

Análisis bioquímico de la inserción de nucleótidos por la Ligasa D bacteriana

Alejandro Sánchez Salvador

Máster en Microbiología



MÁSTERES
DE LA UAM
2017 - 2018

Facultad de Ciencias

Análisis bioquímico de la inserción de nucleótidos por la Ligasa D bacteriana

Alejandro Sánchez Salvador



FACULTAD DE
CIENCIAS

Director: Miguel de Vega José
Tutor: Ricardo Fernández Roblas
Lugar de realización: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa/
Departamento de Dinámica y Función del Genoma

Resumen

El sistema de reparación de roturas de las dos cadenas de DNA mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) está presente en microorganismos que, como *Bacillus subtilis*, pasan largos períodos de tiempo en estado estacionario durante el que sólo existe una copia del genoma. En bacterias, la reparación por NHEJ es realizada fundamentalmente por las proteínas Ku y Ligasa D (LigD), las cuales contribuyen a la estabilidad genómica durante la fase estacionaria y la germinación de esporas. La LigD posee, entre otros, un dominio polimerasa (PolDom) encargado de introducir nucleótidos en moldes de DNA, insertando preferentemente ribonucleótidos (NTPs) frente a desoxirribonucleótidos (dNTPs). Se han identificado varios residuos altamente conservados que pueden estar implicados en la interacción del dominio polimerasa (PolDom) con la ribosa del nucleótido entrante. En este trabajo se ha estudiado el papel de dichos residuos de aminoácido mediante su sustitución puntual, tanto en la LigD de *B. subtilis* (*BsuLigD*) como en el PolDom expresado independientemente de *Pseudomonas aeruginosa*, y posterior análisis comparativo de la capacidad de inserción de nucleótidos entre las proteínas mutantes y la *wild-type*. Así, en este trabajo se han estudiado los residuos Thr⁵³⁹ y His⁴²² de *BsuLigD* y los homólogos Ser⁷⁶⁸ y His⁶⁵¹ del PolDom de la LigD de *P. aeruginosa*, y los resultados nos han indicado el papel fundamental de la His en permitir la inserción preferente de NTPs a través de la interacción con el grupo O2' de la ribosa, y el papel de la Thr⁵³⁹ de *BsuLigD*, homóloga a la Ser⁷⁶⁸ de la LigD de *P. aeruginosa*, en la interacción con los grupos O2' y O3' de la ribosa para su orientación y correcta incorporación del nucleótido en el molde de DNA. Además, se ha analizado el papel de dichos residuos en la fidelidad de incorporación de NTPs, y en la incorporación del nucleótido promutagénico 8oxoGTP.

Abstract

The double-strand break Non-Homologous End-Joining (NHEJ) repair system can be found in microorganisms that, as *Bacillus subtilis*, spend much of their life cycle in stationary phase during which only a single copy of the genome is present. In bacteria, the NHEJ repair pathway is constituted by the proteins Ku and Ligase D (LigD), that further contribute to genome stability during the stationary phase and the spore germination. LigD has a polymerase domain (PolDom), among others, which is responsible for inserting nucleotides in DNA templates. LigD proteins present a marked preference for incorporating ribonucleotides (NTPs) rather than deoxynucleotides (dNTPs). Some highly conserved residues, which can be implied in the interaction between the PolDom and the ribose, have been identified, and mutant proteins of these residues have been analyzed throughout this work. Here, we have studied the role of those residues by single point substitution at the corresponding residues in the *B. subtilis* LigD (*BsuLigD*) as well as in the independently expressed PolDom of the LigD from *Pseudomonas aeruginosa*, and the further comparative analysis of their nucleotide insertion efficiency respect to that showed by the wild-type protein. Thus, we have analyzed *BsuLigD* residues Thr⁵³⁹ and His⁴²², and the homologous Ser⁷⁶⁸ and His⁶⁵¹ of the *P. aeruginosa* PolDom. The results show the key role of the His residue in promoting the preferential insertion of NTPs through the interaction with the O2' of the ribose. The *BsuLigD* Thr⁵³⁹ and its homologue Ser⁷⁶⁸ of the *P. aeruginosa* LigD interacts with the O2' and O3' of the ribose to allow the correct incorporation and orientation of the nucleotide. Moreover, we have analyzed the role of those residues in the fidelity of NTP insertion, and in the insertion of the promutagenic nucleotide 8oxoGTP.

Palabras clave (Keywords): Reparación del DNA, NHEJ, Ligasa D, *Bacillus subtilis*, 8-oxoguanina

Índice

Introducción	1
- Reparación del DNA	1
- NHEJ en bacterias	1
- El PolDom de la LigD	2
- Papel del 8oxoG en lesiones del DNA	5
Objetivos	5
Materiales y métodos.....	6
<i>Materiales</i>	
- Proteínas	6
- Nucleótidos, oligonucleótidos y sustratos de DNA	6
<i>Métodos</i>	
- Mutagénesis dirigida del <i>PaePolDom</i>	7
- Purificación de las proteínas mutantes de <i>PaePolDom</i> S768Y, S768A y H651A	7
- Ensayos bioquímicos de inserción de nucleótidos <i>in vitro</i>	8
o Ensayos de inserción simultánea de nucleótidos	8
o Ensayos de estado estacionario sobre estructura de <i>gapped</i> -DNA	10
o Ensayos de fidelidad	10
o Ensayos de polimerización sobre estructura iniciador/molde Sp1/Sp1c+18	10
o Cinéticas de polimerización sobre estructura iniciador/molde Sp1/Sp1c+18	10
o Ensayos de estado estacionario sobre estructura iniciador/molde Sp1/Sp1c+14A	11
o Ensayos de inserción de 8oxoG	11
Resultados.....	12
- Inserción simultánea de nucleótidos y ribonucleótidos por <i>BsuLigD</i>	12
- Cinéticas de inserción de nucleótido de <i>BsuLigD</i> en estado estacionario	12
- Inserción simultánea de nucleótidos y ribonucleótidos por <i>PaePolDom</i>	15
- Cinéticas de inserción de nucleótido de <i>PaePolDom</i> en estado estacionario	16
- Ensayos de polimerización sobre estructura iniciador/molde	18
- Cinéticas de inserción de nucleótido sobre estructura iniciador/molde	20
- Ensayos de fidelidad	22
- Ensayos de inserción de 8oxodG	26
Discusión.....	27
Conclusiones	29
Bibliografía	30

Introducción

Reparación del DNA

Todos los organismos están expuestos a lo largo de su vida a una serie de condiciones ambientales que pueden ocasionarles daños a nivel genético. Los daños en el DNA producidos en una célula pueden ser ocasionados por diversas fuentes, como la radiación ionizante, la desecación, o los agentes oxidantes (Fry *et al.*, 2005). Todos estos daños pueden afectar a la supervivencia del organismo en cuestión, y, por ello, las células poseen maquinarias específicas capaces de proteger su genoma frente a agentes genotóxicos y de repararlo (Cline y Hanawalt, 2003; Fry *et al.*, 2005).

Entre los tipos de daños que pueden darse a nivel del DNA, las rupturas de doble hebra (DSBs, por sus siglas en inglés) son las más graves, pudiendo provocar desde mutaciones puntuales o reordenamientos cromosómicos hasta la muerte celular (Hoeijmakers, 2001). Cuando ocurren, si está presente otra copia intacta del cromosoma afectado, su reparación se llevará a cabo generalmente utilizando como molde la otra hebra del DNA presente en el organismo por recombinación homóloga (HR). En el caso de que en el momento de la reparación no exista otra copia del cromosoma disponible, la reparación de la DSB se realizará mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ). La HR es la principal vía utilizada por células con más de una copia de DNA para reparar las DSBs (Haber, 2006), como en las células eucarióticas en fase S/G1 o las bacterias en fase de crecimiento vegetativo, siendo mucho más fidedigna al utilizar una hebra con la información genética intacta y disponible para ser utilizada como molde. Sin embargo, en las células eucariotas en fase G2, así como en algunas bacterias que pasan largos periodos de su vida con una copia de su genoma, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*, este mecanismo de reparación del DNA no es posible, ya que sólo está disponible una de las copias de DNA y la recuperación de la información genética será mucho más difícil. Por ello, en estos casos se reparará el DNA principalmente mediante la NHEJ (Bowater y Doherty, 2006), aunque esto suponga una fuente de introducción de mutaciones, o incluso de reordenamientos genéticos. La ruta NHEJ se ha asociado con procariontes que experimentan períodos prolongados con una copia del genoma como parte de su estilo de vida, ya sea durante la esporulación como en el caso de *B. subtilis* o durante periodos prolongados en fase estacionaria, en el caso de *M. tuberculosis* (Moeller *et al.*, 2007).

NHEJ en bacterias

Es posible encontrar la reparación de DSB por NHEJ en los tres dominios de la vida (White y Allers, 2018), aunque con distintas características. En eucariotas, la NHEJ comienza con la unión a los extremos del DNA del heterodímero en forma de anillo Ku70/80 que posteriormente recluta la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de DNA, formando un complejo sináptico que mantiene los dos extremos de la rotura juntos. Ya que dichos extremos suelen presentar lesiones, o desapareamientos, se requiere de factores de procesamiento como nucleasas (Artemis, complejo MRN), fosfatasa (como la PNPK) o DNA polimerasas como Pol λ y Pol μ (Hoeijmakers, 2001; Pitcher *et al.*, 2007a; Kragelund *et al.*, 2016), que remodelan los extremos para que finalmente sean ligados por el complejo LigasaIV/XRCC4/XLF.

En bacterias, el NHEJ es una ruta de reparación constituida por dos proteínas, el homodímero Ku, homólogo al eucariótico, que aproxima los extremos de la rotura y recluta a una proteína multicatalítica llamada Ligasa D, que en la mayoría de los casos contiene un dominio fosfoesterasa (PEDom), dominio polimerasa (PolDom), y dominio ligasa (LigDom), capaces de modificar los extremos del DNA y permitir la reparación completa del mismo (Zhu y Shuman, 2005; Pitcher *et al.*, 2007b). La LigD busca regiones de microhomología para poder unir los dos extremos protuberantes, actuando de forma secuencial los dominios PEDom, que escinde los posibles nucleótidos desapareados, PolDom, añadiendo nucleótidos complementarios, y LigDom uniendo las mellas resultantes para completar la DSB (Figura 1; Pitcher *et al.*, 2007a)

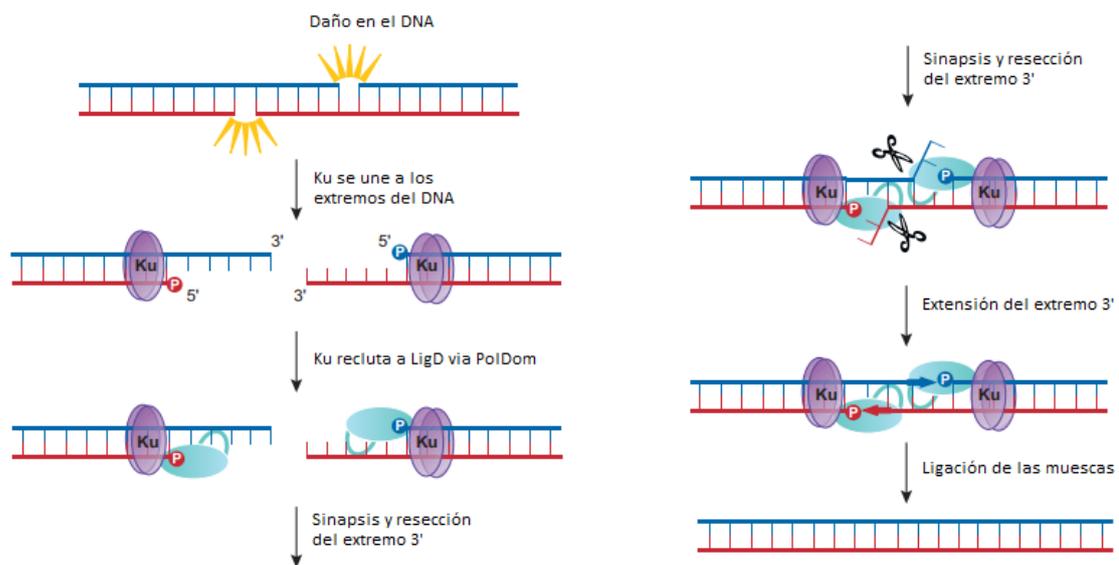


Figura 1. Esquema general de reparación de DSB en el DNA por NHEJ en bacterias. El homodímero Ku se une en forma de anillo a cada extremo 5' de la rotura tras la DSB, y se encarga de reclutar a la LigD mediante su PolDom. Se encuentran regiones de microhomología y se unen ambos extremos, en los que actúan los diferentes dominios de la LigD eliminando nucleótidos del extremo 3', añadiendo nucleótidos complementarios rellenando los gaps, y, finalmente, ligando los extremos, completando así la reparación (Tomado de Pitcher *et al.*, 2007).

El PolDom de la LigD

En la LigD encontramos los dominios polimerasa y ligasa como en la precedente de especies como *M. tuberculosis* (MtuLigD) o *P. aeruginosa*, (PaeLigD), en los que van acompañados de un dominio fosfoesterasa, ausente en el caso de la LigD de *B. subtilis* (BsuLigD) (Figura 2A). El dominio polimerasa es un miembro divergente de la superfamilia de primasas tipo Archaeo-Eukaryotic (AEP), a diferencia de las polimerasas del NHEJ eucariótico como Pol λ , Pol μ y TdT, que pertenecen a la familia X (Bowater y Doherty, 2006). Se ha estudiado la actividad de polimerización del dominio PolDom, que es capaz de reconocer y elongar gran cantidad de sustratos de ácidos nucleicos, como pueden ser los *gaps* que pueden darse *in vivo* durante la reparación de las DSB (Pitcher *et al.*, 2007a; Brisset *et al.*, 2011), los cuales simularemos *in vitro* en este trabajo. Se ha descrito la preferencia de inserción de NTP frente a dNTP, así como que la actividad polimerasa de este dominio *in vitro* es óptima en presencia de iones Mn^{2+} (de Vega,

2013). Esto puede sugerir que la capacidad de la utilización de NTP frente a dNTP por la LigD podría suponer cierta ventaja para la reparación de roturas del material genético (Yakovleva y Shuman, 2006), posiblemente debido a que los dNTP podrían encontrarse de manera limitante cuando las bacterias no se están replicando activamente, como cuando se produce la germinación de las esporas de *B. subtilis* (Moeller *et al.*, 2007).

Como se ha comentado anteriormente, el PolDom muestra preferencia en la inserción de ribonucleótidos. La resolución del complejo ternario del PolDom de *M. tuberculosis* LigD (*MtuPolDom*) mostró que el ATP entrante se extiende desde el grupo trifosfato y se une a la enzima mediante el apilamiento de la base de adenina con la cadena lateral de la Phe⁶⁴ y de una red de contactos directos y otros mediados por agua a la ribosa, incluyendo enlaces de hidrógeno entre el O2' de la ribosa y los O γ de la Thr²³⁶ y N δ de la His¹¹¹ y, por otro lado, enlaces de hidrógeno entre el O3' de la ribosa, los átomos de los grupos carbonilo de la cadena principal y los átomos O γ de Thr²³⁶ y N δ de His¹¹¹, además de una molécula de agua compartida con el oxígeno del trifosfato que realiza la unión α - β (Brissett *et al.*, 2007; Brissett *et al.*, 2011; Figura 2B y 2C).

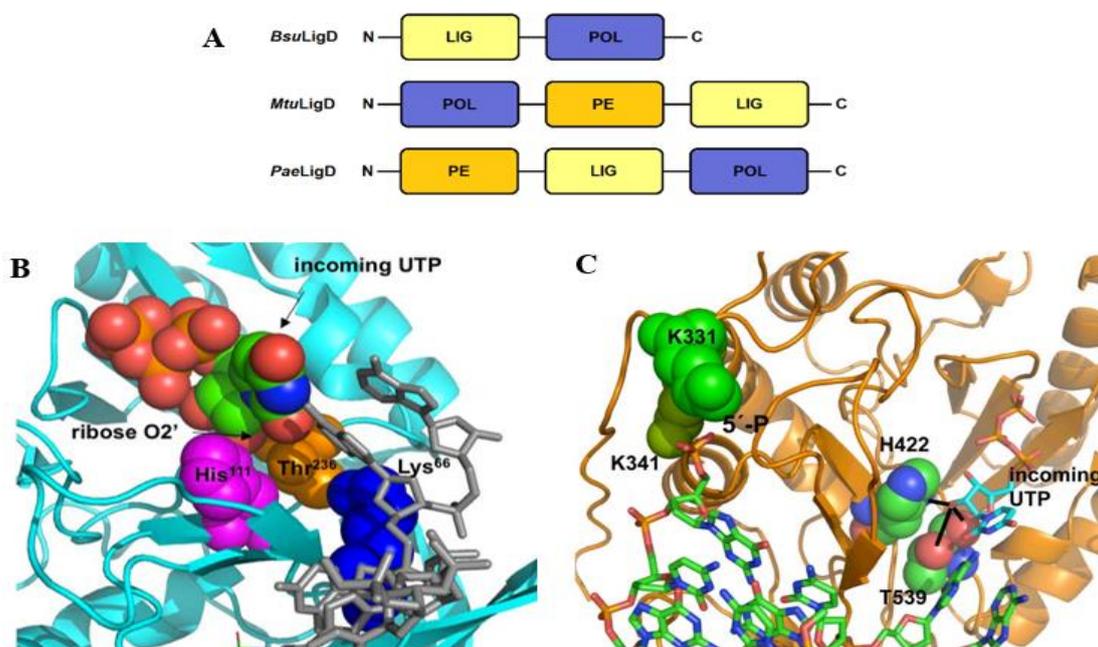


Figura 2. A. Esquema de la organización de las distintas actividades enzimáticas de las LigDs de *B. subtilis* (*BsuLigD*), *M. tuberculosis* (*MtuLigD*), y *P. aeruginosa* (*PaeLigD*). Los dominios polimerasa (POL), ligasa (LIG) y fosfoesterasa (PE) se representan en azul, amarillo y naranja respectivamente (adaptado de de Vega, 2013). B. Detalle del sitio de inserción de NTP de *MtuPolDom*. [PDB 3PKY; (Brissett *et al.*, 2011)]. La cadena molde se muestra en color en gris. Los residuos His¹¹¹ y Thr²³⁶ propuestos como responsables de la discriminación contra dNTP se representan como esferas magenta y naranja, homólogos respectivamente de His⁴²² y Thr⁵³⁹ de *BsuPolDom*, estudiados en este trabajo. C. Representación del modelo estructural de *BsuPolDom* (Residuos 320-611). Se propone que el grupo O2' de la UTP establezca puentes de hidrógeno (líneas negras) con los residuos H422 y T539, representados como esferas (tomado de de Vega, 2013).

Gracias a alineamientos múltiples de secuencia de los PolDom de las LigD bacterianas se ha podido determinar el alto grado de conservación de los residuos correspondientes a la His¹¹¹ y Thr²³⁶ de *MtuPolDom* (ver alineamiento, Figura 3) y correspondientes a la His⁴²² y Thr⁵³⁶ de *BsuLigD* y a la His⁶⁵¹ y Ser⁷⁶⁸ del PolDom de la LigD de *P. aeruginosa* (*PaePolDom*). Por lo tanto, para comprobar la hipótesis de la implicación de los residuos His y Thr en la incorporación preferente de ribonucleótidos llevaremos a

cabo el estudio bioquímico de los mutantes de *Bsu*LigD T539Y, T539A y H422A, que se encontraban disponibles en el laboratorio, y su estudio comparativo con los mutantes homólogos S768Y, S768A, H651A del *Pae*PolDom que realizaremos a lo largo de este estudio.

Por otra parte, la superposición de las estructuras de *Mtu*PolDom y el dominio de polimerización Prim-Pol (perteneciente a la familia AEP) codificadas por el plásmido de *Sulfolobus islandicus* pRN1 (Lipps *et al.*, 2004), el cual inserta preferentemente dNTPs, muestra que, en este último, el residuo Tyr¹⁷⁸ se coloca en la misma posición que el residuo Thr²³⁶ de la LigD de *M. tuberculosis*. En la Prim-pol de pRN1, el grupo hidroxilo de Tyr¹⁷⁸ podría encontrarse evitando la adición de NTP a través de una interacción estérica con el O2' de la ribosa.

Basándonos tanto en la inserción preferente de NTP por LigDs, como en las estructuras cristalográficas de *Mtu*PolDom y los complejos ternarios de la Prim-Pol de pRN1, la hipótesis es que el imidazol de la His¹¹¹ de *Mtu*PolDom podría ser un residuo crítico para unir ambos, dNTP y NTP, mientras que la cadena lateral de la Thr²³⁶ podría ser responsable de la adición preferencial de NTP en estas enzimas.

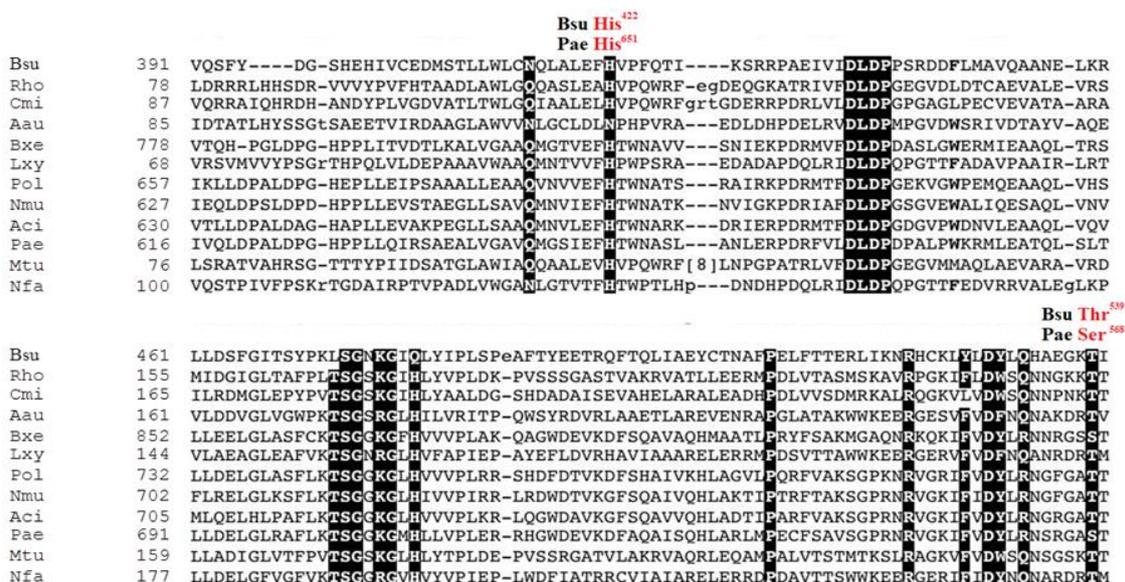


Figura 3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de múltiples PolDom de LigD bacterianas. Los números indican la posición del aminoácido en relación con el extremo N de cada LigD. Debido a la gran cantidad de secuencias, solo están alineadas las secuencias representativas. Los nombres de los organismos se abrevian de la siguiente manera: *Bsu*, *Bacillus subtilis*; *Rho*, *Rhodococcus*; *Cmi*, *Clavibacter michiganenses*; *Aau*, *Arthobacter aurescens*; *Bxe*, *Burkholderia xenovorans*; *Lxy*, *Leifsonia xyli*; *Pol*, *Polaromonas*; *Nmu*, *Nitrosospora multiformis*; *Aci*, *Acidovorax*; *Pae*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Mtu*, *Mycobacterium tuberculosis*; *Nfa*, *Nocardia farcinica*. Los residuos altamente conservados se indican con letras blancas sobre un fondo negro. En letras rojas, residuos de *Bsu*PolDom y de *Pae*PolDom que serán estudiados en este trabajo.

Papel del 8oxoG en lesiones del DNA

En las células se pueden dar especies reactivas de oxígeno, que pueden derivarse del metabolismo celular (Hoejmakers, 2001), y pueden causar lesiones tanto en el DNA como en el *pool* de nucleótidos, generando entre ellos el 8-oxo-7,8-dihidroguanosina 5'-trifosfato (8oxoGTP). Los efectos que esta lesión puede causar (en forma de 8oxoGTP en el *pool* de NTPs, y en forma de 8oxodGMP en el DNA) reside en su habilidad de adoptar bien la conformación *anti* o *syn* en el sitio activo de las DNA polimerasas cuando se aparean con citosina (dC) o adenina (dA), respectivamente (Kouchakdjian *et al.*, 1991; Oda *et al.*, 1991). Debido a este potencial de aparear con una u otra base, puede darse la inserción errónea de nucleótido si el error no es reparado, llevando a las transversiones A:T a C:G, o G:C a T:A (McAuley-Hecht *et al.*, 1991; Nakabeppu, 2014).

Además del papel de reparación del DNA de los residuos mencionados anteriormente, haremos un estudio cualitativo para observar el posible papel de estos residuos en la incorporación del nucleótido promutagénico 8oxoGMP en moldes de DNA *in vitro*.

Objetivos

Objetivos generales:

- Determinar el papel de los residuos Thr⁵³⁹ y His⁴²² de *BsuLigD* y sus homólogos Ser⁷⁶⁸ y His⁶⁵¹ de *PaePolDom* en la incorporación diferencial de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos
- Determinar el papel de dichos residuos en la incorporación fiel de nucleótidos
- Analizar el papel de estos residuos en la inserción del nucleótido promutagénico 8oxoGMP

Objetivos específicos:

- Purificar las proteínas mutantes de *PaePolDom* S768Y, S768A y H651A
- Analizar la inserción simultánea de nucleótidos sobre un *gapped*-DNA por los distintos mutantes
- Realizar cinéticas de inserción de nucleótido sobre *gapped*-DNA en estado estacionario con los distintos mutantes y determinar sus parámetros cinéticos K_m , k_{cat} y *Eficiencia catalítica* (*Cat. Eff.*).
- Analizar las diferencias en la polimerización en una estructura de DNA del tipo iniciador/molde con NTPs o con dNTPs entre los distintos mutantes
- Realizar cinéticas de inserción de nucleótido sobre DNA molde/iniciador en estado estacionario con los distintos mutantes y determinar sus parámetros cinéticos K_m , k_{cat} y *Cat. Eff.*
- Ensayar la inserción de distintos rNMPs sobre distintos *gapped*-DNA para analizar la fidelidad de inserción de nucleótido de los distintos mutantes de la LigD
- Realizar cinéticas de inserción del nucleótido promutagénico 8oxoGMP sobre los *gapdA* y *gapdC*, y compararlos con la inserción del nucleótido correcto correspondiente por *PaePolDom*
- Analizar el posible papel de los residuos indicados en la inserción de 8oxoGMP en los moldes de DNA *gapdA* y *gapdC*

Materiales y Métodos

Materiales

Proteínas

Para estudiar el papel bioquímico de los residuos de treonina e histidina comentados en la introducción, se utilizaron los mutantes de *BsuLigD* T539Y, T539A y H422A en los residuos homólogos Thr⁵⁹³ y His⁴²², de la *LigD* de *M. tuberculosis*, que además poseen una mutación E184A en el *LigDom*, que elimina la actividad ligasa de la proteína (de Ory *et al.*, 2016). Todas estas proteínas se encontraban purificadas en el laboratorio.

Para analizar el papel de dichos residuos en la *LigD* de *P. aeruginosa*, se llevó a cabo mutagénesis dirigida a los residuos homólogos Ser⁷⁶⁸ e His⁶⁵¹ y la posterior purificación de las proteínas mutantes S768Y, S768A y H651A (ver en Métodos).

Nucleótidos, oligonucleótidos y sustratos de DNA

Todos los nucleótidos se obtuvieron de GE Healthcare, con la excepción del 8oxoGTP, que fue adquirido de Trilink. Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos y en la mutagénesis dirigida se obtuvieron de Sigma-Aldrich y sus secuencias se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos de DNA empleados en este trabajo. En amarillo los oligonucleótidos utilizados en los ensayos *in vitro*; en azul, los oligonucleótidos empleados en el clonaje y mutagénesis.

Cy5-Sp1	Cy5-GATCACAGTGAGTAC
Pnick-P	p-AACGACGGCCAGT
Sp1c +14A	ACTGGCCGTCGTTAGTACTCACTGTGATC
Sp1c +14C	ACTGGCCGTCGTTCTGACTCACTGTGATC
Sp1c +14G	ACTGGCCGTCGTTGGTACTCACTGTGATC
Sp1c +14T	ACTGGCCGTCGTTTGTACTCACTGTGATC
Sp1c+18	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC
<i>PaePolDom</i> H651A_F	CATCGAATTTgcTACCTGGAACGCTTCTC
<i>PaePolDom</i> H651A_R	CTGCCCATTTGAACGGCA
<i>PaePolDom</i> S768A_F	CCGCGGCGCCgCTACCGTTGC
<i>PaePolDom</i> S768A_R	CTATTACGCAGATAATCCACGAAGATTTTGCCGACG
<i>PaePolDom</i> S768Y_F	CGCGGCGCCTaTACCGTTGCA
<i>PaePolDom</i> S768Y_R	GCTATTACGCAGATAATCCACGAAGATTTTGCC

Para obtener los sustratos de DNA con un gap de 1 nucleótido (*gapped-DNA*) se hibridaron los oligonucleótidos Cy5-Sp1 (*upstream*), que posee el fluoróforo en su extremo 5', y el oligonucleótido Pnick-P (*downstream*), a los oligonucleótidos molde Sp1c+14A para el *GapdA*, Sp1c+14C para el *GapdC*, Sp1c+14G para el *GapdG*, y Sp1c+14T para el *GapdT*. Para obtener las estructuras de DNA tipo

iniciador/molde se hibridaron el oligonucleótido Cy5-Sp1 al Sp1c+18, y el Cy5-Sp1 al Sp1c+14A. Estas hibridaciones se realizaron calentándolas a 80°C durante 5 minutos, en presencia de 60 mM Tris-HCl (pH 7.5) y 0,2 M NaCl, y dejándolas enfriar lentamente. En cada experimento se indican los híbridos empleados.

Métodos

Mutagénesis dirigida del *PaePolDom*

Se realizó la mutagénesis dirigida en el PolDom de *P. aeruginosa* (H651A, S768A y S768Y) utilizando el Q5 *site-directed mutagenesis kit* de NEB y siguiendo el protocolo de la casa comercial. Se realizó una PCR con los oligonucleótidos indicados en azul en la Tabla 2 (H651A-F, H651A-R, S768A-F, S768A-R, S768Y-F, S768Y-R); los productos de PCR se trataron con el kit de enzimas KLD (Kinasa, Ligasa y DpnI), y se transformaron las células competentes *Escherichia coli* DH5 α del kit como se indica en el protocolo. Se plaquearon 100 μ l del mix resultante en placas con medio selectivo con kanamicina, y se dejaron a temperatura ambiente durante 72h. De las colonias resultantes se seleccionaron dos y se crecieron en 10mL de LB + kanamicina (50 μ g/ml) a 37 °C durante 12h. Se aislaron los plásmidos mediante el kit Wizard Plus SV Minipreps de Promega y se secuenció el inserto PolDom para comprobar la presencia de la mutación, así como para descartar la presencia de mutaciones no deseadas. Posteriormente, se transformó la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3) con los plásmidos correctos.

Purificación de las proteínas mutantes de *PaePolDom* S768Y, S768A y H651A

Las células de expresión transformadas por cada plásmido mutante se crecieron en 100 ml de medio Luria Bertani [LB (Lennox, 1955)] en presencia de kanamicina (50 μ g/ml) y la expresión de la proteína se indujo con 1 mM IPTG durante 72 h a 15°C. Las crecidas se centrifugaron a 5.000 x g durante 10 min a 4°C para obtener el pellet de células. Los pellets se resuspendieron en 4 ml de tampón A [50mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 7 mM β -mercaptoetanol, 5% glicerol] en presencia de 0,3 M NaCl. Se llevó a cabo una comprobación de la expresión y solubilidad con 1 ml de las células expresadas. Así, las muestras se sonicaron y se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C, y se comprobó que las tres proteínas eran solubles mediante SDS-PAGE 12% (Figura 4, panel superior).

Una vez comprobada la expresión y solubilidad de las proteínas, el resto de los cultivos se incubaron en presencia de 1mg/ml de lisozima (para ayudar a la digestión de las paredes celulares) y 3 μ l de Benzonas de New England Biolabs (para eliminar los ácidos nucleicos) durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se sonicaron mediante 10 pulsos de 10" seguido cada uno por un período de enfriamiento de 50". Se recogió una muestra como control de la inducción de proteína, y posteriormente el resto de la muestra se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min a 4°C para eliminar los debris celulares y las proteínas insolubles. El sobrenadante se pasó a través de una columna de Ni-NTA (1 ml) preequilibrada con 3 ml de tampón A en presencia de 0,3 M NaCl y 10 mM Imidazol. Posteriormente se realizaron dos lavados con 3 ml de tampón A, 0,3 M NaCl, 10 mM Imidazol, y posteriormente 2 lavados de 2 ml con tampón A 0,3 M NaCl y concentraciones crecientes de imidazol (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM y 250 mM). La proteína unida a la columna se eluyó principalmente en el segundo lavado de 100 mM y en los dos lavados de 150 mM (Figura 4, panel central). Se juntaron el segundo lavado de 100 mM (2 ml) y los dos de 150 mM (4 ml) y se adicionaron 12 ml de tampón A para obtener una concentración final de 100

ml NaCl. Estas muestras se pasaron a través de una columna de heparin-sepharosa (1 ml), preequilibrada con tampón A 100 mM NaCl. Se realizaron dos lavados con 3 ml tampón A 100 mM NaCl, y posteriormente dos lavados de 2 ml cada uno de tampón A suplementado con concentraciones crecientes de NaCl (200 mM, 300 mM, 400 mM y 500 mM). Las proteínas mutantes eluyeron principalmente en las dos fracciones de 400 mM NaCl (Figura 4, panel inferior). Estas se dializaron durante toda la noche a 4°C con tampón A en presencia de 1 mM EDTA, 0,3 M NaCl, 50% (v/v) glicerol y 0,05% tween-20.

Para cuantificar la concentración de la proteína purificada se utilizaron diferentes masas de las proteínas purificadas, junto con concentraciones conocidas del *PaePolDom*, que fueron comparadas mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie, como se muestra en la Figura 5. Las bandas fueron analizadas cuantitativamente con el software ImageJ. Las concentraciones obtenidas tras la purificación fueron las siguientes: S768Y: 81,6 µM; S768A: 100,5 µM y H651A: 79,26 µM

Ensayos bioquímicos de inserción de nucleótidos *in vitro*

Todas las reacciones mostradas a continuación en los diferentes ensayos bioquímicos se realizaron en un volumen final de 12,5 µl, en presencia de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 4% (v/v) glicerol y 0,1 mg/ml BSA. Antes de comenzar cada reacción, las mezclas se preincubaron durante 3 min a 30°C. Tras la incubación por el tiempo indicado, la reacción se detuvo con 10 µl de 95% formamida y 10 mM EDTA. Posteriormente, el resultado de las reacciones se analizó mediante 20% PAGE 7 M urea, y posterior visualización con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare). Las intensidades de las bandas se cuantificaron utilizando el software de ImageJ, y el porcentaje de la formación de producto se calculó mediante la ratio de cadenas iniciadoras elongadas en relación al total de cadenas iniciadoras totales.

Ensayos de inserción simultánea de nucleótidos

Estos ensayos se realizaron en presencia de *gapped-DNA* (5 nM) y las distintas proteínas en las concentraciones indicadas en cada caso. Para analizar la inserción simultánea por parte de *BsuLigD* se utilizó 40 nM del mutante deficiente en la actividad ligasa E184A (*wild-type*) en presencia de 100 nM dTTP/UTP para GapdA, y 100 nM dGTP/GTP para GapdC. Se comenzaron las reacciones tras la adición de MnCl₂ (5 mM final) y se pararon con 10 µl de 95% formamida y 10 mM EDTA tras los tiempos indicados.

Para comparar la inserción simultánea de los distintos mutantes de *BsuLigD* se realizó el mismo experimento con 5 nM GapdA, 10 nM proteína (*wild-type*, T539Y, T539A o H422A), y 50 nM dTTP/UTP para todas salvo para H422A, en la que se utilizó 500 nM dTTP/UTP, debido a su baja actividad. Las reacciones comenzaron tras la adición de MnCl₂ (5 mM final) y se pararon tras los tiempos indicados.

Para comparar la inserción simultánea de los distintos mutantes de *PaePolDom* se realizó el experimento con 5 nM GapdA, 20 nM dTTP/UTP, en presencia de MnCl₂ (5 mM). Las reacciones se iniciaron con la adición de diluciones crecientes de proteína, según se especifica en cada caso, y se pararon tras 1 minuto con 10 µl de 95% formamida y 10 mM EDTA.

En todos los casos, una vez detenida las reacciones el resultado de las mismas se analizó mediante 20% PAGE 7 M urea, y posterior visualización con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare).

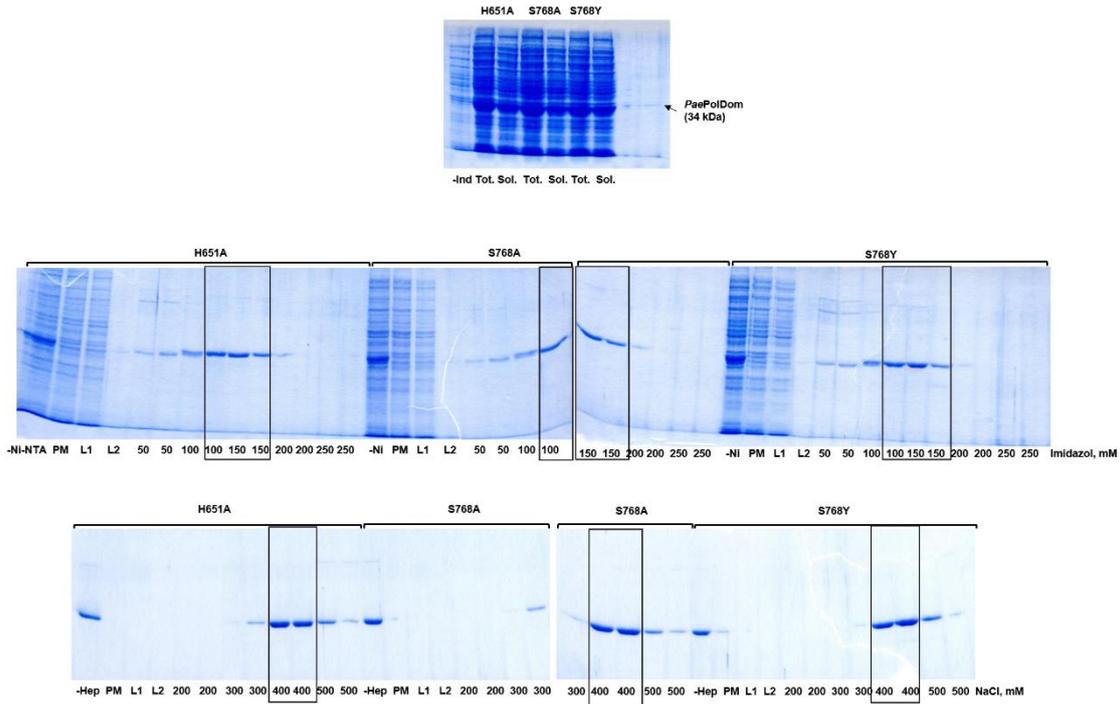


Figura 4. Sobreexpresión y purificación de las proteínas mutantes. Aparecen representadas las diferentes fracciones recogidas a lo largo del proceso de purificación de los mutantes, tras separación mediante SDS-PAGE 12% y tinción con azul de Coomassie. **Panel superior: Prueba de inducción y solubilidad de las proteínas mutantes.** -Ind: control sin inducir; Tot.: proteína total tras sonicación; Sol.: fracción de proteínas solubles tras centrifugación. PaePolDom, marcador de tamaño de la proteína expresada. **Panel central: purificación a través de la columna de Ni-NTA.** -Ni-NTA: muestra previa al paso por la columna de Ni-NTA; PM: muestra obtenida tras el paso por la columna; L1 y L2: muestras obtenidas tras los lavados en presencia de 10 mM imidazol. 50-250: muestras obtenidas tras los lavados en presencia de la concentración indicada de imidazol. **Panel inferior: purificación a través de la columna de Heparin-Sepharose;** -Hep: muestra previa al paso por la columna de Heparin-Sepharose; PM: muestra obtenida tras el paso por la columna; L1 y L2: muestras obtenidas tras los lavados en presencia de 100 mM NaCl. 200-500: muestras obtenidas tras los lavados en presencia de la concentración indicada de NaCl.

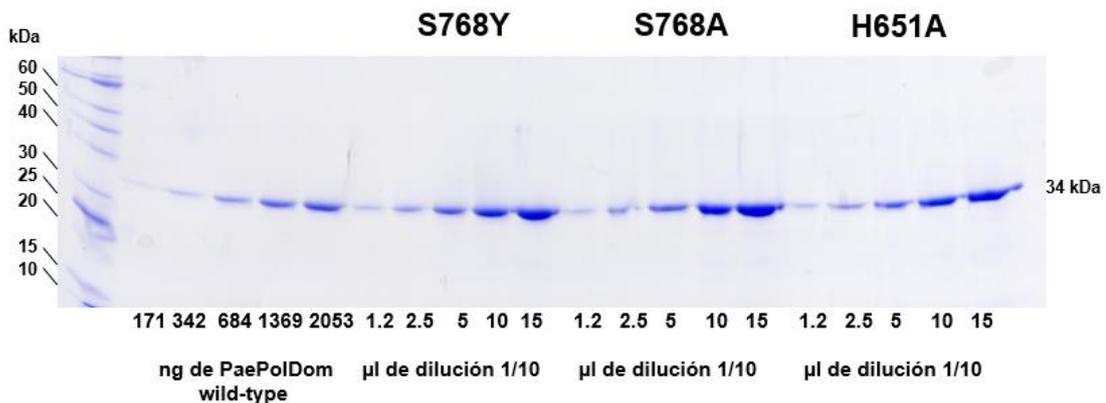


Figura 5. Cuantificación de las proteínas de PaePolDom mutantes S768Y, S768A y H651A. Se cargaron volúmenes crecientes de las diferentes proteínas, marcados en la parte inferior (μ l) de una dilución conocida de proteína. Se obtuvo la cuantificación de los mutantes partir de concentraciones conocidas del PaePolDom wild-type.

Ensayos de estado estacionario sobre estructura de gapped-DNA

Las reacciones se realizaron mediante la incubación de 200 nM del híbrido de DNA indicado (*gapped-DNA* o Sp1/Sp1c+18) en presencia de 5 mM MnCl₂ y de la concentración de proteína y tiempo de reacción indicados en cada caso con el objetivo de que la proporción de las cadenas iniciadoras elongadas fuera inferior al 20%. La reacción comenzó con la adición de la concentración indicada de NTPs o dNTPs. Tras la incubación por el tiempo indicado a 30°, las reacciones se detuvieron con 10 µl de 95% formamida y 10 mM EDTA. Posteriormente, el resultado de las reacciones se analizó mediante 20% PAGE 7 M urea, y posterior visualización con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare). El análisis y la cuantificación de incorporación de nucleótido se realizaron como está descrito [O'Flaherty y Guengerich (2014)]. Así, los valores de *turnover* (v , min⁻¹) se calcularon según la ecuación $v = Rp \cdot Di / E \cdot t$, donde Rp representa la relación de formación de producto con respecto a la suma de producto y sustrato, Di es el sustrato de DNA inicial, E es la concentración de proteína y t es el tiempo. Los valores de *turnover* se representaron en función de la concentración de nucleótidos.

Los parámetros cinéticos de estado estacionario V_{max} y K_m se determinaron ajustando los datos a la ecuación de Michaelis-Menten $V = V_{max} \cdot [S] / (K_m + [S])$ usando el software Prism 7.0.4. La k_{cat} se determinó con la ecuación $k_{cat} = V_{max} / [E]$. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

Ensayos de fidelidad

Para los mutantes de *BsuLigD*, las reacciones se llevaron a cabo mediante la incubación de 5 nM del *gapped-DNA* indicado (GapdA, GapdC, GapdG y GapdT) con de 5 nM de las proteínas *wild-type* y mutantes, salvo para H422A que se utilizó 10 nM, en presencia de mM MnCl₂ 5. Las reacciones se iniciaron con la adición de 50 nM del NTP indicado. Tras incubar las muestras durante 5 min a 30°C, las reacciones se detuvieron con 10 µl de 95% formamida y 10 mM EDTA. Posteriormente, el resultado de las reacciones se analizó mediante 20% PAGE 7 M urea, y posterior visualización con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare). Los ensayos con *PaePolDom* y sus mutantes se llevaron a cabo de la misma manera pero en presencia de 1 nM de proteína y 20 nM del NTP indicado en cada caso.

Ensayos de polimerización sobre estructura iniciador/molde Sp1/Sp1c+18

Estos ensayos se realizaron con las proteínas *PaePolDom* y sus mutantes, y se utilizó el híbrido tipo iniciador/molde Sp1/Sp1c+18 (5nM), en presencia de 5 mM MnCl₂, 100 nM NTP o dNTP, y 50 nM (*wild-type*) y 100 nM (resto de mutantes). Tras la incubación por el tiempo indicado a 30°, las reacciones se detuvieron con 10 µl de 95% formamida y 10 mM EDTA. Posteriormente, el resultado de las reacciones se analizó mediante 20% PAGE 7 M urea, y posterior visualización con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Cinéticas de polimerización sobre estructura iniciador/molde Sp1/Sp1c+18

Se utilizó el híbrido de DNA Sp1/Sp1c+18A a una concentración de 5nM, una concentración de proteína (*PaePolDom* y mutantes) de 200 nM y en presencia de 5 mM MnCl₂. La reacción comenzó tras la adición

de concentraciones crecientes (desde 1,6 nM a 50 nM) de una mezcla de NTPs o dNTPs, según se indique. Las reacciones se pararon tras 2 min de incubación con 10 μ l de 95% formamida y 10 mM EDTA. Posteriormente, el resultado de las reacciones se analizó mediante 20% PAGE 7 M urea, y posterior visualización con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Ensayos de estado estacionario sobre estructura iniciador/molde Sp1/Sp1c+14A

Este ensayo se llevó a cabo utilizando 200 nM del híbrido de DNA Sp1/Sp1c+14A, en presencia de 5 mM MnCl₂ y de la concentración de proteína indicada. Los tiempos de reacción se ajustaron en cada caso con el objetivo de que la proporción de las cadenas iniciadoras elongadas fuera inferior al 20%. Así, para el *PaePolDom wild-type* se utilizó 0,4 nM y 1 min de reacción para la inserción de UTP, 4 nM y 5 min para dTTP; para el mutante S768Y, 4 nM y 1,5 min para UTP, 32 nM y 5 min para dTTP; para S768A 2 nM y 1,5 min para UTP, 4 nM y 5 min para dTTP; y para H651A se utilizaron 4 nM y 5 min para UTP y para dTTP. La reacción comenzó tras la adición de concentraciones crecientes de UTP o dTTP (de 3,12 a 400 nM para todas las proteínas excepto en el caso del mutante H651A, con el que se utilizó de 6,25 a 800 nM). El análisis y la cuantificación de incorporación de nucleótido se realizaron como se ha descrito anteriormente. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

Ensayos de inserción de 8oxoGMP

Para comprobar la eficiencia de inserción de 8oxoGMP en *gapped*-DNA respecto a la de los nucleótidos naturales se utilizaron 5 nM del *gapdA* o del *gapdC*, según se indique y 20 nM de, o bien 8oxoGTP o UTP (en el caso de utilizar el *gapdA*) o GTP (en el caso del *gapdC*). Las reacciones comenzaron tras la adición de concentraciones crecientes de la proteína *PaePolDom* (0,5, 1 y 2 nM). Tras la incubación durante 1 min a 30°, las reacciones se detuvieron con 10 μ l de 95% formamida y 10 mM EDTA. Posteriormente, el resultado de las reacciones se analizó mediante 20% PAGE 7 M urea, y posterior visualización con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Se realizó otro ensayo con cinéticas de inserción de 8oxoGMP en *gapdA* (5 nM) comparándolo con la inserción de UMP en *gapdA* (5 nM), así como las cinéticas de inserción de 8oxoGMP en *gapdC* (5 nM) comparándola con la inserción de GMP en *gapdC* (5 nM). El experimento se realizó en presencia de 5 mM MnCl₂ y 1 nM de *PaePolDom*. Se comenzó la reacción con concentraciones crecientes de los nucleótidos indicados, en un rango de 5 a 160 nM, y se paró con 10 μ l de 95% formamida y 10 mM EDTA. Posteriormente, el resultado de las reacciones se analizó mediante 20% PAGE 7 M urea, y posterior visualización con el escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare). Los valores de *turnover* (v , min⁻¹) se calcularon según la ecuación $v = Rp \cdot Di / E \cdot t$, como está descrito [O'Flaherty y Guengerich (2014)], donde Rp representa la relación de formación de producto con respecto a la suma de producto y sustrato, Di es el sustrato de DNA inicial, E es la concentración de proteína y t es el tiempo. Los valores de *turnover* se representaron en función de la concentración de nucleótidos.

Resultados

Inserción simultánea de nucleótidos y ribonucleótidos por *BsuLigD*

Se realizaron experimentos con el mutante *wild-type* de *BsuLigD* (E184A) sobre el *gapdA* y el *gapdC*, los cuales difieren en la base del molde, y se les añadió un único nucleótido, complementario al nucleótido presente en el *gap* (Figura 6), con el fin de observar las mayores diferencias y seleccionar el híbrido de DNA a utilizar en posteriores experimentos. En ambos casos, se observó que el ribonucleótido era insertado por la proteína de manera más eficiente que el correspondiente desoxirribonucleótido. En el caso de *gapdC*, al insertar simultáneamente GMP y dGMP se obtuvieron menos diferencias que al insertar simultáneamente UMP y dTMP en el *gapdA*, por lo que posteriormente se utilizó este sustrato para las cinéticas de inserción de nucleótido de las distintas proteínas.

Una vez que se determinó la idoneidad del *gapdA*, se analizó la capacidad de inserción de los nucleótidos por parte de las proteínas mutantes de *BsuLigD* (Figura 7). Como se puede observar en la figura, tanto el mutante T539Y como el T539A insertaron de manera más eficiente UMP que dTMP, mostrando un patrón parecido a la enzima *wild-type*. Por el contrario, en el caso del mutante H422A, esas diferencias se minimizaron considerablemente, un resultado que apoyaría la hipótesis de la implicación de este residuo en la inserción preferente de ribonucleótidos. Para poder cuantificar estas diferencias se realizaron las distintas cinéticas de inserción de nucleótido en estos sustratos de DNA.

Cinéticas de inserción de nucleótido de *BsuLigD*

Se establecieron las condiciones para realizar los experimentos de estado estacionario, con el fin de obtener los parámetros cinéticos de inserción de nucleótidos de las proteínas y analizar los datos obtenidos. Gracias a los gráficos obtenidos mediante Prism 7.0.1 de las cinéticas de inserción de las proteínas de *BsuLigD* (Figura 8) se obtuvieron los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 2. Estos datos nos muestran que en todos los mutantes de *BsuLigD* se han obtenido unas eficiencias catalíticas mayores para la inserción de los ribonucleótidos (UMP) frente a los desoxirribonucleótidos (dTMP), como está descrito para esta proteína (Zhu y Shuman, 2005). Las relaciones obtenidas entre las eficiencias de inserción de UMP y dTMP no son muy distintas, ya que en el enzima *wild-type* (E184A) se observa únicamente una diferencia de 1,2 veces. La mayor diferencia la encontramos con la mutación T539Y, pasando a ser 2,3 veces mayor la inserción de UMP frente a la de dTMP. Por otro lado, los mutantes T539A y H422A presentan una relación similar a la del *wild-type*.

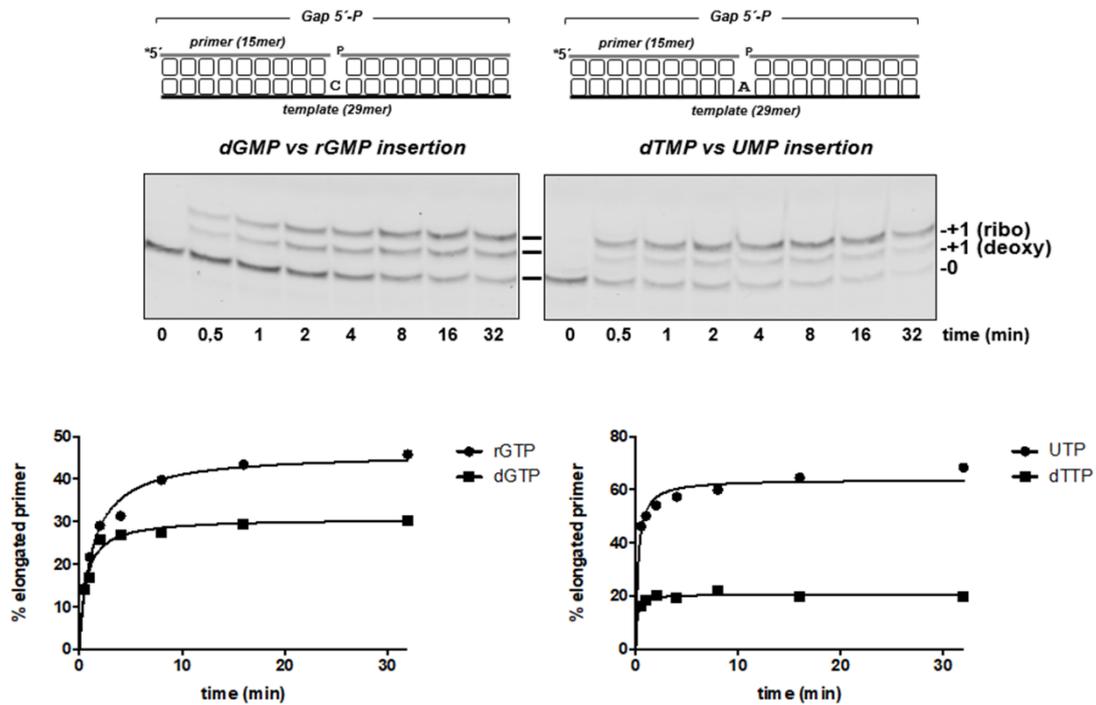


Figura 6. Inserción simultánea de rGMP/dGMP en *gapdC* y de UTP/dTMP en *gapdA*. La estructura de la gapped-DNA se muestran en la parte superior, *gapdC* (izquierda) y *gapdA* (derecha), difiriendo en la base del molde, C o A, respectivamente. Los ensayos se realizaron según se indica en Materiales y Métodos. Se representaron los valores de porcentaje de cadenas iniciadoras elongadas respecto al total de cadenas iniciadoras, frente al tiempo de reacción, y se ajustaron a una curva mediante regresión no lineal de mínimos cuadrados (panel inferior).

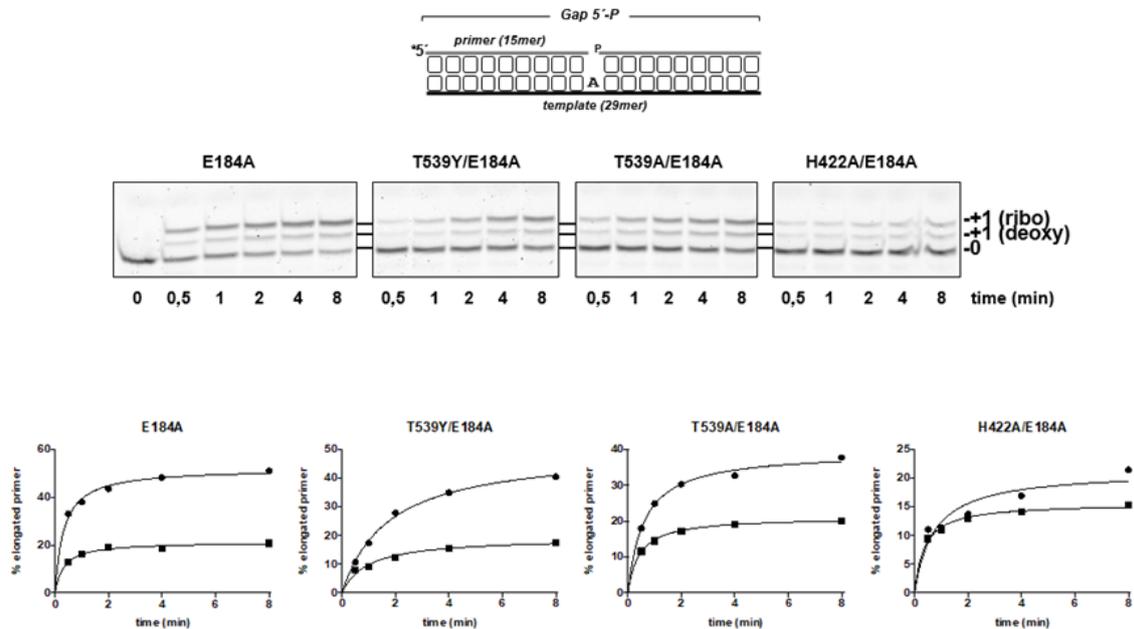


Figura 7. Inserción simultánea de UMP/dTMP por los mutantes de BsuLigD. La estructura del híbrido de DNA empleado se muestra en la parte superior. Las condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos. Se emplearon 10 nM de los cuatro mutantes, 5 nM del híbrido de DNA, y 50 nM nucleótidos (salvo para H422A, que se emplearon 500 nM). El ensayo de inserción de nucleótidos, en el centro de la figura, muestra cómo se insertan simultáneamente los nucleótidos UMP y dTMP al añadir ambos. En la parte inferior de la figura se muestran las gráficas correspondientes al experimento mostrado en el panel central.

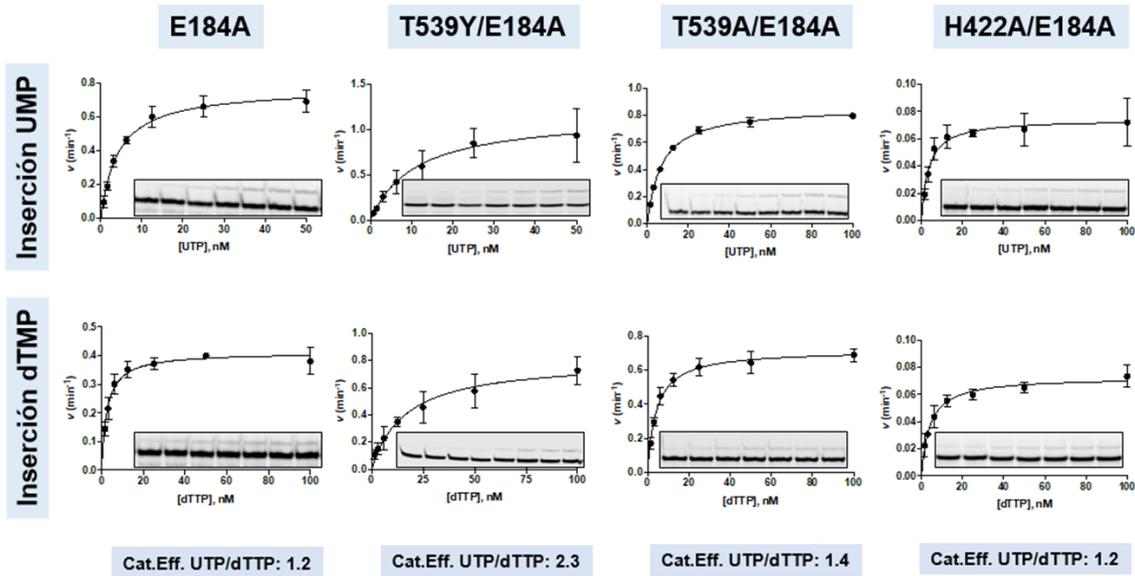


Figura 8. Incorporación de UMP/dTMP en *gapA* por los mutantes de *BsuLigD*. Los ensayos se realizaron en condiciones de estado estacionario, como se indica en *Materiales y Métodos*. Se muestran los valores de turnover (v , min^{-1}) de la incorporación de los nucleótidos (UMP o dTMP) frente a la concentración de dicho nucleótido. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten como se describe en *Materiales y Métodos*. Los valores de K_m , k_{cat} y la eficiencia catalítica (Cat. Eff. = k_{cat} / k_m) vienen representados en la *Tabla 2*. La relación entre las eficiencias catalíticas de inserción de UMP frente a dTTP de cada proteína vienen indicadas en la parte inferior.

Tabla 2. Resultados de las cinéticas de inserción de nucleótido en estado estacionario de las proteínas de *BsuLigD* en el *gapA*. Los resultados son las medias de tres experimentos independientes \pm el error estándar.

Proteína	Nucleótido utilizado	k_{cat} (min^{-1})	K_m (nM)	Eficiencia catalítica (k_{cat} / K_m) ($\text{nM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
E184A	UTP	$0,77 \pm 0,02$	$4,23 \pm 0,45$	0,182
	dTTP	$0,41 \pm 0,01$	$2,63 \pm 0,32$	0,158
T539Y/E184A	UTP	$1,16 \pm 0,12$	$10,85 \pm 2,9$	0,110
	dTTP	$0,81 \pm 0,06$	$16,65 \pm 3,54$	0,048
T539A/E184A	UTP	$0,72 \pm 0,02$	$4,25 \pm 0,42$	0,169
	dTTP	$0,86 \pm 0,01$	$6,91 \pm 0,28$	0,124
H422A/E184A	UTP	$0,074 \pm 0,003$	$3,39 \pm 0,68$	0,022
	dTTP	$0,073 \pm 0,002$	$4,1 \pm 0,54$	0,018

Las eficiencias catalíticas mayores las encontramos en el mutante *wild-type* (E184A), tanto para la inserción de UMP como para la de dTMP, respecto a los demás mutantes. Las eficiencias más bajas son las del mutante H422A, que disminuyen aproximadamente 10 veces respecto a las del *wild-type*. Pero si se comparan las constantes catalíticas (k_{cat} y K_m ; Tabla 2) de E184A frente a los mutantes del residuo de Tyr, lo que observamos con la mutación es un aumento en la K_m de 2 y 7 veces para el UMP y el dTMP en T539Y, y de 2 veces para el dTMP en el caso del mutante T539A. Esto compensa los cambios que sufren a nivel de k_{cat} , la cual aumenta tanto para UMP como para dTMP en T539Y, y para dTMP en T539A. Estos resultados podrían indicar que este residuo estaría relacionado con la interacción con el nucleótido, al alterar la eficiencia con la que introduce el nucleótido en el molde de DNA. Por otro lado, en la mutación H422A se observa un gran descenso en ambas k_{cat} y no tanto en la K_m , que son similares a las mostradas por el enzima *wild-type*, lo que nos estaría indicando la importancia de este residuo para la orientación adecuada de los nucleótidos en el centro activo de polimerización para permitir la formación del enlace fosfodiéster.

Las diferencias fenotípicas en cuanto a la inserción diferencial del nucleótido cuando comparamos los experimentos de inserción simultánea (exceso de proteína respecto a DNA) con los experimentos de estado estacionario (exceso de DNA respecto a proteína), nos llevó a pensar que, aunque los mutantes y la *wild-type* carecen de capacidad de ligación debida a la mutación E184A, podrían, una vez insertado el nucleótido y rellenado el *gap*, quedar en un estado precatalítico de ligación que "secuestrara" la proteína unida al extremo 5'-P (sustrato natural de la actividad ligasa), siendo limitante la disociación del enzima, y enmascarando los resultados de inserción de nucleótidos. Por ese motivo decidimos analizar la inserción de nucleótidos del PolDom expresado de manera independiente, y para eliminar la posible interferencia de los otros dominios en la interacción proteína-nucleótido-DNA. Inicialmente se pretendió hacerlo con el PolDom de la LigD de *B. subtilis*, pero dada su insolubilidad en todas las condiciones ensayadas decidimos realizar los mismos experimentos en mutantes en los residuos homólogos en el PolDom de la LigD de *P. aeruginosa* (*PaePolDom*), que es perfectamente soluble (ver Materiales y Métodos).

La purificación y la cantidad de proteína tanto *wild-type* como mutantes nos permitió realizar de manera adecuada los experimentos, sobre todo en el caso del mutante de la His, ya que la concentración de proteína disponible en la H422A de *BsuLigD* era muy baja (213 nM).

Inserción simultánea de nucleótidos y ribonucleótidos por *PaePolDom*

Inicialmente se realizó un experimento de inserción simultánea de UMP y dTMP con *PaePolDom* y sus derivados mutantes, similar al realizado con las proteínas de *BsuLigD* pero, en lugar de utilizar tiempos de reacción crecientes, en este caso se aumentó gradualmente la concentración de proteína utilizando un único tiempo de reacción (ver Materiales y Métodos). Como se puede observar en la Figura 9, de nuevo la proteína *wild-type* y los mutantes S768Y, S768A mostraron una inserción preferente del ribonucleótido, siendo esta más patente en el caso del mutante S768Y. Que una de las mutaciones en la Ser⁷⁶⁸ altere la ratio de inserción UMP/dTMP estaría indicando un papel de dicho residuo en la interacción con el azúcar del nucleótido entrante. En el caso del mutante H651A la preferencia de inserción se llega incluso a invertir, mostrando una eficiencia de inserción de dTMP ligeramente superior a la de UMP, y de acuerdo con los resultados obtenidos con el mutante homólogo H422A de la *BsuLigD* (mostrados anteriormente), lo que de manera

inequívoca indica que este residuo es el principal responsable de garantizar la inserción preferente de ribonucleótidos en las LigDs bacterianas.

Cinéticas de inserción de nucleótido de *PaePolDom* en estado estacionario

Al igual que con la proteína *BsuLigD*, se determinaron los parámetros cinéticos de inserción de nucleótido del *PaePolDom* y sus mutantes mediante ensayos cinéticos en estado estacionario tras la realización de experimentos previos encaminados a determinar la concentración de proteína y de tiempo de reacción necesario en cada caso individual (ver Materiales y Métodos). Gracias a los gráficos obtenidos mediante Prism 7.0.1 de las cinéticas de inserción de las proteínas de *PaePolDom* (Figura 10) se obtuvieron los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 3. Se realizaron las cinéticas de inserción de UMP y dTMP en el mismo híbrido de DNA (gapdA) utilizado para los mutantes de *BsuLigD*. Los resultados, mostrados en Figura 10 y la Tabla 3 nos muestran las diferencias entre las incorporaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos en este tipo de sustrato por el dominio polimerasa sin la posible interacción del dominio ligasa (LIGDom), presente en los mutantes de *BsuLigD* utilizados anteriormente.

Al analizar las relaciones entre la inserción de UMP respecto a dTMP se puede observar que, si bien la relación de inserción UMP/dTMP es parecida a la mostrada por la *BsuLigD*, dicha relación aumenta 5 y 2 veces en los mutante S768Y y S768A (ver Tabla 3). El aumento respecto a la discriminación en la inserción de dTMP es debido fundamentalmente a una disminución de la k_{cat} de inserción de dTMP en el caso de S768Y y un aumento de la k_{cat} en la inserción de UMP en el caso de S768A, de manera semejante a lo que se muestra en la Figura 9. En el caso del mutante S768Y también muestra un aumento en la K_m tanto por UTP como por dTTP (ver Tabla 3), lo que podría estar reflejando el papel de la Ser⁷⁶⁸ en la interacción tanto con el O2' (en ribonucleótidos) y el O3' de la ribosa de los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos.

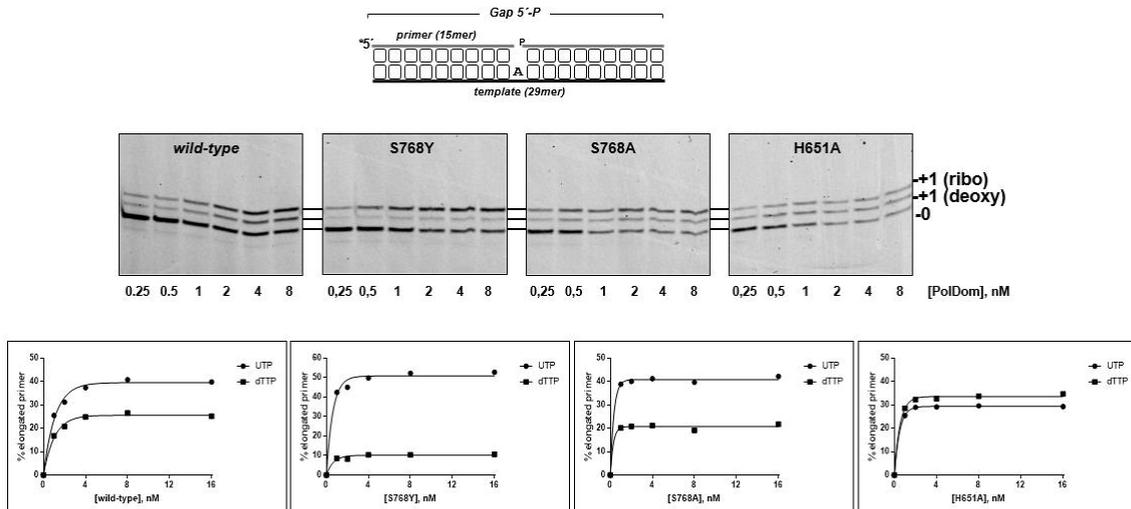


Figura 9. Inserción simultánea de UMP/dTMP por la proteína wild-type y mutantes de *PaePolDom*. La estructura del híbrido de DNA empleado se muestra en la parte superior. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos. Se emplearon 10 nM de las cuatro proteínas, 5 nM del híbrido de DNA, y 50 nM nucleótidos (salvo para el H651A, con el que se emplearon 500 nM). El ensayo de inserción de nucleótidos, en el centro de la figura, muestra cómo se insertan simultáneamente los nucleótidos UMP y dTMP al añadir ambos. Las representaciones gráficas de la inserción de nucleótidos aparecen en la parte inferior, mostrando en cada caso la concentración de la proteína indicada frente al porcentaje de DNA elongado por cada nucleótido respecto al DNA total.

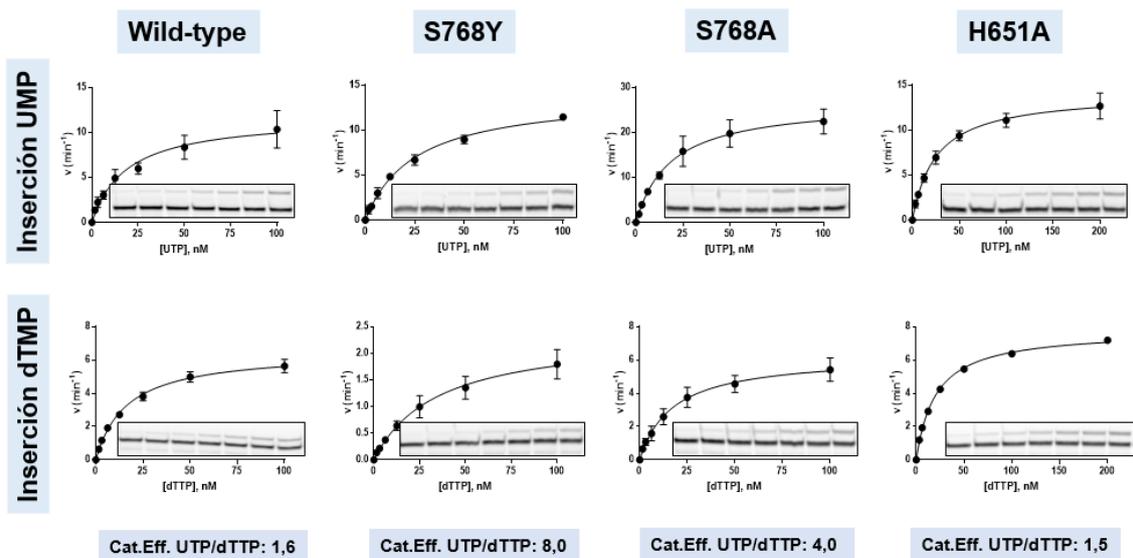


Figura 10. Incorporación de UMP/dTMP en GapA por la proteína wild-type y mutantes de *PaePolDom*. Los ensayos se realizaron en condiciones de estado estacionario, como se indica en Materiales y Métodos. Se muestran los valores de turnover (v , min^{-1}) de la incorporación de los nucleótidos (UMP o dTMP) frente a la concentración de dicho nucleótido. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten como se describe en Materiales y Métodos. Los valores de K_m , k_{cat} y la eficiencia catalítica (Cat. Eff. = k_{cat} / K_m) vienen representados en la tabla 3. La relación entre las eficiencias catalíticas de inserción de UMP respecto a dTTP de cada proteína vienen indicadas en la parte inferior.

Tabla 3. Resultados de las cinéticas de inserción de nucleótido en estado estacionario de la proteína wild-type y mutantes de *PaePolDom* en el *gapA*. Los resultados son medias de tres experimentos independientes \pm el error estándar.

Proteína	Nucleótido utu	k_{cat} (min^{-1})	K_m (nM)	Eficiencia catalítica (k_{cat} / K_m) ($\text{nM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
wt	UTP	$11,8 \pm 0,84$	$18,8 \pm 3,74$	0,628
	dTTP	$6,52 \pm 0,17$	$16,3 \pm 1,24$	0,400
S768Y	UTP	$14,0 \pm 0,45$	$25,3 \pm 2,10$	0,553
	dTTP	$2,38 \pm 0,18$	$34,8 \pm 6,13$	0,069
S768A	UTP	$26,9 \pm 1,43$	$18,5 \pm 2,78$	1,452
	dTTP	$6,27 \pm 0,32$	$17,3 \pm 2,56$	0,363
H651A	UTP	$14,1 \pm 0,43$	$25,3 \pm 2,40$	0,558
	dTTP	$7,78 \pm 0,082$	$20,3 \pm 0,71$	0,382

Estos resultados de nuevo estarían indicando un papel de dicho residuo en la interacción con el azúcar del nucleótido entrante y en su correcta orientación respecto del metal y/o del extremo 3'-OH de la cadena iniciadora para que se pueda dar la correcta catálisis de inserción del nucleótido. Estos resultados también indican que existe gran similitud de la incorporación de nucleótido por parte del mutante en la His⁶⁵¹ respecto al *wild-type*, no observándose el aumento de eficiencia de inserción de dTMP respecto a UMP mostrado en el experimento de inserción simultánea (Figura 9). Esto nos lleva a plantear que el molde utilizado puede no ser realmente el adecuado para realizar los estudios de cinética y dar datos concretos de constantes cinéticas. Por ello, se realizaron estudios similares pero realizados sobre estructuras de iniciador/molde, de forma que la proteína no disponga de un grupo 5'-fosfato al que anclarse y se puedan observar mejor las eficiencias.

Ensayos de polimerización sobre estructura iniciador/molde

Se repitieron experimentos similares a los realizados con los híbridos de *gapped*-DNA, pero utilizando una estructura de DNA iniciador/molde (Sp1/Sp1c+18; esquematizado en la Figura 11), en la que no se dispone de un extremo 5'-P al que la proteína puede anclarse. Sobre esta estructura puede insertar varios nucleótidos de forma continuada. Inicialmente se evaluó la capacidad de las proteínas de insertar tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos con el tiempo (Figura 11, ver Materiales y Métodos). Como se muestra en dicha figura, tanto la proteína *wild-type* como los mutantes de la Ser⁷⁶⁸ tienen una mayor eficiencia de inserción de NMPs frente a dNMPs en todos los casos. Sin embargo, podemos observar que el mutante de la His⁶⁵¹ ha incorporado notablemente mejor los desoxirribonucleótidos que los ribonucleótidos.

Para determinar más adecuadamente las diferencias entre la *wild-type* y los mutantes en los distintos residuos se realizó otro experimento incubando la proteína, el DNA y concentraciones crecientes de nucleótidos (ver Materiales y Métodos y Figura 12). En este ensayo podemos cuantificar la inserción de nucleótido comparándola con la concentración de nucleótido que se añadió, y podemos ver que la más eficiente en la inserción de NMPs es la *wild-type*, siendo considerablemente mayor que la inserción de dNMPs. Los mutantes S768Y y S768A, aunque muestran defectos en la inserción general de los nucleótidos, muestran una inserción preferente de los NMPs. En el caso del mutante H651A, si bien es muy deficiente en la inserción de NMPs, muestra una actividad *wild-type* en la inserción de dNMPs, lo que de nuevo indicaría una interacción del residuo de la His⁶⁵¹ de *PaePolDom* (así como su homólogo His⁴²² de *BsuLigD*) con el O2' de la ribosa, y, por lo tanto, que dicho residuo estaría implicado en la inserción preferencial de NMPs frente a dNMPs.

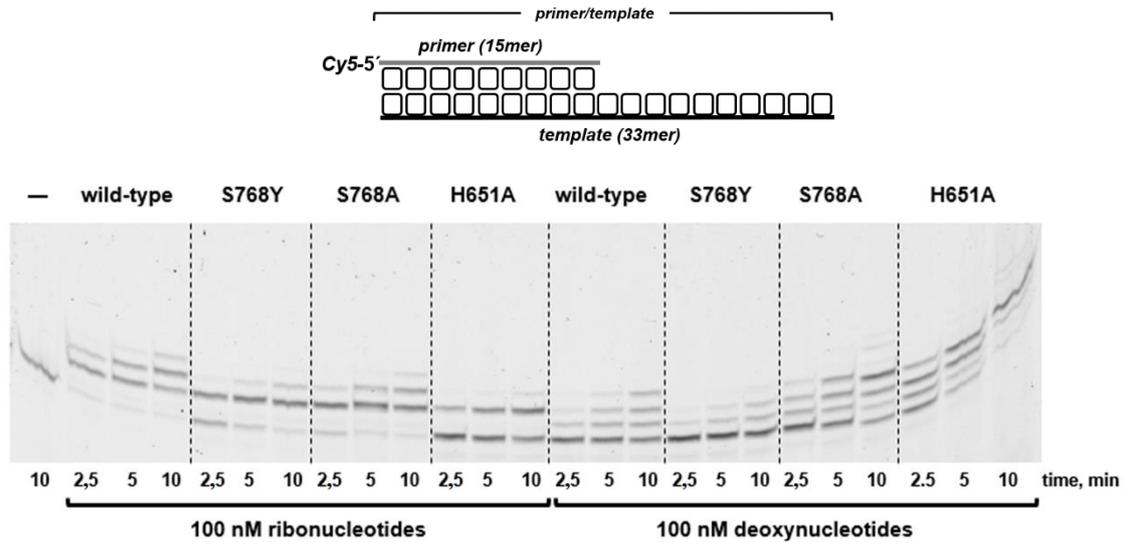


Figura 11. Ensayo de polimerización sobre el híbrido iniciador/molde *Sp1/Sp1c+18*. En la parte superior se muestra un esquema del híbrido empleado del tipo iniciador/molde. El ensayo se realizó como se indica en *Materiales y Métodos*, con 50 nM wild-type y 100 nM de los demás mutantes y en los tiempos indicados. En la parte izquierda se muestra la inserción NMPs, mientras que en la derecha se muestra la inserción de dNMPs.

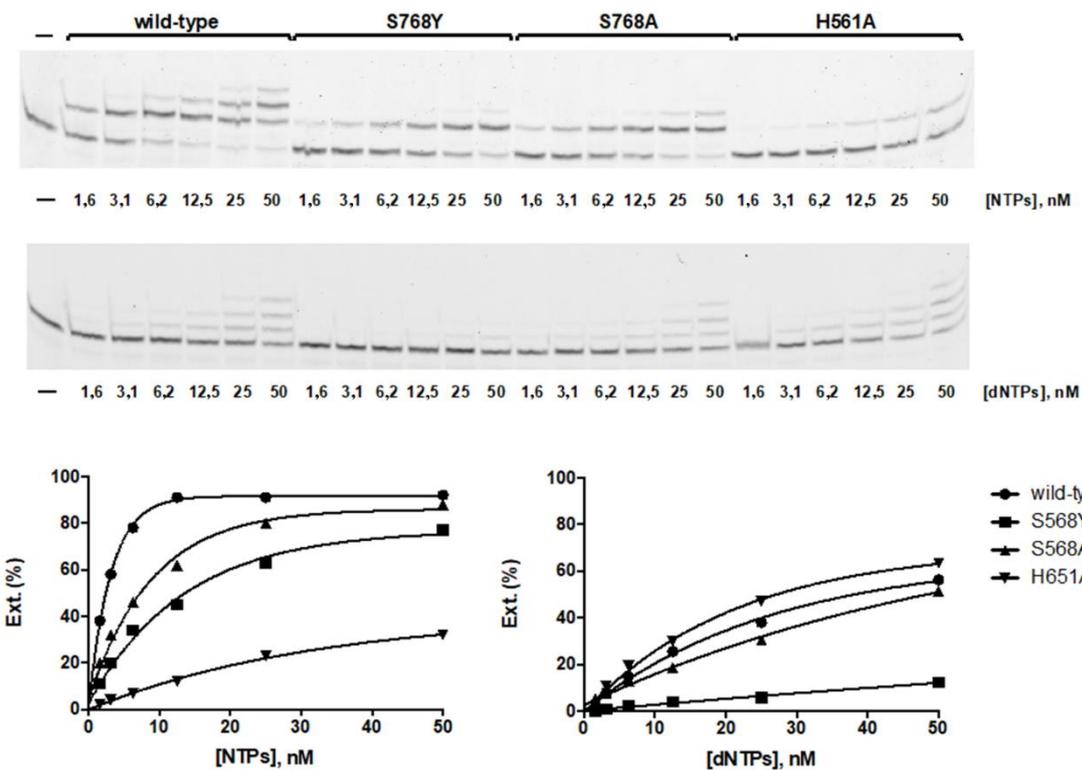


Figura 12. Análisis de polimerización sobre el híbrido iniciador/molde *Sp1/Sp1c+18*. Se muestra el ensayo de incorporación de nucleótidos en función de la concentración de NTPs (panel superior) y dNTPs (panel inferior) por *PaePolDom* y los distintos mutantes sobre *Sp1/Sp1c+18*. En la parte inferior, representación gráfica de los ensayos de incorporación de NMPs (izquierda) y dNMPs (derecha). Los valores mostrados son porcentajes de DNA elongado respecto al total de híbrido de DNA

Cinéticas de inserción de nucleótido sobre estructura iniciador/molde

Se realizaron cinéticas de inserción sobre el híbrido Sp1/Sp1c+14A para poder cuantificar las diferencias entre la inserción de UMP y de dTMP en un DNA sin extremo 5'-P (Figura 13) por *PaePolDom* y sus mutantes. Si observamos las relaciones en eficiencias catalíticas, vemos que la *wild-type* pasa de una relación de inserción de UMP/dTMP de 2 veces en el gapdA a una relación de 7 veces mejor incorporación de UMP en una estructura iniciador/molde sin un extremo 5'-P. Esto nos indica que el molde utilizado sí que ha influido a la hora de realizar los experimentos, y que al no tener tanta estabilidad la interacción DNA-nucleótido-proteína se observan mejor las diferencias. El mutante S768A muestra un comportamiento similar al de la proteína *wild-type*, pero la mutación con S768Y ha disminuido enormemente la eficiencia de incorporación de dTMP, lo que hace que la relación sea de 44 veces mejor incorporación de UMP frente a dTMP. Para el mutante en la His⁶⁵¹, en esta ocasión sí somos capaces de detectar un cambio respecto al enzima *wild-type*, ya que las eficiencias catalíticas de incorporación de ambos nucleótidos son muy similares. Esto nos confirma de nuevo la implicación de este nucleótido en la discriminación de los ribonucleótidos frente a los desoxirribonucleótidos.

Por otra parte, analizando los resultados que se muestran en la Tabla 4, los parámetros cinéticos del mutante S768A son bastante similares a los de la *wild-type*. Sin embargo, el mutante S768Y disminuye su eficiencia en incorporación de UMP por una disminución en la k_{cat} , pero su eficiencia de incorporación de dTMP disminuye 10 veces respecto a la *wild-type*, tanto por una brusca disminución de la k_{cat} como por un aumento del doble de la K_m . Esto indica la importancia funcional que en la inserción de nucleótidos tiene las interacciones establecidas por el residuo de Ser⁷⁶⁸ y su homólogo en *B. subtilis* Thr⁵³⁹ con el extremo O2' de los ribonucleótidos y además con el extremo O3' de los rNTPs y dNTPs, para su correcta incorporación al molde de DNA.

En el caso del mutante en la His⁶⁵¹, la eficiencia en la incorporación de UMP ha disminuido en torno a 10 veces respecto a la del *wild-type*, pero la de dTMP no ha sufrido tal cambio, sino que es sólo 2 veces inferior a la de la proteína *wild-type*. La disminución de la eficiencia catalítica de inserción de UMP se debe tanto a una disminución de la k_{cat} como a un aumento de la K_m . Esto concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos de polimerización (Figuras 11 y 12), donde podíamos observar un descenso en la afinidad por la incorporación de ribonucleótidos en general respecto a los demás mutantes.

Fidelidad de inserción de nucleótidos

Estudios previos realizados con *PaePolDom* pusieron de manifiesto la capacidad de esta polimerasa de llevar a cabo la inserción infiel de ribonucleótidos (Zhu y Shuman, 2005). Para determinar si los residuos objeto de este estudio pueden estar implicados en la fidelidad de incorporación de ribonucleótidos, pusimos a punto un ensayo en el que cada uno de los cuatro NTPs fue ensayado individualmente como sustrato para ser incorporado frente a las cuatro posibles bases molde (gapdA, gapdC, gapdG y gapdT, ver esquema en Figura 14) en presencia de Mn^{2+} (ver Materiales y Métodos). Este ensayo nos permitiría conocer a nivel cualitativo la fidelidad con la que la proteína *wild-type* incorpora el nucleótido complementario correcto (A:T, C:G, G:C y U:A) frente a las otras opciones de incorporación de nucleótido incorrectas.

El experimento se realizó en primer lugar con las proteínas de *BsuLigD* (Figura 14), se cuantificó y se compararon los porcentajes de extensión de los distintos nucleótidos respecto al correcto. Como se puede observar, la proteína *wild-type* (E184A), si bien incorpora preferentemente el nucleótido correcto, en ausencia de éste puede incorporar, aunque con una menor eficiencia, nucleótidos incorrectos, generando desapareamientos. En el caso de los mutantes se observó un notable aumento en la fidelidad de inserción de los nucleótidos, fundamentalmente en el caso del mutante H422A, en el que no se observó introducción de nucleótido incorrecto, a pesar del aumento de concentración de proteína y de tiempo.

Se decidió comparar los parámetros cinéticos de uno de los nucleótidos incorrectos incorporados, AMP frente a gapdA, frente a los del nucleótido correcto del mismo molde, UMP frente a gapdA. Esto se hizo mediante ensayos de estado estacionario con las distintas proteínas de *BsuLigD*, y los resultados, mostrados en la Figura 15 y la Tabla 5, nos indican de la misma manera que existe un aumento de la fidelidad con las mutaciones presentes en ambos residuos frente a la *wild-type*.

De la misma manera se ensayó la fidelidad de inserción de las proteínas de *PaePolDom* homólogas. Como se puede observar en la Figura 16, la capacidad de inserción de nucleótidos erróneos en el caso de la proteína *wild-type* y el mutante S768Y son similares, mientras que la fidelidad de inserción en el caso del mutante S768A y sobre todo en el mutante H651A es considerablemente mayor, como ocurre con los mutantes de *BsuLigD*.

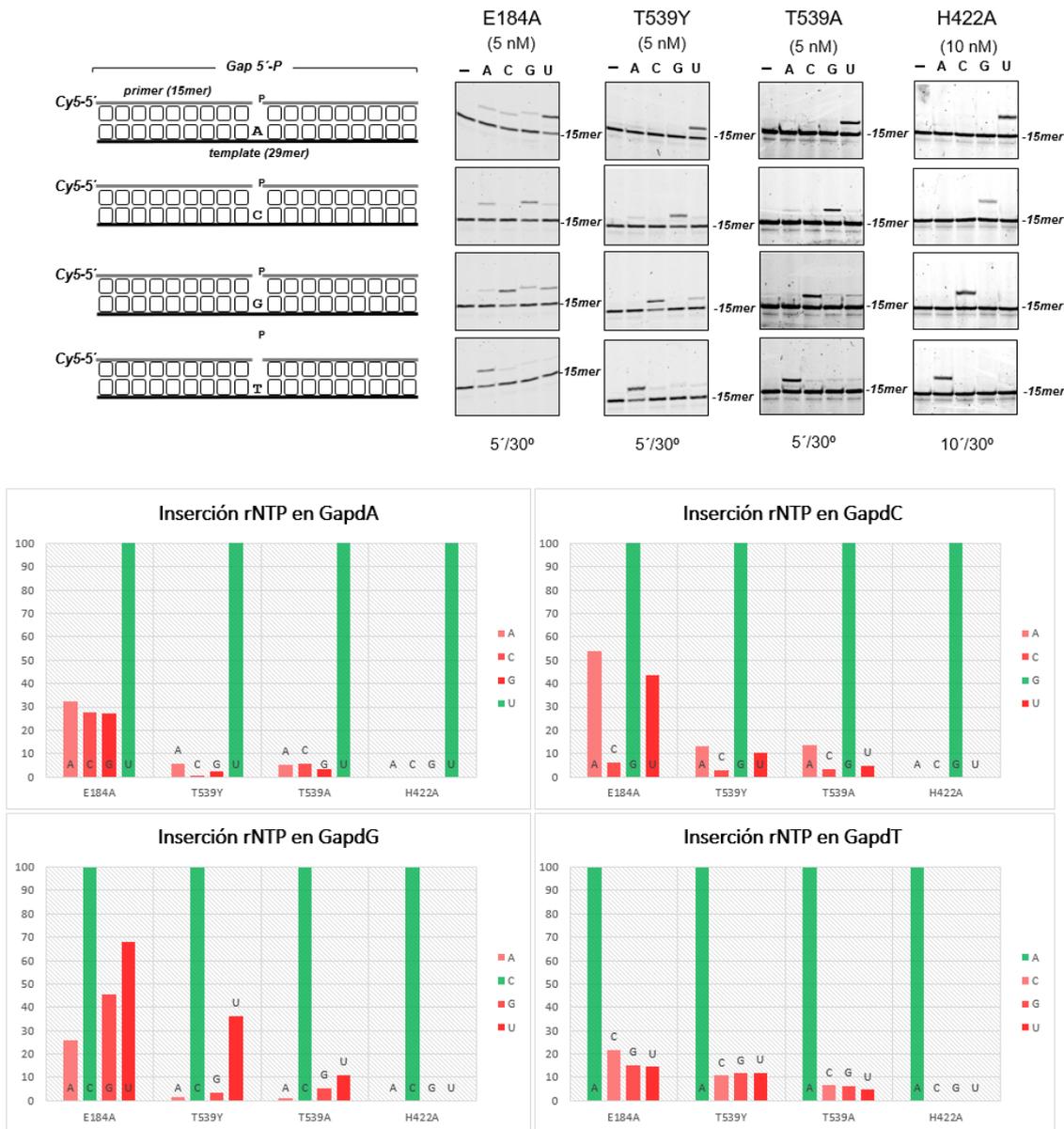


Figura 14. Ensayos de fidelidad. Se utilizaron las cuatro estructuras tipo gap de un único nucleótido con el extremo 5'-P mostradas en la parte izquierda de la figura y que diferían en la primera base del molde (de arriba abajo: GapdA, GapdC, GapdG, GapdT). El ensayo se realizó como está descrito en Materiales y Métodos, usando para E184A, T539Y y T539A (5 nM) 50 nM del sustrato indicado, y para H422A (10 nM) 100 nM del sustrato indicado. En la parte inferior aparece la representación gráfica de la inserción relativa normalizada de los diferentes nucleótidos en cada híbrido de gapped-DNA por parte de las proteínas indicadas. En cada caso está indicado en verde la inserción de nucleótido correcto y en distintos tonos de rojo la inserción de nucleótidos incorrectos, según el gapped-DNA utilizado.

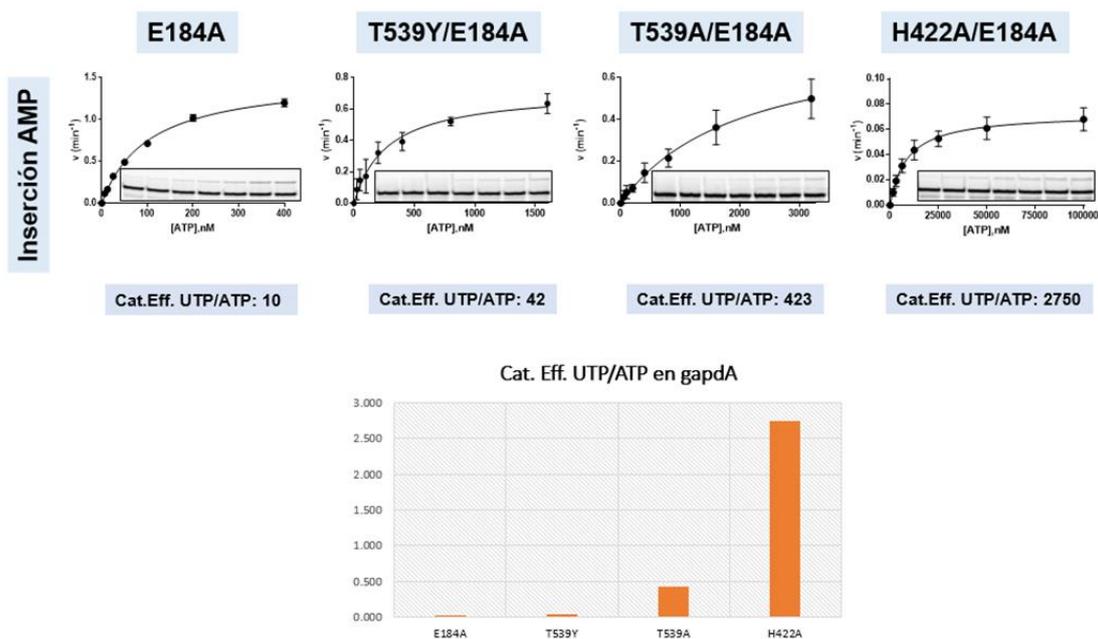


Figura 15. Cinéticas de inserción de AMP en GapdA por BsuLigD y sus mutantes. Los ensayos se realizaron en condiciones de estado estacionario, como se indica en Materiales y Métodos. Se muestran los valores de turnover (v , min^{-1}) de la incorporación de los nucleótidos (UMP o dTMP) frente a la concentración de dicho nucleótido. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten como se indica en Materiales y Métodos. Los valores de K_m , k_{cat} y la eficiencia catalítica ($\text{Cat. Eff.} = k_{cat} / K_m$) vienen representados en la Tabla 5. En la parte inferior de cada cinética viene dada la relación entre las eficiencias catalíticas de inserción de UMP respecto a AMP de cada proteína, y viene representada gráficamente en el panel inferior.

Tabla 5. Resultados de las cinéticas de inserción de nucleótido en estado estacionario de las proteínas de BsuLigD en un gapped-DNA (GapdA). Los resultados son medias de tres experimentos independientes \pm el error estándar.

Proteína	Nucleótido utilizado	k_{cat} (min^{-1})	K_m (nM)	Eficiencia catalítica (k_{cat} / K_m) ($\text{nM}^{-1} \text{min}^{-1}$)
E184A	ATP	$26,95 \pm 0,79$	$58,38 \pm 5,11$	0,462
T539Y	ATP	$14,75 \pm 0,38$	$55,47 \pm 3,54$	0,266
T539A	ATP	$22,63 \pm 1,46$	$46,02 \pm 9,48$	0,492
H422A	ATP	$2,86 \pm 0,08$	$89,01 \pm 6,42$	0,030

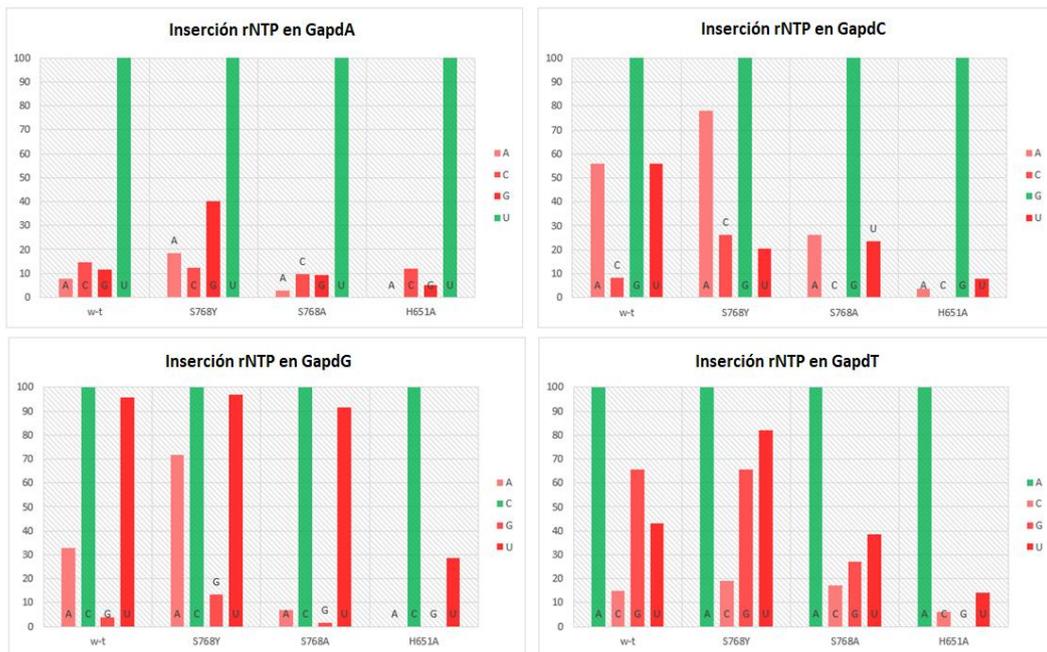
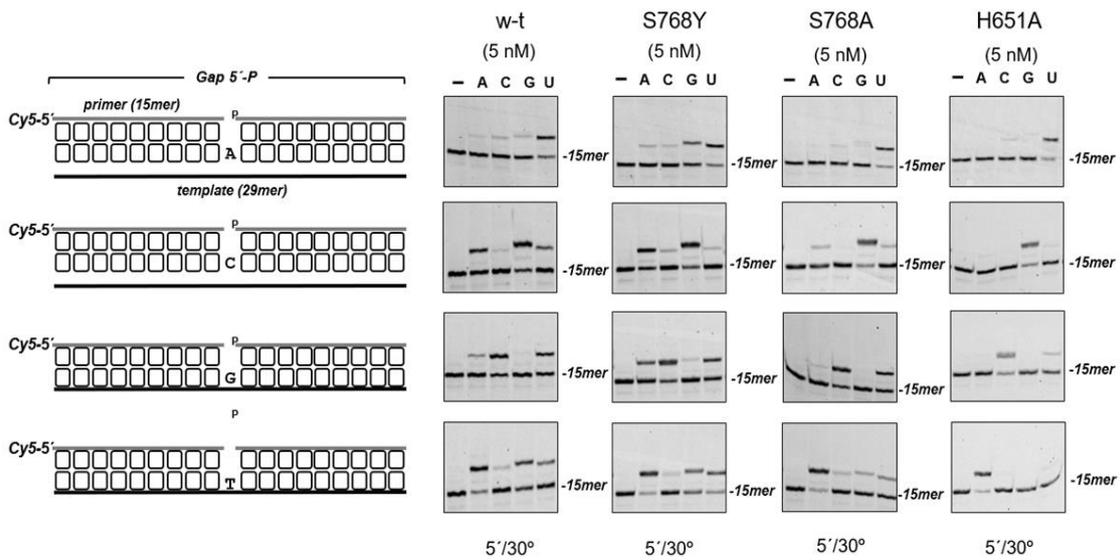


Figura 16. Ensayos de fidelidad por *PaePolDom*. Se utilizaron las cuatro estructuras tipo gap de un único nucleótido con el extremo 5'-P mostradas en la parte izquierda de la figura y que diferían en la primera base del molde (de arriba abajo: *GapdA*, *GapdC*, *GapdG*, *GapdT*). El ensayo se realizó como está descrito en *Materiales y Métodos*, usando 2nM proteína y 20nM rNTPs. En la parte inferior aparece la representación gráfica de la inserción relativa normalizada de los diferentes nucleótidos en cada híbrido de gapped-DNA por parte de las proteínas indicadas. En cada caso está indicado en verde la inserción de nucleótido correcto y en distintos tonos de rojo la inserción de nucleótidos incorrectos, según el gapped-DNA utilizado.

Ensayos de inserción de 8oxodG

Para observar la inserción del nucleótido 8oxoGMP en moldes de *gapped*-DNA se utilizaron los híbridos *gapdA* y *gapdC*, ya que sobre estos el enlace glicosídico puede adoptar su conformación *anty* y *syn*, respectivamente (Figura 17). Como se puede observar, el *PaePolDom* muestra la misma eficiencia de inserción de la conformación promutagénica (frente a A) y la canónica (frente a C). Al mismo tiempo se analizó la eficiencia de inserción de 8oxoGMP con la de los nucleótidos naturales correspondientes (UMP, en el caso del *gapdA* y GMP en el caso del *gapdC*). Como se puede observar en la Figura 18, *PaePolDom* no discrimina entre la inserción del nucleótido oxidado y el nucleótido natural.

Por otra parte, se quiso analizar si alguno de los residuos estudiados en este trabajo podría tener influencia en la inserción relativa de 8oxoGMP frente a dA o dC. Como se puede observar en la Figura 18, ninguna de las proteínas mutantes mostró preferencia en la inserción de 8oxoGMP frente a uno u otro nucleótido.

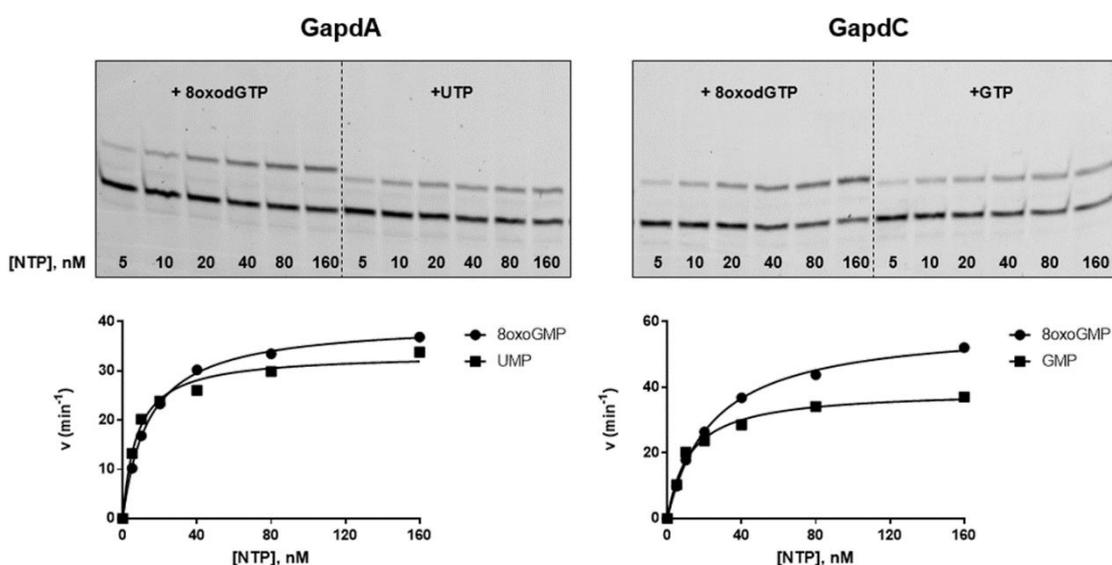


Figura 17. Inserción de 8oxodGMP y UMP en *gapdA* (izquierda) e inserción de 8oxodGMP y GMP en *gapdC* (derecha) por *PaePolDom*. Los experimentos se llevaron a cabo como se especifica en Materiales y Métodos, en presencia de 1nM proteína y 2 minutos de reacción. En la parte inferior se muestra la representación gráfica de la velocidad de inserción de cada tipo de nucleótido en cada *gapped*-DNA. Se muestran los valores de turnover (v , min^{-1}) de la incorporación de los nucleótidos frente a la concentración de dicho nucleótido. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten como se describe en Materiales y Métodos.

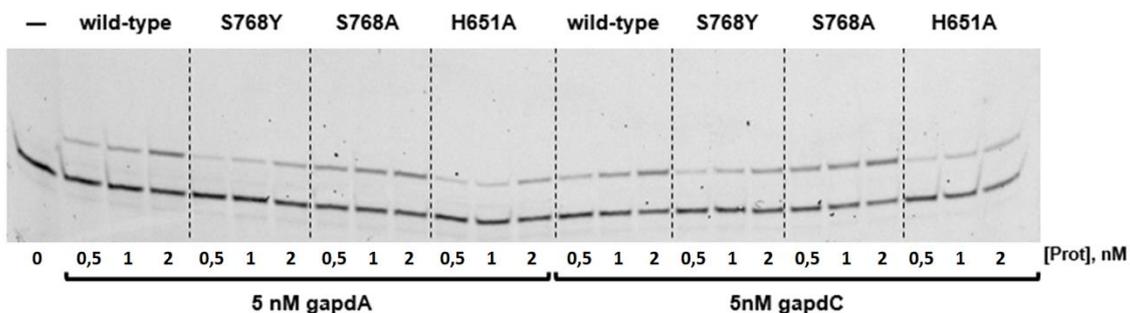


Figura 18. Inserción de 8oxodGMP en *gapdA* y *gapdC* por *PaePolDom* y mutantes. A la izquierda se ve la inserción de 8oxodG en *gapdA*, y a la derecha en *gapdC*. Se utilizaron concentraciones crecientes de las proteínas *PaePolDom*, S768Y, S768A y H651A, marcadas en la parte inferior.

Discusión

Tras la aparición de lesiones en el DNA que pueden causar roturas de doble cadena (DSBs), las células suelen activar maquinarias para su reparación, como la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Debido a que en la NHEJ la unión de los extremos es directa, no se requiere la presencia de una copia adicional de DNA que actúe como molde (Lieber, 1999), apareciendo en muchas bacterias que pasan parte de su ciclo vital en estado estacionario, como *Bacillus subtilis*, o en eucariotas en fase G2 (Pitcher *et al.*, 2007). La Ligasa D es una de las principales enzimas bacterianas implicadas en la reparación por NHEJ. Está descrito que el dominio polimerasa de proteína, presente en microorganismos como *B. subtilis*, *M. tuberculosis* o *P. aeruginosa*, es capaz de incorporar de manera más eficiente ribonucleótidos frente a desoxirribonucleótidos (Zhu y Shuman, 2005) y hemos estudiado a lo largo de este trabajo dos residuos altamente conservados y que interaccionan con la ribosa del nucleótido entrante. Para estudiar dicha incorporación diferencial de nucleótidos se estudiaron los mutantes en los residuos Thr⁵³⁹ y His⁴²² de *BsuLigD*, y posteriormente se obtuvieron mutantes en el *PaePolDom* de *P. aeruginosa* en los residuos homólogos, Ser⁷⁶⁸ y His⁶⁵¹, respectivamente.

Se realizaron experimentos de inserción simultánea de nucleótidos en moléculas de DNA con un *gap*, y se observó que, al introducir ambos, en las proteínas *wild-type* existe una mayor incorporación de ribonucleótidos frente a desoxirribonucleótidos (Figura 6, Figura 7 y Figura 9), como ya se había descrito previamente (Della *et al.*, 2004; de Vega, 2013; Zhu y Shuman, 2005). Al realizar ese experimento con sus respectivos mutantes, lo que se observaron fueron variaciones del patrón de incorporación de nucleótidos, sobre todo en el mutante de la His, ya que en ambos casos la proteína mutante ha perdido la capacidad de utilizar preferentemente ribonucleótidos. Los experimentos posteriores nos llevaron al análisis de los parámetros cinéticos de incorporación de nucleótidos frente a ribonucleótidos en condiciones de estado estacionario (O'Flaherty y Guengerich, 2014), tanto en proteínas de *BsuLigD* como en las de *PaePolDom*. Los resultados nos mostraron la diferencia entre la incorporación de rNMTPs y la incorporación de dNMPs en un *gapped*-DNA. Al igual que en el caso de las proteínas *wild-type*, los mutantes de la Thr⁵³⁹ de *BsuLigD* y de la Ser⁷⁶⁸ de *PaePolDom* mostraron una inserción preferente de ribonucleótidos, siendo de hecho incluso mayor en los mutantes T539Y de *BsuLigD* y S768Y de *PaePolDom*. Este aumento en la discriminación contra la inserción de dNMPs, fue debido fundamentalmente a un aumento de la *K_m* sobre todo en el caso de los dNMPs y, en el caso del mutante S768Y de *PaePolDom* también a una disminución de la *k_{cat}*. En el caso de los mutantes T539A y S768A, la inserción preferente de ribonucleótidos fue debido a un aumento de la *k_{cat}* durante la inserción de NMPs y a un aumento de la *K_m* en la inserción de dNMPs, respectivamente. Sin embargo, la comparación de los experimentos de inserción simultánea (ensayos *single-turnover*, en las que hay un exceso de proteína respecto de DNA, y por lo tanto todas las moléculas de sustrato se encuentran unidas por la proteína en el momento de comenzar la reacción) muestran cierta disparidad respecto a los datos cinéticos obtenidos con los sustratos tipo *gap*, especialmente en el caso de los mutantes en la His. Si bien en los ensayos de *single-turnover* se apreciaba una utilización preferente de los dNMPs, los datos cinéticos obtenidos en estado estacionario no revelaban diferencias en la ratio de inserción de nucleótidos respecto al enzima *wild-type*. La principal diferencia entre los experimentos *single turnover* y estado estacionario se encuentra en la relación enzima/DNA, siendo en el primer caso muy alta y en el segundo muy baja, y en este último caso la detección de actividad depende de multiples

asociaciones/disociaciones de la proteína a diferentes moléculas de DNA. Podría estar ocurriendo que la cinética de disociación del complejo proteína/DNA en estado estacionario fuera un paso limitante de la reacción que enmascarara las verdaderas diferencias entre las proteínas *wild-type* y mutantes. Estudios previos han demostrado que el PolDom de las LigDs se une de manera específica a un extremo 5'-P en una estructura tipo gap para estabilizar el complejo (Zhu y Shuman, 2004; Brisset et al., 2007; 2011; de Vega et al., 2013). Por este motivo se decidió analizar el comportamiento de los mutantes en un sustrato tipo iniciador/molde en el que la estabilidad del complejo enzima/DNA es menor debido a la ausencia de un extremo 5'-P. Los experimentos de polimerización realizados sobre un sustrato tipo iniciador/molde mostraban: 1) la utilización preferente de ribonucleótidos por parte de la proteína *wild-type* y los mutantes S768A y S768Y; 2) que los mutantes en la Ser768, fundamentalmente el S768Y, muestran en general una disminución en la eficiencia de la inserción de nucleótidos; 3) que si bien el mutante H651A muestra una eficiencia en la inserción de dNMPs similar a la del enzima *wild-type*, es muy defectuoso en la inserción de ribonucleótidos. Los parámetros cinéticos en condiciones de estado estacionario sobre este sustrato mostraron cómo la ratio de inserción de NMPs/dNMPs bajo de 7 en el caso de la enzima *wild-type* a 1 en el caso del mutante H651A. Estos resultados hacen patente el papel clave de este residuo que, a través de la interacción con el grupo O2' de la ribosa del ribonucleótido entrante, permite la utilización preferente de NTPs. La eliminación del grupo -OH de la Ser768 en el mutante S768A no tuvo un efecto sustancial en la inserción general de nucleótidos ni en la ratio NMPs/dNMPs, sugiriendo que dicha interacción con los grupos O2' y O3' no contribuye sustancialmente a la interacción con el nucleótido ni a la discriminación de los dNTPs. Es interesante el hecho de que la sustitución de la cadena lateral de la Ser768 por una más voluminosa en el mutante S768Y no disminuya de manera significativa la capacidad de inserción de ribonucleótidos, pero sí la de dNMPs. Probablemente en el primer caso, el grupo OH- de la Tyr pueda establecer las interacciones adecuadas con el grupo O2' y O3', mientras que la ausencia de un grupo O2' en los dNTPs provoquen una orientación inadecuada de la cadena lateral de la Tyr que impida establecer las interacciones con el grupo O3'.

Por otro lado, se realizaron experimentos para dilucidar el papel de estos residuos en la fidelidad de la proteína a la hora de incorporar nucleótidos correctos o incorrectos. Los resultados nos indican que los mutantes, fundamentalmente los mutantes de la His, muestran una fidelidad de inserción de nucleótido mayor que la correspondiente enzima *wild-type*. Esto podría tener un sentido evolutivo, al tener en cuenta que estas proteínas se encuentran actuando en condiciones de estrés celular en las que están expuestas a agentes genotóxicos (Pitcher *et al.*, 2007b), por lo que aumentar la promiscuidad y disminuir la fidelidad podría bien ser un mecanismo de resistencia a la baja disponibilidad de dNTPs en el *pool* en casos de quiescencia o de fase estacionaria (Shuman y Glickman, 2008; Pitcher *et al.*, 2007b), y le aportarían flexibilidad para favorecer la reacción de NHEJ. Sin embargo, estos residuos se encuentran interactuando con la ribosa, y en la cristalografía no se ha observado interacción con la base nitrogenada, por lo que estos resultados pueden deberse a una disminución en las eficiencias catalíticas. Por otro lado, se conoce que la LigD tiene mayor fidelidad cuando utiliza dNTPs que rNTPs (Yakovleva y Shuman, 2006), por lo que sería interesante poder realizar estos experimentos con dNTPs, para saber si los mutantes actuarían de manera similar con estos nucleótidos.

Por último, se observó la capacidad de estas proteínas de insertar el nucleótido 8oxoGMP en moldes de DNA. Este nucleótido es capaz de adoptar bien la conformación *anti* o bien la conformación *syn*. Según qué conformación posea, podrá aparearse con dC o con dA, respectivamente (Kouchakdjian *et al.*, 1991; Oda *et al.*, 1991), por lo que es un nucleótido promutagénico presente en el *pool* de nucleótidos en situaciones de oxidación. Los valores de incorporación de 8oxoGMP no varían demasiado con los distintos mutantes, por lo que estos residuos parecen no estar implicados ni en la estabilización de una forma u otra ni en la discriminación por el contacto con este nucleótido por el 8O' de su base nitrogenada. Sin embargo, analizando la incorporación de 8oxoGMP por *PaePolDom*, llama la atención la gran facilidad de incorporación de este nucleótido, ya que se incorpora incluso mejor que el NTP normal (Figura 18). Esto podría suponer una ventaja por el hecho de actuar polimerizando durante la NHEJ para reparar el DNA, pero supondría la adición de mutaciones al DNA. No obstante, habría que realizar estudios posteriores para analizar si las demás actividades tendrían efecto sobre esta incorporación, ya que tras la polimerización debe actuar la actividad de ligación. Podría ocurrir que la presencia en general de un 8oxoGMP en el extremo 3' de la cadena iniciadora no se ligara eficientemente al extremo 5'-P, lo que posibilitaría que o bien nucleasas celulares, o la propia actividad nucleolítica del dominio fosfoesterasa eliminaran el 8oxoGMP incorporado antes de la ligación, favoreciendo un nuevo ciclo de inserción del nucleótido natural. De la misma manera, la actividad ligasa de estas enzimas podría discriminar específicamente contra una de las conformaciones *anti* o *syn* del enlace glicosídico. Todo esto haría en el primer caso que la eficiencia de inserción estable de 8oxoGMP fuera realmente menor que la de los NTPs naturales, o bien en el segundo caso que sólo una de las conformaciones de 8oxoGMP pudiera permanecer tras la reacción de NHEJ.

Conclusiones

- La interacción del residuo Thr⁵³⁹ de *BsuLigD* y su homólogo Ser⁷⁶⁸ de *PaePolDom* con los O2' y O3' de la ribosa tienen un papel secundario en la estabilización del nucleótido entrante.
- El residuo Thr⁵³⁹ de *BsuLigD* y su homólogo Ser⁷⁶⁸ de *PaePolDom* no determinan la inserción preferente de ribonucleótidos observada en este tipo de proteínas.
- El residuo His⁴²² de *BsuLigD* y su homólogo His⁶⁵¹ de *PaePolDom*, a través de su interacción con el O2' de la ribosa tiene un papel central en la inserción preferente de ribonucleótidos frente a desoxirribonucleótidos.
- Las estructuras de *gapped*-DNA no han resultado adecuadas para la realización de cinéticas de inserción de nucleótido en estado estacionado, sin embargo, sí se realizaron correctamente con estructura iniciador/molde
- Los mutantes presentaron una fidelidad mayor que la *wild-type*, y podría considerarse su papel en la flexibilidad de introducción de nucleótidos.
- El *PaePolDom* muestra una eficiencia de inserción del nucleótido 8oxoGMP similar a la de un nucleótido natural, no discriminando entre la conformación no mutagénica (frente a dC) y la promutagénica (frente a dA)
- Los residuos analizados no tienen un papel en la inserción de 8oxoG.

Bibliografía

- Bowater, R., & Doherty, A. J. (2006). Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet.*, 2(2), e8.
- Brissett, N. C., Pitcher, R. S., Juarez, R., Picher, A. J., Green, A. J., Dafforn, T. R., Fox, G. C., Blanco, L. & Doherty, A. J. (2007). Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science*, 318(5849), 456-459.
- Brissett, N. C., Martin, M. J., Pitcher, R. S., Bianchi, J., Juarez, R., Green, A. J., Fox, G. C., Blanco, L. & Doherty, A. J. (2011). Structure of a preternary complex involving a prokaryotic NHEJ DNA polymerase. *Mol. Cell*, 41(2), 221-231.
- Cline, S. D., & Hanawalt, P. C. (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage?. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4(5), 361.
- Della, M., Palmbo, P. L., Tseng, H. M., Tonkin, L. M., Daley, J. M., Topper, L. M., ... & Doherty, A. J. (2004). Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science*, 306(5696), 683-685.
- Fry, R. C., Begley, T. J., & Samson, L. D. (2005). Genome-wide responses to DNA-damaging agents. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 357-377.
- Shuman S, Glickman MS (2007) Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5, 852–861.
- Haber, J. E., & Debatisse, M. (2006). Gene amplification: yeast takes a turn. *Cell*, 125(7), 1237-1240.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366.
- Kragelund, B. B., Weterings, E., Hartmann-Petersen, R., & Keijzers, G. (2016). The Ku70/80 ring in Non-Homologous End-Joining: easy to slip on, hard to remove. *Front. Biosci.*, 21, 514-527.
- Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A. P., & Patel, D. J. (1991). NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG (syn). cntdot. dA (anti) alignment at lesion site. *Biochemistry*, 30(5), 1403-1412.
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Ann. Rev. Biochem.*, 79, 181-211.

- McAuley-Hecht, K. E., Leonard, G. A., Gibson, N. J., Thomson, J. B., Watson, W. P., Hunter, W. N., & Brown, T. (1994). Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs. *Biochemistry*, *33*(34), 10266-10270.
- Moeller, R., Stackebrandt, E., Reitz, G., Berger, T., Rettberg, P., Doherty, A. J., Horneck, G. & Nicholson, W. L. (2007). Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *J. Bacteriol.*, *189*(8), 3306-3311.
- Nakabeppu, Y. (2014). Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.*, *15*(7), 12543-12557.
- Oda, Y., Uesugi, S., Ikehara, M., Nishimura, S., Kawase, Y., Ishikawa, H., ... & Ohtsuka, E. (1991). NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res.*, *19*(7), 1407-1412.
- O'Flaherty, D. K., & Guengerich, F. P. (2014). Steady-State Kinetic Analysis of DNA Polymerase Single-Nucleotide Incorporation Products. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, *59*(1), 7-21.
- Pitcher, R. S., Brissett, N. C., & Doherty, A. J. (2007). 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., ... & Doherty, A. J. (2007). Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *J. Mol. Biol.*, *366*(2), 391-405
- de Vega, M. (2013). The minimal *Bacillus subtilis* nonhomologous end joining repair machinery. *PLoS one*, *8*(5), e64232.
- White, M. F., & Allers, T. (2018). DNA Repair in the Archaea—an emerging picture. *FEMS Microbiol. Rev.* *42*, 514-526.
- Yakovleva, L., & Shuman, S. (2006). Nucleotide misincorporation, 3'-mismatch extension, and responses to abasic sites and DNA adducts by the polymerase component of bacterial DNA ligase D. *J. Biol. Chem.* *281*, 25026-25040.
- Zhu, H., & Shuman, S. (2005). A primer-dependent polymerase function of *Pseudomonas aeruginosa* ATP-dependent DNA ligase (LigD). *J. Biol. Chem.*, *280*(1), 418-427.