generándose mutaciones que harían variar la afinidad del receptor por el antígeno. La segunda hipótesis postula un modelo en el que *AID* desamine ciertas desoxicitosinas de los genes V, generando pares G·U potencialmente mutagénicos (revisado por Neuberger y cols., 2003). La replicación a través de estos pares podría dar lugar a transiciones C·G → T·A al tener una U como molde, o a transiciones y transversiones si se replica la hebra tras la eliminación de la base U por una glicosilasa. Al igual que en el modelo anterior, la intervención de mecanismos de reparación en los que participen ADN polimerasas de baja fidelidad de síntesis provocaría la aparición de mutaciones.

1.1.3.1.4. ADN polimerasa λ

Pol λ es un miembro de la Familia X descubierto recientemente. Es el miembro de esta familia que guarda mayor similitud con Pol β, ya que presenta una identidad del 32% a nivel de secuencia aminoacídica en el núcleo conservado tipo Pol β (García-Díaz y cols., 2000; Aoufouchi y cols., 2000; Nagasawa y cols., 2000).

1.1.3.1.4.1. Organización estructural

La organización estructural de Pol λ es similar a Pol β, 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 ADN (Callebaut y Moron, 1997; Bork y cols., 1997). Además, entre el dominio BRCT y el núcleo conservado tipo Pol β 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 Pol λ (García-Díaz y cols., 2000) (Figura 1.1).

1.1.3.1.4.2. Propiedades bioquímicas

Pol λ es una ADN polimerasa dependiente de molde, que carece de actividad 3'→5' exonucleasa y cuyo modo de síntesis es distributivo en moléculas tipo molde/cebador, es decir, sólo es capaz de sintetizar unos pocos nucleótidos antes de disociarse del ADN (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 ADN, 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 ADN polimerasas influye de manera determinante en aspectos como la fidelidad de síntesis o la eficiencia catalítica, como ha sido descrito para Pol β (Pelletier y cols., 1996b) y Pol μ (Domínguez y cols., 2000). De igual forma, el uso de Mn^{2+} como metal activador de Pol λ 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 λ posee una gran afinidad por nucleótido (baja K_m), 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 λ 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 λ sí que es capaz de discriminar entre dNTPs (2'H) y rNTPs (2'OH), al contrario de lo que le sucede a Pol μ (Ruiz y cols., 2003; Nick-McElhinny y Ramsden, 2003).

Las ADN 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 β y Pol λ cometen errores de sustitución de base con una frecuencia similar, sin embargo, Pol λ posee una tendencia exacerbada a cometer errores de deleción, 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).

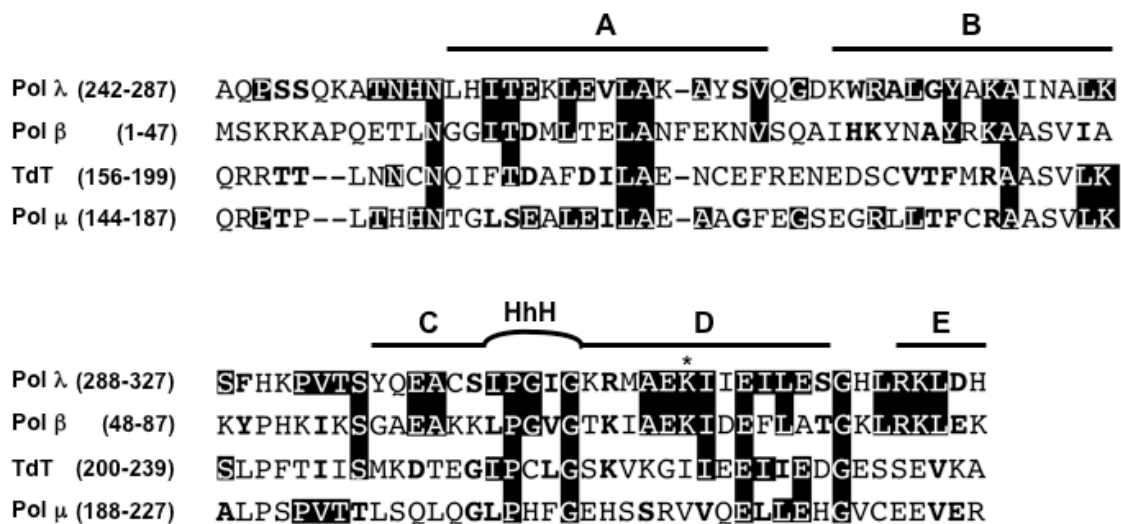


Figura 1.8: Alineamiento de secuencia aminoacídica de los dominios de 8 kDa de las diferentes ADN polimerasas humanas de la Familia X. Los aminoácidos de Pol λ idénticos a los de otras ADN polimerasas se muestran en blanco sobre fondo negro. Los residuos de Pol λ conservados en otras ADN polimerasas se muestran en negrita. La numeración de los residuos se realiza tomando como origen la metionina del extremo N-terminal. Las α -hélices que forman el dominio de 8 kDa de Pol λ se nombran (A→E) en la parte superior del alineamiento. También se nombra el motivo hélice-horquilla-hélice (HhH) que se forma con las hélices C y D. El residuo responsable de la actividad dRP-liasa de Pol λ (K312) y Pol β (K72) está señalado con un asterisco. Este alineamiento fue realizado con el programa MULTALIN (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 Pol β (Pelletier y cols., 1994; Pelletier y Sawaya, 1996; Pelletier y cols., 1996a; Sawaya y cols., 1997).

El dominio de 8 kDa de Pol λ es crucial para entender las peculiaridades funcionales de este enzima. Al igual que sucede con Pol β , el dominio de 8 kDa es responsable de múltiples características básicas de Pol λ . 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 λ carece de actividad AP-liasa, a pesar del alto grado de similitud con el dominio de 8 kDa de Pol β , lo que sugiere que quizá esta actividad resida en el dominio de polimerización de Pol β (García-Díaz y cols., 2001).

Al igual que sucede con los residuos implicados en la actividad dRP-liasa, Pol λ 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 β (Figura 1.8), lo que explicaría el cambio de patrón de polimerización observado en moléculas tipo *gap* con grupo fosfato en 5' (García-Díaz y cols., 2002).

1.1.3.1.4.3. Funciones propuestas al inicio de esta Tesis doctoral

La expresión predominante de Pol λ en testículo llevó a proponer un papel de esta polimerasa en procesos de reparación asociados a procesos de meiosis durante la espermatogénesis. Además, la expresión se ve regulada en el tiempo y en el espacio, siendo la presencia de Pol λ máxima en los espermatoцитos en fase Paquitene tardía, momento en que se produce la recombinación meiótica (García-Díaz y cols., 2000).

El descubrimiento de la actividad dRP-liasa asociada al dominio de 8 kDa de Pol λ , junto con la capacidad de llevar a cabo la reacción de reparación por escisión de base *in vitro* con proteínas purificadas, alentó la idea de que Pol λ pudiera 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 Pol λ 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 Pol λ podría estar asociada a eventos de reparación específicos no accesibles a Pol β (García-Díaz y cols., 2001). Asimismo, gracias a su capacidad de desplazamiento de banda en presencia de iones Mn^{2+} , Pol λ podría tener un papel relevante en la ruta de reparación *BER* de trecho largo (García-Díaz y cols., 2002).

Por otro lado, Pol λ podría ser la proteína implicada en diferentes eventos de síntesis de ADN 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 Pol β), 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 elevada propensión de Pol λ a cometer errores de delección podría reflejar una capacidad intrínseca de esta polimerasa para utilizar sustratos de ADN que tuviesen apareamientos imperfectos, como los que probablemente se generen durante la reparación de roturas de doble cadena mediante el mecanismo *NHEJ*, por lo que se podría sugerir un papel de Pol λ en esta ruta de reparación (Bebenek y cols., 2003). Adicionalmente, la presencia del dominio BRCT podría ser beneficiosa para la regulación de la participación de Pol λ en este mecanismo, ya que podría regular el acceso de Pol λ a la sinapsis de los extremos sólo cuando se produzcan cierto tipo de sustratos que requieran de su acción.

Otras evidencias que apoyan el papel de Pol λ en la ruta de reparación *NHEJ* son los datos obtenidos de estudios sobre la ADN polimerasa IV de *Saccharomyces cerevisiae*. Pol IV muestra un alto grado de identidad estructural y de secuencia aminoacídica con Pol λ . Comparten el núcleo tipo Pol β y también los dominios situados en la zona N-terminal, el

dominio BRCT y el dominio Ser/Pro (García-Díaz y cols., 2000). Pol IV 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).

La caracterización de su baja fidelidad de síntesis hizo pensar en un posible papel de Pol λ en el proceso de hipermutación somática, ya que existe una opinión generalizada según la cual este proceso ha de involucrar ADN polimerasas propensas a cometer errores (revisado por Gearhart y Woods, 2001). Sin embargo, al obtener el modelo murino deficiente en Pol λ 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 λ no es indispensable para este proceso, probablemente debido a una situación de redundancia entre distintas ADN polimerasas.

Por último, la demostración de la interacción específica entre Pol λ y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, Maga y cols., 2002; Shimakazi y cols., 2002), abrió las puertas a la implicación de Pol λ en nuevos procesos de reparación y de tolerancia al daño, ya que en presencia de PCNA Pol λ es capaz de sintetizar ADN 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).

2

Objetivos

Como primer objetivo de esta Tesis doctoral nos planteamos evaluar la implicación *in vivo* de Pol λ en los procesos de reparación de daño oxidativo en el ADN mediante el mecanismo de reparación por escisión de base (*BER*), así como el grado de redundancia con Pol β . Para ello, dispusimos de un modelo murino deficiente en Pol λ , así como de líneas celulares que sobre-expresan Pol λ de forma estable. Estos materiales permitieron obtener extractos celulares con los que evaluar la actividad de reparación por *BER*, así como estudiar el efecto en dichas células de diversos agentes que producen diferentes daños en el ADN.

Las evidencias existentes en torno a mecanismos de regulación de la actividad dRP-liasa de Pol β mediante modificaciones postraduccionales nos encaminaron al estudio de la acción de tales mecanismos sobre Pol λ y el efecto en sus propiedades bioquímicas, así como sus implicaciones en la ruta de reparación por escisión de base.

Estudios previos a esta Tesis establecieron las características básicas de polimerización de Pol λ . Sin embargo, dichos estudios adolecían de carecer de un análisis exhaustivo de sus propiedades de unión a los diferentes sustratos posibles de ADN. Por tanto, decidimos caracterizar la afinidad de unión de Pol λ al ADN, dada la importancia de este hecho en su posible participación en los diversos procesos de síntesis de ADN *in vivo*.

La realización de alineamientos de la secuencia aminoacídica de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas, junto con la obtención de la estructura tridimensional de Pol λ durante el desarrollo del trabajo expuesto en esta Tesis, permitió identificar diversos residuos susceptibles de ser responsables de ciertas propiedades bioquímicas de Pol λ . La construcción y caracterización de proteínas mutantes permitió identificar la función de diversos residuos aminoacídicos en el reconocimiento de un grupo fosfato presente en el extremo 5' de un ADN tipo *gap*.

Por otro lado, la aparición de diversas evidencias de la participación de Pol λ en la reparación de roturas de doble cadena mediante el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (*NHEJ*), nos encaminaron al estudio en mayor profundidad de las propiedades de polimerización de Pol λ y de su implicación en la citada ruta de reparación.

El descubrimiento de la exacerbada tendencia de Pol λ a cometer errores de delección, junto con la posterior evidencia estructural de que Pol λ establece mínimos contactos con la hebra molde del ADN, parecían indicar una posible capacidad de utilización de moléculas con extremos desapareados. Tras una primera comprobación cualitativa de dicha hipótesis, nos dispusimos a realizar una caracterización cinética exhaustiva de la capacidad de extensión directa de extremos desapareados en el ADN por parte de Pol λ , así como el análisis de la repercusión de dicha capacidad en la ruta *NHEJ*.

La interacción de Pol λ y el factor de procesividad PCNA, junto con la caracterización cinética de la capacidad de extensión de extremos desapareados en el ADN y su base estructural hallada mediante estudios cristalográficos, nos dirigieron al estudio de la capacidad de síntesis a través de diversas modificaciones químicas en las bases nitrogenadas de la cadena molde del ADN, y de la posible implicación de Pol λ en los procesos de síntesis a través de lesiones.

3

Materiales y Métodos

3.1. Materiales

Los diferentes desoxinucleótidos y ribonucleótidos ultrapuros no marcados, y los nucleótidos marcados radiactivamente ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 3000 Ci/mmol; $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 3000 Ci/mmol; $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$ 3000 Ci/mmol) fueron obtenidos de Amersham Biosciences. Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por Promega, New England Biolabs y Roche. Los enzimas uracil ADN glicosilasa de *E. coli*, T4 polinucleótido quinasa, T4 ADN ligasa fueron obtenidas de New England Biolabs. La ADN polimerasa TdT y la *Pfu* ADN polimerasa fueron suministradas por Promega. El ADN activado de timo de ternera fue suministrado por Amersham Biosciences. El cóctel de inhibidores de proteasas y la histona H1 fueron suministrados por Roche. Los diferentes oligonucleótidos sintéticos fueron obtenidos de Invitrogen, Isogen y Eurogentec. La AP-endonucleasa humana, el anticuerpo policlonal contra Pol β y Pol β fueron generosamente donadas por el Dr. S.H. Wilson (NIEHS, USA).

3.2. Sobre-expresión y purificación de Pol λ

El ADN codificante de Pol λ clonado en el vector pRSET fue transformado en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-pRIL (Stratagene), que contiene copias adicionales de los ARNt argU, ileY y leiW para mejorar la eficiencia de expresión de proteínas eucarióticas. Estas células se crecieron en medio LB a 28 °C hasta fase exponencial ($\text{DO}_{600\text{nm}}=0.6\text{-}0.8$), momento en el que se indujo la expresión de la proteína heteróloga gracias a la adición de IPTG (1 mM). Tras 20 min de inducción, se añadió rifampicina (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se prosiguió la incubación a 28 °C durante 2 horas. Tras ese tiempo, se recogieron las células y se congelaron a -80 °C.

Las células descongeladas se lisaron mediante el empleo de 5 veces su peso de alúmina (Al_2O_3) y un volumen equivalente a la masa celular de tampón A (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 10% glicerol) con 1 M NaCl. El lisado se recogió con 4 volúmenes de tampón A 1 M NaCl. Los restos celulares y la alúmina se sedimentaron por centrifugación (3000 rpm / 5 min / 4 °C), así como el material insoluble (11000 rpm / 20 min / 4 °C). Se precipitó el ADN mediante polietilenimina (PEI, 0.3%) y se sedimentó por centrifugación (10000 rpm / 10 min / 4 °C). La fracción soluble se diluyó en tampón A hasta una concentración de 250 mM NaCl y se precipitaron las proteínas con sulfato amónico al 58% de saturación para eliminar la PEI. El precipitado se sedimentó por centrifugación (12000 rpm / 20 min / 4 °C). El sedimento se resuspendió en tampón A con 100 mM NaCl y se sometió a sucesivas cromatografías de intercambio iónico (fosfocelulosa) y cromatografías de afinidad (Ni-NTA, ya que la proteína posee una cola de 6 histidinas), mediante las que se purificó la ADN polimerasa a homogeneidad. Las eluciones de las columnas de fosfocelulosa se realizaron mediante concentraciones crecientes de NaCl. La elución de la columna de Ni-NTA se realizó mediante concentraciones crecientes de imidazol. Los eluidos de las diferentes columnas fueron evaluados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y tinción con Coomassie. Una última columna de fosfocelulosa sirve como paso de concentración, obteniendo la proteína en tampón A 1 M NaCl. La concentración de la proteína se estimó por densitometría de geles de poliacrilamida-SDS teñidos con Coomassie, empleando patrones de concentración conocida. Para su conservación se añadió glicerol hasta un 50% y BSA hasta una concentración final de 0.1 mg/ml. Las fracciones fueron congeladas a -80 °C. Este mismo protocolo fue aplicado para expresar y purificar los mutantes descritos en esta Tesis, los cuales fueron obtenidos por mutagénesis directa por PCR sobre el vector de expresión.

3.3. Preparación de extractos celulares totales a partir de tejidos y células

Los tejidos extraídos del modelo murino deficiente en Pol λ , 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.

Los *pellets* celulares, obtenidos de tejidos o de células en cultivo, fueron resuspendidos (10^6 células / 20 μ 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), la suspensión celular se incubó a 4 °C durante una hora en rotación. Tras esa incubación, la fracción insoluble se precipitó por centrifugación (16000 xg / 10 min / 4 °C). Se hicieron alícuotas del sobrenadante y se congelaron a -80 °C. Protocolo adaptado de Biade y cols., 1998.

3.4. Ensayos de reparación por escisión de base (BER)

El oligonucleótido P6 (5'CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTAC 3') se hibridó con el oligonucleótido T4 (5'GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGC-AG 3') en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl. Las reacciones de reparación por *BER* (20 μ l) se llevaron a cabo en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 2 mM ATP, 0.5 mM NAD, 5 mM fosfocreatina, 10 unidades de creatina fosfoquinasa, 100 nM ADN, 13.3 nM (0.1 μ Ci) de [α - 32 P]dCTP y la cantidad indicada de los extractos celulares totales. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de la cantidad indicada de extracto y se incubaron a 37 °C durante el tiempo indicado. 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 desnaturizantes (20% poliacrilamida, 8 M urea) y autorradiografía.

3.5. Ensayos de acetilación *in vitro*

Las proteínas Pol β y Pol λ (5 μ g) se incubaron con 0.1 μ Ci [14 C]acetil coenzima A (MC 269, Moravek Biochemicals) en 30 μ l de tampón (50 mM Tris-HCl pH=8, 10% glicerol, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 mM butirato de sodio), junto con la proteína p300 completa o el dominio HAT fusionado a la proteína GST (100 ng). Los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, que fueron teñidos con Coomassie y sometidos a autorradiografía. Ensayos realizados por el Dr. Nazim El-Andaloussi bajo la dirección del Dr. Michael O. Hottiger (Institute of Veterinary Biochemistry and Molecular Biology, University of Zürich).

3.6. Ensayos de retraso en gel (EMSA). Análisis del efecto de la acetilación en la capacidad de unión estable de Pol λ a un ADN tipo *gap*

El cebador SP1C (5'GATCACAGTGAGTAC 3', 100 ng) fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P]ATP (0.1 μ Ci) y T4 polinucleótido quinasa (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. La hibridación del cebador con los oligonucleótidos molde (T13A, 5'AGAAGTGTATCTAGTACTCACTGT-GATC 3') y *downstream* (Dg1P, 5'AGATACACTTCT 3') fue llevada a cabo en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 4 nM de ADN marcado y las cantidades indicadas de Pol λ . Tras una incubación de 10 min a 37 °C, se añadió glicerol a las muestras hasta una concentración final del 10%, y a continuación se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida / bisacrilamida (4% / 0.05%) durante 1.5 horas a 180 V y 4 °C. Tras la electroforesis, el gel fue transferido a papel Whatman, secado y revelado por autorradiografía.

3.7. Ensayos de actividad dRP-liasa. Análisis del efecto de la acetilación en la actividad dRP-liasa de Pol λ y Pol β

El oligonucleótido P6 (5'CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTAC 3') se marcó en el extremo 3' empleando TdT (30 unidades) y [α -³²P]ddATP (0.5 μ Ci), y se hibridó con el oligonucleótido T4 (5'GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG 3'). Este sustrato (1 μ M) se incubó con uracil ADN glicosilasa (UDG, 2 unidades) a 37 °C durante 20 min, en 20 μ l de tampón que contenía 50 mM Hepes pH=7.5, 20 mM KCl y 2 mM DTT. Tras la incubación, se añadió MgCl₂ a una concentración final de 10 mM y 40 nM de AP-endonucleasa humana, para generar el sustrato para la actividad dRP-liasa.

Las reacciones (20 μ l) se realizaron en presencia de 50 mM Hepes pH=7.5, 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 2 mM DTT y 100 nM del sustrato de ADN descrito en el párrafo anterior. Las reacciones se iniciaron con la adición de las cantidades indicadas de Pol β o Pol λ , y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras la incubación, se añadió NaBH₄ a una concentración final de 340 nM, manteniendo las reacciones en hielo durante 20 min. Los productos de reacción reducidos se precipitaron en presencia de etanol y 0.1 μ g/ml de tRNA, se resuspendieron en agua y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida del 20% y 8 M urea. Los productos de la reacción se visualizaron por autorradiografía.

3.8. Ensayos de actividad ADN polimerasa en ADN activado. Análisis del efecto de la acetilación en la actividad ADN polimerasa de Pol λ y Pol β

El ensayo (25 μ l) se llevó a cabo en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 2.5 mM MgCl₂ para Pol λ y 7.5 mM MgCl₂ para Pol β , 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 13.3 nM (0.1 μ Ci) [α -³²P]dCTP, 625 ng de ADN activado de timo de ternera y 50 o 100 nM de Pol β o Pol λ . Las reacciones se iniciaron mediante la adición de Pol β o Pol λ y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras la incubación, las reacciones se detuvieron mediante la adición de 10 mM EDTA (25 μ l), y las muestras se filtraron por centrifugación en columnas de Sephadex G-50 (1 ml). La actividad ADN polimerasa es proporcional a la radiactividad presente en el volumen excluido, determinada por conteo de la radiación de Cerenkov.

3.9. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto y gap de un nucleótido. Análisis del efecto de la acetilación en la actividad ADN polimerasa de Pol λ y Pol β

El cebador SP1C (5'GATCACAGTGAGTAC 3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (0.1 μ 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. Este oligonucleótido marcado se

ADN polimerasa lambda

hibridó entonces con uno (molde/cebador abierto; T13C, 5'AGAAGTGTATCTCGTACTCAC-TGTGATC 3') o dos oligonucleótidos (*gap*; T13C y Dg1, 5'AGATACACTTCT 3', con grupo OH o fosfato en el extremo 5') en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl.

Las reacciones (20 μ l) se llevaron a cabo en 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 2.5 mM MgCl₂ o 1 mM MnCl₂ para Pol λ , 10 mM MgCl₂ o 1 mM MnCl₂ para Pol β , 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 200 nM ADN, 10 μ M de dNTPs y las cantidades indicadas de cada ADN polimerasa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de Pol β o Pol λ 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.

3.10. Espectroscopía de masas: Identificación de las dianas del proceso de acetilación de Pol λ y Pol β

Los productos de la reacción de acetilación *in vitro* se sometieron a digestión controlada con tripsina y quimotripsina. Las mezclas peptídicas se purificaron mediante columnas de fase reversa (Millipore) y fueron sometidas a análisis LC-MS/MS en un espectrómetro de masas LCQ Deca XP. Estudio realizado por el Dr. Peter Gehrig (Functional Genomic Center, Zürich), gracias a la colaboración establecida con el grupo dirigido por el Dr. Michael O. Hottiger (Institute of Veterinary Biochemistry and Molecular Biology, University of Zürich).

3.11. Ensayos de retraso en gel (EMSA). Caracterización de las propiedades de unión a ADN de Pol λ

El oligonucleótido SP1C (5'GATCACAGTGAGTAC 3') es utilizado como cebador en todos los ensayos salvo en el caso de la molécula *Gap2-5'P* (5'TCGAGAGAGGGACTTCATT-TTTTGAAGTCCCTCTCTCGACGAAGAACCTGCACAGATTTTTTCTGTGCAGGTTCTT 3'). Los oligonucleótidos T6 (5'GTATCTAGTACTCACTGTGATC 3'), T13X (5'AGAAGTG-TATCTXGTACTCACTGTGATC 3', siendo X: A, C, G o T), T13-3 (5'AGTGTATCTGGTACTCACTGTGATC 3'), T13-5 (5'TGTATCTGGTACTCACTGTGATC 3'), T13-7 (5' TATCTGGTACTCACTGTGATC 3'), T13-9 (5' TCTGGTACTCACTGTGATC 3'), T13-11 (5' TG-GTACTCACTGTGATC 3'), T13-12 (5' GGTACTCACTGTGATC 3'), T13-13 (5' GTACTCACTGTGATC 3'), T13-14 (5' TACTCACTGTGATC 3'), T13-15 (5' ACTCACTGTGATC 3'), T13-16 (5' CTCACTGTGATC 3') y T18 (5'ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTCACTGTGATC 3') son utilizados como molde. Los oligonucleótidos Dg1 (5'AGATACACTTCT 3'), Dg15^{'desap.} (5'CGATACACTTCT 3') y Dg5 (5'AACGACGGCCAGT 3'), con grupo OH o fosfato en su extremo 5', son utilizados como oligonucleótidos *downstream*. Dependiendo del ensayo en cuestión, uno de los oligonucleótidos que conforman la molécula es marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (0.1 μ 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. El oligonucleótido marcado se hibridó entonces con uno (molde/cebador abierto o molde/*downstream*) o dos oligonucleótidos (*gap*) en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 4 nM de ADN marcado y las cantidades indicadas de Pol λ . Tras una incubación de 10 min a 37 °C, se añadió glicerol a las muestras hasta una concentración final del 10%, y a continuación se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida / bisacrilamida (4% / 0.05%) durante 1.5 horas a 180 V y 4 °C. Tras la electroforesis, el gel fue transferido a papel Whatman, secado y revelado por autorradiografía.

3.12. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo *gap* de uno y dos nucleótidos. Implicaciones en la ruta de *NHEJ*

Los cebadores SPIC (5'GATCACAGTGAGTAC 3') y P15X (5' TCTGTGCAGGTTCTX 3', siendo X: A, C o T) fueron marcados radiactivamente en sus extremos 5' con [γ -³²P]ATP (0.1 μ 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. Cada oligonucleótido marcado se hibridó entonces con dos oligonucleótidos para formar los diferentes *gaps* de uno y dos nucleótidos, en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl. Los oligonucleótidos hibridados con el cebador SPIC son T13C (5'AGAAGTGTATCTCGTACTCACTGTGATC 3') y Dg1 (5'AGATACTTCT 3') con grupo OH o fosfato en su extremo 5', para dar lugar a la molécula *gap* de un nucleótido. Los oligonucleótidos hibridados con el cebador P15X son T17 (5'TGAAGTCCCTCTCTCGACGAAGAACCTGCACAGA 3') y Dg2P (5'TCGAGAGAGGGACTTCA 3') con grupo fosfato en su extremo 5', para dar lugar a la molécula *gap* de dos nucleótidos y grupo fosfato en 5'.

Las reacciones (20 μ l) se llevaron a cabo en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 250 nM ADN, la cantidad indicada de cada dNTP o rNTP, y las cantidades indicadas de cada ADN polimerasa. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de nucleótido 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.

3.13. Ensayos de reparación por *NHEJ* con extractos celulares totales

El ensayo tipo se realizó incubando la cantidad indicada de un fragmento de ADN de 880 pares de bases correspondiente al minisatélite humano MsH42 (Boán y cols., 1998), digerido con un enzima de restricción (*Sma*I, *Eco*RI o *Pst*I), y la cantidad indicada de extracto celular, en presencia de 20 mM Tris-HCl pH=7.5, 10 mM MgSO₄ y 10 mM ATP. Los componentes de la reacción se incubaron durante 30 min a 37 °C y la reacción se finalizó por rápida congelación a -70 °C. El ADN presente en la reacción fue entonces purificado en algunos casos mediante fenolización y precipitación con etanol. Los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa (1%) en tampón TAE 1x (40 mM Tris-HCl pH=8, 40 mM ácido acético, 1 mM EDTA). En algunos ensayos se acompañó la reacción de histona H1 purificada. El ADN del bacteriófago λ digerido con el enzima *Hind*III es llevado como marcador de pesos moleculares en la electroforesis. Los extractos empleados en estos ensayos fueron obtenidos siguiendo el protocolo explicado en el punto 3.1.

3.14. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto. Estudio de la capacidad de extensión de desapareamientos de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas

El cebador SP1G (5'GATCACAGTGAGTAG 3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P]ATP (0.1 μ 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. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T5 (5'TCTATCTACTCACTGTGATC 3') o T5+1 (5'TCTATC-GTACTCACTGTGATC 3') en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl.

Las reacciones (20 μ l) se llevaron a cabo en 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 5 nM ADN, 5 μ M de cada dNTP y 360 nM de cada ADN polimerasa (Pol β , Pol μ y Pol λ). 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% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol). Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes (20% poliacrilamida, 8 M urea) y autorradiografía.

3.15. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto y *gap* de un nucleótido con grupo fosfato en 5'. Estudio de la capacidad de extensión de desapareamientos de Pol λ en condiciones de estado estacionario

El cebador SP1X (5'GATCACAGTGAGTAX 3', siendo X: A, C, G o T) fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P]ATP (0.1 μ 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. El oligonucleótido marcado se hibridó entonces con uno (molde/cebador; T6X, 5'GTATCXAGT-ACTCACTGTGATC 3', siendo X: A, C, G o T) o dos oligonucleótidos (*Gap15'P*; T13X 5'A-GAAGTGTATCTXGTACTCACTGTGATC 3', siendo X: A, C, G o T; Dg1P, 5'AGATACA-CTTCT 3', con grupo fosfato en 5') en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl.

Las reacciones (20 μ l) se llevaron a cabo en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 250 nM ADN, y 2.5 o 5 nM del núcleo catalítico de Pol λ (Δ Pol λ) para las moléculas tipo molde/cebador abierto en las que el extremo 3' del cebador aparee perfectamente, y 75 o 100 nM Δ Pol λ para las que su extremo se encuentra desapareado. Las concentraciones de dGTP empleadas para las moléculas perfectamente apareadas tomaron valores desde 0.05 hasta 100 μ M, mientras que para las moléculas con desapareamientos las concentraciones utilizadas fueron mayores, desde 1 hasta 1000 μ M. En las moléculas tipo *gap*, la concentración empleada de Δ Pol λ fue de 5 nM, salvo en el caso del desapareamiento dC·dCMP que necesitó 20 nM de Δ Pol λ . Las concentraciones de dGTP empleadas en las moléculas tipo *gap* fueron desde 0.0005 hasta 0.2 μ M para las moléculas perfectamente apareadas, y desde 0.005 hasta 1000 μ M para las moléculas con desapareamientos. Las reacciones se iniciaron con la adición de dGTP y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras esa 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 desnaturizantes (20% poliacrilamida, 8 M urea) y autorradiografía. La cuantificación de la intensidad de las bandas

fue realizada empleando el equipo BAS reader 1500 (Fujifilm). La tasa de incorporación de nucleótido (cebadores extendidos) fue representada en función de la concentración de dGTP empleada en cada caso. Los valores de K_m y V_{max} aparentes fueron obtenidos del mejor ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1), usando regresión no lineal (Kaleidagraph, Synergy Software, www.synergy.com). En todos los casos la calidad del ajuste de los datos fue aceptable. Los valores de la constante catalítica (k_{cat} , ecuación 2) y eficiencia catalítica (ecuación 3) fueron calculados en función de los valores de K_m y V_{max} aparentes obtenidos. La eficiencia intrínseca de extensión de desapareamientos (f_{ext}^o), constante que representa la eficiencia de extensión relativa entre pares complementarios y no complementarios, fue por último calculada (ecuación 4).

Ecuación 1: $V = V_{max} * [dNTP] / K_m + [dNTP]$

Ecuación 2: $k_{cat} = V_{max} / [enzima]$

Ecuación 3: Eficiencia catalítica = k_{cat} / K_m

Ecuación 4: $f_{ext}^o = (k_{cat} / K_m)$ apareamiento / (k_{cat} / K_m) desapareamiento

3.16. Cristalización de Pol λ . Recolección de datos, procesamiento de los mismos y refinamiento de la estructura

Procedimiento realizado por el Dr. Miguel García-Díaz y el Dr. Lars C. Pedersen, como parte de la colaboración establecida con el grupo dirigido por el Dr. Thomas A. Kunkel (NIEHS, NIH, USA).

Los cristales se formaron utilizando el método de la “gota suspendida”, mezclando 2 μ l de la solución proteica con ADN con 2 μ l de la solución reservorio que contenía 0.1 M cacodilato de sodio pH=5.5, 40 mM MgCl₂, 7% MPD. El cristal fue entonces transferido a una solución que contenía 0.1 M cacodilato de sodio pH=5.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl y 8% MPD, y después transferido de nuevo a una solución que contenía 0.1 M cacodilato de sodio pH=5.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl y 35% MPD para su rápido enfriamiento y congelación (N₂ líquido). De esta forma, el cristal fue transferido a la solución crio-protectora en cuatro pasos en los que se incrementa progresivamente la concentración de crio-protector (MPD). Los cristales congelados se montan en un goniómetro refrigerado con N₂ líquido para la recolección de datos.

Los datos fueron obtenidos en un sistema detector de área RAXISIV montado en un generador anódico rotante RU3H, equipado con espejos azules confocales MSC. El software utilizado fue HKL2000 (Otwinowsky y Minor, 1997).

Las coordenadas del cristal 1XSL (complejo binario Pol λ / ADN tipo *gap* de un nucleótido con fosfato en 5') fueron utilizadas como modelo de partida para el refinamiento de la estructura obtenida. El refinamiento fue realizado mediante CNS (Brünger y cols., 1998), utilizando protocolos de refinamiento de dinámica de torsión de ángulos y factor B individual. La construcción del modelo fue llevada a cabo mediante ciclos iterativos de modelado manual mediante el programa O (Jones y cols., 1991) y refinamiento mediante CNS (Brünger y cols., 1998). Los mapas de densidad electrónica tuvieron la suficiente calidad para reconstruir la mayoría de las cadenas laterales de los aminoácidos, todos los átomos del esqueleto carbonado de Pol λ (residuos 249-575) y todos los nucleótidos de las cadenas molde, cebador y *downstream*. La superposición de las cuatro moléculas presentes en la subunidad asimétrica no

ADN polimerasa lambda

revelaron diferencias significativas entre ellas. La molécula con menor valor B (cadena M) fue utilizada para generar las figuras.

La calidad del modelo fue evaluada mediante *Molprobity* (Lovell y cols., 2003) y resultó tener una buena estéreo-química (ver tabla 3.I).

Estadística de recolección de datos		Estadística de refinamiento	
Dimensiones de unidad de celda (a x b x c)	192.374 x 98.268 x 104.960 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Resolución (Å)	2.4
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2	R _{cryst} (%) ^b	20.9
Número de observaciones	351477	R _{free} (%) ^c	25.2
Difracciones únicas	146433	Número de complejos por unidad asimétrica	4
R _{sym} (%) (última capa) ^a	12.4 (47.0)	Número de moléculas de agua	799
I/σI (última capa)	10.1 (2.4)	Valor B medio (Å)	45.39
Perfección (%) (última capa)	98.7 (94.5)		
Desviación Rms de los valores ideales		Estadística de Ramachandran	
Distancia de enlace (Å)	0.006	Residuos en:	
Ángulo de enlace (°)	1.135	Regiones favorecidas	96.99
Ángulo dihédrico (°)	21.533	Regiones permitidas	100
Ángulo irregular (°)	0.885	Regiones prohibidas	0

Tabla 3.I: Estadística de los datos cristalográficos

^aR_{sym} = $\sum(I_i - \langle I \rangle) / \sum(I_i)$, donde “I_i” es la intensidad de la observación e “I” es la intensidad media de la difracción.

^bR_{cryst} = $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, calculado de la colección de datos de trabajo.

^cR_{free} es calculado de un 5% de datos escogidos de forma aleatoria y no incluidos en el refinamiento.

3.17. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto. Estudio de la capacidad de inserción frente a bases modificadas (8oxoG y 6mG) y extensión desde pares cuya base molde está modificada

Los cebadores Pber (5'CTGCAGCTGATGCGC 3') y PberX (5'CTGCAGCTGATGC-GCX 3', siendo X: A, C o T) fueron marcados radiactivamente en sus extremos 5' con [γ -

³²P]ATP (0.1 μ 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'GTACCCGGGGATCCGTACXGCGCATCAGCTGCAG 3', siendo X G, 8oxoG o 6mG) en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl.

Las reacciones (20 μ l) se llevaron a cabo en 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 2.5 mM MgCl₂ o 1 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 5 o 250 nM ADN según se indica en cada caso, la cantidad indicada de cada dNTP y 100 nM de cada ADN polimerasa (Pol β , Pol λ y Pol μ). 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% xilen-cianol, 0.1% azul de bromofenol). Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes (20% poliacrilamida, 8 M urea) y autorradiografía.

3.18. Ensayos de retraso en gel (EMSA). Análisis del efecto de la presencia de bases modificadas en la capacidad de unión estable de Pol λ a un ADN tipo molde/cebador abierto

El cebador Pber (5'CTGCAGCTGATGCGC 3') fue marcado radiactivamente en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (0.1 μ 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. Este oligonucleótido marcado se hibridó con el oligonucleótido T4X (5'GTACCCGGGGATCCGTACXGCGCATCAGCTGCAG 3', siendo X G, 8oxoG o 6mG) en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 12.5 μ l en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 4 nM de ADN marcado y las cantidades indicadas de Pol λ . Tras una incubación de 10 min a 37 °C, se añadió glicerol a las muestras hasta una concentración final del 10%, y a continuación se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida / bisacrilamida (4% / 0.05%) durante 1.5 horas a 180 V y 4 °C. Tras la electroforesis, el gel fue transferido a papel Whatman, secado y revelado por autorradiografía.

3.19. Ensayos de actividad ADN polimerasa en moléculas tipo molde/cebador abierto. Estudio de la capacidad de inserción frente a una base modificada (8oxoG o 6mG) y extensión desde pares cuya base molde esté modificada por Pol λ en condiciones de estado estacionario

Los cebadores Pber (5'CTGCAGCTGATGCGC 3') y PberX (5'CTGCAGCTGATGC-GCX 3', siendo X A, C o T) fueron marcados radiactivamente en sus extremos 5' con [γ -³²P]ATP (0.1 μ 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'GTACCCGGGGATCCGTACXGCGCATCAGCTGCAG 3', siendo X G, 8oxoG o 6mG) en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5 y 0.3 M NaCl.

Las reacciones (20 μ l) se llevaron a cabo en presencia de 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 4% glicerol, 0.1 mg/ml BSA, 250 nM ADN, y 10 nM del núcleo catalítico de Pol λ (Δ Pol λ). Las concentraciones de dGTP empleadas en los ensayos de

ADN polimerasa lambda

extensión de los pares cuya base molde era 8oxoG fueron desde 0.01 hasta 200 μM , mientras que para los pares cuya base molde era 6mG fueron desde 0.01 hasta 500 μM . Las concentraciones de dGTP empleadas en los ensayos de extensión del par control dG·dCMP fueron desde 0.01 hasta 5 μM . Las concentraciones de los dNTPs (dCTP o dATP) empleadas en los ensayos de inserción frente a dG (control) o 8oxoG variaron desde 0.02 hasta 2 μM .

Las reacciones se iniciaron con la adición del dNTP correspondiente y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras esa 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. La cuantificación de los productos de la reacción y los cálculos cinéticos se realizaron de la forma descrita en el apartado 3.15.

RESULTADOS

4

Reparación por escisión de base

Como ya se adelantó en la introducción de esta Tesis, las células están constantemente expuestas a agentes endógenos y medioambientales capaces de producir modificaciones químicas en las bases del ADN. Gran parte de estas modificaciones son reparadas por la ruta de reparación por escisión de base (*BER*), a través de cualquiera de sus dos variantes: trecho corto y trecho largo.

El descubrimiento de la actividad dRP-liasa asociada al dominio de 8 kDa de Pol λ , junto con la demostración de la capacidad de llevar a cabo la reacción *BER in vitro* con proteínas purificadas, alentó la idea de que Pol λ pudiera participar en esta ruta de reparación *in vivo* (García-Díaz y cols., 2001). Además, a pesar de que Pol β es esencial para la ruta *BER* de trecho corto tanto en su paso de síntesis de ADN (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), se ha observado que en ausencia de Pol β las células muestran cierto grado de reparación por esta ruta (Fortini y cols., 1998; Stucki y cols., 1998). Esto implica que *in vivo* existen proteínas capaces de suplir, o al menos aliviar, la ausencia de Pol β . En este sentido, otros estudios han demostrado que es la deficiencia en actividad dRP-liasa, y no en actividad polimerasa, la que provoca el aumento en la sensibilidad a agentes metilantes de las fibroblastos embrionarios deficientes en Pol β (Sobol y cols., 2000). Este dato resalta la importancia de la actividad dRP-liasa *in vivo* y sugiere que un enzima con esta actividad sería la responsable de los niveles residuales de *BER* observados en ausencia de Pol β . Recientemente, ha sido descrita la actividad dRP-liasa de dos nuevas ADN polimerasas, Pol ι (Bebenek y cols., 2001) y Pol γ (Longley y cols., 1998; Pinz y Bogenhagen, 2000), que podrían, junto con Pol λ , asistir a Pol β en esta ruta de reparación *in vivo*.

Con el fin de profundizar en el estudio del rol de Pol λ en esta ruta de reparación *in vivo* se realizaron dos aproximaciones experimentales diferentes. En primer lugar, se utilizó un modelo celular de sobre-expresión de Pol λ basado en técnicas de transducción retroviral en la línea celular murina NIH-3T3 (García-Ortiz, 2003). El empleo de esta técnica permitió obtener tres líneas celulares establemente transducidas, denominadas NIH3T3 VV (vector vacío), utilizada como control del nivel de reparación basal de este tipo celular, NIH3T3 *Sense*, que sobre-expresa la forma murina de Pol λ en grandes cantidades, y NIH3T3 *AS* (*antisense*), que da lugar al ARNm antisentido de Pol λ , provocando la eliminación de los niveles endógenos de Pol λ propios de esta línea celular.

En segundo lugar, la disponibilidad de un modelo murino deficiente en Pol λ (viable y fértil) permitió la obtención de diferentes tejidos para el estudio de los niveles de reparación presentes en cada uno. El estudio se centró inicialmente en testículo, ya que es el tejido en que Pol λ se expresa de manera más abundante y en el que se ha visto un diferente patrón de expresión entre Pol β y Pol λ a lo largo del desarrollo (García-Díaz y cols., 2000). Asimismo, se obtuvieron extractos de cerebro, en el que Pol λ parece tener una expresión predominante en células postmitóticas durante el desarrollo embrionario (García-Ortiz, 2003), y de fibroblastos embrionarios en cultivo, para comparar con los resultados obtenidos previamente con Pol β (Sobol y cols., 1996), dada la letalidad del modelo murino deficiente en esta ADN polimerasa (Sugo y cols., 2000).

Ambas aproximaciones experimentales se encaminaron a la obtención de extractos celulares totales con los que poder realizar ensayos *in vitro* de reparación por *BER*. La

utilización de extractos celulares supone un modelo de estudio biológicamente mucho más relevante, puesto que una gran cantidad de procesos bioquímicos pueden ser analizados en un contexto celular en el que fenómenos como las modificaciones postraduccionales, la inducción o represión de la expresión proteica, o la formación de complejos multiproteicos, están presentes y pueden aportar información muy valiosa. El método utilizado para la obtención de dichos extractos está basado en el descrito por Biade y cols. (1998), cuyos extractos mostraron una mayor actividad específica que los obtenidos por el método clásico propuesto por Manley y cols. (1983), y que resultó ser mucho más sencillo metodológicamente.

El sustrato utilizado en los ensayos *in vitro* de reparación por *BER* consiste en un híbrido de dos oligonucleótidos de ADN, en el que uno de los oligonucleótidos posee una base nitrogenada uracilo frente a una guanina, simulando la situación fisiológica en la que una citosina se desamina dando lugar a un uracilo.

4.1. La sobre-expresión de Pol λ en la línea celular NIH3T3 provoca un aumento en los niveles de reparación por *BER*

Los extractos obtenidos de las líneas celulares NIH3T3 VV y NIH3T3 *Sense*, tras ser cuantificados mediante un ensayo Bradford, fueron empleados en el ensayo de reparación por *BER*. El ensayo, esquematizado en la parte A de la Figura 4.1, consiste en la incubación del extracto celular total con el sustrato de ADN descrito anteriormente y el nucleótido dCTP marcado con el radioisótopo ^{32}P en el fosfato α , con lo que se consigue que, tras la eliminación de la base nitrogenada uracilo (glicosilasa) y el corte en 5' del sitio abásico (AP-endonucleasa), una ADN polimerasa pueda incorporar el nucleótido marcado, señalando el inicio del papel de la polimerasa en esta ruta de reparación. A continuación, la actividad dRP-liasa de la ADN polimerasa elimina el residuo dRP sobrante y una ADN ligasa sella la unión, por lo que el oligonucleótido marcado pasa a tener una movilidad electroforética menor (bajo condiciones desnaturalizantes) debido al aumento de su peso molecular (Figura 4.1, parte A). Este tipo de ensayo tiene la ventaja de poder evaluar dos actividades enzimáticas diferentes en un mismo experimento. La señal correspondiente a un oligonucleótido de 16 bases, refleja el paso de incorporación del nucleótido marcado por la actividad ADN 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.

Al evaluar la capacidad de reparación de los extractos obtenidos a partir de cultivos asincrónicos de las líneas celulares NIH3T3 VV y *Sense*, se observa como apenas existen diferencias en la eficiencia del paso de incorporación (Inc.-; Figura 4.1, parte B), que es reflejo de la actividad ADN polimerasa presente en el extracto. Sin embargo, la cantidad de producto reparado (Rep.-; Figura 4.1, parte B), reflejo de la actividad dRP-liasa y ligasa sobre el sustrato generado en el paso de incorporación (ADN polimerasa), sí que experimenta un aumento significativo en el extracto proveniente de la línea *Sense*. La representación gráfica en función del tiempo de los niveles de incorporación y reparación, expresados en unidades de absorbancia, permite obtener los valores de velocidad de incorporación y velocidad de reparación (valor de la pendiente del ajuste lineal de la representación gráfica). El valor relativo entre las velocidades correspondientes a cada extracto (Vel. *Sense*/ Vel. VV * 100), refleja el incremento a nivel de actividad polimerasa y dRP-liasa de los extractos *Sense* respecto a su control VV, tomado como monitor del nivel de reparación basal de este tipo celular (Figura 4.1, parte C). Partiendo de la

premisa de que los niveles de ADN ligasa presentes en ambos extractos son similares, podemos concluir que la sobre-producción de Pol λ provoca una mejoría en la reparación por la ruta *BER*, debido en gran parte al incremento en la capacidad de eliminación de los grupos dRP, descrito previamente como paso limitante de toda la ruta (Srivastava y cols., 1998).

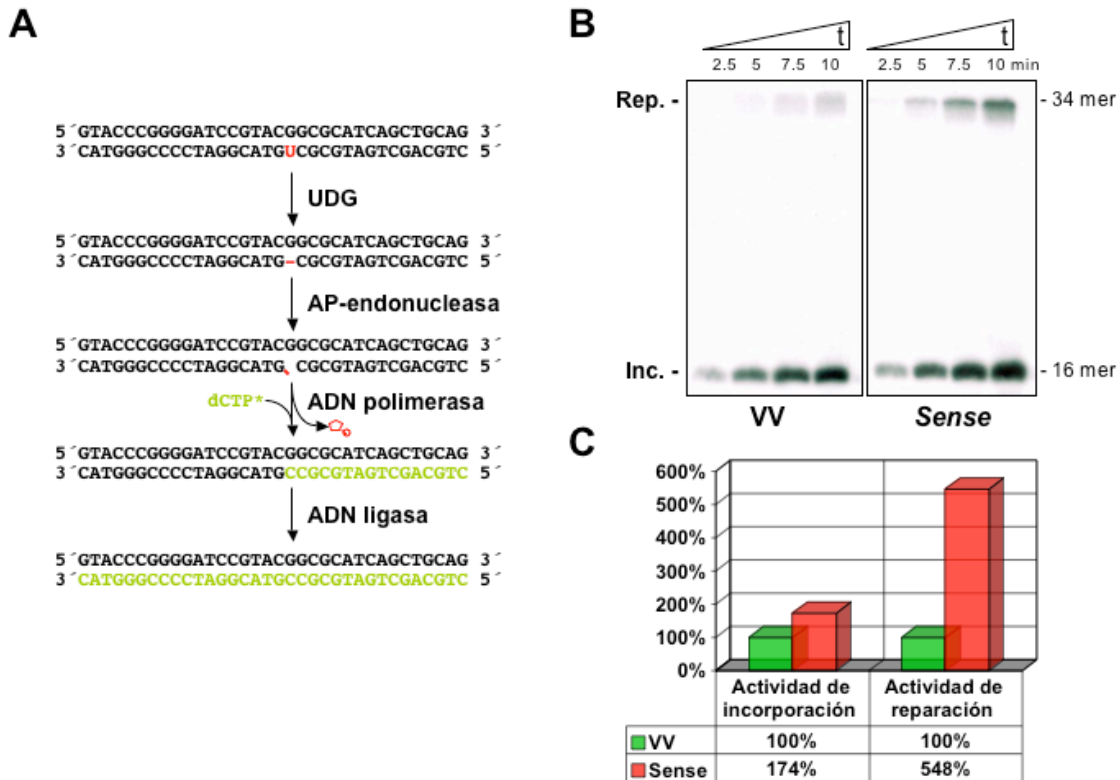


Figura 4.1: La sobre-expresión de Pol λ en la línea celular NIH3T3 provoca un aumento en la capacidad de reparación por *BER*. **A.** Representación esquemática del ensayo de reparación por *BER* en su variante de trecho corto. Una base dañada (uracilo) es eliminada por una ADN glicosilasa específica (uracil ADN glicosilasa, *UDG*). A continuación, una endonucleasa de sitios sin base nitrogenada (AP-endonucleasa) escinde el enlace fosfodiéster en 5' respecto al sitio sin base, generando un residuo desoxirribosa-fosfato (dRP). Posteriormente, una ADN polimerasa con actividad dRP-liasa elimina el residuo dRP e inserta el nucleótido complementario a la base molde del *gap* generado (dCTP frente a dG). Por último, una ADN ligasa restablece la unión entre ambos segmentos de ADN. En verde se representa la porción de ADN marcada radiactivamente en cada paso, gracias al empleo de dCTP marcado con el radioisótopo ^{32}P en el fosfato α . **B.** Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de ADN de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 5 μg . Los componentes de la reacción se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante los tiempos indicados. Los productos de la reacción se separaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes (PA 20%, 8M Urea) y su detección fue realizada por autorradiografía. La aparición de oligonucleótido marcado en una posición equivalente a 16 bases señala el paso de incorporación. La señal de 34 bases refleja el paso de eliminación del grupo dRP y la ligación de ambos fragmentos. **C.** La densitometría de las bandas obtenidas en la autorradiografía permite cuantificar los productos de la reacción. La actividad de incorporación se obtiene de la suma de los valores obtenidos en las bandas de incorporación y reparación (para que haya reparación tiene que ocurrir primero un paso de incorporación), mientras que la actividad de reparación se deduce sólo del valor densitométrico de la banda de 34 bases. Tomando como actividad de incorporación y reparación basal la obtenida con los extractos derivados de la línea NIH3T3 VV, se calcula el incremento relativo obtenido en la actividad de incorporación y reparación con los extractos derivados de la línea NIH3T3 *Sense*.

Sin embargo, esta interpretación debe ser revisada en el contexto del descubrimiento de una mutación puntual (no conservativa) en el ADN codificante de Pol λ , que sería posteriormente clonado en el vector de expresión empleado para la transducción retroviral en el

tipo celular *Sense*. El residuo mutado, situado en el dominio polimerasa, es susceptible de provocar una disminución en la actividad ADN polimerasa del enzima, ya que el citado residuo posee un alto grado de conservación entre diferentes Pol λ eucarióticas, lo que refleja su importancia funcional y/o estructural. Este hecho podría justificar que el aumento en la velocidad de incorporación de las células *Sense* sea tan bajo (174%). Por otro lado, el dominio de 8 kDa de este enzima conserva su secuencia normal, por tanto su actividad enzimática asociada (dRP-liasa) ha de ser completamente funcional. Esto explicaría el aumento en la velocidad de reparación (548%) no acompañado con un aumento equivalente en la velocidad de incorporación.

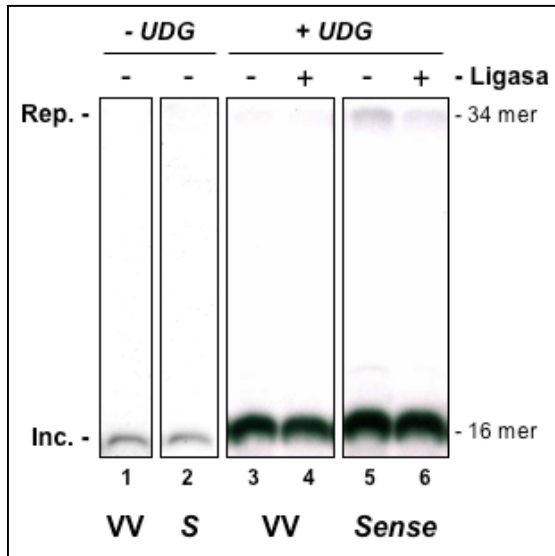


Figura 4.2: Estudios de complementación y daño celular en las líneas celulares NIH3T3 VV y *Sense*. Las células en cultivo fueron incubadas durante una hora en un medio que contenía MMS (3 mM) y H₂O₂ (0.5 mM). Tras esa incubación, se recolectaron las células y se prepararon extractos celulares totales como se describe en Materiales y Métodos. Las reacciones de reparación por *BER* se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de ADN de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 10 μ g. El tratamiento previo del sustrato con *UDG* de *E. coli* fue realizado mediante la incubación del sustrato de ADN con 1 unidad de enzima durante 20 min a 37 °C. Tras esa incubación, el ADN fue inmediatamente empleado en el ensayo *BER*. La cantidad de ADN ligasa del bacteriófago T4 añadida es de 7.5 unidades. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

5). Un incremento similar se obtuvo también con extractos derivados de cultivos celulares no sometidos a estrés oxidativo y alquilante (no mostrado).

Sin embargo, al complementar los extractos con ADN ligasa del bacteriófago T4, los niveles de reparación disminuyeron significativamente en los dos casos (VV y *Sense*) como se

A continuación, quisimos evaluar la capacidad de inducción o activación de esta ruta de reparación en respuesta a un daño celular severo en la célula. Para ello, sometimos a las células en cultivo a una situación de estrés oxidativo y alquilante durante una hora, mediante la adición al medio de cultivo de MMS (3 mM) y H₂O₂ (0.5 mM). Tras el tiempo indicado se recogieron las células y se prepararon extractos celulares totales, llevando como control un grupo de células no sometidas a daño celular. Los extractos obtenidos se evaluaron en la capacidad de reparación por *BER* con el resultado mostrado en la Figura 4.2 (carriles 1 y 2). Los niveles de incorporación y reparación, no sólo no aumentaron como consecuencia del daño, si no que disminuyeron drásticamente tanto en los extractos derivados de la línea *Sense* como de la línea VV, imposibilitando estimar diferencias entre los niveles de reparación de ambas líneas celulares.

Estudios de complementación de estos extractos con proteínas purificadas revelaron que los extractos obtenidos de la línea celular NIH3T3 son deficitarios en actividad *UDG*, ya que el tratamiento previo del sustrato con el enzima *UDG* de *E. coli* provoca un aumento tanto en los niveles de incorporación como de reparación (Figura 4.2, carriles 1 y 2 *versus* 3 y

observa en la Figura 4.2 (carriles 3 y 5 *versus* 4 y 6). Esto podría deberse a que el sustrato óptimo de esta ligasa exógena fuese un ADN de mayor tamaño, lo que justificaría que no aumentasen los niveles de reparación. La reducción en los niveles de reparación podría estar causada por un fenómeno de competencia por el ADN al añadir la ADN ligasa de T4, que podría dificultar la unión de las ADN ligasas propias del extracto, a pesar de que la proteína de T4 no tuviese éxito a la hora de sellar la unión.

A pesar de la reducción en el nivel de reparación global de los extractos derivados de células sometidas a daño celular agudo, sigue observándose una mayor reparación en la línea *Sense* que en la VV (Figura 4.2, carriles 3 y 4 *versus* 5 y 6), lo que apoya un papel de Pol λ en esta ruta de reparación *in vivo*.

4.2. Estudio del efecto de la depleción de Pol λ en extractos derivados de la línea celular NIH3T3

La línea celular NIH3T3 AS produce el ARNm antisentido de Pol λ , lo que en teoría provocaría el cese de la expresión de esta proteína por la degradación celular interna del híbrido. En primer lugar, este modelo celular deficiente en Pol λ es viable, y el ritmo de crecimiento es similar al mostrado por las líneas VV y *Sense*. Estudios de caracterización realizados anteriormente, parecían indicar que el ARN producido no produce el efecto deseado, ya que el análisis por inmunofluorescencia parece mostrar niveles de Pol λ equivalentes a los presentes en la línea VV (García-Ortiz, 2003). Asimismo, cabe reseñar de estos estudios que el ARN antisentido no interfiere en la expresión de Pol β .

A pesar de estos datos *a priori* desalentadores, el análisis mediante el ensayo *BER* de los extractos celulares obtenidos, muestra una disminución significativa en la capacidad de reparación de los extractos AS, ya que no se observa producto reparado y los niveles de incorporación son muy bajos, en comparación con el control de la línea VV (Figura 4.3, carriles 1 y 2 de la parte A), ambos realizados sobre un sustrato de ADN tratado previamente con *UDG*. Este dato confirma que la producción del ARNm antisentido de Pol λ provoca una reducción en los niveles de esta proteína y, como consecuencia, una reducción en la capacidad de reparación de esta línea celular.

El tratamiento de estas células con MMS y H₂O₂, da lugar a un aumento en la capacidad de reparación evaluada a partir de los extractos celulares totales obtenidos (Figura 4.3, carriles 2 y 3 de la parte A). Esto puede ser debido a que los reducidos niveles de Pol λ puedan provocar cambios en el patrón de expresión génica de la célula, cambios que prepararían a la célula para dar respuesta a una situación de daño en el ADN. En los casos de las líneas VV y *Sense*, los niveles basales de proteínas implicadas en reparación quizá fuesen suficientes para reparar el nivel de daño causado, no siendo necesario entrar en una situación de inducción o activación proteica para preservar la integridad del ADN y de la célula.

Cabe reseñar que a pesar del incremento en los niveles de incorporación por el pretratamiento con *UDG* y el daño celular, siguen sin existir niveles relevantes de producto reparado en los ensayos realizados con los extractos derivados de la línea celular AS. Esto podría reflejar, bien una modificación química del sustrato en contacto con el extracto que imposibilitase la reparación por esta ruta, o bien una deficiencia intrínseca del extracto a nivel de actividad dRP-liasa o ligasa.

ADN polimerasa lambda

Con el fin de dilucidar estas posibilidades se realizaron diversos estudios de complementación con proteínas purificadas y de depleción con anticuerpos específicos. En primer lugar, al añadir el anticuerpo monoclonal contra Pol β se observa una reducción en el nivel de incorporación (Figura 4.3, carriles 1 y 2 de la parte B). Esto refleja el conocido papel activo de Pol β en esta ruta y sirve de control para saber los niveles de actuación de este enzima en esta línea celular, que parecen ser mínimos. El nivel de actividad residual observado puede estar mediado por cualquiera de las otras dos ADN polimerasas que poseen actividad dRP-liasa: Pol ι y Pol γ , que a pesar de ser estrictamente mitocondrial, podría tener acceso al sustrato al utilizar extractos celulares totales. Asimismo, ya que no se observa producto ligado alguno que refleje la eliminación del grupo dRP, cualquier ADN polimerasa que pudiera polimerizar en un *gap* con un residuo dRP en el extremo 5' del *gap*, podría ser la responsable de la incorporación residual.

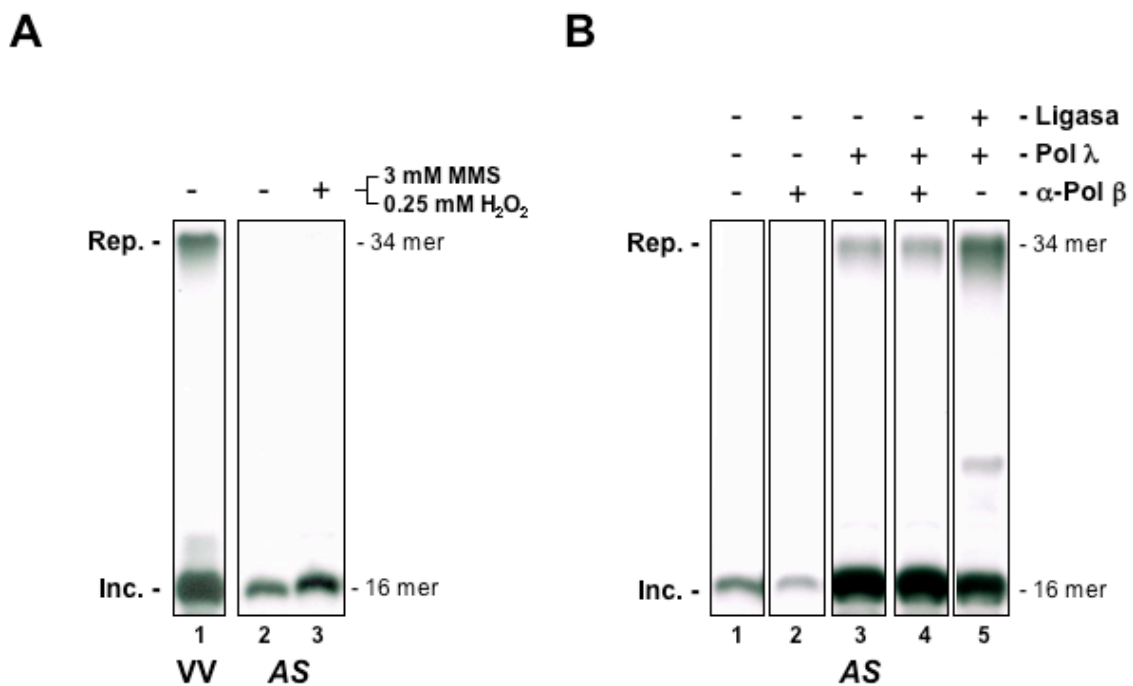


Figura 4.3: Estudios de complementación y daño celular en la línea celular NIH3T3 AS. A. Capacidad de reparación por BER de la línea celular NIH3T3 AS y efecto de una situación de estrés oxidativo en dicha capacidad. Las células en cultivo fueron incubadas durante una hora en un medio que contenía MMS (3 mM) y H₂O₂ (0.5 mM). Tras esa incubación, se recolectaron las células y se prepararon extractos celulares totales como se describe en Materiales y Métodos. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de ADN de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 10 μ g. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min. **B.** Estudios de complementación con la línea NIH3T3 AS. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de ADN de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 10 μ g. De forma exógena se añadió anticuerpo policlonal contra Pol β en la cantidad necesaria para una eficiente neutralización, así como Pol λ purificada (50 nM) y ADN ligasa de T4 (7.5 unidades). Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

La complementación del extracto AS con Pol λ purificada da lugar a un aumento muy significativo en los niveles de incorporación y reparación (Figura 4.3, carriles 1 y 3 de la parte B), lo que parece indicar que la deficiencia en producto reparado viene dada por una carencia en actividad dRP-liasa y no en actividad ligasa. Asimismo, tampoco parece provocada por una modificación química del sustrato que evite su procesamiento por el mecanismo de β -

eliminación de la actividad dRP-liasa. Esto se confirmó con la utilización de la variante de Pol λ correspondiente al núcleo tipo Pol β , que muestra unos niveles de actividad dRP-liasa mucho mayores que la proteína completa. Al complementar los extractos con esta proteína se observan unos niveles de incorporación y reparación mucho mayores aún (no mostrado), descartando la hipótesis de un déficit en actividad ligasa o una modificación química del sustrato.

La adición simultánea de Pol λ purificada y anticuerpo anti-Pol β produce el mismo resultado que la adición única de Pol λ , lo que indica que este anticuerpo no reconoce epítipo alguno en Pol λ (Figura 4.3, carriles 3 y 4 de la parte B). Por último, y al contrario de lo que sucede en las líneas VV y *Sense*, la adición de ADN ligasa procedente del bacteriófago T4 sí que produce un aumento en los niveles de producto reparado (Figura 4.3, carriles 3 y 5 de la parte B). Resultados equivalentes se obtuvieron con extractos obtenidos a partir de células en cultivo sometidas a estrés oxidativo y alquilante (no mostrado).

4.3. Reparación con extractos derivados de los tejidos obtenidos del modelo murino deficiente (*KO*) en Pol λ

El modelo murino deficiente en Pol λ es viable, fértil y muestra una longevidad similar a la variante silvestre. La única diferencia macroscópica significativa es que muestra un tamaño mayor que la variante silvestre.

El estudio inmunohistoquímico de los testículos de los ratones *KO* no reveló una sobreproducción compensatoria de Pol β en respuesta a la ausencia de Pol λ (García-Ortiz, 2003). 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 λ en procesos de meiosis producidos durante el desarrollo post-natal de los testículos (García-Ortiz, 2003).

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 entre los segmentos génicos V(D)J de los ratones *KO* y silvestre, han demostrado un papel de Pol λ en la recombinación de los segmentos génicos correspondientes a la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Bertocci y cols., 2006). Asimismo, sí han sido detectadas sutiles diferencias durante el desarrollo del sistema hematopoyético a nivel de las diferentes poblaciones celulares (García-Ortiz, 2003).

El aislamiento e inmortalización de fibroblastos embrionarios (*MEFs*) permitió disponer de un modelo de estudio estandarizado. Los *MEFs KO* 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 λ , que provocase que llegado cierto punto, las células se divadiesen más lentamente (García-Ortiz, 2003).

Dadas estas premisas nos propusimos el estudio de la capacidad de reparación por *BER* de los extractos derivados de testículo, cerebro y *MEFs*. De los resultados obtenidos (Figura 4.4), se deduce que tanto los *MEFs* como los extractos derivados de testículo son competentes a la hora de completar la reparación del sustrato empleado mediante el mecanismo *BER*, aunque los obtenidos de testículo son mucho más eficientes, ya que con una menor masa total añadida (10 μ g), son los que mayor nivel de incorporación y reparación muestran. Este dato tiene

sentido ya que el testículo es un tejido donde se han descrito altos niveles de reparación por esta ruta (Intano y cols., 2001; Olsen y cols., 2001). Sin embargo, tanto en testículo como en los *MEFs*, la deficiencia en Pol λ no provoca un descenso en los niveles de incorporación ni de reparación por este mecanismo.

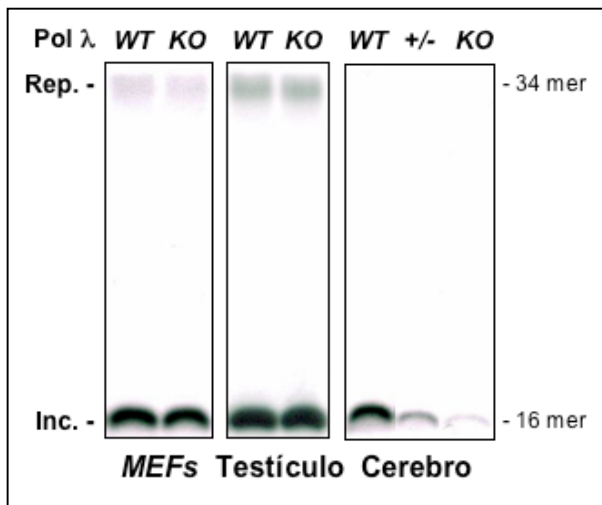


Figura 4.4: Estudio de la capacidad de reparación de los tejidos y células derivadas del modelo murino deficiente en Pol λ . Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de ADN de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 15 μ g para los *MEFs*, 10 μ g para los extractos de testículo y 20 μ g para los extractos de cerebro. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

La expresión en testículo de Pol λ durante el desarrollo post-natal (pn) muestra un carácter marcadamente regulado (García-Díaz y cols., 2000; Figura 4.5, parte A). El análisis de los ARNm presentes durante el desarrollo post-natal muestra como hasta el día 15 de desarrollo no se comienza a producir una acumulación significativa, alcanzando niveles máximos el día 16. Hasta este punto del desarrollo, los niveles de expresión de Pol λ y Pol β discurren por sendas paralelas, sin embargo, a partir del día 16 Pol λ mantiene unos niveles de ARNm altos hasta el día 22 donde alcanza otro máximo. Por el contrario, los niveles de ARNm de Pol β disminuyen significativamente a partir del día 16, manteniéndose en niveles mínimos hasta el día 28 de desarrollo post-natal donde hallamos un repunte de la expresión. En tejido adulto, los ARNm de Pol β son preponderantes, mostrando niveles máximos dentro del estudio realizado, mientras que los ARNm de Pol λ muestran un nivel alto, pero muy por debajo de los de Pol β e inferiores a los máximos observados en los días 16 y 22. Estos datos, junto con los obtenidos del estudio de las poblaciones celulares testiculares (García-Ortiz, 2003), parecen indicar que Pol λ tendría un papel más relevante durante el desarrollo post-natal que en el tejido adulto, por lo que decidimos obtener tejidos de diferentes días de desarrollo para comprobar esta hipótesis. En primer lugar, obtuvimos tejidos de ratones de 12 días de desarrollo, en los que se supone que tanto Pol λ como Pol β muestran niveles muy bajos. También obtuvimos tejidos de ratones de 19 días de vida, en los que la diferencia entre los niveles de ARNm de Pol λ y Pol β se hace máxima en favor de Pol λ , y en los que se había observado el déficit de células haploides en los ratones *KO*. Por último, se llevó como control extractos derivados de tejido adulto, donde la relación entre Pol λ y Pol β es máxima a favor de Pol β .

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la Figura 4.5. Al emplear extractos testiculares derivados de ratones silvestres y *KO* de 12 días de vida, se observan significativos niveles de incorporación y reparación en ambos casos, aunque siendo ambos llamativamente superiores en los extractos *KO*. En primer lugar, hay que destacar que a pesar de los bajos niveles de ARNm de Pol β y Pol λ detectados, los niveles de reparación son altos. El

hecho de que los niveles de incorporación y reparación aumenten en el extracto *KO* puede reflejar procesos de activación proteica sobre Pol β o procesos de expresión compensatoria de alguna otra ADN polimerasa con actividad dRP-liasa (Pol ι o Pol γ), ya que estudios previos no detectaron una expresión compensatoria de Pol β (García-Ortiz, 2003).

Los resultados del día 19 post-natal muestran una reducción a nivel de producto reparado en los extractos *KO* (Figura 4.5, parte B), lo que concuerda con las diferencias de expresión observadas en este punto del desarrollo (Figura 4.5, parte A), y apoya un papel fundamental de Pol λ en reparación por *BER* durante el desarrollo post-natal en testículo, donde ha sido descrita su expresión predominante (García-Díaz y cols., 2000).

En tejido adulto, la ausencia de Pol λ no provoca descenso alguno en los niveles de reparación (Figura 4.5, parte B), lo que es consistente con la expresión masiva y mayoritaria de Pol β (Figura 4.5, parte A).

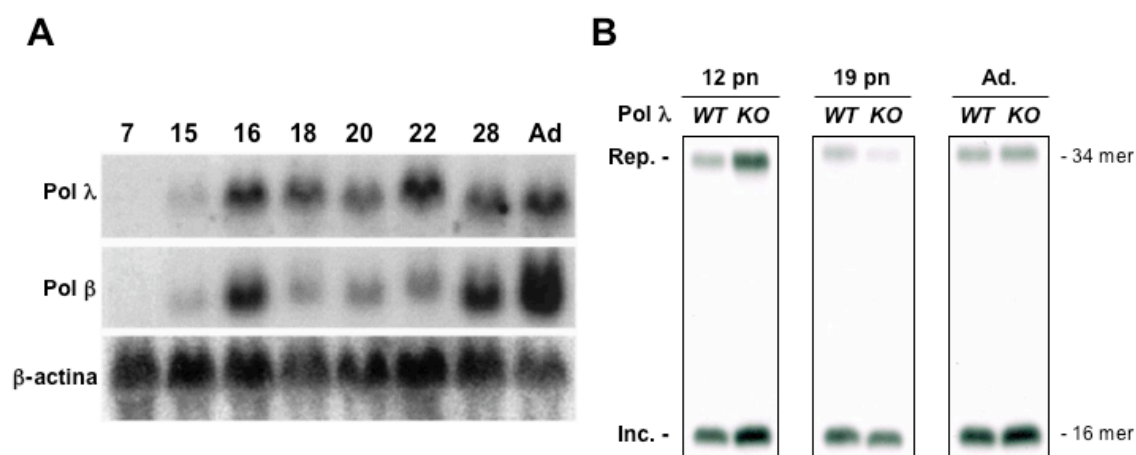


Figura 4.5: Estudio de la capacidad de reparación de extractos obtenidos de testículos de diferente desarrollo post-natal. **A.** Expresión génica en testículo de Pol β y Pol λ . Detección mediante la técnica de *Northern Blot* del ARN mensajero de Pol β y Pol λ durante el desarrollo post-natal en testículo. El análisis del ARNm de β -actina se muestra como control de carga. Figura tomada de García-Díaz y cols., 2000. **B.** 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 ADN de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 5 μ g. Los componentes de la reacción se incubaron a 37 °C durante 10 min.

Reseña aparte merece el resultado obtenido con los extractos obtenidos de cerebro de ratones silvestres, heterocigotos y *KO* para el gen de Pol λ . En primer lugar, se trata de los extractos menos activos de los tres estudiados, ya que requieren la mayor cantidad de extracto (20 μ g) y muestran los menores niveles de incorporación de los tres. También cabe destacar el hecho de que no aparezca ni siquiera una traza de producto reparado, lo que podría reflejar un déficit en actividad ligasa. Pero lo más importante es que la deficiencia en Pol λ se traduce en una reducción en los niveles de incorporación observados, ya que la delección de uno de los alelos del gen (+/-) provoca un claro descenso en la incorporación, que se ve acentuado al deleccionar ambos alelos (*KO*). La densitometría de gel permite expresar en términos numéricos el descenso observado en los extractos derivados del individuo heterocigoto y del individuo *KO*. El valor obtenido ronda un 75% en el caso del heterocigoto, mientras que en el *KO* el descenso

alcanza un valor de hasta un 90%. Este descenso demuestra un papel significativo de Pol λ en la ruta de reparación *BER* en cerebro.

4.4. Evaluación de la capacidad de Pol λ de participar en la ruta *BER* de trecho largo

Hasta este punto nos hemos centrado en el estudio de la ruta de reparación *BER* de trecho corto. Sin embargo, Pol λ ha sido propuesta como candidata a participar en la variante de trecho largo, dada su capacidad intrínseca de síntesis asociada a desplazamiento de banda (García-Díaz y cols., 2002). En los resultados expuestos a lo largo de este capítulo no hay evidencias que apoyen el papel de Pol λ en esta variante de la ruta *BER*. Sin embargo, el sustrato utilizado no requería de la ruta de trecho largo para ser reparado, ya que el residuo dRP generado por la acción de la AP-endonucleasa es perfectamente escindible por la actividad dRP-liasa aportada al extracto por diferentes ADN polimerasas.

Ha sido descrito anteriormente que la acción de agentes químicos reductores u oxidantes sobre un ADN de doble cadena con un sitio abásico, produce diferentes modificaciones químicas que impiden la escisión del grupo dRP a través del mecanismo de β -eliminación, ya que no puede formarse el intermedio en forma de base de Schiff, imprescindible durante la catálisis de la actividad dRP-liasa (Hadi y Goldthwait, 1971). Modificaciones similares pueden producirse *in vivo* debido a la abundante presencia de radicales hidroxilo u otras especies reactivas de oxígeno.

El sustrato para estos ensayos se generó en dos pasos (Figura 4.6, parte A). En primer lugar, tratamiento con *UDG* para eliminar la base nitrogenada del híbrido de doble cadena, y a continuación, incubación con borhidruro sódico (NaBH_4) para reducir el sitio abásico.

Este sustrato fue sometido a ensayos de reparación por los extractos obtenidos de las líneas NIH3T3 (VV, *Sense* y *AS*), así como por los extractos derivados del ratón deficiente en Pol λ (*MEFs*, testículo y cerebro).

En el caso de los extractos derivados de las líneas celulares NIH3T3 (Figura 4.6, parte B), sólo se observan escasos niveles de producto reparado en los extractos derivados de las líneas VV y *Sense*, a pesar de los altos niveles de incorporación obtenidos en los tres casos. La ausencia de producto reparado en los extractos *AS* apoya un papel de Pol λ en la ruta *BER* de trecho largo. Sorprendentemente, no se observan productos de extensión de mayor peso molecular que reflejen la adición de más de un nucleótido al oligonucleótido susceptible de ser reparado, salvo en el caso de los extractos NIH3T3 VV y *Sense*, que se observa una leve banda de menor movilidad que la que refleja el paso de incorporación.

En línea con los conocimientos sobre Pol λ y sus propiedades bioquímicas, se realizaron diversas pruebas en las que se complementaba el ensayo con iones Mn^{2+} , bajo la acción de los cuales Pol λ es capaz de llevar a cabo una síntesis asociada a desplazamiento de banda de forma eficiente. Sin embargo, la adición de iones Mn^{2+} a la reacción enzimática no mejoró la capacidad de reparación a través de la ruta *BER* de trecho largo (no mostrado).

En el caso de los extractos derivados de tejidos y células de ratón, no se observa producto reparado en ningún caso, a pesar de tener altos niveles de incorporación (Figura 4.6, parte C). De nuevo, resulta muy interesante el resultado obtenido con los extractos derivados de cerebro, en los que los niveles de incorporación muestran una dependencia clara de la presencia

de Pol λ . Sin embargo, los extractos derivados de *MEFs* y testículo no muestran una carencia de incorporación por la ausencia de Pol λ .

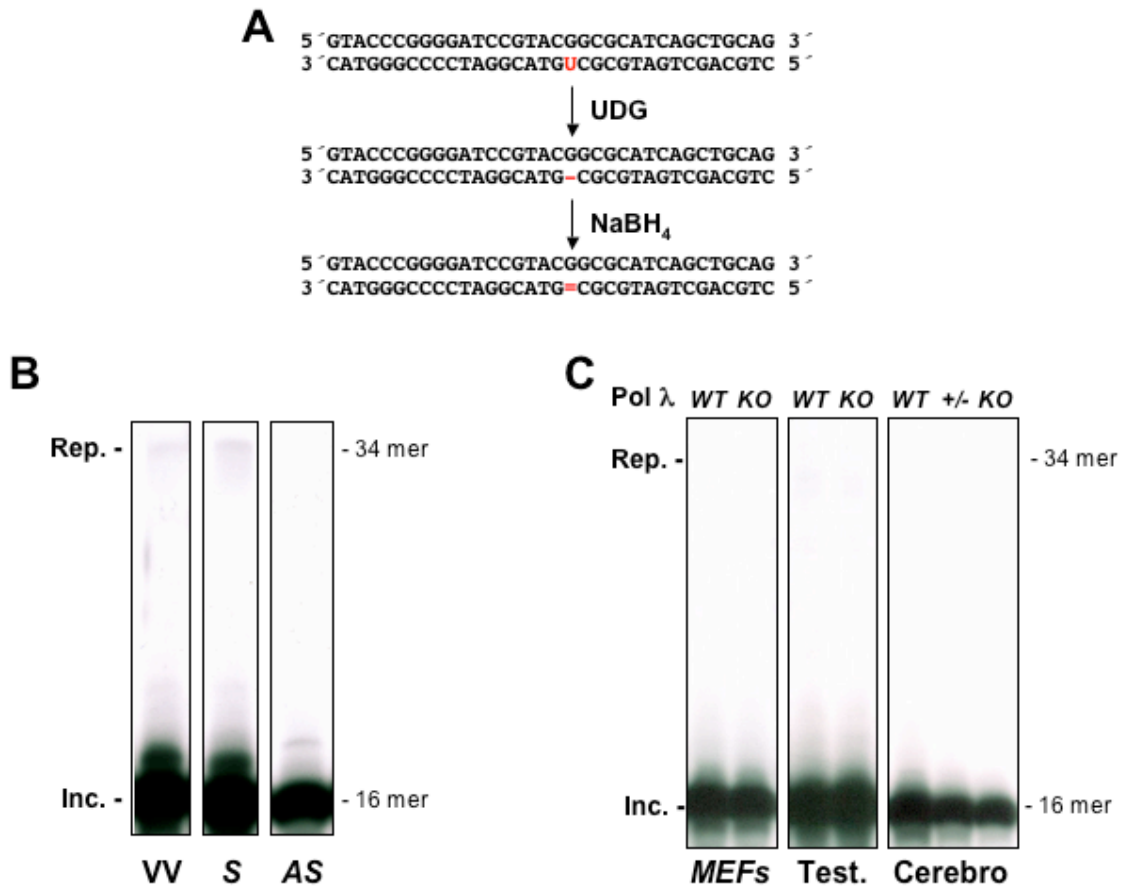


Figura 4.6: Estudio de la participación de Pol λ en la ruta BER de trecho largo. **A.** Representación esquemática de la generación del sustrato de ADN empleado en el estudio. Tras la eliminación de la base nitrogenada por el enzima *UDG*, se incuba el sustrato durante 20 min con borhidruro sódico (NaBH_4 , 340 nM) para reducir el sitio abásico, y por último se precipita con etanol para eliminar el borhidruro sódico. **B.** Análisis de la capacidad de reparación por la variante de trecho largo de la ruta BER de extractos celulares totales derivados de las líneas celulares NIH3T3 VV, *Sense* y AS. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de ADN de 100 nM y una cantidad de extracto celular total de 10 μg . **C.** Análisis de la capacidad de reparación por la variante de trecho largo de la ruta BER de extractos celulares totales derivados de tejidos y células del modelo murino deficiente en Pol λ . Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando una concentración de ADN 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.

En este último apartado puede que nos enfrentemos a un problema de diseño experimental. La reparación por BER de trecho largo es estrictamente dependiente de PCNA (Matsumoto y cols., 1994; Frosina y cols., 1996), ya que sin su presencia se hace inviable la acción de las ADN polimerasas δ y ϵ , que han de intervenir tras la actuación inicial de Pol β . Además, PCNA posee una estructura toroidal que le permite alojar en su interior al ADN de doble cadena y deslizarse a través de su estructura, motivo por el cual sólo permanece unido establemente a un ADN de tipo circular (una vez cargado por el factor de replicación C; revisado por Majka y Burgers, 2004), o a uno de tipo lineal que no tenga los extremos libres, de forma que se impida el deslizamiento de PCNA fuera de la molécula. En nuestro caso, al utilizar un sustrato de ADN de tan solo 34 pares de bases, resulta complicado asumir una unión de

ADN polimerasa lambda

PCNA lo suficientemente estable para que Pol δ y Pol ϵ puedan ejercer su función en esta ruta. Este puede ser el motivo por el que no observamos ningún producto reparado al utilizar el sustrato reducido. Habría que disponer de un sustrato de ADN circular de doble cadena con un uracilo en algún punto de su secuencia para esclarecer el posible papel de Pol λ en el mecanismo de reparación *BER* de trecho largo.

5

Acetilación de Pol β y Pol λ

Las ADN polimerasas β y λ han sido implicadas en la ruta de reparación por escisión de base (*BER*), tanto *in vitro* (Kubota y cols., 1996; García-Díaz y cols., 2001), como *in vivo* (Sobol y cols., 1996; Braithwaite y cols., 2005b). Para esta ruta de reparación resulta fundamental la capacidad de eliminación del residuo desoxirribosa-fosfato (dRP) generado durante el proceso. Ambas polimerasas son capaces de eliminar este residuo gracias a su actividad dRP-liasa. La actividad dRP-liasa implica la formación de un complejo enzima-ADN en forma de base de Schiff, a través de una lisina (Lys72 de Pol β y Lys312 de Pol λ) del dominio de 8 kDa que actúa como nucleófilo (Deterding y cols., 2000; Matsumoto y cols., 1998; Prasad y cols., 1998b; García-Díaz y cols., 2001).

p300 y su homólogo CBP (*Creb binding protein*) son coactivadores transcripcionales que interactúan con gran cantidad de factores de transcripción específicos de secuencia (revisado por Goodman y Smolik, 2000), y que ejercen su función de dos formas diferentes. En primer lugar, activan la transcripción reclutando a la ARN polimerasa II a través de su interacción física con diversos factores de transcripción (revisado por Goodman y Smolik, 2000). En segundo lugar, acetilan las histonas gracias a su dominio histona acetil transferasa (HAT) (Ogryzko y cols., 1996), lo que provoca una apertura en la estructura de la cromatina que facilita la unión de los factores de transcripción (Utley y cols., 1998).

Estudios recientes han sugerido la participación de p300 y CBP en procesos relacionados con la reparación del ADN. p300 interactúa con PCNA (Hasan y cols., 2001a), y acetila, tanto *in vitro* como *in vivo*, a FEN1, provocando una reducción en su afinidad por el ADN, que se traduce en un descenso de su actividad endonucleolítica (Hasan y cols., 2001b). Asimismo, se ha demostrado la interacción física y funcional entre p300 y Pol β (Hasan y cols., 2002). Esta interacción desemboca en la acetilación de Pol β , fundamentalmente en el residuo Lys72 del dominio de 8 kDa, lo que provoca un drástico descenso en su actividad dRP-liasa, conservando intactas sus actividades ADN polimerasa y AP-liasa (Hasan y cols., 2002).

Esta modificación química de Pol β puede formar parte de un mecanismo de regulación de la ruta *BER*. Puede ser una forma de inactivar a Pol β una vez que haya realizado su función, para así poder proceder con el paso de ligación del ADN. También podría constituir un mecanismo de regulación entre la ruta *BER* de trecho corto (dRP-liasa dependiente), y la de trecho largo (dRP-liasa independiente). Por el contrario, podría tratarse de una forma de impedir el acceso de Pol β a determinados sustratos, facilitando la entrada de otras ADN polimerasas con actividad dRP-liasa, como son Pol γ , Pol ι y Pol λ . En este sentido sería muy interesante evaluar la posible acetilación de estas ADN polimerasas y el efecto que esa posible acetilación tuviera en sus diferentes actividades enzimáticas. En nuestro caso, gracias a la colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Michael O. Hottiger (Institute of Veterinary Biochemistry and Molecular Biology, University of Zürich), responsable de los estudios realizados con Pol β , decidimos estudiar la posible modificación química de Pol λ a través de p300, así como sus posibles consecuencias sobre las actividades ADN polimerasa y dRP-liasa.

5.1. Pol λ es acetilable *in vitro*

Para demostrar la acetilación de Pol λ *in vitro* por p300 se utilizaron dos estrategias diferentes. En primer lugar, se utilizó el dominio histona acetil transferasa (HAT) de p300 expresado como producto de fusión con la proteína GST en un sistema heterólogo (*E. coli*), lo

ADN polimerasa lambda

que permite su rápida purificación a partir del extracto bacteriano. En segundo lugar, la proteína p300 completa fue expresada en baculovirus y purificada a homogeneidad. Ambas proteínas fueron incubadas con acetil-CoA marcado radiactivamente, y las ADN polimerasas Pol β , Pol λ y el mutante puntual de ésta última K312A. Esta mutación en el dominio de 8 kDa de Pol λ provoca una caída del 90% en su actividad dRP-liasa, lo que demuestra que se trata del principal residuo responsable de la catálisis enzimática (García-Díaz y cols., 2001).

El resultado de estos ensayos se muestra en la Figura 5.1. En la parte A se muestra el resultado del ensayo de acetilación con el dominio HAT y en la parte B se muestra el resultado obtenido con la proteína completa p300. En la parte izquierda de cada ensayo se muestra la tinción con Coomassie del gel SDS-PAGE en el que se resolvieron las muestras una vez realizada la incubación. En la parte derecha se muestra la autorradiografía del mismo gel, en la que se puede observar la incorporación de radiactividad consecuencia de la acetilación de las proteínas *in vitro*.

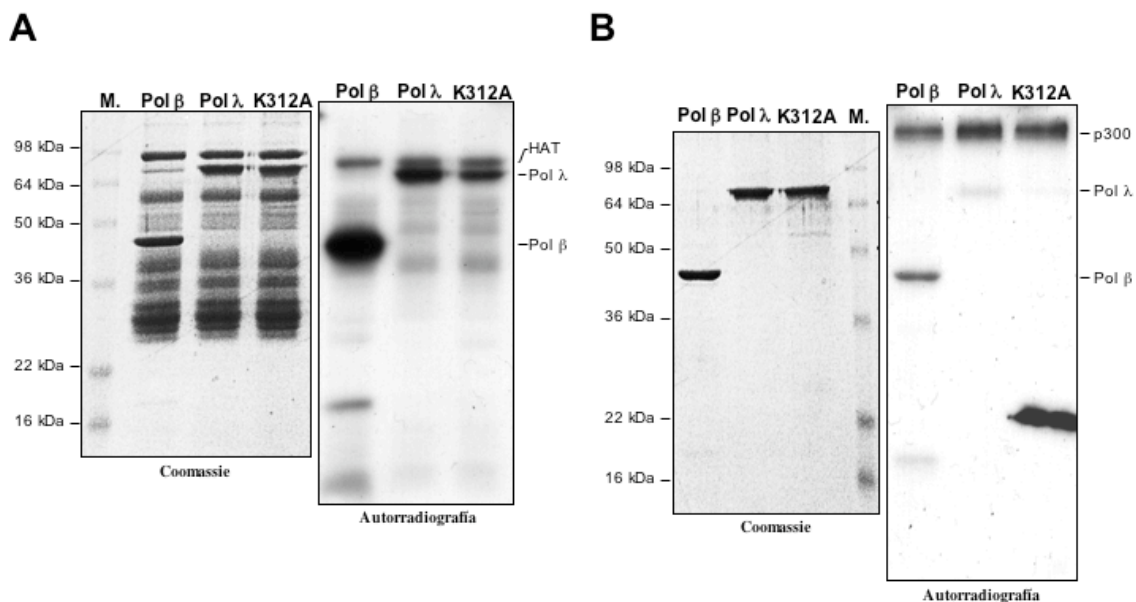


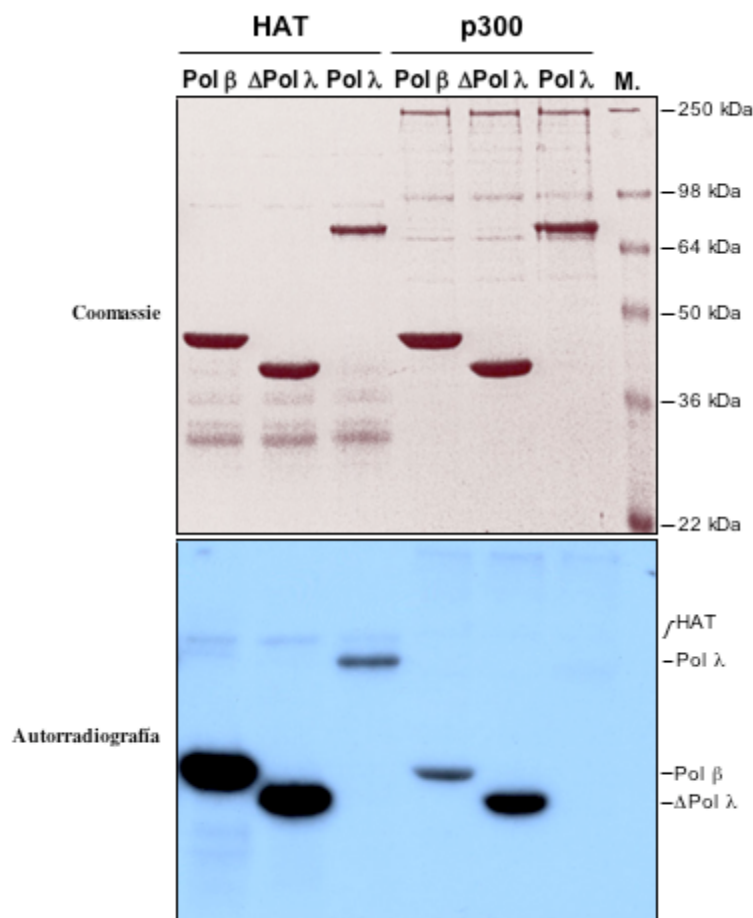
Figura 5.1: Pol λ es acetilada *in vitro*. **A.** El dominio histona acetil transferasa (HAT) de p300 acetila a Pol λ y Pol β . El dominio HAT de p300, fusionado a la proteína GST, fue expresado y purificado de *E. coli*. La incubación del dominio HAT con Pol β , Pol λ y el mutante puntual de Pol λ K312A (5 μ g) da lugar a la acetilación de todas las ADN polimerasas. En la parte izquierda se observa la tinción con Coomassie del gel de poliacrilamida-SDS en el que se cargaron los productos de la reacción de acetilación. En la parte derecha se expone la autorradiografía del mismo gel. **B.** La proteína p300 completa acetila a Pol λ y Pol β . La incubación de la proteína p300 completa (expresada y purificada de baculovirus) con Pol β , Pol λ y el mutante puntual de Pol λ K312A (5 μ g) da lugar a la acetilación de ambas ADN polimerasas, aunque en menor cuantía que con el dominio HAT. En la parte izquierda se observa la tinción con Coomassie del gel de poliacrilamida-SDS en el que se cargaron los productos de la reacción de acetilación. En la parte derecha se expone la autorradiografía del mismo gel.

El resultado de ambos ensayos fue positivo. Pol λ es acetilada *in vitro* tanto por el dominio HAT de p300, como por la proteína completa, aunque con menor eficiencia. En la parte A de la Figura 5.1, se observa como la acetilación de Pol λ por el dominio HAT es menor que la de Pol β (a igualdad de masas como se observa en la tinción con Coomassie). El mutante de Pol λ deficiente en actividad de dRP-liasa (K312A) muestra un nivel de acetilación algo reducido respecto a la proteína silvestre. Este dato es muy relevante, ya que en el caso de Pol β , el mutante equivalente (K72A) muestra una reducción casi total del nivel de acetilación, lo que

5. Acetilación de Pol λ y Pol β

demuestra que la Lys72 es la diana principal del proceso de acetilación en Pol β (Hasan y cols., 2002). Comparando la tinción con Coomassie y la autorradiografía, cabe reseñar la especificidad y eficiencia global del proceso de acetilación *in vitro*, a pesar de la heterogeneidad del extracto bacteriano (Figura 5.1, parte A). Asimismo, se observa la auto-acetilación del dominio HAT de p300.

Por otro lado, la proteína p300 completa no muestra una actividad específica muy alta, como se observa en la parte B de la Figura 5.1. Aun así, se observa el mismo resultado que en la parte A. Tanto Pol β como Pol λ son acetiladas por p300, aunque la primera de forma más eficiente. En este caso se hace más patente la diferencia en el nivel de acetilación entre Pol λ y su mutante K312A, lo que parece indicar que este residuo podría ser una de las dianas del proceso, aunque la acetilación residual observada en la parte A, sugiere que no sería la única. En este caso, también se observa la auto-acetilación de p300.



Desde un punto de vista cuantitativo, los niveles de acetilación observados en Pol λ son claramente inferiores a los de Pol β . Mientras que para Pol β la acetilación alcanza en torno a un 90% de la proteína total, en el caso de Pol λ se acetila tan solo un 25% de la proteína, lo que puede enmascarar el efecto de la acetilación en las actividades dRP-liasa y ADN polimerasa.

La reducción tan significativa en el nivel de acetilación de Pol λ respecto a Pol β , podría ser reflejo de diferencias específicas a nivel de su núcleo conservado, o podría ser consecuencia de un efecto de apantallamiento ejercido por la parte N-terminal de Pol λ (dominio BRCT, dominio Ser/Pro), ausente en Pol β , que evitaría la modificación química del núcleo conservado

de Pol λ . Para dilucidar esta cuestión sometimos a la forma truncada de Pol λ (Δ Pol λ), correspondiente al núcleo conservado tipo Pol β , a un ensayo de acetilación *in vitro*, mediante la incubación con el dominio HAT o la proteína completa p300, ambos en presencia de acetil-CoA marcado radiactivamente.

La forma truncada de Pol λ es acetilada *in vitro* por el dominio HAT y también por la proteína p300 (Figura 5.2). Sin embargo, la eficiencia del proceso aumenta significativamente respecto a la forma completa de Pol λ , acercándose a los niveles de Pol β en el caso del dominio HAT, y superándolos claramente en el caso de la proteína p300 completa. Esto parece indicar que la parte N-terminal de Pol λ podría estar previniendo la acetilación de la proteína, o al menos ejerciendo un papel regulador de este proceso. Los altos niveles de acetilación de la forma truncada de Pol λ permitirán, al contrario de lo que sucede con la proteína completa, caracterizar el efecto de la acetilación sobre las propiedades bioquímicas del enzima, sin temer a un efecto de fondo del fenotipo de la proteína no acetilada.

Una vez demostrada la acetilación de Pol λ , nos propusimos evaluar el efecto de esta modificación química en sus dos actividades enzimáticas: la actividad dRP-liasa y la actividad ADN polimerasa.

5.2. Pol λ conserva intacta su actividad dRP-liasa a pesar del proceso de acetilación

Antes de evaluar el efecto de la acetilación en las actividades enzimáticas de Pol λ , quisimos comprobar la capacidad de unión al ADN de la forma acetilada de Pol λ en comparación con la forma no acetilada. Este dato es crucial, ya que se podría confundir una falta de actividad enzimática con un defecto de unión que, en último término, provocase un descenso en la eficiencia catalítica del enzima. De esta forma, realizamos diferentes ensayos de retraso en gel para evaluar la estabilidad de unión al ADN de Pol λ acetilada. En el ejemplo de la Figura 5.3, se observa como ambas formas (acetilada y no acetilada con el dominio HAT) de la forma truncada de Pol λ , forma que más se acetila *in vitro* (Figura 5.2), se unen con la misma estabilidad a un ADN tipo *gap* de un nucleótido y grupo fosfato en 5', sustrato idóneo de Pol λ . La ligera diferencia en la movilidad electroforética de ambos complejos puede ser debida a la acetilación de los residuos de Pol λ . Una vez comprobado que la acetilación no impide la unión de Pol λ al ADN, nos dispusimos a evaluar el efecto de la acetilación en su actividad dRP-liasa.

La acetilación de Pol β , en su mayoría producida en el residuo Lys72, provoca un drástico descenso en su actividad dRP-liasa, debido al impedimento que esta modificación ejerce sobre esta lisina a la hora de actuar como nucleófilo durante el proceso de escisión del grupo dRP (Hasan y cols., 2002).

En el ensayo para evaluar la actividad dRP-liasa se utiliza un ADN de doble cadena que posee en su parte central un par G·U, que simula la desaminación espontánea o inducida de una citosina, situación que se produce de forma habitual en la célula. El oligonucleótido que posee el uracilo se marca radiactivamente en su extremo 3' gracias a la adición mediante TdT de un didesoxinucleótido (3' H) marcado en su fosfato α con el radioisótopo ^{32}P . Se emplea un didesoxinucleótido para evitar la adición de más de un nucleótido por oligonucleótido, consiguiendo así una población homogénea de oligonucleótidos del mismo peso molecular. El esquema del ensayo dRP-liasa se esquematiza en la parte A de la Figura 5.4. En primer lugar, se incubaba el sustrato marcado con el enzima *UDG*, que elimina la base nitrogenada uracilo. A

continuación, se añade el enzima AP-endonucleasa, que realiza un corte en 5' del sitio abásico, dando lugar a un extremo 3'OH y un extremo 5' desoxirribosa-fosfato (dRP), que será el sustrato para la acción de la actividad dRP-liasa. La acción de esta actividad se detecta por un aumento en la movilidad electroforética (condiciones desnaturalizantes) del oligonucleótido marcado, como consecuencia de la reducción de su peso molecular debido a la escisión del grupo dRP.

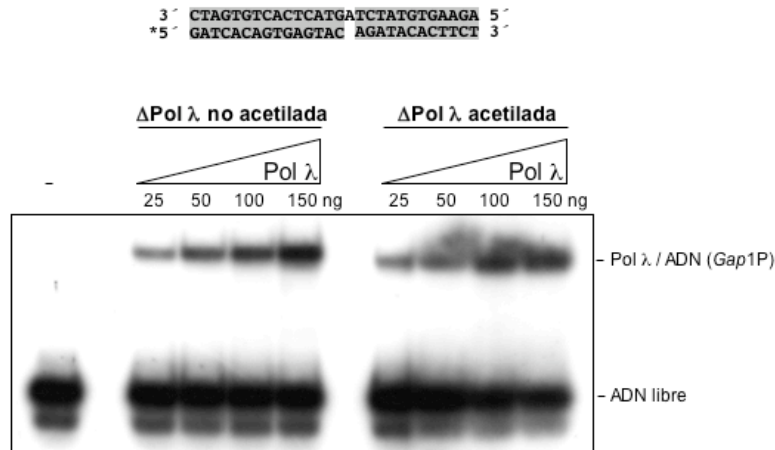


Figura 5.3: Las formas acetilada y no acetilada de Pol λ se unen con la misma estabilidad al ADN. Ensayo de retraso en gel (ver Materiales y Métodos) en el que se evalúa la capacidad de formar un complejo estable de la forma truncada de Pol λ (Δ Pol λ) con una ADN tipo *gap* de un nucleótido y grupo fosfato en 5'. En la parte superior de la figura se muestra la secuencia de la molécula de ADN empleada en el ensayo. El asterisco señala el oligonucleótido marcado radiactivamente.

Como se observa en la parte B de la Figura 5.4, tanto la forma truncada como la forma completa de Pol λ conservan su actividad dRP-liasa intacta a pesar de sufrir el proceso de acetilación. Sin embargo, Pol β ve reducida casi completamente su actividad dRP-liasa, como había sido previamente descrito (Hasan y cols., 2002). La forma truncada de Pol λ posee mayor actividad dRP-liasa que la forma completa, lo que parece indicar que la zona N-terminal de Pol λ podría interferir de alguna forma en la catálisis de la actividad dRP-liasa. La forma truncada de Pol λ no sometida a la reacción de acetilación, sea ésta en presencia (forma acetilada) o ausencia (forma no acetilada) de acetyl-CoA, se expone como control positivo de la reacción y sirve para detectar cierto indicio de pérdida de actividad de Pol λ como consecuencia de la reacción de acetilación en sí misma.

Estos resultados demuestran que la acetilación de Pol λ no afecta a su actividad dRP-liasa. Sin embargo, la acetilación podría tener influencia sobre las características de polimerización de Pol λ , ya que podría producirse en lisinas importantes desde un punto de vista conformacional o estructural, de especificidad de sustrato, o de catálisis.

5.3. Efecto de la acetilación sobre la actividad ADN polimerasa de Pol λ y Pol β

Para evaluar el efecto de la acetilación sobre la actividad ADN polimerasa realizamos dos tipos de ensayos diferentes. En primer lugar, se evaluó la actividad polimerasa en un sustrato heterogéneo como es el ADN activado, consistente en un ADN purificado de timo de ternera y parcialmente digerido con ADNasa I, lo que provoca la aparición de diversos *gaps* de diferente tamaño a lo largo del ADN. Por otro lado, se evaluó la actividad polimerasa en

ADN polimerasa lambda

moléculas de ADN de secuencia y estructura conocidas, siendo éstas un ADN tipo molde/cebador abierto y un ADN tipo *gap* de un nucleótido, en presencia o ausencia de grupo fosfato en 5' del *gap*. El primer grupo de ensayos se basan en la cuantificación (radiación de Cerenkov) de la incorporación de desoxinucleótidos radiactivos en el ADN. Los ensayos realizados con ADN de secuencia conocida se basan en el marcaje radiactivo del extremo 5' del iniciador y la resolución de los productos de la reacción en geles desnaturalizantes, lo que permite diferenciar los diferentes productos de la reacción por su peso molecular.

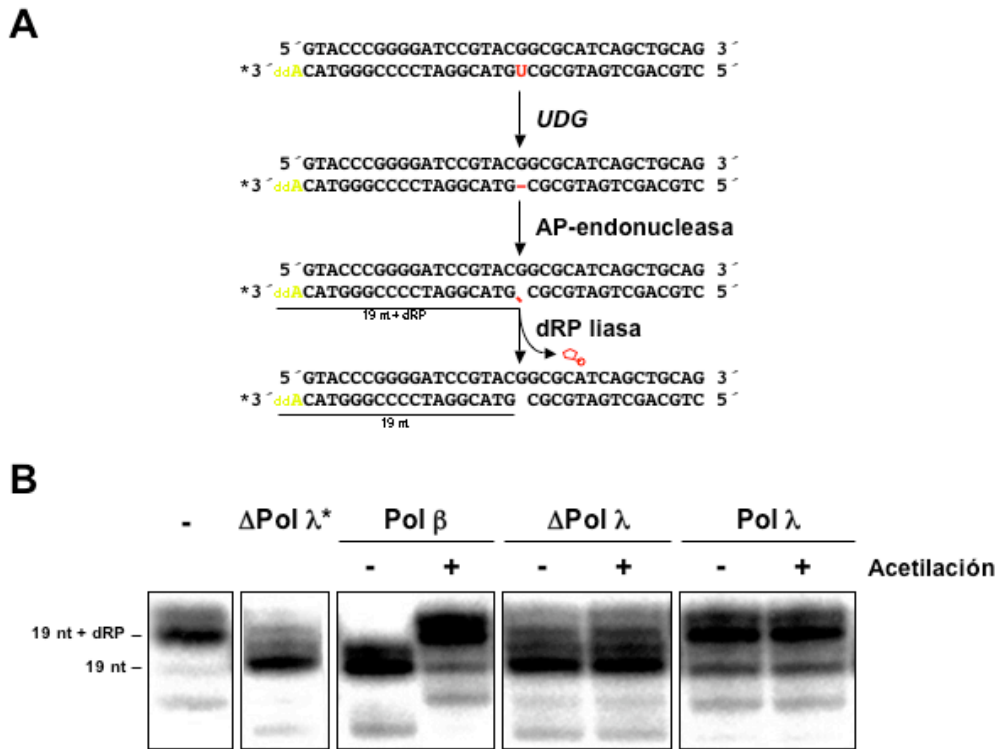


Figura 5.4: La acetilación de Pol λ no afecta a su actividad dRP-liasa. **A.** Esquema del ensayo dRP-liasa. El oligonucleótido que contiene el uracilo se marca en su extremo 3' mediante TdT y [α - 32 P] ddATP (ver Materiales y Métodos). A continuación se incuba con UDG, que elimina la base nitrogenada. Posteriormente se añade AP-endonucleasa, que realiza un corte en 5' respecto al sitio sin base, generando un residuo desoxirribosa-fosfato (dRP) en 5'. Por último, una ADN polimerasa con actividad dRP-liasa elimina el residuo dRP. Se señala la longitud del sustrato (19 nt + dRP) y del producto de la reacción (19 nt). **B.** Estudio del efecto del proceso de acetilación en la actividad dRP-liasa de Pol λ y Pol β. Se muestra el cambio de movilidad del oligonucleótido marcado como consecuencia de la eliminación del grupo dRP situado en el extremo 5'. Como control positivo se presenta la forma truncada de Pol λ (Δ Pol λ*) no sometida a la reacción de acetilación, sea ésta en presencia (+) o ausencia (-) de acetil CoA.

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad polimerasa en ADN activado (Figura 5.5), muestran un claro efecto de la acetilación sobre la actividad polimerasa de las tres proteínas evaluadas: Pol β, Pol λ y la forma truncada de Pol λ correspondiente al núcleo conservado tipo Pol β (Δ Pol λ). Pol β muestra un descenso en su actividad ADN polimerasa por la acetilación (aproximadamente 3 o 4 veces), lo que contrasta con resultados previos (Hasan y cols., 2002), en los que la acetilación no parecía tener efecto sobre la actividad ADN polimerasa evaluada en una molécula tipo *gap* de un nucleótido y fosfato en 5'. Por el contrario, Pol λ muestra un aumento en su actividad ADN polimerasa producto de la reacción de acetilación. Este incremento se hace más patente en la forma truncada de Pol λ, mientras que la forma completa sólo muestra un leve ascenso. Esto parece indicar un efecto de proporcionalidad

directa entre el grado de acetilación de la proteína y el incremento en su actividad ADN polimerasa, ya que la forma que más se acetila (Δ Pol λ , Figura 5.2) es la que muestra un mayor aumento de actividad, mientras que la forma completa de Pol λ sólo muestra un ligero incremento de actividad, en línea con los bajos niveles de acetilación que adquiere (Figura 5.1. y 5.2). Por último, las diferencias cuantitativas (cpm incorporadas) entre las formas truncada y completa de Pol λ pueden ser debidas a diferencias a nivel de K_m por nucleótido, ya que la forma completa tiene un valor de K_m 5 veces menor que la forma truncada (García-Díaz y cols., 2004), lo que justificaría que la forma completa de Pol λ muestre mayores niveles de incorporación de radiactividad (cpm), debido a su mayor afinidad por nucleótido.

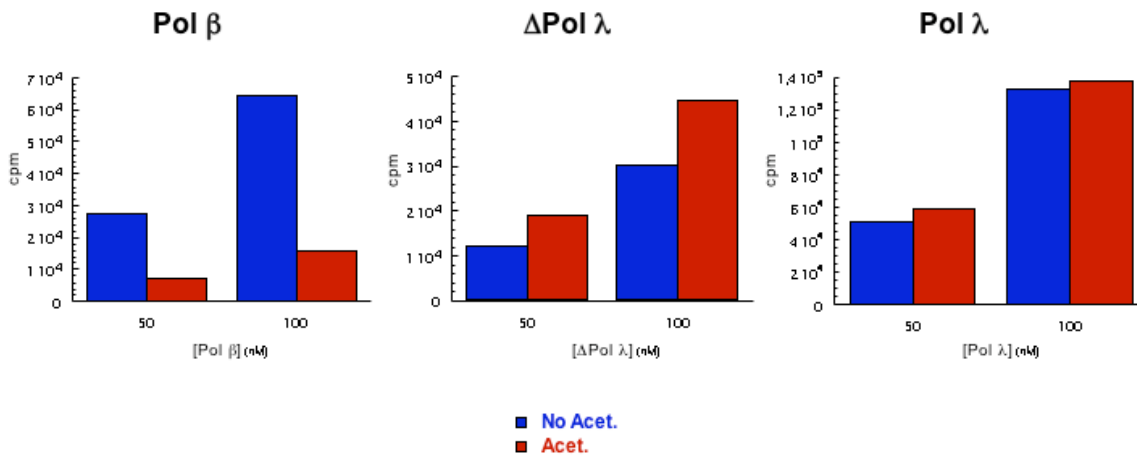


Figura 5.5: Efecto de la acetilación en la actividad ADN polimerasa evaluada en ADN activado. Ensayo de actividad ADN polimerasa utilizando como sustrato ADN activado de timo de ternera (ver Materiales y Métodos), en el que se evalúa el efecto de la acetilación sobre Pol β , Pol λ y la forma truncada de Pol λ correspondiente al núcleo conservado tipo Pol β (Δ Pol λ). La actividad ADN polimerasa se expresa en cuentas por min (cpm) en función de la concentración de ADN polimerasa empleada en el ensayo.

La unión del ADN y el nucleótido provocan significativos cambios conformacionales en Pol β (Sawaya y cols., 1994; Pelletier y cols., 1994; Pelletier y cols., 1996a; Sawaya y cols., 1997; Beard y Wilson, 1998), cambios imprescindibles para la catálisis enzimática. Sin embargo, Pol λ no requiere grandes movimientos de sus subdominios para llevar a cabo la unión del ADN y la reacción enzimática (García-Díaz y cols., 2005a). Estos datos podrían explicar el diferente efecto de la acetilación en ambas ADN polimerasas, ya que en el caso de Pol β la acetilación de sus residuos podría interferir en los cambios conformacionales necesarios para la unión del ADN y para la catálisis, siendo especialmente relevante en este caso el paso de unión a ADN, ya que el sustrato (ADN activado) está formado por un grupo heterogéneo de moléculas que requerirán diferentes procesos para ser unidas y polimerizar sobre ellas. Por su parte, Pol λ no vería perjudicada su capacidad de polimerización dados los mínimos cambios conformacionales que necesita para la catálisis.

Estos resultados parecen indicar que, al contrario de lo que sucede con la actividad dRP-liasa, la acetilación de Pol λ provoca un claro efecto en su actividad ADN polimerasa. Asimismo, los resultados obtenidos con Pol β , mostrando una inactivación paralela de sus actividades ADN polimerasa y dRP-liasa, abre la posibilidad de que la acetilación sea un mecanismo selectivo de activación e inhibición de las diferentes ADN polimerasas presentes en la célula.

ADN polimerasa lambda

La aproximación experimental basada en el ensayo de la actividad ADN polimerasa en moléculas de secuencia y estructura conocidas, permite evaluar mayor cantidad de variables y hacer un seguimiento mucho más estrecho de la reacción enzimática. De esta forma, nos dispusimos a evaluar la influencia del metal utilizado como cofactor de la reacción (Mg^{2+} versus Mn^{2+}), dado el efecto que tiene la utilización de Mn^{2+} sobre la fidelidad de síntesis y la capacidad de síntesis asociada a desplazamiento de banda de las ADN polimerasas. Asimismo, evaluamos la influencia sobre la actividad ADN polimerasa de la estructura del ADN utilizado como sustrato, pudiendo ser éste similar a un intermedio de replicación (ADN tipo molde/cebador abierto), o similar a estructuras generadas durante diferentes procesos de reparación (*BER*, *NHEJ*, etc.), como son las moléculas con *gaps* de uno o más nucleótidos. Dentro de este último tipo de moléculas cabe reseñar la influencia tan importante de la presencia o ausencia del grupo fosfato en 5', tanto para Pol β (Singhal y cols, 1993; Prasad y cols., 1994) como para Pol λ (García-Díaz y cols., 2002; capítulos 6 y 7 de esta Tesis), por lo que también es una variable tomada en cuenta en este estudio.

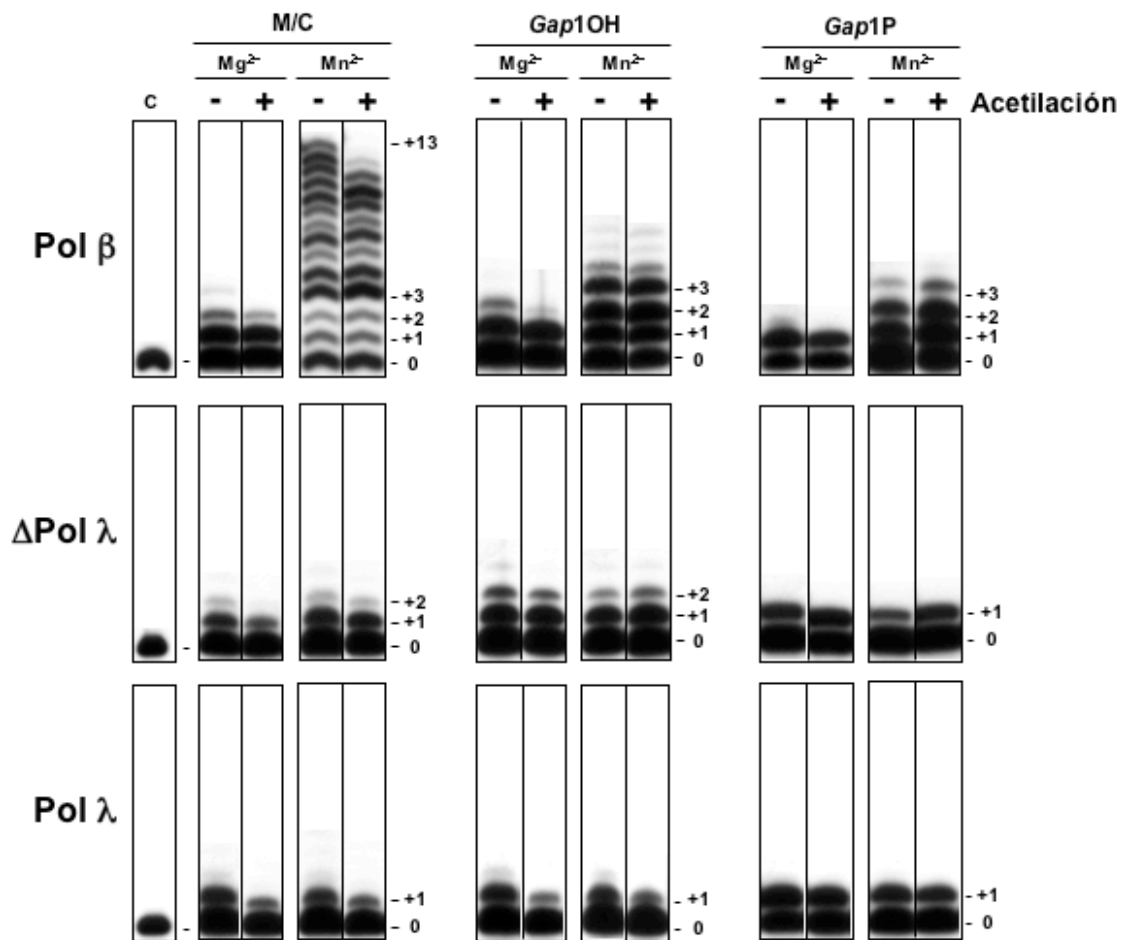


Figura 5.6: Efecto de la acetilación en la actividad ADN polimerasa. Estudio del efecto de la acetilación en la actividad ADN polimerasa de Pol β , Pol λ y la forma truncada de Pol λ (Δ Pol λ). Estudio realizado en diferentes moléculas de ADN: ADN molde/cebador abierto (M/C), ADN *gap* de un nucleótido y grupo OH en 5' (*Gap1OH*), ADN *gap* de un nucleótido y grupo fosfato en 5' (*Gap1P*). Asimismo, se evalúa el efecto del metal utilizado como cofactor (Mg^{2+} o Mn^{2+}). La concentración de Pol β utilizada es de 10 nM en el caso de la utilización de Mg^{2+} como cofactor, y 20 nM en el caso de Mn^{2+} . La concentración utilizada de ambas formas de Pol λ (completa y truncada) es de 40 nM para las moléculas M/C y *Gap1OH*, y 20 nM en el caso de la molécula *Gap1P*.

Los resultados obtenidos en moléculas de secuencia y estructura conocidas, mostrados en la Figura 5.6, permiten entrever diferencias mucho más sutiles entre las formas acetilada y no acetilada de cada una de las ADN polimerasas estudiadas.

En el caso de Pol β , la inhibición tan acusada observada en el ADN activado no se observa en estos casos, produciéndose tan solo una ligera inhibición en la reacción enzimática (Figura 5.6). Esta ligera inhibición se hace patente sobre todo en el caso de la molécula tipo molde/cebador abierto, mientras que en el caso de los *gaps* es muy leve, habiendo diferencias únicamente a nivel del último nucleótido añadido al cebador, como parte de un fenómeno de síntesis asociada a desplazamiento de banda (Figura 5.6). Estas diferencias se acentúan al incrementar la concentración de proteína en el ensayo (40 nM, no mostrado), mientras que se hacen mínimas o incluso se invierte el efecto (inhibición \rightarrow activación por acetilación) al reducir dichas concentraciones (5 nM, no mostrado). Esto puede ser debido a un efecto de la acetilación sobre la agregación de las moléculas de ADN polimerasa. A altas concentraciones de proteína la acetilación puede provocar la agregación entre moléculas y, por tanto, la inactivación de las mismas, dando lugar a la reducción del nivel global de actividad. Sin embargo, a bajas concentraciones de proteína el fenómeno de agregación se reduciría, de forma que la actividad polimerasa no vería reducido su nivel como consecuencia de la acetilación. Esta hipótesis está en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos sobre ADN activado, en los que las diferencias observadas son máximas, y en los que se utilizan concentraciones máximas de proteína (50 y 100 nM). De todas formas, esto no descarta una influencia intrínseca del tipo de sustrato utilizado en la actividad ADN polimerasa mostrada por cada proteína estudiada.

En la molécula tipo *gap* con fosfato y utilizando Mn^{2+} como cofactor, se observa un fenotipo contrario al resto de los casos, ya que Pol β sufre un leve incremento de su actividad producto de su acetilación en todas las concentraciones de proteína estudiadas.

En el caso de Pol λ , la acetilación provoca diferentes consecuencias sobre la proteína completa y la forma truncada. En la forma truncada de Pol λ (Δ Pol λ), la acetilación carece de efecto en moléculas tipo molde/cebador abierto y *gap* de un nucleótido con OH en 5', tanto en presencia de Mg^{2+} como de Mn^{2+} (Figura 5.6). Sin embargo, en moléculas tipo *gap* de un nucleótido y fosfato en 5', la acetilación provoca un leve aumento en la actividad de Pol λ , al igual que ocurre con Pol β (Figura 5.6). Por el contrario, la forma completa de Pol λ muestra una clara inhibición por acetilación en moléculas tipo molde/cebador abierto y *gap* de un nucleótido con OH en 5', tanto en presencia de Mg^{2+} como de Mn^{2+} (Figura 5.6). Sin embargo, en moléculas tipo *gap* de un nucleótido y fosfato en 5', la acetilación carece de efecto o es producto de una compensación entre efectos positivos y negativos (Figura 5.6).

Las diferencias en el nivel de acetilación de las formas truncada y completa de Pol λ , junto con los datos obtenidos en los ensayos de actividad ADN polimerasa sobre ADN activado, parecerían indicar que el efecto de la acetilación de ambas formas de Pol λ se diferenciaría tan solo desde un punto de vista cuantitativo. Sin embargo, los datos obtenidos en las moléculas molde/cebador y *gap*, indican que la acetilación de ambas formas de Pol λ provoca diferencias a nivel cualitativo, ya que muestran fenotipos diferentes que difícilmente podrían justificarse sólo desde el punto de vista del grado de acetilación de la proteína. Por lo tanto, estos datos parecen demostrar diferencias cualitativas en el proceso de acetilación de las formas truncada y completa de Pol λ . Estas diferencias podrían estar causadas por la acetilación de diferentes

lisinas en cada caso, debido a la ausencia o presencia de la zona N-terminal de la proteína, lo que sugiere un posible papel regulador de esta zona en el proceso.

Por tanto, las diferencias entre las dos formas de Pol λ , así como las diferencias entre Pol λ y Pol β , podrían deberse a la acetilación de diferentes lisinas, lo que provocaría la aparición de diferentes fenotipos en cada caso. La identificación de los residuos acetilados en cada caso abriría las puertas a una interpretación mucho más concluyente de los resultados obtenidos hasta el momento.

5.4. Identificación de los residuos de Pol λ y Pol β implicados en el proceso de acetilación

La colaboración con el Dr. Peter Gehrig (Functional Genomic Center, Zürich) permitió la aplicación a nuestro estudio de técnicas de espectroscopía de masas, mediante las cuales pudimos identificar los residuos acetilados en Pol β y Pol λ .

El patrón de acetilación de Pol β y Pol λ muestra diferencias muy claras. Asimismo, los residuos acetilados en las dos formas de Pol λ (completa y truncada) son diferentes, mostrando tan solo dos residuos en común.

En el alineamiento de la Figura 5.7 se muestran las lisinas identificadas como dianas del proceso de acetilación en cada caso.

El patrón de acetilación de Pol β se centra en el dominio de 8 kDa (Figura 5.8), mostrando 7 lisinas acetiladas en este dominio (K5, K35, K60, K61, K72, K81 y K87), entre las que destaca la Lys72, responsable de la actividad dRP-liasa (Deterding y cols., 2000; Matsumoto y cols., 1998; Prasad y cols., 1998b) e identificada previamente como la diana mayoritaria del proceso de acetilación (Hasan y cols., 2002). Otro residuo destacado es la Lys35, responsable del reconocimiento del grupo fosfato en 5' de un *gap* (Prasad y cols., 1998b) y que participa, junto con las Lys60 y Lys68, en la unión de ADN de cadena sencilla (Prasad y cols., 1998b). Además, existen otras dos dianas del proceso de acetilación en el subdominio “dedos” del dominio de polimerización (K113 y K141) (Figura 5.8).

La forma truncada de Pol λ , equivalente al núcleo conservado tipo Pol β , muestra un patrón de acetilación opuesto a Pol β . La mayoría de los residuos identificados como dianas del proceso de acetilación se sitúan en el dominio de polimerización y tan solo tres en el dominio de 8 kDa (Figura 5.7).

Los residuos identificados en el dominio de 8 kDa de Pol λ son Lys248, Lys273 y Lys281, equivalentes a los residuos Pro7, Ile33 y Lys41 de Pol β . Las cadenas laterales de los residuos Lys273 y Lys281 se encuentran apuntando al dominio de polimerización, por lo que su acetilación no afectaría a la actividad dRP-liasa situada en el dominio de 8 kDa (Figura 5.8). No existen datos cristalográficos sobre el residuo Lys248 que permitan interpretar la posición de su cadena lateral.

El opuesto patrón de acetilación descrito en Pol β y Pol λ puede ser debido a la diferente conformación de ambas ADN polimerasas en solución. En ausencia de ADN (apoenzima), el dominio de 8 kDa de Pol β se encuentra alejado del dominio de polimerización (Figura 1.2, parte A; Sawaya y cols., 1994; Pelletier y cols., 1994), resultando probablemente más accesible a otras proteínas y facilitando el proceso de acetilación de los residuos de dicho dominio. Pol λ no ha sido cristalizada en ausencia de ADN, sin embargo, los datos cristalográficos obtenidos en diferentes complejos binarios (ADN polimerasa/ADN; García-

Díaz y cols., 2004; García-Díaz y cols., 2005a) y ternarios (ADN polimerasa/ADN/dNTP entrante; García-Díaz y cols., 2005a) parecen indicar que Pol λ , al contrario que Pol β , se encuentra siempre en una conformación cerrada, lo que prevendría la acetilación de su dominio de 8 kDa y posibilitaría de algún modo la acetilación de otras zonas de la proteína.

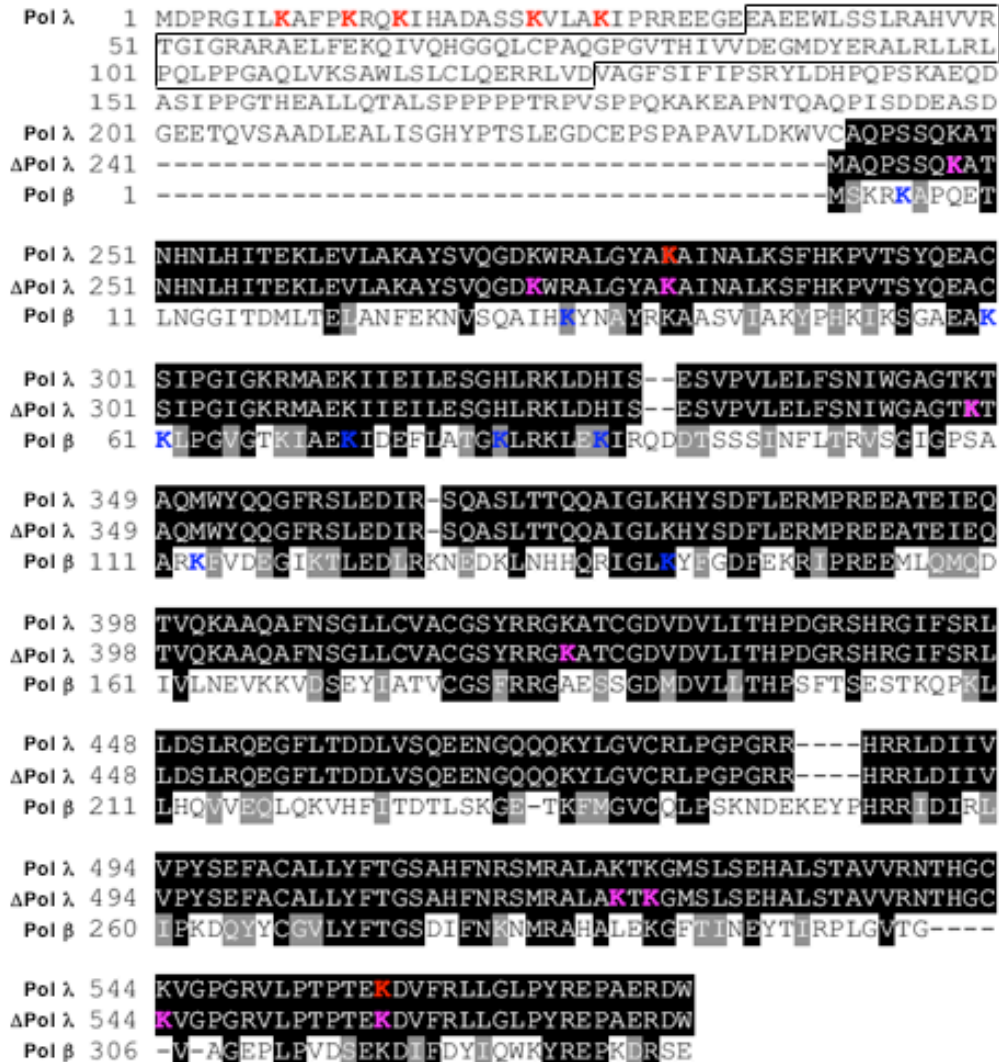


Figura 5.7: Dianas del proceso de acetilación de Pol β y Pol λ . Alineamiento de la secuencia aminoacídica de Pol β y Pol λ en el que se señalan las lisinas identificadas como dianas del proceso de acetilación mediante la técnica de espectroscopía de masas. En azul se señalan las dianas identificadas en Pol β , en rojo las de Pol λ y en magenta las de la forma truncada de Pol λ (Δ Pol λ). Los residuos idénticos entre Pol β y Pol λ se muestran en blanco sobre fondo negro. Los residuos conservados entre Pol β y Pol λ se muestran en blanco sobre fondo gris. El dominio BRCT de Pol λ (residuos 36-126) se encuentra señalado con un recuadro.

El patrón de acetilación de la forma completa de Pol λ se centra en su extremo N-terminal, mostrando 5 lisinas acetiladas (K5, K12, K15, K23 y K27) antes del dominio BRCT (residuos 36-126, Figura 5.7). Este hecho apoya la hipótesis del papel regulador o preventivo de la zona N-terminal de Pol λ durante el proceso de acetilación. Los únicos residuos identificados dentro del núcleo conservado tipo Pol β son las Lys281 y Lys557, situadas en el dominio de 8 kDa y en el subdominio “pulgar” del dominio de polimerización respectivamente (Figura 5.8).

ADN polimerasa lambda

Es especialmente reseñable la no acetilación del residuo Lys312, responsable principal de la actividad dRP-liasa (García-Díaz y cols., 2001), tanto en la forma truncada como en la forma completa de Pol λ . Este dato concuerda con los resultados obtenidos, según los cuales la actividad dRP-liasa de Pol λ no se ve afectada por el proceso de acetilación (Figura 5.4).

De los residuos identificados en el dominio de polimerización de la forma truncada de Pol λ (K347, K422, K522, K524, K544 y K557), sólo los residuos Lys347 y Lys422 se sitúan fuera del subdominio “pulgar”, formando parte de los subdominios “dedos” y “palma” respectivamente (Figura 5.8). La Lys422, no conservada en Pol β (Ala185), se encuentra interactuando con la Arg420 de la “palma” y el Asp574 del “pulgar”, lo que podría ayudar a mantener la conformación cerrada de Pol λ en ausencia de nucleótido (García-Díaz y cols., 2004). La acetilación de este residuo provocaría la ruptura de esta interacción, lo que presumiblemente podría afectar a la actividad ADN polimerasa de Pol λ .

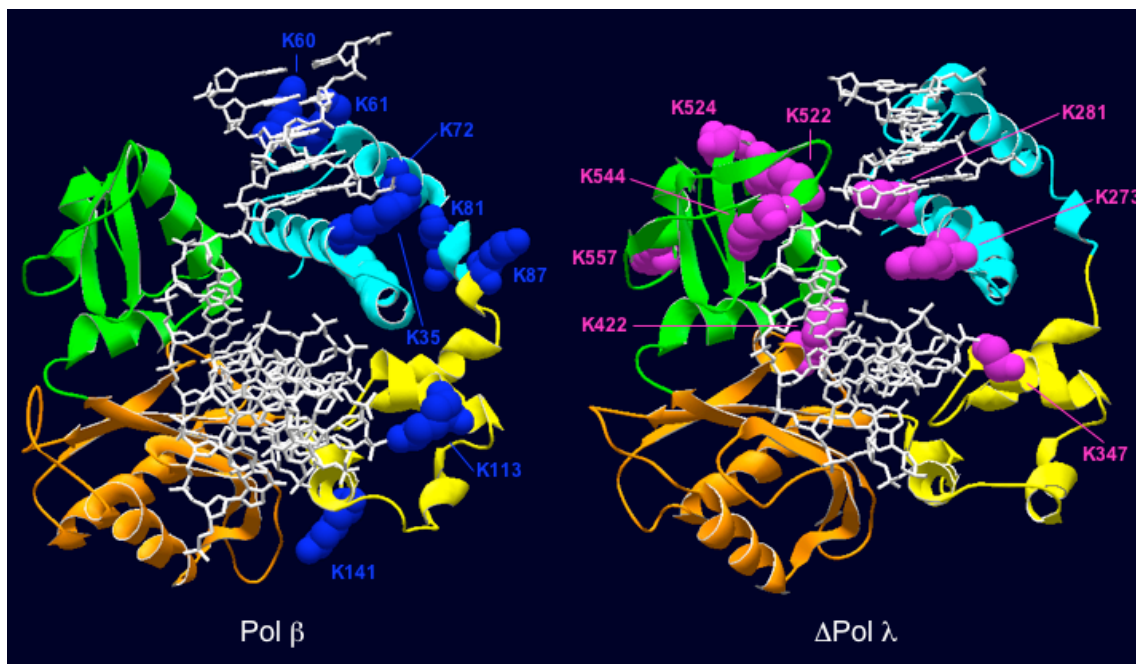


Figura 5.8: Distribución tridimensional de los residuos acetilados de Pol β y Pol λ . Representación tridimensional de los residuos identificados como dianas del proceso de acetilación de Pol β y de la forma truncada de Pol λ (Δ Pol λ). Los dominios de 8 kDa de ambas ADN polimerasas se representan en azul, el subdominio “dedos” en amarillo, el subdominio “palma” en naranja y el subdominio “pulgar” en verde. El ADN se representa en blanco. La figura se ha realizado empleando el programa Swiss PDB Viewer (Guex y cols., 1997; <http://www.expasy.com/spdbv/>). Las coordenadas cristalográficas empleadas en cada caso corresponden a los complejos ternarios de cada ADN polimerasa (1BPY Pol β ; 1XSN Pol λ) de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>).

De los residuos situados en el subdominio “pulgar” llama especialmente la atención la Lys544, situada en el extremo C-terminal de un lazo de gran tamaño situado entre las láminas- β 7 y 8 (Figura 5.8). Este residuo ha sido caracterizado recientemente como el residuo responsable de la estabilización de un nucleótido extra-hélice de la hebra molde durante el proceso necesario para que Pol λ cometa un error de delección (García-Díaz y cols., 2006). Asimismo, podría ser necesario para estabilizar apareamientos imperfectos generados como intermedios de sinapsis durante una reacción de reparación por *NHEJ*. Esta estabilización es llevada a cabo mediante puentes de hidrógeno a través de moléculas de agua, por lo que la acetilación de este residuo

impediría la formación de dichos puentes y, por tanto, dificultaría el mecanismo de generación de errores de deleción tan frecuentes en Pol λ (Bebenek y cols., 2003). Asimismo, la sustitución de este residuo por alanina provoca una disminución de 2 veces en la tasa de generación de errores de deleción en secuencias repetidas de 2 nucleótidos (García-Díaz y cols., 2006), de forma consistente con la hipótesis de que la acetilación haría disminuir la tasa de error.

Cabe destacar que los residuos Lys281 y Lys557 se encuentran acetilados en ambas formas de Pol λ (Figura 5.7), lo que parece denotar un alto grado de especificidad del proceso de acetilación en cuanto a ciertos residuos. En este sentido, la alta actividad específica del dominio HAT podría estar dando lugar a acetilaciones inespecíficas, por lo que sería conveniente comparar el patrón de acetilaciones obtenido con el derivado de las proteínas incubadas con la proteína p300 completa.

6

Propiedades de unión a ADN

El estudio de las propiedades de unión a ADN de una ADN polimerasa resulta de vital importancia a la hora de dilucidar su papel en los diferentes procesos celulares de síntesis de ADN. El estudio de la afinidad de unión por los diferentes sustratos susceptibles de ser objeto de su actividad de polimerización permite profundizar en las causas del grado de actividad mostrado en cada uno de dichos sustratos, así como en las implicaciones funcionales que todo ello conlleva.

Este estudio fue realizado gracias al empleo de ensayos de retraso en gel (ver Materiales y Métodos), que permiten evaluar la formación de complejos estables ADN / proteína en ausencia de nucleótido y de iones metálicos, elementos necesarios para la catálisis enzimática. En estos ensayos pueden ser empleados diferentes sustratos de ADN, sustratos que simulen la estructura generada durante diferentes procesos de síntesis de ADN en la célula, como son los procesos asociados a la replicación del ADN, o los diferentes procesos de reparación.

Estudios previos con Pol β revelaron la dependencia del grupo fosfato en 5' de un *gap* de pocos nucleótidos para llevar a cabo una polimerización procesiva en el citado *gap* (Singhal y Wilson, 1993). Estudios posteriores, basados en técnicas de entrecruzamiento, demostraron que la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' de un *gap* hace aumentar la afinidad de Pol β por moléculas tipo *gap* de más de un nucleótido, ya que en *gaps* de un nucleótido la presencia del grupo fosfato no influye en la capacidad de unión de Pol β (Prasad y cols., 1994). Sin embargo, la presencia del grupo fosfato en moléculas tipo *gap* de un nucleótido sí que tiene influencia sobre la eficiencia catalítica de Pol β , así como en el nivel de fidelidad de síntesis mostrado. Ambos parámetros aumentan significativamente debido a la presencia del grupo fosfato en el extremo 5' del *gap* (Chagovetz y cols., 1997), lo que denota una influencia intrínseca de dicho grupo que permite una conformación catalítica óptima sin variar la afinidad global de unión.

La similitud estructural entre Pol β y Pol λ , así como resultados obtenidos con Pol λ que indican una dependencia sobre el grupo fosfato en 5' para llevar a cabo una síntesis procesiva en *gaps* de pocos nucleótidos (García-Díaz y cols., 2002), hacen necesaria la caracterización de sus propiedades de unión a ADN para así poder discutir más ampliamente su hipotético papel en los diferentes procesos celulares de síntesis de ADN.

6.1. Afinidad de Pol λ por diferentes sustratos de ADN

Desde el punto de vista estructural y funcional los principales sustratos de ADN susceptibles de ser evaluados mediante ensayos de retraso en gel son tres. En primer lugar, un ADN de cadena sencilla conforma el sustrato óptimo de una ADN polimerasa que muestre actividad transferasa terminal, por tanto independiente de molde, como TdT o Pol μ . En segundo lugar, una molécula tipo molde / cebador abierto muestra una estructura similar a la que se genera durante la replicación, proceso en el que intervienen diferentes ADN polimerasas, bien sea en la propia replicación o bien en la síntesis a través de lesiones que puedan formar parte de la cadena molde. Por último, moléculas que formen pequeños *gaps* se asemejan a las estructuras generadas durante diferentes procesos reparativos, como son la reparación por escisión de base (*BER*) y la reparación por reunión de extremos no homólogos (*NHEJ*), procesos ambos en los que ha sido implicada Pol λ .

ADN polimerasa lambda

En los ensayos expuestos en la Figura 6.1 se evalúa la capacidad de unión estable de Pol λ a diferentes sustratos de ADN. Se observa como Pol λ no produce bandas de retraso en el caso del ADN de cadena sencilla, lo que refleja la imposibilidad de formar complejos estables ADN / proteína. Este hecho es consistente con resultados obtenidos en nuestro laboratorio que demuestran que Pol λ carece de actividad transferasa terminal (Juárez, 2006), a pesar de otros resultados publicados que defienden lo contrario (Ramadan y cols., 2003). Esta discrepancia probablemente sea debida a los diferentes sustratos de ADN empleados para evaluar la actividad transferasa terminal. En nuestro caso fue evaluada en oligonucleótidos homopoliméricos para impedir la posible hibridación intra- o intermolecular mediada por pequeñas complementariedades de secuencia, que permitiesen dar lugar a reacciones de polimerización dirigidas por molde. Por el contrario, el empleo de oligonucleótidos heteropoliméricos permite la formación de estructuras mediadas por complementariedad de secuencia que sirven de sustrato y dan lugar a reacciones dirigidas por molde. Este hecho se ve favorecido por la capacidad de las ADN polimerasas λ y μ de participar en la ruta de reparación por *NHEJ*, que se basa en el empleo de complementariedades de secuencia de pocos nucleótidos para la reunión de los extremos de una rotura de banda doble.

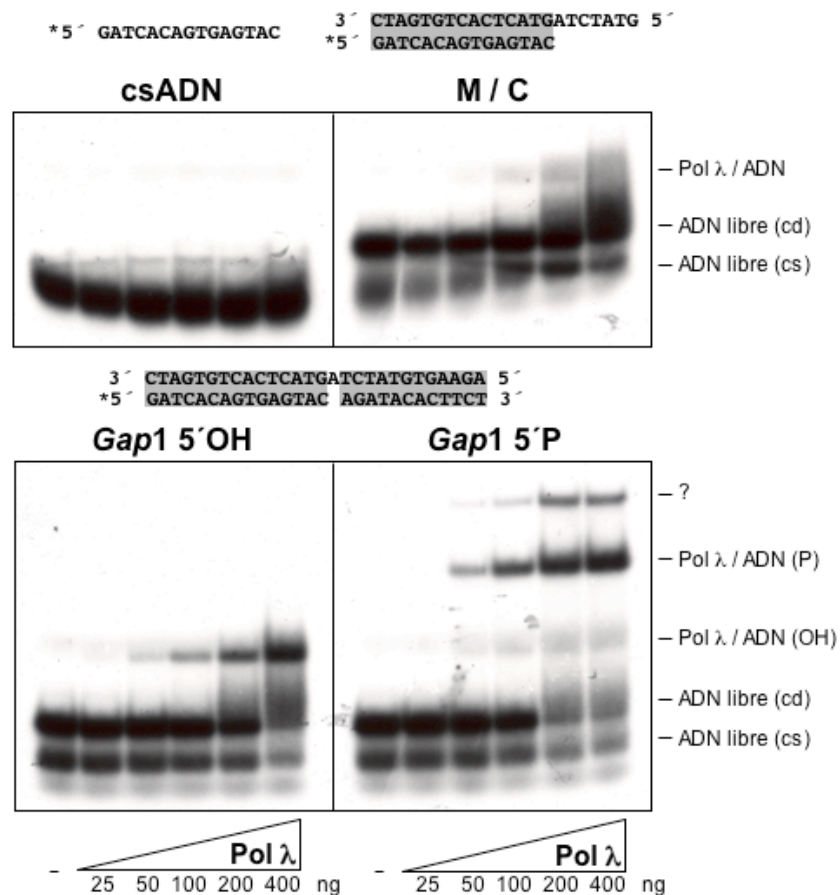


Figura 6.1: Capacidad de unión estable de Pol λ a diferentes sustratos de ADN. Análisis de la capacidad de formación de complejos estables Pol λ / ADN en función del tipo de ADN utilizado como sustrato (cs, cadena sencilla; cd, cadena doble; M/C, ADN molde/cebador abierto; *Gap1 5'OH*, ADN tipo *gap* de un nucleótido y grupo OH en 5' del *gap*; *Gap1 5'P*, ADN tipo *gap* de un nucleótido y grupo fosfato en 5' del *gap*). El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos. La secuencia de las moléculas de ADN y las cantidades de Pol λ utilizadas se detallan en la figura. El asterisco señala el oligonucleótido marcado radiactivamente.

En segundo lugar, se observa como altas dosis de Pol λ producen un pequeño rastro de retraso del ADN tipo molde / cebador abierto, aunque no llega a formarse una banda única y definida (Figura 6.1). Esto refleja una capacidad de unión inestable a este tipo de moléculas.

Por último, se evalúa la capacidad de unión estable de Pol λ a moléculas tipo *gap* de un nucleótido en presencia o ausencia de grupo fosfato en el extremo 5' del *gap*, dada la relevancia que esta variable tiene en la actividad de polimerización de Pol λ (García-Díaz y cols., 2002). Como se observa en la Figura 6.1, Pol λ es capaz de formar complejos estables ADN / proteína desde pequeñas dosis de proteína en ambos casos (5'OH o 5'P), lo que denota una gran estabilidad de unión. La intensidad de las bandas de retraso formadas parece reflejar una ligera mayor afinidad de Pol λ por las moléculas con grupo fosfato. Asimismo, la diferente movilidad de los complejos de retraso mayoritarios en cada caso podría ser reflejo de una diferente conformación proteica debido a la presencia o ausencia del grupo fosfato en 5' del *gap*, que podría justificar una diferente movilidad electroforética en cada caso. En el caso de la molécula con grupo fosfato aparece una banda de mayor retraso (indicada como "?") que muestra un comportamiento paralelo a la banda mayoritaria. Esta banda podría estar causada por un evento de dimerización proteica que facilitase la unión de dos moléculas de proteína a una única molécula de ADN, lo que haría disminuir la movilidad electroforética del complejo. Una molécula de Pol λ habría de unirse al *gap* en sí mismo, mientras que la otra tendría que unirse a uno de los extremos romos, probablemente al marcado en 5', gracias a la presencia del grupo fosfato radiactivo incorporado durante el marcaje. Pol λ no se une de manera estable a un ADN de doble cadena con los extremos romos (no mostrado), sin embargo, la dimerización podría estabilizar la unión hasta tal punto que permitiese la formación de un complejo estable electroforéticamente. Otra posibilidad sería que una molécula de Pol λ uniese dos moléculas de ADN, una mediante su dominio de polimerización (31 kDa) y otra mediante su dominio de 8 kDa, en el que se encuentra el sitio de unión del grupo fosfato en 5', lo que también haría disminuir la movilidad electroforética del complejo. Sin embargo, la resolución de la estructura cristalina de Pol λ formando un complejo con un ADN tipo *gap* de un nucleótido y grupo fosfato en el que la polimerasa se encuentra uniendo tanto el extremo 3'OH como el fosfato en 5' (García-Díaz y cols., 2005a), así como el ratio ADN / proteína empleado en el ensayo ([Pol λ] >> [ADN]), parecen descartar esta hipótesis.

Por lo tanto, Pol λ parece mostrar mayor afinidad de unión por moléculas semejantes a las generadas durante diversas rutas de reparación, lo que apoya su papel en estos procesos. Por otro lado, la estabilidad de unión a moléculas tipo molde / cebador abierto parece ser de menor cuantía, aunque no hay que descartar que la interacción con factores implicados en procesos de síntesis en moléculas de este tipo, como por ejemplo PCNA (Maga y cols., 2002), pudiera estabilizar la unión de Pol λ a estos sustratos.

6.2. Capacidad de unión de Pol λ a moléculas semejantes a intermedios de procesos replicativos

Una de las posibles variables a tener en cuenta en el estudio de la capacidad de unión de Pol λ a moléculas tipo molde / cebador abierto, que se asemejan a las generadas durante el proceso de replicación del ADN, es la longitud de la porción de cadena sencilla que ejerce de molde durante la polimerización. En la Figura 6.2 se evalúan tres posibles longitudes del

ADN polimerasa lambda

extremo 5' protuberante y su influencia en la estabilidad de unión de Pol λ . Cuando el extremo posee sólo 6 nucleótidos en su parte 5' protuberante se reproduce el resultado mostrado en la Figura 6.1, ya que Pol λ produce un rastro de retraso que no llega a formar una banda definida. Sin embargo, al aumentar la longitud de cadena sencilla que ejercería de molde durante la polimerización hasta 13 nucleótidos, se observa como se forma un complejo estable ADN / Pol λ , que aumenta de intensidad con el incremento en la dosis de Pol λ empleada en el ensayo (Figura 6.2). Por último, si la longitud de la porción 5' protuberante aumenta hasta 18 nucleótidos, se produce una mayor formación de banda de retraso a igualdad de dosis proteica, lo que refleja una mayor estabilidad de unión que en el caso de la cadena sencilla de 13 nucleótidos (Figura 6.2).

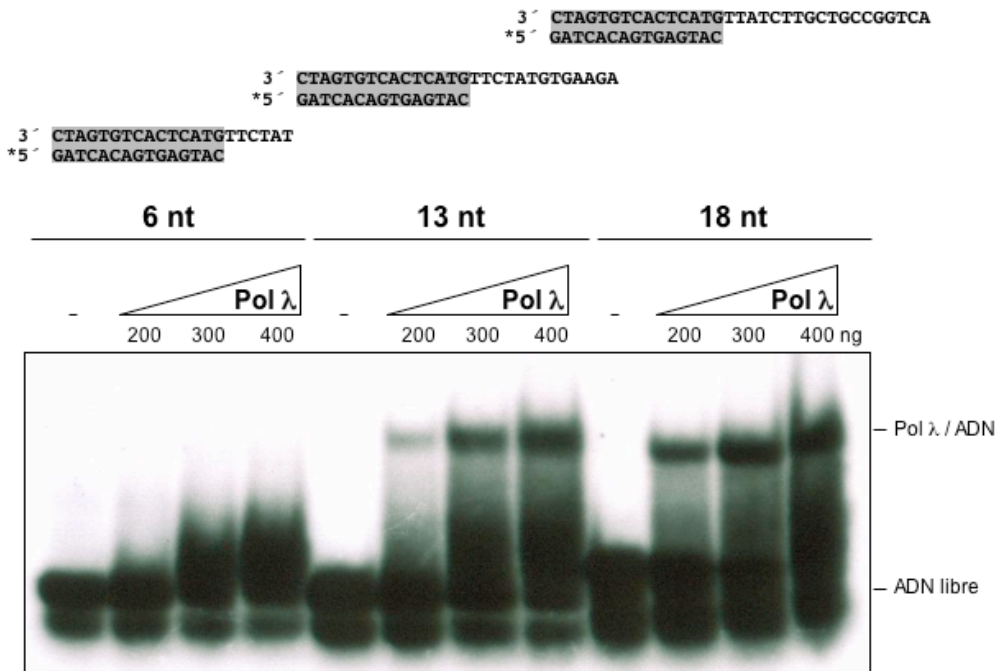


Figura 6.2: Efecto del número de nucleótidos protuberantes en el extremo 5' de la cadena molde en la capacidad de unión de Pol λ a moléculas tipo molde / cebador abierto (I). Ensayo realizado como se describe en Materiales y Métodos, utilizando diferentes moléculas cuyo cebador se encuentra marcado en su extremo 5'(*). La secuencia de las moléculas de ADN y las cantidades de Pol λ utilizadas se detallan en la figura.

A la hora de interpretar estos resultados hay que tener en cuenta los datos derivados de la resolución de la estructura cristalina de Pol λ formando diversos complejos (García-Díaz y cols., 2004; García-Díaz y cols., 2005a). Estas estructuras revelan que Pol λ sólo establece interacciones específicas con pocos nucleótidos de los oligonucleótidos molde, cebador y *downstream*, todos ellos situados próximos al extremo 3'OH en el que se produce la polimerización, lo que dificulta aún más la interpretación de los resultados expuestos en la Figura 6.2.

El efecto en la estabilidad de unión de la longitud de la porción 5' protuberante en una molécula tipo molde / cebador puede reflejar dos situaciones diferentes. En primer lugar, el aumento en la longitud de la porción de cadena sencilla puede favorecer la búsqueda de zonas de complementariedad intra- o intermoleculares, que podrían dar lugar a la formación de pequeños *gaps*, que como se ha visto en la Figura 6.1, conforman el sustrato por el que Pol λ

muestra una mayor afinidad. Por otro lado, el aumento en la longitud de la porción de cadena sencilla podría permitir la unión inespecífica de las zonas más distales de cadena sencilla a la ADN polimerasa, ya que Pol λ posee zonas de su superficie externa con un marcado carácter electropositivo, como el subdominio “pulgar” (Figura 6.3). Gracias a la flexibilidad conformacional del ADN de cadena sencilla se podrían producir interacciones electrostáticas entre el ADN y la superficie molecular de la proteína, interacciones que serían de mayor cuantía a medida que aumentase la longitud disponible de ADN de cadena sencilla, y que estabilizarían el complejo ADN / Pol λ .

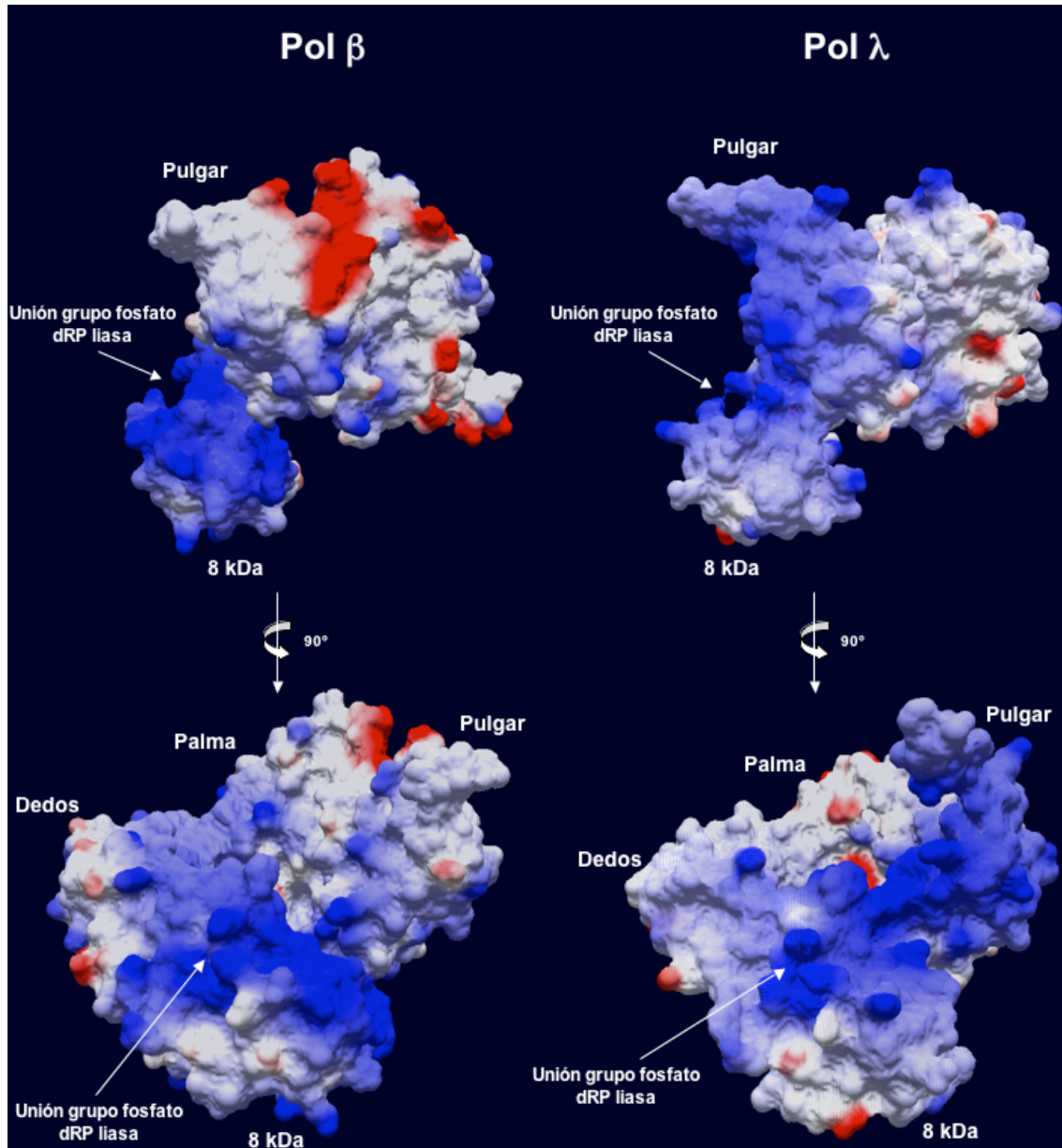


Figura 6.3: Potencial electrostático de la superficie molecular de Pol β y Pol λ . Representación en diferentes orientaciones de la superficie molecular de ambas ADN polimerasas. La coloración de la superficie molecular representa un potencial electropositivo (azul), neutro (blanco) o electronegativo (rojo). La figura se ha realizado empleando el programa Swiss PDB Viewer (Guex y cols., 1997; <http://www.expasy.com/spdbv/>). Las coordenadas cristalográficas empleadas en cada caso corresponden a los complejos binarios de cada ADN polimerasa con un ADN tipo *gap* de un nucleótido y grupo fosfato en 5' (1BPX Pol β ; 1XSL Pol λ) de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>).

Para intentar esclarecer la primera hipótesis decidimos reevaluar la unión de Pol λ a las moléculas empleadas en el ensayo de la Figura 6.2, con la única diferencia del oligonucleótido marcado radiativamente. En los ensayos de la Figura 6.2 se marcó el cebador, mientras que en el ensayo propuesto se marcaría el molde, de forma que contaríamos con un grupo fosfato en el extremo 5' (protuberante) de la hebra molde. Este hecho, teniendo en cuenta el efecto en la unión del grupo fosfato en una molécula tipo *gap* (Figura 6.1), debería producir una mejoría en la unión de Pol λ a estas moléculas si el mecanismo que media en la citada unión es la formación de *gaps* intra- o intermoleculares mediados por complementariedad de secuencia, así como una posible diferencia de movilidad electroforética. Además, el efecto del grupo fosfato es posible que se acentúe en moléculas inestables como las que podrían formarse.

El resultado de estos ensayos se muestra en la Figura 6.4. El patrón de bandas de retraso, así como la intensidad relativa de las mismas, muestra un resultado similar al obtenido en los ensayos marcando el extremo 5' del cebador (Figura 6.2), lo que parece indicar que el mecanismo por el que Pol λ aumenta su estabilidad de unión a este tipo de moléculas no es a través de la formación de *gaps* inter- o intramoleculares.

Asimismo, evaluamos el posible efecto del contexto de secuencia en el patrón e intensidad de las bandas de retraso. Cambios en la secuencia del cebador y de la porción 5' protuberante de la cadena molde no producen diferencias significativas en la afinidad de unión de Pol λ a estas moléculas, mientras que la longitud del extremo 5' protuberante sigue primando a la hora de establecer una unión estable, lo que apunta a un mecanismo de estabilización de la unión independiente de secuencia (no mostrado).

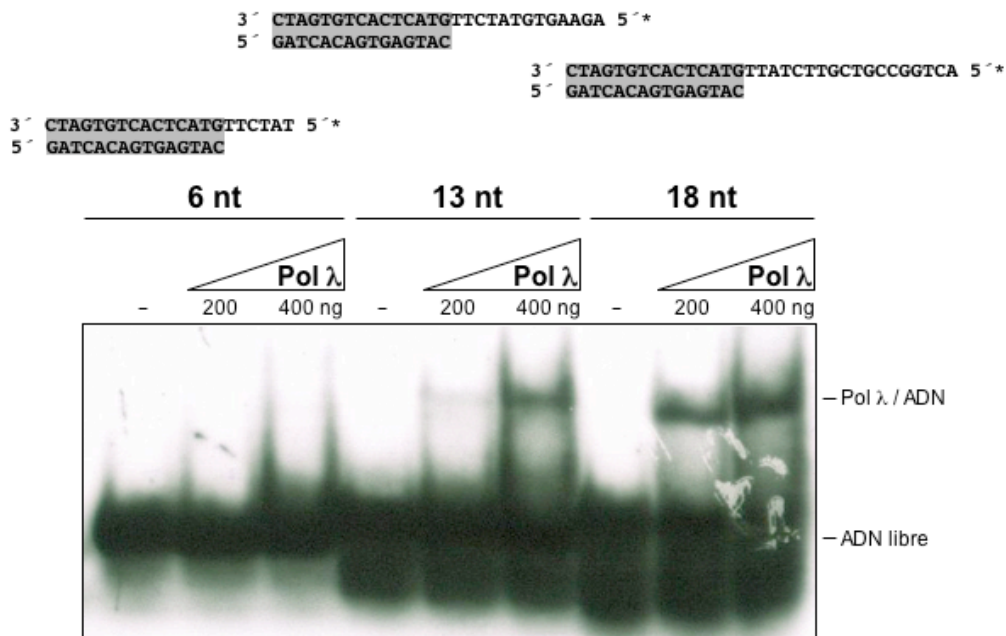


Figura 6.4: Efecto del número de nucleótidos protuberantes en el extremo 5' del molde en la capacidad de unión de Pol λ a moléculas tipo molde / cebador abierto (II). Ensayo realizado como se describe en Materiales y Métodos, utilizando diferentes moléculas cuya cadena molde se encuentra marcada en su extremo 5'(*). La secuencia de las moléculas de ADN y las cantidades de Pol λ utilizadas se detallan en la figura.

6.3. Capacidad de unión de Pol λ a moléculas análogas a las generadas durante diferentes procesos de reparación del ADN

En primer lugar procedimos a estudiar si el nucleótido codificante influye en la afinidad de unión de Pol λ a un *gap* de un nucleótido. Como se observa en la Figura 6.5, Pol λ se une con similar afinidad a un ADN tipo *gap*, sea cual sea la base codificante, tanto en presencia como en ausencia de grupo fosfato en 5'.

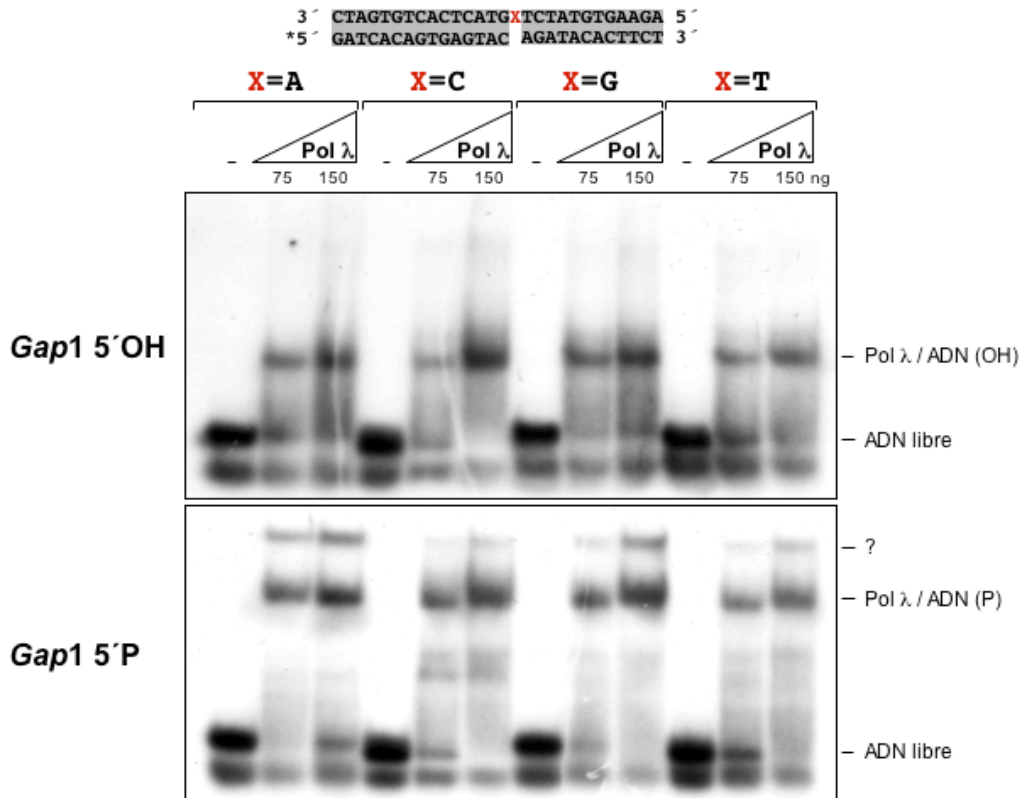


Figura 6.5: Influencia de la base codificante en la capacidad de unión de Pol λ a moléculas tipo *gap* de un nucleótido. Ensayo realizado como se describe en Materiales y Métodos, utilizando diferentes moléculas de ADN en las que varía la base codificante de la cadena molde, así como el residuo presente en el extremo 5' del *gap* (OH o fosfato). La secuencia de las moléculas de ADN y las cantidades de Pol λ utilizadas se detallan en la figura. El asterisco señala el oligonucleótido marcado radiactivamente.

Para intentar dilucidar si la aparición de varias bandas de retraso se debe a procesos de dimerización proteína-proteína asociados a la unión estable a varios lugares de una misma molécula de ADN (al propio *gap* y a alguno de los extremos romos), diseñamos un oligonucleótido que aparease consigo mismo para formar un *gap* de dos nucleótidos dejando los extremos sellados (ver esquema en Figura 6.6), con lo que evitaríamos la presencia de extremos romos en el ensayo.

El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 6.6. La unión de Pol λ a la molécula con los extremos sellados da lugar a la aparición de dos bandas de retraso. Este hecho implica que la aparición de diferentes bandas de retraso no viene dada por la unión de dos moléculas de proteína a una única molécula de ADN, al menos mediante la unión a los extremos romos. Asimismo, el hecho de emplear este oligonucleótido auto-apareante permite observar con más claridad el efecto del grupo fosfato en 5', ya que el marcaje radiactivo empleado se traduce necesariamente en la presencia del grupo fosfato en el extremo 5', por lo que todas las moléculas detectables por autorradiografía poseerán el grupo fosfato unido covalentemente a su

ADN polimerasa lambda

extremo 5'. Esta premisa permite concluir que la presencia de dos bandas de retraso no es consecuencia exclusiva de la presencia o ausencia del grupo fosfato en el extremo 5' del *gap*. Por lo tanto, ha de haber otras variables en el proceso de unión de Pol λ a estas moléculas de ADN que den lugar a diferentes complejos o conformaciones que se traduzcan en diferentes bandas de retraso en los ensayos.

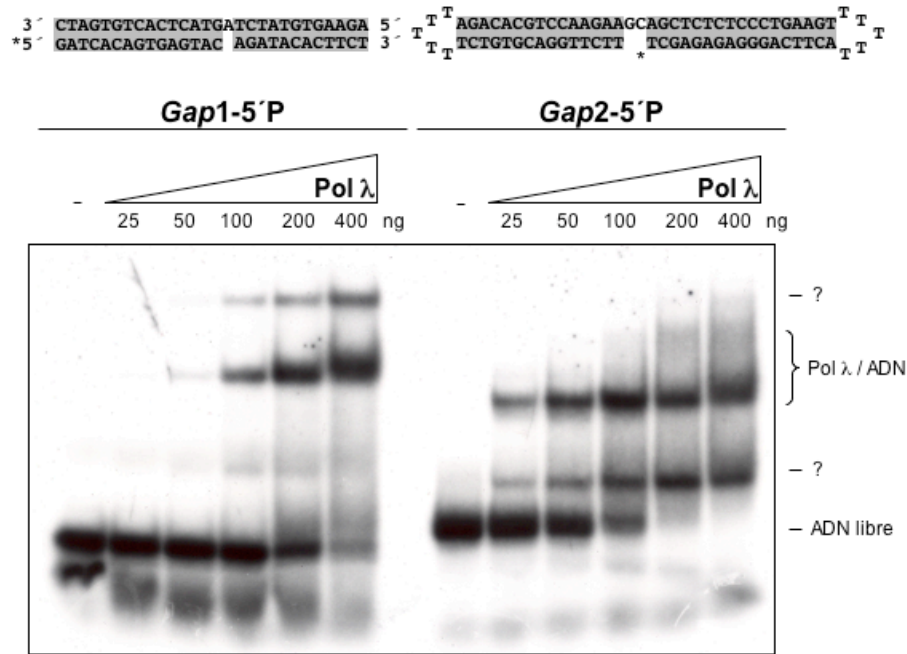


Figura 6.6: Influencia de la presencia de extremos romos en la unión de Pol λ. Ensayo realizado como se describe en Materiales y Métodos, utilizando diferentes moléculas de ADN en las que varía la presencia de extremos romos. En la parte izquierda de la figura se evalúa la unión a un ADN tipo *gap* de un nucleótido y grupo fosfato, formado a partir de la hibridación de tres oligonucleótidos independientes, con lo que se generan dos extremos romos, uno en cada extremo de la molécula. Sin embargo, en la parte derecha de la figura se utiliza un ADN tipo *gap* de dos nucleótidos y grupo fosfato, formado a partir de un único oligonucleótido auto-apareante, lo que provoca la desaparición de los extremos romos, quedando un grupo de nucleótidos desapareados (5 dTs) formando una horquilla. La secuencia de las moléculas de ADN y las cantidades de Pol λ utilizadas se detallan en la figura. El asterisco señala el oligonucleótido marcado radiactivamente.

Los ensayos expuestos hasta el momento han sido realizados con la forma truncada de Pol λ, correspondiente al núcleo conservado tipo Pol β. La forma completa de Pol λ, incluyendo la zona N-terminal correspondiente a los dominios BRCT y Ser/Pro, muestra una afinidad y especificidad de unión similar a la proteína truncada (Figura 6.7).

Sin embargo, en la forma completa de Pol λ se acentúa la dependencia sobre el grupo fosfato para dar lugar a la formación de una banda concreta y definida de retraso. Como se observa en la Figura 6.7, las moléculas molde/cebador y *Gap1* 5'OH, provocan la aparición de un rastro de retraso que no llega a formar una banda definida. Sin embargo, la molécula que posee grupo fosfato (*Gap1* 5'P) da lugar a una banda de retraso definida, lo que refleja la estabilidad del complejo Pol λ / ADN. En conjunto, estos resultados parecen indicar cierto papel de la zona N-terminal de Pol λ en las propiedades de unión a ADN de Pol λ, ya que parece aumentar su especificidad por sustratos que posean grupo fosfato en 5' del *gap*.

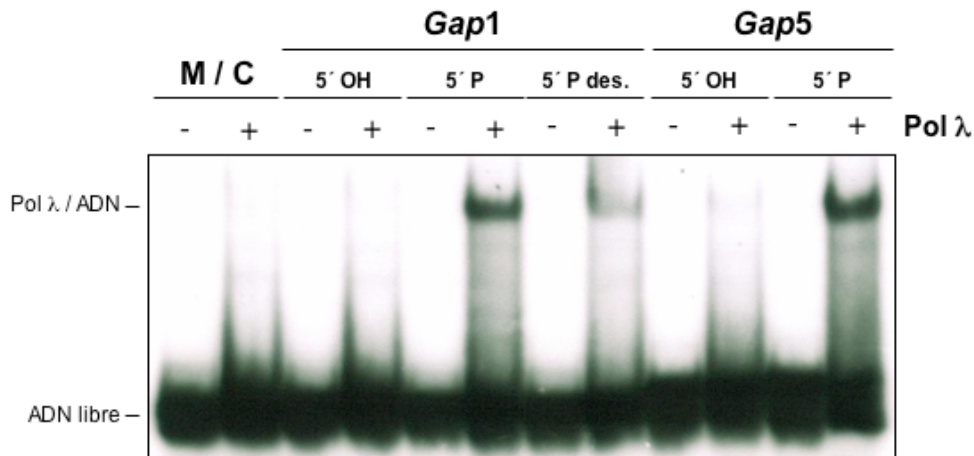


Figura 6.7: Capacidad de unión de Pol λ completa a diferentes moléculas de ADN. Ensayo realizado como se describe en Materiales y Métodos, utilizando las moléculas de ADN estudiadas hasta el momento con la forma truncada de Pol λ: M/C, molde/cebador abierto (13 nt protuberantes en 5'); *Gap1*, con grupo OH o fosfato en 5', así como con un nucleótido desapareado en 5' (des.); *Gap5*, con grupo OH o fosfato en 5'. La masa de Pol λ empleada fue 650 ng.

La reparación de roturas de doble cadena mediante el proceso de reunión de extremos no homólogos (*NHEJ*) puede dar lugar a multitud de sustratos diferentes. Las pequeñas zonas de complementariedad de secuencia generadas durante la reunión de los extremos pueden implicar nucleótidos internos y/o nucleótidos de los extremos protuberantes que se realinean. Por tanto, es factible que se generen extremos desapareados tanto en los extremos 3' como 5'. La implicación de los extremos desapareados en 3' se discutirá ampliamente en el capítulo 8. Por otro lado, la presencia de un nucleótido desapareado en el extremo 5' podría tener también amplia repercusión en esta ruta de reparación debido a la importancia del grupo 5' fosfato en la capacidad global de unión de las ADN polimerasas implicadas en el mecanismo *NHEJ*.

En la Figura 6.7 también se evalúa la afinidad de unión de Pol λ a una molécula tipo *gap* de un nucleótido y fosfato en 5', en el que el nucleótido del extremo 5' (nucleótido que posee el grupo fosfato) se encuentra desapareado (5' P des.). La banda de retraso observada es claramente similar a la que se obtiene al utilizar un *gap* con el nucleótido del extremo 5' perfectamente apareado. Sin embargo, la intensidad de la misma ha disminuido significativamente, lo que refleja un descenso en la afinidad de unión de Pol λ si el nucleótido del extremo 5' se encuentra desapareado, a pesar de poseer el grupo fosfato.

Con el fin de dilucidar el efecto del tamaño del *gap* en la afinidad de unión de Pol λ, realizamos ensayos de unión con moléculas de ADN que formasen un *gap* de cinco nucleótidos, en presencia o ausencia de grupo fosfato en 5' (Figura 6.7). Pol λ se une de forma similar a moléculas de uno y cinco nucleótidos. Además, al igual que sucede en los *gaps* de un nucleótido, la presencia del grupo fosfato en 5' es imprescindible para que se produzca una banda de retraso definida, lo que resalta la importancia de la presencia de grupos fosfato en 5' para la unión de la forma completa de Pol λ (Figura 6.7).

La aparición de dos bandas diferentes en los ensayos de unión realizados con la forma truncada de Pol λ y los *gaps* de un nucleótido y grupo fosfato, abren la posibilidad de considerar las diferentes movilidades electroforéticas de los complejos como un reflejo de diferentes conformaciones del enzima, que hipotéticamente podrían representar los estados activo e

ADN polimerasa lambda

inactivo de Pol λ . Para esclarecer este punto decidimos realizar ensayos de unión en presencia del nucleótido complementario a la base codificante del *gap* (dT). La presencia del nucleótido marcado radiactivamente ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$) y el ADN frío nos permitiría valorar la formación de un complejo “pre-catalítico” (en ausencia de metal) compuesto por Pol λ / ADN / dATP. La formación de este complejo reflejaría la formación de un complejo activo compatible con la catálisis.

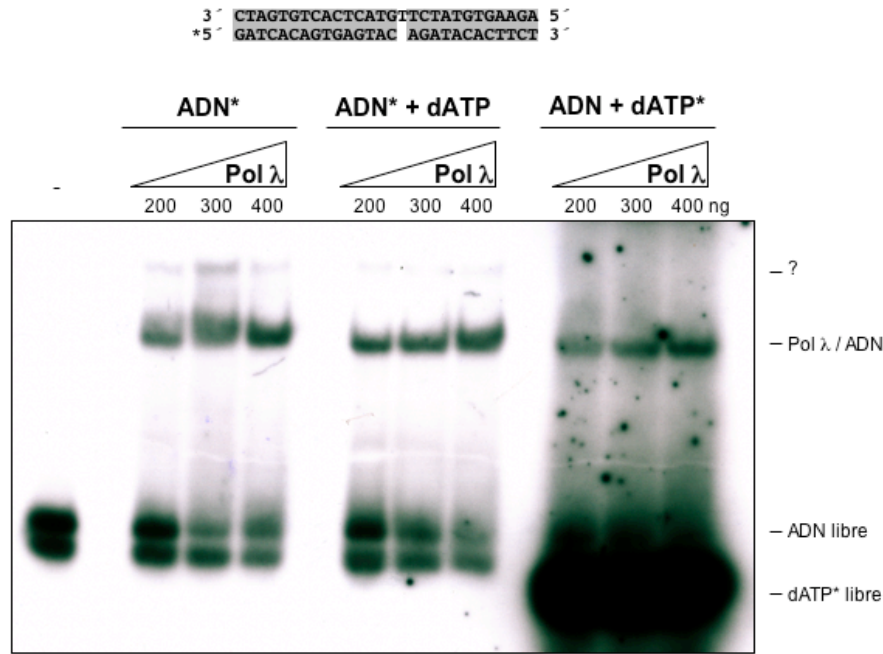


Figura 6.8: Capacidad de formación del complejo ternario pre-catalítico. Ensayo realizado como se describe en Materiales y Métodos, en el que se evalúa la capacidad de Pol λ de unir el nucleótido en ausencia de iones metálicos. El seguimiento de la formación del complejo ternario pre-catalítico se realiza mediante la adición del nucleótido marcado (10 nM $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$) complementario a la base codificante (dT) del *gap* no marcado. Como control se muestra el patrón de unión de Pol λ a una molécula marcada (ADN*), en presencia o ausencia del nucleótido complementario (dATP, 25 nM) a la base molde del *gap* (dT). La secuencia de la molécula de ADN y las cantidades de Pol λ utilizadas se detallan en la figura.

El resultado de estos ensayos se muestra en la Figura 6.8. En primer lugar se evalúa el efecto de la presencia del nucleótido complementario a la base codificante del *gap* en la movilidad electroforética del complejo Pol λ / ADN. Como se observa en la parte central de la Figura 6.8, la presencia de nucleótido no alteró significativamente la movilidad del complejo Pol λ / ADN, mostrando una distancia de retraso similar a la del complejo Pol λ / ADN en ausencia de dATP (Figura 6.8, parte izquierda). La presencia del nucleótido marcado radiactivamente ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$) y el ADN frío permite la detección de la formación del complejo ternario (Pol λ / ADN / dATP). En la parte derecha de la Figura 6.8 se observa una banda definida y proporcional a la dosis de Pol λ , a la misma altura que las observadas con el ADN marcado radiactivamente, lo que denota que el complejo Pol λ / ADN se encuentra en una conformación activa, ya que es capaz de unir el nucleótido complementario a la base codificante del *gap*. Sin embargo, la banda de mayor retraso observada con el ADN marcado radiactivamente en ausencia de dATP (señalada como “?”), no se observa al emplear el

nucleótido marcado radiactivamente ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$), lo que podría deberse al bajo límite de detección, o a que no se trata de un complejo conformacional activo de Pol λ .

6.4. Capacidad de unión en ausencia de cebador y su implicación en la ruta de reparación NHEJ

Pol λ ha sido implicada en la ruta de reparación por reunión de extremos no homólogos (NHEJ) por diferentes evidencias directas e indirectas. Este mecanismo de reparación requiere la asociación de los extremos de dos moléculas de ADN, ya sean romos o con una corta protuberancia de una de las cadenas. Los extremos protuberantes pueden ser de dos tipos: 3' o 5' protuberantes. Los extremos 5' protuberantes podrían ser rellenados en pasos previos a su reunión, gracias a la presencia de un 3'OH y a una hebra molde para la síntesis, dando lugar a un extremo romo que puede ser ligado directamente. Sin embargo, cualquier evento de polimerización sobre los extremos 3' protuberantes (a excepción de una actividad transferasa terminal) requiere su reunión previa, para así disponer de una hebra molde. La capacidad de unión de una ADN polimerasa a este tipo de extremos de ADN podría representar una ventaja a la hora de llevar a cabo el relleno de los *gaps* generados durante el proceso de reunión de extremos, ya que situaría al enzima en una posición de privilegio para iniciar la polimerización. La unión a este tipo de moléculas puede producirse de dos formas diferentes, ya que la ADN polimerasa podría unirse al extremo 3' protuberante o al extremo 5' recesivo. Para dilucidar si Pol λ es capaz de unirse a este tipo de moléculas 3' protuberantes realizamos ensayos de retraso en gel con moléculas formadas por el oligonucleótido molde y el oligonucleótido *downstream*, pero en ausencia de cebador, con lo que se genera una molécula con un extremo 3' protuberante (ver esquema en Figura 6.9). Asimismo, estudiamos la unión a moléculas en las que el extremo 5' recesivo tuviese un grupo fosfato o un grupo OH, dada la preferencia de Pol λ por las moléculas con grupo fosfato en 5'.

Como se observa en la Figura 6.9, Pol λ se une establemente a las moléculas 3' protuberantes en las que el extremo 5' recesivo posea un grupo fosfato, lo que indica que la unión se está produciendo al extremo 5' recesivo y no al 3' protuberante. Esta unión "orienta" a la molécula de ADN polimerasa, cuyo centro activo de polimerización no puede utilizar el extremo 3' de la misma molécula (extremo) de ADN, quedando a la espera de un extremo 3'OH que se genere durante la reunión de los extremos de la rotura. Este rol de Pol λ podría ser beneficioso en dos aspectos diferentes. En primer lugar, la presencia de Pol λ a la espera de un grupo 3'OH desde el que iniciar la catálisis podría hacer mejorar la eficiencia global de la ruta, ya que no tendría que ganar el acceso al sustrato sino que formaría parte de él de forma previa a la reacción. Esta hipótesis es consistente con los datos de interacción entre los diferentes componentes de la ruta NHEJ (Nick-McElhinny y cols., 2005), según los cuales Pol λ , a través de su dominio BRCT, es capaz de interaccionar directamente con el complejo formado por las proteínas Ku y el ADN, sin necesidad de la presencia de XRCC4 y ADN Ligasa IV. En segundo lugar, Pol λ podría acceder al sustrato de ADN de forma previa a las proteínas ADN-PK y Artemis, lo que podría significar que Pol λ pudiera mediar en un primer intento de relleno de *gaps* y ligación independiente de actividad exonucleolítica (Artemis), como forma de prevenir la pérdida de información genética. Si los niveles de complementariedad de secuencia fuesen insuficientes para la reunión y sellado de los extremos, entrarían en juego las proteínas ADN-

ADN polimerasa lambda

PK y Artemis, con el fin de aumentar el grado de complementariedad entre extremos para poder reparar la rotura de doble cadena.

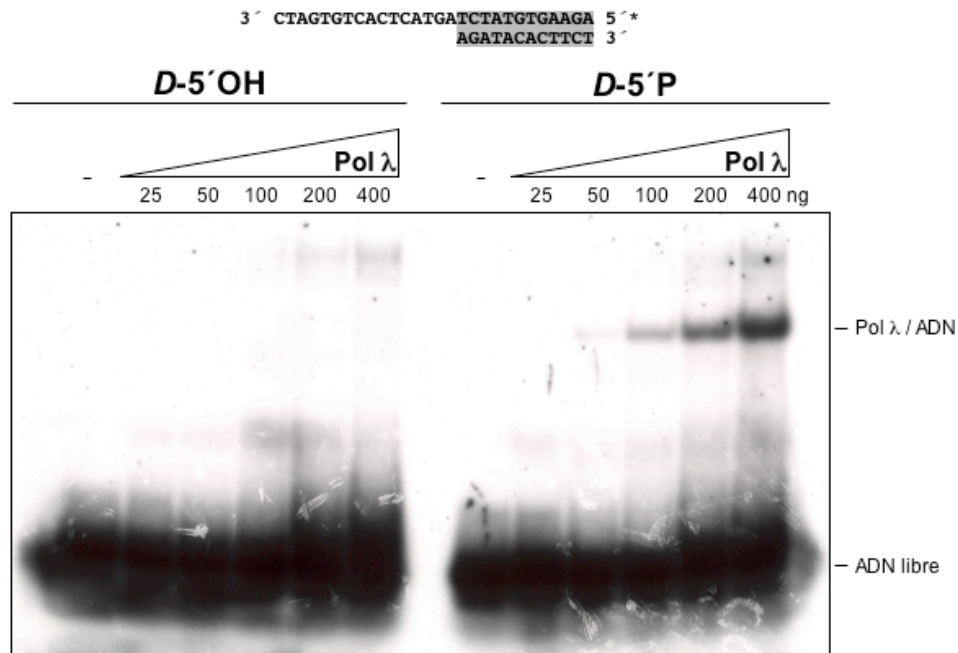


Figura 6.9: Capacidad de unión a moléculas 3' protuberantes en función de la presencia o ausencia de grupo fosfato en el extremo 5' del oligonucleótido *downstream*. Ensayo realizado como se describe en Materiales y Métodos, en el que se evalúa la capacidad de Pol λ para unir moléculas de ADN en ausencia de cebador. La secuencia de la molécula de ADN y las cantidades de Pol λ utilizadas se detallan en la figura. El asterisco señala el oligonucleótido marcado radiactivamente.

Una vez comprobada la unión estable de Pol λ a las moléculas con extremos 3' protuberantes, era interesante comprobar los posibles requerimientos de longitud de hebra molde necesarios para la unión estable, dados los antecedentes expuestos en el apartado 6.2. Por tanto, decidimos evaluar la estabilidad de la unión de Pol λ en relación a la longitud (número de nucleótidos) del extremo 3' protuberante.

Como se observa en la Figura 6.10, Pol λ se une de forma estable a todas las moléculas 3' protuberantes evaluadas, aunque con diferente eficiencia. Se observa una relación de proporcionalidad directa entre la longitud del extremo 3' protuberante y la cantidad de complejo Pol λ / ADN formado. Este comportamiento recuerda al observado durante la evaluación de la estabilidad de unión a un ADN tipo molde / cebador abierto (apartado 6.2), lo que podría reflejar un mecanismo común de estabilización de la unión, a pesar de la configuración opuesta entre el ADN y la ADN polimerasa. Asimismo, en el ensayo de la Figura 6.10 también se aprecia como Pol λ no se une a una molécula de ADN con los extremos romos (0 nucleótidos 3' protuberantes), lo que resulta consistente con el mecanismo *NHEJ*, según el cual no sería necesaria la acción de una ADN polimerasa para reparar una rotura de doble cadena formada por dos extremos romos.

Los resultados expuestos a lo largo de este capítulo posibilitan la participación de Pol λ en procesos asociados a la replicación del ADN nuclear, así como en diversos procesos de reparación, entre los que destacamos la reparación por escisión de base (*BER*) y la reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (*NHEJ*).

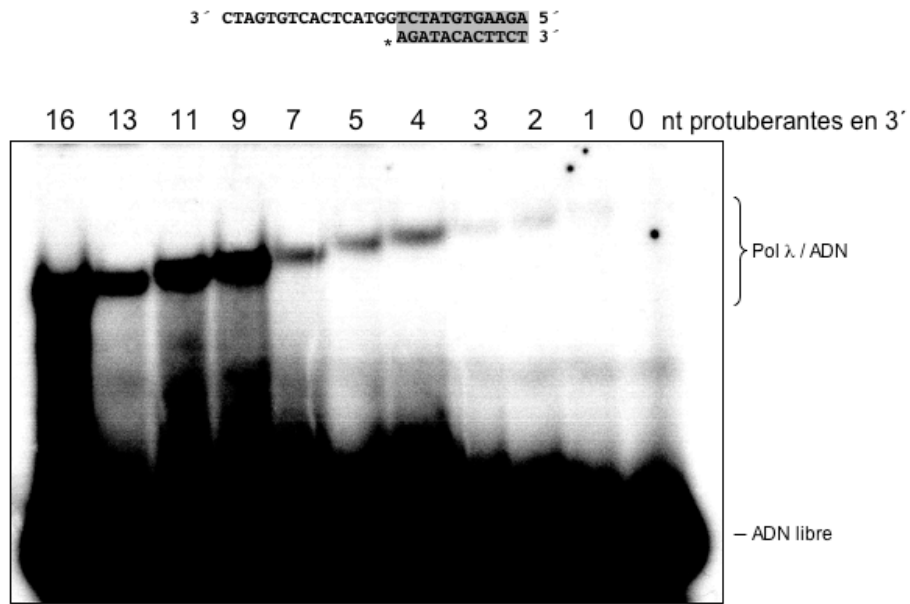


Figura 6.10: Efecto del número de nucleótidos protuberantes en el extremo 3' sobre la capacidad de unión de Pol λ . Ensayo realizado como se describe en Materiales y Métodos, en el que se evalúa la capacidad de Pol λ para unir moléculas de ADN en ausencia de cebador en función del número de nucleótidos protuberantes en el extremo 3'. La masa de Pol λ empleada fue 400 ng. La secuencia de la molécula de ADN se detalla en la figura. El asterisco señala el oligonucleótido marcado radiactivamente.

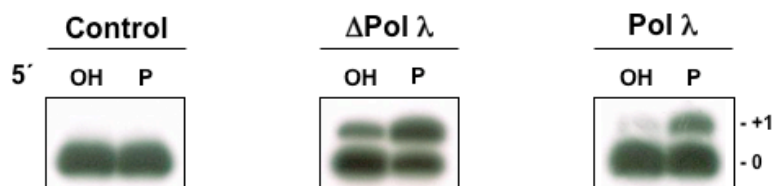
7

Pol λ y NHEJ

7.1 Influencia de la presencia de grupos fosfato en 5' de un *gap* sobre la actividad ADN polimerasa de Pol λ

Las propiedades de unión a ADN de Pol λ, expuestas a lo largo del sexto capítulo de esta Tesis, hacen hincapié en la importancia de la presencia de un grupo fosfato en 5', tanto de un *gap*, como de una molécula 3' protuberante. Sin embargo, se hace necesario evaluar la repercusión de dichas propiedades de unión en la actividad enzimática de Pol λ. Asimismo, la disponibilidad de la estructura tridimensional de Pol β y Pol λ, junto con los alineamientos aminoacídicos de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas, permitieron prever la importancia de ciertos residuos en la discriminación del grupo fosfato en 5' de un *gap*. La comprobación de dichas previsiones fue acometida mediante estudios de mutagénesis dirigida.

En primer lugar, decidimos evaluar la actividad de Pol λ en el relleno de un *gap* de un nucleótido en función de la presencia o ausencia del grupo fosfato en 5'. Asimismo, dadas las diferencias obtenidas en los ensayos de unión a ADN obtenidos con la forma completa y truncada (dominio conservado tipo Pol β) de Pol λ, también se evaluó la capacidad de relleno de *gap* de la forma truncada de Pol λ.



ADN polimerasa	% _{ins.} 5'OH	% _{ins.} 5'P	Ratio
ΔPol λ	22.23 ± 5.41	48.03 ± 1.85	2.2
Pol λ	6.33 ± 2.14	21.6 ± 5.11	3.4

Figura 7.1: Capacidad de discriminación del grupo fosfato en 5' de un *gap* de un nucleótido. Ensayo de actividad ADN polimerasa sobre un sustrato de ADN compuesto por un *gap* de un nucleótido, en el que se evalúa el efecto sobre la eficiencia de la reacción de la presencia o ausencia de un grupo fosfato en 5' del *gap*. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de Pol λ de 12.5 nM, y una concentración de dGTP de 1 μM. En la parte inferior de la figura se exponen la media de los porcentajes de inserción obtenidos con cada ADN polimerasa en cada sustrato en tres experimentos independientes, así como la desviación estándar y la relación entre ambos valores (Ratio = %_{ins.} 5'P / %_{ins.} 5'OH).

Como se observa en la Figura 7.1, ambas formas de Pol λ llevan a cabo la eficiente inserción de dGTP frente a la base codificante del *gap* (dC) en presencia de un grupo fosfato en 5'. Sin embargo, la eficiencia de inserción disminuye significativamente en ambos casos cuando en el extremo 5' se encuentra un grupo OH. Por otra parte, se aprecian diferencias relativas entre ambas formas de Pol λ respecto a la eficiencia catalítica con la que llevan a cabo la reacción.

En el caso de la forma completa de Pol λ , los datos señalan una diferencia de actividad de 3.4 veces a favor de la molécula con grupo fosfato en 5', lo que señala un claro efecto de la presencia de dicho grupo en la capacidad de síntesis de Pol λ . Estos datos son consistentes con los datos de unión que reflejan que en la forma completa de Pol λ se acentúa la dependencia sobre el grupo fosfato para dar lugar a un complejo de unión estable Pol λ / ADN (Figura 6.7), lo que irremediamente ha de repercutir negativamente en la eficiencia catalítica mostrada en moléculas sin grupo fosfato en 5'.

Por otro lado, la forma truncada de Pol λ (Δ Pol λ), correspondiente al núcleo conservado tipo Pol β , muestra unos niveles de actividad globales mayores que la forma completa. Sin embargo, el valor relativo entre la inserción en presencia de grupo fosfato y en presencia de grupo OH, es menor que el obtenido con la forma completa (2.2 veces; Figura 7.1). Estos datos parecen apoyar la hipótesis desarrollada en el sexto capítulo de esta Tesis, sobre las diferentes conformaciones del complejo Pol λ / ADN, ya que la actividad de polimerización de Pol λ disminuye claramente en ausencia de grupo fosfato a pesar de que la afinidad de unión es aproximadamente similar (Figura 6.1). Por tanto, la diferente movilidad electroforética de los complejos Pol λ / *Gap1* 5'OH y Pol λ / *Gap1* 5'P (Figura 6.1), podría reflejar una unión compatible con la catálisis en un caso (*Gap1* 5'P), y una unión más o menos "inactiva" en el otro (*Gap1* 5'OH).

La resolución de las estructuras cristalinas de Pol β (Pelletier y cols., 1994; Sawaya y cols., 1994; Pelletier y cols., 1996a; Sawaya y cols., 1997), y Pol λ (García-Díaz y cols., 2004; García-Díaz y cols., 2005a), junto a las comparaciones de secuencia aminoacídica de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas, ha llevado a la identificación, y posterior demostración mediante mutagénesis dirigida, de la relación estructura/función de residuos aminoacídicos concretos.

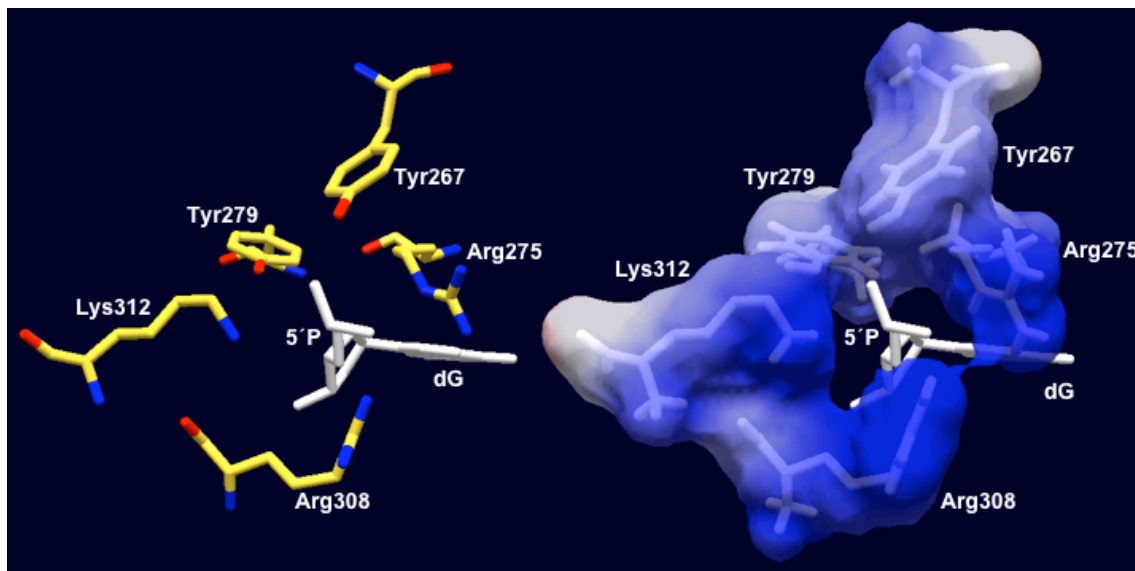


Figura 7.2: Residuos de Pol λ implicados en la unión del grupo fosfato en 5' de un nucleótido. Representación tridimensional de los residuos que forman el bolsillo de unión del grupo fosfato del dominio de 8 kDa de Pol λ . En la parte izquierda se muestra la estructura de los residuos, mientras que en la parte derecha se representa el volumen de los mismos y su carácter electrostático (azul: electropositivo; blanco: neutro; rojo: electronegativo). 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 al complejo binario de Pol λ (1XSL), obtenido de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>).

El estudio de la estructura tridimensional de Pol λ ha permitido identificar los residuos encargados de llevar a cabo la unión del grupo fosfato en 5' de un *gap*. Como se observa en la Figura 7.2, los residuos situados a una distancia máxima de 5 Å respecto al fósforo del grupo fosfato situado en 5' del *gap*, forman un bolsillo de unión altamente electropositivo y muy ajustado al grupo fosfato, lo que probablemente sea la causa de la alta estabilidad de unión del complejo Pol λ / ADN (capítulo 6).

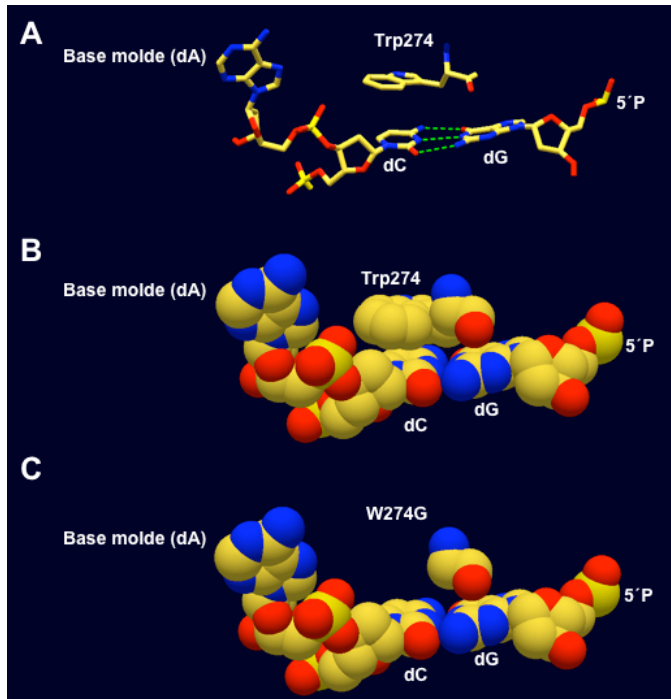


Figura 7.3: Representación tridimensional de los contactos que establece el residuo Trp274 de Pol λ con la cadena molde y downstream de la zona 5' de un *gap* de un nucleótido. A. Estructura del residuo Trp274 de Pol λ y los contactos que establece con el ADN. Se representa el nucleótido molde del *gap* (dA) y el par formado por el nucleótido presente en el extremo 5' del oligonucleótido *downstream* (dG) y su correspondiente par de la cadena molde (dC). Los puentes de hidrógeno entre las bases se representan como líneas de puntos. B. Representación de *Van der Waals* de la estructura expuesta en la parte A. C. Representación de *Van der Waals* de la estructura expuesta en las partes A. y B. en la que se ha sustituido el Trp274 de Pol λ por una glicina. 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 al complejo binario de Pol λ (1XSL), obtenido de la base de datos de estructura de proteínas (PDB; <http://www.pdb.org>).

este residuo pueda jugar un papel esencial en el reconocimiento y/o posicionamiento del grupo fosfato y su posterior efecto sobre la actividad de polimerización.

Para demostrar el hipotético papel que juega cada uno de los residuos comentados hasta el momento, así como para intentar demostrar el mecanismo general por el que una ADN polimerasa se ve influida por la presencia de un grupo fosfato en 5' de un *gap*, decidimos obtener varios mutantes puntuales en la forma completa de Pol λ , ya que es la forma que

Independientemente de los residuos que conforman el bolsillo de unión del grupo fosfato en 5', existe otro residuo que podría tener una importancia crucial para la polimerización de Pol λ en un *gap*. La cadena lateral del residuo Trp274 apila con la base del nucleótido de la cadena molde que aparea con el nucleótido en 5' de la cadena *downstream* (Figura 7.3, partes A y B). Asimismo, el esqueleto del residuo Trp274 apila con la base del nucleótido en 5' de la cadena *downstream* (Figura 7.3, partes A y B). Ambas interacciones podrían ser esenciales para el correcto posicionamiento de la cadena *downstream* y, por ende, del grupo fosfato en su sitio de unión.

Al igual que en Pol λ , la presencia de un grupo fosfato en 5' de un *gap* tiene un gran efecto en la actividad de polimerización de Pol β , tanto a nivel de eficiencia como de procesividad (García-Díaz y cols., 2002; Singhal y Wilson, 1993; Chagovetz y cols., 1997). Pol β posee también un residuo aromático (His34) en la posición equivalente al residuo Trp274 de Pol λ , lo que parece apoyar la hipótesis de que

ADN polimerasa lambda

muestra una mayor influencia por la presencia de dicho grupo (Figura 7.1), con el fin de esclarecer las causas últimas del comportamiento de Pol λ al sintetizar en presencia o ausencia de un grupo fosfato en el extremo 5' de un *gap*.

Los mutantes obtenidos son dos: K312A, que afecta a uno de los residuos implicados directamente en la unión del grupo fosfato en 5' (Figura 7.2), y W274G, que elimina el carácter aromático de los residuos presentes en Pol β y Pol λ , por lo que no podría formarse el apilamiento con la base de la cadena molde que aparea con el nucleótido en 5' de la cadena *downstream* (Figura 7.3, parte C), lo que podría repercutir en el posicionamiento de la cadena *downstream* y del grupo fosfato.

El residuo Lys312 de Pol λ había sido caracterizado previamente como el residuo responsable principal de la actividad dRP-liasa de Pol λ , ya que su sustitución por alanina provoca un descenso del 90% en dicha actividad (García-Díaz y cols., 2001). Sin embargo, no había sido estudiado desde el punto de vista de la discriminación del grupo fosfato en 5'.

Como se observa en la Figura 7.4, la sustitución de la Lys312 por alanina provoca un descenso significativo en el ratio de discriminación (de 3.4 a 2.1 veces), lo que apoya el papel de este residuo en la interacción específica con el grupo fosfato en 5'.

Por otro lado, el mutante W274G muestra un descenso aún mayor en su ratio de discriminación (de 3.4 a 1.4 veces, Figura 7.4), lo que sugiere un papel esencial de este residuo en la detección, posicionamiento y posterior efecto en la catálisis del grupo fosfato presente en el extremo 5' de un *gap*, ejerciendo un rol imprescindible y previo al anclaje del grupo fosfato en su bolsillo específico de unión en el dominio de 8 kDa, ya que en ausencia del grupo aromático, el bolsillo de unión no es suficiente para estimular la actividad de polimerización.



ADN polimerasa	% _{ins.} 5' OH	% _{ins.} 5' P	Ratio
K312A	13.37 ± 2.68	27.67 ± 1.76	2.1
W274G	27.26 ± 0.59	38.80 ± 1.83	1.4

Figura 7.4: Identificación de residuos implicados en la capacidad de discriminación del grupo fosfato presente en el extremo 5' de un *gap*. Ensayo de actividad ADN polimerasa sobre un sustrato de ADN compuesto por un *gap* de un nucleótido, en el que se evalúa el efecto de las mutaciones introducidas en Pol λ sobre la capacidad de discriminación del grupo fosfato presente en el extremo 5' de un *gap*. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de Pol λ de 12.5 nM, y una concentración de dGTP de 1 μ M. En la parte inferior de la figura se exponen la media de los porcentajes de inserción obtenidos con cada ADN polimerasa en cada sustrato en tres experimentos independientes, así como la desviación estándar y la relación entre ambos valores (Ratio = %_{ins.} 5' P / %_{ins.} 5' OH).

Estos resultados tienen importantes implicaciones en la ruta de reparación *NHEJ*, ya que la presencia o ausencia de grupo fosfato en los extremos 5' de la rotura de doble cadena, puede determinar qué ADN polimerasa intervenga en primer término y, como se verá más adelante (Apartado 7.2), el resultado final de la ruta de reparación. Por tanto, en este proceso tendrán gran relevancia tanto las propiedades de unión de cada ADN polimerasa, como la eficiencia catalítica mostrada en cada uno de los sustratos susceptibles de ser generados durante el proceso.

7.2. Patrón de síntesis de Pol λ y Pol μ en un *gap* de dos nucleótidos, y su implicación en la ruta de reparación *NHEJ*

El proceso de reparación *NHEJ* es susceptible de generar pequeños *gaps* durante el proceso de reunión de extremos, *gaps* que habrán de ser rellenados para que pueda llevarse a cabo la ligación de los extremos de forma eficiente. Las diferentes propiedades enzimáticas de Pol λ y Pol μ plantean un escenario en el que ambas enzimas podrían ejercer un papel complementario en el relleno de los pequeños *gaps* generados durante la reunión de los extremos de una rotura de doble cadena. En este estudio nos planteamos comparar la acción individual de cada ADN polimerasa en un *gap* de dos nucleótidos que contiene un grupo fosfato en 5' en función de los sustratos nucleotídicos disponibles, así como la implicación de dicha acción en una posterior actuación de una u otra ADN polimerasa. Asimismo, otra variable tomada en cuenta en este estudio es la situación del nucleótido situado en el extremo 3' del cebador. Se evalúan tres situaciones diferentes: nucleótido apareado (dTMP), nucleótido no apareado pero realineable con la primera base molde del *gap* (dCMP), y nucleótido no apareado y no realineable (dAMP) (Figura 7.5, parte A).

En primer lugar, evaluamos la capacidad de Pol μ de insertar nucleótidos de forma dirigida por la primera o la segunda base de la cadena molde, gracias a su eficiente mecanismo de dislocación de la cadena molde (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004). Asimismo, dada la conocida capacidad de Pol μ de insertar eficientemente ribonucleótidos en un sustrato de ADN (Nick-McElhinny y Ramsden, 2003; Ruiz y cols., 2003), se evaluó la capacidad de inserción en presencia de desoxinucleótidos y ribonucleótidos. Ambas especies se añadieron al ensayo en una relación de concentraciones de 10:1 a favor de los ribonucleótidos, ya que esa parece ser la relación mínima existente entre ambos *in vivo* (Traut, 1994).

Como se observa en la parte B de la Figura 7.5, si el extremo del cebador (dTMP) apareca con la base correspondiente de la cadena molde (dA), Pol μ inserta eficientemente tanto desoxinucleótidos como ribonucleótidos de forma dirigida por las dos bases de la cadena molde que conforman el *gap*. Sin embargo, la eficiencia del proceso de inserción es mayor en el caso de la inserción dirigida por la segunda base del *gap*, a través del mecanismo de dislocación de la cadena molde, que muestra una eficiencia exacerbada en el contexto de un *gap*. En ambos casos, la presencia conjunta de desoxinucleótidos y ribonucleótidos provoca la aparición de un patrón de inserción aproximadamente similar a la suma de los fenotipos individuales obtenidos con cada uno de los nucleótidos, de lo que se deduce que en este caso no existe un mecanismo de preferencia hacia una de las especies en particular.

Si el extremo del cebador posee un nucleótido (dAMP) que no apareca con su correspondiente base de la cadena molde (dA) y no se puede realinear con ninguna de las dos bases que forman el *gap* (dG y dC), el mecanismo de inserción mediado por dislocación de la

ADN polimerasa lambda

cadena molde no muestra grandes diferencias en ningún caso (desoxinucleótidos o ribonucleótidos) respecto al cebador que posee su extremo apareado (dTMP; Figura 7.5, parte B), lo que parece implicar un mecanismo de dislocación/polimerización independiente de la situación del extremo del cebador.

Sin embargo, en el caso de que el extremo del cebador (dCMP) se pueda aparear con la primera base del *gap* (dG), se produce una mayor inserción por dislocación de rG en presencia de dG (Figura 7.5, parte B), lo que probablemente refleje una necesidad de mayor estabilización en este caso, ya que los pares formados por un desoxinucleótido y un ribonucleótido son más fuertes que los formados por dos desoxinucleótidos (SantaLucía, 1998). Dicha necesidad de mayor estabilización puede ser consecuencia de la diferente conformación de la cadena molde en este evento de dislocación respecto a los mencionados anteriormente, ya que en este caso el nucleótido de la cadena molde dislocado es el que originalmente apareaba con el nucleótido del extremo del cebador (dA), mientras que en los casos anteriores se trataba del primer nucleótido de los dos que conforman el *gap* (dG). Por tanto, las sutiles diferencias en la eficiencia del proceso de dislocación parecen deberse mayoritariamente a la conformación que adopta la cadena molde, careciendo de efecto apreciable la disposición del nucleótido situado en el extremo 3' del cebador.

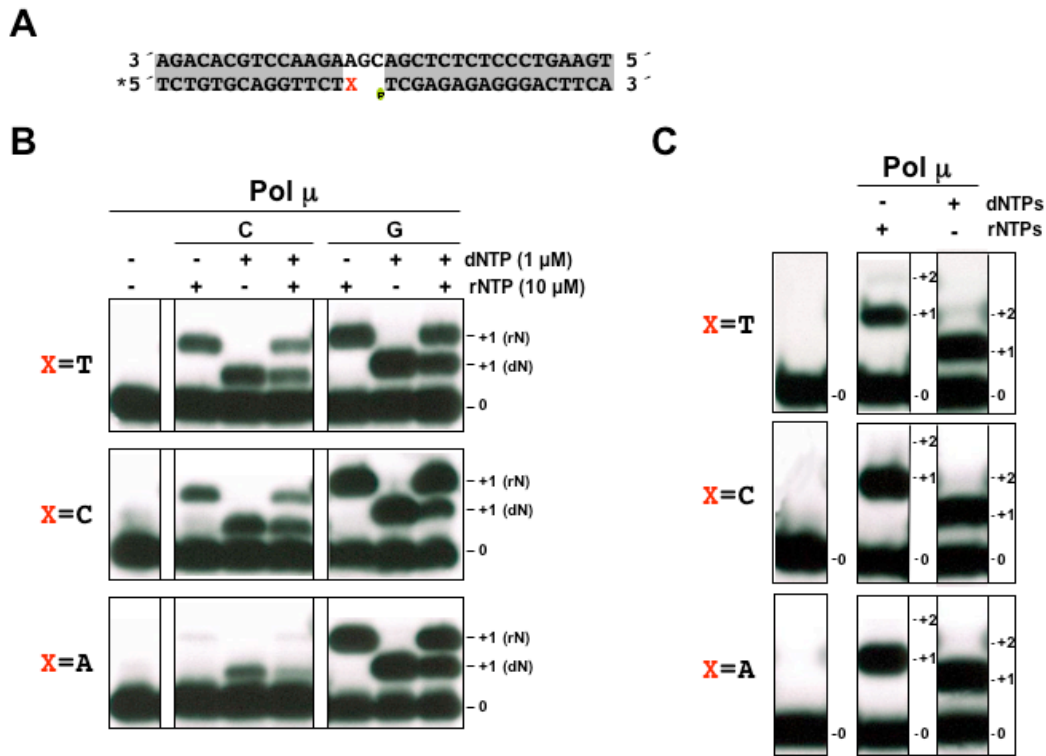


Figura 7.5: Capacidad de relleno de un *gap* de dos nucleótidos por la ADN polimerasa μ en función de la situación del nucleótido del extremo 3' del cebador. A. Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Estudio de la capacidad de inserción mediada por la primera o la segunda base de la cadena molde. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de Pol μ de 50 nM, y las concentraciones indicadas en la figura de desoxinucleótidos y ribonucleótidos. **C.** Relleno del *gap* en presencia de desoxinucleótidos o ribonucleótidos. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de Pol μ de 50 nM, 1 μ M de desoxinucleótidos (dCTP y dGTP) y 10 μ M de ribonucleótidos (rCTP y rGTP).

Por otra parte, la presencia de un nucleótido no apareado y no realineable en el extremo del cebador (dAMP), afecta drásticamente a la inserción dirigida por la primera base del *gap*, lo que parece indicar que Pol μ no es capaz de extender directamente extremos despareados (Figura 7.5, parte B). Si el nucleótido despareado (dCMP) puede ser apareado con alguna base de la cadena molde (dG) situada próxima al extremo del cebador, la inserción mediada por la primera base del *gap* conserva una eficiencia similar a la mostrada por un extremo perfectamente apareado (Figura 7.5, parte B), lo que parece indicar que la primera base del *gap* ejerce una doble función, ya que por un lado dirige el paso de inserción y además estabiliza el extremo del cebador para que se produzca la catálisis de forma eficiente.

Al evaluar la polimerización de Pol μ en el *gap* de dos nucleótidos en presencia de los desoxinucleótidos (dCTP + dGTP) o los ribonucleótidos (rCTP + rGTP) necesarios (Figura 7.5, parte C), se observa como en ningún caso se lleva a cabo el relleno completo del *gap* de forma eficiente, ya que predomina el mecanismo de dislocación (síntesis dirigida por la segunda base molde) frente a la inserción dirigida por la primera base molde, lo que provoca un bloqueo en la capacidad de síntesis de Pol μ , que impide que se complete el relleno del *gap*. Este bloqueo, en el que mayoritariamente se produce un producto +1, está provocado por la aparición de un desapareamiento dG·dGMP tras la entrada dirigida por la segunda base molde del *gap*, que impide el posterior paso de síntesis de Pol μ , de lo que se deduce la incapacidad de Pol μ de llevar a cabo la extensión directa de desapareamientos presentes en el extremo 3' del cebador, como ya se intuía de los resultados expuestos en la parte B de la Figura 7.5.

Estos resultados hacen patente la necesidad de la actuación de otra ADN polimerasa que colabore con Pol μ para llevar a cabo el relleno completo de los *gaps* generados durante el proceso NHEJ, ya que Pol μ es incapaz por sí sola de realizar esta tarea de forma eficiente.

El estudio de la capacidad de polimerización de Pol λ en el *gap* de dos nucleótidos fue realizado en presencia de desoxinucleótidos, ya que Pol λ inserta ribonucleótidos con una eficiencia muy baja, mostrando un factor de discriminación aproximado entre ambas especies $\geq 10^4$ (no mostrado). Asimismo, se evaluó la influencia de la presencia de un nucleótido despareado en el extremo 3' del cebador.

Como se observa en la parte B de la Figura 7.6, Pol λ posee un modo de síntesis opuesto a Pol μ , ya que su inserción preferente es la dirigida por la primera base molde del *gap*, independientemente de la presencia de un nucleótido despareado en el extremo del cebador. Esta capacidad de Pol λ de extender extremos despareados será ampliamente descrita en el siguiente capítulo de esta Tesis.

La única inserción eficiente de Pol λ mediada por la segunda base del *gap*, se produce cuando el nucleótido despareado del extremo del *gap* (dCMP) puede aparearse de forma correcta con la base contigua (primera base molde del *gap*, dG), dislocando un nucleótido de la cadena molde (dA), de forma que se genere un par correcto en el extremo del cebador (dG·dCMP) desde el que iniciar la catálisis.

Al evaluar la síntesis de Pol λ en presencia de ambos desoxinucleótidos se observa como Pol λ lleva a cabo el relleno del *gap* de forma eficiente en todos los casos, salvo en el caso de que el nucleótido del extremo del cebador sea realineable con la primera base molde del *gap*, lo que provoca una acumulación de producto +1 (inserción de dGMP), que refleja la

incapacidad de Pol λ de extender el desapareamiento doble (dA·dCMP/dG·dGMP) generado por el mecanismo de dislocación de la cadena molde.

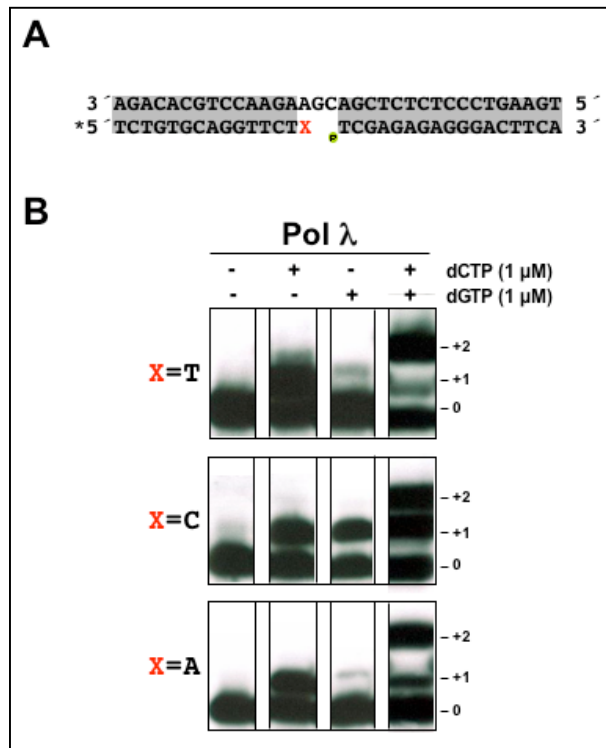


Figura 7.6: Capacidad de relleno de un *gap* de dos nucleótidos por la ADN polimerasa λ en función de la situación del nucleótido del extremo 3' del cebador. A. Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. B. Estudio de la capacidad de inserción mediada por la primera o la segunda base de la cadena molde, así como el relleno completo del *gap*. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de Pol λ de 50 nM, y las concentraciones indicadas en la figura de desoxinucleótidos.

En conjunto, los datos obtenidos con Pol λ y Pol μ reflejan la necesidad de una acción concertada de ambas ADN polimerasas para rellenar los diferentes sustratos que se pueden generar durante el proceso de reparación *NHEJ*. En el contexto de secuencia evaluado, la participación de Pol λ produciría una reparación más eficiente y fiel, ya que sería capaz de rellenar el *gap* sin cometer errores adicionales, salvo en el caso de realineamiento del extremo del cebador. Por su parte, Pol μ aporta la capacidad de polimerización eficiente con ribonucleótidos, lo que podría ser de vital importancia fuera de la fase S del ciclo celular, donde los reservorios de desoxinucleótidos celulares muestran niveles muy bajos (Bjursell y cols., 1980; McCormick y cols., 1983; Traut, 1994). Sin embargo, la capacidad de inserción de ribonucleótidos, sumada a la exacerbada tendencia a la dislocación en el contexto de un *gap*, provocaría la aparición de desapareamientos formados por un desoxinucleótido en la cadena molde y un ribonucleótido en el extremo 3' del cebador, lo que podría suponer un

problema para la capacidad de extensión de desapareamientos de Pol λ . Sin embargo, como se verá ampliamente explicado en siguiente capítulo, Pol λ extiende aún más eficientemente este tipo desapareamientos que los formados por dos desoxinucleótidos, lo que apoya la posible colaboración de ambas ADN polimerasas en este proceso de reparación.

De los resultados expuestos hasta el momento podemos concluir que la participación única de Pol μ no sería suficiente para llevar a cabo la síntesis necesaria para la reparación por *NHEJ* de una rotura de doble cadena, y además de ser insuficiente, tendría un carácter marcadamente mutagénico, tendente a producir deleciones, ya que en muchos casos impediría la subsiguiente actuación de otra ADN polimerasa, como es el caso de Pol λ frente a un doble desapareamiento en el extremo 3' del cebador. Asimismo, Pol μ podría hacer uso de su actividad transferasa terminal (independiente de molde) para rellenar los *gaps* generados sin necesidad de la participación de otra ADN polimerasa, lo que probablemente conllevaría un significativo aumento de las mutaciones introducidas.

Pol λ podría ser suficiente para llevar a cabo la síntesis completa en el *gap*, ya que a pesar de los reducidos niveles de desoxinucleótidos fuera de la fase S (Bjursell y cols., 1980; McCormick y cols., 1983; Traut, 1994), su gran afinidad (reducida K_m) por nucleótido (García-Díaz y cols., 2002) le permitiría llevar a cabo la polimerización de forma eficiente. Sin embargo, existen multitud de contextos de secuencia en los que resultaría fundamental la capacidad de reordenamiento del ADN molde de Pol μ , para que a continuación Pol λ prosiguiese con su polimerización libre de error.

Asimismo, los agentes exógenos y endógenos que producen roturas de doble cadena pueden provocar de forma colateral modificaciones químicas en las bases nitrogenadas de los nucleótidos próximos a la rotura, por lo que sería muy interesante evaluar la capacidad de síntesis frente a (molde), y a partir de (cebador) nucleótidos cuya base haya sido modificada. El estudio de síntesis frente a diversas bases modificadas se expone ampliamente en el noveno capítulo de esta Tesis.

7.3. Reparación por NHEJ con extractos derivados de los tejidos obtenidos del modelo murino deficiente (KO) en Pol λ

Con el fin de ahondar en el estudio del rol de Pol λ en esta ruta de reparación *in vivo* se llevaron a cabo diferentes ensayos de reparación por el mecanismo NHEJ mediante extractos celulares totales derivados de tejidos del modelo murino deficiente en Pol λ (KO). Los tejidos escogidos fueron testículo, donde la expresión de Pol λ es más abundante (García-Díaz y cols., 2000), y cerebro, donde Pol λ parece tener una expresión predominante en células postmitóticas durante el desarrollo embrionario (García-Ortiz, 2003). El ADN utilizado como sustrato consiste en un fragmento de 880 pares de bases correspondiente al minisatélite humano MsH42 (Boán y cols., 1998), que se encuentra clonado en el vector pGemT-Easy (Promega). Los diferentes sustratos de ADN ensayados fueron obtenidos mediante la digestión del citado plásmido con diferentes enzimas de restricción (ver Materiales y Métodos), de forma que pudimos aislar fragmentos con los extremos romos (*SmaI*), 5' protuberantes (*EcoRI*) y 3' protuberantes (*PstI*), ya que la presencia de diferentes extremos en los fragmentos de ADN utilizados como sustrato podría ser una variable relevante a la hora de estudiar el papel de Pol λ en esta ruta de reparación.

Estos ensayos consisten en la incubación de los extractos celulares totales con el fragmento de ADN en cuestión con el fin de que el proceso de reparación dé lugar a multímeros, resultantes de la unión de varios fragmentos individuales. La detección del resultado se realiza por visualización directa del ADN en geles de agarosa.

Como se observa en la Figura 7.7, la incubación de los diferentes sustratos de ADN con los extractos de los tejidos provenientes de los ratones silvestre y KO de Pol λ , produjo cierto grado de reparación por NHEJ en todos los casos, aunque siempre más eficiente en el caso de los extractos derivados de testículo. Asimismo, la eficiencia se ve incrementada gracias a la adición de la histona H1 (extremos 3' protuberantes) que protege el fragmento de la degradación nucleolítica y evita ligaciones intramoleculares, por tanto favoreciendo la aparición de multímeros (Blanco y cols., 2004). Dicho incremento en la eficiencia de la reacción produce la aparición de trímeros (T), a pesar de la baja concentración de ADN que dificulta la detección (Figura 7.7).

ADN polimerasa lambda

Los resultados obtenidos con los tres sustratos evaluados (extremos romos, 5' protuberantes y 3' protuberantes) no demuestran un requerimiento específico de Pol λ para llevar a cabo la ligación de los fragmentos, puesto que los niveles de reparación obtenidos con los extractos de tejidos del ratón *KO* de Pol λ muestran niveles similares a los obtenidos con los tejidos derivados del ratón silvestre (Figura 7.7). Este hecho es consistente con el empleo de extremos perfectamente compatibles que en principio no requieren de la acción de una ADN polimerasa para poder ser ligados. La única posibilidad se basa en que las exonucleasas presentes en el extracto procesasen parcialmente los extremos de los fragmentos de forma que se hiciese necesaria la acción de una ADN polimerasa para rellenar los *gaps* generados durante la reunión de los extremos. En este sentido, el estudio de la reparación de fragmentos con extremos 3' protuberantes no se ve alterada por la presencia o ausencia de nucleótidos añadidos de manera exógena, de forma consistente con la idea de que la reparación observada no es dependiente de la acción de una ADN polimerasa (no mostrado).

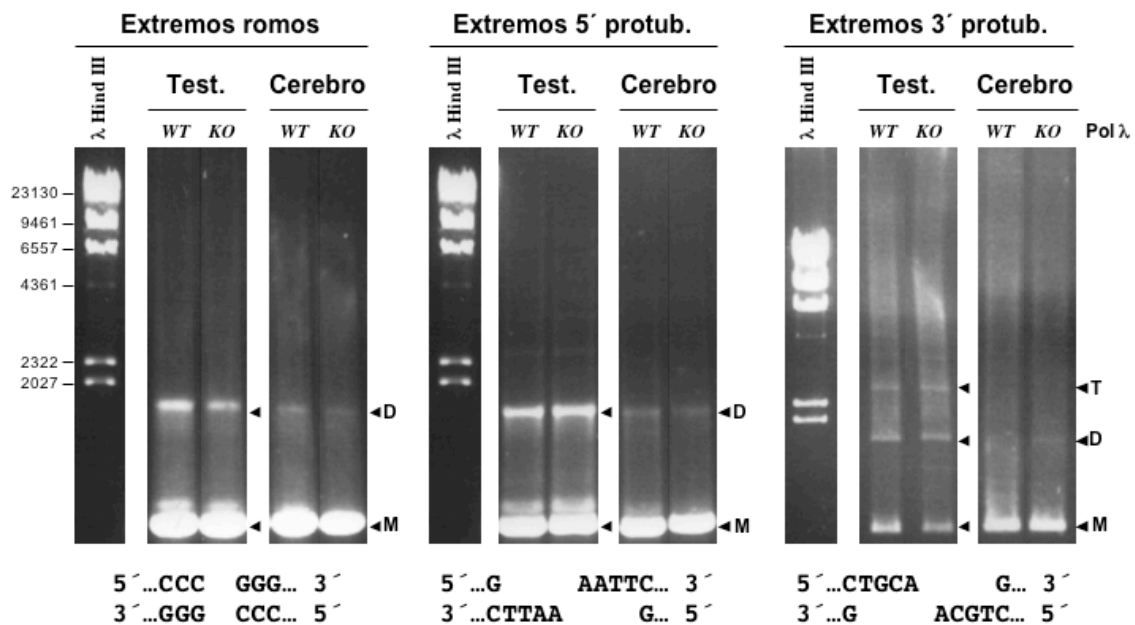


Figura 7.7: Ensayos de reparación por NHEJ con extractos derivados del modelo murino deficiente en Pol λ . Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. En el caso de los fragmentos con extremos romos o 5' protuberantes, se utilizó 1.5 μ g de ADN como sustrato y 12 μ g de extracto celular total. Tras la incubación de los componentes de la reacción, se purificó el ADN por fenolización y precipitación con etanol. En el caso de los extremos 3' protuberantes se utilizó 0.6 μ g de ADN como sustrato, 0.6 μ g de histona H1 y 4 μ g de extracto celular total. Tras la incubación de los componentes de la reacción y la parada de la reacción por congelación a -70 $^{\circ}$ C, se cargaron directamente los productos de la reacción en la electroforesis. M: monómero (sustrato); D: dímero; T: trímero.

Con el fin de profundizar en el posible papel de Pol λ en la ruta de reparación por NHEJ, decidimos evaluar la capacidad de reparación por esta ruta de extractos derivados de testículo de ratones de diferentes días de desarrollo post-natal, dado el carácter marcadamente regulado de la expresión de Pol λ en este tejido (García-Díaz y cols., 2000; Figura 4.5, parte A). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.8. El sustrato empleado es el fragmento con extremos 5' protuberantes (*EcoRI*). Se observa como los extractos derivados de tejido adulto muestran niveles similares de formación de dímeros (D), sin embargo, los extractos derivados de individuos de diferentes días de desarrollo post-natal muestran diferencias significativas. Los

extractos obtenidos de individuos silvestres de 19 días de desarrollo post-natal muestran una eficiencia de reparación por *NHEJ* mayor que la mostrada por los extractos derivados de individuos deficientes en Pol λ (Figura 7.8), lo que parece indicar un papel relevante de Pol λ en esta ruta de reparación durante el desarrollo post-natal. Este resultado es consistente con el patrón de expresión de Pol λ , ya que los niveles de expresión del ARNm de Pol λ son altos desde el día 16 de desarrollo post-natal (Figura 4.5, parte A), por lo que la carencia de Pol λ podría desembocar en una reducción en la capacidad de reparación por el mecanismo *NHEJ*.

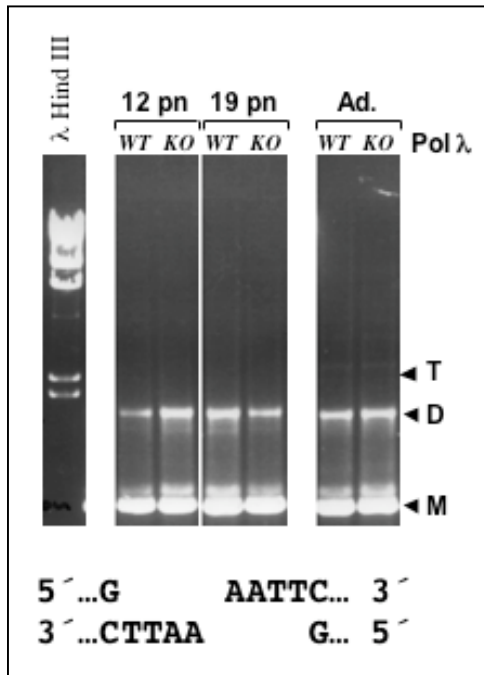


Figura 7.8: Estudios de la capacidad de reparación por *NHEJ* de extractos obtenidos de testículos de diferente desarrollo post-natal. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, utilizando 1.5 μ g de ADN como sustrato y 12 μ g de extracto celular total. Tras la incubación de los componentes de la reacción, se purificó el ADN por fenolización y precipitación con etanol. M: monómero (sustrato); D: dímero.

Por otro lado, los resultados obtenidos con los extractos obtenidos de tejidos de 12 días de desarrollo post-natal, en los que la expresión del ARNm de Pol λ no es detectable (Figura 4.5, parte A), muestran diferencias en el nivel de reparación por *NHEJ* en favor de los extractos derivados del individuo deficiente en Pol λ (Figura 7.8), lo que podría indicar una expresión compensatoria de Pol μ , la otra ADN polimerasa dependiente de molde implicada hasta el momento en este proceso de reparación.

Las diferencias observadas a lo largo del desarrollo indican además un diferente patrón de actividad nucleolítica, imprescindible para que la presencia o ausencia de una determinada ADN polimerasa se haga patente en el resultado final del ensayo.

Los resultados expuestos hasta el momento no demuestran claramente la implicación de Pol λ en la ruta de reparación *NHEJ*. Sería necesario el empleo de extremos parcialmente compatibles que generen *gaps* durante la reunión de los mismos, con el fin de establecer un requerimiento de actividad ADN polimerasa, que permitiese evaluar más exhaustivamente el papel de Pol λ .

8

Extensión de desapareamientos

La demostración de que Pol λ posee una extraordinaria capacidad para generar errores de desplazamiento de pauta de lectura, especialmente deleciones (Bebenek y cols., 2003), sugiere una especial aptitud de Pol λ para usar como sustrato moléculas de ADN con apareamientos imperfectos. Este tipo de moléculas son susceptibles de ser generadas durante el proceso de reparación *NHEJ*, puesto que la complementariedad a nivel de secuencia que permite la unión de los extremos casi nunca será total, pudiendo quedar nucleótidos desapareados en la parte interna o en los extremos 3' o 5' de las moléculas a reunir. Por tanto, la capacidad de extensión de desapareamientos en el extremo 3' del cebador puede constituir una ventaja a la hora de procesar una rotura de doble cadena por el mecanismo *NHEJ*, por lo que decidimos estudiar el comportamiento de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas ante este tipo de sustratos, dado el hipotético papel de algunos de sus miembros en esta ruta de reparación.

Asimismo, la interacción de Pol λ con PCNA y su capacidad de síntesis frente a un sitio abásico (Maga y cols., 2002), sumado a la constante de que todas las ADN polimerasas implicadas en síntesis a través de lesiones (Pol ζ , Pol η , Pol κ y Pol ι) son capaces de extender más o menos eficientemente extremos desapareados (Johnson y cols., 2000a; Washington y cols., 2001; Washington y cols., 2002; Vaisman y cols., 2001), apoyaba el posible papel de Pol λ en procesos relacionados con la tolerancia al daño, por lo que se realizó un estudio detallado de la capacidad de síntesis de Pol λ frente a este tipo de sustratos.

La extensión de desapareamientos es un proceso clave en la mutagénesis. Si un extremo desapareado no se extiende eficientemente, puede entrar en juego un enzima con actividad exonucleasa 3'→5' que eliminaría el nucleótido del extremo del cebador, abortando así la fijación de la posible mutación. La mutagénesis es un proceso fundamental para el organismo desde dos puntos de vista diferentes. En primer lugar, la prevención de estos fenómenos es esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica y, por tanto, para la prevención de enfermedades como el cáncer, derivadas en muchos casos de la aparición de mutaciones puntuales en proteínas implicadas en el control del ciclo celular o en reparación del ADN. Sin embargo, los fenómenos de mutagénesis son imprescindibles para que el sistema inmunológico realice su función de manera correcta, ya que gracias a ellos se consigue mejorar la afinidad de los receptores antigénicos a través de procesos como la recombinación V(D)J y la hipermutación somática, por lo que el posible papel de Pol λ en estos procesos se vería avalado por una característica como la eficiente extensión de extremos desapareados que probablemente resultaría útil en los procesos de generación de variabilidad.

8.1. Diversidad funcional de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas

Las tres ADN polimerasas de la Familia X dependientes de molde (Pol β , Pol λ y Pol μ) preferentemente realizan la incorporación del nucleótido complementario a la primera base molde contigua al extremo del cebador cuando el extremo del cebador aparea perfectamente con su correspondiente base en la cadena molde, de acuerdo a las reglas de Watson y Crick (Watson y Crick, 1953). En el caso particular presentado en la Figura 8.1, se observa la inserción de dA frente a la base molde dT llevada a cabo eficientemente por las tres ADN polimerasas de la Familia X (Figura 8.1, parte izquierda). Sin embargo, cuando el extremo del cebador no se encuentra correctamente apareado a la base molde, como por ejemplo un desapareamiento dG-dGMP, el comportamiento de estos tres enzimas es completamente diferente (Figura 8.1,

parte derecha). Mientras que Pol β no es capaz de extender el iniciador desapareado con ninguno de los 4 nucleótidos, Pol λ y Pol μ utilizan diferentes estrategias para llevar a cabo la extensión del cebador. De acuerdo con la capacidad intrínseca de Pol μ de llevar a cabo dislocaciones en la cadena molde (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004), Pol μ prefiere recolocar la base del extremo del cebador de forma que aparee con la siguiente base de la cadena molde, formando así un par correcto dC·dGMP, que permite la incorporación de un residuo dA frente a la siguiente base molde (dT). De acuerdo con este mecanismo, al cambiar la base molde, el nucleótido incorporado es el complementario a la nueva base molde. Con menor eficiencia, Pol μ es también capaz de insertar dT, probablemente gracias a su actividad transferasa terminal (Domínguez y cols., 2000; Covo y cols., 2004; Juárez y cols., 2006). Por último, la solución menos eficiente es la inserción de dG, lo que sugiere que la capacidad de Pol μ para extender desapareamientos de manera directa, sin realinear la molécula para generar un par perfectamente apareado, es muy baja.

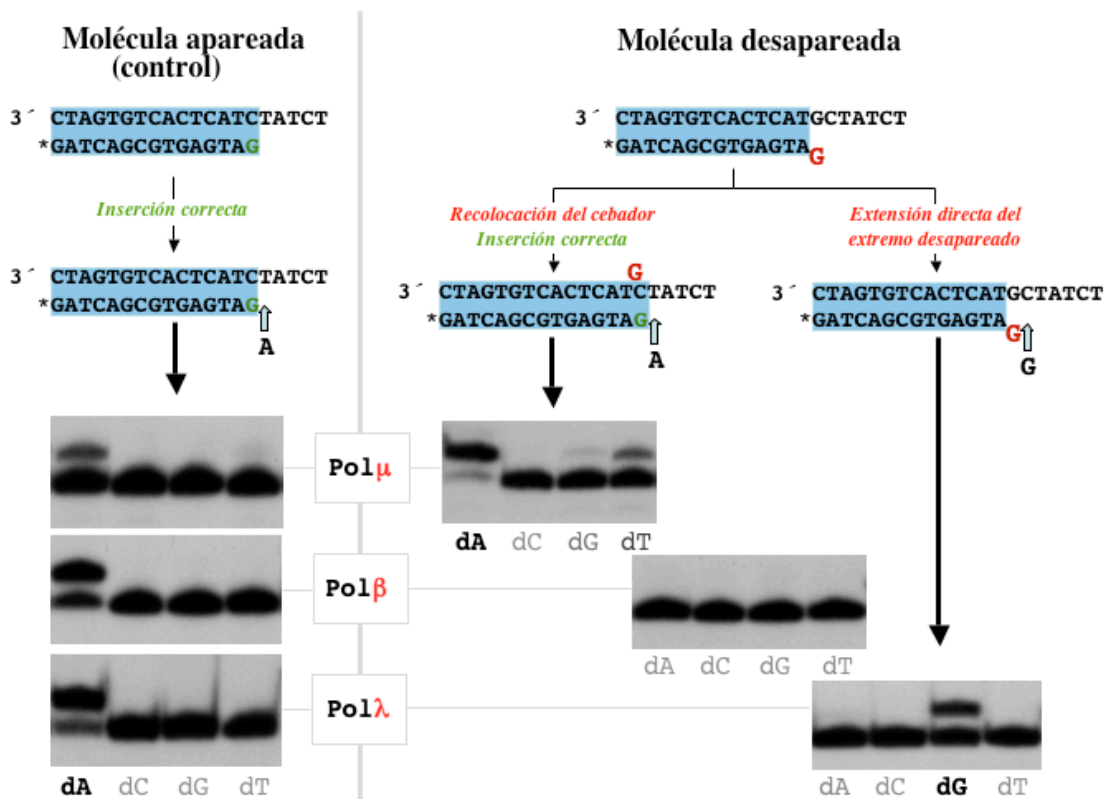


Figura 8.1: Diversidad funcional de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas. En el ensayo se emplearon dos moléculas de ADN, siendo la única diferencia entre ambas la situación del nucleótido del extremo 3' del cebador. La extensión del cebador (5 nM) marcado radiactivamente en su extremo 5'(*), se evaluó en presencia de cada ADN polimerasa (360 nM) y una concentración de 5 μ M de cada nucleótido. Los componentes de la reacción, descritos en Materiales y Métodos, se incubaron 20 min a 37 °C. Los productos de la reacción fueron separados mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (20% poliacrilamida, 8M urea) y detectados mediante autorradiografía.

En claro contraste, Pol λ al tener como sustrato una molécula con un desapareamiento dG·dGMP en el extremo del cebador, únicamente es capaz de extenderlo directamente incorporando dG de manera dirigida por la base molde dC contigua al par desapareado. El nivel de extensión observado parece denotar una alta eficiencia en la realización de la catálisis enzimática.

Por lo tanto, tanto Pol λ como Pol μ son capaces de extender extremos de cebadores desapareados respecto a la cadena molde, pero de diferente manera y con diferentes consecuencias. La acción de Pol μ generaría la delección de un nucleótido o dos mutaciones en tándem, mientras que Pol λ extendería el desapareamiento sin cometer errores adicionales, provocando de esa forma la fijación de una mutación en el ADN, que podría ser o no reparada posteriormente según el contexto en el que se haya producido (mantenimiento de la estabilidad genómica *versus* generación de variabilidad).

Estos resultados iniciales adolecían de tener un carácter meramente cualitativo, por lo que decidimos realizar un análisis cuantitativo que permitiese valorar objetivamente la capacidad de extensión de extremos desapareados de Pol λ y comparar esa capacidad con el resto de ADN polimerasas estudiadas hasta la fecha, pudiendo así esclarecer la eficiencia relativa de su capacidad en el contexto celular. Esta tarea se acometió con la realización de una caracterización cinética exhaustiva en condiciones de estado estacionario de la extensión de los 16 pares posibles, 4 correctamente apareados y 12 desapareados.

8.2. Análisis en condiciones de estado estacionario de la capacidad de Pol λ para extender extremos desapareados

Para este estudio se utilizó la forma truncada de Pol λ correspondiente al núcleo conservado tipo Pol β , que carece de la zona N-terminal donde se sitúan el dominio BRCT y el dominio Serina/Prolina, dominios en principio dispensables para la actividad enzimática (Delarue y cols., 2002). El motivo de esta decisión fue la posibilidad que ofrece la forma truncada de complementar el estudio desde un punto de vista estructural, dado que hasta la fecha ha sido imposible obtener estructuras cristalinas con la proteína completa. A nivel bioquímico, ambas formas de Pol λ tienen el mismo comportamiento general, siendo la única diferencia significativa un aumento de 5 veces en el valor de K_m en el caso de la forma de 39 kDa, lo que podría reflejar cierta influencia de los dominios de la zona N-terminal en la unión del nucleótido (García-Díaz y cols., 2004). Ensayos preliminares confirmaron que la forma truncada de Pol λ conserva la capacidad de extensión de extremos desapareados por lo que se procedió a la realización de la caracterización cinética.

Se llevó a cabo la caracterización cinética en condiciones de estado estacionario de la extensión de los 16 pares posibles, 4 correctamente apareados y 12 desapareados, en moléculas tipo molde/cebador abierto, que podrían simular intermedios de replicación. La extensión directa de los 16 pares posibles se valoró en presencia de dGTP, nucleótido complementario a la primera base molde contigua a cada uno de los pares estudiados (dC), asegurándonos de esta forma que los únicos eventos de síntesis que evaluaríamos serían aquellos derivados de la extensión directa del par en cuestión. La tasa de incorporación de nucleótido, obtenida como se describe en Materiales y Métodos, se representó en función de la concentración de nucleótido empleada en cada caso, y los valores de V_{max} y K_m aparentes se obtuvieron del mejor ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1, ver Materiales y Métodos). De estos datos se obtuvieron tanto los valores de eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) como los de frecuencia de extensión de desapareamientos (f_{ext}^o) (Ecuaciones 3 y 4, ver Materiales y Métodos).

Como se observa en la Tabla 8.I, Pol λ es capaz de extender la mayoría de los desapareamientos, aunque la eficiencia catalítica varía dependiendo de la naturaleza de cada

ADN polimerasa lambda

uno. De esta forma, Pol λ extiende de manera poco eficiente los pares que tengan una pirimidina como base molde (dC·dAMP, dC·dCMP; dC·dTMP; dT·dCMP; dT·dTMP), siendo los niveles de extensión insuficientes para poder realizar una cuantificación fiable por densitometría. Sin embargo, los desapareamientos en los que es una purina la base molde se extienden de manera más eficiente (dA·dAMP; dA·dCMP; dA·dGMP; dG·dAMP; dG·dGMP; dG·dTMP). La excepción a esta tendencia la observamos en el par dT·dGMP, que se extiende con una eficiencia similar a la de los pares con una base purínica como molde. Esto puede ser debido a que el centro activo de Pol λ fuerce una conformación del par en cuestión que se asemeje a la simetría presentada por un par correcto, como ha sido descrito para la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Johnson y Beese, 2004).

Incluso en los casos en los que el desapareamiento tiene como base molde una purina, las eficiencias catalíticas se muestran alejadas de los valores obtenidos con los pares correctamente apareados, mostrando diferencias en torno a 100 veces. En resumen, Pol λ es capaz de polimerizar partiendo de un extremo de iniciador desapareado con una frecuencia media de 2.76×10^{-2} , por lo que la diferencia media entre la eficiencia de extensión de un par apareado y desapareado se reduce a un valor de 36 veces, considerando únicamente los desapareamientos cuyos niveles de extensión fueron suficientes para realizar los cálculos cinéticos.

M · C	V_{max} $\mu\text{M min}^{-1}$	K_m μM	k_{cat} min^{-1}	k_{cat}/K_m $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$	f_{ext}^o
A · A	$(1.44 \pm 0.45) \times 10^{-4}$	15.51 ± 1.21	$1.92 \cdot 10^{-3}$	$1.24 \cdot 10^{-4}$	$1.04 \cdot 10^{-2}$
A · C	$(5.71 \pm 0.86) \times 10^{-4}$	9.87 ± 1.22	$7.61 \cdot 10^{-3}$	$7.71 \cdot 10^{-4}$	$6.48 \cdot 10^{-2}$
A · G	$(3.25 \pm 0.65) \times 10^{-4}$	7.75 ± 0.68	$3.91 \cdot 10^{-3}$	$5.09 \cdot 10^{-4}$	$4.28 \cdot 10^{-2}$
A · T	$(2.86 \pm 0.46) \times 10^{-3}$	7.84 ± 0.83	$9.18 \cdot 10^{-2}$	$1.19 \cdot 10^{-2}$	
C · A	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
C · C	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
C · G	$(7.49 \pm 0.82) \times 10^{-4}$	9.61 ± 1.22	$2.44 \cdot 10^{-1}$	$2.54 \cdot 10^{-2}$	
C · T	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
G · A	$(1.98 \pm 0.26) \times 10^{-4}$	15.28 ± 2.35	$1.98 \cdot 10^{-3}$	$1.30 \cdot 10^{-4}$	$7.83 \cdot 10^{-3}$
G · C	$(6.49 \pm 0.54) \times 10^{-4}$	7.83 ± 0.52	$1.30 \cdot 10^{-1}$	$1.66 \cdot 10^{-2}$	
G · G	$(1.78 \pm 0.13) \times 10^{-4}$	9.37 ± 1.85	$2.37 \cdot 10^{-3}$	$2.53 \cdot 10^{-4}$	$1.52 \cdot 10^{-2}$
G · T	$(4.47 \pm 0.48) \times 10^{-4}$	7.97 ± 0.48	$4.99 \cdot 10^{-3}$	$6.25 \cdot 10^{-4}$	$3.77 \cdot 10^{-2}$
T · A	$(1.81 \pm 0.29) \times 10^{-4}$	1.48 ± 0.27	$3.62 \cdot 10^{-2}$	$2.45 \cdot 10^{-2}$	
T · C	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
T · G	$(2.29 \pm 0.45) \times 10^{-4}$	8.05 ± 1.61	$2.76 \cdot 10^{-3}$	$3.54 \cdot 10^{-4}$	$1.45 \cdot 10^{-2}$
T · T	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

Tabla 8.I: Frecuencias de extensión de nucleótidos apareados y desapareados en moléculas tipo molde/cebador abierto por Pol λ . La extensión fue medida en presencia de dGTP, el siguiente nucleótido correcto. Los datos son medias (\pm desviación estándar) de al menos tres ensayos independientes. n.c. Niveles de extensión no cuantificables. M: nucleótido del par perteneciente a la cadena molde. C: nucleótido del extremo 3' del cebador.

8.3. La presencia de un oligonucleótido *downstream* con un grupo fosfato en 5' permite a Pol λ llevar a cabo la extensión de los 12 desapareamientos posibles de manera eficiente

Las moléculas de ADN con pequeños *gaps* son el sustrato preferido de Pol λ (ver capítulos 6 y 7; García-Díaz y cols., 2002). En estos sustratos, el dominio de 8 kDa de Pol λ establece contactos específicos con la parte 5' del *gap* (García-Díaz y cols., 2004) que modulan la actividad del enzima. Asimismo, la presencia de un grupo fosfato en 5' del *gap* produce un significativo incremento en la formación del complejo binario enzima-ADN (ver capítulo 6), y también aumenta la procesividad del enzima (García-Díaz y cols., 2002). Además, las posibles funciones de Pol λ *in vivo* (*BER*, *NHEJ*) requieren pasos de síntesis de ADN en contexto de pequeños *gaps*, por lo que es importante medir la capacidad de extensión de desapareamientos en su sustrato preferido, un ADN con un *gap* de un nucleótido y con un grupo fosfato en 5' del *gap*.

Como se observa en la Tabla 8.II, la eficiencia catalítica obtenida para los 4 pares correctos (dA·dTMP; dC·dGMP; dG·dCMP; dT·dAMP) es 320, 130, 270 y 340 veces mayor respectivamente que la obtenida en el sustrato tipo molde/cebador abierto, siendo el contexto de secuencia en torno al par exactamente igual. Estos datos corroboran la afirmación de que éste es el sustrato óptimo de Pol λ .

M · C	V_{max} $\mu\text{M min}^{-1}$	K_m μM	k_{cat} min^{-1}	k_{cat}/K_m $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$	f_{ext}^o
A · A	$(1,12 \pm 0,16) \times 10^{-3}$	$7,48 \pm 0,54$	$2,24 \cdot 10^{-1}$	$3,00 \cdot 10^{-2}$	$8,00 \cdot 10^{-3}$
A · C	$(2,27 \pm 0,23) \times 10^{-3}$	$1,85 \pm 0,25$	$4,54 \cdot 10^{-1}$	$2,45 \cdot 10^{-1}$	$6,53 \cdot 10^{-2}$
A · G	$(1,46 \pm 0,17) \times 10^{-3}$	$7,99 \pm 1,65$	$2,92 \cdot 10^{-1}$	$3,66 \cdot 10^{-2}$	$9,76 \cdot 10^{-3}$
A · T	$(2,25 \pm 0,34) \times 10^{-3}$	$0,12 \pm 0,01$	$4,50 \cdot 10^{-1}$	3,75	
C · A	$(2,01 \pm 0,41) \times 10^{-4}$	$42,82 \pm 6,49$	$4,02 \cdot 10^{-2}$	$9,39 \cdot 10^{-4}$	$2,94 \cdot 10^{-4}$
C · C	$(4,36 \pm 0,76) \times 10^{-4}$	$6,84 \pm 0,17$	$2,18 \cdot 10^{-2}$	$3,19 \cdot 10^{-3}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$
C · G	$(5,59 \pm 0,96) \times 10^{-3}$	$0,35 \pm 0,04$	1,12	3,19	
C · T	$(4,21 \pm 0,49) \times 10^{-4}$	$8,27 \pm 0,78$	$8,42 \cdot 10^{-2}$	$1,02 \cdot 10^{-2}$	$3,19 \cdot 10^{-3}$
G · A	$(3,91 \pm 0,78) \times 10^{-4}$	$4,48 \pm 0,21$	$7,82 \cdot 10^{-2}$	$1,75 \cdot 10^{-2}$	$3,93 \cdot 10^{-3}$
G · C	$(3,78 \pm 0,73) \times 10^{-3}$	$0,17 \pm 0,04$	$7,56 \cdot 10^{-1}$	4,45	
G · G	$(2,49 \pm 0,45) \times 10^{-3}$	$5,73 \pm 1,29$	$4,98 \cdot 10^{-1}$	$8,69 \cdot 10^{-2}$	$1,95 \cdot 10^{-2}$
G · T	$(2,44 \pm 0,30) \times 10^{-3}$	$1,94 \pm 0,09$	$4,88 \cdot 10^{-1}$	$2,52 \cdot 10^{-1}$	$5,66 \cdot 10^{-2}$
T · A	$(3,73 \pm 0,61) \times 10^{-4}$	$0,09 \pm 0,02$	$7,46 \cdot 10^{-1}$	8,29	
T · C	$(3,55 \pm 0,61) \times 10^{-4}$	$5,51 \pm 0,71$	$7,10 \cdot 10^{-2}$	$1,29 \cdot 10^{-2}$	$1,56 \cdot 10^{-3}$
T · G	$(6,41 \pm 0,66) \times 10^{-4}$	$1,24 \pm 0,28$	$1,28 \cdot 10^{-1}$	$1,03 \cdot 10^{-1}$	$1,24 \cdot 10^{-2}$
T · T	$(1,84 \pm 0,36) \times 10^{-4}$	$8,17 \pm 0,54$	$3,68 \cdot 10^{-2}$	$2,00 \cdot 10^{-2}$	$2,41 \cdot 10^{-3}$

Tabla 8.II: Frecuencias de extensión de nucleótidos apareados y desapareados en moléculas tipo *gap* de un nucleótido con un grupo fosfato en 5' por Pol λ . La extensión fue medida en presencia de dGTP, el siguiente nucleótido correcto. Los datos son medias (\pm desviación estándar) de al menos tres ensayos independientes. M: nucleótido del par perteneciente a la cadena molde. C: nucleótido del extremo 3' del cebador.

La extensión de los 12 posibles desapareamientos fue detectable y cuantificable en el caso de ser evaluada en el sustrato tipo *gap* de un nucleótido con fosfato en 5' (Tabla 8.II), en contraste con lo observado en las moléculas tipo molde/cebador abierto (Tabla 8.I). El

incremento medio en la eficiencia catalítica de extensión de desapareamientos tiene un valor similar al obtenido en el caso de los pares correctos (260 veces).

Hay que reseñar que el incremento observado en los valores de eficiencia catalítica, tanto en el caso de los apareamientos como en el de los desapareamientos, es estrictamente dependiente de la presencia del grupo fosfato en el extremo 5' del *gap*. Al evaluar la extensión de nucleótidos apareados y desapareados en un ADN tipo *gap* de un nucleótido con un grupo OH en el extremo 5', los valores de extensión se aproximan a los obtenidos en moléculas tipo molde/cebador abierto (no mostrado).

En conclusión, en el contexto de un ADN tipo *gap* con fosfato en 5', Pol λ es capaz de polimerizar partiendo de un extremo de iniciador desapareado con una frecuencia media de 1.53×10^{-2} , por lo que la diferencia media entre la eficiencia de extensión de un nucleótido apareado y desapareado es tan solo de 65 veces. Esta reducción en la eficiencia catalítica no se debe a un déficit en la capacidad de unión estable a estas moléculas con desapareamientos, ya que Pol λ se une con similar estabilidad a moléculas apareadas y desapareadas (Figura 8.2). Por lo tanto, la diferencia en la eficiencia catalítica ha de ser debida a cambios a nivel de centro activo que dificulten la catálisis, y no a impedimentos estéricos que dificulten la unión de Pol λ al ADN.

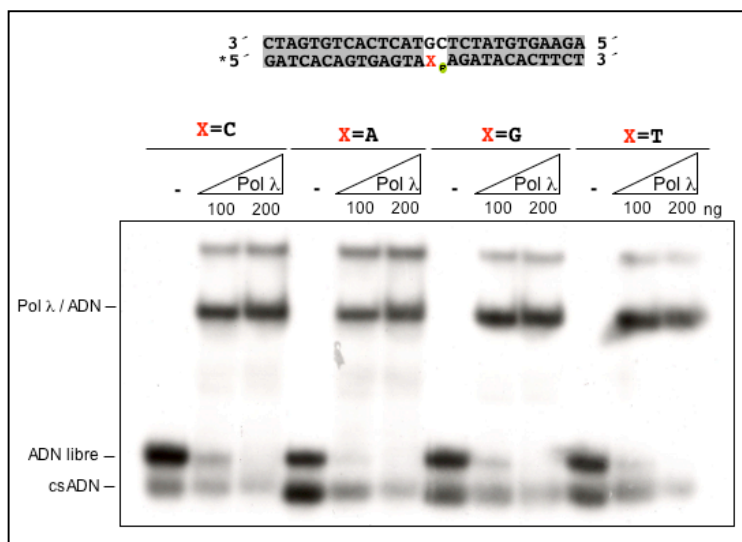


Figura 8.2: Capacidad de unión de Pol λ a moléculas tipo *gap* de un nucleótido con grupo fosfato en 5' en función de la configuración del extremo 3' del cebador. Análisis, mediante ensayos de retraso en gel (ver Materiales y Métodos), de la capacidad de Pol λ de formar complejos estables con diferentes moléculas de ADN cuyo extremo 3' del cebador esté perfectamente apareado (dG·dCMP) o desapareado (dG·dAMP, dG·dGMP y dG·dTMP).

8.4. Mecanismos de Pol λ, alternativos a la extensión directa, para polimerizar desde extremos desapareados

El contexto de secuencia en el que se produzca la extensión de un desapareamiento puede tener una relevancia crucial en el proceso. Pueden existir situaciones en las que el nucleótido desapareado del extremo del cebador encuentre complementariedad de base en posiciones próximas de la cadena molde, lo que podría dar lugar a fenómenos de síntesis distintos de la extensión directa del desapareamiento, de forma similar a lo que ocurre con Pol μ, que es capaz de reordenar el extremo del cebador dislocando un nucleótido de la hebra molde para formar un par correctamente apareado (Figura 8.1). Asimismo, dicha complementariedad entre la base del extremo del cebador y alguna base próxima de la cadena molde podría desembocar en una reducción de la eficiencia catalítica del paso de extensión directa.

En el contexto de un *gap* de un nucleótido con grupo fosfato en 5', en el que la eficacia de unión y extensión de desapareamientos de Pol λ es máxima, la posible complementariedad

del extremo desapareado habría de producirse con bases *upstream* de la cadena molde, ya que la zona *downstream* se encontraría establemente hibridada. Con el fin de evaluar esta posibilidad, estudiamos la capacidad de extensión de extremos apareados y desapareados en presencia de cada uno de los cuatro nucleótidos por separado, ya que de esta forma podríamos evaluar los diferentes eventos de síntesis individualmente.

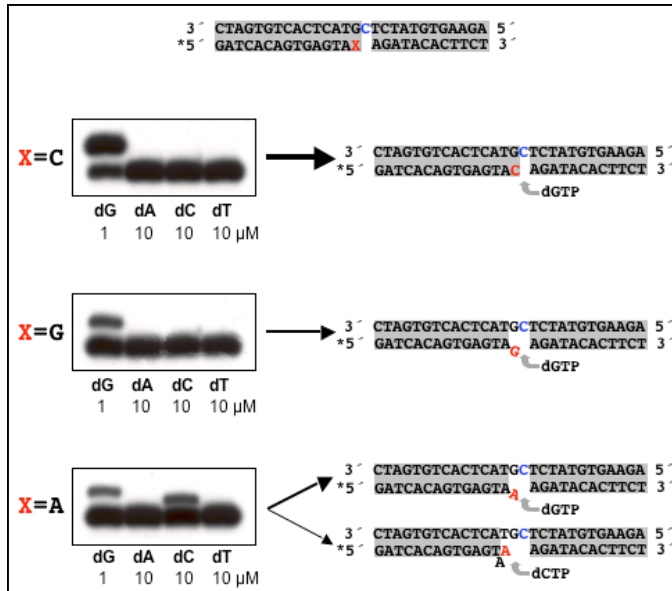


Figura 8.3: Mecanismos alternativos para la extensión de desapareamientos (I). Ensayos de extensión del cebador marcado radiativamente en su extremo 5'(*), en los que se evalúa la capacidad de Pol λ de efectuar eventos de síntesis, distintos de la extensión directa, en moléculas tipo *gap* de un nucleótido y fosfato en 5', en las que el nucleótido del extremo del cebador se encuentra desapareado. La extensión del cebador (250 nM) se evaluó en presencia de Pol λ (50 nM) y la concentración señalada de cada nucleótido. Los componentes de la reacción (ver Materiales y Métodos) se incubaron 20 min a 37 °C. El grosor de las flechas indica la tendencia relativa de Pol λ a realizar el evento de síntesis esquematizado.

Como se observa en la Figura 8.3, y como era previamente conocido (García-Díaz y cols., 2002), Pol λ sólo introduce el nucleótido complementario a la primera base molde al polimerizar a partir de un extremo perfectamente apareado (dG·dCMP), a pesar de que la concentración de los nucleótidos incorrectos es diez veces mayor que la del nucleótido correcto (dGTP). Asimismo, al extender desde un extremo desapareado (dG·dGMP), Pol λ sólo realiza la extensión directa del mismo, introduciendo el nucleótido complementario (dGTP) a la base codificante del *gap* (dC). Sin embargo, al evaluar la polimerización desde un par desapareado (dG·dAMP), en el que el nucleótido del extremo 3' del cebador (dAMP) puede aparearse correctamente con un nucleótido inmediatamente anterior de la hebra molde (dT), se observa como Pol λ es capaz de introducir un nucleótido (dCTP) dirigido por la base de la cadena molde anterior (dG) a la base codificante del *gap* (dC). Dada la diferencia de concentraciones de nucleótido empleadas en cada caso (dGTP 1 μ M; dCTP 10 μ M), la inserción de dCTP se produce de manera menos eficiente que la extensión directa del par desapareado efectuada con la inserción de dGTP. Por lo tanto, podemos concluir que la eficiencia de extensión mediada por reordenamiento del extremo del cebador, es aproximadamente 10 veces menor que la extensión directa del desapareamiento. Este caso ejemplifica un nuevo mecanismo de Pol λ para poder polimerizar a partir de extremos desapareados, y denota un alto grado de versatilidad de esta ADN polimerasa a la hora de enfrentarse a sustratos de diferente naturaleza.

En la Figura 8.4 se evalúan estos mismos fenómenos con la única variación consistente en el cambio de la base codificante del *gap* (dC \rightarrow dA). Los resultados expuestos denotan la importancia del contexto de secuencia en la capacidad intrínseca de cada ADN polimerasa a la hora de llevar a cabo un evento de síntesis. Al contrario de lo que ocurría en el caso de la Figura 8.3, al llevar a cabo la extensión de un par perfectamente apareado (dG·dCMP), Pol λ introduce

el nucleótido complementario (dTTP) a la base codificante del gap (dA), pero también introduce eficientemente dCTP. Esta inserción ha de venir dirigida por la base anterior a la base codificante del *gap*, base que en definitiva forma el par apareado con la base del extremo del cebador (dG·dCMP). Como se esquematiza en la Figura 8.4, Pol λ ha de ser capaz de desplazar el nucleótido apareado del extremo 3' del cebador (dCMP), de forma que la entrada de nucleótido venga dirigida por la propia base del par original (dG), pero también de forma que el extremo 3'OH del nucleótido del extremo del cebador mantenga una posición compatible con la catálisis enzimática. Esta capacidad resulta mucho menos eficiente que la inserción correcta y es estrictamente dependiente de la presencia de una adenina como base codificante del *gap* (no mostrado).

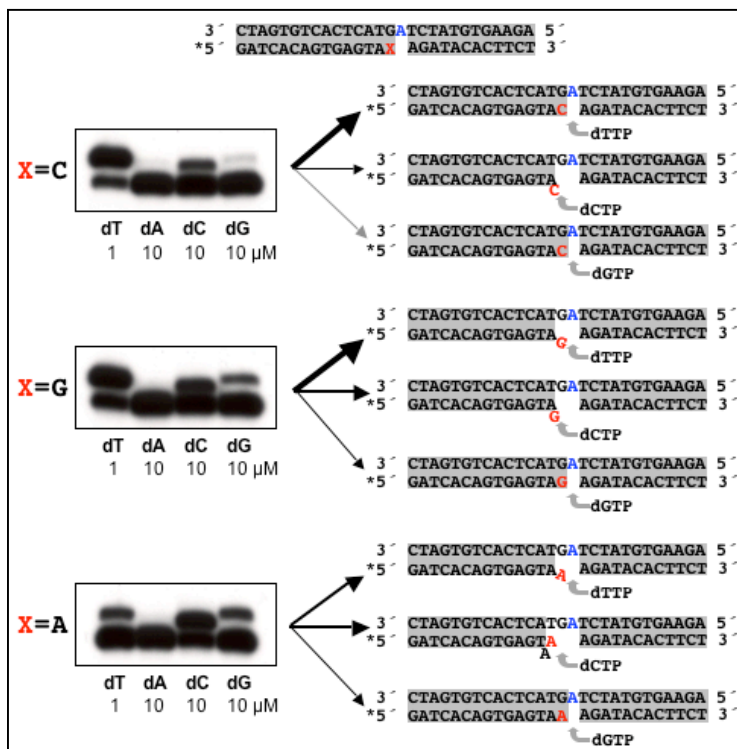


Figura 8.4: Mecanismos alternativos para la extensión de desapareamientos (II). Ensayos de extensión de cebador marcado radiactivamente en su extremo 5'(*), en los que se evalúa la capacidad de Pol λ de efectuar eventos de síntesis, distintos de la extensión directa, en moléculas tipo *gap* de un nucleótido y grupo fosfato en 5', en las que el nucleótido del extremo del cebador se encuentra desapareado. La extensión del cebador (250 nM) se evaluó en presencia de Pol λ (50 nM) y la concentración señalada de cada nucleótido. Los componentes de la reacción, descritos en Materiales y Métodos, se incubaron 20 min a 37 °C. El grosor de las flechas indica la tendencia relativa de Pol λ a realizar el evento de síntesis esquematizado.

Al evaluar la extensión del par desapareado (dG·dGMP), se observa como Pol λ realiza muy eficientemente su extensión de forma directa, introduciendo el nucleótido complementario (dTTP) a la base codificante del *gap* (dA), y alcanzando niveles similares a la extensión del par correctamente apareado (dG·dCMP). Sin embargo, Pol λ también es capaz de llevar a cabo la inserción dirigida por la base molde del propio par desapareado (dG), introduciendo de forma eficiente el nucleótido dCTP. Comparando los niveles de extensión con dCTP del par apareado (dG·dCMP) y del par desapareado (dG·dGMP), se puede concluir que el hecho de que el nucleótido del extremo 3' del cebador se encuentre desapareado favorece la eficiencia de este extraño mecanismo de polimerización.

Por último, al estudiar la extensión de un par desapareado (dG·dAMP) que permita que el nucleótido del extremo 3' del cebador (dAMP) aparezca de manera correcta con la base de la cadena molde inmediatamente anterior al par desapareado (dT), se observa como la inserción mediada por la base original del par desapareado aumenta de manera considerable (dCTP). Este incremento probablemente sea debido a la formación de un par correcto (dT·dAMP) y, consecuentemente, a un posicionamiento del extremo 3'OH mucho más compatible con la

catálisis enzimática. En este caso resulta especialmente relevante que la tasa de extensión directa del par desapareado reduzca significativamente sus niveles, lo que parece indicar un efecto negativo de la posibilidad de recolocación del extremo 3' del cebador sobre la extensión directa del par desapareado, aunque no puede descartarse que los niveles observados sean los niveles óptimos de extensión propios del par dG·dAMP, ya que no todos los pares se extienden con la misma eficiencia, como se ha visto anteriormente (Tablas 8.I y 8.II).

La inserción del nucleótido dGTP, favorecida por la presencia de un nucleótido desapareado en el extremo del cebador, no puede tratarse de una inserción dirigida por molde, ya que no existe ningún nucleótido complementario cercano al extremo del cebador. Por lo tanto, tendría que tratarse de la inserción directa de un nucleótido incorrecto. Este error se vería favorecido de alguna forma por la presencia de la base codificante dA en el *gap*, ya que con cualquier otra base codificante (dC, dG o dT) no se produce este fenómeno (no mostrado).

En definitiva, estos resultados abren la posibilidad a fenómenos distintos de la extensión directa cuando Pol λ se enfrente a moléculas con extremos desapareados, y reafirman la importancia del contexto de secuencia para las ADN polimerasas.

Asimismo, resultaría interesante evaluar el efecto que tiene la extensión de desapareamientos sobre posteriores eventos de síntesis, ya que la presencia de pares de bases mal apareados podría dificultar de alguna forma el proceso de polimerización. De igual forma, el mecanismo de recolocación del extremo del cebador generaría un nucleótido no apareado que podría dificultar posteriores adiciones nucleotídicas. Para evaluar ambas posibilidades estudiamos la extensión de nucleótidos apareados y desapareados en el contexto de un *gap* de 5 nucleótidos con grupo fosfato en 5'.

Como se observa en la Figura 8.5, Pol λ lleva a cabo eficientemente el relleno de un *gap* de 5 nucleótidos cuando el extremo del cebador se encuentra perfectamente apareado (dG·dCMP). Asimismo, Pol λ es capaz de polimerizar los 5 nucleótidos del *gap* partiendo de los extremos desapareados dG·dAMP, dG·dGMP y dG·dTMP, de lo que se deduce que la presencia de un par de bases desapareado en la zona *upstream* del extremo de cebador no impide la polimerización de Pol λ.

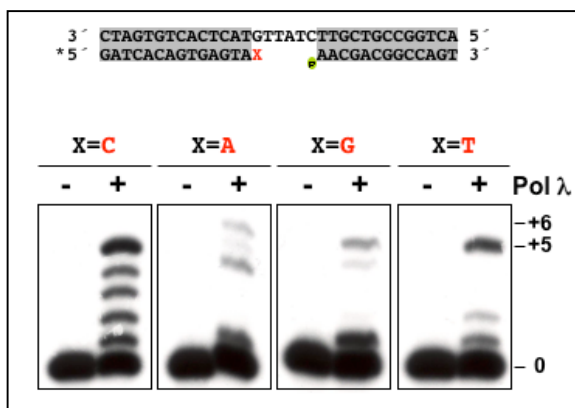


Figura 8.5: Extensión de desapareamientos por Pol λ en moléculas tipo *gap* de 5 nucleótidos y fosfato en 5'. Ensayos de extensión de cebador marcado radiactivamente en su extremo 5'(*), en los que se evalúa la capacidad de Pol λ de rellenar un *gap* de 5 nucleótidos en función de la situación del nucleótido del extremo 3' del cebador. Las concentraciones de Pol λ empleadas fueron 2.5 nM para el extremo apareado (dG·dCMP), y 75 nM para los extremos desapareados (dA·dCMP, dC·dCMP y dT·dCMP). La reacción se llevó a cabo como en presencia de los 4 dNTPs (100 μM) durante 20 minutos a 37 °C.

Sin embargo, al iniciar la extensión desde el desapareamiento dG·dAMP se produce la adición de 6 nucleótidos al extremo del cebador, de forma consistente con el mecanismo de recolocación del extremo del cebador en la posición contigua anterior al par desapareado, dando lugar a un par perfectamente apareado desde el que iniciar la síntesis. De esta forma, Pol λ es capaz de añadir 6 nucleótidos (frente a los 5 nucleótidos esperados) de forma dirigida por la

hebra molde. Este resultado indica que tampoco la presencia de un nucleótido no apareado en el cebador imposibilita la polimerización de Pol λ .

8.5. Análisis estructural de la capacidad de extensión de desapareamientos de Pol λ

Los estudios cinéticos de extensión de desapareamientos realizados con otras ADN polimerasas parecen indicar que, en general, los desapareamientos formados por dos purinas se extienden menos eficientemente que los formados por dos pirimidinas o una purina y una pirimidina (Joyce y cols., 1992; Mendelman y cols., 1990; Huang y cols., 1992). Esto concuerda con la importancia que tiene para la fidelidad de una ADN polimerasa tanto la forma como el tamaño del par de bases que sirve de iniciador para la polimerización (Kunkel, 2004). Sin embargo, Pol λ parece ser capaz de extender los desapareamientos purina-purina con una eficiencia similar, e incluso mayor en algunos casos, que los desapareamientos purina-pirimidina o pirimidina-pirimidina.

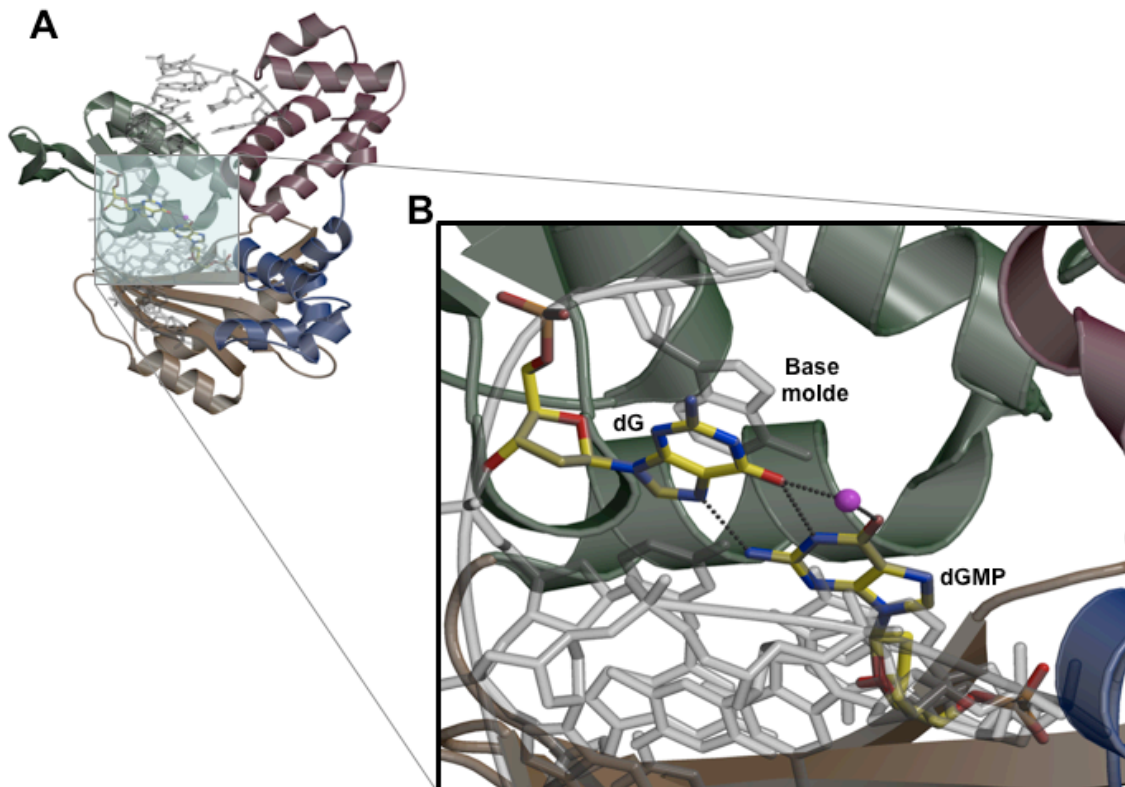


Figura 8.6: Estructura tridimensional de Pol λ formando un complejo con un ADN tipo *gap* de un nucleótido con un desapareamiento dG·dGMP en el extremo del cebador. **A.** Pol λ formando un complejo con un ADN tipo *gap* de un nucleótido y grupo fosfato en 5', en el que el extremo del cebador (dGMP) forma un desapareamiento con la correspondiente base (dG) de la cadena molde (PDB: 2GWS). Los cuatro subdominios de Pol λ se representan en diferentes colores: 8 kDa, magenta; “dedos”, azul; “palma”, marrón; “pulgar”, verde. El desapareamiento dG·dGMP se representa en amarillo. **B.** Vista más cercana del extremo del cebador. La base nitrogenada del nucleótido de la cadena molde que forma el desapareamiento se encuentra rotada en conformación *syn*, mientras que la base del nucleótido del extremo del cebador conserva la configuración *anti*. Las bases del desapareamiento pueden formar tres puentes de hidrógeno (líneas de puntos), uno de ellos a través de una molécula de agua (representada en rosa). 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>).

Gracias a la colaboración con el Dr. Thomas A. Kunkel (NIEHS, NIH, USA) pudimos ahondar en las causas de este comportamiento mediante la cristalización de Pol λ formando un complejo con un ADN tipo *gap* de un nucleótido y fosfato en 5', que tuviera un desapareamiento en el extremo del cebador tipo purina-purina, dG·dGMP concretamente, puesto que es uno de los que peor se extiende por las diferentes ADN polimerasas (Mendelman y cols., 1990) y uno de los que mejor extiende Pol λ (Tabla 8.II).

La caracterización estructural de Pol β y otras ADN polimerasas de las Familias A y B, ha revelado que la unión del nucleótido al complejo binario formado por el ADN y la polimerasa provoca cambios conformacionales en las posiciones relativas de los subdominios “dedos” y “pulgar” (Sawaya y cols., 1997; Li y cols., 1998; Doublet y cols., 1999). Este paso de conformación “abierta” (inactiva) a conformación “cerrada” (activa) puede servir de punto de control para asegurar un alto grado de fidelidad de síntesis (Joyce y Benkovic, 2004). También se ha sugerido que la complementariedad estérica en el centro activo permitiría a las ADN polimerasas discriminar entre los pares correctos de Watson y Crick (geoméricamente equivalentes), y los incorrectos, que mostrarían diferentes formas de apareamiento geoméricamente distintas de los pares correctos (Kunkel y Bebenek, 2000).

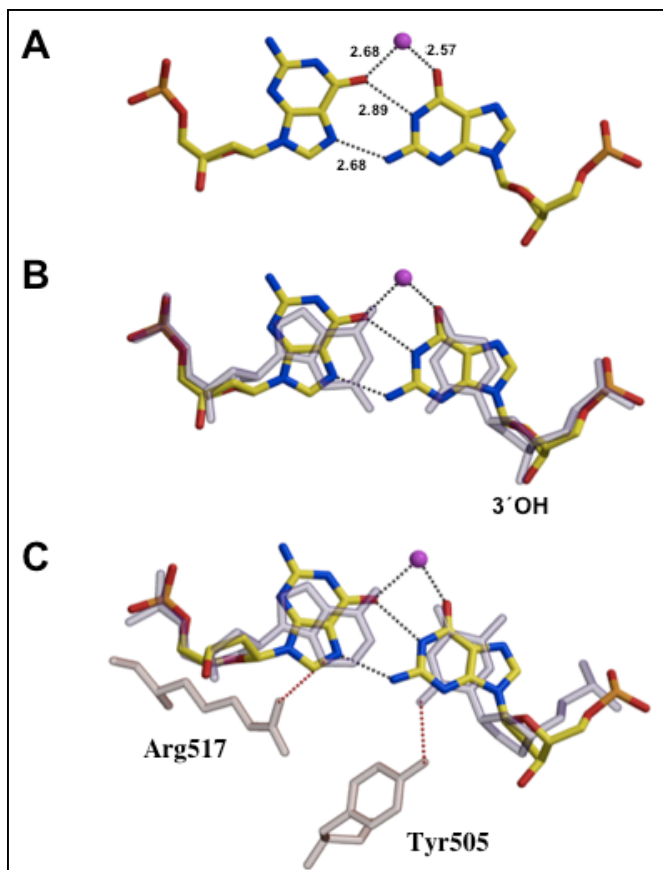


Figura 8.7: Conformación apareada y desapareada del extremo 3' del cebador del complejo Pol λ / ADN. A. Distancias de enlace entre las bases que conforman el desapareamiento dG·dGMP. Los puentes de hidrógeno se representan como líneas de puntos y una molécula de agua está representada en rosa **B.** Superposición del desapareamiento dG·dGMP y un par correcto dG·dCMP derivado del complejo binario Pol λ / ADN (PDB: 1XSL). **C.** Superposición del desapareamiento dG·dGMP y un par correcto dA·dTMP derivado del complejo ternario Pol λ / ADN (PDB: 1XSN), en el que se representan las interacciones necesarias para la catálisis de los residuos Tyr505 y Arg517. 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>).

Los cristales obtenidos revelaron que Pol λ se encuentra, al contrario que Pol β y otras polimerasas, en una conformación “cerrada” y activa en ausencia de nucleótido entrante (Figura 8.6), similar a la obtenida previamente con un ADN con un extremo apareado en moléculas tipo *gap* de 1 y 2 nucleótidos (García-Díaz y cols., 2004; García-Díaz y cols., 2005a). Al estudiar en detalle la estructura obtenida, se observó que la base molde dG se encuentra girada sobre el

enlace glicosídico y se halla en configuración *syn*, formando tres puentes de hidrógeno (uno de ellos a través de una molécula de agua) con la base del extremo 3' del cebador (dGMP) desapareado (Figura 8.7, parte A).

Al comparar la estructura obtenida con el cristal del complejo binario con un ADN perfectamente apareado (PDB: 1XSL), se observa como no fueron necesarios movimientos significativos de las cadenas laterales de los aminoácidos para poder acomodar el desapareamiento en el centro activo, y además, no se produjeron alteraciones significativas en el esqueleto carbonado del ADN (Figura 8.7, parte B), lo que concuerda con los datos obtenidos previamente, según los cuales, el centro activo de Pol λ realiza muy pocos contactos con la hebra molde en una molécula tipo *gap* de 1 o 2 nucleótidos y fosfato en 5' (García-Díaz y cols., 2004; García-Díaz y cols., 2005a). Todo esto indica que Pol λ es capaz de acomodar en su centro activo un desapareamiento tan voluminoso como el formado por dos purinas, de manera compatible con una alta eficiencia catalítica de extensión como se concluye de la caracterización cinética (Tabla 8.II).

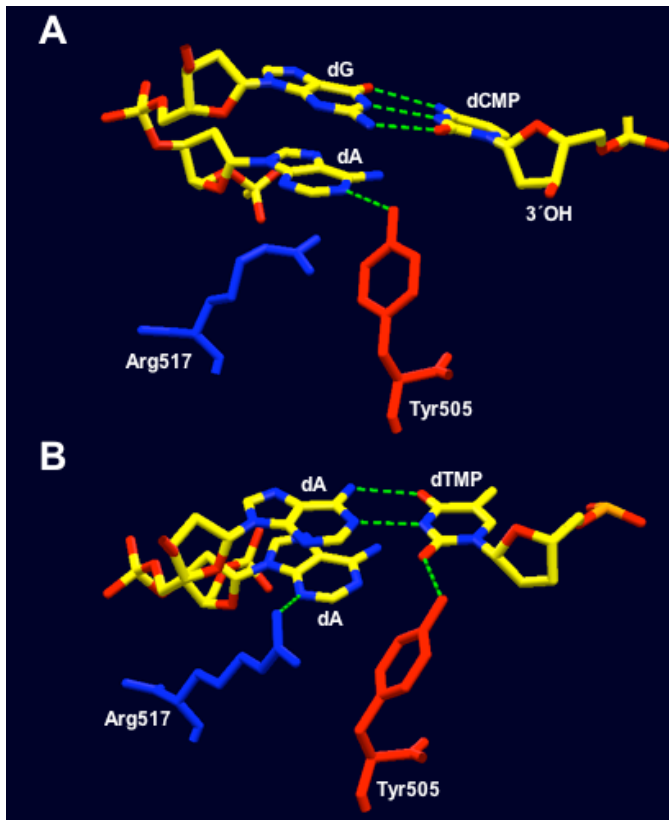


Figura 8.8: Cambios conformacionales asociados a la formación del complejo ternario de Pol λ . A. Interacciones específicas en el complejo binario de Pol λ (PDB: 1XSL). La Tyr505 (rojo) forma un puente de hidrógeno con la base codificante del *gap* y obstruye la entrada del nucleótido, mientras que la Arg517 (azul) apila con la base codificante. B. Interacciones específicas en el complejo ternario de Pol λ (PDB: 1XSN). La Tyr505 (rojo) se desplaza de forma que forma un puente de hidrógeno con la base del extremo 3' del iniciador y la Arg517 cambia su conformación, pasando a formar un puente de hidrógeno con la base del nucleótido codificante del *gap*. 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>).

Sin embargo, la extensión desde el par dG·dGMP es 50 veces menos eficiente que desde el correspondiente par correcto dG·dCMP. Esto puede estar causado por una ligera diferencia en la conformación de la ribosa del nucleótido en 3' del iniciador (dGMP) y, por tanto, del residuo 3'OH que ejerce como nucleófilo durante la catálisis enzimática. Además, ha sido previamente descrito que la unión del nucleótido provoca una serie de sutiles cambios conformacionales en ciertos residuos aminoacídicos que dan lugar a un desplazamiento de la posición de la cadena molde encaminada a situar la base codificante en una posición compatible con la catálisis. Esta recolocación se realiza fundamentalmente gracias a interacciones específicas de las cadenas laterales de los residuos Arg517 y Tyr505 con el surco menor del ADN. La Tyr505, que en el

complejo binario forma un puente de hidrógeno con la base codificante y obstruye la entrada del nucleótido (Figura 8.8, parte A), en el complejo ternario se desplaza de forma que interacciona con la base del extremo 3' del iniciador (Figura 8.8, parte B). La Arg517 por su parte, que en el complejo binario se apila con la base codificante (Figura 8.8, parte A), en el complejo ternario forma un puente de hidrógeno con la base de la cadena molde previa a la codificante (García-Díaz y cols., 2005a). Adicionalmente, la Arg517 podría establecer también un enlace con la base codificante (Figura 8.8, parte B), estabilizando de esta forma tanto la base molde del último par como la base codificante (García-Díaz y cols., 2005a). Estas interacciones son fundamentales para el correcto posicionamiento del par de bases terminal y, por tanto, para la catálisis. De estos datos se deduce que la geometría del par de bases terminal resultaría crucial para que se diesen estas interacciones fundamentales para la catálisis.

El desplazamiento del ADN propio de la formación del complejo ternario modelado en el ADN con el desapareamiento dG·dGMP del cristal de Pol λ obtenido, deja entrever que la geometría de este par no permitiría que se produjesen las interacciones de los residuos Tyr505 y Arg517 de manera óptima, de forma que los componentes del complejo pre-catalítico (los tres aspárticos catalíticos, los dos iones Mg^{2+} , el residuo 3'OH del iniciador y el fosfato α del nucleótido entrante) no se situarían a las distancias apropiadas, lo que influiría negativamente en la catálisis y justificaría la menor eficiencia catalítica de extensión del desapareamiento dG·dGMP respecto del par correcto dC·dGMP (Figura 8.7, parte C).

8.6. Pol λ extiende preferentemente desapareamientos tipo ADN/ARN

El descubrimiento de la capacidad de Pol λ de extender cebadores de ARN hibridados a una cadena molde de ADN (Ramadan y cols., 2003) abrió la posibilidad de estudiar la capacidad de extensión de desapareamientos en los que el nucleótido en 3' del cebador fuera un ribonucleótido (Figura 8.9).

Como se observa en la Tabla 8.III, Pol λ extiende los cuatro nucleótidos correctamente apareados con aproximadamente la misma eficiencia independientemente del residuo en 2' del azúcar, ya que todos los ratios se aproximan a 1. En el caso de los desapareamientos, Pol λ es capaz de extender todos aquellos formados por un desoxinucleótido en la hebra molde y un ribonucleótido como iniciador. Al estudiar la eficiencia comparada del proceso (ratio par ADN·ARN / par ADN·ADN) se observa como los porcentajes de extensión son mayores en el caso de los desapareamientos tipo ADN·ARN, ya que todos los ratios muestran valores mayores que 1. El valor medio obtenido refleja una diferencia de 2.82 veces a favor de la extensión de los desapareamientos ADN·ARN. Cabe reseñar que los pares que poseen una citosina como base molde (dC·rAMP; dC·rCMP; dC·rUMP) son los que muestran ratios de mayor valor. Por otro lado, cuando otra pirimidina es la base molde (dT) resulta imprescindible la presencia del ribonucleótido en el extremo del cebador para poder detectar la extensión, salvo en el caso del par dT·dGMP, debido a su posible geometría similar a la de un par correcto.

Los miembros de la Familia X de ADN polimerasas han sido implicados en diferentes procesos de reparación de ADN, como *BER*, *NHEJ* y recombinación V(D)J. Cruciales diferencias en sus propiedades bioquímicas les permiten tomar parte en diversas reacciones de síntesis de ADN. En este estudio se describe minuciosamente la capacidad de extensión de extremos desapareados de Pol λ , lo que la postula como candidata a participar en los diferentes procesos que requieran de la extensión de desapareamientos. Esta capacidad asemeja a Pol λ a

ADN polimerasa lambda

las ADN polimerasas implicadas en los mecanismos de tolerancia al daño (Pol ζ, Pol η, Pol κ y Pol ι), capaces de sintetizar a través de lesiones en el ADN y desde cebadores cuyo extremo no aparece con la correspondiente base de la cadena molde. Desde de un punto de vista cuantitativo, los valores obtenidos por Pol λ en ciertos desapareamientos de moléculas tipo molde/cebador abierto, semejantes a intermedios de replicación, es similar a la ofrecida por las ADN polimerasas más promiscuas a la hora de extender este tipo de sustratos, Pol κ y Pol ζ (Washington y cols., 2002; Johnson y cols., 2000a), lo que sugiere un posible papel de Pol λ en el paso de extensión durante el proceso de síntesis a través de lesiones. Esta hipótesis se apoya asimismo en la interacción demostrada entre Pol λ y PCNA (Shimazaki y cols., 2002 y 2005; Maga y cols., 2002 y 2004), que podría ejercer un papel de coordinación de las diferentes ADN polimerasas implicadas en replicación y síntesis a través de lesiones (Pagés y Fuchs, 2002).

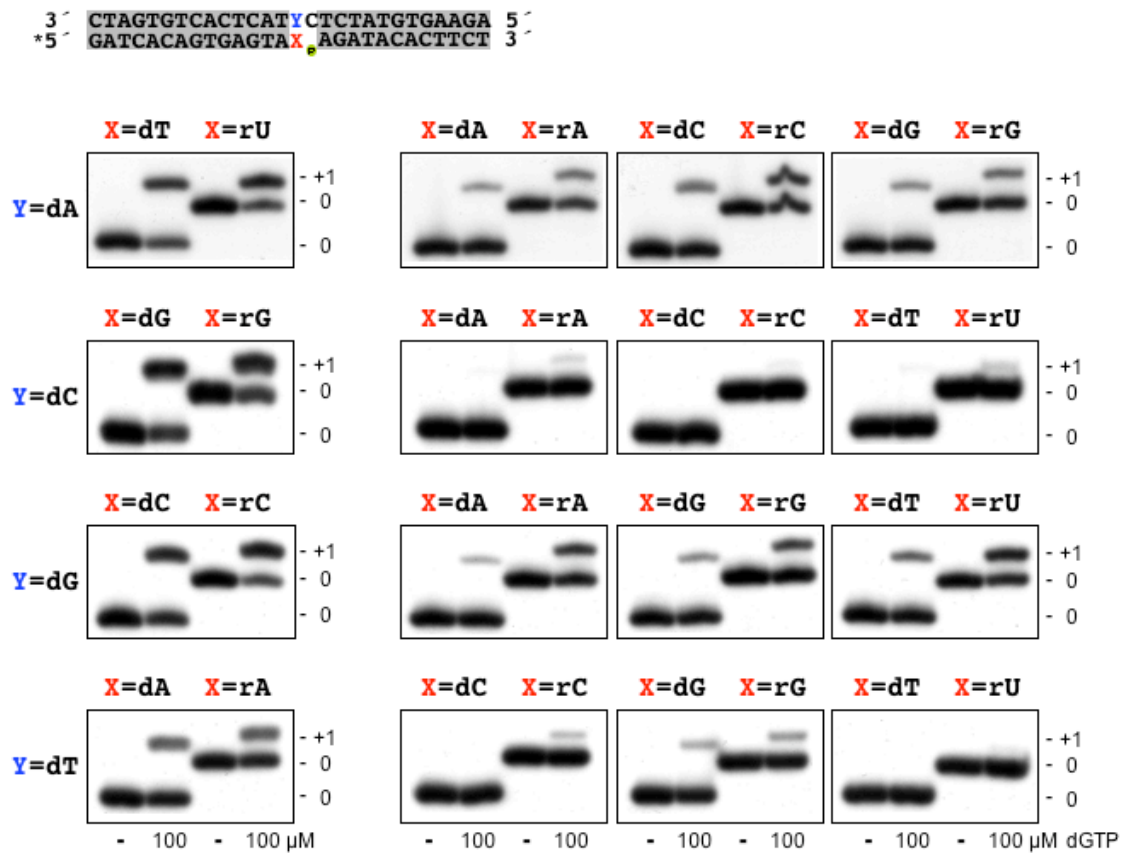


Figura 8.9: Pol λ extiende preferentemente extremos mal apareados de ARN. Ensayos de extensión de cebador marcado radiativamente en su extremo 5'(*), en los que se evalúa la capacidad de Pol λ de extender extremos apareados y desapareados en función de la naturaleza del azúcar (ribosa o desoxirribosa) del nucleótido situado en el extremo 3' del cebador. La concentración de Pol λ empleada fue de 5 nM en todos los casos, mientras que la concentración de ADN fue de 250 nM. El nucleótido entrante (dGTP) se haya en el ensayo en una concentración de 100 μM. Los componentes de la reacción, descritos en Materiales y Métodos, se incubaron 20 min a 37 °C.

Los valores obtenidos en moléculas tipo *gap* de un nucleótido con fosfato en 5', moléculas relevantes en procesos de reparación, reflejan una gran capacidad de extensión de todos los posibles pares por parte de Pol λ (Tabla 8.II). Cuando una purina es la base de la cadena molde del desapareamiento, Pol λ muestra valores de extensión similares a los obtenidos por Pol κ y Pol ζ, mientras que si es una pirimidina la base de la cadena molde, los valores descienden y se aproximan a los mostrados por Pol β (Beard y cols., 2004) (Figura 8.10).

C \ M	dT	dG	dC	dA
rA	34,5 ± 0,5 %	22,0 ± 1,0 %	5,5 ± 2,5 %	34,0 ± 0,0 %
dA	30,0 ± 1,0 %	6,5 ± 0,5 %	1,0 ± 1,0 %	14,5 ± 0,5 %
Ratio	1,15	3,37	5,50	2,35
rC	7,5 ± 0,5 %	59,0 ± 4,0 %	3,5 ± 0,5 %	44,0 ± 0,0 %
dC	0,0 ± 0,0 %	46,5 ± 1,5 %	1,0 ± 0,0 %	25,0 ± 0,5 %
Ratio	-	1,27	3,50	1,76
rG	16,5 ± 0,5 %	33,5 ± 0,5 %	56,5 ± 0,5 %	30,5 ± 1,5 %
dG	12,5 ± 0,5 %	19,5 ± 0,5 %	51,0 ± 5,0 %	17,0 ± 0,0 %
Ratio	1,32	1,76	1,11	1,79
rU	4,0 ± 0,0 %	50,0 ± 0,0 %	7,5 ± 2,5 %	63,0 ± 2,0 %
dT	0,0 ± 0,0 %	27,0 ± 2,0 %	1,5 ± 0,5 %	52,0 ± 1,0 %
Ratio	-	1,85	5,00	1,21

Tabla 8.III: Pol λ extiende preferentemente extremos mal apareados de ARN. Ratio = (% Ext. dN/rN) / (% Ext. dN/dN). Los datos son medias (± desviación estándar) de al menos tres ensayos independientes. M: nucleótido del par perteneciente a la cadena molde. C: nucleótido del extremo 3' del cebador.

La relevancia *in vivo* de la extensión de desapareamientos de Pol λ podría estar relacionada con su posible papel en *NHEJ* (ver capítulos 6 y 7). Durante la reparación por *NHEJ*, una o varias ADN polimerasas serán necesarias para cualquier evento de síntesis de ADN, como el relleno de pequeños *gaps* o la extensión de extremos 3' en moléculas 5' protuberantes. Estudios recientes han demostrado que Pol λ y Pol μ son capaces de unirse a los componentes de la maquinaria de *NHEJ*, y realizar eventos de síntesis de ADN durante las reacciones de reunión de extremos (Nick-McElhinny y Ramsden, 2003; Ma y cols., 2004; Fan y Wu, 2004; Nick-McElhinny y cols., 2005). Sin embargo, las reacciones enzimáticas que realizan cada una de ellas son muy diferentes.

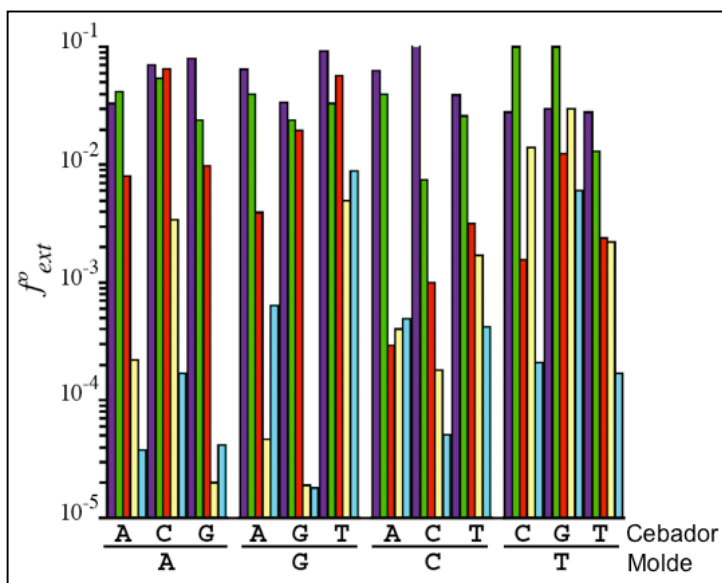


Figura 8.10: Frecuencias de extensión de extremos desapareados por diferentes ADN polimerasas. Comparación de las frecuencias de extensión de desapareamientos ($f_{ext}^p = [k_{cat}/K_m]_{apareamiento} / [k_{cat}/K_m]_{desapareamiento}$) de varias ADN polimerasas: Pol κ (azul oscuro, Washington y cols., 2002), Pol ζ (verde, Johnson y cols., 2000a), Pol λ (rojo, datos obtenidos de la Tabla 8.II), Pol β (amarillo, Beard y cols., 2004) y Pol α (azul claro, Mendelman y cols., 1990).

ADN polimerasa lambda

En este estudio se muestra la gran capacidad de extensión directa de desapareamientos de Pol λ , lo que la diferencia de Pol μ , que no extiende eficientemente este tipo de sustratos (Figura 8.1). Asimismo, existen otras aptitudes y propiedades presentes en una polimerasa y ausentes en la otra, y viceversa, lo que denota el alto grado de especialización que han sufrido los miembros de la Familia X de ADN polimerasas, los cuales pueden realizar diferentes tareas dentro de un mismo mecanismo de reparación. La aparente redundancia funcional se torna en complementariedad de función al estudiar en detalle el proceso de reparación.

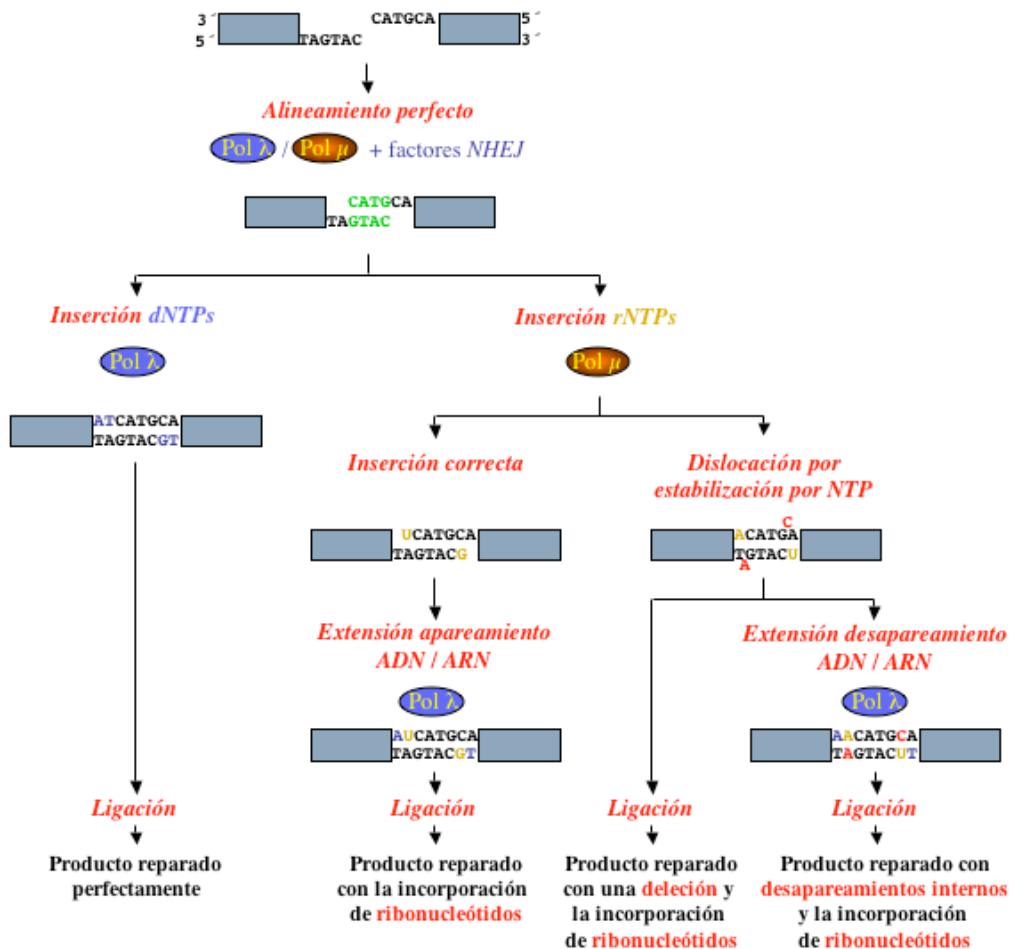


Figura 8.11: Posible implicación funcional de Pol λ y Pol μ en NHEJ (I). Posible contexto de secuencia surgido a partir de una rotura de doble cadena que da lugar a dos extremos 3' protuberantes perfectamente compatibles. El resultado de la reparación varía en función de la disponibilidad de los diferentes sustratos nucleotídicos.

En el ejemplo de la Figura 8.11 se ilustra una posible situación surgida a partir de una rotura de doble cadena, en la que las diferentes propiedades bioquímicas de Pol λ y Pol μ se complementan con el fin de reparar eficientemente la rotura, mostrando diferentes soluciones en función de la disponibilidad de sustratos nucleotídicos. En el ejemplo escogido se muestra la reunión de extremos 3' protuberantes, ya que son los que requerirán de un realineamiento y posterior relleno de los *gaps* generados para poder ser ligados. Los extremos 5' protuberantes pueden ser rellenos antes de la reunión y ser ligados como extremos romos, con lo que se minimizaría la pérdida de secuencia nucleotídica.

Si la rotura y procesamiento de extremos da lugar a una zona de complementariedad perfecta (Figura 8.11), la disponibilidad de nucleótidos será el factor limitante que decidirá qué

polimerasa actuaría. En presencia de desoxinucleótidos, Pol λ será la mejor candidata para llevar a cabo el relleno de los *gaps* de dos nucleótidos generados, ya que podrá hacerlo de forma eficiente y sin cometer errores (ver apartado 7.2). Por este motivo, la actuación de Pol μ se vería restringida a situaciones en las que la concentración de desoxinucleótidos no fuese suficiente para que Pol λ ejerciera su acción. En ese caso, Pol μ podría insertar ribonucleótidos de forma dirigida por la primera o la segunda base del *gap* (ver apartado 7.2; Nick-McElhinny y Ramsden, 2003; Ruiz y cols, 2003). En ambos casos, sería necesaria la posterior actuación de Pol λ para extender eficientemente esos ribonucleótidos, los cuales pueden estar formando un par perfectamente apareado si fueron insertados de forma dirigida por la primera base del *gap*, o un desapareamiento si fueron insertados frente a la segunda base. En este punto, Pol λ se beneficiaría de su baja K_m por desoxinucleótidos (García-Díaz y cols., 2002) y de su especial capacidad para extender pares formados por un desoxinucleótido en la cadena molde y un ribonucleótido en el extremo del cebador, tanto en el caso de que formen un par correctamente apareado como un desapareamiento (Tabla 8.III). Estas propiedades habilitan a Pol λ para llevar a cabo la extensión de los ribonucleótidos insertados por Pol μ de forma eficiente aunque los niveles de desoxinucleótidos sean bajos y existan desapareamientos en el extremo del cebador.

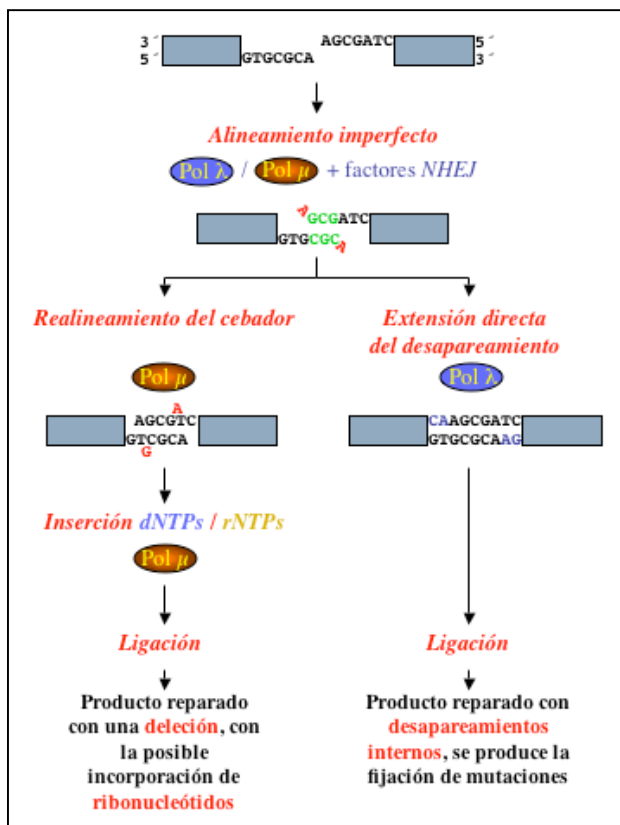


Figura 8.12: Posible implicación funcional de Pol λ y Pol μ en NHEJ (II). Posible contexto de secuencia surgido a partir de una rotura de doble cadena que da lugar a dos extremos 3' protuberantes parcialmente compatibles. El resultado de la reparación varía en función de la disponibilidad de los diferentes sustratos nucleotídicos y del orden de actuación.

Se ha especulado mucho sobre las posibles causas y repercusiones de la inserción de ribonucleótidos en el ADN. Entre las causas figura la disponibilidad constante de ribonucleótidos durante todas las fases del ciclo celular, al contrario de lo que sucede con los desoxinucleótidos, que sólo muestran concentraciones elevadas durante la fase S (Bjursell y cols., 1980; McCormick y cols., 1983; Traut, 1994). Otra de las posibles causas de la inserción de ribonucleótidos es el hecho de que los pares formados por un desoxinucleótido y un ribonucleótido son más estables que los formados por dos desoxinucleótidos, debido a un apareamiento más estable termodinámicamente y porque el grupo OH en 2' del ribonucleótido puede formar un puente de hidrógeno adicional con el oxígeno número 4 del azúcar del nucleótido adyacente (SantaLucía, 1998). Este aumento en la estabilidad de la sinapsis de los extremos de la rotura sería muy beneficioso cuando el nivel de complementariedad de secuencia entre

los extremos fuese escaso. Asimismo, la inserción de ribonucleótidos puede formar parte de un mecanismo de señalización que permita llevar a cabo posteriores eventos de reparación en la

ADN polimerasa lambda

zona de la rotura. Dichos eventos incluirían la retirada de los ribonucleótidos insertados mediante un mecanismo específico en el que participan ARNasa H y FEN1 (Rydberg y Game, 2002), y la subsanación de otros posibles errores cometidos durante la reparación de la rotura de doble cadena.

Si la rotura y procesamiento generan un alineamiento imperfecto de los extremos 3' protuberantes, podrían generarse nucleótidos desapareados en la zona interna o en los extremos. Los nucleótidos desapareados en la zona interna no dificultarían la acción de relleno de *gap* ni de Pol λ (Apartado 8.4; García-Díaz y cols., 2006) ni de Pol μ (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004), situándonos en una situación semejante a la descrita en la Figura 8.11. Sin embargo, si los nucleótidos desapareados se encuentran en el extremo 3', Pol λ y Pol μ utilizarían diferentes estrategias para llevar a cabo la extensión y el relleno del *gap* generado (Figura 8.12). Pol μ podría, si el contexto de secuencia se lo permite, realinear el extremo del cebador para formar un par correcto e insertar el nucleótido complementario a la siguiente posición, generando un sustrato susceptible de ser ligado, con el inconveniente de la generación de una delección de un nucleótido. Por su parte, Pol λ podría extender directamente el extremo desapareado y posteriormente rellenar el resto del *gap* sin pérdida de información, aunque con la consiguiente fijación de una mutación por cambio de base.

En conclusión, esta propiedad de Pol λ sugiere un papel potencial como extensora de desapareamientos durante la reparación de roturas de doble cadena por *NHEJ* y durante los procesos asociados a síntesis a través de lesiones.

9

Síntesis a través de lesiones

Las lesiones en las bases nitrogenadas del ADN a menudo bloquean el progreso de la horquilla de replicación, pero mediante ADN polimerasas especializadas es posible llevar a cabo la síntesis a través de esas lesiones y continuar con el proceso de replicación. Por lo tanto, la capacidad de síntesis a través de lesiones acoplada al proceso de replicación tiene una importancia crucial para la célula. Tales ADN polimerasas son los miembros de la Familia Y y Pol ζ, perteneciente a la Familia B. El caso más representativo de la importancia de este proceso lo ejemplifica la enfermedad derivada de la carencia de Pol η, ADN polimerasa perteneciente a la Familia Y. En humanos, la falta de este enzima provoca la aparición de una variante de la enfermedad *Xeroderma pigmentosum* (Johnson y cols., 1999a; Masutani y cols., 1999), caracterizada por una sensibilidad extrema a luz ultravioleta y una alta predisposición al desarrollo de cánceres de piel. El fenotipo asociado a la carencia de Pol η viene dado por el papel que este enzima desarrolla en la célula. Pol η es la encargada de llevar a cabo la replicación libre de error frente a un ADN molde formado por dos timinas contiguas unidas covalentemente (Johnson y cols., 1999b; Johnson y cols., 2000b; Washington y cols., 2000). Dicha unión aberrante está causada por la acción de la luz ultravioleta, y altera la geometría del ADN de forma que bloquea la acción de las ADN polimerasas replicativas.

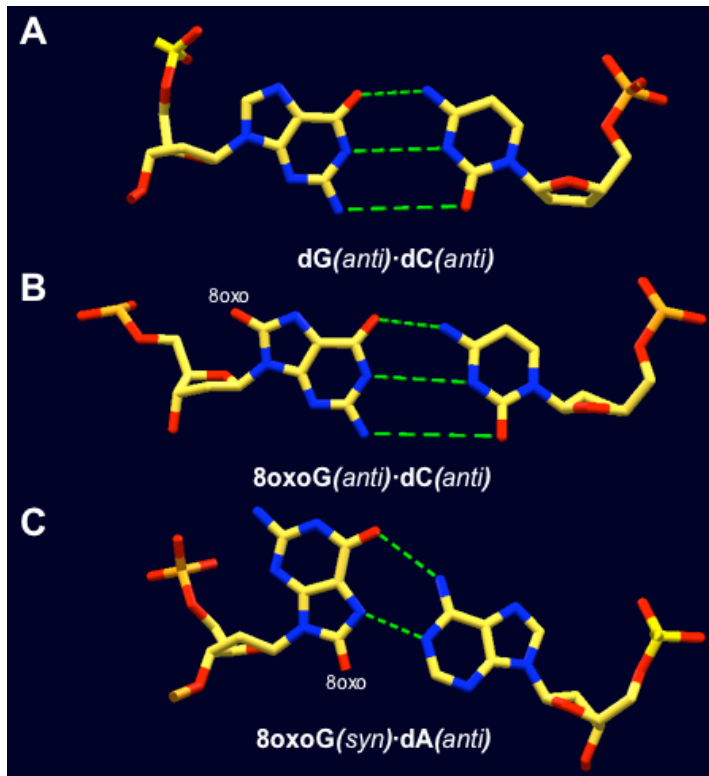


Figura 9.1: Estructura de los apareamientos posibles teniendo como base molde 8oxoG. A. Apareamiento de Watson y Crick entre las bases dG y dC. Los puentes de hidrógeno entre las bases se representan como líneas de puntos. **B.** Estructura del apareamiento entre las bases 8oxoG y dC (PDB: 1U48). **C.** Estructura del apareamiento entre las bases 8oxoG y dA (PDB: 178D). 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>).

Una de las formas más comunes de daño oxidativo es la modificación de la base nitrogenada guanina a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8oxoG), que se produce entre 10^3 y 10^4 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). Esto se debe a que la base 8oxoG aparee tanto con la base nitrogenada citosina como con la base adenina (Figura 9.1). En el par de bases 8oxoG·dCMP (Figura 9.1, parte B), el enlace glicosídico de ambas bases nitrogenadas se encuentran en configuración *anti* y el par de bases está estabilizado por tres puentes de

hidrógeno (Oda y cols., 1991; Lipscomb y cols., 1995). En cambio, en el par de bases 8oxoG·dAMP (Figura 9.1, parte C), el enlace glicosídico de la base 8oxoG se encuentra en configuración *syn* y forma un apareamiento tipo Hoogsteen con dos puentes de hidrógeno con la base adenina (Kouchakdjian y cols., 1991; McAuley-Hecht y cols., 1994). Además, a pesar de la presencia de ambos pares de bases modificados en el ADN, éste sigue presentando una configuración tipo B (Oda y cols., 1991; Lipscomb y cols., 1995; Kouchakdjian y cols., 1991; McAuley-Hecht y cols., 1994), aunque en el caso del par 8oxoG·dCMP el esqueleto carbonado del ADN sufre ciertas perturbaciones (Lipscomb y cols., 1995).

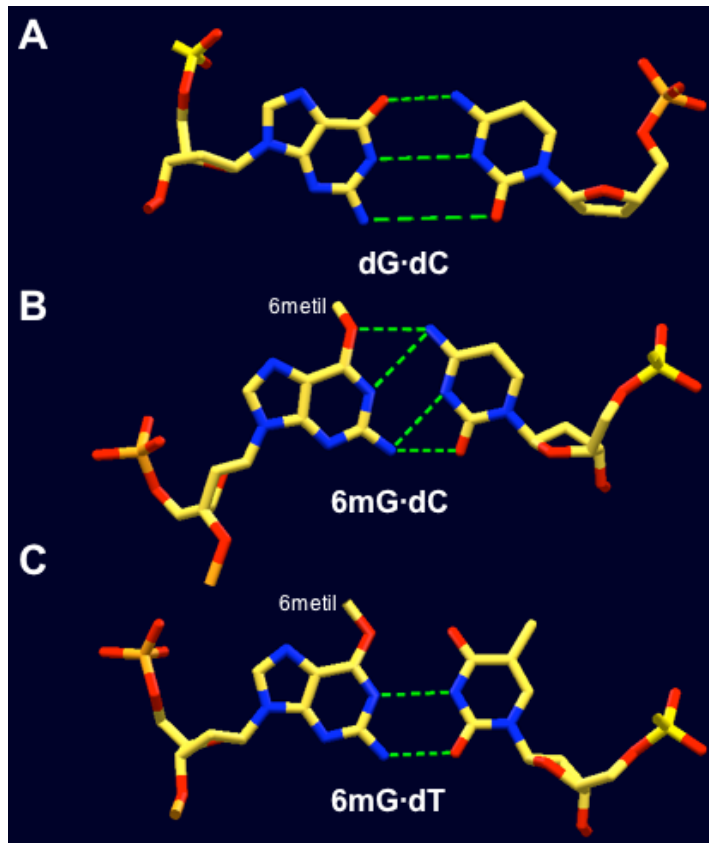


Figura 9.2: Estructura de los apareamientos posibles teniendo como base molde 6mG. A. Apareamiento de Watson y Crick entre las bases dG y dC. Los puentes de hidrógeno entre las bases se representan como líneas de puntos. B. Estructura del apareamiento entre las bases 6mG y dC (PDB: 1D24). C. Estructura 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>).

La O⁶-metilguanina (6mG) es otra modificación química habitual del ADN, que puede estar causada por diversos agentes como el humo de tabaco, la metil-nitroso-urea u otros agentes alquilantes (Singer y Grunberger, 1983), algunos de los cuales se utilizan en tratamientos de quimioterapia contra procesos cancerígenos. Esta lesión, al igual que sucede con la 8oxoG, es marcadamente mutagénica, ya que preferentemente aparea con una base nitrogenada timina en vez de una citosina (Figura 9.2), provocado la aparición de mutaciones de transición G·C → A·T. La estructura de los posibles apareamientos, 6mG·dCMP o 6mG·dTMP, viene determinada por la orientación del grupo metilo unido covalentemente al oxígeno 6 de la base guanina. El apareamiento 6mG·dTMP (Figura 9.2, parte C), a pesar de estar formado por menor número de puentes de hidrógeno (Patel y cols., 1986a) y de ser menos estable energéticamente (Gaffney y Joens, 1989), posee una geometría más parecida a la geometría de Watson y Crick (Williams y Shaw, 1987; Leonard y cols., 1990; Tan y cols., 1994; Spratt y Levy, 1997), lo que provoca que la mayoría de las ADN polimerasas inserten más eficientemente dT que dC frente a 6mG. Además, el par 6mG·dCMP (Figura 9.2, parte B),

forma un apareamiento inestable a pesar del mayor número de puentes de hidrógeno a que da lugar (Patel y cols., 1986b), lo que favorece aún más la formación del par 6mG·dTMP (Williams y Shaw, 1987; Leonard y cols., 1990; Tan y cols., 1994; Spratt y Levy, 1997).

En todo proceso de síntesis a través de lesiones hay que diferenciar entre el paso de inserción frente a la lesión y el paso de extensión del par generado en el paso previo de inserción. Ambos pasos tienen sus peculiaridades y, dependiendo del tipo de lesión, podrán ser llevados a cabo por la misma o distintas ADN polimerasas. En cualquier caso, la capacidad de llevar a cabo cada uno de los pasos por una ADN polimerasa viene definida por dos parámetros: la eficiencia y la fidelidad. La eficiencia representa la capacidad de insertar un nucleótido frente a una base modificada o a partir de un par de bases formado por una base modificada, en comparación con la reacción realizada en un sustrato no dañado. La fidelidad representa la tendencia a insertar el nucleótido complementario a pesar de la modificación química de la base que ejerce de molde (inserción de dC, y no dA, frente a 8oxoG; inserción de dC, y no dT, frente a 6mG). De igual forma, la fidelidad también afecta al paso de extensión, dependiendo de la tendencia intrínseca del enzima a extender cada uno de los pares generados, siendo más fiel cuanto más tienda a extender los pares “correctos” (8oxoG·dCMP y 6mG·dCMP). Según estos dos parámetros podemos clasificar a las ADN polimerasas según su comportamiento frente a los diferentes sustratos posibles, diferenciándolas por su grado de propensión al error y por la eficiencia relativa de la síntesis.

Diversos estudios cinéticos en condiciones de estado estacionario han sido desarrollados con diferentes ADN polimerasas para determinar su capacidad de inserción frente a una lesión y su capacidad de extensión a partir de un par dañado. Estos estudios permiten dilucidar y comparar desde un punto de vista global, el papel que cada ADN polimerasa puede desempeñar en los diferentes procesos incluidos bajo la denominación de síntesis a través de lesiones.

La caracterización bioquímica y estructural de la capacidad de Pol λ de extender extremos desapareados (Picher y cols., 2006; capítulo 8), así como su demostrada interacción con PCNA (Shimazaki y cols., 2002 y 2005; Maga y cols., 2002 y 2004), abren la posibilidad de que Pol λ pueda participar en procesos de síntesis a través de lesiones, al menos como uno de los enzimas responsables del paso de extensión necesario tras la inserción frente a una base modificada.

9.1. Diversidad funcional de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas en el paso de inserción frente a una base nitrogenada modificada

Las tres ADN polimerasas de la Familia X dependientes de molde (Pol β , Pol λ y Pol μ) preferentemente realizan la inserción del nucleótido complementario a la primera base molde contigua al extremo del cebador. Sin embargo, Pol μ también realiza eficientemente la inserción del nucleótido complementario a la segunda base molde contigua al extremo del cebador, gracias a su capacidad de dislocación de la hebra molde (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004).

Sin embargo, al evaluar la inserción frente a una base modificada el comportamiento de cada ADN polimerasa varía significativamente. En nuestro caso llevamos a cabo el estudio de la síntesis frente a dos posibles modificaciones químicas de la base nitrogenada guanina, la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8oxoG) y la O⁶-metilguanina (6mG), dos de las modificaciones más habituales en la célula y de gran importancia desde el punto de vista de la mutagénesis, dada su

ADN polimerasa lambda

capacidad de apareamiento con dos bases nitrogenadas diferentes cada una (Figuras 9.1 y 9.2). El estudio fue realizado en moléculas tipo molde/cebador abierto (Figura 9.3, parte A), ya que simulan la estructura de un intermedio de replicación, proceso en el que se produce el fenómeno de síntesis a través de lesiones con el fin de evitar la parada del proceso de replicación del ADN.

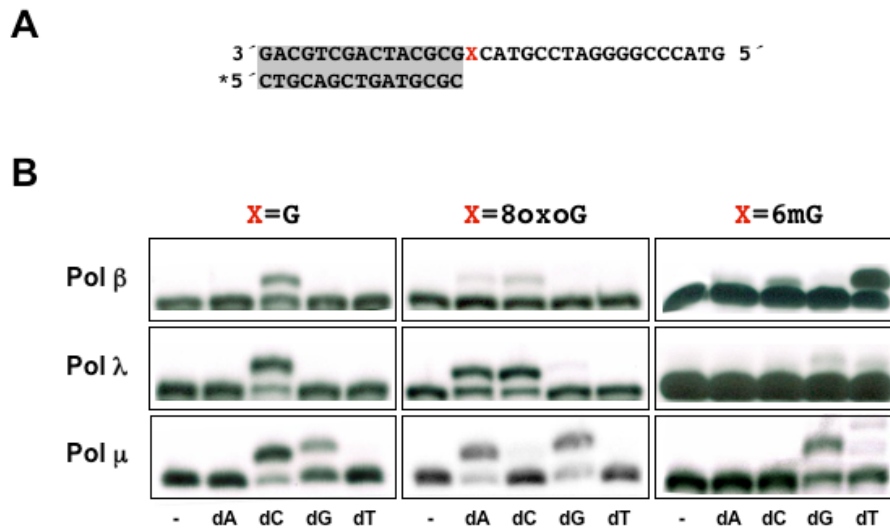


Figura 9.3: Diversidad funcional de los miembros de la Familia X en el paso de inserción frente a una base nitrogenada modificada. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de inserción frente a las bases dG, 8oxoG y 6mG por Pol β, Pol λ y Pol μ. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM ADN y 100 nM de cada ADN polimerasa. El metal utilizado como cofactor es Mg²⁺, salvo en el caso de la inserción frente a 6mG por Pol β y Pol λ, en los que se utilizó Mn²⁺. La concentración de dNTPs es de 10 μM en todos los casos, salvo la inserción frente a 6mG por Pol μ (1 mM).

Como se observa en la parte B de la Figura 9.3, las tres ADN polimerasas realizan preferentemente la inserción dirigida por la primera base molde (dG), aunque Pol μ también inserta dG de forma dirigida por la segunda base de la cadena molde (dC), gracias a su capacidad de dislocación de la hebra molde. Sin embargo, al evaluar la síntesis frente a la base 8oxoG se observan claras diferencias entre las tres ADN polimerasas estudiadas. Pol β realiza preferentemente la inserción “correcta” (dC), aunque de manera menos eficiente que la inserción de dC frente a la base molde no dañada dG. Asimismo, Pol β también introduce dA frente a la base 8oxoG, aunque la eficiencia del proceso es menor que la de la inserción “correcta” (dC), de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios previos (Miller y cols., 2000). Pol λ por su parte lleva a cabo la inserción de dA y dC frente a 8oxoG de manera muy eficiente, alcanzando niveles similares a los obtenidos en la inserción de dC frente a la base dG no modificada. Al contrario que Pol β, los niveles de inserción de dA y dC frente a 8oxoG son aproximadamente similares. Pol λ también es capaz de realizar una leve inserción de dG mediada probablemente por un mecanismo de dislocación de la cadena molde. Por último, Pol μ únicamente inserta dA de forma dirigida por la base 8oxoG, aunque también puede insertar dG de manera dirigida por la segunda base molde (dC), gracias a su capacidad de dislocación. El mecanismo de dislocación de Pol μ parece estar favorecido por la presencia de la base 8oxoG en la primera posición de la cadena molde, ya que los niveles de reacción alcanzados superan a los obtenidos con la base no modificada dG en la misma posición.

Los resultados de la inserción frente a la base 6mG también reflejan la disparidad entre los miembros de la Familia X de ADN polimerasas. En primer lugar, cabe reseñar que Pol β y Pol λ necesitaron iones Mn^{2+} como cofactor de la reacción para realizar la inserción de algún nucleótido. Por otro lado, Pol μ necesitó mayor concentración de nucleótidos (1 mM) para obtener productos de reacción, ya que el empleo de iones Mn^{2+} hace que se dispare su actividad transferasa terminal, obteniendo una escalera de adiciones nucleotídicas no justificables desde el punto de vista de la dirección mediada por la cadena molde (no mostrado).

Como se observa en la parte B de la Figura 9.3, Pol β realiza eficientemente la inserción “mutagénica” de dT frente a 6mG, mientras que la inserción “correcta” (dC) muestra unos niveles de reacción ínfimos, de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios previos (Singh y cols., 1996). Por otro lado, la base 6mG supone un gran bloqueo para la acción de Pol λ , ya que no se observa la inserción eficiente de ningún nucleótido. Únicamente se observa una leve inserción de dG, probablemente introducido por dislocación de la cadena molde, y la aún más leve inserción directa de dT frente a 6mG. Por último, Pol μ lleva a cabo la inserción de dG, probablemente por dislocación, y una doble inserción de dT, probablemente mediada por un primer paso de inserción directa de dT frente a 6mG y un segundo paso de dislocación de la segunda base de la cadena molde (dC) para que la tercera base (dA) ejerza de molde y se pueda insertar de nuevo dT.

Los resultados obtenidos en los estudios de inserción frente a 6mG con los miembros de la Familia X de ADN polimerasas están en línea con los obtenidos previamente con otras ADN polimerasas, ya que la mayoría de las estudiadas hasta la fecha han mostrado una marcada preferencia de inserción de dT frente a 6mG. Estas ADN polimerasas son Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003), Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000a), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a), y Pol β humana (Singh y cols., 1996).

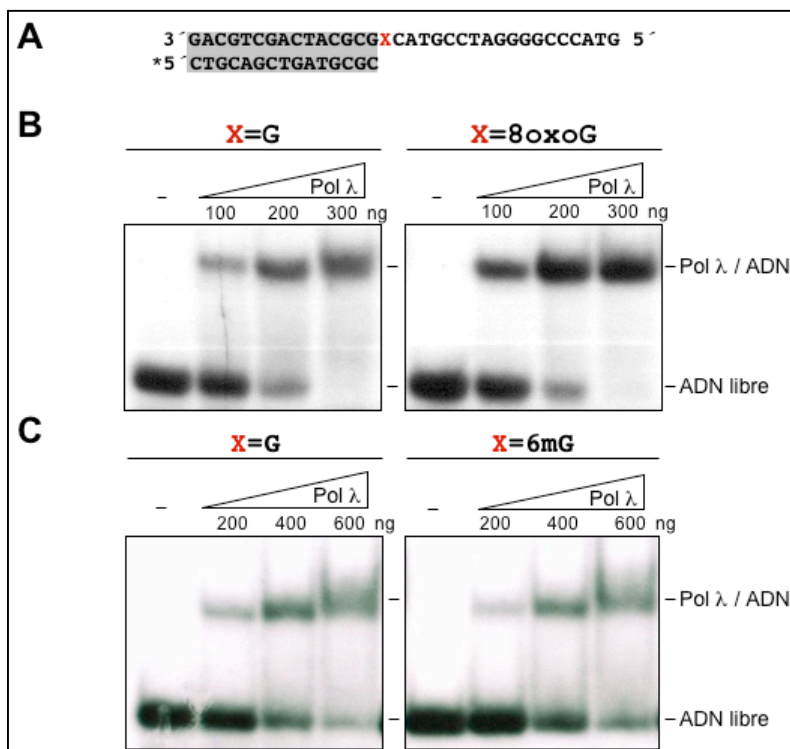


Figura 9.4: Estabilidad de unión de Pol λ a un molde dañado. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B y C.** Análisis, mediante ensayos de retraso en gel (ver Materiales y Métodos), de la capacidad de Pol λ de formar complejos estables con un ADN tipo molde/cebador abierto en función de la presencia de la base no modificada dG y las bases modificadas 8oxoG (parte B) y 6mG (parte C) en la posición señalada de la cadena molde. Las cantidades de Pol λ utilizadas se detallan en la figura.

La disparidad en los resultados de inserción obtenidos con Pol λ frente a los moldes 8oxoG y 6mG, podrían reflejar una diferente capacidad de unión de Pol λ a estas moléculas en función de la modificación química de la base del nucleótido contiguo al extremo del cebador. Como se observa en la Figura 9.4, Pol λ se une con similar estabilidad a las moléculas con 8oxoG (Figura 9.4, parte B) y 6mG como base molde (Figura 9.4, parte C). Por lo tanto, la diferente capacidad de inserción frente a 8oxoG y 6mG ha de ser reflejo de sutiles diferencias a nivel del centro activo de Pol λ que permitan la inserción frente a 8oxoG e impidan la misma frente a 6mG.

En conclusión, estos resultados reflejan la diversidad funcional de los miembros de la Familia X en relación al paso de inserción frente a una base modificada, enmarcado en un posible proceso de síntesis a través de lesiones. Asimismo, estos resultados ahondan en la importancia de las modificaciones químicas en las bases nitrogenadas del ADN, así como su diferente influencia en las ADN polimerasas, lo que denota sutiles diferencias a nivel de centro activo que posibilitan o impiden la polimerización en cada caso.

Los resultados obtenidos abren la posibilidad de que Pol λ pueda participar en el paso de inserción frente a 8oxoG en procesos de síntesis a través de lesiones. Para poder evaluar esta capacidad de manera objetiva y comparable nos dispusimos a la realización de la caracterización cinética en condiciones de estado estacionario de la inserción de dA y dC frente a 8oxoG, así como la inserción de dC frente a la base no modificada dG.

9.2. Mecanismos alternativos a la síntesis frente a una base nitrogenada dañada

De los resultados descritos en el apartado 9.1 se deduce que existen alternativas a la inserción directa frente a la primera base molde, sea ésta una base modificada o no. Una de estas alternativas se basa en la capacidad de dislocación de nucleótidos de la hebra molde para producir diferentes apareamientos del nucleótido situado en el extremo 3' del cebador, de forma que el nucleótido codificante sea distinto del nucleótido que originalmente se situaba contiguo al extremo del cebador. La dislocación de la cadena molde puede ser mediada por dos mecanismos diferentes, la dislocación por deslizamiento o la dislocación por estabilización por dNTP (Zhang y cols., 2001; Ruiz y cols., 2004). En el primer caso, la ADN polimerasa es capaz de inducir la reordenación de los nucleótidos de la hebra molde de forma que el nucleótido que se enfrentaba al nucleótido del extremo del cebador, pase a situarse extra-hélice entre el último y el penúltimo nucleótido que se encuentran apareados al extremo del cebador. De esta forma, el nucleótido que se encontraba contiguo al nucleótido codificante es el que pasa ahora a dirigir la entrada en el extremo del cebador (Figura 9.5, parte A). En el segundo caso, la ADN polimerasa provoca la dislocación del nucleótido molde contiguo al par de bases del extremo del cebador (codificante), situándolo extra-hélice entre el nucleótido de la cadena molde que aparea con el nucleótido del extremo del cebador y el nucleótido de la cadena molde que ahora se sitúa contiguo al extremo del cebador, y que por tanto pasa a dirigir la entrada del siguiente nucleótido en el extremo del cebador (Figura 9.5, parte A). En ambos mecanismos se dispone de un par perfectamente apareado en el extremo del cebador, que estabiliza la estructura, y desde el que se puede iniciar la polimerización. En el contexto de secuencia utilizado en nuestros ensayos resulta imposible diferenciar entre ambos mecanismos, ya que los dos provocan la entrada de dG como primer nucleótido añadido al extremo del cebador (Figura 9.5, parte A). Este hecho nos permite evaluar globalmente la capacidad de dislocación de Pol λ y Pol μ en

función de la presencia de una base modificada 8oxoG en el primer nucleótido contiguo al extremo del cebador.

En la parte B de la Figura 9.5, se evalúa tanto la inserción directa (dC o dA) frente a la base 8oxoG, como la posible dislocación de la cadena molde reflejada por la inserción de dG. En el caso de Pol μ se confirman los resultados mostrados en la Figura 9.3. Pol μ inserta preferentemente dA frente a 8oxoG y realiza muy eficientemente la dislocación de la cadena molde teniendo como primer nucleótido contiguo al extremo del cebador tanto dG como 8oxoG. Asimismo, sólo si el nucleótido codificante es dG, Pol μ también es capaz de insertar dT. Para que esta inserción estuviese dirigida por la cadena molde, tendría que haberse producido un fenómeno de doble dislocación que permitiese que la base dA, situada como parte del tercer nucleótido desde el extremo del cebador, se acercase al extremo del cebador para realizar la catálisis. Esta inserción también podría estar causada por la actividad transferasa terminal de Pol μ , pero el hecho de que sólo se produzca cuando la primera base molde es dG, y no cuando es 8oxoG, apunta a un mecanismo específico diferente de un evento de síntesis independiente de molde.

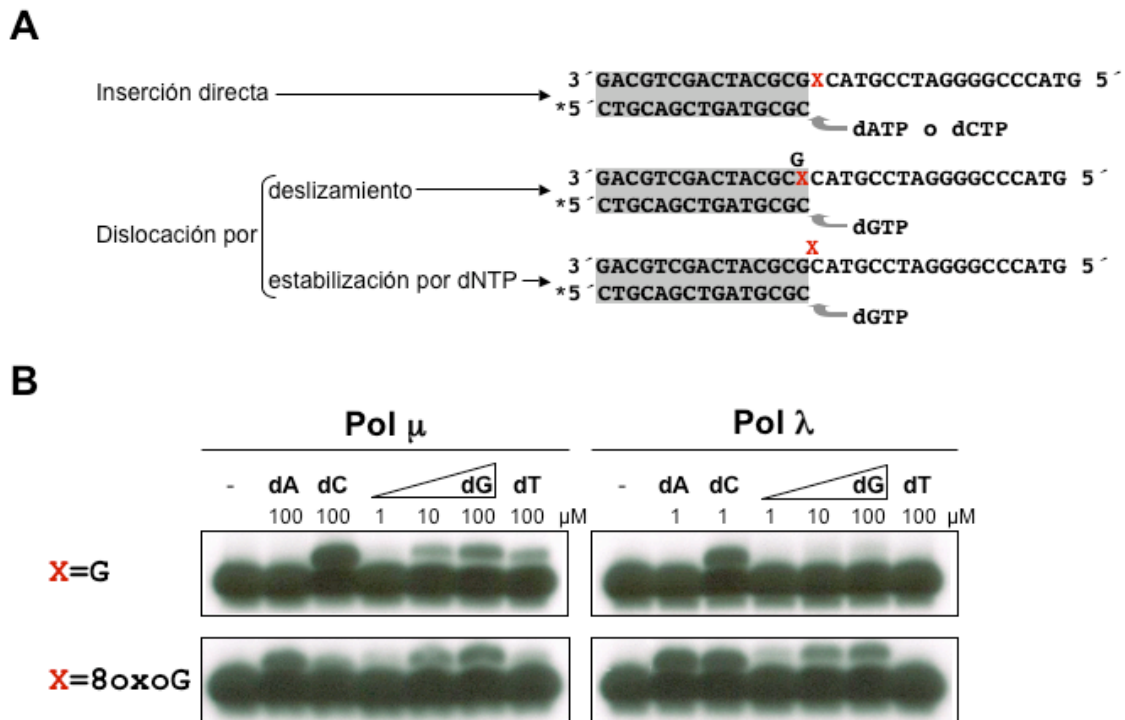


Figura 9.5: Mecanismos alternativos de síntesis frente a 8oxoG. **A.** Representación esquemática de los posibles mecanismos de inserción en el contexto de un ADN tipo molde/cebador abierto. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de inserción frente a las bases dG y 8oxoG, por Pol λ y Pol μ , en el que se evalúan mecanismos alternativos a la inserción directa. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 250 nM ADN y 10 nM de cada ADN polimerasa. El metal utilizado como cofactor es Mg^{2+} (2.5 mM). La concentración utilizada de cada dNTP se detalla en la figura.

Los resultados obtenidos con Pol λ reafirman los mostrados en la Figura 9.3. Pol λ inserta con la misma eficiencia dA y dC frente a 8oxoG. Sin embargo, la presencia de la base 8oxoG como molde produce la inducción del mecanismo de síntesis asociado a dislocación de la cadena molde, como refleja la eficiente inserción de dG únicamente cuando la base molde es 8oxoG (Figura 9.5, parte B). La dislocación por deslizamiento genera una estructura según la

cual el nucleótido que codificaba la entrada pasa a ser el que forma el par de bases del extremo del cebador (Figura 9.5, parte A). Esto podría justificar que sólo se observase inserción de dG cuando existe un 8oxoG en la cadena molde, ya que como se verá más adelante (apartado 9.5.), Pol λ extiende más eficientemente un par 8oxoG·dCMP que un par dG·dCMP, lo que justificaría que la dislocación sólo fuese productiva cuando generase un par 8oxoG·dCMP en el extremo del cebador.

9.3. Caracterización cinética en condiciones de estado estacionario de la capacidad de inserción frente a 8oxoG de Pol λ

Se llevó a cabo la caracterización cinética de la inserción frente a dG y 8oxoG en presencia de los nucleótidos correspondientes en cada caso (dC para dG; dC o dA para 8oxoG). La tasa de incorporación de nucleótido, obtenida como se describe en Materiales y Métodos, se representó en función de la concentración de nucleótido empleada en cada caso, y los valores de V_{max} y K_m aparentes se obtuvieron del mejor ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1, ver Materiales y Métodos). De estos valores se obtuvieron los valores de eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) (Ecuación 3, ver Materiales y Métodos).

Como se observa en la Tabla 9.I, los valores obtenidos de eficiencia catalítica reflejan el comportamiento previamente observado en los experimentos cualitativos de las Figuras 9.3 y 9.5. Pol λ inserta dC frente a dG, así como dC y dA frente a 8oxoG, mostrando los tres eventos de síntesis aproximadamente la misma eficiencia.

Molde	dNTP	V_{max} $\mu\text{M min}^{-1}$	K_m μM	k_{cat} min^{-1}	k_{cat}/K_m $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
G	dCTP	$(4,04 \pm 0,79) \times 10^{-3}$	$1,11 \pm 0,10$	$4,04 \cdot 10^{-1}$	$3,64 \cdot 10^{-1}$
8oxoG	dCTP	$(3,27 \pm 0,43) \times 10^{-3}$	$1,32 \pm 0,28$	$3,27 \cdot 10^{-1}$	$2,48 \cdot 10^{-1}$
8oxoG	dATP	$(3,52 \pm 0,40) \times 10^{-3}$	$0,84 \pm 0,02$	$3,52 \cdot 10^{-1}$	$4,19 \cdot 10^{-1}$

Tabla 9.I: Parámetros cinéticos de la inserción frente a dG y 8oxoG en moléculas tipo molde/cebador abierto por la ADN polimerasa λ . Los datos son medias (\pm desviación estándar) de al menos tres ensayos independientes.

Por lo tanto, la fidelidad con la que Pol λ realiza la inserción frente a 8oxoG es proclive al error, ya que más de la mitad de las veces que Pol λ se enfrente a la inserción frente a 8oxoG realizará la inserción mutagénica de dA. Sin embargo, al tener en cuenta el otro parámetro importante en este proceso, la eficiencia, Pol λ muestra una eficiencia de inserción similar frente a la base modificada (8oxoG) y frente a la base no modificada (dG), lo que la postula como candidata a participar en el proceso de síntesis a través de la lesión 8oxoG, a pesar de que su fidelidad de síntesis en este caso no asegure una polimerización libre de error.

Para tener una noción clara de la posible situación fisiológica, hay que tener en cuenta el comportamiento que cada ADN polimerasa pueda tener al enfrentarse a la inserción frente a 8oxoG. Por este motivo son cruciales los estudios realizados en condiciones comparables por diferentes grupos de investigación, y que permiten dilucidar qué ADN polimerasa es la más capacitada para lidiar con un determinado sustrato. En este sentido, se han realizado diversos estudios cinéticos en condiciones de estado estacionario en los que se evalúa la inserción frente a 8oxoG por diferentes ADN polimerasas. De la Familia B han sido estudiadas Pol α de timo de

ternera (Shibutani y cols., 1991), Pol δ de timo de ternera, en presencia o ausencia de PCNA (Einolf y Guenguerich, 2001), y Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003). De la Familia Y han sido estudiadas Pol ι humana (Vaisman y Woodgate, 2001), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a), Pol η humana (Zhang y cols., 2000) y Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000b). Por último, de la Familia X ha sido previamente estudiada Pol β humana (Miller y cols., 2000).

Al comparar la fidelidad con la que cada una de estas ADN polimerasas realizaría la síntesis frente a 8oxoG, encontramos situaciones diversas (Figura 9.6). Los miembros de la Familia B (Pol α , Pol δ y Pol ζ) tienden a realizar la inserción mutagénica de dA, con la única excepción de Pol δ acompañada de PCNA. En la Familia Y encontramos comportamientos dispares. Pol κ tiene una alta propensión a insertar dA frente a 8oxoG. Sin embargo, Pol ι y Pol η de *S. cerevisiae* tienden claramente a realizar la inserción “correcta” de dC. Es especialmente llamativo el comportamiento de Pol η humana, ya que no se comporta como su variante de levadura, sino que muestra un fenotipo parecido al descrito en este apartado con Pol λ , ya que inserta con similar eficiencia dA y dC frente a 8oxoG. Por último, Pol β muestra mayor tendencia a insertar dC frente a 8oxoG, aunque la diferencia con la inserción dA es muy leve.

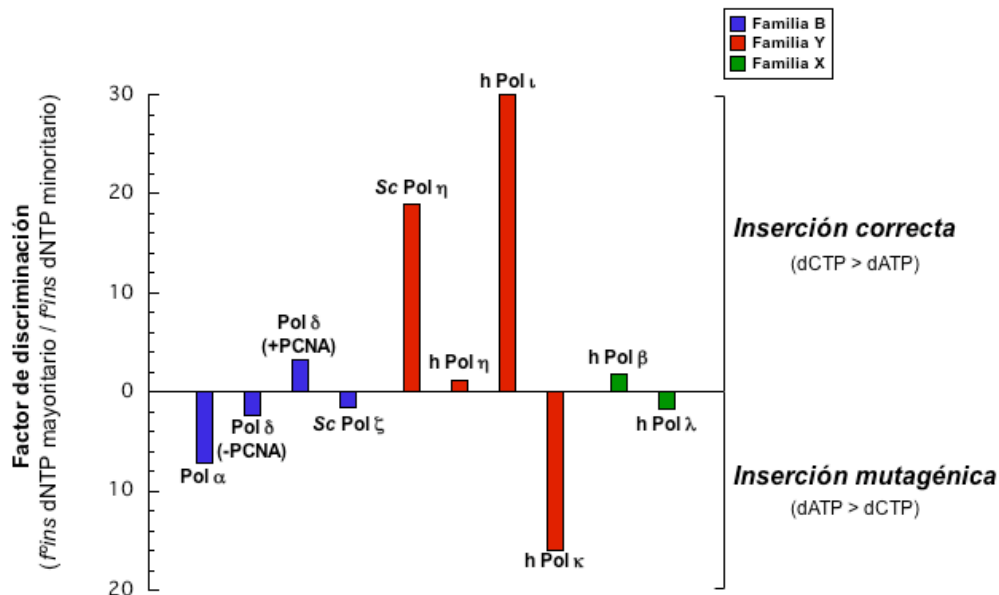


Figura 9.6: Fidelidad de inserción frente a 8oxoG por las diferentes ADN polimerasas eucarióticas. Comparación del factor de discriminación (f_{ins}^p dNTP mayoritario / f_{ins}^m dNTP minoritario) de diferentes ADN polimerasas: Pol α de timo de ternera (Shibutani y cols., 1991), Pol δ de timo de ternera, en ausencia o presencia de PCNA (Einolf y Guenguerich, 2001), Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003). Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a), Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000b), Pol η humana (Zhang y cols., 2000), Pol ι humana (Vaisman y Woodgate, 2001), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a), Pol β humana (Miller y cols., 2000) y Pol λ humana (Tabla 9.I de esta Tesis).

Sin embargo, los datos de la fidelidad por sí solos son insuficientes para evaluar la posible situación fisiológica de inserción frente a 8oxoG. Es necesario tener conocimiento de la eficiencia del proceso comparada con la eficiencia de inserción frente a un molde no dañado, ya que así podremos apostar por el candidato idóneo para llevar a cabo el proceso *in vivo*.

Si evaluamos la eficiencia con la que cada una de estas ADN polimerasas realiza la inserción frente a 8oxoG, en comparación con la eficiencia de inserción frente a un molde no dañado, obtenemos diversos resultados (Figura 9.7). En primer lugar, los miembros de la

Familia B muestran eficiencias, tanto para la inserción correcta como para la inserción mutagénica, muy alejadas de los valores de eficiencia catalítica obtenidos en un molde no dañado. Los miembros de la Familia Y muestran en general eficiencias mayores que los miembros de la Familia B, aunque no alcanzan los valores de inserción obtenidos frente a un molde no dañado, salvo el caso de la inserción “correcta” (dC) de Pol η de *S. cerevisiae*. Pol β , perteneciente a la Familia X, muestra unos valores de eficiencia catalítica ligeramente inferiores a los obtenidos en un molde no dañado. Pol λ por su parte muestra unos valores de eficiencia equivalentes a los obtenidos en un molde no dañado (Tabla 9.I), convirtiéndose en la ADN polimerasa humana que muestra mayor eficiencia relativa de inserción frente a 8oxoG.

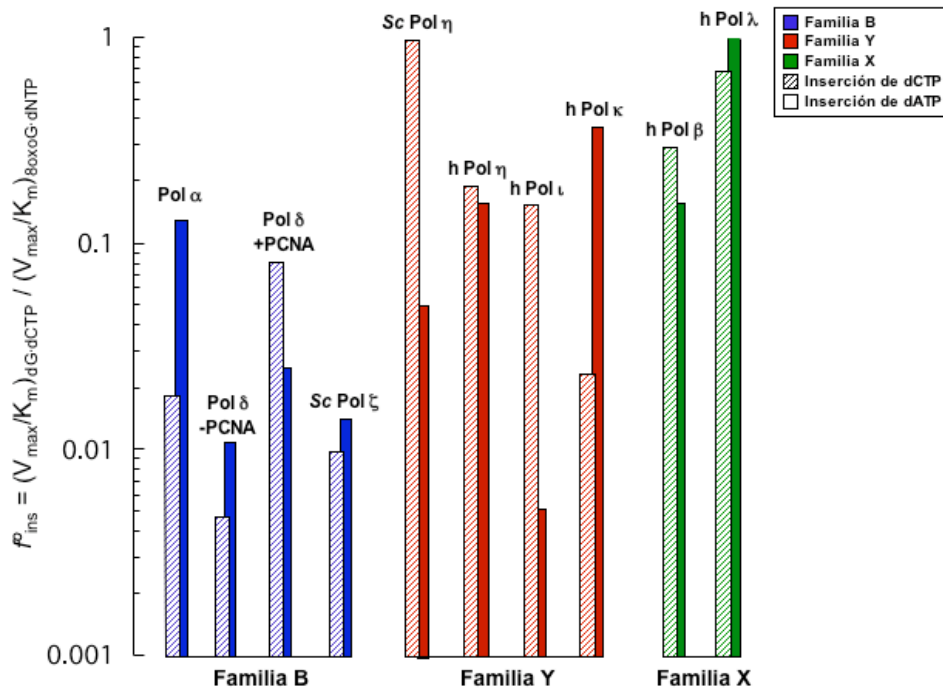


Figura 9.7: Eficiencia de inserción frente a 8oxoG por las diferentes ADN polimerasas eucarióticas. Comparación de la eficiencia de inserción frente a 8oxoG por diversas ADN polimerasas: Pol α de timo de ternera (Shibutani y cols., 1991), Pol δ de timo de ternera, en ausencia o presencia de PCNA (Einolf y Guengerich, 2001), Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003). Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a), Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000b), Pol η humana (Zhang y cols., 2000), Pol ι humana (Vaisman y Woodgate, 2001), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a), Pol β humana (Miller y cols., 2000) y Pol λ humana (Tabla 9.I de esta Tesis).

La única ADN polimerasa que combina una gran fidelidad y una gran eficiencia catalítica es Pol η de *S. cerevisiae*, convirtiéndose en el candidato idóneo para llevar a cabo la síntesis frente a 8oxoG de manera libre de error. Sin embargo, resulta llamativo que en humanos no exista ningún candidato que reúna ambas cualidades. Existen enzimas que muestran una gran fidelidad (Pol ι , Figura 9.6), y enzimas que muestran una gran eficiencia (Pol λ , Figura 9.7), pero ninguna de las estudiadas hasta la fecha aún ambas cualidades, lo que permitiría asegurar una replicación libre de error de la modificación 8oxoG.

La ADN polimerasa Rev1 (Familia Y), caracterizada inicialmente como una desoxicitidil transferasa (Nelson y cols., 1996b), podría ser la encargada de llevar a cabo la inserción fiel y eficiente frente a los derivados de la base nitrogenada guanina, ya que siempre llevaría a cabo la inserción correcta. Sin embargo, estudios cinéticos han desvelado que la

eficiencia de inserción de Rev1 frente a 8oxoG y 6mG se aleja mucho (400 y 40 veces inferior respectivamente) del valor de eficiencia obtenido frente a un molde no dañado (dG) (Haracska y cols., 2002b), lo que parece descartarla como principal enzima responsable del paso de inserción libre de error frente a 8oxoG y 6mG.

Hay que destacar el dato obtenido con Pol δ acompañada de PCNA (Figuras 9.6 y 9.7), ya que será Pol δ acompañada de PCNA la primera en tener acceso a la base dañada durante el proceso de replicación del ADN. Los valores de fidelidad y eficiencia de este complejo auguran cierta capacidad de replicación libre de error, que podrían implementarse gracias a la colaboración de otras ADN polimerasas como Pol ϵ . Además, es posible que, al igual que ha sucedido con Pol δ en presencia y ausencia de PCNA, las demás ADN polimerasas cambien su patrón de fidelidad y/o eficiencia por la presencia de proteínas accesorias. Asimismo, es posible que modificaciones postraduccionales de las proteínas *in vivo* también tengan influencia sobre las capacidades de cada ADN polimerasa. Por lo tanto, sería muy interesante ampliar estos estudios desde el punto de vista de la complementación entre proteínas y la regulación por modificación química de las mismas.

9.4. Diversidad funcional de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas en el paso de extensión desde pares cuya base molde está modificada

El paso de extensión de un par en el que una de las bases se encuentra modificada posee una relevancia crucial. De la eficiencia de este proceso depende que el par generado durante el proceso de inserción quede fijado e inaccesible a proteínas con actividad exonucleasa 3'→5', que podrían eliminar el nucleótido insertado. Este hecho tiene dos lecturas posibles. Si el par generado durante el paso de inserción está libre de error interesará que el paso de extensión sea lo más eficiente posible, mientras que si en el paso de inserción se realizó una adición mutagénica interesará que el paso de extensión sea lo menos eficiente posible, para que la adición mutagénica pueda corregirse antes de la extensión. Por lo tanto, en el paso de extensión será de nuevo muy relevante tanto la fidelidad de extensión (tendencia a extender el par no mutagénico respecto al mutagénico), como la eficiencia de extensión (eficiencia relativa de extensión de los pares mutagénicos y no mutagénicos respecto a la extensión de un par no dañado).

Las tres ADN polimerasas de la Familia X dependientes de molde (Pol β , Pol λ y Pol μ) realizan eficientemente la extensión de un par dG·dCMP, siendo Pol λ la más eficiente debido a su menor K_m por nucleótido (Figura 9.8, parte B). Sin embargo, al evaluar la extensión de los posibles pares generados durante el paso de inserción frente a una base modificada 8oxoG (8oxoG·dCMP y 8oxoG·dAMP), el comportamiento de cada ADN polimerasa es diferente (Figura 9.8, parte B). Pol β y Pol λ muestran mayor eficiencia de extensión en el caso de la extensión del par 8oxoG·dCMP respecto al par 8oxoG·dAMP, mientras que Pol μ realiza la extensión de ambos pares con similar eficiencia. Por lo tanto, Pol β y Pol λ tienen una alta fidelidad de extensión, ya que tienden mayoritariamente a extender el par “correcto” (8oxoG·dCMP), mientras que Pol μ posee menor nivel de fidelidad, ya que extiende de igual forma el par “correcto” y el par mutagénico (8oxoG·dAMP).

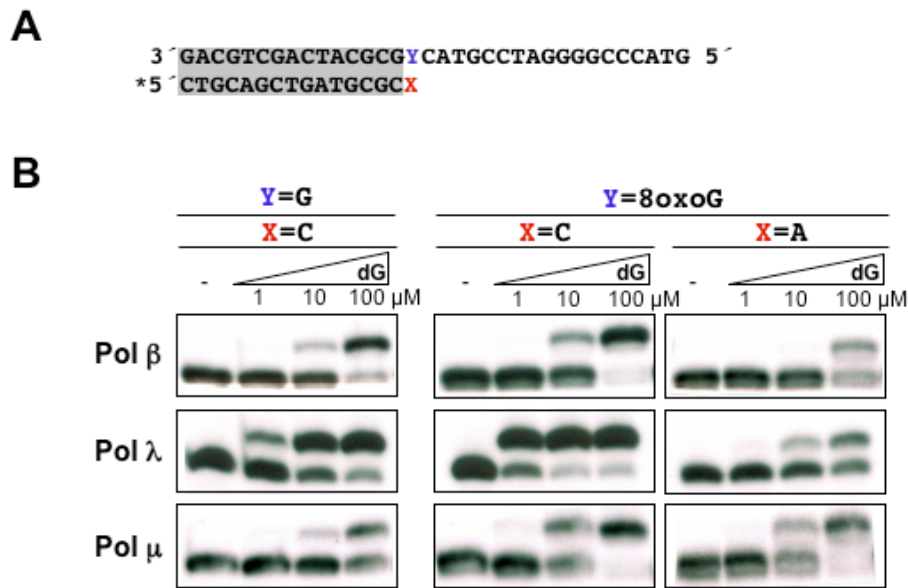


Figura 9.8: Diversidad funcional de los miembros de la Familia X en el paso de extensión desde pares con la base 8oxoG como molde. **A.** Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de extensión de los posibles pares formados con dG y 8oxoG como base molde por Pol β, Pol λ y Pol μ. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM ADN y 100 nM de cada ADN polimerasa. El metal utilizado como cofactor es Mg²⁺. Las concentraciones utilizadas de dGTP se detallan en la figura.

La eficiencia de extensión respecto al par no dañado dG·dCMP, también refleja diferencias entre las tres ADN polimerasas (Figura 9.8, parte B). Pol β extiende el par 8oxoG·dCMP con aproximadamente la misma eficiencia que el par dG·dCMP. Pol μ extiende los pares 8oxoG·dCMP y 8oxoG·dAMP con aproximadamente la misma eficiencia que el par no modificado dG·dCMP. Sin embargo, Pol λ muestra un significativo aumento en el nivel de extensión por la presencia de la base modificada 8oxoG respecto a la base no modificada dG, siempre que en el extremo del cebador exista dCMP, ya que en presencia de dAMP la eficiencia de la reacción se reduce significativamente. Este dato parece indicar una predisposición especial de Pol λ para llevar a cabo la extensión del par 8oxoG·dCMP con implementada eficiencia.

Asimismo, la extensión de los posibles pares generados frente a la base modificada 6mG refleja claras diferencias entre los miembros de la Familia X de ADN polimerasas (Figura 9.9, parte B). Pol β extiende poco eficientemente el par 6mG·dCMP y no extiende el par 6mG·dTMP. Pol μ extiende ambos pares eficientemente, aunque el par 6mG·dCMP de forma más eficiente. Por último, Pol λ extiende el par 6mG·dCMP mucho más eficientemente que el par 6mG·dTMP, alcanzando niveles máximos entre las tres ADN polimerasas estudiadas. Por lo tanto, las tres ADN polimerasas dependientes de molde de la Familia X tienen una alta fidelidad de extensión respecto a los posibles pares generados frente a 6mG, dada su mayor tendencia a la extensión del par “correcto” 6mG·dCMP, pero la eficiencia del proceso varía mucho en cada caso.

Al estudiar la eficiencia del proceso respecto a la extensión del par no modificado dG·dCMP, se observa como el comportamiento de los tres enzimas es diferente (Figura 9.9, parte B). Pol β ve muy reducida su eficiencia de extensión respecto al par no modificado. Pol μ

parece extender más eficientemente el par 6mG·dCMP que el par dG·dC, mientras que Pol λ extiende el par 6mG·dCMP menos eficientemente que el par no modificado.

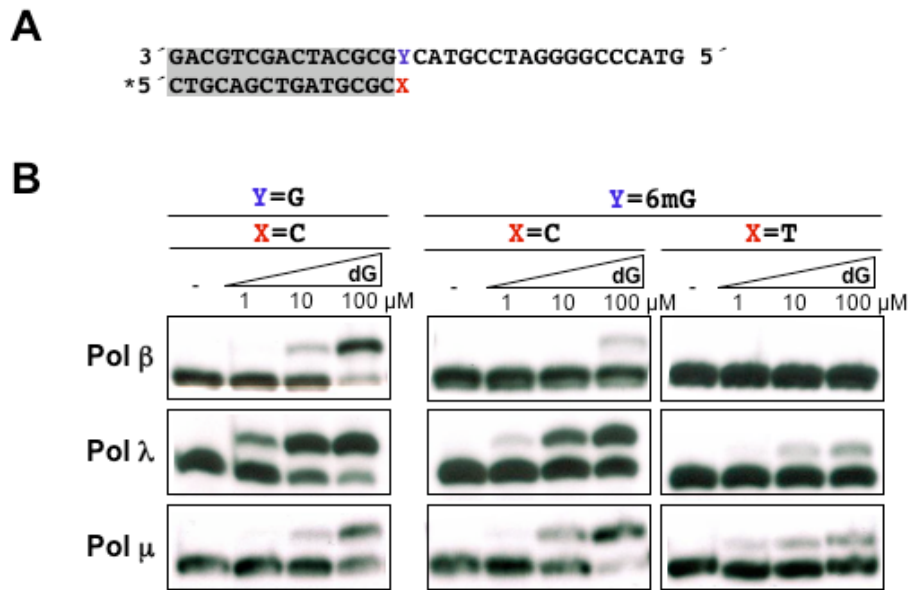


Figura 9.9: Diversidad funcional de los miembros de la Familia X en el paso de extensión desde pares con la base 6mG como molde. A. Secuencia de la molécula de ADN utilizada como sustrato en el ensayo. El asterisco representa el oligonucleótido marcado radiactivamente. **B.** Ensayo de extensión de los posibles pares formados con dG y 6mG como base molde por Pol β , Pol λ y Pol μ . El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos, utilizando una concentración de 5 nM ADN y 100 nM de cada ADN polimerasa. El metal utilizado como cofactor es Mg^{2+} . Las concentraciones utilizadas de dGTP se detallan en la figura.

9.5. Caracterización cinética en condiciones de estado estacionario de la capacidad de extensión de pares cuya base molde es 8oxoG o 6mG por Pol λ

Dados los resultados iniciales expuestos en el apartado 9.4, decidimos llevar a cabo la caracterización cinética en condiciones de estado estacionario de la extensión de los posibles pares generados frente a las bases 8oxoG y 6mG por Pol λ .

Como se observa en la Tabla 9.II, los valores obtenidos de eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) reflejan el comportamiento previamente observado en los experimentos cualitativos de las Figuras 9.8 y 9.9. Pol λ extiende el par 8oxoG·dCMP mucho más eficientemente que el par mutagénico 8oxoG·dAMP (23 veces), superando incluso la eficiencia de extensión del par no modificado dG·dCMP (5 veces). Por lo tanto, Pol λ combina una alta fidelidad y una alta eficiencia de extensión, lo que sugiere un papel *in vivo* de esta ADN polimerasa en el paso de extensión libre de error de la lesión 8oxoG.

Por otro lado, Pol λ extiende el par 6mG·dCMP más eficientemente que el par mutagénico 6mG·dTMP (3.4 veces), lo que le atribuye una relativamente alta fidelidad de extensión. Sin embargo, el valor de eficiencia catalítica obtenido con el par 6mG·dCMP se muestra alejado del valor obtenido con el par no modificado dG·dCMP (4.4 veces), por lo que la eficiencia de la reacción no será óptima de cara a la realización *in vivo* de este paso.

M · C	V_{max} $\mu\text{M min}^{-1}$	K_m μM	k_{cat} min^{-1}	k_{cat}/K_m $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
G · C	$(3,38 \pm 0,42) \times 10^{-3}$	$8,66 \pm 0,96$	$3,38 \cdot 10^{-1}$	$3,90 \cdot 10^{-2}$
8 · C	$(5,87 \pm 0,82) \times 10^{-3}$	$3,06 \pm 0,22$	$5,87 \cdot 10^{-1}$	$1,92 \cdot 10^{-1}$
8 · A	$(2,55 \pm 0,26) \times 10^{-4}$	$3,05 \pm 0,58$	$2,55 \cdot 10^{-2}$	$8,36 \cdot 10^{-3}$
6 · C	$(4,87 \pm 0,79) \times 10^{-3}$	$5,50 \pm 0,94$	$4,87 \cdot 10^{-2}$	$8,86 \cdot 10^{-3}$
6 · T	$(1,86 \pm 0,34) \times 10^{-3}$	$7,17 \pm 0,93$	$1,86 \cdot 10^{-2}$	$2,59 \cdot 10^{-3}$

Tabla 9.II: Parámetros cinéticos de la extensión desde pares cuya base molde está modificada en moléculas tipo molde/cebador abierto por la ADN polimerasa λ . La extensión fue medida en presencia de dGTP, el siguiente nucleótido correcto. Los datos son medias (\pm desviación estándar) de al menos tres ensayos independientes. M: nucleótido del par perteneciente a la cadena molde. C: nucleótido del extremo 3' del cebador.

La obtención de estos valores permiten comparar, al igual que hicimos en el paso de inserción, las capacidades para realizar el paso de extensión dentro de un proceso de síntesis a través de lesión de las distintas ADN polimerasas estudiadas hasta el momento. La extensión de los pares formados por 8oxoG como base molde ha sido estudiada en Pol α de timo de ternera (Shibutani y cols., 1991), Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a), Pol η humana (Zhang y cols., 2000) y Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000b). La extensión de los pares formados por 6mG como base molde ha sido estudiada en Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a), Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000a) y Pol β humana (Singh y cols., 1996).

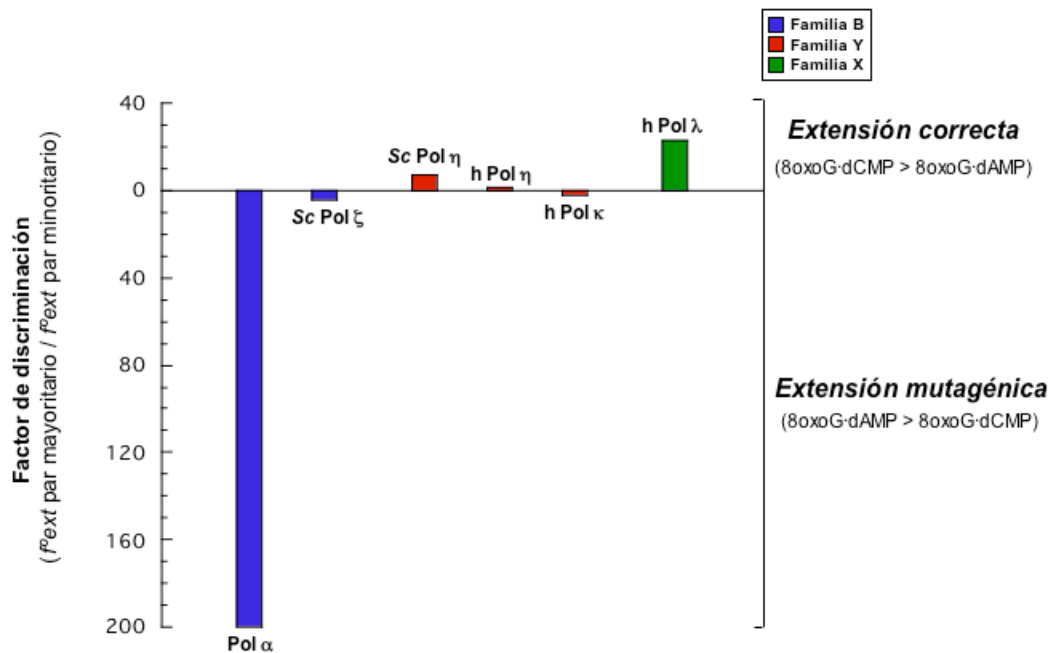


Figura 9.10: Fidelidad de extensión desde pares con 8oxoG como base molde por las diferentes ADN polimerasas eucarióticas. Comparación del factor de discriminación ($f_{ext}^{par\ mayoritario} / f_{ext}^{par\ minoritario}$) de diferentes ADN polimerasas: Pol α de timo de ternera (Shibutani y cols., 1991), Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003), Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000b), Pol η humana (Zhang y cols., 2000), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a) y Pol λ humana (Tabla 9.II de esta Tesis).

En la Figura 9.10 se compara el nivel de fidelidad de extensión de los posibles pares generados en torno a la base 8oxoG. Se observa como Pol λ es la ADN polimerasa más fiel de

las estudiadas hasta el momento, ya que tiene el mayor factor de discriminación a favor de la extensión del par “correcto” 8oxoG·dCMP.

En la Figura 9.11 se comparan las eficiencias de extensión de los pares 8oxoG·dCMP y 8oxoG·dAMP en relación a la extensión del par correcto dG·dCMP. Pol λ es el enzima que muestra mayor eficiencia en la extensión del par correcto 8oxoG·dCMP, mostrando valores superiores a los obtenidos en la extensión del par no modificado dG·dCMP ($f_{ext}^o > 1$). Este dato, junto con los datos de fidelidad expuestos en la Figura 9.10, convierte a Pol λ en la ADN polimerasa idónea para llevar a cabo el paso de extensión libre de error durante el proceso de síntesis a través de la lesión 8oxoG.

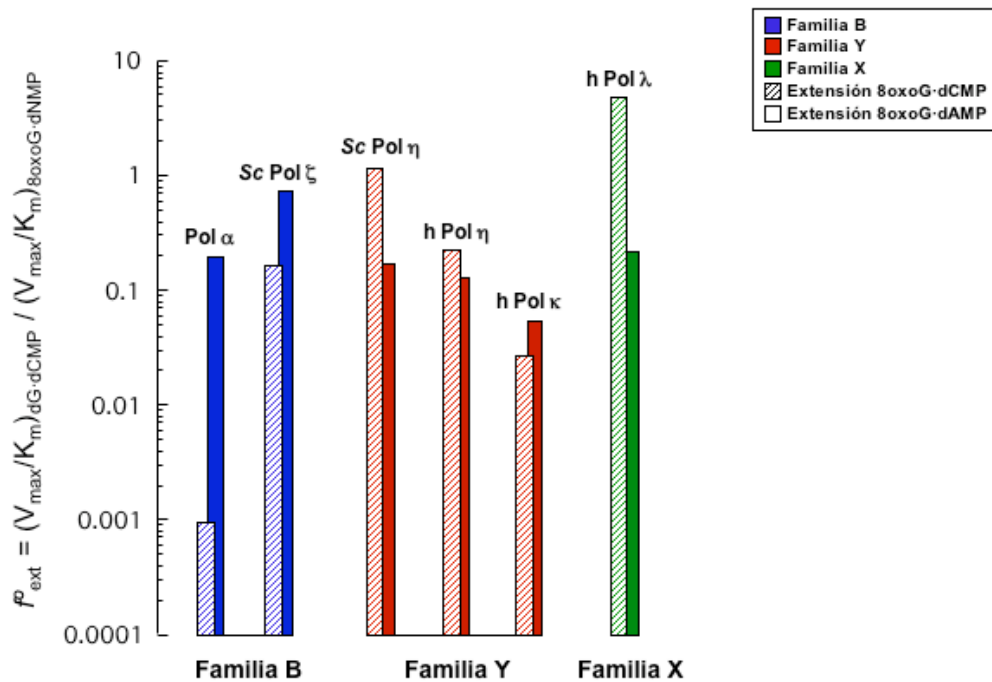


Figura 9.11: Eficiencia de extensión desde pares con 8oxoG como base molde por las diferentes ADN polimerasas eucarióticas. Comparación de la eficiencia de la extensión de los diferentes pares formados frente a 8oxoG por diferentes ADN polimerasas: Pol α de timo de ternera (Shibutani y cols., 1991), Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003), Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000b), Pol η humana (Zhang y cols., 2000), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002a) y Pol λ humana (Tabla 9.II de esta Tesis).

En la Figura 9.12 se comparan las eficiencias de extensión de los pares 6mG·dCMP y 6mG·dTMP en relación a la extensión del par correcto dG·dCMP. Se observa como todas las ADN polimerasas, salvo Pol κ, promueven la extensión del par no mutagénico 6mG·dCMP, aunque mostrando factores de discriminación reducidos (≤ 6), lo que no asegura un proceso de síntesis libre de error.

En la Figura 9.13 se comparan las eficiencias de extensión de los pares 6mG·dCMP y 6mG·dTMP en relación a la extensión del par correcto dG·dCMP. En humanos, la ADN polimerasa que muestra una mayor eficiencia de extensión relativa es Pol β, aunque seguida de cerca por Pol λ. Ambos miembros de la Familia X podrían actuar en el paso de extensión no mutagénico del par 6mG·dCMP. Sin embargo, no se ha caracterizado el comportamiento de muchos de los enzimas de la Familia Y frente a este tipo de sustrato, y alguno de sus miembros

podría ser el referente de este proceso desde el punto de vista de la prevención de la mutagénesis.

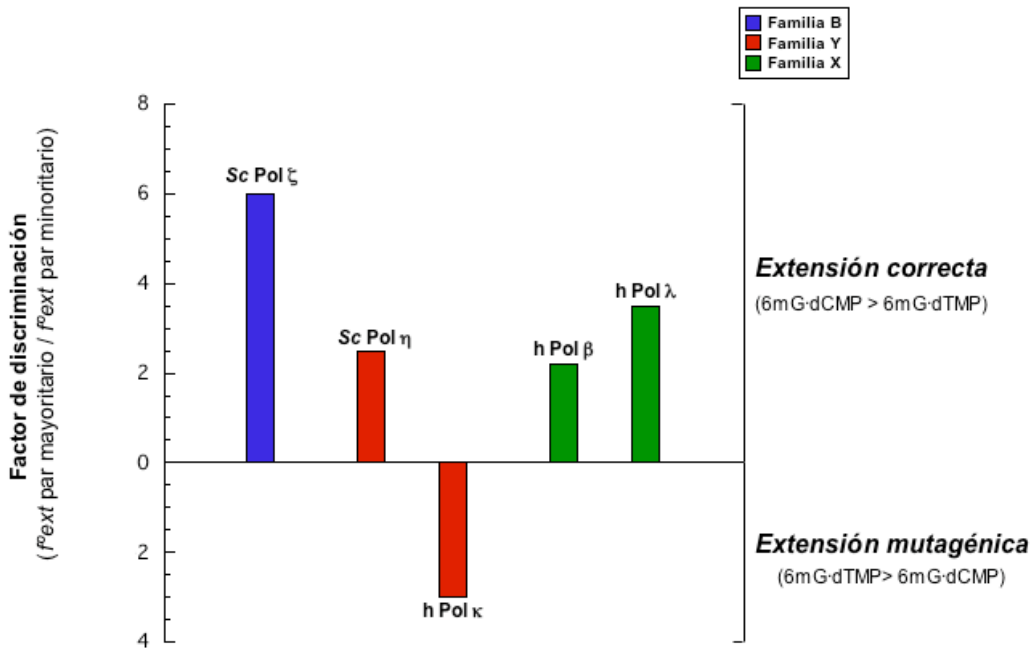


Figura 9.12: Fidelidad de extensión desde pares con 6mG como base molde por las diferentes ADN polimerasas eucarióticas. Comparación del factor de discriminación (f_{ext}^{p} par mayoritario / f_{ext}^{p} par minoritario) de diferentes ADN polimerasas: Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003), Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000a), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002), Pol β humana (Singh y cols., 1996) y Pol λ humana (Tabla 9.II de esta Tesis).

Los valores obtenidos en los estudios realizados con ADN polimerasas purificadas de *S. cerevisiae* no han de ser extrapolados directamente a humanos, ya que como sucede en el caso de Pol η y la inserción frente a 8oxoG (Figura 9.6), no siempre el comportamiento de ambas proteínas será idéntico, por lo que sería muy interesante conocer el comportamiento de las variantes humanas de enzimas como Pol ζ.

Los resultados y discusiones expuestas a lo largo de este capítulo plantean un escenario en el que existen claras lagunas respecto a la manera en que la célula asegura un resultado no mutagénico en ciertos procesos englobados bajo el término de síntesis a través de lesiones. Sin embargo, existen gran cantidad de factores que no han sido tenidos en cuenta y que podrían influir de forma determinante en el proceso. La regulación de la actividad de las ADN polimerasas mediante modificaciones postraduccionales puede tener una influencia esencial, como ha sido expuesto en el quinto capítulo de esta Tesis. Asimismo, la compartimentalización celular, así como el acceso mediado por factores al lugar de la lesión puede determinar el resultado final del proceso de síntesis. En este sentido cabe destacar el posible papel que pueda jugar PCNA *in vivo*. Esta proteína, con la que interaccionan la mayoría de las ADN polimerasas nombradas en este capítulo, puede ejercer de regulador del acceso de una determinada ADN polimerasa a una determinada lesión, beneficiando en cada caso el paso libre de error. Sin embargo, han de existir otros factores que colaboren con PCNA a la hora de regular el acceso de las ADN polimerasas a las diferentes lesiones en el ADN, ya que PCNA tan solo posee tres sitios de unión para ADN polimerasas, uno por cada subunidad que conforma el trímero funcional de la proteína. En esta misma línea, podría tener relevancia la interacción específica entre diferentes ADN polimerasas que conformen un complejo capaz de llevar a cabo un

proceso de síntesis con menor propensión al error que las proteínas evaluadas individualmente. En nuestro laboratorio han sido realizados estudios de interacción *in vivo* mediante el sistema de doble híbrido en levadura. Gracias a estos estudios se ha descubierto la interacción específica entre las formas humanas de Pol λ y Pol η . Sería muy interesante disponer de ambas proteínas para evaluar *in vitro* la síntesis a través de diversas lesiones con ambas proteínas de manera conjunta, así como evaluar el efecto de la presencia de PCNA en la reacción, ya que podría coordinar el acceso de cada ADN polimerasa al sustrato según el paso a realizar, sea éste la inserción o la extensión.

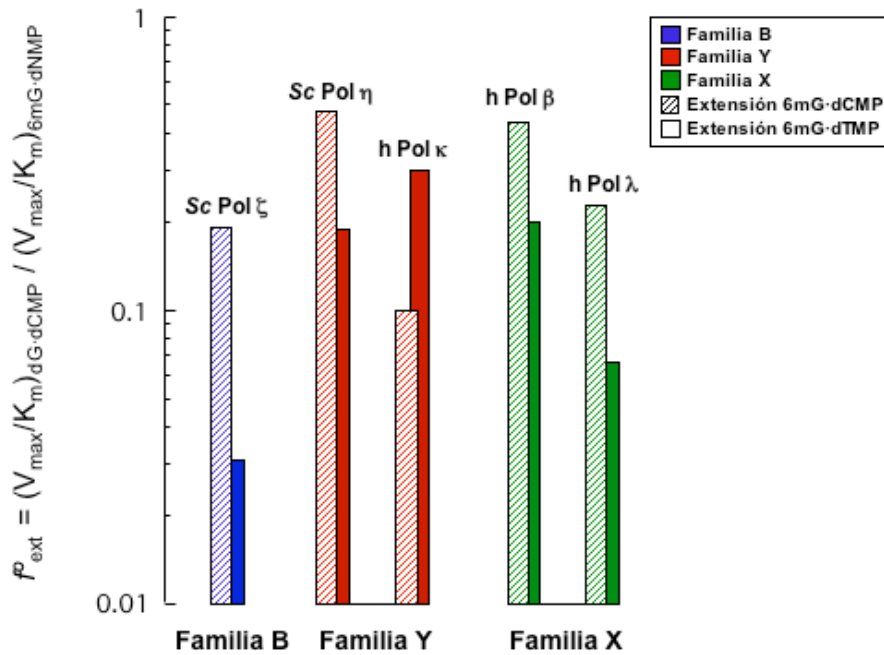


Figura 9.13: Eficiencia de extensión desde pares con 6mG como base molde por las diferentes ADN polimerasas eucarióticas. Comparación de la eficiencia de la extensión de los diferentes pares formados frente a 6mG por diferentes ADN polimerasas: Pol ζ de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2003), Pol η de *S. cerevisiae* (Haracska y cols., 2000a), Pol κ humana (Haracska y cols., 2002), Pol β humana (Singh y cols., 1996) y Pol λ humana (Tabla 9.II de esta Tesis).

La demostrada implicación de Pol λ en el proceso de reparación de roturas de doble cadena mediante el mecanismo *NHEJ* (Nick-McElhinny y Ramsden, 2003; Ma y cols., 2004; Fan y Wu, 2004; Nick-McElhinny y cols., 2005), junto con los datos expuestos en este capítulo, abren la posibilidad de que Pol λ participe en procesos de síntesis a través de lesiones no acoplados al proceso de replicación del ADN celular. Los agentes endógenos y exógenos que dan lugar a las roturas de doble cadena pueden también provocar la modificación química de las bases nitrogenadas próximas al lugar de la rotura, por lo que las ADN polimerasas implicadas en esta ruta de reparación (Pol λ y Pol μ) puede que tengan que efectuar eventos de síntesis frente a bases nitrogenadas modificadas. En este sentido, sería muy interesante evaluar la capacidad de inserción y extensión de Pol λ y Pol μ frente a bases modificadas en moléculas susceptibles de ser intermedios de la ruta de *NHEJ*, como podrían ser moléculas con extremos 3' protuberantes, en los que alguna de las bases de la zona protuberante estuviese modificada. Otro dato interesante a evaluar sería la influencia de los factores de la ruta *NHEJ*, como son las proteínas Ku, ADN-PK, XRCC4 y ADN ligasa IV, en el resultado de la reacción de síntesis frente a bases dañadas.

10

Discusión

El genoma está constantemente expuesto a factores endógenos y ambientales que producen diversos daños en el ADN. Como consecuencia, las bases nitrogenadas del ADN pueden ser modificadas, unidas covalentemente o escindidas. Asimismo, el esqueleto carbonado del ADN también puede sufrir modificaciones químicas y roturas de cadena sencilla o doble. Algunas de estas lesiones pueden desembocar en mutaciones o bloquear el avance de la horquilla de replicación, con la consiguiente amenaza para la integridad del genoma. Otras lesiones pueden impedir el proceso de transcripción génica, modificando el patrón de expresión proteica e interrumpiendo diversos procesos celulares.

Con el fin de tratar de eliminar o tolerar todas las posibles lesiones que se producen en la célula se han desarrollado múltiples mecanismos específicos a lo largo de la evolución. El empleo de uno u otro dependerá en cada caso del tipo de lesión producida y de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula. La mayoría de estos procesos implican pasos de síntesis de ADN, y según el tipo de sustrato generado se harán necesarias unas propiedades enzimáticas concretas para llevar a cabo dichos procesos de síntesis de manera eficiente y, en la medida de lo posible, de forma libre de error. Por este motivo existe en la célula un amplio repertorio de ADN polimerasas que permiten abarcar todos los procesos de síntesis de ADN posibles.

10.1 Pol λ y la reparación del daño oxidativo en el ADN

Los resultados recogidos en esta Tesis no apoyan claramente un papel de Pol λ *in vivo* en la reparación mediante el mecanismo *BER* de las lesiones producidas por el daño oxidativo (capítulo 4). El tipo de estudio realizado evalúa la capacidad de reparación global de la célula y, teniendo en cuenta el importante fondo aportado por Pol β , resulta difícil establecer la implicación de Pol λ en este proceso. Sería necesario obtener líneas celulares en las que el efecto de la ausencia o presencia de Pol λ se pudiera evaluar en ausencia de Pol β .

Sin embargo, estudios recientes han revelado que el fondo de reparación *BER* observado en *MEFs* deficientes en Pol β puede ser eliminado con el empleo de anticuerpos específicos contra Pol λ (Braithwaite y cols., 2005a). Asimismo, *MEFs* deficientes en Pol λ son hipersensibles a tratamientos con H_2O_2 (Braithwaite y cols., 2005b) y entran en estado de senescencia de forma prematura en condiciones de estrés oxidativo (20% O_2 ; 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 λ son hipersensibles a la incorporación en el ADN de 5-hidroximetil-desoxiuridina, lesión que se genera de manera fisiológica como consecuencia del estrés oxidativo. En conjunto, estos datos sugieren un papel activo de Pol λ en los procesos de protección frente a daño oxidativo en el ADN.

La reparación por *BER* de la 5-hidroximetil-desoxiuridina es dependiente de la glicosilasa SMUG1 (Boorstein y cols., 2001), con la que Pol λ interacciona de manera específica (Braithwaite y cols., 2005b). Este hecho abre la posibilidad de la participación especializada de Pol λ y Pol β en rutas específicas de *BER* según la lesión que inicie el mecanismo de reparación. Además, estudios de localización proteica subcelular tras una lesión en el ADN, indican que los componentes de los focos inducidos por lesión son diferentes entre Pol λ y Pol β (Braithwaite y cols., 2005b), lo que apoya la hipótesis de que ambas ADN polimerasas participen en diferentes procesos de forma independiente.

ADN polimerasa lambda

Existen otros factores que podrían tener influencia a la hora de establecer el diferente papel de cada ADN polimerasa en la ruta de reparación *BER*. La compartimentalización subcelular podría ser responsable del posible acceso de una u otra ADN polimerasa a una determinada lesión en el ADN. El caso más claro es Pol γ , que se ubica en el interior de las mitocondrias y es responsable tanto de la reparación como de la replicación del ADN mitocondrial (revisado por Graziewicz y cols., 2006). Por otra parte, Pol λ podría mediar en la reparación de bases en el ADN de manera simultánea a su posible papel en la reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo *NHEJ*.

Recientemente ha sido descrita la interacción *in vitro* entre Pol β y el complejo 9-1-1, heterotrímero formado por las proteínas Rad9, Rad1 y Hus1 (Touille y cols., 2004). Este complejo se une al ADN tras un daño como uno de los pasos iniciales de las cascadas de señalización que forman parte de los puntos de control del ciclo celular. Este complejo podría funcionar como un sensor del daño en el ADN, reclutando a Pol β cuando fuese necesario y promoviendo la ruta de reparación de “trecho largo”, dada la estimulación que produce en Pol β de su capacidad de síntesis acoplada a desplazamiento de banda. Sin embargo, no se ha detectado interacción entre el complejo 9-1-1 y Pol λ , ni cambios en las propiedades enzimáticas de Pol λ por la presencia del complejo en la reacción (Touille y cols., 2004). Por tanto, este estudio también avala la hipótesis de que Pol λ y Pol β participen en diferentes rutas de reparación por *BER* y señala una de las herramientas celulares que podría determinar el reclutamiento *in vivo* de una determinada ADN polimerasa, en este caso Pol β , a una lesión específica en el ADN.

Otro factor que puede tener una influencia crucial son las modificaciones postraduccionales. Se ha demostrado que Pol β es acetilada por p300, provocando una significativa caída en su actividad dRP-liasa (Hasan y cols., 2002), lo que impediría su participación en la ruta *BER* de trecho corto, abriendo el camino a otras ADN polimerasas en el proceso. Asimismo, modificaciones postraduccionales en otros componentes de la ruta podrían establecer qué ADN polimerasa participara en cada caso.

Los estudios descritos en esta Tesis demuestran la acetilación específica de Pol λ por p300 (capítulo 5). Dicho proceso no afecta a la actividad dRP-liasa de Pol λ , al contrario de lo que sucede con Pol β (Hasan y cols., 2002) y de forma consistente con el patrón de acetilación observado mediante técnicas de espectroscopía de masas. Este patrón justifica la falta de efecto del proceso de acetilación sobre la actividad dRP-liasa, ya que el residuo principal responsable de esta actividad no se acetila en ninguna de las dos formas (completa y truncada) de Pol λ , lo que podría significar una protección específica de este residuo frente a su modificación química. Este resultado contrasta con el comportamiento mostrado por Pol β , cuya actividad dRP-liasa es completamente inhibida por el proceso de acetilación, lo que concuerda con la identificación del residuo Lys72 como una de las dianas del proceso.

Esta diferencia en el efecto del proceso de acetilación de Pol β y Pol λ apunta a que la acetilación sea un mecanismo de regulación diferencial de ambas ADN polimerasas *in vivo* durante la ruta *BER*.

Sin embargo, la acetilación de Pol β y Pol λ provoca efectos dispares a nivel de su actividad ADN polimerasa, según el sustrato utilizado y las condiciones de ensayo. En ADN activado (ADN de gran tamaño con *gaps* de diferentes longitudes producto de la digestión

parcial con ADNasa I), la forma acetilada de Pol β sufre un notable descenso en su actividad ADN polimerasa, mientras que Pol λ ve incrementada su actividad. Sin embargo, al utilizar moléculas correspondientes a moldes y *gaps* discretos, las diferencias en los resultados obtenidos con cada ADN polimerasa se minimizan.

Este hecho podría ser reflejo de la existencia de una población heterogénea de moléculas de ADN polimerasa con diferentes residuos modificados en cada caso, lo que provocaría que en un sustrato heterogéneo, como el ADN activado, las diferentes modificaciones podrían suponer una ventaja, ya que podrían dotar a la ADN polimerasa de nuevas propiedades que le permitiesen usar determinados sustratos que antes no podía, o que anteriormente utilizaba menos eficientemente. En cambio, si enfrentamos una población heterogénea de ADN polimerasas modificadas a un sustrato homogéneo, es probable que sólo parte de las moléculas de proteína estén dotadas de las propiedades necesarias para lidiar con ese sustrato de ADN, lo que supondría una disminución global de su actividad enzimática.

Aun así, el diferente comportamiento de Pol β y Pol λ en este sentido habría de ser justificado desde el punto de vista del patrón de acetilación específico de cada proteína. Pol λ se acetila fundamentalmente en el dominio de polimerización, lo que podría dar lugar a moléculas con nuevas aptitudes en cuanto a su actividad ADN polimerasa que permitirían utilizar diversos sustratos de ADN, lo que justificaría el aumento en su actividad sobre ADN activado. Por el contrario, Pol β se acetila fundamentalmente en el dominio de 8 kDa, lo que podría repercutir negativamente en la función de reconocimiento de la zona *downstream* de *gaps* de tamaño mayor a un nucleótido (Prasad y cols., 1994), lo que justificaría el descenso de actividad observado en ADN activado, mostrando por el contrario un fenotipo similar a la forma no acetilada en la evaluación realizada en las moléculas tipo molde/cebador abierto y *gap* de un nucleótido, donde el dominio de 8 kDa tiene un menor efecto.

En esta misma línea argumental, resulta complicado asociar modificaciones en residuos concretos con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad ADN polimerasa, ya que se necesitaría una población homogénea de moléculas de proteína para atribuir un determinado fenotipo a la modificación de un determinado residuo.

Otro punto muy relevante es el papel ejercido por la zona N-terminal de Pol λ . Esta zona, que incluye los dominios BRCT (residuos 36-126) y Ser/Pro (residuos 127-241), se ve fuertemente acetilada, en detrimento del núcleo conservado tipo Pol β . Este hecho tiene dos posibles consecuencias. En primer lugar, otorga un papel de prevención y/o regulación a esta zona de la proteína respecto a la posible acetilación del núcleo conservado de Pol λ *in vivo*, lo que podría tener destacada importancia a nivel fisiológico. En segundo lugar, la acetilación de la zona N-terminal podría tener importancia desde el punto de vista de las interacciones con otros factores proteicos o con el ADN. A pesar de que los residuos identificados se sitúan fuera de los dominios BRCT y Ser/Pro (Figura 5.7), no hay que descartar que su modificación química tenga de alguna forma influencia sobre estos dominios. Este hecho podría tener una relevancia crucial en la implicación de Pol λ en la ruta de reparación *NHEJ*, ya que la participación en esta ruta y la interacción con los factores de la misma se produce a través del dominio BRCT (Nick-McElhinny y cols., 2005), por lo que la modificación del mismo o de residuos próximos podría afectar a las interacciones con los demás componentes de la ruta. Por tanto, la acetilación de Pol λ podría ser un mecanismo de regulación de su participación en diferentes rutas de reparación,

como son la reparación por escisión de base (*BER*) y la reunión de extremos no homólogos (*NHEJ*).

Existen otros tipos de modificaciones postraduccionales que pueden afectar a las proteínas. Recientemente se ha caracterizado la regulación por metilación de Pol β (El-Andaloussi y cols., 2006), según la cual residuos de arginina de Pol β son metilados por el enzima arginina metiltransferasa 6 (PRMT6). Esta modificación estimula la actividad ADN polimerasa de Pol β a través de un incremento de la afinidad por ADN y de la procesividad del enzima (El-Andaloussi y cols., 2006). Por el contrario, la actividad dRP-liasa no se ve afectada por esta modificación (El-Andaloussi y cols., 2006).

Este nuevo mecanismo de regulación podría afectar también a Pol λ , de la misma forma que ocurre con el mecanismo de acetilación. Además, sería muy interesante estudiar la posible metilación de Pol λ , ya que muchos de los residuos acetilados en Pol β (por ejemplo, K35 implicada en el reconocimiento del grupo fosfato en 5' de un *gap*), en Pol λ están sustituidos por arginina (K35 \rightarrow R275, Figura 5.7) y ocupan la misma posición en la estructura tridimensional, por lo que podemos deducir que cumplen la misma función. La posible metilación de estos residuos podría constituir un nuevo mecanismo de regulación de las actividades enzimáticas de Pol λ , que podría complementar al mecanismo de acetilación según las necesidades de la célula en cada momento.

Otra modificación postraduccional de demostrada importancia es la fosforilación. Inicialmente, el dominio Ser/Pro de Pol λ fue propuesto como un posible dominio diana de modificaciones postraduccionales que pudieran regular la actividad de Pol λ (García-Díaz y cols., 2000). Recientemente ha sido descrita la fosforilación de este dominio por el complejo formado por la quinasa dependiente de ciclina CDK2 y la ciclina A (Frouin y cols., 2005). Dicha fosforilación parece no afectar a la actividad ADN polimerasa de Pol λ , por lo que su efecto podría estar relacionado con la interacción con otras proteínas o con la fidelidad de síntesis, dados los resultados obtenidos recientemente que parecen otorgar un papel activo de este dominio en la fidelidad de síntesis de Pol λ (Fiala y cols., 2006).

Resulta muy interesante que la presencia de PCNA prevenga la fosforilación de Pol λ (Frouin y cols., 2005), ya que sus niveles están altamente regulados a lo largo del ciclo celular. Sus niveles son máximos durante la fase S y disminuyen significativamente durante las fases G2 y M. Este hecho concuerda con el hecho de que la fracción no fosforilada de Pol λ sea mayor que la fosforilada durante la fase S del ciclo celular. Sin embargo, durante las fases G2 y M Pol λ se encuentra mayoritariamente fosforilada (Frouin y cols., 2005). Este patrón de fosforilación dependiente de ciclo celular concuerda con el modo en que la célula repara las roturas de doble cadena en cada momento del ciclo. Durante las fases G2 y M, donde Pol λ se haya completamente fosforilada, las roturas de doble cadena se reparan mediante recombinación homóloga, mientras que durante las fases G0 y G1 el mecanismo empleado es la reunión de extremos no homólogos. Por tanto, la fosforilación de Pol λ podría tener relación con su función fisiológica, a nivel de interacción con los componentes de diferentes rutas de reparación, dirigiendo PCNA la acción de Pol λ hacia unos u otros procesos de síntesis según la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula.

Durante la fase S del ciclo celular, donde se produce la replicación del ADN nuclear, es necesario que el proceso de síntesis a través de lesiones se encuentre activo, con el fin de evitar

la parada de la horquilla de replicación por la presencia de lesiones en el ADN. El posible papel de Pol λ en este proceso está apoyado por la interacción específica con PCNA tanto *in vitro* como *in vivo* (Shimazaki y cols., 2002 y 2005; Maga y cols., 2002 y 2004), así como por su capacidad de extensión de extremos desapareados (Picher y cols., 2006, capítulo 8), y de síntesis frente y a partir de bases modificadas en la cadena molde, ambas características de vital importancia en este proceso (capítulo 9). Por tanto, la regulación del proceso de fosforilación del dominio Ser/Pro de Pol λ por la presencia de PCNA podría dirigir a Pol λ hacia procesos de síntesis a través de lesiones durante la fase S y hacia la reparación de roturas de doble cadena por *NHEJ* durante las fases G0 y G1.

Maga y colaboradores describieron la interacción de PCNA y Pol λ a través de un dominio hélice-horquilla-hélice que posee un motivo de unión a PCNA semejante al que presenta Pol ι (residuos 331-338). Según este estudio, Pol λ se uniría al bolsillo de unión hidrofóbico y al *loop* ID (inter-dominio) de PCNA, regiones donde se unen la mayor parte de proteínas que interaccionan con PCNA, lo que podría tener importantes consecuencias a nivel de regulación y acceso de Pol λ al ADN a través de PCNA. Asimismo, p21, proteína inducida por la presencia de daño en el ADN y que regula el ciclo celular a través de interacciones con CDKs y PCNA, compite *in vitro* con Pol λ por la unión a PCNA, lo que abre la posibilidad de que la interacción de Pol λ y PCNA esté sujeta a la regulación por el ciclo celular. En estos estudios, el efecto de la interacción de PCNA y Pol λ se reduce a un incremento en la procesividad del enzima.

Por otro lado, Shimakazi y colaboradores describieron una región en el extremo C-terminal de Pol λ (residuos 518-537) imprescindible para la unión de ambas proteínas. En concordancia con los resultados expuestos por Maga y cols., Pol λ se uniría al *loop* ID de PCNA. En este caso, la interacción de Pol λ y PCNA parece provocar una disminución en la actividad ADN polimerasa de Pol λ .

Asimismo, se han realizado estudios sobre la influencia de la presencia de PCNA en la fidelidad de síntesis de Pol λ , obteniendo datos que no muestran influencia alguna (Maga y cols., 2006).

En conjunto, estos estudios recientes muestran algunos resultados confusos e incluso contradictorios en cuanto a la forma en la que interaccionan PCNA y Pol λ , y en cuanto al efecto de esta interacción sobre la actividad ADN polimerasa de Pol λ , por lo que se hacen necesarios nuevos estudios que traten de clarificar este asunto, dada la importancia de PCNA en procesos tan diversos como la replicación, la síntesis a través de lesiones, la reparación por escisión de base de trecho largo e incluso en la reparación de roturas de doble cadena por *NHEJ*, ya que interacciona con las proteínas Ku y ADN-PK (Ohta y cols., 2002). Por tanto, PCNA parece constituir una encrucijada en la que confluyen gran cantidad de procesos celulares, por lo que es de vital importancia esclarecer su acción o efecto sobre Pol λ y las demás ADN polimerasas con las que interacciona.

Otra proteína que parece afectar la función de Pol λ es RPA. RPA es una proteína de unión a ADN de cadena sencilla que ha sido implicada en procesos de reparación y replicación del ADN. La presencia de RPA provoca un aumento en la fidelidad de síntesis de Pol λ (Maga y cols., 2006). Este dato posee importancia ya que ha sido demostrado que la presencia de RPA facilita el proceso de reparación por *NHEJ*, y su depleción de extractos celulares hace disminuir

la eficiencia de la reacción de reparación *in vitro* por *NHEJ* (Perrault y cols., 2001). Por lo tanto, la presencia de RPA en una reacción de reparación por *NHEJ* llevada a cabo por Pol λ podría hacer disminuir la probabilidad de que Pol λ inserte errores durante la síntesis de ADN, minimizando el carácter mutagénico de esta vía de reparación.

10.2 Reparación por *NHEJ* y los miembros de la Familia X

La radiación ionizante presente en el ambiente de forma natural y las especies reactivas de oxígeno producto del metabolismo oxidativo que se produce en las células, son factores que han afectado a las formas de vida a lo largo de la evolución. Estos factores producen un gran repertorio de roturas de doble cadena, por lo que la reparación por reunión de extremos no homólogos ha de poseer las herramientas necesarias para enfrentarse a las diferentes roturas generadas. La versatilidad de la ruta *NHEJ* se sustenta en las diferentes actividades enzimáticas que puede desplegar. Procesos de degradación nucleolítica, de polimerización y de ligación pueden ser llevados a cabo en cada hebra del ADN de forma independiente, lo que dota a este mecanismo de la versatilidad idónea para reparar todas las posibles roturas de doble cadena producidas.

Otro dato que avala la importancia esencial de la reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo *NHEJ* es su conservación evolutiva, ya que se produce en gran cantidad de organismos desde bacterias (revisado por Bowater y Doherty, 2005) hasta mamíferos (revisado por Hefferin y Tomkinson, 2005).

Entre los primeros indicios que apuntaron a la participación de Pol λ y Pol μ en la ruta *NHEJ* se encuentran los estudios realizados sobre sus características de polimerización y fidelidad de síntesis. Pol λ (Bebenek y cols., 2003) y Pol μ (Zhang y cols., 2001 y 2002; Covo y cols., 2004; Tippin y cols., 2004) son capaces de generar deleciones de un nucleótido de forma muy eficiente, lo que sugiere que poseen escasos requerimientos a nivel de apareamiento en el extremo del cebador para llevar a cabo un evento de síntesis, lo que puede suponer una característica muy beneficiosa a la hora de participar en la ruta *NHEJ*, dada la escasa o nula complementariedad de secuencia que suele existir en los extremos de una rotura de doble cadena.

La incubación de extractos celulares derivados de la línea celular HeLa con anticuerpos anti-Pol λ provoca una disminución en la capacidad de relleno de *gap* y de reparación por *NHEJ* (Lee y cols., 2004). Además, dicha inhibición se anula con la adición de Pol λ purificada, lo que apoya el papel de Pol λ en la ruta *NHEJ*.

Asimismo, ha sido demostrado que la unión de Pol λ y Pol μ a los componentes de la ruta *NHEJ* se produce a través del dominio BRCT presente en el extremo N-terminal de ambas ADN polimerasas (Mahajan y cols., 2002; Fan y Wu, 2004; Ma y cols., 2004; Nick-McElhinny y cols., 2005). Por el contrario, Pol β no interacciona con los citados componentes (Mahajan y cols., 2002), en concordancia con la ausencia de dominio BRCT.

La reciente caracterización de los dominios BRCT como dominios de unión a péptidos fosforilados (Manke y cols., 2003; Yu y cols., 2003; Rodríguez y cols., 2003) abre la posibilidad de que el acceso y la acción de las ADN polimerasas implicadas en *NHEJ* se regule a través de este nuevo mecanismo.

En principio, las proteínas Ku, ADN-PK, XRCC4 y ADN ligasa IV serían suficientes para reparar una rotura de doble cadena cuyos extremos fuesen completamente compatibles o romos (Figura 10.1, parte A). Sin embargo, en los extremos de una rotura a menudo existirán estructuras o modificaciones que impidan la ligación inmediata. Estos elementos, aun siendo eliminados por una actividad nucleasa, dejarán fragmentos de cadena sencilla protuberantes y no complementarios en los extremos, por lo que se hacen imprescindibles eventos previos de síntesis de ADN para poder llevar a cabo la ligación. Además, el hecho de que la secuencia de los extremos protuberantes de cadena sencilla se suela conservar tras la reparación, implica que una ADN polimerasa rellene los *gaps* generados durante la reunión, y no que una nucleasa elimine la porción protuberante para permitir la ligación. Este dato parece indicar una tendencia encaminada a preservar en la medida de lo posible la información genética codificada en el lugar donde se ha producido la rotura.

Existen dos tipos de extremos con fragmentos de cadena sencilla. Según en que hebra de ADN se encuentre la porción de cadena sencilla, encontramos extremos 5' o 3' protuberantes. Este hecho posee vital importancia a la hora de llevar a cabo la reparación por *NHEJ*, como se explica a continuación.

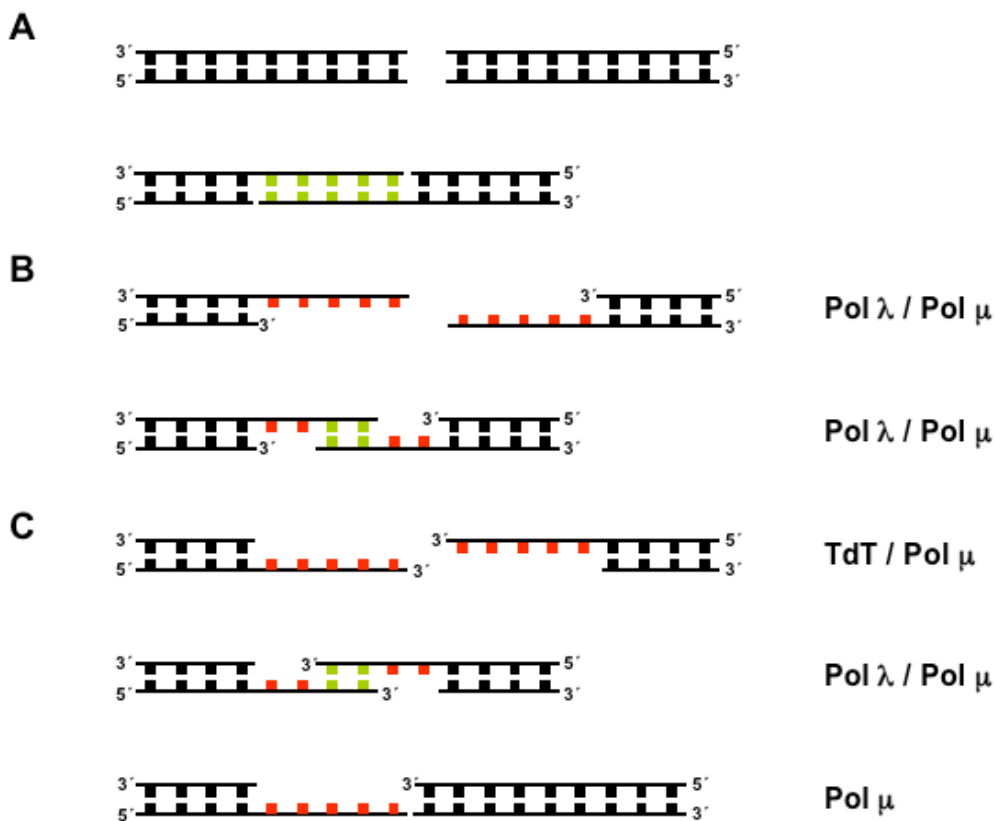


Figura 10.1: Tipos de extremos posibles generados a partir de una rotura de doble cadena en el ADN. A. Extremos romos o perfectamente compatibles. **B.** Extremos 5' protuberantes. **C.** Extremos 3' protuberantes. En la parte derecha se señala qué ADN polimerasas podrían intervenir en el proceso de reparación por *NHEJ* de cada extremo. En verde se señalan las secuencias de ADN compatibles y en rojo las incompatibles.

Los extremos 5' protuberantes pueden ser reparados de dos formas diferentes (Figura 10.1, parte B). Si no existe complementariedad de secuencia alguna, tanto Pol λ como Pol μ podrían convertir los extremos 5' protuberantes en extremos romos, gracias a la presencia de un

grupo 3'OH recesivo y una hebra molde que dirija la síntesis. Tras este paso, se produciría la ligación de ambos extremos romos. Si existe complementariedad entre los fragmentos de cadena sencilla se producirá la reunión de los extremos y se rellenarán los *gaps* generados durante el proceso. Este hecho no sería estrictamente necesario para la reparación, aunque de producirse probablemente mejore la eficiencia del proceso.

En el caso de los extremos 3' protuberantes, el grado de complementariedad entre extremos determinará la solución a adoptar para su reparación (Figura 10.1, parte C). Si no existe complementariedad de ningún tipo, Pol μ y TdT podrán añadir nucleótidos de manera aleatoria a los residuos 3'OH protuberantes hasta lograr cierta complementariedad entre los extremos que permita estabilizar la reunión. Una vez establecida la complementariedad mínima de secuencia, sea por la acción de la actividad transferasa terminal o porque los extremos originales eran parcialmente complementarios, Pol λ y Pol μ rellenarán los *gaps* generados para a continuación proceder con el paso de ligación.

Por último, existe la posibilidad de que la reunión tenga que producirse entre un extremo 3' protuberante y un extremo romo. En tal caso, parece ser que Pol μ podría estabilizar la reunión y polimerizar desde el extremo 3' romo teniendo como molde la hebra 3' protuberante del otro extremo de la rotura sin necesidad de que exista ningún apareamiento entre los extremos (Figura 10.1, parte C). Esta propiedad podría residir en un pequeño dominio denominado *loop1*, imprescindible para la actividad transferasa terminal de Pol μ (Juárez y cols., 2006), que podría adoptar diferentes conformaciones y actuar como agente estabilizador de conformaciones no mediadas por complementariedad de secuencia (Nick-McElhinny y cols., 2005).

El dominio *loop1* de Pol λ es más corto que el presente en Pol μ y TdT, lo que concuerda con la ausencia de actividad transferasa terminal (Juárez, 2006), y por lo que Pol λ en principio no parece un candidato claro para actuar sobre este tipo de sustratos.

Una vez establecido cierto grado de complementariedad de secuencia entre los extremos, el tándem formado por Pol λ y Pol μ será capaz de rellenar los *gaps* generados, aunque dadas sus diferentes propiedades enzimáticas, la eficiencia y fidelidad de la vía dependerá en gran medida de qué enzima acceda al extremo y, si ambas acceden, del orden en que lo hagan, como ya se ejemplificó ampliamente en la parte final del capítulo 8.

Otro factor determinante del modo en que Pol λ y Pol μ participarán en la ruta *NHEJ* será la presencia de grupos fosfato en 5' de los *gaps* generados durante la reunión de extremos. La presencia de grupo fosfato posee vital importancia en el modo en que Pol λ se une al ADN (capítulo 6), permitiendo incluso que se una establemente a intermedios de la ruta (extremos 3' protuberantes) en ausencia de proteínas accesorias. Asimismo, la presencia de grupos fosfato favorece la actividad de relleno de *gap* de Pol λ (capítulo 7), por lo que en función de la presencia o ausencia de grupos fosfato tendrá preferencia de actuación una u otra ADN polimerasa.

La relevancia de la presencia de grupos fosfato para las ADN polimerasas implicadas en *NHEJ* viene avalada por la conservación de la unión específica de dichos grupos, presente incluso en primasas implicadas en *NHEJ* de organismos procariotas como *Mycobacterium tuberculosis* (Pitcher y cols., 2006).

Por tanto, si el fin último de la ruta *NHEJ* es reparar una rotura de doble cadena con la menor pérdida posible de información genética y el menor número de cambios en dicha información, han de existir mecanismos muy finos que regulen la participación de ambas ADN polimerasas en dicha ruta. Tales mecanismos pueden derivar de la compartimentalización subcelular de cada proteína, o de modificaciones postraduccionales que regulen su actividad o su interacción con otros factores de la ruta que regulen el acceso a la rotura.

En este sentido, las demostradas modificaciones postraduccionales en Pol λ (acetilación, capítulo 5; fosforilación, Frouin y cols., 2005) y la metilación recientemente descubierta en Pol β (El-Andaloussi y cols., 2006), que también podría afectar a Pol λ , abren un abanico ingente de posibles formas de regular la actividad de Pol λ , sea a través de efectos sobre sus propiedades enzimáticas, o a través de la regulación de su interacción con otras proteínas. Dado los paralelismos existentes entre los miembros de la Familia X, sería muy interesante evaluar si Pol μ es susceptible de ser modificada mediante estos mecanismos, y si es así, el efecto que tendrían en su actividad. De esta forma sería más fácil entender de que manera la célula promueve la integridad de la secuencia durante la reparación de una rotura por *NHEJ*.

Asimismo, se ha observado que la presencia de la ADN ligasa IV es imprescindible para que las ADN polimerasas implicadas en *NHEJ* ejerzan su actividad de forma idónea (Mahajan y cols., 2002; Lee y cols., 2003). Así, la presencia de la ADN ligasa IV en cada extremo de la rotura posibilita que la ligación se produzca en cuanto exista la complementariedad de secuencia mínima necesaria, favoreciendo la eficiencia global del proceso y evitando que se cometan adiciones nucleotídicas innecesarias que aumentarían la tasa de error.

El hecho de que Pol λ posea actividad dRP-liasa (García-Díaz y cols., 2001) sugiere que quizá pueda participar en la reparación de extremos que posean residuos desoxirribosa-fosfato como consecuencia colateral del agente que generó la rotura de doble cadena, aumentando aún más la versatilidad del mecanismo de reparación.

Por otro lado, la capacidad de extensión de desapareamientos de Pol λ (Picher y cols., 2006) también es una facultad muy beneficiosa a la hora de reparar una rotura de doble cadena como se ejemplificó en el capítulo 8 de esta Tesis.

Asimismo, la capacidad de inserción frente a bases modificadas y de extensión desde pares cuya base molde se encuentra modificada también es una propiedad útil en el proceso de *NHEJ*, ya que es factible que el agente que provoque la rotura también cause modificaciones químicas en las bases próximas a la rotura. Además, el carácter no mutagénico de Pol λ en estos procesos (capítulo 9), favorecería que la ruta *NHEJ* cometiese el menor número de errores posibles durante la reparación.

Recientemente ha sido descrita una nueva proteína denominada XLF-Cernunnos implicada en *NHEJ* (Ahnesorg y cols., 2006; Buck y cols., 2006). Esta proteína se encuentra mutada en pacientes con síndromes hereditarios poco comunes caracterizados por una inmunodeficiencia severa, retraso mental e hipersensibilidad a agentes que causan roturas de doble cadena en el ADN. XLF-Cernunnos posee una estructura similar a XRCC4, por lo que se ha propuesto que su función consista en ejercer de puente entre los componentes de la ruta o que, gracias a su posible multimerización con XRCC4, regule la estabilidad y/o actividad de la ADN ligasa IV. Sería interesante evaluar la influencia de la presencia de XLF-Cernunnos en la reacción *in vitro* de *NHEJ* llevada a cabo por Pol λ y Pol μ , ya que podría influir en la acción de una o ambas proteínas.

10.3 NHEJ versus recombinación V(D)J

La reparación *NHEJ* y la recombinación V(D)J son mecanismos de reparación de roturas de doble cadena que comparten la misma maquinaria proteica, sin embargo, la finalidad de ambos procesos es diferente. En la reparación *NHEJ* se han de reparar las roturas de la forma más fiel posible, tratando de preservar la secuencia de ADN original y, por ende, la información genética asociada. Por el contrario, en la recombinación V(D)J se busca incrementar la diversidad de los receptores, por lo que es conveniente que la reparación de la rotura lleve asociada eventos de síntesis de ADN que busquen modificar lo más posible la secuencia original. Estas diferencias se consiguen, al menos en parte, gracias al empleo de diferentes ADN polimerasas. En la recombinación V(D)J tiene un papel crucial TdT, que inserta nucleótidos de forma aleatoria de forma no dirigida por una cadena molde (adiciones “N”), lo que aporta una importante fuente de variabilidad y diversidad. Sin embargo, la acción de TdT por sí sola es insuficiente para completar el proceso, siendo imprescindible la acción de ADN polimerasas dependientes de molde. Por el contrario, en la reparación *NHEJ* participan fundamentalmente ADN polimerasas dependientes de molde, lo que promueve la conservación de la secuencia de ADN original y la fidelidad. Tales ADN polimerasas han de ser capaces de polimerizar desde extremos parcialmente complementarios o no complementarios (Figura 10.1, partes B y C).

El patrón de expresión de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas implicados en reparación de roturas de doble cadena también podría determinar en gran parte en que proceso participan. TdT se expresa únicamente en las células de los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea) donde el proceso de recombinación V(D)J se encuentra activo, sin embargo, Pol λ (García-Díaz y cols., 2000) y Pol μ (Domínguez y cols., 2000) se expresan de manera ubicua, lo que favorece su papel en un mecanismo general de reparación como la ruta *NHEJ*.

Sin embargo, ha sido demostrado recientemente que Pol μ y Pol λ también poseen un papel relevante en el proceso de recombinación V(D)J. Los ratones deficientes en Pol μ muestran deleciones entre las regiones codificantes correspondientes a los segmentos V y J de la cadena ligera κ de las inmunoglobulinas (Bertocci y cols., 2003). Por otro lado, los ratones deficientes en Pol λ poseen deleciones entre los segmentos V, D y J, de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Bertocci y cols., 2006). Además, el estudio de los ratones deficientes en ambas ADN polimerasas reveló un patrón de recombinación similar a la suma de los patrones observados en los ratones carentes en cada una de las ADN polimerasas, lo que apoya la hipótesis de que ambas proteínas poseen una función concreta, en contra de la idea de redundancia o expresión compensatoria de ambas ADN polimerasas, al menos durante el proceso de recombinación V(D)J (Bertocci y cols., 2006). Este hecho avala la idea de que el acceso de cada ADN polimerasa se encuentra altamente regulado, ya que si no fuese de esta manera, ambas ADN polimerasas no verían restringido su papel a la recombinación de las cadenas ligeras (Pol μ) y pesada (Pol λ) respectivamente. En este sentido, el patrón de expresión parece restringir en gran medida el papel de TdT en la reparación de roturas de doble cadena. Sin embargo, la ubicuidad de Pol μ y Pol λ hace necesaria la existencia de otros mecanismos que regulen su actuación, tanto a nivel de recombinación V(D)J como de *NHEJ*.

10.4 Evolución de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas

Los miembros de esta familia están presentes en gran cantidad de organismos desde virus a eucariotas. El alto grado de conservación estructural a nivel global y a nivel de secuencia aminoacídica entre las ADN 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 ADN polimerasas en los procesos de reparación del ADN.

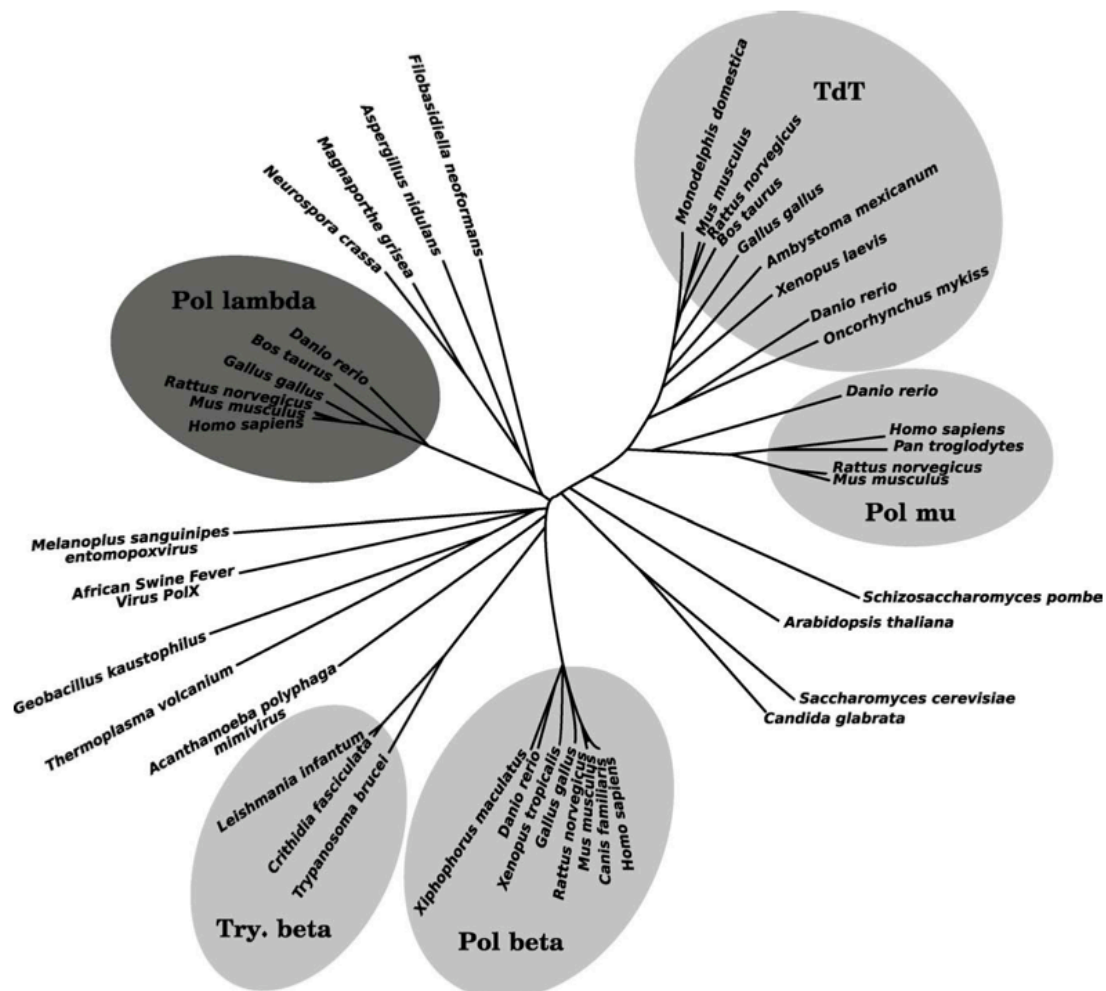


Figura 10.2: Relación evolutiva de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas. Árbol filogenético realizado empleando un segmento conservado perteneciente al dominio catalítico. Las diferentes ADN polimerasas se agrupan en subfamilias: Pol β , Pol λ , Pol μ , TdT y Pol β de Tripanosomas. Figura tomada de García-Díaz y cols., 2005b.

La figura 10.2 muestra las relaciones filogenéticas entre los miembros conocidos de la Familia X de ADN 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

ADN polimerasa lambda

identificar dentro de la Familia X (Pol β , Pol β Try., Pol λ , Pol μ y TdT) han evolucionado a partir de un ancestro común, quizá para adaptarse a los diferentes requerimientos funcionales. La evolución podría ir encaminada a la especialización de los miembros de la Familia X con el fin de aumentar la eficiencia de los procesos de síntesis de ADN 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 β (Figura 10.3), cuya mínima versión se encuentra en 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 y/o de unión a ADN que este dominio ejerce en los miembros de la Familia X de otros organismos. 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).

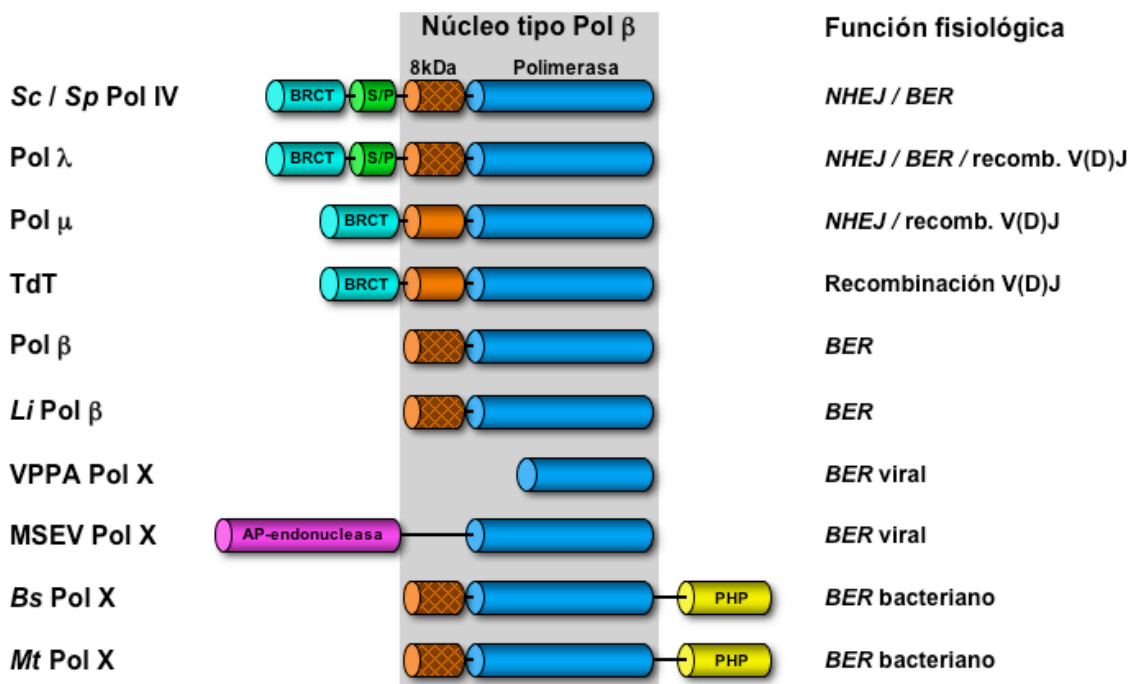


Figura 10.3: Organización modular de los miembros de la Familia X de ADN polimerasas. Representación esquemática de los dominios presentes en miembros de la familia desde virus a eucariotas superiores, así como la función propuesta para cada uno de dichos miembros. Los dominios de 8 kDa carentes de actividad 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 la adquisición de dominios adicionales con diferentes propiedades reguladoras y/o actividades enzimáticas.

Por su parte, Pol X de MSEV posee asociada en el mismo polipéptido una AP-endonucleasa (Figura 10.3), 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 independiente de su núcleo conservado tipo Pol β a un dominio fosfodiesterasa (PHP, Figura 10.3), con el fin de poseer en un mismo polipéptido las actividades ADN 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 (Figura 10.3). Sin embargo, existen grandes diferencias en cuanto a los dominios accesorios que presentan y que guardan una relación muy estrecha con su función fisiológica.

En levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*) existe un único miembro de la Familia X (Pol IV). Pol IV posee en su extremo N-terminal dos dominios accesorios, un dominio de regulación Ser/Pro (S/P) y un dominio de interacción BRCT (Figura 10.3). Además, poseen la actividad dRP-liasa asociada a su dominio de 8 kDa (Bebenek y cols., 2005; González-Barrera y cols., 2005), lo que sugiere un papel de Pol IV en procesos de reparación por *BER*.

La presencia de dominios de interacción BRCT tanto en Pol IV como en Pol λ , Pol μ 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 ADN polimerasa en los eventos de síntesis de ADN producidos durante la reparación de una rotura de doble cadena. De igual modo, en eucariotas superiores el dominio BRCT de Pol λ , Pol μ 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 ADN polimerasas tengan gran importancia a la hora de regular el acceso de cada ADN polimerasa a un determinado sustrato o proteína de la ruta.

Por último, la versión eucariótica de Pol β 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 única conservación del dominio polimerasa y del dominio de 8 kDa (Figura 10.3), donde reside la actividad dRP-liasa, resulta idónea para la participación en la ruta *BER*.

La similitud entre Pol λ y Pol IV, que muestran los mismos dominios adicionales (Figura 10.3), junto con la extraordinaria conservación evolutiva de Pol λ , presente en diversos eucariotas superiores pero también presente en plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Glicinia maxima*, *Oryza sativa*), parece indicar que Pol λ 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 λ , ya que el ancestro común del que deriva habría de llevar a cabo diversos y numerosos procesos de síntesis de ADN. En este sentido, tiene especial relevancia la presencia del dominio S/P, que podría regular la participación de Pol λ 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 ADN polimerasas se han especializado en diferentes procesos de síntesis de ADN asociados a reparación. Tales procesos son básicamente

ADN polimerasa lambda

tres: la reparación por escisión de base (*BER*), llevada a cabo fundamentalmente por Pol β , aunque también Pol λ 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 λ , como Pol μ y TdT; y la recombinación V(D)J, en la que participan Pol λ , Pol μ 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. Los miembros de esta familia han evolucionado para llevar a cabo tareas concretas dentro de procesos de síntesis en los que participan otros miembros de la familia, alcanzando de esta forma un alto grado de especialización que ha tenido como consecuencia un alto grado de eficiencia de los procesos en los que toman parte.

11

Conclusiones

1. Utilizando extractos celulares totales, derivados de diferentes tejidos y fibroblastos embrionarios en cultivo, obtenidos de un modelo murino deficiente en Pol λ , apoyamos un papel de esta ADN polimerasa en la ruta de reparación por escisión de base en cerebro y durante el desarrollo post-natal del testículo. Asimismo, la sobre-expresión de Pol λ en fibroblastos produjo un aumento en la capacidad global de reparación de los extractos celulares totales, lo que sugiere un papel de Pol λ en esta ruta de reparación.
2. Pol λ es acetilada por p300 *in vitro*, pero sin provocar la inhibición específica de su actividad dRP-liasa, al contrario de lo que sucede con Pol β . La identificación de los residuos acetilados en Pol λ y Pol β justifica el fenotipo observado y otorga un papel regulador a la zona N-terminal de Pol λ . Así, la acetilación podría actuar como mecanismo regulador de la acción de ambas ADN polimerasas durante la reparación por escisión de base.
3. Pol λ se une establemente a moléculas de ADN que simulan intermedios replicativos, así como a moléculas de ADN que simulan las situaciones generadas durante diferentes procesos de reparación, como la reparación por escisión de base y la reunión de extremos no homólogos. Esto posibilita la participación de Pol λ en procesos de síntesis asociados a la replicación del genoma y en diferentes procesos de reparación de ADN.
4. La presencia de grupos fosfato en los extremos 5' de moléculas de ADN relacionadas con diversos procesos de reparación tiene una importancia crucial en la capacidad de unión estable al ADN y en la eficiencia catalítica de polimerización de Pol λ .
5. El estudio de la capacidad de relleno de *gap* de Pol λ y Pol μ en función de los sustratos nucleotídicos y de la situación del nucleótido situado en el extremo 3' del cebador ha evidenciado la necesidad de una acción concertada de ambas ADN polimerasas durante la ruta *NHEJ* para producir una reparación eficiente y con el menor número de mutaciones posible.
6. Pol λ extiende de manera directa nucleótidos desapareados situados en el extremo 3' del cebador, lo que podría resultar de vital importancia a la hora de participar en la reparación por *NHEJ*. Además, dicha eficiencia aumenta si el nucleótido del extremo del cebador es un ribonucleótido, lo que podría tener importantes implicaciones en la ruta *NHEJ*, dada la eficiente capacidad de inserción de ribonucleótidos de Pol μ .
7. La resolución de la estructura cristalina de Pol λ formando un complejo con un ADN tipo *gap* con un desapareamiento en el extremo del cebador parece indicar que, al menos para ciertos desapareamientos, Pol λ no es capaz de discriminar entre un par apareado y uno desapareado durante el paso de unión del ADN, lo que podría ser una de las causas de su alta capacidad de extensión de desapareamientos.

ADN polimerasa lambda

8. Pol λ es capaz de utilizar como molde la base 8oxoG, una de las lesiones más frecuentes en la célula, mostrando una inserción eficiente pero mutagénica. Por otro lado, Pol λ 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, 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.

12

Bibliografía

1. Abbotts, J., SenGupta, D.N., Zmudzka, B., Widen, S.G., Notario, V. and Wilson, S.H. (1988) Expression of human DNA polymerase beta in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry*, **27**, 901-909.
2. Ahn, J., Werneburg, B.G. and 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**, 1100-1107.
3. Ahn, J., Kraynov, V.S., Zhong, X., Werneburg, B.G. and Tsai, M.D. (1998) DNA polymerase beta: effects of gapped DNA substrates on dNTP specificity, fidelity, processivity and conformational changes. *Biochem J*, **331** (Pt 1), 79-87.
4. Ahnesorg, P., Smith, P. and Jackson, S.P. (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, **124**, 301-313.
5. Aoufouchi, S., Flatter, E., Dahan, A., Faili, A., Bertocci, B., Storck, S., Delbos, F., Cocca, L., Gupta, N., Weill, J.C. *et al.* (2000) Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3684-3693.
6. Beard, W.A. and Wilson, S.H. (1998) Structural insights into DNA polymerase beta fidelity: hold tight if you want it right. *Chem Biol*, **5**, R7-13.
7. Beard, W.A. and Wilson, S.H. (2000) Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase beta. *Mutat Res*, **460**, 231-244.
8. Beard, W.A. and Wilson, S.H. (2003) Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure*, **11**, 489-496.
9. Beard, W.A., Shock, D.D. and Wilson, S.H. (2004) Influence of DNA structure on DNA polymerase beta active site function: extension of mutagenic DNA intermediates. *J Biol Chem*, **279**, 31921-31929.
10. Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E.G., McDonald, J.P., Prasad, R., Wilson, S.H., Woodgate, R. and Kunkel, T.A. (2001) 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. *Science*, **291**, 2156-2159.
11. Bebenek, K., García-Díaz, M., Blanco, L. and Kunkel, T.A. (2003) The frameshift infidelity of human DNA polymerase lambda. Implications for function. *J Biol Chem*, **278**, 34685-34690.
12. Bebenek, K. and Kunkel, T.A. (2004) Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*, **69**, 137-165.
13. Bebenek, K., García-Díaz, M., Patishall, S.R. and Kunkel, T.A. (2005) Biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase IV. *J Biol Chem*, **280**, 20051-20058.
14. Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*, **272**, 19633-19636.
15. Bennett, R.A., Wilson, D.M., 3rd, Wong, D. and 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**, 7166-7169.
16. Bertocci, B., De Smet, A., Flatter, E., Dahan, A., Bories, J.C., Landreau, C., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. (2002) Cutting edge: DNA polymerases mu and lambda are dispensable for Ig gene hypermutation. *J Immunol*, **168**, 3702-3706.

ADN polimerasa lambda

17. Bertocci, B., De Smet, A., Berek, C., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. (2003) Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity*, **19**, 203-211.
18. Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J.C. and Reynaud, C.A. (2006) Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity*, **25**, 31-41.
19. Biade, S., Sobol, R.W., Wilson, S.H. and Matsumoto, Y. (1998) Impairment of proliferating cell nuclear antigen-dependent apurinic/apyrimidinic site repair on linear DNA. *J Biol Chem*, **273**, 898-902.
20. Bjursell, G. and Skoog, L. (1980) Control of nucleotide pools in mammalian cells. *Antibiotics and chemotherapy*, **28**, 78-85.
21. Blanca, G., Villani, G., Shevelev, I., Ramadan, K., Spadari, S., Hubscher, U. and Maga, G. (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**, 11605-11615.
22. Blanco, M.G., Boán, F. and Gómez-Márquez, J. (2004) A paradox in the in vitro end-joining assays. *J Biol Chem*, **279**, 26797-26801.
23. Boán, F., Rodríguez, J.M. and Gómez-Márquez, J. (1998) A non-hypervariable human minisatellite strongly stimulates in vitro intramolecular homologous recombination. *J Mol Biol*, **278**, 499-505.
24. Bollum, F.J. (1960) Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem*, **235**, PC18-20.
25. Boorstein, R.J., Cummings, A., Jr., Marenstein, D.R., Chan, M.K., Ma, Y., Neubert, T.A., Brown, S.M. and Teebor, G.W. (2001) Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *J Biol Chem*, **276**, 41991-41997.
26. Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F. and Koonin, E.V. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J*, **11**, 68-76.
27. Boule, J.B., Rougeon, F. and Papanicolaou, C. (2001) Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *J Biol Chem*, **276**, 31388-31393.
28. Bowater, R. and Doherty, A.J. (2006) Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *Plos Genetics*, **2**, 93-9.
29. Braithwaite, E.K., Prasad, R., Shock, D.D., Hou, E.W., Beard, W.A. and Wilson, S.H. (2005a) DNA polymerase lambda mediates a back-up base excision repair activity in extracts of mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*, **280**, 18469-18475.
30. Braithwaite, E.K., Kedar, P.S., Lan, L., Polosina, Y.Y., Asagoshi, K., Poltoratsky, V.P., Horton, J.K., Miller, H., Teebor, G.W., Yasui, A. *et al.* (2005b) DNA polymerase lambda protects mouse fibroblasts against oxidative DNA damage and is recruited to sites of DNA damage/repair. *J Biol Chem*, **280**, 31641-31647.
31. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W.,

- Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S. *et al.* (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 905-921.
32. Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M.C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J.L., Hufnagel, M., le Deist, F. *et al.* (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, **124**, 287-299.
33. Burgers, P.M., Koonin, E.V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K.C., Christman, M.F., Copeland, W.C., Friedberg, E.C., Hanaoka, F., Hinkle, D.C. *et al.* (2001) Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem*, **276**, 43487-43490.
34. Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. and 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**, 4387-4394.
35. Callebaut, I. and Mornon, J.P. (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett*, **400**, 25-30.
36. Canitrot, Y., Hoffmann, J.S., Calsou, P., Hayakawa, H., Salles, B. and 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.
37. Carrodegua, J.A., Theis, K., Bogenhagen, D.F. and 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**, 43-54.
38. Chagovetz, A.M., Sweasy, J.B. and Preston, B.D. (1997) Increased activity and fidelity of DNA polymerase beta on single-nucleotide gapped DNA. *J Biol Chem*, **272**, 27501-27504.
39. Chappell, C., Hanakahi, L.A., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M. and West, S.C. (2002) Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *Embo J*, **21**, 2827-2832.
40. Chen, L., Trujillo, K., Sung, P. and 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**, 26196-26205.
41. Covo, S., Blanco, L. and Livneh, Z. (2004) Lesion bypass by human DNA polymerase mu reveals a template-dependent, sequence-independent nucleotidyl transferase activity. *J Biol Chem*, **279**, 859-865.
42. Davies, J.F., 2nd, Almassy, R.J., Hostomska, Z., Ferre, R.A. and Hostomsky, Z. (1994) 2.3 A crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase beta. *Cell*, **76**, 1123-1133.
43. DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D. and Chu, G. (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J*, **21**, 3192-3200.
44. Delarue, M., Boule, J.B., Lescar, J., Expert-Bezancon, N., Jourdan, N., Sukumar, N., Rougeon, F. and Papanicolaou, C. (2002) Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: murine terminal deoxynucleotidyltransferase. *Embo J*, **21**, 427-439.
45. DeRose, E.F., Kirby, T.W., Mueller, G.A., Bebenek, K., García-Díaz, M., Blanco, L., Kunkel, T.A. and London, R.E. (2003) Solution structure of the lyase domain of human DNA

ADN polimerasa lambda

polymerase lambda. *Biochemistry*, **42**, 9564-9574.

46. Desiderio, S.V., Yancopoulos, G.D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M.A., Landau, N., Alt, F.W. and Baltimore, D. (1984) Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature*, **311**, 752-755.

47. Deterding, L.J., Prasad, R., Mullen, G.P., Wilson, S.H. and 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**, 10463-10471.

48. Dianov, G.L., Prasad, R., Wilson, S.H. and Bohr, V.A. (1999) Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem*, **274**, 13741-13743.

49. Díaz, M., Verkoczy, L.K., Flajnik, M.F. and 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**, 327-335.

50. Díaz, M. and Casali, P. (2002) Somatic immunoglobulin hypermutation. *Curr Opin Immunol*, **14**, 235-240.

51. Dimitriadis, E.K., Prasad, R., Vaske, M.K., Chen, L., Tomkinson, A.E., Lewis, M.S. and Wilson, S.H. (1998) Thermodynamics of human DNA ligase I trimerization and association with DNA polymerase beta. *J Biol Chem*, **273**, 20540-20550.

52. Doherty, A.J., Serpell, L.C. and 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**, 2488-2497.

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

54. Doublet, S., Sawaya, M.R. and Ellenberger, T. (1999) An open and closed case for all polymerases. *Structure*, **7**, R31-35.

55. Dvir, A., Peterson, S.R., Knuth, M.W., Lu, H. and 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**, 11920-11924.

56. Dynan, W.S. and Yoo, S. (1998) Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1551-1559.

57. Efrati, E., Tocco, G., Eritja, R., Wilson, S.H. and 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**, 2559-2569.

58. Einolf, H.J. and 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**, 3764-3771.

59. El-Andaloussi, N., Valovka, T., Toueille, M., Steinacher, R., Focke, F., Gehrig, P., Covic, M., Hassa, P.O., Schar, P., Hubscher, U. *et al.* (2006) Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol Cell*, **22**, 51-62.

60. Faili, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Gueranger, Q., Reynaud, C.A. and Weill, J.C. (2002) Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature*, **419**, 944-947.
61. Fan, W. and Wu, X. (2004) DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 1328-1333.
62. Fiala, K.A., Duym, W.W., Zhang, J. and Suo, Z. (2006) Up-regulation of the fidelity of human DNA polymerase lambda by its non-enzymatic proline-rich domain. *J Biol Chem*, **281**, 19038-19044.
63. Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H. and Dogliotti, E. (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, **37**, 3575-3580.
64. Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V. and Dogliotti, E. (2003) The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*, **85**, 1053-1071.
65. Fortune, J.M., Pavlov, Y.I., Welch, C.M., Johansson, E., Burgers, P.M. and 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**, 29980-29987.
66. Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L.S., Lane, D.P., Abbondandolo, A. and Dogliotti, E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*, **271**, 9573-9578.
67. Frouin, I., Toueille, M., Ferrari, E., Shevelev, I. and Hubscher, U. (2005) Phosphorylation of human DNA polymerase lambda by the cyclin-dependent kinase Cdk2/cyclin A complex is modulated by its association with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5354-5361.
68. Gaffney, B.L. and Jones, R.A. (1989) Thermodynamic comparison of the base pairs formed by the carcinogenic lesion O6-methylguanine with reference both to Watson-Crick pairs and to mismatched pairs. *Biochemistry*, **28**, 5881-5889.
69. García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernández, L.A., de Lera, L.T., Saniger, M.L., Ruiz, J.F., Parraga, M., García-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J. *et al.* (2000) DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol*, **301**, 851-867.
70. García-Díaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A. and Blanco, L. (2001) Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair. *J Biol Chem*, **276**, 34659-34663.
71. García-Díaz, M., Bebenek, K., Sabariego, R., Domínguez, O., Rodríguez, J., Kirchhoff, T., García-Palomero, E., Picher, A.J., Juárez, R., Ruiz, J.F. *et al.* (2002) DNA polymerase lambda, a novel DNA repair enzyme in human cells. *J Biol Chem*, **277**, 13184-13191.
72. García-Díaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Blanco, L., Kunkel, T.A. and Pedersen, L.C. (2004) A structural solution for the DNA polymerase lambda-dependent repair of DNA gaps with minimal homology. *Mol Cell*, **13**, 561-572.
73. García-Díaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Kunkel, T.A. and Pedersen, L.C. (2005a) A

ADN polimerasa lambda

closed conformation for the Pol lambda catalytic cycle. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 97-98.

74. García-Díaz, M., Bebenek, K., Gao, G., Pedersen, L.C., London, R.E. and Kunkel, T.A. (2005b) Structure-function studies of DNA polymerase lambda. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1358-1367.

75. García-Díaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Pedersen, L.C. and Kunkel, T.A. (2006) Structural analysis of strand misalignment during DNA synthesis by a human DNA polymerase. *Cell*, **124**, 331-342.

76. García-Escudero, R., García-Díaz, M., Salas, M.L., Blanco, L. and 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**, 1403-1412.

77. García-Ortiz, M.J. (2003) Tesis doctoral: Estudio de la expresión de la ADN polimerasa λ en el ratón adulto, el desarrollo embrionario y las consecuencias fisiológicas de su deficiencia (UAM).

78. Garg, P. and Burgers, P.M. (2005) DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **40**, 115-128.

79. Gearhart, P.J. and Wood, R.D. (2001) Emerging links between hypermutation of antibody genes and DNA polymerases. *Nat Rev Immunol*, **1**, 187-192.

80. Gellert, M. (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem*, **71**, 101-132.

81. Gilfillan, S., Benoist, C. and Mathis, D. (1995) Mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase: adult mice with a fetal antigen receptor repertoire. *Immunol Rev*, **148**, 201-219.

82. González-Barrera, S., Sánchez, A., Ruiz, J.F., Juárez, R., Picher, A.J., Terrados, G., Andrade, P. and Blanco, L. (2005) Characterization of SpPol4, a unique X-family DNA polymerase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*, **33**, 4762-4774.

83. Goodman, R.H. and Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*, **14**, 1553-1577.

84. Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P. (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, **72**, 131-142.

85. Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M. and Lieber, M.R. (1997) Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, **388**, 492-495.

86. Graziewicz, M.A., Longley, M.J. and Copeland, W.C. (2006) DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev*, **106**, 383-405.

87. Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.

88. Hadi, S.M. and Goldthwait, D.A. (1971) Endonuclease II of *Escherichia coli*. Degradation of partially depurinated deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **10**, 4986-4993.

89. Haracska, L., Prakash, S. and Prakash, L. (2000a) Replication past O(6)-methylguanine by yeast and human DNA polymerase eta. *Mol Cell Biol*, **20**, 8001-8007.

90. Haracska, L., Yu, S.L., Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S. (2000b) Efficient and accurate replication in the presence of 7,8-dihydro-8-oxoguanine by DNA polymerase ϵ . *Nat Genet*, **25**, 458-461.
91. Haracska, L., Johnson, R.E., Unk, I., Phillips, B.B., Hurwitz, J., Prakash, L. and Prakash, S. (2001) Targeting of human DNA polymerase ι to the replication machinery via interaction with PCNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14256-14261.
92. Haracska, L., Prakash, L. and Prakash, S. (2002a) Role of human DNA polymerase κ as an extender in translesion synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16000-16005.
93. Haracska, L., Prakash, S. and Prakash, L. (2002b) Yeast Rev1 protein is a G template-specific DNA polymerase. *J Biol Chem*, **277**, 15546-15551.
94. Haracska, L., Prakash, S. and Prakash, L. (2003) Yeast DNA polymerase ζ is an efficient extender of primer ends opposite from 7,8-dihydro-8-Oxoguanine and O6-methylguanine. *Mol Cell Biol*, **23**, 1453-1459.
95. Hasan, S., Hassa, P.O., Imhof, R. and Hottiger, M.O. (2001a) Transcription coactivator p300 binds PCNA and may have a role in DNA repair synthesis. *Nature*, **410**, 387-391.
96. Hasan, S., Stucki, M., Hassa, P.O., Imhof, R., Gehrig, P., Hunziker, P., Hubscher, U. and Hottiger, M.O. (2001b) Regulation of human flap endonuclease-1 activity by acetylation through the transcriptional coactivator p300. *Mol Cell*, **7**, 1221-1231.
97. Hasan, S., El-Andaloussi, N., Hardeland, U., Hassa, P.O., Burki, C., Imhof, R., Schar, P. and Hottiger, M.O. (2002) Acetylation regulates the DNA end-trimming activity of DNA polymerase β . *Mol Cell*, **10**, 1213-1222.
98. Hashim, M.F., Schnetz-Boutaud, N. and Marnett, L.J. (1997) Replication of template-primers containing propanodeoxyguanosine by DNA polymerase β . Induction of base pair substitution and frameshift mutations by template slippage and deoxynucleoside triphosphate stabilization. *J Biol Chem*, **272**, 20205-20212.
99. Hefferin, M.L. and Tomkinson, A.E. (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 639-648.
100. Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C. and Ames, B.N. (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**, 288-293.
101. Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135-141.
102. Honjo, T., Kinoshita, K. and Muramatsu, M. (2002) Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol*, **20**, 165-196.
103. Honjo, T., Muramatsu, M. and Fagarasan, S. (2004) AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity*, **20**, 659-668.
104. Horton, J.K., Srivastava, D.K., Zmudzka, B.Z. and Wilson, S.H. (1995) Strategic down-regulation of DNA polymerase β by antisense RNA sensitizes mammalian cells to specific DNA damaging agents. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3810-3815.

ADN polimerasa lambda

105. Horton, J.K., Prasad, R., Hou, E. and Wilson, S.H. (2000) Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair. *J Biol Chem*, **275**, 2211-2218.
106. Huang, M.M., Arnheim, N. and Goodman, M.F. (1992) Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Res*, **20**, 4567-4573.
107. Hubscher, U., Maga, G. and Spadari, S. (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem*, **71**, 133-163.
108. Idriss, H.T., Al-Assar, O. and Wilson, S.H. (2002) DNA polymerase beta. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 321-324.
109. Intano, G.W., McMahan, C.A., Walter, R.B., McCarrey, J.R. and Walter, C.A. (2001) Mixed spermatogenic germ cell nuclear extracts exhibit high base excision repair activity. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1366-1372.
110. Jenkins, T.M., Saxena, J.K., Kumar, A., Wilson, S.H. and Ackerman, E.J. (1992) DNA polymerase beta and DNA synthesis in *Xenopus* oocytes and in a nuclear extract. *Science*, **258**, 475-478.
111. Johnson, A.A. and Johnson, K.A. (2001a) Fidelity of nucleotide incorporation by human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, **276**, 38090-38096.
112. Johnson, A.A. and Johnson, K.A. (2001b) Exonuclease proofreading by human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, **276**, 38097-38107.
113. Johnson, R.E., Kondratyck, C.M., Prakash, S. and Prakash, L. (1999a) hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science*, **285**, 263-265.
114. Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (1999b) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science*, **283**, 1001-1004.
115. Johnson, R.E., Washington, M.T., Haracska, L., Prakash, S. and Prakash, L. (2000a) Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*, **406**, 1015-1019.
116. Johnson, R.E., Washington, M.T., Prakash, S. and Prakash, L. (2000b) Fidelity of human DNA polymerase eta. *J Biol Chem*, **275**, 7447-7450.
117. Johnson, S.J. and Beese, L.S. (2004) Structures of mismatch replication errors observed in a DNA polymerase. *Cell*, **116**, 803-816.
118. Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47 (Pt 2)**, 110-119.
119. Joyce, C.M., Sun, X.C. and Grindley, N.D. (1992) Reactions at the polymerase active site that contribute to the fidelity of *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment). *J Biol Chem*, **267**, 24485-24500.
120. Joyce, C.M. and Benkovic, S.J. (2004) DNA polymerase fidelity: kinetics, structure, and checkpoints. *Biochemistry*, **43**, 14317-14324.

121. Juárez, R. (2006) Tesis doctoral: Caracterización bioquímica de la ADN polimerasa μ humana y su implicación en *NHEJ* (UAM).
122. Juárez, R., Ruiz, J.F., McElhinny, S.A., Ramsden, D. and Blanco, L. (2006) A specific loop in human DNA polymerase μ allows switching between creative and DNA-instructed synthesis. *Nucleic Acids Res*, **34**, 4572-82.
123. Karanjawala, Z.E., Murphy, N., Hinton, D.R., Hsieh, C.L. and 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**, 397-402.
124. Karimi-Busheri, F., Daly, G., Robins, P., Canas, B., Pappin, D.J., Sgouros, J., Miller, G.G., Fakhrai, H., Davis, E.M., Le Beau, M.M. *et al.* (1999) Molecular characterization of a human DNA kinase. *J Biol Chem*, **274**, 24187-24194.
125. Kato, K.I., Goncalves, J.M., Houts, G.E. and Bollum, F.J. (1967) Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal deoxynucleotidyltransferase. *J Biol Chem*, **242**, 2780-2789.
126. Kedar, P.S., Kim, S.J., Robertson, A., Hou, E., Prasad, R., Horton, J.K. and Wilson, S.H. (2002) Direct interaction between mammalian DNA polymerase beta and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem*, **277**, 31115-31123.
127. Kelman, Z. (1997) PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, **14**, 629-640.
128. Komori, T., Okada, A., Stewart, V. and Alt, F.W. (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*, **261**, 1171-1175.
129. Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A.P. and Patel, D.J. (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn).dA(anti) alignment at lesion site. *Biochemistry*, **30**, 1403-1412.
130. Krayevsky, A.A., Victorova, L.S., Arzumanov, A.A. and Jasko, M.V. (2000) Terminal deoxynucleotidyl transferase. catalysis of DNA (oligodeoxynucleotide) phosphorylation. *Pharmacol Ther*, **85**, 165-173.
131. Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D.E. and 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**, 6662-6670.
132. Kumar, A., Widen, S.G., Williams, K.R., Kedar, P., Karpel, R.L. and 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**, 2124-2131.
133. Kunkel, T.A. (1985) The mutational specificity of DNA polymerase-beta during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations. *J Biol Chem*, **260**, 5787-5796.
134. Kunkel, T.A. and Bebenek, K. (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem*, **69**, 497-529.
135. Kunkel, T.A. (2004) DNA replication fidelity. *J Biol Chem*, **279**, 16895-16898.
136. Lawrence, C.W. (2004) Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *Adv*

ADN polimerasa lambda

Protein Chem, **69**, 167-203.

137. Lee, G.S., Brandt, V.L. and Roth, D.B. (2004) B cell development leads off with a base hit: dU:dG mismatches in class switching and hypermutation. *Mol Cell*, **16**, 505-508.

138. Lee, J.W., Yannone, S.M., Chen, D.J. and Povirk, L.F. (2003) Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res*, **63**, 22-24.

139. Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., García-Díaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z. and Povirk, L.F. (2004) Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem*, **279**, 805-811.

140. Leonard, G.A., Thomson, J., Watson, W.P. and Brown, T. (1990) High-resolution structure of a mutagenic lesion in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9573-9576.

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

142. Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K. (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 712-720.

143. Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K. (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 817-826.

144. Lim, S.E., Longley, M.J. and 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**, 38197-38203.

145. Lipscomb, L.A., Peek, M.E., Morningstar, M.L., Verghis, S.M., Miller, E.M., Rich, A., Essigmann, J.M. and Williams, L.D. (1995) X-ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 719-723.

146. Longley, M.J., Prasad, R., Srivastava, D.K., Wilson, S.H. and Copeland, W.C. (1998) Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12244-12248.

147. Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., 3rd, de Bakker, P.I., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S. and Richardson, D.C. (2003) Structure validation by C α geometry: phi,psi and C β deviation. *Proteins*, **50**, 437-450.

148. Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. and 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**, 781-794.

149. Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M.F., Shimazaki, N., Koiwai, O., Hsieh, C.L., Schwarz, K. and Lieber, M.R. (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell*, **16**, 701-713.

150. Ma, Y., Lu, H., Schwarz, K. and 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**, 1193-1200.

151. Maciejewski, M.W., Shin, R., Pan, B., Marintchev, A., Denninger, A., Mullen, M.A., Chen, K., Gryk, M.R. and Mullen, G.P. (2001) Solution structure of a viral DNA repair polymerase. *Nat Struct Biol*, **8**, 936-941.
152. MacLennan, I.C. (1994) Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, **12**, 117-139.
153. Maga, G., Villani, G., Ramadan, K., Shevelev, I., Tanguy Le Gac, N., Blanco, L., Blanca, G., Spadari, S. and Hubscher, U. (2002) Human DNA polymerase lambda functionally and physically interacts with proliferating cell nuclear antigen in normal and translesion DNA synthesis. *J Biol Chem*, **277**, 48434-48440.
154. Maga, G., Blanca, G., Shevelev, I., Frouin, I., Ramadan, K., Spadari, S., Villani, G. and Hubscher, U. (2004) The human DNA polymerase lambda interacts with PCNA through a domain important for DNA primer binding and the interaction is inhibited by p21/WAF1/CIP1. *Faseb J*, **18**, 1743-1745.
155. Maga, G., Shevelev, I., Villani, G., Spadari, S. and Hubscher, U. (2006) Human replication protein A can suppress the intrinsic in vitro mutator phenotype of human DNA polymerase lambda. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1405-1415.
156. Mahajan, K.N., Gangi-Peterson, L., Sorscher, D.H., Wang, J., Gathy, K.N., Mahajan, N.P., Reeves, W.H. and Mitchell, B.S. (1999) Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13926-13931.
157. Mahajan, K.N., Nick McElhinny, S.A., Mitchell, B.S. and Ramsden, D.A. (2002) Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **22**, 5194-5202.
158. Majka, J. and Burgers, P.M. (2004) The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **78**, 227-260.
159. Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A. and Yaffe, M.B. (2003) BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*, **302**, 636-639.
160. Manley, J.L., Fire, A., Samuels, M. and Sharp, P.A. (1983) In vitro transcription: whole-cell extract. *Methods Enzymol*, **101**, 568-582.
161. Marini, F., Kim, N., Schuffert, A. and Wood, R.D. (2003) POLN, a nuclear PolA family DNA polymerase homologous to the DNA cross-link sensitivity protein Mus308. *J Biol Chem*, **278**, 32014-32019.
162. Masuda, K., Ouchida, R., Takeuchi, A., Saito, T., Koseki, H., Kawamura, K., Tagawa, M., Tokuhisa, T., Azuma, T. and J, O.W. (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**, 13986-13991.
163. Masuda, K., Ouchida, R., Hikida, M., Nakayama, M., Ohara, O., Kurosaki, T. and J, O.W. (2006) Absence of DNA polymerase theta results in decreased somatic hypermutation frequency and altered mutation patterns in Ig genes. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1384-1391.
164. Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K. and Hanaoka, F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature*, **399**, 700-704.
165. Matsumoto, Y., Kim, K. and 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**, 6187-6197.

166. Matsumoto, Y. and Kim, K. (1995) Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, **269**, 699-702.

167. Matsumoto, Y., Kim, K., Katz, D.S. and Feng, J.A. (1998) Catalytic center of DNA polymerase beta for excision of deoxyribose phosphate groups. *Biochemistry*, **37**, 6456-6464.

168. McAuley-Hecht, K.E., Leonard, G.A., Gibson, N.J., Thomson, J.B., Watson, W.P., Hunter, W.N. and Brown, T. (1994) Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs. *Biochemistry*, **33**, 10266-10270.

169. McCormick, P.J., Danhauser, L.L., Rustum, Y.M. and Bertram, J.S. (1983) Changes in ribo- and deoxyribonucleoside triphosphate pools within the cell cycle of a synchronized mouse fibroblast cell line. *Biochimica et biophysica acta*, **756**, 36-40.

170. Mendelman, L.V., Petruska, J. and Goodman, M.F. (1990) Base mispair extension kinetics. Comparison of DNA polymerase alpha and reverse transcriptase. *J Biol Chem*, **265**, 2338-2346.

171. Michel, B., Ehrlich, S.D. and Uzest, M. (1997) DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *Embo J*, **16**, 430-438.

172. Miller, H., Prasad, R., Wilson, S.H., Johnson, F. and Grollman, A.P. (2000) 8-oxodGTP incorporation by DNA polymerase beta is modified by active-site residue Asn279. *Biochemistry*, **39**, 1029-1033.

173. Mills, K.D., Ferguson, D.O. and Alt, F.W. (2003) The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev*, **194**, 77-95.

174. Mol, C.D., Izumi, T., Mitra, S. and Tainer, J.A. (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected]. *Nature*, **403**, 451-456.

175. Morgan, W.F., Day, J.P., Kaplan, M.I., McGhee, E.M. and Limoli, C.L. (1996) Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res*, **146**, 247-258.

176. 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**, 1122-1126.

177. Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, **102**, 553-563.

178. Nagasawa, K., Kitamura, K., Yasui, A., Nimura, Y., Ikeda, K., Hirai, M., Matsukage, A. and Nakanishi, M. (2000) Identification and characterization of human DNA polymerase beta 2, a DNA polymerase beta -related enzyme. *J Biol Chem*, **275**, 31233-31238.

179. Nealon, K., Nicholl, I.D. and Kenny, M.K. (1996) Characterization of the DNA polymerase requirement of human base excision repair. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3763-3770.

180. Nelson, J.R., Lawrence, C.W. and Hinkle, D.C. (1996a) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science*, **272**, 1646-1649.

181. Nelson, J.R., Lawrence, C.W. and Hinkle, D.C. (1996b) Deoxycytidyl transferase activity

of yeast REV1 protein. *Nature*, **382**, 729-731.

182. Neuberger, M.S., Harris, R.S., Di Noia, J. and Petersen-Mahrt, S.K. (2003) Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci*, **28**, 305-312.

183. Nick McElhinny, S.A. and Ramsden, D.A. (2003) Polymerase mu is a DNA-directed DNA/RNA polymerase. *Mol Cell Biol*, **23**, 2309-2315.

184. Nick McElhinny, S.A. and 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.

185. Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., García-Díaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A. and Ramsden, D.A. (2005) A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell*, **19**, 357-366.

186. Nowak, R., Woszczyński, M. and 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**, 51-56.

187. Ochs, K., Sobol, R.W., Wilson, S.H. and Kaina, B. (1999) Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage. *Cancer Res*, **59**, 1544-1551.

188. Oda, Y., Uesugi, S., Ikehara, M., Nishimura, S., Kawase, Y., Ishikawa, H., Inoue, H. and Ohtsuka, E. (1991) NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res*, **19**, 1407-1412.

189. Oda, N., Saxena, J.K., Jenkins, T.M., Prasad, R., Wilson, S.H. and 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**, 13816-13820.

190. Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-959.

191. Ohta, S., Shiomi, Y., Sugimoto, K., Obuse, C. and Tsurimoto, T. (2002) A proteomics approach to identify proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding proteins in human cell lysates. Identification of the human CHL12/RFCs2-5 complex as a novel PCNA-binding protein. *J Biol Chem*, **277**, 40362-40367.

192. Oliveros, M., Yanez, R.J., Salas, M.L., Salas, J., Viñuela, E. and Blanco, L. (1997) Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *J Biol Chem*, **272**, 30899-30910.

193. Olsen, A.K., Bjortuft, H., Wiger, R., Holme, J., Seeberg, E., Bjoras, M. and Brunborg, G. (2001) Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1781-1790.

194. Osheroff, W.P., Jung, H.K., Beard, W.A., Wilson, S.H. and Kunkel, T.A. (1999) The fidelity of DNA polymerase beta during distributive and processive DNA synthesis. *J Biol Chem*, **274**, 3642-3650.

195. Otwinowsky, Z. and Minor, V. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth Enzymol*, **276**, 307-326.

ADN polimerasa lambda

196. Pages, V. and Fuchs, R.P. (2002) How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene*, **21**, 8957-8966.
197. Papavasiliou, F., Casellas, R., Suh, H., Qin, X.F., Besmer, E., Pelanda, R., Nemazee, D., Rajewsky, K. and Nussenzweig, M.C. (1997) V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science*, **278**, 298-301.
198. Papavasiliou, F.N. and Schatz, D.G. (2002) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell*, **109 Suppl**, S35-44.
199. Patel, D.J., Shapiro, L., Kozlowski, S.A., Gaffney, B.L. and Jones, R.A. (1986a) Structural studies of the O6meG.T interaction in the d(C-G-T-G-A-A-T-T-C-O6meG-C-G) duplex. *Biochemistry*, **25**, 1036-1042.
200. Patel, D.J., Shapiro, L., Kozlowski, S.A., Gaffney, B.L. and Jones, R.A. (1986b) Structural studies of the O6meG.C interaction in the d(C-G-C-G-A-A-T-T-C-O6meG-C-G) duplex. *Biochemistry*, **25**, 1027-1036.
201. Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H. and Kraut, J. (1994) Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, **264**, 1891-1903.
202. Pelletier, H., Sawaya, M.R., Wolfle, W., Wilson, S.H. and Kraut, J. (1996a) Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity. *Biochemistry*, **35**, 12742-12761.
203. Pelletier, H., Sawaya, M.R., Wolfle, W., Wilson, S.H. and Kraut, J. (1996b) A structural basis for metal ion mutagenicity and nucleotide selectivity in human DNA polymerase beta. *Biochemistry*, **35**, 12762-12777.
204. Pelletier, H. and 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**, 12778-12787.
205. Perrault, R., Cheong, N., Wang, H., Wang, H. and Iliakis, G. (2001) RPA facilitates rejoining of DNA double-strand breaks in an in vitro assay utilizing genomic DNA as substrate. *Int J Radiat Biol*, **77**, 593-607.
206. Picher, A.J., García-Díaz, M., Bebenek, K., Pedersen, L.C., Kunkel, T.A. and Blanco, L. (2006) Promiscuous mismatch extension by human DNA polymerase lambda. *Nucleic Acids Res*, **34**, 3259-3266.
207. Pitcher, R.S., Brissett, N.C., Picher, A.J., Andrade, P., Juárez, R., Thompson, D., Fox, G.C., Blanco, L. and Doherty, A.J. (2006) Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *J Mol Biol*, In press.
208. Pinz, K.G. and Bogenhagen, D.F. (2000) Characterization of a catalytically slow AP lyase activity in DNA polymerase gamma and other family A DNA polymerases. *J Biol Chem*, **275**, 12509-12514.
209. Plug, A.W., Clairmont, C.A., Sapi, E., Ashley, T. and Sweasy, J.B. (1997) Evidence for a role for DNA polymerase beta in mammalian meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1327-1331.
210. Podlutzky, A.J., Dianova, II, Wilson, S.H., Bohr, V.A. and Dianov, G.L. (2001a) DNA

synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry*, **40**, 809-813.

211. Podlutzky, A.J., Dianova, II, Podust, V.N., Bohr, V.A. and Dianov, G.L. (2001b) Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *Embo J*, **20**, 1477-1482.

212. Prakash, S., Johnson, R.E. and Prakash, L. (2005) Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem*, **74**, 317-353.

213. Prasad, R., Beard, W.A. and Wilson, S.H. (1994) Studies of gapped DNA substrate binding by mammalian DNA polymerase beta. Dependence on 5'-phosphate group. *J Biol Chem*, **269**, 18096-18101.

214. Prasad, R., Singhal, R.K., Srivastava, D.K., Molina, J.T., Tomkinson, A.E. and 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**, 16000-16007.

215. Prasad, R., Beard, W.A., Strauss, P.R. and Wilson, S.H. (1998a) Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem*, **273**, 15263-15270.

216. Prasad, R., Beard, W.A., Chyan, J.Y., Maciejewski, M.W., Mullen, G.P. and 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**, 11121-11126.

217. Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J. and Wilson, S.H. (2001) DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J Biol Chem*, **276**, 32411-32414.

218. Ramadan, K., Maga, G., Shevelev, I.V., Villani, G., Blanco, L. and Hubscher, U. (2003) Human DNA polymerase lambda possesses terminal deoxyribonucleotidyl transferase activity and can elongate RNA primers: implications for novel functions. *J Mol Biol*, **328**, 63-72.

219. Rodríguez, M., Yu, X., Chen, J. and Songyang, Z. (2003) Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *J Biol Chem*, **278**, 52914-52918.

220. Rogozin, I.B., Pavlov, Y.I., Bebenek, K., Matsuda, T. and Kunkel, T.A. (2001) Somatic mutation hotspots correlate with DNA polymerase eta error spectrum. *Nat Immunol*, **2**, 530-536.

221. Roychoudhury, R. (1972) Enzymic synthesis of polynucleotides. Oligodeoxynucleotides with one 3'-terminal ribonucleotide as primers for polydeoxynucleotide synthesis. *J Biol Chem*, **247**, 3910-3917.

222. Ruiz, J.F., Domínguez, O., Lain de Lera, T., García-Díaz, M., Bernad, A. and Blanco, L. (2001) DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 99-109.

223. Ruiz, J.F., Juárez, R., García-Díaz, M., Terrados, G., Picher, A.J., González-Barrera, S., Fernández de Henestrosa, A.R. and Blanco, L. (2003) Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4441-4449.

224. Ruiz, J.F., Lucas, D., García-Palomero, E., Saez, A.I., González, M.A., Piris, M.A.,

ADN polimerasa lambda

Bernad, A. and Blanco, L. (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**, 5861-5873.

225. Rydberg, B. and Game, J. (2002) Excision of misincorporated ribonucleotides in DNA by RNase H (type 2) and FEN-1 in cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 16654-9.

226. Salas, M. (1991) Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem*, **60**, 39-71.

227. SantaLucía, J. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 1460-5.

228. Sawaya, M.R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S.H. and Kraut, J. (1994) Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism. *Science*, **264**, 1930-1935.

229. Sawaya, M.R., Prasad, R., Wilson, S.H., Kraut, J. and Pelletier, H. (1997) Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, **36**, 11205-11215.

230. Seki, M., Marini, F. and Wood, R.D. (2003) POLQ (Pol theta), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6117-6126.

231. Seki, M., Masutani, C., Yang, L.W., Schuffert, A., Iwai, S., Bahar, I. and Wood, R.D. (2004) High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q. *Embo J*, **23**, 4484-4494.

232. Semizarov, D.G., Arzumanov, A.A., Dyatkina, N.B., Meyer, A., Vichier-Guerre, S., Gosselin, G., Rayner, B., Imbach, J.L. and Krayevsky, A.A. (1997) Stereoisomers of deoxynucleoside 5'-triphosphates as substrates for template-dependent and -independent DNA polymerases. *J Biol Chem*, **272**, 9556-9560.

233. Sharief, F.S., Vojta, P.J., Ropp, P.A. and Copeland, W.C. (1999) Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. *Genomics*, **59**, 90-96.

234. Shcherbakova, P.V., Pavlov, Y.I., Chilkova, O., Rogozin, I.B., Johansson, E. and Kunkel, T.A. (2003) Unique error signature of the four-subunit yeast DNA polymerase epsilon. *J Biol Chem*, **278**, 43770-43780.

235. Shevelev, I.V. and Hubscher, U. (2002) The 3' 5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 364-376.

236. Shibusaki, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, **349**, 431-434.

237. Shimazaki, N., Yoshida, K., Kobayashi, T., Toji, S., Tamai, K. and Koiwai, O. (2002) Over-expression of human DNA polymerase lambda in E. coli and characterization of the recombinant enzyme. *Genes Cells*, **7**, 639-651.

238. Shimazaki, N., Yazaki, T., Kubota, T., Sato, A., Nakamura, A., Kurei, S., Toji, S., Tamai, K. and Koiwai, O. (2005) DNA polymerase lambda directly binds to proliferating cell nuclear antigen through its confined C-terminal region. *Genes Cells*, **10**, 705-715.

239. Shinohara, A. and Ogawa, T. (1995) Homologous recombination and the roles of double-

- strand breaks. *Trends Biochem Sci*, **20**, 387-391.
240. Showalter, A.K., Byeon, I.J., Su, M.I. and Tsai, M.D. (2001) Solution structure of a viral DNA polymerase X and evidence for a mutagenic function. *Nat Struct Biol*, **8**, 942-946.
241. Singer, B. and Grunberger, D. (1983) *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, pp 55-78, Plenum Press, New York.
242. Singh, J., Su, L. and Snow, E.T. (1996) Replication across O6-methylguanine by human DNA polymerase beta in vitro. Insights into the futile cytotoxic repair and mutagenesis of O6-methylguanine. *J Biol Chem*, **271**, 28391-28398.
243. Singhal, R.K. and Wilson, S.H. (1993) Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *J Biol Chem*, **268**, 15906-15911.
244. Sobol, R.W., Horton, J.K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K. and Wilson, S.H. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*, **379**, 183-186.
245. Sobol, R.W., Prasad, R., Evenski, A., Baker, A., Yang, X.P., Horton, J.K. and Wilson, S.H. (2000) The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*, **405**, 807-810.
246. Spratt, T.E. and Levy, D.E. (1997) Structure of the hydrogen bonding complex of O6-methylguanine with cytosine and thymine during DNA replication. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3354-3361.
247. Srivastava, D.K., Berg, B.J., Prasad, R., Molina, J.T., Beard, W.A., Tomkinson, A.E. and Wilson, S.H. (1998) Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J Biol Chem*, **273**, 21203-21209.
248. Steitz, T.A. (1999) DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem*, **274**, 17395-17398.
249. Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U. and Dogliotti, E. (1998) Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, **17**, 835-843.
250. Sugo, N., Aratani, Y., Nagashima, Y., Kubota, Y. and Koyama, H. (2000) Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase beta. *Embo J*, **19**, 1397-1404.
251. Sweasy, J.B., Chen, M. and Loeb, L.A. (1995) DNA polymerase beta can substitute for DNA polymerase I in the initiation of plasmid DNA replication. *J Bacteriol*, **177**, 2923-2925.
252. Sweasy, J.B. and Loeb, L.A. (1992) Mammalian DNA polymerase beta can substitute for DNA polymerase I during DNA replication in Escherichia coli. *J Biol Chem*, **267**, 1407-1410.
253. Takata, K., Shimizu, T., Iwai, S. and 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**, 23445-23455.
254. Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. and Takeda, S. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in

ADN polimerasa lambda

the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J*, **17**, 5497-5508.

255. Tan, H.B., Swann, P.F. and Chance, E.M. (1994) Kinetic analysis of the coding properties of O⁶-methylguanine in DNA: the crucial role of the conformation of the phosphodiester bond. *Biochemistry*, **33**, 5335-5346.

256. Tippin, B., Kobayashi, S., Bertram, J.G. and Goodman, M.F. (2004) To slip or skip, visualizing frameshift mutation dynamics for error-prone DNA polymerases. *J Biol Chem*, **279**, 45360-45368.

257. Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-581.

258. Toueille, M., El-Andaloussi, N., Frouin, I., Freire, R., Funk, D., Shevelev, I., Friedrich-Heineken, E., Villani, G., Hottiger, M.O. and Hubscher, U. (2004) The human Rad9/Rad1/Hus1 damage sensor clamp interacts with DNA polymerase beta and increases its DNA substrate utilisation efficiency: implications for DNA repair. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3316-3324.

259. Traut, T.W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and cellular biochemistry*, **140**, 1-22.

260. Tseng, H.M. and 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**, 45630-45637.

261. Uchiyama, Y., Kimura, S., Yamamoto, T., Ishibashi, T. and Sakaguchi, K. (2004) Plant DNA polymerase lambda, a DNA repair enzyme that functions in plant meristematic and meiotic tissues. *Eur J Biochem*, **271**, 2799-2807.

262. Ulrich, H.D. (2004) How to activate a damage-tolerant polymerase: consequences of PCNA modifications by ubiquitin and SUMO. *Cell Cycle*, **3**, 15-18.

263. Utley, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Cote, J., Steger, D.J., Eberharter, A., John, S. and Workman, J.L. (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature*, **394**, 498-502.

264. Vaisman, A., Tissier, A., Frank, E.G., Goodman, M.F. and Woodgate, R. (2001) Human DNA polymerase iota promiscuous mismatch extension. *J Biol Chem*, **276**, 30615-30622.

265. Vaisman, A., Lehmann, A.R. and Woodgate, R. (2004) DNA polymerases eta and iota. *Adv Protein Chem*, **69**, 205-228.

266. Vaisman, A. and Woodgate, R. (2001) Unique misinsertion specificity of poliota may decrease the mutagenic potential of deaminated cytosines. *Embo J*, **20**, 6520-6529.

267. Walker, J.R., Corpina, R.A. and Goldberg, J. (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, **412**, 607-614.

268. Ward, J.F. (2000) Complexity of damage produced by ionizing radiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **65**, 377-382.

269. Washington, M.T., Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (2000) Accuracy of thymine-thymine dimer bypass by *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3094-3099.

270. Washington, M.T., Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (2001) Mismatch extension

- ability of yeast and human DNA polymerase eta. *J Biol Chem*, **276**, 2263-2266.
271. Washington, M.T., Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S. (2002) Human DINB1-encoded DNA polymerase kappa is a promiscuous extender of mispaired primer termini. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1910-1914.
272. Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.
273. Werneburg, B.G., Ahn, J., Zhong, X., Hondal, R.J., Kraynov, V.S. and Tsai, M.D. (1996) DNA polymerase beta: pre-steady-state kinetic analysis and roles of arginine-283 in catalysis and fidelity. *Biochemistry*, **35**, 7041-7050.
274. West, S.C. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 435-445.
275. Williams, L.D. and Shaw, B.R. (1987) Protonated base pairs explain the ambiguous pairing properties of O6-methylguanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1779-1783.
276. Wilson, S.H. and Kunkel, T.A. (2000) Passing the baton in base excision repair. *Nat Struct Biol*, **7**, 176-178.
277. Wilson, T.E. and 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**, 23599-23609.
278. Yaneva, M., Kowalewski, T. and Lieber, M.R. (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *Embo J*, **16**, 5098-5112.
279. Yang, W. (2005) Portraits of a Y-family DNA polymerase. *FEBS Lett*, **579**, 868-872.
280. Yoshimura, M., Kohzaki, M., Nakamura, J., Asagoshi, K., Sonoda, E., Hou, E., Prasad, R., Wilson, S.H., Tano, K., Yasui, A. *et al.* (2006) Vertebrate POLQ and POLbeta cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage. *Mol Cell*, **24**, 115-125.
281. Yu, X., Chini, C.C., He, M., Mer, G. and Chen, J. (2003) The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*, **302**, 639-642.
282. Zan, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M.F., Diaz, M. and Casali, P. (2001) The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation. *Immunity*, **14**, 643-653.
283. Zeng, X., Winter, D.B., Kasmer, C., Kraemer, K.H., Lehmann, A.R. and Gearhart, P.J. (2001) DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat Immunol*, **2**, 537-541.
284. Zhang, Y., Yuan, F., Wu, X., Rechkoblit, O., Taylor, J.S., Geacintov, N.E. and Wang, Z. (2000) Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase eta. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4717-4724.
285. Zhang, Y., Wu, X., Yuan, F., Xie, Z. and Wang, Z. (2001) Highly frequent frameshift DNA synthesis by human DNA polymerase mu. *Mol Cell Biol*, **21**, 7995-8006.

ADN polimerasa lambda

286. Zhang, Y., Wu, X., Guo, D., Rechkoblit, O., Taylor, J.S., Geacintov, N.E. and Wang, Z. (2002) Lesion bypass activities of human DNA polymerase mu. *J Biol Chem*, **277**, 44582-44587.