



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD IRAPUATO

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

“Proteínas de polimerización de Ácidos Nucleicos”

TESIS QUE PRESENTA

Q.A. FRANCISCO JAVIER CÓRDOBA ANDRADE

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Director de Tesis: Dr. Luis Gabriel Briebe de Castro

Irapuato, Guanajuato.

Febrero 2019

Agradecimientos

Los fondos para el capítulo 1 de este proyecto fueron otorgados por el Fondo CONACYT Ciencia Básica a través del proyecto CONACYT [253757].

Los fondos para el capítulo 2 de este proyecto fueron otorgados por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social FOSISS-CONCYT a través del proyecto “Validación de un sistema de detección de agentes infecciosos de importancia clínica por medio de la amplificación del DNA isotérmico” con clave 261354 y convenio I1000/890/2015.

Agradecimientos

Al gobierno de México por la beca otorgada a través de CONACYT [615598].

Un profundo agradecimiento al Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro investigador titular del laboratorio de Bioquímica estructural por haberme dado un lugar en su grupo de investigación por la paciencia, por las enseñanzas y conocimientos que me ha podido compartir, así como como la confianza que me ha depositado en mi persona al asignarme estos los dos temas de investigación bajo su dirección.

Al Dr. Luis Eugenio González De la Vara y al Dr. Alejandro Blanco Labra por haber formado parte de mi comité, ya que gracias a sus correcciones y aportaciones éste trabajo es posible.

De la misma manera agradezco la asesoría del M. en C. Antolín Peralta Castro bajo la cual aprendí las técnicas necesarias para poder desempeñarme en un laboratorio de esta magnitud, así como la calidez humana que en muy pocas personas he podido sentir. Cabe destacar que él es autor de los diseños experimentales del capítulo I de este proyecto de tesis.

Al M. en C. Noe Baruch Torres por ser un excelente compañero gracias al cual tuvo a bien ayudarme con el ensayo de actividad (gel de radioactividad) del capítulo II.

A la Ing. Corina Diaz Quesada, pieza clave ya que durante mi estancia en el laboratorio siempre se ha preocupado por conseguir todo lo necesario (material, equipo y reactivos) para poder realizar mis experimentos, de ella he aprendido muchas cosas (técnicas como las mutaciones puntuales, buenas prácticas de laboratorio, así como el orden y limpieza en las mesas de trabajo) .

Al Dr. Carlos Humberto Trasviña-Arenas por ser mi maestro y mentor recién llegué al laboratorio, por mostrarme que el orden en la bitácora es una costumbre que siempre se debe mantener.

A Julián Vázquez Flores que, aunque en teoría era mi alumno, terminó siendo mi mentor, a mis queridos amigos, a Eduardo Castro Torres, Alma Fuentes Pascasio, Paola Libertad Medel, Pedro Jimenez Sandoval, a Victor Ayala y en éstos últimos meses a Luis Bueno.

La familia es una de las Obras maestras de la Naturaleza, muchas gracias
A mi Padre José Luis Cordoba Rodriguez, a mi madre Eva Andrade Lora, a mis hermanos Luis Daniel, Victor Manuel y Juan Pablo.

A Fanny Estefanía Oliva Duran por convertirte en mi inspiración y motivación.

1. INDICE

2. CAPITULO I:	VI
3. Introducción	2
4. Antecedentes	4
4.1. Estructura	5
4.1. Secuencias de iniciación	7
4.2. Mecanismo de Síntesis de iniciadores	7
4.2.1. Síntesis de primers por la T7 DNA primasa	7
4.2.2. Función Estructural del Dominio Dedos de Zn de T7	11
4.2.3. Dominio de polimerización RNAP de T7.....	12
4.3. Replicación mitocondrial en plantas	13
4.3.1. La primasa organelar de <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
5. HIPÓTESIS.....	16
6. OBJETIVOS.....	16
6.1. Específicos:.....	16
7. METODOLOGÍA.....	17
7.1. Mutagénesis dirigida y construcción de proteína quiméricas	17
7.2. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	17
7.3. Purificación por columna de afinidad a níquel.....	18
7.4. Purificación por columna de Heparina.....	18
7.5. Remoción de etiqueta de Histidinas	18
7.6. Purificación por Exclusión molecular	19
7.7. Polimerización de iniciadores por mutantes puntuales frente a templado con secuencia canónica	19
7.8. Ensayo de elongación frente a múltiples templados	19
7.9. Elongación de iniciadores de proteínas quiméricas.....	20
7.10. Reacción en <i>Trans</i> Polimerización.....	20
7.11. Polimerización de iniciadores síntesis de iniciadores acoplados a polimerización.....	20
8. RESULTADOS	21
8.1. Análisis <i>in silico</i>	21
8.2. Polimerización de mutantes puntuales frente a templado 5'-CGGA-3'.....	22
8.3. Ensayo de elongación frente a múltiples templados	24
8.4. Elongación de primers de proteínas quiméricas.....	25

8.5.	El subdominio ZBD y RPD reaccionan en trans	27
8.6.	Ensayo de primasa acoplado a polimerasa	28
9.	DISCUSIÓN.....	29
10.	CONCLUSIONES	31
11.	CAPITULO II: Amplificación Isotermal múltiple por desplazamiento de hebra, efectuado por la polimerasa termoestable de <i>Thermotoga marítima</i> A4A.	32
12.	Introducción	33
13.	Antecedentes	35
13.1.	Estructura de las DNA polimerasas	35
13.2.	Fidelidad de las DNA polimerasas	37
13.3.	Las Polimerasas de la Familia B	38
13.3.1.	El círculo catalítico de las DNA polimerasas de la familia B	40
13.4.	La polimerasa del bacteriófago Phi29	41
13.5.	Métodos de Amplificación Isotermal	43
13.5.1.	Amplificación por Desplazamiento Múltiple MDA.....	43
13.5.2.	Amplificación isotermal medida por lazo LAMP	44
13.5.1.	Mecanismo de amplificación de LAMP	45
14.	Hipótesis.....	46
15.	Objetivos	46
15.1.	Objetivos específicos.....	46
16.	Metodología	47
16.1.	Purificación de la DNA polimerasa <i>T. marítima</i>	47
16.2.	Ensayo de MDA	47
16.3.	Fidelidad de la DNA polimerasa	48
16.4.	Síntesis Translesión	49
16.5.	Actividad exonucleasa y polimerasa	49
16.6.	Ensayo LAMP	50
17.	Resultados	51
17.1.	Estructura por Homología	51
17.2.	Ensayo MDA	52
17.3.	Fidelidad de la DNA polimerasa	53
17.3.1.	Tasa de Error	54
17.4.	Resultados síntesis translesión	55

17.5.	Actividad Exonucleasa y polimerasa	56
17.6.	Ensayo LAMP	57
18.	Discusión	58
19.	Conclusión	60
20.	BIBLIOGRAFÍA	61

Índice de Figuras

Figura 1. Estructuras de las primasas Bacterianas y Virales	6
Figura 2. Primasa de T7.....	8
Figura 3. Modelo hexamerico primasa-helicasa de T7.	9
Figura 4. Interacción DNA/primasa-Helicasa.....	10
Figura 5. Motivo Cys4 de la primasa T7.....	10
Figura 6. Coordinación del átomo de zinc.....	11
Figura 7. Dominio de polimerización (Tomado de Kato et al. 2003).	12
Figura 8 Modelos circulares y lineales de la estructura de mtDNA en plantas.	13
Figura 9 AtTwinkle es un homólogo de la primasa-helicasa del bacteriófago T7 y Twinkl. 14	
Figura 10 Reacción de acoplamiento primasa-DNA polimerasa	15
Figura 11. Representación estructural de dominios de AtTwinklePrimasas.....	22
Figura 12. Polimerización de mutantes puntuales frente a templado 5'-CGGA-3'..	23
Figura 14. Primasas quimeras sintetizan primers en templados específicos.....	26
Figura 15. Reacción en Trans.....	27
Figura 16. Ensayo de polimerización de iniciadores acoplado a polimerasas.	28
Figura 17 Estructura de la polimerasa Pol η de <i>S. cerevisiae</i> (PDB 1JIH).	36
Figura 18 Rango de fidelidad de las familias de las polimerasas.....	37
Figura 19 Mecanismo de formación del enlace fosfodiéster.....	38
Figura 20 Estructura de la DNA polimerasa RB69.....	39
Figura 21 Reconocimiento del par de bases nacientes..	40
Figura 22 Representación esquemática de los dominios de DNA polimerasa de phi29... 41	
Figura 23 Estructuras de los dominios TPR1 y TPR2.....	42
Figura 24 Esquema de amplificación por MDA.	43
Figura 25 Indicador Calceina para monitorear una reacción de LAMP	44
Figura 26 Mecanismo de amplificación de LAMP.....	45
Figura 27 Estructura por Homología de la DNA pol de <i>T. maritima</i>	51
Figura 28 Amplificación de <i>Thermotoga marítima</i> y phi29..	52
Figura 29 Amplificación del plasmido pUC19 por medio de MDA.....	53
Figura 30 Síntesis translesión frente a diferentes daños.	55
Figura 31 Comparación de la actividad exonucleasa de phi29 y <i>T. maritima</i> A7A.....	56
Figura 32 Ensayo de amplificación por LAMP.....	57

Índice de Tablas

Tabla 1 Mecanismos de generación de iniciadores.....	4
Tabla 2 Iniciadores para mutagénesis dirigida en AtPrimasa.	17
Tabla 3 Iniciadores síntesis Translesión. El * indica el oligo marcado radioactivamente...	49
Tabla 4 Iniciadores para el ensayo LAMP.....	50
Tabla 5 Resultados de la evaluación de fidelidad por medio de MDA.	54

2. **CAPITULO I:**

Evaluación del mecanismo de reconocimiento de secuencia con doble nucleótido críptico de la primasa mitocondrial de *Arabidopsis thaliana*.

Resumen

La Primasa-Helicasa organelar AtTwinkle, es una proteína que se localiza en cloroplasto y mitocondria de *Arabidopsis thaliana*, se une a DNA y es capaz de sintetizar iniciadores de ARN que son utilizados por las polimerasas AtPolA y AtPolB. AtTwinkle es una enzima ortóloga de la primasa-helicasa del bacteriofago T7, de manera que posee los subdominios región de polimerización de ARN (RNAP) y helicasa unidos a través de un conector de 39 aminoácidos al subdominio dedos de Zn (ZBD, Zinc Binding Domain por sus siglas en inglés).

La AtPrimasa (una versión la primasa de *A. thaliana* que carece del subdominio helicasa) polimeriza oligorribonucleótidos cuando tiene una secuencia de tres nucleótidos 5'-GGA-3' en DNA de cadena sencilla como sustrato, sin embargo, se desconoce el motivo encargado de reconocer la secuencia de DNA de cadena sencilla. Se sabe que los residuos His33 y Lys70 en el motivo ZBD, son los responsables del reconocimiento del DNA de cadena sencilla en las primasas del fago T7 y *Clostridium difficile*. En el 2017 Peralta-Castro y colaboradores sugirieron que los aminoácidos Arg166, Lys168 y Trp162 podrían estar involucrados en el mecanismo de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento.

En el presente trabajo me propuse llevar a cabo la caracterización bioquímica del mecanismo de reconocimiento del doble críptico, a partir mutaciones puntuales de los aminoácidos reportados previamente y de la construcción de proteínas quiméricas intercambiando los motivos ZBD y RNAP de *A. thaliana* y T7.

Mis datos indican que los aminoácidos Lys168 y Arg166 en el motivo ZBD en la primasa AtPrimasa es el encargado del reconocimiento de DNA de cadena sencilla, puesto que las mutaciones puntuales afectaron la capacidad de sintetizar iniciadores frente a un templado con la secuencia promotora. Dicha hipótesis se ve reforzada cuando las proteínas quiméricas At-T7 y T7-At (ZBD-RNAP) sintetizaron iniciadores funcionales cuando las reacciones de síntesis de iniciadores son incubadas en presencia del templado canónico para el ZBD.

Abstract

The organellar Primase-Helicase AtTwinkle, is a protein that localizes in chloroplasts and mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. It binds DNA and is capable to synthesize RNA primers that are used by the organellar polymerases PolA and PolB. It is an orthologous of that of T7 phage, and have a RNA polymerization subdomain (RNAP) and helicase bound by 30 aminoacids linker to finger Zn subdomain (ZBD).

The AtPrimase polimerizes oligorribonucleotides on ssDNA containing sequence 5'-GGA-3'. However, the subdomain responsible for recognizing the promoter sequence is unknown. It's known that His33 and Lys70 in the ZBD motif are responsible for the recognition of ssDNA in T7 and *Clostridium difficile* primases. Peralta-Castro 2017 suggest that Arg166 Lys168 and Trp162 could be involved in the recognition mechanism of the promoter sequence.

In the present work il carried out the biochemical characterization of this enzyme, by generating point mutations, in the previously reported amino acids and constructing chimeric proteins exchanging the subdomains ZBD and RNAP of the *A. thaliana* and T7 primases.

My data indicate that the ZBD subdomain in the primase AtPrimase is the motif responsible for the recognition of simple DNA, since point mutations affected the ability to synthesize primers against a template with the promoter sequence. This hypothesis is reinforced when the chimeric proteins At-T7 and T7-At (ZBD-RNAP) synthesized functional primers, when the synthesis reactions of primers are incubated in the presence of the canonical template for the ZBD.

3. Introducción

Previamente en el laboratorio, se había clonado y purificado la primasa organelar de *Arabidopsis thaliana*, y se descubrió que necesita dos nucleótidos crípticos en la secuencia de reconocimiento para una eficiente síntesis de iniciadores de RNA en un templado 5'-GGA-3'; A partir de dicha secuencia la primasa es capaz de sintetizar los di-ribonucleótidos pppAC, pppUC, pppGC y pppCC, los cuales pueden ser utilizados por las DNA polimerasas mitocondriales de *Arabidopsis* ¹.

En un análisis *in silico* se encontró que los residuos de la primasa organelar de *A. thaliana* posee un 22% de identidad en secuencia de aminoácidos con la primasa del fago T7 de *E. coli*. A pesar de esto se predice que el dominio primasa presenta arreglos estructurales muy similares a la primasa helicasa del fago T7, como cisteínas conservadas que podrían estar coordinando un átomo de Zn²⁺. Mientras que de los organismos eucariontes el motivo CXXC(H)(X₁₅₋₁₈)CXXC se encuentra altamente conservado (Krishna y col., 2003), en los organismos vegetales la principales diferencias residen en los residuos que se encuentran cerca del motivo de cisteínas ya que el primer repetido CXXC es conservado, el segundo repetido es sustituido por la secuencia CXRXKC ¹.

Se sabe que los residuos de His33 y Lys70 localizados antes del segundo par de cisteínas en las primasas de T7 y *Clostridium difficile* están directamente involucradas en el reconocimiento de la secuencia de DNA de cadena sencilla, no así con los correspondientes aminoácidos de la primasa Thr161 y Asn163 ². Sin embargo, en un análisis computacional del dominio dedos de Zn⁺⁺ de la primasa organelar AtTwinkle muestra que las cadenas laterales de Arg166 y Lys168 y un residuo de triptófano (Trp162) se encuentran en la misma orientación que la His33 y Lys70 del fago T7 y la bacteria *C. difficile*, por lo que podrían estar directamente involucradas en el reconocimiento del DNA de cadena sencilla ¹.

Por lo anterior, es necesario hacer estudios estructurales a través de un enfoque de mutaciones puntuales para investigar el papel que juegan los residuos antes

mencionados en el reconocimiento de la secuencia de DNA, así como los subdominios dedos de Zn^{++} y el dominio de polimerización involucrados en la modulación de la secuencia de reconocimiento descrita por Peralta-Castro en 2017¹.

4. Antecedentes

Desde su publicación en 1970, el dogma central de la biología molecular establece que el DNA codifica para la producción de ARN y éste a su vez codifica la producción de proteínas; a pesar de que el DNA sea quizá la unidad más importante para el almacenamiento de la información genética éste no se puede autorreplicar o reparar, por lo que las proteínas codificadas por él, suplen dicha función ³.

Para el proceso de replicación del DNA es necesario romper los puentes de hidrógeno para de esta manera, las bases nitrogenadas expuestas puedan ser apareadas con su correspondientes bases canónicas (apareamiento Watson-Crick) las cuáles son polimerizadas por la enzima DNA polimerasa ⁴.

Sin embargo, las DNA polimerasas son incapaces de sintetizar cadenas de DNA *de novo*, puesto que necesitan de una región de DNA de doble cadena con un extremo 3-OH libre, ésta condición se cumple con la síntesis de un “primer” o iniciador de DNA o ARN que, en la naturaleza existen cuatro mecanismos (Tabla 1) por los cuales es posible la síntesis de primers aunque en la mayoría de los organismos, es sintetizado por una enzima especializada conocida como primasa ⁵.

Tabla 1 Mecanismos de generación de iniciadores.

Mecanismo	Descripción	Organismos
DNA Cadena Sencilla	Utilizan una serina la cual puede reaccionar con un dCTP resultando en un enlace fosfodiéster dejando un 3-OH libre el puede ser utilizado por una primasa en todos los casos el sDNA contiene una proteína unida.	-fago Phi29 ⁶ -PRD1 ⁶ -HB-3 ⁶ -Hepnavirus ⁶ -ArMV ⁶
Replicación mitocondrial	La ARN polimerasa sintetiza iniciadores abortivos tanto en la cadena líder como en la pesada los	POLRMT ⁷

	cuales son utilizados por la DNA polimerasa y	
ARNt primer	Algunos virus utilizan un ARNt como oligo para convertir su genoma de ARN a DNA.	Retrovirus: ⁶ -ASLV -MuLV -VIH -HFV Transposones: <i>S. cerevisiae</i> <i>Drosophila gypsy</i>
Primasa	Utiliza una proteína especializada en la síntesis de iniciadores.	-AtTwinkle ¹

4.1. Estructura

Existen diferentes primasas cuyas estructuras han sido resueltas y por lo cual ha sido posible hacer análisis comparativos entre las secuencias de diferentes organismos; dentro de los cuales están: *E. coli*, T7, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus furiosus* y *Sulfolobus solfataricus* ⁸. Las estructuras pueden ser clasificadas en dos tipos; aquellas con un núcleo catalítico como el de *E. coli* o la de T7 con un dominio tipo “TOPRIM” (topoisomerasa primasa) las polimerasas con esta arquitectura con forma de almendra, con una hendidura poco profunda flanqueada por dos subdominios (Figura 1A). Por otro lado las primasas de arqueas poseen dos laminas beta antiparalelas apiladas una sobre otra y flanqueadas por dos alfa hélices tal como se muestra en la figura 1 (E y F) ⁵.

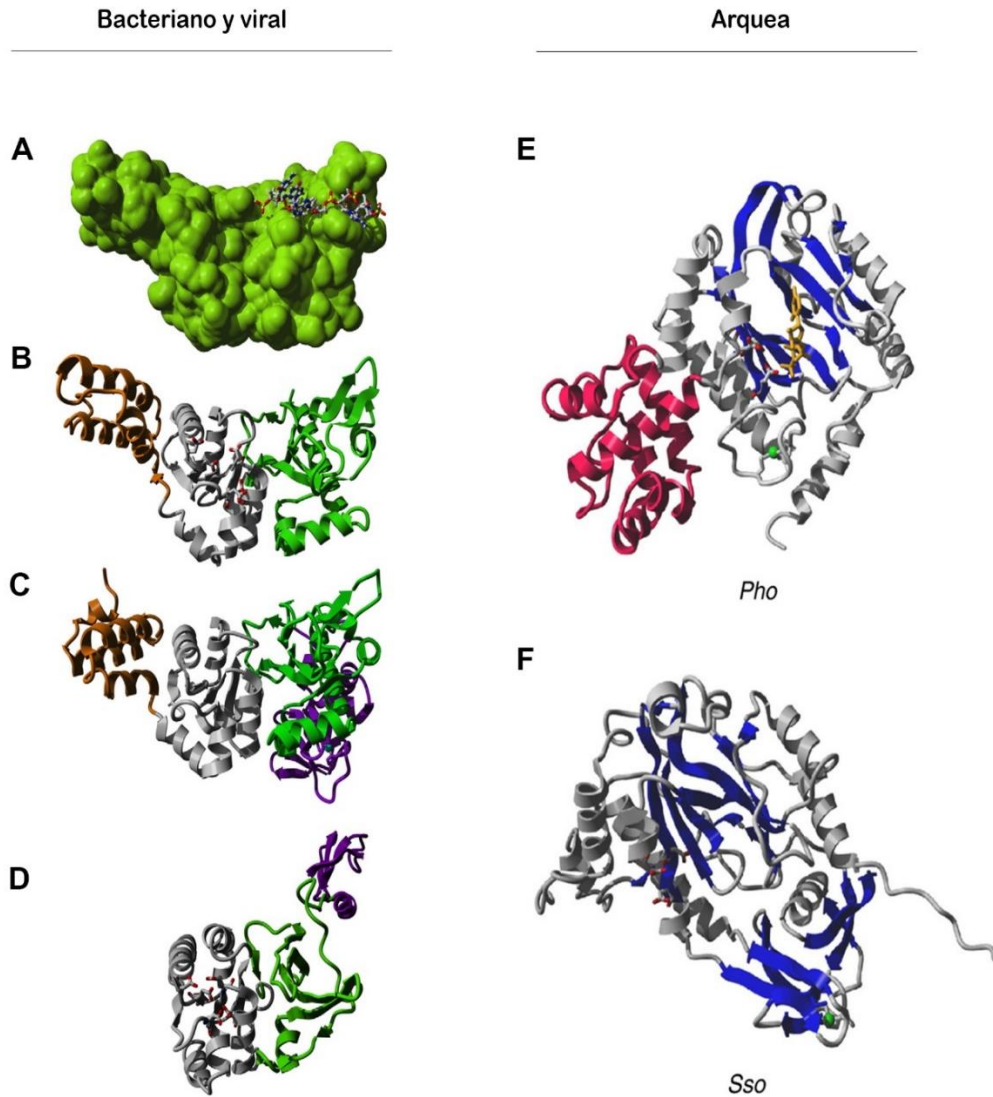


Figura 1. Estructuras de las primasas Bacterianas y Virales (izquierda) y la arquitectura de arqueas (Tomado de Kuchta y Stengel 2010). Panel A al D primasas bacterianas y virales donde A) Superficie del RNAP (Dominio de polimerización de RNA) DnaG de *E. coli* donde se puede apreciar la forma de almendra. B) RNAP de *E. coli*. C) *A. aeolicus*. D) fago T7. El color naranja indica el C-terminal subdominio RNAP, en gris y verde el domino top-prim. Adicionalmente se aprecia el dominio dedos de Zinc en morado. Y las primasas de arqueas E) *Pyrococcus horikoshii* y F) *Sulfolobus solfataricus*.

4.1. Secuencias de iniciación

La síntesis de los iniciadores en un templado no ocurre de manera aleatoria (al menos en todas las primasas estudiadas a la fecha), algunas primasas sintetizan en secuencias específicas, más comúnmente en un trinucleótido 3'-XN₁N₂-5', donde N son los dos nucleótidos codificados por la primasa, mientras que X sólo es necesario para la lectura inicio de la síntesis también llamada base criptica. En la tabla 1, podemos ver las bases cripticas subrayadas ⁹.

Tabla 1. Diferentes primasas y sus secuencias templado. Pu=Purina, Py= pirimidina, N cualquier base nitrogenada, ppp= trifosfato en el extremo 5' (Kuchta y Stengel 2010).

Organismo	Secuencia Templado	Oligo sintetizado
Herpes simplex-1	3'- <u>G</u> PyPy	pppPuPu ¹⁰
T4	3'- <u>T</u> TG	pppAC ¹⁰
T7	3'- <u>C</u> TG	pppAC ¹⁰
<i>E. coli</i>	3'- <u>G</u> TG	pppAG ¹⁰
<i>S. aureus</i>	3'- <u>A</u> TPy	pppAPu ¹¹
<i>A. aeolicus</i>	3'- <u>C</u> CC, <u>C</u> CG, <u>C</u> GC	pppGG, pppGC, pppCG ¹²
<i>B. stearothermophilus</i>	3'- <u>A</u> TPy	pppAPu ¹³
Human	3'-Py <u>N</u> N	pppPuNN ¹⁰
Calf	3'-Py <u>N</u> N	pppPuNN ¹⁰

4.2. Mecanismo de Síntesis de iniciadores

4.2.1. Síntesis de primers por la T7 DNA primasa

Se ha estudiado a profundidad el mecanismo por el cual la primasa del bacteriófago T7, replica los iniciadores necesarios para poder replicarse en su hospedero, descrito por primera vez por Scherzinger en 1977, como el producto del gen 4 cuya traducción es un polipéptido con subdominio dedos de Zinc (1-54 pb), un dominio de polimerización o RNAP por sus siglas en inglés (71-245 pb) unidos a través de

un polipéptido sin estructura secundaria (55-70 pb) y un dominio helicasa en el mismo polipéptido (272-566 pb) que se une con el dominio RNAP a través de 26 residuos (246-271) el cual es necesario para la formación de un hexámero funcional (Figura 2) ¹⁴ .

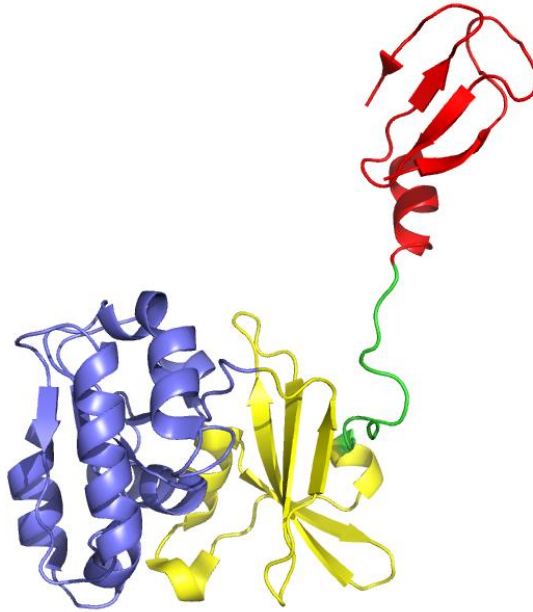


Figura 2. Estructura cristalográfica de la primasa del bacteriófago T7. En amarillo se encuentra el subdominio de polimerización RNAP; en azul subdominio TOPRIM (topo isomerasa), en rojo dominio Dedos de Zinc unido a través de un polipéptido en verde (PDB código 1NUI).

La primasa de T7 cataliza la síntesis de los tetrarribonucleotidos pppACCC, pppACAC, y pppACCA a partir de la secuencia de reconocimiento 3'-XnCTGXn-5' ¹⁴.

A diferencia del bacteriófago T4 y *E. coli*, el dominio Helicasa de T7 se encuentra dentro del mismo polipéptido que el dominio primasa (formándose un anillo hexamerico con otros dominio helicadas aledaños, figura 3), lo que le capacidad de

translocarse en el DNA buscando la secuencia de reconocimiento, además de poder interactuar el subdominio ZBD con otros subdominios RNAP en una reacción *trans* (Kuchta y Stengel 2010).

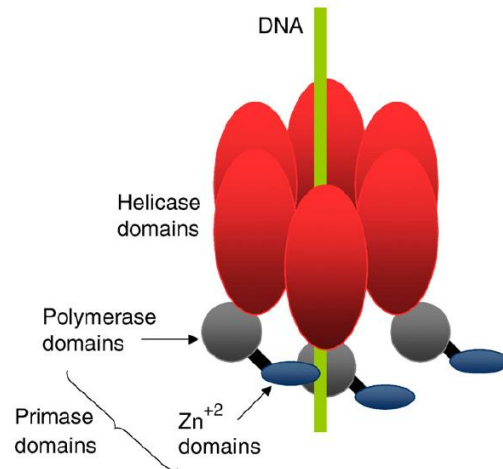


Figura 3. Modelo hexamérico primasa-helicasa de T7 donde el dominio ZBD interactúa con un dominio primasa-helicasa aledaño, en un sitio de reconocimiento 3'-CTG-5'.

Kusakabe y Richardson (1999), proponen un mecanismo de reconocimiento del templado en DNA de cadena sencilla, debido a tres regiones independientes, el sitio 3' de unión de nucleótido se une a CTP reconociendo G en el templado, mientras que el motivo Cys₄ utiliza el residuo de His33 para contribuir al reconocimiento de C en el templado (también se postula que la primasa reconoce el grupo metil en el carbono C₅ de la base timina del templado). El residuo de Asp31, contribuye al reconocimiento de ATP en el sitio 5'- de unión a nucleótido (Figura 4).

De la misma manera que sucede en *E. coli*, la primasa de T7 presenta un mecanismo tipo "Gusano medidor" (inchworm-like), en donde el extremo frontal permanece anclado mientras que el sitio catalítico continúa polimerizando, en dicho mecanismo el ATP permanece unido al sitio 5' de unión a nucleótido, y el sitio 3' podría continuar elongando un polímero de citosinas (Figura 4)⁹.

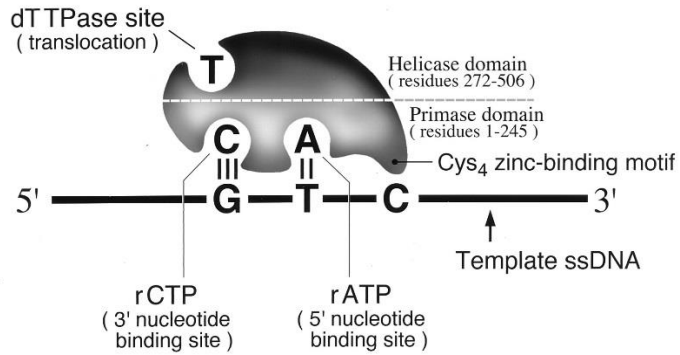


Figura 4. Interacción DNA/primasa-Helicasa. El dominio helicasa (272-566 a.a.) con un sitio de unión dTTP, el dominio primasa (1-245 a.a.) contiene el motivo Cys₄ encargado del reconocimiento 5'-GTC-3' y sus respectivos sitios de unión a ATP y CTP (Tomado de Kusakabe y col., 1999).

El motivo Cys₄ se encuentra presente en muchas proteínas de interacción con DNA, en factores de Transcripción (TFIIS y TFIIE), así como en las primasas de los fagos T4 y T7 las cuales reconocen secuencias específicas. Mientras que por un lado el dominio helicasa (56 KDa) contiene un sitio de hidrólisis de dTTP, necesario para la unión con DNA de cadena sencilla, de traslocación, sitios de formación del hexámero, y de interacción con la T7 DNA polimerasa; en el dominio primasa muestra dos sitios de unión, uno para ATP y otro para CTP además del sitio de reconocimiento de la base crítica de Citosina. Figura 5⁹.

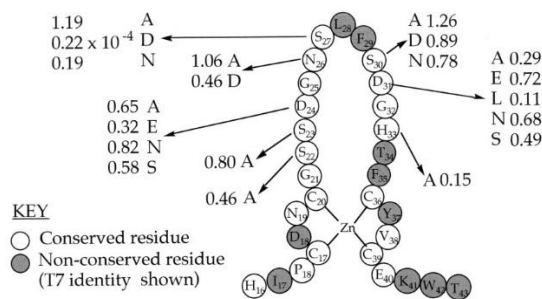


Figura 5. Motivo Cys₄ de la primasa T7. En dicha figura se pueden apreciar sustituciones de aminoácidos y como éstos se pueden alejar en la eficiencia (con valor de 1) de la primasa nativa (plating efficiency, tomado de Kusakabe y col., 1999).

4.2.2. Función Estructural del Dominio Dedos de Zn de T7

El dominio dedos de zinc, contiene un átomo de zinc coordinado por cuatro residuos de cisteína (Cys4), la alteración en cualquiera de dichas cisteínas afecta la capacidad de sintetizar iniciadores a partir de una secuencia templado. Cuando se muta la His33 por una alanina se afecta la capacidad de reconocimiento de secuencia templado, cambiando la citidina críptica en la secuencia canónica 3'-CTG-5', por cualquier purina en un templado 3'-G/ATG-5' (aunque con una actividad muy por debajo del motivo WT) lo que demuestra que la His33 se encuentra directamente relacionada con la base críptica (Mendelman y col., 1994). Además se ha encontrado que el átomo de zinc, cambia su carga formal a un estado parcialmente reducido (normalmente se encuentra oxidado en Zn II) cuando la primasa contacta el DNA, el primer paso en el mecanismo de síntesis, debido a una modificación en los aminoácidos que lo coordinan, cuando se analiza a través de estructura fina por absorción de rayos X extendida (EXAFS, por sus siglas en inglés), se encuentra un cambio en los enlaces zinc-azufre causado por la protonación de las cisteínas Cys20 y Cys39 cuando el motivo dedos de zinc contacta al DNA (Figura 6, Akabayov et al. 2009)

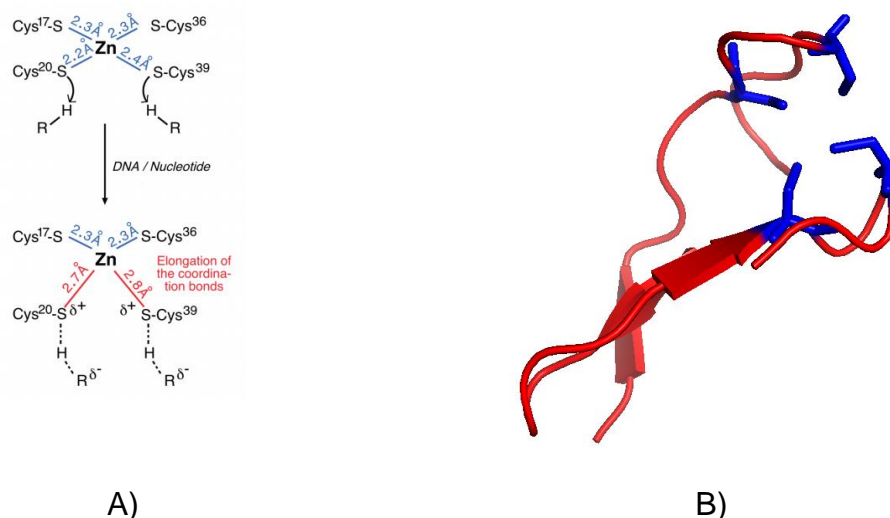


Figura 6. Coordinación del átomo de zinc. En el panel A podemos observar un cambio en la elongación del enlace entre el átomo de zinc y las cisteínas 20 y 39 en T7. En el panel B se puede observar el motivo dedos de zinc de T7.

4.2.3. Dominio de polimerización RNAP de T7

El subdominio de polimerización o RNAP encargado de la síntesis de los iniciadores que utilizan las DNA polimerasas, está compuesto de dos subestructuras, un dominio C-terminal TOPRIM, plegado de manera similar a la primasa de *E. coli* DnaG primasa, un dominio N-terminal con una mezcla de formas α y β . El subdominio RNAP N-terminal consiste de cuatro laminas beta antiparalelas, donde están plegadas una alfa hélice y dos 3_{10} hélices como se puede observar en la figura 7¹⁶.

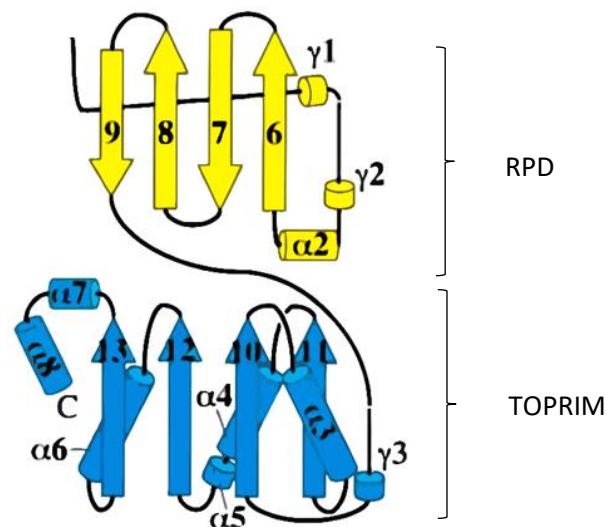


Figura 7. Dominio de polimerización. El dominio RNAP en amarillo consiste en cuatro laminas beta antiparalelas (6-9) además de una alfa hélice $\alpha 2$ y dos 3_{10} hélices. El dominio C-terminal dominio TOPRIM consiste de cuatro laminas β (10-13) intercaladas con 6 alfa hélices y una hélice 3_{10} ($\gamma 3$) (Tomado de Kato et al. 2003).

4.3. Replicación mitocondrial en plantas

En contraste con los genomas mitocondriales (mtDNA) animales que varían en tamaño de 16.5 kpb en promedio en vertebrados e invertebrados¹⁷ y existen de manera circular; los mtDNA vegetales pueden variar hasta 2400 kpb y pueden ser tanto lineales como ramificados, así como moléculas circulares pequeñas (Tal como se aprecia en la figura 8)¹⁸ que pueden incluso replicarse de manera independiente del cromosoma principal¹⁹.

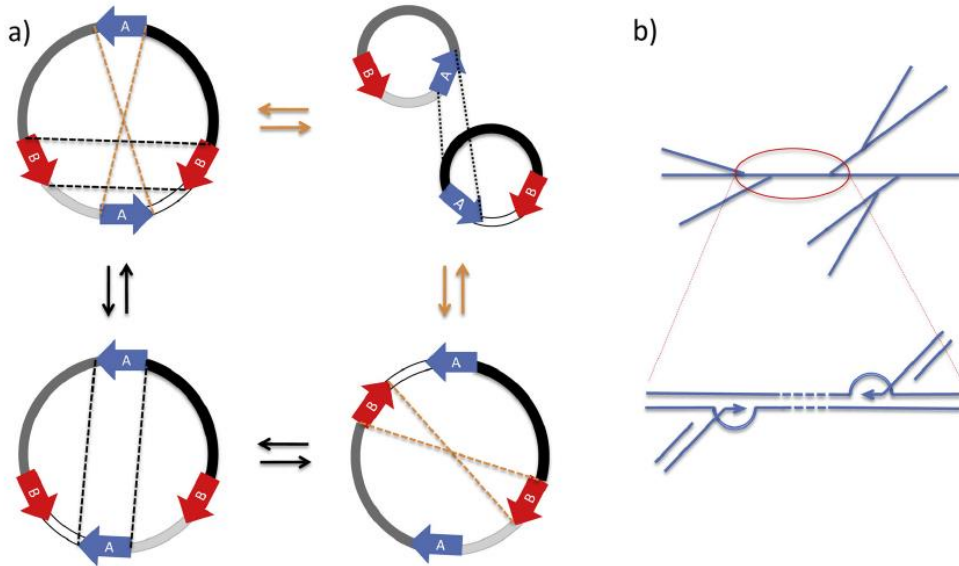


Figura 8 Modelos circulares y lineales de la estructura de mtDNA en plantas. A) Modelo de genoma circular donde se representa diferente nivel de organización, las flechas azules y rojas son repetidos recombinantes. Las diferentes partes del genoma en escala de grises, mientras que las líneas punteadas representan los posibles eventos de recombinación. B) El genoma mtDNA predominante en plantas es un arreglo complejo de moléculas lineales cuyas formas ramificadas podrían ser procesos de recombinación dependiente (Tomado de Gualberto et al., 2014).

4.3.1. La primasa organelar de *Arabidopsis thaliana*

En el genoma *Arabidopsis thaliana* el gen At1g30680 codifica para una proteína homóloga de la primasa del bacteriófago T7 (T7 gp4), y de la primasa humana Twinkle (Twinkle TWNK) como se aprecia en la figura 9, AtTwinkle posee actividad helicasa y primasa codificada en el núcleo con una etiqueta dual para mitocondria y cloroplasto, la secuencia de dicho gen predice una proteína de aproximadamente 80 KDa ¹⁷.

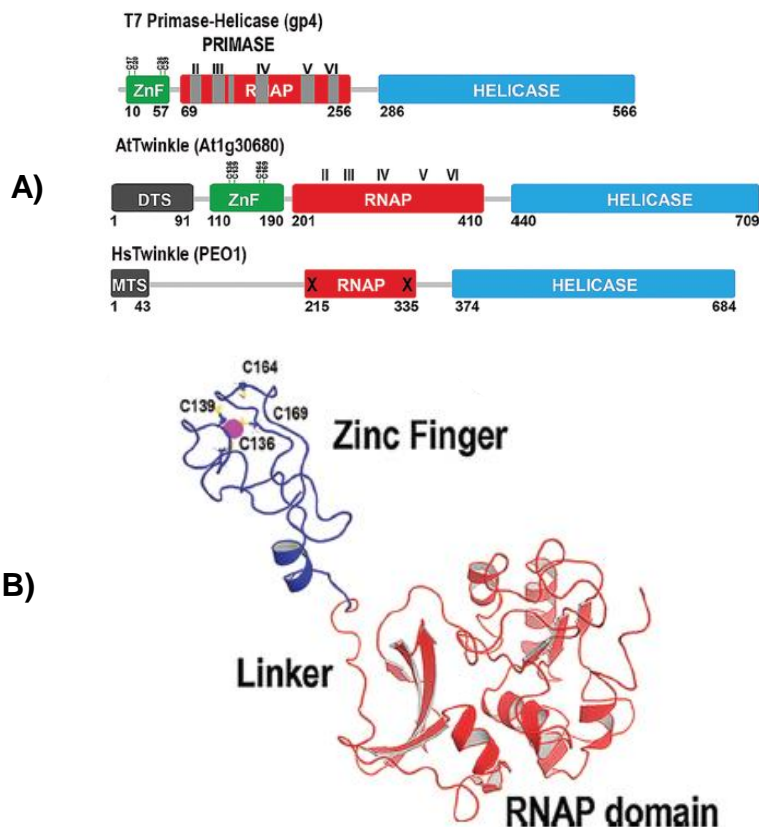


Figura 9 AtTwinkle es un homólogo de la primasa-helicasa del bacteriófago T7 y Twinkle. A) Representación esquemática de la primasa bifuncional T7 en comparación con la de *Arabidopsis* y la Twinkle de humano. B) Estructura computacional por homología del dominio primasa en donde se pueden apreciar las cisteínas que presuntamente coordinan el átomo de zinc en el ZBD (Tomado de Peralta-Castro et al. 2017).

Los genomas mtDNA varían en rangos de tamaño de 70 a 100 kpb en levaduras y de 200 a 2000 kpb en plantas, cuya replicación involucra un mecanismo de replicación dependiente de recombinación, cuya DNA primasa es requerida (de igual manera en el sistema de replicación de los fagos) para el primado de las hebras retardadas, durante algunas fases de la replicación de DNA ¹⁷, sin embargo en plantas no se conoce a ciencia cierta como se replica el genoma mitocondrial.

Se han identificado dos DNA polimerasas (AtPolA y AtPolB) con etiquetado para mitocondria y cloroplasto ²⁰, las cuales utilizan los iniciadores sintetizados por la AtTwinkle para la replicación de DNA ¹ como puede apreciarse en la figura 10.

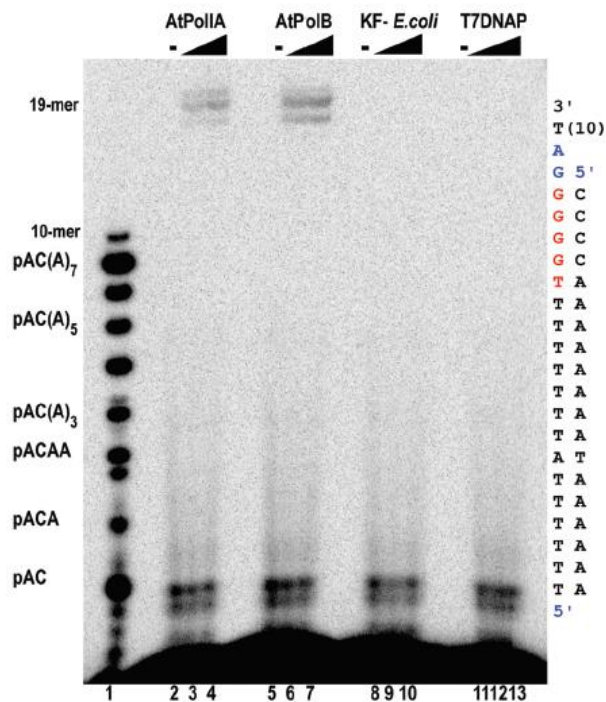


Figura 10 Reacción de acoplamiento primasa-DNA polimerasa (Tomado de Peralta-Castro et al., 2017). En los carriles 2-7 podemos ver que los primers ge por la primasa AtTwinkle (carril 1), son utilizados por las DNA polimerasas PolA y PolB (no así cuando la reacción es acoplada con las polimerasas KF-Ecoli y t7DNAP carriles 8 a 13) para poder elongar frente a un templado que contiene la secuencia tríptico 3'-GGA-5' descrita por Peralta-Castro en 2017.

5. HIPÓTESIS

Dado que en el segundo par de cisteínas existe una novedad estructural (en plantas) ya que usualmente es CXXC-N-CXXXC y en plantas es CXXC-N-CXXXXC, estos residuos extra en el segundo par podrían ser responsables de la capacidad única de la AtTwinkle para reconocer dos bases crípticas.

6. OBJETIVOS

- Objetivo general: Determinar los residuos que están involucrados en el reconocimiento de secuencia y de las bases crípticas.

6.1. Específicos:

- Clonar versiones de primasa organelar de *A. thaliana* con mutaciones puntuales de los aminoácidos Arginina 166, Lisina 168 y Triptófano 162 por Alanina en el subdominio dedos de Zn.
- Clonar y purificar el subdominio dedos en Zn de T7 y *A. thaliana*.
- Clonar y purificar el subdominio de Polimerización de T7 y *A. thaliana*.
- Crear versiones quiméricas entre los subdominios dedos de Zn y dominio de polimerización de las primasas del fago T7 y *A. thaliana*.
- Evaluar la capacidad de polimerización de iniciadores funcionales de cada una de las mutantes puntuales a partir del templado canónico 5´-GGA-3´.

7. METODOLOGÍA

7.1. Mutagénesis dirigida y construcción de proteína quiméricas

La mutagénesis dirigida fue llevada a cabo usando el kit de mutagénesis dirigida Q5 (New England Biolabs) con los iniciadores presentados en la tabla 2, nombrando a las mutantes como W162Y, N163A, R166A, K168A y K171A. La construcción de las proteínas quiméricas de acuerdo con el protocolo de extensión de genes por sobreposición de genes (SOEing ²¹) con cada uno de los subdominios de las primasas de T7 (1-255 pb) y *A. thaliana* (91-410 pb) nombrándolas como T7At y AtT7 (donde los dos primeros caracteres corresponden a la subunidad dedos de Zn y los últimos dos la región de polimerización RNAP).

Tabla 2 Iniciadores para mutagénesis dirigida en AtPrimasa.

Nombre oligo	Secuencia
W162Y-F	AGTGCAACCTACAATTGCTTTTCGC
W162Y-R	AGAACCATCCGGGGCAAT
N163A-F	TGCAACCTGGGCATGCTTTTCGCGG
N163A-R	CTAGAACCATCCGGGGCA
R166A-F	GAATTGCTTTgccGGTAAATGTGGTC
R166A-R	CAGGTTGCACTAGAACCATC
K168A-F	CTTTCGCGGTgcaTGTGGTCTGA
K168A-R	CAATTCCAGGTTGCACTAG
K171A-F	ATGTGGTCTGgcaGGTGGCGTTC
K171A-R	TTACCGCGAAAGCAATTC

7.2. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

La expresión y purificación de las mutantes de AtPrimasa y proteínas quiméricas fueron llevados en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) en el vector de expresión pet19 en medio LB suplementada con 0.1 mM ZnCl₂ previamente descrita (Peralta-Castro, Baruch-Torres, and Briebe 2017).

7.3. Purificación por columna de afinidad a níquel

Una colonia aislada fue empleada para inocular 50 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y colocada en agitación a 220 rpm a 37°C por aproximadamente 12hr, con dicho cultivo se inoculó 1 litro de medio LB, y se puso a incubación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, para en ese punto agregar el inductor IPTG a una concentración de final de 0.5 mM, los cultivos se pusieron a incubación a 16°C durante 12hr aproximadamente. Pasado el tiempo de incubación las células fueron cosechadas por centrifugación a 5000 rpm durante 15min. La pastilla celular se resuspendió en 40 mL de regulador de lisis (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl y 10 mM de imidazol) y lisado por sonicación. El producto de lisis se clarificó por centrifugación a 15,000 rpm durante 30 min a 4 °C. La fracción soluble fue filtrada (filtro 0.45 µm) e inyectada a través de una columna de afinidad a níquel. Se efectuó un primer lavado (30 mM imidazol, 250 mM NaCl y 25 mM Tris-HCl pH 7.5) y un segundo (50 mM Imidazol, 100 mM NaCl y 50 mM Tris-HCl pH 7.5) seguido de una elución con 5mL de solución reguladora (500 mM imidazol, 80 mM NaCl y 25 mM Tris-HCl pH 7.5).

7.4. Purificación por columna de Heparina

La elución de la columna de níquel se lleva a cabo con una solución reguladora (20 mM Tris-HCl pH 8 y 10% de glicerol) a una concentración de 4 mM de NaCl, seguido de un gradiente de NaCl (Solución A: 20 mM Tris-HCl, 0 mM NaCl y 10% glicerol y Solución B: 20 mM Tris-HCl, 1000 mM NaCl y 10% glicerol) por medio de una columna de afinidad iónica de heparina (GE Healthcare Life Sciences TM) previamente equilibrada con Solución A.

7.5. Remoción de etiqueta de Histidinas

Para la remoción de la cola de histidinas, la fracción colectada de la columna de heparina se puso a incubar en presencia de PPS (Prescission protease) una solución amortiguadora (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% glicerol, 0.1 mM EDTA y 3 mM de DDT) durante 16hr a 4°C.

7.6. Purificación por Exclusión molecular

Finalmente la fracción de la proteólisis, se purificó a través de una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences TM), con una solución reguladora (25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% Glicerol y 0.1 mM EDTA) y se dejó dializando durante 16hr a 4°C en una solución con 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT y 50% de Glicerol; además se corrió un gel SDS-PAGE al 12%.

7.7. Polimerización de iniciadores por mutantes puntuales frente a templado con secuencia canónica

La reacción de actividad de polimerización de iniciadores fue llevada a cabo a tres diferentes concentraciones 0.5 μ M, 1 μ M y 2 μ M de proteína para las mutantes puntuales, y concentraciones de 0.25 μ M, 0.5 μ M y 1 μ M para la primasa nativa; en un medio de reacción (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM Glutamato de Potasio, 4 mM MgCl₂, 4 mg/mL BSA albúmina de suero bovino y 4 mM DTT), cada reacción fue llevada a cabo en presencia de 100 μ M de NTPs, 10 μ Ci de [α -³²P]-CTP y un oligo con la secuencia de primasa (5'-CGGA-3') a una concentración de 5 μ M .

La reacción se incubó a 37°C durante 1hr, pasado el tiempo se paró la reacción con solución de paro (15 mM EDTA, 95% formamida y 0.1% azul de bromofenol). Los productos de reacción fueron separados en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 27% y 3 M de urea.

7.8. Ensayo de elongación frente a múltiples templados

.Las reacciones se llevaron a con cada una de las mutantes puntuales frente a diferentes templados posibles (tabla xxxxx), con las mismas condiciones antes mencionadas (con una concentración final de 2 μ M para cada proteína).

7.9. Elongación de iniciadores de proteínas quiméricas

Se efectuaron reacciones en una solución reguladora ya mencionada, con las proteínas quiméricas T7At y AtT7 (a tres concentraciones 100 nM, 500 nM y 1 μ M), utilizando como control la primasa de *A. thaliana* y la primasa del fago T7 frente a los iniciadores 5'-T₆GGGAT₇-3' y 5'-T₆GGTCT₇-3' (5 μ M en ambos casos) con los nucleótidos radioactivos [α -³²P]-CTP y [γ -³²P]-ATP respectivamente.

7.10. Reacción en *Trans* Polimerización

Las reacciones en trans se llevaron a cabo con los subdominios dedos de Zn (0 μ M, 50 μ M y 100 μ M) y dominio de polimerización RNAP (25 μ M) de la primasa de *A. thaliana* utilizando como control la primasa nativa (1 μ M) frente a los iniciadores templado 5'-T₆GGGAT₇-3' y 5'-T₇GGAT₇-3' con [α -³²P]-CTP. En dicha reacción se espera que si hay polimerización de los oligos puede existir una reacción en trans, esto es que una subunidad de dedos de zinc interactúe con un dominio de polimerización.

7.11. Síntesis de iniciadores acoplados a polimerización

En reacciones de 50 μ L con una solución reguladora ya descrita, utilizando las proteínas quiméricas AtT7 y T7At a concentraciones 10 μ M y 2 μ M respectivamente y 150 nM de primasa nativa, utilizando un oligo de 36 nucleótidos (10 μ M) cuya secuencia incluye la secuencia de reconocimiento criptica de la primasa de T7 y de *A. thaliana*. Se tomaron alícuotas (10 μ L) a diferentes tiempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min y 120 min, terminando la reacción con solución de paro.

8. RESULTADOS

8.1. Análisis *in silico*

En un análisis *in silico* muestra que la secuencia (disponible en <https://www.arabidopsis.org>) (anexos) de la proteína primasa-helicasa organelar de *A. thaliana*, se encuentra codificada en el cromosoma 1, con número de accesión AT1G30680 y un tamaño de 70.03 kDa.

A partir de dicha secuencia se amplificaron los subdominios catalíticos dedos de zinc y dominio de polimerización de RNA (RNAP) de *A. thaliana*, de igual manera con la secuencia del fago T7.

En la figura 11 panel A, se pueden apreciar los sitios a partir de los cuales se clonaron los genes, removiendo la región helicasa en ambos casos; mientras que en el panel B, se puede apreciar la estructura cristalográfica de la primasa de fago T7 con los subdominios, mientras que a la derecha la imagen muestra la estructura por homología de la primasa vegetal de *A. thaliana* cuya estructura es muy similar a la del fago.

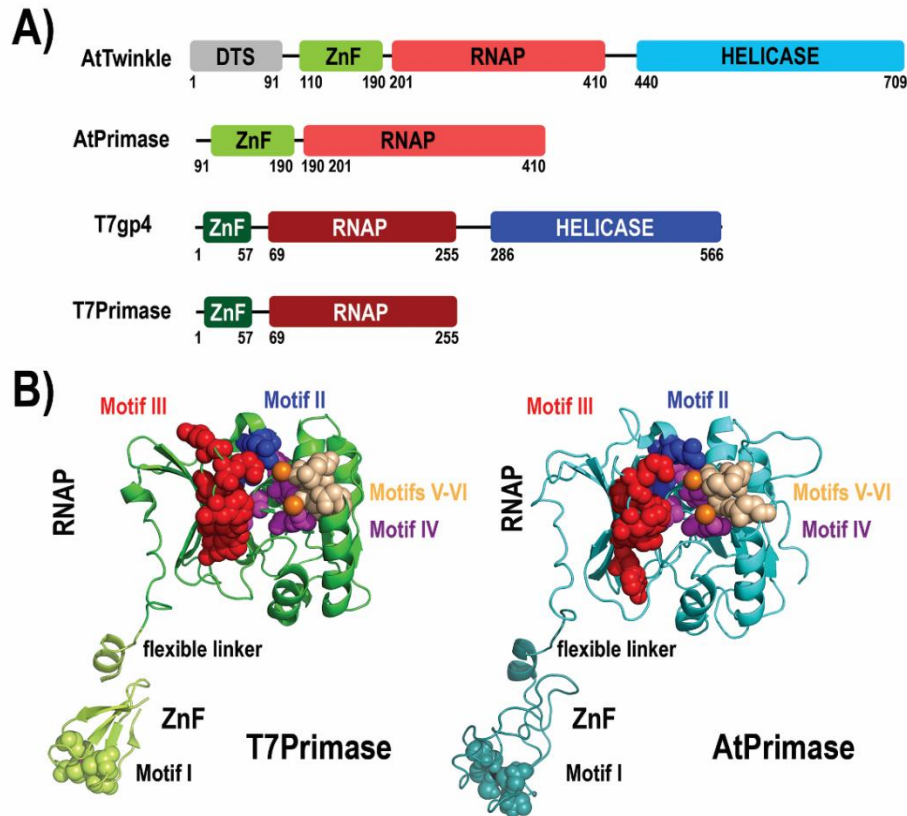


Figura 11. Representación estructural de dominios de AtTwinklePrimasas. A) Un diagrama mostrando los dominios estructurales para AtTwinkle silvestre, la delección AtPrimase, T7gp4 y T7Primase, se muestran los rangos de residuos que conforman cada dominio. B) Representación de la estructura terciaria del dominio primasa de AtTwinkle y T7gp4, mostrando diferentes regiones con similitud entre ellas.

8.2. Polimerización de mutantes puntuales con el templado 5'-CGGA-3'

En la figura 12 se pueden apreciar la capacidad de polimerizar iniciadores a partir de la secuencia de reconocimiento descrita por Peralta-Castro, 2017, comparada con la AtPrimasa, la mutación de la Arginina 166 seguida de la Lisina 168 afecta considerablemente la capacidad de elongar iniciadores.

En la mutación de la Asparagina 163 se pueden apreciar los productos pCC, pCCC y pCCA, no así los productos pCCA₂ y pCCA₃, los cuales si es posible apreciarlos en la mutación de Triptófano 162 (aunque en menor medida pCCA₃), la mutación Lisina 172 muestra los mismos productos que la AtPrimasa.

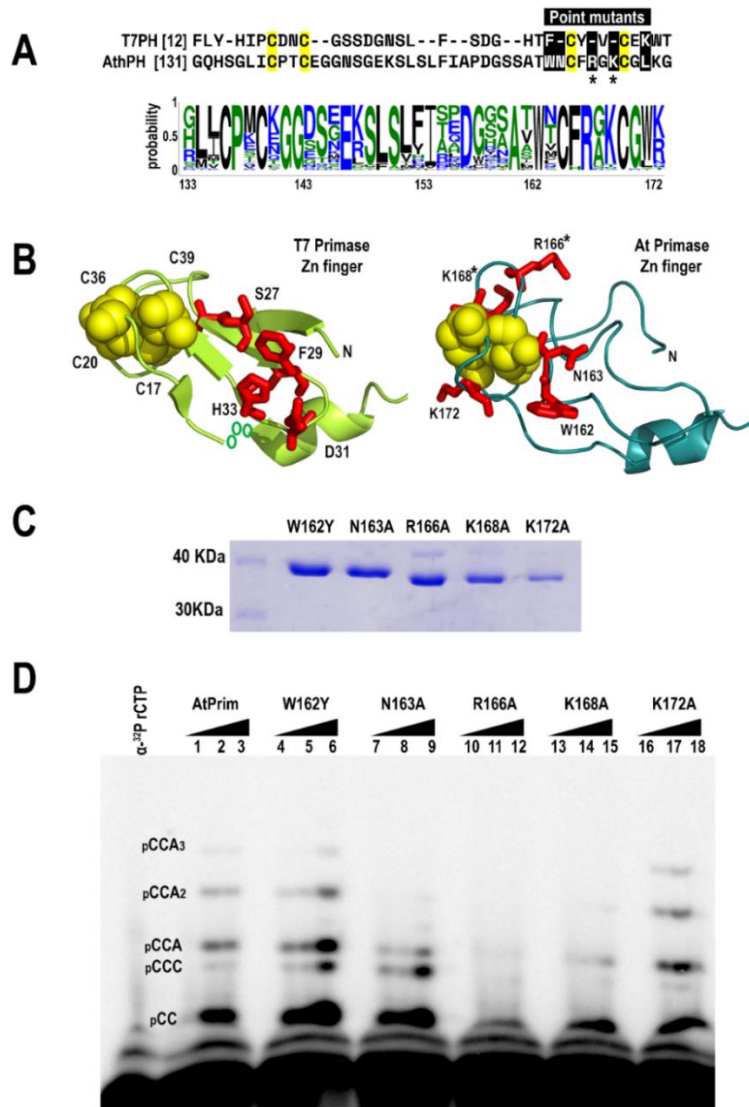
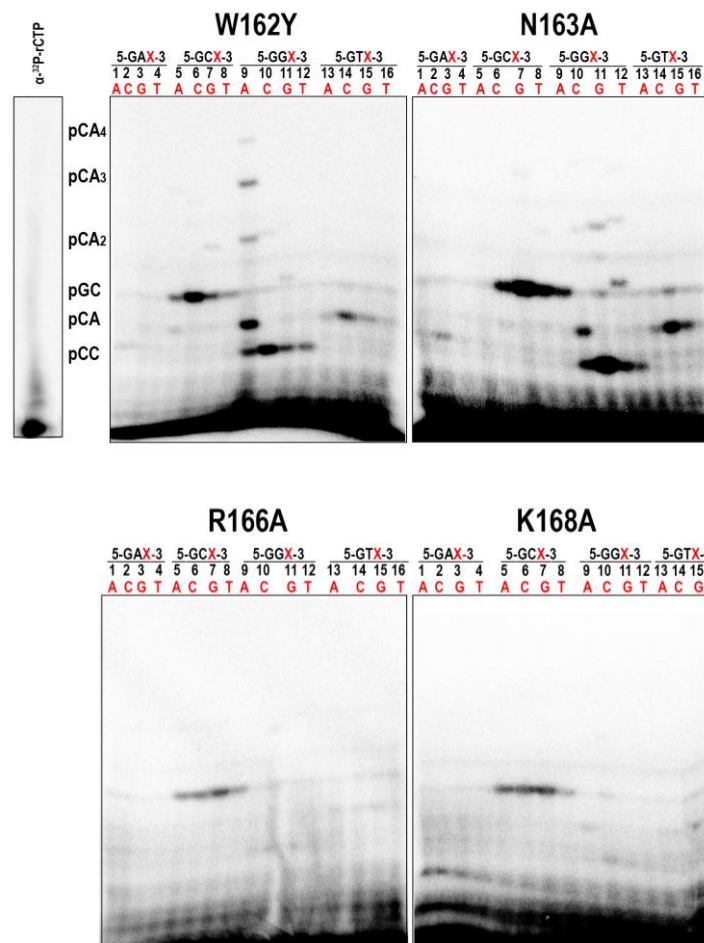


Figura 12. Polimerización de mutantes puntuales frente a templado 5'-CGGA-3'. Panel A) Alineación de los aminoácidos de primasa de *A. thaliana* y T7, en amarillo se aprecian las cisteínas de dicho motivo, y las mutaciones puntuales en los aminoácidos reportados por Peralta-Castro 2017. Panel B) Estructuras de T7 (1NUI) y *A. thaliana* por homología donde se muestran las cadenas secundarias de los residuos que se mutaron en comparación a su ubicación en la T7 primasa. Panel C) Gel de SDS PAGE de las 5 mutantes de AtPrimasa para evaluar la pureza de las enzimas Panel D) Ensayo de Actividad síntesis de Iniciadores en presencia de la secuencia canónica 5'-GGA-3'. Tres concentraciones de enzimas mutantes 500 nM (carril 4, 7, 10 13 y 16), 1 μ M (carril 5, 8, 11, 14 y 17) y 2 μ M (carril 6, 9, 12, 15 y 18), para AtPrimasa 250 nM, 500 nM y 1 μ M.

8.3. Ensayo de elongación frente a múltiples templados

Se evaluaron cada una de las mutantes puntuales para su capacidad de elongar iniciadores frente a 16 diferentes templados correspondientes a la variación sistemática de las dos bases cripticas conocidas para AtPrimasa, en la mutante W162Y y K172A se puede apreciar (Figura 13) una elongación similar a la AtPrimasa, con el oligo producto pCA₄ de mayor tamaño seguido de pCA₃, pCA₂, pGC, pCA y pCC, frente al templado 5'-T₇GGAT₇. Además, en todas las mutantes incluyendo la AtPrimasa se puede apreciar el oligo producto pGC.



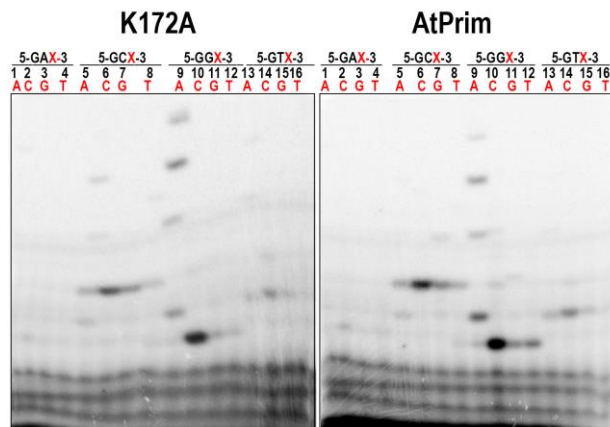


Figura 13. Ensayo de elongación frente a múltiples templados. Las mutantes puntuales de primasa y primasa WT de *A. thaliana* frente a diferentes a templados con variación en tres nucleótidos (16 combinaciones posibles) incubado en presencia de α -³²P-rCTP.

8.4. Elongación de primers de proteínas quiméricas

Se evaluó la actividad de las proteínas quiméricas frente a los templados canónicos 5'-T₆GGGAT₇-3' y 5'-T₆GGTCT₇-3' tanto de *A. thaliana* y T7, la quimera T7At es capaz de elongar iniciadores de mayor tamaño respecto a las primasas control frente al templado canónico de T7 (lo cual es evidente a la concentración de 1 μ M).

La quimera T7At no muestra actividad frente a un oligo de AtPrimasa, la actividad de AtT7 puede elongar los iniciadores pCC, pCCC, pCCA y pCCA2 pero presenta una menor actividad respecto a la primasa control AtPrimasa (panel C carril 2 Figura 14).

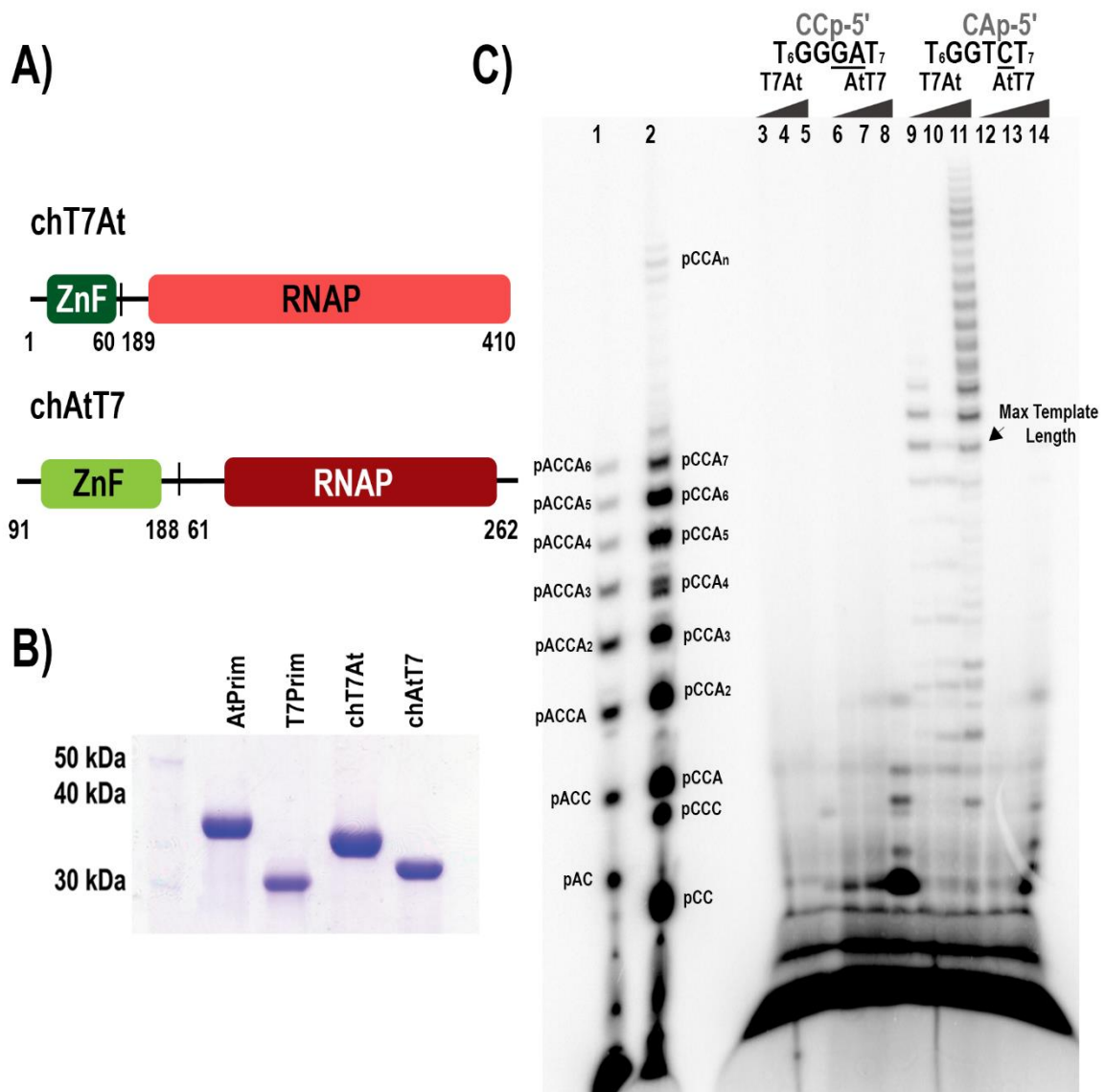


Figura 14. Primasas quimeras sintetizan primers en templados específicos. Panel A) Construcción de la Quimeras. Panel B) Gel 12% SDS-PAGE primasas nativas y quiméricas, teñidas con azul de Coomassie. Panel C) Ensayo de polimerización frente al templado canónico de la AtTwinkle 5'-T6GGGAT7-3' (carril 2) y de T7 5'-T6GGTCT7 (Carril 1). Tres diferentes concentraciones para cada enzima quimérica 100 nM (carril 3, 6, 9 y 12), 500 nM (carril 4, 7, 10 y 14) y 1 μM (5, 8, 11 y 14),.

8.5. El subdominio ZBD y RPD reaccionan en trans

Para analizar si los subdominios actuaban en cis o trans (esto es si el subdominio RNAP unido covalentemente al subdominio ZBD actúan juntos) o si el ZBD de una subunidad actúa con el RNAP de otra subunidad, se expresaron por separado los dominios ZBD y RNAP. Para verificar si existe actividad en trans, se incubaron reacciones con el motivo de polimerización RPD a una concentración constante, y el motivo dedos de Zn, utilizando como control positivo la AtPrimasa, la polimerización de iniciadores es evidente utilizando un templado 5'-T₆GGGAT₇-3' (Figura 15).

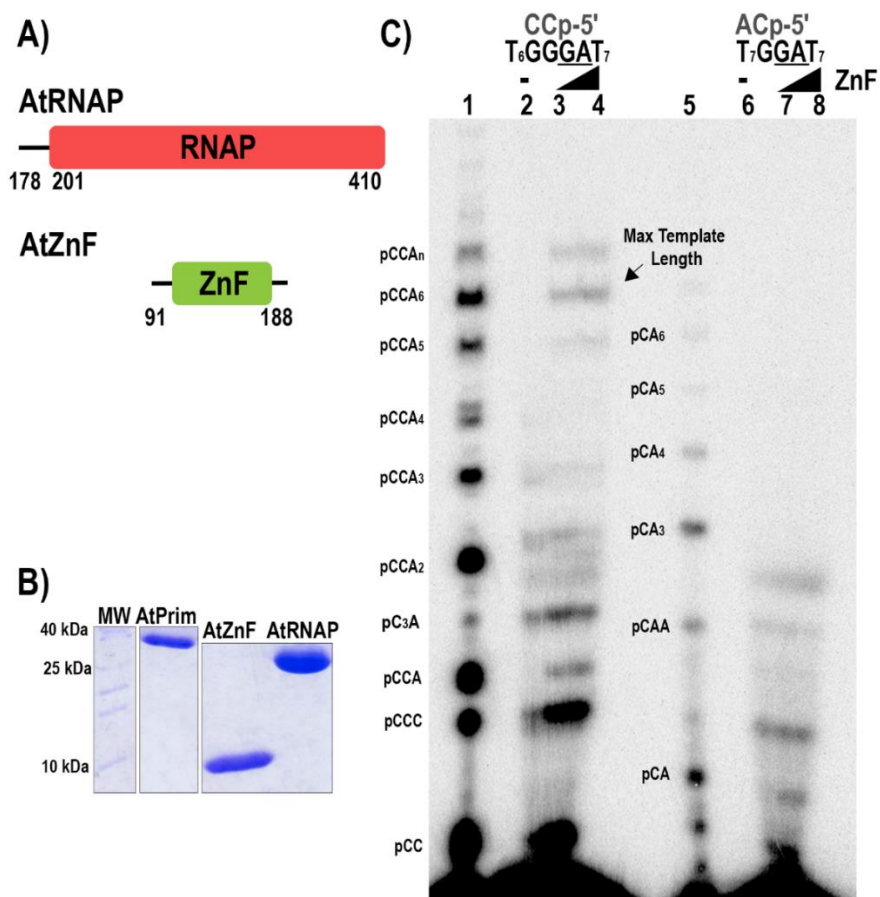


Figura 15. Reacción en *trans*. Panel A) Construcción de subdominios dedos de Zn y dominio de polimerización RNAP de *A. thaliana*. B) Gel SDS-PAGE primasas nativa y subdominios. Panel C) Ensayo de primasa a tres condiciones diferentes 0 μM de ZBD (Carril 2 y 6), 50 μM ZBD (carril 3 y 7) y 100 μM ZBD (carril 4 y 8).

8.6. Ensayo de primasa acoplado a polimerasa

Para determinar si las proteínas quiméricas eran capaces de sintetizar primers para sus respectivas DNA polimerasas se realizó un ensayo de primasa acoplado a la DNA polimerasa. En la reacción primasa-polimerasa (Figura 16) se incubó una reacción en presencia de las proteínas quiméricas AtT7 y T7At con la AtPrimasa como control; en presencia de un oligo de 36 nucleótidos (el cual contiene ambas secuencias de reconocimiento) y ambas polimerasas organelares de *A. thaliana* AtPolA y AtPolB.

En todos los casos, hubo polimerización de un oligo de mayor tamaño a los 36 nucleótidos, con ambas polimerasas.

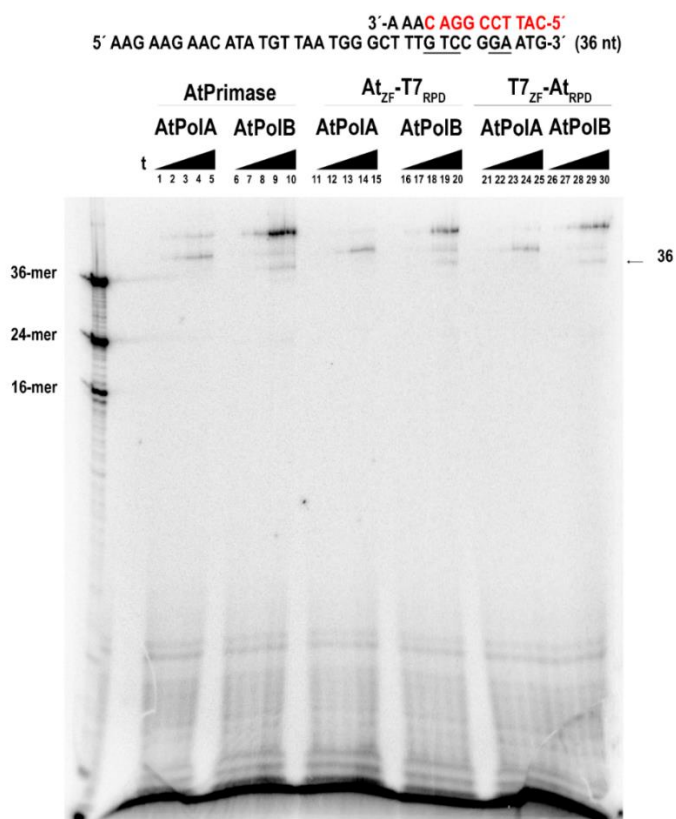


Figura 16. Ensayo de polimerización de iniciadores acoplado a polimerasas. Reacciones incubadas a 5 diferentes tiempos 0 min (carril 1,6,11,16, 21 y 26), 15 min (2, 7, 12, 17, 22, 27), 30 min (3,8,13,18,23, 28), 60 min (4, 9, 14, 19, 24 y 29) y 120 min (5,10, 15, 20, 25 y 30).

9. DISCUSIÓN

Los aminoácidos Arginina 166 y Lisina 168 afectaron considerablemente la capacidad de elongar iniciadores en la AtPrimasa, dichos aminoácidos ya habían sido reportados por Peralta-Castro en 2017, como aquellos que tienen una orientación similar a los residuos Histidina 33 de T7 y a la lisina 70 de *C. difficile* encargados de reconocer la cadena de DNA.

Peralta-Castro 2017, reporta que el residuo triptófano 162 se encuentra altamente conservado en un análisis de primasa de cerca de 71 especies vegetales, por lo cual también decidió mutar por un residuo de tirosina. Sin embargo la mutación de Asparagina comprometió en mayor medida la capacidad de elongar iniciadores de mayor peso a pCCA. La mutación de Lisina 172, aminoácido aledaño al motivo dedos de Zn⁺⁺, no comprometió la capacidad del reconocimiento de DNA, cuyos iniciadores son similares a los de la enzima control AtPrimasa.

Las mutaciones puntuales podrían afectar la selectividad en el reconocimiento de la secuencia templado 5'-GGA-3', para demostrar esto se incubaron las mutantes puntuales frente a cada una de las combinaciones de templado de tres nucleótidos (Figura 10), resultando 16 combinaciones para cada enzima. En cada ensayo no hubo un cambio en la capacidad de elongar iniciadores con un templado diferente al canónico, la elongación del oligo pGC estuvo presente en todas las reacciones cuando se utiliza el templado 5'-GCX-3'.

Con la construcción de las proteínas quiméricas es posible determinar cuál de los subdominios dedos de Zn y dominio de polimerización RNAP están involucrados en el reconocimiento de la secuencia templado, por lo que se llevaron a cabo reacciones con ambas proteínas y ambas secuencias templado, en la figura 11, es posible apreciar elongación de iniciadores de mayor peso respecto a las primasas control con la quimera T7At (Dedos de Zn de T7 y RNAP de *A. thaliana*) con el templado 5'-T₆GGTCT₇ de T7, la quimera AtT7 también es capaz de elongar iniciadores con la secuencia 5'-T₆GGGAT₇-3' sin embargo no es tan eficiente como la AtPrimasa y la primasa de T7 ya que el mayor producto que se puede apreciar

es pCCA₂. La quimera T7At no es capaz de polimerizar iniciadores frente a un templado de AtPrimasa, lo mismo sucede con la quimera AtT7 frente a un templado de T7.

Para demostrar la capacidad de polimerizar iniciadores entre ZBD y RNAP de distintas moléculas en una reacción *trans*, se purificaron ambos por separado, la reacción se llevó a cabo con un gradiente de ZBD, en la figura 12, se puede observar iniciadores de hasta pCCA₆ con un templado 5'-T₆GGGAT₇-3' en presencia de ZBD, cuando se incuba la reacción sólo con RNAP se pueden apreciar iniciadores de menor tamaño de hasta pC₃A.

Una vez demostrada la capacidad de polimerizar iniciadores por parte de las proteínas quiméricas, fue necesario evaluar la funcionalidad de dichos productos, acoplado la reacción con las polimerasas organelares PolA y PolB. En este ensayo el templado incluye ambas secuencias canónicas de T7 como para la AtPrimasa. En las reacciones (Figura 13) es posible observar la polimerización de un producto de 35 nucleótidos e incluso de tamaño mayor debido a una actividad terminal transferasa por parte de las polimerasas.

10. CONCLUSIONES

- Los aminoácidos Arginina166 y Lisina 168 en la AtPrimasa están involucrados en el reconocimiento de la secuencia templado.
- El dominio dedos de Zn en la AtPrimasa es el responsable del reconocimiento de la secuencia 5'-GGA-3' en una secuencia templado.
- Es posible la reacción en *trans* ya fue posible la polimerización de iniciadores cuando son puestos los subdominios ZBD y RNAP en una reacción en presencia de la secuencia templado 5'-T₆GGAT₇-3' como con 5'-T₇GGAT₇.
- Los iniciadores producto de las proteínas quiméricas AtT7 y T7At son funcionales y pueden ser utilizadas por las polimerasas PolA y PolB.

11. **CAPITULO II:** Amplificación Isoterma múltiple por desplazamiento de hebra, efectuado por la polimerasa termoestable de *Thermotoga marítima* A4A.

12. Introducción

La técnica más común en un laboratorio de biología molecular y que con más frecuencia se utiliza, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), dicha técnica permite amplificar fragmentos específicos de DNA *in vitro*. A partir de su publicación en 1988 (Mullis y col., 1988) donde se describe la utilización de una enzima termoestable capaz de amplificar fragmentos específicos de DNA, se han ideado distintas técnicas de amplificación basadas en PCR tales como: el RT-PCR, Long-PCR, qPCR, dPCR, etcétera, todos ellos para distintas aplicaciones, pero manteniendo los componentes principales, esto es; un templado de DNA, una polimerasa estable y un aparato capaz de realizar ciclos de calor para desnaturalizar el DNA y permitir el alineamiento de los iniciadores.

La desnaturalización de DNA para la posterior alineación iniciadores mediante ciclos de calor requiere de un termociclador, lo cual representa una desventaja en campo por la nula portabilidad de dicho equipo; por lo que fue necesario diseñar métodos de aplicación isotérmica con la finalidad de prescindir de dicho aparato. La amplificación dependiente de helicasa (HDA), método de amplificación de fragmentos (NASBA), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación circular dependiente de helicasa (cHDA), son algunas de las técnicas desarrolladas donde es posible amplificar regiones de DNA a temperatura constante; Además de éstas, existen la amplificación isotérmica mediada por lazo (LAMP) y amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) las cuales requieren una enzima capaz de realizar desplazamiento de hebra ²².

Existen polimerasas que pueden unirse a una proteína a modo de oligo, llamada TP (“terminal protein”) gracias a dos motivos TPR1 y TPR2 (“terminal protein region”) los cuales le permiten a la enzima desplazar una de las hebras y utilizar la otra como templado. La polimerasa del fago phi29 presenta ambos motivos, puede utilizar un oligo o el grupo hidroxilo de la serina 232 ²³; Por años ha sido una proteína modelo para técnicas de amplificación isotérmica, sin embargo al ser un organismo mesófilo la proteína pierde actividad a temperaturas por arriba de los 30° ²⁴.

Previamente en el laboratorio se clonó la polimerasa del organismo extremófilo termoresistente *Thermotoga maritima* A4A la cual en un análisis de estructura por homología presenta un motivo TPR2 que podría darle la capacidad de realizar desplazamiento de hebra a temperaturas por arriba de los 30°C.

13. Antecedentes

13.1. Estructura de las DNA polimerasas

Basado en la comparación entre secuencias, e información estructural, las polimerasas se clasifican en siete familias A, B, C, D (polimerasas replicativas) X, Y (tolerancia a síntesis translesión) y RT. Las polimerasas replicativas poseen un sitio de unión a DNA y dNTPs muy ajustado lo que le permite realizar correctos apareamientos de bases (regla Watson-Crick), resultando en polimerasas de alta fidelidad; y una fuerte inhibición frente a bases anormales presentes en DNA con daño. Por el contrario, las polimerasas con tolerancia a bases con lesión, poseen sitios activos más tolerantes a bases aberrantes, pero con una fidelidad mucho menor, lo cual representa una desventaja durante la replicación de DNA genómico pero un beneficio durante la síntesis translesión ²⁵.

Quizá la familia mayormente estudiada es la DNA polimerasa I (pol I) o familia A, la cual incluye el fragmento Klenow de *Escherichia coli*, la DNA polimerasa de *Bacillus*, DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* y las T7 DNA polimerasa y RNA polimerasas. La segunda familia de DNA polimerasas son la α DNA polimerasa o familia B ²⁶. Todas las arqueas y eucariotas poseen al menos una polimerasa de esta familia ²⁷.

En el caso de la familia C de las DNA polimerasas presentes en el replisoma bacteriano; todos sus miembros poseen cuatro subdominios: Polimerasa e histidinol fosfatasa (PHP), palma, pulgar y dedos, organizados en un mismo polipéptido, las subfamilias poseen dominios accesorios tal como el pliegue (OB-fold) que se unen al DNA monocatenario ²⁸.

Las DNA polimerasas de la familia D están presentes en todas las Arqueas excepto en las Crenarqueas y son las responsables de iniciar la síntesis de DNA tanto en la hebra líder como en la retrasada ²⁹.

Se ha sugerido que las enzimas que pertenecen a familia X de las DNA polimerasas están involucradas en una amplia variedad de mecanismos de reparación en

eucariotas tal como la ruta de reparación por escisión de bases (BER), reparación de rompimiento de cadena doble vía recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) ³⁰.

Los miembros de la familia Y son polimerasas con una alta capacidad de realizar síntesis translesión ya que pueden replicar DNA con daños mutagénicos. Ningún miembro posee un dominio exonucleasa exhibiendo un amplio rango de errores, aunque con tasas de 100 a 1000 veces menores que miembros de otras familias ³¹.

Independientemente de los motivos estructurales que diferencian a cada familia de polimerasas todas comparten una arquitectura en común, cuya forma es comparada con una mano derecha en donde es posible apreciar los dominios “palma”, “dedos” y “pulgar” con funciones muy bien definidas (Figura 17). En el caso de la mano es un dominio involucrado en reacciones de fosforilación, mientras que los dedos median la interacción del nucleósido trifosfato entrante y la base nitrogenada con la que será apareado; por otro lado el pulgar juega un papel importante en el posicionamiento del DNA de cadena doble, en la procesividad y en la translocación ²⁶.

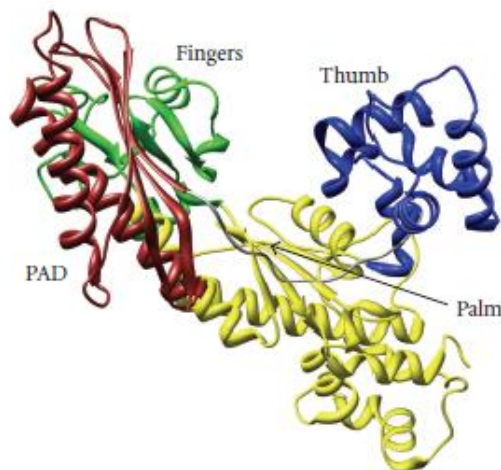


Figura 17 Estructura de la polimerasa Pol η de *S. cerevisiae* (PDB 1JIH). Se pueden apreciar los subdominios: dedos (Verde), pulgar (Azul), palma (Amarillo) y el dominio PAD (Dominio de polimerasa asociado en Rojo).

13.2. Fidelidad de las DNA polimerasas

La fidelidad en la incorporación los dNTP's es dependiente de la catálisis la cual varía con una tasa de error de 10^7 - 10^8 para las polimerasas replicativas y de hasta 2 para polimerasas mutagénicas ³².

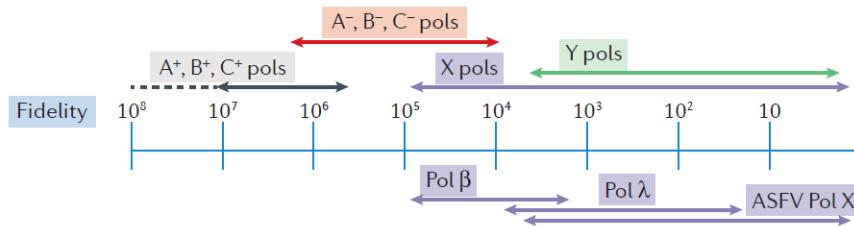


Figura 18 Rango de fidelidad de las familias de las polimerasas. Los signos + y - denotan la presencia o ausencia del dominio corrector exonucleasa, ASFV (Polimerasas del virus de la fiebre porcina Africana; Tomado de Wen-Jin Wu y et al., 2017).

La incorporación de bases incorrectas según las reglas de Watson-Crick, puede deberse distintos factores, uno de ellos es la presencia de formas tautoméricas, por ejemplo la incorporación de un nucleótido dCTP cuando la base A sufre una tautomerización tipo ceto-enol; de igual forma, cuando el pH aumenta de 6.5 a 9.5. Además el uso de Mn^{2+} un metal altamente mutagénico, el cual mejora la eficiencia de la síntesis de DNA en detrimento de la fidelidad ³².

El mecanismo de transferencia de los nucleótidos involucra la coordinación de 3 metales: un sitio (metal B) el cual tiene dos roles corrige la posición correcta del trifosfato entrante y estabiliza la carga negativa del grupo saliente PPi. Un segundo sitio (metal A), un metal divalente se enlaza a tres carboxilatos, al fosfato α y dos ligandos H_2O , activando el grupo 3'-OH del oligo cuya desprotonación (ahora nucleófilo alcóxido) ataca al P α en una reacción tipo SN2. Un tercer sitio (metal C), dicho metal se enlaza con el grupo PPi saliente y a uno de los átomos de oxígeno del grupo saliente ³².

aspartatos coordinan el átomo de Mg^{2+} y la tirosina es esencial para la actividad polimerasa ³⁴ .

Por su alto grado de equivalencia estructural la polimerasa del bacteriófago RB69 es un buen modelo estructural para las polimerasas de la familia B a pesar de su baja similitud de las secuencias entre ellas (RB69 es 18% similar a las polimerasas termófilas y 15% con la polimerasa humana pol α) ³⁵ . En la polimerasa RB69 los aspartatos 222 y 327 son los encargados de la actividad exonucleasa coordinando un átomo de Mg^{2+} en la figura 20 se muestra como una esfera azul.

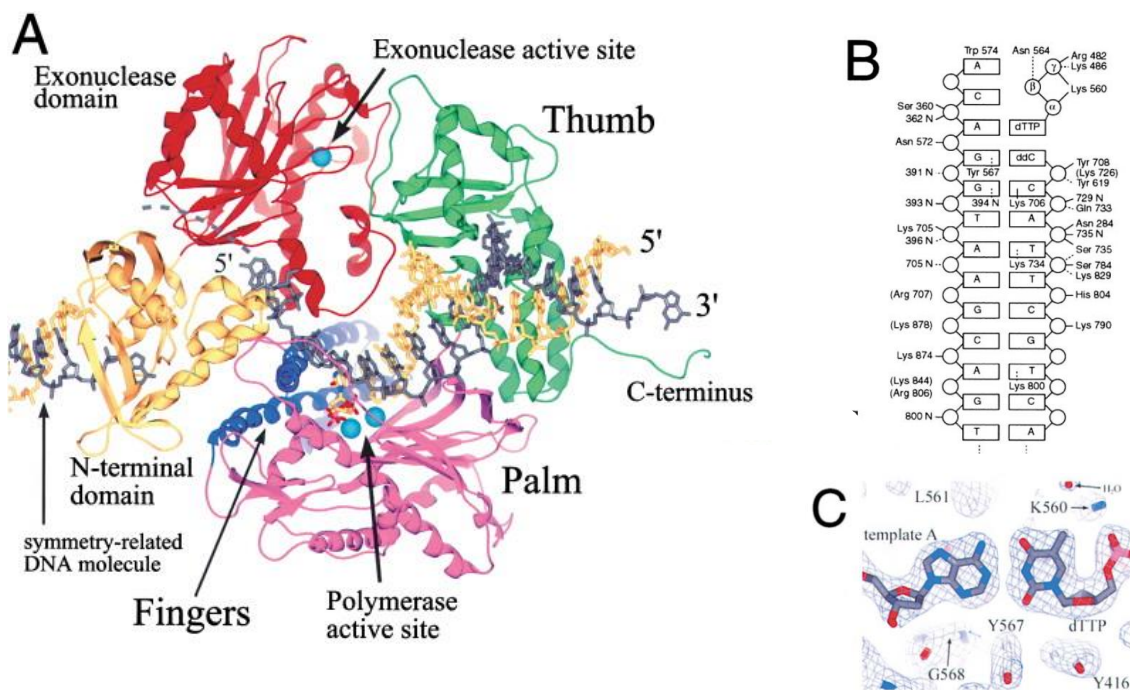


Figura 20 Estructura de la DNA polimerasa RB69. A) El dominio N terminal (Residuos 1-108) en amarillo, dominio exonucleasa (residuos 109-339) en rojo, palma (residuos 383-468 y 573-729) en magenta, dedos (residuos 469-572) en azul, y pulgar (residuos 730-903). B) Representación esquemática del contacto proteína-DNA las bases son representadas como rectángulos y los fosfatos como círculos, la interacción del Triptófano 574 causa un apilamiento de las bases con el extremo 5' terminal del templado. C) Mapa de densidad electrónica donde se puede apreciar el templado A y dTTP entrante así como las cadenas laterales de los residuos circundantes (Tomado de Matthew et al., 2001).

13.3.1. El círculo catalítico de las DNA polimerasas de la familia B

La unión de un dNTP entrante correctamente apareado al complejo binario polimerasa- cebador/DNA induce la rotación del dominio dedos de igual manera como se ha observado en otras familias de DNA polimerasas, es probable que el dNTP entrante se una al dominio abierto de los dedos de igual manera como sucede en el fragmento Klenow y en *T. aquaticus*. En el caso de la polimerasa RB69 la unión con el dNTP está medida por los residuos Arg 482, Lys 486, Lys 560, seguido un cambio conformacional en el cual los dedos giran a un estado cerrado (como se aprecia en la figura 21) liberando el dNTP al sitio activo de la polimerasa ³⁵.

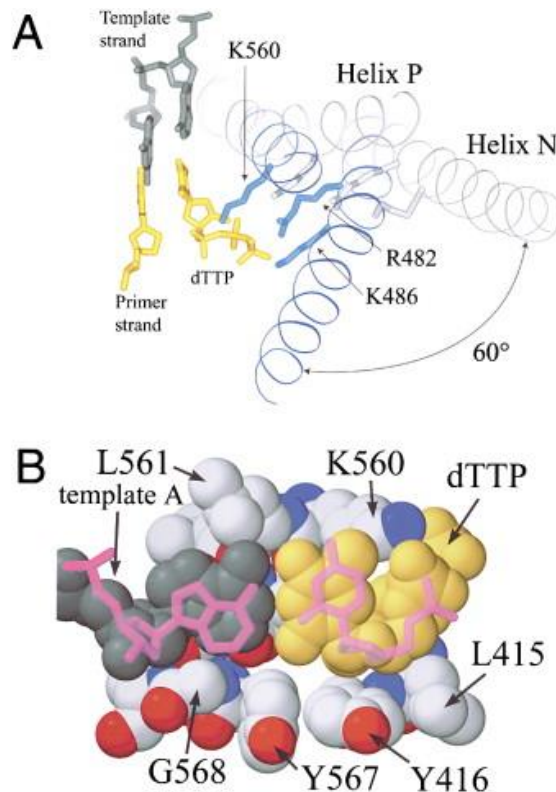


Figura 21 Reconocimiento del par de bases nacientes. A) Se muestran las helices N y P del dominio dedos cuyos residuos K486, R482 y K560 (en Azul) encargados de contactar el dNTP adopta una conformación cerrada con un giro de 60° para poder alinearlo con la base del DNA templado. B) El dominio dedos y palma forman el sitio catalítico con el dTTP entrante (dorado) y la base A (gris), en rosa superpuesto se puede ver un un apareamiento no canónico A:C (Tomado de la base PDB | 402D, 2018).

13.4. La polimerasa del bacteriófago Phi29

El bacteriófago phi29 de *Bacillus subtilis* posee un genoma lineal de aproximadamente 19.3 kb, con una proteína covalente unida al extremo 5' llamada p3 o proteína terminal (TP) codificada por el gen 3³⁶. La replicación del fago inicia cuando la TP se une covalentemente al DNA viral, quedando un grupo -OH de la Serina-232 disponible para poder ser utilizada a modo de cebador³⁷ por la DNA polimerasa viral, codificada por el gen 2. La DNA polimerasa del fago phi29 pertenece a la familia B de las polimerasas la cual posee actividad correctora 3'-5' exonucleasa lo cual la convierte en una polimerasa altamente fiel³⁸.

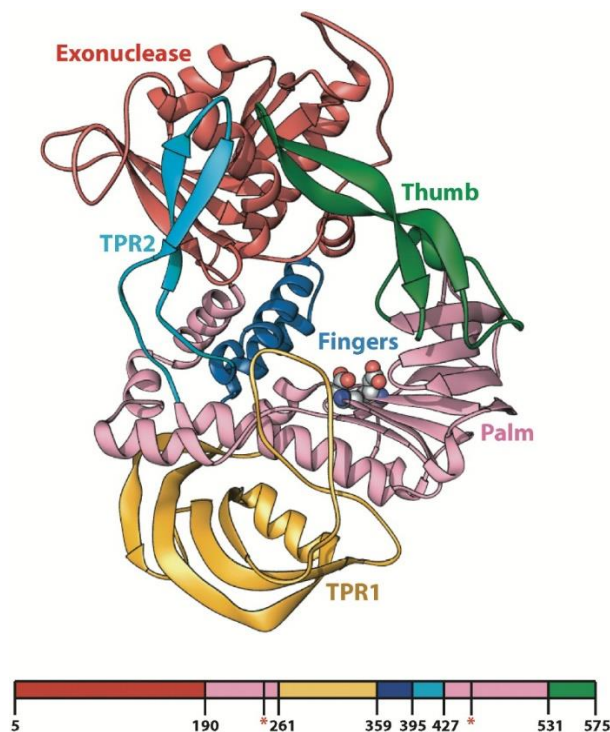


Figura 22 Representación esquemática de los dominios de DNA polimerasa de phi29. Rojo subdominio Exonucleasa (1-190), Rosa subdominio palma (190-261 y 427-531), Amarillo subdominio TPR1, Azul subdominio dedos (359-395), Celeste subdominio TPR2 (395-427), Verde subdominio pulgar (531-575) Tomado de Kamtekar et al., 2004.

Las polimerasas de la familia B capaces de unirse a una proteína TP para la elongación de DNA, posee dos motivos, uno el TPR1 (Terminal Protein Region 1) el cual está involucrado en la interacción TP y DNA; y el motivo TPR2 el cual le confiere desplazamiento de hebra y alta procesividad; además dicho motivo recuerda mucho a las proteínas de sujeción lo cual explica la alta procesividad ³⁷.

En phi29 el dominio TPR1 comprende la región entre los residuos 261 a 358, es un conjunto de α hélices y láminas β (como se muestra en la figura 23), dicho motivo se encuentra en el borde del subdominio de la palma, las mutaciones en los residuos K305 y Y315 afectan las capacidad de la DNA polimerasas de utilizar TP como cebador ²³.

El desplazamiento de hebra en polimerasas replicativas usualmente es potenciado por motivos que se encuentran en los alrededores del DNA, en el caso de la DNA polimerasa de phi29 se forman tres túneles, uno de los cuales está formado por el dominio exonucleasa, la palma y la región TPR2 ³⁹. La estrecha dimensión de este túnel (10 Å de longitud y 10 Å diámetro aproximadamente) impide el paso de DNA de doble cadena proporcionando una base estructural para el desplazamiento de hebra, hecho que queda demostrado ya que la eliminación del motivo TPR2 perjudica la procesividad de la polimerasa mutante ²³.

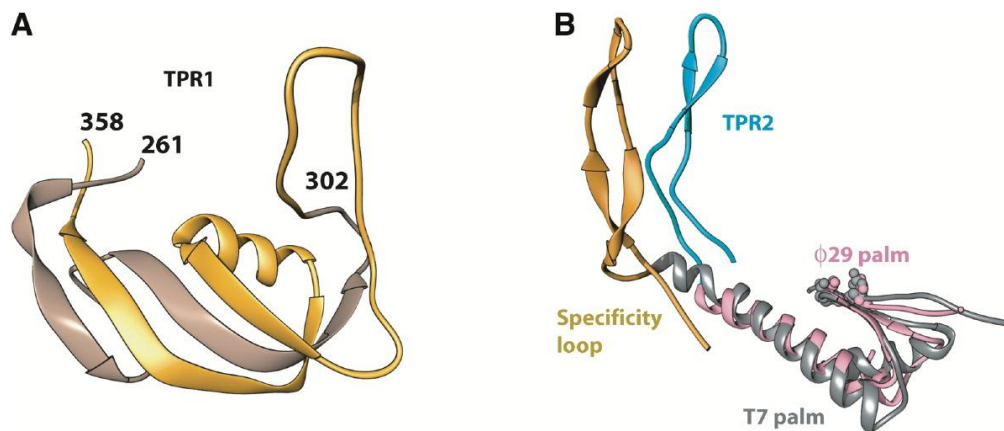


Figura 23 Estructuras de los dominios TPR1 y TPR2. A) Motivo TPR1 se encuentra entre los subdominios palma y dedos (302-358) y 261-301 con los cuales no tiene homología con otras DNA polimerasas de la familia B. B) Motivo TPR2 de phi29 (Azul) y motivo TPR2 de la T7 RNA polimerasa (dorado) Tomado de Kamtekar et al., 2004.

13.5. Métodos de Amplificación Isotérmica

13.5.1. Amplificación por Desplazamiento Múltiple MDA

En la naturaleza la replicación de DNA circular tanto de plásmidos como de virus frecuentemente sucede vía círculo rodante (RCA), que consiste en la amplificación de un oligonucleótido alineado a un templado de DNA circular en una continua amplificación en tándem, la ventaja de esta técnica es la amplificación a temperatura constante ⁴⁰.

La amplificación por desplazamiento múltiple utiliza la propiedad de desplazamiento de hebra de phi29, así como su alta procesividad y fidelidad utilizando iniciadores aleatorios amplificando hasta 10,000 veces. Para evitar la degradación debido a la actividad correctora 3'-5' exonucleasa los oligonucleótidos poseen tiofosfatos en los dos nucleótidos terminales en 3' (5'-NpNpNpNp^sNp^sN-3) y de ésta manera pueden ser desplazados sin que se degraden ⁴⁰.

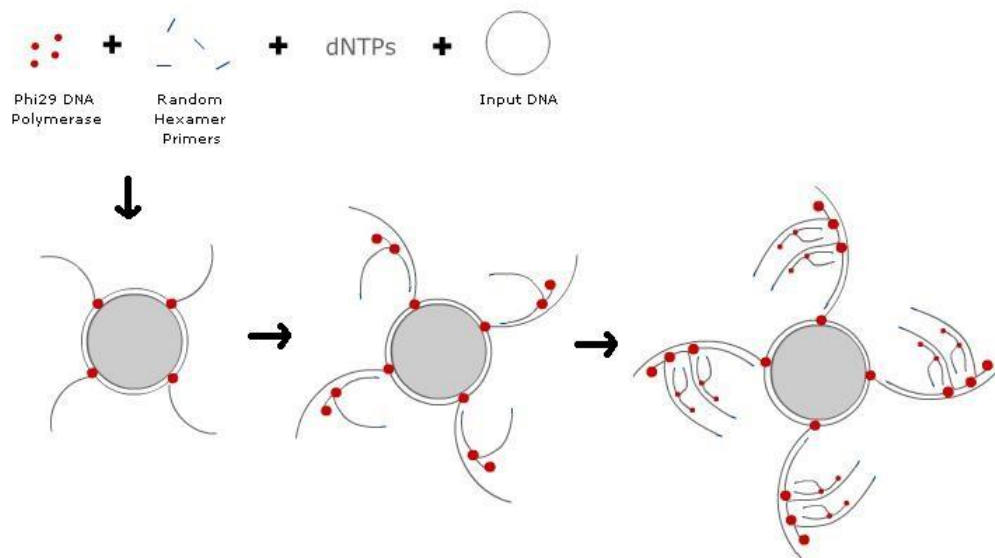
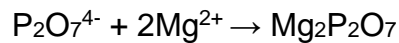
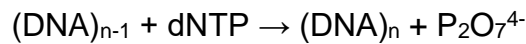


Figura 24 Esquema de amplificación por MDA. Los iniciadores al ser aleatorios se alinean a cualquier parte de la secuencia, posteriormente la phi29 DNA polimerasa desplaza los iniciadores que se encuentran adyacentes realizando más de 800 copias por hora (Tomado de <http://biol2.wikifoundry.com> 2018).

13.5.2. Amplificación isotérmica mediada por lazo LAMP

La amplificación LAMP es una tecnología de amplificación de ácidos nucleicos que amplifica DNA bajo condiciones isotérmicas ⁴¹. La técnica utiliza un set de cuatro (o hasta seis) iniciadores que reconocen cuatro secuencias diferentes y una DNA polimerasa que presente desplazamiento de hebra. Los productos amplificados son estructuras de tallo-lazo con varias repeticiones invertidas de la secuencia diana y estructuras tipos coliflor con múltiples bucles ²².

En la polimerización de DNA por la DNA polimerasa, iones de pirofosfato $P_2O_7^{4-}$ son liberados de los dNTP como subproducto, cuando se produce en grandes cantidades el pirofosfato reacciona con el Magnesio produciéndose un precipitado blanco ⁴² :



Es posible monitorear la formación del precipitado tanto a simple vista o con indicadores colorimétricos; de manera indirecta la calceína forma un complejo con los iones de Magnesio presentes en la reacción, a este punto la solución es de color naranja, si embargo cuando los iones de pirofosfato se encuentran presentes la calceína libera los iones magnesio recuperando el verde fluorescente ⁴³

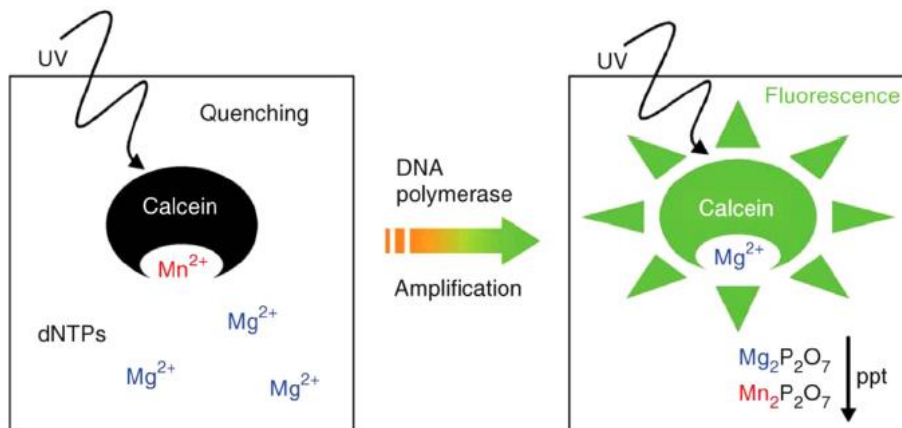


Figura 25 Indicador Calceína para monitorear una reacción de LAMP (Tomado de Zhang et al., 2014)

13.5.1. Mecanismo de amplificación de LAMP

El método está basado en la síntesis de DNA a través del desplazamiento de hebra de manera auto cíclica. La técnica utiliza la polimerasa *Bst* large fragment de *Bacillus stearothermophilus* la cual presenta desplazamiento de hebra:

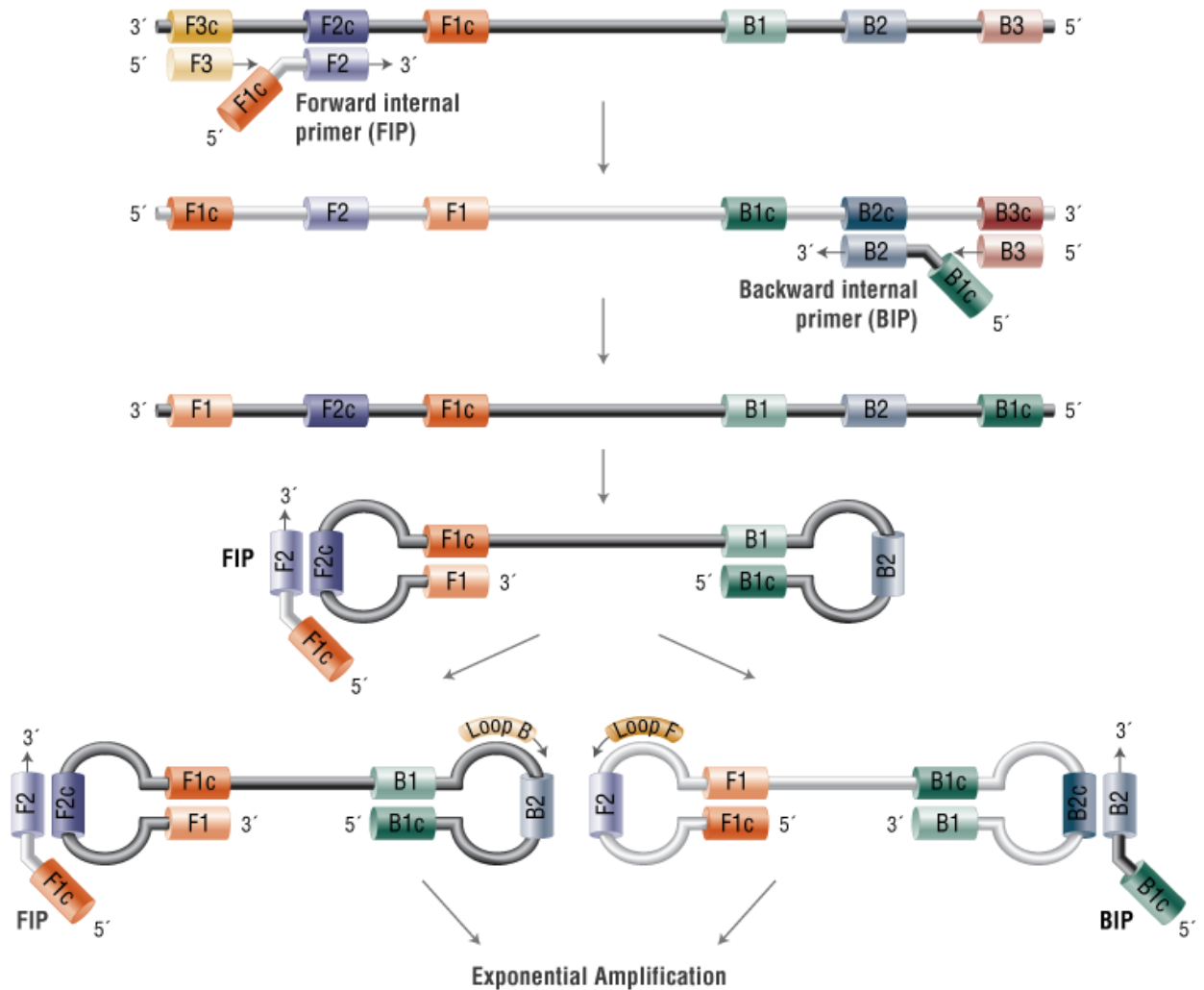


Figura 26 Mecanismo de amplificación de LAMP. Alineación de iniciadores F3 y FIP donde el oligo FIP formará parte del lazo izquierdo y F3 es un oligo necesario para desplazar la hebra adyacente, los iniciadores B3 y FIP forman parte del lazo derecho, una vez obtenida la estructura de lazos la amplificación se realiza de manera exponencial.

14. Hipótesis

Por provenir de un organismo extremófilo la DNA polimerasa de *Thermotoga marítima* A7A, que además posee un motivo TPR2 será capaz de realizar desplazamiento de hebra, necesario para poder ser implementados en técnicas de amplificación como MDA y LAMP.

15. Objetivos

- Objetivo General: Evaluar la capacidad de la DNA polimerasa de *Thermotoga marítima* A7A de realizar desplazamiento de hebra debido a la presencia del motivo TPR2.

15.1. Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de realizar desplazamiento por medio del ensayo de MDA con iniciadores resistentes a actividad exonucleasa.
- Evaluar la fidelidad de amplificación por medio de la amplificación del plásmido puc19.
- Evaluar la síntesis translesión de la polimerasa frente a templados con lesiones.
- Evaluar la capacidad de amplificar regiones específicas de gDNA de distintos patógenos frente a temperatura constante a través del método de amplificación isothermal LAMP.

16. Metodología

16.1. Purificación de la DNA polimerasa *T. marítima*

Previamente se había clonado la DNA polimerasa en el vector de expresión pet19, con cuyo plásmido se clonó en la cepa de expresión BL21, transformando 2 µl de plásmido en 40 µl de células y se sembraron en cajas con medio LB y antibiótico ampicilina. Se realizaron pre-inóculos de 20 ml de medio Lb con antibiótico para posteriormente inocular 1 litro de medio LB con antibiótico. Se dejaron a 37°C en agitación hasta que llegar a una O.D entre 0.6-0.8. Posteriormente se indujeron con 1 mM de IPTG y se incubó a 16 °C por toda la noche. Se estableció un protocolo de purificación de la siguiente manera: Se centrifugó el medio a 5,500 rpm durante 15 min. Los pellets se resuspendieron en 20 ml de BL o buffer de lisis (500 mM de NaCl, 25 mM HEPES, 10% Glicerol y 1 mM PMSF) y 1 mg/mL de lisozima para dar inicio a la lisis celular, posteriormente se puso en hielo por 30min. Después se congeló con nitrógeno líquido y se dejó descongelar a temperatura ambiente. La mezcla se sonicó entre 10 a 20 veces según su viscosidad posteriormente se puso en agitación durante 30 minutos mientras que se le agregó PEI pH 7.4 por goteo hasta que la mezcla cambió de color. La muestra se centrifuga a 13,000 rpm durante 1hr a 4°C. Se colectó la fracción soluble y se filtró (Merck Millipore de 0.45 µm). El filtrado se lavó en una solución de BL en 5 mM de Imidazol, luego BL en 15 mM Imidazol y un tercer lavado en 20 mM Imizadazol.

16.2. Ensayo de MDA

Para el ensayo de desplazamiento de hebra se utilizó el plásmido puc19 el cual codifica para el fragmento N-terminal del gen la β-galactosidasa. En una reacción de 50 µL el cual contiene un buffer de reacción para polimerasa phi29, el plásmido pUC19 a una concentración de 10 ng/µL, albumina de suero bovino (BSA) a una concentración de 100 µg/mL, diotiotreitol (DTT) 2 mM, iniciadores hexaméricos aleatorios (Random Hexameric Primer ThermoFischer) 5 µM, DNA polimerasa a una concentración de 100 nM final y agua MilliQ.

16.3. Fidelidad de la DNA polimerasa

A partir de pUC19 amplificado mediante MDA por la polimerasa, se tomaron hasta 250 ng y se trataron simultáneamente con HindIII y DpnI durante 2h a 37°C en un volumen total de 50 µL en la siguiente reacción: DNA hasta 250 ng Buffer 2.1 (New England Biolabs), HindIII (NEB) 1 µL, DpnI 1 µL y agua cbp 50 µL. Posteriormente a la digestión el DNA se purifica por columna (Qiagen PCR purification kit), y se resuspendió en 20 µL en agua libre de nucleasas. Del DNA purificado se tomaron al menos 100 ng. Este DNA se recircularizó mediante ligación en una reacción de 20 µL durante toda la noche a 16 °C. Con los plásmidos recirculados se transforma con el procedimiento de rutina 100 µL de células químicamente competentes de la cepa XL-1 Blue (Tc) de *E. coli* con 20 ng de DNA ligado, después del choque térmico, se adicionó 1 mL de medio SOC y las células se incubaron a 37°C por 2hr. Se siembran alícuotas de 250 µL en placas de 150 mm suplementadas con ampicilina (100 µg/mL), X-Gal (100 µg/mL) e IPTG (1 mM). Se incubaron las placas a 37°C al menos 24hr hasta la aparición de colonias. Para obtener una óptima actividad de la β-galactosidasa y discernir entre colonias azules y blancas, se incubaron las placas a temperatura ambiente 30°C por al menos 2hr.

Para calcular la tasa de error se utilizó la siguiente formula:

$$ER = \frac{f - f_0}{344bp} * d$$

Donde:

f = frecuencia de mutantes (colonias blancas/ colonias totales), f₀= frecuencia de fondo (colonias blancas/ colonias totales, transformando con la misma cantidad de pUC19 tratado con las condiciones que el DNA proveniente de MDA), d= número de veces que el DNA fue duplicado por la polimerasa en estudio (ng de producto/ng iniciales de DNA).

16.4. Síntesis Translesión

Para evaluar la síntesis translesión se marcaron iniciadores en el extremo 5' con fosforo radioactivo (γ -ATP). En una reacción de 30 μ L, se ajustan los iniciadores a una concentración de 1.25 μ M, cinasa (T4 polynucleotide kinase), Buffer PNK (NEB) y 1 μ L de ATP [γ - 32 P], la reacción se incubó durante 1hr a 37°C, posteriormente se purifica por medio de kit de purificación considerando una pérdida del 30% quedando los iniciadores a una concentración de 200 nM. Cada uno de los iniciadores se hibridan a un templado complementario el cual contiene una lesión frente la cual se evaluó la capacidad de traspasar dicha lesión frente a un gradiente de tiempo (0, 30, 120 y 480 segundos) con la polimerasa *Thermotoga marítima* A7A a una concentración final de 40 nM .

Tabla 3 Iniciadores síntesis Translesión. El * indica el oligo marcado radioactivamente

Nombre	Secuencia	Longitud
OligoDg*	5' CAC TGA CTG TAT GAT G 3'	16 pb
5S6R	5' CTC GTC AGC ATC TXC ATC ATA CAG TCA GTG 3'	30 pb
5R6S	5' CTC GTC AGC ATC TXC ATC ATA CAG TCA GTG 3'	30 pb
6-4 PP	5' CTC GTC AGC ATC XXC ATC ATA CAG TCA GTG 3'	30 pb
CPD	5' CTC GTC AGC ATC XXC ATC ATA CAG TCA GTG 3'	30 pb
OligoPrimer*	5' TGT TAG CAG ACA AGC CGA T 3'	19 pb
Guanine	5' AAG AGT AC G ATC GGC TTG TCT GCT AAC A 3'	28 pb
8-oxoG	5' AAG AGT AC X ATC GGC TTG TCT GCT AAC A 3'	28 pb
Abasic site	5' AAG AGT AC X ATC GGC TTG TCT GCT AAC A 3'	28 pb

16.5. Actividad exonucleasa y polimerasa

De igual manera que con el ensayo de síntesis translesión se evaluó la actividad exonucleasas y polimerasa (*Thermotoga* DNA y phi29 DNA polimerasas) frente a una mezcla de reacción en ausencia y presencia de dNTP's 1 mM y MgCl₂ 10 mM con el oligoPrimer y el templado Guanine.

16.6. Ensayo LAMP

En una mezcla de reacción: en una reacción de 25 µL, dNTPs 400 µM, Buffer phi29 (Thermo Fisher) 1x, oligo F3 y B3 0.2 µM, iniciadores FIP y BIP 1.6 µM, BSA 10 µg/mL, gDNA (de los organismos descritos en la tabla 3) 1 ng total y agua, se incubó durante 2 minutos a 95°C para poder alinear los iniciadores al gDNA, seguido de un enfriamiento en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se incubó a 65°C la DNA polimerasa de *Thermotoga marítima* A7A durante 3 horas. El amplicón se visualiza en un gel de agarosa al 3%.

Tabla 4 Iniciadores para el ensayo LAMP

Nombre	Oligo	Secuencia	Gen diana
Klebsiella pneumoniae	F3-Kn	5'CCTGATTGCATTCGCCACT-3'	Khe ⁴⁴
	B3-Kn	CCTCCAGCACGTAGATGAAC	
	FIB-Kn	GTTGAGACGTAAACCGCGCCCGACGATGCCACTTATCCCG	
	BIP-Kn	GATCCACCACGAGCGACTGCTTCCTCATCGCTCTCCGC	
Candida albicans	F3-Ca	ATGCGGGATGAACCGAAC	ITS ⁴⁵
	B3-Ca	TCGTCACTGACCTCCACG	
	FIB-Ca	TTCCGACTTCCATGGCCACCGAATGCACGCTCATCAGACA	
	BIP-Ca	CACCGGCCGAATGAACTAGCCCGTCAAACAGCAATCACGG	
Salmonella typhimurium	F3-St	GCGGTGGGTTTTGTTGTCT	invA ⁴⁶
	B3-St	CGTAAAGCTGGCTTTCCTT	
	FIB-St	TCCGCGACAGTTCTGAACCCTCTATTGTCACCGTGGTCC	
	BIP-St	TGCCGATTTGAAGGCCGGTACAGTACGCTTCGCCGTTT	

17. Resultados

17.1. Estructura por Homología

A partir de la secuencia de aminoácidos y con ayuda del servidor i-tasser, fue posible modelar la estructura por homología de la DNA polimerasa *Thermotoga* DNA polimerasa (Con un C-score -1.20), los motivos presentes en la proteína se obtuvieron a partir de la alineación con la polimerasa del bacteriófago phi29.

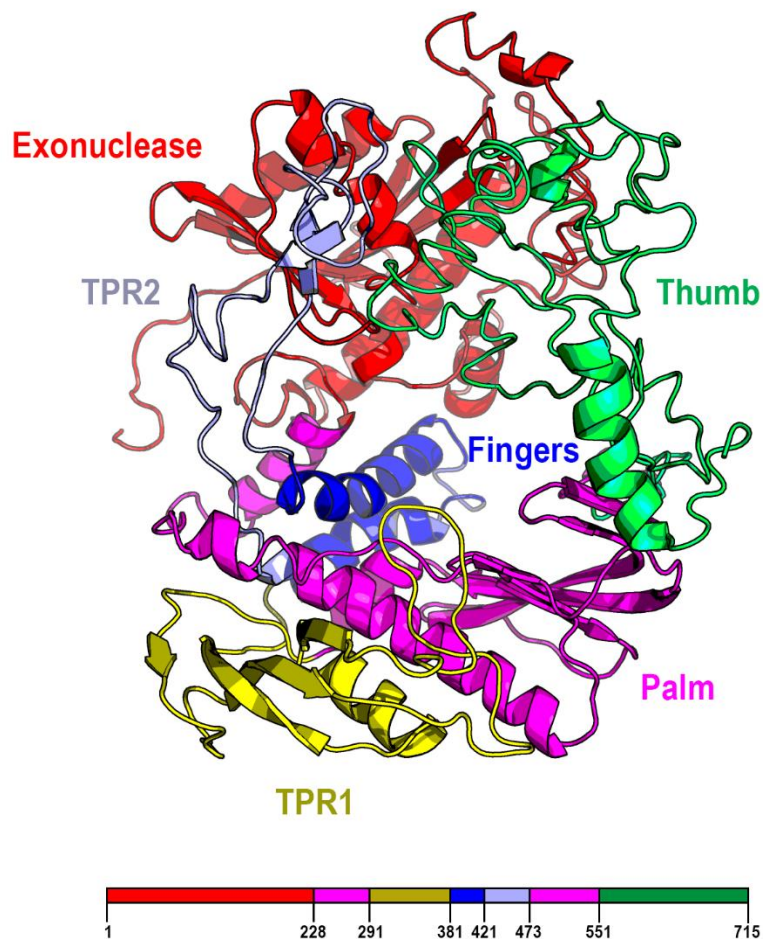


Figura 27 Estructura por Homología de la DNA pol de *T. maritima*. Es posible apreciar los subdominios pulgar (verde), palma (rosa), dedos (Azul) presentes en todas las polimerasas. En azul claro se puede apreciar el dominio TPR2 responsable del desplazamiento de hebra en la polimerasas de la familia B.

17.2. Ensayo MDA

La polimerasa de *Thermotoga marítima* A7A es capaz de efectuar amplificación isotérmica (50°C) en un ensayo de MDA en el curso de 6 horas como puede verse en la figura 28, el concatámero muestra un peso molecular mayor a las 10 kpb, seguido de una digestión con la enzima HindIII, con la cual es posible apreciar el tamaño del templado inicial 2686 pb. La concentración final en el tubo de reacción fue de 60.36 ng/μL en promedio.

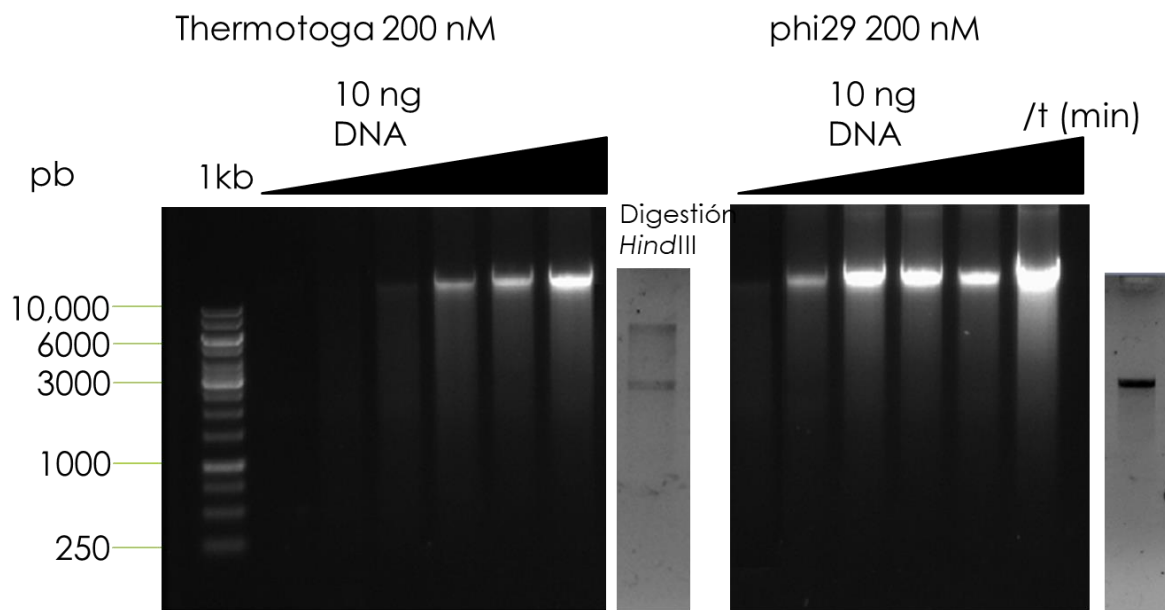


Figura 28 Amplificación de *Thermotoga marítima* y phi29. El amplicón producto del ensayo de MDA se corre en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

17.3. Fidelidad de la DNA polimerasa

Evaluar la fidelidad en la replicación de una DNA polimerasa nos permitirá determinar la posible utilidad biotecnológica de dicha enzima.

Una vez demostrada la capacidad de efectuar MDA se procedió a evaluar la tasa de error de la polimerasa de *Thermotoga marítima* A7A frente lo reportado por la polimerasa phi29.

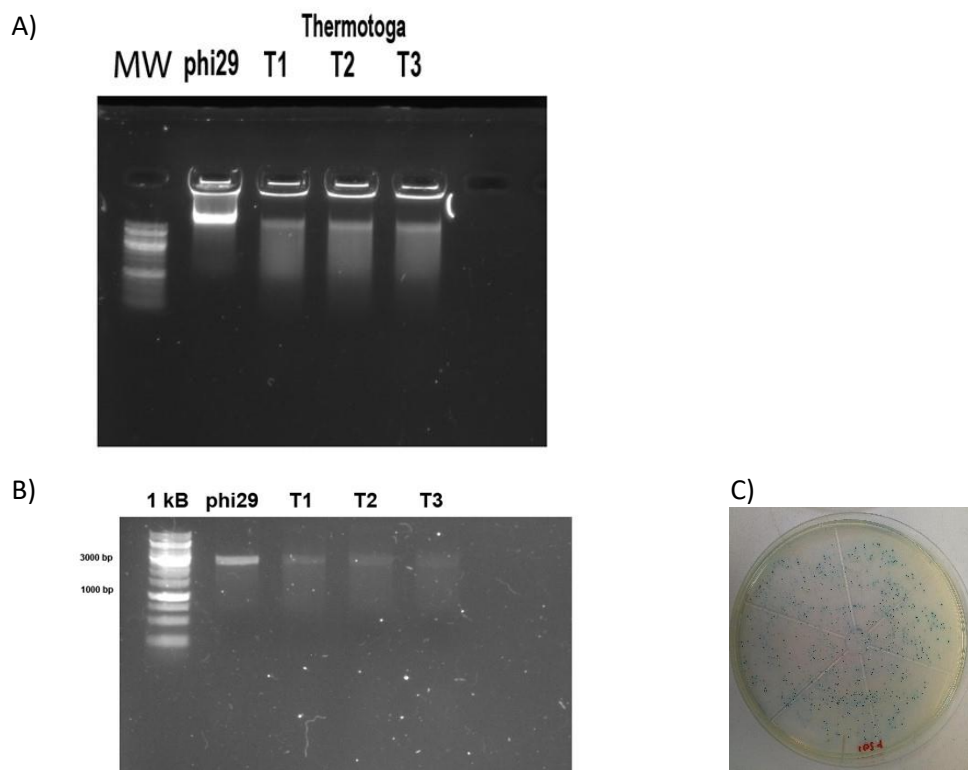


Figura 29 Amplificación del plasmido pUC19 por medio de MDA. A) Amplificación isothermal antes de la reacción de digestión con HindIII. B) Productos de digestión de 2686 pb. C) Los productos digeridos son recirculados y transformados en la cepa XL-1 Blue la cual muestra una colonia azul cuando no hubo errores en la amplificación en presencia de X-Gal.

17.3.1. Tasa de Error

En la tabla 4 podemos apreciar la tasa de error de cada uno de los eventos de replicación y el promedio de tasa de error de 7×10^{-3} .

Tabla 5 Resultados de la evaluación de fidelidad por medio de MDA.

ID	Azules			Blancas			Total	f, frecuencia mutantes	Concentración final MDA	d, ng DNAfin/ ng DNAini	ER
f0	1603	1647	1573	17	13	7	4860	0.007613169			0
PHI29	962	1008	1139	16	7	2	3134	0.007977026	57.27 ng/uL	114.54	0.00012186
T1	342	351	322	12	12	8	1047	0.030563515	53.74 ng/uL	107.48	0.007212582
T2	451	360	457	19	15	13	1315	0.035741445	68.65 ng/uL	137.3	0.011292434
T3	650	632	600	8	11	17	1918	0.018769552	58.7 ng/uL	117.4	0.003829706
										Promedio	7×10^{-3}

17.5. Actividad Exonucleasa y polimerasa

Ensayo de actividad exonucleasa y polimerasa cuando la polimerasa se incubaba en ausencia o presencia de dNTPs una reacción que se incubó a 6 diferentes tiempos (0, 30, 60, 120, 240 y 480 segundos). La concentración de polimerasa en *Thermotoga maritima* fue de dos veces la concentración de phi29.

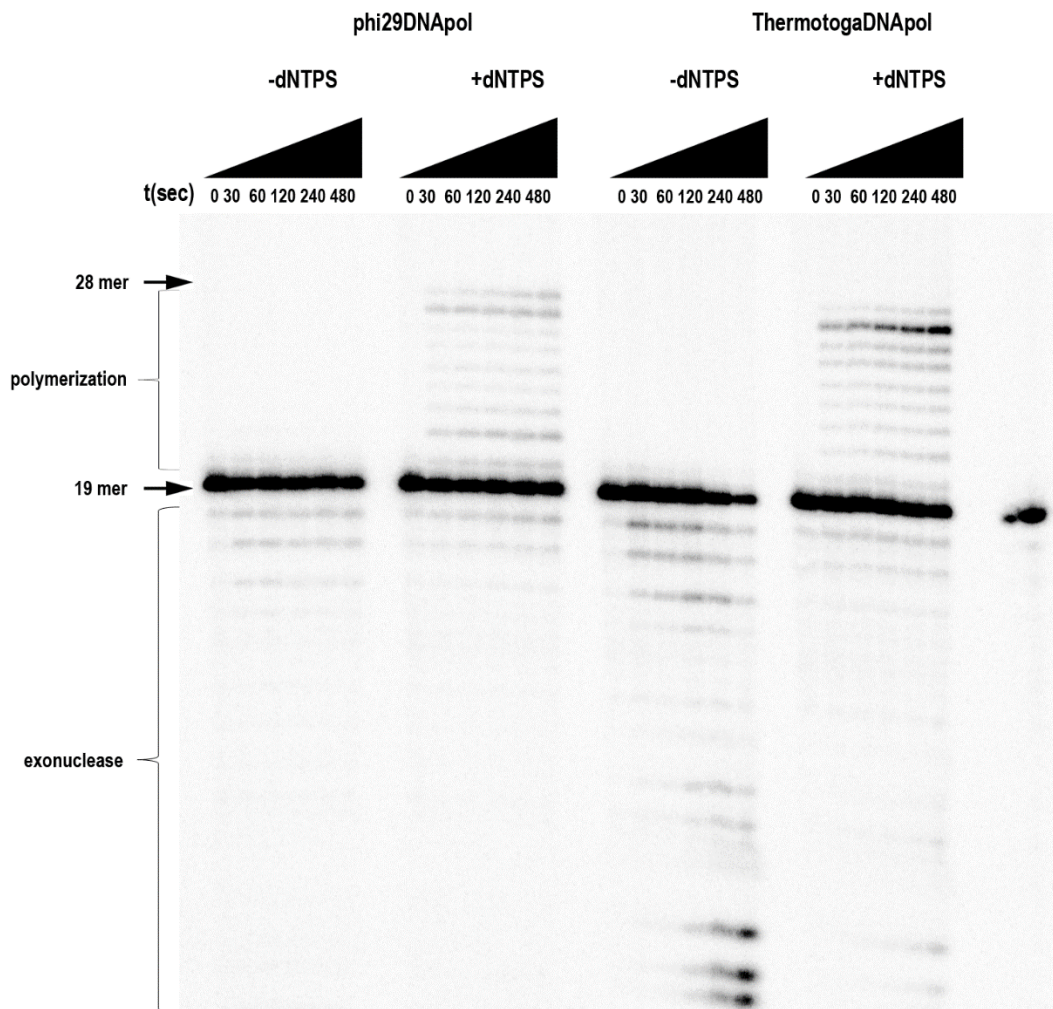


Figura 31 Comparación de la actividad exonucleasa de phi29 y *Thermotoga maritima* A7A. Para el caso de la DNA polimerasa de T. marítima se utilizó una concentración de 40 nM frente phi29 de 20 nM.

17.6. Ensayo LAMP

Ensayo de amplificación de regiones específicas, utilizando la capacidad de desplazamiento de hebra y su posible aplicación para la detección de patógenos a temperatura constante.

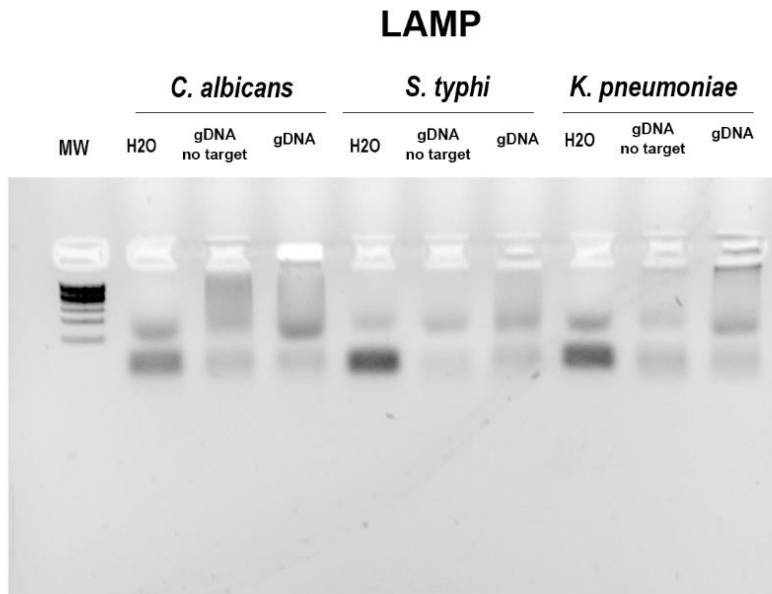


Figura 32 Ensayo de amplificación por LAMP. Para la detección del patógeno a través de la técnica LAMP, se utilizaron 1 set de cuatro diferentes primer cuyo gen diana fue diferente en cada caso; para *C. albicans* fue la región ITS; en *S. typhi* el gen *invA* mientras que para *K. pneumoniae* el gen *khe*.

18. Discusión

Por medio de la amplificación vía MDA fue posible obtener a partir de 10 ng totales de plásmido pUC19 una concentración final de 60.36 ng/ μ L (una vez purificado por Kit), la amplificación se efectúa a una temperatura de 50°C lo cual brinda una ventaja sobre la polimerasa de phi29 un organismo mesófilo cuya óptima temperatura es entre 25°C y 30°C.

El uso de oligos resistentes a la actividad exonucleasa permite amplificar desplazando la hebra adyacente sin que sea degradada por la polimerasa ya que ésta presenta actividad 3'-5' exonucleasa.

Evaluar la fidelidad de la polimerasa en un evento de replicación nos permitirá disponer de un parámetro para los posibles usos biotecnológicos, ya que por ejemplo las polimerasas con una alta fidelidad son generalmente utilizadas para secuenciación de genomas completos (WGA whole genome amplification), como el caso de la polimerasa phi29. En el ensayo de fidelidad la polimerasa de *Thermotoga maritima* presenta una tasa de error promedio de 7×10^{-3} , muy por debajo de las polimerasas comerciales ya que por ejemplo McInerney en 2014 reporta tasas de error: para Taq $1-20 \times 10^{-5}$, *pfu* $1-2 \times 10^{-6}$, Phusion Hot Start 4×10^{-7} . En este ensayo, phi29 mostró una tasa de error de 12×10^{-5} . Con dicha tasa de error tan alta es posible que acepte una amplia variedad de sustratos.

Para comprobar si la alta tasa de error podría estar involucrada en la replicación en DNA con daño, se llevó a cabo la síntesis translesión. Por lo que se evaluaron 6 posibles daños que normalmente presenta el DNA: 8-oxo-Guanina (es el tipo de lesión más común que resulta de la interacción del DNA con el oxígeno), AB (abasic site, es una ubicación en el DNA que no presenta una base de purina o pirimidina), 5R-6S y 5S-6R timin glicol (los cuales son el resultado del oxígeno con una timina), CPD (dímero de pirimidina un tipo de daño provocado por la interacción del DNA con energía de alta intensidad como luz UV) y 6-4 PP (dímeros de ciclobutano pirimidina un subproducto de la reacción de CPD). El ensayo mostró que la polimerasa de *Thermotoga maritima* es capaz de traspasar la lesión 8-oxoG,

seguido de las lesiones de timin glicol y en menor medida el sitio abásico, por otro lado la polimerasa muestra nula polimerización cuando se trata de las lesiones fotoproducto.

La polimerasa *Thermotoga maritima* muestra actividad 3'-5' exonucleasa en ausencia de dNTPs así como de actividad 5'-3' polimerasa dicha actividad fue medida utilizando un oligo de 19 pb marcado en el extremo 5' con γ -P32 alineado a un templado sin marcar de 28 pb. Debido a una menor actividad de la enzima se utilizó una concentración dos veces mayor al de la polimerasa control phi29.

La amplificación isotérmica MDA posee la desventaja de utilizar oligos aleatorios lo que significa se pueden alinear a cualquier muestra de DNA presente en el tubo de reacción, lo cual lo convierte en una técnica susceptible a contaminación, para mediar esto en 2000 se diseñó la técnica de amplificación mediada por lazo, dicha técnica utiliza un set de 4 a 6 oligos los cuales se alinean a regiones muy específicas del DNA diana. En el ensayo de amplificación por lazo de este proyecto es posible observar una alta especificidad con los oligos para LAMP con *S. typhi* y *K. pneumoniae*, sin embargo, en ninguno de los carriles es posible apreciar el patrón típico de una amplificación vía LAMP, esto quizá debido a la fuerte actividad exonucleasa previamente descrita.

19. Conclusiones

- La polimerasa del organismo extremófilo *Thermotoga maritima* presenta un motivo TPR2 el cual le confiere la capacidad de realizar desplazamiento de hebra.
- La DNA polimerasa de *Thermotoga maritima* es una enzima termoestable capaz de realizar desplazamiento de hebra por arriba de la temperatura de la DNA pol de phi29.
- La DNA polimerasa de *Thermotoga maritima* es capaz de realizar amplificación isoterma a través del método MDA el cual utiliza oligos aleatorios resistentes a la actividad 3'-5' exonucleasa.
- La baja fidelidad mostrada y estabilidad térmica en el dicho ensayo podría ser un indicio de la capacidad de la polimerasa para aceptar una amplia variedad de nucleótidos modificados, con la cual se pueden desarrollar nuevas técnicas de amplificación.
- La capacidad de desplazamiento de hebra le permitiría identificar regiones específicas con el ensayo isotérmico LAMP, como una alternativa a la Bst DNA polimerasa.

20. BIBLIOGRAFÍA

1. Peralta-Castro, A., Baruch-Torres, N. & Brieba, L. G. Plant organellar DNA primase-helicase synthesizes RNA primers for organellar DNA polymerases using a unique recognition sequence. *Nucleic Acids Res.* **45**, 10764–10774 (2017).
2. Kusakabe, T. & Richardson, C. C. Gene 4 DNA primase of bacteriophage T7 mediates the annealing and extension of ribo-oligonucleotide at primase recognition sites. *J. Biol. Chem.* **272**, 12446–12453 (1997).
3. CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **227**, (1970).
4. Cha, T. A. & Alberts, B. M. Studies of the DNA helicase-RNA primase unit from bacteriophage T4. A trinucleotide sequence on the DNA template starts RNA primer synthesis. *J. Biol. Chem.* **261**, 7001–7010 (1986).
5. Kuchta, R. D. & Stengel, G. Mechanism and evolution of DNA primases. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**, 1180–1189 (2010).
6. Pronk, R. & van der Vliet, P. C. The adenovirus terminal protein influences binding of replication proteins and changes the origin structure. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2293–2300 (1993).
7. Wanrooij, S. *et al.* Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11122–11127 (2008).
8. Ito, N., Nureki, O., Shirouzu, M. & Yokoyama, S. Crystal structure of the Pyrococcus horikoshii DNA primase- UTP complex : implications for the mechanism of primer synthesis. 913–923 (2003). doi:10.1046/j.1365-2443.2003.00693.x
9. Kusakabe, T., Hine, a V, Hyberts, S. G. & Richardson, C. C. The Cys4 zinc finger of bacteriophage T7 primase in sequence-specific single-stranded DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4295–4300 (1999).
10. Frick, D. N. & Richardson, C. C. Key Words replication, RNA, oligoribonucleotides, polymerase, helicase. 39–80 (2001).
11. Koepsell, S. A., Larson, M. A., Frey, C. A., Hinrichs, S. H. & Griep, M. A. Staphylococcus aureus primase has higher initiation specificity, interacts with single-stranded DNA stronger, but is less stimulated by its helicase than Escherichia coli primase. *Mol. Microbiol.* **68**, 1570–1582 (2008).
12. Larson, M. A. *et al.* Hyperthermophilic Aquifex aeolicus initiates primer synthesis on a limited set of trinucleotides comprised of cytosines and guanines. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5260–5269 (2008).
13. Thirlway, J. & Soutanas, P. In the Bacillus stearothermophilus DnaB-DnaG complex, the activities of the two proteins are modulated by distinct but overlapping networks of residues. *J. Bacteriol.* **188**, 1534–1539 (2006).
14. Qimron, U., Lee, S. J., Hamdan, S. M. & Richardson, C. C. Primer initiation and extension by T7 DNA primase. *EMBO J.* **25**, 2199–2208 (2006).
15. Akabayov, B. *et al.* DNA recognition by the DNA primase of bacteriophage T7: a structure-function study of the zinc-binding domain. *Biochemistry* **48**, 1763–1773

- (2009).
16. Kato, M., Ito, T., Wagner, G., Richardson, C. C. & Ellenberger, T. Modular architecture of the bacteriophage T7 primase couples RNA primer synthesis to DNA synthesis. *Mol. Cell* **11**, 1349–1360 (2003).
 17. Diray-Arce, J., Liu, B., Cupp, J. D., Hunt, T. & Nielsen, B. L. The Arabidopsis At1g30680 gene encodes a homologue to the phage T7 gp4 protein that has both DNA primase and DNA helicase activities. *BMC Plant Biol.* **13**, 1 (2013).
 18. Manchekar, M., Scissum-Gunn, K. D., Hammett, L. A., Backert, S. & Nielsen, B. L. Mitochondrial DNA recombination in *Brassica campestris*. *Plant Sci.* **177**, 629–635 (2009).
 19. Gualberto, J. M. *et al.* The plant mitochondrial genome: Dynamics and maintenance. *Biochimie* **100**, 107–120 (2014).
 20. Christensen, A. C. Dual-Domain, Dual-Targeting Organellar Protein Presequences in Arabidopsis Can Use Non-AUG Start Codons. *Plant Cell Online* **17**, 2805–2816 (2005).
 21. Horton, R. M. PCR-Mediated Recombination and Mutagenesis. **3**, 99–100 (1995).
 22. Gill, P. & Ghaemi, A. Nucleic acid isothermal amplification technologies - A review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **27**, 224–243 (2008).
 23. Kamtekar, S. *et al.* Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage ϕ 29. *Mol. Cell* **16**, 609–618 (2004).
 24. Garmendia, C., Bernad, A., Esteban, J. A., Blanco, L. & Salas, M. The bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *J. Biol. Chem.* **267**, 2594–2599 (1992).
 25. Jozwiakowski, S. K., Keith, B. J., Gilroy, L., Doherty, A. J. & Connolly, B. A. An archaeal family-B DNA polymerase variant able to replicate past DNA damage: Occurrence of replicative and translesion synthesis polymerases within the B family. *Nucleic Acids Res.* **42**, 9949–9963 (2014).
 26. Steitz, T. A. DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* **274**, 17395–17398 (1999).
 27. Rogozin, I. B., Makarova, K. S., Pavlov, Y. I. & Koonin, E. V. A highly conserved family of inactivated archaeal B family DNA polymerases. *Biol. Direct* **3**, 1–5 (2008).
 28. Barros, T. *et al.* A structural role for the PHP domain in *E. coli* DNA polymerase III. *BMC Struct. Biol.* **13**, 1 (2013).
 29. Sauguet, L., Raia, P., Henneke, G. & Delarue, M. Shared active site architecture between archaeal PolD and multi-subunit RNA polymerases revealed by X-ray crystallography. *Nat. Commun.* **7**, 1–12 (2016).
 30. Lecointe, F., Shevelev, I. V., Bailone, A., Sommer, S. & Hübscher, U. Involvement of an X family DNA polymerase in double-stranded break repair in the radioresistant organism *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* **53**, 1721–1730 (2004).
 31. Pata, J. D. NIH Public Access. **1804**, 1124–1135 (2011).

32. Wu, W., Yang, W. & Tsai, M. How DNA polymerases catalyse replication and repair with contrasting fidelity. (2017). doi:10.1038/s41570-017-0068
33. Savino, C. *et al.* Insights into DNA replication: The crystal structure of DNA polymerase B1 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Structure* **12**, 2001–2008 (2004).
34. Kropp, H. M., Betz, K., Wirth, J., Diederichs, K. & Marx, A. Crystal structures of ternary complexes of archaeal B-family DNA polymerases. *PLoS One* **12**, 1–20 (2017).
35. Matthew C. Franklin, Jimin Wang, T. A. S. Global congress for qualitative health research. *Qual. Health Res.* **21**, 299–300 (2011).
36. M, S. Protein-priming of DNA replication. *Annu Rev Biochem* 39–71 (1991).
37. Kamtekar, S. *et al.* The ϕ 29 DNA polymerase:protein-primer structure suggests a model for the initiation to elongation transition. *EMBO J.* **25**, 1335–1343 (2006).
38. Salas, M. Replication of phage phi29 DNA with purified terminal protein and DNA polymerase : Synthesis of full-length 429 DNA. **82**, 6404–6408 (1985).
39. Berman, A. J. *et al.* Structures of phi29 DNA polymerase complexed with substrate: The mechanism of translocation in B-family polymerases. *EMBO J.* **26**, 3494–3505 (2007).
40. Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L. & Lasken, R. S. Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. 1095–1099 (2001). doi:10.1101/gr.180501.4
41. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, (2000).
42. Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N. & Notomi, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 150–154 (2001).
43. Zhang, X., Lowe, S. B. & Gooding, J. J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.* **61**, 491–499 (2014).
44. Hartman, L. J. *et al.* Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: Screening of nonhuman primates. *J. Mol. Diagnostics* **11**, 464–471 (2009).
45. Wahyuningsih, R., Freisleben, H. J., Sonntag, H. G. & Schnitzler, P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3016–3021 (2000).
46. K. Rahn, S . A. De Grandis, 2 R. C. Clarke, ' S . A. McEwen, 3 J . E. Galin; C. Ginocchio, 4, 3, R. C. 1115 and C. L. G. & 'A. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Infect. Genet. Evol.* **1**, 313–320 (2002).