



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD IRAPUATO**

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

“ADN polimerasas de organelos de plantas (POPs) capaces de replicar a través de ADN con daño: el caso de *Arabidopsis thaliana*”

Tesis que presenta

IBQ. Noé Baruch Torres

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA PLANTAS**

Director de tesis

Dr. Luis Gabriel Briebe de Castro

Irapuato, Guanajuato

Agosto de 2016

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica Estructural de la Unidad de Genómica Avanzada (UGA) del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato (UI), bajo la dirección del Dr. Luis Gabriel Briebe de Castro, Profesor Titular de la UGA y con asesoría de los Doctores Alfredo Cruz Ramírez y Alejandro Blanco Labra, Profesores Titulares de la UGA y del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACyT por la beca número 339466 otorgada para la realización de mis estudios de maestría en el programa Maestría en Ciencias en la especialidad de Biotecnología de Plantas en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, en el periodo comprendido entre septiembre de 2014 a agosto de 2016.

Agradezco al Dr. Luis Alfredo Cruz Ramírez y al MC. Alejandro Aragón Raygoza por facilitarme el gen de la ADN polimerasa organelar de *Marchantia polymorpha*.

Este trabajo fue financiado por el proyecto “P-222 Fondo Institucional 48/2016” y el proyecto P-291: 213915 otorgado al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro.

Agradezco al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación y por el apoyo en mi formación académica.

Agradezco a la I. A. Corina Elizabeth Díaz Quezada, auxiliar del Laboratorio de Bioquímica Estructural, por su asistencia y apoyo durante el desarrollo de este proyecto y al laboratorio de Bioquímica Estructural.

Agradezco Paola Libertad García Medel por su valioso apoyo en los experimentos de purificación proteínas

Agradezco el apoyo incondicional de mi familia que siempre me motivo para continuar mis estudios y dar lo mejor de mí.

Agradezco a mis compañeros y amigos de este Instituto por hacer más grata la estancia.

Índice general

Contenido	
Resumen.....	11
Abstract.....	12
Introducción.....	13
ADN polimerasas y la agrupación en familias.....	14
Diversidad estructural y mecanismos en común de las ADN polimerasas.....	19
1.3. ADN polimerasa en organelos.....	21
1.4. ADN polimerasas de organelos de plantas (POPs).....	22
II. Hipótesis.....	23
III. Objetivos.....	24
Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
IV. Materiales y Métodos.....	25
4.1 Caracterización <i>in silico</i> de las AtPOLs.....	25
4.1.2 Búsqueda de ortólogos y análisis filogenético.....	28
4.2 Obtención de las diversas mutantes en ambas AtPOLs.....	29
4.3 Expresión heteróloga y purificación de las mutantes y deleciones de cada AtPOL.....	32
4.4 Ensayo de polimerización y 3'-5' exonucleasa <i>in vitro</i>	34
4.5 Replicación a través de ADN dañado.....	37
4.6 Ensayo de desplazamiento de hebra.....	40
4.7 Condiciones de cristalización de la mutante con mejor rendimiento.....	41
V. Resultados.....	44
5.1 Caracterización <i>in silico</i> de las AtPOLs.....	44
5.1.2 Identificación de pre-secuencias organelares y regiones desordenadas en las AtPOLs.....	44
5.2 Obtención de mutantes en ambas AtPOLs por la técnica Q5 Site-Directed Mutagenesis y PCR con oligos delecionales.....	48
5.3 Expresión heteróloga y purificación proteínas de cada AtPOL en la cepa BL21-PKJE7.....	54
5.4 Las ADN polimerasas organelares de <i>A. thaliana</i> son ADN polimerasas funcionales y con capacidad exonucleolítica.....	57
5.5 Síntesis de translesión de ADN por polimerasas organelares de <i>A. thaliana</i>	59

5.6 ADN polimerasa organelares de <i>A. thaliana</i> capaces de hacer desplazamiento de hebra.....	63
5.7 condiciones de cristalización de la mutante AtPOLIB-KF exo^-	64
VI. Discusión	66
VII. Conclusiones.....	69
VIII. Perspectivas.....	70
IX. Referencia bibliográfica	71
X. Apéndice	74

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. DNA Polimerasas en <i>Escherichia coli</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> . -----	16
Figura 1. ADN polimerasas involucradas en diversas funciones de replicación, reparación y síntesis a través de ADN dañado. -----	17
Figura 2. Estructura de ADN polimerasas. -----	18
Figura 3. Modelo de la ADN polimerasa similar a una mano derecha.-----	19
Figura 4. Mecanismo de reacción para una cadena de ADN-----	20
Tabla 2. Localización dual organelar de las AtPOLs-----	25
Figura 5. Alineamiento de la región N-terminal de AtPOLIA y AtPOLIB.-----	26
Tabla 4. Oligonucleótidos usados para hacer las mutantes de la región desordenada-----	27
Tabla 5. Oligonucleótidos usados para las mutantes del sitio exonucleasa-----	28
Figura 6. Modelo comparativo de las AtPOLs y sitios conservados con ADN polimerasas típicas-----	45
Figura 7. Alineamiento en ClustalW de POPs y la ADN polimerasa canónica de la familia A. -----	46
Figura 8. Análisis filogenético del dominio polimerasa de las POPs.-----	47
Figura 9. PCR de las mutantes A1 y B1. -----	48
Figura 10. Digestión de los plásmidos de las mutantes A1 y B1. -----	49
Figura 11. PCR de las mutantes KF en las AtPOLs. -----	50
Figura 12. Digestión de los plásmidos de las mutantes AtPOLIA-KF y AtPOLIB-KF. -----	51
Figura 13. PCR de las mutantes KF-Exo ⁻ en las AtPOLs. -----	52
Figura 14. Digestión de los plásmidos de las mutantes AtPOLIA-KF exo ⁻ y AtPOLIB-KF exo ⁻ . -----	53
Figura 15. Purificación por afinidad a metales inmovilizados níquel de las mutantes AtPOLs. -----	54
Figura 16. Purificación por afinidad a metales inmovilizados níquel de las mutantes AtPOLs KF. -----	55
Figura 17. Purificación por intercambio iónico de las mutantes de AtPOLs. -----	56

Figura 18. Ensayo exonucleasa y polimerización de las mutantes AtPOLs. -----	58
Figura 19. Síntesis de translesión de ADN con sitio abásico por mutantes de AtPOLs. -----	59
Figura 20. Síntesis de translesión de ADN través del aducto timin glicol 5R-6S por AtPOLs. -----	61
Figura 21. Síntesis de translesión de ADN través del aducto timin glicol 5S-6R por AtPOLs. -----	62
Figura 22. Capacidad de desplazamiento de hebra por AtPOLs. -----	63
Figura 23. Ensayo cristalográfico de la mutante AtPOLIB-KF exo^{-} . -----	65

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
POPs	ADN polimerasa de organelos de plantas y protistas
AtPols	<i>Arabidopsis thaliana</i> ADN polimerasas
AtPolIA	<i>Arabidopsis thaliana</i> Polimerasa IA
AtPolIB	<i>Arabidopsis thaliana</i> Polimerasa IB
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PDB	Banco de datos de proteínas (por sus siglas en inglés)
LB	Luria-Bertani
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético (por sus siglas en inglés)
TAE	Tris-base, Acetato y EDTA
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (por sus siglas en inglés)
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo (por sus siglas en inglés)
VC	Volumen de columna
SDS	Dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
DTT	Ditiotreitol
ADNdc	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
nt	Nucleótidos

BSA

Sero albúmina bovina (por sus siglas en inglés)

Resumen

La información genética de todo ser vivo se encuentra en sus ácidos nucleicos es decir en su genoma, cuya preservación es crucial para el desarrollo y descendencia. Los organismos eucariontes albergan 2 ó 3 genomas: el nuclear, el mitocondrial y el cloroplastídico, en el caso de las plantas y algunos protistas. Sobre el proceso de replicación de los genomas de organelos, se conoce que el genoma mitocondrial en *H. sapiens* y *S. cerevisiae* es sintetizado en su totalidad por la ADN polimerasa γ , una polimerasas perteneciente a la familia A.

En las plantas no se ha encontrado un homólogo de la ADN polimerasa γ , en su lugar se encontró un par de ADN polimerasas codificadas en el núcleo y con señalización dual a cloroplasto y mitocondria, miembros de la familia A, éstas ADN polimerasas se han clasificado en una nueva subfamilia denominada ADN Polimerasas organelares de plantas y protistas (POPs). Existen evidencias que dichas POPs pueden estar involucradas en la replicación del genoma cloroplastídico y mitocondrial, ya que cuando se obtenían plantas mutantes de Arabidopsis para alguna de esta AtPols, las plantas presentaban amarillamiento en sus hojas, baja estatura y una reducción en la cantidad del genoma mitocondrial y cloroplastídico. También sería algo razonable pensar que éstas AtPols puedan ser capaces de replicar a través de ADN dañado, ya que el genoma en estos organelos está expuesto a un estrés oxidativo y exposición a alta radiación UV.

En este trabajo se evaluó bioquímicamente a las POPs de *A. thaliana* (AtPOLIA y AtPOLIB), haciendo ensayos de replicación *in vitro* para caracterizar las funciones canónicas de polimerización y de actividad exonucleolítica. La idea principal de este proyecto fue determinar si estas POPs eran capaces de replicar a través de daños de timin glicoles y sitios abásicos, y también si podían hacer desplazamiento de hebra. Los resultados muestran que éstas POPs presentan las actividades canónicas y mostraron capacidad para hacer replicación a través de los principales daños que ocurren en el cloroplasto y la mitocondria. Finalmente se realizaron ensayos de cristalización de la mutante AtPOLIB-KF exo^- .

Abstract

The genetic information of all organisms is located in the genome, whose preservation is important for development. Eukaryotic organisms have 2 or 3 genomes: nuclear, mitochondrial and plastidial in the case of plants and some protists. The pathway organelle genome replicates are only known that the mitochondrial genome in *H. sapiens* and *S. cerevisiae* is synthesized entirely by DNA polymerase γ , member of family A.

In plants not found a homologous DNA polymerase γ , instead a pair of DNA polymerases encoded in the nuclear genome and that are dual-targeted to mitochondria and plastids, member of family A, these have been classified into subfamily Plant organelar DNA Polymerases (POP). There is evidence that these POPs may be involved in the replication of plastidial and mitochondrial genome as when mutant *Arabidopsis* plants were obtained for any of this AtPols, plants showed yellowing in their leaves, a reduction in the amount of the mitochondrial genome and chloroplast, and were shorter. Also it would be reasonable to think that these AtPols may be able to replicate through damaged DNA because the genome in these organelles is exposed to oxidative stress and UV exposure to high radiation.

In this work was evaluated biochemically *A. thaliana* POPs (AtPOLIA and AtPOLIB), making in vitro replication assays for characterizing the canonical functions exonucleolytic activity and polymerization. The main idea of this project was to determine whether these POPs are capable of replicating through thymine glycols damage and abasic sites, and also if they could make strand displacement. The results show that these POPs have canonical activities and the ability to replicate through major damage occurring in the chloroplast and mitochondria. Finally, the crystallization assays for AtPOLIB-KF exo^- mutant were tried.

Introducción

La información genética principal, que define las características de todo ser vivo se encuentra conformando el genoma nuclear y su duplicación correcta es crucial para el desarrollo del organismo y, para mantener la herencia genética en las siguientes generaciones las ADN polimerasas son las encargadas de preservar esta información. Además del núcleo, los cloroplastos y la mitocondria son organelos eucariotas que tienen su propio genoma. El origen de estos genomas es explicado por la teoría endosimbiótica, la cual dice que el cloroplasto y la mitocondria surgieron de una cianobacteria y una α -proteobacteria respectivamente (Moriyama et al., 2013). La mitocondria es el organelo eucarionte donde se lleva a cabo el proceso de la respiración celular y la obtención de ATP necesarios para las actividades de la célula y el cloroplasto es el organelo donde toma lugar la fotosíntesis para obtener los azúcares.

Las maquinarias de replicación organelares más estudiados son los de la mitocondria de humano y levadura. Todos los componentes en ambas maquinarias tienen un origen evolutivo semejante a los del bacteriófago T7 (Shutt et al., 2006). La ADN polimerasa mitocondrial de humanos y de levadura, derivan del bacteriófago T7, mientras que las dos ADN polimerasas organelares en *Arabidopsis thaliana* como en otras plantas y protistas son similares a las ADN polimerasas de bacteria (Moriyama et al., 2011).

El genoma de las plantas superiores codifica para once ADN polimerasas que incluye las ADN polimerasas replicativas: α , δ , y ϵ así como ADN polimerasas implicadas en la reparación tales como ζ , ν , Θ , λ , y η (García et al., 2007, Yokoi et al., 1997, Anderson et al., 2008, Furukawa et al., 2015, Inagaki et al., 2006, Takahashi et al., 2005). El mecanismo de reparación del ADN nuclear en plantas incluye al sistema de escisión de bases (BER por sus siglas en inglés), las vías de reparación por escisión de nucleótidos (NER por sus siglas en inglés) y las vías de reparación de doble cadena (DSBR, por sus siglas en inglés) se encuentran conservado en organismos modelo como humanos, la mosca, o la levadura

(Manova et al., 2015). En contraste con el estudio de la replicación y reparación del ADN nuclear en plantas, los mecanismos de replicación del ADN y la reparación en organelos en las plantas se encuentran menos estudiadas. Inclusive a la fecha aún no se sabe cuál es la ADN polimerasa encargada de replicar el genoma del cloroplasto y la mitocondria.

ADN polimerasas y la agrupación en familias

La primera evidencia clara de una enzima que era capaz de sintetizar ADN *in vitro* fue en 1958 cuando A. Korberg y colaboradores descubrieron la ADN polimerasa I de *E. coli*, hallazgo por el cual se haría merecedor del premio Nobel un año más tarde (Lehman et al., 1958). Por estos procesos se duplican los genomas y mantienen la información para poder transmitir fielmente la herencia hacia las nuevas generaciones (Bebenek et al., 2004). Además de la actividad de polimerización, las ADN polimerasas pueden presentar funciones accesorias, como las de 3'-5' exonucleasa y 5'-3' exonucleasa.

El estudio de las ADN polimerasas empezó a tener un auge en cuanto a estudios de estructura y función en los últimos 10 años, actualmente se sabe más acerca de ellas, por ejemplo, se conocen cinco polimerasas en *E. coli*, nueve en *Saccharomyces cerevisiae*, dieciséis en humanos y al menos once en plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* (Tabla 1). Las ADN polimerasas se clasifican de acuerdo a las diferencias en su estructura primaria, las subunidades que la conforman o la capacidad catalítica. A la fecha existen cinco distintas familias: A, B, C, X e Y (Tabla 1) que incluyen DNA polimerasas capaces de replicar, reparar y realizar síntesis translesión entre otras funciones (Figura 1).

La familia A, incluye a las ADN polimerasas replicativas y reparativas, siendo la polimerasa I de *E. coli* la ADN polimerasa canónica de este grupo. Además de ésta se incluyen la T7 ADN polimerasa Pol γ , Pol ν y Pol θ . (Doublie et al 1998, Graziewicz et al., 2006, Matsuda et al., 2001). La familia B, agrupa a las ADN polimerasas nucleares de eucariontes α , δ , ζ y ϵ (Garg et al., 2005). La familia C, incluye a las polimerasas replicativas bacterianas por ejemplo la ADN polimerasa III de *E. coli* (García-Díaz et al., 2007). La familia X incluye a las DNA polimerasas que rellenan espacios con nucleótidos durante la reparación del ADN (Ramadan et al., 2004). A este grupo pertenecen polimerasas de diversos organismos como virus, bacterias, levaduras y mamíferos. Las polimerasas λ y μ involucradas en el proceso de recombinación V(D)J pertenecen a este grupo (Dominguez et al., 2000). Perteneciendo a la familia Y, se encuentran todas las ADN polimerasas diferentes al resto, las cuales se caracterizan por poseer poca fidelidad y por lo tanto son propensas a cometer errores al momento de la replicación (Figura 2).

Tabla 1. DNA Polimerasas en *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*.

Name	Family	E. coli	Homo sapiens	S. cerevisiae	A. thaliana
Ec Pol I	A	Pol A			
γ (gamma)			POLG	MIP1	-
θ (theta)			POLQ	-	AtPolq
ν (nu)			POLN	-	-
POP			-	-	AtPolIA AtPolIB
Ec Pol II	B	Pol B			
α (alpha)			POLA	POL1 (CDC17)	AtPol α
δ (delta)			POLD1	POL3 (CDC3)	AtPol δ
ϵ (epsilon)			POLE	POL2	AtPol ϵ
ζ (zeta)			POLZ (REV3)	REV3	AtREV3
Ec Pol III	C X	dnaE			
β (beta)			-	-	-
λ (lambda)			POLB	-	-
μ (mu)			POLL	POLIV (POLX)	AtPol λ
TdT			POLM	-	-
σ (sigma)			TdT	-	-
Ec Pol IV	Y	DinB	POLS(TRF4-1)	TRF4	-
η (eta)			-	-	-
κ (kappa)			POLH	RAD30	AtRAD30
ι (iota)			POLK (DINB)	-	AtPol κ
			POLI (RAD30B)	-	-

Tabla modificada de Bebenek et al., 2004

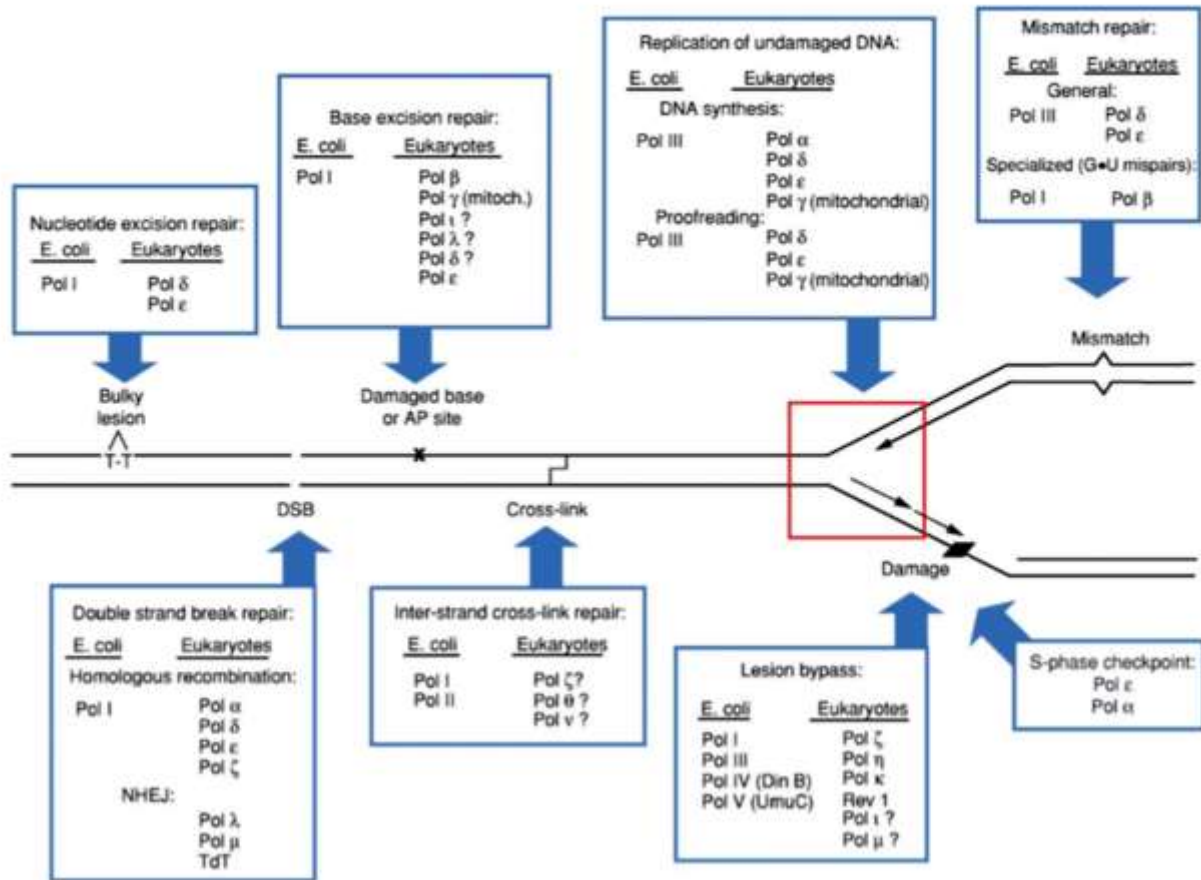


Figura 1. ADN polimerasas involucradas en diversas funciones de replicación, reparación y síntesis a través de ADN dañado. Las ADN polimerasas son clasificadas de acuerdo al rol que desarrollan tales como replicación, reparación y síntesis a través de ADN con y sin daño. (Tomado Bebenek et al., 2007).

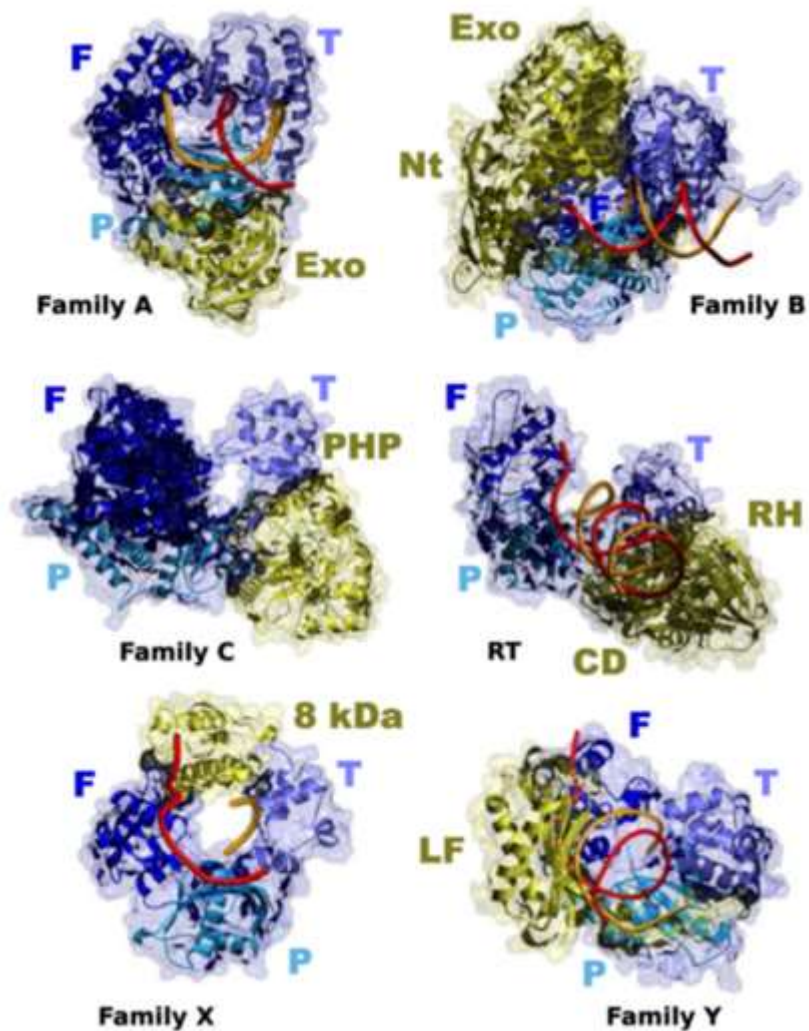


Figura 2. Estructura de ADN polimerasas. Estructura a partir del cristal de las diferentes familias de ADN polimerasas. (A, *T. aquaticus* Pol I; B, RB69 Pol; C, *E. coli* Pol III; X, Pol λ e Y, *Sulfolobus solfataricus* Dpo4) y retrotranscriptasas (RT). Todas las ADN polimerasas mantienen un arreglo similar a la mano derecha conteniendo los dominios de los dedos, del pulgar y de la palma, coloreado in diferentes tonos de azul. Dominios adicionales son mostrados en amarillo. Exo, 3'-5' exonucleasa; Nt, dominio N-terminal; PHP, Polimerasa e Histidinol Fosfatasa; 8 kDa, dominio 8 kDa; LF, dominio de pequeños dedos; RH, dominio RNAsa H y CD, dominio conector. Tomado de García-Díaz et al., 2007.

Diversidad estructural y mecanismos en común de las ADN polimerasas

Evolutivamente hablando, la actividad polimerasa posiblemente fue de las primeras en surgir debido a que el genoma debía ser replicado correctamente para mantenerlo a través de las generaciones. Puesto que el ADN se encuentra en todos los seres vivos, estas enzimas replicativas deben ser universales a todos los organismos.

A pesar de tener diversas funciones, las ADN polimerasas que han sido cristalizadas a la fecha, guardan ciertas similitudes. Por ejemplo, una ADN polimerasa puede ser comparada con la forma que guarda la mano derecha consistiendo de los dominios del pulgar, de la palma y de los dedos (Figura 3).

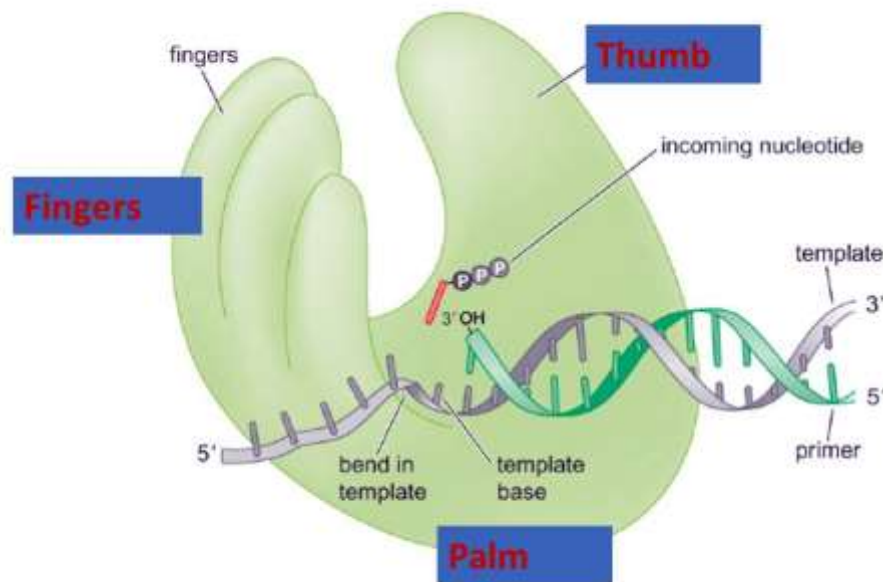


Figura 3. Modelo de la ADN polimerasa mostrando la similitud a una mano derecha. En la figura se pueden observar las regiones de los dedos, del pulgar y de la mano. Se puede apreciar la cadena de ADN en el dominio de la palma con un nucleótido entrante. Copyright 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

El dominio de la palma se encarga de catalizar la transferencia del fosforilo, el dominio de los dedos es el responsable de la interacción con el nucleótido trifosfato entrante que será colocado en la cadena naciente y en el dominio del pulgar se encarga de posicionar el dúplex de ADN (Steitz T., 1999). A pesar de que el dominio de la palma es homólogo en las diferentes familias, los dominios del pulgar y de los dedos son muy diferentes entre las diferentes familias de polimerasas.

A través de estudios estructurales se sabe que la reacción de polimerización es llevada a cabo catalizada por dos iones metálicos bivalentes mismos que interactúan con aminoácidos conservados del núcleo catalítico de polimerización (Beese et al., 1991). Este mecanismo de reacción inicia con un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo (-OH) en el extremo 3' del cebador sobre el fosfato α del desoxirribonucleótido entrante. En la reacción uno de los iones metálicos bivalentes desprotona el grupo hidroxilo del cebador, mientras que el otro estabiliza la reacción formando un estado de transición penta covalente con los fosfatos beta y gamma del desoxirribonucleótido. El resultado es la adición de un nucleósido al cebador con una subsiguiente ligación por un enlace 3'-5' fosfodiéster y la eliminación del pirofosfato (Figura 4).

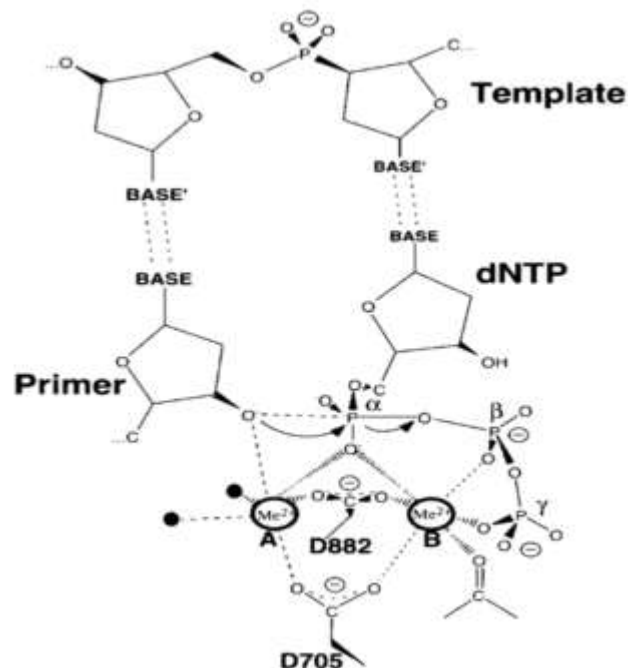


Figura 4. Mecanismo de reacción para alargar una cadena de ADN. El mecanismo de reacción inicia con un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo (-OH) en el extremo 3' del cebador sobre el fosfato del desoxirribonucleótido, en la reacción, uno de los iones metálicos bivalentes desprotona el grupo hidroxilo del cebador, mientras que el otro estabiliza la reacción formando un estado de transición penta covalente con los fosfatos beta y gamma del desoxirribonucleótido. El resultado es la adición de un nucleósido al cebador con una subsiguiente ligación por un enlace 3'-5' fosfodiéster y la eliminación del pirofosfato. (Tomado de Beese et al., 1991)

1.3. ADN polimerasa en organelos

Los plástidos y mitocondria son organelos semiautónomos que tiene su propio ADN y que surgieron a partir de una endosimbiosis ancestral. La forma en que se replica el ADN en dichos organelos aún no se ha esclarecido con certeza. Los cloroplastos están presentes en células de plantas y protistas, no así en células animales. Estos organelos contienen múltiples copias de un cromosoma de 150 kb aproximadamente, que varía a lo largo del desarrollo del tejido (Nielsen et al., 2010). Hace unos años, al analizar el genoma del arroz (*Oryza sativa*), de *Arabidopsis thaliana* y del tabaco (*Nicotiana tabacum*) condujeron a la identificación de genes nucleares codificando ADN polimerasas organelares (Takeuchi et al., 2007, Ono et al., 2007, Mori et al., 2008).

La ADN polimerasa γ perteneciente a la familia A, es la única ADN polimerasa encontrada en mitocondria de levaduras y mamíferos. Ésta enzima es la encargada de replicar y reparar en genoma en este organelo (Graziewicz et al., 2006). Además de la función de polimerización, presenta actividad 3'-5' exonucleasa. Y como es de esperarse por pertenecer a la familia A, esta ADN polimerasa presenta alta fidelidad y procesividad (Longley et al., 2001).

A pesar de que se ha purificado ADN polimerasas de la mitocondria de varias plantas superiores (Heinhorst et al., 1990), no se ha tenido certeza que no haya sido una polimerasa contaminante o bien observar una actividad polimerasa plenamente identificada. Mediante análisis de genomas de plantas, no ha sido encontrado ningún gen homólogo de la POLG (Kimura et al., 2006). En estudios se encontró

que una ADN polimerasa similar a la polimerasa I de *E. coli* puede re-localizarse a la mitocondria.

1.4. ADN polimerasas de organelos de plantas (POPs)

Arabidopsis thaliana como otras plantas superiores y protistas, codifica para dos ADN polimerasas similares a la ADN polimerasa I de *E. coli* con etiqueta dual a cloroplasto y mitocondria, denominadas *AtPolIA* y *AtPolIB* (Elo et al., 2003, Christensen et al., 2005, Ono et al., 2007, Mori et al., 2011). Análisis estructurales y filogenéticos indican que éstas novedosas ADN polimerasas son distintas de las ADN polimerasas mitocondriales de animales y levaduras, y que guarda mayor relación filogenética con la ADN polimerasa I de *E. coli*. La ADN polimerasa de organelos de la planta de tabaco fue expresada, purificada y caracterizada, mostrando la actividad canónica de replicación así como la actividad 3'-5' exonucleasa (Ono et al., 2007). También se han caracterizado bioquímicamente las POPs de *Oryza sativa* y una POP del alga roja *C. merolae* mostrando la actividad replicativa y de edición del ADN (Takeuchi et al., 2007, Moriyama et al., 2008).

II. Hipótesis

Las ADN polimerasas de organelos de plantas (POPs), contienen inserciones estructurales que le pueden permitir replicar a través de lesiones tales como sitios abásicos, timina glicoles y productos oxidados de bases nitrogenadas que se forman en la mitocondria y el cloroplasto.

III. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la función bioquímica *in vitro* de las dos ADN polimerasas de organelos de *Arabidopsis thaliana*: AtPOLIA y AtPOLIB.

3.2 Objetivos específicos

- I. Caracterizar *in silico* las regiones estructurales de las AtPOLs.
- II. Generar las mutantes en ambas AtPOLs.
- III. Expresar y purificar las proteínas mutantes y delecionales de cada AtPOL.
- IV. Evaluar *in vitro* las actividades de polimerización y de exonucleasa.
- V. Determinar la capacidad de replicación a través de ADN dañado.
- VI. Evaluar la actividad de desplazamiento de hebra.
- VII. Establecer condiciones de cristalización de la mutante que mejor se exprese.

IV. Materiales y Métodos

4.1 Caracterización *in silico* de las AtPOLs

4.1.1 diseño de mutantes y modelo estructural de las AtPOLs

A través de ensayos *in vivo* se tenía evidencia que AtPolIB se relocaliza al cloroplasto y a la mitocondria y que AtPolIA sólo se dirige al cloroplasto (Annakaisa et al., 2003). Tomando como base la información anterior se decidió ubicar la secuencia de etiqueta organelar por lo que a través de los predictores Predotar (<https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) y TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) se analizó si estas ADN polimerasas se dirigían al cloroplasto, a la mitocondria o a ambos organelos. Lo anterior consistió en analizar el formato FASTA de la secuencia de aminoácidos de cada proteína en la ventana del servidor y obtener una probabilidad (Tabla 2), el servidor iPSORT (<http://ipsort.hgc.jp/index.html>) sirvió para predecir a que organelo se re localizaban y para ubicar las pre secuencias aminoacídicas de ambas proteínas.

Tabla 2. Localización dual organelar de las *AtPols*

PROTEÍNA	PREDICTORES		
	Ipsort	TargetP	Predotar
<i>AtPolIA</i>	Cloroplasto	0.928 (C)	0.957 (C)
		0.314 (M)	0.005 (M)
<i>AtPolIB</i>	Mitocondria	0.588 (C)	0.640 (C)
		0.741 (M)	0.776 (M)

M, mitocondria; C, cloroplasto. Los valores en negritas son consideradas significativas ($P > 0.35$)

Tabla modificada de Elo et al 2003.



Figura 5. Alineamiento de la región N terminal de AtPOLIA y AtPOLIB. Comparación de los primeros aminoácidos de la región N terminal donde se ubica la secuencia de etiqueta dual organelar. En rectángulos rojos se muestra la secuencia de aminoácidos que el algoritmo iPSORT predijo como péptido de localización a cloroplasto.

Con la región de la etiqueta dual organelar localizada en ambas proteínas (Figura 5), se procedió a realizar mutantes en cada proteína, para el caso de AtPOLIA se diseñó un oligonucleótido sentido que contuviera un sitio de restricción *Nde* I justo después de la región de etiquetado dual organelar. El oligonucleótido anti sentido se hizo con la secuencia correspondiente al C-terminal y añadiendo un sitio de restricción *Bam*HI. En el caso de AtPOLIB se hizo el mismo procedimiento, se diseñó un oligonucleótido sentido que contuviera un sitio de restricción para *Nde* I después de la región de etiqueta dual organelar y el oligonucleótido anti sentido se realizó en la secuencia C-terminal de la proteína y se añadió un sitio de restricción *Bam*HI (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para generar las mutantes A1 y B1

A1- N terminal	5'-GGGAAGGGCATATGAGGCTTAGCTCTAGTCCATTACC-3'
A1- C terminal	5'-GGAGGAGGGATCCTTATTTAGCTGCATACCAATT-3'
B1- N terminal	5'-GGGAAGGGCATATGCCACGCCGTCGTATCCTGTGTAC-3'
B1- C terminal	5'-GGGAAGGG GGATCCTTATTTGCCCGCATACC-3'

Con la secuencia de aminoácidos de ambas AtPOLs se decidió buscar homología con ADN polimerasas cristalizadas, para esto se colocó la secuencia de aminoácidos en formato FASTA en la venta del servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), después del procesamiento se obtiene una lista con las ADN polimerasas más parecidas en secuencia, así como el código de acceso al PDB de cada una de ellas. Este resultado sirvió como base para realizar el alineamiento de las AtPOLs y así encontrar los sitios canónicos y regiones contrastantes.

Posteriormente se decidió hacer un modelo por homología de ambas AtPols en el software MOE, tomando como molde para la región exonucleasa el Fragmento Klenow (1KLN), que fue la ADN polimerasa más parecida en secuencia a las AtPOLs. Para modelar la región de polimerización se tomó como molde la Taq Polimerasa (1QSS). Con los resultados se hizo un análisis estructural utilizando el sistema de visualización molecular PyMOL, al sobre poner la estructura del Fragmento Klenow (1KLN) con cada una de las AtPOLs. Con la información anterior se diseñó un oligonucleótido sentido tomando como primer aminoácido el L259 y añadiendo un sitio de restricción NdeI y un oligonucleótido anti sentido con la secuencia respectiva del C-terminal y añadiendo un sitio de restricción BamHI, esto para AtPOLIA. Para AtPOLIB se siguió el mismo procedimiento, pero tomando el aminoácido L252 como primer aminoácido y añadiendo los respectivos sitios de corte, las mutantes que se obtendrán se asemejarán en la región N-terminal al Fragmento Klenow de *E. coli*. (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para hacer las mutantes de la región desordenada

mutA3-F	5'-GGGAAGGGCATATGCTCGGGAAAATCTATGATAAA-3'
mutA3-R	5'-GGAGGAGGGATCCTTATTTAGCTGCATACCAATT-3'
mutB3-F	5'-GGGAAGGGCATATGCTGAAGAAAATCTACAATCGCGTTC GTGTTGTGGATAATG-3'
mutB3-R	5'-GGGAAGGG GGATCCTTATTTGCCCGCATACC-3'

Como ya se tenía evidencia *in silico* que éstas AtPOLs presentaban los sitios conservados de la actividad 3´-5´ exonucleasa y los respectivos sitios de polimerización se procedió a hacer un alineamiento en el software BioEdit Sequence Alignment Edit para ubicar dichos sitios, lo anterior se hizo utilizando la secuencia del Fragmento Klenow de *E. coli* y con las dos POPs de *Oryza sativa* que había reportado Takeuchi por poseer actividad 3´-5´ exonucleasa y actividad de polimerización (Takeuchi et al., 2007). Después de haber alineado las AtPols se ubicó la región 3´-5´ exonucleasa y los respectivos sitios Exo I, Exo II y Exo III y los 3 motivos de la región de polimerización (A, B y C). Ubicados los aminoácidos del sitio catalítico para la actividad 3´-5´ exonucleasa se diseñaron oligonucleótidos en NEB changer (<http://nebasechanger.neb.com/>) para hacer las siguientes mutaciones D294A/E296A en AtPOLIA, D287A/E289A en AtPOLIB (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para las mutantes del sitio exonucleasa

AExo-F	5'-GGCAGTGAGCGGCATCGAAGTT-3'
AExo-R	5'-GTAGCGCAAGAATGCACATGATT-3'
BExo-F	5'-GGCAGTGTACGCATCGATGTTAAAAC-3'
BExo-R	5'-GTTGCGCAAGCATGAACCAAGTTAC-3'

4.1.2 Búsqueda de ortólogos y análisis filogenético

La búsqueda e identificación de secuencias ortólogas a las ADN polimerasas organelares de *A. thaliana* se realizó usando como templatado el producto del gen AT1G50840.1 (AtPOLIA) en una análisis con BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se construyó un árbol filogenético con el dominio de polimerización de secuencias aminoacídicas correspondientes a ADN polimerasas organelares (POPs), además de las AtPOLs, el árbol incluye las POPs de algunos protistas como *C. merolae* y *P. pallidum* también algunas bacterias y la T7 ADN polimerasa. Las secuencias se alinearon en el programa MEGA5 usando el algoritmo ClustalW (Tamura et al., 2011). El alineamiento obtenido se usó para

construir un dendograma con el método “Maximum Likelihood Estimation” con una robustez de bootstrap igual a 500.

4.2 Obtención de las diversas mutantes en ambas AtPOLs

Los genes sintéticos de las AtPOLs en el vector PCR4-E y optimizado en su uso de codones para la expresión en *E. coli* fueron obtenidos de la compañía BIOMATIK (ver apéndice). Los plásmidos conteniendo estos genes fueron resuspendidos en agua miliQ grado biología molecular de manera que quedará una concentración de 50 ng/ μ L. Con los genes sintéticos resuspendidos se transformó cepas competentes *E. coli* TOP10 como sigue: Descongelar en hielo un tubo de 100 μ L de células competentes *E. coli* TOP10 durante 10 minutos, adicionar 2 μ L del gen sintético resuspendido, incubar 15 minutos en el hielo, colocar el tubo a 42 °C durante 45 segundos y regresar al hielo inmediatamente por 2 minutos. Adicionar 250 μ L de medio LB (ver apéndice) sin antibiótico e incubar a 37 °C, 220 rpm durante 60 minutos. Después se plaqueó en cajas Petri de LB agar con ampicilina a 100 μ g/mL y se incubó 18 horas a 37 °C.

Se picó una colonia de cada AtPOL y se inocularon 2 tubos con 5 mL de medio LB suplementado con Ampicilina a 100 μ g/mL, se incuban a 37 °C, 220 rpm durante 8 horas. Los medios se centrifugan a 12 000 x g (Eppendorf 5424, ThermoFisher Scientific Brand) durante 5 minutos y se purificó el plásmido con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific) como recomienda el fabricante (ver apéndice).

Con el vector PCR4-E conteniendo el inserto de cada AtPOL ya purificado se procedió a hacer las mutantes por PCR. Se realizó una reacción de 100 μ L de PCR para cada AtPOL como se describe: adicionar 20 μ L de buffer 5x phusion HF, 2 μ L de dNTPs (10 mM c/u), 5 μ L oligo sentido (10 μ M), 5 μ L de oligo anti sentido (10 μ M), 1 μ L enzima *Phusion* (2 U/100 μ L NEB Biolabs), ADN templado a una concentración final a 2 ng/ μ L. Para obtener la mutante A1 se utilizaron los

oligonucleótidos A1 N-terminal y A1 C-terminal y el ADN templado fue PCR4-E/AtPolIA, para la mutante B1 se utilizaron los oligonucleótidos B1 N-terminal y B1 C-terminal y el templado fue PCR4-E/AtPolIB. Cada uno de los mix se dividen en tubos de 20 μ L y se colocaron en un termociclador C1000 (BioRad). La rampa de PCR fue de 98 °C:30 segundos, 98 °C: 10 segundos, un gradiente de 59-63 °C: 30 segundos, 72°C: 120 segundos, 72 °C: 10 minutos y 4 °C por 60 minutos.

Se corrió un gel de agarosa al 1 % (ver apéndice) para verificar que estuviera presente la banda con el peso esperado del ADN para cada AtPOL. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 0.8 %, se cortó la banda correspondiente al peso esperado para cada AtPOL y se purificó por el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Para la reacción de digestión se mezcla 15 μ L de buffer 2.0 10X (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT a 1X), 50 μ L del producto de PCR purificado, 4 U de *Bam*HI (NEB Biolabs) y 4 U de *Nde* I (NEB Biolabs) esto se lleva a 150 μ L con agua miliQ grado biología molecular. La reacción de digestión se incubó a 37 °C por 4 horas. La mezcla de digestión se purificó por el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) como recomienda el fabricante.

La digestión purificada de cada AtPOL fue insertada en el vector pET19b modificado para portar el sitio de corte de la enzima *PreScission Protease* (ver apéndice). Las reacciones de ligación se hicieron independientes en un volumen final de 20 μ L. Estas reacciones contenían una relación molar 3:1 inserto-vector calculado en el servidor NeBioCalculator (<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) tomando como base 20 ng totales de vector, 0.5 μ L de *T4 DNA ligasa* (ThermoFisher Scientific), 2 μ L de buffer T4 ligasa 10X (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5 a 1X) y agua miliQ grado biología molecular para completar 20 μ L de reacción. La reacción se incubó a 16 °C durante 16 horas.

Con cada ligación se transforman 100 μ L de células competentes *E. coli* TOP10 como se describió anteriormente. Se purificó el plásmido de cada AtPOL con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific) y se manda a secuenciar en una mezcla de 6 μ L con 200 ng totales de plásmido y 4 picomoles del oligonucleótido T7 promotor (5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3').

Con los resultados de secuenciación positivas, se procedió a realizar un segundo PCR para generar las deleciones de la región N-terminal desordenada en cada AtPOL. El PCR se realizó como se describió anteriormente, en este caso el ADN templado fue la mutante A1 y los oligonucleótidos mutA3-F y mutA3-R para la AtPOLIA, para AtPOLIB el ADN templado fue la mutante B1 y los oligonucleótidos mutB3-F y mutB3-R. Se utilizó el mismo procedimiento que se siguió para obtener las mutantes A1 y B1. Las deleciones obtenidas se denominaron AtPOLIA-KF y AtPOLIB-KF

Con los resultados de secuenciación positivas, se procedió a realizar un tercer PCR para generar las mutaciones de los aminoácidos en el sitio 3' -5' exonucleasa en cada AtPOL. El PCR se realizó como se describió anteriormente, en este caso el ADN templado fue la deleción AtPOLIA-KF y los oligonucleótidos AExo-F y AExo-R para la AtPOLIA, para AtPOLIB el ADN templado fue la deleción AtPOLIB-KF y los oligonucleótidos BExo-F y BExo-R. Se utilizó el mismo procedimiento de purificación por el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) que se realizó para obtener las mutantes A1 y B1. Se realizó una reacción de kinación mezclando 2 μ L de buffer 10x T4 ADN ligasa (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7.5 a 1X), 3 μ L de producto de PCR, 0.5 μ L de *PNK* y se lleva a 20 μ L con agua miliQ grado biología molecular. La reacción de kinación se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después a la reacción se le adicionó 0.5 μ L de enzima *T4 ADN ligasa* y se incubó a 16 °C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo a la reacción se le adicionó 1 μ L de enzima *Dpn I* y se incubó a 37 °C por 16 horas. Se transformó 100 μ L de cepas competentes *E.coli* TOP10 como se describió anteriormente. Se crecieron los cultivos de medio LB para extraer plásmidos con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (ThermoFisher Scientific). Los plásmidos de cada AtPol se mandaron a secuenciar en mezclas de 6 μ L conteniendo 200 ng totales de plásmido y 4 picomoles del oligonucleótido mutA3-F y mutB3-F para AtPolIA y AtPolIB respectivamente. Las mutantes obtenidas se denominaron AtPOLIA-KF exo⁻ y AtPOLIB-KF exo⁻.

4.3 Expresión heteróloga y purificación de las mutantes y deleciones de cada AtPOL

Las construcciones de todas las mutantes y deleciones clonados en el sistema de expresión pET19b modificado, fueron transformadas en la cepa *E. coli* BL21 suplementado con el plásmido PKJE7 (TAKARA) como se describió anteriormente. Una colonia crecida en cajas LB agar se utilizó para inocular 20 mL de medio LB, con 34 µg/mL de cloranfenicol y 100 µg/mL de ampicilina. El cultivo se creció a 37°C con agitación constante a 220 rpm durante 16 horas, luego se utilizó para inocular 2 L de medio LB con los antibióticos utilizados para crecer el pre inóculo, una vez inoculado se incubó a 37 °C hasta alcanzar una D.O. entre 0.5 y 0.8. Los cultivos se mantuvieron 60 minutos a 4 °C, se le adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y para inducir el plásmido de las chaperonas se adicionó arabinosa a 0.5 mg/ml final. El cultivo fue crecido 16 horas a 15 °C con agitación constante a 220 rpm. Concluido el tiempo se centrifugó el cultivo a 16 620 x g (JA-10 rotor Beckman Coulter) 4 °C durante 12 minutos. La pastilla fue almacenada a -80 °C hasta su purificación.

Las pastillas de los 2 L de cultivo de cada una de las 6 proteínas se resuspendió en 80 mL de un buffer BL (20 mM HEPES pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 % glicerol, 10 mM imidazol, 1 mM PMSF), homogeneizar gentilmente, después se adicionó lisozima (Sigma Aldrich) a una concentración final de 0.5 mg/mL y se incubó durante 60 minutos a 4°C en un agitador orbital. Se procedió a procesar la muestra utilizando un sonicador (Branson Sonifier 450), el proceso consistió de 8 ciclos de 30 segundos a 85 % de potencia y 2 ciclos de 20 segundos a 100 % de potencia, con descanso de 90 segundos entre cada ciclo, en todo momento el lisado se mantuvo en hielo. El lisado se centrifugó a 27 000 x g (JA-20 rotor Beckman Coulter) a 4°C durante 45 minutos. Se recupera el sobrenadante y se filtra en una membrana de 0.45 µm (MF-Milipore). El sobrenadante fue pasado a través de una columna de níquel de 1 mL (GE Healthcare) previamente equilibrada con 10 VC de buffer BL. Se colectó la fracción pasada por la columna, se procedió a pasar 30 VC de BL conteniendo 20 mM de imidazol y se colectó la muestra, después se pasó 30 VC de

BL conteniendo 30 mM imidazol y finalmente se eluyó con 5 volúmenes de columna de BL conteniendo 500 mM de imidazol. En todo momento el proceso de purificación se realizó en un cuarto a 4 °C para evitar degradación de las proteínas. Se tomaron 20 µL de muestra de cada fracción, muestra del debris, y se mezclaron con 5 µL de solución amortiguadora Laemmli 5X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 50% glicerol), posteriormente se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras ya calentadas se corrieron en un gel de SDS-PAGE al 8 % con un voltaje de 150 V. El gel se sumergió en una solución de azul de Coomassie y se calentó durante 40 segundos, se removió el exceso de azul de Coomassie con agua de llave y se calentó por 40 segundos para terminar de desteñir. La elución se colocó en una membrana de diálisis con tamaño de escrutinio de 10 kDa y se dializó contra un buffer de diálisis BD (20 mM HEPES pH 8.0, 100 mM NaCl, 30 % glicerol, 2 mM EDTA, 5 mM DTT) a 4 °C durante 15 horas. A la membrana de diálisis se adiciona la enzima *PreScission Protease* misma que corta en el sitio LeuGluValLeuPheGln/GlyPro entre las 9 histidinas y el N-terminal de la proteína

Después de dejar dializando las proteínas durante 15 horas, se procedió a realizar una purificación por intercambio iónico del tipo catiónico en una columna SP sefarosa de 1 mL (GE Healthcare). A cada una de las proteínas se le bajó la concentración de NaCl de 100 a 50 mM adicionando buffer B0 (20 mM HEPES pH 8.0, 0 mM NaCl, 30 % glicerol, 2 mM EDTA, 5 mM DTT). Se equilibraron cada una de las columnas con 10 VC de buffer B0 conteniendo 50 mM NaCl. Se pasó por la columna la proteína dializada y se pasaron 25 VC de buffer B0 conteniendo 50 mM de NaCl para remover proteínas de baja interacción iónica. Se procedió a realizar un gradiente de NaCl de 90 a 1000 mM, tomando como fondo el buffer B0. Las fracciones se hicieron de 3 mL cada una y coleccionar cada una de ellas. Se tomaron 20 µL de cada fracción y se adicionaron 5 µL de solución amortiguadora Laemmli 5X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 50% glicerol) posteriormente se calentó a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras ya calentadas se corrieron en un gel SDS-PAGE al 8 % con un voltaje de 150 V. El gel se sumergió en una solución de azul de Coomassie y se calentó durante 40

segundos, se removió el exceso de azul de Coomassie con agua de llave y se calentó por 40 segundos para terminar de desteñir. Las fracciones donde se observaron puras cada una de las 6 proteínas se colocaron por separado en membranas de diálisis con tamaño de escrutinio de 10 kDa y se dializaron contra un buffer de diálisis BF (20 mM HEPES pH 8.0, 100 mM NaCl, 50 % glicerol, 2 mM EDTA, 5 mM DTT) a 4 °C durante 15 horas. Transcurridas las 15 horas, se procedió a colocar las proteínas en alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4.4 Ensayo de polimerización y 3´-5´ exonucleasa *in vitro*

Una de las funciones canónicas de las ADN polimerasas es poder incorporar nucleótidos complementarios a una cadena de ADN, llamándose a este proceso polimerización. Para evaluar ésta función, primero se corrió un gel de SDS-PAGE al 8 % para verificar la concentración de cada proteína y a la par se cuantificó en un NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific) tomando el coeficiente de extinción molar y el peso molecular de cada una de las proteínas para obtener la concentración en mg/mL. Para obtener la concentración molar se utilizó un servidor en línea empleando la concentración en mg/mL y el peso molecular de cada proteína (http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_04.html).

Para obtener el ADNdc, primero se procedió a marcar el oligo A (5'-CGCAGCCCACCTGCCCACCTAACT-3') con $\gamma^{32}\text{P}$ ATP. Para la reacción de marcaje se mezcló 2.5 μL de Buffer PNK A (70 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT a 1X), 1 nmol de $\gamma^{32}\text{P}$ ATP, oligo A a una concentración final de 600 nM, 1 μL de enzima *PNK* (ThermoFisher Scientific) y se llevó a 25 μL con agua miliQ grado biología molecular. Se incubó a 37 °C durante 60 minutos. El oligo A marcado se purificó por el kit QIAquick Nucleotide Removal (QIAGEN), se siguió el protocolo como sugiere el fabricante. La reacción de hibridación para obtener el ADNdc consistió en mezclar 5 μL de buffer de hibridación 10X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl a 1X), templado C, que es complementario al oligo A (5'-CCTTGGCACTAGCGCAGGGCCAGTTAGGTGGGCAGGTGGGCTGCG-3') a una

concentración final de 400 nM, oligo A marcado y purificado a una concentración final de 200 nM, la reacción se llevó a un volumen de 50 μ L con agua miliQ grado biología molecular. La hibridación se calentó a 95 °C durante 5 minutos y se dejó enfriar lentamente, se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Se evaluó la actividad de polimerización a las mutantes A1 y B1 que son las proteínas más completas en secuencia de aminoácidos. La reacción de polimerización consistió en mezclar 10 μ L buffer POP 10X (10 mM Tris-HCl pH 7.7, 50 mM NaCl a 1X), 1.5 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA, ADNdc oligo A-oligo C a 2 nM (la concentración se tomó a partir del oligo marcado), se adicionó agua miliQ grado biología molecular. El mix se dividió 2 y a cada una se le añadió la mutante correspondiente a una concentración final de 20 nM. Se realizó la misma mezcla para el ensayo control, sólo se sustituyó el buffer POP 10X por el buffer T7 10X (20 mM Tris-HCl pH 7.6 , 40 mM KCl a 1X) y la enzima utilizada fue la T7 ADN polimerasa silvestre. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 5 minutos y se iniciaron con una mezcla de MgCl₂/dNTPs, a una concentración final de 1.8 y 0.3 mM respectivamente. Se tomaron 5 μ L de muestra en los siguientes tiempos: 30 segundos, 2, 4, 8 y 16 minutos. La reacción se detuvo con buffer de paro 2X (95% formamida, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xilencianol), se calentó a 95 °C durante 5 minutos, inmediatamente se colocó en hielo durante 5 minutos, se centrifugó a 12 000 x g (Eppendorf 5424, ThermoFisher Scientific Brand) y se corrió a 50 Watts en un gel desnaturalizante de Poliacrilamida al 18 % y 8M de urea durante 2 horas, posteriormente el gel se secó al vacío durante 60 minutos y finalmente se dejó exponiendo en una pantalla Phosphor Screen (KODAK) durante 18 horas. Transcurrido el tiempo, la pantalla se escaneó en el equipo Storm 840 PhosphorImager (BioRad) a una resolución de 100 micrones.

Para evaluar la actividad 3'-5' exonucleasa a las mutantes A1 y B1 que son las proteínas más completas. La reacción de exonucleólisis se preparó de la misma forma que se utilizó para el ensayo de polimerización para la que se mezcló 10 μ L buffer POP 10X (10 mM Tris-HCl pH 7.7, 50 mM NaCl a 1X), 1.5 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA, ADNdc oligo A-oligo C a 2 nM (la concentración se toma a partir del oligo marcado), se adicionó agua miliQ grado biología molecular. El mix se dividió 2 y a cada una se le añadió la mutante correspondiente a una concentración final de 20 nM. Se hizo la misma mezcla para el ensayo control, sólo se sustituyó el buffer POP 10X por el buffer T7 10X (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 40 mM KCl a 1X) y la enzima utilizada fue la T7 ADN polimerasa silvestre. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 5 minutos y se iniciaron con MgCl₂, a una concentración final de 1.8 mM. Se tomó 5 μ L de muestra en los siguientes tiempos: 30 segundos, 2, 4, 8 y 16 minutos. La reacción se detuvo con buffer de paro 2X (95% formamida, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xilencianol), se calentó a 95 °C durante 5 minutos, inmediatamente se colocó en hielo durante 5 minutos, se centrifugó a 12 000 x g durante 30 segundos (Eppendorf 5424, ThermoFisher Scientific Brand), se cargaron 5 μ L de cada muestra y se corrió a 50 Watts en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 18 % y 8M de urea durante 2 horas, posteriormente el gel se secó al vacío durante 60 minutos y finalmente se dejó exponiendo en una pantalla Phosphor Screen (KODAK) durante 18 horas. Transcurrido el tiempo, la pantalla se escaneó con el equipo Storm 840 PhosphorImager (BioRad) a una resolución de 100 micrones.

4.5 Replicación a través de ADN dañado

Una capacidad que algunas ADN polimerasas presentan es la de poder replicar a través de cadenas de ADN que presentan algún tipo de daño, ya sea una modificación por radicales libres, modificaciones debido a los rayos UV o bien la pérdida de la base nitrogenada. Ambientes como los del cloroplasto o la mitocondria donde se encuentran las AtPols, presentan un alto grado de actividad metabólica y por ende alto estrés óxido-reductor que repercute en la integridad del ADN. Por esta razón se procedió a realizar un ensayo *in vitro* para evaluar la replicación a través de sitios abásicos y timin glicoles, daños que compromete la replicación correcta del ADN.

Para obtener el ADNdc del ensayo de replicación a través de sitios abásicos, primero se marcó el oligo Universal (5'-CGAAGTACTAGTAACGACCCT-3') con $\gamma^{32}\text{P}$ ATP. Para la reacción de marcaje se mezcló 2.5 μL de Buffer PNK A (70 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT a 1X), 1 nmol de $\gamma^{32}\text{P}$ ATP , oligo Universal a una concentración final de 600 nM, 1 μL de enzima *PNK* (ThermoFisher Scientific) y se llevó a 25 μL con agua miliQ grado biología molecular. Se incubó a 37 °C durante 60 minutos. El oligo Universal marcado se purificó por el kit QIAquick Nucleotide Removal (QIAGEN), se siguió el protocolo como sugiere el fabricante. La reacción de hibridación para obtener el ADNdc consistió en mezclar 5 μL de buffer de hibridación 10X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl a 1X), templado Abásico, que contiene una modificación donde se a perdido una base nitrogenada (5'-

ATATAGGGTACCGACTGAAGCACTGGACGCCGXAAGTCAGGGTTCGTTACTAG TACTTCG-3'), a una concentración final de 400 nM, oligo Universal marcado y purificado a una concentración final de 200 nM, la reacción se llevó a un volumen de 50 μL con agua miliQ grado biología molecular. La hibridación se calienta a 95 °C durante 5 minutos y se deja enfriar lentamente. Para tener un control de una amplificación correcta y si en dado caso no se observara amplificación en el sustrato con una daño de sitio abásico, esto no se debiera a un detalle con la enzima y sus

proceso de purificación, se obtuvo un ADNdc donde un templado Positivo (5'-ATATAGGGTACCGACTGAAGCACTGGACGCCGTAAGTCAGGGTCGTTACTAG TACTTCG-3') el cual tenía una timina en lugar del sitio abásico, se hibridó con el oligo Universal siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para obtener el sustrato ADNdc oligo Universal-templado Abásico. Ambos sustratos se almacenaron -20 °C hasta su utilización.

La actividad de replicación a través del sitio abásico se evaluó en las mutantes AtPOLIA-KF, AtPOLIB-KF y AtPOLIB-KF *exo⁻* por la facilidad para purificarlas. La reacción consistió en mezclar 10 µL buffer POP 10X (10 mM Tris-HCl pH 7.7, 50 mM NaCl a 1X), 1.5 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA, ADNdc oligo Universal-templado Abásico a 2 nM (la concentración se tomó a partir del oligo marcado), se adicionó agua miliQ grado biología molecular. El mix se realizó para las tres mutantes AtPOLs y a cada una se le añadió la mutante correspondiente a una concentración final de 50 nM, se hizo la misma mezcla para el ensayo control, sólo se sustituyó el buffer POP 10X por el buffer 2.0 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT a 1X) y la enzima utilizada fue el Fragmento Klenow *E. coli* en su versión *exo⁺* (NEB Biolabs). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 5 minutos y se iniciaron con dNTPs/MgCl₂, a una concentración final de 0.3 y 1.8 mM. Se tomaron 5 µL de muestra en los siguientes tiempos: 30 segundos, 2 y 8 minutos. La reacción se detuvo con buffer de paro 2X (95% formamida, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xilencianol). Se repitió el ensayo exactamente sólo se cambió el sustrato ADNdc oligo Universal-templado Abásico por el sustrato ADNdc oligo Universal-templado Positivo. Las muestras obtenidas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 12 000 x g durante 30 segundos (Eppendorf 5424, ThermoFisher Scientific Brand), se cargaron 5 µL de cada muestra y se corrió a 60 Watts en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20 % y 6M de urea durante 2 horas 30 minutos, posteriormente los geles se secaron al vacío durante 60 minutos y finalmente se expusieron en pantallas Phosphor Screen (KODAK) durante 18 horas. Transcurrido el tiempo, las pantallas se escanearon en el equipo Storm 840 PhosphorImager (BioRad) a una resolución de 100 micrones.

Para realizar los ensayos a través de daños del tipo timin glicol, primero se marcó el oligo Dg (5'-CACTGACTGTATGATG-3') siguiendo el mismo procedimiento empleado para marcar el oligo Universal. Después de purificar el oligo por el kit QIAquick Nucleotide Removal (QIAGEN), se procedió a hibridar el oligo Dg con el templado Timin glicol isómero 5R-6S (5'-CTCGTCAGCATCTXCATCATAACAGTCAGTG-3') y con el templado Timin glicol 5S-6R (5' CTC GTC AGC ATC TXC ATC ATA CAG TCA GTG 3') respectivamente. La hibridación se llevó a cabo de la misma forma en que se hizo el ADNdc oligo Universal-templado Ábásico. Las "X" en cada templado representa el nucleótido dañado.

Para este ensayo las mutantes utilizadas fueron A1, B1, AtPOLIA-KF, AtPOLIB-KF, las polimerasas para el control negativo y positivo fueron la T7 ADN polimerasa silvestre y la ScMIP1 respectivamente. La mezcla de reacción consistió de lo mismo que para el ensayo de sitio abásico, sólo se sustituyó el sustrato por el ADNdc oligo Dg-templado Timin glicol isómero 5R-6S ó el ADNdc oligo Dg-templado Timin glicol isómero 5S-6R según fuera el caso, la concentración final de las enzimas fue de 20 nM. La reacción también se siguió de la misma forma, salvo que para este experimento se tomaron tiempos de 30 segundos, 1, 2, 4 y 8 minutos. Para la reacción con las enzimas control se empleó la misma mezcla que para las AtPOLs, sólo se sustituyó el buffer POP 10X por el buffer T7 10X (20 mM Tris-HCl pH 7.6 , 40 mM KCl a 1X). Las muestras obtenidas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 12 000 x g durante 30 segundos (Eppendorf 5424, ThermoFisher Scientific Brand), se cargaron 5 µL de cada muestra y se corrió a 50 Watts en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 18 % y 8M de urea durante 2 horas 30 minutos, posteriormente los geles se secaron al vacío durante 60 minutos y finalmente se expusieron en pantallas Phosphor Screen (KODAK) durante 18 horas. Transcurrido el tiempo, las pantallas se escanearon en el equipo Storm 840 PhosphorImager (BioRad) a una resolución de 100 micrones.

4.6 Ensayo de desplazamiento de hebra

La actividad de desplazamiento de hebra, es la capacidad que tienen algunas ADN polimerasas para remover una hebra de cadena sencilla resultante de un corte en una región específica. Para evaluar dicha actividad, primero se generó el sustrato ADNdc oligo A-oligo-B6-oligo C65. Para esto se marcó el oligo A con $\gamma^{32}\text{PATP}$ como se describió anteriormente en el ensayo de polimerización. La reacción de hibridación para obtener el ADNdc consistió en mezclar 5 μL de buffer de hibridación 10X (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl a 1X), Oligo B6 (5'-GCGCTAGTGCCAAGG-3') a una concentración de 200 nM, oligo C65 (5'-CCTTGGCACTAGCGCACGATGCCGCTAAGAACCTCAGGGCCAGTTAGGTGG GCAGGTGGGCTGCG-3') a una concentración final de 200 nM, oligo A (5'-CGCAGCCCACCTGCCCACCTAACT-3') marcado y purificado a una concentración final de 100 nM, la reacción se llevó a un volumen de 50 μL con agua miliQ grado biología molecular. Para el control positivo de elongación de oligonucleótidos se utilizó el ADNdc oligo A-templado C. Las mezclas de hibridación se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se dejaron enfriar lentamente. Los sustratos se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

La reacción de desplazamiento de hebra consistió en mezclar 10 μL buffer POP 10X (10 mM Tris-HCl pH 7.7, 50 mM NaCl a 1X), 1.5 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA, ADNdc oligo A-oligo B6-oligo C65 a 5 nM (la concentración se tomó a partir del oligo marcado), se adicionó agua miliQ grado biología molecular. El mix se realizó para las mutantes A1, B1, AtPOLIB-KF, a cada una se le añadió la mutante correspondiente a una concentración final de 20 nM. Se hizo la misma mezcla para el ensayo control de enzima, sólo se sustituyó el buffer POP 10X por el buffer T7 10X (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 40 mM KCl a 1X) y la enzima utilizada fue la T7 ADN polimerasa silvestre. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 5 minutos y se iniciaron con dNTPs/MgCl₂, a una concentración final de 0.3 y 1.8 mM respectivamente. Se tomó 5 μL de muestra en los siguientes tiempos: 30 segundos, 2, 4, 8 y 16 minutos. La reacción se detuvo con buffer de paro 2X (95% formamida, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% xilencianol). Se repitió el

ensayo exactamente sólo se cambió el sustrato ADNdc oligo A-oligo B6-oligo C65 por el sustrato ADNdc oligo A-templado C. Las muestras obtenidas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 minutos, se centrifugaron a 12 000 x *g* durante 30 segundos (Eppendorf 5424, ThermoFisher Scientific Brand), se cargaron 5 µL de cada muestra y se corrió a 60 Watts en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 22 % y 6M de urea durante 3 horas, posteriormente los geles se secaron al vacío durante 60 minutos y finalmente se expusieron en pantallas Phosphor Screen (KODAK) durante 18 horas. Transcurrido el tiempo, las pantallas se escanearon en el equipo Storm 840 PhosphorImager (BioRad) a una resolución de 100 micrones.

4.7 Condiciones de cristalización de la mutante con mejor rendimiento

Como se quería cristalizar la proteína con ADN y dNTPs para obtener mayor rigidez estructural y con base en los resultados de los diversos ensayos de replicación a través de ADN dañado, se decidió intentar cristalizar la mutante AtPOLIB-KF *exo*⁻. Se picó una colonia *E. coli* BL21-pKJE7 que previamente se había transformado con la construcción pET19b *pps/AtPolIB-KF* *exo*⁻, se pusieron 9 matraces con 20 mL de medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol a 100 y 34 µg/mL respectivamente. Los matraces se incubaron a 37 °C, 220 rpm durante 18 horas. Se inocularon 9 L de medio LB (20 mL de pre inóculo por cada litro de medio LB) suplementado con los antibióticos respectivos, se creció el cultivo a 37 °C, 220 rpm hasta una DO entre 0.4-0.8. Los cultivos se colocaron en hielo durante 60 minutos, posteriormente se adicionó IPTG a 0.5 mM final y para expresar el plásmido de las chaperonas se suplementó con 0.5 mg/mL final de Arabinosa. Se indujo a 10 °C, 220 rpm durante 18 horas. Transcurrido el tiempo, se procedió a centrifugar los medios de cultivos como se describió anteriormente.

La pastilla se resuspendió en 360 mL de buffer BL (40 mL por cada litro de cultivo), se siguió el mismo procedimiento de purificación por afinidad a níquel empleado para purificar las demás mutantes, en este caso sobrenadante se mezcló con 15 mL de resina de níquel (Sigma Aldrich) previamente equilibrada con buffer

BL. La mezcla se dividió en tubos de 50 mL (Falcon) y se incubó en un orbital a 4 °C durante 12 horas. La resina se empacó en una columna de 150 mL (BioRad) y se lavó con 100 mL de buffer BL conteniendo 20 mM de imidazol, después se lavó con 200 mL de buffer BL conteniendo 30 mM de imidazol. Para eluir la proteína, se utilizaron 80 mL de buffer BL conteniendo 500 mM de imidazol. La elución se colocó en una membrana de diálisis con tamaño de escrutinio de 10 kDa y se dializó contra un buffer de diálisis BD (20 mM HEPES pH 8.0, 50 mM NaCl, 30 % glicerol, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF) a 4 °C durante 15 horas. A la membrana de diálisis se adicionó la enzima *PreScission Protease* misma que corta en el sitio LeuGluValLeuPheGln/GlyPro entre las 9 histidinas y el N terminal de la proteína.

Después de dializar la proteína durante 15 horas, se procedió a realizar una purificación por intercambio iónico en resina de fosfocelulosa P11 (Sigma Aldrich). Se equilibraron 15 mL de resina de fosfocelulosa con buffer BD (20 mM HEPES pH 8.0, 50 mM NaCl, 30 % glicerol, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF), se mezcló con la proteína dializada y se incubó a 4 °C en orbital durante 4 horas. La mezcla se empacó en una columna de 100 mL (BioRad), se lavó con 50 mL de buffer B0. Se procede a realizar un gradiente de 50 a 1000 mM de NaCl. Las fracciones más abundantes se dializan contra el buffer BD. Para darle un paso más de purificación todo el volumen de proteína dializado se pasó por una columna de heparina 16/10 FF (GE Healthcare) previamente equilibrada con buffer BD. La columna se conectó al equipo AKTA (GE Healthcare), se hizo un lavado con 50 mL de buffer BD a un flujo de 1.5 mL/min, posteriormente se programó un gradiente de 0 a 1000 mM alcanzado en 120 mL. Las fracciones más puras y concentradas se dializaron contra buffer BD.

Debido a que en ocasiones anteriores al momento de concentrar la proteína en tubos Amicon de 15 mL (Merck Milipore) esta se pegaba a las paredes del tubo. Se realizó una concentración poco convencional, ya que estaba pura la proteína y sólo se quería concentrar, se procedió a equilibrar una columna SP sefarosa de 1 mL (GE Healthcare) con buffer BD, se pasaron muy lentamente los aproximadamente 40 mL de proteína, como la proteína en una columna de este tipo

elúa en 250 mM de NaCl, se procedió a eluir en fracciones de 500 μ L con un buffer BD conteniendo 1000 mM de NaCl. Las fracciones fueron dializadas contra un buffer BD conteniendo 40 % de glicerol. Los 2 mL se llevaron hasta 130 μ L en ultra concentradores de 500 μ L con tamaño de escrutinio de 10 K (Sartorius). Se corrió un gel SDS-PAGE 8 % a 150 Voltios y se realizó la tinción con Azul de Coomassie como se describió anteriormente.

Para obtener el complejo ternario la mezcla contenía la proteína a 77 μ M, DNAdc a 84.7 μ M, dATP a 100 μ M, ddCTP 250 μ M, MgCl₂ a 10 μ M. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, después se adicionó dGTP a 5 mM y se volvió a incubar en hielo durante 90 minutos. Usando el equipo Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments) se colocaron las 96 condiciones del kit de cristalización Morpheus (Molecular Dimensions). La caja con las condiciones se almacenó a 20 °C.

V. Resultados

5.1 Caracterización *in silico* de las AtPOLs

5.1.2 Identificación de pre-secuencias organelares y regiones desordenadas en las AtPOLs

Tomando en cuenta los resultados de las predicciones en el algoritmo iPSORT se pidieron los oligonucleótidos para las mutantes hacia la región de localización dual organelar, se observó que esta región es rica en los aminoácidos serina y prolina indicando que se trata de una señal de localización dual a cloroplasto y mitocondria. Más aún, los estudios *in vivo* indican que ambas proteínas se localizan en cloroplasto y mitocondria. En comparación con las ADN polimerasas de la familia A, las AtPOPs contienen unos 230 amino ácidos en la región N-terminal que no presentan identidad en secuencia de aminoácidos con otras proteínas y posiblemente codifiquen para una región involucrada en interacciones proteína-proteína (Fig. 6).

Al hacer la búsqueda por homología con ADN polimerasas cristalizadas, se encontró que el Fragmento Klenow de *E. coli* (1KLN) fue el que mostró mayor identidad de secuencias con 30 % para ambas AtPOLs. Con ésta información se modeló la región exonucleasa (Figura 6B) y para el dominio de polimerización, se tomó como molde el modelo de la Taq ADN polimerasa (1QSS) (Figura 6C). Cuando se obtuvo el modelo predictivo de ambas AtPOLs, se consiguió determinar el sitio para realizar la mutantes KF en ambas AtPOLs (Figura 6A).

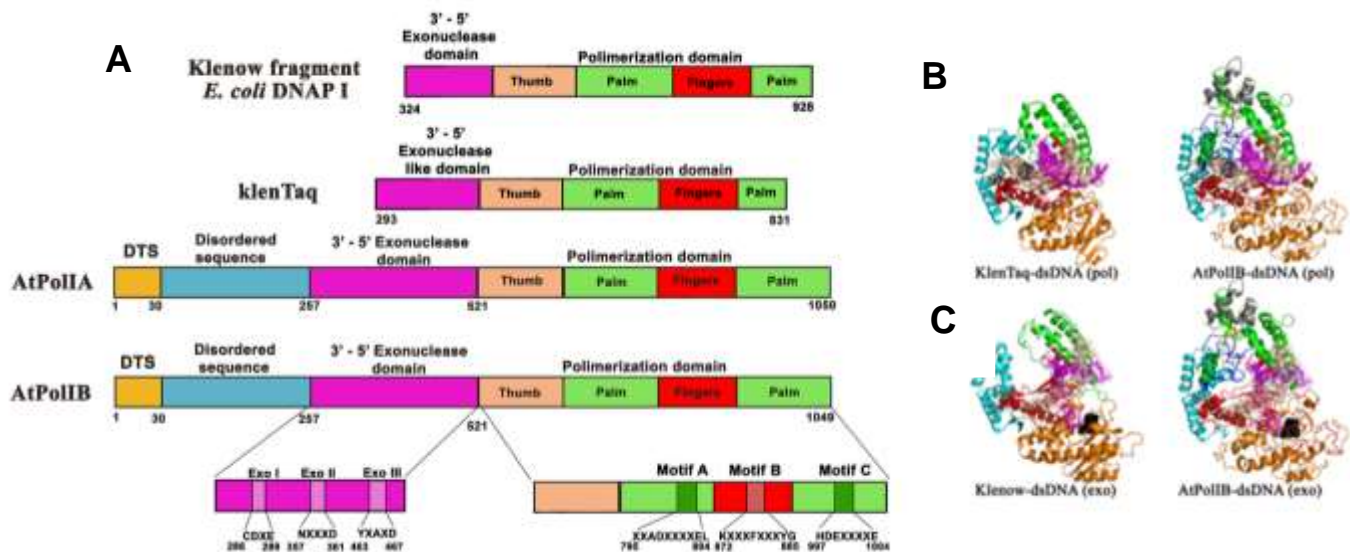


Figura 6. Modelo comparativo de las AtPOLs y sitios conservados con ADN polimerasas típicas. A) se muestra el Fragmento Klenow (1KLN), la polimerasa KlenTaq (1QSS) y las AtPols. En violeta el dominio exonucleasa, en violeta menos intenso los sitios de exonucleasa I, II y III, en beige el dominio del pulgar, en verde la región de la palma, en verde oscuro los motivos de polimerización A y C, en rojo el dominio de los dedos, en rojo oscuro el motivo de polimerización B, en azul una secuencia desordenada en las AtPols, en amarillo la secuencia dual a mitocondria y cloroplasto. **B)** a la izquierda se observa el modelo KlenTaq (1QSS) con ADN y a la derecha el modelo del dominio de polimerización de AtPOLIB-KF con ADN. **C)** a la izquierda se observa el modelo Fragmento Klenow (1KLN) con ADN y a la derecha el modelo del dominio exonucleasa de AtPOLIB-KF.

Para ubicar con exactitud los aminoácidos catalíticos del dominio 3'-5' exonucleasa, se hizo un alineamiento de las dos AtPols con las dos POPs de *O. sativa* y con el Fragmento Klenow *E. coli* (Figura 7). Se encontró que las AtPOLs guardan un 65 % de identidad entre ellas. Al comparar la región de exonucleasa se encontró que la secuencia del núcleo catalítico fue CDTE tanto en AtPOLs como en OsPOLs, éstas últimas ya habían mostrado la capacidad de exonucleólisis *in vitro*. Los aminoácidos responsables de la actividad son D y E, mismos que corresponden a los aminoácidos en el núcleo exonucleasa del Fragmento Klenow de *E. coli*. Con ésta información se realizaron las mutantes KF-exo.

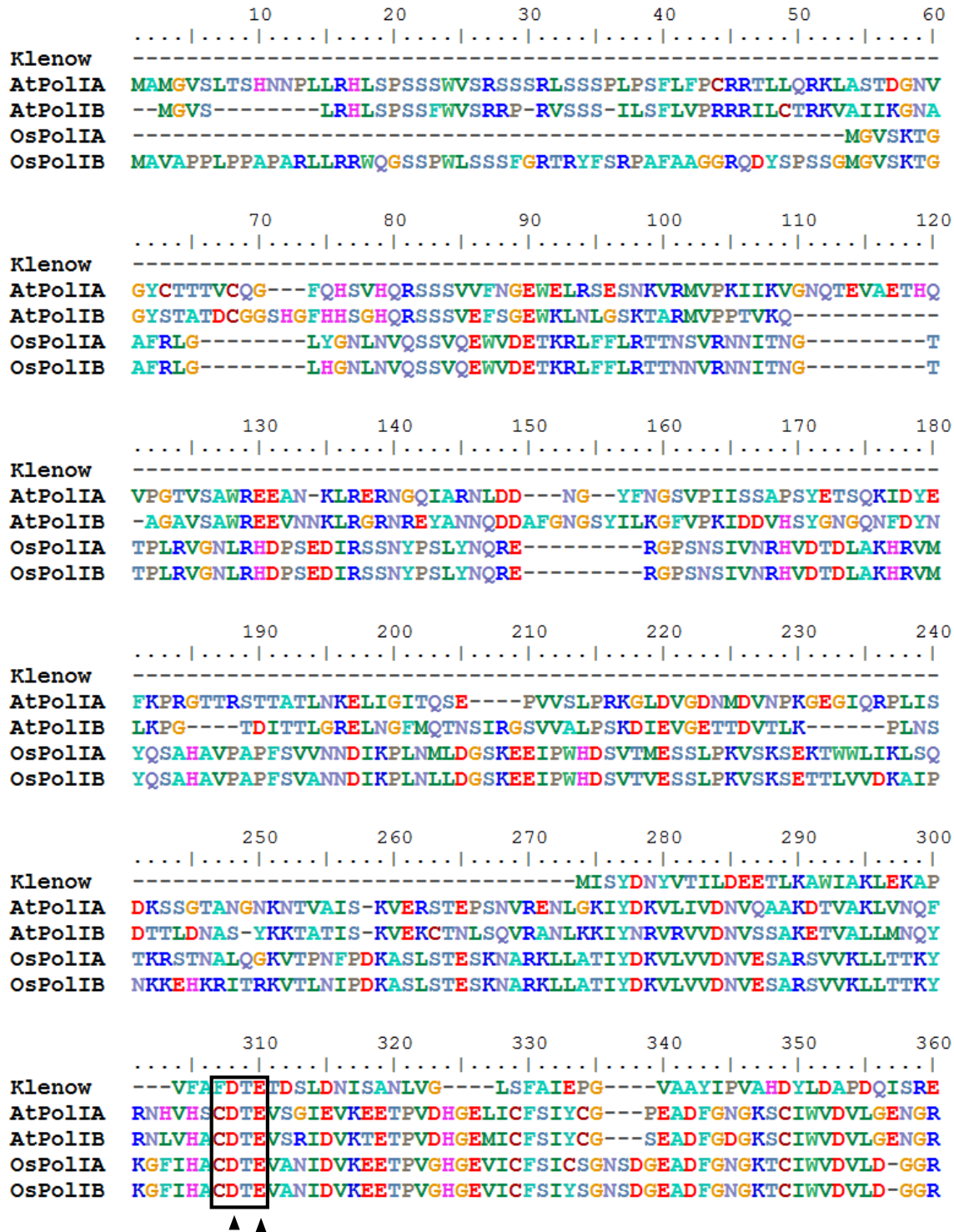


Figura 7. Alineamiento en ClustalW de POPs y la ADN polimerasa canónica de la familia A. alineamiento realizado con el algoritmo ClustalW, de la región exonucleasa, en el cuadro negro se señala el sitio Exo I y con las flechas negras se apuntan los aminoácidos responsables de la actividad exonucleasa.

filogenético se aprecia que las plantas superiores (por ejemplo, maíz, arroz o *Arabidopsis* cuentan con dos genes para POPs, mientras que las algas y los protistas cuentan con un solo gen). De manera preliminar solamente se encontró sólo un gen en la planta *Marchantia polymorpha* indicando que el evento de duplicación de las POPs ocurrió en las plantas con flores.

5.2 Obtención de mutantes en ambas AtPOLs por la técnica Q5 Site-Directed Mutagenesis y PCR con oligos deletoriales

El gen sintético de ambas AtPOLs fue resuspendido en agua miliQ grado biología molecular a la concentración que sugiere el fabricante. Después de transformar cepas químico competentes *E. coli* TOP10 y obtener suficiente ADN de ambos genes, se procedió a realizar PCR's para obtener la mutante A1 y B1, usando como molde los genes sintéticos y oligonucleótidos respectivos para cada AtPOL, el producto de PCR obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1 %, se observaron productos de 3150 y 3050 pares de bases correspondientes a AtPOLIA y AtPOLIB (Figura 9).

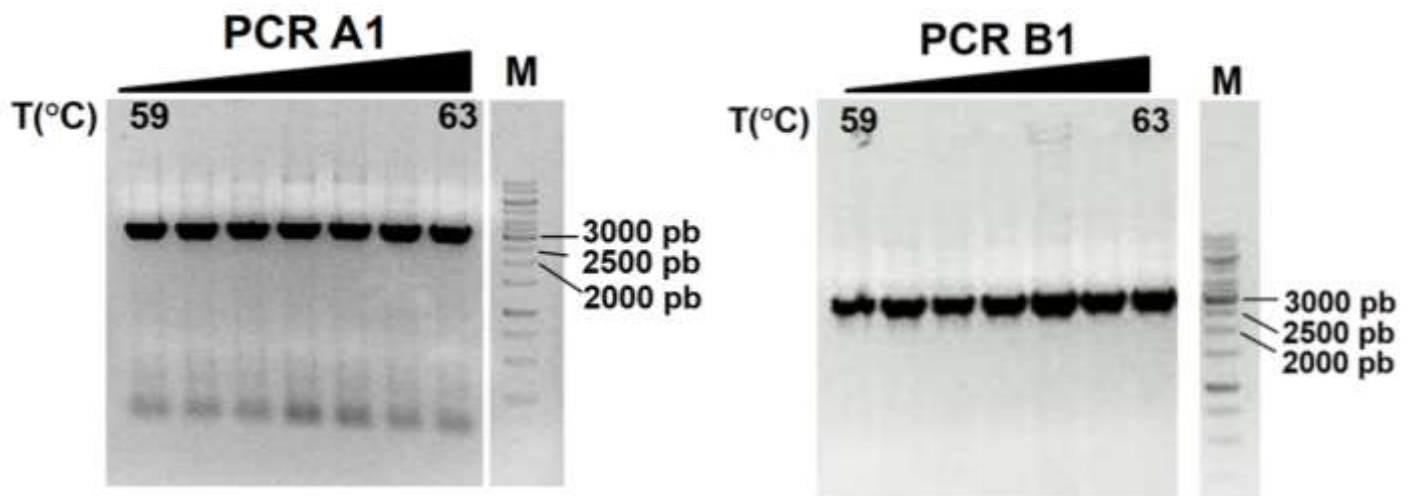


Figura 9. PCR de las mutantes A1 y B1. Gel de agarosa al 1 % con los productos obtenidos del PCR mutacional de A1 y B1 en diferentes temperaturas de anillamiento del primer, M, indica la escalera en pares de bases. En todos los carriles se puede apreciar el inserto de aproximadamente 3000 pb en todas las temperaturas para ambas mutantes.

Después se cortó la banda correspondiente al producto esperado, esto de acuerdo al protocolo de QIAGEN. Posterior a la digestión y ligación del inserto al vector pET19b, se transformaron cepas de *E. coli* TOP10 y se purificó el plásmido de diferentes clonas para cada mutante A1 y B1. Se pusieron a digerir con *Bam*H I y *Nde* I, el resultado de la reacción se observó en un gel de agarosa al 1 %, se muestra sólo el corte de una clona por cada mutante como se ve en la figura 10. Las clonas que mostraron un inserto liberado con el tamaño esperado, se mandaron a secuenciar.

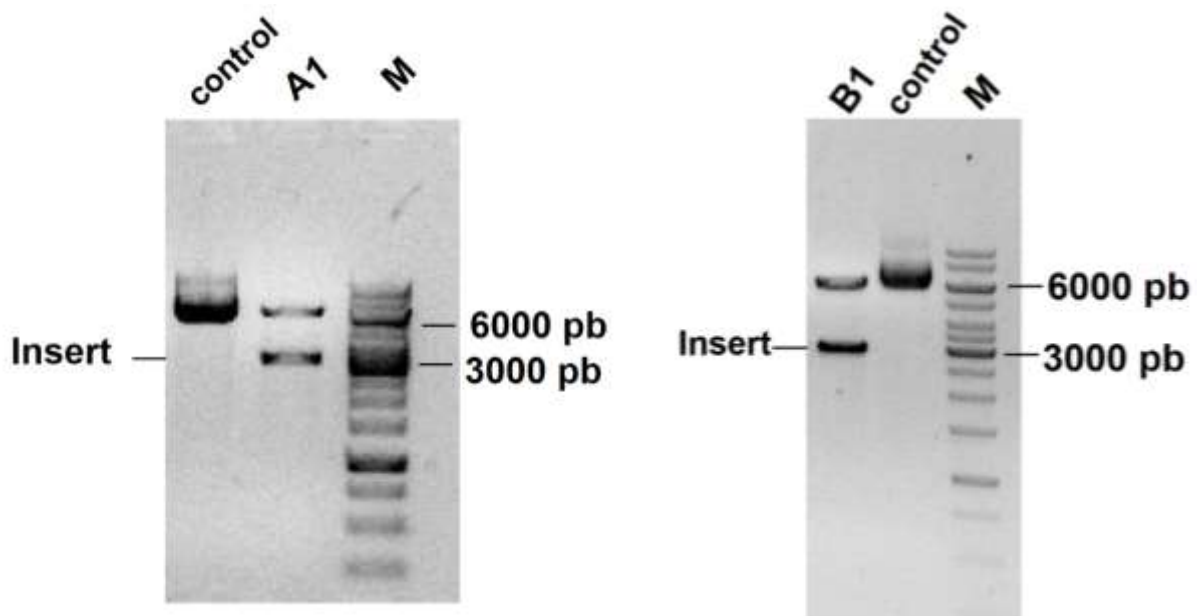


Figura 10. Digestión de los plásmidos de las mutantes A1 y B1. Gel de agarosa al 1 %, M, indica la escalera en pares de bases, en la imagen de la izquierda se observa el carril de control de plásmido no cortado y en el carril A1 el plásmido cortado con *Bam*H I y *Nde* I donde aparece la banda del inserto de aproximadamente 3000 pb y el vector vacío. En la figura derecha se observa el carril de control de plásmido no cortado y en el carril B1 el plásmido cortado con *Bam*H I y *Nde* I donde aparece la banda del inserto de aproximadamente 3000 pb y el vector vacío.

Para hacer las mutantes del sitio desordenado se tomó como molde la construcción A1 y B1 y los oligonucleótidos correspondientes. Se realizó una mezcla de PCR como se indicó anteriormente y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1 %. En este caso la temperatura de anillamiento donde hubo amplificación fue 62 °C. Se observó un producto de aproximadamente 2400 pares de bases correspondientes a las mutantes KF de ambas AtPOLs (Figura 11).

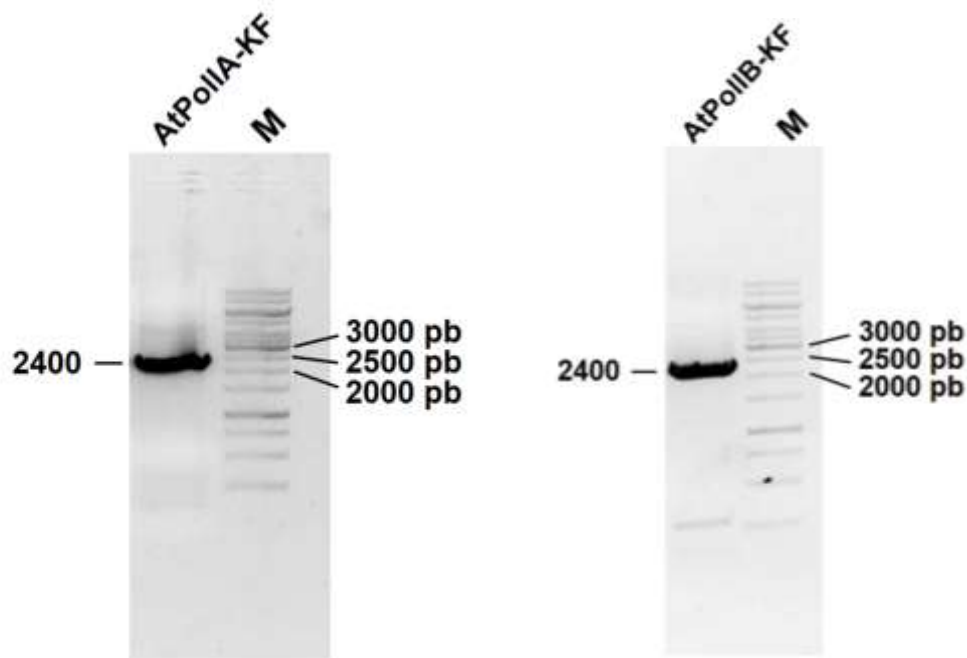


Figura 11. PCR de las mutantes KF en las AtPOLs. Gel de agarosa al 1 % con los productos de PCR, M, muestra la escalera en pares de bases, en la figura izquierda se muestra el carril AtPOLIA-KF con el producto esperado de 2400 pb aproximadamente. En la figura de la derecha se observa el producto esperado de aproximadamente 2400 pb correspondiente a la mutante AtPOLIB-KF.

Después se cortó del gel la banda correspondiente al producto esperado, esto de acuerdo al protocolo de QIAGEN. Posterior a la digestión y ligación del inserto al vector pET19b, se transformaron cepas de *E. coli* TOP10 y se purificó el plásmido de diferentes clonas para cada mutante AtPOLIA-KF y AtPOLIB-KF. Se pusieron a digerir con *Bam*HI y *Nde* I, el resultado de la reacción se observó en un gel de agarosa al 1 %, en la figura 12 se muestra el patrón de corte de una clona

para cada mutante. Las clonas que mostraron la liberación del inserto esperado, se mandaron a secuenciar.

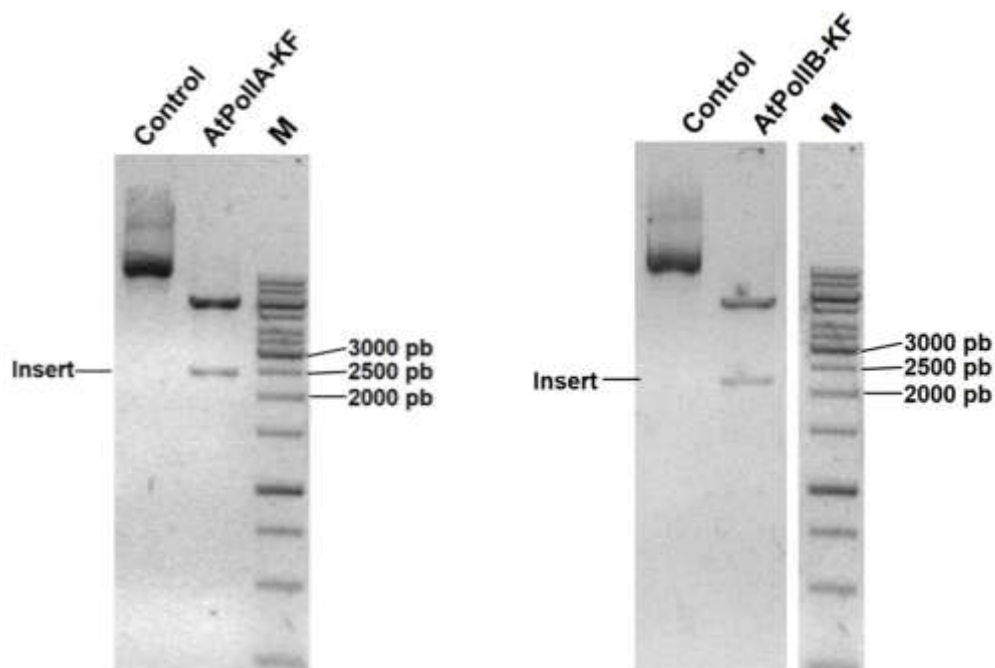


Figura 12. Digestión de los plásmidos de las mutantes AtPOLIA-KF y AtPOLIB-KF. Gel de agarosa al 1 % de las mutantes KF en ambas AtPOLs, donde M, indica la escalera en pares de bases. En la figura izquierda se observa el control de plásmido no cortado y en el carril AtPOLIA-KF el plásmido fue cortado con *BamH* I y *Nde* I donde se observa la liberación del inserto de 2400 pb correspondiente a la mutante AtPOLIA-KF. En la figura derecha se observa el control de plásmido no cortado y en el carril AtPOLIB-KF el plásmido fue cortado con *BamH* I y *Nde* I observándose la liberación del inserto de 2400 pb correspondiente a la mutante AtPOLIB-KF.

Finalmente, para hacer las mutantes del sitio Exo I del dominio 3'-5' exonucleasa se tomó como molde la construcción AtPOLIA-KF y AtPOLIB-KF y los oligonucleótidos correspondientes. Se realizó una mezcla de PCR como se indicó anteriormente y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1 %. La

temperatura de anillamiento en la que se observó la amplificación del producto fue 62 °C (Figura 13).

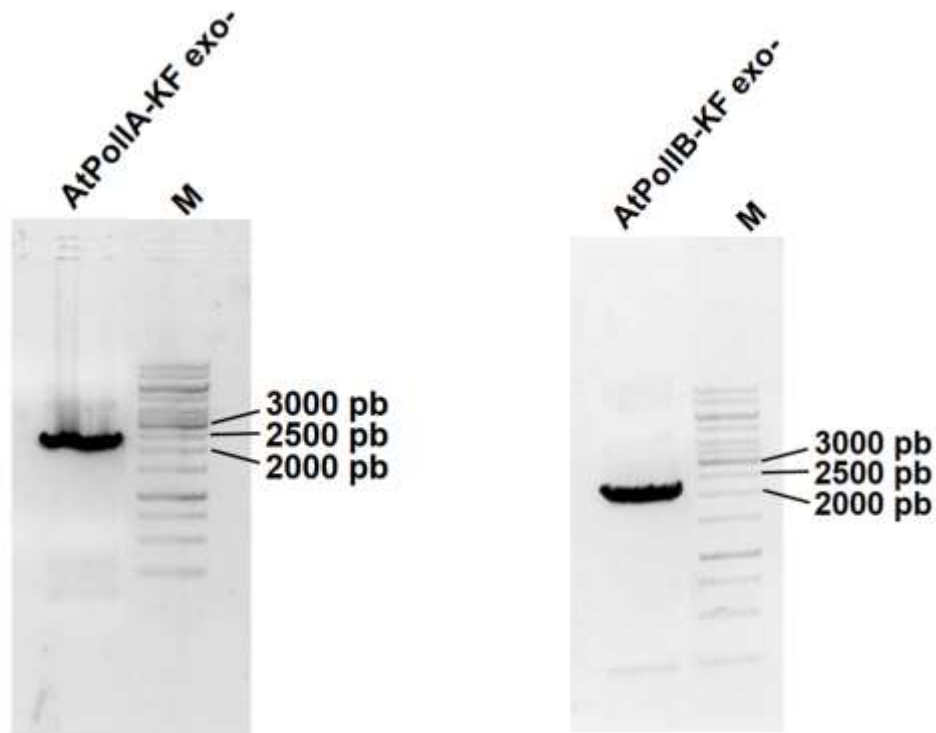


Figura 13. PCR de las mutantes KF-Exo⁻ en las AtPOLs. Gel de agarosa al 1 % con el producto de PCR de ambas mutantes AtPOLs, M, indica la escalera en pares de bases. En la figura de la izquierda se observa el producto amplificado de 2400 pb aproximadamente correspondiente a la mutante AtPOLIA-KF exo⁻. En la figura de la derecha se observa el producto de 2400 pb aproximadamente correspondiente al esperado de la mutante AtPOLIB-KF exo⁻.

Después se cortó del gel la banda correspondiente al producto esperado, esto de acuerdo al protocolo de QIAGEN. Posterior a la digestión y ligación del inserto al vector pET19b, se transformaron cepas de *E. coli* TOP10 y se purificó el plásmido de diferentes clonas para cada mutante AtPOLIA-KF exo⁻ y AtPOLIB-KF exo⁻. Se pusieron a digerir con *Bam*HI y *Nde* I, el resultado de la reacción se observó en un gel de agarosa al 1 % como se ve en la figura 14. Las clonas que mostraron un inserto liberado con el tamaño esperado, se mandaron a secuenciar.

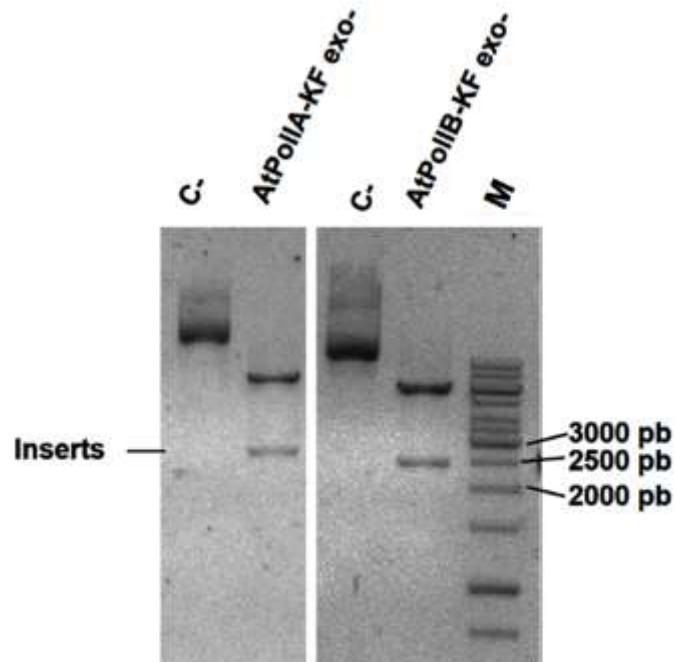


Figura 14. Digestión de los plásmidos de las mutantes AtPOLIA-KF *exo*⁻ y AtPOLIB-KF *exo*⁻. Gel de agarosa al 1 % de las mutantes KF en ambas AtPOLs, donde M, indica la escalera en pares, C-, el plásmido no cortado en ambas mutantes y en el carril AtPOLIA-KF *exo*⁻ y AtPOLIB-KF *exo*⁻ el plásmido fue cortado con *Bam*H I y *Nde* I en ambos carriles se observa la liberación del inserto de 2400 pb aproximadamente.

5.3 Expresión heteróloga y purificación proteínas de cada AtPOL en la cepa BL21-PKJE7

Las construcciones secuenciadas y que fueron positivas de cada mutante para cada AtPOL se utilizaron para transformar las cepas quimio competentes *E. coli* BL21-PKJE7 como se describió en el protocolo. Después de que se obtuvieron las diferentes proteínas en la fracción soluble se procedió a purificar en columnas de níquel. Las proteínas mutantes se purificaron con diferentes rendimientos como se muestra en la figura 15 y 16.

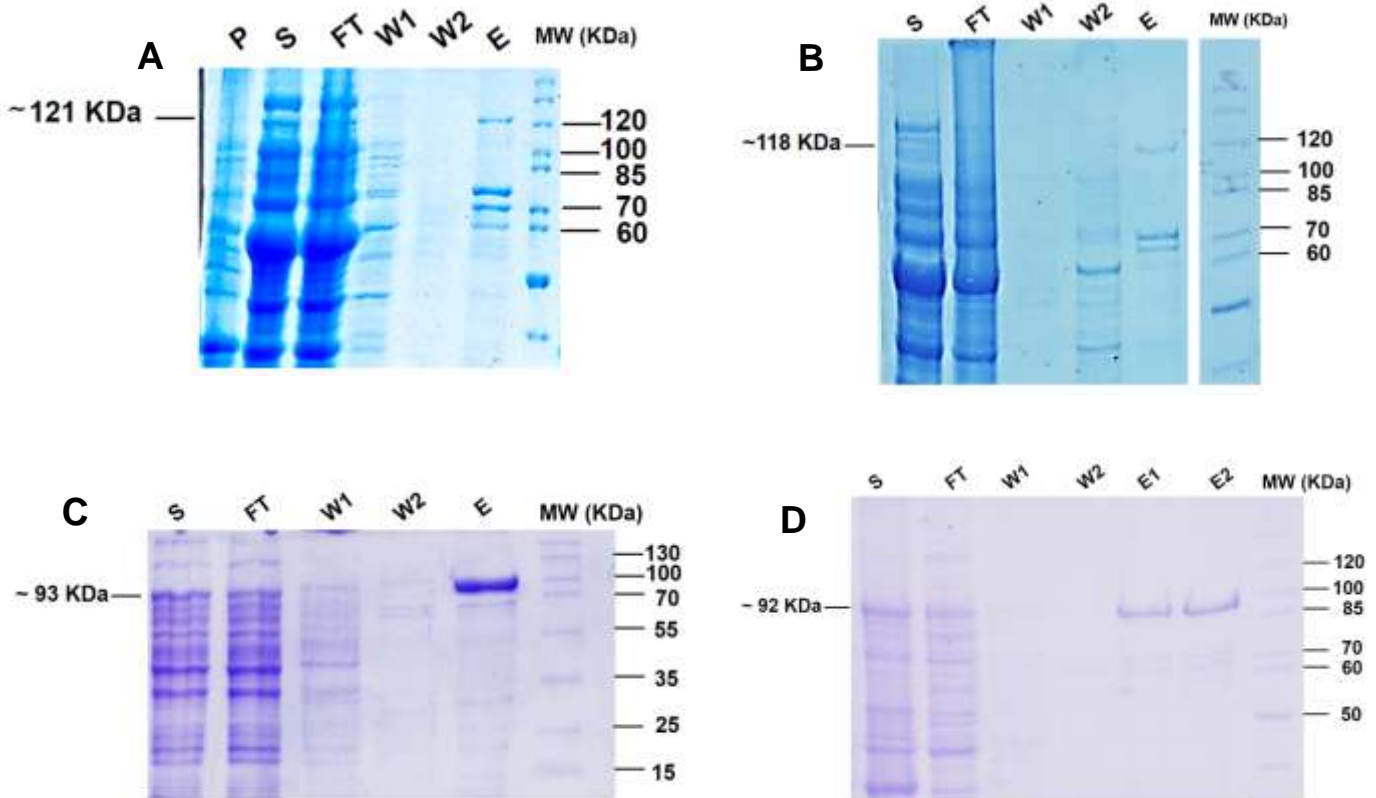
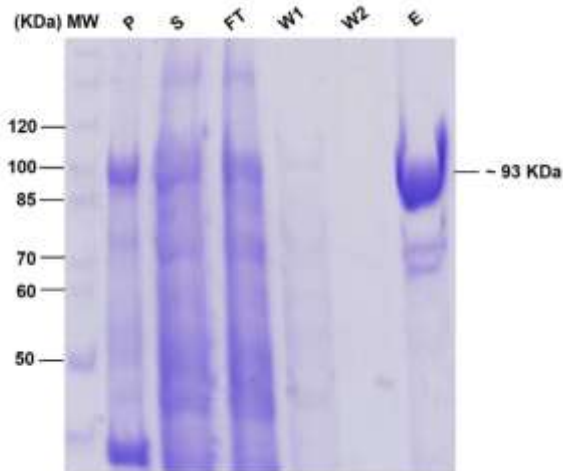


Figura 15. Purificación por afinidad a metales inmovilizados níquel de las mutantes AtPOLs.

Geles de poliacrilamida SDS al 8 % de la purificación para las diversas mutantes donde en la figura **A)** se observa los carriles con distintas etapas de purificación por afinidad a níquel. En la elución se observa una banda de 120 kDa aproximadamente correspondiente a la mutante A1. **B)** se muestran las distintas fracciones en la purificación por níquel y en el carril de la elución se observa una banda de 118 kDa que corresponde con el peso de la mutante B1. **C)** se muestran las diversas fracciones correspondientes al paso de purificación por níquel y en la elución se encuentra la banda más abundante que pertenece a la mutante AtPOLIA-KF. **D)** en la figura se muestran las diversas muestras colectadas de la purificación en la columna de níquel, en los carriles E1 y E2 se observa la banda que pertenece a la proteína AtPOLIB-KF con un peso de aproximadamente 92 kDa.

A



B

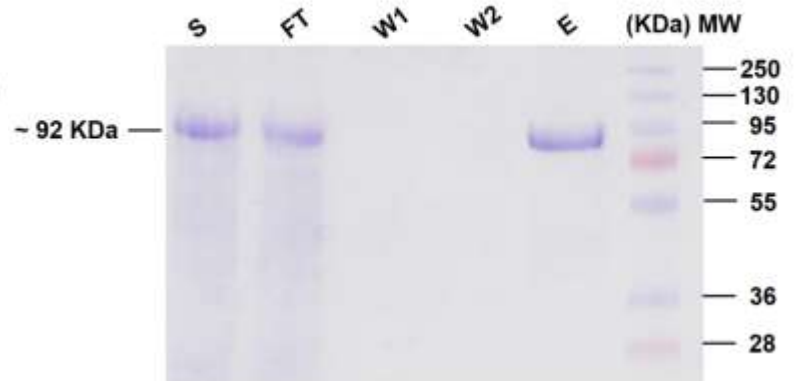
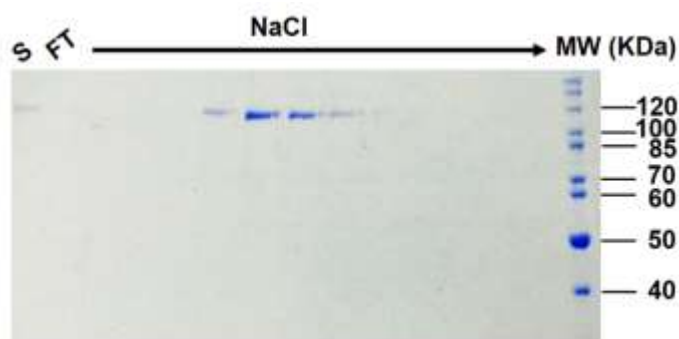


Figura 16. Purificación por afinidad a metales inmovilizados níquel de las mutantes AtPOLs

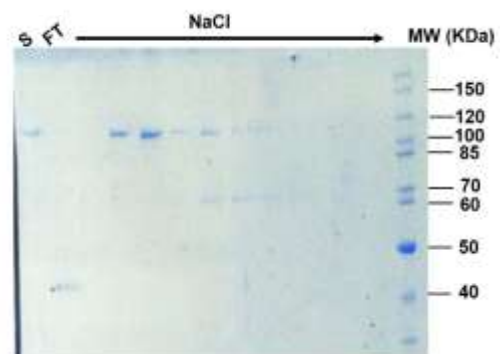
KF. A) se muestran las fracciones de la purificación por níquel de la mutante AtPOLIA-KF exo^- , en el carril E aparece una banda muy abundante de aproximadamente 93 kDa que pertenece a la mutante purificada. **B)** Se muestran los diversos puntos de la purificación en columna de níquel, en el carril E se muestra una banda de 92 kDa correspondiente a la mutante AtPOLIB-KF exo^- .

Después de la purificación en columna de níquel, se continuó el proceso de purificación en columnas SP sefarosa como se mencionó anteriormente y los resultados se muestran en la figura 17.

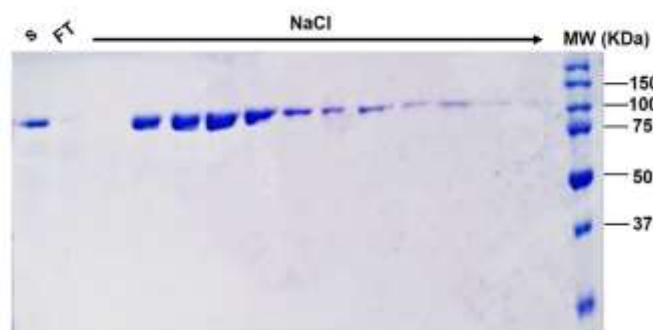
A



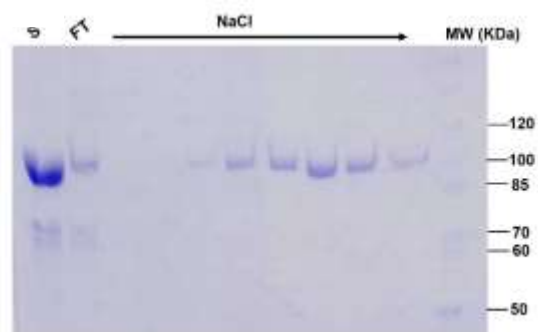
B



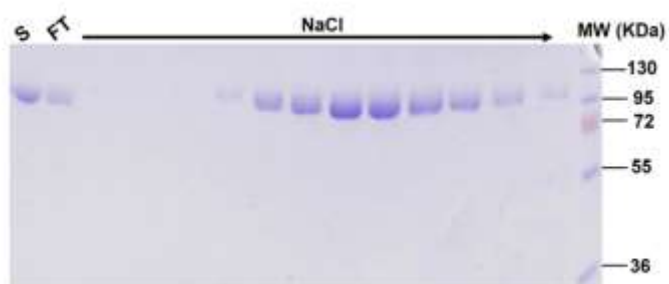
C



D



E



F

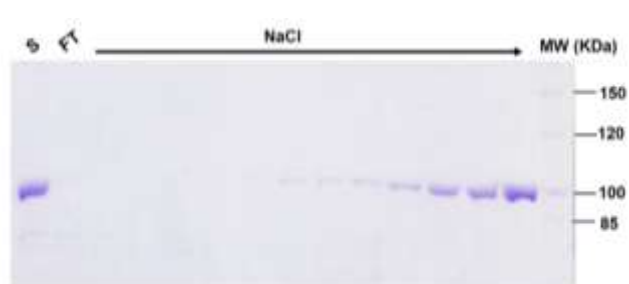


Figura 17. Purificación por intercambio iónico de las mutantes de AtPOLs. Geles de poliacrilamida SDS al 8 % de la purificación en columnas SP sefarosa, en el gel **A)** se muestra las diferentes fracciones del gradiente de NaCl, se observa la mayor elución de la mutante A1 en las fracciones 200 y 250 mM de NaCl. **B)** la figura muestra las diversas fracciones en el gradiente de NaCl, la mayor concentración de la mutante B1 ocurre en 150 y 200 mM de NaCl. **C)** Se muestra las diferentes fracciones obtenidas del gradiente de NaCl, las concentraciones en que eluyó la mayor parte de la proteína AtPOLIA-KF fueron 150, 200, 250 y 300 mM. **D)** el gel muestra las fracciones correspondiente al gradiente de NaCl, la mutante AtPOLIB-KF eluyó principalmente de 200 a 400 mM de NaCl. **E)** los carriles corresponden a las fracciones del gradiente salino, se observa que la mutante AtPOLIA-KF exo- eluyó entre 450 y 800 mM de NaCl. **F)** los carriles corresponden al gradiente de NaCl, dónde se observa que la proteína AtPOLIB-KF exo- eluye de 500 a 80 mM de NaCl.

5.4 Las ADN polimerasas organelares de *A. thaliana* son ADN polimerasas funcionales y con capacidad exonucleolítica

Después de realizar ensayos para marcar el oligonucleótido y optimizar las concentraciones adecuadas en las mezclas de reacción, se evaluó la capacidad de polimerización de las mutantes A1 y B1 (de aquí en adelante estas mutantes se denominarán AtPOLIA y AtPOLIB respectivamente) de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Se escanearon las pantallas Phosphor Screen con el equipo Storm y se observó el patrón que se muestra en la figura 18B. En la figura se puede apreciar un producto de 45 nucleótidos tanto en el control T7 DNA Polimerasa como en las mutantes AtPOLIA y AtPOLIB.

Utilizando el mismo sustrato empleado para evaluar la capacidad de polimerización, se procedió a realizar el ensayo de exonucleólisis de acuerdo al protocolo anteriormente descrito. La foto obtenida después de escanear el gel muestra un patrón de degradación del oligonucleótido A marcado hasta 2 nucleótidos en el caso del control T7 ADN polimerasa silvestre. Para las mutantes AtPOLIA y AtPOLIB se observa un patrón de degradación del oligonucleótido A marcado, decreciendo en el orden de un nucleótido hasta obtener producto de

aproximadamente 5 y 14 nucleótidos respectivamente como se aprecia en la figura 18A.

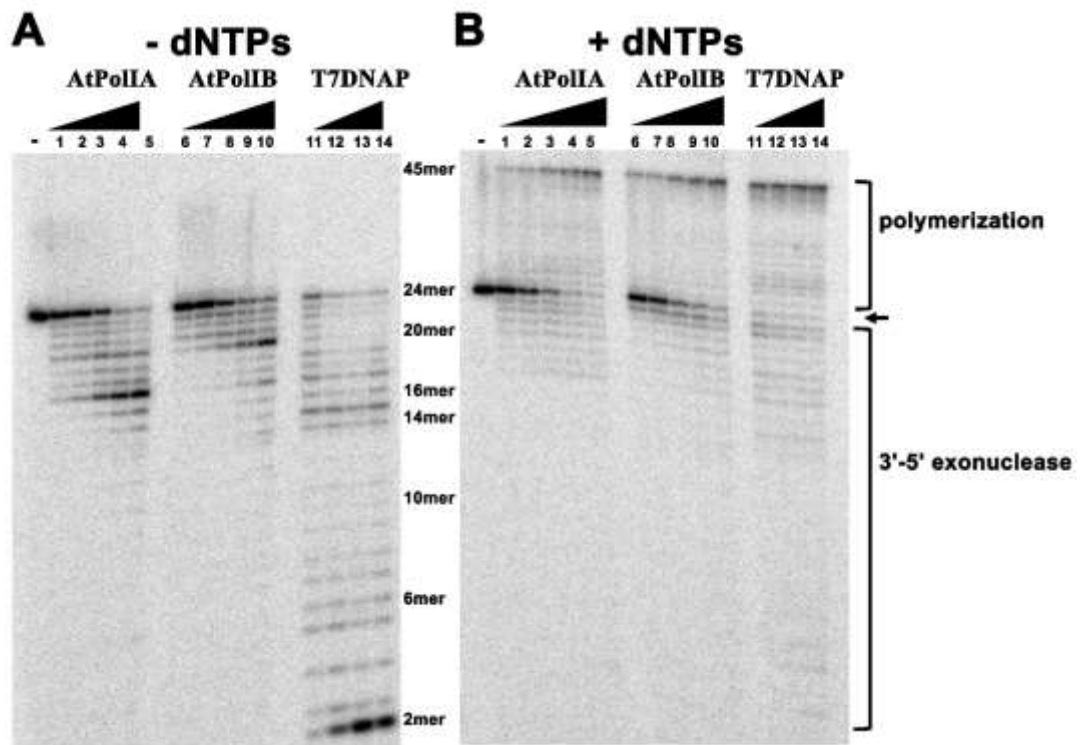


Figura 18. Ensayo exonucleasa y polimerización de las mutantes AtPOLs. Gel de poliacrilamida al 18 % 8 M de urea donde en el panel **A)** Se muestra la actividad exonucleasa. Las diferentes enzimas a una concentración de 20 nM, fueron incubadas con un sustrato ADNdc radio marcado A 2 nM final en ausencia de dNTPs, la reacción se incubó a 37 °C Y Se tomaron tiempos de 30 segundos, 1, 2, 4 y 8 minutos. La degradación del oligonucleótido marcado se observó en las diferentes mutantes (carriles 1 al 10) y de igual forma en el control T7DNAP (carriles 11 al 14). **B)** Se muestra la actividad de polimerización. Las diferentes enzimas a una concentración de 20 nM, fueron incubadas con un sustrato ADNdc radio marcado a 2 nM final en presencia de dNTPs a 270 μ M, la reacción se incubó a 37 °C y Se tomaron tiempos de 30 segundos, 1, 2, 4 y 8 minutos. Se observó la elongación del oligonucleótido marcado hasta 45 nt en las diferentes mutantes (carriles 1 al 10) y de igual forma en el control T7DNAP (carriles 11 al 14).

5.5 Síntesis de translesión de ADN por polimerasas organelares de *A. thaliana*

Como se detalló en el protocolo, las mutantes AtPOLIA-KF, AtPOLIB-KF y AtPOLIB-KF *exo⁻* son las que se evaluaron por su fácil purificación y buen rendimiento. Después de realizar el ensayo como se describió anteriormente y exponer los geles desnaturalizantes, se escaneo la pantalla Phosphor Screen en el equipo Storm y se obtuvo la figura 19, donde se observa que en el sustrato control se ve un producto de 59 nucleótidos correspondiente al tamaño máximo del oligonucleótido templado al que estaba unido el oligo universal marcado. En el caso del sustrato que presentaba un sitio abásico en el templado, se observa un producto correspondiente a 59 nucleótidos que corresponde al tamaño máximo del templado oligo Ábásico para las mutantes AtPOLIA-KF, AtPOLIB-KF y AtPOLIB-KF *exo⁻* y éste producto no se observó en el ensayo con la enzima Fragmento Klenow.

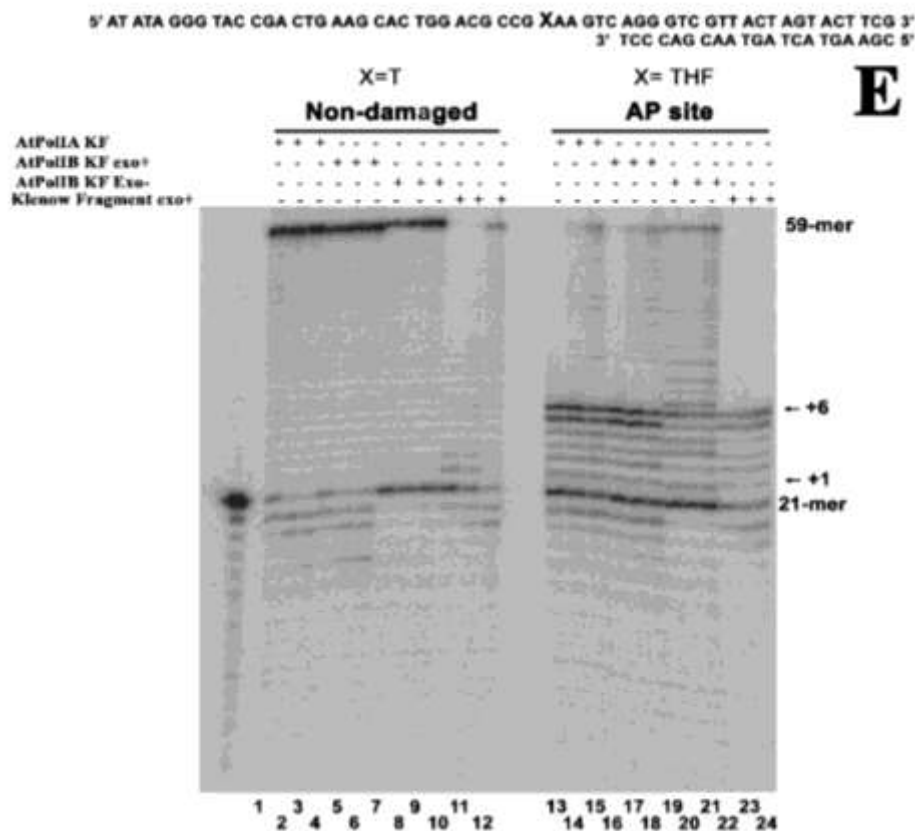


Figura 19. Síntesis de translesión de ADN con sitio abásico por mutantes de AtPOLs. La síntesis de ADN con lesiones se llevó a cabo con el sustrato indicado en la figura. En el lado izquierdo de la figura se muestra replicación a través de un ADN sin daño. Las diferentes enzimas se incubaron a 20 nM con sustrato ADNdc a 2 nM en presencia de dNTPs a 270 μ M, la reacción se llevó a cabo a 37 °C y se detuvo a 30 segundos, 2 y 8 minutos. Se observó la elongación del oligonucleótido hasta 59 nt en todas las mutantes (carriles 1 al 9) así como en el control (carriles 10 al 12). En la parte derecha de la figura se muestra la misma reacción, en este caso se incubaron las enzimas con un sustrato que contenía un sitio abásico. Se observa que la mutante AtPOLIA-KF muestra un producto de 59 nt al minuto a partir del minuto 2 (carriles 14 al 15), la mutante AtPOLIB-KF muestra la banda de 59 nt a partir del minuto 2 (carriles 16 al 18), la versión *exo* muestra una alta formación del producto de 59 nt desde los primeros 30 segundos (19 al 21). El control Fragmento Klenow muestra solo un producto máximo de 27 nt, sitio donde se encuentra la lesión.

Los ensayos realizados para determinar si las AtPOLs son capaces de replicar a través de ADN bases nitrogenadas alteradas (isómeros de timin glicol) y que fueron expuestos en pantallas Phosphor Screen, se escanearon y se procedieron a analizar. En la figura 20 se muestra el resultado donde se evaluó el daño timin glicol 5R-6S, en todas las mutantes de las AtPols se observa un producto de 30 nucleótidos que corresponde a la longitud máxima del templado dañado. Como se esperaba la polimerasa ScMIP1 mostró un producto de amplificación de 30 nucleótidos, no así la T7 ADN polimerasa silvestre. Para el caso del daño timin glicol 5S-6R, las mutantes de las AtPols mostraron el producto de 30 nucleótidos como se aprecia en la figura 21. El control positivo, ScMIP1, de igual forma mostró una banda de 30 nucleótidos y el control negativo T7 ADN polimerasa como se esperaba no mostró este producto.

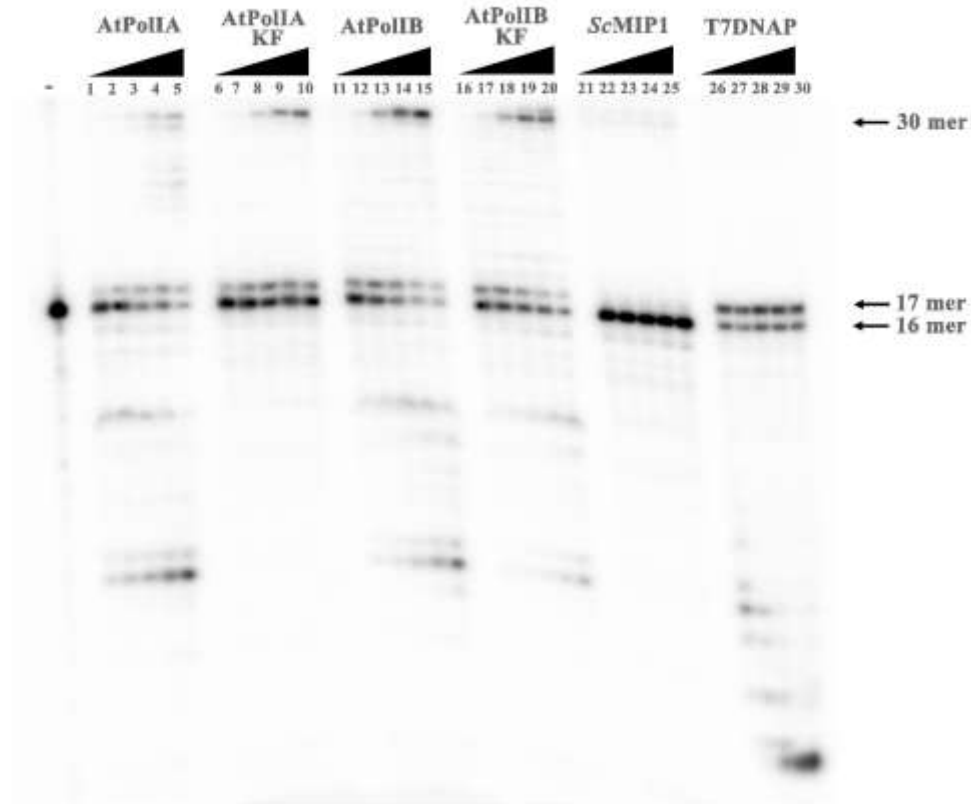


Figura 20. Síntesis de translesión de ADN través del aducto timin glicol 5R-6S por AtPOLs. Se incubaron las enzimas con un sustrato que contenía el aducto timin glicol 5R-6S. Las diferentes enzimas se incubaron a 20 nM con el sustrato ADNdc a 2 nM en presencia de dNTPs a 270 μ M, la reacción se llevó a cabo a 37 $^{\circ}$ C y se detuvo a 30 segundos, 2, 4 y 8 minutos. Se observó la elongación del oligonucleótido hasta 30 nt en todas las mutantes AtPOLs (carriles 1 al 20). La polimerasa ScMIP1 muestra apenas el producto de 30 nt (carriles 21 al 25) y la T7DNAP no muestra el producto, sólo incorpora el nucleótido en la posición del daño (carriles 26 al 30).

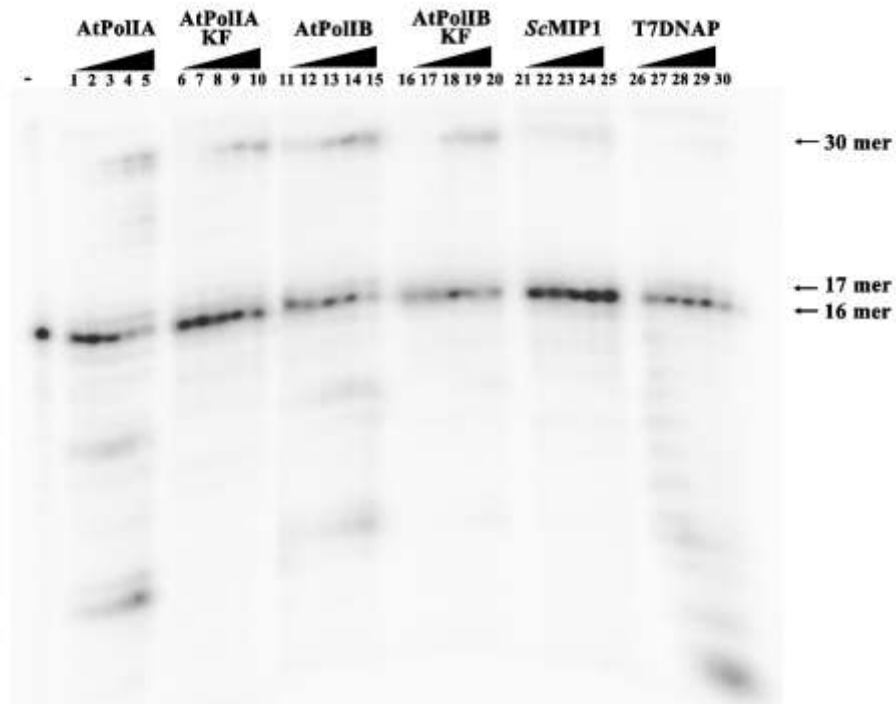


Figura 21. Síntesis de translesión de ADN través del aducto timin glicol 5S-6R por AtPOLs. Se incubaron las enzimas con un sustrato que contenía el aducto timin glicol 5S-6R. Las diferentes enzimas se incubaron a 20 nM con el sustrato ADNdc a 2 nM en presencia de dNTPs a 270 μ M, la reacción se llevó a cabo a 37 $^{\circ}$ C y se detuvo a 30 segundos, 2, 4 y 8 minutos. Se observó la elongación del oligonucleótido hasta 30 nt en todas las mutantes AtPOLs (carriles 1 al 20). La polimerasa ScMIP1 muestra apenas el producto de 30 nt (carriles 21 al 25) y la T7DNAP no muestra el producto, sólo incorpora el nucleótido en la posición del daño (carriles 26 al 30).

5.6 ADN polimerasa organelares de *A. thaliana* capaces de hacer desplazamiento de hebra

El ensayo para determinar si éstas AtPOLs presentaban desplazamiento de hebra se realizó siguiendo el protocolo detallado anteriormente. Aquí se evaluaron las mutantes AtPOLIA, AtPOLIB, AtPOLIB-KF y el control fue la T7 ADN polimerasa. Después de correr el gel desnaturizante y exponerlo en la pantalla Phosphor Screen se escaneo en el equipo Storm y el resultado se observa en la figura 22, donde se aprecia un producto de 65 nucleótidos en todas las mutantes de las AtPOLs, con diferencia en la intensidad de la banda del producto. En el control aparece una banda muy marcada de 46 nucleótidos que coincide con la posición donde empieza la doble cadena de ADN en el sustrato, ésta banda también aparece en diferentes intensidades en las mutantes de las AtPOLs.

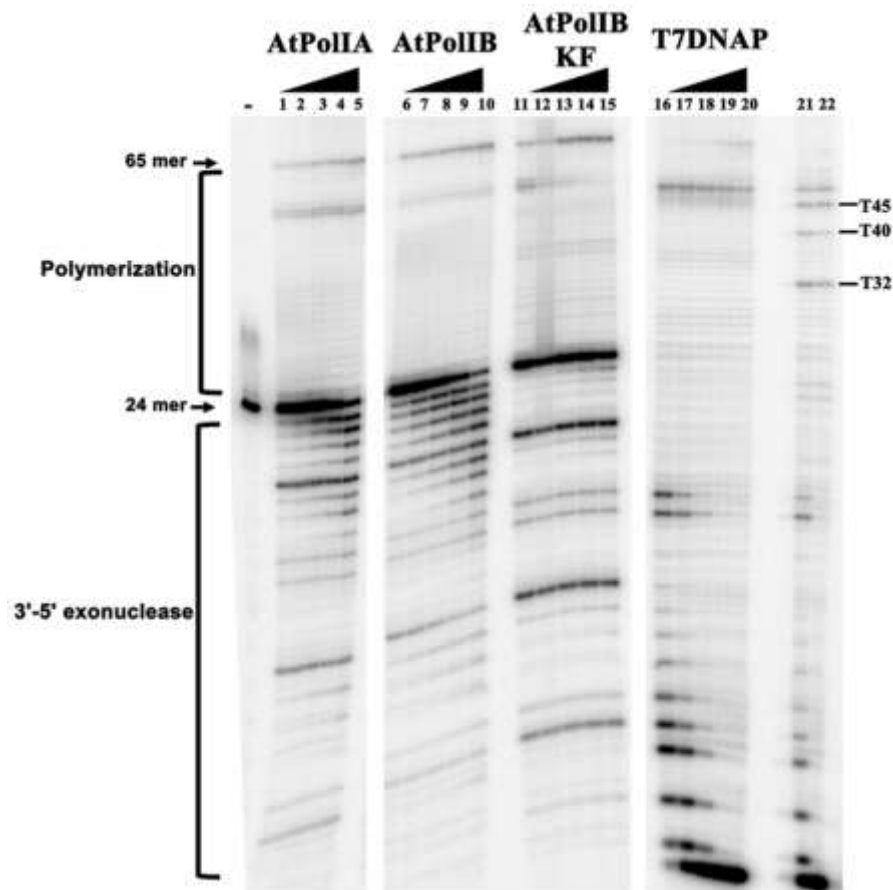


Figura 22. Capacidad de desplazamiento de hebra por AtPOLs. El desplazamiento fue determinado usando un sustrato con un espacio de 6 nt entre dos oligonucleótidos. Las reacciones contenían 20 nM final de la enzima correspondientes y 5 nM final de sustrato en presencia de dNTPs a 270 μ M. Se tomaron tiempos de 30 segundos, 1, 2, 4 y 8 minutos. Se observa que tanto AtPOLIA (A1) como AtPOLIB (B1) muestran desplazamiento de hebra (carriles 1 al 10), la mutante AtPOLIB-KF mostró mayor actividad de desplazamiento de hebra (carriles 11 al 15) y el control T7DNAP exo^- no muestra actividad de desplazamiento marcado (carriles 16 al 20), en los carriles 21 y 22 se indica el control de tamaño en bases, en dicha reacción fue adicionado ddATP además de los dNTPs.

5.7 condiciones de cristalización de la mutante AtPOLIB-KF exo^-

Después de varios pasos de purificación, se observó que la forma poco convencional de concentrar, permitió concentrar la proteína AtPOLIB-KF exo^- de 40 ml a 2 ml de forma muy rápida y simple. Después de poner las 96 condiciones del kit de cristalización Morpheus (Molecular Dimensions), a los 3 días se observaron unos cristales en la condición MD1-32 muy probablemente de magnesio (Figura 23A), ya que también se encontraban en el control que tenía todo menos la enzima. A los 14 días se observó un único cristal multicolor en la condición MD1-35 (Figura 23B) que puede tratarse de algo más que de proteína, porque también se observó en el control. Finalmente, a las 3 semanas se observó un cristal único en la condición MD1-48 y que se trata muy probablemente de un cristal de proteína, ya que el control se observaba transparente (Figura 23C).

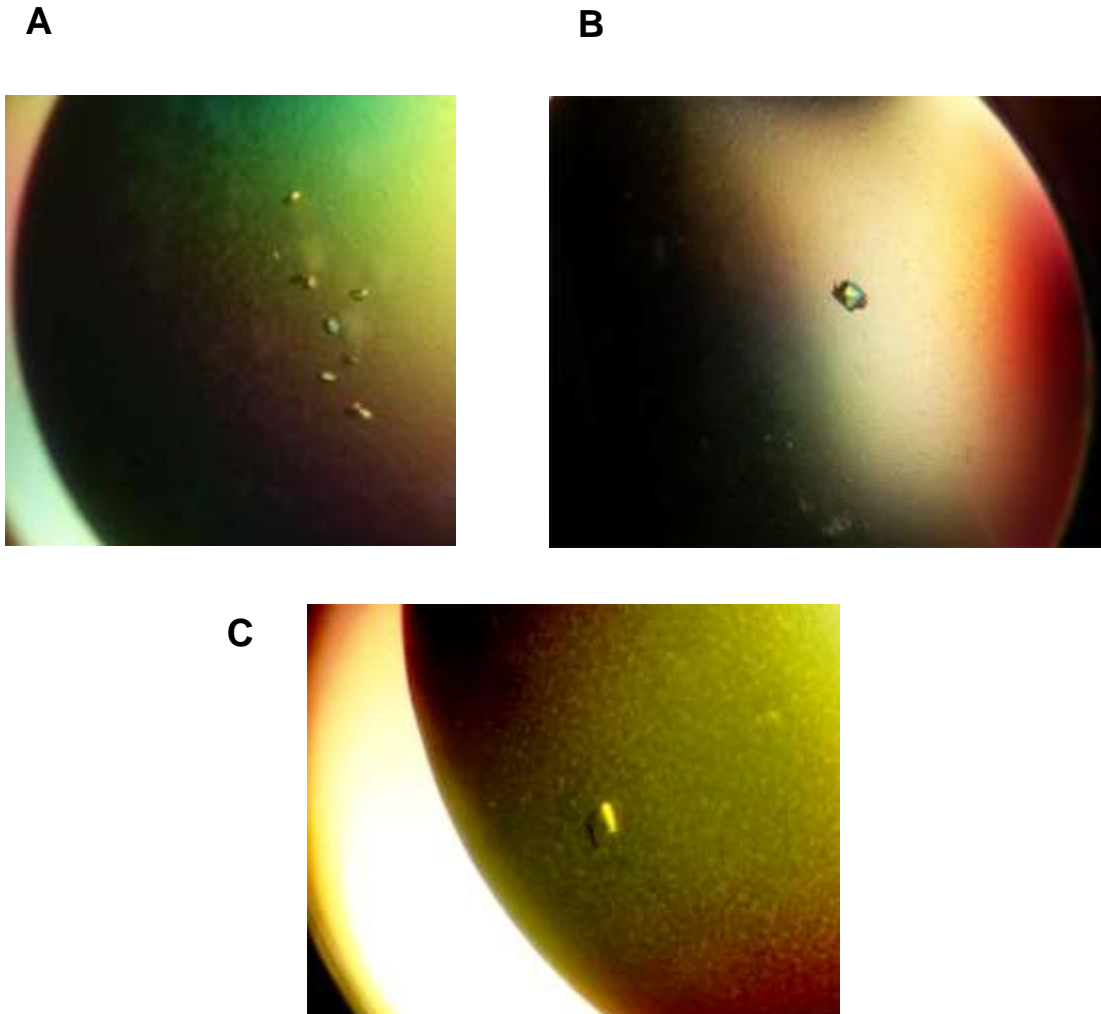


Figura 23. ensayo cristalográfico de la mutante AtPOLIB-KF exo^- . Fotografía tomada a las condiciones que mostraron cristales. **A)** se muestra un grupo de cristales multicolores que son probablemente de magnesio. **B)** se muestra un cristal único multicolor posiblemente también a cristal de magnesio. **C)** Cristal único obtenido en la condición donde la proteína está a 7.7 mg/ml y en su reservorio control sin enzima no crecieron cristales, es altamente probable un cristal de proteína.

VI. Discusión

Las plantas son organismos eucariontes cuyas células poseen organelos semiautónomos conteniendo genomas: el cloroplasto y la mitocondria. En estos organelos es donde se llevan a cabo las reacciones energéticas cruciales de la célula y a pesar de que son organelos muy importantes no se sabe con certeza cuál es la polimerasa encargada de replicar sus genomas. A través de diversos estudios se tiene evidencia que existe un tipo de ADN polimerasas que son codificadas en el núcleo de plantas y protistas y se relocalizan tanto a cloroplasto como a mitocondria, (Christensen et al, 2005, Moriyama et al., 2013, Moriyama et al., 2014) éstas son las candidatas más probables para replicar el genoma en dichos organelos. Las POPs como se han denominado, pertenecen a la familia A y de acuerdo a algunos estudios bioquímicos con algunas representantes de éste grupo novedoso, se ha determinado que presentan la capacidad 3'-5' exonucleasa y la capacidad de replicar ADN, también se ha visto que presentan alta procesividad (Takeuchi et al., 2007, Moriyama, et al., 2008). El genoma nuclear de *A. thaliana* codifica para dos POPs, denominadas como AtPOLIA y AtPOLIB que a la fecha no se han evaluado bioquímicamente para caracterizar sus funciones. Éstas AtPOLs tienen una relación más cercana con la ADN polimerasa I de *E. coli* (aproximadamente 31 % de identidad de secuencia) que con la ADN polimerasa del bacteriófago T7. Siendo éste grupo de polimerasas organelares diferentes a las ADN polimerasas del tipo γ que son las que se han encontrado en los organelos de animales y hongos y que están relacionadas evolutivamente a la polimerasa del bacteriófago T7 (Mori et al., 2005). En el dendograma se observó también que las POP se dividieron en dos grupos principales: en las de plantas y en las de protistas, éstas a su vez se sub agruparon en POPs de algas y de amebozoos, sugiriendo que dichas polimerasas han sufrido cambios estructurales con respecto a las más ancestrales en las que algunas funciones posiblemente sean residuales.

El ambiente del cloroplasto y la mitocondria es un sitio muy estresante para un genoma, puesto que ahí se producen gran cantidad de radicales libres de oxígeno (ROS), agentes alquilantes y además están expuestos a alta radiación UV. Todos

estos factores son los causantes de alteraciones en el ADN, ya sea oxidación, alquilación, pérdida o aductos de bases nitrogenadas. Por lo que una ADN polimerasa que esté involucrada en la replicación o el mantenimiento del genoma en dichos organelos, debe tener una gama de capacidades para resolver estos problemas. Aunque sólo se tenía evidencia que guardan las funciones de replicación y exonucleólisis (Takeuchi et al., 2007) los datos bioquímicos de este trabajo confirman que las AtPols presentan actividad de polimerización y corrección de errores atribuidos a la presencia de aminoácidos conservados en los dominios 3'-5' exonucleasa y de polimerización. Estos residuos corresponden 4 aminoácidos con grupos carboxílicos (D287 y E89, D361, D467) en los motivos Exo I, Exo II y Exo III del dominio 3'-5' exonucleasa; y 2 residuos de ácido aspártico, uno de tirosina y uno de ácido glutámico (D798, Y884, D998 y E999) situados en los motivos A, B y C en el dominio de polimerización. Los radicales libres de oxígeno además de otros daños en el ADN, generan los dos isómeros de la lesión timin glicol que bloquea la síntesis de ADN por ADN polimerasas como las de la familia B y algunas pueden incorporar un nucleótido frente a la lesión, pero ya no alargan la cadena de ADN. Ambas AtPOLs son capaces de incorporar un nucleótido frente a ambos isómeros de timin glicol y continuar sintetizando el ADN con mucha eficiencia. Existe otro tipo de lesión que puede impedir una replicación eficiente del ADN y se trata del sitio abásico. A la fecha se sabe que algunas ADN polimerasas son capaces de replicar a través de dicha lesión como la ADN polimerasa θ (Seki et al., 2004). Las AtPOLs pueden pasar este tipo de daño poniendo un nucleótido frente a lesión y seguir sintetizando el ADN, mostrando la AtPOLIB mayor eficiencia ante este tipo de daño.

Es el desplazamiento de hebra es la capacidad que permite replicar en sitios donde existe una ruptura de ADN (espacio entre dos hebras de cadena doble de ADN). Ambas AtPols fueron capaces de desplazar hebra, es decir, seguir polimerizando sin disociarse del sustrato. AtPOLIB mostró mayor eficiencia al momento de desplazar hebra con respecto a AtPOLIA. Estos resultados bioquímicos sugieren que la AtPOLIB puede estar jugando un papel más versátil al momento de replicar a través de lesiones o rupturas de ADN y que la principal polimerasa replicativa

puede ser la AtPOLIA y sólo frente a una lesión a pesar de que puede pasarla, ésta es desplazada por la AtPOLIB.

La eficiencia de las ADN polimerasa capaces de replicar a través de ADN dañado, puede deberse a la presencia de un sitio activo más voluminoso en el cual el ADN dañado puede acoplarse bien a la enzima y llevarse a cabo la síntesis translesión. Una segunda posibilidad es la presencia de inserciones adicionales como en el caso de la ADN polimerasa θ y que al parecer no están presentes en otras polimerasas de la familia A. Bajo ésta idea se analizaron secuencias de todas las POPs incluidas las AtPols y se encontraron 3 inserciones adicionales en la región de polimerización pudiéndose pensar que éstas inserciones sean las responsables de que puedan realizar síntesis translesión.

Los ensayos de cristalización realizados con la mutante AtPOLIB-KF exo⁻ formando el compuesto ternario da mayor rigidez a la proteína y permite la formación de cristales a concentraciones proteicas al menos de 7 mg/mL, esto aunado a la bioingeniería que se le realizó a la mutante en sus regiones flexibles.

VII. Conclusiones

- *Arabidopsis thaliana* posee ADN polimerasas organelares que muestran capacidades características en el proceso de síntesis translesión.
- Ambas AtPOLs son capaces de pasar eficientemente lesiones timin glicol 5R-6S y timin glicol 5S-6R provocadas por estrés oxidativo.
- Ambas AtPOLs son capaces de realizar síntesis translesión a través de la lesión de sitio abásico, pero AtPOLIB la realiza más eficientemente que AtPOLIA.
- La enzima AtPOLIB realiza desplazamiento de hebra más eficientemente que AtPOLIA
- La bioingeniería realizada en las regiones flexibles de la mutante AtPOLIB-KF^{exo-} permitió la formación del cristal.

VIII. Perspectivas

Determinar la fidelidad de las enzimas mediante ensayos de más finos utilizando un sustrato sin daño y un sustrato donde el oligo se encuentre una posición antes de la lesión.

Realizar las mutantes de las 3 inserciones en AtPOLIB para determinar si estas inserciones son responsables de la capacidad de síntesis translesión.

Evaluar la actividad de procesividad en ambas AtPOLs

Mejorar las condiciones de cristalización tomando como base la mezcla donde se obtuvo el cristal.

IX. Referencia bibliográfica

Anderson, H. J., Vonarx, E. J., Pastushok, L., Nakagawa, M., Katafuchi, A., Gruz, P., Di Rubbo, A., Grice, D. M., Osmond, M. J., Sakamoto, A. N., Nohmi, T., Xiao, W., and Kunz, B. A. (2008) Arabidopsis thaliana Y-family DNA polymerase eta catalyses translesion synthesis and interacts functionally with PCNA2, *Plant J* 55, 895-908.

Bebenek, K., and Kunkel, T. A. (2004). Functions of DNA polymerases, *Adv Protein Chem* 69 137-65.

Beese, L. S., and Steitz, T. A. (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism, *EMBO Journal* 10, 25–33.

Christensen, A. C., Lyznik, A., Mohammed, S., Elowsky, C.G., Elo, A., Yule, R., and Mackenzie, S. A. (2005). Dual domain, Dual-Targeting Organellar Protein Presequences in Arabidopsis Can Use Non AUG Start codons, *The plant cell* 17 (10) 2805-2816.

Cupp, J. D., and Nielsen, B. L. (2013). Arabidopsis thaliana organellar DNA polymerase IB mutants exhibit reduced mtDNA levels with a decrease in mitochondrial area density, *Physiologia Plantarum* 149:91–103.

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

Double S., and Ellenberger, T. (1998) The mechanism of action of T7 DNA polymerase, *Curr. Opin. Struct. Biol* 8:704–712.

Elo, A., Lyznik, A., Gonzalez, D.O., Kachman, S. D., and Mackenzie, S. A. (2003). Nuclear genes that encode mitochondrial proteins for DNA and RNA metabolism are clustered in the Arabidopsis genome, *Plant Cell* 15:1619-1631.

Furukawa, T., Angelis, K. J., and Britt, A. B. (2015) Arabidopsis DNA polymerase lambda mutant is mildly sensitive to DNA double strand breaks but defective in integration of a transgene, *Front Plant Sci* 6, 357.

Garcia-Diaz, M., and Bebenek, K. (2007) Multiple functions of DNA polymerases, *CRC Crit Rev Plant Sci* 26, 105-122.

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

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

Heinhorst, S., Cannon, G. C., and Weissbach, A. (1990). Chloroplast and Mitochondrial DNA Polymerases from Cultured Soybean Cells, *Plant. Physiol* 92:939-945.

- Inagaki, S., Suzuki, T., Ohto, M. A., Urawa, H., Horiuchi, T., Nakamura, K., and Morikami, A. (2006) Arabidopsis TEBICHI, with helicase and DNA polymerase domains, is required for regulated cell division and differentiation in meristems, *Plant Cell* 18, 879-892.
- Kimura, S., and Sakaguchi, K. (2006). DNA repair in plants, *Chem. Rev* 106:753–766.
- Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., and Korberg, A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem* 233: 163-170
- Longley, M. J., Nguyen, D., Kunkel, T. A., and Copeland, W. C. (2001) The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit, *J. Biol. Chem* 276:38555–38562.
- Manova, V., and Gruszka, D. (2015) DNA damage and repair in plants - from models to crops, *Front Plant Sci* 6, 885.
- Matsuda, T., Bebenek, K., Masutani, C., Rogozin, I. B., Hanaoka, F., and Kunkel T.A.(2001) Error rate and specificity of human and murine DNA polymerase eta, *J. Mol. Biol* 312:335–346.
- Mori, Y., Kimura, S., Saotome, A., Kasai, N., Sakaguchi, N., Uchiyama, Y., Ishibashi., T., Yamamoto, T., Chiku, H., and Sakaguchi., K. (2005). Plastid DNA polymerases from higher plants, *Arabidopsis thaliana*, *Biochem Biophys Res Commun* 334(1):43-50.
- Moriyama, T., and Sato, N. (2013). The Plant and Protist Organellar DNA Replication Enzyme POP Showing Up in Place of DNA Polymerase Gamma May Be a Suitable Antiprotozoal Drug Target, *The Mechanisms of DNA Replication*, Dr. David Stuart (Ed.), InTech
- Moriyama, T., Tajima, N., Sekine, K., and Sato, N. (2014). Localization and Phylogenetic Analysis of Enzymes Related to Organellar Genome Replication in the Unicellular Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*, *GBE* 6 (1): 228-237.
- Moriyama, T., Terasawa., K., Fujiwara, M., and Sato, N. (2008). Purification and characterization of organellar DNA polymerases in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*, *FEBS Journal* 275(11):2899-918.
- Nielsen, B. L., Cupp, J. D., and Brammer, J. (2010).Mechanisms for maintenance, replication, and repair of the chloroplast genome in plants, *Journal of Experimental Botany* 61(10) 2535–2537.
- Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G., and Steitz T.A.(1985). Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with Dtmp, *Nature* 313:762–766.
- Ono, Y., Sakai, A., Takechi, K., Takio, S., Takusagawa, M., and Takano, H. (2007). NtPoll-like1 and NtPoll-like2, Bacterial DNA Polymerase I Homologs Isolated from BY-2 Cultured Tobacco Cells, Encode DNA Polymerases Engaged in DNA Replication in Both Plastids and Mitochondria, *Plant Cell Physiol* 48(12): 1679-1692.
- Ramadan, K., Shevelev, I., and Hubscher, U. (2004). The DNA-polymerase-X family: controllers of DNA quality? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 5:1038–1043.

- Seki, M., Masutani, C., Yang, L.W., Schuffer, A., Iwai, S., Bahar, I., and Wood RD. (2004). High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q, *EMBO Journal* 23(22):4484-94.
- Shutt, T. E. and M. W. Gray (2006). Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins, *Trends Genet* 22(2): 90-95.
- Steitz, T. A. (1999). DNA Polymerases: Structural Diversity and Common Mechanisms, *The Journal of Biological Chemistry* 274(25): 17395-17398.
- Takahashi, S., Sakamoto, A., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Tanaka, A. (2005) Roles of Arabidopsis AtREV1 and AtREV7 in translesion synthesis, *Plant Physiol* 138, 870-881.
- Takeuchi, R., Kimura, S., Saotome, A., and Sakaguchi K. (2007). Biochemical properties of a plastidial DNA polymerase of rice, *Plant Mol Biol* 64(5): 601-11.
- Takeuchi, R., Kimura, S., Saotome, A., and Sakaguchi, K. (2007). Biochemical properties of a plastidial DNA Polymerase of rice, *Plant Molecular Biology* 64:601-611
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony, *Methods. Mol. Biol. Evol* 28:2731-2739.
- Yokoi, M., Ito, M., Izumi, M., Miyazawa, H., Nakai, H., and Hanaoka, F. (1997) Molecular cloning of the cDNA for the catalytic subunit of plant DNA polymerase alpha and its cell-cycle dependent expression, *Genes Cells* 2, 695-709.

X. Apéndice

Genes sintéticos de AtPOLs

>IA1_AT1G50840.1(3162bp)

```
CATATGGCAATGGGTGTGAGCCTGACGAGTCATAATAACCCACTGTTACGTCATCTGTCTCCTT
AAGCTCTTGGGTGTCTCGTAGTAGTAGTAGGCTTAGCTCTAGTCCATTACCTTCTTTTCTGTTTC
CGTGTCTGTCGTACCTTACTGCAACGCAAATTAGCTAGTACGGATGGCAATGTGGGCTATTGTA
CAACAACGGTTTGTGACGGGCTTTCAGCATAGCGTTCATCAGCGCTCTTCTTCAGTGGTGTTAA
TGGTGAATGGGAACGCGTAGCGAATCAAACAAGGTTTCGTATGGTTCCTAAAATCATCAAAGG
GGCAATCAGACGGAAGTTGCGGAAACACATCAGGTTCCGGGCACGGTGAGCGCTTGGCGCG
AAGAAGCCAATAAGCTGCGTGAACGTAATGGTCAGATTGCACGCAACCTTGATGATAATGGCT
ATTTTAATGGCTCAGTTCGATTATCTCTAGCGCTCCGAGCTATGAAACCTCACAGAAAATCGA
TTATGAGTTCAAACCACGCGGCACAACACGTTCTACGACCGCTACCCTGAACAAGGAACTGAT
CGGCATTACACAGTCAGAACCAGTTGTGAGCTTACCGCGCAAAGGTCTGGATGTGGGCGATA
ATATGGATGTTAATCCTAAAGGCGAAGGCATCCAGCGTCCACTGATCTCAGATAAATCTTCAGG
AACTGCCAATGGCAATAAGAATACGGTTGCCATTAGTAAAGTTGAACGCTCAACAGAACCTAGT
AATGTTTCGTGAAAATCTCGGGAAAATCTATGATAAAGTGCTGATCGTTGATAATGTGCAGGCCG
CAAAGATACCGTTGCCAAACTGGTTAATCAGTTTTCGTAATCATGTGCATTCTTGCGATACGGA
AGTGAGCGGCATCGAAGTTAAGAAGAAACACCAGTTGATCATGGTGAACGATTTGCTTTAGT
ATCTATTGCGGCCCGGAAGCCGATTTTGGTAATGGTAAATCTTGTATTTGGGTTGATGTGTTAG
GCGAAAATGGTCGCGAAGTGCTGGCGGAGTTTAAACCTTATTTTGAAGATTCTTTTATTCGTA
AGTTTGGCATAATTATAGCTTTGATTCACATATTATCCGCAATCATGGCATCGAAATCTCAGGCT
TTCATGCCGATACCATGCACATGGCCCGCCTGTGGGATAGTGCCCGTCGCATCAAAGGCGGC
TATAGCTTAGAAGCCCTGACGAGTGATCCTAAAGTGTTAGGCGGTACACAGACGAAAGAAGAA
GCAGAATTTCTGGGCAAATCAGTATGAAAACGATCTTTGGTAAACGCAAACGAAAAAGATG
GTAGCGAAGGCAAGATCGTTGTTATCCCTCCGGTGGAAAGATTACAGCGTGAAGATCGCGAAG
CATGGATCTCTTATAGCGCCTTAGATGCTATCTCAACACTGAAACTGTATGAATCTATGACCAA
AAAACCTACAGCTGATGGATTGGCACCTTGATGGTAAACCAGTGTTAGGTGCGACCATGCTGGA
TTTTTATCATGAATTTTGGCGTCCGTTTGGTGAACGCTGGTTAAGATGGAAGCCGAAGGTATT
CTGGTGGATCGCGAATACCTCGCCGAAATCGAAAAAGTTGCCAAAGCCGAACAGCAGGTTGC
GGGTTACAGCTTTCGTAATTGGGCCTCTAAATATTGTCCGGATGCTAAATATATGAATATCGGC
TCAGATACACAGTTACGCCAGCTGTTCTTCGGCGGTATTAGCAATTCACATGATGAAGTGTTAC
CGGTGGA AAAACTGTTTTAAAGTTCCTAATATCGATAAAGTTATCGAAGAAGGCAAGAAAACCC
GACCAAATTTGCAATATCAAATTACATCGTATTAGCGATAGTCCACTGAGTACGGA AAAATTTTA
CCGCTTCAGGCTGGCCGAGTGTGGGCGGAGATGTGCTGAAAGAATTAGCGGGCAAAGTGAGC
GCCGAATATGATTTTATGGATGATGTGTGACACATATCATTAGAAGAAGTTGTTGAAGATGATG
ATGTTGAAACGAGTGAAACCCAGAAATCTAAAACCGATGATGAAACGGATACGAGTGCGTATG
GCACCGCCTATGTTGCCTTTGGCGGCGGCGAACGCGGTAAGAGGCGGTGTCATGCCATTGCC
TCACTGTGCGAAGTTTGTAGTATCGATAGTCTGATCTCTAATTTTATTCTGCCTCTCCAAGGCTC
TAATGTGAGCGGCAAAGATGGTCGCGTGCATTGTAGTCTGAATATTAATACGGAACGGGTGCG
TCTGAGTGCACGTCGTCTAACCTACAGAATCAGCCGGCCCTGGAAAAAGATCGCTACAAAAT
TCGCAAAGCCTTTGTTGCGTCTCCGGTAATACCCTGGTGGTTGCCGATTATGGTCAGCTGGA
ACTGCGCATCCTGGCCCATCTGACGGGCTGTAAATCTATGATGGAAGCCTTTAAAGCAGGCCG
CGACTTTCAATCACGCACCGCCATGAATATGTATCCACATGTTCCGCGAAGCCGTTGAAAATGG
CCAGGTTATCTTAGAATGGCATCCGGAACCAGGCGAAGATAAACCTCCAGTTCCACTGCTGAA
AGATGCGTTTGGTAGCGAACGTCGTAAAGCCAAAATGCTGAATTTTTCTATTGCGTACGGCAAA
ACGGCTGTGGGCTGTCTCGCGATTGGAAAGTGAGCACCAAAGAAGCACAGGAAACCGTGGA
TCTGTGGTATAATGATCGCCAGGAAGTTGCGAAATGGCAGGAAATGAGAAAGAAGAAGCCAT
CGAAGATGGCTATGTGCTGACCTTACTGGGTCGCTCACGTGCTTTCGGGCCTCAAAAATCGAG
AGCCCAGCGCAATCATATCCAGCGCGCCGATCAATACCCCGGTGCAGGGCTCTGCCGCCG
```

ATGTTGCCATGTGCGCCATGCTGGAAATTAGCATCAATCAGCAGCTGAAAAAACTGGGTTGGC
GCTTACTGCTTCAAATCCATGATGAAGTTATCCTGGAAGGTCCTATCGAATCTGCGGAAATTGC
CAAAGATATTGTTGTGGATTGTATGAGCAAACCGTTTAAATGGTCGCAATATCCTGAGCGTGGAT
CTGTCAGTGGATGCCAATGCGCACAGAATTGGTATGCAGCTAAATAAGGATCC

> PolB2_ AT3G20540.1 (3114bp)

CATATGGGCGTGAGTCTGCGTCATCTGAGTCCGAGCAGCTTTTGGGTGTCTCGTCGTCCTCCCGT
GTGTCTTCAAGCATTCTGTCTTTTCTGGTTCACGCCGTCGTATCCTGTGTACCCGCAAAGTTG
CCATCATTAAAGGCAATGCGGGCTATTCAACAGCTACCGATTGCGGCGGCTCACATGGCTTTC
ATCATAGCGGTCATCAGCGCTCAAGTAGCGTTGAGTTCAGCGGCGAGTGAAACTGAATCTCG
GCTCTAAAACCGCCCGCATGGTTCCTCCAACGGTTAAACAGGCGCGGTGCAGTGAGCGCTTGG
CGCGAAGAAGTTAATAACAAATTACGGGGCCGTAATCGCGAATATGCCAACAACCAGGATGAT
GCGTTTGGCAATGGTAGCTATATCCTGAAAGGTTTTGTTCTAAAATTGATGATGTGCATTCTTA
TGGCAATGGTCAGAATTTTATTATAATCTGAAACCGGGCACCGATATAACGACCTTAGGTCGC
GAACTGAATGGCTTTATGCAGACCAATAGTATCCGCGGTAGCGTTGTTGCACTGCCTAGTAAA
GATATAGAAGTGGGCGAAACGACGGATGTGACCCTGAAACCACTGAATAGCGATACAACCTTA
GATAATGCCTCTTACAAAAAGACCGCTACCATTAGCAAAGTTGAAAAATGTACCAATCTGTCAC
AGGTTGCGCGCTAATCTGAAGAAAATCTACAATCGCGTTCGTGTTGTGGATAATGTGTCTTCTGC
CAAAGAAACGGTTGCACTGCTGATGAATCAGTATCGTAACTTGGTTCATGCTTGCATACGGAA
GTGTCACGCATCGATGTTAAAACGGAACCCCGGTGGATCATGGTGAATGATCTGCTTTTCTA
TCTATTGCGGCTCAGAAGCCGATTTTGGGGACGGCAAATCTTGTATTTGGGTGGATGTGCTGG
GTGAAAATGGTCGCGATATTCTGGCCGAGTTCAAACCGTTCTTTGAGGATTCAAGCATCAAAAA
AGTTTGGCATAATTATAGCTTTGATAATCATATTATCCGCAATTATGGCATCAAACCTGAGCGGTT
TTCATGGCGATACCATGCACATGGCTCGCCTGTGGGATAGTAGTCGTCGCATCTCAGGCGGCT
ATAGCTTAGAAGCTCTGACCTCAGATCCTAAAGTGTGCGGTGGTACGGAACCAAGAAGAAG
CAGAAGTGTGGCAAATCTCTATGAAGAAAATATTTGGTAAAGGCAAACCTGAAAAAAGATGG
TTCAGAAGGCAAACCTGGTTATTATCCCTCCGTTAAAGAAGTACAGATGGAAGATCGCGAGGC
TTGGATTTCTTATAGTGCCCTGGATTCTATCTCAACCCTGAAACTGTATGAATCGATGAAAAAC
AGTTACAGGCCAAAAAATGGTTTCTGGATGGTAAACTGATCTCTAAGAAGAACATGTTTGATTTT
TATCAGGAATATTGGCAGCCGTTTGGCGAACTGTTAGCCAAGATGGAATCAGAAGGGATGCTC
GTAGATCGCGATTACCTAGCCAGATCGAAATTGTTGCCAAAGCCGAACAGGAAATTGCAGTG
TCACGCTTTCGCAATTGGGCTAGTAAACATTGTCCGGATGCCAAACACATGAATGTGGGCTCA
GATACACAGTTACGCCAGCTGTTCTTCGGCGGTATTTCTAATAGTTGTAATGATGAGGACCTGC
CGTATGAAAAACTGTTTAAAGTTCCTAATGTGGATAAAGTATCGAAGAAGGCAAGAAACGTGC
TACCAATTTTCGCAATATTAATTACATCGTATTAGTGATCGTCCATTACCTACGGAAAAAGTTTA
CCGCTTACAGGCTGGCCTAGCGTGAGCGGCGATACACTGAAAGCCCTGGCCGGTAAAAGTGAGT
GCCGAATATGATTATATGGAAGGTGTGTTAGACACCTGCTTAGAAGAAAATATCGGCGATGATG
ATTGTATCTCTTTACCGGATGAAGTTGTGGAAACACAGCATGTTAATACGAGCGTGGAAATCAGA
TACCTCTGCGTATGGTACGGCCTTTGATGCGTTTTGGCGGCGGCAATCAGGTAAGAGGCCT
GTCATGCCATTGCTGCCCTGTGCGAAGTGTGTAGTATCGATTCACTGATCTCTAATTTTATCCT
GCCGCTACAAGGTAGCAATGTGTCAGGTAAGATGGTCGCGTTCATTGTAGTCTGAATATCAAT
ACGGAACGGGTGCTCTGAGCGCACGCCGTCTAACCTACAGAATCAGCCGGCCTTAGAAAA
AGATCGCTACAAAATTCGTACAGCCTTTATTGCTTCTCCGGGCAATAGCTTAATCGTTGCAGAT
TATGGCCAGCTGGAAGTGCATCTTAGCACATTTGGCCTCTTGCGAATCTATGAAAGAAGCC
TTTATTGCGGGCGGGGACTTTTATTCCCAGACGGCCATGAATATGTATCCACATATTCGTGAAG
CAGTGGAAAATGGCGAAGTGTACTGGAATGGCATCCACAGCCGGGTCAGGAAAAACCTCCA
GTTCCGTTACTGAAAGATGCCTTTGCTAGTGAACGTCGAAAGCTAAAATGCTGAATTTTAGTA
TTGCCTATGGCAAACCGCCATCGGTCTGAGTCGTGATTGGAAAGTGTCTCGCGAAGAAGCCC
AGGATACCGTTAATCTGTGGTATAATGATCGCCAGGAAGTTCGTAAATGGCAGGAACTGCGCA
AAAAAGAAGCCATCCAGAAAGGCTATGTGCTGACCTTACTGGGTGCGCGCAAGAAAATTTCCGG
AATATCGCTCGCGCGCACAGAAAATCATATCGAACGTGCAGCCATCAATACACCAGTGCAGG
GCTCAGCCGCGATGTTGCCATGTGCGCCATGTTAGAAATCTCTAACAACCAGCGCCTGAAAG

AACTGGGCTGGAAACTGCTGTTACAGGTTTCATGATGAAGTGATCCTGGAAGGTCCGAGCGAAT
CAGCCGAAAATGCCAAAGATATTGTTGTTAATTGTATGAGCGAACCGTTTAATGGCAAAAATAT
CCTGAGCGTGGATCTGTCAGTTGATGCTAAATGCGCCCAGAATTGGTATGCGGGCAAATAAGG
ATCC

Medio LB

Por cada 1000 mL de solución, el medio LB contiene:

- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 10 g de cloruro de sodio

Se ajusta el volumen a 1000 mL con agua miliQ y se esteriliza en autoclave

Para preparar medio LB-agar se añade 15 g de agar por cada 1000 ml de medio líquido LB

Protocol A. Plasmid DNA purification using centrifuges

Steps

1. Resuspend the pelleted cells in 250 μ L of the Resuspension Solution. Transfer the cell suspension to a microcentrifuge tube. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain. Note. Ensure RNase A has been added to the Resuspension Solution
2. Add 250 μ L of the Lysis Solution and mix thoroughly by inverting the tube 4-6 times until the solution becomes viscous and slightly clear. Note. Do not vortex to avoid shearing of chromosomal DNA. Do not incubate for more than 5 min to avoid denaturation of supercoiled plasmid DNA.
3. Add 350 μ L of the Neutralization Solution and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4-6 times. Note. It is important to mix thoroughly and gently after the addition of the Neutralization Solution to avoid localized precipitation of bacterial cell debris. The neutralized bacterial lysate should become cloudy.
4. Centrifuge for 5 min to pellet cell debris and chromosomal DNA.
5. Transfer the supernatant to the supplied GeneJET spin column by decanting or pipetting. Avoid disturbing or transferring the white precipitate.
- 6 Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.
8. Add 500 μ L of the Wash Solution (diluted with ethanol prior to first use as described on p.3) to the GeneJET spin column. Centrifuge for 30-60 seconds and discard the flow-through. Place the column back into the same collection tube.
- 9 Repeat the wash procedure (step 8) using 500 μ L of the Wash Solution.

10 Discard the flow-through and centrifuge for an additional 1 min to remove residual Wash Solution. This step is essential to avoid residual ethanol in plasmid preps.

11 Transfer the GeneJET spin column into a fresh 1.5 mL microcentrifuge tube (not included). Add 50 μ L of the Elution Buffer to the center of GeneJET spin column membrane to elute the plasmid DNA.

12. Discard the column and store the purified plasmid DNA at -20°C .

Buffer TAE 1X

40 mM Tris (pH 7.6) ■

20 mM acetic acid ■

1 mM EDTA

Gel de agarosa al 1 %

Pesar 1 g de agarosa y aforar hasta 100 ml con amortiguador TAE 1X

Calentar hasta fundir la agarosa, dejar enfriar y adicionar 1 μ L de bromuro de etidio

Mapa del vector pET19b-pps

pET-19b sequence landmarks

T7 promoter	472-488
T7 transcription start	471
His-Tag coding sequence	366-395
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> HI)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lac</i> I coding sequence	875-1954
pBR322 origin	3891
<i>bla</i> coding sequence	4652-5509

