

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis mutacional de la actividad transferasa
de la DNA polimerasa μ humana**

Paula Andrade Vivero

Madrid, 2009

Memoria presentada por Paula Andrade Vivero,
Licenciada en Farmacia, para optar al grado de Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid

El trabajo presentado 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 mi madre, quien más
fortaleza y valentía me ha inspirado
durante todos estos años**

About thirty years ago there was much talk that geologists ought only to observe and not theorize, and I well remember someone saying that at this rate a man might as well go into a gravel-pit and count the pebbles and describe the colours. How odd it is that anyone should not see that all observation must be for or against some view if it is to be of any service!

Charles Darwin

No basta la atención expectante, abincada, es preciso llegar a la preocupación. Importa aprovechar para la obra todos los momentos lúcidos de nuestro espíritu, ya la meditación que sigue al descanso prolongado, ya el trabajo mental suprainensivo que sólo da la célula nerviosa caldeada por la congestión, ora, en fin, la inesperada intuición que brota a menudo, como la chispa del eslabón, del choque de la discusión científica.

Santiago Ramón y Cajal

Agradecimientos

Me siento en deuda con muchas personas que a lo largo de estos años me han estimulado para que iniciase mi carrera en la ciencia. Éste es un camino difícil que no siempre lleva al mejor de los finales pero, aún así, me alegro de haber formado parte de todo este proceso.

En primer lugar quisiera agradecer a la Universidad de Santiago de Compostela, donde tuve mi primer contacto con la ciencia y donde publiqué mi primer manuscrito como primera autora, del que me siento muy orgullosa. De aquel tiempo recuerdo con especial cariño a mis compañeros Rosalía, Rafa, Marcos, Ruth y Ana, con los que compartí no solo trabajo, sino también buenos momentos.

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Madrid, y en especial al CBMSO, la oportunidad de formar parte de su historia. También quisiera dar las gracias a la patente de phi 29, que me ha mantenido durante estos cuatro años, y al Dr. Luis Blanco y a todo su equipo, con los que he compartido laboratorio durante este tiempo. Me siento especialmente agradecida a Luis, mi director de tesis, por haber tenido tanta paciencia conmigo y por haberme enseñado tanto, no sólo a nivel profesional sino también a nivel personal. Quiero agradecerle la supervisión de todos estos años de trabajo y de la escritura de esta tesis. Gracias por haberme ayudado a descubrir lo que es la ciencia y por tu siempre inestimable ayuda.

Gracias a toda la gente que a lo largo de todo este tiempo ha estimulado mi interés por la ciencia y que han formado parte de mi vida. A Juan Aguilar, por sus ganas contagiosas de “descubrir” el funcionamiento de nuestro cerebro; a María de la Fuente, por su contagioso optimismo y su necesidad de saber; a Carmen Álvarez por guiar mis primeros pasos en investigación aportando su experiencia; a Oriol Sunyer, por haberme ofrecido formar parte de su grupo y por acogerme durante unos meses en su laboratorio.

A José Antonio Tercero, por haberme introducido en el grupo de corredores de Valdelatas y por haber sido un amigo. Siempre recordaré nuestros entrenamientos con “los físicos” en Valdelatas como uno de los mejores momentos de la semana.

A Irene, con la que compartí no solo trabajo, sino con la que me siento unida por una gran amistad. Las cosas en el CBM no hubieran sido las mismas sin ti. Gracias por escucharme y por tener siempre un buen consejo que darme.

A mi familia por todo lo que habéis hecho por mí desde siempre; a mi padre, por su apoyo durante todo este tiempo; a Marina, por haberme dado siempre ánimos y por haber estado en la familia desde el principio; a mi hermana, por haberme ayudado a distraer de los malos momentos; a mi madre, que siempre estuvo presente infundiéndome valor. Sois el pilar fundamental de mi vida.

A Francisco, el “ave Fénix”. Siempre supe que conseguirías salir adelante. Gracias por haberme animado a continuar y a no rendirme. Gracias por confiar en mí y haberme hecho comprender lo que realmente merece la pena. ¡No sé que hubiera hecho sin ti!. Todo lo demás ya lo sabes.

Summary

DNA stores genetic information in all living organisms. It is also the basic material on which evolutionary mechanisms operate to generate the enormous diversity of living beings. DNA is exposed to several endogenous and exogenous agents that can damage it and, according to the type of damage, several enzymatic routes of DNA repair have evolved. These DNA repair routes often include a DNA polymerase. DNA polymerases of the X family are involved in the synthesis of small fragments of DNA, being specialized in functions such as DNA repair (Pol μ and Pol λ) or the generation of variability (TdT). The four human X family polymerases combine a broad range of activities in order to cover some DNA repair functions of the cell.

This thesis is about the biochemical activities of Pol μ and their comparison with those of TdT, which share a high sequence identity. A mutational analysis of the active center of Pol μ and the effect of these mutations in the biochemical properties of this enzyme is described. We have found a mutant which displays a large increase in terminal transferase activity, but a weaker interaction with single stranded DNA. Based on 3D-structural information of both Pol μ and TdT complexed with different DNA substrates, we concluded that Pol μ residue Arg387, a DNA binding ligand likely involved in primer translocation prior to catalysis, is critical to maintain template-independent synthesis rate-limiting.

Furthermore, we performed a comparative analysis of the terminal transferase activity present on TdT and Pol μ as a function of its ability to extend 3'-protuberances in DNA. Terminal transferase activity of Pol μ , that could contribute to non homologous end joining, is distinct of that present in TdT, which inserts a larger number of nucleotides in order to generate variability during V(D)J recombination. Although terminal transferase activity of Pol μ is less efficient than that of TdT, the studies described in this thesis show how these polymerases could complement or even substitute each other.

Additionally, interaction studies between Pol μ and PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) were made in order to understand previous studies that suggested that Pol μ is involved in DNA translesion synthesis, a mechanism of DNA damage tolerance in the cell. We found an interaction between Pol μ and PCNA, which could suggest that PCNA drives Pol μ towards specific lesions or coordinates its activity with other enzymes.

Finally, we broadened the study of human NHEJ with the study of a polymerase involved in this route in bacteria. The functional comparison between the polymerase domain (PolDom) of LigD in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. smegmatis* with the human eukaryotic polymerases of the X family highlights the simplicity of lower organisms, as PolDom includes the various activities present in several polymerases of the X family (Pol μ , Pol λ y TdT).

Abreviaturas

AEP	Primasa Arqueo-Eucariota
APE	AP endonucleasa
BER	Repación por escisión de bases (<i>Base Excision Repair</i>)
BME	β -mercaptoetanol
BRCT	Dominio C-terminal de BRCA1 (<i>BRCA1 C Terminus domain</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
DNA	Ácido Deoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Densidad Óptica
dNTP	Deoxirribonucleótido Trifosfato (Deoxyribonucleotide triphosphate)
DTT	Ditiotritol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i>)
EJ	Unión de extremos (<i>End Joining</i>)
HR	Recombinación homóloga (<i>Homologous Recombination</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosida
kDa	Kilodalton
$K_{m_{app}}$	Constante aparente de Michaelis-Menten
K_m	Constante de Michaelis-Menten
k_{cat}	Constante catalítica
K_{dis}	Constante de disociación
KO	<i>Knock out</i>
LB	Luria-Bertani Brot
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
MNR	Resonancia Magnética Nuclear
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación (<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PK	Proteínquinasa
Pol	Polimerasa
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
rNTP	Ribonucleótido Trifosfato (<i>Ribonucleotide Tri-Phosphate</i>)
RSS	Señal de reconocimiento de recombinación
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TAE	Tris-acético-EDTA
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal (<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i>)
wt	Tipo silvestre (<i>Wild Type</i>)

Índice

Introducción	1
Objetivos	19
Materiales y Métodos	21
Resultados	
<i>Capítulo 1</i>	
Análisis mutacional del centro activo de Pol μ	29
<i>Capítulo 2</i>	
Residuos implicados en la actividad transferasa terminal de Pol μ	43
<i>Capítulo 3</i>	
Pol μ y TdT: actividad transferasa terminal en extremos de DNA 3'-protuberantes	59
<i>Capítulo 4</i>	
Interacción de Pol μ y PCNA	75
<i>Capítulo 5</i>	
Caracterización bioquímica del dominio polimerasa de LigD	83
Discusión	95
Conclusiones	111
Bibliografía	113

Introducción

I.1. Las DNA polimerasas	3
I.2. Clasificación en familias de las DNA polimerasas.....	4
I.2.1. Polimerasas de la familia B	4
I.2.2. Polimerasas de la familia A	5
I.2.3. Polimerasas de la familia Y	5
I.2.4. Polimerasas de la familia X	6
I.2.4.1. Polβ	6
I.2.4.2. Polλ	9
I.2.4.3. TdT	10
I.2.4.4. Polμ	13
I.2.5. NHEJ en organismos procaróticos	16
I.2.6. Análisis comparativo	16

Introducción

El DNA almacena la información genética de todos los organismos. Es además el material básico sobre el que actúan los mecanismos evolutivos que han generado la enorme diversidad de seres vivos. No obstante, la información codificada en el DNA debe ser transmitida fielmente cada vez que una célula se divide (Baker y Kornberg, 1992). La maquinaria enzimática necesaria para la replicación del DNA está también implicada en los mecanismos de su reparación y del mantenimiento de la integridad del genoma (Friedberg *et al.*, 2006). El DNA está expuesto a múltiples agentes endógenos y exógenos que lo pueden dañar. Cuando el daño en el DNA no es reparado adecuadamente, las mutaciones pueden dar lugar a procesos de apoptosis o descontrol del ciclo celular (cáncer) (Hoeijmakers, 2001). En función del tipo de daño en el DNA se han descrito múltiples rutas de reparación especializadas en su procesamiento. Estas rutas de reparación incluyen a multitud de enzimas y entre ellas casi siempre está implicada al menos una DNA polimerasa. En las células humanas se han identificado hasta 15 polimerasas, y de ellas al menos 10 están especializadas en la reparación del DNA o en la capacidad de tolerar DNA dañado durante la replicación (Bebenek y Kunkel, 2004).

I.1. Las DNA polimerasas

Estudios estructurales indican que las subunidades catalíticas de las polimerasas en diferentes familias comparten tres subdominios comunes, llamados dedos, palma y pulgar (Baker y Kornberg, 1992; Beard y Wilson, 2003). Estos subdominios forman una cavidad cuya base es la palma, donde se alojan los tres residuos catalíticos coordinados con dos átomos de un metal divalente. Todas las polimerasas tienen un mecanismo común para catalizar la ruptura del enlace fosfodiéster del nucleótido previa a su incorporación al DNA y la consiguiente liberación de pirofosfato (Steitz *et al.*, 1994).

Las polimerasas interactúan con diferentes proteínas accesorias que son necesarias para la replicación o reparación del DNA. Por ejemplo, las polimerasas que replican el cromosoma se asocian a factores que le aportan procesividad como el PCNA. Las interacciones entre polimerasas y proteínas accesorias ocurren mediante motivos de varios aminoácidos presentes en la polimerasa, o a través de dominios más extensos como el BRCT en el caso de ciertas polimerasas de reparación (Mahajan *et al.*, 2002).

La eficiencia de polimerización del nucleótido correcto puede ser extraordinariamente diferente entre las DNA polimerasas (puede variar con un rango de 10^7): unas polimerasas priman la fidelidad en la síntesis, mientras que otras introducen nucleótidos erróneos con facilidad (Beard y Wilson, 2003). Otro rasgo que las diferencia es la especificidad por el sustrato de DNA, que varía desde la preferencia por *gaps* pequeños hasta la capacidad para polimerizar un gran número de bases durante la replicación del DNA cromosómico (McHenry, 2003). Algunas polimerasas también tienen propiedades enzimáticas adicionales como son la actividad 3'-5' exonucleasa, 5'-3' exonucleasa, 5'dRP liasa, ATPasa o primasa. Estas actividades se pueden encontrar en el mismo polipéptido que la actividad polimerasa, o separados en otras subunidades asociadas.

Basándose en diferencias en la estructura primaria de sus subunidades catalíticas, las DNA polimerasas se clasifican en diferentes familias (Tabla I.1) (Bebenek y Kunkel, 2004).

Tabla I.1. Clasificación en familias de las DNA polimerasas.

Nombre	Familia	Gen bacteriano	Gen humano	Gen en levadura	Otras actividades
Pol I	A	<i>PolA</i>			<i>5'-3' exonucleasa</i> <i>3'-5' exonucleasa</i> <i>dRP liasa</i> <i>3'-5' exonucleasa</i> <i>ATPasa, helicasa</i>
Pol γ			<i>POLG</i>	<i>MIP1</i>	
Pol θ			<i>POLQ</i>		
Pol ν			<i>POLN</i>		
Pol II	B	<i>PolB</i>			<i>3'-5' exonucleasa</i> <i>Primasa, 3'exo</i> <i>3'-5' exonucleasa</i> <i>3'-5' exonucleasa</i>
Pol α			<i>POLA</i>	<i>POL1</i>	
Pol δ			<i>POLD1</i>	<i>POL3</i>	
Pol ϵ			<i>POLE</i>	<i>POL2</i>	
Pol ζ			<i>POLZ</i>	<i>REV3</i>	
Pol β	X		<i>POLB</i>		<i>dRP liasa, AP liasa</i> <i>dRP liasa</i> <i>TdT</i>
Pol λ			<i>POLL</i>	<i>POL4</i>	
Pol μ			<i>POLM</i>		
TdT			<i>TdT</i>	<i>TRF4</i>	
Pol IV	Y	<i>dinB</i> <i>umuC</i>			<i>dRP liasa</i>
Pol V					
Pol η			<i>POLH</i>	<i>RAD30</i>	
Pol ι			<i>POLI</i>		
Pol κ			<i>POLK</i>		
Rev1		<i>REV1</i>	<i>REV1</i>		

I.2. Clasificación en familias de las DNA polimerasas

I.2.1. Polimerasas de la familia B

La familia B de DNA polimerasas está representada en humanos por las polimerasas α , δ , ϵ y ζ . Las DNA polimerasas α , δ y ϵ están implicadas en la síntesis de las cadenas *leading* y *lagging* durante la replicación del DNA. El complejo Pol α -DNA primasa está encargado de la síntesis de oligos cebadores durante la síntesis de fragmentos de Okazaki, mientras que las DNA polimerasas δ y ϵ están encargadas de la síntesis de la cadena *lagging* y *leading*, respectivamente (Nick McElhinny *et al.*, 2008). Al requerirse para estos procesos un alto grado de procesividad, tanto las polimerasas δ como la ϵ interaccionan con el factor PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). PCNA ancla las polimerasas al DNA para aumentar su tiempo de residencia sobre el mismo (Bruck y O'Donnell, 2001). Pol δ y Pol ϵ son polimerasas con múltiples subunidades y como durante la replicación cromosómica prima la fidelidad de síntesis, tienen asociadas una actividad 3'-5' exonucleasa correctora de errores (Kunkel y Bebenek, 2000). Las DNA polimerasas Pol ζ y Pol α , por el contrario, no poseen actividad exonucleasa asociada. La función de Pol ζ esta todavía por elucidar con claridad, pero se sabe que tiene una

alta capacidad para extender bases desapareadas (Abdulovic *et al.*, 2008). Se cree por tanto que Pol ζ podría actuar en concierto con otras polimerasas para atravesar lesiones en el genoma durante la replicación del DNA. Por ejemplo, se ha observado que el *bypass* de un sitio apurínico se puede realizar mediante la acción combinada de Pol δ y Pol ζ (Zhong *et al.*, 2006). Por otro lado, Pol ζ puede extender una base desapareada introducida por Pol η (ver más abajo) para que luego Pol δ pueda continuar la síntesis (Huang *et al.*, 2002).

La familia B de DNA polimerasas tiene representantes en procariotas y bacteriófagos como Pol II de *E. coli*, T4 y RB69, o la polimerasa del fago phi29, de gran importancia en biotecnología.

I.2.2. Polimerasas de la familia A

En humanos, la familia A de DNA polimerasas está representada por la DNA polimerasa γ , encargada de la replicación del DNA mitocondrial (Kaguni, 2004). Pol γ es una proteína heterodimérica compuesta de una subunidad grande responsable de su actividad catalítica y de una subunidad pequeña accesoria. La subunidad grande contiene además actividades exonucleasa 5'-3' y 3'-5', así como actividad dRP liasa. Por tanto se cree que Pol γ , además de una función replicativa del pequeño genoma mitocondrial, también cumple funciones de reparación (Kang y Hamasaki, 2002). Las rutas de reparación mitocondriales son de especial relevancia, y especialmente la ruta de reparación por escisión de bases, dado el ambiente oxidativo imperante en la mitocondria (Friedberg *et al.*, 2006). Recientemente se han identificado otros miembros de la familia A en eucariotas que parecen estar implicados en reparación, Pol θ y Pol ν .

La familia A de polimerasas incluye otras muchas polimerasas replicativas y de reparación en procariotas (Baker y Kornberg, 1992). Las replicativas son, por ejemplo, la del fago T7. En *E. coli* está representada por DNA polimerasa I, cuyo gen (pol A) da nombre a la familia. Pol I está implicada directamente en reparación por escisión de nucleótido y en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki durante la síntesis de la cadena *lagging*.

I.2.3. Polimerasas de la familia Y

Las polimerasas de la familia Y están representadas en humanos por la polimerasas η , ι , κ y Rev1 (Bebenek y Kunkel, 2004). Las polimerasas de esta familia tiene baja fidelidad de polimerización en sustratos sin daño y además pueden polimerizar a través de DNA dañado (Lehmann, 2006). Debido a esta última característica, estas enzimas se denominan polimerasas de síntesis translesiva (*translesion synthesis polymerases*). Dependiendo del tipo de lesión, las polimerasas de la familia Y pueden sintetizar DNA de manera que incorpore errores con alta probabilidad, o lo pueden hacer con un cierto grado de fidelidad (Maga *et al.*, 2007). En el primer caso, la acción de estas polimerasas resulta en una elevada mutagénesis. Por ejemplo, los pacientes con cierta variante de *Xeroderma pigmentosum* (XPV) tienen mutaciones en el gen que codifica para Pol η , que mantiene una cierta fidelidad en lesiones causadas por la luz ultravioleta. En estos pacientes XPV la polimerasa ζ (de la familia B), con muy baja fidelidad de polimerización, está implicada en la mutagénesis causada por la infructuosa reparación

de las lesiones causadas por la luz UV, y por ello estos pacientes tienen una alta predisposición de sufrir cáncer (Friedberg *et al.*, 2006).

1.2.4. Polimerasas de la familia X

A esta familia pertenecen polimerasas implicadas tanto en la reparación del DNA como en la generación de variabilidad. Los cuatro miembros que forman esta familia en eucariotas superiores son Pol β , Pol λ , Pol μ y TdT. Las polimerasas de la familia X son de pequeño tamaño (entre 39 y 66 KDa) siendo en general bastante imprecisas durante la síntesis del DNA. Son enzimas distributivas, no pudiendo sintetizar más que unas pocas bases antes de disociarse del DNA. Todas las polimerasas de esta familia comparten una estructura básica organizada en torno a un dominio catalítico altamente conservado (Fig. I.1) (Bebenek y Kunkel, 2004; Ramadan *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2001). Están involucradas en varias funciones como la reparación por escisión de bases (BER), la reparación de las roturas de doble cadena en el DNA (NHEJ) y la recombinación V(D)J. En la actualidad se dispone de gran cantidad de información estructural de alta resolución de estas polimerasas, obtenida por resonancia magnética nuclear y cristalografía. Estas estructuras han sido resueltas con sustratos de DNA, nucleótido o con ambos. Estos estudios estructurales nos han permitido una mayor comprensión de las distintas conformaciones que adopta la proteína durante su ciclo catalítico. Asimismo, el análisis de estas estructuras ha permitido una mejor comprensión de las similitudes y diferencias entre los miembros de la familia.

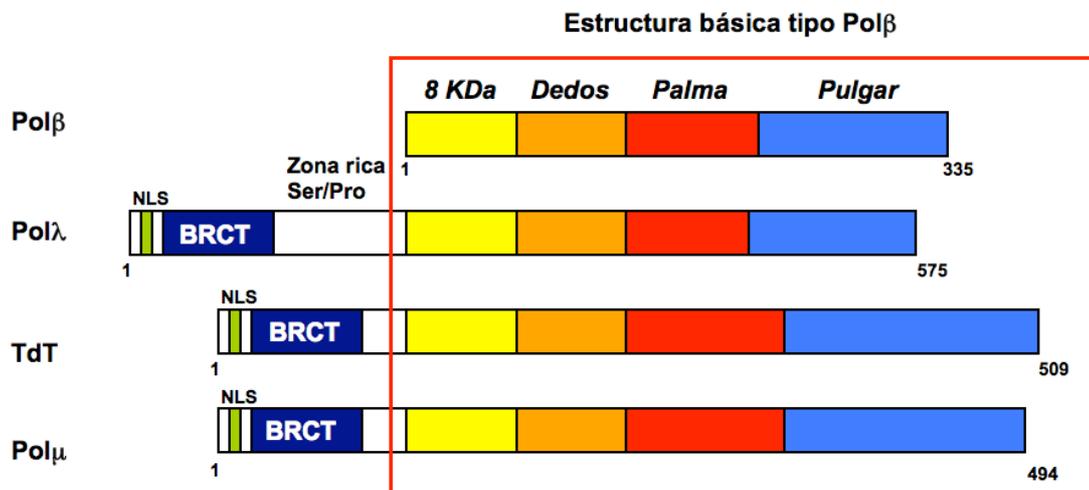


Figura I.1. Representación esquemática de los dominios estructurales de las cuatro DNA polimerasas de la familia X en humanos. La estructura básica de las cuatro polimerasas es similar a Pol β . El dominio adicional de BRCT está presente en Pol λ , Pol μ y TdT.

1.2.4.1. Pol β

Características estructurales de Pol β . Pol β es la polimerasa más pequeña de eucariotas superiores conocida hasta la fecha (39 KDa). Su pequeño tamaño y el hecho de que no necesite proteínas accesorias para desarrollar su actividad *in vitro* ha facilitado su caracterización bioquímica y cinética. Pol β fue la primera polimerasa de la

familia X de la que se obtuvo su estructura cristalizada de alta resolución (Davies *et al.*, 1994; Sawaya *et al.*, 1994). En la actualidad se dispone de un gran número de cristales de Pol β formando complejos con distintos sustratos. La estructura de Pol β es el paradigma para el resto de las polimerasas de la familia, ya que todas comparten una organización modular común (Fig. I.1). La estructura modular básica de Pol β consiste en un dominio aminoterminal de 8 KDa y un dominio carboxiterminal de 31 KDa, que está dividido a su vez en tres subdominios: dedos, palma y pulgar. El dominio aminoterminal (8 KDa) está conectado al carboxiterminal a través de una región altamente sensible a proteasas (Prasad *et al.*, 2001). El dominio de 8 KDa se une fuertemente a DNA de cadena simple con grupos fosfato en 5'. Este dominio también posee una actividad dRP liasa. Las estructuras cristalográficas ternarias en un DNA con un *gap* demuestran como el dominio de 8 KDa puede unirse fácilmente al DNA cuando hay un grupo fosfato en el extremo 5' (Ahn *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1996). La estructura resultante tiene una forma de anillo en donde queda libre un canal por el que puede difundir fácilmente el nucleótido que deba ser incorporado al DNA. La conformación que adopta en estas situaciones es cerrada en comparación con la que adopta en ausencia de DNA (Fig. I.2). En presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' del *gap*, Pol β rellena estos *gaps* de manera más eficiente y procesiva (Chagovetz *et al.*, 1997; Singhal y Wilson, 1993).

El centro activo de la polimerasa se encuentra en el dominio de 31 KDa. El mecanismo cinético que sigue la enzima para la catálisis es similar al de muchas DNA polimerasas. En un primer paso, se produce la unión de la polimerasa al DNA, a continuación se produce la unión del nucleótido al sitio activo de la polimerasa con la consiguiente y rápida reacción de catálisis en la que tres aspárticos catalíticos coordinan dos átomos de metal activador (magnesio o manganeso) (Steitz *et al.*, 1994; Tanabe *et al.*, 1979). En este último paso es cuando se producen cambios conformacionales en la proteína. La unión del nucleótido correcto facilita este cambio conformacional y lleva a una interacción más fuerte con el mismo. Por el contrario, la unión de un nucleótido

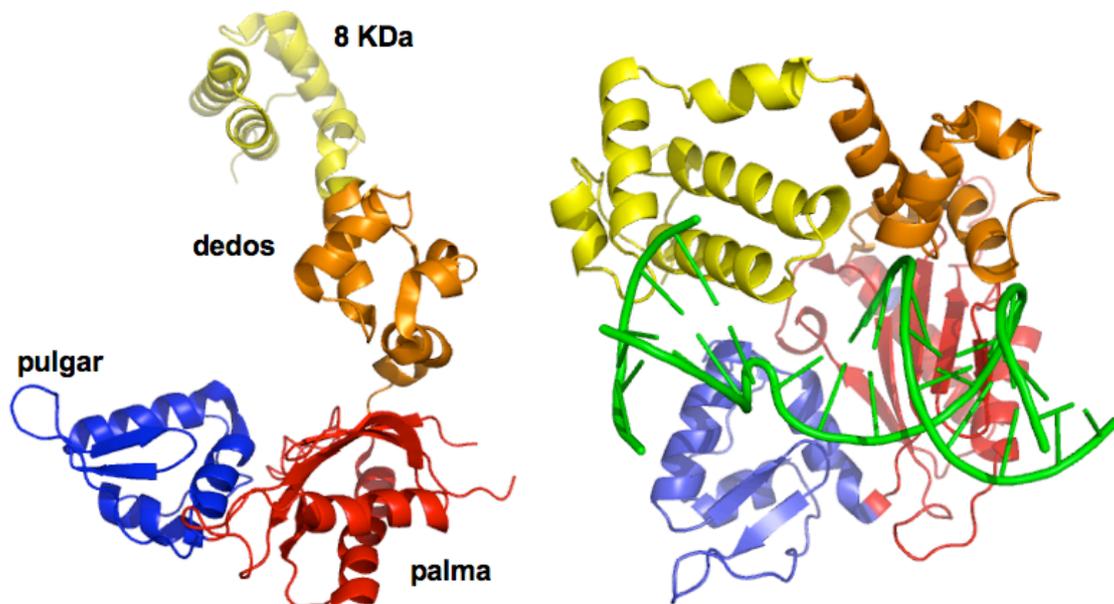


Figura I.2. Modelos estructurales de Pol β . Los diferentes dominios están señalados con colores que siguen el patrón de la Figura I.1. Pol β en ausencia de DNA muestra una conformación abierta (izquierda). En contraste, el cristal de la derecha muestra la conformación cerrada de Pol β cuando está interaccionando con DNA. La referencia PDB de los cristales son 1BPD para la conformación abierta y 1BPY para la conformación cerrada, interaccionando con nucleótido y DNA.

incorrecto provoca un entorpecimiento en este cambio conformacional que resulta en una peor unión.

Función de Pol β en la célula. El dominio de 8 KDa de Pol β , además de definir su especificidad por sustratos, determina parte de la función de la enzima, ya que en este dominio reside la actividad dRP liasa de Pol β (Prasad *et al.*, 1998). Esta propiedad resulta clave para la eliminación de nucleótidos abásicos en un extremo 5' del DNA, que es determinante en la ruta de reparación del DNA por escisión de base. El mecanismo de reparación por escisión de base (BER) es el principal mecanismo que poseen las células para reparar las lesiones producidas en el DNA por radicales hidroxilo generados en el metabolismo celular o por agentes alquilantes como el MMS (metil-metano-sulfonato). Este mecanismo (Figura I.3; Hoeijmakers, 2001) se inicia por una DNA glicosilasa que reconoce la base dañada en el DNA y la elimina mediante la rotura del enlace N-glicosílico, dejando un sitio abásico apurínico o apirimidínico (Lindahl, 1982). El sitio abásico generado por la glicosilasa es reconocido por una AP endonucleasa que rompe el enlace fosfodiéster en la posición 5' con respecto al sitio abásico. Esta AP endonucleasa crea un *nick* con un extremo 3'-OH y otro extremo 5' con el residuo 5'-desoxirribosa fosfato (5'-dRP) en el que ha quedado convertido el nucleótido dañado que activó el proceso. Alternativamente, el mecanismo de reparación por BER puede ser iniciado por una DNA glicosilasa multifuncional que posea actividad AP liasa. Una vez se ha producido la rotura del enlace fosfodiéster en el sitio abásico se genera un *gap* de un único nucleótido con un extremo 3'-OH y otro extremo 5'-P (Beard y Wilson, 2000; Hoeijmakers, 2001; Lindahl y Wood, 1999). Los agentes químicos pueden causar roturas de cadena simple en el DNA que posean extremos modificados que deben ser procesados antes de proceder a su reparación por BER.

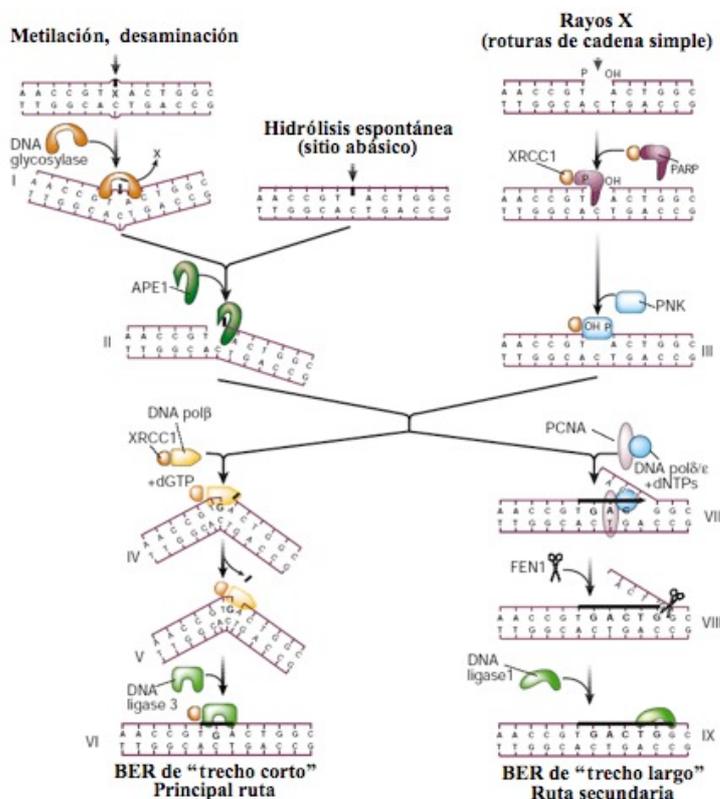


Figura I.3. Mecanismo de reparación por escisión de base (Hoeijmakers, 2001). En la figura están representadas las dos rutas de reparación mediante este mecanismo. A la izquierda la ruta de "trecho corto" en donde interviene Pol β , y a la derecha la ruta de "trecho largo".

La ruta de reparación por "trecho corto" se inicia con una DNA glicosilasa que reconoce el sitio dañado. Estas enzimas se unen al DNA y eliminan la base dañada. El sitio abásico resultante es procesado por toda una serie de proteínas hasta terminar siendo sellado por la Ligasa III.

Se ha descrito la existencia de otra vía alternativa de BER en la que se eliminan de 2 a 6 nucleótidos en una reacción dependiente de PCNA y de la endonucleasa Fen-1. En esta vía, conocida como de "trecho largo", se sintetiza el fragmento de DNA correspondiente mediante la acción de las polimerasas replicativas Pol δ y Pol ϵ .

En mamíferos, el mecanismo de reparación por BER implica a diferentes proteínas, siendo Pol β la polimerasa que actúa mayoritariamente. Cuando interviene Pol β , la ruta de reparación se conoce como de “trecho corto” (Fortini *et al.*, 1998) ya que Pol β inserta un único nucleótido en el extremo 3'-OH y a continuación elimina el grupo 5'-dRP mediante su actividad dRP liasa. Finalmente Pol β es reemplazada por la Ligasa I, que se encarga de sellar la rotura. Se ha descrito la existencia de otra vía alternativa de BER en la que se eliminan de 2 a 6 nucleótidos en una reacción dependiente de PCNA y de la endonucleasa Fen-1. Esta vía, conocida como de “trecho largo”, implica a las polimerasas replicativas Pol δ y Pol ϵ (Stucki *et al.*, 1998) y se utiliza como respuesta a algunos agentes químicos que pueden causar roturas de cadena simple en el DNA, con extremos fuertemente modificados. Estos extremos 5' no pueden ser degradados por la actividad dRP liasa, por lo que deben ser procesados con anterioridad, o eliminados por la actividad Fen-1 como parte del proceso de “trecho largo”.

Otras polimerasas que también poseen esta actividad dRP liasa son Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2001), Pol ι (Bebenek *et al.*, 2001) y Pol γ (Longley *et al.*, 1998). Esto implica que todas estas polimerasas son potencialmente capaces de participar en procesos de reparación que requieran la eliminación de un residuo dRP. La implicación de Pol β en BER también está apoyada por la interacción de esta enzima con varios componentes de la vía de reparación como es el caso de la endonucleasa AP (Bennett *et al.*, 1997), la DNA ligasa I (Dimitriadis *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 1996) y XRCC1 (Caldecott *et al.*, 1996; Kunkel y Bebenek, 2000).

I.2.4.2. Pol λ

Características estructurales de Pol λ y su función en la célula. Pol λ y Pol β son polimerasas similares (32% de identidad de secuencia) (Aoufouchi *et al.*, 2000; García-Díaz *et al.*, 2000; Nagasawa *et al.*, 2000) pero, a diferencia de Pol β , Pol λ contiene un dominio BRCT que le sirve para interactuar con otras proteínas (revisado en Mueller *et al.*, 2008). Se ha demostrado que este dominio BRCT interactúa con XRCC4-LigIV, dos de los factores claves de la ruta de reparación de dobles roturas en la cadena de DNA a través del mecanismo de “reunión de extremos no complementarios” (NHEJ), implicando su actividad en esta ruta de reparación (Fan and Wu, 2004). Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que Pol λ , al igual que Pol β , Pol μ y TdT, tiene un dominio de 8 kDa que es un punto de anclaje al fosfato en 5' durante la unión de extremos no homólogos. Pol λ requiere al menos una base apareada para que se produzca la recombinación de extremos no homólogos mediante NHEJ (Nick McElhinny *et al.*, 2005).

Pol λ presenta además actividad dRP liasa intrínseca en el dominio de 8KDa, y por ello se ha sugerido que esta enzima puede estar implicada en la reparación de roturas que llevan asociado daño oxidativo (García-Díaz *et al.*, 2001). Al igual que en Pol β , la procesividad de Pol λ aumenta al rellenar pequeños *gaps* con un grupo fosfato en el extremo 5' (Picher *et al.*, 2006). *In vitro*, Pol λ puede sustituir a Pol β en el reconocimiento y eliminación de una base dañada. Puede por tanto concluirse de estos experimentos que Pol λ es una candidata idónea para la ruta de reparación por escisión de base, tal vez en un papel redundante con Pol β o tal vez participando en reacciones más especializadas de BER (García-Díaz *et al.*, 2005). Por ejemplo, el hecho de que Pol λ tenga una alta afinidad por nucleótidos es consistente con la idea de que tenga que ver con la reparación por BER en situaciones en donde la concentración de nucleótidos

sea baja, como por ejemplo ocurre en las células quiescentes. Aunque la función de Pol λ está aún por elucidar, su alta expresión en testículos durante la espermatogénesis sugiere una posible actuación en BER durante la meiosis (García-Díaz *et al.*, 2000).

Adicionalmente, se ha demostrado que Pol λ puede tener un posible papel en la síntesis translesiva durante la replicación cromosómica, ya que Pol λ interacciona con el factor de procesividad PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), y es capaz de extender pares de bases que contienen bases dañadas, como la 8-oxo-Guanina (Picher and Blanco, 2007; Zhou *et al.*, 2008). La procesividad de Pol λ se ve fuertemente estimulada por la acción combinada de PCNA y RPA lo que redundará además en una mejor fidelidad de la reacción de síntesis frente a 8-oxo-G (Maga *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que Pol λ juega un cierto papel durante la recombinación V(D)J de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Bertocci *et al.*, 2002; Bertocci *et al.*, 2006), aunque su papel durante el desarrollo de los linfocitos es todavía incierto.

1.2.4.3. TdT

Características estructurales de TdT. TdT es la única polimerasa conocida con capacidad de adición de nucleótidos a un extremo 3'-OH sin requerir la cadena *template* (actividad transferasa terminal) (Bollum, 1960; Kato *et al.*, 1967). TdT ha sido encontrada exclusivamente en vertebrados, en donde está altamente conservada. Su aparición parece coincidir con el desarrollo de un sistema inmune adaptativo que depende en parte de la diversidad generada en los segmentos génicos de los linfocitos. TdT aporta diversidad adicional en el sistema inmune mediante la adición de nucleótidos (adiciones N) a los sitios de unión de los genes V(D)J que codifican las inmunoglobulinas durante la recombinación V(D)J y los receptores antigénicos de las células T (Komori *et al.*, 1993).

En un análisis comparativo de los dominios estructurales de TdT y Pol β se puede observar como comparten un dominio catalítico común pero que además, TdT

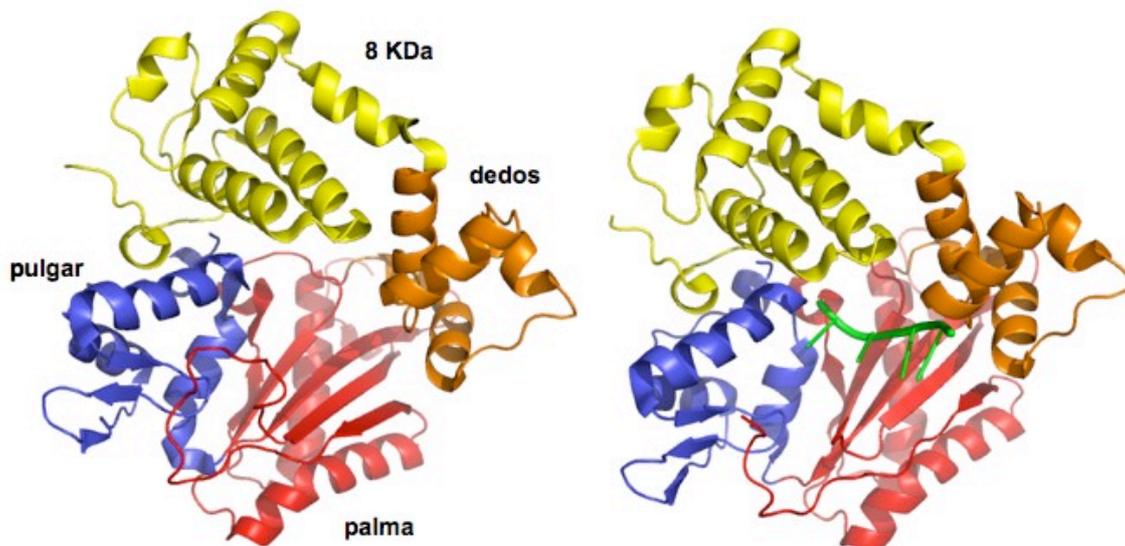


Figura I.4. Modelos estructurales de TdT. Los diferentes dominios están señalados con colores que siguen el patrón de la figura I.1. TdT en ausencia de DNA y nucleótido muestra una conformación cerrada (izquierda), prácticamente idéntica a la que presenta en complejo binario con DNA de cadena simple (derecha, DNA señalado en verde). La referencia PDB para la proteína libre es 1JMS y para el complejo binario es 1KDH. En ambos casos se muestra el dominio polimerasa en ausencia del dominio BRCT.

consta de una región adicional en la zona aminoterminal de 13 KDa que contiene una secuencia de localización nuclear (NLS en Fig.I.1). En esta región aminoterminal también hay un dominio BRCT, que es una región de interacción proteína-proteína (Bork et al., 1997; Callebaut y Mornon, 1997). Otra característica en común entre TdT y Pol β es que ambas tienen un dominio de 8 KDa en su estructura que les permite posicionarse en un *gap* o en un *nick* en el DNA. En el caso de TdT no está clara la función que puede desempeñar este dominio (Moon et al., 2007a). TdT, a diferencia de Pol β , no adopta una conformación abierta en ausencia de DNA. Los cuatro subdominios (8 KDa, dedos, palma y pulgar) están agrupados en una estructura similar a la que adopta cuando está presente DNA de cadena sencilla (Fig. I.4).

Un requerimiento esencial para la extensión de extremos 3' por transferasa terminal es un extremo 3' OH con al menos tres nucleótidos (Kato et al., 1967). Una característica estructural especial de TdT es la presencia de un *loop*, el *Loop 1*, que le permite compensar la falta de una cadena *template* durante la polimerización en extremos 3'. Este *loop* también está presente en Pol μ , que consecuentemente también posee actividad independiente de molde (Dominguez et al., 2000). La obtención de las estructuras cristalográficas de TdT unida a DNA de cadena simple o a nucleótido han permitido analizar más en profundidad el mecanismo de acción de esta polimerasa y sus preferencias por sustratos sin molde (Delarue et al., 2002).

La función de TdT es fundamental durante la recombinación V(D)J en la que la creación de diversidad por adición de secuencias aleatorias de DNA es prioritaria sobre la precisión de la reparación de las roturas de doble cadena. Por ello, la expresión de TdT está restringida a los órganos linfoides primarios, el timo y a la médula ósea, y su ausencia tiene como consecuencia un síndrome de inmunodeficiencia. TdT no muestra una gran discriminación durante la incorporación de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos (Boule et al., 2001; Roychoudhury, 1972), sugiriendo que los NTPs podrían ser utilizados como sustratos durante la creación de variabilidad en los intermedios V(D)J. Esto, junto a la capacidad de polimerización independiente de molde y la interacción con las proteínas Ku, XRCC4-Lig4, han permitido implicar a esta proteína en la generación de variabilidad en las regiones codificantes de receptores antigénicos de las inmunoglobulinas (Mahajan et al., 1999; Mahajan et al., 2002).

Función de TdT en la célula: Recombinación V(D)J. La enorme diversidad de los receptores antigénicos es generada mediante la recombinación V(D)J en el desarrollo de las células B y T (Tonegawa, 1983). Esto tiene lugar en el timo y en la médula ósea respectivamente. Los exones que codifican las regiones variables de los receptores antigénicos de las inmunoglobulinas se ensamblan mediante la recombinación de subexones V (*variability*), D (*diversity*) y J (*joining*). La diversidad de las posibles combinaciones de estos elementos, así como la pérdida de nucleótidos y la incorporación de otros nuevos en las uniones, provoca que se produzca un repertorio de hasta 10^{22} receptores antigénicos diferentes (Bassing et al., 2002; Fugmann et al., 2000).

La recombinación V(D)J se inicia cuando son reconocidas determinadas secuencias que están flanqueando cada segmento codificante (Lieber et al., 2003). Estas secuencias específicas de recombinación (RSS) forman heptámeros y nonámeros de motivos conservados que están separados por 12 ó 23 pares de bases. El proceso de recombinación ocurre entre el extremo de la señal heptamérica y la secuencia codificante. El proceso de recombinación comienza cuando dos secuencias específicas de recombinación son aproximadas por las proteínas RAG1 y RAG2 (Mombaerts et al., 1992; Oettinger et al., 1990). Estas endonucleasas, que forman un complejo con otras

proteínas de alta movilidad (HMG1) (Sawchuk *et al.*, 1997), producen un *nick* entre el extremo 3' codificante y el extremo 5' del heptámero. Estos extremos 3'-OH generados atacan mediante una reacción química a la cadena complementaria y crean una rotura de doble cadena entre los extremos codificantes y las secuencias específicas de recombinación. El paso siguiente es la formación de un *hairpin* en estas roturas de doble cadena que ocurre mediante una transesterificación en estos extremos del DNA (Lieber *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2002). Posteriormente, estos *hairpins* son abiertos de una forma imprecisa por una endonucleasa específica, Artemis. Debido a su actividad endonucleasa, algunos nucleótidos se eliminan mientras que otros son adicionados al azar por polimerasas con actividad transferasa terminal, como TdT o Pol μ . A su vez, dependiendo de la rotura generada, también pueden insertarse nucleótidos en estos puntos de rotura mediante polimerasas de dirección de molde, como Pol λ . Al final de todo este proceso, estas regiones codificantes tienen hasta 15 pares de bases extra. Las adiciones extra incluyen nucleótidos P (palindrómicos), formados por una apertura asimétrica del *hairpin* por Artemis, y adiciones N, generados mediante actividad transferasa terminal. Las secuencias comprendidas entre las regiones V, D y J codifican las regiones más variables de los receptores antígenicos (Friedberg *et al.*, 2006).

Una vez Artemis procede a la apertura del *hairpin* se pone en marcha toda la maquinaria de reparación de roturas de doble cadena por “reunión de extremos no homólogos” (NHEJ), que se detallará en la sección siguiente (Lieber *et al.*, 2003). El mecanismo de recombinación V(D)J no es más que una rotura programada en el DNA y por tanto una especialización de NHEJ (Figura I.5).

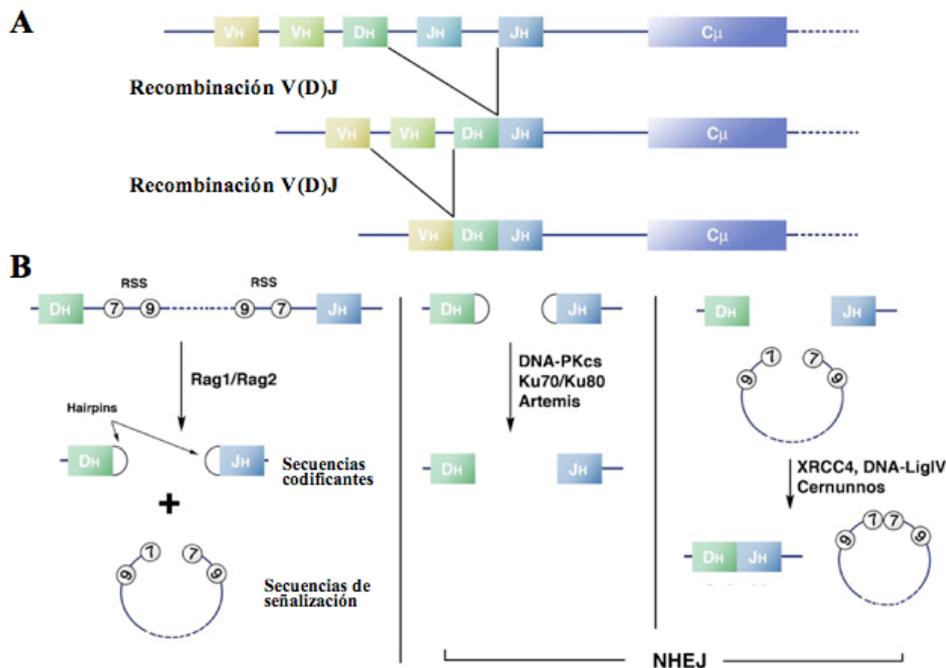


Figura I.5. Recombinación V(D)J. **A)** Representación esquemática del proceso de recombinación de los segmentos génicos codificantes en las inmunoglobulinas H (IgH). **B)** La reacción de recombinación V(D)J puede dividirse en tres pasos. El complejo RAG1/RAG2 introduce una rotura de doble cadena entre los segmentos VH y DH y sus secuencias de señalización (RSS). En las secuencias codificantes se forma un *hairpin* para evitar la degradación nucleolítica de los extremos. Artemis, que es reclutada y fosforilada por el complejo Ku/DNA-PK, abre los *hairpins*. Finalmente, los intermedios de recombinación son procesados como si fuesen roturas de doble cadena en el DNA, mediante la “reunión de extremos no homólogos” (NHEJ).

1.2.4.4. Polμ

Características estructurales de Polμ. Polμ fue identificada y caracterizada por primera vez en el laboratorio del Dr Luis Blanco en el año 2000 (Dominguez *et al.*, 2000). Polμ y TdT comparten una identidad de secuencia del 42% y la organización estructural de los dominios es también muy similar en ambas enzimas. Constan de un core catalítico similar a Polβ organizado en varios subdominios, y una región amino terminal en donde se localiza una serie de aminoácidos que sirven como señal para la localización nuclear, seguido de un dominio BRCT, implicado en la interacción proteína-proteína. Recientemente ha sido resuelta la estructura del BRCT de Polμ mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (MNR) (DeRose *et al.*, 2007). La comparación de esta estructura con el BRCT de TdT será clave en un futuro para aportar nuevas evidencias acerca del papel que desempeña Polμ *in vivo*.

Una característica estructural común con TdT es la presencia de un *loop*, el *Loop 1*, que al igual que en el caso de TdT, es imprescindible para su actividad transferasa terminal pero no para su actividad dependiente de molde, que incluso está incrementada en ausencia del *Loop* (Juarez *et al.*, 2006; Nick McElhinny *et al.*, 2005) En cuanto a sus propiedades bioquímicas, Polμ es una DNA polimerasa DNA-dependiente pero con actividad transferasa terminal (Dominguez *et al.*, 2000). Polμ es capaz de extender *in vitro* desapareamientos en la cadena *primer* y de llevar a cabo una síntesis translesiva. Polμ presenta una fidelidad de inserción muy baja, especialmente en presencia de iones Mn^{+2} como metal activador. La capacidad mutadora de Polμ se ve potenciada por la indiscriminada preferencia de inserción de deoxirribonucleótidos o de ribonucleótidos (Ruiz *et al.*, 2003). Esta capacidad también es compartida por TdT, como ya ha sido comentado en la sección anterior. Asimismo, Polμ es capaz de recolocar una cadena molde de modo que la entrada del nucleótido venga dirigida por otras posiciones que se encuentran alejadas del extremo del *primer* (Ruiz *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2001). Esta capacidad de dislocación se ve favorecida por la presencia de un grupo fosfato en posición 5' del *gap*, donde el dominio de 8 KDa encuentra el anclaje perfecto.

Recientemente ha sido resuelta la estructura cristalográfica de alta resolución del complejo ternario de Polμ. La proteína fue cristalizada interaccionando con DNA de doble cadena con un *gap* de un nucleótido, y el nucleótido entrante correspondiente (Moon *et al.*, 2007b). Esta estructura ha permitido comprobar especulaciones que previamente se habían hecho basadas en extrapolaciones al cristal de TdT. Así se ha podido ratificar que el *Loop 1* de Polμ, a diferencia del de TdT, es un *loop* móvil que puede y debe de ser apartado cuando hay una cadena *template*, y que probablemente cumple la misma función que en TdT sobre una cadena sencilla de DNA que actúa de *primer*.

Función de Polμ en la célula. Polμ se expresa en todas las células del organismo pero su expresión es mayoritaria en los órganos linfoides secundarios (nódulos linfáticos y bazo), a diferencia de TdT, que se expresa mayoritariamente en órganos linfoides primarios (Aoufouchi *et al.*, 2000; Dominguez *et al.*, 2000). No obstante, los ratones *knock out* Polμ son viables y no presentan inmunodeficiencias aparentes. No se ha determinado la función exacta de Polμ *in vivo*, pero parece clara su actuación en los mecanismos de recombinación V(D)J y en el mecanismo de reparación por NHEJ (Nick McElhinny y Ramsden, 2004; Bertocci *et al.*, 2006; Capp *et al.*, 2007).

La ruta de reparación por NHEJ es la vía principal de reparación de las roturas del doble cadena en el DNA en eucariotas. Las roturas de doble cadena en el DNA son especialmente problemáticas ya que al romperse las dos hebras hay peligro de que se

pierda parte de la información genética, o que se produzca una translocación. Las células han desarrollado dos mecanismos de reparación para evitar este problema: recombinación homóloga y la ruta de NHEJ (Jeggo *et al.*, 1995; Krejci *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 1995; Weaver, 1995). La reparación de roturas de doble cadena mediante el mecanismo de reunión de extremos no homólogos (NHEJ) es un tipo de reparación que ha sido conservado a lo largo de la evolución, y está presente desde bacterias hasta mamíferos. Conceptualmente este es un mecanismo simple: las roturas de doble cadena generadas en el DNA son juntadas de nuevo para ser ligadas y reparar así el daño. El problema se agrava si en la célula se produce más de una rotura, por lo que pueden ser unidos trozos del DNA que no deberían ser reunidos y dar lugar a reordenaciones cromosómicas (Hefferin y Tomkinson, 2005). La unión de factores proteicos específicos a los extremos dañados es el primer paso en NHEJ y sirve para evitar la degradación de nucleótidos en los extremos que resultaría en la pérdida de material genético. El paso clave en NHEJ es la yuxtaposición de los dos extremos del DNA. En el caso de existir complementariedad en las secuencias, la reparación es fácil, pero en el caso contrario, las proteínas que intervienen en el proceso han de actuar como puente de unión entre ambos extremos del DNA (Ma *et al.*, 2002; Wilson y Lieber, 1999).

Las proteínas conocidas implicadas en reparación por NHEJ en vertebrados son: Ku, DNA-PKcs, XRCC4 y Ligasa IV. Estudios genéticos y bioquímicos han determinado que el complejo Ku, un heterodímero formado por dos subunidades de 69 KDa y 83 KDa, es un factor de reparación esencial y muy abundante en la célula. La resolución de la estructura cristalográfica de Ku en complejo con DNA, reveló que el heterodímero tiene una forma toroidal con un agujero central donde se acomoda el dúplex de DNA. El interior de este anillo está cargado positivamente, permitiendo así una interacción con los grupos fosfato del DNA independiente de la secuencia. Este heterodímero es el primero en acudir a la zona de rotura de doble cadena del DNA. La forma de anillo le permite acomodar los dos extremos del DNA evitando la degradación nucleolítica y permitiéndole translocar en el DNA hacia posiciones más internas. Esta habilidad para translocar a lo largo del DNA ha demostrado ser ATP-independiente *in vitro* (Hefferin y Tomkinson, 2005). A continuación, una serie de serinas de Ku son fosforiladas por la quinasa DNA-PKcs y el complejo de ambas proteínas se le denomina DNA-PK (Gottlieb y Jackson, 1993). Ku es desplazado hacia el interior del DNA y las proteínas DNA-PKcs interaccionan entre sí para mantener unidas las dos secciones del DNA (Chen *et al.*, 2000; DeFazio *et al.*, 2002; Dynan y Yoo, 1998). A este complejo son reclutadas endonucleasas, como Artemis, para eliminar nucleótidos protuberantes en los extremos 5', dejando extremos romos o 3'-protuberantes (Moshous *et al.*, 2000). En un siguiente paso, el complejo Artemis-DNA-PKcs se disocia del sistema y, si las protuberancias 3' encuentran microhomología, el complejo Ku recluta a polimerasas y al complejo XRCC4-LigIV para sellar esos extremos. En caso de no haber complementariedad una polimerasa más específica como Pol μ es reclutada, que es capaz de generar adiciones independientes de molde que podrían crear cierta microhomología en los extremos protuberantes. En caso de existir unas cuantas bases apareadas las polimerasas proceden al relleno de los *gaps*. Una vez completadas las bases que faltan del DNA se procede a la ligación de los extremos mediante XRCC4-LigIV (Fig. I.6).

Ha sido publicado que Pol μ forma un complejo estable con los factores de *end joining* Ku y XRCC4-LigIV de una forma similar a como lo hace TdT. Este complejo facilita la habilidad de XRCC4-LigIV y Ku para unir extremos parcialmente complementarios *in vitro*. La unión a estas proteínas se hace mediante el dominio BRCT (DeRose *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008). Estos experimentos han permitido

implicar a Pol μ en procesos de reparación por NHEJ. Mientras que TdT parece implicada exclusivamente con el mecanismo de V(D)J, Pol μ tiene un papel tanto en V(D)J como en NHEJ. Ambos sistemas comparten una serie de proteínas, con las que se ha visto que Pol μ interacciona. El papel de Pol μ en V(D)J se restringe al proceso de recombinación VJ de las cadenas ligeras (κ) de las inmunoglobulinas. La deficiencia de Pol μ provoca deleciones a nivel de secuencias de estos segmentos génicos.

Otro papel propuesto para Pol μ la implica en el mecanismo de hipermutación somática. Este proceso consiste en una acumulación de mutaciones en la región variable de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas. Este proceso sirve para generar mayor variabilidad a nivel de los receptores de las inmunoglobulinas. La hipermutación somática no es observada en células que se encuentran en un estadio G1, donde se producen la mayoría de las roturas de doble cadena y donde ocurren por tanto mayor número reacciones de *end joining* en donde Pol μ se ve involucrada. Además, ha podido observarse como en ratones *knock out* Pol μ , la hipermutación somática sigue produciéndose y que por tanto la polimerasa es prescindible en este proceso. Son necesarias más investigaciones para descartar o confirmar la implicación de Pol μ en este proceso y, en el caso de verse implicada, si tiene que ver su actuación con la maquinaria de reparación por NHEJ o si, por el contrario, utiliza otra ruta de reparación.

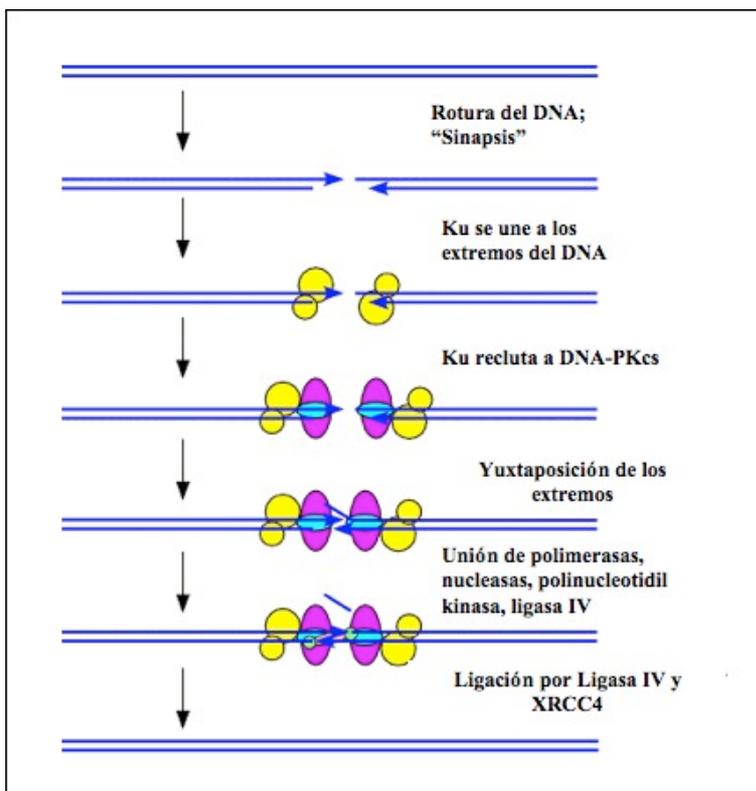


Figura I.6. Mecanismo de reparación por NHEJ. Este mecanismo repara las roturas de doble cadena que se producen en el DNA. El heterodímero Ku es el primer factor proteico que reconoce los extremos del DNA y se une a ellos. A continuación se recluta la DNA-PKcs, que produce un acercamiento físico entre los extremos del DNA. Finalmente son reclutadas toda una serie de proteínas: polimerasas, nucleasas, ligasas... que procesan y sellan la rotura en el DNA.

I.2.5. NHEJ en organismos procarióticos

Hasta hace pocos años estaba ampliamente aceptado que el sistema de reparación por NHEJ estaba ausente en procariotas y en arqueas. Sin embargo, hoy en día existen evidencias de que esta afirmación no es correcta y que la reparación de roturas de doble cadena en el DNA de procariotas puede ser llevada a cabo mediante el mecanismo de NHEJ (Pitcher *et al.*, 2007a). Genes ortólogos al que codifica la proteína Ku humana, importante para la reparación de roturas de DNA de doble cadena, han sido identificados en muchas especies bacterianas. Análisis filogenéticos han revelado además familias distintas de DNA ligasas bacterianas ATP-dependientes (Aravind y Koonin, 2001; Doherty *et al.*, 2001; Weller y Doherty, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001). Una de estas familias es muy cercana a la de las ligasas de las arqueas y está genéticamente asociada en el mismo operón que codifica la proteína Ku (Aravind y Koonin, 2001; Doherty *et al.*, 2001; Weller y Doherty, 2001). Estas ligasas bacterianas han sido identificadas en organismos como *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las ligasas bacterianas están formadas por varios dominios asociados al dominio ligasa: un dominio polimerasa/primasa y un dominio nucleasa. El dominio polimerasa de LigD, Pol Dom, pertenece a la familia de primasas arqueo-eucariotas (AEPs) (Della *et al.*, 2004; Iyer *et al.*, 2005; Lao-Sirieix *et al.*, 2005). Este dominio tiene propiedades similares a otras nucleotidiltransferasas, pero muestra una gran flexibilidad de sustratos, capacidad de generar distorsiones del *template* y capacidad de producir realineamientos del *primer* (Pitcher *et al.*, 2007b). Las propiedades bioquímicas reunidas en LigD son fundamentales para la actuación de esta proteína en el mecanismo de reparación de roturas de doble cadena en el DNA por reunión de extremos no homólogos.

El sistema de reparación de roturas de doble cadena en organismos procarióticos requiere únicamente la presencia de dos componentes (Ku y LigD) que, a pesar de su relativa simplicidad, poseen las propiedades necesarias para proceder al reconocimiento, procesamiento y ligación de la lesión. *Mt-Ku* y *Mt-LigD* expresados en *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de reconstruir un sistema de reparación *in vivo*, sugiriendo que el sistema de reparación en bacterias es mucho más simple que en el mecanismo equivalente en humanos (Della *et al.*, 2004).

Recientemente se ha obtenido la estructura cristalográfica del dominio polimerasa de LigD (PolDom) en un complejo sináptico con otro monómero y DNA de doble cadena con una protuberancia 3' (Brissett *et al.*, 2007). Este descubrimiento aporta un importante avance en la comprensión del mecanismo de reparación de roturas de doble cadena en el DNA, no solo de organismos procarióticos, sino también de eucarióticos, ya que la simplicidad de los organismos inferiores es fundamental para la comprensión de mecanismos más complejos.

I.2.6. Análisis comparativo

A la familia X pertenecen polimerasas implicadas en la síntesis de pequeños segmentos de DNA, y por ello se han especializado en funciones diversas como la reparación o la generación de variabilidad. Como se muestra en la Tabla I.2, un amplio rango de actividades y características funcionales se combinan en las cuatro PolX humanas para cubrir gran parte de las necesidades de la célula. Esta tesis está centrada en las actividades bioquímicas de la DNA polimerasa mu (Pol μ), así como su comparación con las actividades de TdT, con la que comparte una mayor identidad de secuencia.

Tabla I.2. Propiedades comparativas de las cuatro polimerasas de la familia X presentes en humanos.

	Pol β	Pol λ	Pol μ	TdT
Especificidad de sustrato:				
- Relleno de gaps	Sí	Sí	Sí	No
- Dependencia de molde	Sí	Sí	Sí	No
- Independencia de molde	No	No	Sí	Sí
Actividades adicionales y dominios específicos:				
- dRP liasa	Sí	Sí	No	No
- Transferasa terminal	No	No	Sí	Sí
-Dominio Ser/ Pro	No	Sí	No	No
- BRCT	No	Sí	Sí	Sí
- Loop 1	No	Sí	Sí	Sí
Reparación de DNA:				
- BER	Sí	Sí	No	No
- NHEJ	No	Sí	Sí	No
- V(D)J	No	Sí	Sí	Sí

A lo largo de esta tesis doctoral se describe un análisis mutacional del centro activo de Pol μ y el efecto de estas mutaciones en las propiedades bioquímicas de este enzima. Este análisis ha permitido determinar cuáles son los residuos claves para actividades presentes en la polimerasa, como su actividad transferasa terminal, además de permitir conocer cuál es el paso limitante en esta actividad. Posteriormente se procedió a un análisis comparativo de las actividades transferasa terminal de TdT y Pol μ en cuanto a la extensión de extremos 3'-protuberantes. Además se llevaron a cabo estudios de interacción entre Pol μ y PCNA para ampliar los estudios que previamente han implicado a Pol μ en mecanismos de tolerancia al daño en el DNA existentes en la célula, como es la síntesis translesión. Por último, ampliamos el estudio de NHEJ humano con el estudio de una polimerasa implicada en esta ruta en bacterias.

Objetivos

En esta tesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- Análisis bioquímico del centro activo de Pol μ mediante la identificación y mutagénesis de residuos funcionalmente importantes en la síntesis de DNA dependiente o independiente de molde.
- Análisis comparativo de las actividades transferasa terminal de TdT y Pol μ sobre sustratos de DNA de cadena simple, DNA con extremos romos y DNA con extremos 3'-protuberantes.
- Evaluar las diferencias entre Pol μ y TdT en el contexto de la ruta de reparación de roturas de doble cadena en el DNA mediante reunión de extremos no complementarios.
- Estudio de la posible interacción de Pol μ con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), proteína implicada en mecanismos de tolerancia al daño en el DNA.
- Análisis bioquímico comparativo entre Pol μ y el dominio polimerasa de LigD de *Mycobacterium*.

Materiales y Métodos

M.1. Materiales	23
M.2. Construcción y purificación de los mutantes de Polμ humana	23
M.3. Construcción y purificación de transferasa terminal humana	24
M.4. Construcción y purificación de PCNA humano	24
M.5. Ensayos de síntesis de DNA por Polμ	25
M.5.1. Ensayos de polimerización independiente de molde (actividad transferasa terminal)	25
M.5.2. Ensayos de polimerización dependiente de molde	26
M.6. Ensayos de interacción de Polμ con DNA	27
M.6.1. Ensayos de retraso en gel	27
M.6.2. Ensayos de filtración en nitrocelulosa	27
M.7. Ensayos de interacción proteína-proteína	27
M.7.1. Gradiente de glicerol	27
M.7.2. Ensayo de cambio de movilidad electroforética de PCNA	28
M.7.3. Far-western PCNA-Polμ	28

Materiales y métodos

M.1. Materiales

Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Isogen (Ijsselstein, Holland). Los oligonucleótidos descritos a continuación fueron purificados por PAGE y empleados para generar sustratos en los ensayos bioquímicos:

P15 (5'-TCTGTGCAGGTTCTT)
T32 (5'-TGAAGTCCCTCTCGACGAAGAACCTGAACAGA)
D16OH (5'-GTCGAGAGGGACTTCA)
D16P (5'-GTCGAGAGGGACTTCA)
D15OH (5'-TGTCGAGAGGGACTTCA)
D15P (5'-TGTCGAGAGGGACTTCA)
PoliT21 (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT)
PoliA21 (5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA)
T19 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGG)
T20 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGGT)
T21 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGGTT)
T22 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGGTTT)
T23 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGGTTTT)
T24 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGGTTTTT)
T26 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGGTTTTTTT)
T28 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGGTTTTTTTTT)
T30 (5'-CGCAAGTCAGCGCTACGGGTTTTTTTTTTT)
D19OH (5'-CCCGTAGCGCTGACTTGCG)
D19P (5'-CCCGTAGCGCTGACTTGCG)

Los nucleótidos (dNTP), dideoxinucleótidos (ddNTP) y los nucleótidos marcados ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ NTP, 3000 Ci/mmol) fueron obtenidos de GE Healthcare (USA). Las enzimas polinucleótido quinasa de T4 y la proteína quinasa A son de New England Biolabs (Beverly, MA, USA). La DNA polimerasa Pfu se obtuvo de Promega Corporation (Madison, WI, USA).

M.2. Construcción y purificación de los mutantes de Pol μ humana

Mutagénesis dirigida (*QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit*, Stratagene, USA) fue llevada a cabo sobre el plásmido de sobreexpresión de Pol μ (pRSETA-hPol μ). Los oligonucleótidos empleados para la mutagénesis dirigida fueron: **K325s** (5'-TTCCGCAGGGGGGCGTTGCAGGGCCAT) y su complementario para generar la mutación K325A; **H329s** (5'-AAGTTGCAGGGCGGAGACGTGGACTTC) y su complementario para generar la mutación H329G; **R387s** (5'-GACGCTTTTGAGAAGAGTTTCTGCATT) y su complementario para generar la

mutación; **R387s2** (CACGCTTTTGAGCGAAGTTTCTGCATT) y su complementario para generar la mutación R387A; **K438s1** (5'-TGGACTGGCTCCCGGCTTTTCCAGCGG) y su complementario para generar la mutación K438R; **K438s2** (5'-TGGACTGGCTCCGACCTTTTCCAGCGG) y su complementario para generar la mutación K438A; **K438s3** (5'-TGGACTGGCTCCGACCTTTTCCAGCGG) y su complementario para generar la mutación K438D; **Pol μ ^{QKFF}** (5'-CCATGGGCTGTTTGACCCGGAGGCGGCGACAGCTGCCCAAGCGGCTTCAGAGGAAGAC) para generar el mutante cuádruple de Pol μ .

Todos los genes mutantes fueron secuenciados para comprobar que las mutaciones habían sido generadas correctamente. A continuación los plásmidos fueron transformados en *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Para la sobreexpresión de proteínas se crecieron 3 litros de cultivo de estas células en medio LB, inoculadas con una dilución 1/100 de un cultivo nocturno. Este cultivo se creció a 30°C hasta una DO de 0,6 a 595 nm. A continuación se añadió IPTG 0,5 mM, y tras 20 minutos de inducción se añadió rifampicina a 120 μ g/mL y se prosiguió con la incubación a 30°C durante 2 horas. Las células se recogieron por centrifugación (2000g, 20 min), se pesaron y congelaron a -80°C.

Los mutantes sobreproducidos de este modo resultaron solubles y fueron purificados del mismo modo que se ha descrito para Pol μ wt (Dominguez *et al.*, 2000).

M.3. Construcción y purificación de transferasa terminal humana

El clon de TdT humana fue adquirido de ATCC LGC-Promochem (Catalog No. 6487524, IMAGE: 4509721) en el vector pCMV-SPORT6. Fue clonado en pET16b usando directamente las dianas de restricción NcoI y XhoI presentes en ambos vectores. TdT fué sobreexpresada en *E. coli* BL21pLysS y purificada siguiendo exactamente el mismo protocolo aplicado a Pol μ (Dominguez *et al.*, 2000).

M.4. Construcción y purificación de PCNA humano

El clon de PCNA humano fue adquirido de ATCC LGC-Promochem (IMAGE: 2820036) en el vector pOTB7. El gen de PCNA fue amplificado por PCR y clonado en pGEM. pGEM-PCNA fue digerido con las enzimas de restricción AflIII y BamHI, y clonado entre las dianas NcoI y BamHI del vector de sobreexpresión pET16b. Este vector fue transformado en *E. coli* BL21. Tras una inducción con IPTG (1 mM) las células *E. coli* que expresaron PCNA humano fueron lisadas manualmente con dos volúmenes de alúmina durante 20 minutos a 4°C para proceder a su purificación. El método seguido de purificación de PCNA fue una modificación del realizado por Hübscher y colaboradores (Schurtenberger *et al.*, 1998). El lisado resultante se recogió con dos volúmenes de tampón A suplementado con NaCl 0,5M y se centrifugó a 1500xg durante 5 min para eliminar la alúmina y los restos celulares. En un posterior paso de centrifugación a 15000xg durante 20 min se separó la fracción insoluble del extracto soluble. El DNA presente en este extracto soluble se eliminó mediante la precipitación con 0,3% polietiliminina (Sigma) y posterior sedimentación por centrifugación a 12000xg durante 10 min. La fracción proteica del sobrenadante anterior se precipitó selectivamente con sulfato amónico hasta alcanzar una concentración de 0,4 g/mL. En estas condiciones la mayor parte de PCNA precipitaba. Este precipitado fue resuspendido en Tampón A (20 mM TrisCl pH7.7, 1 mM BME, 0.5

mM EDTA) y suplementado con 50 mM de NaCl. Esta solución se cargó en una columna Q sepharosa de 20 mL y la proteína fue eluida mediante un gradiente de NaCl entre 200 y 1000 nM. Las fracciones recogidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y las fracciones que contenían mayor cantidad de PCNA fueron precipitadas con sulfato amónico hasta alcanzar una concentración de 0,4 g/mL. A continuación se repitió este mismo proceso con una segunda columna de Q sepharosa de 10 mL eluyéndose la proteína en un gradiente de NaCl entre 200 y 500 nM.

M.5. Ensayos de síntesis de DNA por Pol μ

M.5.1. Ensayos de polimerización independiente de molde (actividad transferasa terminal). Los oligonucleótidos empleados para evaluar la actividad transferasa terminal fueron: PoliT21, PoliA21, T19, T20, T21, T22, T23, T24, T26, T28, T30 y D19.

PoliT21, PoliA21, T19, T20, T21, T22, T23, T24, T26, T28 y T30 fueron marcados radioactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P] ATP y T4 polinucleótido quinasa. El oligonucleótido T19 marcado fue hibridado con D19OH o D19P frío para generar un sustrato de DNA de doble cadena con extremos romos. Para generar los extremos 3'-protuberantes fueron hibridados T20, T21, T22, T23, T24, T26, T28 y T30 marcados con D19P o D19OH frío. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ L en presencia de 1 mM de MnCl $_2$ y en la mezcla de reacción (MR) 50 mM Tris HCl (pH 7,5); 1 mM DDT; 4% glicerol; 0,1 mg/mL BSA. La concentración de DNA, nucleótidos y proteína es la indicada en cada experimento. Tras una incubación de 30 min a 30°C, las reacciones se pararon añadiendo tampón de carga (95% de formamida; 10 mM EDTA; 0,1% xilencianol; 0,1% azul de bromofenol). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior autorradiografía.

Para cuantificar la actividad transferasa terminal bajo condiciones de estado estacionario se llevaron a cabo las reacciones de polimerización en un volumen 20 μ L en presencia de 1 mM de MnCl $_2$ y en la mezcla de reacción (MR) 50 mM Tris HCl (pH 7,5); 1 mM DDT; 4% glicerol; 0,1mg/mL BSA. La concentración de DNA (PoliT21) en el ensayo fue de 1 μ M y la de proteína de 200 nM. El nucleótido [α - 32 P] NTP utilizado fue titulado en un amplio rango de concentraciones (10 – 1000 nM). Después de ser incubadas las reacciones durante 30 min a 30°C, éstas fueron paradas con 50 μ L EDTA 0,5 M. Las muestras fueron filtradas a través de columnas de Sephadex G-25 (Roche). La radiación Cerenkov fue cuantificada mediante contador de centelleo. Los datos fueron ajustados mediante una curva de regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = V_{\max} [dNTP] / (K_m + [dNTP])$$

Los valores de V_{\max} y K_m se pudieron determinar a partir de las curvas ajustadas. Los valores de constante catalítica (K_{cat}) y eficiencia catalítica (Cat Eff) fueron calculados a partir de las siguientes ecuaciones:

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [\text{enzima}]; \text{ Cat Eff} = K_{\text{cat}} / K_m$$

Para estudiar la velocidad de cada ciclo catalítico en DNA de cadena simple bajo condiciones de estado estacionario, se usó el oligonucleótido PoliT21 (1 μ M) y

dideoxinucleótidos (ddTTP, 100 μ M). Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ L y en la mezcla de reacción 50 mM Tris HCl (pH 7,5); 1 mM DDT; 4% glicerol; 0,1mg/mL BSA. La mezcla fue suplementada con Mn^{+2} (1 mM) y la proteína correspondiente en cada caso a una concentración de 200 nM (Pol μ wt, Pol μ R387K). Las reacciones fueron paradas a diferentes tiempos (indicados en las correspondientes Figuras) mediante tampón de carga (95% de formamida; 10 mM EDTA; 0,1% xilen-cianol; 0,1% azul de bromofenol), y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (8M urea/ 20%). Los productos extendidos fueron cuantificados por *Phosphorimager*. Los datos fueron ajustados mediante una curva de regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten (descrita arriba).

M.5.2. Ensayos de polimerización dependiente de molde. El oligonucleótido usado como *primer* (P15) fue marcado radioactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P] ATP y T4 polinucleótido quinasa. Para crear los sustratos de DNA con un *gap*, P15 fue hibridado a los oligonucleótidos T32 y D16P, D16OH (*gap* de un nucleótido), D15P y D15OH (*gap* de dos nucleótidos) en presencia de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 0,3 M NaCl. Para analizar la polimerización dependiente de *template*, el sustrato de DNA fue incubado con Pol μ wt o con las proteínas mutantes a la concentración indicada en cada caso. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ L en MR (50 mM Tris HCl (pH 7,5); 1 mM DDT; 4% glicerol; 0,1 mg/mL BSA) con una concentración de DNA de 5 nM y de nucleótido a una concentración indicada para cada caso. Las reacciones fueron activadas con Mg^{+2} (3 mM) y se incubaron por un tiempo de 30 min a 30°C. Los productos extendidos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior autorradiografía. Los datos fueron ajustados mediante una curva de regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

Para hacer el análisis de la procesividad de Pol μ se construyó un sustrato mediante la hibridación del oligonucleótido P15, marcado radiactivamente, con el oligonucleótido *template* T32. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ L en MR (50 mM Tris HCl (pH 7,5); 1 mM DDT; 4% glicerol; 0,1mg/mL BSA) con una concentración de DNA de 5 nM y de nucleótido a 100 μ M. La concentración de proteína utilizada es la que está indicada en cada experimento. Las reacciones se incubaron por un tiempo de 30 min a 30°C. Los productos extendidos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% y urea 8 M y posterior autorradiografía.

El análisis cinético de la incorporación de dCTP sobre un sustrato de DNA de doble cadena con un *gap* de dos nucleótidos en condiciones de estado estacionario se realizó usando un sustrato generado mediante la hibridación del oligonucleótido P15 (marcado radiactivamente) a T32 y posteriormente a D16OH o D16P. Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ L en mezcla de reacción (50 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM DTT; 4% glicerol; 0,1 mg/mL BSA). La concentración de DNA marcado fue de 200 nM y la de proteína fue de 30 nM. La reacción fue activada con $MgCl_2$ (3 mM). Para fijar las condiciones de estado estacionario se añadió una concentración saturante de dCTP (100 μ M) y varias concentraciones de proteína. Se realizaron ensayos a distintos tiempos de reacción para obtener una cantidad de *primer* extendido no superior al 30% del total. Bajo las condiciones así seleccionadas (30 nM de proteína y 30 minutos de reacción), la velocidad de la reacción se representó en función de la concentración de dGTP (de 0,1 a 100 μ M). Los datos fueron ajustados mediante una curva de regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten.

M.6. Ensayos de interacción de Pol μ con DNA

M.6.1. Ensayos de retraso en gel. El oligonucleótido usado como *primer* (P15) fue marcado radioactivamente en su extremo 5' con [γ - 32 P] ATP y T4 polinucleótido quinasa. Para crear los sustratos de DNA con un *gap* de un nucleótido, P15 fue hibridado a los oligonucleótidos T32 y D16 en presencia de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 0,3 M NaCl. Las reacciones se llevaron a cabo en 20 μ L en presencia de 50 mM Tris HCl (pH 7,5); 1 mM DDT; 4% glicerol; 0,1mg/mL BSA; 4 nM de sustrato de DNA marcado y la concentración indicada de proteína en cada caso. Tras una incubación de 10 min a 30°C, se añadió glicerol a las muestras hasta una concentración final del 10% y a continuación se las sometió a una separación electroforética a 4°C en geles de poliacrilamida al 4%, en tampón de retraso (TAE 1x) a 180 V durante una hora y 30 min. A continuación el gel fue transferido a papel Whatman, secado y revelado mediante autorradiografía.

M.6.2. Ensayos de filtración en nitrocelulosa. Los oligonucleótidos usados como *primers* (PoliT21, T19, T21, T22 y T26) fueron marcados radioactivamente con [γ - 32 P] ATP y T4 polinucleótido quinasa. Para crear los sustratos de DNA de doble cadena con extremos romos y 3'-protuberantes, T19, T21, T22 y T26 fueron hibridados con D19 en presencia de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) y 0,3 M NaCl. Para evitar la presencia de *primer* no hibridado los complejos fueron purificados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (15%).

El análisis de la interacción de Pol μ y TdT con PoliT21 y con los complejos de DNA con extremos romos y 3'-protuberantes se realizó incubando los sustratos de DNA (5 nM) con cada una de las proteínas durante 10 min a 22°C en tampón de unión (50 mM Tris HCl pH 8,0; 25 mM NaCl; 1 mM DTT). A continuación fueron filtrados en filtros de nitrocelulosa utilizando una presión de vacío constante y suave. Los filtros de nitrocelulosa fueron obtenidos de Millipore en discos de 25 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0,65 μ m.

Para evitar la retención de DNA de cadena sencilla los filtros fueron prelavados durante 20 min en KOH (0,5M) seguido de varios lavados en agua MilliQ hasta obtener un pH neutro (Wong y Lohman, 1993). Seguidamente los filtros fueron equilibrados en tampón de unión (50 mM Tris HCl pH 8,0; 25 mM NaCl; 1 mM DTT) al menos durante una hora antes de ser usados. Para que las muestras fluyesen a través de los filtros de nitrocelulosa fue aplicado vacío mediante una bomba de succión. Inmediatamente después de haber pasado las muestras (200 μ L) los filtros fueron lavados con 100 μ L de tampón de unión para evitar la retención inespecífica de DNA al filtro. La radioactividad retenida en el filtro, indicativa de la cantidad de DNA unido a la proteína, fue cuantificada mediante *Phosphorimager*.

M.7. Ensayos de interacción proteína-proteína

M.7.1. Gradiente de glicerol. La interacción entre Pol μ y PCNA se analizó mediante la técnica de ultracentrifugación en un gradiente de glicerol. Las muestras concentradas mediante filtración y centrifugación hasta 7,81 μ M de Pol μ y 7,14 μ M de PCNA fueron dializadas en un tampón que contenía 100 mM NaCl, 2 mM BME, 0,1 mM EDTA y TrisHCl a pH 7,7. Las muestras fueron aplicadas en un volumen de 200 μ L sobre 5 mL de solución (30-15% glicerol, 20 mM TrisHCl; 200 mM NaCl; 1 mM DTT; 1 mM

EDTA). A continuación las muestras fueron ultracentrifugadas a 62000 rpm durante 24 horas y a 4°C. Por último, alícuotas de 200 µL fueron recogidas y examinadas por geles SDS-PAGE y teñidas con azul de Comasie.

M.7.2. Ensayo de cambio de movilidad electroforética de PCNA. Para ensayos de interacción entre Polµ y PCNA en geles de retraso, el PCNA fue marcado con [γ - 32 P] ATP mediante la acción de la proteína quinasa A (New England Biolabs, Cambridge, USA) en la secuencia RRASL (Kelman *et al.*, 1995). La interacción entre Polµ y [32 P]PCNA se analizó en una mezcla de reacción que contenía 50 mM Tris HCl pH 8,0; 25 mM NaCl; 1 mM DTT. Tras una incubación de 10 min a 30°C, se añadió glicerol a las muestras hasta una concentración final del 10% y a continuación se las sometió a una separación electroforética a 4°C en geles de poliacrilamida al 4%, en tampón de retraso (TAE 1x) a 180 V durante una hora y 30 min. A continuación el gel fue transferido a papel Whatman, secado y revelado mediante *Phosphorimager*.

M.7.3. Far-western PCNA-Polµ. 3 µL de proteínas purificadas a una concentración de 50 nM fueron depositados en una membrana de nitrocelulosa. Tras un secado de la membrana de 15 min a 22°C, la membrana fue bloqueada con PBST (tampón fosfato salino) suplementado con 5% de leche durante 1 h. A continuación la membrana fue lavada con PBST y sumergida en una mezcla de reacción 1x (50 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM DTT; 4% glicerol) suplementada con [32 P]PCNA (200 nM). Tras una incubación a 30°C durante 30 min, la membrana se lavó tres veces con un volumen de 10 mL en cada lavado con PBST. A continuación la membrana fue secada y analizada mediante *Phosphorimager*.

Resultados

Capítulo 1

Análisis mutacional del centro activo de Polμ

1.1. Residuos del centro activo de Polμ importantes para la actividad del enzima	31
1.2. Mutagénesis del centro activo de Polμ	32
1.3. Obtención de los mutantes.....	33
1.4. Reacciones dirigidas por molde con mutantes del centro activo de Polμ	33
1.5. Reacciones independientes de molde con mutantes del centro activo de Polμ	35
1.6. Ensayos de unión a DNA de doble cadena y DNA de cadena sencilla	39
1.6.1. Interacción de las proteínas mutantes con un <i>gap</i> de dos nucleótidos en el DNA	39
1.6.2. Interacción de las proteínas mutantes con DNA de cadena sencilla (PoliT)	40
1.7. Factores que afectan a la actividad transferasa terminal de Polμ	40
1.8. Conclusiones	41

1.1. Residuos del centro activo de Pol μ importantes para la actividad del enzima

En vertebrados, la familia X está representada por cuatro polimerasas de pequeño tamaño (30-60 KDa): Pol μ , Pol β , Pol λ y TdT (Moon *et al.*, 2007b). Su principal papel en la célula es el relleno de pequeños *gaps* durante procesos de reparación del DNA (Ramadan *et al.*, 2004). En plantas (*Arabidopsis thaliana*), en eucariotas inferiores (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), y en algunos virus, solo hay un miembro presente en su genoma. Sorprendentemente no hay ningún miembro de las PolX presente en los dos invertebrados modelo *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*.

TdT es la única polimerasa de la familia X capaz de incorporar nucleótidos con total independencia de molde (Kato *et al.*, 1967). Pol μ es el miembro más especial de la familia, ya que tiene la dualidad de poder utilizar la dependencia de molde, o bien su actividad transferasa terminal cuando sea requerida (Dominguez *et al.*, 2000; Juarez *et al.*, 2006). El alto grado de similitud (42%) entre las secuencias de TdT y Pol μ nos facilitó el diseño y selección de una serie de mutantes del centro activo de Pol μ , con el objetivo de analizar la implicación de esos residuos en su actividad dependiente o independiente de molde.

En la Figura 1.1 se muestra un alineamiento, a nivel de secuencia de aminoácidos, de Pol μ , TdT, Pol λ y Pol β humanas en la región del centro activo de polimerización.

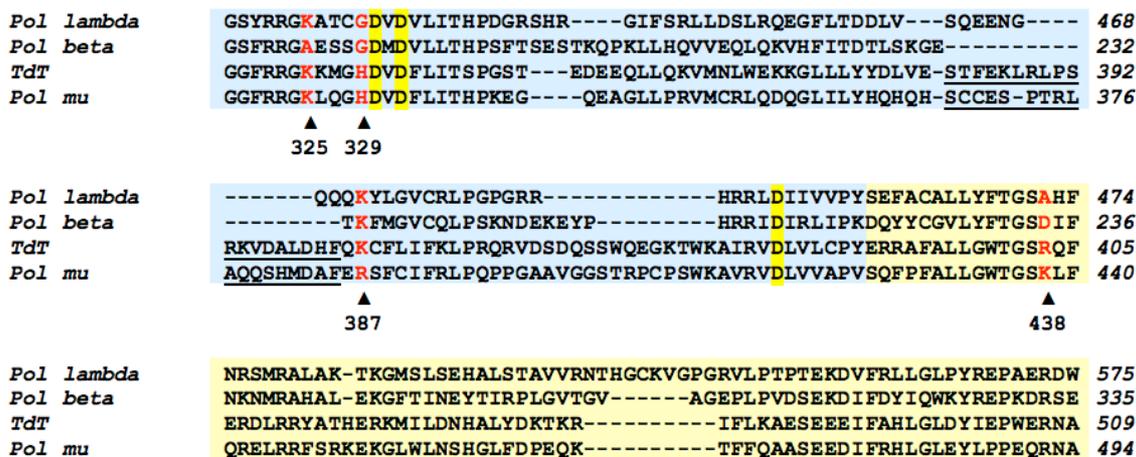


Figura 1.1. Alineamiento de la región del centro activo de las polimerasas humanas de la Familia X. En azul está señalada parte del subdominio palma y en amarillo el subdominio pulgar. Los aminoácidos subrayados corresponden a la región del *Loop 1* descrita en Pol μ y TdT. Los aspárticos catalíticos están señalados en amarillo y los aminoácidos mutados en este estudio marcados en rojo. La posición correspondiente a la Pol μ humana está indicada en cada caso.

1.2. Mutagénesis del centro activo de Polμ

El análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de las distintas polimerasas de la familia X permitió identificar en Polμ aquellos aminoácidos que parecían ser más relevantes para la función de la proteína. Fue entonces cuando se procedió a mutagenizarlos para determinar cuál era la implicación directa de estos residuos en las distintas actividades que desempeña Polμ. Una descripción más pormenorizada de cada residuo se presenta a continuación:

K325 es un residuo conservado en Polμ, Polλ (K422) y TdT (K338) de vertebrados (Fig 1.1). En Polβ esta posición está ocupada por una alanina (A185), también muy conservada en las distintas especies de vertebrados. Estudios cristalográficos de los complejos ternarios disponibles de las polimerasas de la familia X, han mostrado una interacción de este residuo con el nucleótido entrante (García-Díaz *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2007a). En Polμ, el residuo K325 podría también estar interaccionando con el nucleótido, por lo que el cambio a Ala aportaría información de la implicación directa de este residuo en la actividad dependiente o independiente de molde de la polimerasa. La mutación de este residuo, cargado positivamente en Polμ, a un residuo neutro podría reducir la interacción con el nucleótido (perdiéndose la interacción a través de sus grupos fosfato), aunque no es descartable que pudiera generar cambios en la arquitectura del centro activo de la polimerasa que cambiasen la eficiencia catalítica de la proteína.

H329 es un residuo sólo presente en Polμ y TdT (H342); tanto en Polλ como en Polβ es una glicina (G426 y G189, respectivamente) (Fig 1.1). La estructura cristalográfica de TdT en un complejo binario con nucleótido o con DNA no aportaba evidencia de la función que podría cumplir este residuo en la proteína (Delarue *et al.*, 2002), pero al estar conservado en las dos únicas polimerasas de la familia que poseen una actividad transferasa terminal se supuso que podría ser un residuo implicado directamente en esta actividad. Se decidió mutarlo a Gly, como Polλ y Polβ.

R387 es un residuo que está conservado en Polμ de vertebrados pero que en el resto de las polimerasas de la familia es una lisina (K) (Fig 1.1). Las estructuras cristalográficas ternarias de Polβ y Polλ han demostrado que este residuo (Polβ K234; Polλ K472) interacciona con la cadena *template*, en la región “*upstream*” respecto al extremo del *primer* (García-Díaz *et al.*, 2004). En la estructura cristalográfica binaria de TdT con DNA de cadena simple, este residuo (K403) se encuentra muy próximo al DNA (Delarue *et al.*, 2002). Al ser este un residuo que podría interaccionar con la cadena *template*, como ocurre en Polλ y Polβ, y estar en el centro activo, pensamos que sería interesante analizar su implicación en condiciones de transferasa terminal, tanto sobre sustratos de cadena sencilla (sin una cadena *template* con la que este residuo pudiese interaccionar) como sobre sustratos de cadena doble con protuberancias 3' de diferente longitud. Se procedió a mutar la R387 de Polμ a lisina (K), como el resto de las polimerasas de la familia, o bien a alanina (A), un aminoácido neutro y sin carga.

K438 es un aminoácido que no está conservado entre las polimerasas de la familia X, y tampoco lo está dentro de Polμ en las diferentes especies de vertebrados. Este residuo en Polβ es un aspártico (D276), en Polλ una Alanina (A510) y en TdT una arginina (R454) (Fig 1.1). Estudios cristalográficos demuestran que este residuo interacciona con la base del nucleótido entrante en todas las polimerasas de la familia, así que se decidió hacer los cambios a cada uno de los residuos presentes en las otras polimerasas para probar si había un cambio en la actividad/especificidad de Polμ al modificar el grado de interacción con el nucleótido. En TdT este residuo es una

arginina, así que la mutación en Pol μ de K a R podría mejorar la actividad transferasa terminal, debido a una interacción más fuerte con el nucleótido. Los cambios al residuo equivalente en Pol β (D) y Pol λ (A) se hicieron para probar si mejoraba la eficiencia en la polimerización dirigida por molde. En Pol β , la mutación a ácido glutámico causa un aumento de 25 veces la eficiencia catalítica en ensayos de relleno de *gaps*. Por el contrario, la fidelidad del enzima disminuye otras tantas veces, ya que al ser un residuo que interacciona con la base del nucleótido entrante, influye en la selección del nucleótido (Skandalis y Loeb, 2001).

1.3. Obtención de los mutantes

El gen de Pol μ humana se encuentra clonado en el vector pRSETa. Este vector permite la expresión de genes heterólogos en *E. coli* con una elevada eficiencia. Los mutantes de Pol μ descritos en este capítulo se construyeron mediante mutagénesis dirigida del plásmido pRSETa-Pol μ . Para ello se usó el método de mutagénesis dirigida de QuickChange (Stratagene, California, EEUU), utilizando los *primers* descritos en Materiales y Métodos para cada uno de los mutantes.

Para producir la proteína recombinante, las construcciones pRSETa-Pol μ con los distintos mutantes fueron transformadas en *E. coli* BL21(DE3)pLys. Estas células contienen el gen de la RNA polimerasa del fago T7 expresada bajo el control del promotor *lacUV5* y un plásmido que expresa de manera constitutiva la lisozima de T7. La expresión de la RNA polimerasa de T7 es necesaria para la transcripción de los genes heterólogos clonados en pRSET, mientras que la presencia de lisozima reduce, mediante bloqueo de la RNA polimerasa de T7, la expresión basal de dichos genes. En presencia de IPTG se induce la expresión de la RNA polimerasa de T7 y por tanto la expresión del gen heterólogo clonado en el vector pRSETa. De esta manera se consiguen elevados niveles de proteína recombinante en poco tiempo tras añadir IPTG al medio de cultivo de células *E. coli*. BL21(DE3)pLys. Estas proteínas mutantes, solubles y expresadas en gran cantidad, se purificaron hasta homogeneidad en una serie de pasos de precipitación fraccionada con sulfato amónico y cromatografía con diferentes matrices (fosfocelulosa y heparina).

Las proteínas mutantes purificadas se analizaron en ensayos de actividad dependientes e independientes de molde para probar la importancia de estos residuos en la actividad del enzima, como se describe en las secciones siguientes.

1.4. Reacciones dirigidas por molde con mutantes del centro activo de Pol μ

Pol μ presenta *in vitro* una actividad polimerasa dependiente de molde más activa cuanto más pequeño es el *gap*, con un óptimo entre uno y dos nucleótidos (Dominguez *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2001). La fuerte actividad mutadora de Pol μ sobre estos sustratos, reside en su capacidad de crear o aceptar distorsiones de distinto tipo sobre las moléculas de DNA (Zhang *et al.*, 2001). En ensayos con moléculas de tipo “*template/primer*” o en *gaps* mayores de un nucleótido Pol μ puede distorsionar/dislocar la molécula *template*, generando sustituciones y deleciones de bases (Ruiz *et al.*, 2004). Esta capacidad de dislocación supone la base para la extensión de *primers* mal apareados o para estabilizar intermedios de NHEJ del tipo roturas del DNA con micro-homologías.

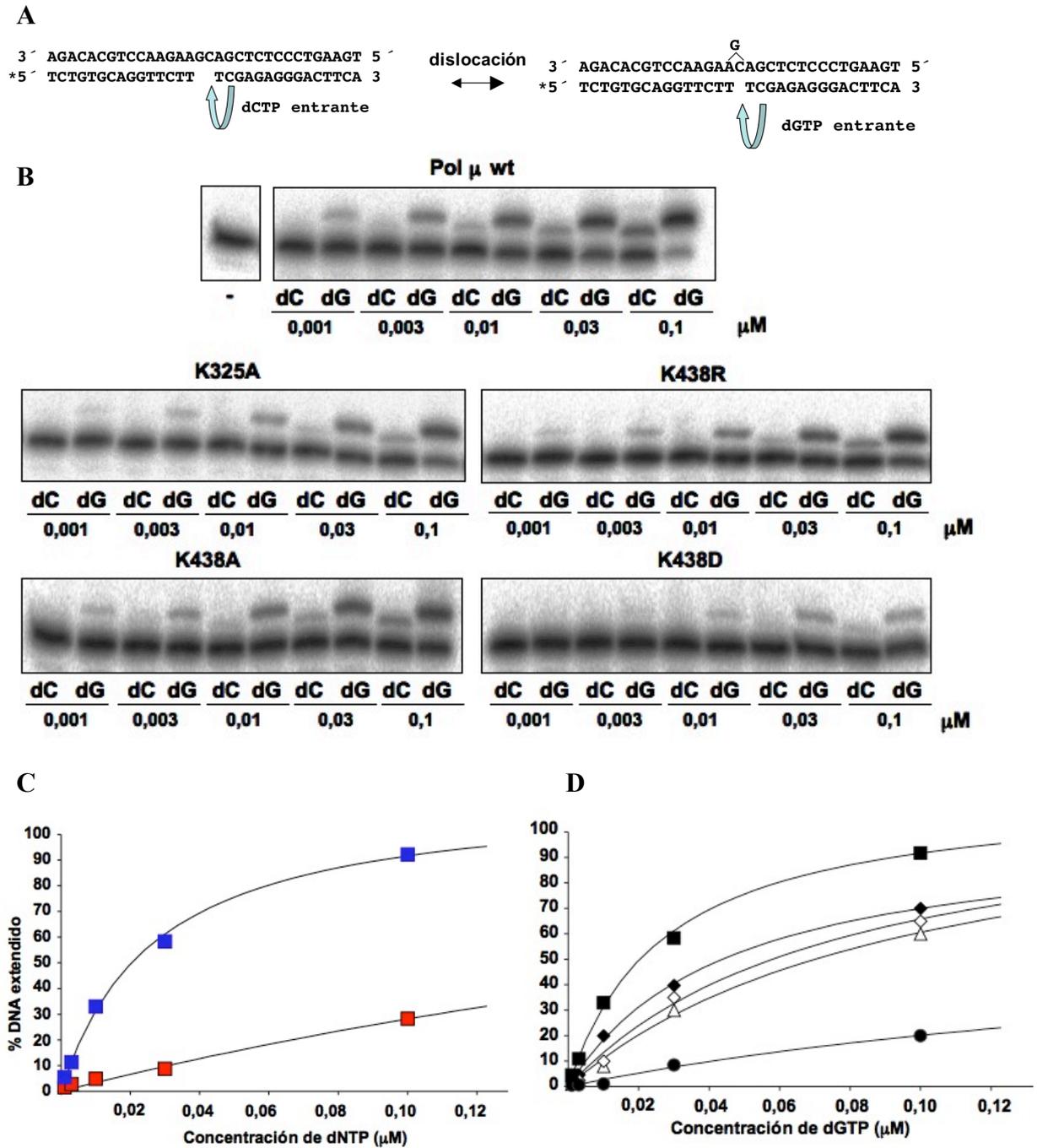


Figura 1.2. Actividad dependiente de molde de Polμ wt y mutantes. **A)** Secuencia de DNA empleada para este tipo de ensayo. El oligonucleótido marcado está representado con un asterisco. **B)** El experimento de polimerización en gap de dos nucleótidos se llevó a cabo a una concentración de DNA marcado radiactivamente a 5 nM y 300 nM de proteína. Las concentraciones de dNTPs son las que están indicadas en la figura. Las reacciones se incubaron durante 30 min a 30°C. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20% - urea 8 M y posterior autorradiografía. **C)** Comparación de la incorporación de dC *versus* dG en un *gap* de dos nucleótidos para Polμ wt. En rojo se indica la incorporación de dCTP, complementario a la primera base al *gap*, y en azul la incorporación de dGTP, complementario a la segunda base del *gap*. **D)** Cuantificación de la incorporación de dG para cada una de las proteínas. Polμ wt está representada por el símbolo ■, K438D por ●, K438R por ◆, K438A por ◇ y K325A por △.

Para analizar si había cambiado la actividad dependiente de molde de las proteínas mutantes con respecto a wt, se hicieron ensayos sobre este tipo de sustratos, utilizándose un *gap* de 2 nucleótidos (ver Fig. 1.2). Como muestra el esquema de la Figura 1.2 A, la reacción de dislocación (incorporación de dGTP) ocurre vía “estabilización por el nucleótido entrante”, tal como fue definida por Ruiz *et al.*, 2004. Se probó la eficiencia de incorporación del nucleótido complementario a la primera y a la segunda posición del *gap* a diferentes concentraciones de nucleótido (1 nM - 100 nM) para poder cuantificar la extensión del *primer* en condiciones no saturadas. Las reacciones se activaron con Mg^{+2} (3 mM) y se incubaron 30 min a 30°C.

Como se puede comprobar en la Figura 1.2, tanto la dislocación como la entrada directa sobre el molde sin recolocar es posible en este tipo de sustrato, aunque es más eficiente la mediada por dislocación. El porcentaje de *primer* extendido con dC en relación al extendido con dG indica que Pol μ wt prefiere, con un factor de 4 veces, usar el segundo nucleótido del *template* (dC) para dirigir la primera incorporación al *primer* (dG) (Fig. 1.2 C).

Como se observa en la Figura 1.2 D, sólo se detectan diferencias cuantitativas en los mutantes del centro activo de Pol μ con respecto al enzima wt, no produciéndose cambios en la preferencia de uno y otro nucleótido. Cuando se evalúa la inserción de dG, se puede concluir que la mutación del residuo **K325** afecta en escasa medida a la actividad dirigida por molde del enzima. En este caso, su mutación a alanina baja 1,5 veces la actividad de la proteína en el DNA con un *gap* de dos nucleótidos. La sustitución del residuo **K438** sólo afecta a la actividad (7,5 veces menor) cuando hacemos el cambio a aspártico (D), aminoácido con carga negativa, pero no parece que ni el cambio conservativo (R) ni el cambio a un aminoácido neutro (A) tengan un efecto relevante sobre la actividad dirigida por molde. La actividad de polimerización de los mutantes en los residuos **H329** y **R387** de Pol μ será descrita en el capítulo siguiente.

1.5. Reacciones independientes de molde con mutantes del centro activo de Pol μ

La actividad transferasa terminal se define como la capacidad de llevar a cabo reacciones de polimerización independiente de molde, añadiendo nucleótidos a un extremo 3' OH sin ser éstos seleccionados por ningún criterio de complementariedad de bases. Para determinar si las mutaciones realizadas en el centro activo de Pol μ producían cambios en su actividad transferasa terminal con respecto a Pol μ wt decidimos llevar a cabo una serie de ensayos sobre tres tipos de sustratos: DNA de cadena simple homopolimérica, DNA de doble cadena de extremos romos y DNA de doble cadena con un extremo 3' protuberante homopolimérico (Fig. 1.3).

Las cadenas sencillas de DNA homopolimérico proporcionan un extremo de DNA 3'-OH libre que, al estar compuestas por el mismo nucleótido en toda su longitud elimina la posibilidad de autoapareamientos internos de la propia cadena de DNA o de apareamientos intermoleculares. De este modo se comenzó el estudio comparando la capacidad de polimerización de las proteínas mutadas frente a Pol μ wt sobre una cadena sencilla de PoliT (21 bases). Pol μ wt extiende aproximadamente 7 bases en las condiciones de ensayo (30°C, 30 min). A continuación se analizó la actividad transferasa terminal sobre una molécula de DNA de doble cadena de extremos romos (18 bases), compuesta por dos cadenas sencillas heteropoliméricas complementarias. En este tipo de sustratos Pol μ muestra una actividad transferasa terminal menor que sobre sustratos de DNA de cadena sencilla. Puede observarse cómo el porcentaje de primer

extendido es mayor en el caso de la extensión sobre sustratos de cadena sencilla que en sustratos de DNA de doble cadena con extremos romos (Fig. 1.3 A y B). Finalmente se analizó la extensión por transferasa terminal sobre sustratos de DNA de doble cadena y con una protuberancia 3'-homopolimérica (9 dTTP). Este tipo de sustrato con protuberancias 3' son los más difíciles de reparar *in vivo* por NHEJ en caso de no existir complementariedad entre los extremos 3'-protuberantes. Una posible manera de ser reparados es que mediante la actividad independiente de molde de Polμ se extiendan los extremos 3' de manera que se cree la suficiente microhomología para generar apareamiento de los extremos. Por eso se decidió medir la capacidad de Polμ para utilizar este tipo de sustratos *in vitro*.

En todas las reacciones independientes de molde aquí descritas se suministró el mismo nucleótido, dTTP (100 μM) y se empleó Mn⁺² (1 mM) como metal activador. Es con este metal con el que se observa una actividad independiente de molde más potente, aunque la actividad transferasa terminal también puede detectarse con otros metales como Mg⁺² y Co⁺².

Al comparar la actividad transferasa terminal de los mutantes de Polμ en relación a la del enzima wt, resultó sorprendente la altísima actividad del mutante **R387K**, 38 veces mayor que la de Polμ wt (Tabla 1). La mutación del mismo residuo **R387** a Ala provocó el efecto contrario, ya que el mutante R387A tiene una actividad transferasa terminal casi nula. Este efecto será analizado y discutido más extensamente en el capítulo siguiente. En los demás casos, los mutantes de Polμ **K325A**, **K438R**, **K438A**, y **K438D** muestran una reducida actividad transferasa terminal con respecto al enzima wt, mientras que no se observa actividad en el mutante **H329G** en ninguno de los moldes ensayados (Fig. 1.3).

En el caso de sustratos de DNA de doble cadena con extremos romos (Fig. 1.3 B) puede apreciarse como la polimerización inicial es lenta, ocurre una parada en la síntesis una vez se han polimerizado cuatro bases, y se observa una mayor dificultad para continuar desde ese punto. Puede apreciarse, especialmente en el caso del mutante **R387K**, como son extendidos preferentemente los sustratos en los que la polimerasa ha extendido uno, dos o tres nucleótidos que los sustratos iniciales con extremos romos. A partir de las cuatro bases polimerizadas, el patrón de inserción es semejante al que presenta sobre sustratos homopoliméricos de cadena sencilla (Fig. 1.3 A). Sobre sustratos con extremos 3'-protuberantes, en las condiciones experimentales aquí descritas, la actividad transferasa terminal es superior a la observada en los otros dos sustratos, observándose un patrón de polimerización similar al observado en cadena simple (Fig. 1.3 C).

El descenso en la actividad transferasa terminal en estos mutantes con respecto a Polμ wt es aproximadamente entre dos y cinco veces, como se observa en la Tabla 1, en donde se muestran las eficiencias catalíticas para cada uno de los mutantes en su actividad transferasa terminal sobre sustratos de DNA de cadena sencilla.

Para determinar qué parámetros cinéticos de la transferasa terminal estaban afectados por las mutaciones en estos residuos se determinó la Km aparente (Km_{app}) por nucleótido en DNA en la reacción sobre DNA de cadena sencilla (PoliT). Se midió la incorporación de dTTP al DNA usando Mn⁺² (1 mM) como metal activador. El nucleótido estaba marcado con ³²P en posición alfa ([α-³²P]dTTP) y la reacción se incubó a 30°C durante 30 min. La titulación de nucleótido frío mezclado con el marcado se llevó a cabo en unas condiciones de DNA y proteína en exceso (estado estacionario). Las reacciones se pararon con EDTA 50 mM y las muestras fueron filtradas a través de columnas de Sephadex G-25, cuantificándose la radiación Cerenkov en un contador de

centelleo. Los datos fueron ajustados a la ecuación de *Michaelis-Menten* $V=V_{max}*(dNTP)/[K_m + (dNTP)]$.

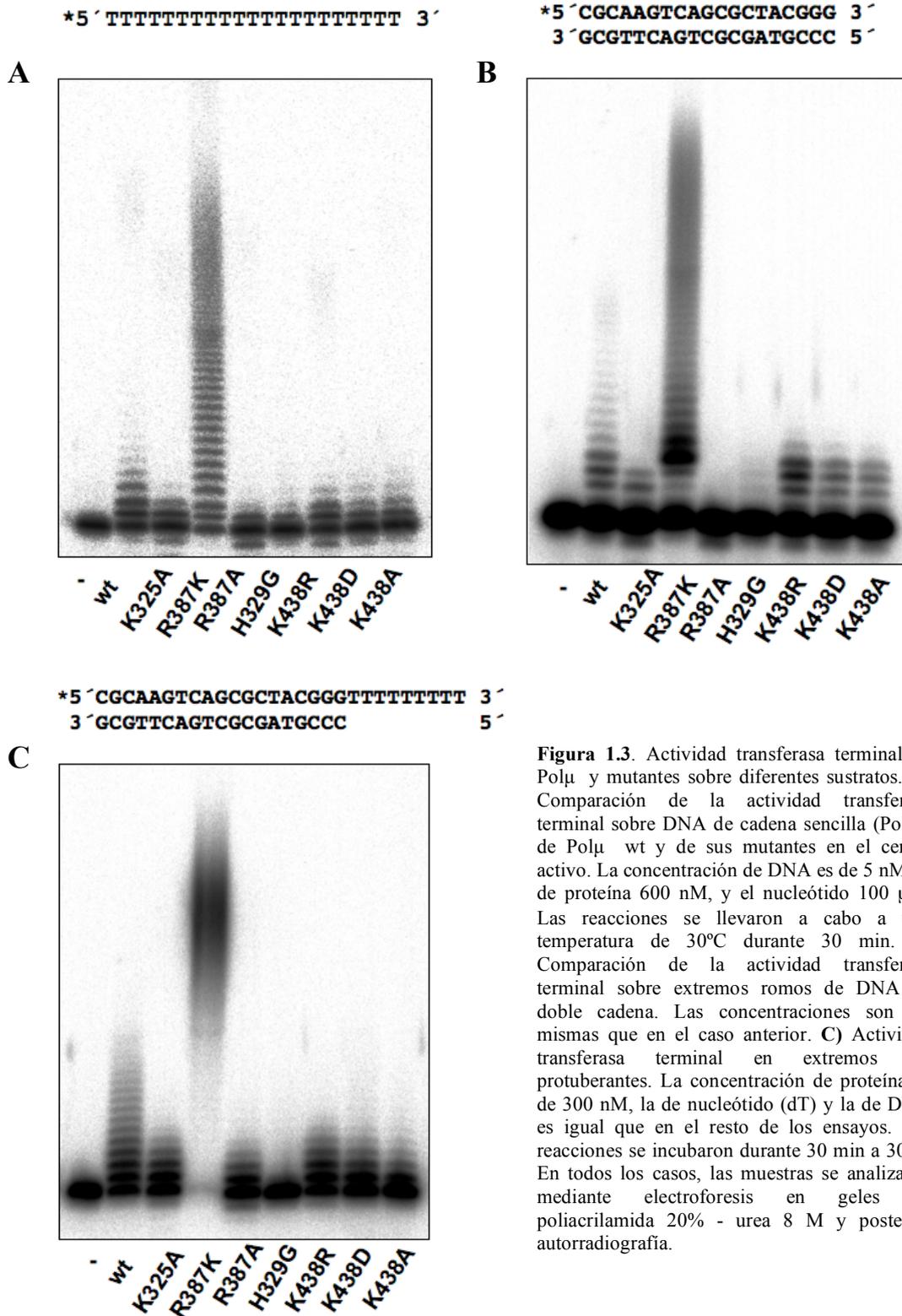


Figura 1.3. Actividad transferasa terminal de Pol μ y mutantes sobre diferentes sustratos. **A)** Comparación de la actividad transferasa terminal sobre DNA de cadena sencilla (PoliT) de Pol μ wt y de sus mutantes en el centro activo. La concentración de DNA es de 5 nM, la de proteína 600 nM, y el nucleótido 100 μ M. Las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 30°C durante 30 min. **B)** Comparación de la actividad transferasa terminal sobre extremos romos de DNA de doble cadena. Las concentraciones son las mismas que en el caso anterior. **C)** Actividad transferasa terminal en extremos 3'-protuberantes. La concentración de proteína es de 300 nM, la de nucleótido (dT) y la de DNA es igual que en el resto de los ensayos. Las reacciones se incubaron durante 30 min a 30°C. En todos los casos, las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20% - urea 8 M y posterior autorradiografía.

En la Tabla 1 puede observarse que los mutantes de Polμ **K325A**, **K438R**, **K438A**, **K438D** tienen una $K_{m,app}$ por nucleótido mayor que Polμ wt, lo que justifica una disminución en la eficiencia catalítica en DNA de cadena simple (Fig. 1.3 A).

		$K_{m,app}$ (μM)	K_{cat} (s^{-1})	Eficiencia catalítica $f^{\circ} ext$	
wild-type	dTTP	319 ± 16	0,00041 ± 0,000023	(1,39 ± 0,0004)10 ⁻⁶	1
	dATP*	4300 ± 2400	0,0016 ± 0,0006	(4,10 ± 0,92) 10 ⁻⁷	
	dCTP	224 ± 26	0,0008 ± 0,0004	(5,97 ± 2,35) 10 ⁻⁶	
	dGTP	5830 ± 70	0,0049 ± 0,0025	(8,43 ± 4,34) 10 ⁻⁷	
K325A	dTTP	2215 ± 276,4	0,00076 ± 0,0005	(3,16 ± 1,45) 10 ⁻⁷	0,22
H329G		ND	ND	ND	
R387K	dTTP	307 ± 17	0,015 ± 0,006	(5,35 ± 1,13) 10 ⁻⁵	38
R387A		ND	ND	ND	
K438A	dTTP	953 ± 430	0,00038 ± 0,0003	(4,04 ± 0,93) 10 ⁻⁷	0,29
K438R	dTTP	1768 ± 730	0,00062 ± 0,0023	(3,56 ± 1,50) 10 ⁻⁷	0,25
K438D	dTTP	1619 ± 982	0,00095 ± 0,0004	(5,88 ± 2,22)10 ⁻⁷	0,42

Tabla 1. Tabla de eficiencias catalíticas de mutantes del centro activo de Polμ. La tabla compara los parámetros cinéticos de polimerización independiente de molde (transferasa terminal) sobre DNA de cadena sencilla, de Polμ wt y mutantes del centro activo. Se indica el valor de la Km aparente, Kcat y Eficiencia catalítica, con los valores de media y desviación estándar de al menos tres experimentos.

Este efecto sugiere que estas mutaciones, como se había especulado, afectan a la interacción con el nucleótido. Para los mutantes **H329G** y **R387A** no puede calcularse una $K_{m,app}$, ya que la actividad transferasa terminal es tan baja que el error de cálculo es demasiado elevado para que pueda ser fiable (Fig. 1.3). Para el caso del mutante **R387K** no hay diferencias en la Km por nucleótido y es muy parecida al valor de Polμ wt, lo que implica que el residuo R387 aparentemente no interacciona con el nucleótido. Como se muestra en la tabla, se observa un incremento de la K_{cat} en el mutante de 38 veces con respecto al valor de K_{cat} de Polμ wt, lo que resulta en un incremento de la eficiencia catalítica para el nucleótido dTTP de 38 veces con respecto a Polμ wt. Su caso será tratado más extensamente en el capítulo siguiente.

Es interesante señalar como los mutantes **K325A**, **K438D** y **K438R** muestran un patrón similar de subida de Km y subida de K_{cat} , lo que hace que la comparación de sus eficiencias catalíticas respecto de Polμ se vea hasta cierto punto compensada (por ejemplo, **K438D** presenta con respecto a wt un aumento de Km de 5 veces y un aumento de Kcat de 2.3 veces, con lo que su eficiencia catalítica resulta ser 2.4 veces menor que wt). La explicación de este fenómeno, como se describirá en más detalle en el capítulo siguiente, podría ser que en este tipo de sustrato el extremo del *primer* y el nucleótido entrante compiten inicialmente por los mismos residuos del centro activo, entre los que se encontrarían los aquí estudiados. Por ello, una misma mutación puede empeorar la interacción con el nucleótido (subida de Km) a la vez que mejorar la catálisis (subida de K_{cat}). La mejora de la catálisis podría deberse a que estos residuos modulen la traslocación del primer de una posición inicial improductiva a una catalíticamente productiva (ver Capítulo 2).

Puede apreciarse en la Tabla 1 como la preferencia de adición de nucleótidos por Polμ wt en un sustrato de DNA de cadena sencilla (PoliT) es dCTP> dTTP> dATP >dGTP. Esta preferencia de inserción ha sido recientemente publicada (Gu *et al.*, 2007) en ensayos *in vivo*, en donde observan, al igual que nosotros, una preferencia de Polμ por la adición de pirimidinas.

La preferencia de inserción de nucleótidos por la actividad transferasa terminal de TdT es opuesta a la de Pol μ . Asimismo, estudios *in vivo* han demostrado una preferencia por la inserción de purinas, mayoritariamente dGTP (Gauss y Lieber, 1996; Mickelsen *et al.*, 1999), de acuerdo con la mayor inserción de dGTP mediada por TdT durante la recombinación V(D)J de las cadenas de inmunoglobulinas.

1.6. Ensayos de unión a DNA de doble cadena y DNA de cadena sencilla

Un paso más en el estudio de los mutantes del centro activo de Pol μ consistió en determinar si había cambios en la interacción directa con el DNA con respecto a la proteína wt. Los ensayos de interacción fueron realizados utilizando tanto DNA de doble cadena como DNA de cadena sencilla, mediante dos técnicas diferentes, retraso en gel y filtración en nitrocelulosa, respectivamente.

1.6.1. Interacción de las proteínas mutantes con un *gap* de dos nucleótidos en el DNA.

Para analizar si los mutantes del centro activo de Pol μ tenían afectada la interacción con DNA de doble cadena se realizaron ensayos de retraso de movilidad electroforética (EMSA) en geles de poliacrilamida. La molécula de DNA utilizada es un DNA que contiene un *gap* de dos nucleótidos y un fosfato en 5', ya que este tipo de sustrato es el idóneo para la unión de esta polimerasa. En tesis anteriores se ha demostrado una interacción de Pol μ más fuerte a un *gap* con P que con OH en 5', ya que el dominio de 8 KDa favorece la interacción con el grupo fosfato en los extremos 5' recesivos del DNA (Ruíz, F.J., 2004; Juárez, R., 2006).

Los resultados obtenidos indicaron que los mutantes **K325A**, **H329G**, **K438R**, **K438A** y **K438D** no tienen afectada la interacción con DNA, como se puede ver en la (Figura 1.4), y su patrón de retraso fue muy parecido en todos los casos al del enzima wt. Los mutantes **R387K** y **R387A** serán descrito más detalladamente en el capítulo siguiente, ya que en este caso sí se pueden observar cambios en la interacción con el DNA.

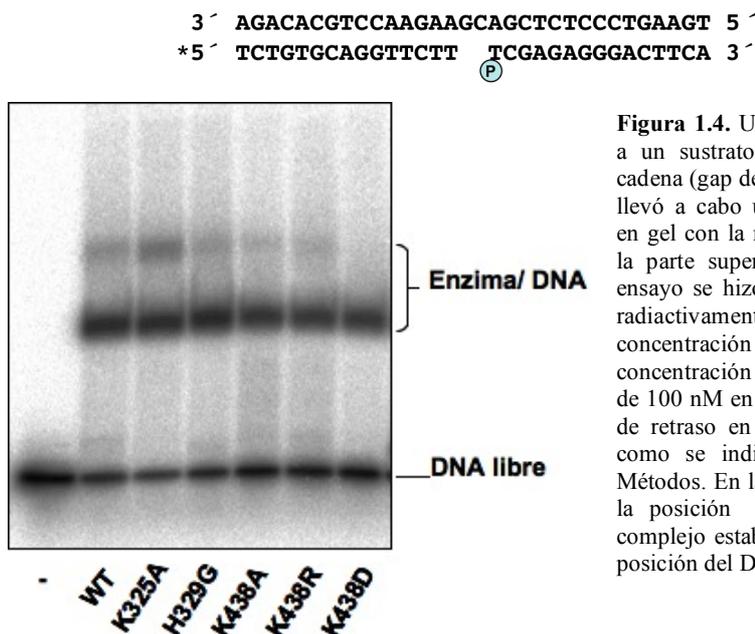


Figura 1.4. Unión de las proteínas a un sustrato de DNA de doble cadena (*gap* de dos nucleótidos). Se llevó a cabo un ensayo de retraso en gel con la molécula dibujada en la parte superior de la figura. El ensayo se hizo con DNA marcado radiactivamente a una concentración de 5 nM. La concentración de las proteínas fue de 100 nM en cada caso. El ensayo de retraso en gel se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos. En la figura está señalada la posición a la que migra el complejo estable enzima/DNA y la posición del DNA libre.

1.6.2. Interacción de las proteínas mutantes con DNA de cadena sencilla (PoliT).

Para determinar la afinidad de las proteínas mutadas por DNA de cadena sencilla se procedió a determinar la interacción directa proteína:DNA mediante retención en filtros de nitrocelulosa, ya que la interacción entre este tipo de sustratos de DNA y la proteína es demasiado lábil para poder ser analizada por ensayos de retraso en gel. Además de su mayor sensibilidad, la técnica de retención en filtros de nitrocelulosa permite obtener un valor de afinidad del complejo formado.

Los filtros son equilibrados en el tampón de reacción durante al menos una hora antes de ser usados. Para el ensayo se utilizan sustratos de DNA marcados radiactivamente (5 nM) y se incuban con diferentes concentraciones de proteína durante 10 min a 22°C en mezcla de reacción (ver Materiales y Métodos). A continuación se procede al paso de filtración, mediante succión con una bomba de vacío. La proteína queda siempre retenida en el filtro de nitrocelulosa, por lo que el DNA (marcado) que interaccione con ésta, puede cuantificarse mediante *Phosphorimager*.

Como se observa en la Figura 1.5, no se detectan diferencias entre las proteínas mutadas en los residuos **K325**, **K438** y **H329** con respecto a Pol μ wt. La K_{dis} de la interacción para todos los casos fué de $1,3 \pm 0,003 \mu\text{M}$.

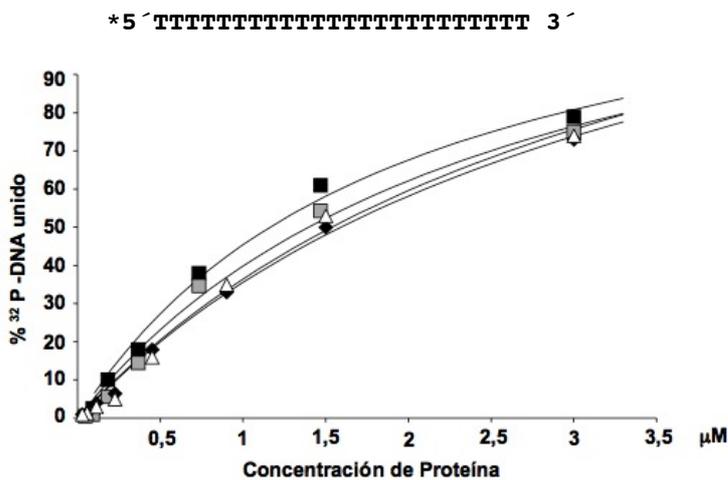


Figura 1.5. Unión a DNA de cadena sencilla de Pol μ y mutantes del centro activo. El experimento se realizó mediante filtración en nitrocelulosa. La concentración de NaCl presente en cada mutante se rebajó a 10 mM para poder detectar la interacción. El DNA utilizado en el ensayo fue un DNA homopolimérico de cadena sencilla (PoliT). Pol μ wt está representada por cuadrados negros, H329G por cuadrados grises, K438R por rombos negros, y K325A por triángulos blancos. La interacción fue cuantificada por *Phosphorimager*.

1.7. Factores que afectan a la actividad transferasa terminal de Pol μ

Durante los estudios realizados sobre la actividad transferasa terminal de Pol μ se observó que tanto la fuerza iónica como la temperatura de ensayo, eran variables que en gran medida condicionaban la actividad transferasa terminal de Pol μ . Por ello, se decidió hacer un análisis de los efectos de estas dos variables sobre la actividad transferasa terminal. Como se observa en la Figura 1.6, la actividad transferasa terminal de Pol μ decrece con rapidez a medida que aumenta la concentración de NaCl en la solución. La sensibilidad de la interacción entre Pol μ y DNA de cadena sencilla sugiere que la superficie de unión entre ambas moléculas está dominada por interacciones iónicas. Esta observación está de acuerdo con la información estructural disponible sobre la interacción de TdT con DNA de cadena sencilla, donde la mayoría de interacciones ocurren a través de la cadena de fosfatos del DNA.

En lo que se refiere a la temperatura óptima de reacción, se realizaron ensayos de actividad transferasa terminal sobre DNA de cadena sencilla, en un intervalo entre 15

y 40 °C. Pol μ presentó un óptimo de actividad entre 15-20 °C y la actividad empeoró a medida que se aumentaba la temperatura (Fig. 1.6). En estos ensayos de actividad han de interactuar simultáneamente 3 componentes que tienen baja afinidad entre sí. *In vivo* es de esperar que las interacciones entre ellos se vean facilitadas por componentes accesorios en la reacción de reparación, lo que se consigue gracias a la interacción entre el dominio BRCT de Pol μ y el complejo Ku-XRCC4-LigIV.

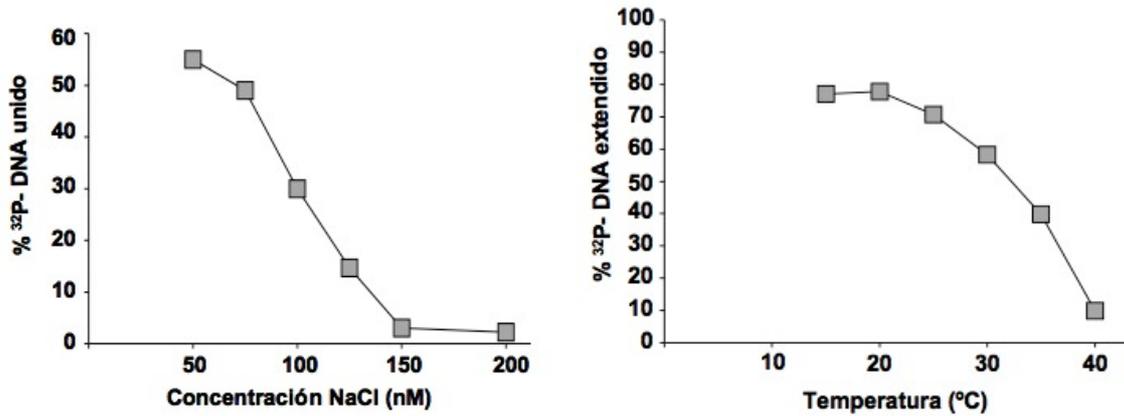


Figura 1.6. Variables que condicionan la actividad transferasa terminal de Pol μ . **A)** Titulación de la fuerza iónica del buffer de la reacción. La interacción entre Pol μ (400 nM) y el DNA de cadena sencilla (PoliT) fue detectada por filtración en filtros de nitrocelulosa. **B)** Porcentaje de *primer* extendido a diferentes temperaturas de ensayo. El tiempo en el que se llevaron a cabo las reacciones (20 μ L) fue de 30 min.

1.8. Conclusiones

Puede concluirse que la unión de las proteínas mutadas en los residuos **K325**, **K438** y **H329** a DNA de doble cadena con *gaps* y a DNA de cadena sencilla es en todos los casos semejante a la de Pol μ wt en las condiciones experimentales indicadas. El descenso de la eficiencia catalítica de las proteínas mutadas en estos residuos se debe probablemente a un defecto de interacción con el nucleótido y no es causado por la interacción con el DNA. Esto queda patente en la Tabla 1, en donde se calcula la $K_{m_{app}}$ por nucleótido en ensayos de transferasa terminal sobre DNA de cadena sencilla.

Los mutantes en los residuos **K325** y **K438** están más afectados en la actividad transferasa terminal que en la actividad dirigida por *template* (3 veces más aproximadamente). Así, concluimos que los defectos de interacción con el nucleótido son más patentes cuando se mide su efecto sobre la actividad transferasa terminal y no tanto en reacciones dirigidas por molde, donde la entrada del nucleótido viene sustentada y reforzada por la presencia de un *template*. Los efectos de las mutaciones en los residuos **K325** y **K438** son más obvios en condiciones de transferasa terminal ya que se requiere una interacción del enzima con el nucleótido más reforzada debido a la ausencia de un nucleótido molde. No obstante, en el caso del mutante **K438D**, la polimerización dirigida por molde está notablemente más afectada que la actividad sobre sustratos de DNA de cadena sencilla. Este efecto puede ser debido a que la sustitución de este aminoácido cargado positivamente por otro aminoácido de carga opuesta es más crítica en la configuración del centro activo durante la polimerización dirigida por molde, tal como ha sido sugerido en el caso del residuo equivalente de la DNA polimerasa lambda (Pol λ) humana (García Díaz, M., 2003).

Capítulo 2

Residuos implicados en la actividad transferasa terminal de Polμ

2.1. Análisis de la actividad dirigida por molde de los mutantes en los residuos H329 y R387 de Polμ	45
2.1.1. Actividad en doble cadena con un <i>gap</i> de un nucleótido	45
2.1.2. Unión a sustratos de DNA con un <i>gap</i> de pequeño tamaño	45
2.2. Análisis de la actividad transferasa terminal de Polμ	48
2.2.1. Actividad transferasa terminal en sustratos de DNA de cadena sencilla y DNA de doble cadena con extremos romos	48
2.2.2. Unión a sustratos de DNA de cadena sencilla y DNA de doble cadena con extremos romos.....	50
2.3. Cálculo de Km aparente ($K_{m_{app}}$) para cada uno de los nucleótidos en el mutante R387K	51
2.4. Análisis de procesividad en reacciones dirigidas por molde y reacciones de transferasa terminal	52
2.5. Ensayo de velocidad de un único ciclo catalítico	54
2.6. Competición entre nucleótido y DNA en su interacción con Polμ	54
2.7. Conclusiones	57

En este capítulo se discuten los residuos de Pol μ que afectan exclusivamente a su actividad transferasa terminal. Estos residuos son la H329 y la R387, que como se mencionó en el Capítulo 1, se localizan en el centro activo de Pol μ . El residuo H329 interacciona con el nucleótido entrante y el residuo R387 con la cadena *template* del DNA (Moon *et al.*, 2007a). En las primeras secciones de este capítulo se describen experimentos que demuestran que estos residuos no afectan a la actividad dirigida por molde de Pol μ cuando el DNA contiene un *gap* de pequeño tamaño (como se verá en el capítulo siguiente, las reacciones de *end joining* de extremos no complementarios, aunque formen un *gap*, están afectadas por la mutación H329G). A continuación, se analiza el mecanismo por el cual el mutante R387K tiene aumentada su actividad transferasa terminal con respecto a Pol μ wt. El estudio del mutante R387K de Pol μ nos ha permitido conocer cuál es el paso limitante en la actividad transferasa terminal de esta enzima. Por el contrario, el mutante H329G no tiene actividad transferasa terminal ya que este residuo es esencial en la coordinación entre el *primer* y el nucleótido.

2.1. Análisis de la actividad dirigida por molde de los mutantes en los residuos H329 y R387 de Pol μ

2.1.1. Actividad en doble cadena con un *gap* de un nucleótido. Pol μ muestra gran afinidad por sustratos de DNA con *gaps* de pequeño tamaño (una o dos bases) (Juárez, R., 2006). Para analizar la actividad de polimerización de los mutantes de Pol μ en los residuos H329 y R387, se llevaron a cabo una serie de ensayos de actividad con sustratos de DNA marcado. El sustrato utilizado fue un DNA con un *gap* de un nucleótido y con un grupo fosfato en 5'. Las reacciones se activaron con Mg⁺² (3 mM) y transcurrieron por 30 min a 30°C. Como se puede observar en las Figuras 2.1 y 2.2, la eficiencia de inserción del nucleótido complementario al *template* (dC) en los mutantes de Pol μ es similar al de wt. Se puede concluir que H329G, R387K y R387A no presentan diferencias con Pol μ wt en el relleno de *gaps* de pequeño tamaño.

2.1.2. Unión a sustratos de DNA con un *gap* de pequeño tamaño. Para evaluar la afinidad de estas variantes mutantes de Pol μ por un DNA de doble cadena con un *gap* en su estructura y un grupo fosfato en el extremo 5', se realizaron ensayos de interacción directa mediante cambios de movilidad electroforética en geles de acrilamida (EMSA) (Fig. 2.3). El mutante H329G, como ya se había señalado en el capítulo anterior, tiene un patrón de unión similar a Pol μ wt y no se observan diferencias en cuanto a la interacción con DNA. En cambio la mutación en el residuo de Pol μ R387, tanto en la variante mutada a Alanina como a Lisina, reduce la afinidad de la interacción entre la proteína y el DNA de doble cadena, especialmente en el rango de concentración entre 0,2-0,4 μ M, donde los complejos retrasados son aparentemente menos estables que los generados por Pol μ wt en estas condiciones experimentales (Fig. 2.3).

A



B

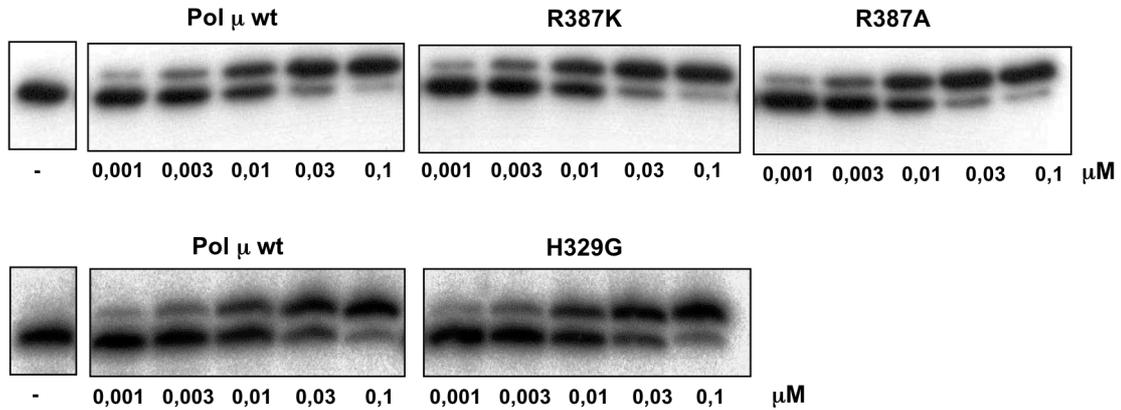


Figura 2.1. Actividad dependiente de molde de Polμ wt, R387K, R387A y H329G. A) Secuencia y estructura del DNA utilizada en este ensayo de actividad. El oligonucleótido marcado está señalado con un asterisco. B) El ensayo de polimerización en un *gap* de un nucleótido se realizó a una concentración de DNA de 5 nM y 300 nM de proteína. Las concentraciones de dNTP son las indicadas en la figura. Los ensayos fueron hechos durante 30°C a 30 min y fueron activados con Mg⁺² (3 mM). Los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8 M y posterior autorradiografía.

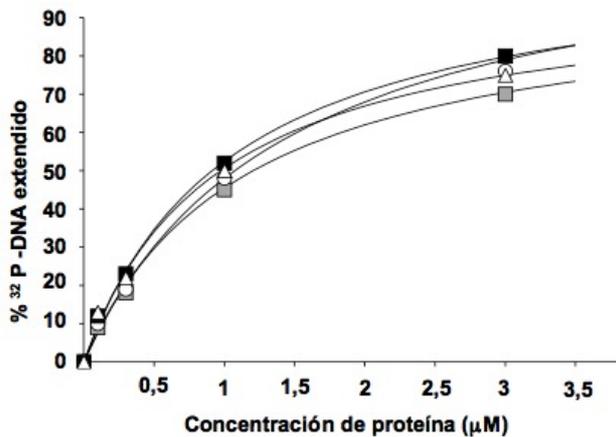


Figura 2.2. Cuantificación de la incorporación de dCTP en un DNA con un *gap* de un nucleótido. La concentración de DNA es de 5 nM y las proteínas están a la concentración indicada en el gráfico. En el gráfico se representan Polμ wt (cuadrados negros), R387K (círculos blancos) R387A (triángulos blancos) y H329G (cuadrados grises). Las reacciones de polimerización fueron activadas con Mg⁺² durante un tiempo de 30 min a 30°C. El primer extendido fue cuantificado por *Phosphorimager*.

Estos resultados fueron contrastados mediante otra técnica de interacción directa entre proteína y DNA: el uso de filtros de nitrocelulosa para separar los complejos de DNA/enzima del DNA libre (Fig. 2.4). En este caso, corroborando el resultado de la Figura 2.3, también se observa como la mutación en el residuo R387 empeora la interacción de la proteína al DNA. El valor de K_{dis} para Pol μ wt es de 306 nM y para R387K y R387A es de 412 nM y 950 nM, respectivamente. Es decir, la mutación afecta a la interacción con el DNA de doble cadena y produce un incremento de 1,3 (para R387K) y 3,1 (para R387A) veces la K_{dis} del enzima. Por el contrario, la mutación en el residuo H329 no afecta a la interacción con el DNA.

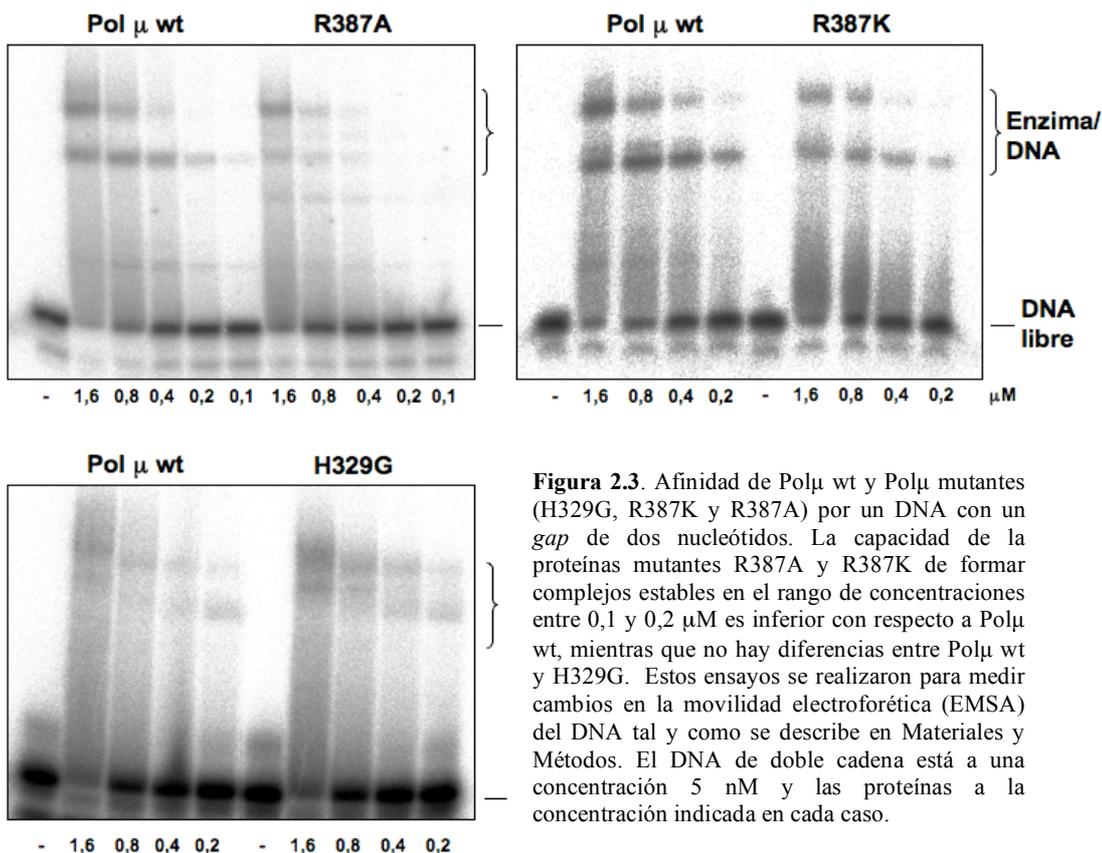


Figura 2.3. Afinidad de Pol μ wt y Pol μ mutantes (H329G, R387K y R387A) por un DNA con un *gap* de dos nucleótidos. La capacidad de las proteínas mutantes R387A y R387K de formar complejos estables en el rango de concentraciones entre 0,1 y 0,2 μ M es inferior con respecto a Pol μ wt, mientras que no hay diferencias entre Pol μ wt y H329G. Estos ensayos se realizaron para medir cambios en la movilidad electroforética (EMSA) del DNA tal y como se describe en Materiales y Métodos. El DNA de doble cadena está a una concentración 5 nM y las proteínas a la concentración indicada en cada caso.

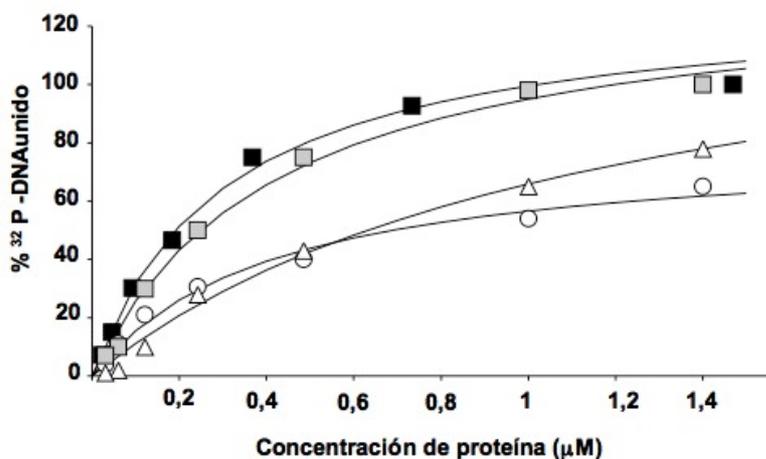


Figura 2.4. Afinidad de Pol μ wt y Pol μ mutantes R387K, R387A y H329G por DNA con un *gap* de dos nucleótidos. El experimento se realizó mediante filtración en nitrocelulosa. La interacción de Pol μ (cuadrados negros) es mejor que la de R387K (círculos blancos) y que la de R387A (triángulos blancos). Por el contrario, la interacción del mutante H329G (cuadrados grises) es similar a la que presenta Pol μ wt. El DNA está a una concentración de 5nM y las proteínas a la concentración indicada.

El hecho de que los mutantes R387K y R387A interaccionen peor con DNA de cadena doble pero no se observen efectos en la actividad probablemente se explique porque en los ensayos realizados en sustratos de DNA con un *gap* la interacción entre la proteína y el DNA no determina la velocidad de la reacción.

2.2. Análisis de la actividad transferasa terminal de Polμ

2.2.1. Actividad transferasa terminal en sustratos de DNA de cadena sencilla y DNA de doble cadena con extremos romos. Se analizó la actividad independiente de molde de Polμ wt, R387K, R387A y H329G utilizando dos sustratos: DNA homopolimérico de cadena simple (PoliT) y un fragmento de DNA de doble cadena con extremos romos. Ya habíamos avanzado en el capítulo anterior que estos mutantes estaban afectados en la actividad transferasa terminal, pero se decidió comprobar si además conservaban el mismo patrón de adición de cada nucleótido por separado igual que Polμ wt. Como metal activador se usó Mn^{+2} (1 mM) y las reacciones se realizaron a 30°C durante 30 min para cada uno de los sustratos. En DNA de cadena sencilla (PoliT), Polμ lleva a cabo adiciones sucesivas de nucleótidos alcanzando una longitud aproximada de 8 bases para el caso del dTTP, nucleótido con el que presenta mayor capacidad de elongación (Fig. 2.5). En el caso de extensión con dCTP, a pesar de presentar la K_m más baja por este nucleótido, sólo unas pocas bases son incorporadas a cada molécula de DNA. Con dATP observamos un patrón característico: aparecen unas primeras inserciones, seguidas de una fuerte y eficiente polimerización que resulta en un acúmulo de material a una altura siempre definida. Este comportamiento puede explicarse debido a que unas primeras adiciones de dATP al extremo de esta molécula de PoliT mediante actividad transferasa terminal generan un extremo con varias unidades de dATP sobre una molécula de PoliT (Juarez *et al.*, 2006). Este extremo es capaz de hibridar con otras moléculas de PoliT presentes en el medio, pudiendo continuar su extensión mediante dirección de molde hasta llegar al final de la cadena. Esta es la explicación por la que aparecen bandas a una altura definida. Las pequeñas diferencias del tamaño inicial observadas podrían ser determinadas por el número de dNTPs que haya incorporado la polimerasa durante la fase de polimerización independiente de molde. Ha sido comprobado que se produce la misma reacción en el caso de que la molécula utilizada sea PoliA y se suministre dTTP. También es posible que la cadena naciente pueda autohibridar mediante la formación de un bucle (Juarez, 2006). No obstante, está aún por dilucidar si la primera base insertada por Polμ está o no dirigida por molde, pues existe la posibilidad de que la primera reacción de *end joining* ya suponga la inserción del nucleótido complementario (ver Capítulo 3).

En sustratos de DNA de doble cadena con extremos romos el patrón de inserción de cada dNTP se mantiene (Fig. 2.6). Como se verá en el capítulo siguiente, la incorporación de bases a este tipo de sustrato es menos eficiente que a DNA de cadena sencilla hasta que se incorporan unas cuantas bases. A partir de ese punto, la polimerización es mejor que la observada para el DNA de cadena simple.

El mutante H329G, como ya se había comentado en el capítulo anterior, presenta una muy reducida actividad transferasa terminal para cada uno de los nucleótidos. Por el contrario, la mutación en el residuo R387 produce diferentes efectos en función de la mutación. Así, la mutación R387A provoca una caída de la actividad transferasa terminal, especialmente sobre sustratos de DNA con extremos romos, mientras que la mutación R387K provoca un enorme aumento de la actividad transferasa terminal con cada uno de los nucleótidos con respecto a Polμ wt, tanto en

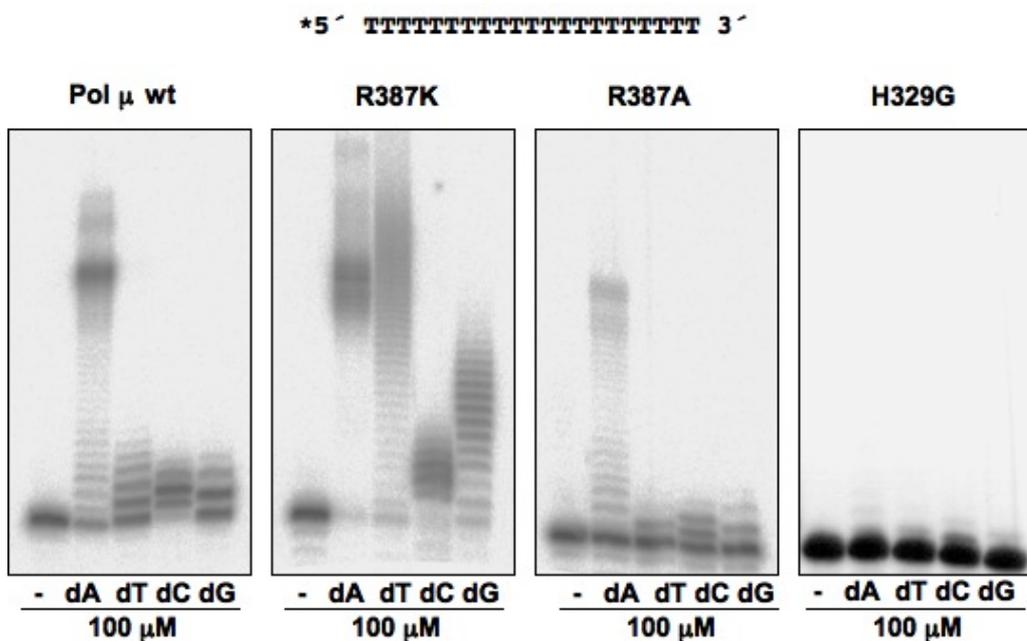


Figura 2.5. Comparación de la actividad transferasa terminal de Polμ wt y mutantes en el residuo R387 y H329 en DNA de cadena sencilla. Las reacciones (20 μL) se llevaron a cabo como se describen en Materiales y Métodos, en presencia de 5 nM de DNA marcado radiactivamente (PoliT), 1 mM de Mn²⁺, 600 nM de proteína y 100 μM del dNTP. Tras una incubación de 30 min a 30°C, los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (20%)-urea 8 M y posterior autorradiografía.

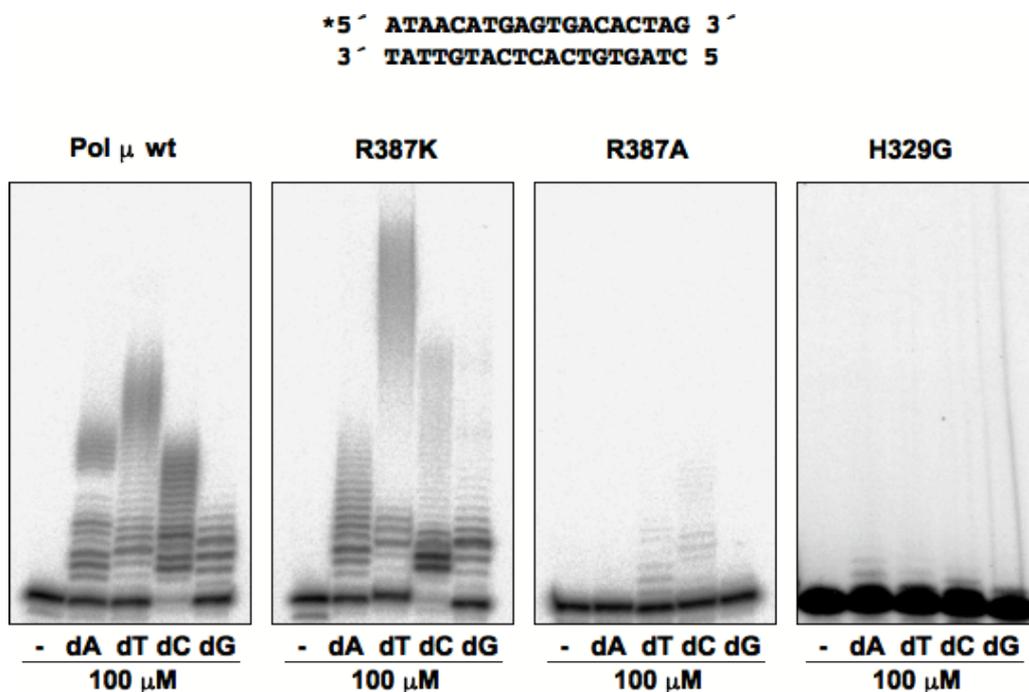


Figura 2.6. Comparación de la actividad transferasa terminal de Polμ wt y mutantes en los residuos R387 y H329 en DNA de doble cadena con extremos romos. Las reacciones (20 μL) se llevaron a cabo como se describen en Materiales y Métodos, en presencia de 5 nM de DNA marcado radiactivamente (PoliT), 1 mM de Mn²⁺, 600 nM de proteína y 100 μM del dNTP. Tras una incubación de 30 min a 30°C, los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (20%)-urea 8 M y posterior autorradiografía.

sustratos de DNA de cadena sencilla como de extremos romos (Fig. 2.5 y 2.6). El aumento en actividad del mutante R387K es especialmente acusada para el caso de DNA de cadena sencilla. No obstante, en DNA de extremos romos la diferencia es patente en el caso de extensiones de dT y dC, pero muy similar a wt en el caso de dA o dG. Estos efectos sugieren que el residuo R387 cumple diferentes funciones en función de la estructura del DNA. En el caso de DNA de cadena sencilla, R387 puede estar implicado en limitar la correcta recolocación del primer en cada ciclo catalítico (traslocación, ver Sección 2.6), mientras que en cadena doble su efecto puede estar enmascarado por la participación de otros muchos residuos que interaccionan con el DNA.

2.2.2. Unión a sustratos de DNA de cadena sencilla y DNA de doble cadena con extremos romos. Para determinar la afinidad de las proteínas mutadas por DNA de cadena sencilla (PoliT) y DNA de doble cadena con extremos romos se utilizó la técnica de filtración en filtros de nitrocelulosa (Wong y Lohman, 1993) ya que la interacción entre el DNA y la proteína es demasiado lábil para poder ser medida por ensayos de movilidad electroforética. La interacción entre Polμ wt y DNA de cadena sencilla ($K_{dis}=1,3 \mu M$) es mucho más estable que la interacción con DNA de doble cadena con extremos romos. En el caso del mutante H329G, como ya habíamos señalado en el capítulo anterior, no se detectan diferencias en la interacción con DNA de cadena sencilla (Fig. 2.6). En el caso de los mutantes R387K y R387A se puede observar una peor interacción en ambos casos con el DNA de cadena sencilla con respecto a Polμ wt (Fig. 2.7A). La K_{dis} de la interacción de Polμ R387K con DNA de cadena sencilla ($5,5 \mu M$) y la de R387A ($5,8 \mu M$) es mayor (4,2 y 4,4 veces, respectivamente) que la de wt en DNA de cadena sencilla (Fig. 2.7A). Para cadena doble con extremos romos la

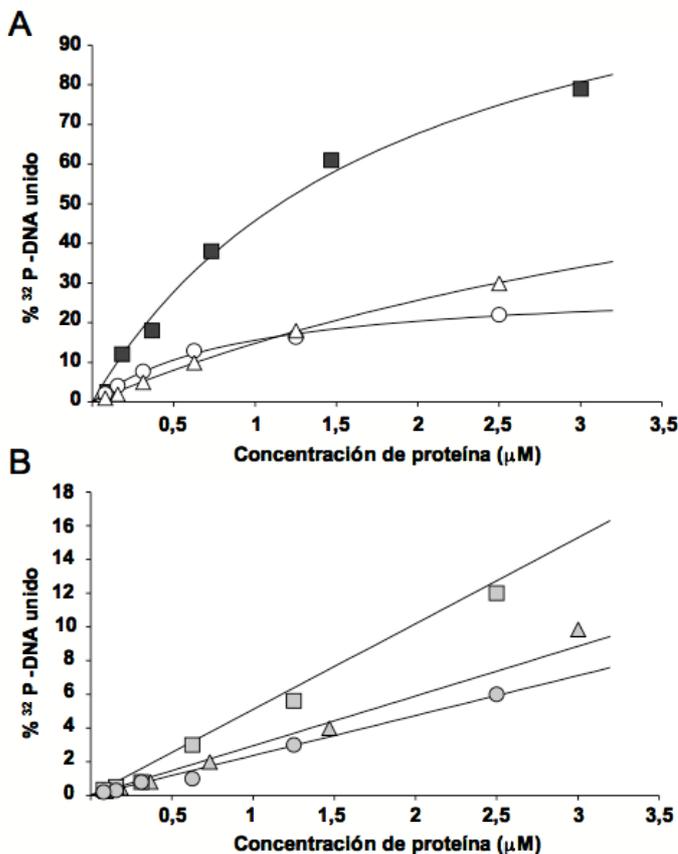


Figura 2.7. Unión a DNA de cadena sencilla y DNA de doble cadena con extremos romos de Polμ wt, R387K y R387A. El experimento se realizó mediante filtración en nitrocelulosa. **A)** Interacción de Polμ wt y los mutantes R387K y R387A a DNA de cadena simple. La interacción de Polμ wt (cuadrados negros) es más fuerte que la de Polμ R387K (círculos blancos) y que la de Polμ R387A (triángulos blancos). La concentración del DNA es de 5 nM, y la de proteína es la que se indica en la figura. **B)** Interacción de Polμ wt y los mutantes R387K y R387A a DNA de doble cadena con extremos romos. Polμ wt (cuadrados grises) y los mutantes R387K (círculos grises) y R387A (triángulos grises) interaccionan prácticamente igual con este tipo de sustrato. Los ensayos se llevaron a cabo a 22°C después de una incubación de 10 min. El DNA retenido en el filtro fue cuantificado mediante *Phosphorimager*.

interacción es prácticamente indetectable en estas condiciones (<10%) pero aparentemente similar en todos los casos (Fig. 2.7B).

Como se puede observar, la interacción de las proteínas con DNA de cadena sencilla es mucho más estable que con DNA de doble cadena con extremos romos, aunque sobre ambos sustratos Pol μ es capaz de llevar a cabo reacciones de transferasa terminal.

En el caso de R387A, la peor interacción podría justificar su peor actividad en la polimerización sobre sustratos de DNA de cadena sencilla. Por el contrario, la mínima actividad observada con este mutante sobre sustratos de DNA de doble cadena con extremos romos no puede ser justificada por su poco aparente defecto de unión a este sustrato. Debería ser utilizada otra técnica más sensible para poder valorar si en realidad hay diferencias en la unión. En el caso del mutante R387K es difícil explicar por qué una peor unión resulta en una mejor actividad. Para resolver esta aparente contradicción se decidió llevar a cabo con este mutante los experimentos que se detallan en las secciones siguientes.

El mutante H329G, a pesar de no tener actividad transferasa terminal, no presenta cambios en la interacción sobre los sustratos sobre los que se midió la actividad transferasa terminal (Fig. 3.5). Esto sugiere que el residuo H329 cumple una función específica en el mecanismo de transferasa terminal independiente de la interacción del DNA. La reciente elucidación de la estructura cristalina de Pol μ ha revelado la función de este residuo y es consistente con nuestros resultados, como se verá en la Discusión (Moon *et al.*, 2007a).

2.3. Cálculo de K_m aparente ($K_{m,app}$) para cada uno de los nucleótidos en el mutante R387K

Para elucidar por qué el mutante R387K mejora su eficiencia catalítica con respecto a Pol μ wt, en primer lugar se determinó su $K_{m,app}$ por nucleótido. Aunque como ya se analizó en el Capítulo 1, el mutante R387K y Pol μ wt tienen una $K_{m,app}$ por dTTP muy similar cuando se mide sobre sustratos de cadena sencilla, se decidió confirmarlo para cada uno de los nucleótidos. Como metal activador de la reacción se usó Mn^{+2} (1 mM). El nucleótido estaba marcado con ^{32}P en posición alfa y el tiempo en que se llevó a cabo la reacción de polimerización fue de 30 min a 30°C. La titulación del nucleótido se realizó en unas condiciones de DNA y proteína en exceso (estado estacionario). Las reacciones se pararon con EDTA 50 mM y las muestras fueron filtradas a través de columnas de Sephadex G-25 y cuantificadas con contador de centelleo. Los datos fueron ajustados a la ecuación de *Michaelis-Menten* $V=V_{max}*(dNTP)/[K_m + (dNTP)]$ y el valor de la $K_{m,app}$ para cada nucleótido está reflejado en la Tabla 2.

Como se puede observar, los cambios en la $K_{m,app}$ de Pol μ R387K por cada uno de los nucleótidos no son tan significativos como los que se detectan para K_{cat} . No es posible excluir la posibilidad de que la mutación tenga un cierto efecto en la arquitectura del centro activo que redunde en cambios en la interacción con cada nucleótido de manera diferente. No obstante, es patente que el mayor cambio entre Pol μ wt y Pol μ R387K es a nivel de la constante catalítica en este tipo de reacciones. La K_{cat} es mucho más alta para el mutante, especialmente en el caso de extensiones con dG y dT (74 y 38 veces, respectivamente). El aumento en la K_{cat} refleja que el mutante R387K tiene un ciclo catalítico más rápido, posiblemente debido a la mayor capacidad de éste de recolocar el primer para una más eficaz polimerización.

		K_{mapp} (μM)	K_{cat} (s^{-1})	Eficiencia catalítica	$f^{\theta} ext$
wild-type	dT	319 ± 16	0.0004 ± 0.0002	(1.39 ± 0.0004) 10 ⁻⁶	1
	dA	4300 ± 2400	0.0016 ± 0.0006	(4.10 ± 0.92) 10 ⁻⁷	1
	dC	224 ± 26	0.0008 ± 0.0004	(5.97 ± 2.35) 10 ⁻⁶	1
	dG	5830 ± 70	0.0049 ± 0.0025	(8.43 ± 4.34) 10 ⁻⁷	1
R387K	dT	307 ± 17	0.015 ± 0.006	(5.35 ± 1.13) 10 ⁻⁵	38
	dA	5100 ± 2300	0.015 ± 0.00008	(3.28 ± 1.47) 10 ⁻⁶	8
	dC	131 ± 24	0.018 ± 0.004	(1.36 ± 0.34) 10 ⁻⁴	22
	dG	3010 ± 100	0.188 ± 0.015	(6.25 ± 0.30) 10 ⁻⁵	74

Tabla 2. Comparación de la eficiencia catalítica en cadena sencilla (PoliT) entre Polμ wt y Polμ R387K. En la tabla se indican los valores de la Km aparente, Kcat y eficiencia catalítica para cada nucleótido incorporado por transferasa terminal sobre PoliT(21T). El dATP fue incorporado sobre un sustrato de PoliA (21A), para evitar dirección de molde. La ultima columna indica el ratio de las eficiencias catalíticas para cada nucleótido entre Polμ wt y Polμ R387K.

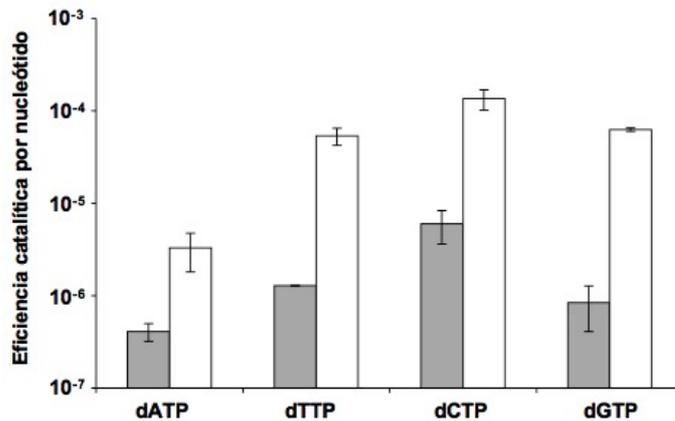


Figura 2.8. Comparación de las eficiencias catalíticas de Polμ wt y Polμ R387K para cada nucleótido. Polμ R387K (barras blancas) está al menos un orden de magnitud por encima de Polμ wt (barras grises). Las barras de error están representadas en cada caso.

Se puede observar en la Tabla 2 como el *ratio* de la eficiencia catalítica del ensayo para cada nucleótido entre wt y mutante es diferente. Hay un *ratio* más alto para dGTP, seguido de dTTP y dCTP. Esto no se corresponde con el valor de la K_{mapp} para cada nucleótido. Probablemente hay diferencias en la afinidad de la proteína por cada sustrato a medida que se van polimerizando nuevas bases del nucleótido incorporado y queda atrás la cadena de DNA original (PoliT). La incorporación de dATP se midió sobre un sustrato de PoliA (21A) para evitar polimerización dirigida de molde. En este caso la afinidad por el DNA será siempre la misma a medida que se van incorporando más bases, lo mismo que cuando se mide la adición de dTTP sobre PoliT(21T).

2.4. Análisis de procesividad en reacciones dirigidas por molde y reacciones de transferasa terminal

Seguidamente se determinó si un aumento de la procesividad del enzima podía explicar el aumento de la eficiencia catalítica con respecto a Polμ wt. Este análisis de la procesividad se realizó sobre dos tipos de sustratos, un *template/primer*, y un DNA de

cadena sencilla, mediante dilución seriada de la proteína (Ruiz, 2004). En el caso de que el mutante de Pol μ R387K hubiese ganado procesividad la dilución de la enzima no afectaría significativamente al número de bases extendidas. En caso de ser tan distributiva como Pol μ wt, la enzima mutante mostraría una extensión en cada sustrato de DNA proporcional a su concentración.

En el caso del *template/primer* se realizó una mezcla de los cuatro nucleótidos a una concentración final de 100 μ M, y en el caso del DNA de cadena sencilla se empleó el mismo nucleótido que el presente en el DNA (dTTP) para evitar cambios en la afinidad de la proteína al ir incorporando dTTP. Se puede observar como en el caso de las reacciones dirigidas por molde, el mutante R387K y Pol μ wt tienen un comportamiento similar, extendiendo el *primer* aproximadamente por igual en ambos

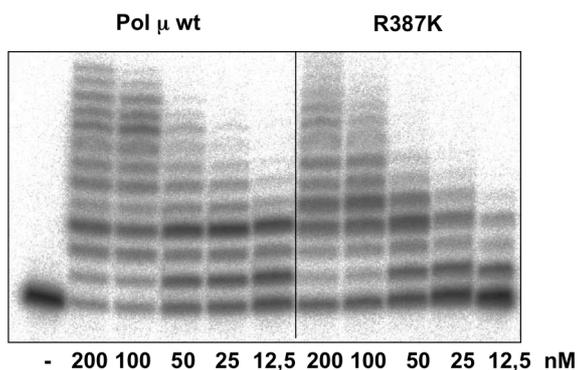


Figura 2.9. Análisis de la procesividad de Pol μ wt y mutante R387K en un *template/primer*. El experimento se realizó mediante diluciones seriadas de las proteínas. El DNA (*template/primer*) está a una concentración final de 5 nM y la mezcla de nucleótidos a 100 μ M final. La reacción fue activada con Mg⁺² (3 mM) y se llevó a cabo durante 30 min a 30°C. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20% - urea 8 M y posterior autorradiografía.

casos (Figura 2.9). Tampoco se ven cambios en el patrón de extensión del *primer*. En la Figura 2.10 se ve como en DNA de cadena sencilla el mutante necesita menos concentración que la proteína wt para una similar extensión, pero sus patrones son muy similares.

En conclusión, la procesividad del enzima no ha cambiado significativamente con respecto a Pol μ wt, ni en DNA de doble cadena ni en DNA de cadena sencilla, y el aumento de la eficiencia catalítica de R387K en cadena sencilla no puede explicarse por un aumento en la procesividad con respecto a wt.

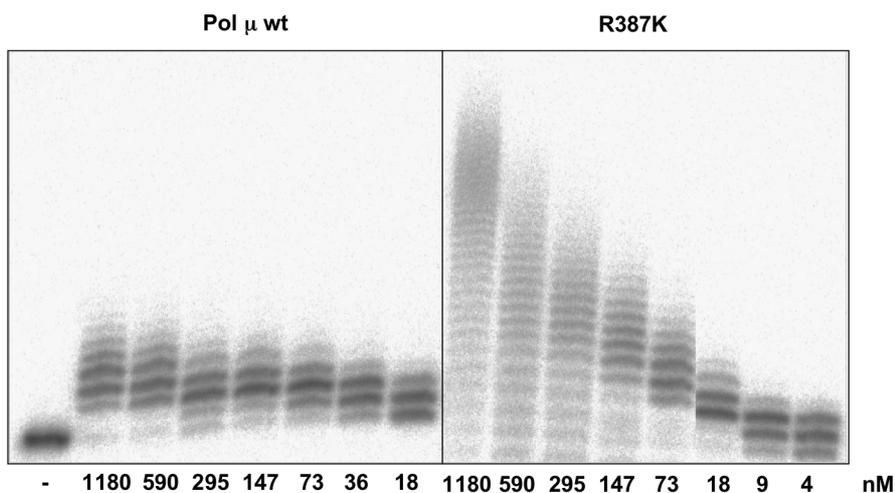


Figura 2.10. Análisis de la procesividad de Pol μ wt y mutante R387K en un DNA de cadena sencilla. El experimento se realizó mediante diluciones seriadas de las proteínas. El DNA (PoliT) está a una concentración de 5 nM y los nucleótidos a 100 μ M. La reacción fue activada con Mn⁺² (1 mM) y se llevó a cabo durante 30 min a 30°C. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20% - urea 8 M y posterior autorradiografía.

2.5. Ensayo de velocidad de un único ciclo catalítico

A continuación, se analizó la velocidad de cada ciclo catalítico para R387K y para Polμ wt. Se utilizó un DNA de cadena sencilla (PoliT) a una concentración 10 veces superior a la de proteína (100 nM de proteína, 1 μM de DNA). El nucleótido empleado fue ddTTP (100 μM), para evitar más de un evento de polimerización. El ensayo cinético fue activado con Mn⁺² (1 mM) y se interrumpió cada reacción en los tiempos indicados en la Figura 2.11. Las reacciones se realizaron a una temperatura de 18°C. Como vimos en el capítulo anterior, esta temperatura es la más adecuada para conseguir una óptima actividad transferasa terminal de Polμ.

Se observa que la eficiencia de cada ciclo catalítico en estas condiciones limitantes de proteína y con un exceso de DNA y nucleótido es mayor para el mutante de Polμ R387K que para Polμ wt. En conclusión, el mutante R387K muestra una velocidad en cada ciclo catalítico superior a Polμ wt y este resultado confirma la mayor eficiencia en condiciones de transferasa terminal de este mutante de Polμ. El modelo más adecuado para explicar este fenómeno es que el mutante R387K tiene una mayor facilidad para configurar un complejo ternario productivo (Polμ-DNA-nucleótido entrante), que es el paso limitante de la reacción de transferasa terminal. El residuo R387 podría estar directamente implicado en la proceso por el cual el *primer* es recolocado tras cada adición de nucleótido, como se describirá en la sección siguiente.

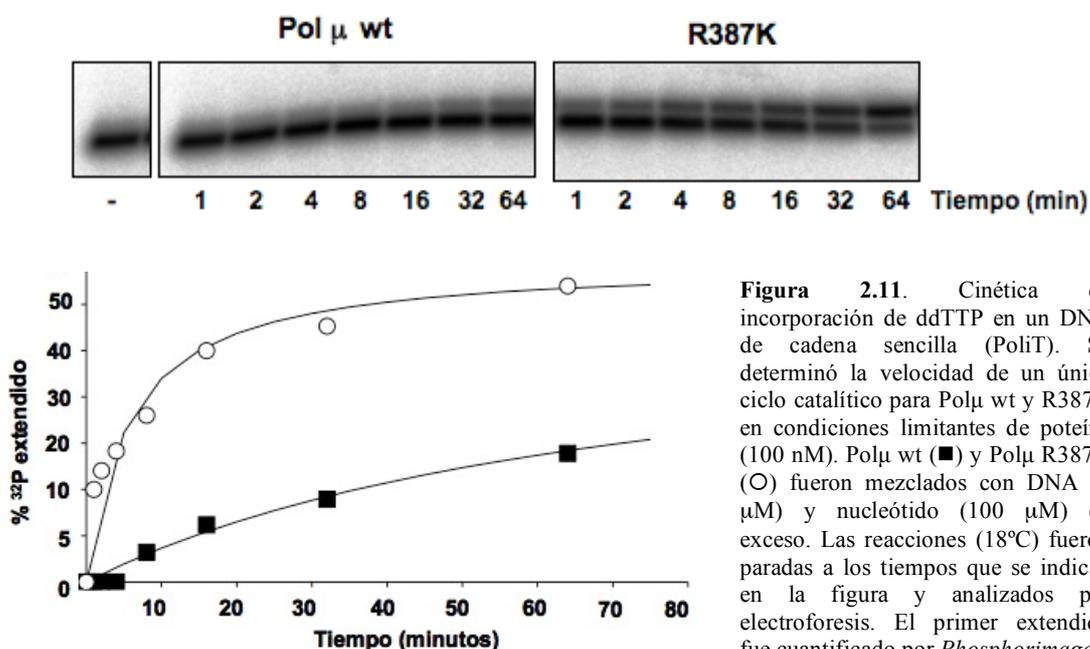


Figura 2.11. Cinética de incorporación de ddTTP en un DNA de cadena sencilla (PoliT). Se determinó la velocidad de un único ciclo catalítico para Polμ wt y R387K en condiciones limitantes de proteína (100 nM). Polμ wt (■) y Polμ R387K (○) fueron mezclados con DNA (1 μM) y nucleótido (100 μM) en exceso. Las reacciones (18°C) fueron paradas a los tiempos que se indican en la figura y analizados por electroforesis. El primer extendido fue cuantificado por Phosphorimager.

2.6. Competición entre nucleótido y DNA en su interacción con Polμ

La estructura de TdT se ha resuelto en dos complejos binarios: TdT unida a DNA de cadena sencilla (PDB: 1KDH) y TdT unida a nucleótido (PDB: 1KEJ) (Delarue *et al.*, 2002). En el cristal de TdT interaccionando con una cadena sencilla de DNA se observa como la enzima está unida al extremo 3' del *primer* en lo que se asemejaría a una posición postcatalítica (n+1), posición incompatible con la unión simultánea de un

nucleótido libre. No existe un cristal de TdT formando un complejo con DNA y nucleótido. Este hecho podría implicar que el DNA unido a la proteína en la posición catalítica “n” (esto es, la que tendría justo antes de la hidrólisis del nucleótido) es una posición relativamente inestable en ausencia de nucleótido. En estos estudios cristalográficos también se describe que el cristal de TdT unido a nucleótido se puede superponer al cristal de la proteína unida al DNA de cadena simple así como al de la proteína libre, sin haber grandes cambios conformacionales en la estructura general de la proteína. La aparente rigidez de TdT, y presumiblemente de Pol μ , contrasta con lo que ocurre a otra polimerasa de la familia, Pol β , en donde hay grandes cambios conformacionales en el pulgar para que la proteína pueda translocarse a lo largo del DNA en pequeños *gaps* (Beard y Wilson, 1998; Sawaya *et al.*, 1997). El residuo R258 de Pol β , que es esencial para mantener la estabilidad de la conformación abierta, está ausente en TdT, Pol μ y Pol λ (Sawaya *et al.*, 1997). Este cambio conformacional no es necesario en el caso de polimerasas independientes de molde como TdT y Pol μ , ya que la distribuidad o falta de procesividad de estas enzimas hace que sean totalmente compatibles con una conformación de la proteína siempre cerrada (Delarue *et al.*, 2002). No obstante, los estudios cristalográficos comparativos también sugieren que ocurren cambios conformacionales a nivel de residuos del centro activo, como es el caso de H329 (Moon *et al.*, 2007).

En el cristal de TdT unido a DNA de cadena sencilla, el residuo K403 (equivalente a R387 en Pol μ humana) interacciona con el DNA (Delarue *et al.*, 2002). En el caso de Pol μ , el residuo de arginina en esa posición podría provocar una interacción más estable con el DNA. Para determinar si Pol μ se une a DNA de cadena sencilla de una forma similar a como lo hace TdT, se decidió comprobar mediante la técnica de filtración en nitrocelulosa la estabilidad de Pol μ unido a DNA de cadena sencilla en una posición precatalítica (mediante la adición de nucleótido) y compararla con la que presenta en ausencia de nucleótido (equivalente a la postcatalítica o que podría ser la posición inicial de unión, como así se ha observado en el cristal de TdT).

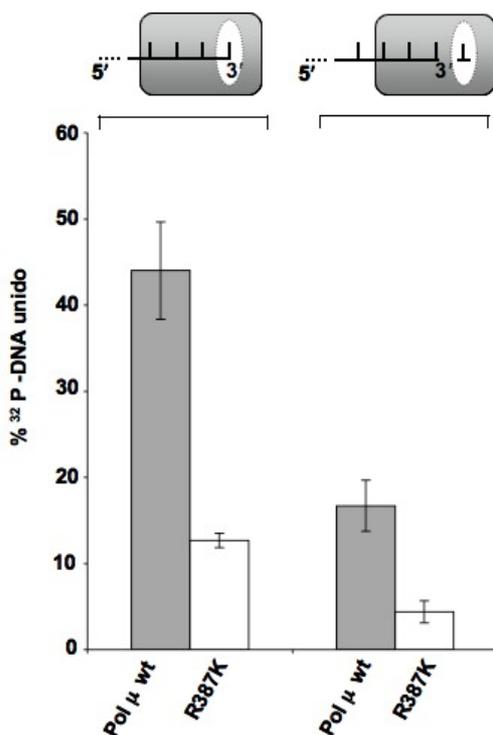


Figura 2.12. Ensayos de filtración en nitrocelulosa de complejos ternarios de Pol μ wt (barras grises) y Pol μ R387K (barras blancas) con DNA marcado (PolIT-ddCTP) en ausencia y presencia de nucleótido. Un esquema de las dos posibles posiciones del primer dependiendo de la ausencia (izquierda) o presencia (derecha) del nucleótido están dibujadas encima del gráfico. Está representado el bolsillo de unión del nucleótido (óvalo blanco) en la proteína (rectángulo gris). El esquema de la izquierda está basado en la estructura del cristal de TdT, en donde la proteína está unida a cuatro bases de un oligonucleótido en una posición que se asemeja a una situación postcatalítica. El esquema de la derecha representa el complejo ternario (o precatalítico) de Pol μ unida a un primer y al nucleótido entrante.

Se realizó un ensayo de interacción de la proteína con el DNA en ausencia y en presencia de nucleótido mediante filtros de nitrocelulosa. En ambos casos, se midió la interacción en presencia de Mn^{+2} (1 mM). Para evitar catálisis en presencia del nucleótido, se utilizó DNA conteniendo una base ddCTP en el extremo 3' OH. El nucleótido (dTTP) fue puesto en un amplio exceso (100 μ M) y el DNA (5 nM) fue marcado con ^{32}P en el extremo 5' OH para poder detectar su interacción con la proteína.

Si en Polμ ocurre lo mismo que en TdT, el nucleótido y el extremo 3' del *primer* competirán por la misma posición en la proteína. Por tanto, en presencia de nucleótido la proteína interaccionará con el DNA peor, ya que tendrá unido a éste en una posición "n" (pre-catalítica) que resulta ser más inestable. Los resultados muestran que la afinidad de Polμ wt y Polμ R387K por una cadena simple de DNA está reducida considerablemente en presencia de nucleótido (2,8 veces y 2,4 respectivamente). Esto sugiere que Polμ, al igual que se observó en el cristal de TdT, une el extremo del *primer* en una posición estable pero improductiva (similar a la postcatalítica) en ausencia de nucleótido, y en una posición precatalítica, menos estable pero productiva, cuando está presente (Fig. 2.12). Por tanto, la necesidad de llevarse a cabo un desplazamiento del extremo del *primer* a una posición mas inestable, junto con la baja afinidad del nucleótido entrante, al no ser seleccionado y estabilizado por una cadena molde, hacen de este paso de ajuste del complejo ternario (*induced-fit*) el paso limitante de la reacción de transferasa terminal.

Ya habíamos demostrado que el mutante R387K tenía reducida su capacidad de interacción con DNA de cadena sencilla, lo cual podría alterar el balance de interacciones que conducen a la formación del complejo ternario productivo. Para determinar de modo directo si la unión de Polμ a DNA de cadena sencilla en la posición improductiva es más estable en Polμ wt que en el mutante R387K, se llevó a cabo un experimento para determinar la estabilidad del complejo improductivo una vez formado. Este experimento se realizó mediante filtración en nitrocelulosa con DNA de cadena sencilla (PoliT) marcado en 5' OH y DNA competidor (PoliT). Se partió de un mismo grado de interacción de las proteínas al DNA marcado (mismo porcentaje de unión de la proteína al DNA, 20%) para que la concentración de complejos binarios inicial fuese la misma para ambas proteínas independientemente de su afinidad por el DNA. Estos complejos de proteína y DNA fueron incubados durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se inició la reacción a tiempo 0 añadiendo una cantidad de DNA competidor frío en función de la concentración de proteína de partida (2 μ M de R387K y 375 nM de Polμ wt). Las reacciones fueron filtradas a diferente tiempos y la radioactividad retenida en los filtros, indicativa de la interacción entre el DNA unido inicialmente y Polμ, fue cuantificada por *Phosphorimager*.

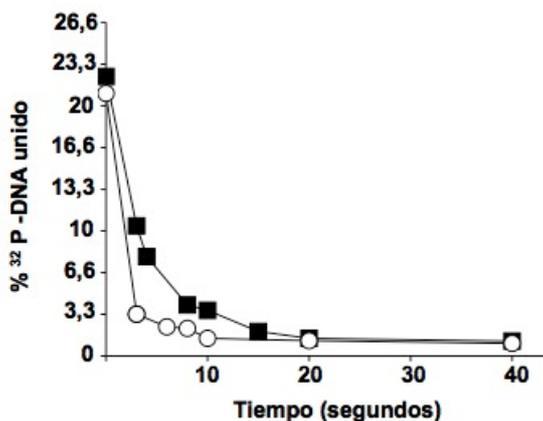


Figura 2.13. Ensayo de competición en la unión de proteína a DNA de cadena sencilla. El ensayo se llevó a cabo mediante filtración en nitrocelulosa a una temperatura de 22°C. Polμ wt (cuadrado negro) presenta una K_{off} menor que Polμ R387K (círculo blanco). El DNA de cadena simple (PoliT) está marcado en 5' OH y a una concentración de 5 nM. El DNA (PoliT) competidor se añade a una concentración de 2 μ M para R387K y 375 nM para Polμ wt (un exceso de 4 veces con respecto a la proteína) sobre la mezcla de proteína y DNA marcado. El DNA retenido en el filtro fue cuantificado por *Phosphorimager*. Los ensayos fueron realizados a una temperatura de 22°C.

Como se observa en la Figura 2.13, el mutante R387K muestra una K_{off} por DNA de cadena sencilla < 3 segundos, diferente a la de Pol μ wt (aproximadamente 5 segundos). El valor real de K_{off} para el mutante R387K no puede determinarse mediante esta técnica, ya que no se puede comprobar el grado de interacción entre la proteína y el DNA en menos de 3 segundos. Este resultado implica que la interacción con DNA de cadena sencilla en la posición improductiva es más inestable para el mutante R387K que para la Pol μ wt, es decir, R387K tiene una mayor facilidad que Pol μ wt para formar un complejo ternario productivo en presencia de nucleótido. Este experimento se repitió en las mismas condiciones utilizando TdT humana, obteniéndose un resultado similar al mutante de Pol μ , es decir, un valor de la $K_{\text{off}} < 3$ segundos.

2.7. Conclusiones

Según los experimentos mostrados en este capítulo, Pol μ parece interactuar con DNA de cadena sencilla en una posición similar a la que se observa en el cristal del complejo binario TdT-DNA. Esta interacción con el *primer* es más estable en Pol μ wt que en el mutante R387K. Para la formación de un complejo ternario productivo ha de llevarse a cabo un desplazamiento del extremo del *primer* a una posición más inestable, y para que esto ocurra, una peor interacción de R387K con el DNA facilita el movimiento.

El residuo R387 de Pol μ parece ser crítico en determinar la velocidad de la actividad transferasa terminal y ésta puede ser aumentada al hacer el cambio conservativo de R a K. El residuo R387 está implicado en el paso limitante de la actividad transferasa terminal de Pol μ y contribuye a una interacción más estable con el DNA de cadena simple.

En los experimentos descritos en este capítulo se ha demostrado como el mutante R387A está afectado en la actividad transferasa terminal y provoca un descenso en la actividad. Este comportamiento podría deberse a que la eliminación de un residuo cargado positivamente por un residuo neutro modificase la arquitectura del centro activo e impidiese la correcta recolocación del extremo del *primer* en posición “n” en presencia del nucleótido.

Otro residuo clave para la actividad transferasa terminal de Pol μ es H329, que como se ha visto no cambia la actividad dirigida por molde de Pol μ en *gaps* de pequeño tamaño, pero es crucial en la actividad independiente de molde y en reacciones de *end joining* donde no hay complementariedad de secuencia. Como veremos en el capítulo siguiente, el residuo H329 es crítico para la correcta orientación del primer con el nucleótido entrante, y por tanto su mutación repercute directamente en la reparación de roturas de doble cadena en el DNA cuando no hay complementariedad.

Con los elementos aquí descritos tratamos de estudiar en el siguiente capítulo la actividad transferasa terminal en el contexto de reparación por NHEJ y cómo la actividad transferasa terminal de Pol μ se distingue y complementa a la de la TdT durante la reacción de reparación.

Capítulo 3

Pol μ y TdT: actividad transferasa terminal en extremos de DNA 3'-protuberantes

3.1. Actividad transferasa terminal de Pol μ y TdT en DNA de doble cadena con extremos 3'-protuberantes	62
3.2. Interacción de TdT y Pol μ wt con sustratos de DNA de doble cadena con extremos 3'-protuberantes.....	64
3.3. La presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' inhibe la reaccion de transferasa terminal de Pol μ sobre extremos de DNA con protuberancias cortas.....	66
3.4. La presencia de un grupo fosfato permite reacciones de reunión de extremos no complementarios.....	68
3.5. Reunión de extremos 3'-protuberantes con complementariedad de secuencia.....	73
3.6. Conclusiones.....	74

El sistema de reparación del DNA por reunión de extremos no homólogos (NHEJ) es el principal mecanismo de reparación de roturas de doble cadena utilizada por las células de los organismos eucarióticos superiores (Friedberg *et al.*, 2006). Cuando ocurren este tipo de lesiones en el DNA, son reclutadas en la zona dañada una serie de factores de reparación especializados. Inicialmente, se une al DNA el dímero Ku, que a su vez recluta a nucleasas (Artemis: DNA-PKcs), polimerasas (Pol μ y Pol λ) y ligasas (XLF: XRCC4:DNA ligasa IV) (Nick McElhinny y Ramsden, 2004). Dependiendo de la forma en la que el DNA se rompe se pueden generar extremos romos, 5'-protuberantes o 3'-protuberantes (Daley y Wilson, 2005; Ma *et al.*, 2002). Los extremos 5'-protuberantes son sustratos de ciertas polimerasas, como por ejemplo Pol λ , que pueden polimerizar fácilmente mediante dirección de molde los nucleótidos que faltan (García-Díaz *et al.*, 2000). En las situaciones en las que el extremo del DNA es 3'-protuberante la situación es más complicada. Un extremo 3' puede tener regiones de cierta microhomología con otro extremo 3'-protuberante o pueden ser secuencias sin ningún par de bases complementarias. Es especialmente en este último caso donde una polimerasa como Pol μ , con una gran capacidad de distorsión del *template* y realineamiento del *primer*, es capaz de reunir extremos con poca o ninguna complementariedad (Dominguez *et al.*, 2000; Juárez *et al.*, 2006). Adicionalmente, como se visto en capítulos anteriores, Pol μ puede incorporar bases no dirigidas por molde mediante su actividad transferasa terminal, creando así un cierto potencial para que exista complementariedad entre los extremos 3'-protuberantes que deben ser reunidos para reparar la rotura.

En las células del sistema inmune, la ruta de reparación del DNA por reunión de extremos no homólogos se ha especializado en un mecanismo para generar variabilidad durante la recombinación V(D)J en los receptores antigénicos de las inmunoglobulinas. Es en este contexto donde TdT y Pol μ , ambas con capacidad de polimerización independiente de molde, tienen un papel crítico por su habilidad de extender los extremos romos o 3' protuberantes generados durante las roturas programadas que ocurren en este proceso. Pol μ genera variabilidad mediante la adición de nucleótidos durante el mecanismo de recombinación VJ de las cadenas ligeras (κ) de las inmunoglobulinas. Por otra parte, TdT actúa incorporando nucleótidos entre los segmentos V, D y J de las cadenas pesadas (Bertocci *et al.*, 2003; Bertocci *et al.*, 2006).

La comparación entre Pol μ y TdT llevó a un análisis más exhaustivo del mecanismo que permite modular la incorporación de pocos nucleótidos que generen una conectividad eficaz para la reparación de roturas de doble cadena en el DNA (NHEJ). La actividad transferasa terminal de Pol μ en NHEJ contrasta con la de TdT, que incorpora una gran cantidad de nucleótidos para generar variabilidad durante la recombinación V(D)J. Aunque la actividad transferasa terminal de Pol μ es mucho más reducida que la de TdT, los estudios en este capítulo implican que estas polimerasas

pueden complementarse o sustituirse en ciertos tejidos o durante el desarrollo embrionario.

3.1. Actividad transferasa terminal de Polμ y TdT en DNA de doble cadena con extremos 3' protuberantes

Como se ha descrito, la habilidad de Polμ y TdT de extender extremos 3'-protuberantes mediante actividad transferasa terminal hace que estas polimerasas sean capaces de crear conectividad entre extremos no complementarios. La adición de un único nucleótido en un extremo 3' puede generar la suficiente complementariedad para hibridar con otro extremo 3'-protuberante de otra molécula de DNA (Gu *et al.*, 2007a; Gu *et al.*, 2007b; Ma *et al.*, 2004).

Para determinar si Polμ y TdT muestran un patrón de actividad transferasa terminal semejante sobre sustratos romos o 3'-protuberantes, se decidió medir este tipo de actividad en estos sustratos. Se diseñaron moléculas sintéticas de DNA con protuberancias 3' que abarcaban desde un sólo nucleótido protuberante hasta 11 nucleótidos protuberantes. En todos los casos se sintetizaron secuencias homopoliméricas (Poli-T) para evitar complementariedad entre dos moléculas de DNA. El experimento se llevó a cabo en condiciones limitantes de proteína (200 nM) frente a una concentración de DNA (400 nM) y nucleótido (100 μM) en exceso. La reacción fue activada con Mn^{+2} (1 mM) e incubada por 30 min a 30°C. El nucleótido incorporado fue ddTTP para evitar más de un evento de catálisis y la posibilidad de complementariedad con otra molécula de DNA.

Se puede observar en la Figura 3.1 como el patrón que presenta Polμ es marcadamente diferente al que presenta TdT. TdT tiene una mayor actividad que Polμ (un factor de cinco veces) en extremos romos de DNA de doble cadena. Asimismo, TdT es más activa a partir de protuberancias de más de 3 Ts mientras que Polμ presenta el patrón inverso: Polμ es más eficiente en protuberancias de DNA cortas (1, 2 y 3 nucleótidos) y se observa un mínimo de actividad con una protuberancia de 4 y 5 nucleótidos. El porcentaje de DNA extendido empeora paulatinamente a medida que aumenta la protuberancia 3' hasta 3 nucleótidos. La actividad de Polμ se estabiliza cuando la protuberancia tiene 7 bases, con una actividad equivalente a la que presenta cuando el sustrato es DNA de cadena simple (PoliT).

Como se comentó en el capítulo anterior, el mutante de Polμ R387K presenta una actividad transferasa terminal mucho más alta (100 veces) que Polμ wt. Se decidió ensayar la actividad transferasa terminal de este mutante en extremos de DNA 3'-protuberantes con el objetivo de determinar si el patrón de actividad cambiaba con respecto a Polμ wt. El experimento se llevó a cabo en condiciones limitantes de proteína (200 nM) frente a una concentración de DNA (400 nM) y nucleótido (100 μM) en exceso. La reacción fue activada con Mn^{+2} (1 mM) e incubada 30 min a 30°C. El nucleótido empleado fue el ddTTP, el mismo que la protuberancia 3', para evitar más de un evento de catálisis y la posibilidad de complementariedad con otra molécula de DNA 3'-protuberante. Se puede observar en la Figura 3.2 como el patrón de incorporación de ddTTP a extremos de DNA 3'-protuberantes es semejante al que presenta Polμ wt. R387K, al igual que Polμ wt, extiende mejor protuberancias cortas (hasta 3 T) y su actividad va disminuyendo paulatinamente a medida que la protuberancia se hace más larga. Polμ R387K presenta un mínimo de producto extendido cuando la protuberancia 3' del sustrato es de 4 bases. Por tanto las diferencias que se pueden observar entre Polμ wt y Polμ R387K son aparentemente cuantitativas.

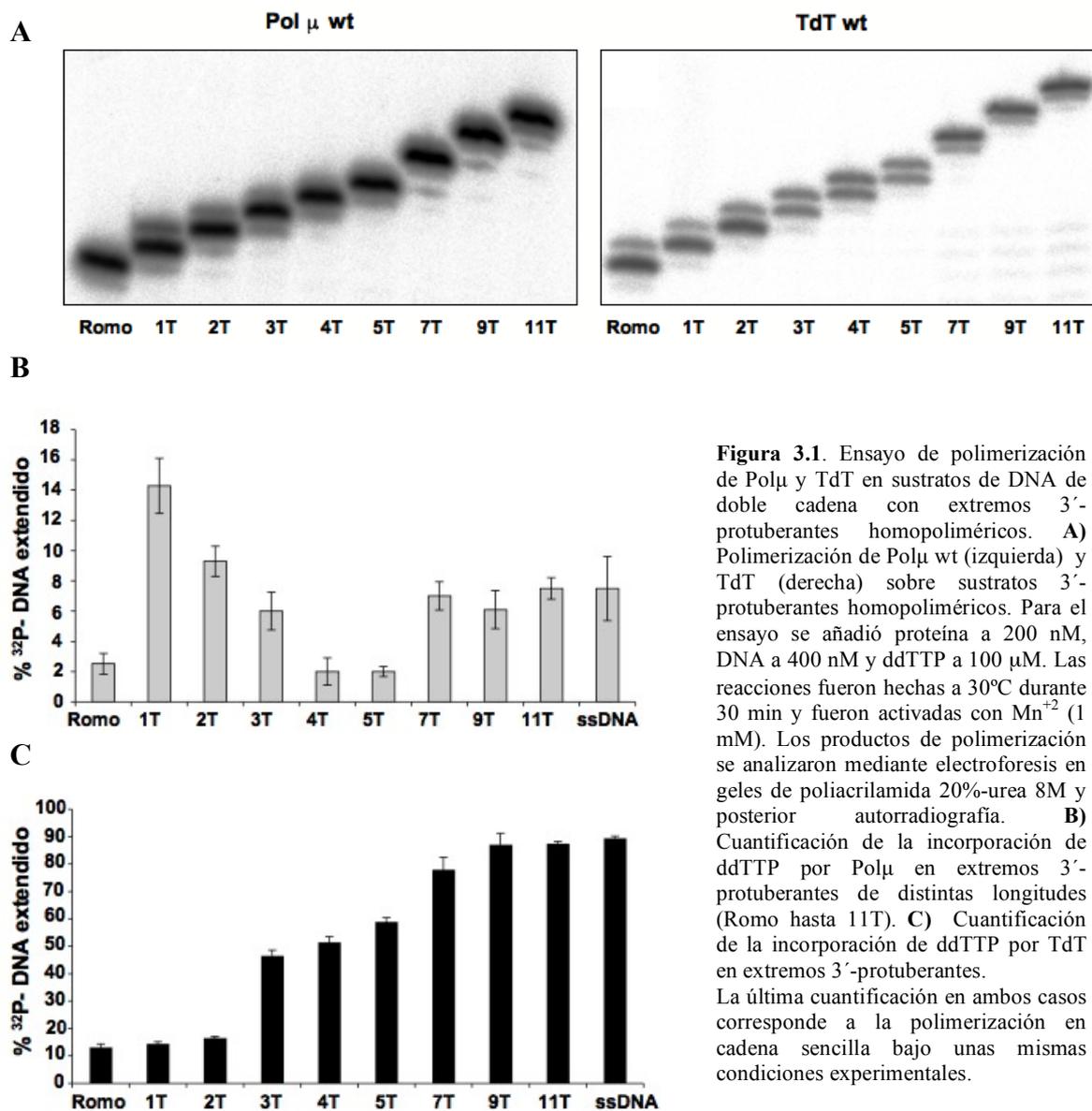


Figura 3.1. Ensayo de polimerización de Pol μ y TdT en sustratos de DNA de doble cadena con extremos 3'-protuberantes homopoliméricos. **A)** Polimerización de Pol μ wt (izquierda) y TdT (derecha) sobre sustratos 3'-protuberantes homopoliméricos. Para el ensayo se añadió proteína a 200 nM, DNA a 400 nM y ddTTP a 100 μ M. Las reacciones fueron hechas a 30°C durante 30 min y fueron activadas con Mn⁺² (1 mM). Los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8M y posterior autorradiografía. **B)** Cuantificación de la incorporación de ddTTP por Pol μ en extremos 3'-protuberantes de distintas longitudes (Romo hasta 11T). **C)** Cuantificación de la incorporación de ddTTP por TdT en extremos 3'-protuberantes. La última cuantificación en ambos casos corresponde a la polimerización en cadena sencilla bajo unas mismas condiciones experimentales.

Como queda patente en la Figura 3.3, con la mutación R387K en Pol μ se obtuvo una polimerasa más potente que la propia TdT en protuberancias 3' de DNA menores de tres nucleótidos (8 veces más eficiente en el caso de protuberancias de un nucleótido y 5,5 veces más eficiente en protuberancias de 2 nucleótidos).

En conclusión, TdT y Pol μ , las dos únicas DNA polimerasas con actividad transferasa terminal conocidas en células humanas, no tienen un papel redundante en la extensión de protuberancias 3' en el DNA. Mientras TdT es más activa en sustratos de DNA con protuberancias mayores de tres nucleótidos, Pol μ lo es en aquellas protuberancias menores de tres bases.

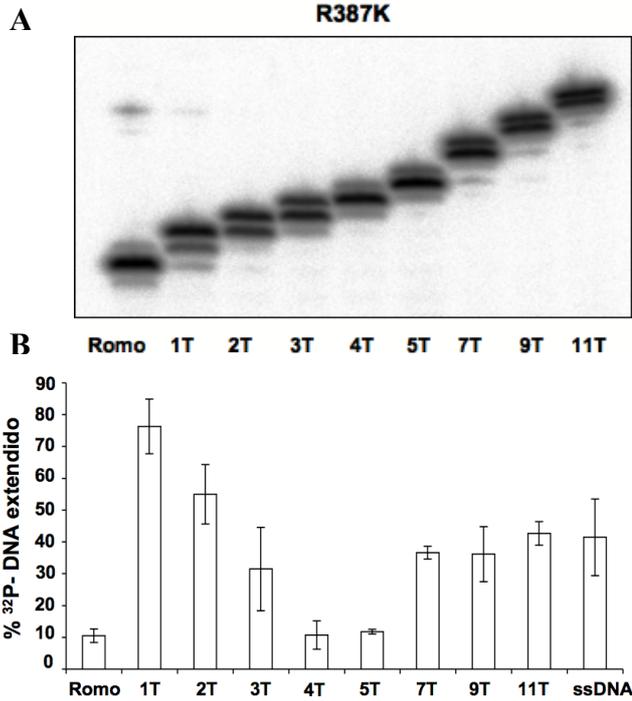


Figura 3.2. Ensayo de polimerización de Polμ R387K en sustratos de DNA de doble cadena con extremos 3'-protuberantes homopoliméricos. **A)** Polimerización de Polμ R387K sobre sustratos 3'-protuberantes homopoliméricos. Para el ensayo se utilizó una concentración de proteína de 200 nM, DNA a 400 nM y ddTTP a 100 μM. Las reacciones fueron hechas a 30°C durante 30 min y fueron activadas con Mn²⁺ (1 mM). Los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8M y posterior autorradiografía. **B)** Cuantificación de la incorporación de ddTTP por Polμ R387K en extremos 3'-protuberantes de distintas longitudes (Romo hasta 11T). La última cuantificación corresponde a la polimerización en cadena sencilla bajo unas mismas condiciones experimentales.

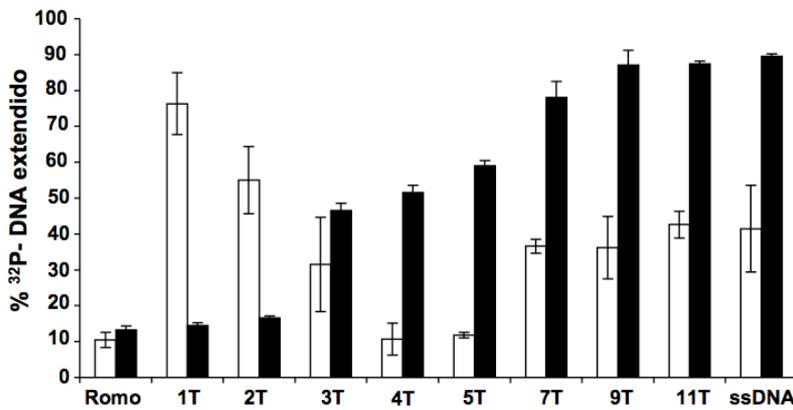


Figura 3.3. Comparación de los patrones de extensión de Polμ R387K (barras blancas) y TdT (barras negras) sobre sustratos de DNA de doble cadena con extremos romos, 3'-protuberantes y DNA de cadena sencilla.

3.2. Interacción de TdT y Polμ wt con sustratos de DNA de doble cadena con extremos 3' protuberantes

Para estudiar la interacción de Polμ y TdT con sustratos 3'-protuberantes, se llevaron a cabo ensayos de filtración en filtros de nitrocelulosa. Se comparó la afinidad de las proteínas por estos sustratos 3'-protuberantes frente a la afinidad por DNA de cadena sencilla (PoliT). La interacción de Polμ y de TdT con DNA de extremos romos es peor que a DNA de cadena sencilla. La K_{dis} en cadena sencilla de Polμ es de 1,3 μM y la de TdT de 5,7 μM mientras que en DNA de doble cadena con extremos romos la K_{dis} es más alta (por debajo del 10% del DNA retenido en el filtro) en ambas proteínas.

Se estudió la interacción de Pol μ con fragmentos de DNA romos, con extremos 3'-protuberantes de dos y siete bases y con DNA de cadena sencilla. La interacción de Pol μ con DNA de cadena sencilla es mejor que con cadena doble con extremos romos, como ya se había descrito en el Capítulo 2. Sorprendentemente, una protuberancia 3' en el DNA de siete bases no cambia la interacción con respecto al DNA de extremos romos ni lo hace asemejarse más a la interacción observada entre Pol μ y DNA de cadena sencilla (Fig. 3.4). Estos resultados sugieren que Pol μ , independientemente de la longitud de la protuberancia, está preferentemente unida a la región del DNA de doble

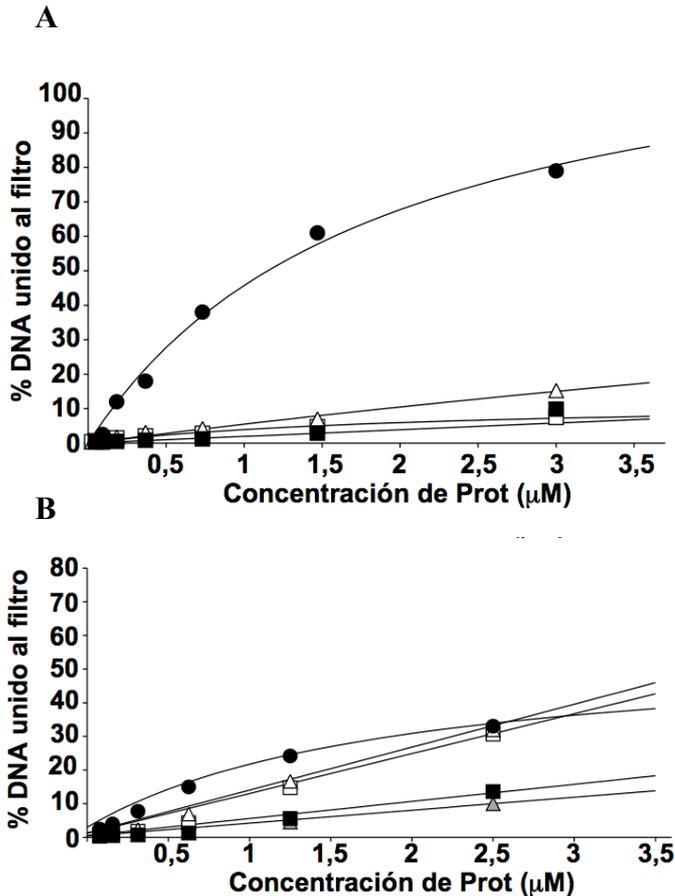


Figura 3.4. Ensayos de interacción DNA-proteína mediante la técnica de filtración en nitrocelulosa. **A)** Interacción entre Pol μ wt y DNA de cadena sencilla (círculos negros), DNA con sustratos romos (cuadrados negros), DNA con tres bases protuberantes en el extremo 3' (triángulos blancos) y DNA con siete bases protuberantes (cuadrados blancos). **B)** Interacción entre TdT y DNA de cadena sencilla (círculos negros), DNA con sustratos romos (cuadrados negros), DNA con dos bases protuberantes en el extremo 3' DNA (triángulos grises); DNA con tres bases protuberantes en el extremo 3' (triángulos blancos) y DNA con siete bases protuberantes (cuadrados blancos). En todos los casos el DNA está marcado radiactivamente y el retenido en el filtro fue cuantificado por *Phosphorimager*.

cadena. Posiblemente Pol μ extiende el extremo 3'-protuberante del *primer* aunque esté anclada a la región de doble cadena. Este mecanismo ya ha sido observado en otras polimerasas en las que protuberancias 3' son extendidas por el enzima tras formar una distorsión o bucle (*snap back*) (Brissett *et al.*, 2007).

TdT, por el contrario, a partir de una protuberancia 3' de tres nucleótidos, interacciona con el DNA de doble cadena igual que con el DNA de cadena sencilla. Este tipo de unión se corresponde con el cambio de actividad de TdT observado en la Figura 3.1 cuando la proteína pasa de un DNA de dos bases 3' protuberantes a otro DNA con tres bases protuberantes. Lo más probable es que a partir de la posición de tres nucleótidos protuberantes, el *Loop 1* de TdT puede cerrarse sobre la cadena sencilla al no tener ya impedimentos estéricos con la cadena molde.

3.3. La presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' inhibe la reacción de transferasa terminal de Polμ sobre extremos de DNA con protuberancias cortas

En condiciones fisiológicas, en los extremo 5' recesivos del DNA de doble cadena ha de existir un grupo fosfato para que pueda ser ligado el *gap* y así reparada la rotura en el DNA. Recientemente se ha publicado como la Ligasa IV puede ligar a través de *gaps* de pequeño tamaño, pero siempre es requerida la presencia de un grupo fosfato para hacer la reacción de ligación (Gu *et al.*, 2007a). El dominio de 8 KDa que poseen todas las polimerasas de la familia X permite la interacción con el grupo fosfato en la posición 5' de sustratos de DNA que forman un *gap* (región *downstream*). Es la alta concentración de cargas positivas en este dominio la que favorece la interacción con el grupo fosfato en 5'. La afinidad de las polimerasas de la familia X por sustratos de DNA con un grupo 5' fosfato en el *gap*, se correlaciona con la cantidad de cargas positivas que contienen en este dominio (Fig. 3.5). Esta interacción con el grupo 5' fosfato del *gap* es más fuerte en Polλ y en Polβ que en Polμ. TdT, por el contrario, es la polimerasa de la familia con menor número de residuos cargados positivamente en este dominio. No está clara la función del dominio de 8 KDa en TdT ya que hasta el momento no existen estructuras cristalográficas de la proteína con un *gap* de DNA (Moon *et al.*, 2007).

La interacción del dominio de 8 KDa de estas polimerasas con el grupo 5' fosfato al reunir dos extremos 3'-protuberantes de DNA durante el mecanismo de

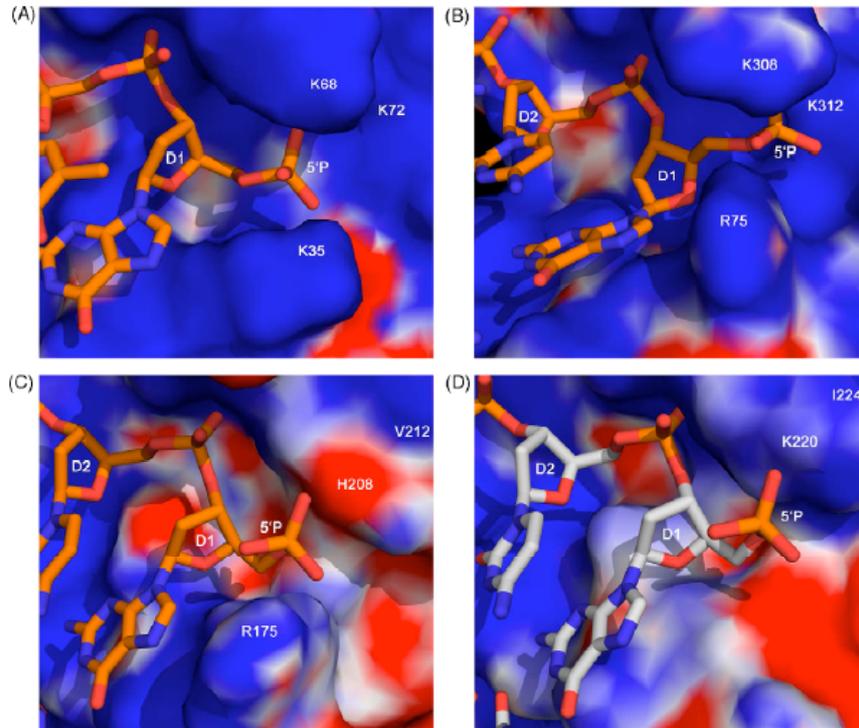


Figura 3.5. Comparación del número de residuos cargados positivamente presentes en el dominio de 8 KDa de las polimerasas de la Familia X. El DNA y los residuos de las proteínas están marcados en blanco. En naranja está señalado el DNA *downstream* en cada polimerasa. A) Polβ (PDB: 2FMS) B) Polλ (PDB: 1XSN) C) Polμ (PDB: 2IHM) D) TdT (PDB: 1JMS). En este último caso, fue modelado el DNA *downstream* de Polμ en el dominio de 8 kDa de TdT, ya que no hay cristal de TdT unido a un *gap* de DNA. La figura está adaptada de Moon et al (2007).

reparación por NHEJ, resulta en una estructura similar a la de un *gap*. *In vivo* estas reacciones tienen lugar en presencia de Ku, DNA-PKcs y XRCC4-Lig4.

Se decidió comparar la eficiencia catalítica de Pol μ wt en una reacción de polimerización con un grupo fosfato *versus* un grupo OH en un extremo 5' de un *gap* de dos nucleótidos. El ensayo de la cinética de incorporación del nucleótido complementario a la segunda base del *gap* (dG) se realizó en condiciones de estado estacionario (DNA a una concentración de 200 nM y Pol μ a 30 nM). La reacción fue activada con Mg⁺² (3 mM) y se incubó 30 min a 30°C.

	Km_{app} (μM)	$Kcat$ (s^{-1})	Eficiencia catalítica
Gap P			
Experimento 1	83,00	0,00335	$4,036 \cdot 10^{-5}$
Experimento 2	85,27	0,00219	$2,576 \cdot 10^{-5}$
Experimento 3	90,42	0,00363	$4,015 \cdot 10^{-5}$
Media + SD	86,23 \pm 3,80	0,0030 \pm 0,00076	3,542 $\cdot 10^{-5}$ \pm 8,370 $\cdot 10^{-6}$
Gap OH			
Experimento 1	410,36	0,00285	$6,9663 \cdot 10^{-6}$
Experimento 2	362,52	0,00333	$9,2102 \cdot 10^{-6}$
Experimento 3	375,90	0,00281	$7,4968 \cdot 10^{-6}$
Media + SD	382,92 \pm 33,82	0,0030 \pm 0,00028	7,891 $\cdot 10^{-6}$ \pm 1,172 $\cdot 10^{-6}$

Tabla 3. Comparación de los parámetros cinéticos de Pol μ wt sobre DNA de doble cadena con un *gap* de dos nucleótidos y con un grupo OH *versus* un grupo fosfato en el extremo 5' del *gap*. Se indican los valores de Kcat, Km y Eficiencia catalítica obtenidos a partir de experimentos independientes. Los valores de la media y la desviación estandar (SD) están indicados en cada caso.

Tras ajustar los datos resultantes a la ecuación de *Michaelis-Menten*, se calcularon los valores aparentes de V_{max} y K_{max} . Como se observa en la Tabla 3, el hecho de que haya un grupo fosfato en el extremo 5' del *gap* no cambia la constante catalítica (K_{cat}) de la reacción, pero provoca un descenso de la Km_{app} de aproximadamente 5 veces. Esto implica que en presencia de un grupo fosfato en la posición 5' del *gap*, la eficiencia catalítica de la reacción aumenta hasta 5 veces.

En vista del aumento observado en la eficiencia de incorporación del nucleótido complementario (dC) al *template* en un *gap* con fosfato con respecto a un *gap* sin fosfato, se determinó si la actividad transferasa terminal se veía afectada por la presencia de un grupo fosfato o un grupo OH en el extremo 5' recesivo.

El experimento se realizó a una concentración de DNA y de proteína de 100 nM y 200 nM respectivamente. El DNA con el que se llevó a cabo el experimento fue DNA de doble cadena con una, dos y tres bases 3' protuberantes homopoliméricas. El nucleótido incorporado al extremo 3' protuberante fue el mismo que el presente en la protuberancia, ddTTP (100 μM). Como se observa en la Figura 3.6, un grupo fosfato en posición 5' empeora la incorporación de ddTTP en extremos 3' protuberantes respecto a la presencia de un grupo OH en ese extremo. Esto ocurre principalmente cuando la protuberancia 3' del DNA de doble cadena es de una base. Puede observarse que en las protuberancias de dos y de tres nucleótidos, ese efecto inhibitorio debido al fosfato en la

posición 5' va perdiéndose. Cuando los nucleótidos protuberantes son tres, la presencia de un grupo OH o un grupo fosfato es irrelevante para la incorporación de ddTTP.

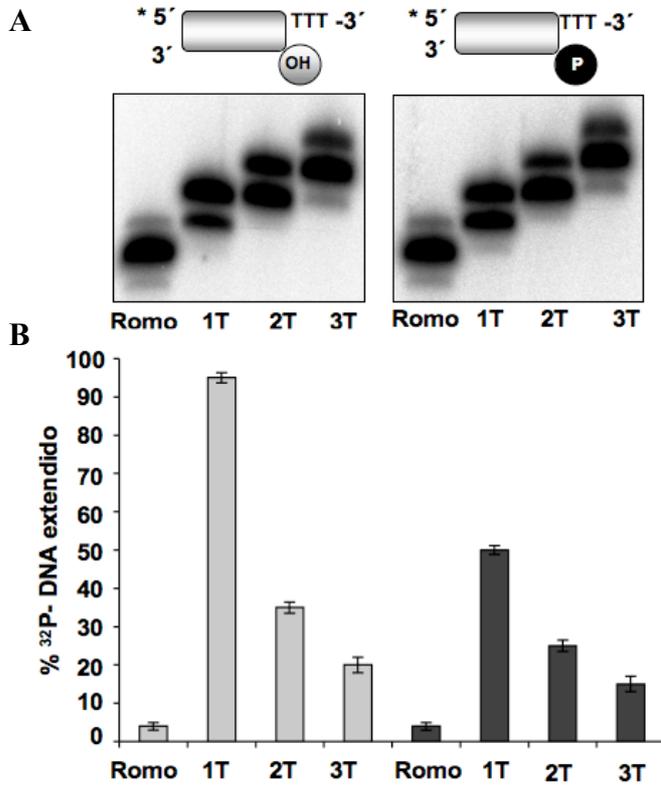


Figura 3.6. Extensión de DNA de doble cadena con extremos romos y 3'-protuberantes por Polμ con un grupo OH *versus* un grupo fosfato en el extremo 5' del DNA. **A)** Polimerización de Polμ wt sobre sustratos romos y 3'-protuberantes homopoliméricos (hasta 3 bases protuberantes). Para el ensayo se utilizó una concentración de proteína de 200 nM, DNA a 100 nM y ddTTP a 100 μM. Las reacciones fueron hechas a 30°C durante 30 min y fueron activadas con Mn⁺² (1 mM). Los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8M y posterior autorradiografía. **B)** Cuantificación de la incorporación de ddTTP por Polμ wt en extremos romos y 3'-protuberantes. En la izquierda (barras gris claro) se muestra la incorporación de ddTTP en presencia de un grupo OH y en la derecha (barras gris oscuro) la incorporación en presencia de un grupo fosfato.

3.4. La presencia de un grupo fosfato permite reacciones de reunión de extremos no complementarios

Debido a la importancia del grupo 5' fosfato en el reconocimiento de *gaps* y a la inhibición de la actividad transferasa terminal de Polμ observada sobre sustratos 3'-protuberantes con un grupo fosfato en el extremo 5' recesivo (Fig. 3.6), pensamos en la posibilidad de que dos moléculas de DNA estuviesen configurando un *gap*. Si así fuese, la reacción óptima requeriría un nucleótido complementario al posible *gap* (dATP en

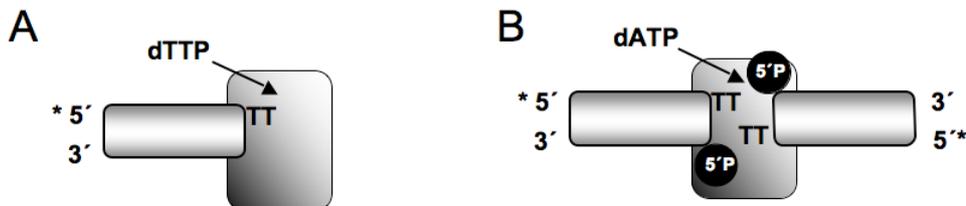


Figura 3.7. Modelo de la actividad de Polμ sobre extremos 3'-protuberantes en función de la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5'. **A)** La actividad de Polμ es estrictamente transferasa terminal cuando el nucleótido incorporado es idéntico a la protuberancia, reacción que es eficiente en ausencia de un grupo 5' P. **B)** Si hay un grupo 5' P, el nucleótido incorporado podría ser complementario a la protuberancia 3' si la reacción sobre uno de los extremos fuese dirigido por la otra molécula de DNA que actuase como molde.

este caso y no dTTP). Este modelo puede observarse en el esquema de la Figura 3.7.

Se decidió ensayar la eficiencia de incorporación del nucleótido complementario a la protuberancia, ddATP, y del no complementario, ddTTP, en presencia y en ausencia de un grupo fosfato en el extremo 5' del DNA de doble cadena. La concentración del DNA y de proteína en el ensayo fue de 200 nM para ambos casos y la de nucleótido de 100 μ M. El metal con el que se activó la reacción fue Mn^{+2} (1mM). La reacción fue incubada a 30°C durante 30 min. En la Figura 3.8 se observa que si se suministra ddATP, nucleótido complementario a la protuberancia 3', el hecho de tener un grupo fosfato a una distancia no mayor de un nucleótido incrementa el porcentaje de *primer* extendido. A medida que aumenta la protuberancia 3', tener un grupo fosfato en el extremo 5' del *gap* va dejando de tener efecto. El porcentaje de *primer* extendido con ddATP es muy similar en presencia o en ausencia de un grupo fosfato a partir de 3 bases protuberantes. Este efecto es el mismo que el observado con el ddTTP a partir de tres bases protuberantes.

La explicación de este fenómeno es que Pol μ puede hacer una reunión de extremos con el DNA de una forma más eficiente cuando hay un grupo fosfato en el extremo 5' y cuanto más cortas son las protuberancias 3'. La incorporación de la base complementaria a la protuberancia es más eficiente en protuberancias de un nucleótido y a medida que aumenta la longitud de la protuberancia 3' esta reacción se dificulta. En DNA con protuberancias de tres nucleótidos, la polimerización de ddATP no está favorecida por dirección de molde sino que las incorporaciones ocurren mediante la actividad transferasa terminal de Pol μ .

El hecho de tener un grupo fosfato en 5' mejora el *end joining* de dos moléculas de DNA por molécula de Pol μ pero dificulta la entrada de un nucleótido no complementario a la protuberancia. Así, si se suministra el mismo nucleótido que tiene la protuberancia 3', ddTTP, la incorporación es más eficiente cuando no hay un grupo fosfato en 5', por eso puede observarse un efecto inhibitorio debido a la presencia de fosfato en protuberancias de un nucleótido. Este efecto se va perdiendo a medida que la capacidad de unir extremos desapareados empeora debido a la longitud de la protuberancia. Cuando la longitud de la protuberancia es de 3 bases, el efecto del grupo 5' P es irrelevante con ambos nucleótidos (ddTTP *versus* ddATP).

Como se puede observar en la Figura 3.9, el mutante R387K no mostró diferencias cualitativas con wt en la incorporación tanto del nucleótido complementario como del no complementario a la protuberancia 3'. En el caso del mutante fue necesario reducir la concentración de nucleótido cuatro veces para observar el mismo porcentaje de producto extendido que en el caso de Pol μ wt.

Como se ha descrito anteriormente, en un DNA con un extremo 3'-protuberante de una única base las reacciones de reunión de extremos por Pol μ se ven más favorecidas. Se decidió ensayar en este tipo de sustrato si existía incorporación de cada uno de los cuatro nucleótidos independientemente. El objetivo era estudiar el modo en el que Pol μ incorpora nucleótidos no complementarios a la secuencia 3'-protuberante. Se comparó para cada nucleótido incorporado el efecto de la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' del DNA y se contrastó con el efecto que tendría en TdT. El ensayo se realizó a una concentración de DNA de 200 nM y de proteína de 200 nM (tanto de Pol μ como de TdT). Los nucleótidos fueron añadidos a una concentración de 50 μ M. La reacción fue activada con Mn^{+2} a una concentración de 1 mM y fue realizada durante 30 min a una temperatura de 30°C.

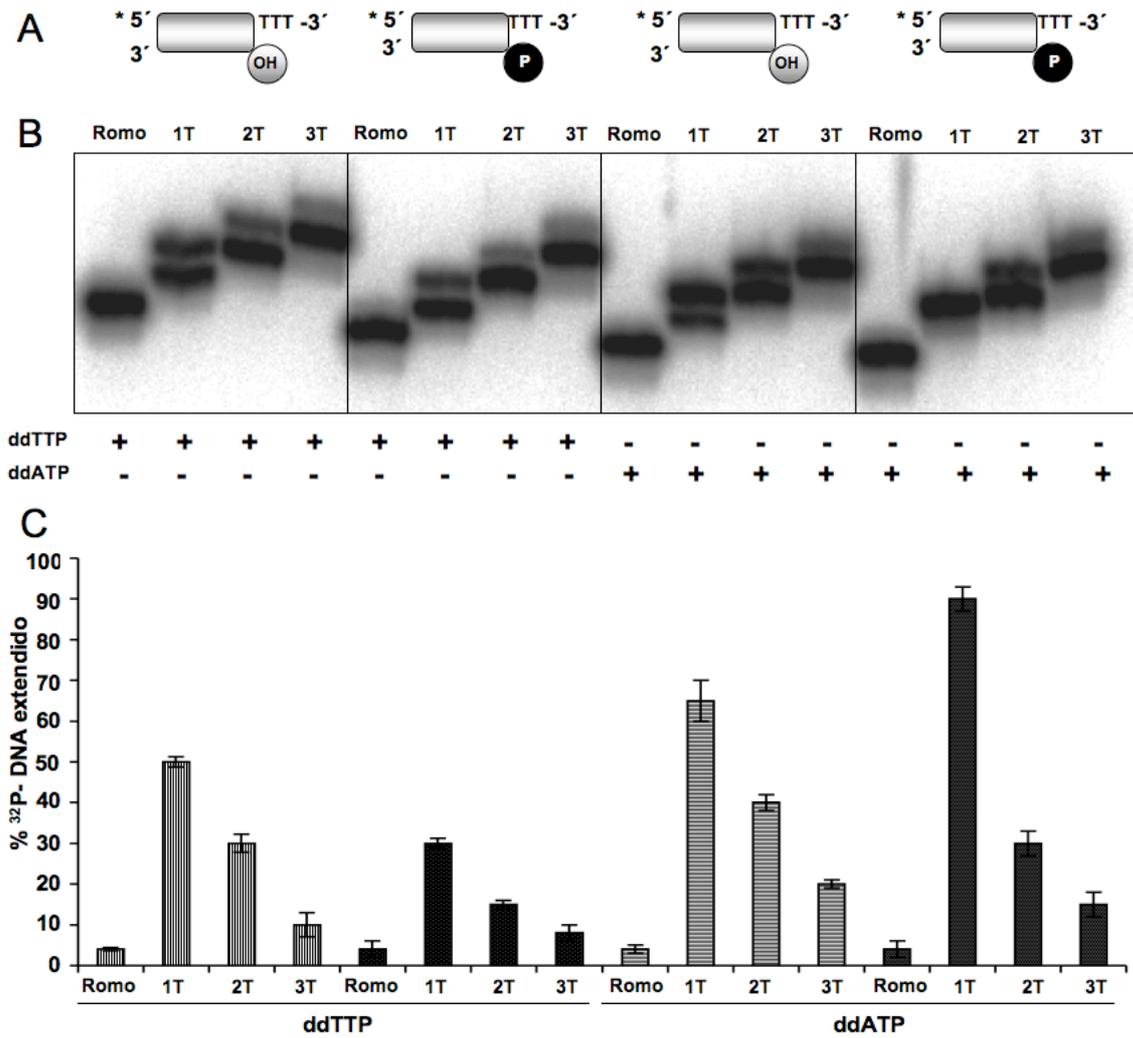


Figura 3.8. Ensayo de polimerización de Polμ wt en sustratos de DNA de doble cadena con extremos romos y 3'-protuberantes (hasta tres bases protuberantes). **A)** Esquema de las moléculas utilizadas. **B)** Incorporación de ddTTP (izquierda) y de ddATP (derecha) por Polμ wt sobre sustratos 3'-protuberantes homopoliméricos (PoliT). Para el ensayo se utilizó una concentración de proteína de 200 nM, DNA a 200 nM y nucleótido a 100 μM. Las reacciones fueron hechas a 30°C durante 30 min y fueron activadas con Mn⁺² (1 mM). Los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8M y posterior autorradiografía. **C)** Cuantificación de la incorporación de ddTTP y ddATP por Polμ en extremos romos y 3'-protuberantes.

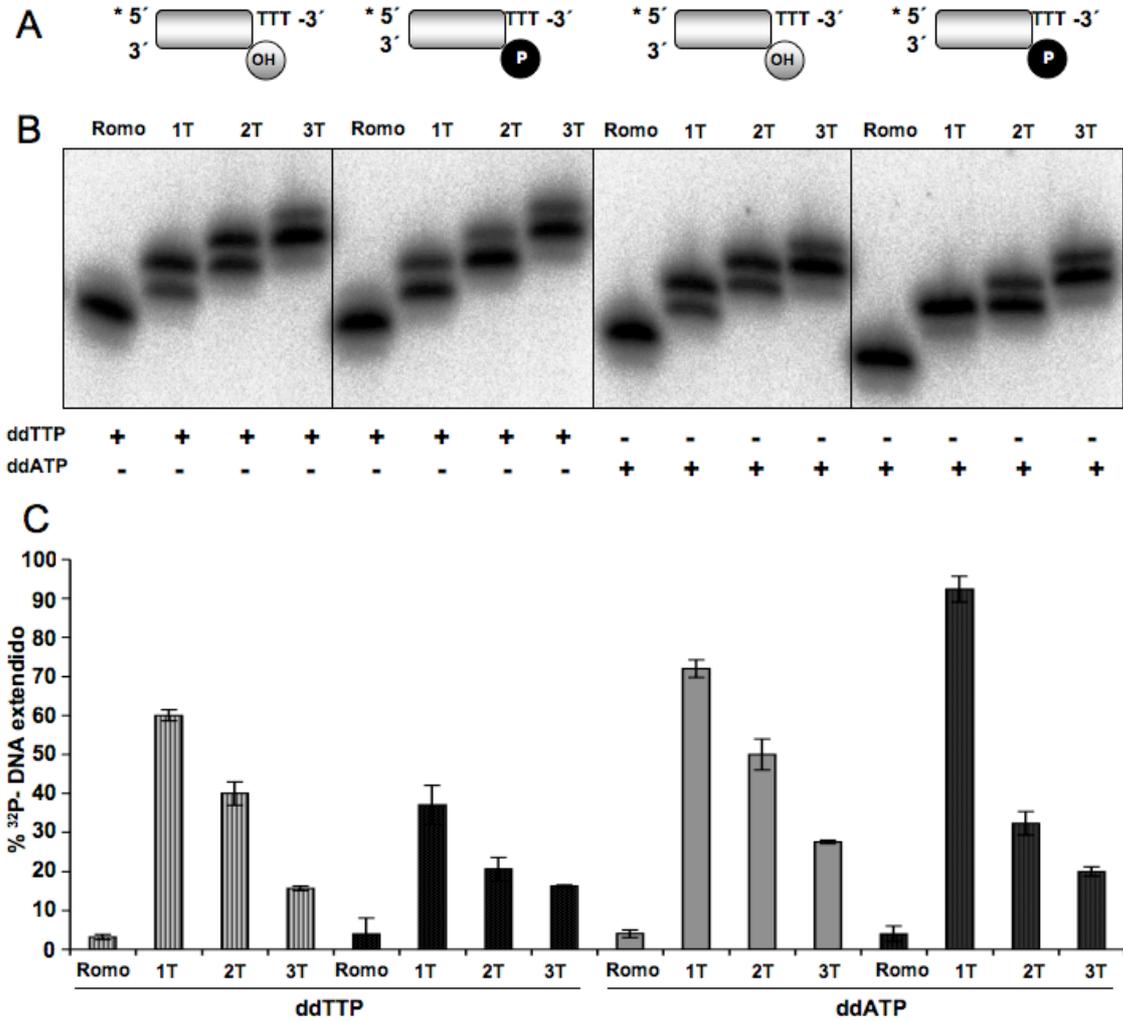


Figura 3.10. Ensayo de polimerización de Pol μ R387K en sustratos de DNA de doble cadena con extremos romos y 3'-protuberantes homopoliméricos (hasta tres bases protuberantes). **A)** Esquema de las moléculas utilizadas. **B)** Incorporación de ddTTP (izquierda) y ddATP (derecha) por Pol μ R387K sobre sustratos 3'-protuberantes homopoliméricos (PoliT) con un grupo fosfato o con un grupo OH en posición 5' según se indica en cada caso. Para el ensayo se utilizó una concentración de proteína de 200 nM, DNA a 200 nM y nucleótido a 100 μ M. Las reacciones fueron hechas a 30°C durante 30 min y fueron activadas con Mn⁺² (1 mM). Los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8M y posterior autorradiografía. **C)** Cuantificación de la incorporación de ddTTP y ddATP por Pol μ en extremos romos v 3'-protuberantes.

Como se observa en la Figura 3.10, Pol μ incorpora preferentemente la base complementaria a la protuberancia, ddATP, cuando hay un grupo fosfato en la posición 5'. Pol μ también puede incorporar cada uno de los cuatro nucleótidos no complementarios a la base 3'-protuberante gracias a su actividad transferasa terminal. TdT, por el contrario, extiende el extremo 3'-protuberante del *primer* con cada uno de los cuatro nucleótidos mediante su actividad transferasa terminal, ya que no se observan

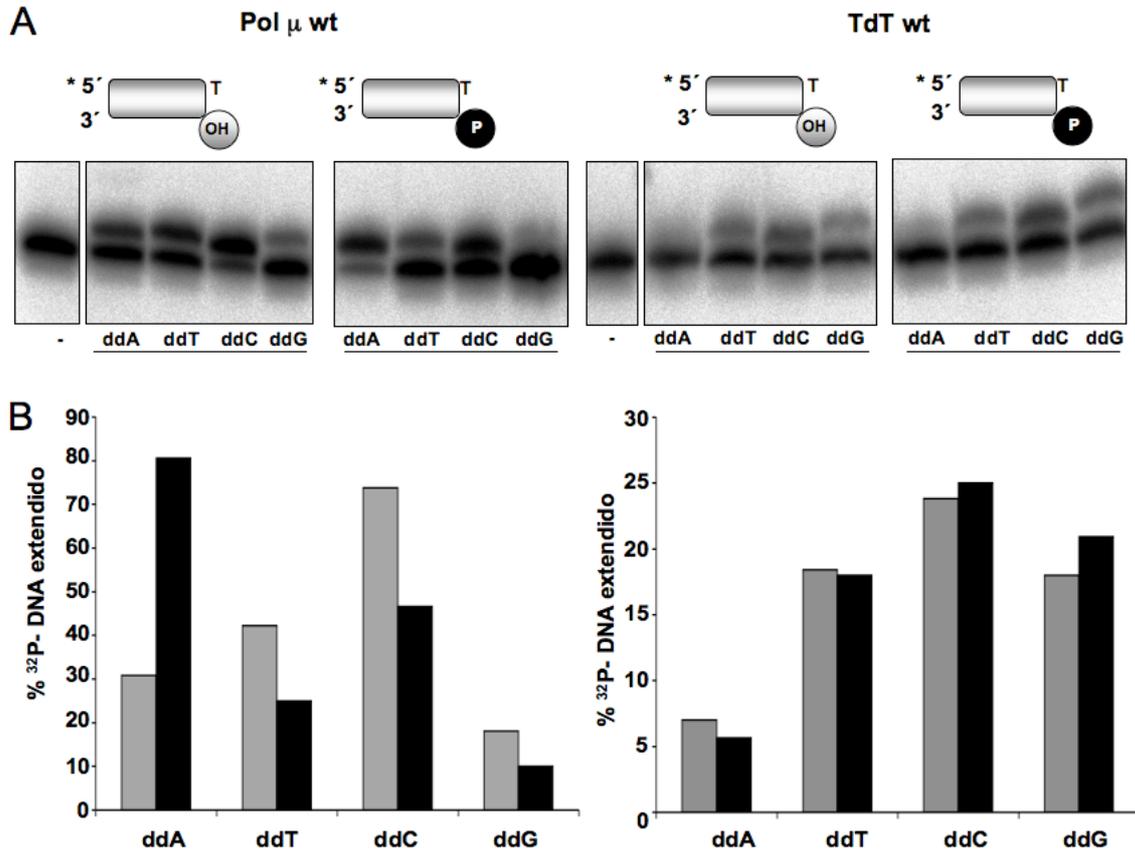


Figura 3.10. Extensión de sustratos con una base 3'-protuberante por Pol μ wt y TdT en presencia de un grupo OH o un grupo fosfato en 5'. **A)** Reacciones de polimerización de Pol μ wt (izquierda) y TdT (derecha) sobre sustratos 3'-protuberantes. El DNA (200 nM) utilizado en cada caso está esquematizado en la parte superior de la figura. La concentración de proteína empleada para el ensayo fue de 200 nM y la de ddNTP de 100 μ M. Las reacciones fueron realizadas durante 30 min a 30°C y fueron activadas con Mn⁺². **B)** En la figura de la izquierda está representada la cuantificación de la extensión de ddNTP sobre sustratos 3'-protuberantes con un grupo OH (barras grises) y con un grupo fosfato (barras negras) por Pol μ wt. En la figura de la derecha está representada la cuantificación de la extensión de ddNTP sobre sustratos 3'-protuberantes con un grupo OH (barras grises) y con un grupo fosfato (barras negras) por TdT.

diferencias en el porcentaje de primer extendido cuando hay en posición 5' del *downstream* un grupo OH con respecto a un grupo fosfato. El porcentaje de *primer* extendido en el caso de TdT es igual para ambas situaciones. Se puede observar como la actividad de TdT en este ensayo está por debajo de la actividad de Pol μ wt. Esto se debe a que el sustrato de una base 3'-protuberante no es el óptimo para la actividad de TdT, como se ha visto en apartados anteriores.

En conclusión, la presencia del grupo fosfato es fundamental para que la incorporación principal sea dirigida por el molde proporcionado por el otro extremo del

DNA en una reacción de reunión de extremos. La incorporación residual de los otros tres nucleótidos podría entonces ser debida a la actividad transferasa terminal.

3.5. *End-Joining* de extremos 3'-protuberantes con complementariedad de secuencia

Como se ha demostrado anteriormente, Pol μ wt es capaz de incorporar el nucleótidos en un extremo 3'-protuberante cuando no existe complementariedad en las bases protuberantes. Es la única polimerasa de la familia X con esta peculiar habilidad.

El mutante de Pol μ H329G no es capaz de producir reacciones de reunión de extremos cuando no hay complementariedad en los extremos 3'-protuberantes del DNA (resultados obtenidos en nuestro laboratorio y también confirmados por Moon *et al* con el mutante H329A). Como ya se ha comentado en los capítulos anteriores este mutante también carece de actividad transferasa terminal. Por el contrario, como se puede observar en la Figura 3.11, el mutante H329G puede hacer reacciones de reunión de

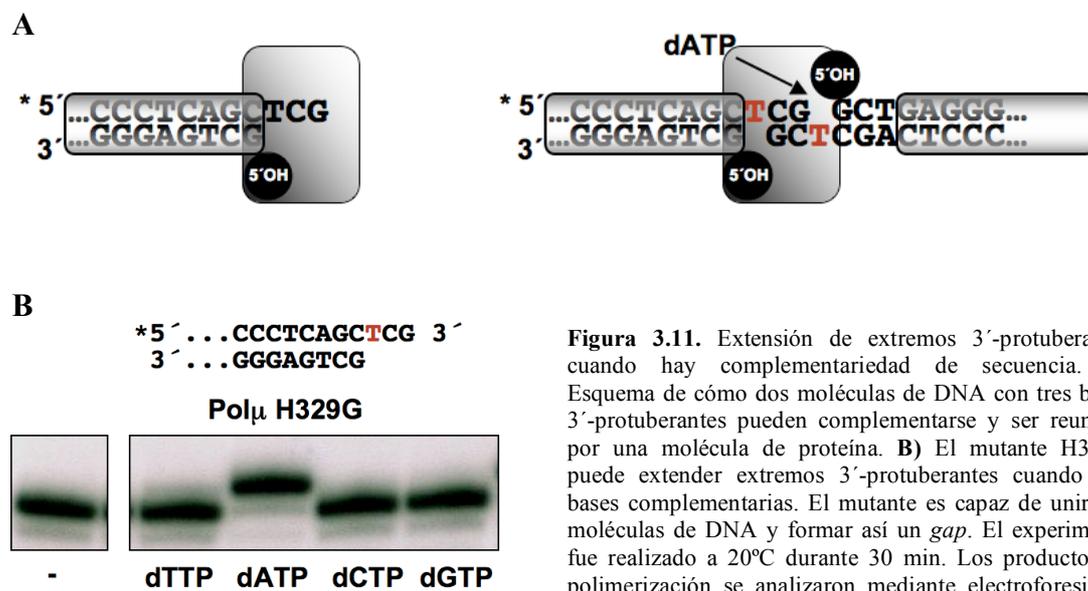


Figura 3.11. Extensión de extremos 3'-protuberantes cuando hay complementariedad de secuencia. **A)** Esquema de cómo dos moléculas de DNA con tres bases 3'-protuberantes pueden complementarse y ser reunidas por una molécula de proteína. **B)** El mutante H329G puede extender extremos 3'-protuberantes cuando hay bases complementarias. El mutante es capaz de unir dos moléculas de DNA y formar así un *gap*. El experimento fue realizado a 20°C durante 30 min. Los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8M y posterior autorradiografía.

extremos 3' de DNA cuando en la secuencia 3'-protuberante hay complementariedad. Este experimento fue realizado con el sustrato indicado en la parte superior de la figura, en donde dos bases complementan para crear un *gap* de un nucleótido (dT como molde) (Fig. 3.10 A, derecha). La exclusiva incorporación de dATP indica que se está incorporando el nucleótido complementario al molde y de manera dependiente de molde. Este no requerimiento de la H329 refleja la situación que presentaría Pol λ en este tipo de sustratos, capaz de reunir extremos complementarios sin la necesidad de una histidina en su secuencia (Nick McElhinny *et al.*, 2005).

Por el contrario, este residuo es dispensable para el *end joining* de extremos complementarios en los que el extremo 3' del *primer* se coloca en la posición productiva (como en un *gap*).

3.6. Conclusiones

En conclusión, Polμ es capaz de producir reacciones de reunión de extremos no complementarios *in vitro* sin el resto de los factores implicados *in vivo*. También se aprecia cómo con una molécula de fosfato en posición 5' del *downstream* se consigue mejorar la reacción de reunión de extremos no complementarios de dos moléculas de DNA por una molécula de proteína. Esa unión, probablemente más fuerte debida a ese grupo fosfato, provoca que sea más eficiente la entrada del nucleótido complementario a la protuberancia 3' cuando hay un *gap* de un nucleótido, pero que decaiga la eficiencia a medida que aumenta la distancia del *gap*. A partir de una protuberancia 3' de tres nucleótidos ya no se produce una reunión de extremos no complementarios eficiente. En estos casos la entrada del nucleótido tanto complementario como no complementario a la protuberancia ocurre mediante actividad transferasa terminal. Un número de bases 3'-protuberantes superior a cinco imposibilita que la molécula de proteína mantenga unidas a dos moléculas de DNA, y por tanto a partir de esa posición el porcentaje de primer extendido por Polμ es similar al que se observa con un DNA de cadena sencilla.

Capítulo 4

Interacción entre Polμ y PCNA

4.1. Interacción física entre PCNA y Polμ	78
4.2. Ensayos funcionales de la interacción entre PCNA y Polμ	80
4.3. Conclusiones	81

Las DNA polimerasas de la célula con frecuencia necesitan de la participación de factores accesorios para llevar a cabo su función. Por ejemplo, las DNA polimerasas replicativas siempre se encuentran formando parte de complejos multiproteicos de alto peso molecular (replisoma), que contienen actividades enzimáticas adicionales. La mayoría de las rutas de reparación del DNA implican muchos pasos secuenciales, incluyendo la síntesis de DNA, por lo que polimerasas específicas interaccionan con otros factores de la misma ruta de reparación y de esta manera su actividad es regulada para intervenir en el momento apropiado y de manera efectiva (Indiani *et al.*, 2005; Lopez de Saro *et al.*, 2003). Un factor accesorio de las DNA polimerasas que está implicado en numerosas reacciones de replicación y reparación es PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*, o Antígeno Nuclear de Células Proliferantes) (Moldovan *et al.*, 2007). PCNA es un homotrímero que interacciona con el DNA a manera de anillo (Fig. 4.1), pudiéndose entonces desplazar bidireccionalmente por el DNA (Bruck y O'Donnell, 2001). PCNA aumenta considerablemente la procesividad de las DNA polimerasas replicativas, que de esta manera pueden sintetizar grandes fragmentos de DNA sin soltarse del sustrato (O'Donnell *et al.*, 1992). Adicionalmente, PCNA sirve para reclutar diferentes enzimas a sitios activos de replicación y reparación y así servir como organizador de sus diversas reacciones enzimáticas (Warbrick, 1998; Lopez de Saro *et al.*, 2004;).

En años recientes ha sido demostrado que Pol λ y Pol β interaccionan con PCNA (Kedar *et al.*, 2002; Maga *et al.*, 2002). Pol λ puede interactuar físicamente con PCNA durante

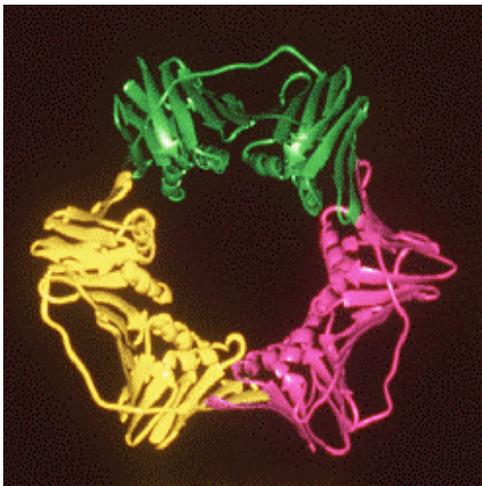


Figura 4.1. Estructura cristalográfica de PCNA humano. Cada monómero se ha representado de un color diferente.

el proceso de síntesis normal del DNA, y también durante la síntesis frente a DNA dañado (“translesión”), y por ello Pol λ podría estar implicada en la polimerización a través de lesiones abásicas en el DNA durante la replicación del genoma. Con respecto a Pol λ , un estudio reciente ha mostrado que la combinación de PCNA y RPA (Factor de Replicación A) aumentaba 1200 veces la correcta incorporación de dCTP (con respecto al incorrecto dATP) frente a lesiones que contenían 8-oxo-G (Maga *et al.*, 2007). Este efecto pudo ser observado asimismo *in vivo* utilizando extractos celulares carentes de Pol λ . Estos resultados sugieren que PCNA y RPA actúan de forma sinérgica para modificar la fidelidad de Pol λ al polimerizar a través de lesiones.

Con el objeto de completar estos estudios en la familia X, analizamos si existía una interacción entre Pol μ y PCNA, y si el factor de procesividad producía cambios en la capacidad de polimerización de Pol μ *in vitro*.

4.1. Interacción física entre PCNA y Pol μ

Un clon de cDNA correspondiente al gen de PCNA humano fue obtenido comercialmente y utilizado para construir un vector de sobreexpresión (basado en pET16b) de la proteína en *E. coli*. PCNA fue purificado hasta la homogeneidad mediante cromatografía (ver Materiales y Métodos). PCNA y Pol μ fueron concentradas mediante filtración y centrifugación (Centricón) y dializadas en tampón A (50 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM DTT; 4% glicerol; 50 mM NaCl).

La interacción entre ambas proteínas fue demostrada mediante un gradiente de glicerol 15-30 % (ver Materiales y Métodos), en el que se observó que PCNA y Pol μ podían formar un complejo estable en solución, en ausencia de DNA, y en estas condiciones de fuerza iónica (Fig. 4.2). En condiciones nativas, los monómeros de PCNA (MW: 28,6 KDa) forman un trímero que sedimenta en el gradiente de glicerol como una proteína de 86 KDa. Pol μ sedimenta de acuerdo al peso molecular del monómero (55 kDa), tal y como se puede ver en el panel central de la Figura 4.2.

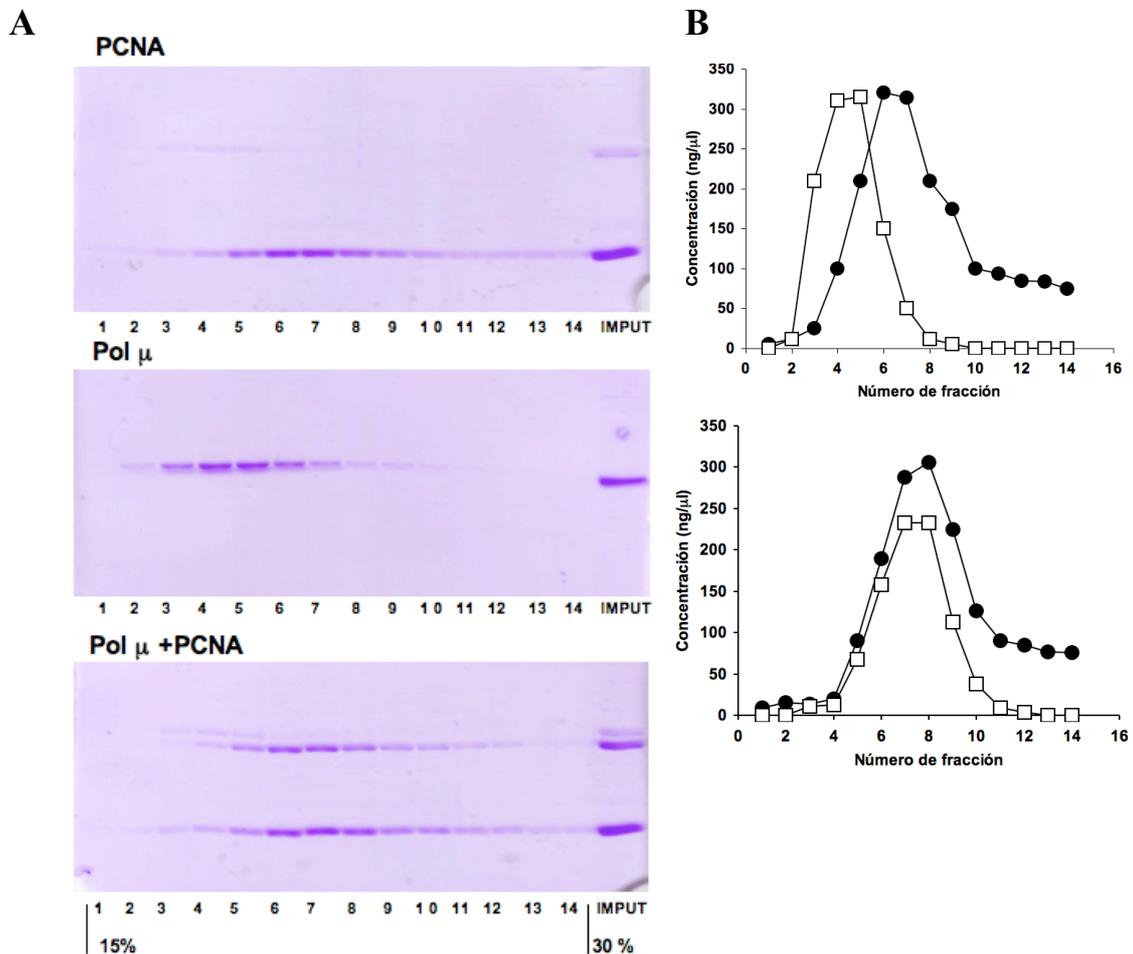


Figura 4.2. Interacción entre Pol μ y PCNA. **A)** Las fracciones (200 μ L) de los tres gradientes de glicerol que contenían PCNA (10 μ M como trímero), Pol μ (23 μ M) o PCNA-Pol μ , fueron analizadas por SDS-PAGE (12%) y teñidas con Azul de Coomassie. **B)** Cuantificación mediante densitometría de las proteínas PCNA (círculos negros) y Pol μ (cuadrados blancos) correspondientes a los geles de la izquierda.

Cuando las dos proteínas se incubaron 15 min a 4°C, Pol μ cambia su posición en el gradiente: mientras que Pol μ migra en las fracciones 4, 5 y 6 (panel central), en presencia de PCNA (panel inferior) lo hace en las posiciones 6, 7 y 8. Esto implica que ambas proteínas están interaccionando de modo estable en ausencia de DNA.

Para confirmar este resultado se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética en geles nativos utilizando PCNA marcado radiactivamente. Se marcó PCNA utilizando una versión modificada de la proteína en la que se añadió una secuencia de reconocimiento para la proteína quinasa A (PKA) en el extremo N-terminal de PCNA. El PCNA modificado de esta manera conserva sus funciones y se comporta a todos los efectos como PCNA *wild-type* (Kelman *et al.*, 1995). Los resultados de estos ensayos muestran que Pol μ causa un retraso significativo en la movilidad electroforética de [32 P]PCNA, demostrando así una interacción entre ambas moléculas (Fig. 4.3). La falta de definición de los complejos observados hacen especular que la interacción entre Pol μ y PCNA no es fuerte o que la vida media de la interacción es corta.

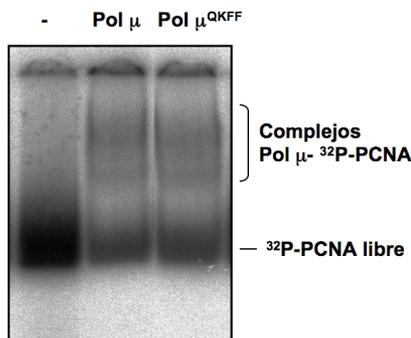


Figura 4.3. Interacción entre Pol μ y 32 P-PCNA. Los complejos PCNA-Pol μ fueron resueltos en un gel de poliacrilamida (4%) en condiciones nativas. Tras electroforesis (18 mA 2 horas) el gel fue secado sobre papel Whatman y revelado en *Phosphorimager*. La alta carga negativa de PCNA hace posible que esta proteína corra bien bajo estas condiciones de electroforesis. Su complejo con otra proteína, aún en ausencia de DNA, hace que su movilidad cambie.

Por último, otra técnica utilizada fue un ensayo de interacción sobre membranas de nitrocelulosa (Far-Western). Para esta técnica se inmovilizaron 20 pmol de cada una de las proteínas indicadas en la Figura 4.4 y se bloqueó la membrana con leche al 5% en PBS. Posteriormente la membrana fue tratada con [32 P]PCNA y sometida a tres lavados con PBS y expuesta a *Phosphorimager*. Como se observa en la Figura 4.4, [32 P]PCNA interacciona bajo estas condiciones con Pol λ , Pol β y Pol μ .

El sitio de interacción de Pol λ y Pol β con PCNA ha sido estudiado con anterioridad (Kedar *et al.*, 2002; Maga *et al.*, 2004), pero sus secuencias no parecen

contener una región consenso de interacción con PCNA. Para determinar el punto de interacción entre Pol μ y PCNA mutamos en Pol μ una región del subdominio pulgar que parecía reunir unas condiciones óptimas para interaccionar con PCNA: un *loop* en la superficie de la proteína muy cercano a puntos de interacción con PCNA propuestos para Pol β y Pol λ , que contiene una secuencia consenso de otras proteínas que

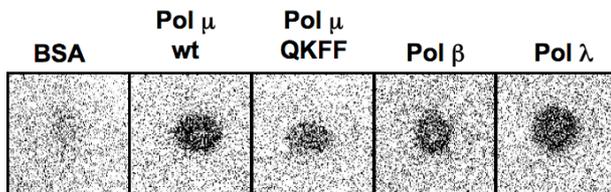


Figura 4.4. Demostración de la interacción de PCNA con polimerasas de la familia X mediante Far-Western en membrana de nitrocelulosa.

(DPEQKTFFQAA) parecida a la secuencia

interaccionan con PCNA (QL-V/L-FF) (Warbrick, 1998). Realizamos mutagénesis dirigida sobre los cuatro residuos considerados críticos para la interacción (Q,K,F,F), que fueron simultáneamente mutageneizados a Alanina. Este mutante cuádruple fue sobreexpresado y purificado como se ha descrito para Pol μ wt. Como puede observarse en la Figura 4.4, el mutante de Pol μ interacciona ligeramente peor con PCNA que Pol μ wt a una misma concentración de proteína. No obstante, el mutante claramente interacciona con PCNA (Fig. 4.3 y Fig. 4.4), lo que sugiere que o bien este sitio no es el correcto o bien existe más de un sitio de interacción entre Pol μ y PCNA.

4.2. Ensayos funcionales de la interacción entre PCNA y Pol μ

Diversos ensayos encaminados a encontrar un efecto funcional de PCNA en la actividad de Pol μ en diversos sustratos de DNA mostraron tan solo efectos modestos en la actividad de la polimerasa. En primer lugar se realizaron ensayos de actividad en *template/primer* con el objeto de analizar si PCNA cambiaba las propiedades de Pol μ sobre este sustrato.

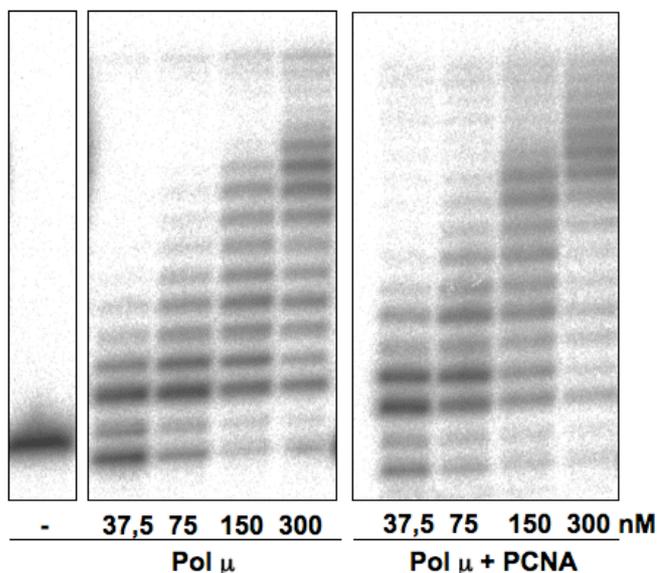


Figura 4.5. Estimulación de Pol μ en *template/primer* en presencia de PCNA. Un oligo sintético de 15 bases (*primer*) fue hibridado a una molécula de 32 bases (*template*) a una concentración final de 5 nM de manera que quedaba un extremo de doble cadena romo y otro con una protuberancia 5' de 17 bases. Las concentraciones de Pol μ utilizadas son las indicadas en la figura, y la de PCNA es de 1,2 μ M. Los nucleótidos fueron añadidos a una concentración de 100 μ M. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-urea y posteriormente revelados por *Phosphorimager*.

Las reacciones se llevaron a cabo durante 30 min a 30°C, utilizando las concentraciones de proteína indicadas en la Figura 4.5, y DNA a una concentración de 5 nM. En la Figura 4.5 se observa que la estimulación de Pol μ por PCNA no es muy pronunciada, pero sin embargo, puede observarse una mayor extensión especialmente a la concentración más alta de proteína. Estas condiciones de ensayo no son las óptimas para la detección de cambios en la procesividad causados por PCNA, ya que idealmente PCNA debe ser cargado en el DNA enzimáticamente por el complejo RFC. En estas condiciones mostradas es de esperar que PCNA se inserte en el DNA por difusión pasiva. Por otro lado, como se ha observado en el caso de Pol λ , Pol μ podría requerir factores adicionales para su máxima actividad, como RPA.

Pol μ presenta una actividad óptima en DNA con *gaps* de pequeño tamaño. Para determinar si PCNA tenía algún efecto sobre la actividad de Pol μ en estos sustratos se llevó a cabo un ensayo con DNA marcado (5 nM) y a las concentraciones de proteínas

indicadas en la Figura 4.6. El experimento fue realizado a 30°C durante 30 min. Puede observarse como la actividad de Pol μ aumenta ligeramente en presencia de PCNA. El incremento de actividad de Pol μ en presencia de PCNA es de aproximadamente el doble.

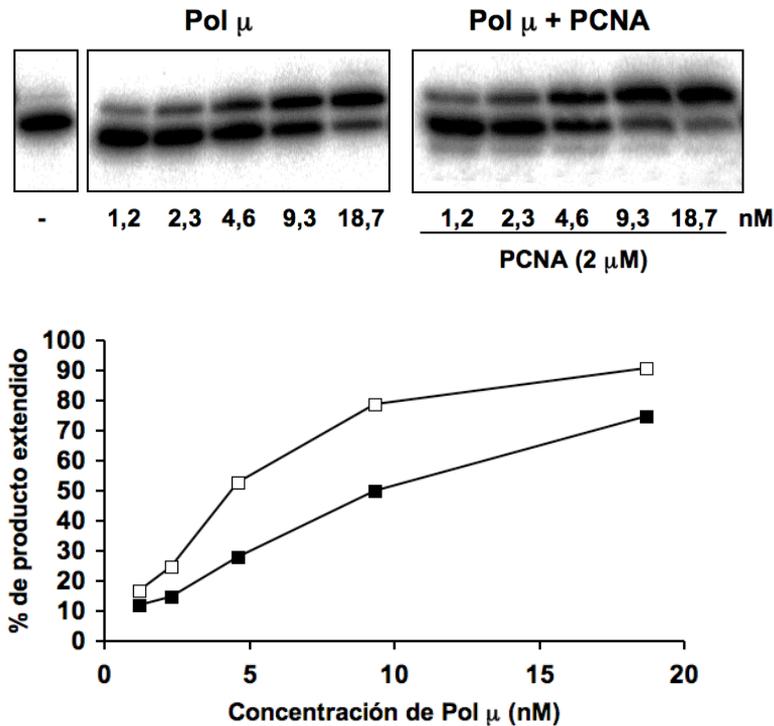


Figura 4.6. Estimulación de Pol μ por PCNA sobre sustratos de DNA de doble cadena con un *gap* de una base. El ensayo de polimerización se realizó a una concentración de 5 nM de DNA y 1,2 μ M de PCNA a las concentraciones de Pol μ indicadas en la Figura. La estructura de esta molécula está descrita en la Figura 4.1. Los ensayos fueron hechos durante 30 min a 30°C y activados con Mg $^{+2}$ (3 mM). Los productos de polimerización se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8 M y posteriormente analizados mediante un *Phosphorimager*. La cuantificación de los productos extendidos se muestra en el panel inferior (Pol μ , cuadrados negros y Pol μ + PCNA, cuadrados blancos).

4.3. Conclusiones

Hemos determinado que existe una interacción *in vitro* entre Pol μ y el factor de procesividad PCNA. Esta interacción, en ausencia de DNA, no parece ser fuerte, pero lo suficiente para ser detectable en diversos ensayos de interacción (ultracentrifugación en gradiente de glicerol, cambio de movilidad electroforética y Far-Western en membranas de nitrocelulosa) o de actividad (ensayos en *template/primer* y en DNA de doble cadena con un *gap*). Tal vez *in vivo* otros factores estén implicados en la estimulación del complejo PCNA-Pol μ . Por otro lado, estos resultados podrían sugerir que, más que alterar la capacidad de polimerización de Pol μ , PCNA sirve a esta polimerasa para dirigirla hacia lesiones específicas o para coordinar su actividad con otras enzimas. Numerosos estudios han implicado a PCNA en prácticamente todas las rutas de reparación del DNA conocidas.

Capítulo 5

Caracterización bioquímica del dominio polimerasa de LigD

5.1. La actividad transferasa terminal de PolDom incorpora preferentemente ribonucleótidos	86
5.2. Actividad de PolDom en distintos tipos de sustratos de DNA	87
5.3. Unión y actividad de PolDom en extremos 3'-protuberantes	90
5.4. Capacidad de PolDom de dislocación y realineamiento del DNA	91
5.5. Conclusiones	92

Las roturas de doble cadena (DSB) son de uno de los daños más agresivos y frecuentes que ocurren en el DNA. Este tipo de roturas ocurren con una frecuencia de una a cinco veces al día en cada célula en mamíferos, y pueden ser provocadas de forma exógena o endógena. Su incorrecta reparación provoca daños en el DNA que llevan en último término a la muerte celular. No todas las roturas de doble cadena son consecuencia de daño en el DNA, sino que también existen roturas programadas, como en el caso de las que ocurren durante la recombinación V(D)J y la meiosis. Las células han desarrollado dos vías principales para reparar roturas de doble cadena en el DNA: la recombinación homóloga (HR) y la ruta de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ). Ambos sistemas de reparación están altamente conservados a lo largo de la evolución en eucariotas (Friedberg *et al.*, 2006).

En la mayoría de las roturas de doble cadena se generan extremos que no son complementarios. Estos extremos han de ser procesados para generar extremos ligables por factores diversos, entre los que se incluyan nucleasas y DNA polimerasas. Las DNA polimerasas Pol μ , Pol λ y TdT (en mamíferos) y Pol4 (en levaduras), y las nucleasas Artemis, Mre11 y FEN-1, han sido implicadas en reparación por NHEJ.

Hasta hace muy poco se consideraba que en bacterias y en arqueas no existía la reparación por NHEJ, solo la HR. La primera evidencia se obtuvo cuando se identificaron en algunas bacterias secuencias de genes que codificaban ortólogos de Ku eucariótico. El gen que codifica esta proteína en bacterias está bajo el mismo operón que el que codifica las DNA ligasas ATP-dependientes (LigD). Ku y LigD están genéticamente asociados en muchas especies bacterianas, implicando una función conjunta de ambas proteínas (Aravind y Koonin, 2001; Doherty *et al.*, 2001; Weller y Doherty, 2001). Posteriormente se comprobó mediante estudios bioquímicos que Ku bacteriano es un homodímero que se une a extremos de doble cadena de la misma forma que el eucariótico, sugiriendo que el NHEJ es funcional en procariotas (Della *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2002). Así, en procariotas, parece que la reparación por NHEJ necesita exclusivamente dos componentes: Ku y LigD. Sin embargo, la ruta de reparación por NHEJ no está conservada en todas las especies bacterianas, implicando que no es una ruta de reparación imprescindible para el ciclo celular normal de una bacteria. Muchas de las especies bacterianas filogenéticamente divergentes que conservan Ku y LigD pasan mucha parte de su ciclo de vida en estado estacionario, en donde no es posible la HR, y por eso tal vez han llegado a desarrollar un sistema de reparación de roturas alternativo (Pitcher *et al.*, 2005b). En estudios recientes se pudo demostrar que Ku y LigD trabajan juntas y se reconstruyó un sistema *in vitro* de reparación de roturas de doble cadena (Bowater y Doherty, 2006; Pitcher *et al.*, 2005b).

Del análisis de la secuencia de LigD se pudo apreciar una cierta homología con secuencias eucarióticas de las DNA polimerasas, nucleasas y ligasas. LigD es un miembro de la familia de las DNA ligasas ATP dependientes (AEP). En algunas bacterias LigD existe como un único dominio ligasa, mientras que en otras especies, como *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, tiene tres dominios: un dominio polimerasa/primasa (PolDom), otro nucleasa (NucDom) y otro ligasa (LigDom). La organización de estos dominios varía dependiendo de la especie bacteriana. En *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium tuberculosis*, Pol Doms y Nuc Doms están próximos a la zona amino terminal y LigDom se encuentra en el extremo carboxilo terminal. En la LigD de *Pseudomonas aeruginosa*, el NucDom and PolDom están en la zona amino terminal y carboxilo terminal respectivamente, mientras que en el dominio central está LigDom (Pitcher *et al.*, 2007a; Pitcher *et al.*, 2005a).

El dominio polimerasa de LigD posee una amplia variedad de actividades: nucleotidiltransferasa como RNA primasa DNA dependiente, actividad transferasa terminal y actividad polimerasa DNA/RNA en relleno de *gaps*. Este dominio polimerasa puede aislarse del resto de la proteína manteniendo intactas las propiedades de polimerización DNA o RNA. Los homólogos funcionales de este dominio polimerasa (PolDom) son las polimerasas eucarióticas de la familia X (Pol μ y Pol λ), implicadas en la reparación de roturas del DNA por NHEJ. Las polimerasas procarióticas implicadas en NHEJ no pertenecen a la familia X, sin embargo han evolucionado para desarrollar un papel en NHEJ en lugar de sintetizar los iniciadores (RNA) para la síntesis del DNA.

En este capítulo se describe la caracterización bioquímica de *Mt*-PolDom y *Ms*-PolDom en varios sustratos relevantes para el NHEJ, lo que refleja el *modus operandi* de estas polimerasas de reparación de roturas de doble cadena.

5.1. La actividad transferasa terminal de PolDom incorpora preferentemente ribonucleótidos

La actividad transferasa terminal del dominio polimerasa (PolDom) de *Mycobacterium tuberculosis* LigD (*Mt*-LigD) y *Mycobacterium smegmatis* LigD (*Ms*-LigD) se midió usando una cadena homopolimérica como sustrato. Estas moléculas son las idóneas para este tipo de ensayos ya que no sólo proporcionan un extremo de DNA con un 3'-OH libre, sino que también al estar compuestas por el mismo nucleótido en toda su longitud, se elimina la posibilidad de autoapareamientos internos de la propia cadena de DNA, o de apareamientos intermoleculares, que generarían sustratos con molde en los que la polimerización podría venir dirigida por éste.

Se comenzó el estudio analizando la capacidad de polimerización independiente de molde sobre una cadena sencilla de PoliA, suministrando cada uno de los nucleótidos por separado y utilizando Mn⁺² o Mg⁺² como metal activador. En estas condiciones Pol μ , como la TdT, es capaz de polimerizar cada uno de los dNTPs suministrados, (aunque con menor eficiencia) siendo activada preferentemente por Mn⁺². Cuando se usan ribonucleótidos, la actividad de Pol μ está más limitada a unas cuantas adiciones. *Mt*-PolDom tiene una actividad transferasa terminal mucho más limitada que Pol μ con una preferencia de inserción de ribonucleótidos frente a deoxinucleótidos (Fig. 5.1).

Como en el caso de Pol μ , la actividad transferasa terminal con ribonucleótidos está restringida a unas pocas extensiones y activada preferentemente por Mn⁺². Cuando la actividad transferasa terminal se mide en doble cadena y con extremos romos la especificidad sigue siendo por ribonucleótidos y por Mn⁺², pero es más prominente que

en cadena simple, tal vez debida a una mejor unión de la proteína a la doble cadena *versus* cadena sencilla.

La capacidad de PolDom de llevar a cabo preferentemente la inserción de ribonucleótidos en ausencia de cadena *template* concuerda con la información cristalográfica del complejo proteína (PolDom)/ NTP, ya que éste parece ser estable en ausencia de *template* y en una conformación activa comparado con el complejo enzima/dNTP (Pitcher *et al.*, 2007b).

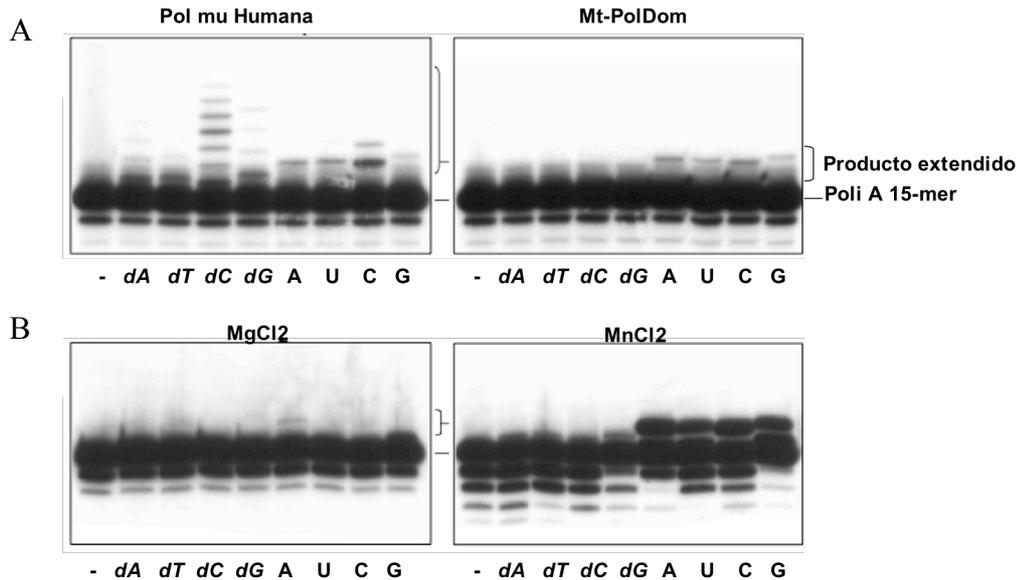


Figura 5.1. Ensayo de transferasa terminal de *Mt-PolDom*. **A)** DNA homopolimérico Poli(dA) o **B)** DNA romo, se usó como sustrato para analizar la actividad transferasa terminal de *Mt-PolDom*. Los ensayos de polimerización se hicieron como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 380 nM de Polμ humana o 380 nM de *Mt-PolDom*, y las reacciones fueron activadas en presencia de iones Mg⁺² (izquierda) 3 mM o Mn⁺² (derecha) 1 mM. Después de la incubación durante 30 min a 30°C en presencia de dNTP o NTP (100 μM), las reacciones se pararon y se analizó la extensión de los iniciadores por electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8 M y posteriormente por autorradiografía.

5.2. Actividad de PolDom en distintos tipos de sustratos de DNA

Todas las polimerasas de la familia X (Polβ, Polλ, Polμ y TdT) tienen un dominio de 8kDa importante para la unión a *gaps* (Moon *et al.*, 2007). No se conoce la función de este dominio en TdT, ya que los *gaps* no son el sustrato adecuado de esta proteína, sino los extremos 3'-protuberantes (Kato *et al.*, 1967). En el caso de Polβ, el dominio de 8KDa además tiene una actividad dRP liasa necesaria para su papel en BER (*base excision repair*) (Garcia-Diaz *et al.*, 2001). En este dominio existen varios residuos de carga positiva responsables de la alta afinidad por extremos 5' recesivos con un grupo fosfato preferentemente. Se ha demostrado que en Polβ la presencia del fosfato hace que la polimerasa sea más procesiva durante la polimerización de ese *gap* (Prasad *et al.*, 1994).

Mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA), se pudo observar como *Mt-PolDom* tiene una fuerte preferencia por unión a *gaps* en los que hay un extremo 5' fosfato, dando una única y clara banda de retraso con muy poca cantidad de proteína (5 ng) (Fig. 5.2). Se obtuvieron resultados similares con *Ms-PolDom*. El significado funcional del complejo enzima/proteína observado es sugerido por la inserción

preferente de C en un *gap* de una forma más eficiente cuando hay un grupo fosfato en el extremo 5' recesivo (Fig. 5.3). La inserción de dC también ocurre de forma eficiente en un sustrato con un grupo fosfato en 5', aunque en menor grado comparado con la

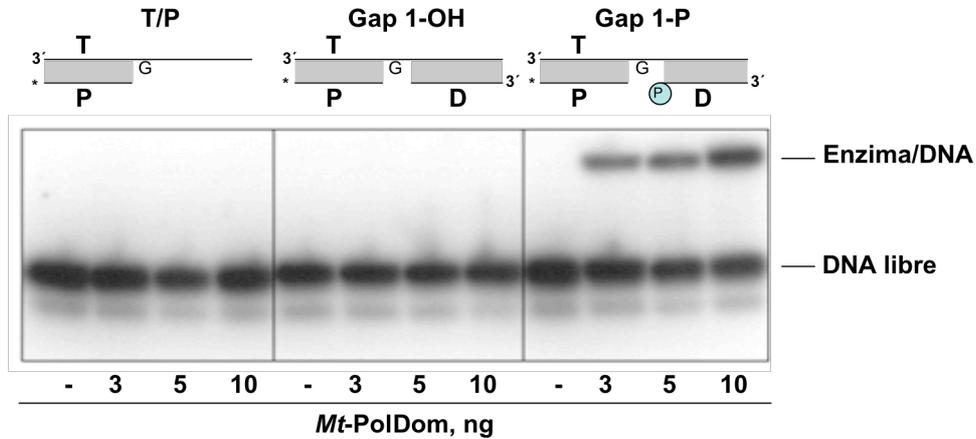


Figura 5.2. PolDom prefiere unirse a sustratos que tengan un pequeño gap y un fosfato en 5'. Ensayo de unión a DNA de *Mt-PolDom*. Los ensayos se hicieron mediante retraso en gel, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los sustratos fueron T/P; Gap 1-OH; Gap 1-P, con las cantidades de proteína que se indican en cada figura. La movilidad del DNA libre y del complejo enzima/DNA se detectó mediante autorradiografía.

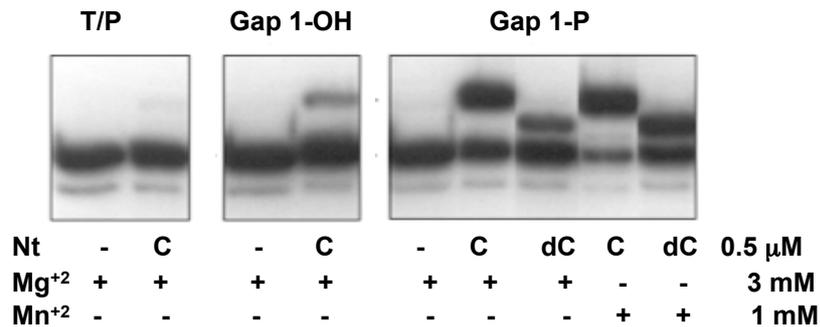


Figura 5.3. Síntesis dirigida por molde y preferencias de incorporación de *Mt-PolDom*. Extensión de primer marcado en los sustratos T/P; Gap 1-OH; Gap 1-P. El ensayo se llevó a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos usando *Mt-PolDom* a 380 nM, las concentraciones indicadas en la figura de Mg⁺² y Mn⁺² y el nucleótido complementario (dCTP o CTP). Después de una incubación a 30°C durante 30 min, las reacciones se pararon y se analizó la extensión de los *primers* marcados por electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8 M y posteriormente por autorradiografía.

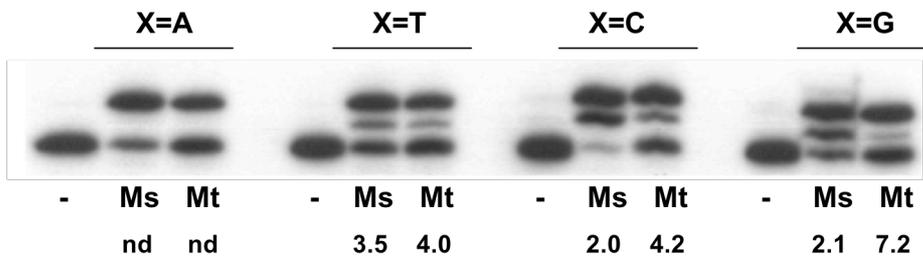


Figura 5.4. Preferencias de incorporación de *Mt-PolDom* y *Ms-PolDom*. Extensión de primer marcado en *Gap 1-P* con cada uno de los cuatro nucleótidos como *template*. El ensayo se llevó a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos usando la proteína a 380 nM, Mn⁺² a 1mM y el nucleótido complementario correspondiente en cada caso (dNTP o NTP). El NTP tiene un exceso de 10 veces sobre el dNTP. Después de una incubación a 30°C durante 30 minutos, las reacciones se pararon y se analizó la extensión de los *primers* marcados por electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8 M y posteriormente por autorradiografía.

inserción de C. Como también ocurría en las reacciones independientes de molde (transferasa terminal) la inserción dirigida por molde tanto de dC como de C es mayoritaria en presencia de Mn^{+2} (1mM). La preferencia de inserción de NTPs *versus* dNTPs con Mn^{+2} como metal activador, en ensayos de *gap* con un grupo fosfato en posición 5', es aproximadamente de 20 a 70 veces mayor dependiendo de cada nucleótido en particular (Fig. 5.4).

Otra cuestión de interés era comprobar la fidelidad de inserción de estas proteínas. Para analizar este fenómeno se escogieron como sustratos *gaps* de pequeño tamaño por ser los sustratos más favorables para la polimerización. Una óptima interacción con el DNA puede afectar a la selectividad del nucleótido a insertar, sobre todo teniendo en cuenta que la proteína es capaz de unirse al nucleótido en ausencia de DNA como ya se ha visto por cristalografía y como queda patente en su actividad transferasa terminal.

Para hacer el análisis cualitativo seleccionamos un sustrato con un *gap* de un nucleótido que tiene cada una de las cuatro bases como molde (Figura 5.5) y probamos la fidelidad de la proteína mediante la inserción de cada una de las cuatro bases independientemente y a diferentes concentraciones en presencia de iones Mg^{+2} .

Observamos como en todos los casos la base del *template* dirigía la entrada del nucleótido, aún siendo forzada hasta 10 veces el nucleótido no complementario al molde. Esto ocurría tanto con deoxirribonucleótidos como con ribonucleótidos, aunque en este último caso era necesaria una dosis 100 veces menor para poder observar la incorporación.

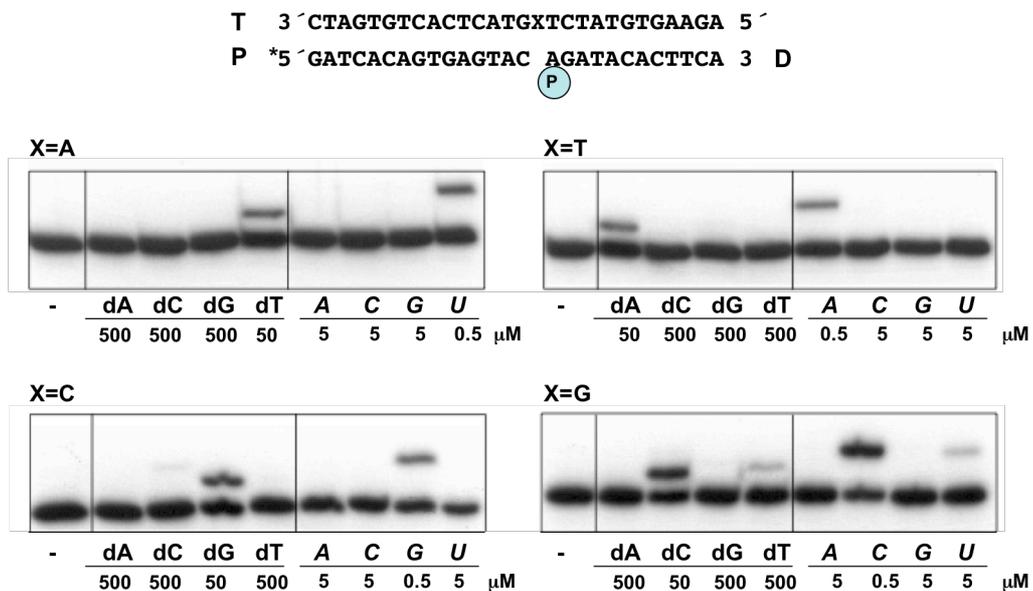


Figura 5.5. Fidelidad de inserción de *Mt-PolDom* en un *gap* de un nucleótido. Los sustratos de DNA usados tienen un grupo fosfato en el extremo 5' del oligo *downstream* (D) y cada una de las cuatro bases en el *template* (T). El *primer* (P) marcado está indicado con un asterisco. Las reacciones de relleno de *gaps* fueron llevadas a cabo como se indica en Materiales y Métodos, usando cada uno de las variantes de sustratos, y usando una concentración de *Mt-PolDom* de 380 nM y 3mM Mg^{+2} . La extensión del primer marcado en presencia del correcto o incorrecto dNTP o rNTP (como se ve en la figura) fue analizado en geles de 8 M urea-PAGE (geles 20% poliacrilamida) y a continuación por autorradiografía.

En conclusión, el dominio PolDom de *Mt-LigD* y *Ms-LigD* se une con preferencia a sustratos con un grupo fosfato en posición 5', que simulan un paso

intermedio en el mecanismo de reparación de roturas de doble cadena, similar a lo que ocurriría *in vivo* como último paso a la reunión de extremos. Esta interacción es funcional y mejora la polimerización y la selección de nucleótidos por parte del molde.

Como sabemos por el cristal, *Mt*-PolDom carece de dominio de 8kDa, y tampoco tiene una actividad dRP liasa, como tiene Pol β (Prasad *et al.*, 1998a; Prasad *et al.*, 1998b), por lo cual estas enzimas deben de usar un dominio estructural diferente para facilitar la interacción con el grupo fosfato en 5'.

5.3. Unión y actividad de PolDom en extremos 3'-protuberantes

Como se ha demostrado recientemente, Pol μ y Pol λ son capaces de empalmar extremos 3'-protuberantes dependiendo de la microhomología de los extremos (Nick McElhinny *et al.*, 2005). Mientras que Pol λ requiere una cierta microhomología, Pol μ es capaz de realinear extremos 3'-protuberantes sin homología en la secuencia e incluso sin la ayuda del resto de factores de *end joining*. Esto implica un papel no redundante de ambas polimerasas en la reparación de las roturas de doble cadena por NHEJ. Ambas enzimas también comparten una gran afinidad por extremos 5' con fosfato, al que se unen mediante el dominio de 8kDa (Moon *et al.*, 2007), siendo éste uno de los primeros pasos implicados en la reparación de doble cadena para que se produzca un eficiente *end joining*. Un segundo paso implicaría la conexión de los extremos 3'-protuberantes, siendo éste más fácil cuando hay microhomología de secuencia.

El dominio polimerasa de LigD puede formar complejos binarios enzima/DNA en extremos 3' protuberantes (misma molécula que el *gap* pero eliminando el *primer*), pero manteniendo la presencia del grupo fosfato en la posición 5' (Fig. 5.6). Este resultado es el mismo para *Ms*-PolDom y para *Mt*-PolDom. La capacidad de unir sustratos *template/downstream* (T/D), conteniendo un fosfato en la posición 5', es importante en un contexto de roturas de doble cadena en el DNA. Como ha sido demostrado posteriormente, ya sea por autohibridación de la molécula consigo misma o por hibridación con otra molécula, ésta es una unión productiva ya que ambas enzimas son capaces de polimerizar en estos sustratos (Brissett *et al.*, 2007).

PolDom parece reunir las propiedades necesarias para trabajar en reparación de roturas de doble cadena en el DNA, ya que la reunión de extremos 3' protuberantes es uno de los primeros pasos implicados en este proceso de reparación, a la vez que

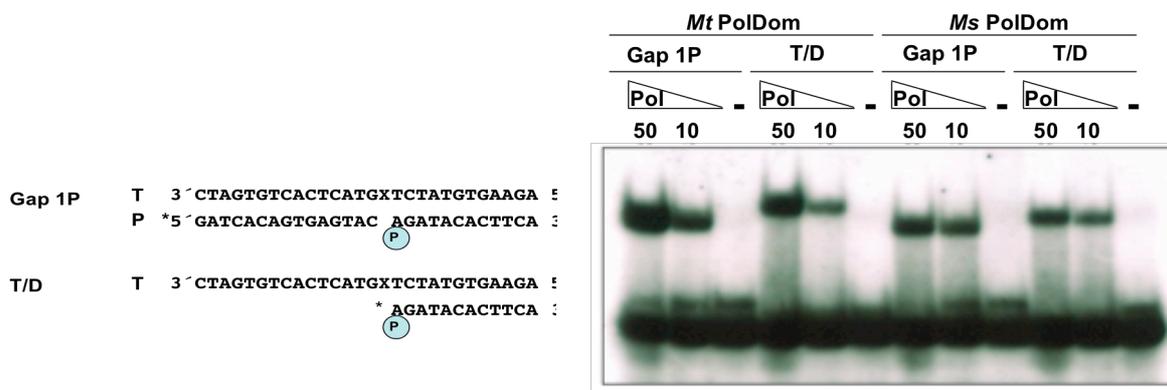


Figura 5.6. PolDom se puede unir de forma eficiente a extremos 3'-protuberantes. Los dos tipos de DNA (*gap* de un nucleótido y T/D con un grupo fosfato en 5') se muestran en el esquema. Los oligos marcados están señalados con un asterisco. Los ensayos de retraso se hicieron en las condiciones que se describen en Materiales y Métodos y con las cantidades que se indican de cada polimerasa. El gel fue revelado por autorradiografía.

también tiene la capacidad de unirse a extremos 5' recesivos con un grupo fosfato.

5.4. Capacidad de PolDom de dislocación y realineamiento del DNA

Pol μ es el paradigma de las polimerasas con capacidad de distorsión del *template* y realineación del *primer* (Dominguez *et al.*, 2000; Ruiz, 2004). En ensayos con *template/primer* o en *gaps* mayores de un nucleótido, Pol μ es capaz de extender nucleótidos en bases que están alejadas del *primer*, permitiendo así una distorsión en la molécula *template* y generando deleciones de bases y sustituciones por otras. Es esta capacidad la que hace que Pol μ sea tan hábil para provocar realineamientos en casos de roturas de doble cadena en el DNA incluso cuando no hay ningún tipo de complementariedad en los extremos (Nick McElhinny *et al.*, 2005).

Para averiguar si el dominio polimerasa de *Ms-LigD* y *Mt-LigD* tenían también esta habilidad se llevó a cabo un ensayo en un *gap* de dos nucleótidos. Como puede verse en la Figura 5.7, hay una incorporación mayoritaria de dG o G, complementaria a la segunda base del *gap*, que de dC o C, complementaria a la primera base. Esto es particularmente claro en el caso de *Ms-LigD*. En este caso cuando añadimos dG o G, se insertan dos unidades para rellenar el *gap*. Este resultado apunta también a no sólo la capacidad de dislocación de la enzima, sino también a su habilidad para extender desapareamientos dG:dGMP y dG:GMP.

Como ya se ha descrito en el caso de Pol μ en el Capítulo 4 de esta tesis, esta habilidad la puede emplear cuando sea necesario hacer una conectividad entre extremos 3'-protuberantes con poca o ninguna complementariedad en un contexto de reparación de roturas de doble cadena en el DNA.

Otra característica que complementa esta habilidad es la que vemos en el experimento de la Figura 5.8. En este caso el sustrato es una molécula *template/primer* con una base 3' que no está correctamente apareada. Como control vemos como Pol μ es capaz de distorsionar el DNA, hasta dos nucleótidos en este caso, para provocar un realineamiento del *primer* y formar así un par correcto entre el extremo 3'(dC) y una base complementaria dG disponible en el *primer*. De esta forma la polimerasa es capaz de extender la base complementaria siguiente aceptando esta distorsión de dos bases en el *template*. *Ms-LigD* se comporta de una forma similar a como lo hace Pol μ . Hay un

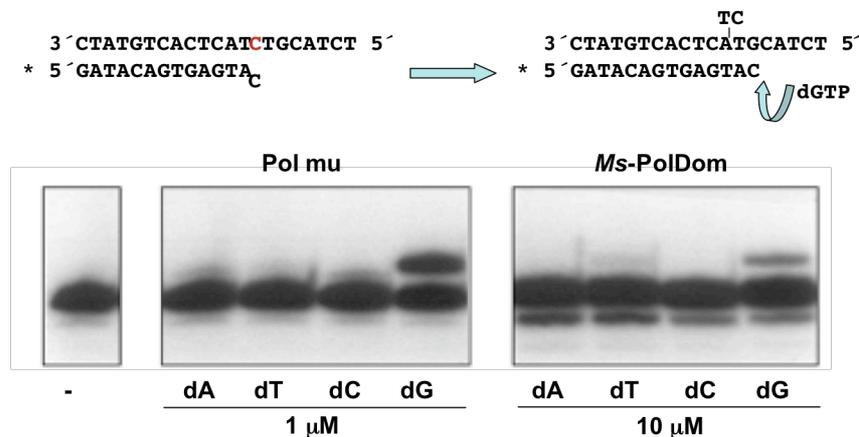


Figura 5.8. PolDom es capaz de realinear el primer. El esquema representa la secuencia que PolDom es capaz de realinear. El oligo marcado está representado con un asterisco. Los ensayos de polimerización fueron llevados a cabo como se describe en Materiales y Métodos y usando una concentración de proteína de 380 nM (Pol μ y PolDom) en presencia de la cantidad de nucleótido indicada. Después de incubar durante 30 min a 30°, las reacciones se pararon y se analizó la extensión de los *primers* marcados por electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8 M y posteriormente por autorradiografía.

gran paralelismo entre ambas proteínas, siendo esta habilidad de distorsionar el *template* una de las más relevantes para implicar a esta proteína en la capacidad de hacer *end joining* mediada por microhomología de secuencias.

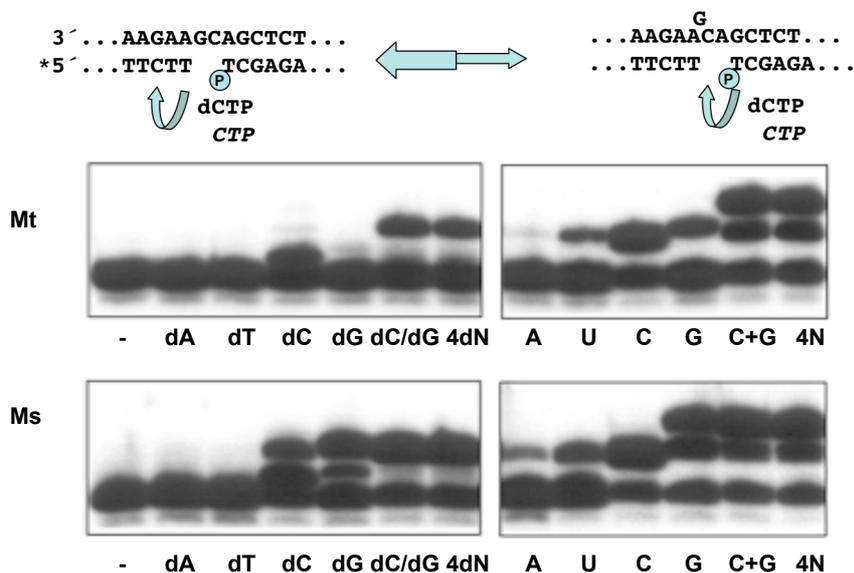


Figura 5.7. Caracterización de la capacidad de dislocación del *template* de PolDom. El esquema representa las secuencias que son más apropiadas para evaluar la propiedad de dislocación de PolDom. Los ensayos de polimerización se llevaron a cabo tal y como se describe en Materiales y Métodos, usando una concentración de proteína de 380 nM en presencia de cada nucleótido dNTP o NTP (1 μ M) individual o combinado. Después de una incubación a 30°C durante 30 min, las reacciones se pararon y se analizó la extensión de los *primers* marcados por electroforesis en geles de poliacrilamida 20%-urea 8 M y posteriormente por autorradiografía.

5.5. Conclusiones

En conclusión, el dominio polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis* reúne gran cantidad de propiedades que la hacen hábil para trabajar en roturas de doble cadena del DNA, como la capacidad de generar distorsiones y realineamientos en el *primer* y la capacidad de interactuar con extremos 5' recesivos con un grupo fosfato, uno de los primeros pasos en el mecanismo de *end joining* de dos moléculas. PolDom también puede conectar extremos 3' protuberantes en una estructura similar a un *gap* y proceder al relleno de bases que falten. Todos estos aspectos hacen de PolDom un dominio funcional e independiente de LigD, que también contiene dominios nucleasa y polimerasa que interactúan también a su vez con el DNA y son necesarios para procesar y rematar el proceso de reparación del DNA por NHEJ.

Recientemente se ha publicado la estructura del cristal de PolDom configurado como un complejo sináptico de dos moléculas de proteína y dos moléculas de DNA con extremos 3'-protuberantes (Brissett *et al.*, 2007). Este estudio reveló que el dominio polimerasa basta para inducir una sinapsis de extremos protuberantes a partir de un acercamiento entre los monómeros. Este es un paso más en la comprensión de la importancia que tiene la polimerasa para mediar entre dos extremos protuberantes de DNA que tengan poca o nada de microhomología sin la necesidad del resto de las proteínas accesorias que también colaboran en el proceso de reparación. En este trabajo

también se elucidó cuál era la estructura que mediaba la interacción entre la proteína y el DNA, un *loop1*, que curiosamente también existe en las polimerasas eucarióticas (Pol μ , TdT) en donde está por descubrir si puede cumplir una función similar. Este *loop1* interacción con las protuberancias 3' y orienta la sinapsis de los extremos.

Esta conexión funcional entre el dominio polimerasa de LigD y las polimerasas eucarióticas humanas de la familia X, refleja la simplicidad de los organismos inferiores, ya que PolDom reúne actividades solapadas de varias polimerasas de la familia X (Pol μ , Pol λ y TdT).

Discusión

D.1. Mutantes del centro activo: localización en la estructura de Polμ e implicaciones funcionales	97
D.2. Actividad transferasa terminal: estructuras y residuos implicados en Polμ	100
D.2.1. El residuo H329 coordina el <i>primer</i> con el nucleótido	101
D.2.2. La traslocación del <i>primer</i> es el paso limitante durante la actividad transferasa terminal de Polμ	102
D.3. Papel de Polμ y TdT en la extensión de extremos 3'-protuberantes durante NHEJ	105
D.3.1. Interacción de Polμ, Polλ y TdT de interaccionar con los factores de NHEJ	105
D.3.2. Regulación de las adiciones N durante la síntesis por transferasa terminal.....	107
D.4. Interacción entre Polμ y PCNA	108
D.5. Similitudes entre los mecanismo de reparación por NHEJ de organismos procarióticos y eucarióticos	109

Pol μ es una DNA polimerasa de la familia X implicada en la reparación de roturas de doble cadena del DNA (Moon *et al.*, 2007). El objetivo de los estudios descritos en esta tesis doctoral fue la identificación de residuos claves del centro activo de Pol μ humana y su caracterización funcional. Estos residuos fueron mutagenizados y las proteínas resultantes fueron analizadas comparativamente en ensayos de actividad dependiente e independiente de molde (transferasa terminal). En el transcurso de estos estudios identificamos una serie de residuos relevantes para la unión de Pol μ con el nucleótido entrante. Asimismo hemos identificado dos residuos esenciales en la actividad transferasa terminal de Pol μ : R387 y H329. El residuo R387 está implicado en el paso limitante de la actividad transferasa terminal. El residuo H329 es fundamental para la correcta orientación del *primer* y el nucleótido cuando no hay dirección por una base en el *template*. Ambos residuos fueron cruciales para entender el mecanismo de la actividad transferasa terminal de Pol μ y cómo se diferencia de la presente en TdT.

Recientemente se obtuvo el cristal de Pol μ murina en complejo ternario con un fragmento de DNA de doble cadena y con el nucleótido entrante complementario a la base del *gap*, descrito a continuación (Moon *et al.*, 2007). Esta estructura ha permitido contrastar nuestros resultados con la localización espacial de los residuos en el cristal.

El objetivo de esta discusión es integrar los resultados obtenidos en esta tesis con los anteriores obtenidos por el laboratorio y por otros grupos de investigación.

D.1. Mutantes del centro activo: localización en la estructura de Pol μ e implicaciones funcionales

Los alineamientos de secuencia de aminoácidos sugerían una organización estructural común de las enzimas de la familia X a nivel del dominio catalítico. La diferencia principal era la ausencia del dominio BRCT en Pol β y que estaba presente en el resto de las polimerasas de la familia. Pol β fue la primera polimerasa de la familia X en ser cristalizada y su estructura sirvió para crear los primeros modelos estructurales del dominio catalítico de las demás polimerasas de la familia (Sawaya *et al.*, 1994). Posteriormente fueron resueltas las estructuras cristalográficas de TdT y Pol λ , ambas sin el dominio BRCT, confirmándose que su estructura cristalográfica era sustancialmente similar a la de Pol β (García-Díaz *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2007).

La alta identidad de secuencia entre TdT y Pol μ (42%) permitió en un principio modelar la estructura de Pol μ sobre la de TdT. Este modelado fue, junto con la comparación de las secuencias de aminoácidos, la base sobre la que se hicieron estudios mutacionales en la proteína que sirvieran para analizar las actividades bioquímicas de Pol μ .

La estructura cristalográfica de Pol μ murina fue resuelta en el laboratorio del Dr Kunkel (NIEHS, National Institutes of Health) durante el desarrollo de esta tesis doctoral. El dominio catalítico de Pol μ murina (Pro132-Ala496) fue cristalizado en un complejo ternario con un *gap* de DNA de una base y el nucleótido entrante correcto a esta base del *gap*. La conformación que adopta la proteína en el cristal es común al resto de las proteínas de la familia. Pol μ puede superponerse al resto de los cristales ternarios del resto de las polimerasas de la familia X: Pol β (1BPY), Pol λ (1XSN) y TdT (1JMS). Pol μ se diferencia del resto de las polimerasas de la familia en ciertas regiones de su estructura secundaria como son un *loop* que se localiza entre la lámina beta 7 y la alpha

hélice O en el subdominio pulgar (D465-V471); y un *loop* de 17 residuos (His366-Arg389). Este último, el *Loop 1*, está sólo presente en TdT pero presenta diferencias con el *Loop 1* de Pol μ como serán discutidas más adelante (Delarue *et al.*, 2002; Nick McElhinny *et al.*, 2005). Las estructuras cristalográficas de Pol μ y TdT, a pesar de estar formando un complejo con dos sustratos diferentes, comparten un enorme parecido como puede apreciarse en la Figura D.1.

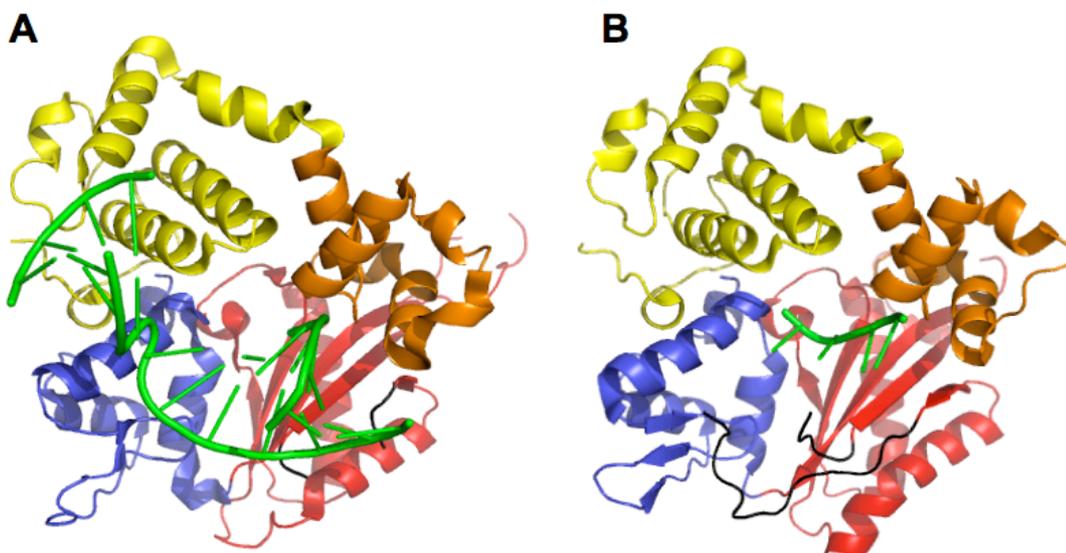


Figura D.1. Comparación de las estructuras cristalográficas de Pol μ y TdT. Los dominios de las polimerasas se encuentran representados en colores: 8KDa en amarillo, dedos en naranja, palma en rojo y pulgar en azul. El *Loop 1* está representado en negro. El DNA está representado en verde. **A)** Estructura cristalográfica (2IHM) ternaria de Pol μ unido a un *gap* de una base y nucleótido entrante. **B)** Estructura cristalográfica (1KDH) binaria de TdT unida a un fragmento de DNA de cadena sencilla de nueve bases, de las cuales solo cuatro fueron resueltas.

La interacción de los residuos de Pol μ con el DNA implica a todos los subdominios del *core* catalítico pero es diferente en cuanto a las interacciones que presentan Pol λ y Pol β . La interacción con el *primer* en Pol μ es llevado a cabo mediante los subdominio palma y dedos. Las interacciones con el *primer* incluyen regiones más extensas que el caso de Pol λ (García-Díaz *et al.*, 2004). La mayoría de las interacciones de Pol μ con el DNA se realizan con el grupo fosfato del enlace fosfodiéster y la excepción la aporta el residuo R389 (R387 humana), localizado en el surco menor y que interacciona con el O en posición 4 de la ribosa. Las interacciones entre el *downstream* y la proteína ocurren mediante el dominio de 8kDa. El grupo fosfato del *downstream* es reconocido por el dominio de 8kDa, con el que interacciona fuertemente (Moon *et al.*, 2007b). Este dominio en Pol μ está cargado positivamente, pero no tanto como en el caso de Pol β y Pol λ . Hay una graduación de cargas positivas en la polimerasa que se corresponde con el grado de interacción con el grupo fosfato (Fig. 3.5) (Moon *et al.*, 2007a).

La mayoría de los residuos que interaccionan con el nucleótido están conservados en todas las polimerasas de la familia (Fig. 1.1). Muchas de las interacciones que se observan en el cristal de Pol μ entre la proteína y el nucleótido entrante son similares a las observadas en Pol β y en Pol λ . El nucleótido entrante está coordinado por un primer metal que posiciona correctamente el nucleótido en el sitio activo, y un segundo metal posicionado en el extremo 3' del primer que ataca el fosfato

alpha del nucleótido entrante. Las dos interacciones que se producen con el fosfato en posición gamma del nucleótido son Lys325, que esta conservada en Pol μ , Pol λ y TdT, pero que es una Ala en Pol β ; y la His329 que está conservada en Pol μ y TdT pero es una Gly en Pol β y en Pol λ . Estos residuos, junto con el K438, que no está conservado entre las polimerasas de la familia, fueron los residuos mutados en Pol μ humana para poder comprender mejor su función en la proteína.

Como se describió en el Capítulo 1, el diseño de mutantes del centro activo de Pol μ fue llevado a cabo mediante un alineamiento de secuencias de aminoácidos y mediante un modelado de la estructura tridimensional de Pol μ sobre la del cristal de TdT. Esta estructura nos permitió contrastar la localización espacial de los residuos mutados que previamente habían sido hechos. La localización espacial de estos residuos en el cristal de Pol μ murina y su comparación con la localización en TdT de estos mismos residuos se puede observar en la Figura D.2.

Como se había predicho mediante el análisis de las secuencias, la estructura cristalográfica de Pol μ muestra que K325 interacciona con el nucleótido entrante. La interacción de este residuo ocurre con el fosfato en posición gamma del nucleótido. Este residuo está muy conservado en todas las polimerasas de la familia, excepto en Pol β , donde es sustituido por una alanina. Tras la construcción y ensayo de la proteína mutante, se ha podido observar cómo la sustitución de este residuo en Pol μ por alanina (presente en Pol β) reduce la eficiencia de polimerización de las reacciones dirigidas y no dirigidas por molde. También hemos podido comprobar que su mutación no afectaba a la interacción con el DNA. Pudo concluirse por tanto que este es un residuo importante en la interacción con el nucleótido y que por tanto su sustitución conduce a una peor actividad del enzima.

Otro de los residuos predichos como importantes en cuanto a su función en el centro activo de Pol μ es el residuo K438. Este no es un residuo conservado entre las distintas polimerasas de la familia X. Existen evidencias de que su cambio en Pol β por glutámico mejora la actividad catalítica del enzima (Skandalis y Loeb, 2001). Hemos podido comprobar que su eliminación en Pol μ provocaba un descenso de la eficiencia de polimerización sobre cualquier tipo de sustrato llevada a cabo por este enzima. Se observó que su eliminación no cambia la afinidad por el DNA pero que aumenta la K_m por nucleótido, concluyéndose que es un residuo de interacción con el nucleótido (Capítulo 1). La mutación que más dramáticamente afecta a la actividad es la de cambio de carga (K438D). Probablemente este ligando de nucleótido sea uno de los más importantes ya que su sustitución por otro de carga opuesta elimina la capacidad de interaccionar con el nucleótido de forma eficiente y esto repercute especialmente en la actividad dirigida por molde del enzima, como ya se comprobó con esta misma mutación en Pol λ (García Díaz, M., 2003).

Como será discutido en las secciones siguientes y hemos comprobado en el Capítulo 2, el extremo del *primer* en Pol μ ocupa la misma posición que el nucleótido. Nuestros resultados han demostrado cómo estos residuos, a la vez que presentan un aumento de la $K_{m,app}$ por nucleótido con respecto a Pol μ wt, tienen una K_{cat} ligeramente superior a la que presenta Pol μ wt (Tabla 1). Este efecto podría ser un reflejo de que la movilidad del *primer* está favorecida desde la posición improductiva hasta la posición productiva cuando el nucleótido está presente.

Los residuos R387 y H329 fueron dos residuos claves para desvelar el mecanismo de transferasa terminal de Pol μ . H329 coordina la correcta alineación del nucleótido (con quien interacciona en el fosfato gamma) con el *primer*. Cuando no hay dirección de una base en el *template*, la mutación de este residuo provoca una incapacidad para la coordinación de ambos ligandos. Por eso su actividad se ve

fuertemente inhibida en condiciones de transferasa terminal o en situaciones de reunión de extremos 3'-protuberantes cuando no hay complementariedad de los extremos (será discutido más adelante). El residuo R387 interacciona con el DNA de doble cadena con la cadena *template* y en ausencia de éste, interacciona con el *primer*. Su mutación afecta especialmente a la actividad transferasa terminal de Pol μ , como será discutido en las secciones siguientes, donde juega un papel crucial en la formación de un complejo ternario (Pol μ -DNA-nucleótido) productivo.

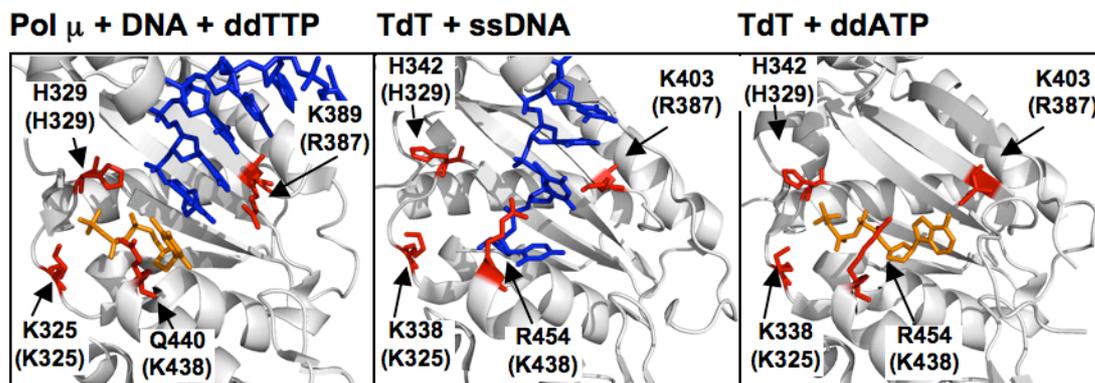


Figura D.2. Estructuras del centro activo de Pol μ y TdT. Las proteínas están coloreadas en gris, la cadena primer en azul y los residuos mutados en esta tesis en rojo. Los residuos equivalentes en la Pol μ humana están entre paréntesis bajo sus equivalentes en Pol μ y TdT murinas. En todos los casos se eliminó el dominio de 8 KDa para una mejor visualización del centro activo. El complejo ternario del core catalítico de Pol μ murina (132-496) con un gap de dos nucleótidos y ddTTP (*template* y *downstream* han sido eliminadas para una mejor visualización) está en el panel de la izquierda. Los complejos binarios del core de TdT murina (130-510) unida a 9-mer dUTP o ddATP están en el panel del centro y derecho respectivamente. Las referencias del *Protein Data Bank* (PDB) son: 2IHM para el complejo ternario de Pol μ , 1KDH para el complejo poly(dU), y 1KEJ para el complejo de TdT con ddATP.

D.2. Actividad transferasa terminal: estructuras y residuos implicados en Pol μ

Todas las polimerasas de la familia X, excepto TdT, son polimerasas dependientes de molde. Pol β y Pol λ son totalmente dependientes de molde, mientras que Pol μ puede tener actividad dependiente o independiente de molde (Moon *et al.*, 2007a). TdT es la única DNA polimerasa conocida hasta la fecha con total independencia de molde. Es capaz de añadir nucleótidos a un extremo 3'-OH de una cadena sencilla de DNA sin ninguna dirección en cada una de las bases insertadas (Chang y Bollum, 1986). El único requisito necesario en la síntesis es un *primer* con al menos tres nucleótidos. Esta capacidad transferasa terminal de TdT es fundamental a la hora de crear variabilidad en los receptores antigénicos de las inmunoglobulinas en el proceso de recombinación V(D)J. A lo largo de esta tesis se describen no sólo las diferencias en la actividad transferasa terminal de Pol μ y TdT, sino que también se trata acerca de cuál es el papel de estas dos polimerasas que las hacen únicas y no redundantes en la célula.

Pol μ es el miembro más especial de la familia X, ya que puede polimerizar de una forma dependiente e independientemente de molde (Dominguez *et al.*, 2000). Pol μ es capaz de conjugar ambas actividades en función de lo que sea requerido en un determinado momento. Sin embargo, a pesar de esta capacidad transferasa terminal intrínseca, a Pol μ se la considera una DNA polimerasa DNA dependiente, ya que su actividad se ve fuertemente estimulada en presencia de molde. La eficiencia de polimerización en sustratos de DNA de cadena sencilla es bastante menor que la

mostrada por TdT bajo unas mismas condiciones experimentales. Sin embargo, la presencia de metales como Mn^{+2} estimulan fuertemente la reacción independiente de molde de Pol μ . El patrón de inserción de nucleótidos es otra diferencia descrita entre Pol μ y TdT en cuanto a su actividad independiente de molde. Mientras que Pol μ inserta preferentemente pirimidinas, el patrón de TdT es preferentemente por purinas (Dominguez *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la actividad transferasa terminal tanto de Pol μ como de TdT está asociada al dominio catalítico, siendo totalmente independiente del dominio BRCT que ambas poseen (Mahajan *et al.*, 2002; Nick McElhinny *et al.*, 2005). Este dominio sin embargo es fundamental para la interacción con otras proteínas implicadas en los procesos de reparación en los que tanto TdT como Pol μ intervienen (Nick McElhinny *et al.*, 2005). El alto grado de similitud a nivel de secuencias de aminoácidos hacía prever de la existencia de un elemento estructural común entre ambas polimerasas y que estuviese implicado en la actividad transferasa terminal de Pol μ . Así, pudo asociarse esta actividad a una región, el *Loop1*, presente en ambas polimerasas, y demostrarse su implicación en la actividad transferasa terminal de ambas enzimas (Juarez *et al.*, 2006; Nick McElhinny *et al.*, 2005).

D.2.1. El residuo H329 coordina el *primer* con el nucleótido –Otro de los residuos importantes para la actividad transferasa terminal de Pol μ , además del ya mencionado *Loop 1*, es el residuo H329, obtenido y estudiado en esta tesis. Este residuo está posicionado, como se puede observar en el cristal de Pol μ , de tal forma que coordina la entrada del nucleótido con el extremo 3' del *primer* (Moon *et al.*, 2007b; Fig. D.3). Como se muestra en esta tesis, este residuo puede ayudar cuando no hay un *template* que normalmente ayudaría a la correcta colocación del *primer* y del nucleótido que entra, permitiendo la actividad transferasa terminal de la que solo TdT y Pol μ , ambas con este residuo, pueden llevar a cabo. Por el contrario, en *gaps* de pequeño tamaño y en reacciones de NHEJ con extremos complementarios, la correcta colocación del extremo 3' del primer no hace esencial la acción de este residuo. En el Capítulo 1

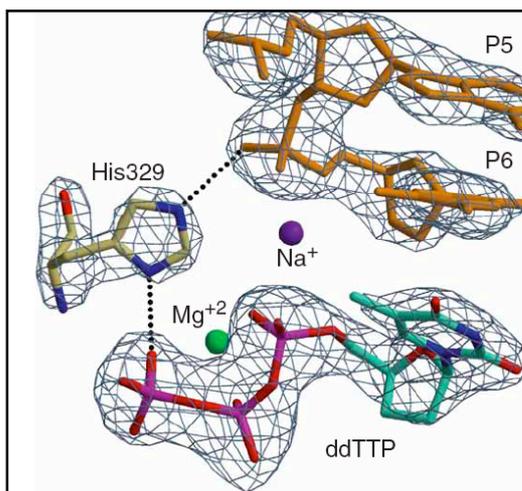


Figura D.3. Papel del residuo H329 en la catálisis. Puede observarse en la figura como el residuo H329 interacciona con el extremo 3' del primer y con el nucleótido entrante. H329 está representado en amarillo, el primer en naranja y en morado el ddTTP. Esta estructura corresponde a la de Pol μ murina interactuando con un primer y el nucleótido entrante (2IHM) y la figura está adaptada de Moon *et al.* (2006).

hemos demostrado como la sustitución de H329 por glicina, residuo presente en Pol λ y Pol β , elimina casi por completo la actividad transferasa terminal de Pol μ pero mantiene intacta la polimerización de Pol μ en *gaps* de pequeño tamaño. La eliminación de la transferasa terminal afecta a otras actividades como la habilidad para reparar roturas de doble cadena por el mecanismo de NHEJ cuando no hay complementariedad en la secuencia como ha sido demostrado en trabajos posteriores del laboratorio en el caso del

mutante H329G, así como ya había sido también observado y publicado previamente por el laboratorio del Dr Kunkel con el mutante H329A (Moon *et al.*, 2007b).

D.2.2. La traslocación del primer es el paso limitante durante la actividad transferasa terminal de Polμ –El *Loop 1* y el residuo H329 hacen a Polμ hábil a la hora de conjugar las dos capacidades de dependencia e independencia de molde en reacciones de NHEJ. No obstante, aún no explica la fuerte diferencia de actividad transferasa terminal entre Polμ y TdT. Nuestra hipótesis es que la habilidad de Polμ para insertar unas pocas bases, a diferencia de lo que hace TdT que inserta muchas, posiblemente viene condicionada en Polμ por el residuo R387. El residuo R387 de Polμ, estudiado en esta tesis, está colocado al comienzo de la lámina beta 4 (sudominio palma), en la base del *Loop 1*. El *Loop 1* sufre grandes cambios conformacionales en Polμ en función del sustrato al que esté unido la polimerasa, especialmente si el cambio es de sustratos de DNA de doble cadena a DNA de cadena sencilla. Es posible que este paso, que provoca un reposicionamiento del *Loop 1*, provoque el movimiento de residuos próximos, entre ellos el R387, cuya función va a depender del sustrato al que se encuentre unido la proteína. R387 parece ser un residuo importante para la estabilización del DNA de cadena sencilla pero su colocación exacta sobre estos sustratos deberá ser resuelta por cristalografía.

Para verificar esta hipótesis mutamos R387 a Lys, el residuo presente en TdT. Con esta mutación se consiguió obtener una proteína mutante con una actividad transferasa terminal hasta ~70 veces más potente que Polμ wt. Puede observarse en el cristal ternario de Polμ murina como este residuo interacciona con la cadena *template* cuando el sustrato es un DNA con un *gap* de pequeño tamaño (Moon *et al.*, 2007b). El nucleótido con el que este residuo interacciona es el que está en la posición -3 con

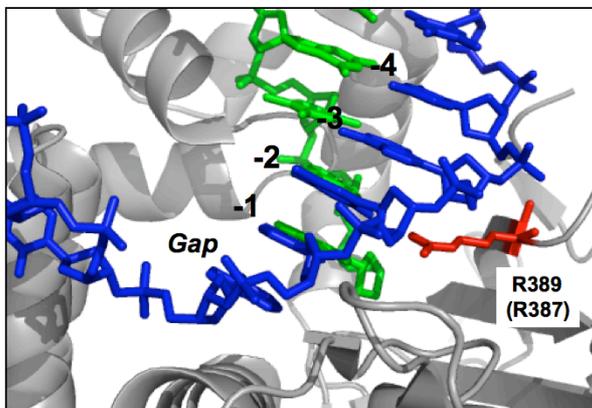


Figura D.4. Localización del residuo R389 en Polμ murina (R387 en Polμ humana) cuando la polimerasa está unida a DNA de doble cadena con un gap de una base y un nucleótido. El residuo R389 está interaccionando con la posición -3 de la cadena *template*. El primer está representado en verde y la cadena *template* de azul. R389 está señalado con color rojo.

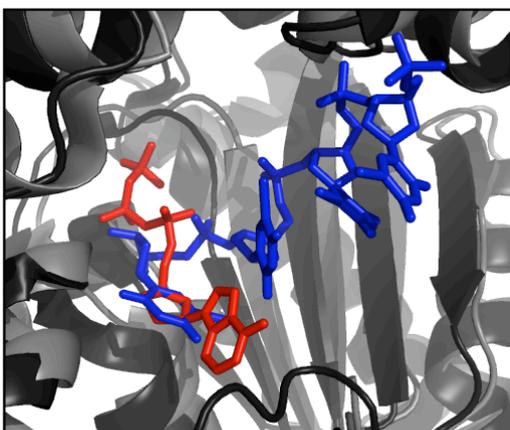


Figura D.5. Localización de nucleótido y ssDNA en el cristal de TdT. Superposición de las estructuras 1KDH (TdT y nucleótido) y 1KEJ (TdT y ssDNA) para comparar la localización del primer (azul) y el NT entrante (rojo). Las estructuras cristalográficas 1KEJ (gris) y 1KDH (negro) están representadas para comparar el paralelismo entre las estructuras de ambos cristales.

respecto al extremo 3' del *gap* (Fig. D.4). Nuestros resultados han demostrado que R387 también interacciona con el DNA de cadena simple en ausencia de *template*, afectando positivamente a la polimerización por transferasa terminal de Pol μ , y que por tanto este residuo debe sufrir una recolocación cuando la síntesis es sobre un DNA de cadena sencilla.

¿Cuál es el mecanismo por el que Pol μ tiene una actividad transferasa terminal más lenta que la actividad transferasa terminal de TdT? Como se puede observar en el cristal binario de TdT unido a DNA de cadena sencilla (Delarue *et al.*, 2002), el extremo 3' del *primer* se encuentra ocupando el centro activo de la proteína en la posición que debería ocupar el nucleótido entrante. Esta posición podría ser interpretada como una inicial de unión de TdT a DNA previa a su traslocación y antes de la incorporación del nucleótido, o alternativamente como una posición equivalente a la presente tras la incorporación del nucleótido al extremo 3' del *primer* (Fig. D.5).

Nuestros resultados han demostrado que, probablemente, el extremo 3' del *primer* de DNA de cadena sencilla debe de ocupar en Pol μ una posición similar a la que ocupa en TdT en ausencia de nucleótido. Esta posición resulta incompatible con la capacidad de polimerización, por lo que el DNA debe traslocarse a una posición productiva para permitir la entrada del nucleótido. Nosotros consideramos que la correcta y eficiente colocación en la posición "n" desde esa situación improductiva es el paso limitante de la actividad transferasa terminal de Pol μ y que la hace diferente a la actividad transferasa de TdT, mucho más eficiente en este caso. Por tanto, la traslocación del DNA para colocarse en la correcta posición (posición "n") para la entrada del nucleótido, es decir la formación del complejo ternario, es el paso limitante de esta reacción transferasa terminal de Pol μ . Con el cambio de R387 al residuo presente en TdT, lisina, hemos conseguido obtener una polimerasa casi tan potente como TdT en las reacciones de polimerización no dirigidas por molde, y sin repercusión aparente en la polimerización dirigida de molde en *gaps* de pequeño tamaño y en moléculas *template/primer*. Esto parece lógico, ya que la lisina presenta un menor impedimento para el movimiento de la polimerasa, mientras que la Arg, al tener más carga que la lisina, es un anclaje más fuerte de la polimerasa al sitio no productivo y esto limita el rápido movimiento del DNA hacia la posición "n" en condiciones de polimerización en cadena sencilla de DNA. Este efecto queda más solapado en la doble cadena porque probablemente la Lisina esté desempeñando diferentes funciones en función del sustrato de DNA sobre el que se encuentra la proteína, y además otros muchos aminoácidos interaccionan con el DNA, oscureciendo el efecto global de R387 en la traslocación del primer. Por tanto la formación de un complejo ternario productivo es el paso limitante de la actividad transferasa terminal de Pol μ y es posible que el cambio K \rightarrow R en la evolución de Pol μ haya resultado en una limitada capacidad para crear variabilidad asociada a las roturas de doble cadena por NHEJ en donde se sabe que participa. Por otro lado, esta habilidad de crear variabilidad es beneficiosa para el caso de TdT, en donde su participación en la recombinación de las secuencias que codifican los receptores antigénicos es beneficiosa a la hora de generar secuencias *de novo*.

Es de esperar que la traslocación del *primer* conlleve una serie de movimientos coordinados de residuos del centro activo de Pol μ . Un modelo de los movimientos que se pueden esperar se muestra en la Figura D.6. La estructura de TdT ejemplifica la estructura improductiva previa a la traslocación. Pol μ representa la posición productiva

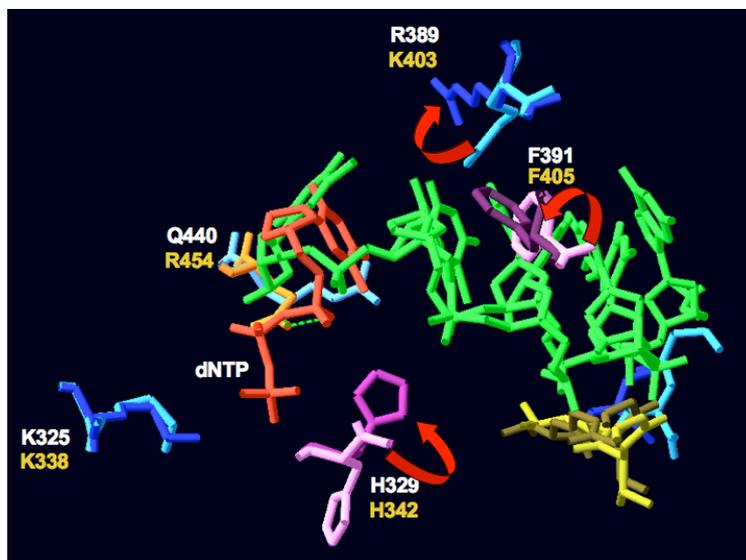


Figura D.6. Modelo de movimientos moleculares del centro activo de Pol μ basados en la estructura de Pol μ unida a DNA de doble cadena con nucleótido entrante y la estructura de TdT unida a DNA de cadena simple. Mediante el programa de modelado molecular Swiss-PDBviewer se superpusieron las estructuras de ambas polimerasas. Sólo se muestra en ambos casos la cadena *primer* (verde). El nombre del residuo se muestra en blanco para Pol μ y en amarillo para TdT. Las flechas rojas indican los movimientos conformacionales de tres residuos críticos implicados en la traslocación.

y posterior a la traslocación. En esta situación la F405 de TdT se encuentra insertada entre las bases en posición -2 y -3 con respecto del extremo 3' del *primer*. En cambio, en Pol μ la fenilalanina homóloga (F391) está una posición perpendicular al DNA. Otro residuo que sufre un gran cambio conformacional es H329 (H342 en TdT), que gira 180° para posicionarse con el extremo 3' del *primer*, de manera que pueda recibir el nucleótido entrante. Finalmente, otro residuo que cambia de posición es R389 (K403 en TdT) aunque su movimiento conformacional es algo menor. En Pol μ R389 podría producir una mayor “fricción” que la K403 de TdT, lo que implica una peor traslocación en Pol μ .

El mecanismo de movimiento de las DNA polimerasas con respecto del DNA, o traslocación, se ha estudiado extensamente en polimerasas de las familias A y B, y es un aspecto crítico del ciclo de adición de cada nucleótido en todas las polimerasas (Berman *et al.*, 2007; Rothwell y Waksman, 2005). Las DNA polimerasas son máquinas moleculares que convierten la energía química en energía mecánica. Hay dos modelos que se han utilizado para explicar el mecanismo energético de la traslocación. En el contexto del ciclo de polimerización, un modelo propone que la energía de la traslocación proviene de la disociación del pirofosfato generado en la reacción nucleotidil-transferasa. El segundo modelo sugiere que la traslocación utiliza la energía cinética que surge del deslizamiento del *template-primer* y que facilita el movimiento unidireccional de la polimerasa en la cadena *template*. Es posible que en la realidad exista una combinación de ambos mecanismos (Guajardo y Sousa, 1997; Simon *et al.*, 1992). No obstante, este tipo de traslocación no debe confundirse con la descrita en esta tesis para Pol μ , pues esta es una enzima especializada de reparación adaptada a polimerizar en extremos de moléculas de DNA o pequeños *gaps*.

D.3. Papel de Pol μ y TdT en la extensión de extremos 3'-protuberantes durante NHEJ

D.3.1. Capacidad de Pol μ , Pol λ y TdT de interactuar con los factores de NHEJ-

La capacidad de Pol μ , Pol λ y TdT de interactuar con los factores de NHEJ ha sido demostrado bioquímicamente (Ma *et al.*, 2004; Mahajan *et al.*, 2002; Nick McElhinny *et al.*, 2005). Estas interacciones son dependientes del dominio BRCT en todos los casos. La principal diferencia entre las polimerasas radica en el modo de actuación y en los requerimientos de las polimerasas sobre extremos 3'-protuberantes (Fig. D.7). Sobre extremos 3'-protuberantes complementarios, tanto Pol μ como Pol λ son capaces de llevar a cabo la polimerización necesaria para llevar a cabo la reparación de los extremos. En cambio, sobre extremos no complementarios sólo TdT y Pol μ son capaces de actuar. Como se ha visto en el Capítulo 3, la diferencia entre ambas polimerasas radica en su diferente capacidad de polimerizar en extremos 3': mientras que Pol μ actúa sobre protuberancias cortas, TdT lo hace sobre protuberancias mayores de tres nucleótidos. Pol μ es capaz de llevar a cabo reacciones de reunión de extremos no complementarios sin la necesidad de las proteínas accesorias que intervienen en el mecanismo de reparación por NHEJ. En la literatura se ha discutido con frecuencia si Pol μ en estas uniones insertaba nucleótidos N o eran todas polimerizaciones dirigidas por molde. La dificultad radicaba en decidir hasta que punto las adiciones se habían llevado a cabo mediante una dirección de molde o habían sido introducidas por transferasa terminal. Actualmente sabemos que Pol μ es preferentemente una polimerasa ADN dependiente pero que cuando no hay posibilidades de complementariedad entre dos extremos, Pol μ es capaz de crearla mediante la adición de nucleótidos N (Nick McElhinny *et al.*, 2005). Estudios recientes *in vivo* parecen indicar que una base es suficiente para alinear dos extremos 3'-protuberantes y permitir actuar a XRCC4-ligasa 4 (Gu *et al.*, 2007). Pol μ tiene una preferencia por incorporar el menor número de adiciones N en los extremos de roturas: típicamente una o dos bases son incorporadas en las secuencias analizadas, mientras que la probabilidad de incorporar tres nucleótidos baja drásticamente (Lieber y Goodman, 2007).

Para la actividad transferasa terminal es imprescindible el *Loop 1* y el residuo H329, como ya se ha discutido en la sección anterior. Como se describe en el Capítulo 3, las reacciones de *end joining* por Pol μ son más eficientes cuanto más cortas son las protuberancias. Protuberancias mayores de 4 nucleótidos impiden la unión de las dos moléculas de DNA. Así una distancia de una base es la más adecuada para que el *Loop 1* de Pol μ cree la suficiente estabilidad que permita a la proteína insertar la base complementaria al molde o de insertar nuevas bases que puedan complementar con otras bases de la protuberancia 3' (Davis *et al.*, 2008). Pol μ es incapaz de extender eficientemente extremos de DNA de doble cadena con extremos romos, pero no se cree que este tipo de sustrato sea comunmente encontrado por Pol μ cuando la nucleasa Artemis abre el *hairpin* durante el proceso de V(D)J.

En extremos 3'-protuberantes mayores de 3 nucleótidos, Pol μ es incapaz de unir las dos moléculas de DNA y permanecer así formando un *gap*. La importancia del 5'P también ha sido demostrada en reacciones de NHEJ al mutar el residuo R175 que se encuentra en el dominio de 8 kDa, implicado en la interacción con el grupo fosfato en 5' del *downstream*, y observar que la polimerasa realizaba una peor síntesis (Davis *et al.*, 2008). En Pol μ , el residuo R175 está muy conservado entre los ortólogos de Pol μ y es funcionalmente análogo a los encontrados en Pol β y Pol λ (K35 y R275

respectivamente). Por el contrario no se observa ningún residuo cargado positivamente en esta región de TdT (Figura 3.5).

Hemos comprobado con nuestros experimentos que la forma de interaccionar de TdT y Pol μ con sustratos 3'-protuberantes es diferente para cada polimerasa, al menos en ausencia de las demás proteínas que intervienen en el mecanismo de reparación por NHEJ. Aparentemente Pol μ permanece unida al sustrato de DNA doble cadena independientemente de la protuberancia 3' y es similar a la observada en DNA de extremos romos. TdT en cambio interacciona con la protuberancia 3' y es con una protuberancia de tres bases cuando la interacción que presenta es similar a la observada en cadena sencilla, mientras que en protuberancias más cortas la interacción es similar a la observada en DNA de extremos romos.

Otra diferencia que se puede observar es que el *Loop 1* de Pol μ es más flexible que el *Loop 1* de TdT, ya que mientras que éste necesita tres bases para acomodarse en DNA de cadena sencilla (como puede apreciarse en la estructura cristalográfica obtenida por Delarue *et al.*, 2002; ver también Fig. D.7), el *Loop 1* de Pol μ puede hacerlo en sustratos a partir de una base protuberante, dando estabilidad al complejo. Como ya se comentó en el Capítulo 3, a partir de una sólo base protuberante se están produciendo reacciones de EJ entre dos moléculas de DNA y sin homología en la secuencia. En estos sustratos Pol μ saca partido del *Loop 1* para la polimerización, ya que como ya ha sido demostrado en sustratos sin homología de secuencia, no puede polimerizar sin la presencia de este elemento estructural (Davis *et al.*, 2008). También

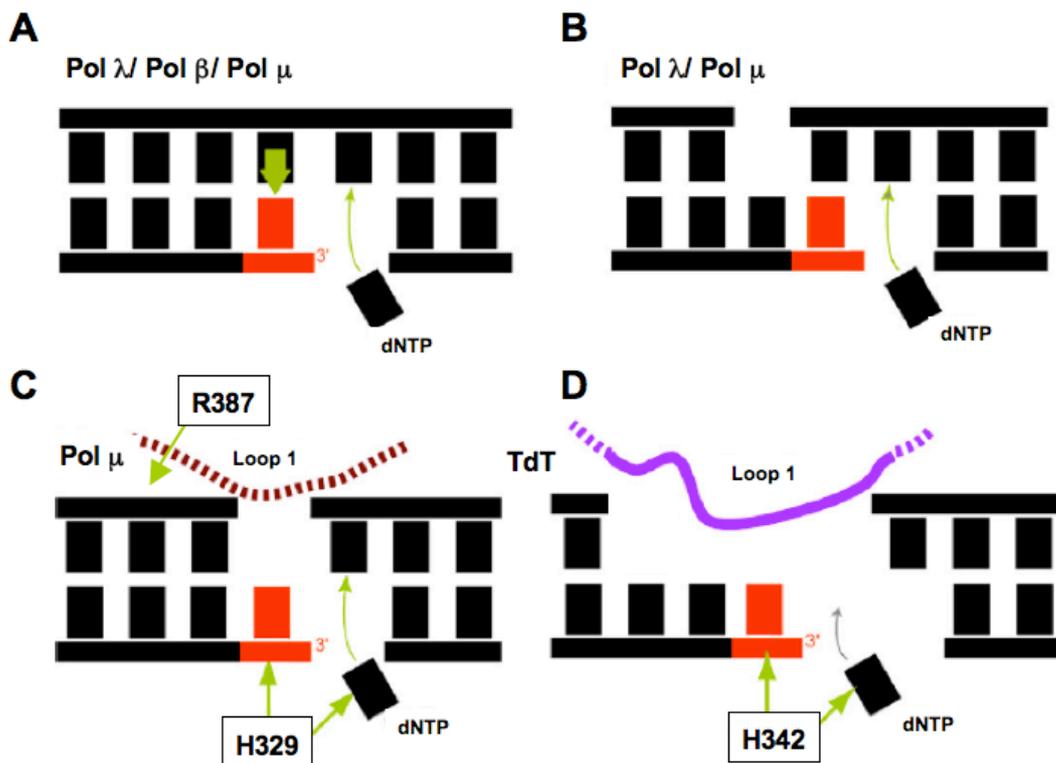


Figura D.7. Representación esquemática de las distintas preferencias por sustratos de las polimerasas de la familia X. El extremo 3' del *primer* está señalado en rojo y el nucleótido entrante en negro. **A)** Pol β , Pol λ y Pol μ pueden rellenar gaps de pequeño tamaño de una forma dependiente de molde. **B)** Pol λ y Pol μ pueden rellenar gaps formados en extremos 3'-protuberantes cuando existe una complementariedad de al menos una base. **C)** Pol μ ayudado por el *Loop 1* y el residuo H329 puede incorporar bases complementarias a extremos 3'-protuberantes más eficientemente que bases no complementarias. El residuo R387 interacciona con la base en posición -3 de la cadena *template*. **D)** TdT, también ayudada por el *Loop 1* y el residuo H342 puede incorporar mediante transferencia terminal bases a un extremo 3'-protuberante sin complementariedad de secuencia. El número de bases óptimo para TdT es el de una protuberancia de 3 bases.

se ha visto que sin el residuo H329 no se puede polimerizar en reacciones de EJ de dos extremos salvo cuando hay complementariedad de bases en las protuberancias (Moon *et al.*, 2007b).

Así, como ya ha sido publicado con anterioridad, Pol μ presenta un comportamiento intermedio entre una total dependencia del molde, como le ocurre a Pol λ , y una independencia absoluta del molde, como TdT. Muchos estudios se han centrado en encontrar la diferencia estructural que provocaba una menor dependencia del molde en TdT y en Pol μ . El dominio de 8 kDa, que es el responsable de la interacción con el grupo fosfato en el extremo 5' del *gap*, tiene una mayor cantidad de cargas positivas en Pol β y en Pol λ que en TdT y en Pol μ . La dependencia de molde de las polimerasas de la familia X se podría por tanto corresponder con la carga neta en el dominio de 8 kDa (Moon *et al.*, 2007a; Nick McElhinny *et al.*, 2005).

Como hemos demostrado en esta tesis, otra diferencia entre Pol μ y TdT es la velocidad del paso limitante, que en Pol μ esta determinada por el residuo R387. Este único residuo claramente limita la velocidad de la reacción de transferasa terminal, que es la traslocación del extremo del *primer* de una posición improductiva a una productiva, y por tanto su mutación a lisina (el residuo presente en TdT) la aumenta. Actualmente se está estudiando el efecto que esta mutación pudiera tener durante reacciones de NHEJ *in vivo*. Es de esperar que Pol μ R387K se comportase *in vivo* causando un exceso de incorporaciones N comparable a la de TdT, y podría ser una valiosa herramienta para analizar la complementariedad funcional entre estas dos enzimas.

Datos recientes del grupo muestran que el mutante H329G se ve afectado en el *end-joining* de extremos 3'-protuberantes no complementarios, ya que se requiere la ayuda de la translocación del primer, y por tanto se requiere la ayuda del residuo H329, que coordina la correcta orientación del *primer* con el nucleótido. Por el contrario, como se ha demostrado en esta tesis, en el *end-joining* de extremos 3'-protuberantes complementarios, el extremo del *primer* se coloca en la posición productiva (como en un *gap*) sin la ayuda del residuo H329 y por eso la polimerización sobre estos extremos es posible por el mutante H329G.

D.3.2. Regulación de las adiciones N durante la síntesis por transferasa terminal

Estudios recientes han demostrado que las adiciones N de TdT podrían estar reguladas por Ku (Purugganan *et al.*, 2001). En ausencia de esta proteína, TdT inserta de una manera indiscriminada un mayor número de nucleótidos. ¿Podría un mecanismo similar actuar sobre Pol μ *in vivo*? Aparentemente, a la luz de resultados anteriores y de los descritos en esta tesis, Pol μ podría limitarse ella misma al ser capaz de polimerizar unos pocos nucleótidos hasta encontrar la suficiente complementariedad en la secuencia que le permitiese detener esa síntesis por transferasa terminal y llevar a cabo la dirigida por molde.

Nuevos datos parecen indicar que la importancia de Pol μ en el mecanismo de V(D)J tiene más relevancia en fases embrionarias, donde TdT aún no se manifiesta (Gonzalbo-Lopez *et al.*, 2008). Así, mientras que la mayoría de las adiciones N en adultos son incorporadas por TdT (Gilfillan *et al.*, 1993; Komori *et al.*, 1993), hay unas cuantas adiciones N que se siguen incorporando en ratones TdT^{-/-} (Gauss y Lieber, 1996). Las adiciones N de las uniones DJ son incorporadas por Pol μ en los primeros estadios del desarrollo embrionario, como ha sido demostrado mediante el análisis de embriones de ratones Pol μ ^{-/-}. Tanto Pol μ como Pol λ son expresadas en el embrión, mientras que TdT no se expresa, por tanto esta última es la responsable de las adiciones de nucleótidos durante estas fases del desarrollo. Parece que Pol μ y TdT no están solo temporalmente

separadas durante la ontogenia y en diferentes tejidos linfoides, sino que estas también presentan diferentes sustratos sobre los que actuar, como se ha descrito en los apartados anteriores. Por otro lado, estudios *in vivo* parecen indicar que los ratones adultos KO Pol μ muestran a una deficiencia en células B. Parece que no siempre Pol λ o TdT puedan suplir la acción de Pol μ en la reordenación de los segmentos génicos de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulinas.

D.4. Interacción entre Pol μ y PCNA

En las células eucariotas las DNA polimerasas de la familia X están especializadas en la reparación del DNA. En años recientes ha sido demostrado que varias de ellas (Pol λ y Pol β) interaccionan con PCNA (proliferating cell nuclear antigen), el factor de procesividad eucariótico (Kedar *et al.*, 2002; Maga *et al.*, 2002). PCNA reduce la velocidad de Pol λ pero incrementa el grado de asociación de la polimerasa con el DNA, y por tanto aumenta ligeramente su procesividad. Sin embargo, PCNA no afecta la eficiencia de incorporación de nucleótidos o fidelidad de Pol λ . Más recientemente, un estudio de la capacidad de síntesis translesión de Pol λ y otras polimerasas demostró que PCNA aumentaba la fidelidad de Pol λ en presencia de RPA en 1200 veces (inserción de dCTP enfrente de 8-oxo-G en la cadena *template*) (Maga *et al.*, 2007). Este estudio por tanto sugirió que Pol λ , en presencia de factores adicionales, podría ser el enzima preferido en la célula para polimerizar a través de ciertas lesiones durante la replicación cromosómica. Numerosos estudios han intentado localizar la superficie de interacción entre Pol β , Pol λ y PCNA, sin alcanzarse una conclusión clara (Maga *et al.*, 2004; Shimazaki *et al.*, 2005). En la actualidad se ha observado que numerosas polimerasas contienen más de un contacto con PCNA (Vivona y Kelman, 2003), y algo semejante podría pasar con las enzimas de la familia X.

Con el objeto de completar los estudios de la interacción de la familia X con PCNA, analizamos si existía una interacción entre Pol μ y este factor de procesividad *in vitro* (Capítulo 4). Nuestros resultados mostraron que la interacción podía observarse en ausencia de DNA o de nucleótido, y aplicando distintas metodologías. Intentamos asimismo encontrar el punto de la interacción mediante mutagénesis de Pol μ . Nos centramos en una región del dominio pulgar porque compartía parcialmente la secuencia consenso de unión a PCNA (QKTFE), porque estaba en un *loop* en la superficie de Pol μ y además porque era una zona que se había propuesto como punto de interacción entre Pol λ y Pol β con PCNA. Adicionalmente, Pol β usa este *loop* para interaccionar con XRCC1 (Gryk *et al.*, 2002). No obstante, la mutagénesis de cuatro residuos de esta secuencia no abolió por completo la interacción de Pol μ con PCNA. No se puede descartar, sin embargo, que la interacción de Pol μ con PCNA sea compleja y que haya más de un sitio de interacción.

La interacción observada entre Pol μ y PCNA podría sugerir una implicación de esta polimerasa en procesos asociados a la replicación del DNA. Quizá de forma cooperativa con otros factores de replicación o reparación, Pol μ podría estar implicada en el *bypass* de ciertas formas de daño en el DNA o en la reparación de roturas de doble cadena generadas por la DNA polimerasa replicativa (Pol ϵ y Pol δ) cuando éstas encuentra con una rotura en cadena simple no previamente reparada por la ligasa. PCNA serviría como plataforma móvil en la cual se anclan las diferentes polimerasas para llevar a cabo sus funciones. PCNA es un homotrímero, por lo que podría interaccionar hasta tres polimerasas diferentes en un solo anillo. En estas situaciones en las que varias polimerasas son organizadas por el factor de procesividad, la regulación ocurre por medio de modificaciones postraduccionales sobre el PCNA o sus ligandos

(Lee y Myung, 2008). PCNA es modificado mediante ubiquitinación o sumoilación en dos aminoácidos diferentes, y se ha observado que estos cambios provocan a su vez alteraciones en su afinidad por diferentes polimerasas replicativas o de la familia Y (Zhuang *et al.*, 2008). Por otro lado, la fosforilación de proteínas implicadas en la replicación, como por ejemplo DNA ligasa, cambia su afinidad por PCNA (Montecucco *et al.*, 1998). Hasta ahora se sabe muy poco sobre la regulación de la interacción de PCNA con polimerasas de la familia X, pero un estudio reciente apunta a que también podría estar modulada por modificaciones postraduccionales (Maga *et al.*, 2007). Así, en el caso de Pol β la metilación por la metiltransferasa 1 (PRMT1) provoca la abolición de su interacción con PCNA, aunque esta modificación no genera una disminución en la actividad dRP-liasa o polimerasa de Pol β (El-Andaloussi *et al.*, 2007). Se sabe ahora que Pol λ sufre fosforilaciones en su dominio rico en serina-prolina por quinasas del ciclo celular (Cdk2/ciclina A) y que la interacción con PCNA reduce sustancialmente estas modificaciones (Frouin *et al.*, 2005). Adicionalmente, se sabe que Pol λ puede sufrir acetilación en residuos cercanos a la región en la que posiblemente interacciona con PCNA (El-Andaloussi *et al.*, 2007). En el caso de Pol μ son hasta ahora desconocidas sus posibles modificaciones, pero es de esperar que éstas puedan modular su unión a los factores de *end joining* o PCNA.

D.5. Similitudes entre los mecanismo de reparación por NHEJ de organismos procarióticos y eucarióticos

En esta tesis se describe en el Capítulo 5 la comparación del dominio polimerasa de LigD con las polimerasas de la familia X y como ambas familias comparten una serie de características funcionales. En un principio se pensó que las primasas de procariotas de la familia AEP (primasas archeo-eucariotas) pertenecían a la misma familia que las polimerasas de la familia X. Sin embargo, la comparación de las estructuras cristalográficas reveló que aunque las proteínas de ambas familias tenían una localización de los tres aspárticos catalíticos similar, el plegamiento tridimensional de las estructuras de una y otra familia era totalmente diferente (Arezi y Kuchta, 2000; Augustin *et al.*, 2001; Koonin *et al.*, 2000). Sin embargo, la conservación de ciertos residuos importantes del centro activo de ambas familias sugirió que ambas deben de haber evolucionado de forma convergente, ya que las dos comparten mecanismos catalíticos similares (Arezi y Kuchta, 2000; Iyer *et al.*, 2005; Pitcher *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que tanto las polimerasas procariotas como las eucariotas, ambas implicadas en la ruta de reparación de DNA de doble cadena mediante NHEJ, pueden incorporar RNA para reparar las roturas de doble cadena en el DNA cuando las reservas de dNTPs son bajas, por ejemplo durante la fase estacionaria (Della *et al.*, 2004; Nick McElhinny y Ramsden, 2003; Pitcher *et al.*, 2005). La preferencia de PolDom de incorporar ribonucleótidos y su falta de especificidad por sustratos refleja la plasticidad catalítica que ha sido mantenida a lo largo de la evolución con respecto a otras polimerasas implicadas en NHEJ, como por ejemplo Pol μ (Della *et al.*, 2004; Nick McElhinny y Ramsden, 2003; Pitcher *et al.*, 2005). La incorporación de RNA podría potencialmente estar actuando como señalización en la célula de sitios en donde se han producido demasiadas roturas que han sido reparadas.

Al igual que las polimerasas de la familia X, PolDom también interacciona fuertemente con los grupos fosfato en extremos 5' recesivos de *gaps* o de DNAs con extremos 3'-protuberantes (Pitcher *et al.*, 2007a; Pitcher *et al.*, 2007b). La versatilidad de PolDom como enzima implicada en reparación también viene condicionada por su habilidad para provocar dislocaciones de la cadena *template* y habilidad de realinear

mistmaches, como Pol μ , a la vez que puede continuar la síntesis translesiva como le ocurre a Pol λ (Juarez *et al.*, 2006; Picher *et al.*, 2006).

Considerando los paralelismos que existen entre PolDom, Pol λ , TdT, Pol μ y Pol β , sería interesante descubrir cual es el dominio en PolDom que está implicado en la interacción con el grupo fosfato en 5', ya que mientras que en las polimerasas de la familia X el dominio de 8 KDa es el responsable, en PolDom parece incierto.

La actividad transferasa terminal de Pol μ y TdT ha sido atribuida al *Loop1* presente en el subdominio palma (Juarez *et al.*, 2006; Nick McElhinny *et al.*, 2005). Pol λ contiene un *loop* más pequeño, que está completamente ausente en Pol β , y así ambas carecen de actividad transferasa terminal (Moon *et al.*, 2007a). PolDom claramente posee actividad transferasa terminal y recientemente, con la obtención de la estructura cristalográfica de PolDom formando un complejo sináptico con otro monómero idéntico unidos a dos extremos 3'-protuberantes, se ha identificado la estructura de un *Loop* que orienta a los extremos 3'-protuberantes hacia el correcto posicionamiento para llevar a cabo una síntesis en los extremos 3'. Experimentos han demostrado que la mutación de este *Loop*, impide la formación de complejos sinápticos de PolDom (Brissett *et al.*, 2007).

PolDom parece haber evolucionado como un enzima capaz de combinar las actividades presentes en Pol μ , Pol λ y TdT. Parece ser la única polimerasa implicada en el procesamiento de reparaciones de roturas de doble cadena por NHEJ. PolDom puede combinar las propiedades de las polimerasas de la familia X en un único centro activo. Comparte con TdT y Pol μ su habilidad para polimerizar independientemente de molde, probablemente para cumplir la misma función, la de encontrar complementariedad entre las secuencias que deben repararse (Pitcher *et al.*, 2007b).

Conclusiones

1. **De acuerdo con la hipótesis de partida, hemos demostrado que los residuos de Polμ K325 y K438 interaccionan con el nucleótido.** Su mutación resulta en un descenso de la eficiencia catalítica, más patente cuando se mide su efecto sobre la actividad transferasa terminal, y no tanto en reacciones dirigidas por molde, donde la entrada del nucleótido viene sustentada y reforzada por la presencia de un molde. Es por ello que los efectos de las mutaciones en los residuos K325 y K438 son más obvios en esas condiciones.
2. **El residuo K438 es importante también durante la polimerización dirigida por molde** y su sustitución por un aminoácido de carga opuesta como Asp disminuye la eficiencia catalítica, probablemente debido a una alteración en la organización del centro activo necesaria para la formación del complejo ternario pre-catalítico.
3. **El residuo R387 está implicado en el paso limitante de la actividad transferasa terminal de Polμ y contribuye a la intensidad de la interacción con el DNA de cadena sencilla.** El residuo R387 de Polμ parece ser crítico en limitar el desplazamiento del extremo del *primer* desde una posición estable, no productiva, a una posición más inestable, productiva, en la que el dNTP ya puede ser incorporado a un complejo ternario catalíticamente competente. El cambio conservativo de Arg a Lys reduce la estabilidad de la interacción no productiva, incrementando enormemente la eficiencia catalítica de la actividad transferasa terminal.
4. **El residuo H329 es crucial en la actividad transferasa terminal de Polμ porque ayuda a la correcta colocación del nucleótido con respecto al *primer*.** La sustitución de este residuo no cambia la eficiencia catalítica de la actividad de polimerización dirigida por molde de Polμ en *gaps* de pequeño tamaño.
5. **La presencia de un grupo fosfato en un extremo 5' recesivo mejora las reacciones de reunión de extremos no complementarios mediadas por Polμ,** facilitando la inserción de nucleótidos en el extremo 3' y dirigidos "en trans" por el otro extremo de DNA.
6. **Polμ y el factor de procesividad PCNA interaccionan *in vitro*.** Esta interacción podrían servir para dirigir a esta polimerasa hacia lesiones específicas o para coordinar su actividad con otras enzimas, ya que PCNA se ha visto implicado en prácticamente todas las rutas de reparación del DNA conocidas.
7. **El dominio polimerasa de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis* reúne gran cantidad de propiedades que la implican en la reparación de roturas de doble cadena del DNA.** Entre ellas está la capacidad de generar distorsiones y realineamientos en el *primer* y la capacidad de interaccionar con extremos 5' recesivos con un grupo fosfato, uno de los primeros pasos en el mecanismo de NHEJ.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulovic, A.L., Minesinger, B.K. y Jinks-Robertson, S. (2008) The effect of sequence context on spontaneous Polzeta-dependent mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **36**, 2082-2093.
- Ahn, J., Kraynov, V.S., Zhong, X., Werneburg, B.G. y 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.
- Aoufouchi, S., Flatter, E., Dahan, A., Faili, A., Bertocci, B., Storck, S., Delbos, F., Cocea, L., Gupta, N., Weill, J.C. y Reynaud, C.A. (2000) Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3684-3693.
- Aravind, L. y Koonin, E.V. (2001) Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNA-end-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Res*, **11**, 1365-1374.
- Arezi, B. y Kuchta, R.D. (2000) Eukaryotic DNA primase. *Trends Biochem Sci*, **25**, 572-576.
- Augustin, M.A., Huber, R. y Kaiser, J.T. (2001) Crystal structure of a DNA-dependent RNA polymerase (DNA primase). *Nat Struct Biol*, **8**, 57-61.
- Baker, T.A. y Kornberg, A. (1992) DNA replication. W.H. Freeman, New York.
- Bassing, C.H., Swat, W. y Alt, F.W. (2002) The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*, **109 Suppl**, S45-55.
- Beard, W.A. y Wilson, S.H. (1998) Structural insights into DNA polymerase beta fidelity: hold tight if you want it right. *Chem Biol*, **5**, R7-13.
- Beard, W.A. y Wilson, S.H. (2000) Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase beta. *Mutat Res*, **460**, 231-244.
- Beard, W.A. y Wilson, S.H. (2003) Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure*, **11**, 489-496.
- Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E.G., McDonald, J.P., Prasad, R., Wilson, S.H., Woodgate, R. y Kunkel, T.A. (2001) 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. *Science*, **291**, 2156-2159.
- Bebenek, K. y Kunkel, T.A. (2004) Functions of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*, **69**, 137-165.

Bennett, R.A., Wilson, D.M., Wong, D. y 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.

Berman, A.J., Kamtekar, S., Goodman, J.L., Lazaro, J.M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M. y Steitz, T.A. (2007) Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases. *Embo J*, **26**, 3494-3505.

Bertocci, B., De Smet, A., Flatter, E., Dahan, A., Bories, J.C., Landreau, C., Weill, J.C. y Reynaud, C.A. (2002) Cutting edge: DNA polymerases mu and lambda are dispensable for Ig gene hypermutation. *J Immunol*, **168**, 3702-3706.

Bertocci, B., De Smet, A., Berek, C., Weill, J.C. y Reynaud, C.A. (2003) Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity*, **19**, 203-211.

Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J.C. y Reynaud, C.A. (2006) Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity*, **25**, 31-41.

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

Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F. y Koonin, E.V. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J*, **11**, 68-76.

Boule, J.B., Rougeon, F. y Papanicolaou, C. (2001) Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *J Biol Chem*, **276**, 31388-31393.

Bowater, R. y Doherty, A.J. (2006) Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet*, **2**, e8.

Brissett, N.C., Pitcher, R.S., Juarez, R., Picher, A.J., Green, A.J., Dafforn, T.R., Fox, G.C., Blanco, L. y Doherty, A.J. (2007) Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science*, **318**, 456-459.

Bruck, I. y O'Donnell, M. (2001) The ring-type polymerase sliding clamp family. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3001.

Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. y 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.

Callebaut, I. y Mornon, J.P. (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett*, **400**, 25-30.

- Capp, J.P., Boudsoq, F., Besnard, A.G., Lopez, B.S., Cazaux, C., Hoffmann, J.S. y Canitrot, Y. (2007) Involvement of DNA polymerase mu in the repair of a specific subset of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3551-3560.
- Chagovetz, A.M., Sweasy, J.B. y Preston, B.D. (1997) Increased activity and fidelity of DNA polymerase beta on single-nucleotide gapped DNA. *J Biol Chem*, **272**, 27501-27504.
- Chang, L.M. y BOLLUM, F.J. (1986) Molecular biology of terminal transferase. *CRC Crit Rev Biochem*, **21**, 27-52.
- Chen, L., Trujillo, K., Sung, P. y 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.
- Daley, J.M. y Wilson, T.E. (2005) Rejoining of DNA double-strand breaks as a function of overhang length. *Mol Cell Biol*, **25**, 896-906.
- Davies, J.F., Almassy, R.J., Hostomska, Z., Ferre, R.A. y Hostomsky, Z. (1994) 2.3 A crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase beta. *Cell*, **76**, 1123-1133.
- Davis, B.J., Havener, J.M. y Ramsden, D.A. (2008) End-bridging is required for pol mu to efficiently promote repair of noncomplementary ends by nonhomologous end joining. *Nucleic Acids Res*, **36**, 3085-3094.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D. y Chu, G. (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J*, **21**, 3192-3200.
- Delarue, M., Boule, J.B., Lescar, J., Expert-Bezancon, N., Jourdan, N., Sukumar, N., Rougeon, F. y Papanicolaou, C. (2002) Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: murine terminal deoxynucleotidyltransferase. *Embo J*, **21**, 427-439.
- Della, M., Palmbos, P.L., Tseng, H.M., Tonkin, L.M., Daley, J.M., Topper, L.M., Pitcher, R.S., Tomkinson, A.E., Wilson, T.E. y Doherty, A.J. (2004) Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science*, **306**, 683-685.
- DeRose, E.F., Clarkson, M.W., Gilmore, S.A., Galban, C.J., Tripathy, A., Havener, J.M., Mueller, G.A., Ramsden, D.A., London, R.E. y Lee, A.L. (2007) Solution structure of polymerase mu's BRCT Domain reveals an element essential for its role in nonhomologous end joining. *Biochemistry*, **46**, 12100-12110.
- Dimitriadis, E.K., Prasad, R., Vaske, M.K., Chen, L., Tomkinson, A.E., Lewis, M.S. y Wilson, S.H. (1998) Thermodynamics of human DNA ligase I trimerization and association with DNA polymerase beta. *J Biol Chem*, **273**, 20540-20550.
- Doherty, A.J., Jackson, S.P. y Weller, G.R. (2001) Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS Lett*, **500**, 186-188.

Dominguez, O., Ruiz, J.F., Lain de Lera, T., Garcia-Diaz, M., Gonzalez, M.A., Kirchhoff, T., Martinez, A.C., Bernad, A. y Blanco, L. (2000) DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *Embo J*, **19**, 1731-1742.

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

El-Andaloussi, N., Valovka, T., Toueille, M., Hassa, P.O., Gehrig, P., Covic, M., Hubscher, U. y Hottiger, M.O. (2007) Methylation of DNA polymerase beta by protein arginine methyltransferase 1 regulates its binding to proliferating cell nuclear antigen. *Faseb J*, **21**, 26-34.

Fan, W. y 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.

Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H. y Dogliotti, E. (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, **37**, 3575-3580.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A. y Ellenberger, T. (2006) DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington DC.

Frouin, I., Toueille, M., Ferrari, E., Shevelev, I. y 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.

Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J. and Schatz, D.G. (2000) The RAG proteins y V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol*, **18**, 495-527.

Garcia-Diaz, M., Dominguez, O., Lopez-Fernandez, L.A., de Lera, L.T., Saniger, M.L., Ruiz, J.F., Parraga, M., Garcia-Ortiz, M.J., Kirchhoff, T., del Mazo, J., Bernad, A. y Blanco, L. (2000) DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *J Mol Biol*, **301**, 851-867.

Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A. y 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.

Garcia-Diaz, M. (2003) Identificación y caracterización de una nueva ADN polimerasa eucariótica: la ADN polimerasa lambda. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Blanco, L., Kunkel, T.A. y Pedersen, L.C. (2004) A Structural Solution for the DNA Polymerase [lambda]-Dependent Repair of DNA Gaps with Minimal Homology. *Molecular Cell*, **13**, 561-572.

- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Gao, G., Pedersen, L.C., London, R.E. y Kunkel, T.A. (2005) Structure-function studies of DNA polymerase lambda. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1358-1367.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Kunkel, T.A. y Pedersen, L.C. (2005) A closed conformation for the Pol lambda catalytic cycle. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 97-98.
- Gauss, G.H. y Lieber, M.R. (1996) Mechanistic constraints on diversity in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol*, **16**, 258-269.
- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C. y Mathis, D. (1993) Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science*, **261**, 1175-1178.
- Gottlieb, T.M. y Jackson, S.P. (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, **72**, 131-142.
- Gozalbo-López B, Andrade P, Terrados G, de Andrés B, Serrano N, Cortegano I, Palacios B, Bernad A, Blanco L, Marcos MA, Gaspar ML. (2009) A role for DNA polymerase mu in the emerging DJH rearrangements in the post-gastrulation mouse embryo. *Mol Cell Biol*, **5**, 1266-75.
- Gryk, M.R., Marintchev, A., Maciejewski, M.W., Robertson, A., Wilson, S.H. and Mullen, G.P. (2002) Mapping of the interaction interface of DNA polymerase beta with XRCC1. *Structure*, **10**, 1709-1720.
- Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F. y Lieber, M.R. (2007a) XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *Embo J*, **26**, 1010-1023.
- Gu, J., Lu, H., Tsai, A.G., Schwarz, K. and Lieber, M.R. (2007b) Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5755-5762.
- Guajardo, R. y Sousa, R. (1997) A model for the mechanism of polymerase translocation. *J Mol Biol*, **265**, 8-19.
- Hefferin, M.L. y Tomkinson, A.E. (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair*, **4**, 639-648.
- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**, 366-374.
- Huang, M.E., Rio, A.G., Galibert, M.D. y Galibert, F. (2002) Pol32, a subunit of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta, suppresses genomic deletions and is involved in the mutagenic bypass pathway. *Genetics*, **160**, 1409-1422.

- Indiani, C., McInerney, P., Georgescu, R., Goodman, M.F. y O'Donnell, M. (2005) A sliding-clamp toolbelt binds high- and low-fidelity DNA polymerases simultaneously. *Mol Cell*, **19**, 805-815.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., Leipe, D.D. y Aravind, L. (2005) Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members. *Nucleic Acids Res*, **33**, 3875-3896.
- Jeggo, P.A., Taccioli, G.E. y Jackson, S.P. (1995) Menage a trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. *Bioessays*, **17**, 949-957.
- Juarez, R., Ruiz, J.F., Nick McElhinny, S.A., Ramsden, D. y Blanco, L. (2006) A specific loop in human DNA polymerase mu allows switching between creative and DNA-instructed synthesis. *Nucleic Acids Res*, **34**, 4572-4582.
- Juarez, R. (2006) Caracterización bioquímica de la ADN polimerasa mu humana y su implicación en NHEJ. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.
- Kaguni, L.S. (2004) DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem*, **73**, 293-320.
- Kang, D. y Hamasaki, N. (2002) Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Curr Genet*, **41**, 311-322.
- Kato, K.I., Goncalves, J.M., Houts, G.E. y Bollum, F.J. (1967) Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal deoxynucleotidyltransferase. *J Biol Chem*, **242**, 2780-2789.
- Kedar, P.S., Kim, S.J., Robertson, A., Hou, E., Prasad, R., Horton, J.K. y Wilson, S.H. (2002) Direct interaction between mammalian DNA polymerase beta and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem*, **277**, 31115-31123.
- Kelman, Z., Naktinis, V. y O'Donnell, M. (1995) Radiolabeling of proteins for biochemical studies. *Methods Enzymol*, **262**, 430-442.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V. y Alt, F.W. (1993) Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*, **261**, 1171-1175.
- Koonin, E.V., Wolf, Y.I., Kondrashov, A.S. y Aravind, L. (2000) Bacterial homologs of the small subunit of eukaryotic DNA primase. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **2**, 509-512.
- Krejci, L., Chen, L., Van Komen, S., Sung, P. y Tomkinson, A. (2003) Mending the break: two DNA double-strand break repair machines in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **74**, 159-201.
- Kunkel, T.A. and Bebenek, K. (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem*, **69**, 497-529.
- Lao-Sirieix, S.H., Pellegrini, L. y Bell, S.D. (2005) The promiscuous primase. *Trends Genet*, **21**, 568-572.

- Lee, K.Y. and Myung, K. (2008) PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Mol Cell*, **26**, 5-11.
- Lehmann, A.R. (2006) New functions for Y family polymerases. *Mol Cell*, **24**, 493-495.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. y Schwarz, K. (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 712-720.
- Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. y Schwarz, K. (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair*, **3**, 817-826.
- Lindahl, T. (1982) DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem*, **51**, 61-87.
- Lindahl, T. y Wood, R.D. (1999) Quality control by DNA repair. *Science*, **286**, 1897-1905.
- Longley, M.J., Prasad, R., Srivastava, D.K., Wilson, S.H. y Copeland, W.C. (1998) Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 12244-12248.
- Lopez de Saro, F.J., Georgescu, R.E., Goodman, M.F. y O'Donnell, M. (2003) Competitive processivity-clamp usage by DNA polymerases during DNA replication and repair. *Embo J*, **22**, 6408-6418.
- Lopez de Saro, F., Georgescu, R.E., Leu, F. y O'Donnell, M. (2004) Protein trafficking on sliding clamps. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 25-30.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. y 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.
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M.F., Shimazaki, N., Koiwai, O., Hsieh, C.L., Schwarz, K. y Lieber, M.R. (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell*, **16**, 701-713.
- Maga, G., Villani, G., Ramadan, K., Shevelev, I., Tanguy Le Gac, N., Blanco, L., Blanca, G., Spadari, S. y 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.
- Maga, G., Blanca, G., Shevelev, I., Frouin, I., Ramadan, K., Spadari, S., Villani, G. y 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.

- Maga, G., Villani, G., Crespan, E., Wimmer, U., Ferrari, E., Bertocci, B. y Hubscher, U. (2007) 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature*, **447**, 606-608.
- Mahajan, K.N., Gangi-Peterson, L., Sorscher, D.H., Wang, J., Gathy, K.N., Mahajan, N.P., Reeves, W.H. y Mitchell, B.S. (1999) Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13926-13931.
- Mahajan, K.N., Nick McElhinny, S.A., Mitchell, B.S. y 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.
- McHenry, C.S. (2003) Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences. *Mol Microbiol*, **49**, 1157-1165.
- Mickelsen, S., Snyder, C., Trujillo, K., Bogue, M., Roth, D.B. y Meek, K. (1999) Modulation of terminal deoxynucleotidyltransferase activity by the DNA-dependent protein kinase. *J Immunol*, **163**, 834-843.
- Moldovan, G.L., Pfander, B. y Jentsch, S. (2007) PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, **129**, 665-679.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. y Papaioannou, V.E. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, **68**, 869-877.
- Montecucco, A., Rossi, R., Levin, D.S., Gary, R., Park, M.S., Motycka, T.A., Ciarrocchi, G., Villa, A., Biamonti, G. and Tomkinson, A.E. (1998) DNA ligase I is recruited to sites of DNA replication by an interaction with proliferating cell nuclear antigen: identification of a common targeting mechanism for the assembly of replication factories. *Embo J*, **17**, 3786-3795.
- Moon, A.F., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Davis, B.J., Zhong, X., Ramsden, D.A., Kunkel, T.A. y Pedersen, L.C. (2007a) Structural insight into the substrate specificity of DNA Polymerase mu. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 45-53.
- Moon, A.F., Garcia-Diaz, M., Batra, V.K., Beard, W.A., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wilson, S.H. y Pedersen, L.C. (2007b) The X family portrait: Structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA Repair*, **12**, 1709-25.
- Moshous, D., Li, L., Chasseval, R., Philippe, N., Jabado, N., Cowan, M.J., Fischer, A. y de Villartay, J.P. (2000) A new gene involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination is located on human chromosome 10p. *Hum Mol Genet*, **9**, 583-588.
- Mueller, G.A., Moon, A.F., Derose, E.F., Havener, J.M., Ramsden, D.A., Pedersen, L.C. y London, R.E. (2008) A comparison of BRCT domains involved in nonhomologous end-joining: Introducing the solution structure of the BRCT domain of polymerase lambda. *DNA Repair*, **8**, 1340-51

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

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

Nick McElhinny, S.A. y 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.

Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A. y 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.

Nick McElhinny, S.A., Gordenin, D.A., Stith, C.M., Burgers, P.M. y Kunkel, T.A. (2008) Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol Cell*, **30**, 137-144.

O'Donnell, M., Kuriyan, J., Kong, X.P., Stukenberg, P.T. y Onrust, R. (1992) The sliding clamp of DNA polymerase III holoenzyme encircles DNA. *Mol Biol Cell*, **3**, 953-957.

Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C. y Baltimore, D. (1990) RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, **248**, 1517-1523.

Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H. y Kraut, J. (1994) Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, **264**, 1891-1903.

Picher, A.J., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Pedersen, L.C., Kunkel, T.A. y Blanco, L. (2006) Promiscuous mismatch extension by human DNA polymerase lambda. *Nucleic Acids Res*, **34**, 3259-3266.

Picher, A.J. y Blanco, L. (2007) Human DNA polymerase lambda is a proficient extender of primer ends paired to 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 1749-1756.

Pitcher, R.S., Tonkin, L.M., Green, A.J. y Doherty, A.J. (2005) Domain structure of a NHEJ DNA repair ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol*, **351**, 531-544.

Pitcher, R.S., Wilson, T.E. y Doherty, A.J. (2005) New insights into NHEJ repair processes in prokaryotes. *Cell Cycle*, **4**, 675-678.

Pitcher, R.S., Brissett, N.C. y Doherty, A.J. (2007a) Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu Rev Microbiol*, **61**, 259-282.

Pitcher, R.S., Brissett, N.C., Picher, A.J., Andrade, P., Juarez, R., Thompson, D., Fox, G.C., Blanco, L. y Doherty, A.J. (2007b) Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *J Mol Biol*, **366**, 391-405.

Prasad, R., Beard, W.A. y 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.

Prasad, R., Singhal, R.K., Srivastava, D.K., Molina, J.T., Tomkinson, A.E. y 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.

Prasad, R., Beard, W.A., Chyan, J.Y., Maciejewski, M.W., Mullen, G.P. y Wilson, S.H. (1998) 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.

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

Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J. y 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.

Purugganan, M.M., Shah, S., Kearney, J.F. y Roth, D.B. (2001) Ku80 is required for addition of N nucleotides to V(D)J recombination junctions by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1638-1646.

Ramadan, K., Shevelev, I. y Hubscher, U. (2004) The DNA-polymerase-X family: controllers of DNA quality? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 1038-1043.

Roth, D.B., Lindahl, T. y Gellert, M. (1995) Repair and recombination. How to make ends meet. *Curr Biol*, **5**, 496-499.

Rothwell, P.J. y Waksman, G. (2005) Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*, **71**, 401-440.

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

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

Ruiz, J.F., Juarez, R., Garcia-Diaz, M., Terrados, G., Picher, A.J., Gonzalez-Barrera, S., Fernandez de Henestrosa, A.R. y Blanco, L. (2003) Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4441-4449.

Ruiz, J.F., Lucas, D., Garcia-Palomero, E., Saez, A.I., Gonzalez, M.A., Piris, M.A., Bernad, A. y 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.

Ruiz, J.F. (2004) ADN polimerasa mu, una enzima implicada en reparación y variabilidad del ADN. *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

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

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

Sawchuk, D.J., Weis-Garcia, F., Malik, S., Besmer, E., Bustin, M., Nussenzweig, M.C. y Cortes, P. (1997) V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J Exp Med*, **185**, 2025-2032.

Schurtenberger, P., Egelhaaf, S.U., Hindges, R., Maga, G., Jonsson, Z.O., May, R.P., Glatter, O. y Hubscher, U. (1998) The solution structure of functionally active human proliferating cell nuclear antigen determined by small-angle neutron scattering. *J Mol Biol*, **275**, 123-132.

Simon, S.M., Peskin, C.S. y Oster, G.F. (1992) What drives the translocation of proteins? *Proc Natl Acad Sci*, **89**, 3770-3774.

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

Skandalis, A. y Loeb, L.A. (2001) Enzymatic properties of rat DNA polymerase beta mutants obtained by randomized mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2418-2426.

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

Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U. y Dogliotti, E. (1998) Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, **17**, 835-843.

Tanabe, K., Bohn, E.W. y Wilson, S.H. (1979) Steady-state kinetics of mouse DNA polymerase beta. *Biochemistry*, **18**, 3401-3406.

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

- Vivona, J.B. y Kelman, Z. (2003) The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins. *FEBS Lett*, **546**, 167-172.
- Warbrick, E. (1998) PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays*, **20**, 195-199.
- Weaver D, Boubnov N, Wills Z, Hall K, Staunton J. (1995) V(D)J recombination: double-strand break repair gene products used in the joining mechanism. *Ann N Y Acad Sci.*, **764**, 99-111.
- Weaver, D.T. (1995) What to do at an end: DNA double-strand-break repair. *Trends Genet*, **11**, 388-392.
- Weller, G.R. y Doherty, A.J. (2001) A family of DNA repair ligases in bacteria? *FEBS Lett*, **505**, 340-342.
- Weller, G.R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L.M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S.K., Day, J.P., Wilkinson, A., d'Adda di Fagagna, F., Devine, K.M., Bowater, R.P., Jeggo, P.A., Jackson, S.P. y Doherty, A.J. (2002) Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, **297**, 1686-1689.
- Wilkinson, A., Day, J. y Bowater, R. (2001) Bacterial DNA ligases. *Mol Microbiol*, **40**, 1241-1248.
- Wilson, T.E. y 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.
- Wong, I. y Lohman, T.M. (1993) A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5428-5432.
- Zhang, Y., Wu, X., Yuan, F., Xie, Z. y Wang, Z. (2001) Highly frequent frameshift DNA synthesis by human DNA polymerase mu. *Mol Cell Biol*, **21**, 7995-8006.
- Zhong, X., Garg, P., Stith, C.M., Nick McElhinny, S.A., Kissling, G.E., Burgers, P.M. y Kunkel, T.A. (2006) The fidelity of DNA synthesis by yeast DNA polymerase zeta alone and with accessory proteins. *Nucleic Acids Res*, **34**, 4731-4742.
- Zhou, R.Z., Blanco, L., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A. y Povirk, L.F. (2008) Tolerance for 8-oxoguanine but not thymine glycol in alignment-based gap filling of partially complementary double-strand break ends by DNA polymerase lambda in human nuclear extracts. *Nucleic Acids Res*, **36**, 2895-2905.
- Zhuang, Z., Johnson, R.E., Haracska, L., Prakash, L., Prakash, S. y Benkovic, S.J. (2008) Regulation of polymerase exchange between Poleta and Poldelta by monoubiquitination of PCNA and the movement of DNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci*, **105**, 5361-5366.