

ADN Polimerasas Bacterianas Bacterial DNA polymerases

Fecha de recepción: May 08, 2018, Fecha de aceptación: May 11, 2018, Fecha de publicación: May 18, 2018

ADN Polimerasas Bacterianas

Desde el uso de la especie bacteriana *E.coli* se han realizado avances importantes en el estudio de los mecanismos de replicación del ADN en bacterias y en otras clases de organismos, incluyendo el ser humano. Hoy se sabe que bacterias como *E.coli* utiliza cinco clases diferentes polimerasas conocidas como Pol I, II, III, IV y V, siendo la clase III la encargada de mediar el proceso de replicación del ADN cromosómico principalmente. Mientras, que la Pol I, corta el cebador de ARN y rellena los espacios en las hebras [1].

Aspectos Estructurales y Funcionales de las Enzimas ADN Polimerasas

DNA pol I

La ADN pol I, posee tres actividades enzimáticas: una actividad de ADN polimerasa 5'→3', una actividad de exonucleasa 3'→5' que media la corrección de pruebas, y una actividad de nucleasa 5'→3' usada para la traducción de mellas durante la reparación del ADN. La eliminación de los dominios de exonucleasa 5'→3' de las polimerasas de Pol I completas de *E.coli* y *Thermus aquaticus* produce los dominios de fragmentos grandes de Klenow y Klenoq [1,2]. Los análisis estructurales obtenidos con cristalografía de rayos X indican que tanto Klenow como Klenoq poseen homología estructural. Los dominios de la polimerasa de estas proteínas comparten una característica arquitectónica común que se asemeja a una mano derecha semiabierta con subdominios de dedos, pulgar y palma [3]. El subdominio del pulgar se une a la región dúplex del ADN, mientras que el subdominio del dedo se une al dNTP entrante. El subdominio de la palma, que consiste en los residuos del sitio activo conservado, orienta la cadena de cebador para la formación del enlace fosfodiéster. Varios estudios bioquímicos, cristalográficos y espectroscópicos han examinado las interacciones del ADN con el dominio de edición de Klenow. La estructura de cristalizada de Klenow en modo de edición muestra los últimos cuatro nucleótidos del cebador anillados al ADN dúplex, y unidos al dominio de edición [3,4].

DNA pol III

La ADN polimerasa III consiste en una máquina proteica tripartita responsable para la replicación bacteriana. Se le ha descrito la

Hugo Corrales-Santander¹,
Andrea Ardila-Saenz²,
Marlon Múnera-Gómez³,
Andrés Sánchez-Caraballo³,
Dilia Aparicio-Marengo⁴,
Yiser Martínez-Hernández⁵,
Huber Padilla-Zambrano⁶ and
Luis Moscote-Salazar⁶

- 1 Médico, Candidato a Magíster en Toxicología, Profesor Facultad de Medicina – Universidad de Cartagena, Grupo GINUMED - Profesor Programa de Medicina, Corporación Universitaria Rafael Núñez, Colombia
- 2 Escuela de Medicina, Universidad del Sinú Seccional Cartagena, Colombia
- 3 Biólogo, Magister en Inmunología – Grupo GINUMED - Profesor Programa de Medicina, Corporación Universitaria Rafael Núñez, Colombia
- 4 Microbióloga, Magister en Microbiología - Grupo GINUMED - Profesor Programa de Medicina, Corporación Universitaria Rafael Núñez, Colombia
- 5 Estudiante miembro Grupo GINUMED - Programa de Medicina, Corporación Universitaria Rafael Núñez, Colombia
- 6 Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB). Facultad de Medicina – Universidad de Cartagena, Cartagena Colombia

*Correspondencia:

Huber Padilla-Zambrano

✉ huber_padilla20@hotmail.com

presencia de una replicasa ($\alpha, \epsilon, \gamma, \theta$) La polimerasa contiene factores de procesividad llamados clamp o pinzas y un cargador complejo clamp. Estos factores funcionan como abrazaderas que se unen a proteínas involucradas en la replicación del ADN [5]. Hasta la fecha se han identificado cinco clases conocidos como: $\gamma, \delta, \delta', \zeta, \chi, \psi$ [6]. Estructuralmente estas abrazaderas adoptan formas de anillos para unirse a sus blancos, actualmente, se han resuelto las estructuras 3D de diferentes factores presentes en ADN polimerasas de bacterias como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp y *Mycobacterium tuberculosis* [5].

En la pol III existe una región conocida como subunidad alfa, la cual participa directamente en la síntesis de ADN. La subunidad alfa puede darse en dos formas distintas entre sí, denominadas como *dnaE* y *PolC* [7]. Los análisis de genomas completos bacterianos, han identificado la presencia de una o más subunidades alfa. Por su lado, los análisis estructurales sugieren que las subunidades alfa pueden clasificarse en cuatro tipos: *PolC*, *dnaE1*, *dnaE2*, y *dnaE3* [6]. En organismos como *Bacillus subtilis*, la subunidad *PolC* se encarga de guiar la polimerización de la cadena líder, mientras que, la subunidad *dnaE* polimeriza la cadena rezagada. Los análisis filogenéticos indican que la *PolC* es característica del phylum Firmicutes. Sin embargo, no todas las bacterias utilizan las dos subunidades en sus mecanismos de replicación. Los análisis bioinformáticos han encontrado que la *PolC* contiene dominios de exonucleasas, los cuales están presentes en la misma posición de todos los genes de bacterias donde *PolC* está presente. Además, se han identificado dominios de fosfatasa de tipo PHP, presentes en las demás subunidades que conforman a la AND pol III [6]. Otros tipos de dominios descritos en las subunidades de la Pol III son: dominios de unión a ADN de clase OB. Finalmente, los dominios de tipo reductasa deshidrogenasa/reductasa GMP [8].

En la especie *E. coli*, solo se encuentra presente la subunidad *dnaE1* [9]. La *Dna1* coexiste en un 89% con la *PolC* en los organismos [6]. Esta subunidad es parte esencial de las estructuras de las polimerasas IV y V de organismos como la *E. coli*. Estas polimerasas son inducidas como parte de los mecanismos de respuesta a situación de auxilio en esta clase de bacterias [8]. Sin embargo, para *E. coli*, no es esencial la actividad de la subunidad *dnaE*.

Se sugiere que la existencia de homólogos en diferentes organismos fue producto de la transferencia horizontal de genes. Se ha descrito hasta una subunidad denominada como *dna3*, la cual ha evolucionado en la capacidad de corrección de errores [8]. Los tres elementos (*PolC*, *dna1* y *dna3* convergen en muchos organismos. Esta coexistencia entre *PolC* y *dnaE3/dnaE1* sugiere que *polC* puede formar heterodímeros con *dnaE1* y *dnaE3*, pero prefiere *dnaE3* en la mayoría de los casos. Además de la bacteria en Firmicutes, tres bacterias en otros phylum también poseen *PolC*: *Fusobacterium nucleatum* en Fusobacteria y *Thermotoga maritima* en Thermotogae poseen *PolC* y *dnaE1* [6].

Los estudios de caracterización de la subunidad *dnaE* han mostrado que es altamente sensible a producir errores. La *dnaE* puede evitar las lesiones de codificación y no codificación con una alta eficiencia. La propensión a errores se logra por cualquiera de las dos vías siguientes, sea por la desalineación de la unión plantilla-cebador o extensión de cebador directo. La derivación de sitios abásicos se logra principalmente a través de los "dNTP-

estabilizado" [8], lo que logra la desalineación de la plantilla, generando deleciones en la cadena recién sintetizada. Este mecanismo puede ser similar al mecanismo de desalineación estabilizado con dNTP usado por la familia Y de ADN polimerasas y es el primer ejemplo de derivación de lesión y síntesis propensa a error catalizada por una polimerasa de la familia C [8].

Por lo tanto, *dnaE* puede funcionar en una capacidad propensa a errores que puede ser esencial en las células Gram-positivas, pero no en las Gram-negativas, lo que sugiere una diferencia fundamental en el metabolismo del ADN entre estas dos clases de bacterias. Se sabe que la fidelidad de replicación de una polimerasa depende del tamaño y orientación de los sitios activos. Generalmente, las polimerasas con sitios activos pequeños y ajustados acomodan solamente bases apareadas, lo cual, le brinda una alta capacidad de fidelidad en la síntesis o polimerización de las cadenas de AND [9].

Por su parte las polimerasas con un sitio activo mayor en área, acomoda lesiones de ADN. Esto induce en la polimerasa que ignore las rupturas de las cadenas, lo cual, deriva en que no corrijan los errores que se estén presentando.

También se ha descrito recientemente, que la fidelidad de la subunidad *dnaE* en la polimerización está influenciada por su interacción con el replisoma. Esto se da por su capacidad de modulación [10]. Lo anterior se ha descrito en especies bacterianas como *Bacillus subtilis*. Se sabe que *DnaE* es esencial para la elongación e iniciación del ADN, que las concentraciones de *PolC* influyen inversamente en la fidelidad de *dnaE*.

Además, de *PolC*, los elementos *dnaN* y SSB inducen la activación de *dnaE*. En este escenario tenemos que *dnaN* y SSB al inducir a *dnaE*, se genera el reclutamiento de *PolC* en las hebras que ya están cebadas para formar un complejo ternario. De esta manera se inicia el replisoma que, en conjunto con las helicasas, DNasas y las agarraderas "clamps" continúan la replicación de toda la hebra de AND [11]. Luego, si persiste algún daño en el ADN se da la activación de la Pol II. Este mecanismo se activa casi de manera inmediata cuando se emiten señales de daño del ADN. Si esto no es suficiente, se activan los mecanismos de reparación basados en la Pol V. Los cuales, se generan a los 35 minutos aproximadamente [12].

Los análisis muestran que las subunidades *dnaE* diez clases distintas de motivos. Nueve de ellos se conservan entre las subunidades alfa del ADN pol III de las bacterias descritas hasta la fecha. Algunos se presentan entre los dominios fosfoesterasas PHP. Al analizar los genes que codifican para las distintas subunidades se encuentra que existe variación en la ubicación de las secuencias que codifican para cada uno de los diez motivos presentes en *dnaE* [12].

Referencias

1 Brissett NC, Martin MJ, Bartlett EJ, Bianchi J, Blanco L, et al. (2013) Molecular basis for DNA double-strand break annealing and primer extension by an NHEJ DNA polymerase. *Cell Reports* 5: 1108-1120.

2 Wowor AJ, Datta K, Brown HS, Thompson GS, Ray S, et al. (2010) Thermodynamics of the DNA structural selectivity of the Pol I DNA polymerases from *Escherichia coli* and *Thermus aquaticus*. *Biophys J* 98: 3015-3024.

3 Li Y, Korolev S, Waksman G (1998) Crystal structures of open and

- closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: Structural basis for nucleotide incorporation. *EMBO J* 17: 7514-7525.
- 4 Freemont PS, Friedman JM, Beese LS, Sanderson MR, Steitz TA (1988) Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85: 8924-8928.
 - 5 Wolff P, Amal I, Oliéric V, Chaloin O, Gygli G, et al. (2014) Differential modes of peptide binding onto replicative sliding clamps from various bacterial origins. *J Med Chem* 57: 7565-7576.
 - 6 Zhao XQ, Hu JF, Yu J (2006) Comparative analysis of eubacterial DNA Polymerase III Alpha subunits. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 4: 203-211.
 - 7 Seco EM, Ayora S (2017) *Bacillus subtilis* DNA polymerases, PolC and DnaE, are required for both leading and lagging strand synthesis in SPP1 origin-dependent DNA replication. *Nucleic Acids Res* 45: 8302-8313.
 - 8 Bruck I, Goodman MF, O'Donnell M (2003) The essential C family DnaE polymerase is error-prone and efficient at lesion bypass. *J Biol Chem* 278: 44361-44368.
 - 9 Timinskas K, Balvociute M, Timinskas A, Venclovas C (2014) Comprehensive analysis of DNA polymerase III alpha subunits and their homologs in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 42: 1393-1413.
 - 10 Paschalis V, Le Chatelier E, Green M, Kepes F, Soultanas P, et al. (2017) Interactions of the *Bacillus subtilis* DnaE polymerase with replisomal proteins modulate its activity and fidelity. *Open Biol* 7.
 - 11 Rannou O, Le Chatelier E, Larson MA, Nouri H, Dalmais B, et al. (2013) Functional interplay of DnaE polymerase, DnaG primase and DnaC helicase within a ternary complex, and primase to polymerase hand-off during lagging strand DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 41: 5303-5320.
 - 12 Fijalkowska IJ, Schaaper RM, Jonczyk P (2012) DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: A multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol Rev* 36: 1105-1121.