

SEBBM DIVULGACIÓN

ACÉRCATE A NUESTROS CIENTÍFICOS



Procesamiento de sitios abásicos en el DNA

DOI: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2017.11.1

Miguel de Vega

Grupo de investigación "Reparación del DNA bacteriano" en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM)

Biografía *Resumen*

Miguel de Vega (Madrid, 1971) es Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid (1998, premio extraordinario de la UAM y premio Juan Abelló Pascual I de la Real Academia de Doctores). Desde el año 2009 es Científico Titular del CSIC y dirige el grupo de investigación "Reparación del DNA bacteriano" en el Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM). Su línea de investigación se centra en el estudio bioquímico de la enzimología de la reparación y replicación del DNA. Ha dirigido siete Tesis Doctorales, es coautor de cuarenta y siete publicaciones internacionales, así como de tres patentes, una de las cuales recibió el IX Premio Madrid a la mejor patente de la Comunidad de Madrid (2013).

El DNA está continuamente expuesto a agentes genotóxicos causantes de múltiples lesiones en esta molécula. De entre ellas, una de las más frecuentes y deletéreas es la generación de sitios abásicos que puede conducir a la generación de roturas de doble cadena del DNA, así como al bloqueo de procesos esenciales como la replicación y la transcripción.

Summary

DNA is constantly exposed to genotoxic agents that cause multiple damages in this molecule. Abasic sites are one of the most frequent and deleterious type of lesions that can lead to double strand breaks, as well as to the blockage of essential processes as replication and transcription.

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA: http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/acercate-a-nuestros-cientificos_107

De entre los múltiples tipos de lesiones que pueden surgir en el DNA, una de las más frecuentes es la generación de sitios abásicos (AP), que en el caso de células de mamíferos aparecen con una frecuencia de entre 10.000 y 50.000 por célula y día. Los sitios AP pueden originarse por la depurinización espontánea de los nucleótidos, o tras la acción de glicosilasas que hidrolizan el enlace glicosídico para eliminar tanto bases nitrogenadas dañadas como el uracilo resultante de la desaminación de las citosinas. La proximidad de sitios AP en las dos cadenas del DNA pueden dar lugar a roturas de doble cadena (DSBs, del inglés *Double Strand Breaks*) que son las lesiones más peligrosas que puede sufrir el DNA ya que pueden provocar reordenaciones cromosómicas o la muerte celular (Hoeijmakers, 2001), siendo pues su reparación crucial para el mantenimiento de la integridad del genoma.

Las DSBs generadas ya bien sea por proximidad de sitios abásicos, como por otros agentes genotóxicos, como la radiación ionizante, pueden ser reparadas básicamente por dos mecanismos: la recombinación homóloga (HR, del inglés *Homologous Recombination*), y la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non homologous End Joining*). En la HR la información de una copia intacta del DNA "roto" se emplea como molde para la síntesis de DNA en el sitio de la rotura, de manera que la lesión se repara de manera fiel, de ahí que sea la ruta de reparación principal en bacterias en proliferación, así como durante las fases S y G2 de células eucariotas (Krejci *et al.*, 2003). Por el contrario, debido a que en la NHEJ la unión de los extremos es directa, no se requiere la presencia de una copia adicional de DNA que actúe como molde, siendo una ruta activa a lo largo del ciclo celular eucariota, así como en muchas bacterias que pasan parte de su ciclo vital en estado estacionario en el que solo hay una copia del DNA. Durante la NHEJ, los extremos de la rotura son usualmente procesados por actividades nucleolíticas y/o de polimerización antes del paso final de ligación. Esto hace que el resultado final de la reparación sea una molécula de DNA en la que se han insertado/delecionado uno o varios nucleótidos en el sitio donde se produjo la rotura, por lo que esta ruta de reparación es frecuentemente infiel o mutagénica (Pitcher *et al.*, 2007).

SEBBM
SEBBM

Sociedad Española
de Bioquímica y
Biología Molecular

En nuestro grupo estamos interesados en estudiar las características bioquímicas de los componentes del sistema NHEJ bacteriano. Se trata de un sistema mínimo constituido por dos proteínas: un homodímero de la proteína Ku y una proteína multicatalítica denominada Ligasa D (LigD). El homodímero Ku tiene forma de anillo y reconoce la rotura, enhebrando los extremos a través de su canal central (ver Figura 1A). Posteriormente recluta a LigD, que en muchos casos contiene una actividad nucleasa, polimerasa y ligasa, que se encargan del procesamiento de los extremos, el relleno de los huecos (*gaps*) que surgen cuando se produce la sinapsis entre los dos extremos de la rotura, y de la ligación final de las cadenas, respectivamente (Pitcher *et al.*, 2007). Nuestros últimos resultados han demostrado que si se encuentran sitios AP próximos a extremos 5' protuberantes de la DSBs, son reconocidos y procesados por Ku gracias a una nueva actividad catalítica denominada AP-liasa que rompe el enlace fosfodiéster 3' del sitio AP, dando lugar a una pequeña deleción (de Ory *et al.*, 2014). Posteriormente, la LigD es reclutada a la rotura, lleva a cabo el relleno del *gap* por su actividad polimerasa y finalmente liga el grupo 3'-OH de uno de los extremos de la rotura con el 5'-P, generado tras la actividad AP-liasa de Ku, del otro extremo (ver Figura 1A).

Por otra parte, la presencia de sitios AP en solo una de las cadenas de DNA también puede tener consecuencias mutagénicas y citotóxicas ya que son sitios "no informativos" que las DNA polimerasas replicativas y las RNA polimerasas no son capaces de utilizar como molde durante la incorporación de nucleótidos, pudiendo dar lugar a un bloqueo de procesos esenciales como la replicación y la transcripción. En este caso, la reparación de los sitios AP es llevada a cabo mediante la ruta de reparación por escisión de bases (BER), la más frecuentemente utilizada *in vivo* y en la que los enzimas que participan están conservados en procariontas y eucariotas (Almeida y Sobol, 2007). El sitio AP es reconocido por una AP-endonucleasa que hidroliza el enlace fosfodiéster 5' del sitio AP, generando un extremo 5'-deoxiribosa fosfato (dRP) que ha de ser eliminado por una 5'-dRP liasa para generar un extremo 5'-P. El

pequeño *gap* resultante es posteriormente relleno por una DNA polimerasa que restaura el nucleótido original. Finalmente, los extremos 3' y 5' son sellados por una DNA ligasa. Hasta ahora, estas actividades parecían residir en proteínas independientes. Sin embargo, recientemente hemos mostrado cómo la proteína LigD, además de las actividades polimerasa y ligasa ya comentadas anteriormente presenta una actividad 5'-dRP liasa, encargada de sanear los extremos 5'-dRP que surgen durante la reparación de sitios abásicos tras la actuación de la AP endonucleasa (de Ory *et al.*, 2016). Hemos demostrado cómo la LigD es capaz por sí sola de reconocer el *nick* generado por una AP endonucleasa, rellenar el hueco resultante restaurando el nucleótido original, eliminar el extremo 5'-dRP y finalmente sellar las dos cadenas de DNA (ver esquema en Figura 1B). Esta actividad parece ser general de las proteínas LigD ya que tanto la LigD de *Bacillus subtilis* como la de *Pseudomonas aeruginosa* la poseen. Además, hemos demostrado *in vivo* la importancia de dicha actividad, ya que esporas de *B. subtilis* carentes de LigD y sometidas a daño oxidativo (que es fundamentalmente reparado por la vía BER) presentan una caída drástica de la viabilidad celular. Estos resultados expanden la intervención de esta proteína en diferentes vías de reparación, haciendo que sea una potencial diana terapéutica para la generación de inhibidores de dicha proteína que podrían conducir a la muerte bacteriana.

Referencias:

- Almeida, K.H., and Sobol, R.W. (2007). *DNA repair* 6, 695-711.
- de Ory, A., Nagler, K., Carrasco, B., Raguse, M., Zafra, O., Moeller, R., and de Vega, M. (2016). *Nucleic Acids Res.*44, 1833-1844.
- de Ory, A., Zafra, O., and de Vega, M. (2014). *Nucleic Acids Res.*42, 13082-13095.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). *Nature* 411, 366-374.
- Krejci, L., Chen, L., Van Komen, S., Sung, P., and Tomkinson, A. (2003). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 74, 159-201.
- Pitcher, R.S., Brissett, N.C., and Doherty, A.J. (2007). *Annu. Rev. Microbiol.*61, 259-282.

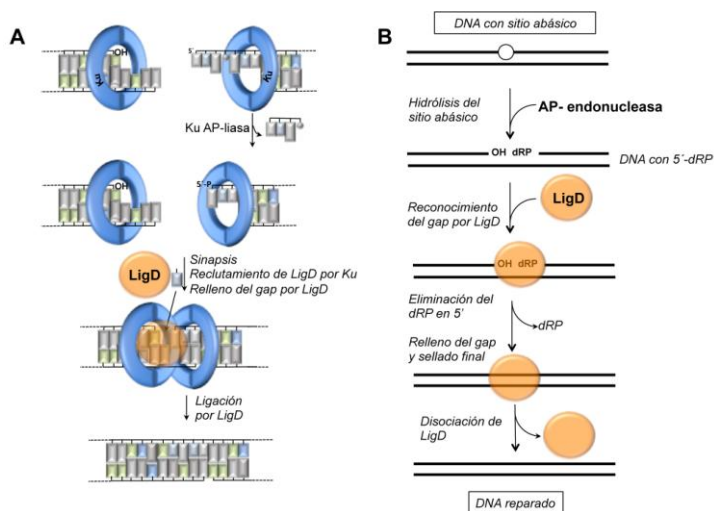


Figura: (A) Reparación de roturas del DNA por el sistema NHEJ bacteriano. (B) Esquema de la reparación de sitios AP por la LigD bacteriana.