



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

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

**“La replicación del ADN por recombinación no homóloga de organelos de
Arabidopsis es mediada por las ADN polimerasas organelares (POPs)”**

Tesis que presenta

IBQ. Paola Libertad García Medel

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Director de tesis

Dr. Luis Gabriel Briebe de Castro

Irapuato, Guanajuato

Agosto, 2018

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Bioquímica Estructural de la Unidad de Genómica Avanzada-CINVESTAV IPN, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Luis Gabriel Brieba de Castro y la asesoría del Dr. Alfredo Herrera Estrella y del Dr. Alfredo Cruz Ramírez, todos investigadores titulares de la Unidad de Genómica Avanzada- CINVESTAV IPN, Unidad Irapuato.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **CONACyT** por la beca número 783886 otorgada para la manutención durante mi estancia en la maestría por el período de Septiembre-2016 a Agosto-2018.

Agradezco al **CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato** y a la **Unidad de Genómica Avanzada** por el apoyo otorgado desde instalaciones, reactivos y demás insumos.

Agradezco al **Dr. Luis Gabriel Briebe de Castro** por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, por cada consejo, sugerencia y llamadas de atención que sin duda contribuyeron a mi formación tanto académica como personal.

Agradezco al **Dr. Alfredo Herrera Estrella** y al **Dr. Alfredo Cruz Ramírez** por haber formado parte de mi comité, ya que sin duda siempre tenían preguntas muy interesantes en cada tutorial, por las observaciones, correcciones, sugerencias y propuestas para mejorar la presentación del trabajo.

Agradezco al **Dr. Stefan de Folter**, quién en un inicio formó parte de mi comité tutorial, por las sugerencias y dudas planteadas para mejorar mi proyecto.

Agradezco a la **I.A. Corina Elizabeth Díaz Quezada**, auxiliar del laboratorio de Bioquímica estructural, por ayudarme a purificar proteínas cuando ya me las había acabado y sobre todo porque siempre buscaba la manera de obtener los insumos que requería para algunos experimentos.

Agradezco al **M.C. Noé Baruch Torres** por enseñarme y guiarme en el desarrollo de mis experimentos preliminares de mi proyecto.

Agradezco a mi familia, **mi mamá** y **hermano** por brindarme su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, por sus consejos y ayuda cuando más lo necesitaba. A mis amigos de generación por haber hecho de esto una estancia muy agradable.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I.- INTRODUCCIÓN	11
2.- ANTECEDENTES.....	13
2.1 Genomas organelares.....	13
2.2 Lesiones en el genoma	14
2.3 Mecanismos de reparación de ADN dañado	15
2.4 Recombinación homologa (HR).....	15
2.5 Non-homologous end-joining (NHEJ).....	16
2.6 Microhomology mediated end joining (MMEJ).....	17
2.7 Replisoma organelar.....	18
2.8 ADN Polimerasas de organelos de plantas (POPs)	20
2.9 Proteínas de unión a cadena sencilla (SSBs) de organelos de plantas	22
2.9.1 SSB de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtmtSSB)	22
2.9.2 OSB de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtOSB)	24
2.9.3 Whirlies de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtWhy).....	25
2.10 Otros mecanismos de reparación de ADN de plantas.....	26
3.- PREGUNTA BIOLÓGICA.....	27
4.- HIPÓTESIS	27
5.- OBJETIVOS	28
6.- METODOLOGÍA.....	28
6.1-Clonación de las Proteínas de unión a cadena sencilla (SSBs) recombinantes	28
6.2- Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	29
6.3 Sustratos para ensayos de Microhomología	31
6.4 Ensayos de Microhomología (MMEJ).....	31
6.5 Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET)	34
6.6 Ensayos de afinidad usando anisotropía fluorescente	35

6.7 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA).....	36
7.- RESULTADOS.....	37
7.1 Clonación de las SSBs	37
7.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	37
7.3 Ensayos de Microhomología (MMEJ).....	39
8.- DISCUSIÓN	52
9.- CONCLUSIONES.....	54
10.- PERSPECTIVAS	55
11.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	56

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1 Tipos de daños al ADN	14
Fig. 2 Mecanismos de reparación de DSBs	15
Fig. 3 Modelo de la MMEJ en mamíferos	17
Tabla 1. Proteínas del replisoma en diferentes organismos	19
Fig. 4 Modelo comparativo de las AtPOPs	21
Fig. 5 Modelo representativo de las AtmtSSBs	23
Fig. 6 Modelo representativo de las AtOSB	24
Fig. 7 Estructura de una AtWhirly	25
Tabla 2 Oligonucleótidos usados para la clonación de las AtSSBs	29
Tabla 3 Oligonucleótidos usados para ensayos de secuencia mínima de microhomología	32
Tabla 4 Oligonucleótidos usados para ensayos de MMEJ con malos apareamientos	33
Tabla 5 Oligonucleótidos usados para la evaluación de longitud de <i>overhang</i>	34
Tabla 6 Oligonucleótidos etiquetados para FRET	35
Fig. 8 Modelo hipotético de reparación de DSBs	27
Fig. 9 Digestión de los plásmidos de las AtSSBs	37
Fig.10 Electroforesis de ADN polimerasas en gel de poliacrilamida al 10%	38
Fig. 11 Electroforesis de AtSSBs en gel de poliacrilamida al 10%	38
Tabla 7 Secuencias representativas de microhomologías localizadas en <i>A.thaliana</i>	39
Fig. 12 Modelo propuesto de alineamiento en MMEJ	40
Fig. 13 AtPOPs ejecutan MMEJ <i>in vitro</i>	41
Fig. 14 Representación de sustratos para MMEJ	42
Fig. 15 AtPollB efectúa MMEJ con tamaño de microhomología de 8 nts	42
Fig. 16 AtPollB efectúa MMEJ con secuencias menores de 8 nts	43
Fig. 17 Formación de sinapsis ensayado con FRET	44

Fig. 18 La MMEJ es ejecutada por las inserciones únicas presentes en el dominio de polimerización de las AtPOPs	45
Fig. 19 Secuencias de malos apareamientos y sus alineamientos	46
Fig. 20 AtPOPs ejecutan MMEJ en presencia de mismatches	47
Fig. 21 AtSSBs y el tamaño de overhang de ADN disponible regulan la MMEJ	49
Fig. 22 Perfil oligomérico en filtración en gel de las AtSSBs	50
Tabla 8 Constantes de disociación (kd) de las AtSSBs	50
Fig. 23 Unión de las AtSSBs a ADN de cadena sencilla en un EMSA	51

RESUMEN

Poco se conoce sobre los mecanismos de reparación de daño del ADN mitocondrial y cloroplastídico en plantas, qué maquinaria es requerida para proteger al ADN o cómo se ensambla para dicha protección. En este trabajo, se estudió particularmente el caso de reparación de rupturas de doble cadena de ADN *in vitro* a través de un mecanismo denominado “unión de extremos por microhomología (MMEJ, por sus siglas en inglés)”, que, a la fecha, ya ha sido reportado en organelos de plantas

Aquí se demuestra que las dos polimerasas organelares de *Arabidopsis thaliana* conocidas como AtPOPs (AtPollA y AtPollB) son capaces de efectuar la MMEJ requiriendo de mínimo 4 pares de bases como secuencia microhomóloga. Sin embargo, otras proteínas involucradas en el mantenimiento genómico organelar, particularmente proteínas de unión a cadena sencilla (SSB), como AtWhirly y AtOSB impiden la MMEJ.

Las rupturas de doble cadena pueden generar rearrreglos genómicos como duplicaciones o inversiones, a través de rutas de reparación infieles como MMEJ, al formar un extremo 3' – OH, donde se localizan estas secuencias microhomólogas capaces de alinearse; si las AtWhirlies o las AtOSBs logran ensamblarse a ese extremo 3'-OH, la reacción podría dirigirse hacia la vía fiel, es decir, recombinación homóloga. Sin embargo, si ese sitio queda disponible para la polimerasa, este mecanismo puede explicar la abundancia de rearrreglos que existen en organelos de plantas.

ABSTRACT

Little is known about pathways that participate in mitochondrias' and chloroplasts' DNA repair, what machinery performs those pathways or how this machinery is organized for the repair. In this work, a repair mechanism for Double Strand Breaks (DSBs), the most lethal damage in DNA, dubbed Microhomology-mediated end-joining (MMEJ), was *in vitro* evaluated. This mechanism has already been reported in plant organelles.

Here we demonstrated that two organellar DNA polymerases from *Arabidopsis thaliana* (AtPolIA and AtPolIB) perform MMEJ using microhomologies sequences as short as four nucleotides by specialized insertions located in their thumb subdomains, however, MMEJ was hindered by single stranded DNA binding proteins (SSBs), unique in plants, known as Organellar Single Stranded Binding protein (AtOSB) and Whirly (AtWhy).

DSBs induce genomic rearrangements such as insertions, deletions and duplications by illegitimate repair pathways like MMEJ, generating a single stranded 3'-OH overhang where microhomologous sequences are located and could annealing. If AtOSBs or AtWhirlies gain access at 3'-OH overhang, reaction will shift towards high-fidelity routes like Homologous Recombination (RH). On the other hand, if AtPOPs gain access at 3'-OH overhang, microhomologous sequences are extended generating aberrant products and MMEJ could explain the origin of those rearrangements in plant organelles.

I.- INTRODUCCIÓN

Las plantas albergan 3 tipos de genomas en diferentes compartimentos: el nuclear, el mitocondrial y el cloroplastídico (Bendich, 1987; Ravi, *et al.*, 2007). Sin embargo, estos genomas constantemente están sometidos a diferentes tipos de estrés que provocan daños en la estructura genética (Cabral de Medeiros, *et al.*, 2015), desde mutaciones, deleciones e incluso la muerte celular (Bleuyard, *et al.*, 2006; Boesch, P., 2011).

Uno de los daños más letales al ADN son las rupturas de doble cadena, DSBs, (Mehta y Haber, 2014). Ante este tipo de escenario, las células han desarrollado vías de reparación inmediatas para salvaguardar la integridad de su información genética, como la recombinación homologa (RH), siendo esta la principal vía de protección ante este daño, y rutas alternas como la “unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés)” o la “unión de extremos por microhomologías” (MMEJ, por sus siglas en inglés) (Chiruvella, *et al.*, 2013; Puchta, 2005).

En plantas se han reportado dos ADN polimerasas organelares codificadas en núcleo y con etiqueta dual de señalización conocidas como polimerasas organelares de plantas y protistas, POPs, (Mori, *et al.*, 2005). Adicional a estas POPs, existen otras proteínas, como ADN primasa, ADN helicasa, ADN ligasa, ADN topoisomerasas y proteínas de unión a cadena sencilla, SSBs (Moriyama y Sato, 2014; Shereda, *et al.*, 2008), que conforman un replisoma organelar encargado de replicar, recombinar y reparar el ADN.

Haciendo énfasis en las SSBs, en plantas existen alrededor de 14 proteínas de este tipo (Gualberto y Kühn, 2014), e incluso algunas de ellas se encuentran sólo en estos organismos, como las de las familias Whirly y las de la familia llamada *Organellar Single-stranded DNA Binding protein* (OSB), atribuyéndoles participación en diversas actividades desde mantenimiento genómico (prevención de inversiones, deleciones, duplicaciones), cambios sub-estequiométricos y

recombinación homóloga (Miller-Messmer, *et al.*, 2012; Zaegel, *et al.*, 2006; Cappadocia, *et al.*, 2010).

Por otro lado, las POPs tienen un papel importante en la replicación del ADN organelar (Parent, J., *et al.*, 2011). Éstas comparten características funcionales con otras polimerasas existentes, por ejemplo, con la ADN polimerasa θ de humanos.

Una de las principales características que comparten es la presencia de 3 inserciones (loops) únicos que están relacionadas con actividades bioquímicas como síntesis translesional a través de sitios abásicos (Baruch-Torres y Brieba, 2017; Yousefzadeh y Wood, 2013; Hogg, *et al.*, 2011).

Recientemente Kent, *et al.* (2015) han demostrado que esta Pol θ es la única polimerasa de la familia A, capaz de efectuar MMEJ, usando una secuencia de microhomología de mínimo 2 nucleótidos (nts), siendo la inserción 1 (loop 1) del dominio de polimerasa, la región responsable del alineamiento y extensión del sustrato (Hogg, *et al.*, 2011).

Se sabe que tanto en mitocondria como en cloroplasto existen vías de reparación de DSBs, como la MMEJ, en donde a partir secuencias cortas de entre 5 a 30 pb (microhomologías), se pueden generar rearrreglos genómicos, como inversiones o duplicaciones, y que, proteínas como las Whirlies, actúan como inhibidores de estas vías propensas a errores (Capadocia, *et al.*, 2010); sin embargo, no se conoce a nivel bioquímico cómo se genera esta reparación de ADN organelar.

Considerando las similitudes funcionales con otras polimerasas y al ser estas POPs las únicas ADN polimerasas replicativas organelares reportadas en *Arabidopsis thaliana* y, además, tomando en cuenta el papel de protección de las SSBs ante una DSBs, el objetivo de este trabajo fue evaluar si estas polimerasas son capaces de ejecutar MMEJ y si este mecanismo es regulado negativamente por las SSBs previamente mencionadas.

2.- ANTECEDENTES

En los organismos eucariontes, el material genético está organizado en su mayoría en el núcleo y la correcta replicación de éste, es un proceso crucial en cualquier organismo. En el caso de plantas, a diferencia de otros organismos, esta información está distribuida en 3 tipos de genomas: el nuclear, el mitocondrial y el cloroplastídico, que deben ser protegidos de factores que puedan dañar su estructura, como luz ultravioleta, radiación ionizante, entre otros (Manova y Gruzka,2015; Cabral de Medeiro, *et al.*, 2015).

2.1 Genomas organelares

La presencia de ADN en mitocondria y cloroplasto les confiere a estos organelos un grado de autonomía para realizar las funciones de respiración celular y fotosíntesis, ya que contienen genes que codifican para polipéptidos que se ensamblan para formar los complejos proteicos relacionados a estos procesos, sin embargo, poco se sabe del mantenimiento y replicación de estos ADNs (Oldenburg y Bendich, 2015).

Contrario a lo que se pensaba con respecto a la conformación de su ADN, la presentación es variable y se ha encontrado evidencia que el ADN organelar puede ser lineal, ramificado o circular (Bendich, 2013; Arrieta-Montiel y Mackenzie, 2011) y que no toda su información es codificable; además hay abundancia de secuencias repetidas de diferentes tamaños que están clasificados en largos repetidos (>500 nts) que se asocian a recombinación homóloga; repetidos intermedios (50-500 nts) y pequeños repetidos (<50 nts) que pueden promover una recombinación ilegítima por microhomologías (Gualberto y Newton, 2017; Gualberto, *et al.*, 2014), y la presencia de estos repetidos probablemente son los que dan estabilidad estructural para preservar esas formas de presentación del ADN organelar y que además puedan contribuir a la formación de rearrreglos genómicos como duplicaciones (Ruhlman y Jansen, 2014).

2.2 Lesiones en el genoma

El genoma está sometido a diferentes tipos de estrés, que provocan alteraciones a la estructura al ADN, causando una pérdida de información hasta la muerte celular.

Los principales daños se muestran en la Fig. 1 (Itzhaki, 2012) y son divididos en dos grupos: A) daño en cadena sencilla que comprenden desde oxidaciones de bases, alquilaciones de bases, malos apareamientos y rupturas de cadena sencilla, y B) daño en cadena doble, que comprenden los inter-strand cross-links y double-strand DNA breaks, DBS. De todos esos daños el más letal es la ruptura de doble cadena (DSBs), ya que esta alteración puede llevar al sistema a la muerte celular (Manova y Gruzka, 2015; Tafurt y Marin, 2014).

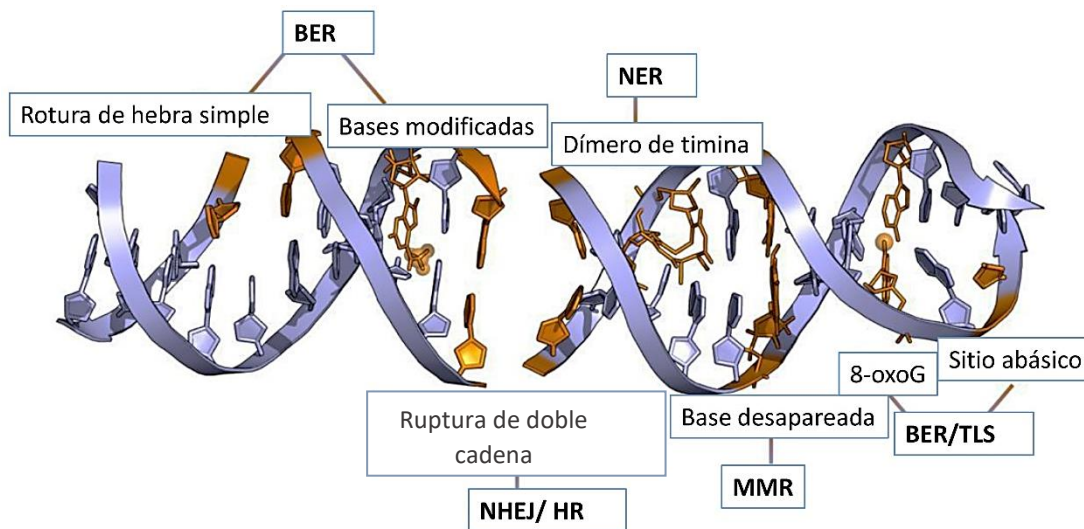


Fig. 1. Tipos de daño al ADN. Diversos factores pueden provocar alteraciones (indicados en letras minúsculas) a la estructura del ADN, para todas esas alteraciones existen mecanismos que logran repararlas y así evitar pérdida de información o un colapso en la maquinaria replicativa, estos mecanismos están señalados en letras negras.

2.3 Mecanismos de reparación de ADN dañado

La célula ha generado vías reparativas ante las lesiones ya mencionadas, y particularmente para el caso de DSBs, existen 3 vías (Fig. 2) que pueden reparar esta alteración: la recombinación homóloga, la non-homologous end-joining (NHEJ, por sus siglas en inglés) y la forma alternativa de NHEJ, denominada MMEJ (McVey y Lee, 2008).

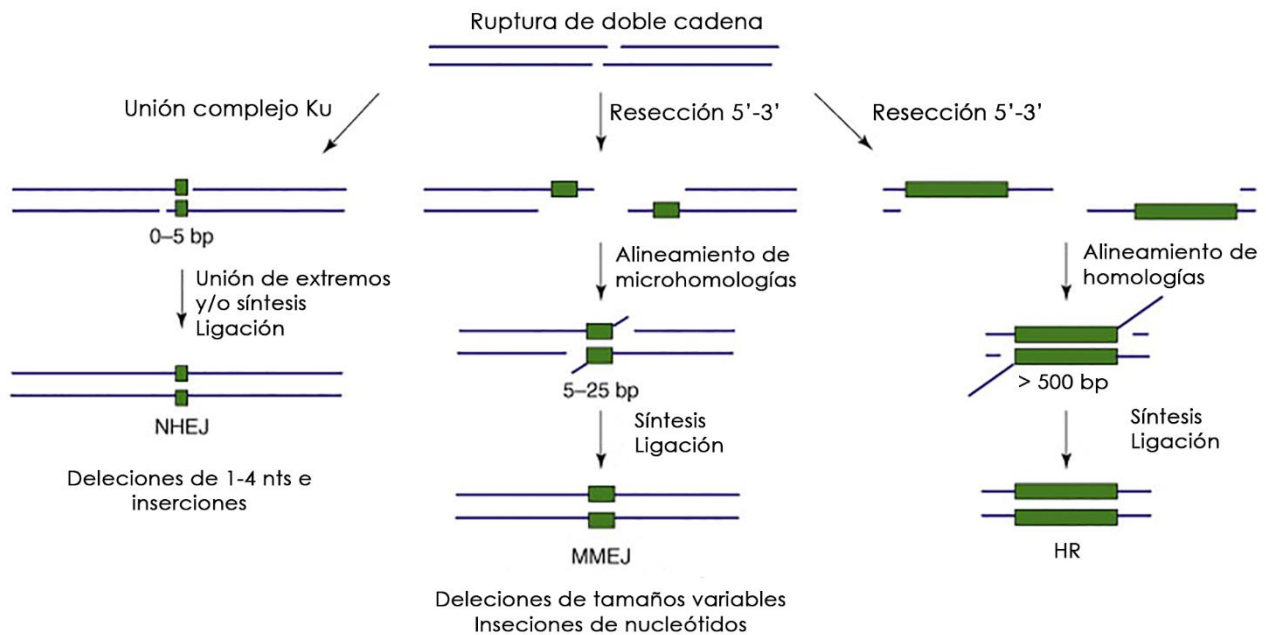


Fig. 2. Mecanismos de reparación de rupturas de doble cadena. Existen a la fecha reportado 3 principales vías de reparación en el caso de DSBs, la recombinación homóloga (HR), la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la unión de extremos por microhomologías (MMEJ). La MMEJ y HR comparten el primer paso que se refiere a un corte de una de las cadenas (5'-3') para que puedan generarse extremos con capacidad de alinearse, y todas requieren un paso de síntesis y ligación.

2.4 Recombinación homóloga (HR)

La recombinación homóloga es un mecanismo de replicación y reparación libre de errores, ya que se requiere una extensiva secuencia de homología para poder realizar el intercambio de cadenas, por ello esta vía es esencial para mantener la integridad genómica, gracias a la capacidad de replicar correctamente el ADN. Las

principales proteínas que actúan en esta vía son las de la familia RecA y SSB (Kanaar, *et al.*, 1998; Wyman, *et al.*, 2004). En el modelo de estudio, *Arabidopsis thaliana*, estas proteínas son codificadas en núcleo, y se denomina AtRecA1, AtRecA2, AtRecA3, AtmtSSB1 y AtmtSSB2, y todas poseen una péptido señal de localización a mitocondria o cloroplasto (Rowan, *et al.*, 2010; Edmonson, *et al.*, 2005).

2.5 Non-homologous end-joining (NHEJ)

A diferencia de la HR, este mecanismo no requiere de secuencias largas ni homólogas para poder recombinarse; aquí, dos extremos de ADN se unen inmediatamente después de la ruptura, por medio de un complejo de proteínas denominadas Ku70-Ku80, que se une a los extremos generados, para protegerlos de degradación y reclutar otras proteínas que participan en este mecanismo que finalmente unen estos extremos (Pastwa, *et al.*, 2009; Ohnishi, *et al.*, 2009). La presencia del complejo Ku es indispensable para este mecanismo; en *A. thaliana*, a la fecha se ha encontrado esta proteína en núcleo y citoplasma (Tamura, *et al.*, 2002), por tanto, este mecanismo parece estar ausente en organelos.

Gallego, *et al.* (2003) demostró que la transformación de T-DNA en plantas mutantes para *atku80*, fue similar que en una planta no mutada; por su parte Kozak, *et al.* (2009) observaron un porcentaje de reparación de DSBs en plantas mutantes para *atku80* similar al de una planta wild silvestre, por lo que ambos grupos sugieren que existe un mecanismo alternativo a la NHEJ, independiente de las proteínas Ku, en *Arabidopsis*.

2.6 Microhomology mediated end joining (MMEJ)

La MMEJ es un mecanismo alternativo a la NHEJ, independiente del complejo Ku, y es considerada como una forma de replicación ilegítima de ADN. En esta vía se requieren secuencias cortas de entre 5 a 25 pb para generar un alineamiento y poder completar la secuencia faltante.

En mamíferos, levadura (Sfeir y Symington, 2015) y también en *Drosophila* (Chan, *et al.*, 2010) esta ruta ha sido más explorada que en plantas. De manera general, la MMEJ se realiza en el siguiente orden: 1) resección en un extremo, 2) alineamiento de microhomologías, 3) síntesis y 4) ligación (Fig. 3, tomado de Sfeir y Symington, 2015).

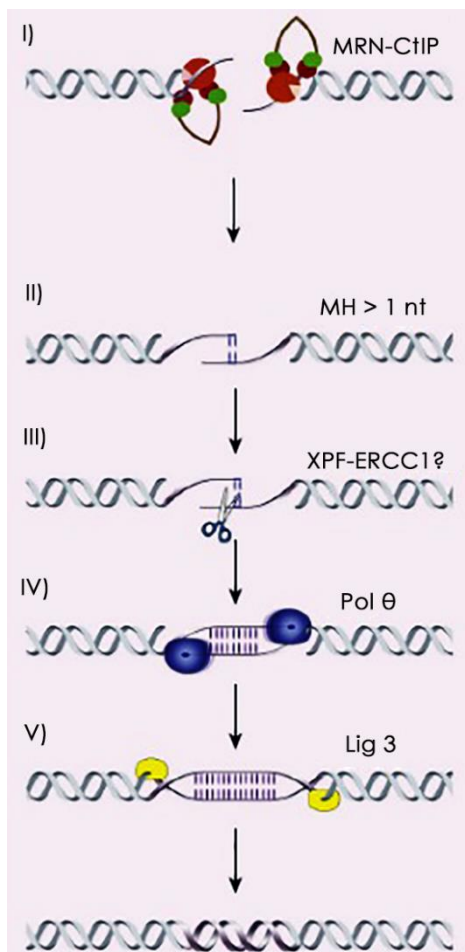


Fig. 3. Modelo de la MMEJ en mamíferos. Al haber una ruptura de doble cadena (DSB), I) un complejo nucleolítico denominado MRN-CtIP degrada la cadena en dirección 5'-3' para generar un extremo de cadena sencilla con un 3'-OH disponible que contiene una secuencia corta de microhomología mayor a 1 nt. Este paso es esencial para este mecanismo y también es un paso en recombinación homóloga. II) El alineamiento de microhomologías es el segundo paso de esta vía, en mamíferos se ha reportado que al menos se requieren 2 nts para efectuar un alineamiento y en levadura son requeridos 6 nts. La presencia de proteínas como RPA pueden unirse al extremo 3'-OH y evitar el alineamiento. III) En el caso de microhomologías que se localizan unos nucleótidos en medio del extremo 3'-OH, se requiere un corte de las cadenas que no se alinean (no homólogas), para permitir que la polimerasa logre extender el alineamiento. IV) En la síntesis, una ADN polimerasa es la encargada de completar la cadena opuesta, en mamíferos se sabe que Pol θ , perteneciente a la familia A, es la responsable de este paso. V) Finalmente, un paso de ligación es requerido para unir las cadenas.

El alineamiento de microhomologías y la síntesis son pasos cruciales que son efectuados por ADN polimerasas. Algunas polimerasas que participan en la MMEJ son Pol θ (Kent, *et al.*, 2015), Pol δ , Pol λ (Meyer, *et al.*, 2015), mus308 (Chan, *et al.*, 2010), sin embargo, poco se sabe sobre la maquinaria proteica que efectúa este mecanismo en plantas.

En este último grupo, se encuentra un ortólogo de la Pol θ , denominado Pol TEBICHI (Inagaki, *et al.*, 2006). Recientemente el grupo de Tijsterman (2016) han reportado que Pol TEBICHI es la responsable de la integración del T-DNA, alineándose con microhomologías localizadas en el extremo 3'; sin embargo, TEBICHI actúa en núcleo.

De organelos de plantas se sabe, por ejemplo, que en cloroplasto existe MMEJ gracias ensayos de inducción de DSBs con ciprofloxacina o por homing endonucleasas (Maréchal, *et al.*, 2009; Kwon, *et al.* 2010) al encontrar en los rearrreglos generados por DSBs secuencias cortas y repetidas de entre 8 a 16 nts (microhomologías) ricas en A/T, que fácilmente pueden ser alineadas, pero no se conoce por lo menos que polimerasas logran alinear y extender estas microhomologías.

2.7 Replisoma organelar

En términos generales, el replisoma es el conjunto de proteínas encargadas de replicar el ADN, como las ADN polimerasas, primasa y proteínas de unión a cadena sencilla, SSBs; esta maquinaria ha sido ampliamente estudiada en procariontes y en eucariontes (Yao y O'Donnell, 2010). Poco a poco también se han hecho estudios de replisomas organelares como el mitocondrial (Korhonen, *et al.*, 2004; Ciesielski, *et al.*, 2016) y el cloroplastídico (Moriyama y Sato, 2014; Oldenburg y Bendich, 2015) y es interesante observar que las proteínas pueden estar presentes, ausentes o expandidas por duplicación de genes, como se muestra en la Tabla 1 (Basado en: Kato, *et al.*, 2001; Kim, *et al.*, 2002; Krause, *et al.*, 2005; Qimron, *et al.*,

2006; Shedge, *et al.*, 2007; Sage, *et al.*, 2009; Sánchez-Sandoval, *et al.*, 2015; Oldenburg y Bendich, 2015; Ramachandran, *et al.*, 2016; Kulczyk, *et al.*, 2017).

Tabla 1. Proteínas del replisoma en diferentes organismos

	Bacteriofago T7	<i>S. cerevisiae</i> mitocondria	<i>H. sapiens</i> mitocondria	<i>A. thaliana</i> (Mitochondria / Cloroplasto)	Etiqueta
ADN polimerasa	T7 DNA Pol	MIP1	POLG	AtPOLA AtPOLB	MT + CP MT + CP
Helicasa-primasa	Helicasa-Primasa			AtTwinkle	MT + CP
Helicasa	Helicasa		Twinkle (PEO1)		
Primasa	Primasa	mtRNAP(Rpo41)	mtRNAP (POLRMT)		
SSB	SSB	Rim1	SSB	SSB1 SSB2	MT MT
OSB				OSB1 OSB2 OSB3 OSB4	MT CP MT + CP
Whirly				Whirly 1 Whirly 2 Whirly 3	CP MT CP
RecA			Rad 51	AtRecA1 AtRecA2 AtRecA3	CP MT + CP MT
ODB		Rad 52 Mgm101p	Rad 52	ODB 1 ODB 2	MT CP
PrimPol			Prim-Pol	AtPrimPol	MT + CP + N

La presencia de abundantes proteínas en organelos del organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, puede sugerir que en conjunto trabajan para conservar la integridad del ADN organelar, a través de actividades como replicación, recombinación y reparación

2.8 ADN Polimerasas de organelos de plantas (POPs)

Las AtPOPs pertenecen a la familia A de las ADN polimerasas (Moriyama, *et al.*, 2011), grupo al que pertenecen las ADN polimerasas que son similares a la ADN polimerasa I de *E. coli* (Bebenek y Kunkel, 2004) y una de las características estructurales que muestran estas AtPOPs, es la presencia de tres inserciones únicas (loops) (Fig. 4) similares a las de HsPOLQ (Seki, *et al.*, 2004; Hogg, *et al.*, 2011), en diferentes sitios del dominio de polimerasa, el loop 1 y loop 2 se localizan en el dominio del pulgar y el modelo estructural sugiere que estos loops interactúan con el sustrato; el loop 3 está localizado en el dominio de la palma (Baruch-Torres y Brieba, 2017).

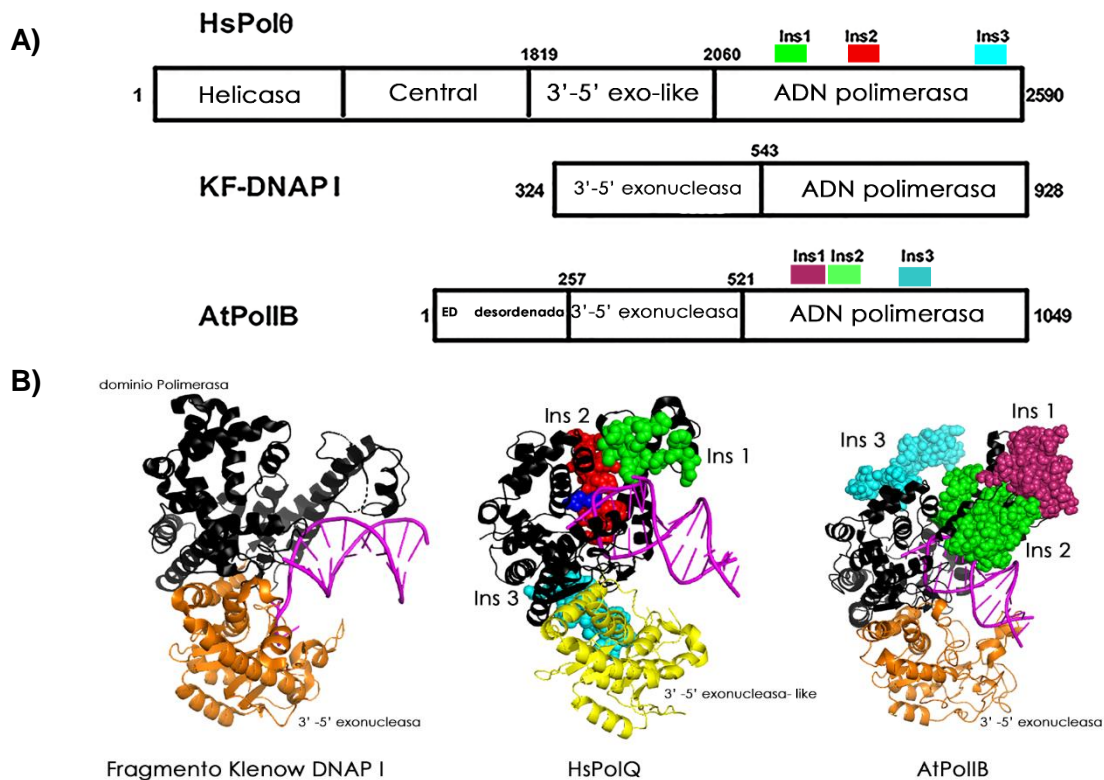


Fig. 4. Modelo comparativo de las AtPOLs. A) Representación líneal entre la HsPol θ , KF DNAP I y AtPolIB, en donde se muestran los dominios que son comunes entre estas polimerasas, además se indican en recuadros la presencia de las inserciones únicas en HsPol θ y AtPolIB. B) Comparación estructural entre un modelo de homología de AtPolIB con las estructuras cristalográficas de HsPol θ (Zahn, *et al.*, 2015) y KF DNAP I (Beese, *et al.*, 1992). El dominio de polimerización se indica en color negro, y el dominio EXO en color naranja y el dominio EXO-like en amarillo. Las inserciones únicas son indicadas e identificadas por diferentes colores en presentación de esferas.

En HsPOLQ (Pol θ), estas inserciones han sido evaluadas para explorar su relevancia (Hogg, *et al.*, 2011), por ejemplo, se relacionan con la capacidad de replicar a través de un daño, como sitios abásicos, es decir, síntesis translesional (Yousefzadeh, y Wood, 2013).

Esta capacidad de síntesis translesional también la presentan estas AtPOPs (Baruch-Torres y Brieba, 2017) y puede favorecer el proceso de replicación para que continúe a pesar de las condiciones oxidativas que se genera en la mitocondria

y cloroplasto, que a la vez generan modificaciones internas al ADN, como oxidaciones o malos apareamientos.

Otra característica que recientemente se ha descrito de la Pol θ es que juega un papel importante en el proceso de reparación de ADN conocido como "MMEJ" (Newman, *et al.*, 2015). Pol θ requiere de al menos 2 nts de secuencia de microhomología para alinear el sustrato, extenderlo y ligar el producto, y la inserción 2 es esencial para realizar este mecanismo de reparación (Kent, *et al.*, 2015).

A la fecha ya se ha reportado la existencia de este mecanismo en cloroplasto (Kwon, *et al.*, 2010) sin embargo no se ha descrito la vía detalladamente.

2.9 Proteínas de unión a cadena sencilla (SSBs) de organelos de plantas

Por otro lado, se sabe que, en procariontes, el reclutamiento de proteínas encargadas de reparar el ADN es coordinado por SSBs (Shereda, *et al.*, 2008). La presencia de abundantes proteínas de unión a cadena sencilla en organelos de plantas sugiere la participación en diferentes actividades como unión a ADN de cadena sencilla y doble (Edmonson, *et al.*, 2005; Zaegel, *et al.*, 2006, Cappadocia, *et al.*, 2009), unión a ARN (Prikryl, *et al.*, 2008) y mantenimiento genómico.

Las 3 familias de SSBs que se dirigen a organelo de plantas corresponden a la familia de las SSBs canónicas, la familia de las *Organellar Single-stranded DNA Binding protein* (OSB, por sus siglas en inglés) y la familia de Whirly.

2.9.1 SSB de *Arabidopsis thaliana* (AtmtSSB)

En *Arabidopsis thaliana*, se han reportado dos proteínas de unión a cadena sencilla que se codifican en núcleo (At4g11060 y At3g18580) y que se dirigen a mitocondria, y se han denominado AtmtSSB1 y AtmtSSB2 (Edmonson, *et al.*, 2005). Estas AtmtSSBs están conformadas por una péptido señal a mitocondria en el N-terminal,

un dominio OB (oligosaccharide/oligonucleotide-binding), que consiste en 5 láminas β colocadas en forma antiparalela, terminando con una α hélice, el tamaño aproximado de este dominio oscila entre 70 y 150 aminoácidos, y no contiene una secuencia específica que permita una identificación única de este dominio OB (Shamoo, 2002; Theobald, *et al.*, 2003). Este dominio OB está involucrado en la interacción con ADN y ha sido reportado en diferentes proteínas de unión a cadena sencilla por ejemplo SSB del bacteriófago T7 (Hollis, *et al.*, 2001) y SSB de *E. coli*. Después de este dominio OB se localiza una extensión C-terminal altamente ácida que interactúa con proteínas del metabolismo de ADN (Edmonson, *et al.*, 2005) (Fig. 5).

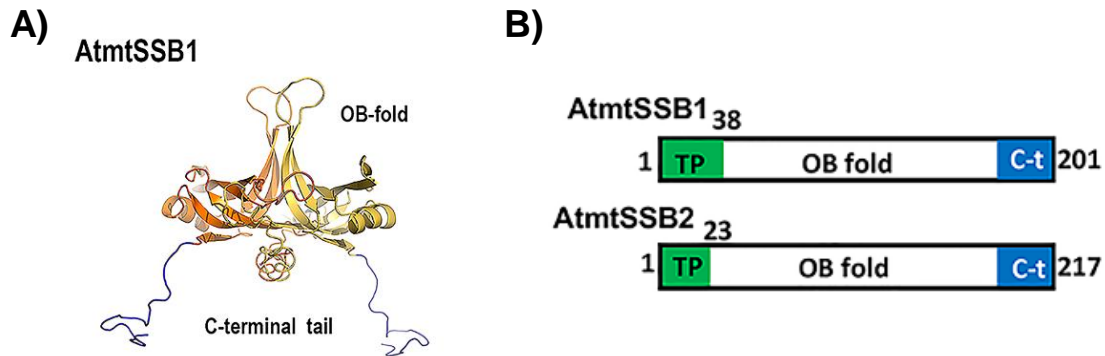


Fig. 5. Modelo representativo de AtmtSSBs. A) Se presenta un modelo predictivo de la proteína canónica AtmtSSB1 en donde se observa el dominio OB y la extensión C-terminal; B) Se muestra una estructura básica de ambas AtmtSSBs, indicando el dominio OB, este dominio está presente en proteínas relacionadas con ADN y no contienen una secuencia única de clasificación.

2.9.2 OSB de *Arabidopsis thaliana* (AtOSB)

La familia de las *Organellar Single-stranded DNA Binding protein* en *A. thaliana* está integrada por 4 miembros: AtOSB1 (At1g47720), AtOSB2 (At4g20010), AtOSB3 (At5g44785) y AtOSB4 (At1g31010), (Fig. X). En el N-terminal contienen un péptido señal de localización a mitocondria, cloroplasto o a ambos organelos, seguido por un dominio OB-like y un extremo C-terminal en donde se localizan de 1 a 3 dominios conocidos como PDF, que están involucrados en interacción ADN-proteína y son únicos en el reino de plantas (Zaegel, *et al.*, 2006) (Fig. 6).

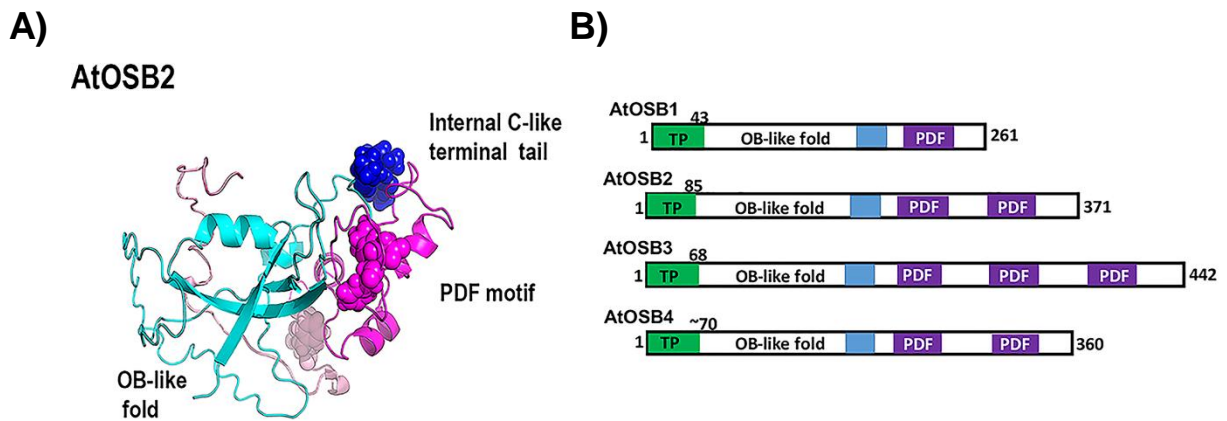


Fig. 6. Modelo representativo de AtOSB. A) Se muestra un modelo predictivo de AtOSB2 en donde se indica el dominio OB-like en color cyan, el dominio PDF y la extensión C-terminal. B) Se muestran las 4 AtOSBs y en morado se resaltan la presencia de 1 a 3 motivos PDFs. El número de dominios PDFs es considerado para el nombramiento de cada AtOSB.

2.9.3 Whirlies de *Arabidopsis thaliana* (AtWhy)

Estas proteínas han sido únicamente reportadas en organelos de plantas. En *A. thaliana* la familia Whirly está conformada por 3 miembros AtWhy1 (At1g14410), AtWhy2 (At1g71260) y AtWhy3 (At2g02740). Al igual que las otras proteínas de unión a cadena sencilla, en el N-terminal se localiza un péptido señal que las dirige a mitocondria, cloroplasto o a ambos organelos; posterior a ese péptido señal, se localiza un dominio Whirly, que está relacionado con múltiples funciones como activador transcripcional, splicing y unión a ADN. Los dominios whirly son largos (~180 aminoácidos) y contienen dos láminas β de cuatro cadenas y dos α -hélices. Las estructuras de las 3 AtWhirlies han sido resueltas y gracias a ello se sabe que estas proteínas son ensambladas como tetrámero análogas a un molino de viento (*whirligig*, en francés), además se observó que la secuencia KGKAAL del dominio Whirly está directamente involucrada con el ensamblaje tetrámerico y la unión de estas proteínas a ADN (Desveaux, *et al.*, 2005; Maréchal, 2009; Cappadocia, *et al.*, 2012; Cappadocia, *et al.*, 2013, Dickey, *et al.*, 2013) (Fig. 7).

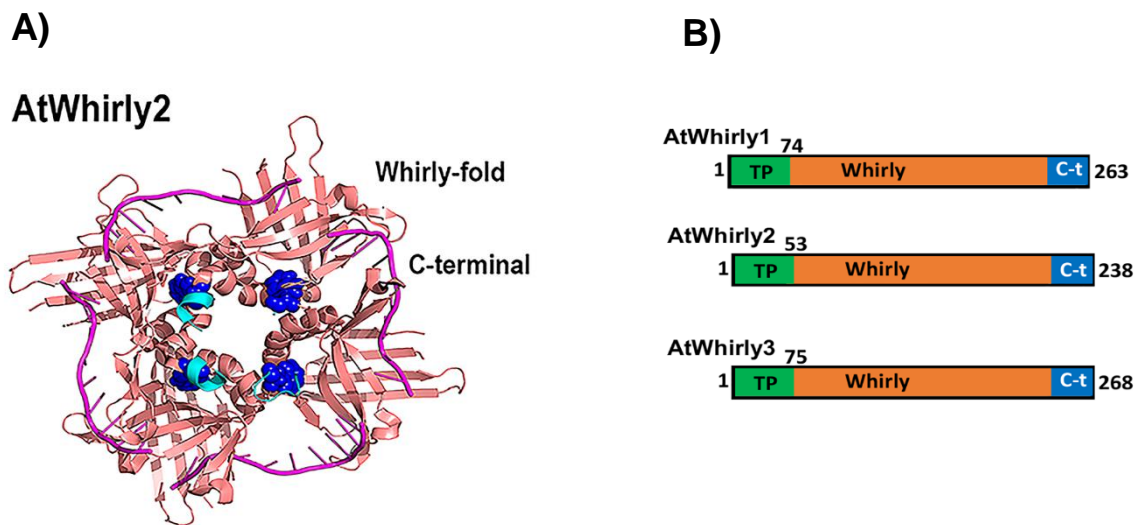


Fig. 7. Estructura de una AtWhy. A) Se muestra la conformación tetrámerica de AtWhy2 unida a un sustrato de cadena sencilla. B) Se muestra la secuencia lineal de cada AtWhirlies, los dominios Whirly son señalados en el cuadro naranja y TP, en color verde, se refiere a la péptido señal que las dirige a mitocondria o cloroplasto.

2.10 Otros mecanismos de reparación de ADN de plantas

Los mecanismos de reparación del ADN nuclear de plantas han sido ampliamente estudiados, por ejemplo: Sistema de Escisión de Bases (BER, por sus siglas en inglés), Sistema de Escisión de Nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés), Tolerancia a daños (TLS) y rutas de reparación de rupturas de doble cadena (DSBR, por sus siglas en inglés) (Boesch, *et al*, 2011)

Caso contrario ocurre en organelos, donde los mecanismos de reparación de ADN no han sido explorados a detalle, excepto el caso de BER en organelos de plantas, que ha sido más estudiado (Boesch, *et al.*, 2009; Boesch, *et al.*, 2011; Trasviña-Arenas, *et al.*, 2018).

Con lo anterior, los escenarios de reparación de ADN organelar son solo escenarios propuestos, por lo que evaluaciones particulares para cada vía de reparación abre un amplio campo de estudio en organelos de plantas.

3.- PREGUNTA BIOLÓGICA

Al ser las únicas ADN polimerasas (POPs) de organelos de plantas, ¿Estas son capaces de efectuar MMEJ? Y si es así ¿Cómo es regulada?

4.- HIPÓTESIS

En los organelos de plantas se efectúa la MMEJ por las AtPolIA y AtPolIB (POPs), debido a las inserciones únicas que le confieren estabilidad ante el paso de lesiones

La MMEJ es regulada negativamente por proteínas de unión a cadena sencilla, como las de la familia Whirly (Fig. 8).

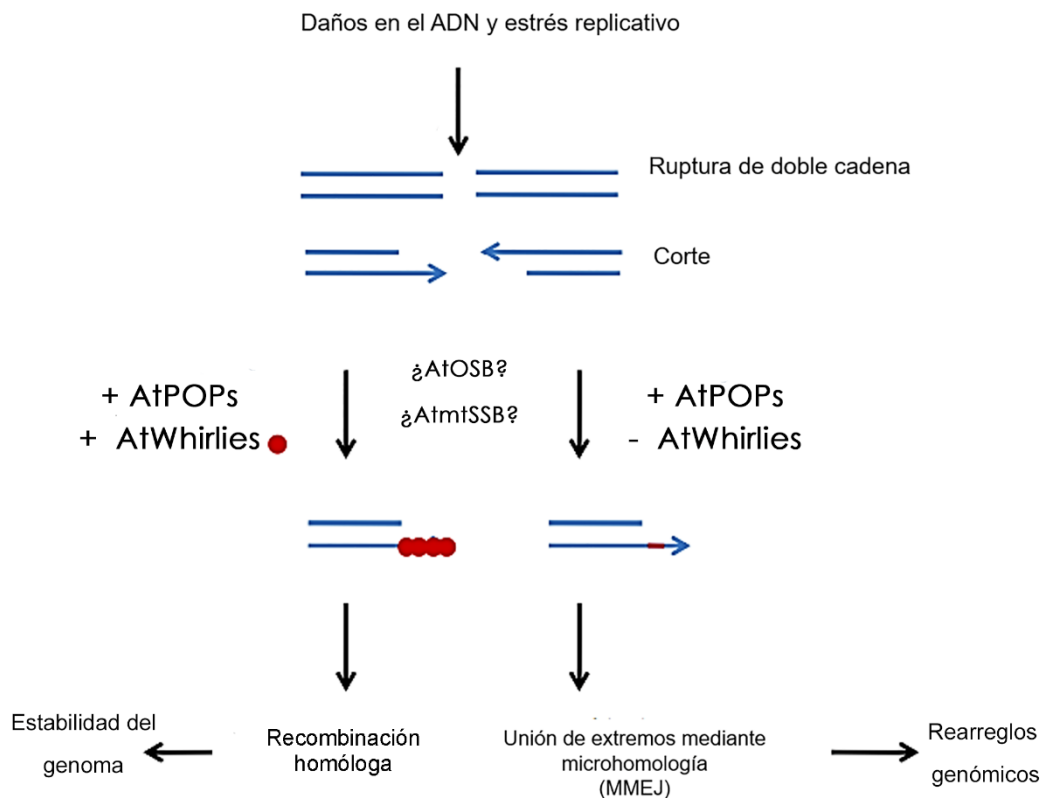


Fig. 8. Modelo hipotético de reparación de DSBs. Al generarse una ruptura de doble cadena una de las cadenas es degradada para generar un extremo 3'-OH de cadena sencilla. Si AtWhirlies se encuentran presentes y logran colocarse en ese extremo 3'-OH bloquean el paso para que la polimerasa, dirigiendo la reparación hacia recombinación homóloga. Por otro lado, en ausencia de AtWhirlies, las AtPOPs se colocan en ese extremo 3'-OH disponible y en presencia de pequeñas secuencias de microhomologías, se alinean y completan la secuencia faltante, dirigiendo la reparación hacia MMEJ.

5.- OBJETIVOS

➤ **Objetivo general:**

Evaluar la capacidad de las POPs para ejecutar MMEJ y su regulación, de forma *in vitro*

➤ **Objetivos específicos:**

- ✓ Evaluar si las POPs ejecutan la MMEJ, *in vitro*
- ✓ Generar y estandarizar protocolos de purificación de las proteínas SSB, OSB y WHY
- ✓ Evaluar bioquímicamente, si la MMEJ es modulada por proteínas de unión a cadena sencilla (SSB, OSB, WHY)

6.- METODOLOGÍA

6.1-Clonación de las Proteínas de unión a cadena sencilla (SSBs) recombinantes

Las regiones codificantes correspondientes a las proteínas de unión a cadena sencilla de *Arabidopsis thaliana*, AtmtSBB1 (AT4G11060.1), AtmtSSB2 (AT3G18580.1), AtOSB2 (AT4G20010), AtOSB3 (AT5G44785) y AtWhirly2 (AT1G71260) fueron amplificadas a partir de cDNA. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2: Oligonucleótidos usados para la clonación de las AtSSBs

Nombre	Secuencia
AtmtSSB1-F	5' AAGATCACATATGAAGTCGTGGTTCTCTACTGGTC 3'
AtmtSSB1-R	5' GGTTCTTGGATCCCTAAATCAATCCTTCTTTTAGC 3'
AtmtSSB2-F	5' AAGATCACATATGCAAGCTTCCATGTCTTTCTGTAC 3'
AtmtSSB2-R	5' GGTTCTTGGATCCTCAGTAGTAGCCAACGCCTC 3'
AtOSB2- F	5' AAGATCACATATGGTGAAACCGCTGGAGATTGCGTC 3'
AtOSB2- R	5' GGTTCTTGGATCCCTAAAAGACAATACTTTCTTGTTTC 3'
AtOSB3 -F	5' AAGATCACATATGCCACCGCTAAATGTAGCGACGGAG 3'
AtOSB3 -R	5' GGTTCTTGGATCCTTAGGCCATGACAGGTCTTTCTTG 3'
AtWhy2 - F	5'AAGATCACATATGAAAGATGCCGCAAAGCCTAGTG 3'
AtWhy2 - R	5' GGTTCTTGGATCCTCATTTATCCCACTCCAGCTC 3'

Los productos obtenidos de la amplificación de todos los cDNA fueron digeridos con BamHI y NdeI, excepto para la AtWhirly2, que fue digerida con NdeI y HindIII, posteriormente fueron clonados dentro del vector pET-19 b, y en el caso de AtWhirly2, en el vector pET-28 b. La AtmtSSB2 fue subclonada en el vector pCri- 1 b. Las clonas positivas fueron verificadas por secuenciación.

6.2- Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

AtPOPs

Todas las diferentes versiones de las AtPOPs fueron expresadas y purificadas de acuerdo con el protocolo de Baruch-Torres y Brieba (2017).

SSBs

Las construcciones para AtmtSSB1, AtmtSSB2, AtOSB2, AtOSB3 y AtWhy2 fueron transformadas usando la cepa de expresión *E. coli* BL21 PKJE7. En medio LB, las cepas transformadas fueron inoculadas a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica

(O.D.) de 0.6 a 600 nm. Una vez alcanzado este valor, se indujeron los medios usando 0.5 mM de IPTG (Isopropil- 1- tio- β -D- galactopiranosido) durante 18 h a 16 °C. Las células fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas usando un buffer de Lisis (20 mM HEPES pH 8, 600 mM NaCl, 10 mM imidazol, 10 % glicerol, 1 mM PMSF). Al lisado se le agregó 0.5 mg/ml de lisozima y se dejó incubando 1 h a 4°C; posteriormente, fue sonicado (Branson Ultrasonics™ Sonifier™ S-450A) en hielo con una potencia de 80 % por lapsos de 30 s.

El lisado fue centrifugado y el sobrenadante obtenido fue filtrado con membrana de 0.45 μ m y cargado en una columna de Níquel (GE Healthcare Columns HisTrap™ FF) previamente equilibrada con buffer de lisis. Se efectuaron 2 lavados con buffer de lisis con 20 y 30 mM de imidazol, y las proteínas recombinantes fueron eluidas en el mismo buffer de lisis con 500 mM de imidazol.

Las proteínas recombinantes, excepto la AtmtSSB2, fueron dializadas en un buffer de diálisis (20 mM HEPES pH 8, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 30% glicerol, 5 mM DTT), y la cola de Histidina (His-Tag) fue cortada con la PreScission Protease (pps).

Posteriormente fueron cargadas en columnas de Heparina (HiTrap® Heparin High Performance GE Healthcare) previamente equilibradas con un buffer A (20 mM HEPES pH 8, 30 % glicerol, 50 mM NaCl, 5 mM DTT y 2 mM EDTA). Las proteínas fueron eluidas usando un gradiente de NaCl (50 mM a 1000 mM) empleando el mismo buffer A. La purificación se hizo en un equipo ÄKTA purifier (GE Healthcare ®) a 4°C.

Las eluciones fueron colectadas y dializadas en un buffer de almacenamiento (20 mM HEPES pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 2 mM EDTA y 50 % glicerol). Posteriormente fueron guardadas a -20 °C.

Retomando el caso de la AtmtSSB2, después de la purificación por níquel, esta proteína fue dializada en un buffer D (25 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl, 5 Mm DTT, 2 mM EDTA y 10 % glicerol). De ahí, la proteína fue cargada en una columna de maltosa (Maltose Binding Protein Trap HP column GE Healthcare), previamente equilibrada con el buffer D, y lavada con el buffer D con una concentración de 1500

mM de NaCl. La proteína fue eluida usando un buffer E (25 mM HEPES pH 8, 150 mM KCl, 20 mM maltosa, 5 mM EDTA y 10 % de glicerol). Se dejó dializando, a 20°C, en un buffer de diálisis (25 mM HEPES pH 8, 300 mM NaCl, 30% glicerol, 0.5 mM EDTA y 1 mM DTT) y se le adicionaron alícuotas de la proteasa TEV (tobacco etch virus), para hacer el corte de la cola de MBP. El último paso fue una cromatografía por exclusión molecular usando una columna S-75 en un equipo ÄKTA pure (GE Healthcare ®), empleando un buffer EM (25 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 15 % glicerol, 2 mM EDTA y 5 mM DTT). Las fracciones obtenidas fueron dializadas en el mismo buffer de almacenamiento de las demás SSBs y guardadas a -20 °C.

En cada paso de purificación se corrieron geles SDS-PAGE del 12 % y 15 % dependiendo el caso.

6.3 Sustratos para ensayos de Microhomología

Los oligonucleótidos para microhomología fueron fosforilados en el extremo 5' con γ -³²ATP empleando la T4 kinasa; esta reacción se realizó a 37 °C con un tiempo de incubación de 1 h. Estos fueron purificados siguiendo el protocolo indicado en el kit de remoción nucleótidos de QIAGEN ® y posteriormente fueron hibridados con el respectivo oligonucleótido complementario.

6.4 Ensayos de Microhomología (MMEJ)

Para explorar la capacidad de polimerización de las POPs usando microhomologías, se diseñaron oligonucleótidos similares a los usados en el trabajo de Kent, *et al.* (2015). Para todos los ensayos de MMEJ, 20 nM de sustrato previamente marcado se agregaron a un buffer de reacción que contenía 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1.5 mM de DTT, 10 % glicerol y 0.05 mg/ml de BSA. AtPolIA y AtPolIB fueron usadas a 100 nM y, en reacciones separadas, se dejaron incubando en el mix de reacción a 37° C por 15 min. Posteriormente, se inició la reacción con 500 μ M de dNTPs y 2, 6 o 10 mM de MgCl₂ (dependiendo el caso), final y se dejó incubando por 30 min a la misma temperatura. El MnCl₂ se usó en un

solo ensayo a 2 mM. Las reacciones se detenían usando stop buffer (95% formamida, 10 mM EDTA, 0.1 % de azul de bromofenol y 0.1 % de xileno-cianol), se calentaban a 95 °C por 5 min e inmediatamente se colocaban en hielo. De ahí, las reacciones fueron cargadas en geles del 17% de poliacrilamida desnaturalizantes (urea). Los geles eran expuestos en pantallas Phosphor Screen (KODAK) durante 12 h, y la pantalla finalmente se escaneaba en el equipo Storm 840 PhosphorImager a una resolución de 100 micrones.

Se evaluaron diferentes características en estos ensayos de microhomologías:

- 1) Tamaño mínimo requerido para microhomologías en cadena parcialmente doble (pssDNA)

Para conocer la secuencia mínima microhomóloga requerida para que las ADN polimerasas (POPs) logren alinear y extender el sustrato, se usaron oligos con secuencias variables de microhomología desde 0 nts hasta 12 nts, mostrados en la Tabla 3. Todos los oligos MH fueron alineados con el oligo Reverse-MH.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para ensayos de secuencia mínima de microhomología

Nombre	Secuencia (5' -3')
MH-0	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGAGATAC
MH-2	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGAGATCG
MH-4	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGAGCCGG
MH-6	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCGGG
MH-8	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCCGGGG
MH-10	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCCCGGGGG
MH-12	AACACTGTGAGCTTAGGGTAGCCAAATCGCGACTCATTAG TCTCCCCCGGGGGG
Reverse MH	CTAAGCTCACAGTGTT

- 2) Presencia de malos apareamientos (mismatches) en la secuencia de microhomología

Considerando que en análisis de secuencias de microhomologías generadas por DSBs en cloroplastos se encontró la presencia de repetidos perfectos y algunos con presencia de *mismatches* (Kwon, *et al.*, 2010), se decidió evaluar la polimerización a través de malos apareamientos colocados en la secuencia microhomologa. Los oligos empleados para estos ensayos se muestran en la tabla 4. Los oligos fueron alineados con el oligo MH-8.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para ensayos de MMEJ con malos apareamientos.

Nombre	Secuencia (5' -3')
Mismatch I	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCCGGGGGACT
Mismatch II	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCCGGGGGACTA
Mismatch III	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCCGGGGGCTGA
Mismatch IV	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCCGGGGGCTGAT
Mismatch V	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCCGGGGGTGT
Mismatch VI	AACACTGTGAGCTTAGGGTTACAGCCCCGGGGGAGTA

3) Capacidad de unión de las SSBs a diferentes tamaños de *overhang* de pssDNA.

Estudios de Zaegel, *et al.* (2006) y de Maréchal, *et al.* (2009), le atribuyen a las AtOSB y AtWhy un papel relevante para el mantenimiento genómico tanto mitocondrial como cloroplastídico, actuando como proteínas que evitan la formación de productos generados en eventos de recombinación *ilegítima*. Tomando en cuenta que al ser proteínas con alta afinidad a ADN de cadena sencilla y existiendo extremos 3' OH disponibles tanto en RH y en MMEJ, se decidió explorar un posible rol de estas SSBs en la MMEJ.

Diferentes sustratos con tamaños variables de *overhang* (Tabla 5) fueron incubados en el mix de reacción ya descrito. Se incubaron las SSBs (AtmtSSBs, AtOSBs y

Tabla 6. Oligonucleótidos etiquetados para FRET

Nombre	Secuencia (5' -3')
MH8-Cy3	Cy3-AACACTGTGAGCTTAGAGCCCCGGGG
MHR-Cy5	Cy5-CTAAGCTCACAGTGTT

50 nM de MH8-Cy3 o MHR-Cy5 fueron incubados en un buffer de reacción que contenía 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1.5 mM DTT, 10 % glicerol, 0.1 mg/ml BSA y 10 mM MgCl₂. El mix no contenía dNTPs. Las POPs fueron agregadas en diferentes concentraciones. Las reacciones se dejaron incubar durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Las mediciones de la fluorescencia total fueron realizadas en un lector de placas Infinite M1000 (Tecan®), usando longitudes de onda (λ) de 530 nm para excitación y 675 nm para emisión. Los datos fueron analizados en GraphPad Prism 6.

6.6 Ensayos de afinidad usando anisotropía fluorescente

Para evaluar la constante de disociación (k_d) de las SSBs se usó un oligo poli-T de cadena sencilla de 45 nts etiquetado en el 3' con fluoresceína (Fic) y otro oligo parcialmente doble etiquetado con Cy3 en el extremo 5' con un *overhang* de 10 nts, en un ensayo de anisotropía fluorescente.

En la anisotropía fluorescente, se evalúa el cambio de anisotropía o polarización de una molécula fluorescente. Cuando se incide luz polarizada (luz que presenta sólo un plano de polarización) en moléculas pequeñas, esta luz deja de estar polarizada debido al movimiento aleatorio que presentan estas moléculas pequeñas en solución; sin embargo, con moléculas de mayor tamaño, o si una molécula pequeña se une a otra de mayor tamaño, el movimiento va a ser menor y la luz va a estar más polarizada. Ese cambio en el valor de la polarización se refleja en un valor adimensional de polarización o anisotropía, que sirve para evaluar valores de

constantes de disociación en sistemas de interacción molecular, como ligando-receptor y proteína-proteína (Córisco, *et al.*, 2013).

En el ensayo de anisotropía, se usaron 10 nM de oligo etiquetado en un buffer de reacción que contenía 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.05 mg/ml BSA, y 10% glicerol. Un gradiente de concentración de proteínas, consideradas como tetrámero, fue adicionado en reacciones individuales que se dejaron incubando por 20 min en oscuridad. Los cambios de anisotropía fueron medidos en un lector de placas Infinite M1000 (Tecan®), usando longitudes de onda (λ) de 470 nm para excitación y 525 nm para emisión, respectivamente. Los datos fueron analizados usando GraphPad Prism 6, siguiendo el modelo de Hill de acuerdo a la siguiente ecuación: $Y = B_{max} * X^h / (Kd^h + X^h)$, donde B indica el número máximo de sitios de unión; kd, se refiere a la concentración de proteína que se requiere para unir la mitad de los sitios de unión y h es el coeficiente de Hill.

6.7 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Las interacciones proteína-ADN fueron evaluadas usando ADN parcialmente doble (MH-8) con las diferentes versiones de las POPs, marcado previamente con γ -³²ATP.

También se evaluó la interacción con las SSBs, empleando un oligo poli-T de 70 nts, también marcado con γ -³²ATP.

Los ensayos se hicieron usando 1 nM de oligo marcado agregado en un buffer 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1.5 mM DTT, 10 % glicerol, 0.1 mg/ ml BSA y 10 mM de MgCl₂. Las reacciones fueron incubadas en hielo durante 20 min y detenidas usando un buffer no desnaturizante (40 % sacarosa, 20 mM EDTA, y 0.05 % de azul de bromofenol); y de ahí fueron corridas en un gel no desnaturizante de acrilamida al 4 % a 4 °C.

7.- RESULTADOS

7.1 Clonación de las SSBs

Se obtuvieron clonas positivas de los insertos que codifican para cada una de las SSBs. Se hizo una digestión para corroborar el peso de los insertos esperados para cada construcción (Fig. 9).

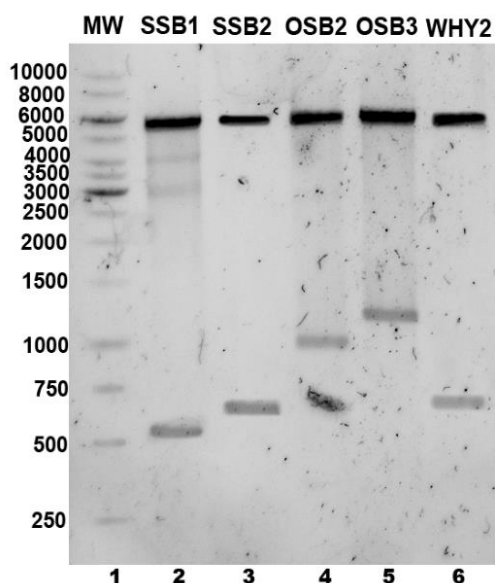


Fig. 9. Digestión de los plásmidos de las AtSSBs.

Gel de agarosa al 1 % donde se muestran los insertos que codifica para cada proteína. Línea 1, marcador de peso molecular de 1 kb; las construcciones de las líneas 1 a 5 fueron cortadas con las enzimas de restricción BamHI y NdeI para el vector pET 19 b, cuyo peso es de 5717 pb, que coincide con las bandas localizadas cerca de 6000; la línea 6 corresponde a la construcción diseñada en el vector pET 28 b; fue cortada con NdeI y HindIII. Los insertos corresponden a los tamaños esperados: SSB1, 500 pb (línea 2), SSB2, 580 pb (línea 3), OSB2, 900 pb (línea 4), OSB3, 1150 pb (línea 5) y WHY2, 580 pb (línea 6). El gel fue teñido con SYBR Gold.

7.2 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Todas las POPs fueron expresadas y purificadas por dos pasos de purificación (columna de níquel y columna de heparina) para obtener un mayor rendimiento de pureza, como se muestra en la Fig. 10.

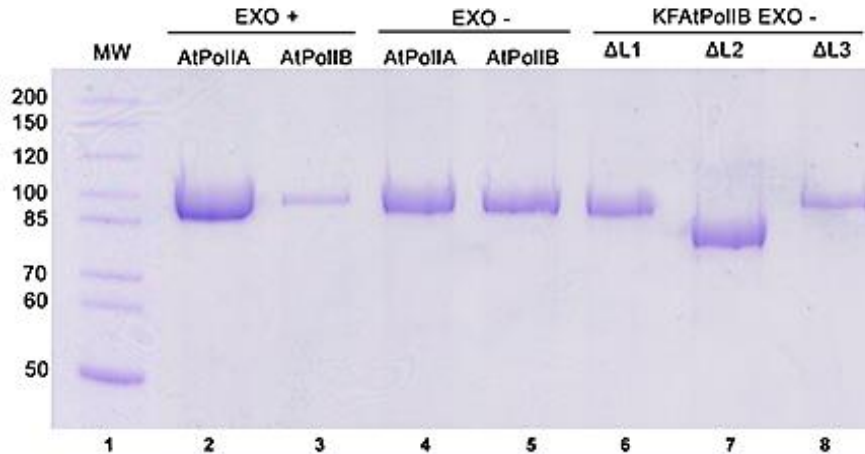


Fig. 10. Electroforesis de ADN polimerasas en gel de poliacrilamida al 10%. Todas las ADN polimerasas (POPs) fueron corridas en un gel SDS-PAGE. Las versiones EXO + (Silvestre) y EXO – de las POPs tienen un peso de ~93 kDa (Líneas 2-5). Las deleciones de los loops (Líneas 6-8) tienen un peso entre 82 a 90 kDa. En la línea 1 se muestra el marcador de peso molecular (MW). El gel fue teñido con azul de Coomasie.

En el caso de las SBBs todas se lograron obtener en condiciones solubles y con alto grado de pureza (Fig. 11).

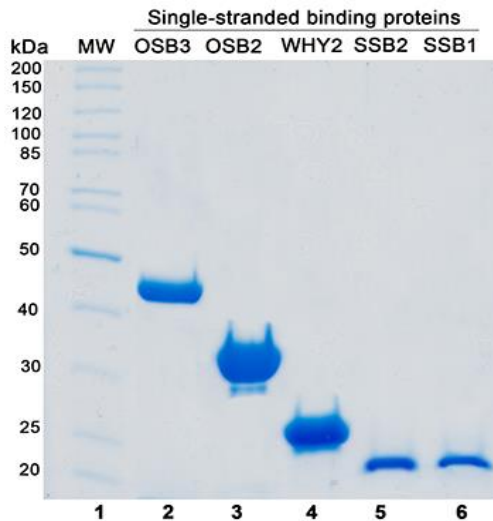


Fig. 11. Electroforesis de AtSSBs en gel de poliacrilamida al 10%. Las proteínas de unión a cadena sencilla (SSBs) sin cola de histidina son mostradas en bandas únicas que coinciden en los pesos predichos. Línea 1, marcador de peso molecular. Los pesos esperados en las líneas 2 a 6 abarcan desde 44 a 20 kDa. El gel fue teñido con Blue Safe Protein Stain®.

7.3 Ensayos de Microhomología (MMEJ)

Diversos trabajos han demostrado que las rupturas de doble cadena en cloroplastos son reparadas por medio de mecanismos ilegítimos como alineamiento de cadena sencilla (SSA, por sus siglas en inglés) o MMEJ; estas rupturas generan productos que son evaluados por PCR y a través de su secuencia se sabe que son fragmentos cortos con diferentes temperaturas de alineamiento, T_m , inferiores a 37°C, (Tabla 7) lo que sugiere que existen factores proteicos que pueden favorecer el alineamiento de estas secuencias pequeñas para ser reparadas por medio de MMEJ, por ejemplo. (Kibbe 2007, Odom, *et al.*, 2008; Maréchal, *et al.*, 2009; Parent, *et al.*, 2011).

Tabla 7. Secuencias representativas de microhomologías localizadas en *A. thaliana*

Tamaño de repetido (nts)	Secuencia	T_m (°C)	Referencia
6	CAGTCA	18 (Salt)	Kwon, <i>et al.</i> , 2010
8	GTTTACGA	22 (Salt)	Kwon, <i>et al.</i> , 2010
11	ATCCAATTTGA	16.5 (NN)	Kwon, <i>et al.</i> , 2010
12	AGAAATAAAGCA	21 (NN)	Kwon, <i>et al.</i> , 2010
10	CCCCCCCCCA	32.3 (NN)	Capadoccia, <i>et al.</i> , 2010
11	TGGAGCGTATG	27.7 (NN)	Capadoccia, <i>et al.</i> , 2010
10	CCTTTTTTTTTT	18.5 (NN)	Maréchal, <i>et al.</i> , 2012
14	TTCTTTTTTTTTTTTT	31.9 (NN)	Maréchal, <i>et al.</i> , 2012

Primero, se evaluó la capacidad de ambas AtPOPs de efectuar MMEJ, usando un sustrato con una secuencia microhomologa de 8 nts, 5'-CCCCGGGG-3' (Fig. 12) en el overhang del sustrato, cuya T_m corresponde a 22.5 °C.

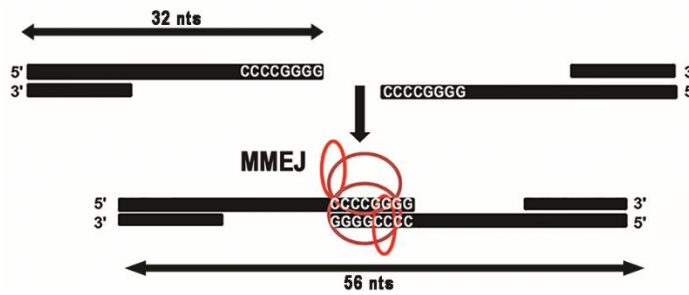


Fig. 12. Modelo propuesto de alineamiento en MMEJ. Al tener una secuencia de microhomología en el extremo 3' del sustrato, este puede colocarse en trans, generar una sinapsis y lograr extenderse en presencia de dNTPs. El producto esperado es aproximadamente el doble del sustrato original. Los círculos rojos representan a las AtPOPs.

Se usaron concentraciones de 10 mM de $MgCl_2$ y 2 mM $MnCl_2$. Se observó que con ambos cofactores la actividad exonucleasa de las AtPOPs silvestres (EXO +) es estimulada de formas similares a las dos concentraciones de AtPOPs, 100 y 400 nM, usadas en el ensayo. También se observó que la cantidad de producto generado por las versiones EXO + es alrededor de un 10 % del sustrato inicial, siendo el 90% degradado por esta actividad. Lo opuesto fue observado cuando se ensayaron las versiones EXO -, donde aprox. El 90 % del sustrato inicial fue convertido al producto esperado (Fig. 13)

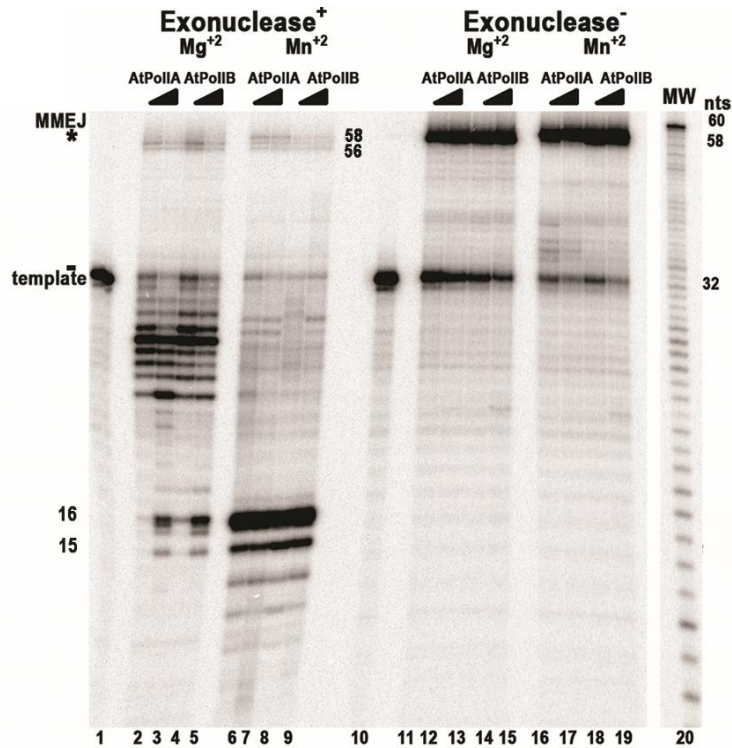


Fig. 13. AtPOPs ejecutan MMEJ *in vitro*. En un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 17 %, se muestran las reacciones de MMEJ ejecutadas por ambas ADN polimerasas, AtPolIA y AtPolIB, la versión silvestre (líneas 2 a 9) y las versiones deficientes de actividad exonucleasa (líneas 11 a 19), usando Mg²⁺ (líneas 2 a 5 y 11 a 15) y Mn²⁺ (líneas 6 a 9 y 16 a 19) como cofactores a concentraciones altas. El sustrato inicial tiene un tamaño de 32 nts (líneas 1 y 10) y el producto esperado es de 56 nts, indicado con (*).

Debido a que ambas AtPOPs de forma similar fueron capaces de extender el sustrato y generar los productos esperados, se decidió evaluar diferentes longitudes de secuencias de microhomología desde 0 hasta 12 nts (Fig. 14), para conocer la secuencia mínima requerida que promueve la sinapsis en la reacción, usando solo la AtPolIB (Fig.15).

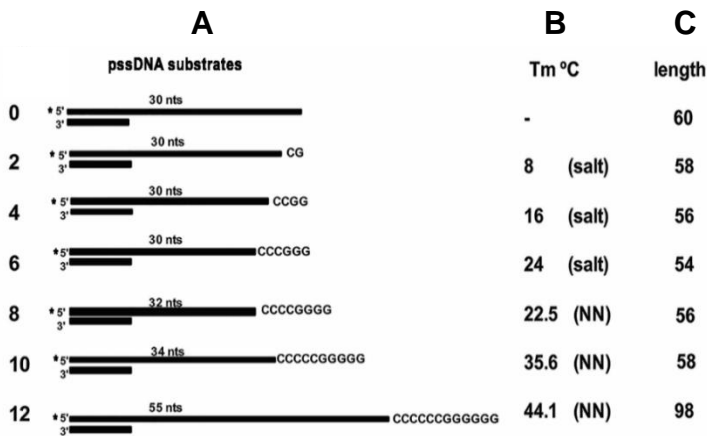


Fig. 14. Representación de sustratos para MMEJ. Un gradiente de longitud de microhomologías (0 a 12 nts) fueron generados, variando la longitud del *overhang* completo, como se muestra en el panel A. Los sustratos fueron marcados con γ^{32} ATP en la posición 5' del mismo templado, indicado con asterisco. Las T_m calculadas y la longitud del producto esperado de cada sustrato, son indicados en el panel B y C, respectivamente.

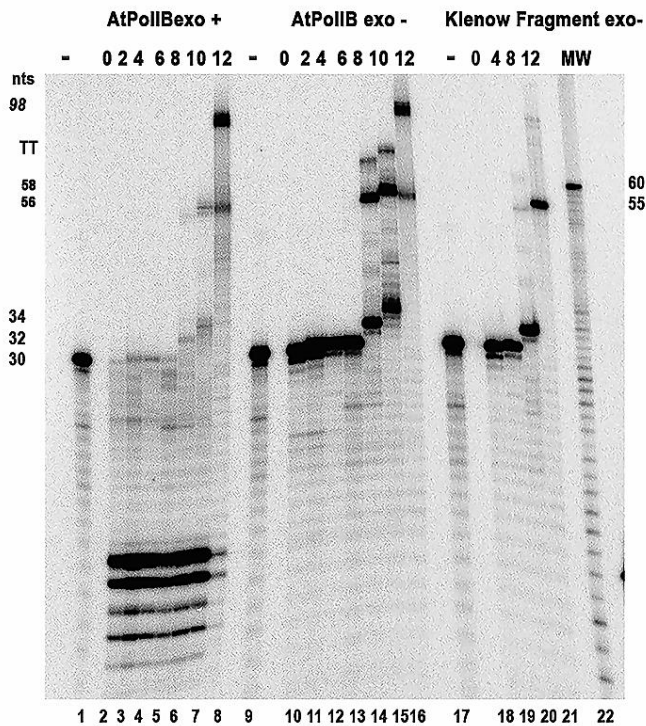


Fig. 15. AtPolIB efectúa MMEJ con tamaño microhomología mínimo de 8 nts. En el gel desnaturante de poliacrilamida del 17%, se muestran las reacciones con la EXO + (líneas 2 a 8) y con la EXO - (líneas 10 a 16), teniendo como control reacciones con el Fragmento Klenow de *E.coli* EXO- (líneas 18 a 21). El control de sustrato sin polimerasa se observa en las líneas 1, 9 y 17. Un marcador de peso fue puesto en la línea 22 para identificar el tamaño de los productos. Con la AtPolB fue posible observar productos en los pesos deseados, en contraste con el Fragmento Klenow, que forma productos en baja cantidad, con microhomología de 8 y 12 nts. La TT denota una posible actividad terminal transferasa de la enzima.

Al no observar productos en una microhomología menor de 8 nts, se decidió realizar experimentos usando diferentes concentraciones del cofactor 2, 6 y 10 mM de MgCl₂, y los sustratos que se usaron fueron los de tamaño de microhomología de 2, 4, 6 y 8 nts (Fig. 16).

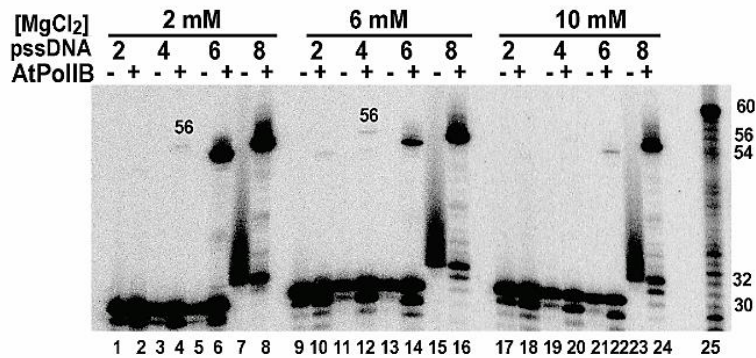


Fig. 16. AtPolIB efectúa MMEJ con secuencias menores de 8 nts de microhomología a diferentes concentraciones de MgCl₂. Con concentraciones crecientes de MgCl₂, en 2 mM se observan productos correspondientes a microhomologías de 6 y 8 nts (líneas 5 a 8); en 6 mM se disminuye la cantidad de producto con microhomología de 6 (línea 14) y con una concentración de 10 mM se observa una cantidad mínima de producto (línea 22).

Se exploró también la capacidad de las AtPOPs de alinear las secuencias de microhomología (sinapsis). Para ello se realizó un ensayo de FRET, usando dos oligos marcados con distintos fluoróforos (Cy3 y Cy5) conservando la secuencia de 8 nts de microhomología en donde se evaluaron cambios en la intensidad de la fluorescencia conforme la concentración de la proteína aumentaba (Fig. 17).

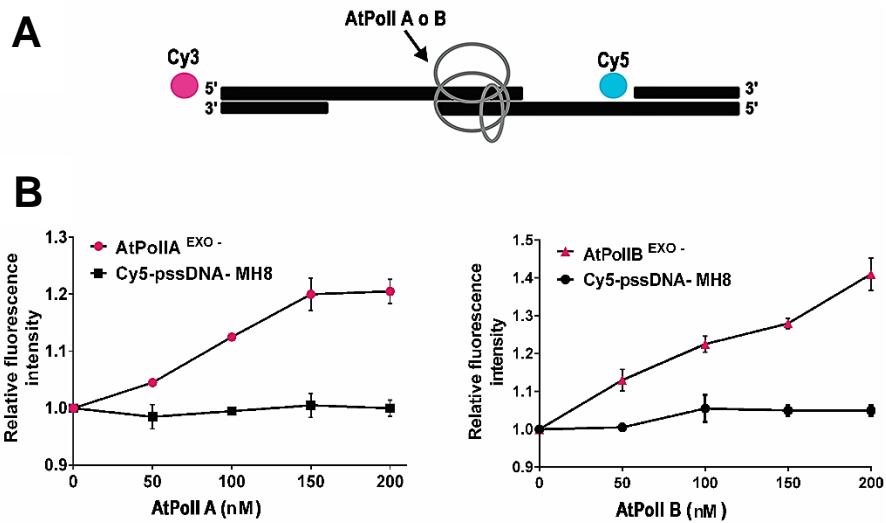


Fig. 17. Formación de sinapsis ensayado por FRET. A) Modelo propuesto para ensayo de formación de sinapsis, teniendo dos fluoróforos conjugados (Cy3-Cy5). B) La intensidad relativa de fluorescencia incrementa proporcionalmente con la concentración de proteína agregada. El control Cy5-pssDNA-MH8, al no tener el otro oligo (Cy3), no genera cambios en la intensidad.

Considerando la importancia de las inserciones únicas (loops) en actividades como síntesis translesional, se usaron mutantes deletoriales para cada uno de estos loops en el fondo de la AtPollB EXO- para conocer que loop o loops está involucrado en el mecanismo de MMEJ y también la capacidad de formación de sinapsis usando FRET con microhomología de 8 nts. Adicional se evaluó la afinidad de forma cualitativa de las AtPOPs al sustrato de microhomología por medio de un ensayo EMSA (Fig. 18).

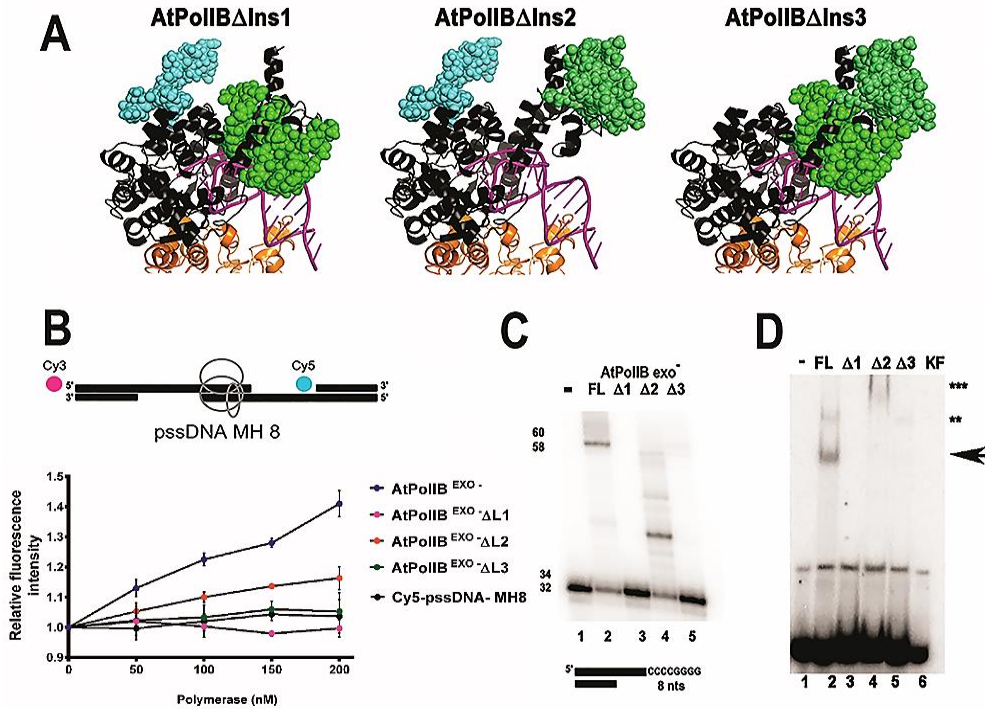


Fig. 18. La MMEJ es ejecutada por las inserciones únicas presentes en dominio de polimerización de las AtPOPs. A) Modelo representativo de las mutantes deleciones de los loops únicos. La inserción 1 y 2 están representadas por colores verde y lima, respectivamente, mientras que la inserción 3 se representa en color azul turquesa. B) Ensayo FRET con cada una de las deleciones, se observa que la deleción del loop1 no muestra cambio en la intensidad relativa de fluorescencia. C) Gel desnaturizante de poliacrilamida al 17%, se muestra que no hay generación de producto con la mutante del loop 1 (línea 3), en contraste con la reacción incubada con el loop 2 (línea 4) y loop 3 (línea 5) en donde se observan cantidades mínimas de productos que corresponden al tamaño esperado y de otros pesos. Con el control positivo (línea 2) se observa un producto de mayor cantidad. D) EMSA de poliacrilamida al 6%. Se observa que la AtPOP tiene afinidad al sustrato (línea 2) a diferencia de la mutante del loop 1 (línea 3), donde no se muestra la formación de un complejo entre ADN y la proteína. Para la mutante del loop 2 se muestra la formación de un complejo de peso mayor, indicado con dos asteriscos (línea 4) al observado con el control positivo, indicado con una flecha (línea 2). Se utilizó como control el Fragmento Klenow de *E. coli*, y no se observó formación de complejo (línea 6).

Con lo anterior, se demostró que el loop 1 es el principal responsable para el mecanismo de MMEJ, ya que no se observaron productos en el gel desnaturalizante ni en el gel nativo, sin embargo, con las demás mutantes se observó también una disminución en el rendimiento de los productos formados.

El análisis de las secuencias de microhomologías encontradas en cloroplastos y mitocondria generadas por DSBs, revelan la presencia de malos apareamientos, *mismatches*, (Cappadocia, *et al.*, 2010; Kwon, *et al.*, 2010). Por ello se decidió evaluar la capacidad de las AtPOPs de ejecutar la MMEJ aún en presencia de *mismatches* (Fig.19)



Fig. 19. Secuencias de malos apareamientos y sus alineamientos. Diferentes posiciones de mismatches fueron evaluadas, los mismatches están en color rojo, mientras que los apareamientos tipo Watson-Crick esta en blanco. Los mismatches están localizados 1 o 2 posiciones el extremo 3'-OH (I y II), en el extremo 3'-OH (III y IV) o 3 o 4 posiciones antes del 3'-OH. El * denota el oligo que fue marcado con γ -³²ATP.

Se encontró que todos los sustratos fueron capaces de extender aún con la presencia del mismatch localizado en el justo al final del extremo 3'-OH (Fig. 20).

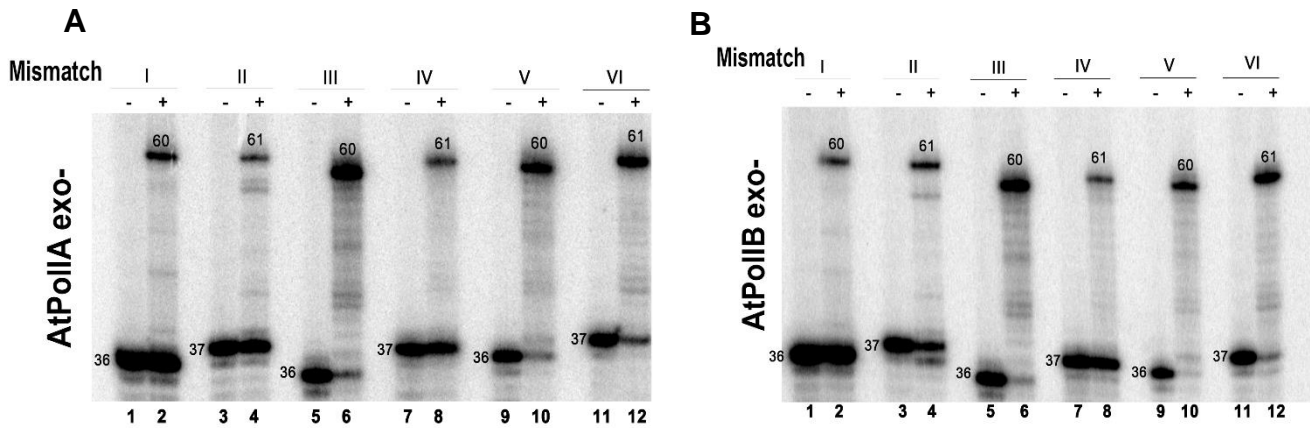


Fig. 20. AtPOPs ejecutan MMEJ en presencia de mismatches. Las reacciones en presencia de A) AtPolIA EXO - y B) AtPolIB EXO - generan productos en los 6 sustratos con mismatches. Las reacciones sin enzima se indican con un -. Los tamaños de los productos se observan arriba de las bandas de los productos.

La presencia de abundantes proteínas de unión a cadena sencilla (SSBs) en plantas en comparación con otros organismos como levaduras y mamíferos sugiere roles de éstas en actividades como protección del ADN, debido a la afinidad que caracteriza a las SSBs por sustratos de cadena sencilla y/o cadena doble. Considerando que los sustratos usados para los ensayos de MMEJ contienen un extremo 3'-OH de cadena sencilla, se evaluó la función de 5 SSBs presentes en *A. thaliana*: AtmtSSB1, AtmtSSB2, AtOSB2, AtOSB3 y AtWhirly2, en este mecanismo propuesto como posibles inhibidores, conservando el tamaño de microhomología de 8 nts y variando el tamaño de overhang del sustrato de 0 a 65 nts. Para este ensayo se usó la AtPolIB EXO -.

Se encontró que en tamaños cortos de overhang, indicado como pssDNA-MH8₍₀₎ y pssDNA-MH8₍₄₎ (Fig 21, panel A), la presencia de SSBs no afectó en la formación de productos de MMEJ. Con la adición de 4, 35 y 65 nts al overhang más la secuencia de microhomología de 8 nts, se observó una inhibición de formación de productos en presencia de AtOSB2 y AtWhy2 (Fig. 21, panel A y B), y una decreciente cantidad de producto con sustratos con overhangs de 35 y 65 nts en presencia de la AtOSB3 (Fig. 21, panel B).

Sin embargo, ningún efecto fue observado con las AtmtSSBs (Fig. 21. panel A y B), entonces, considerando que una de las funciones de las SSBs canónicas es reclutar proteínas encargadas de la replicación de ADN, se decidió evaluar si la presencia de las AtmtSSB1 y AtmtSSB2 podría promover la MMEJ por las AtPOPs silvestres en sustratos más largos (Fig. 21, panel D y E).

Se usaron concentraciones crecientes de AtmtSSBs y una concentración de AtPolIB silvestre, en un sustrato con overhang de 16 nts, se observa una deficiente cantidad de producto (Fig 21, panel C) como se observó en la Fig. 13. Por otro lado, en sustratos más largos (Fig. 21, panel D y E), la AtPolIB silvestre fue eficiente como la AtPolIB EXO – para generar los productos, mostrando una disminución de la cantidad de producto degradado por la actividad exonucleasa de la enzima y la presencia de las AtmtSSBs no influyó en la MMEJ como la OSB2 o WHY2.

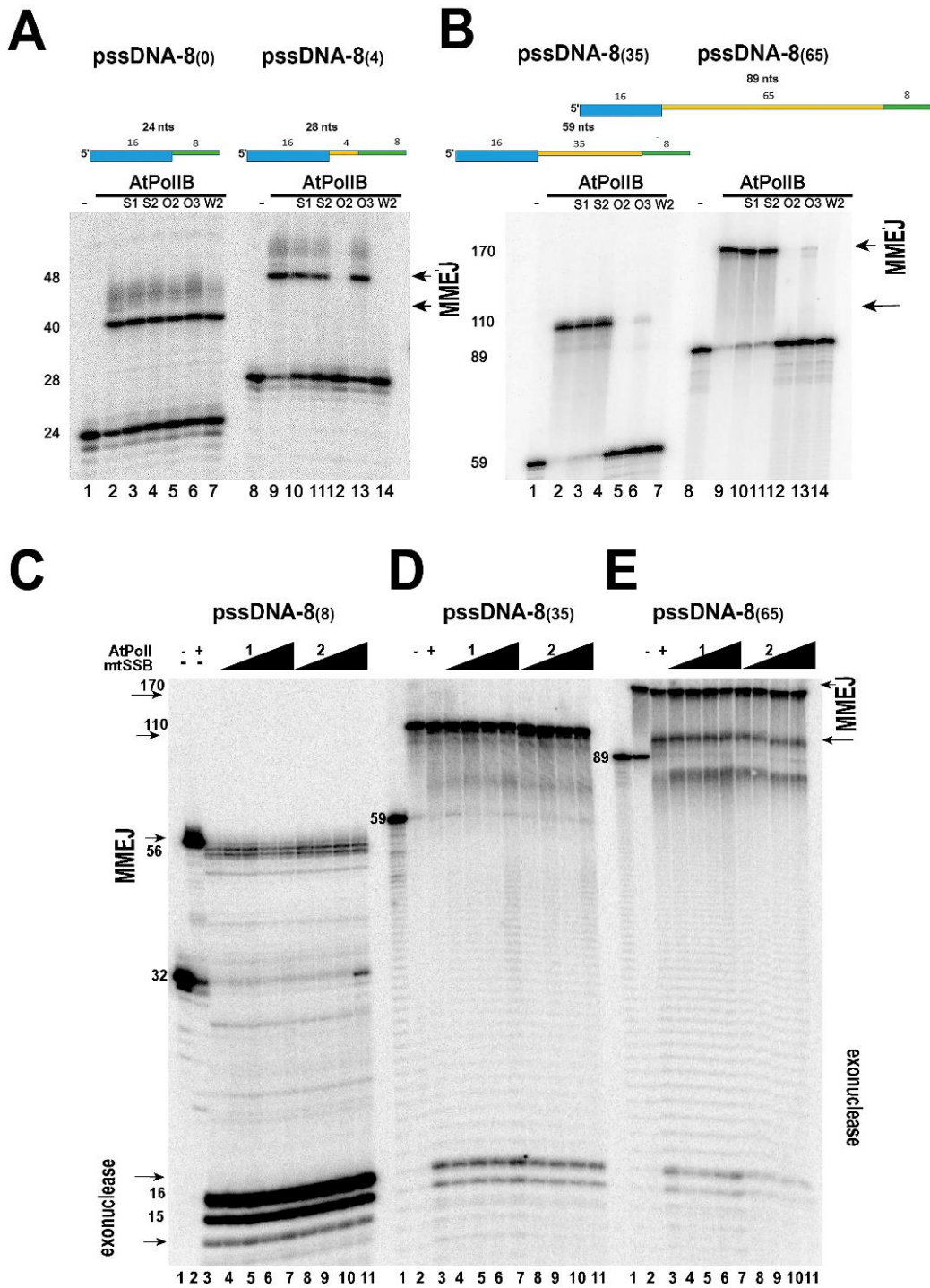


Fig 21. AtSSBs y el tamaño de *overhang* de ADN disponible regulan la MMEJ. En presencia de las AtSSBs (AtmtSSB1, S1; AtmtSSB2, S2, AtOSB2, O2, AtOSB3, O3 y AtWHY2, W2) en sustratos con variación en la longitud del *overhang* A) 8 nts (líneas 1 a 7) y 12 nts (8 a 14 nts), B) 43 nts (líneas 1 a 7) y 83 nts (líneas 8 a 14) se observan con la OSB2 y WHY2 en tamaños de *overhang* mayores de 8 nts, efectos inhibitorios de la MMEJ usando la AtPolIB EXO⁻. Los productos son indicados con flechas. C, D y E) La actividad de polimerización de la AtPolIB silvestre independientemente de la presencia de S1 y S2, es eficiente de forma similar a la AtPolIB deficiente de exonucleasa conforme el tamaño de *overhang* es más largo.

Se evaluó la afinidad de las AtSSBs con sustratos de cadena sencilla y cadena parcialmente doble (pssDNA) de forma cuantitativa y cualitativa. Para ello, primero se evaluó el estado oligomérico de las AtSSBs por filtración en gel (Fig. 22). Se realizó un ensayo de anisotropía fluorescente para las AtSSBs en donde se evaluó el cambio de la polarización para obtener valores de constantes de disociación, kd, (Tabla 8). Las concentraciones de las AtSSBs fueron consideradas en un estado oligomérico de tetrámero, dato obtenido del experimento de filtración en gel.

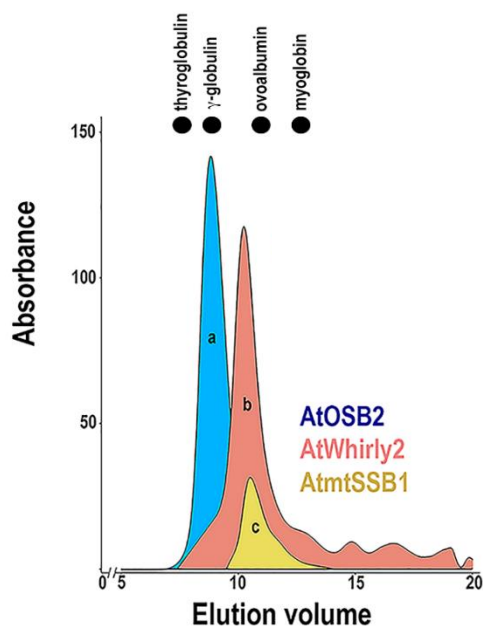


Fig. 22. Perfil oligomérico en filtración en gel de las AtSSBs.

Los perfiles de elución de las AtSSBs puras en una columna S75 muestran un ensamblaje tetramérico. Los pesos correspondientes son AtOSB2 28.3 kDa, AtWhirly2, 21.5 kDa y AtmtSSB1 19.5 kDa. Los puntos en la parte superior denotan los estándares de peso molecular.

Tabla 8. Constantes de disociación (kd) de las AtSSBs en diferentes sustratos

Proteína	pssDNA-10 (<i>overhang</i>)	ssDNA-45 nts
	Estado oligomérico en solución	Estado oligomérico en solución
	Kd (nM)	Kd (nM)
AtmtSSB1	----	62.8 ± 3.6 (tetramero)
AtOSB2	8.6 ± 0.46 (tetramero)	11.7 ± 2.2 (tetramero)
AtWhirly2	22.1 ± 1.3 (tetramero)	8.2 ± 0.19 (tetramero)

De acuerdo con los datos obtenidos de kd, refiriéndose a cadena sencilla la AtWhy2 y la AtOSB2 muestran valores similares a los reportados por Capadoccia *et al.* (2010) y Zaegel, *et al.* (2006) y se observa que la afinidad AtmtSSB1 es más baja aproximadamente 5 veces en comparación con la AtOSB2 y AtWhy2.

Por otro lado, con sustratos de cadena parcialmente doble con overhang de 10 nts, la AtmtSSB1 fue incapaz de unir al sustrato, mientras que la AtOSB2 y AtWhy2 unieron al sustrato con constantes de disociación de 8 y 22 nM, respectivamente (Tabla 8).

Un experimento adicional para evaluar la afinidad de las AtSSBs de forma cualitativa con un sustrato largo de cadena sencilla fue un EMSA al 4% (Fig. 23).

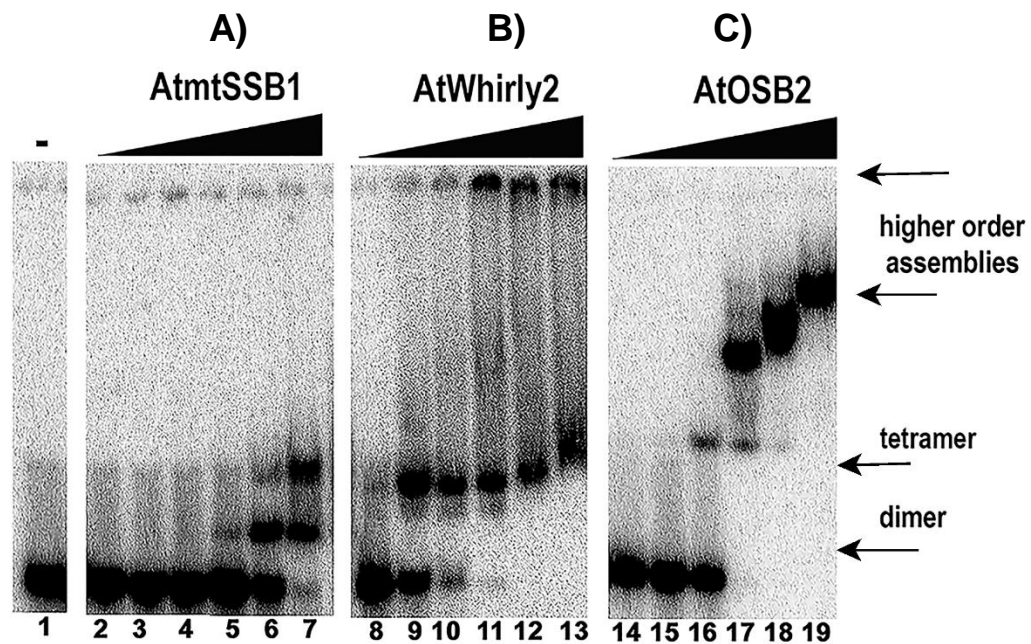


Fig. 23. Unión de las AtSSBs a ADN de cadena sencilla en un EMSA. Las AtSSBs fueron incubadas en gradiente de concentración como tetrámero (0, 1.15, 4.125, 14.87, 53.5, 192.9 y 694.2 nM) usando un oligo de 75 nts. A) La AtmtSSB1 forma complejos a partir de concentraciones altas (líneas 6 y 7), mostrando complejos como dímero y tetrámero indicados con flechas. B) AtWhy2 forma complejos desde la concentración mínima del gradiente (línea 8) y se ensambla el complejo como tetrámero, a diferencia de la AtOSB2 (panel C) se generan complejos de alto peso conforme la concentración de la proteína aumenta (líneas 17 a 19).

8.- DISCUSIÓN

La MMEJ es un mecanismo de reparación de rupturas de doble cadena, que coexiste aun en presencia de la recombinación homóloga (HR). Requiere una formación de sinapsis entre los extremos 3'-OH que contengan una pequeña secuencia de entre 5 a 20 pb que puedan alinearse y extenderse. En el modelo *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado rearrreglos moleculares que son dirigidos por secuencias de microhomologías de ADN (Capadoccia, *et al.*, 2010).

Se ha encontrado que las dos únicas ADN polimerasas organelares (AtPOPs) reportadas a la fecha, son capaces de ejecutar MMEJ, sumándose además de la HsPOLQ, a la lista de ADN polimerasas de la familia A capaces de efectuar este mecanismo.

Las AtPOPs requieren al menos de 4 nts de secuencia de microhomología para poder alinearse y lograr extenderse. Estas polimerasas presentan 3 inserciones únicas que le confieren estabilidad ante el paso de lesiones, dichas inserciones están localizadas en diferentes zonas del dominio de polimerización, siendo la principal responsable de la MMEJ la inserción 1, caso similar reportado con la HsPOLQ para actividades como síntesis translesional y MMEJ, donde estas inserciones son esenciales para dichos mecanismos (Baruch-Torres y Brieba, 2017; Kent, *et al.*, 2015).

De las rearrreglos encontrados por el grupo de Capadoccia *et al.* (2010) generados por uniones de microhomología, varios contienen algún mal apareamiento (mismatch). Entonces, considerando esto, la maquinaria proteica encargada de la MMEJ debe ser bioquímicamente capaz de extender el templado aún en presencia de mismatches como se observó con estas AtPOPs, que fueron eficientes al extender el sustrato aún en presencia de mismatches justo en el extremo 3'-OH. Otro escenario especulativo por la que se podría explicar la extensión aún en presencia de mismatches puede ser que estas AtPOPs sean capaces efectuar un mecanismo de replicación denominado *slippage* (Canceill y Ehrlich, 1996; Canceill, *et al.*, 1999; Viguera, *et al.*, 2001).

En sustratos con overhang cortos (menores de 16 nts), las AtPOPs usan su actividad de exonucleasa preferentemente que la de polimerización, contrastando en sustratos con overhang más largos (mayores de 16 nts) en donde la actividad de polimerización, mostrada como formación de productos por MMEJ, es eficiente de forma similar con la versión EXO – de las AtPOPs ensayadas en el trabajo, lo que sugiere que la presencia de nucleótidos extra, permite un ensamblaje adecuado de la polimerasa para poder alinear las secuencias microhomólogas, es decir, una formación de sinapsis.

Estudios *in vivo* de Maréchal *et al.* (2009) demuestran que en la ausencia de AtWhy1 y AtWhy3 se incrementa la formación de productos derivados de una recombinación ilegítima. Cadenas sencillas generadas después de una DSBs quedan expuestas y pueden ser degradadas o recombinarse por pequeñas secuencias de microhomologías, por lo que es relevante su papel para prevenir este tipo de recombinación.

De forma bioquímica, en este trabajo se demostró que la AtWhy2, así como otras proteínas de unión a cadena sencilla como AtOSB2 y en menor eficiencia AtOSB3, son capaces de inhibir la formación de productos de MMEJ. La presencia de los dominios Whirly de AtWhy y dominios PDF presentes en AtOSB en la región C-terminal pueden explicar una alta afinidad al ADN.

Por otro lado, en presencia de las AtmtSSB1 y AtmtSSB2, no se observó alguna inhibición; esto puede sugerir que las concentraciones que se requieren de AtmtSSBs deben ser altas para que puedan bloquear la MMEJ o que la asociación con ADN es inestable. Un dato similar ha sido reportado con otra SSB, la g2.5, SSB del fago T7, en donde hasta altas concentraciones de proteína se forman complejos entre proteína-ADN (He, *et al.*, 2003), es decir, muestra una baja afinidad hacia sustratos de cadena sencilla.

Considerando que la presencia de AtWhy y AtOSBs evita un alineamiento de secuencias de microhomología al colocarse sobre el extremo 3'-OH expuesto, y se bloquea el sitio para las AtPOPs o AtmtSSBs, en un escenario alternativo, la presencia de proteínas de la maquinaria de recombinación homóloga, como ODB1 (Rad-52-like) (Janicka, *et al.*, 2012) o RecA, podrían interactuar con AtmtSSB y colocarse en ese extremo 3'-OH libre para dirigir la reparación hacia una vía fiel (Gualberto y Newton, 2017), generando una estabilidad genómica en el sistema.

Considerando el ambiente estresante en el que se encuentran tanto cloroplasto como mitocondria, derivado de sus propios procesos oxidativos y de la incidencia constante de luz UV, la existencia de sistemas proteicos capaces de proteger y reparar el ADN organelar es necesaria para el mantenimiento tanto genómico como funcional de las plantas.

9.- CONCLUSIONES

- De forma *in vitro* estas AtPOPs son capaces de efectuar MMEJ sin diferencias entre una u otra enzima, sin embargo, la vía completa de MMEJ en organelos de plantas aún no ha sido completamente descrita.
- Estas AtPOPs son análogas a la HsDNAPQ (Pol θ) en funciones como síntesis translesional y en MMEJ, en donde se ha comprobado que la presencia de los loops es esencial para estas actividades
- La alta afinidad de las SSBs a sustratos de cadena sencilla evita la formación de productos por vías ilegítimas, como la MMEJ, siendo esto una de las muchas explicaciones del por qué la presencia de tantas SSBs en plantas.
- Las vías ilegítimas de recombinación como la MMEJ, pueden explicar la cantidad de rearreglos de ADN que existen en mitocondria y cloroplasto.

10.- PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos *in organello* de MMEJ usando la técnica de inmunoprecipitación.
- Realizar ensayos de cristalización de AtmtSSB1, AtmtSSB2, AtOSB2 y AtOSB3, con sustratos de cadena sencilla y sustratos de cadena parcialmente, y sin sustrato
- Estudios bioquímicos de los dominios PDF de las AtOSB
- Evaluar el sistema de MMEJ con las AtPOPs silvestres en presencia de AtWhy y AtOSB en diferentes tamaños de overhang
- Evaluar la afinidad de las AtSSBs con ARN

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arrieta-Montiel, M., y Mackenzie, S., 2011. "Plant Mitochondria". Advances in Plant Biology 1.

Baruch-Torres, N., y Brieba, L., 2017. "Plant organellar DNA polymerases are replicative and translesion DNA synthesis polymerases". Nucleic Acids Research. Vol. 45. Páginas 10751–10763.

Bebenek, K. y Kunkel, T., 2004. "Functions of DNA Polymerases". Advances in Protein Chemistry. Vol. 69, Páginas 137-165.

Beese, L., Derbyshire, V., y Steitz, T., 1992. "Structure of DNA Polymerase I Klenow Fragment Bound to Duplex DNA". SCIENCE. Vol. 260. Páginas 352-355.

Bendich, 2013. "DNA abandonment and the mechanisms of uniparental inheritance of mitochondria and chloroplasts". Chromosome Res. Vol. 21. Páginas 287-296.

Bendich, A., 1987. "Why Do Chloroplasts and Mitochondria Contain So Many Copies of Their Genome?". BioEssays. Vol 6. Páginas 279-282.

Bleuyard, J., Gallego, M., y White, C., 2006. "Recent advances in understanding of the DNA double-strand break repair machinery of plants". DNA repair. Vol. 5. Páginas 1-12.

Boesch, P., Ibrahim, N., Paulus, F., Cosset, A., Tarasenko, V. y Dietrich, A., 2009. "Plant mitochondria possess a short-patch base excision DNA repair pathway". Nucleic Acids Res. Vol. 37. Páginas 5690–5700.

Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F., Lightowlers, R., y Dietrich, A., 2011. "DNA repair in organelles: Pathways,

organization, regulation, relevance in disease and aging”. Biochimica et Biophysica Acta. Vol. 1813. Páginas 186-200.

Cabral de Medeiros, N., Marques, A., Cristiane, H. y Castanho, K., 2015. “Recent Advances in Plant DNA Repair”. Advances in DNA Repair (book).

Canceill, D., Viguera, E., y Ehrlick, S., 1999. “Replication Slippage of Different DNA Polymerases Is Inversely Related to Their Strand Displacement Efficiency”. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 274. Páginas 27481–27490.

Canceill, D., y Ehrlich, D., 1996. “Copy-choice recombination mediated by DNA polymerase III holoenzyme from *Escherichia coli*”. PNAS. Vol. 93. Páginas 6647-6652.

Cappadocia, L., Maréchal, A., Parent, J., Lepage, É., Sygusch, J., y Brisson, N., 2010. “Crystal Structures of DNA-Whirly Complexes and Their Role in Arabidopsis Organelle Genome Repair”. The Plant Cell. Vol. 22, Páginas 1849–1867.

Cappadocia, L., Parent, J., Sygusch, J. y Brisson, N., 2013. A family portrait: structural comparison of the Whirly proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Solanum tuberosum*”. Acta Crystallographica. Vol. 69. Páginas 1207–1211.

Cappadocia, L., Parent, J., Zampini, É., Lepage, É., Sygusch, J. y Brisson, N., 2011. “A conserved lysine residue of plant Whirly proteins is necessary for higher order protein assembly and protection against DNA damage”. Nucleic Acids Research. Vol. 40. Páginas 258-269.

Chan, S., Yu, A. y McVey, M., 2010. “Dual Roles for DNA Polymerase Theta in Alternative End- Joining Repair of Double-Strand Breaks in *Drosophila*”. Plos Genetics. Vol. 6.

Chiruvella, K., Liang, Z., y Wilson, T., 2013. "Repair of Double-Strand Breaks by End joining". Cold Spring Harb Perspect Biol. 5: a012757.

Ciesielski, G., Oliveira, M., Kaguni, L., 2016. "Animal Mitochondrial DNA Replication" [e-book]. The Enzymes. Vol 39. Capítulo 8.

Desveaux, D., Maréchal, A. y Brisson, N., 2005. "Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond". TRENDS in Plant Science. Vol. 10. Páginas 95-102.

Córsico, B., Falomir, L., Franchini, G. y Scaglia, N., 2013. "ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE MACROMOLÉCULAS". [e-book] Universidad de la Plata. Editorial de la Universidad de la Plata.

Dickey, T., Altschuler, S. y Wuttke, D., 2013. "Single-Stranded DNA-Binding Proteins: Multiple Domains for Multiple Functions". Structure. Vol. 21. Páginas 1074-1084.

Edmondson, A. C., D. Song, L. A. Alvarez, M. K. Wall, D. Almond, D. A. McClellan, A. Maxwell y B. L. Nielsen, 2005. "Characterization of a mitochondrially targeted single-stranded DNA-binding protein in *Arabidopsis thaliana*". Mol Genet Genomics Vol. 273. Páginas 115-122.

Gallego, M., Bleuyard, J., Daudoal-Cotterell, S., Jallut, N. y White, C., 2003. "Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in *Arabidopsis*". The Plant Journal. Vol. 35. Páginas 557-565.

Gualberto, J. y Newton, K., 2017. "Plant Mitochondrial Genomes: Dynamics and Mechanisms of Mutation". Annu. Rev. Plant Biol. Vol. 68. Páginas 17.1-17.28

Gualberto, J., Mileshina, D., Wallet, C., Khan, A., Weber-Lotfi, F. y Dietrich, A., 2014. "The plant mitochondrial genome: Dynamics and maintenance". Biochimie. Vol.100. Páginas 107-120.

Gualberto, J., y Kühn, K., 2014. "DNA-binding proteins in plant mitochondria: Implications for transcription". Mitochondrion. Vol. 19. Páginas 323-328.

He, Z., Rezende, L., Willcox, S., Griffith, J., y Richardson, C., 2003. "The Carboxyl terminal Domain of Bacteriophage T7 Single-stranded DNA-binding Protein Modulates DNA Binding and Interaction with T7 DNA Polymerase". The Journal of Biological Chemistry. Vol.278. Páginas 29538–29545.

Hogg, M., Sauer-Eriksson, A.E., y Johansson, E., 2011. "Promiscuous DNA synthesis by human DNA polymerase θ ". Nucleic Acids Research. Vol. 40. Páginas 2611–2622.

Hogg, M., Seki, M., Wood, R., Doublé, S., y Wallace, S., 2011. "Lesion Bypass Activity of DNA Polymerase θ (POLQ) Is an Intrinsic Property of the Pol Domain and Depends on Unique Sequence Inserts". Journal of Molecular Biology. Vol. 405. Páginas 642-652.

Hollis, T., Stattel, J., Walther, D., Richardson, C. y Ellenberger, T., 2001. "Structure of the gene 2.5 protein, a single-stranded DNA binding protein encoded by bacteriophage T7". PNAS. Vol. 98. Páginas 9557–9562.

Inagaki, S., Suzuki, T., Ohto, M., Urawa, H., Horiuchi, T., Nakamura, K. y Morikami, A., 2006. "*Arabidopsis* TEBICHI, with Helicase and DNA Polymerase Domains, Is Required for Regulated Cell Division and Differentiation in Meristems". The Plant Cell. Vol. 18. Páginas 879–892.

Itzhaki, J., 2012. "DNA damage recognition: keeping the right players on board" [web site]: <http://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/index.asp?pageid=892>. Department of Biochemistry, University of Oxford.

Janicka, S., K. Kuhn, M. Le Ret, G. Bonnard, P. Imbault, H. Augustyniak and J. M. Gualberto, 2012. "A RAD52-like single-stranded DNA binding protein affects mitochondrial DNA repair by recombination". The Plant Journal. Vol. 72.

Kanaar, R., Hoeijmakers, J. y van Gent, D., 1998. "Molecular mechanisms of DNA double strand break repair". trends in CELL BIOLOGY. Vol. 8. Páginas 483-489.

Kato, M., Frick, D., Lee, J., Tabor, S., Richardson, C. y Ellenberger, T., 2001. "A Complex of the Bacteriophage T7 Primase-Helicase and DNA Polymerase Directs Primer Utilization". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 276. Páginas 21809–21820.

Kent, T., Chandramouly, G., McDevitt, S., Ozdemir, A. y Pomerantz, R., 2015. "Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase θ ". Nature Structural & Molecular Biology. Vol. 22. Páginas 230–237.

Kibbe, W. A. (2007). "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator". Nucleic Acids Res. Vol. 35 (Web Server issue): W43-46.

Kim, D., Narayan, M. y Patel, S., 2002. "T7 DNA Helicase: A Molecular Motor that Processively and Unidirectionally Translocates Along Single-stranded DNA". J. Mol. Biol. Vol. 321. Páginas 807-819.

Korhonen, J., Pham, X., Pellegrini, M. y Falkenberg, M., 2004. "Reconstitution of a minimal mtDNA replisome *in vitro*". The EMBO Journal. Vol 23. Páginas 2423–2429.

Kozak, J., West, C., White, C., da Costa-Nunes, J. y Angelis, K., 2009. "Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins

involved in chromosome structure maintenance”. DNA Repair. Vol 8. Páginas 413-419.

Krause, K., Kilbiński, I., Mulisch, M., Rödiger, A., Schäfer, A. y Krupinska, K., 2005. “DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles”. FEBS Letters. Vol. 579. Páginas 3707–3712.

Kulczyk, A., Moeller, A., Meyer, P., Sliz, P. y Richardson, C., 2017. “Cryo-EM structure of the replisome reveals multiple interactions coordinating DNA synthesis”. PNAS. Páginas E1848–E1856

Kwon, T., Huq, E., y Herrin, D., 2010. “Microhomology-mediated and nonhomologous repair of a double-strand break in the chloroplast genome of *Arabidopsis*”. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 107. Páginas 13954–13959.

Manova, V., y Gruzka, D., 2015. DNA damage and repair in plants—from models to crops. Frontiers in Plant Science. Vol. 6.

Maréchal, A., 2009. “Un rôle pour les protéines de la famille Whirly dans le maintien de la stabilité du génome des organelles chez *Arabidopsis thaliana*”. [tesis] Université de Montréal.

Maréchal, A., Parent, J., Véronneau-Lafortune, F., Joyeux, A., Lang, B., y Brisson, N., 2009. “Whirly proteins maintain plastid genome stability in *Arabidopsis*”. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 106. Páginas 14693–14698.

McVey, M. y Lee, S., 2008. “MMEJ repair of double-strand breaks (director’s cut): deleted sequences and alternative endings”. Trends in Genetics. Vol. 24. Páginas 529-538.

Metha, A., y Haber, J., 2014. "Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair". Cold Spring Harb Perspect Biol. 6: a016428.

Meyer, D., Hua, B. y Heyer, W., 2015. DNA polymerases δ and λ cooperate in repairing double-strand breaks by microhomology-mediated end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. PNAS. Vol. 112. Páginas E6907-E6916.

Miller-Messmer, M., Kühn, K., Bichara, M., Le Ret, M., Imbault, P., y Gualberto, J., 2012. "RecA-Dependent DNA Repair Results in Increased Heteroplasmy of the Arabidopsis Mitochondrial Genome". Plant Physiology. Vol. 159. Páginas 211-226.

Mori, Y., Kimura, S., Saotome, A., Kasai, N., Sakaguchi, N., Uchiyama, Y., Ishibashi, T., Yamamoto, T., Chiku, H., y Sakaguchi, K., 2005. "Plastid DNA polymerases from higher plants, *Arabidopsis thaliana*". Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 335. Páginas 43–50.

Moriyama, T., Terasawa, K. y Sato, N., 2011. "Conservation of POPs, the Plant Organellar DNA Polymerases, in Eukaryotes". PROTIST. Vol. 162. Páginas 177–187.

Moriyama, T., y Sato, N., 2014. "Enzymes involved in organellar DNA replication in photosynthetic eukaryotes". Frontiers in Plant Science. Vol. 5.

Newman, J., Cooper, C., Aitkenhead, H., y Gileadi, O., 2015. "Structure of the Helicase Domain of DNA Polymerase Theta Reveals a Possible Role in the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway". Structure. Vol. 23. Páginas 2319–2330.

Odom, o., Baek, K-H., Dani, R., y Herrin, D., 2008. "*Chlamydomonas* chloroplasts can use short dispersed repeats and multiple pathways to repair a double-strand break in the genome". The Plant Journal. Vol. 53. Páginas 842–853.

Ohnishi, T., Mori, E. y Takahashi, A., 2009. "DNA double-strand breaks: Their production, recognition, and repair in eukaryotes". Mutation Research. Vol. 669. Páginas 8-12.

Oldenburg, D., y Bendich, J., 2015. "DNA maintenance in plastids and mitochondria of plants". Frontiers in Plant Science. Vol. 6

Parent, J., Lepage, É., y Brisson, N., 2011. "Divergent Roles for the Two Poll-Like Organelle DNA Polymerases of Arabidopsis". Plant Physiology. Vol. 156. Páginas 254–262.

Pastwa, E., Somiari, R., Malinowski, M., Somiari, S. y Winters, T., 2009. "In vitro non-homologous DNA end joining assays—The 20th anniversary". The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. Vol. 41. Páginas 1254–1260.

Prikryl, J., Watkins, K., Friso, G., van Wijk, K. y Barkan, A., 2008. "A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis". Nucleic Acids Research. Vol. 36. Páginas 5152–5165.

Puchta, H., 2005. "The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution". Journal of Experimental Botany. Vol.56. Páginas 1-14.

Qimron, U., Lee, S., Hamdan, S. y Richardson, C., 2006. "Primer initiation and extension by T7 DNA primase". The EMBO Journal. Vol. 25. Páginas 2199–2208.

Ramachandran, A., Nandakumar, N., Deshpande, A., Lucas, T., R-Bhojappa, R., Tang, Q., Raney, K., Yin, Y. y Patel, S., 2016. The yeast mitochondrial RNA polymerase and transcription factor complex catalyzes efficient priming of DNA synthesis on single-stranded DNA. The Journal of Biological Chemistry. Vol 291. Páginas 16828 –16839.

Ravi, *et al.*, 2007. "An update on chloroplast genomes". Plant Systematics and Evolution. Vol. 271. Páginas 101-122.

Rowan, B., Oldenburg, D. y Bendich, A., 2010. "RecA maintains the integrity of chloroplast DNA molecules in *Arabidopsis*". Journal of Experimental Botany. Vol. 61. Páginas 2575–2588.

Ruhlman, T. y Jansen, R., 2014. "The Plastid Genomes of Flowering Plants". Chloroplast Biotechnology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (e-book). Vol. 1132. Editorial Springer

Sage, J., Gildemeister, O. y Knight, K., 2009. "Discovery of a Novel Function for Human Rad51, MAINTENANCE OF THE MITOCHONDRIAL GENOME". The Journal of Biological Chemistry. Vol. 285. Páginas 18984 –18990.

Sánchez-Sandoval, E., Díaz-Quezada, C., Velazquez, G., Arroyo-Navarro, Luis F., Almanza-Martinez, N., Trasviña-Arenas, C., Briebe, L., 2015. "Yeast mitochondrial RNA polymerase primes mitochondrial DNA polymerase at origins of replication and promoter sequences". Mitochondrion. Vol. 24. Páginas 22-31.

Seki, M., Masutani, C., Yang, L., Schuffert, A., Iwai, S., Bahar, I. y Wood, R., 2004. "High-efficiency bypass of DNA damage by human DNA polymerase Q". The EMBO Journal. Vol 23. Páginas 4484–4494.

Sfeir, A. y Symington, L., 2015. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? Trends in Biochemical Sciences. Vol. 40. Páginas 701-714.

Shamoo, Y., 2002. "Single-stranded DNA-binding Proteins". ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. [e-book] Editorial John Wiley & Sons.

Shedge, V., Arrieta-Montiel, M., Christensen, A. y Mackenzie, S., 2007. "Plant Mitochondrial Recombination Surveillance Requires Unusual RecA and MutS Homologs". The Plant Cell. Vol 19. Páginas 1251–1264.

Shereda, R., Kozlov, A., Lohman, T., Cox, M., y Keck, J., 2008. "SSB as an Organizer/Mobilizer of Genome Maintenance Complexes". Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 43. Páginas 289-318.

Tafurt Y. y Marin, MA, 2014. "Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN". Biosalud. Vol. 13. Páginas 95-110.

Tamura, K., Adachi, Y., Chiba, K., Oguchi, K. y Takahashi, H., 2002. "Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double strand breaks". The Plant Journal. Vol. 29. Páginas 771-781.

Theobald, D., Mitton-Fry, R., y Wuttke, D., 2003. Nucleic Acid Recognition by OB Fold Proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. Vol.32

Trasviña-Arenas, CH., Baruch-Torres, N., Córdoba-Andrade, FJ., Ayala-García, VM., García-Medel, PL., Díaz-Quezada, C., Peralta-Castro, A., Ordaz-Ortiz, JJ. y Brieba, LG., 2018. "Identification of a unique insertion in plant organellar DNA polymerases responsible for 5'-dRP lyase and strand-displacement activities: Implications for Base Excision Repair". DNA Repair. Vol. 65. Páginas 1-10.

van Kregten, M., de Pater, S., Romeijn, R., van Schendel, R., Hooykaas, P. y Tijsterman, M., 2016. "T-DNA integration in plants results from polymerase- θ mediated DNA repair". NATURE PLANTS. VOL 2.

Viguera, E., Canceill, D., y Ehrlick, S., 2001. "Replication slippage involves DNA polymerases pausing and dissociation". The EMBO Journal. Vol. 20. Páginas 2587-2595.

Wyman, C., Ristic, D. y Kanaar, R., 2004. "Homologous recombination-mediated double-strand break repair". DNA Repair. Vol. 3. Páginas 827-833.

Yao, N. y O'Donnell, M., 2010. "SnapShot: The Replisome". Cell. Vol. 141

Yousefzadeh, M., y Wood, R., 2013. "DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage". DNA Repair. Vol. 12. Páginas 1-9.

Zaegel, V., Guermann, B., Le Ret, M., Andrés, C., Meyer, D., Erhardt, M., Canaday, J., Gualberto, J., y Imbault, P., 2006. "The Plant-Specific ssDNA Binding Protein OSB1 Is Involved in the Stoichiometric Transmission of Mitochondrial DNA in Arabidopsis". The Plant Cell. Vol. 18. Páginas 3548–3563.

Zahn, K., Averill, A., Aller, P., Wood, R. y Doublie, S., 2015. "Human DNA polymerase θ grasps the primer terminus to mediate DNA repair". Nature Structural & Molecular Biology. Vol. 22. Páginas 304-312.