

# Bioquímica estructural del metabolismo de ácidos nucleicos: mecanismos de la fidelidad en las polimerasas de ácidos nucleicos

Luis G. Brieda<sup>1</sup>

1. Departamento de Bioquímica, Cinvestav. Av. Instituto Politécnico Nacional # 2508 Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F., México CP 07360. e-mail: lgbrieda@cinvestav.mx

*Recibido: julio 2006 / Aceptado: octubre 2006*

LAS POLIMERASAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS LLEVAN A CABO REACCIONES clave como la replicación y transcripción del material genético con gran exactitud. En esta revisión se explican en términos estructurales, los fundamentos de la elevada fidelidad de las polimerasas de ácidos nucleicos y se da énfasis a la excepción a la regla, la incorporación de nucleótidos usando como substrato la lesión 8-oxoguanosina (8oG). T7 ADN polimerasa es una enzima modular, que consiste en un dominio con actividad de exonucleasa o de edición y un dominio de polimerización. La fidelidad durante la inserción de nucleótidos ocurre por un mecanismo de enlace inducido y la rigidez del dominio de polimerización. Esta fidelidad puede ser mayor debido a la actividad de edición, por la cual, una base erróneamente incorporada, se traslada del dominio de polimerización al de edición para ser removida. Así, T7 ADN polimerasa comente en promedio solamente un error por cada millón de bases replicadas. Sin embargo esta polimerasa se “equivoca” en uno de cada cuatro intentos (incorporación de dATP en lugar de dCTP) cuando replica la lesión 8oG. La inserción, fiel o infiel, teniendo como substrato 8oG, se relaciona con la rigidez del sitio activo de la enzima y modificaciones pequeñas en el sitio activo alteran su grado de fidelidad. Un evento de inserción mutagénico 8oG-dATP, “engaña” el sistema de edición al formar un par que asemeja el par normal Thy-dATP. Entender el fenómeno de la fidelidad en polimerasas replicativas esta directamente asociado a poder combatir enfermedades como el cáncer.

**Palabras clave:** bioquímica / ácidos nucleicos / polimerización / cáncer-investigaciones

## Introducción

Una de las características que definen a un ser vivo es la capacidad de transmitir información hereditaria. Por lo tanto, la presencia de material genético en los organismos vivos hace que existan enzimas involucradas en la replicación de los genomas. Estas enzimas se conocen como ADN polimerasas y se encuentran en la mayoría de las formas de vida, desde los bacteriófagos a los organismos eucariontes desarrollados. Dos eventos clave marcan la historia del estudio de la replicación de ácidos nucleicos: 1) El modelo de la doble hélice propuesto por Watson y Crick, que predice que la replicación del material genético puede ser llevada a cabo utilizando una de los dos cadenas del ácido nucleico como templado (Watson: 1953); y, 2) la identificación y caracterización, en el laboratorio de Arthur Kornberg, de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli*, como la primera enzima con capacidad de polimerizar ácidos nucleicos (Lehman, 1958:163).

Evidentemente, la principal función de las ADN polimerasas es replicar genomas. Sin embargo, se ha visto que existen nuevas familias de polimerasas, como la familia Y, que tienen un papel en la replicación fiel a través de lesiones de ácidos nucleicos o la ADN polimerasa beta, que está involucrada en rutas de reparación del ADN. Las polimerasas de ácidos nucleicos varían en su composición. Por ejemplo, la ADN polimerasa beta es una enzima de 20 kDa (aproximadamente 230 amino ácidos), mientras que las polimerasas replicativas usualmente son proteínas de multisubdominios y en muchos casos de polipéptidos y contienen miles de amino ácidos. Por ejemplo, la ADN polimerasa delta, enzima encargada de replicar genomas de organismos eucariontes como el *Homo sapiens*, es una enzima compuesta de cinco proteínas y de un peso de aproximadamente 475 kDa y la ADN polimerasa III de *E. coli* se compone de 10 proteínas y tiene un peso molecular de aproximadamente 791kDa (cerca de 8000 amino ácidos). En estos complejos, la actividad replicativa se encuentra en una subunidad denominada “coraza”, pero las demás subunidades están involucradas en funciones accesorias (Johnson, 2005:283).

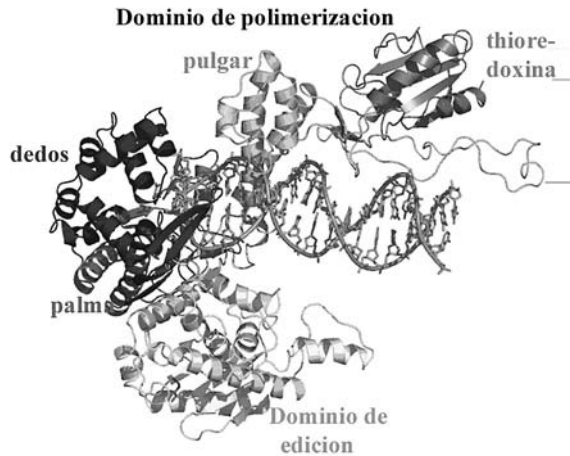
En los últimos 10 años se ha dado una explosión en el descubrimiento de polimerasas de ácidos nucleicos. Actualmente, las polimerasas se dividen en siete familias A, B, C, D, X, Y y Reversa Transcriptasas (RT) (Ohmori, 2001:7). En humanos, se han encontrado a la fecha 14 polimerasas de ácidos nucleicos pertenecientes a cada una de estas familias. A pesar de la divergencia entre las funciones y la complejidad de las ADN polimerasas, la química de la reacción de polimerización se encuentra conservada. Durante el proceso de replicación, el DNA de doble cadena que contiene la cadena templada y la cadena de ADN naciente es translocado al sitio activo de la polimerasa, donde una base del templado es expuesta y el nucleótido complementario se aparea con un ella. La incorporación del nucleótido involucra el ataque nucleofílico por el fosfato alfa del nucleótido que se encuentra en el sitio activo al 3'OH del azúcar del nucleótido final de la cadena naciente. Este ataque nucleofílico es asistido por dos metales que se encuentran coordinados por dos ácidos carboxílicos conservados en todas las polimerasas de ácidos nucleicos.

A pesar de la conservación de la química de la reacción, las polimerasas de ácidos nucleicos también son variables en propiedades bioquímicas, como la fidelidad (entendiendo por fidelidad la capacidad de reconocer un par de bases de tipo Watson-Crick: Adenina-Timidina,

y Guanina-Citocina-). Por ejemplo, la mayoría de las polimerasas replicativas son sumamente fieles. Estas polimerasas comenten, en promedio, solamente un error por cada millón de bases replicadas, mientras que polimerasas como la reversa transcriptasa del VIH-1 comete un error cada 10,000 bases replicadas y polimerasas de la familia Y cometen un error por cada 100 bases replicadas. Otra propiedad bioquímica, conocida como la procesividad (la cantidad de pares de bases replicadas durante un solo evento de unión a la cadena molde), es sujeta a gran variación en diversas ADN polimerasas. Por ejemplo, tanto la DNA polimerasa delta como la DNA polimerasa III se unen a factores procesivos conocidos como el PCNA (“Proliferating Cellular Nuclear Antigen”) o la abrazadera beta. Estos factores procesivos tienen una forma cilíndrica lo cual les permite formar una abrazadera alrededor del ácido nucleico e impedir el desprendimiento de las polimerasas del templado, en marcado contraste con polimerasas como la Reversa Transcriptasa del HIV-1, que replica en promedio ~200 pares de bases por evento o la ADN polimerasa  $\epsilon$  de humano, que replica en promedio ~5 pares de bases antes de desprenderse del templado. A pesar de que la replicación de ácidos nucleicos ha sido ampliamente estudiada desde los años 50, todavía hay muchos vacíos en el entendimiento de su función. Históricamente, diversas polimerasas se han usado como sistemas modelo para estudiar el fenómeno de la replicación. Desde los estudios iniciales de Arthur Kornberger con la DNA polimerasa I y, después, con el Fragmento Klenow de *E. coli*, a la ADN polimerasa beta, la Transcriptasa Reversa del VIH-1 o la ADN polimerasa delta de *Saccharomyces*, por ejemplo.

### **T7 ADN polimerasa como modelo de estudio de la replicación**

Uno de los sistemas clásicos de estudio es la ADN polimerasa del bacteriófago T7, conocida como T7 ADN polimerasa. Esta polimerasa pertenece a la familia A y contiene 704 amino ácidos y, debido a una fuerte interacción con la enzima tioredoxina de *E. coli*, tiene una gran afinidad por el ADN de doble cadena, así la procesividad de esta enzima es comparable a las polimerasas replicativas de organismos más evolucionados. Igual que la mayoría de las ADN polimerasas, T7 ADN polimerasa es una enzima modular y se compone de dos dominios: un dominio con actividad 3'-5' exonucleasa y un dominio con actividad de polimerización de nucleótidos. El dominio de polimerización se compone a su vez de tres subdominios conocidos como palma, pulgar y dedos, por su semejanza a una mano derecha (ilustración 1). T7 ADN polimerasa es una enzima con una fidelidad exquisita, experimentos cinéticos han demostrado que T7 ADN polimerasa se equivoca, en promedio, una vez por cada millón de bases replicadas. Mas aún, si la enzima incorpora una base errónea, la adición del próximo nucleótido se vuelve más lenta, lo cual permite que la cadena que contiene el nucleótido erróneamente incorporado se transporte al sitio de actividad exonucleasa y se lleve a cabo la reacción edición (ilustración 1). Es entonces importante recalcar la presencia de dos actividades enzimáticas que confieren la propiedad global de la fidelidad: la incorporación y la edición.



**Ilustración 1.** T7 ADN polimerasa es una enzima modular. Esta polimerasa se compone de dos dominios: 1) de edición o de exonucleasa (amarillo) y de 2) polimerización. El dominio de polimerización resemblance una mano derecha y se compone de tres subdominios, denominados pulgar (verde), palma (rojo) y dedos (azul). La asociación con tioredoxina (gris) aumenta la procesividad de la polimerasa. La reacción de incorporación de nucleótidos implica la rotación de la alfa hélice O del subdominio de los dedos para formar el sitio activo de la polimerasa.

La incorporación se refiere a la reacción de adición de un nucleótido a la cadena líder utilizando un molde; y la edición es el fenómeno por el cual la DNA polimerasa reconoce que durante la incorporación, se ha cometido una incorporación errónea y se procede a remover esta base y repetir el ciclo de incorporación. La estructura cristalográfica de la T7 ADN polimerasa con dNTP en el sitio activo fue la primera evidencia que la reacción de polimerización de ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante un mecanismo de enlace inducido, en donde una de las alfa hélices del subdominio de los dedos, conocida como alfa hélice O, se mueve  $>60^\circ$  para formar el sitio activo. De esta manera, las polimerasas tienen dos conformaciones: una denominada “abierta”, en la cual el sitio activo se encuentra vacío (sin nucleótido); y una denominada “cerrada”, que corresponde a la forma física de la polimerasa antes de llevar a cabo la reacción de adición de nucleótidos. En la conformación cerrada se forma un sitio activo apretado, en el cual tanto el nucleótido a ser incorporado como el templado, son coordinados por residuos de los dominios de la palma y de los dedos, y se observa la presencia de dos metales que pueden coordinar el ataque en línea del grupo 3'OH por el fosfato alfa del nucleótido a ser incorporado.

Estos estudios cristalográficos concuerdan con estudios cinéticos en donde se postula que el paso limitante de la reacción de la polimerización es un cambio conformacional en la polimerasa y no la química de la reacción. La exquisita fidelidad de las ADN polimerasas parece ser llevada a cabo por un mecanismo de efecto estérico, donde los pares de bases de tipo Watson-Crick, que tienen una geometría similar entre ellos, pueden ser acomodados en un sitio activo relativamente rígido. Estudios utilizando nucleótidos sin capacidad de formar

puentes de hidrógeno, pero con una geometría similar a los pares de bases de Watson-Crick, pueden servir como plantillas y como sustratos de la reacción de polimerización y conservar la propiedad de la fidelidad. Este experimento argumenta la importancia de la forma y no de la capacidad de formar puentes de hidrógeno como determinante de la fidelidad durante la incorporación. Sin embargo, si la polimerasa ha cometido una equivocación durante la incorporación de nucleótidos, el sitio de elongación no es tan rígido en comparación con el sitio de incorporación, ni parece que sufra cambios conformacionales.

¿Cuál es el mecanismo por el cual se reconoce una equivocación? La clave se encuentra en los estudios clásicos de Seeman y Rich, los cuales indican que los pares de bases de tipo Watson-Crick tienen una disposición espacial idéntica de los grupos que pueden ser donadores y aceptores de puentes de hidrógenos en el surco menor del ADN (Seeman: 1976). En las polimerasas de ácidos nucleicos de la familia A, dos aminoácidos conservados en el subdominio de la palma, una Arg y una Gln, están en una posición óptima para contactar los grupos donadores y aceptores del par de bases recién incorporado. Estos aminoácidos se conocen como “sensores del surco menor” (Double, 1998:251).

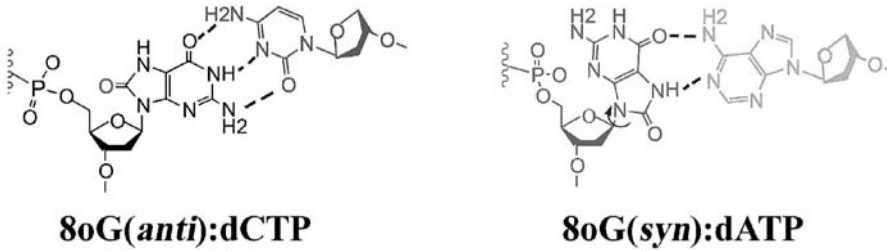
62

Estudios cinéticos postulan que, si se lleva a cabo una incorporación errónea, la disposición espacial de los grupos en el surco menor es distinto y los aminoácidos Arg y Gln no podrían posicionar el grupo 3'OH en una posición óptima para continuar la catálisis. Estudios cristalográficos demuestran que las doce posibles combinaciones erróneas de pares de bases producen cambios sutiles en la posición del grupo 3'OH, lo cual explica que la catálisis de la reacción sea más lenta y pueda efectuarse la transferencia entre los dominios de polimerización y de edición (Johnson, 2004:803). El transporte entre los dos sitios activos de la polimerasa es posiblemente asistido por el subdominio del pulgar. El dominio de edición lleva a cabo la hidrólisis del nucleótido recién incorporado por un mecanismo que también involucra dos metales coordinados por dos carboxilatos. A pesar de que existen mecanismos para evitar las mutaciones, se sabe que la fuerza de la evolución hace que existan cambios en el genoma de los organismos y, a pesar de que se entiende cómo se lleva a cabo una reacción de polimerización fiel, no se entienden los fundamentos por los cuales ocurren las mutaciones.

### **Oxo Guanosina una lesión y agente mutagénico**

El ADN puede ser considerado como el guardián de la información genética. A pesar de su relativa estabilidad, este material puede ser sujeto a reacciones de oxidación, de metilación, o de entrecruzamiento. Uno de los agentes que más dañan a los ácidos nucleicos son las especies reactivas de oxígeno, formadas durante la respiración celular. Las especies reactivas de oxígeno pueden reaccionar con nucleótidos como la guanosina y llevan a cabo su oxidación. Una de las lesiones más estudiadas, es el producto de la oxidación en el grupo 8 de la guanosina, lesión conocida como 8-oxoguanosina (8oG). En marcado contraste con bases que no han sido modificadas y tienen una preferencia por la conformación *anti*, la presencia del oxígeno en la posición 8 de la guanosina hace que la 8-oxoguanosina tenga una preferencia hacia una conformación de tipo *syn*. Así, esta base tiene un potencial de código doble, puede formar una interacción de tipo Watson-Crick con citosina, pero en su conformación de tipo *syn* puede formar una interacción estable de tipo Hoogsteen con dATP

(Ilustración 2). De este modo, cuando las polimerasas de ácidos nucleicos encuentran esta lesión e incorporan dATP en lugar de dCTP, el resultado puede ser un evento mutagénico y, eventualmente, una transversión en el genoma de G→T (Shibutani, 1991:431). La acumulación de la lesión 8oG se ha asociado con enfermedades y fenómenos diversos como la vejez, la muerte celular programada, enfermedades neurodegenerativas, fibrosis quística y cáncer.



**Ilustración 2.** La lesión 8oG tiene un potencial de código doble. a) 8oG puede formar un par de bases de tipo Watson-Crick, 8oG-dCTP, utilizando su conformación anti, en esa conformación los grupos N7 y O8 se localizan en el surco mayor b) 8oG puede formar un par mutagénico apareándose con dATP al utilizar su conformación *syn* (flecha azul). En esta conformación, el grupo N7 se aparea con timina y el grupo O8 se ubica en el surco menor.

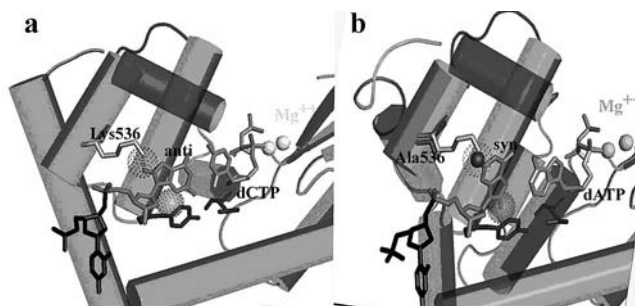
Numerosos experimentos cinéticos han demostrado que las ADN polimerasas de diversas familias tienen diversos grados de preferencia de incorporación fiel (dCTP) o infiel (dATP) cuando replican la lesión 8oG, por ejemplo la T7 DNA polimerasa perteneciente a la familia A es fiel en un 75% de los eventos replicativos, la Reversa Transcriptasa del VIH en un 25%, ADN polimerasa delta de la familia B en un 85%, y la DNA polimerasa eta de *S. cerevisiae*, de la familia Y, en un 90 %. Una explicación razonable de las diferencias observadas en la fidelidad de cada polimerasa puede radicar en diferencias estructurales en el sitio activo de cada una de ellas. Estas polimerasas son también diferentes en el reconocimiento de esta lesión como equivocación: todas las polimerasas estudiadas a la fecha con la excepción de polimerasas de la familia Y, como la ADN polimerasa eta no se detienen una vez que han cometido una incorporación infiel del producto 8oG-dATP. Las polimerasas replicativas distinguen entre una incorporación mutagénica, G-dATP y una incorporación fiel G-dCTP, con un decremento de aproximadamente 100,000 veces en su actividad catalítica y la elongación de un par de bases errónea es 20,000 mas ineficaz que la elongación de un par de bases de tipo Watson-Crick. En cambio, la incorporación mutagénica 8oG-dATP y la incorporación fiel 8oG-dCTP tiene un decremento de solamente tres veces en su actividad catalítica y muchas polimerasas prefieren elongar una equivocación 8oG-dATP, en lugar de un par fiel 8oG-dCTP.

Con el objeto de entender como se lleva a cabo la incorporación fiel e infiel teniendo como templado la lesión 8oG, se han llevado numerosos estudios cristalográficos con esta lesión. Uno de los más detallados es el estudio utilizando como modelo a la enzima T7 ADN polimerasa.



### Inserción fiel o infiel teniendo como templado la 8oG

Numerosos estudios estructurales han establecido que el tamaño y la forma del sitio activo son cruciales en la fidelidad. El doble potencial de código de la lesión 8oG la hace un candidato ideal para elucidar el fenómeno de la infidelidad. Estudios cristalográficos usando como modelo la 7 ADN polimerasa revelan que la estructura del complejo 8oG-dCTP, en comparación del complejo G-dCTP, es casi idéntica. La única diferencia es el movimiento del amino ácido Lys536 de la alfa hélice O1 del subdominio de los dedos para formar un puente de hidrogeno con el grupo O8 del 8oG (ilustración 3a) (Breiba, 2004:3452). Estos resultados son similares a la estructura del complejo de 8oG-dCTP utilizando la ADN polimerasa del bacteriófago RB69, en el cual el complejo 8oG-dCTP es idéntico, dentro de los límites experimentales, al complejo G.dCTP.



64

**Ilustración 3.** Bases estructurales de la incorporación fiel e infiel. a) Estructura cristalográfica del complejo 8oG-dCTP en el sitio activo de la T7 ADN polimerasa. El par 8oG-dCTP es estabilizado por los puentes de hidrógeno entre el residuo Lys536 y el grupo O8 del templado 8oG. b) Estructura cristalográfica del complejo 8oG-dATP en el sitio activo de la T7 ADN polimerasa. La remoción del grupo epsilon amino de Lys536 en la mutante Ala536 evita un choque estérico entre el par 8oG-dATP. El residuo Lys536, observado en el complejo 8oG-dCTP, se observa de color gris. En ambas estructuras se observa la posición de los dos Mg++ que coordinan la química de la reacción.

En esta polimerasa, el grupo O8 del templado 8oG se mueve hacia un sitio activo sin impedimentos estéricos (Freisinger, 2004:1494). La situación del par 8oG-dCTP contrasta en la ADN polimerasa beta, en la que se observa que el fosfato alfa del templado 8oG sufre una rotación de 180° con respecto a templados canónicos. El sitio activo de la ADN polimerasa beta es diferente en la posición de la cadena templada 5', y esta rotación del fosfato alfa es necesaria para impedir un choque entre los grupos PO4 y el O8 del 8oG. La razón por la cual el fosfato alfa del templado es rotado en la ADN polimerasa beta es por que al base siguiente del templado tiene un doblez que no es tan pronunciado como en el caso de la T7 ADN polimerasa o la polimerasa RB69. Estos estudios indican que la única razón para la baja eficiencia catalítica de la incorporación de 8oG debe de ser que esta base existe en un equilibrio entre las dos conformaciones *anti* y *syn*. Estudios cinéticos indican que, en el caso de la T7 ADN polimerasa, la incorporación fiel tiene un paso limitante que se asocia con el cambio conformacional de la alfa hélice O. Es, entonces, congruente pensar que la incorporación de dCTP teniendo como substrato la lesión 8oG se lleva a cabo por un mismo

mecanismo cinético, similar al de una base normal. La rotación del fosfato alfa en el caso de la ADN polimerasa beta puede ocasionar una pérdida en la eficiencia catalítica y hacer que esta polimerasa sufra una pausa antes de la incorporación de nucleótidos cuando encuentra la lesión.

Entender el fenómeno de la incorporación de un evento mutagénico 8oG-dATP ha sido mucho más complicado. Durante el intento de cristalizar a la enzima T7 ADN polimerasa, teniendo como sustrato un par 8oG-dATP, se obtuvo un cristal en que el subdominio de los dedos se encontraba en una conformación abierta y no contenía nucleótido en el sitio activo (Breiba, 2004:3452). Esta conformación “abierta” de la enzima corresponde a un estado no catalítico de la polimerasa. Similares resultados se obtuvieron al resolver las estructuras cristalográficas utilizando las polimerasas RB69 (Freisinger, 2004:1494) y beta (Krahn 2003:121), aunque en el caso de la ADN polimerasa beta se observa una densidad electrónica muy débil en el sitio activo de la polimerasa que puede corresponder a dATP. Estudios cinéticos indican que, en el caso de la T7 ADN polimerasa, el paso limitante de la incorporación de dATP teniendo como templado 8oG es la química de la reacción y no un cambio conformacional en la polimerasa (Einolf, 1998:13300), indicando que la incorporación infiel podría ser llevada por un mecanismo diferente al de la incorporación fiel (por ejemplo que no necesite el cambio conformacional).

Dentro de la misma familia A de las ADN polimerasas, existen polimerasas que tienen rangos de inserción muy variados al tener como templado 8oG. Por ejemplo, la T7 DNA polimerasa incorpora aproximadamente ~30% de dATP (Breiba, 2004:3452, Freisinger, 2004:1494) y la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* ~90% (Hsu, 2004:217). En el caso de la T7 ADN polimerasa, un modelaje inicial propone que el residuo Lys536 podría hacer interacciones electrostáticas y estéricas con un par de bases 8oG-dATP. Un dato interesante es que el residuo correspondiente a la Lys536 en la ADN polimerasa de *Bacillus* es una glicina. De este modo, se propuso realizar una mutante en la que el grupo epsilon amino de la Lys se eliminara y observar las propiedades cinéticas de incorporación de dATP con esta mutante. La mutante Lys536Ala incorpora preferentemente dATP en lugar de dCTP cuando tiene 8oG como templado y esta mutación no altera la fidelidad global de la polimerasa con otros sustrato (Breiba, 2005:1653). Sorprendentemente, al cristalizar esta mutante con un templado 8oG y dATP, se obtuvo un complejo cerrado en el cual se observa clara densidad electrónica para el nucleótido dATP y el templado 8oG, siendo éste el primer ejemplo de una incorporación mutagénica observado en una polimerasa de ácidos nucleicos.

En este complejo, se observa al templado 8oG en una conformación de tipo *syn* y claramente apareado con el dATP. Kool y colaboradores han propuesto que el sitio activo de las ADN polimerasas es “rígido” y tiene cabida para la geometría de un par de bases de tipo Watson-Crick. La estructura del par 8oG(*syn*) dATP en el sitio activo de la T7 ADN polimerasa revela que el sitio activo de las ADN polimerasas puede ser modificado (ilustración 3b) (Guo, 2005:256). Este ejemplo de ingeniería de proteínas concuerda con los datos de que polimerasas típicamente fieles como RB69, ADN polimerasa beta, o ADN polimerasa delta, prefieren incorporar dCTP y polimerasas infieles como la reversa transcriptasa del VIH-1 prefieren incorporar dATP y hay una relación entre lo relajado del sitio activo y la fidelidad. Así, polimerasas con un sitio activo más relajado son más propensas a ser mutagénicas. Sin



embargo, las polimerasas infieles pero especializadas en negociar lesiones, como la DNA polimerasa  $\epsilon$ , tienen el sitio activo más relajado en comparación de todas las polimerasas, pero prefieren incorporar dCTP con una fidelidad exquisita cuando encuentran la lesión 8oG.

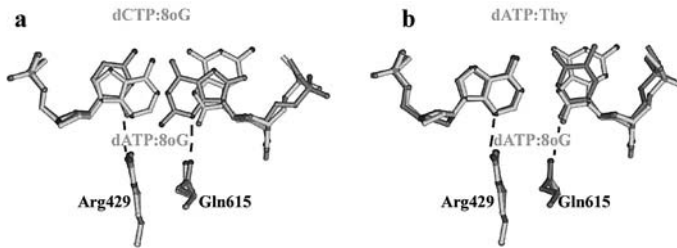
66

En este caso se ha cristalizado a la ADN polimerasa IV (Dpo4) con un par 8oG-dCTP y se observa que dos residuos de la Dpo4 (Arg331 y Arg332) forman una red de puentes de hidrógeno con el templado 8oG en la conformación *anti* que hace que esta conformación sea favorecida en el sitio activo de la polimerasa (Rechkoblit, 2006 y Zang, 2006:2358). Los amino ácidos Arg331 y Arg332 se encuentran en un subdominio conocido como “dedos pequeños”, que no está presente en todas las polimerasas de la familia-Y. así es posible que modificaciones en este subdominio cambie el equilibrio de las forma *anti* o *syn* del templado 8oG y diversas polimerasas de la familia Y sean diversas en su incorporación fiel o infiel al replicar la lesión 8oG. Mutaciones en el subdominio de los dedos han previsto que afecten el equilibrio de la forma abierta o cerrada de las polimerasas (Huang, 2000:11571). Así, una polimerasa que disponga de una barrera energética menor para cambiar de la forma abierta a la cerrada, será en principio más mutagénica. En el caso de la T7 DNA polimerasa, esta barrera energética está dada por el residuo Lys536 y al eliminar la cadena lateral se disminuye la barrera energética y, por lo tanto, la catálisis se puede llevar a cabo de forma eficiente.

### Extensión fiel e infiel

Una vez que las polimerasas incorporan una mutación, en la mayoría de los casos esta incorporación errónea es editada por el dominio exonucleasa. Estudios estructurales revelan que el grupo 3'OH que va a ser extendido es posicionado erróneamente, lo cual disminuye la capacidad del el ataque nucleofílico del fosfato alfa para continuar la catálisis (Johnson, 2004:803). Este posicionamiento erróneo del grupo 3OH hace que pueda trasladarse hacia el dominio de exonucleasa donde la base es editada y, posteriormente, devuelta al dominio de polimerización. En las ADN polimerasas de la familia A, se observa que la extensión de un incorporación infiel es más favorecida (8oG-dATP) que la de una extensión fiel (8oG-dCTP).

La estructura cristalográfica de los complejos de elongación fiel e infiel, revela que los grupos aceptores y donadores de los pares de bases 8oG-dCTP y 8oG-dATP son contactados por residuos Arg429 y Gln615 del “sensor del surco menor” sin sufrir ninguna distorsión (Breiba, 2004:3452) (Ilustración 4a). Estructuras cristalográficas de la T7ADN polimerasa (Breiba, 2004:3452) y de Bacillus ADN polimerasa (Hsu, 2004:217) revelan que el par 8oG-dATP es similar al par canónico Thy-dATP, en el sentido que el grupo O8 del 8oG(*syn*) ocupa la misma posición que el O2 de la Thy. El sitio de elongación no es tan ajustado como el sitio de inserción y permite que la base 8oG(*syn*) se acomode libremente sin ningún impedimento estérico. A pesar del mayor tamaño del par 8oG. dATP de bases con respecto al Thy-dATP, el evento mutagénico no es reconocido porque el sitio de elongación no es “apretado” como el sitio de inserción y la base 8oG(*syn*) no ejerce ninguna interacción negativa con la polimerasa.



**Ilustración 4.** Bases estructurales de la elongación a partir de la lesión 8oG. A) Superposición entre el complejo 8oG-dCTP (naranja) y el complejo 8oG-dATP (azul). Estos dos complejos, una vez insertados en el sitio de elongación, son reconocidos por los residuos Gln615 y Arg429. B) Superposición entre el complejo 8oG-dATP (azul) y el par canónico Thy-dATP (gris). La posición del grupo O8 es idéntica al grupo O2 de la Timina. Esta disposición espacial engaña al sistema de edición de las polimerasas de ácidos nucleicos.

La pérdida de eficiencia catalítica del par 8oG-dCTP puede ser debida a que el fosfato alfa rota aproximadamente 180° para evitar una colisión con el grupo O8 que afectaría la posición del grupo 3'OH del dCTP. Así, el evento mutagénico 8oG dATP engaña a los “sensores del surco menor” de las polimerasas de la familia A al mimetizar la disposición de aceptores-donadores de puentes de hidrogeno de un par Thy·dATP (ilustración 4b).

## Conclusiones

La lesión 8oG ha sido utilizada para entender cómo se llevan a cabo los eventos mutagénicos en las polimerasas de alta fidelidad. Este trabajo demuestra que la incorporación de un evento mutagénico 8oG. dATP se da por un mecanismo que es similar al de una incorporación fiel y se comprueba que el evento mutagénico 8oG. dATP puede engañar al sistema de edición de una polimerasa replicativa al mimetizar un par normal Thy dATP. La lesión 8oG se encuentra principalmente en mitocondria y se estima que una de las posibles causas el envejecimiento es la acumulación de mutaciones originadas por polimerasas mitocondriales, al tener como sustrato 8oG en lugar de Guanosina. Es interesante comprobar que diversas DNA polimerasa gamma tienen amino ácidos como His o Phe, en el lugar correspondiente a Lys635 de la T7 ADN polimerasa. Estudios cinéticos han demostrado que las polimerasas mitocondriales tienen una preferencia por ser fieles (incorporación de dCTP) cuando encuentran la lesión 8oG, pero incorporan dATP en un 20% de los eventos replicativos. Entender fenómenos básicos como la fidelidad, está implicado en eventualmente diseñar herramientas de terapia génica, dado que se conoce que mutaciones de la DNA polimerasa gamma de humano son causales de enfermedades hereditarias.

## Agradecimientos

LGB agradece el apoyo de la beca Fulbright-CONACYT durante su etapa doctoral; al “Pew Latinamerican Program”, por la beca posdoctoral y los fondos iniciales como investigador independiente en México; y a los Doctores Rui Sousa y Tom Ellenberger por sus invaluable enseñanzas

## Referencias bibliográficas

- BRIEBA, L. G., *et al.*, (2004) "Structural basis for the dual coding potential of 8oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase". *Embo J*, 23 (17): pág 3452.
- BRIEBA, L. G., *et al.*, (2005). "A lysine residue in the fingers subdomain of T7 DNA polymerase modulates the miscoding potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine". *Structure* (Camb), 13(11): pág 1653-9.
- DOUBLIE, S., *et al.*, (1998). "Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution". *Nature*, 391(6664): pág. 251-8.
- EINOLF, H. J., *et al.* (1998). "Steady-state and pre steady-state kinetic analysis of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine triphosphate incorporation and extension by replicative and repair DNA polymerases". *Biochemistry*, 37(38): pág 13300-12.
- FREISINGER, E., *et al.*, (2004) "Lesion (in)tolerance reveals insights into DNA replication fidelity" *Embo J*, 23 (7): pág 1494-505.
- GUO, Q. *et al.*, (2005). "Major conformational changes during T7RNAP transcription initiation coincide with, and are required for, promoter release". *J Mol Biol*, 353(2): pág 256-70.
- HSU, G. W., *et al.*, (2004). "Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a highfidelity DNA polymerase". *Nature*, 431(7005): pág 217-21.
- HUANG, J. *et al.*, (2000). "Misincorporation by wild-type and mutant T7 RNA polymerases: identification of interactions that reduce misincorporation rates by stabilizing the catalytically incompetent open conformation". *Biochemistry*, 39(38): pág 11571-80.
- JOHNSON, A. O'DONNELL, M., (2005). "Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork". *Annu Rev Biochem*, 74: pág 283-315.
- JOHNSON, S. J. y BEESE, L. S., (2004). "Structures of mismatch replication errors observed in a DNA polymerase". *Cell*, 2004. 116(6): pág 803-16.
- KRAHN, J. M., *et al.*, (2003). "Structure of DNA polymerase beta with the mutagenic DNA lesion 8-oxodeoxyguanine reveals structural insights into its coding potential". *Structure*, 2003. 11(1): pág 121-7.
- LEHMAN, I. R. *et al.*, (1958). "Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid, I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from Escherichia coli". *J Biol Chem.*, 233(1): pág. 163-70.
- OHMORI, H. *et al.*, (2001). "The Y-family of DNA polymerases". *Mol Cell*, 8 (1): pág 7
- RECHKOBLIT, O. *et al.*, (2006). "Stepwise translocation of Dpo4 polymerase during error-free bypass of an oxoG lesion". *PLoS Biol*, 4(1): pág11.
- SEEMAN, N. C. *et al.*, (1976). "Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73 (3): pág 804-8.
- SHIBUTANI, S. *et al.*, (1991). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG". *Nature*, 349 (6308): p. 431-4.
- WATSON, J. D. y CRICK, F. H., (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid". *Nature*, 171 (4356): pág 737-8.
- ZANG, H., *et al.*, (2006). "Efficient and high fidelity incorporation of dCTP opposite 7,8-dihydro-8-oxodeoxyguanosine by Sulfolobus solfataricus DNA polymerase Dpo4". *J Biol Chem*, 281(4): pág 2358-72.