

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS



TESIS DOCTORAL

Replicación del ADN mitocondrial humano a nivel de moléculas individuales: síntesis de la cadena retrasada

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Fernando Cerrón Campóo

Directores

Borja Ibarra Urruela
Francisco Javier Cao García

Madrid





UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Ciencias Físicas

Departamento de Estructura de la Materia, Física Térmica y Electrónica

-Tesis doctoral-

**Replicación del ADN mitocondrial humano a nivel de
moléculas individuales: síntesis de la cadena retrasada**

Fernando Cerrón Campoó

Tesis dirigida por los doctores:

Borja Ibarra Urruela

Francisco Javier Cao García

Con la participación del Instituto Madrileño de Estudios Avanzados

instituto
imdea
nanociencia

Agradecimientos

En el 2013 me embarqué en esta aventura llamada *tesis doctoral* con una beca de colaboración bajo la tutela de los doctores Borja Ibarra y Francisco Javier Cao. Cuando uno empieza una tesis no sabe bien qué esperar o qué problemas se va a encontrar, y en algunos casos, ni siquiera alcanza a vislumbrar de qué tratará su tema de investigación, o los experimentos que tendrá que llevar a cabo. Lo que uno descubre con el paso del tiempo es que efectivamente una tesis es un proceso largo, tedioso, difícil y lleno de frustraciones, días amargos y momentos donde no le queda más que resignarse a lo que le ocurre sin más remedio. Pero sin embargo una tesis no es sólo eso, sino que durante los años que dura, se trabaja en una cosa preciosa, que es el trabajo por el conocimiento. Sencillamente no se valora lo bonito que es trabajar en algo así hasta que vives otras experiencias, que si bien son enriquecedoras, no le quitan valor a trabajar motivado por el descubrimiento de lo nuevo. Ya han pasado 6 años desde que ese Fernando primerizo entraba a su primer trabajo con el nerviosismo que caracteriza a todos los que empiezan en su primer oficio, con intervenciones estelares como tratar de coger $1\mu\text{l}$ con una pipeta p1000 (para desesperación de uno de mis directores de tesis, aún sigo sin entender cómo siguió dirigiéndome la tesis) o intentar disolver una disolución 5M de NaCl a temperatura ambiente durante horas (para el regocijo de algunos de mis compañeros, que lejos de aconsejarme, entre risas me motivaban a seguir intentando dicha disolución), y los recuerdos que acompañan a mi época doctoral son siempre positivos y alegres, pese a lo duro que es en algunas ocasiones el desarrollo de una tesis.

Sin embargo, podría decir que mi tesis doctoral no ha sido algo exclusivamente mio, pese a que lleva mi nombre como único autor. Este proyecto no hubiese sido posible sin todas aquellas personas que me han rodeado durante todo el proceso. Empezando por aquel grupo de investigación donde hice mi *Trabajo Académicamente Dirigido*, en la universidad, dirigido por Eusebio Bernabeu (caterdrático del departamento de óptica en aquella época), Francisco José Torcal (post-doc en esos años) y Chema (quien estudiaba su doctorado). Con ellos dí mis primeros pasos en investigación y despertaron en mi esa curiosas innata a todo científico por todo lo que le rodea. Tampoco tengo que olvidar a mis compañeros en Imdea Nanociencia y la Complutense, en quienes me apoyé en aquellas comidas/terapia que utilizábamos para ayudarnos entre todos: Irene, mi compi de mesa durante prácticamente todos mis años de

doctorado, con quien compartí frustraciones, confidencias, risas, música y alegrías, cuando te fuiste de Imdea, no sabes lo que te eché de menos y lo que nos hubiésemos reído con todas las aventuras que fueron pasando; Sara, a quien conocí creando una atmósfera estéril del tamaño de una habitación con el mechero Bunsen; a Aitor, con sus ironías, videos de Youtube y risas; a David, rockero de corazón, buen compañero y con mis mismos gustos en materia de bromas; a Patri *Valencia*, con quien compartí más gustos fiesteros; a Patri *Pelirroja*, porque siempre me veías como un cómic y me reías todas las gracias; a Alejandra, porque contigo siempre tuve muchos gustos en común; a Elena Beltrán, buena compañera, quien aún a día de hoy me guió con el procedimiento de entrega de la tesis ahorrándome valioso tiempo; a Javi Jarillo, un gran compañero de trabajo, siempre dispuesto a ayudar y una gran persona, quien no tuvo ningún reparo en echarme una mano de forma completamente desinteresada cuando lo necesité, y dicho sea de paso, un gran colaborador, profesionalmente hablando; a Felipe, un gran amigo y mejor persona, gruñon y bromista, pero con el que conservo una buena amistad (y memes diarios por Whatsapp) incluso dos años después de que nuestros caminos profesionales nos separasen de país; a Kateryna, con tus nervios y tus grandes sorpresas (como que bailas salsa mejor que cualquiera de nosotros); a Héctor, grande entre los grandes, con tus bromas irónicas y cargadas de maldad, que no dejaban de ocultar un gran corazón y una persona siempre dispuesta a ayudar; a Carlitos, ligón y simpático, con quien desde el primer momento compartí afinidad, bromas y confidencias, y con quien a día de hoy no hay semana que no comparta una conversación; Tere, una chica inteligente y sonriente; a Fran, el hombre con la risa más fácil del mundo; a Rebe, mi hermana mayor de Imdea, siempre asesorándome en materia personal y profesional, a quien he contado más confidencias de todos mis compañeros, y con quien mantengo el contacto continuo incluso un año después de dejar Madrid, no te haces a la idea lo que me ayudaste durante todos estos años y lo útiles que me resultaron tus consejos, posiblemente de Imdea eres de las personas que más me ha llegado a conocer; a Sara, siempre dispuesta a ayudar, buena persona y que además tienes una característica que pocas personas tienen, y es que sabes escuchar; a Warren, sencillamente un grande, una persona estupenda, inteligente y bromista, con quien también compartí confidencias y que me animaste a una de las decisiones más *atrevidas* de mi vida; a José Morín, mi mentor en lo experimental y Matlab, creo que nunca supiste la cantidad de cosas que aprendí de tí, y no miento si digo que gracias a ti aprendí a investigar de forma metódica y concienzuda (sobre todo cuando entrabas en las pinzas a revisar cómo había montado todo el instrumento, siempre se me había olvidado algo). Todos ellos formaron mi familia Complu-Imdeana, y siempre seréis parte de mi recuerdo cuando hable de mi tesis doctoral.

Ninguna tesis sería posible sin sus directores de tesis: a Fran, siempre amable, cuando te comenté mi idea de futuro después de la tesis me comprendiste a la perfección, y eso me ayudó mucho; y aunque a veces me haya costado convencerte sobre mis teorías físicas, siempre has tenido en cuenta mi opinión y siempre me has tratado muy bien y me has dado consejo cuando lo he necesitado. A Borja, no sólo un director de tesis, sino alguien a quien contarle mis aventuras

veinteañeras, con tu paciencia infinita y tu resignación constante, siempre dispuesto a ayudar y gran docente en materia de biología; pese a que no haces ningún ruido al andar y siempre me has dado sustos, has sido un gran director de tesis y contigo he aprendido no sólo de biología, sino a ser científico, algo que no siempre se enseña.

Tampoco me quiero dejar fuera del tintero a mucha gente ajena al trabajo que me acompañaron durante todo este tiempo, a quienes les conté una y mil veces mi tesis, me quejé otras mil y les obligué a escucharme otras tantas. Empezando por mis compañeros de promoción universitaria: Guille, gracioso como el que más; Jesús R, siempre compartimos sufrimientos de tesis, viajes, salidas nocturnas y diurnas, discusiones políticas, bodas y banquetes, eres un grande, y si algún día llegas a ser político, te votaré, tenlo claro; a Manu, estrella del rock, y aunque nos sacásemos la carrera en el mismo año yo si te incluyo en mis agradecimientos de mi *disco* estrella, ya que contigo he compartido experiencias únicas, viajes y casas rurales; Inés, mira que me abandonaste al final cuando teníamos nuestro pacto hecho, pero pese a todo siempre te guardaré un recuerdo inmejorable, porque eres muy buena persona y gran amiga; a Irene, siempre tecleando con onditas en los dedos, tu manía de llamarme Fernardita, y tu buena amistad, siempre dispuesta a escuchar mis penas y angustias por Skype o en persona; a Cris, la veterana del grupo, estar contigo siempre me trae la confianza de estar con los de siempre, con quien puedo ser yo mismo al 100 %; a Beita, aunque ya no quieras hablar conmigo y me ignores cuando te escribo, siempre has sido una gran amiga, buena confidente y gran asesora, al menos siempre me has sabido escuchar y siempre fuiste de las primera en pedir consejo cuando tuve problemas; a Victor, porque eres un ser malvado y perverso con tus *quee pasaaaaaa Arandaa*; a J. Ovejero, siempre me has sabido entender y dado buenos consejos cuando hemos mantenido conversaciones, de verdad que eres de esa clase de gente que sabe ponerse en el lugar del otro y tener la paciencia necesaria para comprenderlo; a Bolu, el único argentino del que me fiaría (pero tampoco mucho, que luego me hablas de agujeros negros y materia oscura); a Fer Senent, que me hizo muchísima ilusión que me invitases a tu boda como testigo, y más aún la tarta, la mejor que he visto hasta ahora; Juan Carlos, eres una persona especial, de los más puros de corazón que he conocido en mi vida, tu vida siempre te lo ha puesto más difícil que al resto, pero no obstante la afrontas con una sonrisa y bromas continuas, siempre me ha gustado hablar contigo y tienes mucho que enseñar al mundo, aunque no lo creas; a Pablo (pensabas que me iba a olvidar de ti, seguro), amigo cercano a *Coleguis*, pocas cosas te puedo decir que no sepas, salvo que sigues siendo de mis mejores amigos y siempre estaré orgullo de nuestra amistad, contigo he compartido tanto como el que más, y aunque no lo creas, te echo de menos aquí en Tenerife; a Carlos Bae, no se si alguna vez llegaré a transmitirte lo relevante que fue para mi aquella charla que tuvimos en Sevilla que, literalmente, cambió mi vida; eres una persona muy importante para mí y que me ayudaste muchísimo en un momento crítico de mi vida, no lo olvidaré nunca.

También me gustaría mencionar a mis compañeros residentes de mi nueva vida en Tenerife, que no sé si daros las gracias o maldeciros por ofrecerme planes tan interesantes y tener siempre

la lucha tesis versus planes: Cris, el equipo Onco-Protón siempre presente, siempre dispuesta a una broma, siempre contándonos nuestros dramas y alegrías, eres de lo mejorcito que he podido conocer en Tenerife; Mija Krystel, fuente inagotable de risas y *huevadas*, *bacan* y otras cosas, gracias por este tiempo y tu compañía, eres una crack y siempre vas a tener un amigo en España; Mario Intensiva, un amigo silencioso y confiable, con constantes luchas morales e historias mentales, con tus *me voy corriendo*, y literalmente te vas corriendo, eres muy buen amigo, de los mejores que he podido encontrar aquí; Jelen, estás pasando por uno de los momentos más difíciles de tu vida, pero siempre dispuesta a salir, hacer planes y echarte unas risas, quizá no lo valores, pero tu consejo vale mucho y eres una persona con la capacidad de comprender al resto; Mariquilla, confidente y alegre, con tu característica forma de saludar, asustándome por el hospital para obligarme a ser tu paciente y dándome un abrazo cuando lo he necesitado, te considero una buena amiga mía; a Jose, siempre irónico y compartiendo humor inteligente, cuando se te conoce parece que no, pero luego se demuestra que te preocupas por los demás, eres buen amigo, siempre levantas la moral con tus bromas y sin duda has sido de los que más ha contribuido a que esté bien en Tenerife; al equipo gallego Carmen y Miguel, los *indecisos* según las empanadas, con vosotros siempre es todo más fácil, en vuestra compañía uno se siente cómodo y bien, ya que se os ve buena gente desde el primero momento; Carol, porque me haces sentirme gracioso con tu risa constante ante cualquier broma y tu dignidad cuando me meto contigo; a Maribel, porque eres la alegría andaluza personificada y mi guía turística de lugares secretos en Tenerife; a Sandra, por tu adorable sonrisa; a Marta, por ser tan graciosa y seguir el royo siempre; a Silvia, porque siempre estas alegre y sonriente; a Sara y Michel, buena gente del norte y siempre dispuestos a una buena fiesta; a Pablo PDF, porque contigo tengo charlas serias, y no tan serias; a Esther, porque tu eres de las que más comprenden mi trabajo; a Lorelay, Ana, Carla At., Andrea, Carla Am, Liber, Inés, Mikele, Mireia, Pablo, Sergio, Nico, Martín....todos vosotros hacéis mi vida más fácil y formáis parte de mi gran familia canaria.

No me voy a olvidar de otros amigos que forman parte de mi vida, compañeros de aventuras Madrileñas: Richi, con tu sonora risa y tus comentarios irónicos, siempre dispuesto a bromear ante todo; Borja, siempre con tus camisetas sin mangas y tus bailes; Jaime, eres un personaje que monta en moto como si fuese en bici (con los ruedines digo); Ramón, desde que nos conocimos hace ya 9 años siempre hemos sido amigos y viajado juntos, y sé que cuando vuelva a Madrid seguirás siendo de mi grupo; Chusote, eres un gran amigo y bastante transparente, lo que te da mucho valor como persona, tienes buen corazón y eres un compañero de fatigas bastante confiable, para lo bueno y lo malo; Arthur, el hombre silencioso, una sombra siempre presente, pero fiel hasta la muerte, contigo he compartido muchas aventuras, y siempre serás el VAR de todas nuestras historias; Falero, te conozco desde la infancia y hemos mantenido nuestra amistad durante toda una vida, creo no me hace falta decirte mucho más, siempre con tus bromas extremadamente ocurrentes y tus enfados con el mundo y con todos, pero con buen corazón cuando se necesita tu ayuda; Zebo, siempre dispuesto a ayudar, eres un amigo fiel, y nuestra amistad sigue perdurando después de tantos años, siempre me has escuchado cuando

te he contado mi vida sin importarte que fuese un verdadero peñazo; Miguelo, cuando hablas, sientas cátedra, tienes uno de los mejores corazones que conozco, y aunque la vida tampoco te lo ha puesto fácil, valoro mucho nuestra amistad y cuando te fuiste a Galicia se te echó de menos; Sánchez, mira que no comulgamos mucho en ideas políticas, pero cuando estoy contigo siempre me siento como en casa, con plena confianza y sé que puedo ser yo mismo al 100 %; Ibañez, llevamos toda una vida juntos ya que entre nuestros padres y hermanos formamos una gran familia, creo que a ti te puedo ocultar pocas cosas ya que nos conocemos desde hace mucho y hemos vivido muchas aventuras que espero les contemos a nuestros hijos juntos, como dos grandes amigos, cuando estoy contigo, se que no me tengo que avergonzar de decir una tontería detrás de otra, porque tu las aguantas todas, y hasta las ríes; J. Taboada, eres de los más grandes personajes que conozco, fiel como nadie, divertido, alegre y buena persona, gruñon en ocasiones y un poco despistado en otras, pero precisamente te digo eso por el aprecio que te tengo, ya que desde pequeños formábamos el tandem Fernando-Taboada en el colegio.

A Chewe e Iglesias, el *núcleo duro*, sois amigos-hermanos, porque sois parte de mi familia. Sois los primeros a los que llamo si tengo algún problema, a los que más caso hago cuando me aconsejan (aunque creáis lo contrario), los que más rápido responden cuando he necesitado ayuda, los que mejor me conocen. No sabéis cuanto os echo de menos por aquí y la cantidad de cosas que podría escribir sobre vosotros, así que me limitaré a una cosa: asentimiento.

A mis tíos: Joma, con tus bromas de humor malvado y siempre peleón; a Inma, siempre dispuesta a decir algo bueno sobre mí; a Merche, los días que estoy deprimido me levantas la moral con tus piropos; a Álvaro, porque siempre me rompes la muñeca cuando nos saludamos; a Fernando, compañero de motos, curioso por naturaleza y mi tío favorito en la infancia; a Alicia, siempre hospitalaria en Comillas; a Juanito, porque eres sencillamente, Juanito; a Pachi, porque siempre te has interesado por mi vida y tratas bien a mis primos; a mi tia Margarita, porque cuando voy a tu casa salgo pesando 4 kilos más. Por supuesto a mis primos: Fran, con nuestro choque de suburbio; Itziar, lista e inteligente, muy madura para su edad; Daniel, por tu pachorra y nuestras conversaciones de Whatsapp; a Esther, porque deberíamos fundar la Comisión de Fiestas de la familia Campoó; a Giovanni, porque no podemos coger la bici juntos que me caigo; a Blanca, por las cañas compartidas; a Silvia, porque siempre te interesaste por mi trabajo; a Esther, porque siempre me has asesorado en nutrición y fisioterapia sin esperar nada a cambio. A mi tía-abuela Martina, fallecida recientemente, porque siempre me hacías sentirme tu sobrino-nieto favorito (en competición con Joma) y siempre confiaste en mí; tuviste fe en mi futuro y siempre me animaste. Fuiste posiblemente la persona más generosa que he conocido en mi vida.

A mi cuñada Rosa, siempre me has tratado muy bien y has sido amable conmigo. No has tenido nunca ningún problema en ayudarme cuando lo he necesitado, me has dado buenos consejos cuando te he contado mi vida y mis problemas, y lo más importante de todo, haces feliz a mi hermano.

A mi hermano Nacho, siempre un ejemplo, siempre imitándote, si tu hacías un coche para

los peluches, yo hacía un coche para los peluches, si tu hablabas yo hablaba detrás, si hoy en día me dices que haga algo, lo haré dándolo por bueno. Siempre me has ayudado sin pedir nada a cambio, me haces sentirme gracioso cuando digo mis tonterías, tenemos un montón de recuerdos en común y multitud de bromas de nuestra infancia que perduran hasta nuestros días. No sólo eres mi hermano, eres mi amigo y lo has demostrado a lo largo de toda nuestra vida. Gracias.

A mis padres, Ángel y Mariajosé, a vosotros os debo todo lo que soy y lo que seré. Siempre me habéis apoyado y ayudado, dado consejos y escuchado, soportado en mis malos días y mis berrinches propios de un enano. De verdad que sólo se me ocurre daros las gracias por ser tan buenos padres conmigo y convertirlos en un ejemplo a seguir. Tan sólo espero que el día que defienda la tesis y luego echéis un vistazo a este manuscrito, haberme hecho merecedor de vuestro orgullo, y si dicho orgullo es una décima parte del que yo siento al miraros, ya me daré por satisfecho. Muchas gracias por todo Papá y Mamá.

Finalmente para terminar los agradecimientos quisiera mencionar a mi tía Begoña, fallecida en el 2013. No concibo esta tesis sin pensar en ti, ya que has sido la motivación que me ha impulsado a afrontar los malos momentos durante estos años. Tu sonrisa siempre perenne, incluso en los peores momentos de tu enfermedad, que hacían dudar de si realmente estabas pasándolo tan mal como decían los médicos. Por desgracia nos dejaste justo al comienzo de la tesis, y no tuve oportunidad de contarte mi progreso y mis investigaciones; conociéndote, me habrías escuchado sin perder detalle, asintiendo en cada frase. Tampoco olvidaré tus palabras a mi madre: *dile a Fernando que se den prisa*; no pude darme prisa tía, pero marcaste mi vocación sanitaria, y de verdad que no hay nada que pudiese llenarme más que verte entre el público el día de la defensa de la tesis, porque si hay alguien a quien me gustaría ver allí, sería a ti.

Summary

Mitochondria is an essential organelle of the cell. It produces the ATP and plays a fundamental role in process as cell signaling, apoptosis and aging. Although most DNA is packaged in chromosomes within the nucleus, mitochondria has its own DNA, which in humans is a circular genome of 16.600 base pairs that encodes for 37 genes. Human mitochondrial DNA is in a high number of copies distributed through the cell and the correct expression and translation of the proteins and nucleic acids encoded in the DNA is crucial for cell function. Mutations in mtDNA lead to muscular and neurological diseases and are linked to aging, cancer o metabolic disease.

The mtDNA replication mechanism is still under debate, but there has been reconstituted a minimal mammalian mtDNA replisome *in vitro* with a minimum of three proteins: the helicase TWINKLE, the DNA polymerase γ (pol γ) and the mitochondrial SSB. The helicase unwinds the double stranded DNA (dsDNA) into two single stranded DNA (ssDNA), one of them is used as a template by pol γ (leading strand) and the other will be covered by mtSSB (lagging strand). At about two thirds of the distance around the genome, the the replication of the lagging strand is initiated and synthesis proceeds continuously. In the lagging strand, the pol γ will replicate a substrate of ssDNA covered by mtSSB. Mutations in the genes coding for this proteins are associated with human diseases such as neurodegenerative disease, migraine, epilepsy, Parkinson and premature aging.

Single-molecule manipulation techniques such as optical tweezers have allowed, for the first time, to measure and quantify the mechano-chemical process and kinetics of biological systems at molecular level. Optical tweezers can be used as quantitative tools to exert calibrated forces on systems of interest as well as accurately and sensitively measure the forces and displacement generated by these systems. They allow us to gain essential insights into the mechanical properties of biological macromolecules and the dynamics an mechanisms of molecular systems. The objective of this thesis is to use the optical tweezers to:

- *Determine the structure and organization of mtSSB-ssDNA complexes assembled on different experimental conditions:* Genome replication induces the generation of large stretches of ssDNA intermediates that are rapidly protected by mtSSB proteins with high affinity. mtSSB is a tetramer that presents multiple sites to interact with ssDNA, wich has been

shown *in vitro* to enable them to bind a variable number of single-stranded nucleotides depending on the salt and protein concentration. It has long been suggested that different binding modes might be used selectively for different functions. To study this possibility, we used optical tweezers to determine and compare the structure of long, individual mtSSB-DNA complexes assembled on preformed ssDNA and on ssDNA generated gradually during *in situ* DNA synthesis. We found that when binding occurs on preformed ssDNA, two major modes prevail in which the mtSSB binds ~ 35 nt/tetramer (mtSSB₃₅) and ~ 70 nt/tetramer (mtSSB₇₀), depending on protein and salt concentration. However, when protein binding is coupled to strand-displacement DNA synthesis, only the mtSSB₃₅ mode was observed under all experimental conditions. These results reveal that the mtSSB₃₅ binding mode is the relevant in replication, playing a key role in generating the appropriate nucleoprotein structure for DNA synthetic reactions required for genome maintenance.

- *Determine the coordinated activity of pol γ and mtSSB during lagging strand synthesis:* mtSSB bind ssDNA with high affinity, but bound mtSSB has to be removed from ssDNA by pol γ without compromising lagging strand replication. Here we used optical tweezers to measure the real-time replication kinetics of human mitochondrial DNA polymerase and bacteriophage T7 polymerase on free-ssDNA, in comparison with ssDNA covered with parental and non-parental SSB under mechanical tension. Our results show that the elimination of template secondary structure by SSB binding facilitates the maximum replication rate of the lagging strand polymerase. We demonstrate that specific polymerase-SSB repulsive interactions, up to $\sim 12k_B T$, are required for polymerase to dislodge SSB from the template without compromising the advance of the polymerase. In contrast, in the absence of polymerase-SSB interactions, SSB is a barrier for the advance of the polymerase, slowing down DNA synthesis. In addition, the similarities found in the mitochondrial and bacteriophage T7 DNA replication systems suggest that their respective polymerases may use similar mechanism to dislodge the tightly bound SSBs during lagging strand DNA synthesis.

In this thesis we set up the starting point for future mitochondrial DNA replication studies. The conclusions here will shed light on the mitochondrial DNA replication mechanism and its relation with mitochondrial diseases, which are so far unknown. Besides, in this work we have developed new physical and mathematical tools that will be useful for future studies in the field, as for the mitochondrial DNA replication system as well as for other biologically analogous systems.

Resumen

La mitocondria es un orgánulo celular esencial para el metabolismo celular. Produce el ATP y juega un papel fundamental en procesos relacionados con la señalización celular, apoptosis y envejecimiento (oxidación celular). A diferencia de otros orgánulos (con excepción del núcleo celular), la mitocondria presenta su propio genoma; en humanos, este es un ADN circular de 16.600 pares de bases que contiene 37 genes y del que existen multitud de copias distribuidas por toda la mitocondria. La expresión eficiente de estas proteínas y ácidos es fundamental para su correcto funcionamiento. Por tanto, el mantenimiento de genoma mitocondrial (mtDNA) y replicación fidedigna son esenciales para la viabilidad celular. De hecho, en humanos, una replicación ineficiente y/o poco fiel del mtDNA está relacionada con el desarrollo de tipos específicos de cáncer, envejecimiento prematuro o la aparición de enfermedades mitocondriales; desordenes metabólicos y neurodegenerativos crónicos. Hoy en día el modelo de replicación del mtDNA está aún en debate. Sin embargo, se han identificado tres componentes que forman el replisoma mitocondrial mínimo en humanos; la helicasa TWINKLE, la polimerasa γ ($pol\gamma$), y la SSB mitocondrial. La helicasa abre la hebra doble del ADN (dsDNA) en dos cadenas sencillas (ssDNA), una de ellas, la cadena *líder* es utilizada como molde por la polimerasa $pol\gamma$ para producir dsDNA, y la otra, la *desplazada*, es rápidamente recubierta por la mtSSB. Cuando la replicación de la cadena *líder* ha alcanzado dos terceras partes del total, comienza la replicación en la cadena *desplazada*, donde la $pol\gamma$ debe replicar un sustrato de ssDNA previamente recubierto por la mtSSB. Las proteínas que forman el replisoma mitocondrial humano reúnen una función vital, y es sabido que mutaciones en la secuencia de estas proteínas se relacionan con alteraciones en la función mitocondrial y enfermedades neurodegenerativas, migrañas, epilepsia o Parkinson. El reciente desarrollo de técnicas de manipulación de moléculas a nivel individual, como las pinzas ópticas, está permitiendo por primera vez medir y cuantificar los procesos dinámicos y mecano-químicos que rigen el funcionamiento de los sistemas biológicos a nivel molecular. Permiten seguir la actividad de una sola proteína en tiempo real identificando la dinámica del proceso. Además, las pinzas ópticas permiten medir y ejercer fuerzas mecánicas sobre el sistema biológico en estudio. Así, es posible determinar los procesos mecánicos que gobiernan su funcionamiento y la relación de estos con la coordenada mecano-química del sistema biológico. El objetivo principal de esta tesis es el de aprovechar las propiedades de la

pinzas ópticas para:

- *Determinar la organización de complejos ssDNA-mtSSB en diferentes condiciones experimentales:* Durante la replicación de mtDNA se forman largos complejos mtDNA-mtSSB donde la mtSSB se une al ssDNA con gran afinidad. La mtSSB es un tetrámero que presenta varios puntos de unión capaces de interactuar con el ADN de modo que pueden organizar el material genético uniendo un número variable de nucleótidos. Se ha especulado que estos modos podrían seleccionarse de forma preferente en función del proceso celular, pero se desconoce si alguno predomina en la replicación. En esta tesis hemos recreado estos complejos y estudiado el modo de unión de la mtSSB al ssDNA. Para ello hemos usado dos condiciones experimentales: unión a un ssDNA que ha sido previamente generado, y unión a un ssDNA que es generado de forma gradual mientras tiene lugar la replicación *in situ*. Hemos visto que cuando la unión se produce a un ADN previamente generado, la mtSSB lo organiza en dos modos de unión principales en los que unen $\sim 35\text{nt/tetrámero}$ (mtSSB₃₅) y $\sim 70\text{nt/tetrámero}$ (mtSSB₇₀). Además la prevalencia de uno u otro modo depende de la concentración de sal y proteína. Sin embargo, cuando la unión de la mtSSB tiene lugar de forma acoplada con la síntesis de ADN predomina el modo mtSSB₃₅. Este hecho implica que el modo relevante en la replicación es el modo mtSSB₃₅, modo que serviría para preparar el sustrato adecuado en la replicación de la cadena *desplazada*, así como también en aquellas reacciones necesarias para el mantenimiento del genoma mitocondrial.
- *Determinar la acción coordinada de la mtSSB y la pol γ durante la síntesis de la cadena desplazada:* La mtSSB se une con gran afinidad al ADN, pero no debería comprometer su replicación. Esto implica que debe existir algún mecanismo que facilite la liberación de la mtSSB del sustrato de ADN durante la replicación. Utilizamos las pinzas ópticas para estudiar el efecto de la mtSSB parental, o silvestre, y SSB no parentales en la cinética instantánea de replicación de la polimerasa mitocondrial humana. Nuestros resultados indican que la mtSSB silvestre estimula la cinética en tiempo real de la pol γ al eliminar la estructura secundaria del ssDNA. También demostramos que para desplazar la mtSSB sin que esta suponga un detrimento para el avance de la polimerasa, se establecen interacciones funcionales específicas de naturaleza electrostática entre ambas proteínas. La magnitud de estas interacciones es de hasta $12k_B T$, lo que permite a la polimerasa expulsar activamente la mtSSB del ssDNA molde. Experimentos con SSB no parentales indican que en ausencia de estas interacciones la SSB supone una barrera para el avance de la polimerasa. Además, hemos comprobado que otros sistemas de replicación (como el del bacteriófago T7) usan mecanismos semejantes para desplazar la SSB parentales unidas al ADN, lo que sugiere que este mecanismo podría ser extrapolable a otros sistemas de características similares.

En esta tesis se han sentado las bases para futuros estudios de replicación del ADN mitocon-

drial humano. Sus conclusiones servirán para arrojar luz sobre los mecanismos de replicación y su relación con enfermedades mitocondriales, tan desconocidas hasta ahora. Además, en este trabajo se han desarrollado herramientas físico-matemáticas que serán de gran utilidad en el campo de investigación tanto para el sistema mitocondrial como para otros sistemas biológicamente análogos.

Índice general

Summary	VII
Resumen	IX
1. Introducción	1
1.1. La mitocondria	2
1.2. ADN mitocondrial	5
1.2.1. Molécula de ADN mitocondrial.	5
1.2.2. Síntesis del ADN mitocondrial humano.	6
1.2.3. Estructura y funcionamiento de las proteínas implicadas	8
1.3. <i>In singulo</i> : sistemas biológicos desde el punto de vista de las moléculas individuales	13
1.3.1. Técnicas de manipulación de moléculas individuales	13
1.3.2. La fuerza como coordenada termodinámica	15
1.3.3. Teoría del atrapamiento óptico	16
2. Objetivos	19
3. Materiales y métodos	23
3.1. Las pinzas ópticas	24
3.1.1. Montaje experimental de las pinzas ópticas	24
3.1.2. Sistema fluídico (Cámara fluídica)	26
3.1.3. Manipulación de moléculas individuales	28
3.2. Síntesis de las moléculas	29
3.2.1. Obtención de curvas de fuerza-extension de ADN de cadena sencilla en ausencia y presencia de SSB	30
3.2.2. Experimentos de replicación sobre cadena sencilla	33
3.2.3. Preparación de las microesferas	35
3.3. Método experimental	36

3.3.1.	Obtención de las curvas de fuerza-extensión de la cadena sencilla de ADN desnuda y del complejo ssDNA-SSB	36
3.3.2.	Unión de la SSB a la cadena sencilla de ADN durante la replicación de la horquilla	37
3.3.3.	Experimentos de replicación sobre cadena sencilla en ausencia y presencia de la SSB: recreando la síntesis de la cadena retrasada	39
3.4.	Análisis de resultados	39
3.4.1.	Conversión del cambio en extensión a número de nucleótidos y cálculo de nucleótidos replicados por unidad de tiempo	40
3.4.2.	Cálculo de las energías de unión de la SSB al sustrato	41
3.4.3.	Obtención de la velocidad media y procesividad	41
3.4.4.	Cálculo de la velocidad máxima	41
4.	Resultados	43
4.1.	Identificación de los modos de unión de la SSB de mitocondria humana a cadena sencilla de ADN	44
4.2.	Replicación de la cadena retrasada	51
4.2.1.	La estructura secundaria formada en el ADN de cadena sencilla ralentiza la velocidad máxima de replicación de la polimerasa γ	53
4.2.2.	La SSB impide la formación de la estructura secundaria de la cadena sencilla de ADN favoreciendo la replicación por parte de la pol γ	57
4.2.3.	Las interacciones entre la polimerasa y la SSB son necesarias para la disociación <i>activa</i> de la SSB	58
4.2.4.	Obtención de los cambios conformacionales y energías implicadas en la liberación <i>activa</i> de la SSB	59
4.2.5.	Efecto de SSB homóloga y no homóloga en la actividad de la polimerasa de T7	61
5.	Discusión	65
5.1.	Unión de la SSB al sustrato	66
5.2.	El rol de la SSB en la replicación sobre cadena sencilla	67
6.	Conclusiones	75
A.	Anexos	91
A.1.	Dependencia de la estructura secundaria del ADN de cadena sencilla con la fuerza	92
A.2.	Validación del método de obtención de V_{Max}	93

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1. La mitocondria

Es difícil establecer una definición absoluta del concepto de vida, ya que si observamos el mundo que nos rodea, podemos contemplar variedades sorprendentes de seres vivos, desde pequeños organismos unicelulares, hasta grandes conglomerados de seres vivos pluricelulares como es el ser humano, formado por más de 10^{13} células. Pero sin embargo, todos ellos comparten una característica común, y es que incorporan energía desde su entorno para llevar a cabo sus funciones vitales y mantener así su organización. Sin embargo, todo sistema vivo pluricelular se ha desarrollado a partir de una sola célula que se ha dividido originando dos células idénticas mientras transmite su información genética a las células hijas. Esta herencia genética debe contener las instrucciones necesarias para poder intercambiar información, energía y material biológico con el exterior, por lo que dicha información genética debe tratarse de una copia exacta de la contenida en la célula original (Cooper y Hausman 2017; Alberts y col. 2007). Existen multitud de tipos celulares, formados por distintas estructuras dependiendo de su función, pero en términos generales se puede decir que la célula está formada por distintos compartimentos rodeados por una membrana, conocidos como los *orgánulos* celulares.

Entre estos orgánulos se encuentran varios tipos: *el núcleo*, que contiene el genoma y es el lugar donde se produce la síntesis de ADN y ARN. El *citoplasma* que lo rodea está formado por el *citósol*, que es una sustancia compuesta principalmente por agua e iones, y donde tiene lugar la síntesis de proteínas y su degradación. El citósol a su vez contiene diversos orgánulos suspendidos en él (orgánulos citoplasmáticos) y es el lugar donde se sintetizan la mayoría de las moléculas intermedias que luego servirán para la construcción de las macromoléculas. El *retículo endoplasmático* se sitúa alrededor del núcleo, y contiene los *ribosomas*, que leen la información del ARN y la traducen en proteínas que luego pueden ser transportadas a otros lugares de la célula. Parte de estas proteínas se transportan al *aparato de Golgi*, donde son modificadas y enviadas a otras partes de la célula. Los *lisosomas* contienen enzimas digestivas que degradan el material celular de origen interno o externo. Por otra parte las *mitocondrias* son unos orgánulos que poseen una membrana adicional interna y llevan a cabo diversas funciones como son la producción de ATP, o Adenosín Trifosfato (la molécula energética de la célula) (O'Connor y Adams 2010; Alberts y col. 2007). El ATP se genera en un proceso denominado *fosforilación oxidativa* (Gautheron 1984), que como se verá más adelante, conlleva la generación de radicales libres en forma de oxígeno. Lidar con estos radicales también convierte a la mitocondria en uno de los mecanismos que dispone la célula como defensa anti-oxidante (Cadenas y Davies 2000). Además la mitocondria puede participar en algunos procesos de regulación celular, ya que puede desencadenar la apoptosis o la autofagia de la célula ante situaciones de estrés celular (Alberts y col. 2007; Nicholls 2002; Friedman y Nunnari 2014). Este orgánulo puede actuar como almacén de cationes en condiciones de aumento de la concentración de Ca^{+2} en el citoplasma (Nicholls y Akerman 1982) por lo su funcionamiento puede afectar a la comunicación entre células y a la fisiología general del ser humano.

Este orgánulo posee una cualidad que lo hace único, y es que conserva su propio ADN. Se

creo que la mitocondria proviene de la endosimbiosis de una α -proteobacteria que fue fagocitada, convirtiéndose en la maquinaria encargada de la producción de energía (Margulis 1970; Margulis 1981) de la célula anfitriona. Aunque existen estudios que demuestran que las mitocondrias pertenecientes a distintos organismos poseen distintos tipos de ADN (desde un ADN capaz de codificar para 67 proteínas en *R. Americana* (un tipo de mosca) hasta 3 en los *apicomplexas*, unos protistas parásitos), la hipótesis dice que todos comparten un ancestro común, al poseer genes similares y fragmentos de ADN compartidos entre sí (Gray, Burguer y Lang 1999; Gray, Burguer y Lang 2001; Ernster y Schatz 1981). Estas diferencias en el genoma podrían deberse a la transferencia de los genes de la mitocondria al núcleo a lo largo de la evolución, tal y como señalan algunos estudios como los mencionados anteriormente o el de Berg y Kurland (2000).

Por otra parte, dependiendo del tipo celular, su función y sus requerimientos de ATP, las células tendrán distinto número de mitocondrias, lo que implica que pueden tener distinto número de moléculas de ADN mitocondrial (mtDNA) por cada ADN nuclear (Barthelemy y col. 2001; Miller y col. 2003). Además las mitocondrias pueden fusionarse o dividirse (Friedman y Nunnari 2014; Scott y Youle 2010), lo que implica que el mtDNA debe replicarse en numerosas ocasiones. Estos ADN se organizan y compactan en los denominados nucleoides (ver figura 1.1A), que son complejos proteicos que contienen factores de transcripción y replicación así como algunas proteínas estructurales necesarias para el mantenimiento del mtDNA (Holt y col. 2007).

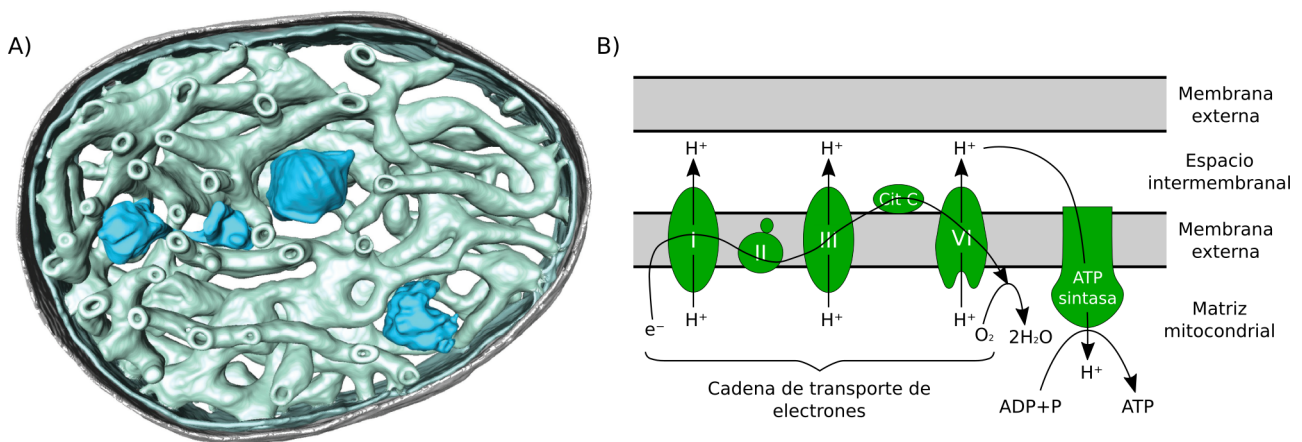


Figura 1.1: A) Estructura tridimensional de la mitocondria obtenida mediante criotomografía electrónica. La figura muestra la sección de la mitocondria de una célula cardiaca bovina. En azul se muestran los agregados de nucleoides en los que se compacta y guarda el ADN mitocondrial (Holt y col. 2007). Las estructuras que los alojan representan las membranas mitocondriales (figura obtenida de la referencia (Gustafsson, Falkenberg y Larsson 2016)). B) Dibujo esquemático del proceso de fosforilación oxidativa. Los complejos proteicos coloreados en verde (I, II, III y IV). La ATP sintasa utiliza el gradiente de hidrógeno para producir ATP.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la mitocondria tiene una estructura característica, ya que tiene una membrana interior que se repliega formando invaginaciones como se muestra en la figura 1.1A (Vogel y col. 2006). La membrana externa envuelve a toda la mitocondria formando una barrera natural selectiva, ya que incluso pequeños iones y sustratos metabólicos requieren el uso de proteínas transportadoras (Simbeni y col. 1991; Ardail y col.

1990). La membrana interna encierra la matriz mitocondrial formando las invaginaciones donde se alojan las proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa (figura 1.1A, siendo el espacio entre las membranas el denominado espacio intermembranal).

El proceso de la fosforilación oxidativa ocurre mediante el transporte de electrones entre varios complejos proteicos integrados en la membrana interna. En la figura 1.1B se muestra un dibujo esquemático del proceso de transferencia de electrones entre dichos complejos proteicos, denominados I, II, III y IV. El transporte de electrones se utiliza para bombear iones H^+ (protones) al espacio intermembranal, creando así un gradiente de protones entre dicho espacio y la matriz mitocondrial. Este gradiente se usa por la proteína de membrana ATP sintetasa para producir ATP mientras bombea protones a la matriz mitocondrial.

Para que se genere el gradiente de protones, la localización y el transporte de los electrones a lo largo de los complejos debe ocurrir con gran precisión, lo que implica que una síntesis incorrecta de los complejos proteicos desembocaría en carencias en la producción de ATP, con consecuencias nefastas para la célula. Tal y como se comentó anteriormente, la mitocondria es un orgánulo central en el correcto funcionamiento y comportamiento de la fisiología humana, por lo que si este orgánulo funciona de forma incorrecta, derivará en numerosas enfermedades que engloban todas las áreas de la medicina: enfermedades neurodegenerativas, síndromes metabólicos, cáncer u obesidad. En algunos estudios como el de Nunnari y Suomalainen (2012) o Ylikallio y Suomalainen (2011) hacen una revisión de una multitud de enfermedades producidas por fallos en el funcionamiento mitocondrial, como puede ser la atrofia del nervio óptico en adultos, que corresponde a defectos en el complejo I (ver figura 1.1B). También señalan que mutaciones en el ADN nuclear que afectan a las enzimas encargadas de la replicación del ADN mitocondrial (como es la polimerasa γ ($pol\gamma$)) pueden causar desórdenes hepato-cerebrales, epilepsia o neuropatías (Graziewicz y col. 2004; hudson y Chinnery 2006).

La naturaleza de estas enfermedades demuestra que la mitocondria está involucrada en multitud de procesos fisiológicos de células y tejidos. Para llevar a cabo su función más conocida, la síntesis de ATP, tienen que ocurrir una serie de fases como es el transporte de electrones a lo largo de la Cadena de Transporte de Electrones (CTE), que como se ha comentado se utiliza para generar un gradiente de protones entre las membranas externa e interna. Esto implica que entre ambas membranas se genera un potencial electrostático que es fundamental para otras funciones mitocondriales, como son el transporte de proteínas a través de las membranas o como indicador de un correcto funcionamiento del orgánulo, generando cambios en la estructura de las proteínas en caso de que la mitocondria no funcione como debería. Además, durante la CTE entre los complejos I y III (figura 1.1B) se generan diferentes especies de oxígeno reactivo (ROS), que incluyen radicales libres de oxígeno y peróxido de hidrógeno, lo que se ha sugerido como contribuyente en algunas enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo la neuropatía hereditaria de Leber (Pätsy y col. 2008). También se sabe que los mecanismos de señalización ROS/redox pueden afectar al crecimiento o diferenciación celular y al mantenimiento de la homeóstasis, ya que están relacionados con enfermedades como el síndrome

progeroide, producido por mutaciones en la actividad exonucleasa de la pol γ (Ahlqvist y col. 2012). También participa en la homeóstasis del Ca²⁺, ya que como se comentó es capaz de almacenar este ión para mantener la función celular, convirtiéndose en un orgánulo de vital importancia en células como las neuronas, donde el flujo de Ca²⁺ mediado por la mitocondria es fundamental para controlar la plasticidad neuronal, la liberación de neurotransmisores o la neurogénesis. Por otra parte, la mitocondria es el lugar donde ocurre el ciclo de *Krebs* o ciclo del ácido cítrico (involucrado en el metabolismo de lípidos, azúcares o aminoácidos), fundamental en la producción de ATP y en el metabolismo celular. Esto convierte a la mitocondria en un indicador del estado energético de la célula, y al metabolismo mitocondrial en el organizador de la respuesta fisiológica de un tejido ante un estímulo. Por ello alteraciones en la masa y actividad mitocondrial, así como en la concentración del mtDNA, pueden ser factores relevantes en obesidad o síndromes metabólicos, tal y como indica el estudio de Pietiläinen y col. (2008), llevado a cabo en gemelos con distinto índice de obesidad, con el mismo ADN mitocondrial pero en distinta concentración. Además, en relación al metabolismo mitocondrial, algunos estudios demuestran que defectos en la síntesis de determinadas enzimas mitocondriales pueden causar enfermedades graves como cáncer (gliomas o paragangliomas), por lo que estas enzimas estarían actuando como supresores de tumores (Baysall y col. 2000; Cohen, Holmen y Colman 2013).

1.2. ADN mitocondrial

1.2.1. Molécula de ADN mitocondrial.

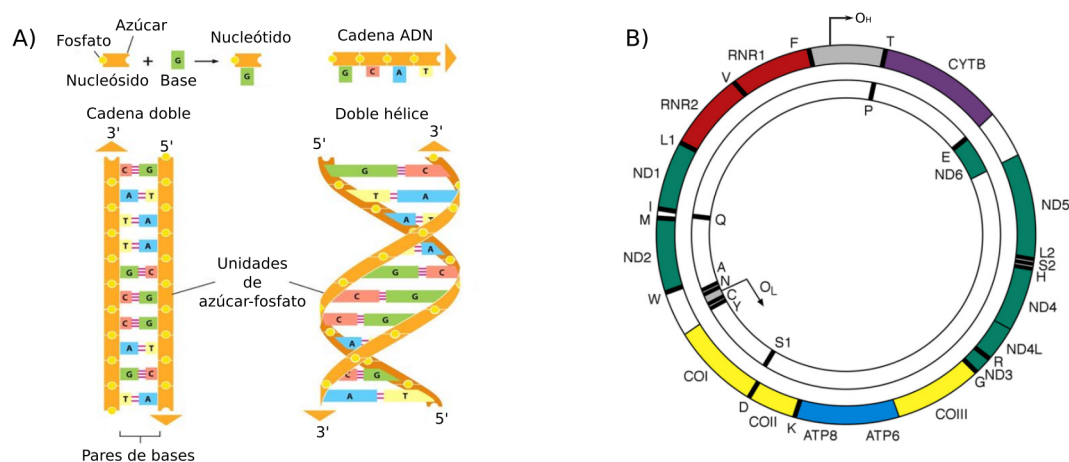


Figura 1.2: A) Descripción gráfica del ADN. Los nucleótidos se unen formando un polímero de cadena de ADN (cadena sencilla). Luego los polimeros se unen dos a dos formando una estructura de doble hélice. B) Representación esquemática del ADN mitocondrial humano. El círculo exterior representa una de las cadenas, y el interior la complementaria. El ADN mitocondrial es un ADN de 16600 pares de bases que codifica para 37 genes (ver texto principal). Imágenes modificadas de las referencias de Alberts y col. (2007) y Tuppen y col. (2010).

El ADN mitocondrial es un ADN circular de cadena doble (dsDNA) de 16600 pares de bases y 37 genes. En la figura 1.2 se detalla la codificación del material genético mitocondrial: 13 genes

son para proteínas asociadas a la cadena de la respiración celular, coloreadas en azul, verde, amarillo y púrpura, 2 se utilizan en la síntesis del ARN ribosómico (banda roja) y 22 para la síntesis de ARN de transferencia (bandas negras). La zona en gris es la zona de *no codificación*, que incluye el D-loop (en sus siglas en inglés) y el punto O_H , lugar de inicio de la replicación en la cadena líder. El punto señalado como O_L en la misma figura indica el punto de inicio de la replicación de la cadena retrasada (Anderson y col. 1981). El resto de proteínas necesarias para la función mitocondrial (unas ~ 1200) se producen en el núcleo celular, y son importadas directamente a la mitocondria (Gustafsson, Falkenberg y Larsson 2016; Berg y Kurland 2000).

Una célula puede tener distinto número de moléculas de ADN mitocondrial en función del tipo celular y su función (Miller y col. 2003; Barazzoni, Short y Nair 2000). Además los procesos de fusión y división celular pueden implicar la regulación y copia del genoma mitocondrial, lo que convierte a la replicación del ADN mitocondrial en un proceso de suma importancia para permitir a la mitocondria conservar su función.

1.2.2. Síntesis del ADN mitocondrial humano.

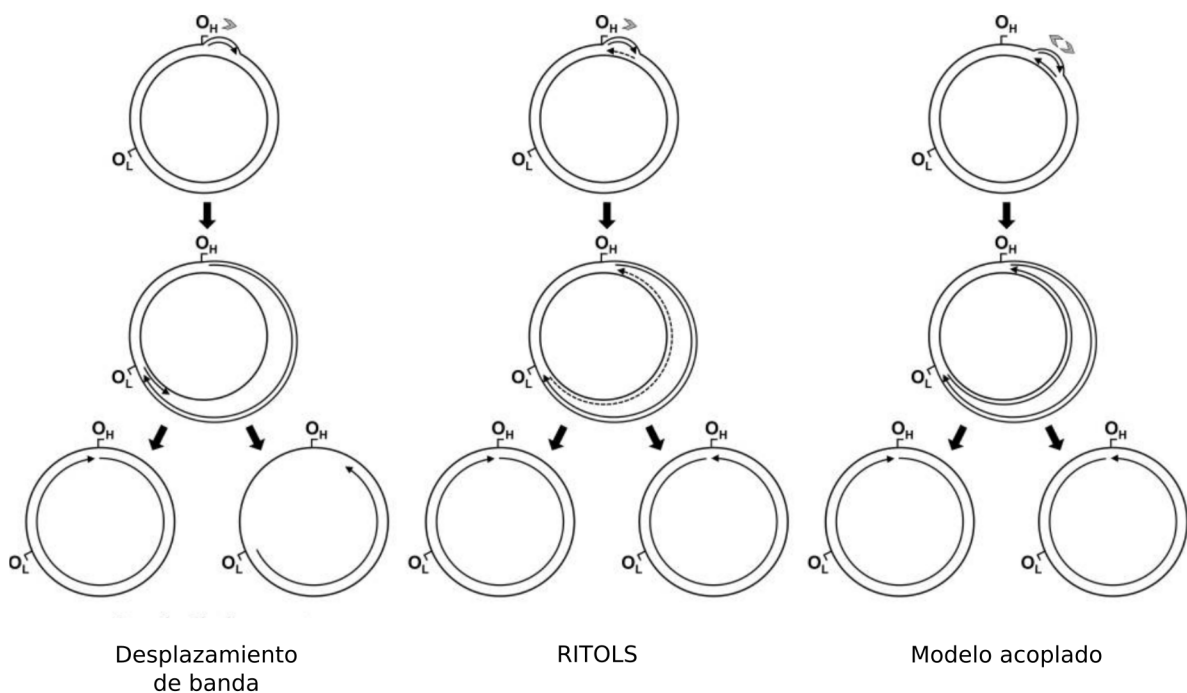


Figura 1.3: Distintos modelos propuestos para la replicación del ADN mitocondrial humano. Imagen originaria del artículo de McKinney y Oliveira (2013).

Si bien no existe una explicación clara que explique cómo ocurre la replicación del ADN mitocondrial humano, existen varios modelos que intentan explicar dicho fenómeno. Estos modelos vienen esquematizados en la figura 1.3, y se consideran generalmente 3: el modelo de *replicación acoplada*, el modelo *RITOLS* (en sus siglas en inglés *RNA Incorporated Through Out The Lagging Strand*), y el modelo de *desplazamiento de banda* (McKinney y Oliveira 2013; Holt y Reyes 2012). El primero de todos, el modelo de *replicación acoplada*, la síntesis del ADN

ocurre de forma unidireccional y asimétrica, con dos orígenes de replicación distintos: uno en el punto O_H de la denominada cadena líder y otro en el O_L de la llamada cadena retrasada (ver figura 1.2B). En ambos sitios la replicación comienza con la adición del RNA iniciador, sintetizado por la ARN polimerasa (McKinney y Oliveira 2013) y sustrato utilizado por la $pol\gamma$ para empezar la incorporación de los nucleótidos. Otro modelo considerado es el *RITOLS*, en el cual la replicación comienza en punto O_H en la cadena líder mientras que en la cadena retrasada se generan fragmentos de ARN. Es decir, la replicación del ADN mitocondrial humano es un dúplex en los que una de las dos cadenas se encuentra recubierta por ARN (Pohjoismaki y col. 2010).

Por otra parte, el modelo de *desplazamiento de banda* es similar al modelo *RITOLS* ya que la síntesis del ADN se da en ambas cadenas pero con la diferencia de que no se generan fragmentos de Okazaki (Clayton 1991). Como en el *RITOLS*, para que la replicación en ambas cadenas ocurra de forma coordinada existen dos puntos de comienzo de la replicación: O_H en la cadena líder y el O_L en la cadena retrasada (la cadena interior y exterior del esquema de la figura 1.4, respectivamente). La replicación se inicia en O_H donde la helicasa *Twinkle* (detallada en la sección 1.2.3) abre la cadena doble de ADN en dos cadenas sencillas. En la cadena líder la ARN polimerasa sintetizará un pequeño fragmento de ARN (el *primer* de ARN, coloreado en morado en la figura 1.4) (Frick y Richardson 2001; Kuchta y Stengel 2010); este fragmento se utilizará como cebador para la ADN polimerasa, que replicará el ADN desde la dirección 5' a la 3' mientras utiliza la cadena líder como molde y sintetiza una cadena sencilla de ADN complementaria generando como resultado una cadena doble de ADN copia del genoma original. Mientras tanto la cadena retrasada es rápidamente recubierta por unas proteínas llamadas *SSB* (de sus siglas en inglés *Single Stranded Binding protein*, sección 1.2.3, coloreadas en verde en la figura 1.4); estas proteínas aseguran la coordinación de la síntesis del ADN e impiden la transcripción del RNA por parte de la RNA polimerasa (Fusté y col. 2014), inhibiendo el comienzo de la replicación de la cadena retrasada. De esta forma, cuando se han replicado 2/3 partes de la cadena líder y la $pol\gamma$ ha sobrepasado el punto O_L , se genera un lazo de replicación en la cadena retrasada que será reconocido y utilizado por la ARN polimerasa para sintetizar un fragmento de ARN de unos 25 nt. Este fragmento marca el inicio de la replicación de la cadena retrasada (Fusté y col. 2014; Gustafsson, Falkenberg y Larsson 2016) donde la polimerasa tendrá que replicar un sustrato de ADN de cadena sencilla recubierto por SSB, por lo que el sistema cambia significativamente con respecto a la replicación de la cadena líder. Este mecanismo implica que la replicación de ambas cadenas está interconectada al comenzar la síntesis de la cadena retrasada cuando se han replicado 2/3 del total de la cadena líder. Después de este paso la elongación de ambas cadenas continúa hasta haber terminado el genoma por completo, resultado en dos copias idénticas del ADN original.

Este modelo se basa en estudios como los de Korhonen y col. (2004), donde consiguieron reconstituir un replisoma capaz de lograr la elongación de un ADN *in vitro* con un sistema simple de tres proteínas: la helicasa *twinkle*, la polimerasa γ y la SSB. Además, también vieron

que las interacciones entre las proteínas del sistema mitocondrial reconstituido parecen ser específicas, ya que la Twinkle no estimula la replicación de las polimerasas del bacteriófago T7 o T4, pese a compartir homología y ser estructural y funcionalmente similares (Graziewicz y col. 2004; Ye, Carrodeguas y Bogenhagen 1996; Spelbrink y col. 2001).

Este fenómeno hace que el estudio de las interacciones entre las proteínas requeridas para lograr la síntesis del ADN mitocondrial humano *in vitro* sea especialmente interesante, ya que parece ser fundamental para lograr la replicación del genoma mitocondrial.

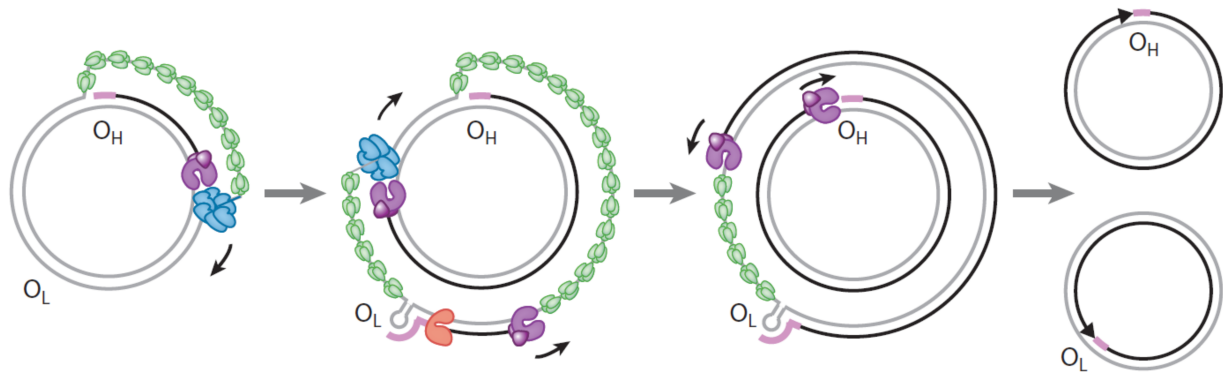


Figura 1.4: Representación gráfica del modelo de *desplazamiento de banda*. La replicación empieza en el punto O_H , donde se produce la apertura de la cadena doble por la helicasa, la replicación de la cadena sencilla por la polimerasa tras la síntesis del *primer* (en morado) y la rápida cobertura de la cadena sencilla generada por la SSB. Cuando se ha alcanzado dos terceras partes del genoma, en la zona O_L empieza la replicación de la cadena desplazada, donde la polimerasa se encarga de replicar la cadena sencilla recubierta por la SSB. (Imagen modificada de la referencia de Gustafsson, Falkenberg y Larsson (2016)).

1.2.3. Estructura y funcionamiento de las proteínas implicadas

En las secciones anteriores se ha comentado que son necesarias un mínimo de 3 proteínas para llevar a cabo la síntesis del ADN mitocondrial humano *in vitro*. Estas proteínas son:

Helicasa Twinkle

Entre sus funciones más conocidas, las helicasas son enzimas cuya función es abrir la cadena doble de ADN en dos cadenas sencillas. Son motores moleculares capaces de producir movimiento a partir del consumo de energía, en el caso particular de la Twinkle, en forma de ATP. Recorre el ADN desde la dirección 5' a la 3' (Korhonen, Gaspari y Falkenberg 2003; Fernández-Millán y col. 2015), y además de abrir la cadena doble de ADN, se ha reportado que una de sus funciones podría ser ayudar en la unión de la cadena de ADN a su complementaria, ya que es capaz de reclutar fragmentos de ADN de cadena sencilla acelerando el proceso (Sen y col. 2012).

El mecanismo de apertura propuesto es similar al de otras helicasas del mismo tipo, que consiste en abrazar una de las cadenas del ADN en el canal central de la enzima, dejando la otra cadena libre por fuera del hexámero, de forma que la proteína se mueve trepando como un motor

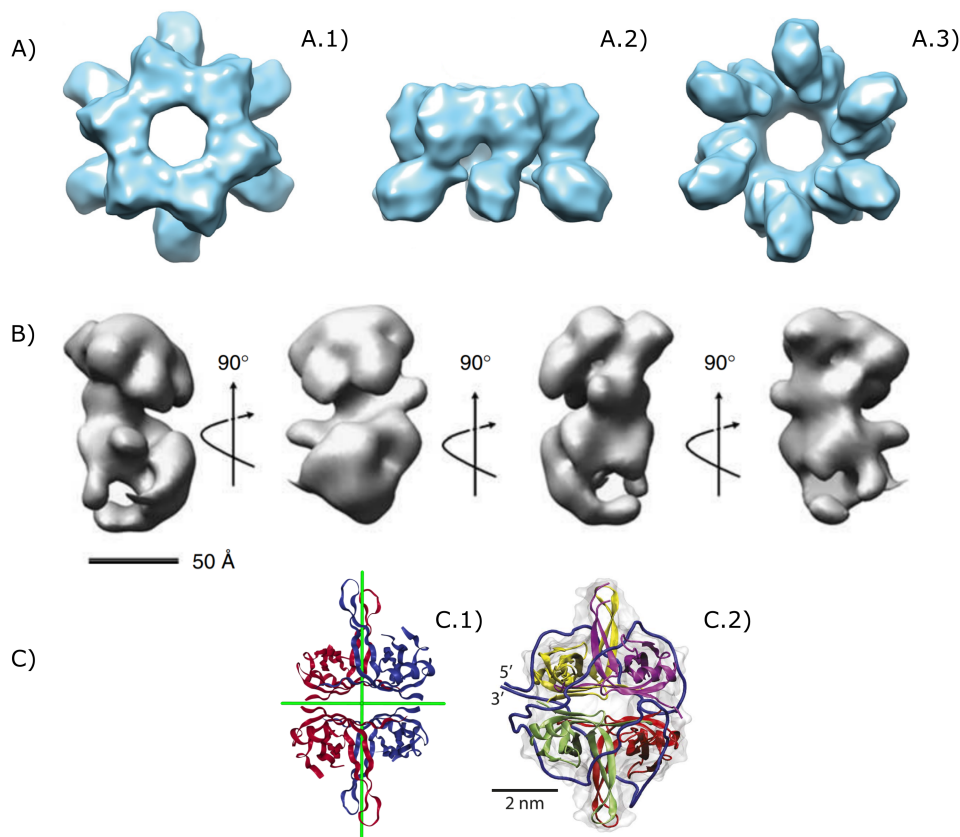


Figura 1.5: Estructura cristalográfica de las proteínas implicadas en la replicación. A) Helicasa hexamérica *Twinkle*, vista superior (A.1), lateral (A.2) e inferior (A.3). B) Pol γ , es una holoenzima formada por tres subunidades en la que una es el núcleo catalítico (con la forma de mano característica de estas enzimas) y dos se unen entre sí (formando una subunidad con forma de champiñón), permaneciendo unidas a la subunidad catalítica. C) estructura cristalográfica de la SSB. C.1) tetrámero de la mtSSB formado por cuatro monómeros (separados por la línea verde de simetría). C.2) SSB de *E.Coli*, sobre la que se ha modelizado la unión del ADN en el modo 65. (Imágenes obtenidas de (Fernández-Millán y col. 2015; Yakubovskaya y col. 2007; Curth, Urbanke y Kang 1997; Suksombat y col. 2015)).

molecular de manera que cada una de sus subunidades se mueve de forma secuencial uniéndose al ssDNA una detrás de otra (Fernández-Millán y col. 2015; Korhonen, Gaspari y Falkenberg 2003; Jeong, Levin y Patel 2004; Patel 2009; Jeong, Rajagopal y Patel 2013; Sun y col. 2011; Itsathitphaisarn y col. 2012; Picha y Patel 1998; Egelman y col. 1995).

Polimerasa Pol γ

La enzima encargada de sintetizar la cadena doble de ADN es la ADN polimerasa. Utiliza una hebra de cadena sencilla de ADN como molde, y va leyendo secuencialmente las posiciones de la cadena molde mientras incorpora los nucleótidos correspondientes en el extremo 3' del ADN que se está replicando (ver figura 1.4). A diferencia de otras polimerasas, pol γ agrupa las funciones de replicación y reparación en la misma enzima (Kaguni 2004; Graziewicz, Longley y Copeland 2005). También es capaz de detectar los nucleótidos que la propia enzima ha

incorporado de forma incorrecta (en un proceso llamado exonucleólisis, que se describirá más adelante), disminuyendo por lo tanto la probabilidad de generar una copia de ADN con una o más posiciones mutadas (Longley y col. 1998; Olson y Kaguni 1992). Esta enzima tiene un rango óptimo de pH (7.5-9.5), requiere un ión divalente para llevar a cabo su función (Mg^{+2}) y tiene alta afinidad por los dNTP. Estructuralmente está formada por 3 subunidades que cumplen distintas funciones (figura 1.5)(Ye, Carrodegua y Bogenhagen 1996; Kaguni 2004; Yakubovskaya y col. 2006; Yakubovskaya y col. 2007; Johnson y col. 2000):

- Subunidad catalítica ($pol\gamma$ A): Utiliza la energía liberada en la hidrólisis del grupo fosfato de los nucleótidos para llevar a cabo su incorporación en el extremo 3' del primer, produciendo así la cadena doble de ADN a partir de la cadena molde. Su estructura se asemeja a la forma de la mano derecha (ver figura 1.5), con subdominios conocidos como los *dedos*, la *palma* y el *pulgar*. El centro activo de la polimerasa, que contiene aminoácidos esenciales para la catálisis, está localizado en el subdominio de la palma, que forma la base del valle formado por los dedos y el pulgar. El subdominio de los dedos es esencial para el reconocimiento y unión de los nucleótidos, dejando el pulgar como encargado de la unión al sustrato de ADN (Rothwell y Waksman 2005). Situado a continuación de la palma se encuentra la región encargada de llevar a cabo la actividad exonucleolítica, que elimina los nucleótidos incorporados erróneamente. Además, el núcleo catalítico es homólogo al de la polimerasa del bacteriófago T7 (Graziewicz y col. 2004). El proceso de incorporación del nucleótido implica una sucesión de cambios de conformación y estados intermedios en la subunidad catalítica, de forma que se produce un proceso cíclico cada vez que se añade un nuevo nucleótido sobre el *primer*. Durante este proceso la subunidad catalítica puede estar en dos estados posibles: con los dedos cerrados o con los dedos abiertos. Así, el ciclo comienza con la unión de un nucleótido cualquiera (dNTP) a la polimerasa, formando un complejo polimerasa-dNTP-ADN; si el nucleótido es el complementario a la posición correspondiente del molde de ADN, los dedos se cierran a través de una serie de estados intermedios formando una estructura estable. Después se forman una serie de enlaces covalentes que preparan el núcleo activo para llevar a cabo la hidrólisis del nucleótido. Posteriormente se produce el enlace fosfodiéster entre carbonos y la liberación del pirofosfato (PPi), provocando al mismo tiempo el cambio de estado al estado abierto de la estructura con forma de mano. Durante este paso la polimerasa translocará a la siguiente posición del ADN, y volverá al estado inicial dejando el extremo 3' del *primer* libre, susceptible de unir un nuevo nucleótido (Berman y col. 2007; Steitz 2006; Morín y col. 2015). Si el nucleótido incorporado es incorrecto se perturbará la estructura formada por el núcleo catalítico y el dúplex de ADN, provocando que el *primer* migre hacia la región exonucleolítica, donde se elimina el nucleótido erróneo (Vega, Blanco y Salas 1999; Donlin, Patel y Johnson 1991; Ibarra y col. 2009). Este proceso hace que $pol\gamma$ se caracterice por su alta fidelidad, ya que se ha estimado que comete un error cada medio millón de nucleótidos introducidos (Lee y Johnson 2006; Johnson y Johnson 2001b). Esta

actividad exonucleasa funciona en la dirección 3'→5', también requiere un ión divalente para poder funcionar (Kaguni 2004) y tiene lugar de forma intramolecular (Johnson y Johnson 2001a). Además se sabe que la actividad exonucleasa no altera la eficiencia del proceso de polimerización del ADN, ya que se ha estimado que dicha actividad supone un 0.14% del total. No obstante no se trata de una actividad procesiva, lo que significa no se eliminan varios nucleótidos cada vez que hay una incorporación incorrecta, sino que cada hidrólisis llevada a cabo para eliminar un nucleótido requiere que el *primer* migre hacia la región exonucleasa de la subunidad catalítica.

- Subunidad accesoria: Esta formada por las otras dos subunidades restantes (pol γ B) (Carrodeguas y col. 2001), y se ha demostrado que su unión al núcleo catalítico aumenta el número de nucleótidos que la enzima es capaz de replicar antes de soltarse del ADN (procesividad), así como mejora la capacidad de polimerización y corrección de errores de la holoenzima (Lim, Longley y Copeland 1999; Johnson y col. 2000; Lee y col. 2010; Graziewicz, Longley y Copeland 2005). Por si sola, la subunidad pol γ A replica unos \sim 100nt, pero se su unión con la pol γ B incrementa la afinidad de ambas proteínas al ADN, lo que consigue aumentar la procesividad a longitudes mayores a \sim 1000 pares de bases, dependiendo de las condiciones experimentales (Lim, Longley y Copeland 1999). Además, una vez la holoenzima se ha unido al ADN, los dos monómeros que forman pol γ B favorecen la colocación óptima del *primer* en el interior de la enzima, ya que sitúa el extremo 3' en el núcleo catalítico, lo que estimula la formación del enlace fosfodiéster con el dNTP entrante (Lee y col. 2010).

La función que lleva a cabo la polimerasa hace que cualquier mutación o variación en su estructura pueda resultar de vital importancia para la célula. El déficit del número de moléculas de ADN necesarias para llevar a cabo una función mitocondrial determinada, o la introducción de mutaciones en el material genético ocasionadas por una polimerasa que no lleva a cabo su función correctamente puede dar lugar al desarrollo de diversos tipos de enfermedades. En el estudio de Luoma y col. (2004) relacionan mutaciones en pol γ con el Parkinson o con la aparición de la menopausia de forma prematura. También se ha encontrado que mutaciones en la subunidad catalítica de esta enzima ocasionen Oftalmoplegia externa progresiva (PEO), una enfermedad rara que se caracteriza por la debilidad muscular ocular y del párpado superior (Graziewicz y col. 2004; hudson y Chinnery 2006). Por otra parte, mutaciones en el dominio exonucleolítico pueden generar la aparición de enfermedades como miopatía mitocondrial (enfermedad caracterizada por la aparición progresiva de debilidad en la musculatura esquelética) o el síndrome de Alpers, una enfermedad multisintomática caracterizada por epilepsia intratable, regresión psicomotora y fallo hepático, que aparece como consecuencia de la depleción del ADN mitocondrial (Euro y col. 2011; Szczepanowska y Foury 2010; Atanassova y col. 2011).

SSB

La SSB es una proteína que se une a la cadena sencilla de ADN, evitando su degradación, haciendo de diana para otras proteínas y generando el sustrato nucleo-proteico sobre el que algunas enzimas deben actuar (Kornberg y Baker 1992; Wong y col. 2008; Roy y col. 2009; Oliveira y Kaguni 2010; Farr, Wang y Kaguni 1999; Myers y Romano 1988).

Algunos tipos de SSB están compuestas por cuatro subunidades iguales dispuestas simétricamente formando un tetrámero (como por ejemplo la SSB de mitocondria humana (mtSSB) o la SSB de *Escherichia Coli* (EcoSSB) (Curth, Urbanke y Kang 1997), cuya estructura cristalina se muestra en la figura 1.4 C.1). Cada monomero presenta un dominio que une nucleótidos y oligosacaridos (OB-fold), y son los encargados de estabilizar las interacciones proteína-ADN (Flynn y Zou 2010; Murzin 1993); además, permiten a los tetrámeros organizar un número variable de nucleótidos (Shereda y col. 2008). En experimentos *in vitro* llevados a cabo con EcoSSB, se ha encontrado organiza el ADN en dos modos principales de unión, 35 y 65 nucleótidos (Lohman y Overman 1985). La unión en uno u otro modo lo determinan el tipo y concentración iónica del entorno, así como la densidad de proteína unida al ADN (Lohman y Ferrari 1994; Ferrari, Bujalowski y Lohman 1994).

La SSB de mitocondria humana (mtSSB) es fundamental en el proceso de replicación del ADN mitocondrial humano. Es una proteína esencial para mantener los niveles de ADN mitocondrial, y tiene un rol vital en las fases de iniciación y elongación de la replicación (Maier y col. 2001; Ruhanen y col. 2010). Cubre la cadena retrasada y mantiene interacciones funcionales con el resto de proteínas implicadas en la horquilla de replicación incluida la estimulación de la pol γ o la Twinkle (Kornberg y Baker 1992; Wong y col. 2008; McKinney y Oliveira 2013; Farr, Wang y Kaguni 1999; Williams y Kaguni 1995). Además, ayuda en la organización del ADN mitocondrial en los nucleoides (Bogenhagen y col. 2003) y podría estar involucrada en el proceso de reparación del genoma mitocondrial (Wong y col. 2008). La mtSSB está formada por cuatro subunidades de 16kDa que contienen un dominio OB (Curth, Urbanke y Kang 1997) formando una estructura similar a la SSB de E.Coli, con quien comparte una serie de residuos en la región del extremo amina (Raghunathan y col. 1997). Ambas SSB comparten propiedades físico-químicas, demostrándose que la mtSSB también presenta un tamaño variable de unión de 50-70 nt por tetrámero (Curth y col. 1994). Estas similitudes sugieren que la mtSSB podría cambiar de modo en función del proceso fisiológico o el contenido salino del medio, tal y como se ha demostrado con la SSB de E.Coli (Lohman y Ferrari 1994; Overman y Lohman 1994).

Existen estudios donde utilizan espectroscopia de fuerzas para analizar el efecto que tienen distintas tensiones aplicadas sobre complejos SSB-ADN (Suksombat y col. 2015; Maffeo y Aksimentiev 2017; Bell, Liu y Kowalczykowski 2015; Zhou y col. 2011). Estos estudios analizan la dinámica de unión de proteínas individuales sobre sustratos de ADN que se encuentran bajo tensión, por lo que permiten obtener información sobre las constantes de equilibrio y la interacción ADN-SSB. De esta forma han obtenido que la SSB es capaz de difundir a través del ADN *reptando* en pasos de unos pocos nucleótidos (1-4nt) (Zhou y col. 2011), lo que convierte

al polímero SSB-ADN en un sustrato dinámico en movimiento constante (Zhou y col. 2011; Ha, Kozlov y Lohman 2012).

1.3. *In singulo*: sistemas biológicos desde el punto de vista de las moléculas individuales

1.3.1. Técnicas de manipulación de moléculas individuales

La célula es una entidad dinámica en la que tienen lugar multitud de procesos que involucran movimientos y desplazamientos, desde transporte de la propia célula o proteínas hasta síntesis del ADN. Todos ellos tienen lugar gracias a la aparición de fuerzas que los hacen posibles de forma que la tensión se convierte en una variable más de las reacciones biológicas. La fuerza altera procesos tan fundamentales como plegamiento de proteínas (Rief y col. 1997; Carrion-Vazquez y col. 1999), el comportamiento de motores moleculares (Keller y Bustamante 2000; Morín y col. 2015; Goel, Astumian y Herschbach 2003; Wuite y col. 2000) o estiramiento de moléculas de ADN (Smith, Cui y Bustamante 1996).

La capacidad de estudiar estos procesos ha evolucionado enormemente en las últimas décadas mediante el desarrollo de nuevas técnicas que permiten aislar moléculas individuales, ejercer fuerzas sobre ellas y estudiar sus movimientos en tiempo real (Neuman y Nagy 2008; Bustamante, Bryant y Smith 2003). A diferencia de las técnicas tradicionales donde los resultados provienen del promediado de todas las interacciones y mediciones de miles o millones de moléculas, estas técnicas permiten acceder a las fluctuaciones y dinámica del movimiento de moléculas individuales, así como estudiar el efecto de tensiones aplicadas en el sistema. Sus aplicaciones varían desde la manipulación de células individuales de unos $\sim 100\mu\text{m}$ (Hormeño y Gonzalez 2006) al estudio de polimerasas mientras replican un ADN en tiempo real (Moffitt y col. 2008; Bustamante, Bryant y Smith 2003; Wuite y col. 2000). Las técnicas más utilizadas en experimentos de moléculas individuales son las pinzas ópticas (OT), el microscopio de fuerza atómica (AFM) y las pinzas magnéticas (MT). En la tabla 1.1 se muestra una comparativa de los instrumentos existentes (Neuman y Nagy 2008).

El instrumento de las pinzas ópticas se consolida como un sistema idóneo para los estudios de moléculas individuales, ya que permite atrapar partículas de pequeño tamaño (de $\sim 20\text{nm}$ a μm) y ejercer fuerzas de más de 100pN . Al mismo tiempo es capaz de detectar el movimiento tridimensional que lleva a cabo la partícula atrapada, con precisión nanométrica y del orden del milisegundo, lo que permite analizar la dinámica de dicha partícula (Hormeño y Gonzalez 2006; Williams 2002; Gonzalez 2013; Moffitt y col. 2008)

Aunque se explicará en detalle en la sección 3.1, en términos generales las pinzas ópticas consisten en un láser focalizado en un punto, de forma que todas las partículas dieléctricas que se sitúan alrededor de dicho punto experimentan una fuerza que las empuja hacia el punto focal. Esto hace que el sistema se comporte como una trampa óptica en la que una partícula

	Pinzas ópticas	Pinzas magnéticas	Microscopía de fuerza atómica
Rango de fuerzas (pN)	0.1-100	0.01-10	$10-10^5$
Desplazamiento (nm)	$0.1-10^5$	$5-10^4$	$0.5-10^4$
Resolución espacial (nm)	0.1-2	5-10	0.5-1
Resolución temporal (s)	10^{-4}	$10^{-1}-10^{-2}$	10^{-3}
Propiedades	Manipulación específica de moléculas individuales. Tiene la mayor resolución en fuerzas (1pN)	Puede introducir torsiones en el sistema	Resolución espacial alta

Tabla 1.1: Tabla comparativa con los distintos instrumentos: pinzas ópticas, pinzas magnéticas y microscopio de fuerza atómica.

dieléctrica quedará atrapada en el punto focal, de forma que se asimila a una partícula unida por un muelle elástico a dicho punto.

Este comportamiento hace que las pinzas ópticas permitan medir las fuerzas que generan los movimientos de la partícula atrapada, por lo que es un instrumento de gran utilidad para estudiar determinados sistemas biológicos como por ejemplo experimentos donde partículas dieléctricas cubiertas por kinesinas son transportadas a través de microtúbulos, donde se pueden medir las fuerzas que son capaces de ejercer dichas kinesinas (en torno a $\sim 5-6$ pN) u obtener propiedades sobre la cinética de su movimiento (Block, Goldstein y Schnapp 1990; Svoboda y Block 1994). Las pinzas ópticas también han servido para obtener las fuerzas de enlace que existen entre los enlaces de puente de hidrógeno en determinadas condiciones fisiológicas (Naranjo y col. 2017), información de gran utilidad para estudiar la estabilidad de los enlaces biológicos. Otros experimentos de gran relevancia han sido experimentos donde moléculas de ADN de cadena doble y cadena sencilla son estirados, obteniendo sus propiedades elásticas y su comportamiento en distintas condiciones experimentales, donde se ha demostrado que los enlaces entre nucleótidos se rompen en torno a $\sim 12-15$ pN dependiendo de las condiciones experimentales, así como a fuerzas altas (~ 80 pN) se logra desestructurar la estructura de cadena doble de ADN a la vez que se rompen los enlaces de apilamiento de unión entre nucleótidos (Smith, Cui y Bustamante 1996; Bosco, Camunas-Soler y Ritort 2014).

Precisamente son estos estudios de estiramiento de ADN los que han servido de base para los experimentos llevados a cabo en esta tesis. Se han utilizado moléculas de ADN sometidas a tensión para estudiar el efecto que producen las fuerzas sobre la replicación, obteniendo información sobre las energías implicadas en el proceso de incorporación del nucleótido y la mecánica de la replicación de polimerasa, analizando una sola enzima en cada experimento. También hemos podido estudiar la unión de la SSB al ADN y la interacción de un sistema polimerasa-SSB, reduciendo los experimentos a una sola polimerasa replicando un solo ADN.

1.3.2. La fuerza como coordenada termodinámica

Muchos procesos moleculares implican cambios conformacionales grandes que acontecen dentro de las propias moléculas o afectan a la interacción entre ellas. Estos cambios conformacionales pueden implicar cambios en la extensión entre moléculas, ser parte del movimiento de un motor molecular a lo largo de una estructura, o producir la deformación de una enzima cuando se une a un sustrato. Dichos cambios pueden verse modificados por efecto de fuerzas externas aplicadas sobre el sistema, ya que la fuerza mecánica puede afectar a la cinética de la reacción, desplazar su equilibrio, modificar el ratio de la reacción o cambiar el perfil de la energía libre del sistema (Bustamante y col. 2004; Tinoco y Bustamante 2002).

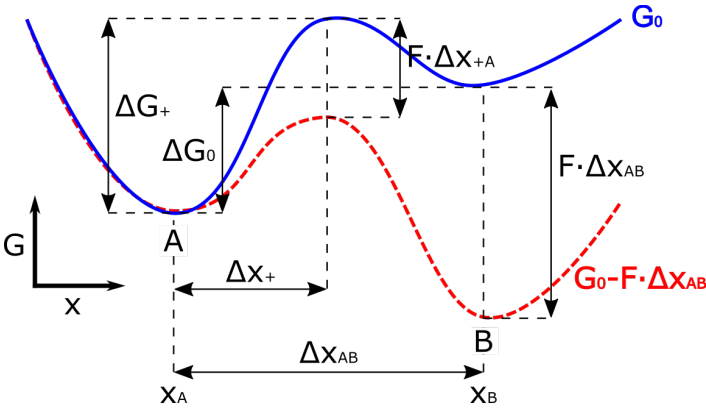


Figura 1.6: Representación esquemática del efecto de la fuerza sobre la energía libre. El eje horizontal representa la coordenada mecánica (ej: cambio conformacional en un motor molecular) y el eje vertical la energía libre. La línea azul (G_0) representa la curva de transición entre los dos estados A y B cuando no hay fuerza aplicada. La línea roja discontinua representa la misma curva bajo el efecto de una fuerza. La cruz representa el estado de transición.

La figura 1.6 representa un diagrama esquemático del efecto de una fuerza sobre una reacción en la que un estado A es convertido a un estado B, correspondientes a estados observables del sistema (ej: posiciones de una enzima a lo largo del ADN) (Bustamante y col. 2004; Tinoco y Bustamante 2002). Cada estado ocupa una posición en la coordenada x , siendo x_A y x_B los puntos locales de energía libre ocupados por A y B, respectivamente. En ausencia de fuerza la diferencia de energía entre A y B es:

$$\Delta G(F = 0) = \Delta G^0 + k_B T \ln \frac{[A]}{[B]} \quad (1.1)$$

ΔG^0 es la energía libre de reacción a 0 fuerza, $[A]$ y $[B]$ representan las probabilidades de poblar el estado A o B respectivamente, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. La aplicación de una fuerza cambia el perfil energético de la transición (figura 1.6):

$$\Delta G(F) = \Delta G^0 - F(x_A - x_B) + k_B T \ln \frac{[A]}{[B]} \quad (1.2)$$

Donde $x_B - x_A = \Delta x_{AB}$ (figura 1.6) es el cambio conformacional asociado a la transición entre los estados A y B. En equilibrio $\Delta G = 0$, luego:

$$\Delta G^0 - F \cdot \Delta x_{AB} = -k_B T \ln \frac{[A]_{eq}(F)}{[B]_{eq}(F)} = -k_B T \ln K_{eq}(F) \quad (1.3)$$

Finalmente se obtiene que la fuerza modifica la constante de equilibrio de la reacción de la

siguiente forma:

$$K_{eq}(F) = K(0) \cdot e^{-\frac{F \cdot \Delta x_{AB}}{k_B T}} \quad (1.4)$$

Se puede seguir un razonamiento análogo (Tinoco y Bustamante 2002) para explicar el efecto de la fuerza sobre la tasa de transición del estado A al B, llegándose a una expresión del mismo tipo:

$$k_{A \rightarrow B}(F) = k(0)_{A \rightarrow B} \cdot e^{-\frac{F \cdot \Delta x_{+A}}{k_B T}} \quad (1.5)$$

Donde $\Delta x_{+A} = x_{+} - x_A$ representa el cambio en distancia al estado de transición. Por lo tanto la fuerza puede utilizarse para modificar tanto la tasa de una reacción entre dos estados como para incrementar la probabilidad de encontrar el sistema en uno u otro estado, lo que convierte a la fuerza aplicada sobre un sistema en una variable de gran interés a estudiar, en particular en sistemas biológicos en los que tensiones mecánicas pueden tener un papel fundamental (cambios de estado de plegamiento a desplegamiento de proteínas, inhibir o estimular el movimiento de un motor molecular a lo largo del ADN, etc).

1.3.3. Teoría del atrapamiento óptico

Se ha comentado anteriormente que las pinzas ópticas permiten atrapar partículas de pequeño tamaño. Para ello utilizan la propiedad de la luz de transportar momento angular y lineal para interactuar con la materia en función de su índice de refracción, así como la propiedad de los fotones de ejercer presión sobre la materia (Hormeño y Gonzalez 2006; Smith, Cui y Bustamante 2003; Ashkin 1970; Ashkin y col. 1986).

Si entendemos la luz como un conjunto de fotones que viajan con un determinado momento, una partícula dieléctrica sentirá dos tipos de interacciones cuando se encuentra iluminada por un haz de luz, la fuerza de *scattering*, producida por los fotones que impactan sobre la partícula y que la impulsan en la dirección de propagación del haz, y la fuerza de *gradiente*, debida al efecto del gradiente de campo eléctrico que produce la luz y que la moverán hacia la zona de mayor intensidad de campo eléctrico del haz (Smith, Cui y Bustamante 2003; Ashkin 1970; Ashkin y col. 1986). En el esquema de la figura 1.7 se ilustra el efecto que ejerce la luz sobre una esfera que es iluminada por un haz láser con perfil de intensidad gaussiano. En el diagrama de la izquierda, una partícula dieléctrica de índice de refracción alto se encuentra sumergida en un haz láser sin focalizar. Sean **a** y **b** las trayectorias trazadas por dos fotones distintos que al atravesar la esfera se difractan, y como consecuencia, cambian su momento. El cambio de momento se transfiere a la esfera, generando las fuerzas F_b y F_a . Dado que un mayor número de fotones siguen la trayectoria **b** por estar más cercana al máximo de intensidad, $F_b > F_a$, luego la esfera tenderá a permanecer en el centro del haz, cerca de la zona del máximo de intensidad.

Sin embargo, para lograr el atrapamiento óptico tridimensional, hay que corregir la fuerza de *scattering*, y para ello hay que focalizar el haz de luz láser en un punto concreto (imágen 1.7, B)); lo que se consigue usando un objetivo de microscopio¹. En el punto focal el gradiente de campo eléctrico será máximo, luego se generará una fuerza de gradiente que apuntará siempre en la dirección de máxima intensidad (también conocido como punto focal), manteniendo la esfera en dicha región y logrando el atrapamiento tridimensional (Ashkin 1970; Ashkin y col. 1986).

Esto implica que en la cercanía de la trampa óptica, la fuerza que experimenta la esfera es proporcional a su separación del punto focal, por lo que la trampa óptica se comporta como un muelle elástico que sigue la ley de *Hooke*:

$$F = -k \cdot x_F \quad (1.6)$$

La constante k es la constante elástica, que dependerá de las características del instrumento, de la potencia de los láseres, el tamaño de las partículas atrapadas y su índice de refracción. Mientras que x_F es la separación de la partícula desde la posición de equilibrio dentro de la trampa.

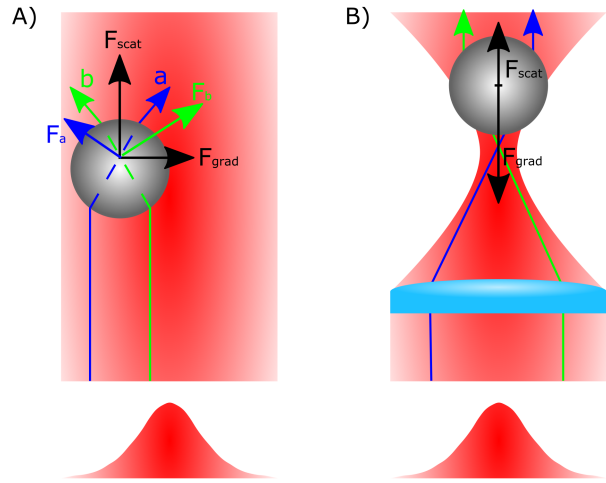


Figura 1.7: Fuerzas actuando en una esfera dieléctrica que se encuentra en un haz láser con un perfil de intensidad gaussiano. A) El láser no está focalizado. Los rayos **a** y **b** atraviesan la esfera generando las fuerzas de *scattering* y *gradiente*, estando esta última dirigida hacia el centro del haz ya que $F_b > F_a$. B) El láser está focalizado en un punto. Si la esfera se encuentra entre la lente y el punto focal, las dos fuerzas resultantes, *scattering* y de *gradiente* tenderán a ir hacia el punto focal; si se encuentra más alejada del punto focal, la fuerza de gradiente superará a la de *scattering* y la esfera tenderá a situarse en el punto focal.

¹En la sección 3.1 se detallan los materiales y el instrumental empleado en la fabricación de las pinzas ópticas.

Objetivos

En el presente trabajo de tesis se han abordado los siguientes objetivos:

- **1) Caracterizar el efecto del proceso de replicación del ADN sobre el modo de unión de mtSSB al ADN de cadena sencilla:** Se ha demostrado que la mtSSB se une al ADN en varios modos de unión que podrían depender del proceso fisiológico, pero sin embargo se desconoce si en la replicación predomina uno u otro. Para comprender mejor el funcionamiento de mecanismo de replicación del ADN mitocondrial humano, en esta tesis pretendemos determinar si existe un modo de unión predominante, lo que ayudará a comprender en funcionamiento de este sistema. Para ello:
 - Analizaremos la unión de la mtSSB al ADN en distintas condiciones experimentales de concentración de sal y proteína. Recurriremos a las pinzas ópticas para ejercer fuerzas sobre un sistema de cadena sencilla de ADN, y veremos como las tensiones aplicadas en sustratos ssDNA-mtSSB afectan a la estabilidad del polímero y de las uniones mtSSB-ssDNA.
 - Utilizaremos el modelo físico-matemático del *Freely Jointed Chain* para estudiar el complejo mtSSB-ssDNA como un polímero, lo que nos permitirá obtener el número de nucleótidos que une cada mtSSB en cada condición experimental, así como qué porcentaje de ssDNA se cubre por completo con mtSSB.
 - Pretendemos diseñar un sistema experimental que simule *in vitro* la replicación de la cadena líder, lo que nos ayudará a determinar si existe algún modo de unión predominante en dicho proceso. Para ello nos valdremos de las pinzas ópticas para ejercer tensiones sobre una horquilla de replicación mientras la polimerasa de $\phi 29$ abre dicha horquilla y se produce la unión de la mtSSB al mismo tiempo.
 - Aplicaremos el mismo modelo físico-matemático para obtener los nucleótidos organizados por las mtSSB en las condiciones de replicación de la cadena líder. Esto nos permitirá obtener el modo de unión relevante en la replicación.

- **2) Determinar la acción coordinada de la polimerasa y las SSB mitocondriales durante la replicación de la cadena retrasada del ADN:** En la replicación de la cadena retrasada la polimerasa γ debe replicar un ADN cubierto por mtSSB, la cual se une al ADN con alta afinidad. Sin embargo, estudios anteriores han demostrado que la mtSSB es beneficiosa para la replicación de la cadena retrasada, lo que implica que debe existir algún mecanismo que facilite la liberación de la mtSSB una vez unida. Por ello pretendemos recrear la replicación de la cadena retrasada *in vitro* con el sistema de pinzas ópticas y estudiar cómo afectan las tensiones a la estabilidad del sistema.
 - Primero analizaremos el mecanismo de replicación de la polimerasa γ . Para ello utilizaremos un ADN mixto de cadena sencilla y cadena doble replicable por la polimerasa sobre el que aplicaremos fuerzas para comprobar cómo afectan a su dinámica y velocidad de replicación.

- Modificaremos un modelo ya existente que predice la curva de fuerza-velocidad de la polimerasa para introducir el efecto de la estructura secundaria en el ADN. Además, comprobaremos si dicho modelo es extensible a otras polimerasas similares como es la del bacteriófago T7.
- Analizaremos el efecto que tiene introducir la mtSSB en la replicación cuando el sustrato está sujeto a fuerzas mecánicas y aplicaremos el mismo modelo que en los casos anteriores. Analizaremos variantes de la mtSSB conocidas por tener un efecto inhibitorio sobre la capacidad de replicación de la polimerasa γ . Estos experimentos nos darán información sobre qué elementos de la estructura de la mtSSB son susceptibles de interactuar con la polimerasa γ .
- Estudiaremos las consecuencias que tiene introducir en el sistema una SSB heteróloga de la mtSSB como es la SSB de E.Coli, también un tetrámero, lo que nos dará información sobre mecanismos específicos de interacción polimerasa-SSB.
- Modificaremos los modelos físico-matemáticos existentes para explicar la replicación de un ADN en presencia de distintos tipos de SSB, así como el efecto de fuerzas mecánicas aplicadas sobre el sistema.
- Analizaremos el efecto que tiene sobre la replicación la presencia de una SSB completamente distinta a la del propio sistema. Para ello llevaremos a cabo experimentos de replicación con la polimerasa del bacteriófago T7 en presencia de su propia SSB (un dímero), la SSB de la mitocondria humana y la SSB de E.Coli.

Materiales y métodos

3.1. Las pinzas ópticas

3.1.1. Montaje experimental de las pinzas ópticas

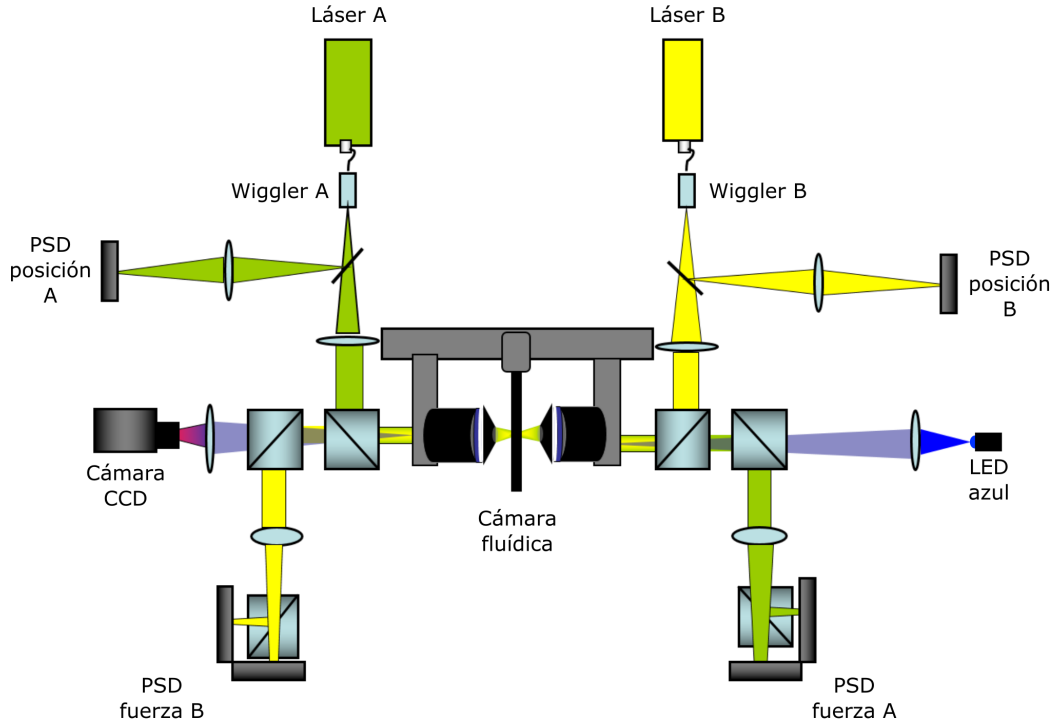


Figura 3.1: Dibujo esquemático del recorrido de los láser, señalizados con distintos colores. El haz se divide en dos mediante un divisor de haz. Uno se concentra en un detector de posición (*PSD*). El otro se focaliza sobre la cámara fluidica mediante uno de los objetivos, donde se produce el atrapamiento óptico y la deflexión de la luz, que es recogida de nuevo por el otro objetivo e ilumina el *PSD* asociado a la fuerza. Al ser un sistema contrapropagante, el otro láser sigue un recorrido análogo focalizado en sus propios *PSD*. La figura ha sido modificada de la referencia Lorenzo 2015.

El montaje de las mT que se ha empleado en esta tesis se muestra en la figura 3.1, cuyo diseño está registrado en la patente de Bustamante y Smith (2005). Este equipo consta de dos láseres de diodo de la marca *Lumics (LU0808 M250-FBG)* que emiten en una longitud de onda de 808nm a una potencia máxima de 250mW. Se utiliza el infrarrojo porque a esa longitud de onda la luz no tiene ningún efecto en las muestras biológicas (Neuman y col. 1999; Ashkin, Dziedzic y Yamane 1987; Ashkin y Dziedzic 1987). Como se puede ver en la figura 3.1, los láser se disponen de forma contra propagante, y son focalizados a través de sendos objetivos de inmersión en agua (60 aumentos, marca *Olympus*, modelo *UPLASAPO 60 XW*). Esta disposición se utiliza para lograr tener una mayor apertura numérica (1.2), es decir, garantiza mayor entrada de luz (Neuman, Abbondanzieri y Block 2005). El diseño contrapropagante garantiza una mayor robustez y estabilidad a la trampa óptica ya que permite caracterizar la trampa óptica como un muelle elástico de constante elástica, k , independiente de factores externos tales como la temperatura (Smith, Cui y Bustamante 2003; Bustamante y Smith 2005; Lorenzo 2015).

Las mT funcionan de la siguiente forma: la luz que sale de uno de los diodos láser es dividida

con un divisor de haz en dos. Uno de estos haces se utiliza para medir distancia (de donde se extrae el valor de la extensión molecular) y el otro para medir fuerzas. El primero se utiliza para detectar los cambios en la posición de la trampa óptica y se focaliza sobre un fotodetector (*PSD* (posición), figura 3.1). El otro haz se focaliza sobre la cámara de fluidos a través de uno de los objetivos, siendo recolectado a la salida de la cámara por el otro objetivo. Después el haz se dirige hacia el otro *PSD* para detectar la fuerza (*PSD fuerza* en la figura 3.1) que sirve para medir la deflexión de la luz por la esfera atrapada en la trampa óptica. Al ser láser contra propagantes, la luz que sale del láser gemelo sigue un camino óptico análogo pero en dirección contra propagante. Para diferenciarlos entre sí se utilizan unos polarizadores que los polarizan linealmente en direcciones opuestas.

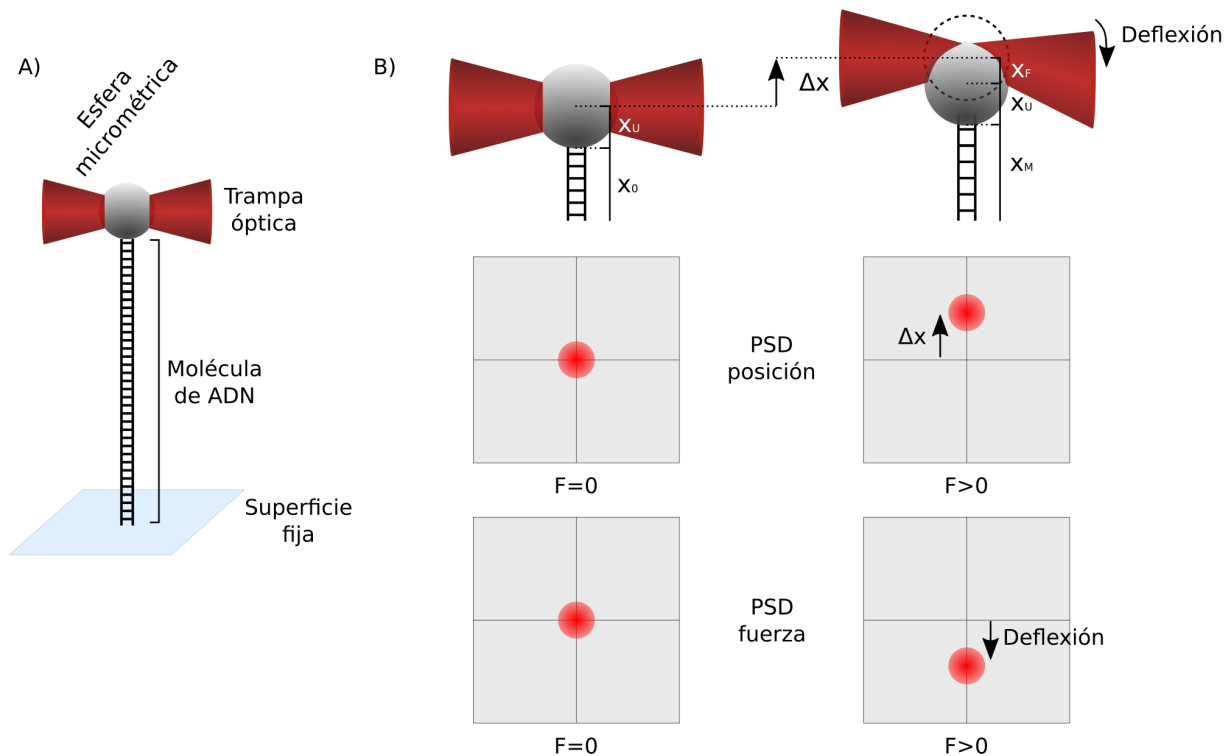


Figura 3.2: Esquema explicativo del sistema de medición de las pinzas ópticas. A) Diagrama que muestra una molécula de ADN unida a una superficie fija por un extremo, y por el otro unida a una esfera micrométrica que se encuentra atrapada en la trampa óptica. B) Detección de la fuerza ejercida sobre una molécula de ADN de extensión inicial x_0 . A la izquierda se muestran los *PSD* de posición (superior) y fuerza (inferior) en ausencia de fuerza. Para ejercer fuerza se mueve la trampa óptica una distancia Δx (esquema de la derecha), lo que produce la deflexión de la luz, y dicha deflexión es detectada en los *PSD* de fuerza.

El sistema es capaz de atrapar partículas de pequeño tamaño, y la forma en la que se miden las fuerzas y los desplazamientos o cambios en distancia es la siguiente: supongamos que tenemos una molécula de ADN de tamaño x_0 que se encuentra unida en un extremo a una superficie fija y por el otro a una esfera micrométrica de un material dieléctrico. La esfera se encuentra atrapada por la trampa óptica, tal y como se muestra en la figura 3.2A. Cuando la esfera se encuentra en equilibrio (se considera en equilibrio cuando no hay fuerza aplicada en el sistema, por lo que la esfera esté centrada en la trampa óptica) no se registra ningún cambio

en los *PSD* tanto de fuerza como de posición (ver figura 3.2B, esquema izquierdo). Entonces, la distancia medida entre las esferas será la siguiente:

$$x_{T,0} = 2 \cdot x_U + x_0 \quad (3.1)$$

Donde x_U es el radio de las esferas, y x_0 es el tamaño inicial de la molécula. Si ahora se mueve la trampa óptica a una nueva posición, $x_{T,1}$, tal y como se puede ver en la figura 3.2 esta nueva distancia vendrá dada por:

$$x_{T,1} = x_F + 2 \cdot x_U + x_M \quad (3.2)$$

Donde x_F es la distancia que se ha desplazado la esfera con respecto al centro de la trampa óptica, y x_M es la nueva extensión que tiene la molécula una vez estirada. Además, debido a que la esfera ha salido de la posición de equilibrio (esto es, la posición central de la trampa óptica), se producirá la deflexión de la luz, por lo que la posición del haz registrado en los *PSD* de fuerza cambiará con respecto a la posición inicial. Finalmente, si juntamos las ecuaciones 3.1 y 3.2 tenemos:

$$\Delta x = x_{T,1} - x_{T,0} = x_F + x_M - x_0 \quad (3.3)$$

La configuración de nuestro instrumento nos permite medir la fuerza que ejercemos en el sistema aprovechando la conservación del momento lineal, por lo que siguiendo el procedimiento descrito en la referencia de Lorenzo (2015), podemos asociar un desplazamiento del haz de luz en los *PSD* de fuerza, con la tensión aplicada en el sistema. Por otra parte, al poder caracterizar la constante elástica de la trampa óptica, k , y teniendo en cuenta la ley de *Hooke* (ecuación 1.6) se puede reconvertir la ecuación 3.3 en:

$$\Delta x = x_{T,1} - x_{T,0} = x_M - \frac{F}{k} + x_0 \quad (3.4)$$

Finalmente, suponiendo que la posición inicial de la molécula no tiene extensión al encontrarse completamente plegada, la extensión molecular del ADN sujeto entre las esferas vendrá dada por:

$$x_M = \Delta x + \frac{F}{k} \quad (3.5)$$

Siendo todas estas variables accesibles en el sistema de pinzas ópticas empleado en la tesis.

3.1.2. Sistema fluídico (Cámara fluídica)

Las condiciones en las que se lleva a cabo todo experimento biológico deben estar controladas y al mismo tiempo ser muy específicas. Para llevar a cabo los experimentos en unas condiciones controladas, hemos utilizado cámaras de microfluídica hechas de vidrio donde se

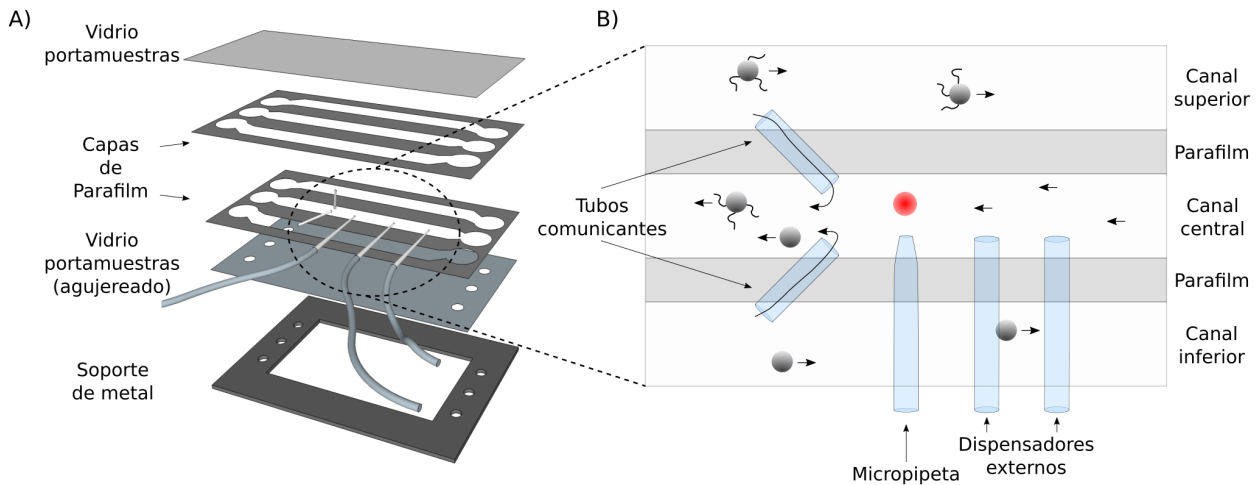


Figura 3.3: Sistema fluidoico empleado en nuestros experimentos. A) Montaje de la cámara de fluidos donde se llevarán a cabo los experimentos. La cámara dispone de varias capas: vidrio portamuestras, dos capas de parafilm con tubos de vidrio entre ellas (su función viene descrita en el texto principal), un vidrio portamuestras agujereado y un soporte de metal. El proceso de montaje se describe en el texto principal. B) Detalle de la parte central de la cámara de fluidos. Los dos tubos comunicantes comunican los canales superior e inferior con el canal central. En los canales superior e inferior se fluyen las esferas biofuncionalizadas. El punto rojo representa el láser focalizado de forma transversal a la cámara. Junto a la pipeta se sitúan los dispensadores externos por el que fluyen las disoluciones iónicas con el material biológico que se quiere estudiar.

pueden desarrollar los experimentos utilizando unas disoluciones tampón determinadas. Dichas cámaras se colocan entre los dos objetivos según se muestra en el diagrama 3.1.

Las cámaras se construyen con un *sandwich* de varias capas. La primera es un vidrio portamuestras de 24X60mm (*Menzel Gläser*) agujereado con una impresora láser (*C-200*, Universal Láser Systems) sobre el que se deposita una lámina de Parafilm en la que previamente se han grabado tres canales paralelos entre sí con la misma impresora (figura 3.3). Estos canales son los que se utilizarán en los experimentos para fluir el material biológico. Después se depositan varios tubos de vidrio, de los cuales dos, los *tubos comunicantes*, que tienen un diámetro interior de $25\mu\text{m}$ y exterior de $100\mu\text{m}$. Su función es permitir la comunicación entre los canales superior (por donde se fluirán las microesferas recubiertas de ADN, ver figura 3.4), y el central; y entre el canal inferior (por donde irán las esferas recubiertas de estreptavidina). Los otros tubos que también se han colocado (los dispensadores externos y la micropipeta, ver figura 3.3) tienen un diámetro interior de $40\mu\text{m}$ y exterior de $80\mu\text{m}$, comunican el canal central con el exterior de la cámara: dos de ellos, conectados con tubos de plástico a una jeringuilla externa (dispensadores externos), se utilizarán para fluir las disoluciones iónicas y/o proteínas de forma controlada sobre el sistema; el otro tubo, una micropipeta, se utilizará para atrapar esferas de plástico biofuncionalizadas mediante succión de aire (el procedimiento de atrapamiento por succión de aire viene descrito gráficamente en la figura 3.4).

Finalmente se coloca otra lámina de Parafilm con el mismo diseño que la primera, sellando la cámara con un vidrio portamuestras sin agujerear. Este montaje se coloca a 100°C con una leve presión, lo que funde las distintas capas de Parafilm entre sí aislando los tres canales

individualmente, de forma que sólo conectan con el resto de canales mediante los tubos de vidrio. Así se crea una cámara de microfluídica de unos $200\ \mu\text{m}$ de anchura, que se coloca sobre un soporte metálico al que van unidos los tubos de plástico (ver esquema de la figura 3.3). Estos tubos permiten fluir las disoluciones tampón y las esferas biofuncionalizadas en los tres canales.

En el diagrama B) de la figura 3.3 se muestra una ampliación de la zona de trabajo de las cámaras. El láser se focaliza de forma transversal (punto rojo), los canales superior e inferior están conectados con el central a través de los tubos comunicantes. Por el canal superior se fluyen esferas funcionalizadas con ADN y por el inferior esferas funcionalizadas con estreptavidina. Los flujos de los canales superior e inferior van en contra de la dirección del flujo del canal central y así evitar atrapamientos no deseados de esferas durante la realización del experimento. La micropipeta tiene un estrechamiento al final de su recorrido para permitir atrapar esferas por succión de unos $0.5\text{-}1\ \mu\text{m}$ de diámetro. Los dispensadores a la derecha de la pipeta sirven para fluir las disoluciones iónicas o tampón con el material biológico a favor del flujo.

3.1.3. Manipulación de moléculas individuales

Para la manipulación y aislamiento de las moléculas de ADN, se utilizaron esferas de plástico de tamaño micrométrico funcionalizadas con distintos anticuerpos: unas funcionalizadas con estreptavidina (marca *Spherotech*, $\phi=2.1\pm 0.2\ \mu\text{m}$) y las otras, funcionalizadas con proteína G (*Kisker Biotech*, $\phi=3\pm 0.5\ \mu\text{m}$). Estas últimas son funcionalizadas con el anticuerpo anti-digoxigenina (ver sección 3.2.3).

Por otra parte, las moléculas de ADN son modificadas en el laboratorio para poder ser atrapadas y medidas por las pinzas ópticas. Cada molécula de ADN tiene un extremo funcionalizado con biotina (creará un enlace de alta afinidad con la esfera recubierta de estreptavidina mediante la unión antígeno-anticuerpo), mientras que el otro extremo libre es modificado con el anticuerpo digoxigenina, el cual se une a la esfera funcionalizada con anti-digoxigenina (o anti-dig). La forma de preparación se puede consultar en la sección 3.2.

Para aislar una molécula de ADN se sigue el procedimiento ilustrado en la figura 3.4. Primero se fluyen esferas recubiertas de estreptavidina por uno de los canales, que pasa al central a través de un tubo comunicante, ahí se atrapa con las pinzas ópticas, y se fija en la micropipeta por succión de aire (diagramas 1 y 2). Luego se atrapan las esferas recubiertas de ADN que circulan a través del canal inferior y se acercan a la esfera fija en la micropipeta con ayuda de los láser focalizados, mediante la frotación de una de las esferas contra la otra se logra la unión estreptavidina-biotina y se consigue aislar una sola molécula de ADN (figuras 3, 4 y 5 de la figura 3.4).

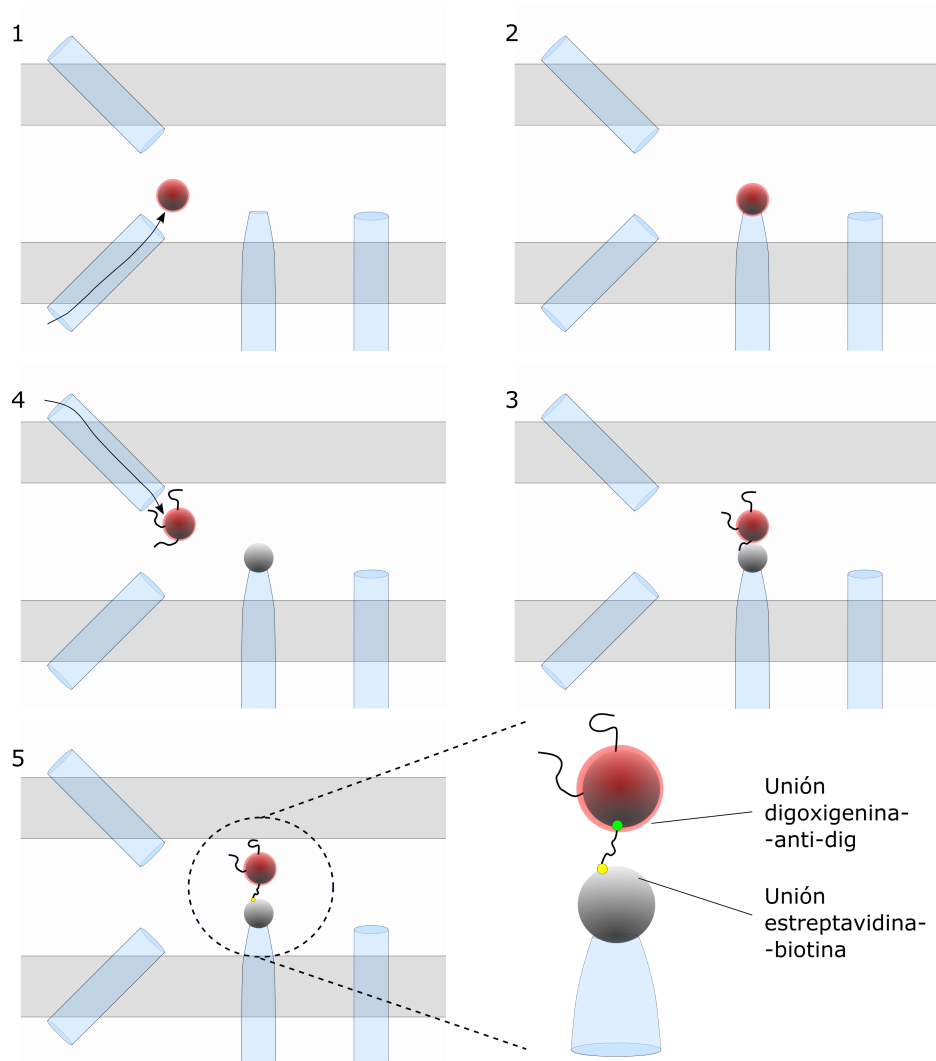


Figura 3.4: Procedimiento estándar para manipulación y aislamiento de moléculas individuales. 1: Atrapamiento de una esfera de estreptoavidina con la trampa óptica (el láser se representa como un punto rojo difuso, focalizado transversalmente al plano de la figura). 2: Fijación de la esfera en la micropipeta por succión de aire. 3: Atrapamiento óptico con el haz láser de una esfera recubierta por ADN. 4: Acercamiento a la esfera fija en la micropipeta. 5: Aislamiento de una única molécula de ADN.

3.2. Síntesis de las moléculas

En los experimentos llevados a cabo en el transcurso de esta tesis las moléculas de ADN fueron sintetizadas en nuestro laboratorio siguiendo unos protocolos previamente establecidos. Se necesitaron un total de cuatro moléculas distintas para cuatro tipos distintos de experimento: tres se emplearon para obtener las propiedades de unión de la SSB al ADN de cadena sencilla y las curvas de fuerza extensión del ADN recubierto por SSB, y la cuarta para los experimentos que simulan la replicación de la cadena retrasada.

De las dos primeras una se empleó para obtener los modos de unión de la SSB en distintas condiciones de concentración y sal, y la otra en los experimentos en los que la unión de la SSB se produce mientras se replica una horquilla (recreando la unión de la SSB en la replicación de la cadena líder).

La tercera se utilizó para obtener las curvas de fuerza-extensión en presencia y ausencia de SSB en las condiciones experimentales de los experimentos que recrean la replicación de la cadena retrasada, ya que son curvas necesarias para obtener el número de nucleótidos replicados por unidad de tiempo (ver sección 3.4.1).

La cuarta molécula utilizada es un fragmento híbrido de un ADN de cadena sencilla y cadena doble que se empleó en los experimentos de replicación sobre cadena sencilla (descrito en la figura 3.8).

Como se verá a continuación las tres primeras se sintetizan de una forma muy similar, sintetizando por separado diversos fragmentos de ADN y uniéndolos posteriormente en una reacción de ligación en la que se ligan todos los ADN.

3.2.1. Obtención de curvas de fuerza-extensión de ADN de cadena sencilla en ausencia y presencia de SSB

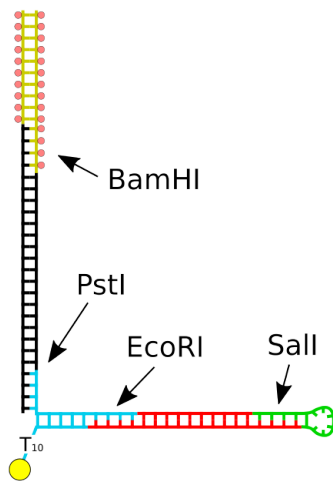


Figura 3.5: Diagrama esquemático de la molécula de ADN utilizada en los experimentos de obtención de las curvas de fuerza-extensión. Los fragmentos que la forman son: *el fragmento marcado con digoxigenina* (en amarillo, las esferas naranjas representan la digoxigenina), *el espaciador* (en negro), *el conector* (en azul, marcado con una biotina (círculo amarillo)), *el fragmento principal de la horquilla* (en rojo) y *el lazo final* (en verde). Junto a las uniones entre fragmentos se indican las enzimas de restricción utilizadas en su preparación. En el texto principal se detallan las distintas partes.

Se trata de una horquilla de replicación sintética formada por varios fragmentos que se representan esquemáticamente en la figura 3.5. En esta figura se indican por colores los fragmentos que componen dicha molécula: *el fragmento marcado con digoxigenina* (en amarillo, con las digoxigeninas dibujadas como esferas naranjas), *el espaciador* (en negro), *el conector* (en azul, marcado con una biotina (círculo amarillo)), *el lazo final* (en verde) y *el fragmento principal de la horquilla* (en rojo). Este último varía en función

del tipo de experimento. En los experimentos diseñados para obtener las características de unión de la SSB a un ADN de cadena sencilla desnudo, así como en los experimentos donde la unión se llevó a cabo a la vez que la replicación de la horquilla, se utilizó un fragmento obtenido por PCR del genoma del bacteriófago $\phi 29$. Sin embargo, en los experimentos donde se estudia la replicación de un

sistema que recrea la cadena retrasada se utilizó un ADN como el descrito en la figura 3.6.

Para sintetizar la molécula se sintetizan todos los ADN por separado en preparaciones distintas, y luego se ligan los entre sí con una incubación. Para asegurar que cada ADN se une donde debe (por ejemplo, el fragmento azul, *el conector*, al *espaciador* (en negro) y *fragmento principal de la horquilla* (en rojo)) se compran con una secuencia determinada o se digieren con

enzimas de restricción determinadas (ver figura 3.5). Esto asegura que durante la incubación de ligación cada fragmento sólo pueda unirse inequívocamente donde le corresponde.

- *Espaciador* (en negro): Se trata de un fragmento de 2686 pares de bases (cadena doble). Su origen es el vector comercial pUC19, que se ha cortado con las enzimas de restricción *BamHI* (*New England Biolabs (NEB)*) y *PstI* (*New England Biolabs*). Su principal función es hacer que una vez unido el ADN entre las esferas, exista un espacio mínimo entre ambas ($\sim 1\mu\text{m}$) evitando interacciones inespecíficas. Para los experimentos de obtención de modo de unión de la SSB al ADN en distintas condiciones experimentales se prescindió de este ADN para evitar posibles efectos de la cadena secundaria en la unión de la SSB.
- *Conector* (en azul): Es un fragmento corto de dsDNA ($\sim 20\text{nt}$) cuya función es hacer que el montaje experimental de ADN pueda unirse a las microesferas funcionalizadas con streptavidina. En la imagen 3.5 se muestra un dibujo esquemático del montaje final. Dos oligonucleótidos de cadena sencilla se unen entre sí mediante un proceso que se llama anillado que consiste en lo siguiente: se mezclan en disolución dos oligonucleótidos en la proporción 1:1 en una disolución tampón específica para el proceso (10mM Tris pH 7.5-8, 50mM NaCl y 1mM EDTA). Se calienta la mezcla a 95°C durante 10 minutos utilizando un termobloque (marca *VWR*). Una vez ha pasado ese tiempo, se deja enfriar lentamente (mínimo 45 minutos) hasta temperatura ambiente. El producto final de la reacción es un ADN de cadena doble ($\sim 20\text{pb}$) acabado en tres extremos distintos (ver figura 3.5): en uno de ellos, extremo inferior según el esquema, hay un fragmento de 10 nucleótidos que acaba en una biotina (esfera amarilla), otro (el superior según el diagrama) acaba en cuatro nucleótidos de cadena sencilla complementarios a un ADN cortado con la enzima *PstI*. Finalmente la cadena doble acaba en un extremo complementario a un ADN cortado con *EcoRI* (parte derecha del diagrama).
- *Lazo final* (en verde): Se trata de un oligonucleótido comprado en la casa comercial *Sigma-Aldrich* con el nucleótido que ocupa la posición central del oligo sin base nitrogenada (tiene un extremo abásico). Su función es evitar la ruptura de la molécula de ADN cuando se abre de forma mecánica con ayuda de las pinzas ópticas (un ejemplo de un experimento que involucra apertura de ADN se muestra en la sección 3.3.1). Para prepararlo se sigue un protocolo similar al utilizado en el *conector*: se calienta el oligo en un termobloque a 95°C durante 10 minutos, y se deja enfriar durante unos ~ 45 minutos hasta temperatura ambiente. Esto evitará que se formen estructuras secundarias en el lazo, de forma que quede libre una secuencia complementaria a un ADN cortado con *Sall*.
- *Fragmento marcado con digoxigenina* (en amarillo): El fragmento marcado con digoxigenina es un fragmento de cadena doble que se ha sintetizado sustituyendo los nucleótidos de timina por uracilos marcados con digoxigenina. Es la parte de la molécula que permite que ésta se una a las esferas recubiertas por anti-digoxigenina. Se sintetiza mediante

una preparación bioquímica consistente en una PCR (*Polymerase Chain Reaction*, (Saiki y col. 1988)) en la cual se amplifica un fragmento del ADN pUC18 (*Novagen*) utilizando una mezcla especial de nucleótidos en la que el dTTP es sustituido por dUTP marcado con dig-11-dUTP (*Roche*). La PCR se llevó a cabo con la *Taq* Polimerasa (*New England Biolabs*) siguiendo un ciclo consistente en calentar la muestra a 94°C durante 3 minutos para conseguir la separación completa de las dos cadenas de ADN por temperatura (*desnaturalización*), luego se sigue un ciclo de 29 repeticiones de la siguiente secuencia: 1 minuto a 94°C para desnaturalizar el ADN, 1 minuto a 60°C para favorecer el reanillado de los oligos que servirán de *primer*¹ para la *Taq* polimerasa. El siguiente paso del ciclo es calentar la muestra a 72°C durante 2 minutos para que la polimerasa replique cada una de las cadenas sencillas en dos cadenas iguales, ya que constituye su temperatura de actuación. Una vez se han completado los 29 ciclos, se deja la muestra 4 minutos a 72°C y se purifica con un kit de purificación (*Promega*).

Para poder unir este fragmento al resto de la preparación de ADN se corta con la enzima de restricción *BamHI* (*New England Biolabs*), que permitirá dejar un extremo libre con la secuencia adecuada para poder unirse al *espaciador*. Una vez cortado, se hace correr la muestra en un gel de electroforesis, purificando en gel (con el mismo kit de purificación, de la marca *Promega*) sólo un fragmento de ADN de unos ~400 pares de bases.

- *Fragmento principal de la horquilla* (en rojo): Este es el único ADN que cambiará en función de los experimentos llevados a cabo. Se utilizó para estudiar las propiedades de unión de la SSB al ADN de cadena sencilla en distintas condiciones experimentales, así como para analizar el efecto que tiene la unión en co-replicación. En estos experimentos se utilizó un ADN de 2500 pares de bases obtenido mediante PCR del genoma del bacteriófago $\phi 29$.

Por otra parte, en los experimentos de replicación en los que se requiere calcular el número de nucleótidos replicados por unidad de tiempo, también se necesitan las curvas de fuerza-extensión. En estos casos se utilizó un ADN como el mostrado en la figura 3.6, formado por cuatro zonas de bajo contenido en GC, y tres zonas de contenido creciente en GC, de un tamaño final de 423 pares de bases. Esta construcción de ADN es una modificación del empleado por Morín y col. (2012) y recibe el nombre del *9GC DNA*.

Independientemente de que el experimento requiera una u otra molécula, ambos fragmentos de ADN se cortaron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Sall*, lo que permite su unión al *conector* y *lazo final*.

Una vez se han sintetizado todos los fragmentos, se realiza una ligación en la que se ponen en disolución todos los ADN sintetizados. Al haberse cortado con las enzimas de restricción específicas cada ADN se unirá al fragmento con la secuencia complementaria. En el proceso de

¹Se define *primer* (en su terminología anglosajona) como el oligonucleótido con el extremo 3' libre, que será utilizado por la polimerasa para iniciar la replicación del ADN uniendo nucleótidos desde el extremo 3' al 5'.

ligación se incuban los fragmentos durante una noche a 16°C con la enzima *T4* ligasa (Roche), que sellará las uniones entre extremos complementarios y dará lugar al montaje mostrado en la figura 3.6.

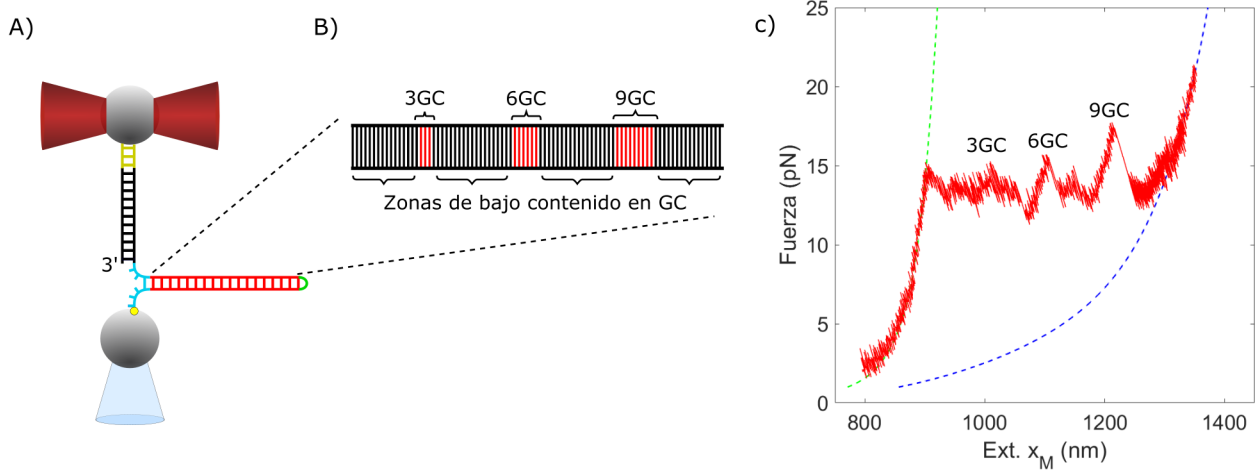


Figura 3.6: Apertura mecánica de la horquilla de ADN del *9GC ADN*. A) Diagrama de la molécula de ADN empleada. En negro se señala un espaciador de ADN de cadena doble de 2686 pares. El fragmento de ADN de color amarillo señala una zona marcada con digoxigenina. En azul se indica el *conector*, que conecta el *espaciador* con la horquilla de ADN (en rojo). En verde está señalizado el *lazo final*, que cierra la molécula. B) Representación en detalle del *9GC DNA*. Contiene cuatro zonas de bajo contenido en pares de bases GC, y tres zonas con un número creciente de pares de bases GC (3, 6 y 9). C) Curva de fuerza extensión de la horquilla de ADN. El proceso de apertura de la horquilla viene descrito en el texto principal. Las líneas discontinuas verde y azul representan las simulaciones con el modelo *Worm Like Chain* para el ADN de cadena doble (en verde) y el ADN de cadena sencilla resultante de abrir la horquilla (en azul).

El instrumento de pinzas ópticas permite aplicar la fuerza necesaria para abrir de forma mecánica el ADN de cadena doble. En la imagen 3.6 C), se muestra la curva de fuerza-extensión que se obtiene al abrir mecánicamente la horquilla del *9GC ADN*. Entre 0 y $\sim 14\text{pN}$ la curva de fuerza-extensión obtenida se debe a las propiedades mecánicas del espaciador de ADN de cadena doble. La apertura progresiva de la horquilla genera gradualmente ADN de cadena sencilla, siguiendo un patrón de fuerza-extensión que refleja la secuencia del ADN. En el caso ejemplo del *9GC DNA* se pueden apreciar tres picos que corresponden a las regiones con 3GC, 6GC y 9GC. El *lazo final* de la horquilla previene la separación de las dos cadenas, por lo que finalmente tras la apertura de la horquilla se genera un ADN híbrido de cadena sencilla (1015 bp) y cadena doble (2686 bp). Las líneas discontinuas verde y azul de la figura 3.6 C) son simulaciones hechas con el modelo para un polímero inextensible *WLC*, *Worm Like Chain*, tanto para un ADN de cadena sencilla (en verde) como de cadena doble (en azul).

3.2.2. Experimentos de replicación sobre cadena sencilla

En estos experimentos se utilizó el tercer tipo de molécula, mostrado esquemáticamente en la figura 3.8. Y al igual que en el caso de los experimentos de unión de la SSB y obtención de las curvas de fuerza-extensión, consta de varias partes:

- *Fragmento marcado con digoxigenina* (en amarillo): Este fragmento es el mismo que el empleado en la preparación de la sección anterior. Se prepara del mismo modo y se corta con la enzima *BamHI-HF* (*New England Biolabs*).
- *Conector* (en azul): La preparación es similar a la explicada para el *conector* de la sección anterior. Consiste en dos oligonucleótidos de 15nt de los cuales uno está marcado en el extremo 5' con biotina y el otro genera un extremo 3' protuberante con la secuencia de restricción de la enzima *HindIII*, por lo que será complementario al extremo cortado con la misma enzima del ADN *ssds*. Estos oligonucleótidos se incuban durante 10 minutos a 95°C y se dejan enfriar 45 minutos a temperatura ambiente.
- *ADN ssds* (en negro): Este fragmento de ADN consiste en una molécula mixta formada por dos fragmentos de unos ~ 3500 pares de bases, entre los cuales se encuentran unos ~ 1000 nucleótidos de ADN de cadena sencilla (Ibarra y col. 2009). El fragmento de cadena sencilla es el fragmento que se replicará en los experimentos de replicación, ya sea la cadena desnuda o cubierta por SSB.

Para prepararlo se corta el ADN circular *pBACgus-11* (8041 pares de bases) con la enzima *Nb.BbvCI* *New England Biolabs*, que producirá un corte en una sola de las dos cadenas del ADN en la posición 560. Una vez inactivada la enzima a 80°C durante 20 min, se incuba en presencia de la enzima *ExoIII* (enzima exonucleolítica, de *New England Biolabs*) durante 6 minutos. Así se generará el fragmento de ADN de cadena sencilla de unos 1000 nucleótidos. Luego se inactiva la enzima con EDTA durante 3 minutos y se digiere con *proteinasasK* para su completa eliminación durante 1 hora y 30 minutos a 55°C. Tras la purificación del ADN con el kit de purificación de *Promega*, este se corta con las enzimas de restricción *BamHI-HF* y *HindIII-HF* durante 2 horas a 37°C en la disolución proporcionada por el fabricante (*New England Biolabs*) y se purifica de nuevo con el mismo kit de purificación.

La longitud del fragmento de cadena sencilla generado se comprueba mediante un gel de electroforesis desnaturizante de agarosa a *pH* básico (~ 11) cuya función es desnaturizar el dsDNA en dos ADN de cadena sencilla al impedir los enlaces entre pares de bases. La figura 3.7 muestra una foto del gel desnaturizante, donde se puede ver que el fragmento de ADN de cadena sencilla tiene en torno a ~ 1000 nt.

Finalmente se unen los tres fragmentos con una única ligación (representada esquemáticamente en la figura 3.8) siguiendo un protocolo similar al indicado en la sección anterior en el que se diluyen los fragmentos en proporción 1:1:1 en presencia de la *ligasa T4* durante una noche a 16°C, utilizando la disolución tampón proporcionada por la casa comercial.

El montaje final se representa en la figura 3.8, donde se puede ver también su comportamiento con la fuerza. En este caso, al ser un híbrido de cadena sencilla y cadena doble de ADN, tiene un comportamiento que se puede predecir simulando unos ~ 1000 nt de cadena sencilla, y ~ 7100 nucleótidos de cadena doble con el modelo *WLC* (línea verde discontinua).

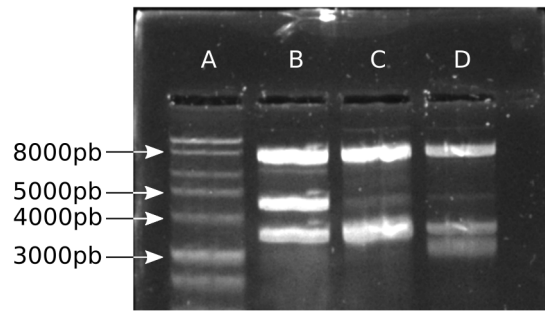


Figura 3.7: Gel de agarosa alcalino para determinar el tamaño del fragmento de cadena sencilla generado en la preparación del ADN *ssds*. La banda marcada como A representa el marcador de peso molecular (comprado en *Promega*). En la banda B se hizo correr el vector *pBacgus11* cortado con la enzima *NBbCIA*. Las tres bandas se corresponden con la cadena no cortada (~ 8000 nt, arriba del todo), y la cortada, que da dos fragmentos, uno de ~ 4500 nt (situada en el punto medio) y otro de ~ 3500 nt (que corre más deprisa, situado abajo). C) En esta banda se hizo correr el *pBacgus11* cortado y digerido con la *Exonucleasa III* durante 6 minutos a temperatura ambiente (22°C). La banda digerida, originalmente de unos ~ 4500 nt, cae a la banda correspondiente a ~ 3500 nucleótidos, por lo que es un indicativo de que el ADN de cadena sencilla generado tendrá unos ~ 1000 nt de longitud. D) Si subimos el tiempo de digestión con la *Exonucleasa III*, la banda digerida cae a ~ 3000 nt, por lo que el fragmento de ADN generado será de unos ~ 1500 nt.

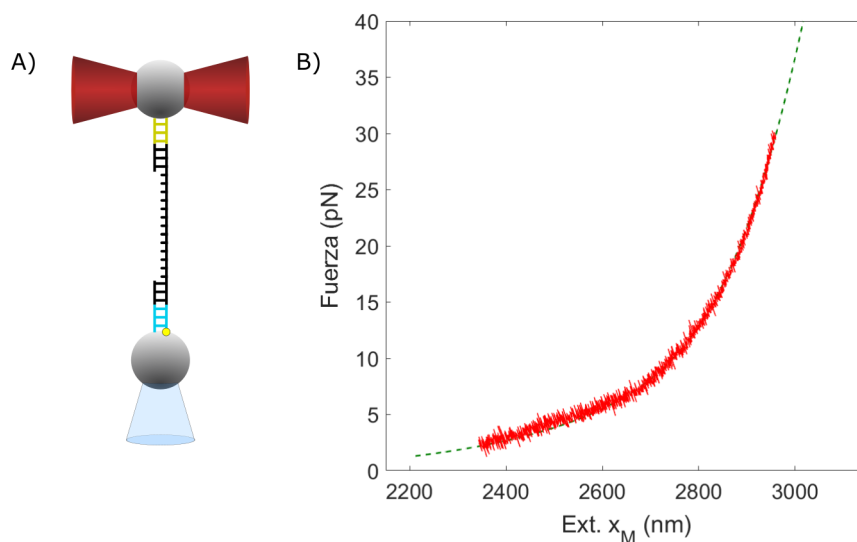


Figura 3.8: ADN utilizado en los experimentos de replicación sobre cadena sencilla. A) Diagrama esquemático del montaje experimental utilizado en los experimentos de primer extensión. En amarillo se muestra el fragmento marcado con digoxigenina. En azul el conector. En negro el ADN *ssds*. B) Curva de Fuerza-Extensión de una molécula del ADN *ssds*. En rojo se muestra una curva característica. La línea discontinua en azul muestra el modelo WLC ajustado con 7041 pares de bases de cadena doble y 1000 pares de bases de cadena sencilla.

3.2.3. Preparación de las microesferas

En las secciones anteriores se ha comentado que para los experimentos de esta tesis se han utilizado microesferas de poliestireno funcionalizadas con anticuerpos en su superficie para poder así unirse a las moléculas de ADN. Se han utilizado microesferas cubiertas con dos tipos de proteínas distintas:

- *Microesferas funcionalizadas con estreptavidina*: Se compraron directamente funcionalizadas

zadas a la casa comercial *Kisker Biotech*. Tienen un tamaño aproximado de $\sim 2\mu\text{m}$.

- *Microesferas funcionalizadas con anti-digoxigenina*: Para preparar estas esferas, se sigue un protocolo en el que se utilizan esferas de $\sim 3.1\mu\text{m}$ recubiertas de proteína G (*Kisker Biotech*). Se centrifugan a 3000rpm durante 6 minutos, lo que provocará su precipitación en la base del tubo, se elimina la disolución sobrante (o sobrenadante) y se vuelven a diluir las microesferas en una disolución 100mM NaCl y 100mM Na_2HPO_4 (*disolución crosslinking*).

A las microesferas resuspendidas en la disolución *crosslinking* le añadimos Dimetil Pimelidato Dihidrocloruro (*DMP*) 50 mg/ml en la proporción 3:100 y anti cuerpo anti-digoxigenina (disuelta en *PBS pH 7.4*²) en la proporción 6:100. Después se incuban una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Durante la incubación los anticuerpos de anti-digoxigenina se unen covalentemente a la proteína G con ayuda del *DMP*.

En el siguiente paso se centrifugan las microesferas a 3000rpm durante 6 minutos para volver a resuspenderlas en una disolución Tris 1M *pH 7.5* y se dejan reposar a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 horas. Este paso sirve para parar la reacción de unión de los anticuerpos con el *DMP*.

Para conservarlas se vuelven a centrifugar a 3000rpm durante otros 6 minutos para resuspenderlas en *PBS 7.4*, y se guardan a 4°C.

3.3. Método experimental

3.3.1. Obtención de las curvas de fuerza-extensión de la cadena sencilla de ADN desnuda y del complejo ssDNA-SSB

En los experimentos para identificar el modo de unión de la SSB se utilizó una horquilla de replicación similar a la explicada en la sección 3.2.1 y la figura 3.9, con la diferencia de que se sustituyó el *espaciador* y el *conector* (ver sección 3.2) por un nuevo *conector* de 30 pb con una biotina en el extremo 5' y una digoxigenina en el extremo 3'. Se eliminó el *espaciador* de este montaje para comprobar que su presencia no interfería con la unión de la SSB.

Para obtener las curvas de fuerza-extensión del ADN de cadena sencilla en ausencia de SSB se sigue el siguiente proceso: la horquilla de replicación se abre mecánicamente aplicando fuerza a la vez que se fluye un oligonucleótido en la cámara fluidica. El oligonucleótido se une al *lazo final* lo que impide que la horquilla se cierre, logrando así un sustrato mixto de cadena sencilla y cadena doble de ADN. Después se realiza un ciclo de reducción y aumento de fuerza desde $\sim 1\text{pN}$ y hasta $\sim 30\text{pN}$, obteniéndose así la curva de fuerza extensión de un montaje híbrido de cadena sencilla con el espaciador de cadena doble. La presencia de cadena doble no afecta a la

²140mM NaCl, 2.7 mM KCl, 81mM K_2HPO_4 , 19mM KH_2PO_4

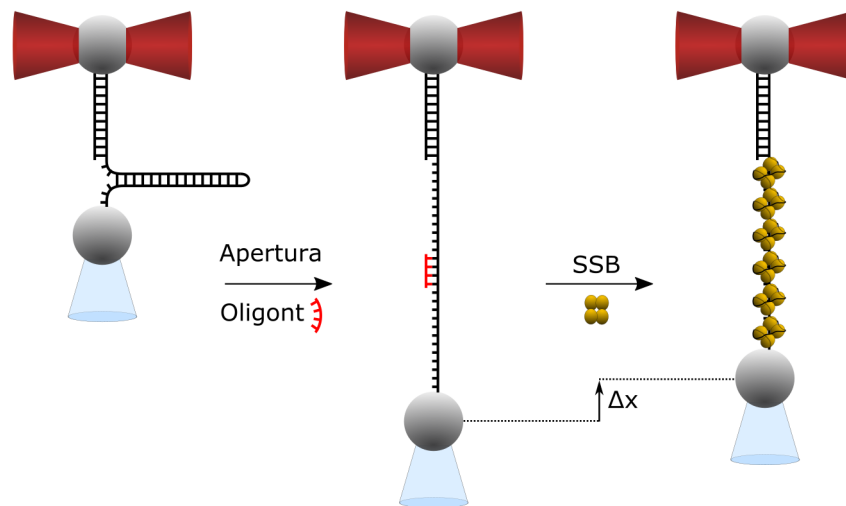


Figura 3.9: Esquema experimental utilizado para tomar las CFE en presencia de la SSB. La horquilla se abre en presencia del oligonucleótido (coloreado en rojo), que evita el reanillado. Una vez tenemos el sustrato de cadena sencilla se fluye la SSB en la cámara logrando el sustrato ssDNA-SSB.

elasticidad de la cadena sencilla (Ibarra y col. 2009), por lo que se puede eliminar su contribución a la curva de fuerza-extensión mediante un sencillo cálculo matemático (ver sección 3.4.1).

Para los experimentos con SSB se sigue el mismo procedimiento pero introduciendo la proteína en la cámara fluidica con el ADN sujeto entre ambas esferas a $\sim 3\text{pN}$ (fuerza donde la unión del tetrámero es más estable (Suksombat y col. 2015; Morín y col. 2017)). Una vez la SSB ha organizado la cadena sencilla se limpia la SSB sobrante (la proteína que no se ha unido) de la cámara y repite el mismo ciclo de estiramiento, logrando así la curva de fuerza-extensión en presencia de SSB.

Las condiciones experimentales utilizadas dependen del tipo de experimento llevado a cabo. En aquellos diseñados para obtener el modo más relevante de unión de la SSB se fluyó SSB en la cámara a concentraciones de 50, 10, 50, 100 o 200nM en una disolución tampón de 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM DTT y contenido iónico variable: 10, 50 o 300 mM NaCl, o 50 y 300 mM NaCl acompañados de 4mM MgCl_2 .

En los experimentos diseñados para el estudio de la replicación de la cadena retrasada se emplearon las mismas condiciones que en los experimentos con las polimerasas $\text{pol}\gamma$ y la polimerasa del bacteriófago T7 (polT7): 50 mM Tris pH 8.5, 30 mM KCl, 10 mM DTT, 4 mM MgCl_2 y 0.2 mg/ml BSA.

3.3.2. Unión de la SSB a la cadena sencilla de ADN durante la replicación de la horquilla

En estos experimentos se produce la unión de la SSB mientras tiene lugar la apertura de la horquilla y el ADN de cadena sencilla es generado de forma gradual. De esta forma se recrea la generación de la cadena retrasada que tiene lugar en la célula durante la elongación de la cadena líder. Dichos experimentos se llevaron a cabo mediante el montaje experimental mostrado en

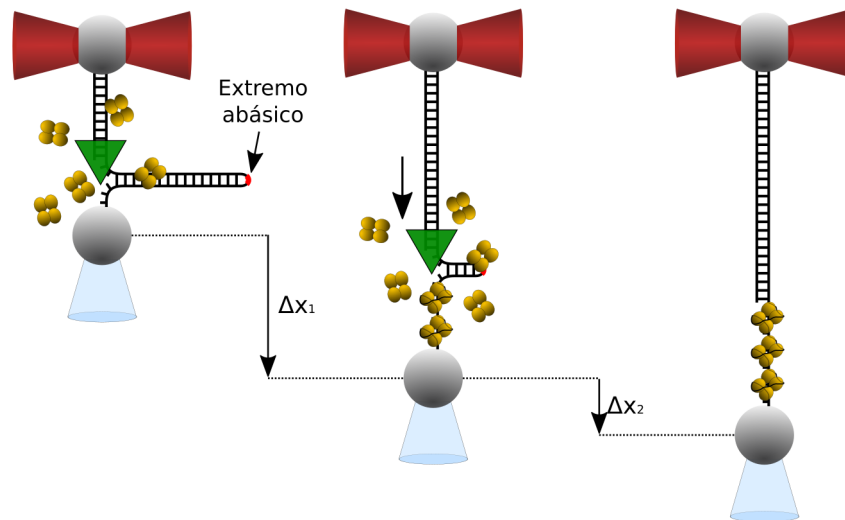


Figura 3.10: Representación gráfica del sistema experimental empleado en los experimentos de replicación coordinada en presencia de la SSB. La polimerasa de $\phi 29$ abre la horquilla de replicación a la vez que genera un sustrato de ssDNA de forma que la SSB se une a la cadena complementaria organizándola progresivamente.

la figura 3.10 donde se utilizó la molécula explicada en la sección 3.2.1, en la que *el fragmento principal de la horquilla* es una sección de 2500 pb del genoma del bacteriófago $\phi 29$, amplificado por PCR con oligonucleótidos que incluyen la secuencias de las enzimas de restricción EcoRI y SalI. Este montaje deja el extremo 3' del *espaciador* libre, lo que permite la unión de la $\phi 29$ y su utilización como *primer*.

La alta capacidad de desplazamiento de banda y procesividad de la polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ hace que sea la enzima idónea para estos experimentos (Morín y col. 2012; Kamtekar y col. 2004; Ibarra y col. 2009; Salas 1991; Blanco y col. 1989; Rodríguez y col. 2005). En presencia de los nucleótidos esta polimerasa replica el extremo 3' de la horquilla utilizando una de las cadenas como molde y liberando de manera progresiva la cadena complementaria hasta que llega al extremo abásico del *lazo final*, donde detendrá su actividad. Este proceso permite la apertura toda la horquilla de replicación a una velocidad aproximada de $\sim 30\text{nt/s}$ a $\sim 3\text{pN}$, lo que garantiza una unión estable de la SSB al ADN de cadena sencilla, que es generado progresivamente (Suksombat y col. 2015; Morín y col. 2017).

En estos experimentos se sujeta la horquilla entre las dos esferas a una fuerza de $\sim 3\text{pN}$ y se fluye en la cámara fluidica una disolución que contiene una mezcla de la polimerasa de $\phi 29$ 2nM, 50mM Tris HCl pH 7.5, 2mM DTT, 50mM NaCl, 4mM MgCl_2 , $50\mu\text{M}$ dNTP y 5, 50 y 200nM de SSB. Mientras la polimerasa va abriendo el ADN de cadena doble, se generará gradualmente ADN de cadena sencilla en el extremo 5' a unos $\sim 30\text{nt/s}$. Así, el producto final de la reacción es una molécula que contiene 5226 pares de bases de cadena doble de ADN y 2540 nucleótidos de cadena sencilla de ADN organizados por la SSB en un sistema que recrea la generación de la cadena retrasada y su organización por la SSB en la replicación del ADN mitocondrial.

3.3.3. Experimentos de replicación sobre cadena sencilla en ausencia y presencia de la SSB: recreando la síntesis de la cadena retrasada

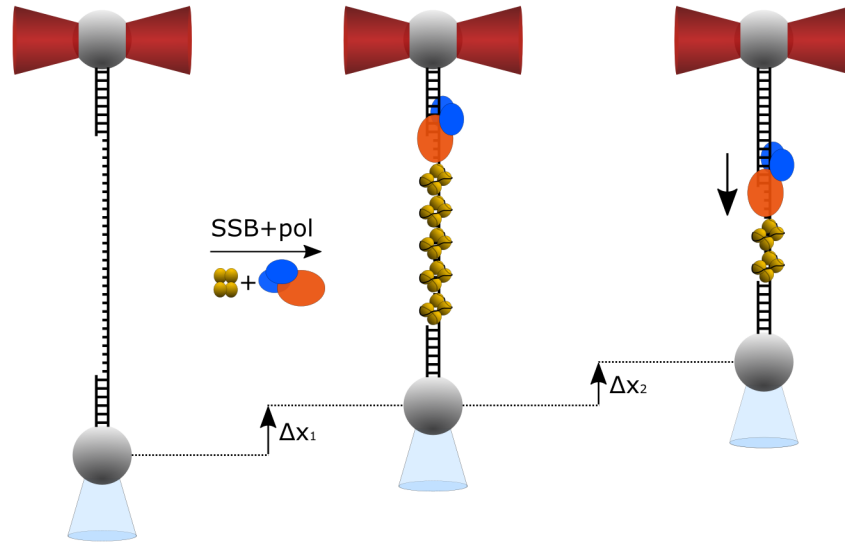


Figura 3.11: Diagrama representativo del sistema experimental utilizado en los experimentos de replicación sobre cadena sencilla para la polimerasa $pol\gamma$. Un ADN híbrido de cadena sencilla y cadena doble se sujeta entre las dos esferas dejando el extremo 3' libre.

En estos experimentos se utilizó el sistema experimental explicado en la sección 3.2.2 y representado en la figura 3.11. Un ADN híbrido de cadena doble y cadena sencilla se sujeta entre las dos microesferas. El fragmento de cadena sencilla tiene unos ~ 1000 nt de longitud, generado entre dos fragmentos de cadena doble de ~ 3500 pares de bases de longitud. La replicación del ADN se lleva a cabo fluyendo 2nM de $pol\gamma$ mientras el sustrato permanece a fuerza constante. La replicación del ADN genera cambios en distancia mientras la polimerasa convierte el ADN de cadena sencilla en ADN de cadena doble, sea en presencia o ausencia de la SSB.

Se midió el efecto sobre la cinética instantánea de replicación de la holoenzima mitocondrial de tres tipos distintos de SSB (discutidas en detalle en las secciones 5.2 y 4.2): la SSB de mitocondria humana (mtSSB), una variante de la SSB de mitocondria humana sin un segmento de su cadena de aminoácidos (mtSSB_{2,3}), y la SSB de la bacteria *Escherichia Coli* (EcoSSB), todas ellas a 50nM .

Los experimentos se llevaron a cabo en las siguientes condiciones: 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 30 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA y $50\mu\text{M}$ dNTP (Oliveira y Kaguni 2011; Ciesielski y col. 2015).

3.4. Análisis de resultados

Los datos experimentales que nos dan las pinzas ópticas deben ser analizados y procesados, para ello en esta tesis se ha utilizado el programa *Matlab* (*Mathworks Inc.*), ya que es una

herramienta muy versátil para programar los cálculos y modelos utilizados en este proyecto.

3.4.1. Conversión del cambio en extensión a número de nucleótidos y cálculo de nucleótidos replicados por unidad de tiempo

En la sección 3.1.1 se ha descrito el instrumento de pinzas ópticas y su capacidad de medir fuerzas y extensión molecular. Sin embargo, en nuestro sistema experimental nos interesa convertir los cambios en distancia a número de nucleótidos, lo que nos permitirá obtener resultados tales como los nucleótidos organizados por una SSB o el número de nucleótidos replicados por unidad de tiempo (velocidad de replicación), así como su dependencia con la fuerza aplicada sobre el sustrato.

Para poder llevar a cabo esta conversión se necesitan las curvas de fuerza-extensión (CFE en adelante) en las distintas condiciones experimentales. Además, dichas curvas deben ser normalizadas a un sólo nucleótido para el cálculo. Por otra parte, a la extensión medida entre las microesferas se le debe quitar la contribución del *espaciador*. Luego teniendo en cuenta esto, para calcular las CFE normalizadas se emplea la siguiente expresión:

$$x_{ssDNA}(f) = \frac{x_{Exp}(f) - N_{ds} \cdot x_{dsDNA}(f)}{N_{ss}} \quad (3.6)$$

x_{ssDNA} es la extensión por nucleótido a una fuerza dada de la molécula de ADN (medida en nanómetros por nucleótido, $\text{nm} \cdot \text{nt}^{-1}$), x_{Exp} es la medida experimental de la extensión entre las esferas (en nm) cuando tienen la molécula de ADN sujeta entre ambas, N_{ds} y N_{ss} es el número de nucleótidos de cadena doble y de cadena sencilla que tiene la molécula que es estirada, respectivamente.

Entre otras cosas esta conversión nos ha permitido obtener el número de nucleótidos que una polimerasa es capaz de replicar en función de tiempo. Este dato nos permite calcular el número de nucleótidos que la enzima es capaz de incorporar antes de soltarse del ADN (procesividad), así como su velocidad promedio de replicación, la velocidad máxima que es capaz de alcanzar, y su dependencia en fuerza. En el caso de los experimentos de replicación sobre cadena sencilla se utilizó el sistema experimental expuesto en la figura 3.8, donde la enzima incorpora un sólo nucleótido en cada ciclo del motor molecular, lo que implica que en cada paso se convierte un nucleótido de cadena sencilla en uno de cadena doble. De esta forma, el cambio en distancia que se observa entre las esferas viene dado por:

$$\Delta x_{Exp}(f, t) = x_{nt}(f, t) * (x_{dsDNA}(f) - x_{ssDNA}(f)) \quad (3.7)$$

Donde $x_{Exp}(f, t)$ es el cambio en distancia medido entre las esferas cuando el ADN se encuentra sujeto bajo una fuerza f y en un tiempo t , $x_{nt}(f, t)$ es el número de nucleótidos replicados en un tiempo t cuando el sustrato se encuentra a una tensión f . Despejando de la expresión anterior podemos obtener el número de nucleótidos que la polimerasa ha replicado en función

del tiempo.

$$x_{nt}(f, t) = \frac{\Delta x_{exp}(f, t)}{x_{dsDNA}(f) - x_{ssDNA}(f)} \quad (3.8)$$

Utilizando las fórmulas 3.7 y 3.8 para calcular $x_{nt}(f, t)$ se elimina de los resultados la contribución elástica del sustrato, por lo que la información obtenida vendrá exclusivamente del efecto de la fuerza sobre la cinética del proceso de replicación. Este fenómeno se puede comprobar analizando el número total de nucleótidos replicados por cada actividad, que coincide con el tamaño aproximado del sustrato empleado, como se verá más adelante en la sección de resultados.

3.4.2. Cálculo de las energías de unión de la SSB al sustrato

Como se verá más adelante, uno de los datos analizados durante el desarrollo de la tesis es el coste energético que cuesta liberar un nucleótido de ADN que se encuentra unido a una SSB. Las energías se calculan como el área encerrada entre la CFE del ADN de cadena sencilla desnuda, y la CFE del ADN cubierto por SSB. En su expresión matemática:

$$Area(k_B T \cdot nt^{-1}) = \int_0^\infty x_{SSB, norm}(f) df - \int_0^\infty x_{ssDNA, norm}(f) df \quad (3.9)$$

$x_{SSB, norm}(f)$ es la extensión por nucleótido del polímero ADN-SSB a una fuerza dada f , y $x_{ssDNA}(f)$ es la extensión por nucleótido del ADN de cadena sencilla cuando ésta se sujeta a una tensión f . Ambas cantidades se utilizan normalizadas a un sólo nucleótido para poder obtener el coste energético que cuesta liberar un sólo nucleótido de ssDNA cubierto por SSB.

3.4.3. Obtención de la velocidad media y procesividad

La velocidad promediada por actividad se calcula dividiendo el número de nucleótidos replicados entre el tiempo total empleado en la actividad:

$$V_{Media}(f) = \frac{x_{nt, total}(nt)}{T(s)} \quad (3.10)$$

Donde $x_{nt, total}$ es el número total de nucleótidos replicados en una sola actividad, y T es el tiempo empleado en dicha actividad de replicación.

3.4.4. Cálculo de la velocidad máxima

La velocidad media da información sobre el promediado de la velocidad de replicación de la enzima durante una actividad, sin embargo, en el transcurso de dicha actividad, habrá momentos en los que la polimerasa estará activamente incorporando nucleótidos, y ocasiones en las que se encuentre en un estado de pausa, es decir, unida al ADN pero sin replicar (Ibarra

y col. 2009; Malik y col. 2017). Para comprender cómo afecta la tensión mecánica a la cinética instantánea de incorporación del nucleótido es necesario separar las regiones de replicación activa de aquellas donde la proteína se encuentra en estado de pausa.

Método de la doble gaussiana

Es el método más usado en la bibliografía para obtener la velocidad máxima (Ibarra y col. 2009; Malik y col. 2017; Morín y col. 2012). Consiste en calcular las velocidades instantáneas de replicación de la enzima. Para ello se realiza un ajuste lineal al número de nucleótidos replicados por unidad de tiempo con un tamaño de ventana, o tiempo sobre el cual se realiza el ajuste, τ , fijo. Por cada actividad se calcula un histograma con la distribución de probabilidad de las velocidades instantáneas de replicación promedio. Típicamente mostrará una distribución bimodal con dos picos, uno centrado en cero que corresponde al estado de pausa, y otro centrado en una velocidad mayor que cero, que se corresponderá al estado de movimiento. Haciendo un ajuste a una gaussiana doble se pueden obtener el valor de los picos, obteniendo así la velocidad máxima de replicación, V_{Max} .

Método de la prominencia en la velocidad

Como se verá en la sección 4.2, debido a la naturaleza de los resultados experimentales de esta tesis hubo que desarrollar un modo alternativo para obtener la velocidad instantánea o velocidad máxima, V_{Max} . En esta sección se dará una breve descripción del nuevo método, ya que está explicado en detalle y con un ejemplo ilustrativo en el anexo A.2. Éste método parte del explicado en el apartado anterior pero utilizando un tamaño de ventana variable que oscila entre 0.01 y 40 segundos para hacer el ajuste lineal al número de nucleótidos replicados por unidad de tiempo. Para cada tamaño de ventana se obtiene V_{max} siguiendo el método tradicional de la distribución de velocidades. En función del tamaño de ventana utilizado, τ , se pueden llegar a promediar las fluctuaciones térmicas del propio aparato (τ pequeños) o incluso promediar la actividad y obtener la velocidad media (τ grandes), pero sin embargo, para tamaños de ventana intermedios, se puede llegar a calcular la velocidad máxima por cada actividad.

Como se ha comentado, esta forma de calcular la velocidad máxima viene explicada en detalle en el anexo A.2 con un ejemplo ilustrativo de obtención de V_{Max} a partir de una actividad de replicación.

Resultados

4.1. Identificación de los modos de unión de la SSB de mitocondria humana a cadena sencilla de ADN

La concentración de sal y proteína modula los modos de unión de la SSB de mitocondria humana a la cadena sencilla de ADN

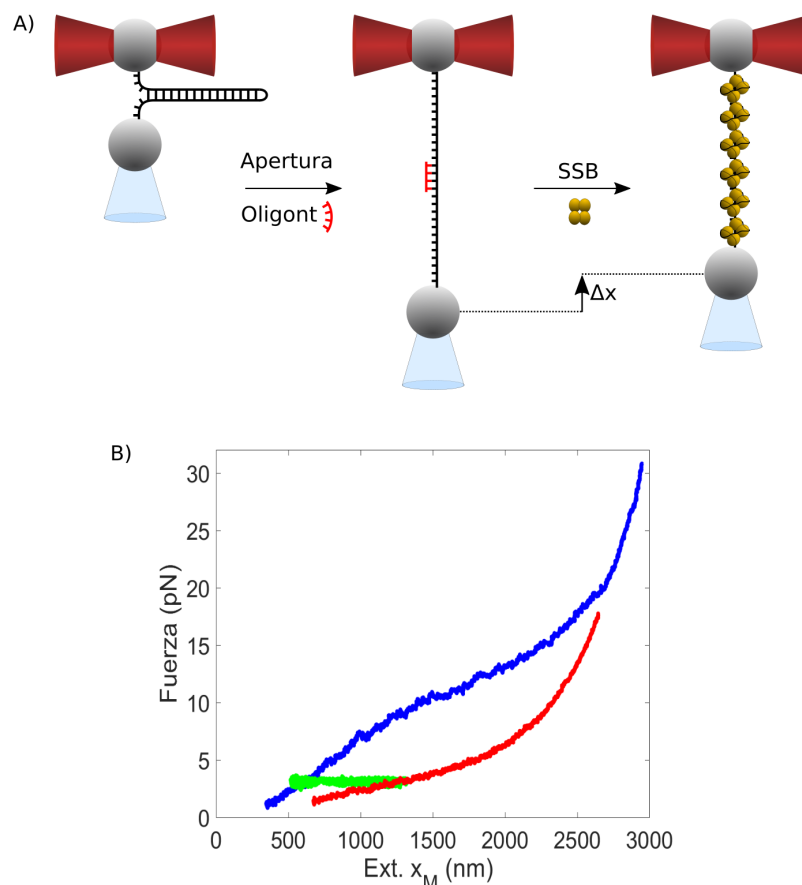


Figura 4.1: Experimentos para obtener el modo de unión de la SSB de mitocondria humana en distintas condiciones experimentales. A) Diagrama esquemático que representa el sistema experimental utilizado. Primero se abre la horquilla de forma mecánica, luego se fluye un oligonucleotido que se une al *lazo final* y evita el cierre de la horquilla. Así se genera un ADN de cadena sencilla de 5080 pares de bases sobre el que se puede fluir la mtSSB. B) curvas experimentales de experimentos con la SSB de mitocondria humana. C) CFE del sustrato sujeto entre las microesferas en distintas condiciones: ADN de cadena sencilla desnudo (en rojo), de la cadena recubierta por SSB (en azul) y la actividad de organización del ADN por la SSB (en verde).

En la primera parte de la tesis quisimos estudiar las propiedades mecánicas de los complejos ADN-SSB cuando se fluye directamente la SSB de mitocondria humana (en adelante mtSSB) sobre el ADN de cadena sencilla (ssDNA) estirado a fuerza baja ($\sim 3\text{pN}$), donde la SSB permanece establemente unida al ADN (Suksombat y col. 2015; Maffeo y Aksimentiev 2017). Para ello empleamos un sistema experimental como el mostrado en la figura 4.1A) que se ha explicado en la sección 3.2.1. En este caso se decidió prescindir del *espaciador* para evitar posibles efectos del ADN de cadena doble sobre la unión de la SSB. Además la cadena doble de

ADN (dsDNA a partir de aquí) no interfiere con las propiedades elásticas del ssDNA (Ibarra y col. 2009; Suksombat y col. 2015). El ADN utilizado en la *molécula distintiva* para estos experimentos es un fragmento del genoma de $\phi 29$ amplificado por PCR como el explicado en la sección 3.2.1, con la diferencia de que el *conector* se sustituyó por uno nuevo formado por una cadena doble con un extremo compatible con un ADN cortado con EcoRI, y en el otro extremo con dos funcionalizaciones distintas: una biotina en el 5', y con una digoxigenina en el 3'. El montaje final consiste en una horquilla de 2540pb de longitud. Una vez abierto (a ~ 19 pN) se fluye en la cámara fluidica un oligonucleótido de 30 pb complementario al *lazo final*, lo que evitará el cierre de la horquilla al disminuir la fuerza, dando lugar a un ADN híbrido de 5080 pares de bases de ssDNA. Con la molécula sujeta, bajar la fuerza a 0 pN y subirla de nuevo a $\sim 30-40$ pN dará lugar a la CFE roja mostrada en la figura 4.1B).

Después se limpia el oligonucleótido mediante el flujo principal de la cámara fluidica, lo que asegurará que una vez fluyamos las SSB, todo el tetrámero organice el ADN que está estirado entre las microesferas, y no existan uniones con los oligonucleótidos. Una vez limpio el sistema, la mtSSB se introduce a una fuerza constante de $\sim 3 \pm 1$ pN, lo que evitará efectos potenciales que las tensiones mecánicas puedan ejercer sobre la unión de la SSB con el ssDNA, tal y como ocurre con la SSB de E.Coli (Suksombat y col. 2015).

Al sujetarse el sistema a fuerza constante, la organización del ssDNA por la mtSSB se detecta como un cambio en distancia entre las microesferas (Δx en la figura 4.1A), línea verde en la imagen B)). Una vez la mtSSB ha organizado el ssDNA, la extensión entre las microesferas permanecerá constante ya que no se está uniendo más proteína. Después se vuelve a limpiar el sistema para eliminar la mtSSB sobrante y se realiza un ciclo de relajación y estiramiento entre 0 y $\sim 30-40$ pN para obtener la CFE en presencia de mtSSB (en la figura 4.1B) se muestra una CFE ejemplo obtenida a 10mM NaCl).

Debido a que el comportamiento del complejo ssDNA-mtSSB puede cambiar con las condiciones del experimento (Curth y col. 1994; Ciesielski y col. 2015), se decidió tomar experimentos con contenido variable de concentración de NaCl (5, 10, 50, 100 y 200 mM), $MgCl_2$ (4 mM) y mtSSB (5, 10, 50, 100 y 200 nM), combinados entre sí. Así, se midieron un total de ~ 25 ratios $[mtSSB]/[NaCl]$ distintos con un mínimo de 4 CFE por cada condición, siendo este ratio una medida del número medio de mtSSB que existen por cada ión en disolución. En todas las condiciones la extensión de un ssDNA cubierto por mtSSB es distinta a la del ssDNA desnudo, y la forma de las CFE depende de la concentración de sal y de mtSSB (ver figura 4.2). Además, dichas curvas no muestran la presencia de agregados (que se detectarían como saltos bruscos en extensión), algo que ya había sido reportado con anterioridad (Ciesielski y col. 2015; Longley, Smith y Copeland 2009).

Las CFE que se representan en la figura 4.2 demuestran que la fuerza puede tener un efecto relevante sobre la estabilidad del polímero mtSSB-ssDNA ya que la aplicación de tensiones puede lograr la liberación de la mtSSB del ADN de cadena sencilla, llegando a recuperar la CFE que se tenía antes de fluir la mtSSB en el medio, tal y como se ha visto en E.Coli

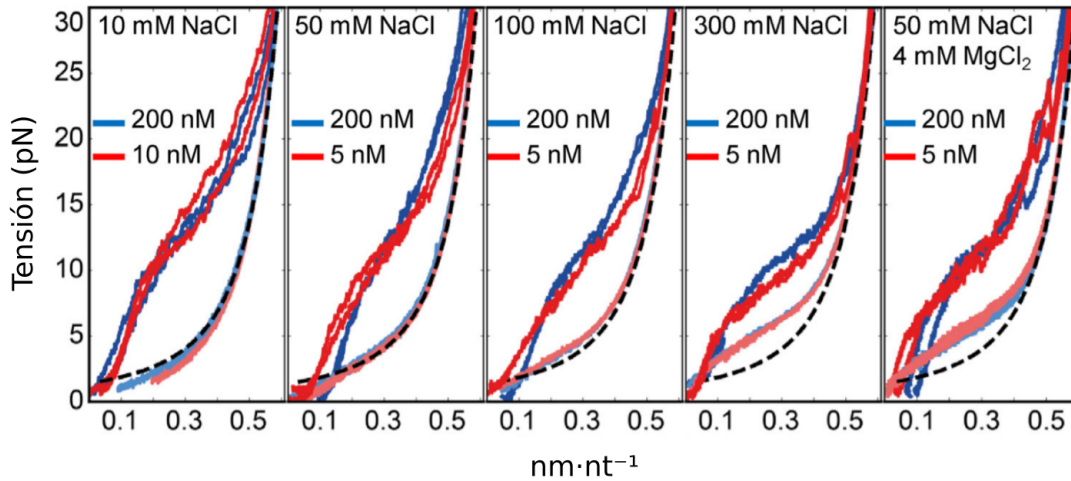


Figura 4.2: Curvas de fuerza-extensión de un ADN organizado por la mtSSB. Las líneas rojas y azules representan los estiramientos una vez unida la mtSSB a ~ 3 pN y en distintas concentraciones. Para cada caso se muestran dos curvas ejemplo. Las líneas más claras representan las CFE de la ssDNA desnuda en las distintas condiciones. La curva negra discontinua es la simulación con el modelo *Worm Like Chain*, *WLC* para polímeros inextensibles, en la que se utilizó una longitud de persistencia de 0.75nm y un módulo de estiramiento de 800pN. La imagen ha sido modificada de la referencia de Morín y col. (2017).

(Suksombat y col. 2015). Para analizar la estabilidad de la unión mtSSB-ssDNA y estudiar las propiedades elásticas intrínsecas del polímero, decidimos llevar a cabo unos experimentos consistentes en una serie de ciclos de estiramiento y relajación empezando a fuerzas bajas, con un incremento de ~ 1 pN por cada ciclo. En estos experimentos solo está presente la SSB que organizó el ssDNA a ~ 3 pN, ya que la mtSSB que no se une se eliminó mediante flujo principal. Diseñados de esta forma nos pueden dar información sobre las fuerzas necesarias para lograr que el ADN se desenrolle de la mtSSB sin soltarse del todo (F_u), y que tensiones son necesarias para lograr la completa liberación del tetrámero (F_d).

En la figura 4.3 se muestran los resultados obtenidos. Para todas las condiciones analizadas, las CFE son completamente reversibles por debajo de $\sim 5 \pm 1$ pN indicando una unión estable mtSSB-ssDNA. Si subimos la tensión aplicada por encima de la fuerza de desenrollamiento, F_u , aparecen fenómenos de histéresis, es decir, se puede calcular un área encerrada entre las curvas de estiramiento y relajación (ver figura 4.3A, panel central). Sin embargo, ciclos consecutivos de estiramiento-relajación presentan CFE similares con histéresis parecidas. Dado que la única mtSSB presente es la que se unió al ADN antes de iniciar los ciclos, la aparición de histéresis demuestra que el cambio en las CFE se debe a cambios en la estructura del polímero sin pérdida de mtSSB. Es decir, si subimos la fuerza por encima de F_u lograremos el desenrollamiento de la mtSSB, pero no su liberación, ya que tras la relajación se recupera la estructura original del polímero. No obstante, subir la fuerza por encima de F_d hace que en ciclos consecutivos la CFE en presencia de mtSSB tienda a la CFE de la ssDNA desnuda, lo que demuestra que la fuerza puede ocasionar la liberación de la mtSSB (figura 4.3A, panel derecho).

Por otra parte, la figura 4.3B muestra que tanto F_u como F_d aumentan con el ratio $[\text{mtSSB}]/[\text{NaCl}]$. Si dicho ratio sube por encima de un determinado valor ($\sim 1.10^6$), ambas fuerzas presentan un incremento de forma abrupta ya que F_u para de valer ~ 6 pN a ~ 9 pN, mientras que F_d sube de ~ 8 pN a ~ 14 pN. Estos resultados demuestran que tanto la concentración salina como la de mtSSB tienen un efecto relevante en la unión de la proteína al ADN. Además, esta misma tendencia se ha observado para la SSB de E.Coli (Suksombat y col. 2015), donde las fuerzas requeridas para desenrollar y soltar una sola SSB son ~ 3 -8 pN y ~ 10 pN, respectivamente, confirmando que las tensiones afectan a la organización del ADN en torno a ambos tetrámeros. Por otra parte, fuerzas superiores a ~ 30 -40 pN son suficientes para lograr la completa liberación del tetrámero.

Para comprobar el efecto que la concentración de sal y mtSSB tienen sobre la forma en la que el tetrámero organiza el ADN, decidimos aplicar el modelo propuesto por Jarillo y col. (2017) en la zona reversible (~ 0 -5 pN) de un total de $N \sim 200$ CFE obtenidas experimentalmente en las distintas condiciones. Dado que no hay evidencia de que la mtSSB se una de forma cooperativa al ADN, el modelo supone que la SSB se puede unir de forma aleatoria en cualquier lugar de la molécula, por lo que cabría esperar que en el complejo ADN-SSB convivan segmentos organizados por SSB y segmentos de ADN de cadena sencilla libres de SSB. Cuando se aplican fuerzas sobre el complejo en la zona reversible, el ADN migra hacia los extremos del tetrámero, obligándolo a mantener su orientación en la dirección de la fuerza

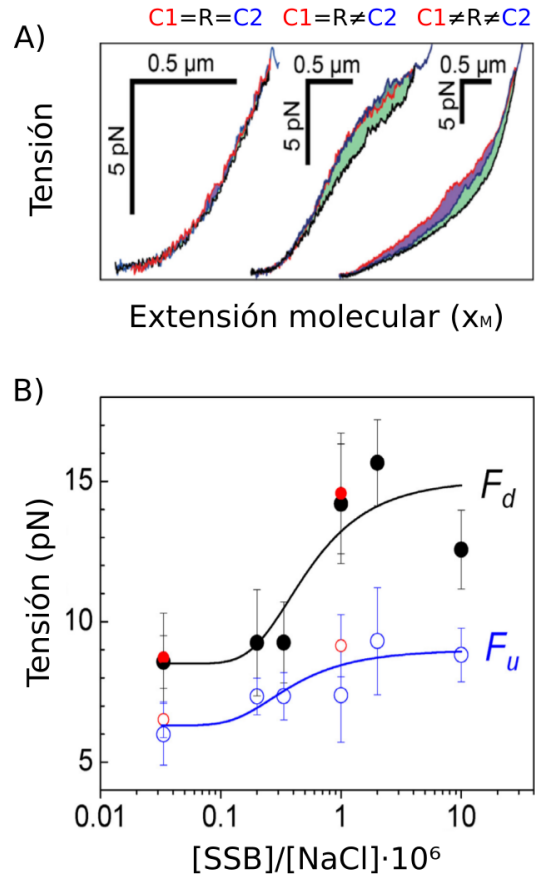


Figura 4.3: Estabilidad de la unión de la mtSSB al sustrato de ADN de cadena sencilla. A) Ejemplos de ciclos de estiramiento-relajación para 50mM NaCl y 100 nM de mtSSB. En todos los paneles C1 representa el primer ciclo, R representa la relajación a ~ 0 pN y C2 representa el segundo ciclo de estiramiento, ~ 1 -2 pN por encima de C1. Por debajo de ~ 5 pN (panel izquierdo) los ciclos son completamente reversibles. Cuando C1 es igual a C2, pero son distintos a la relajación (panel central), significa que la mtSSB se desenrolla sin liberación con la fuerza, ya que tras la relajación se reorganiza el ADN y un nuevo estiramiento presenta una CFE similar a C1. Estos ciclos tienen una histéresis (área verde) que se repite tras el proceso de relajación. Cuando C1 es lo suficientemente alto, la relajación tendrá una CFE similar a la de ADN de cadena sencilla, ya que se ha liberado parte de la mtSSB en el proceso (panel derecho). Al tener el ssDNA más limpio de proteína, el segundo ciclo transcurre con una CFE más proxima a la de cadena sencilla que C1, con una histéresis más pequeña. B) Dependencias de la fuerza de desenrollamiento de la mtSSB, F_u (puntos azules con el centro blanco), y la fuerza de liberación, F_d (puntos rellenos en negro), con el ratio $[\text{mtSSB}]/[\text{NaCl}]$. En rojo se representan los puntos a 4mM MgCl₂ y 50nM NaCl. En todos los casos las barras de error representan el error estándar. Las gráficas se han obtenido de la referencia Morín y col. 2017.

aplicada. Así, para explicar la extensión total de la molécula, se puede considerar que es la suma de dos polímeros independientes, uno cubierto por SSB y otro de ADN desnudo. Por lo tanto en equilibrio, la extensión total experimental por nucleótido $x_{tot}(F)$ se puede explicar como la suma de la extensión total del complejo ADN-SSB a una fuerza dada ($x_{Complejo}(F)$) y la extensión del fragmento de ADN de cadena sencilla $x_{ssDNA}(F)$. De esta forma, si δ es la fracción total de la ssDNA que está cubierta por SSB:

$$x_{Tot}(F) = \delta \cdot x_{Complejo}(F) + (1 - \delta) \cdot x_{ssDNA}(F) \quad (4.1)$$

$x_{ssDNA}(F)$ se obtiene experimentalmente de las CFE de cadena sencilla de ADN como se explica en la sección 3.3.1, por lo que contiene las propiedades elásticas del ADN en cada condición experimental. $x_{tot}(F)$ es la extensión molecular experimental del polímero ssDNA-SSB medida entre las microesferas, normalizada a 1 nt. Por otra parte, la contribución de la región cubierta por mtSSB, $x_{Complejo}(F)$, se modelizó utilizando el *FJC* para elasticidad de polímeros. El *FJC* asume que cada complejo ssDNA-tetrámero se comporta como una varilla rígida de longitud L_{ends} , que coincide con la distancia entre los puntos por donde entra y sale el ADN del tetrámero. Así, la expresión que da la extensión por nucleótido de la región cubierta por mtSSB es la siguiente:

$$x_{Complejo} = \frac{L_{ends}}{N_{nt}} \cdot \left[\coth \left(\frac{F \cdot L_{ends}}{k_B \cdot T} \right) - \frac{k_B \cdot T}{F \cdot L_{ends}} \right] \quad (4.2)$$

N_{nt} es el número de nucleótidos promedio que cada tetrámero es capaz de organizar, $\coth(F \cdot L_{ends}/k_B \cdot T) - k_B \cdot T/F \cdot L_{ends}$ se corresponde con la función de Langevin, y da la medida del alineamiento promedio de los tetrámeros con respecto a la dirección de la tensión aplicada en el sustrato. L_{ends} se tomó como el tamaño cristalográfico de la mtSSB en todas direcciones ($5 \leq L_{ends} \leq 8 \text{ nm}$ (Curth, Urbanke y Kang 1997)), ya que son las posibles distancias que podría valer la unidad del polímero formado por las mtSSB.

Aplicar el modelo demostró que para todos los valores de L_{ends} estudiados se distinguen dos modos de unión estadísticamente distintos: el modo *alto* (mtSSB_A), en el que la mtSSB une mayor número de nucleótidos, y el modo *bajo* (mtSSB_B), en el que se organiza un número más pequeño. La figura 4.4A muestra la variación del número de nucleótidos unidos en las distintas condiciones para un caso ejemplo con $L_{ends}=6 \text{ nm}$. Además en todas las condiciones se demostró que ambos modos son estadísticamente diferentes con un nivel de significancia mayor a un 95% mediante un test t-Student, lo que verifica la existencia de dos modos de unión, tal y como se ha encontrado para la SSB de E.Coli (Lohman y Ferrari 1994; Ferrari, Bujalowski y Lohman 1994). La prevalencia de uno u otro modo depende de la concentración de sal y mtSSB utilizadas, predominando el modo *alto*, mtSSB_A a altas concentraciones de sal ($[\text{NaCl}]=300 \text{ mM}$) o ratios $[\text{mtSSB}]/[\text{NaCl}]$ bajos ($<0.5-1 \cdot 10^6$); mientras que el modo *bajo*, mtSSB_B, predomina a bajas condiciones de sal (10 mM) o alto ratio $[\text{mtSSB}]/[\text{NaCl}]$ (ver figura

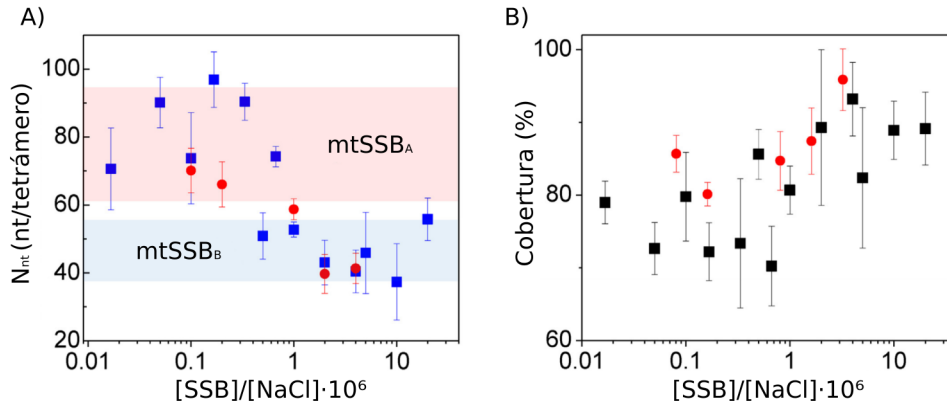


Figura 4.4: Resultados de aplicar el modelo utilizando $L_{ends}=6$ nm. A) Representación del número de nucleótidos organizados por una mtSSB en función del ratio $[SSB]/[NaCl]$. Los puntos rojos representan los resultados a 50mM NaCl y 4mM $MgCl_2$. Prevalen dos de unión mayoritarios, el modo alto (región rosada, mtSSB_A) y el modo bajo (región azulada, mtSSB_B). B) Resultados de la cobertura obtenida en función del ratio $[SSB]/[NaCl]$. En ambos casos las barras de error representan el error estándar. Las gráficas han sido modificadas de la referencia de Morín y col. 2017.

4.4A). Sin embargo, en condiciones intermedias o fisiológicas (~ 100 mM NaCl) el modo de unión dependerá fundamentalmente de la concentración de mtSSB, con el modo *bajo* dominando a concentraciones superiores de ~ 50 -100 nM, lo que implica que habrá mayor número de proteínas unidas por cada ADN de cadena sencilla disponible.

Además, aunque el modo de unión depende del valor de L_{ends} utilizado en los ajustes, tal y como se muestra en la tabla 4.1, para cualquiera de los valores de L_{ends} , el modo mtSSB_B une un número de nucleótidos un 30% menor. En esa misma tabla se puede comprobar que el comportamiento se repite en los experimentos llevados a cabo en presencia de $MgCl_2$. En cualquier caso los resultados del número de nucleótidos de cada modo son compatibles con lo que se puede encontrar en la bibliografía en experimentos de unión a oligonucleótidos en distintas condiciones salinas, donde se han encontrado tamaños de unión de entre 50 y 70 nt por tetrámero (Curth y col. 1994), 68-120 nt por tetrámero para la mtSSB de la *Drosophila melanogaster* (Thommes y col. 1995) o 65-35 para la SSB de E.Coli *TwoBindingModes*.

	$L_{ends}=5nm$	$L_{ends}=6nm$	$L_{ends}=7nm$	$L_{ends}=8nm$
Modos de unión para distinta [NaCl]	43±15	53±27	50±21	57±18
	55±20	67±21	75±22	84±22
Modos de unión con distinta [NaCl] y $MgCl_2$	31±3	39±4	50±7	59±9
	53±16	60±10	73±12	89±16

Tabla 4.1: Tabla con los resultados experimentales para los dos modos de unión encontrados para la SSB de mitocondria humana. En azul se señala el modo bajo obtenido de los ajustes, y en rojo el modo alto. Los errores mostrados corresponden a la desviación estándar. La figura ha sido modificada de (Morín y col. 2017).

Por otra parte, los ajustes a los modelos también demostraron que la cobertura del sustra-

to de ADN también está determinada por el contenido en sal y la concentración de mtSSB. Así, tal y como se puede ver en la figura 4.4B, en el modo *alto* (predominante a bajo ratio $[\text{mtSSB}]/[\text{NaCl}]$) la cobertura será de un $\sim 70\%$, mientras que en el modo *bajo*, predominante a alto ratio $[\text{mtSSB}]/[\text{NaCl}]$, la cobertura será de un $\sim 90\%$.

Modo de unión predominante en la replicación del ADN mitocondrial humano

Hasta ahora se ha podido comprobar que existen dos modos diferenciados de unión de la SSB de mitocondria humana al ADN de cadena sencilla, y la prevalencia de uno u otro modo queda determinada por la concentración de sal y SSB del medio. Sin embargo, dicho modo de unión podría cambiar en función del proceso fisiológico por lo que para determinar si algún modo domina en las condiciones fisiológicas decidimos llevar a cabo unos experimentos que recrean la generación gradual de la cadena retrasada en la replicación del ADN. Se empleó un sistema experimental como el explicado en la sección 3.3.2 en el que se utilizó una horquilla como la utilizada en los experimentos de unión de la mtSSB, pero añadiéndole el *espaciador* junto al *ADN marcado con digoxigenina*. Este montaje deja en el *espaciador* el extremo 3' libre, permitiendo a la polimerasa utilizarlo como *primer* e iniciar la replicación.

En estos experimentos se utiliza una disolución tampón a 50mM Tris HCl pH 7.5, 2mM DTT, 50mM NaCl, 4mM MgCl₂, y se fluyen a la vez, a ~ 3 pN, la polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ (a 2nM) y la mtSSB en distintas concentraciones. Como se explicó en la sección 3.3.2 se utilizó la polimerasa del bacteriófago $\phi 29$ por su alta procesividad y capacidad de desplazamiento de banda (Morín y col. 2012; Kamtekar y col. 2004; Ibarra y col. 2009; Salas 1991; Blanco y col. 1989; Rodríguez y col. 2005). Esto hace que la enzima pueda llegar a replicar a unos ~ 30 nt/s los 2500 pares de bases que forman la horquilla sin disociación hasta que se detiene en el extremo abásico del *lazo final*, lo que deja un sustrato final de 5226 pb de cadena doble y 2540 pb de cadena sencilla que ha sido recubierta por mtSSB de forma gradual. Además, la actividades de replicación no presentan pausas largas ni cambios bruscos en distancia (ver figura 4.5C), lo que confirma una unión progresiva de la mtSSB al ADN de cadena sencilla según es generado en el proceso de apertura de la horquilla.

Suponiendo que la mtSSB permanece estable entre 0 y ~ 5 pN, utilizamos la ecuación 4.2 para repetir los ajustes de la sección anterior pero con las nuevas condiciones de generación de ADN. Estos ajustes nos dan el número de nucleótidos que une cada tetrámero, así como la cobertura total del polímero de ADN. Sus resultados se muestran en la figura 4.5 donde se puede comprobar, que cuando la unión de la mtSSB se produce al mismo tiempo que la generación de cadena sencilla de ADN, y a una velocidad que permite la unión gradual de la mtSSB (~ 30 nt/s), el único modo de unión que prevalece es el modo *bajo* de unión, independientemente de la concentración de la mtSSB. Además, tal y como pasaba en los experimentos de la sección anterior, estos resultados son independientes del valor de L_{ends} ya que el modo mtSSB_B prevalece en todos los casos.

Por otra parte, la generación gradual de la cadena sencilla de ADN garantiza que la mtSSB

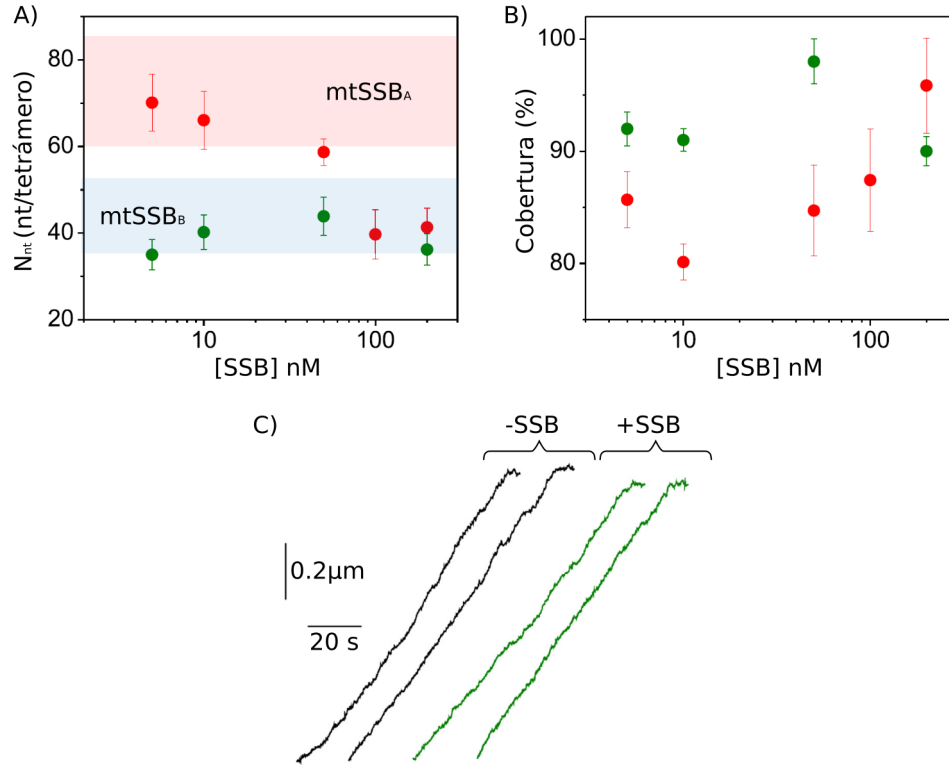


Figura 4.5: Resultados de la unión de la mtSSB al ADN de cadena sencilla cuando tiene lugar al mismo tiempo que la replicación de la horquilla. A) Número de nucleótidos unidos por tetramero para $L_{ends}=6\text{nm}$ y distinta concentración de mtSSB. La región rosada representa el modo alto de unión, y la azulada el modo bajo. B) Cobertura obtenida para las distintas condiciones con $L_{ends}=6\text{nm}$. En A) y B) los puntos rojos representan los resultados obtenidos cuando la unión se produce a un ADN de cadena sencilla previamente generado. Los puntos verdes representan los resultados obtenidos cuando la unión se produce al mismo tiempo que el ADN es generado de forma gradual. C) Trazas representativas de actividades de replicación sin (en negro) y con mtSSB (en verde). Estas trazas representan los cambios en distancia entre las microesferas debidas al efecto combinado de la replicación y la unión de la mtSSB, que son llevadas a cabo con el ADN sujeto a $\sim 3\text{pN}$ y a una velocidad de $\sim 30\text{nt/s}$. Las imágenes han sido modificadas de la referencia Morín y col. 2017.

cubrirá prácticamente la totalidad de la molécula de ADN, ya que como se puede ver en la figura 4.5B), para todas las concentraciones de mtSSB estudiadas la cobertura está en un $\sim 95\%$.

$L_{ends}=5\text{nm}$	$L_{ends}=6\text{nm}$	$L_{ends}=7\text{nm}$	$L_{ends}=8\text{nm}$
34 ± 2	44 ± 4	54 ± 5	63 ± 5
32 ± 2	44 ± 2	53 ± 3	63 ± 3

Tabla 4.2: Tabla con los resultados de los ajustes hechos con el modelo de la ecuación 4.2 para los experimentos de unión en co-replicación. Independientemente del valor de L_{ends} utilizado la concentración de mtSSB no determina el modo de unión, siendo el modo *bajo* el que domina en estas condiciones. Tabla tomada de Morín y col. 2017.

4.2. Replicación de la cadena retrasada

Hasta ahora se han explicado los resultados obtenidos en relación a la comprensión del comportamiento de la SSB de la mitocondria humana. Como se ha comentado en los objetivos

(capítulo 2) en esta tesis se ha tratado de comprender el funcionamiento individual de una parte de las proteínas implicadas en la replicación del ADN mitocondrial humano, así como su funcionamiento colectivo, por lo que en las siguientes secciones se van a mostrar y explicar los resultados obtenidos en los experimentos de replicación de la polimerasa de la mitocondria humana.

Detección de actividades individuales de replicación de la $pol\gamma$ y obtención de las CFE de la cadena sencilla de ADN en presencia de la SSB

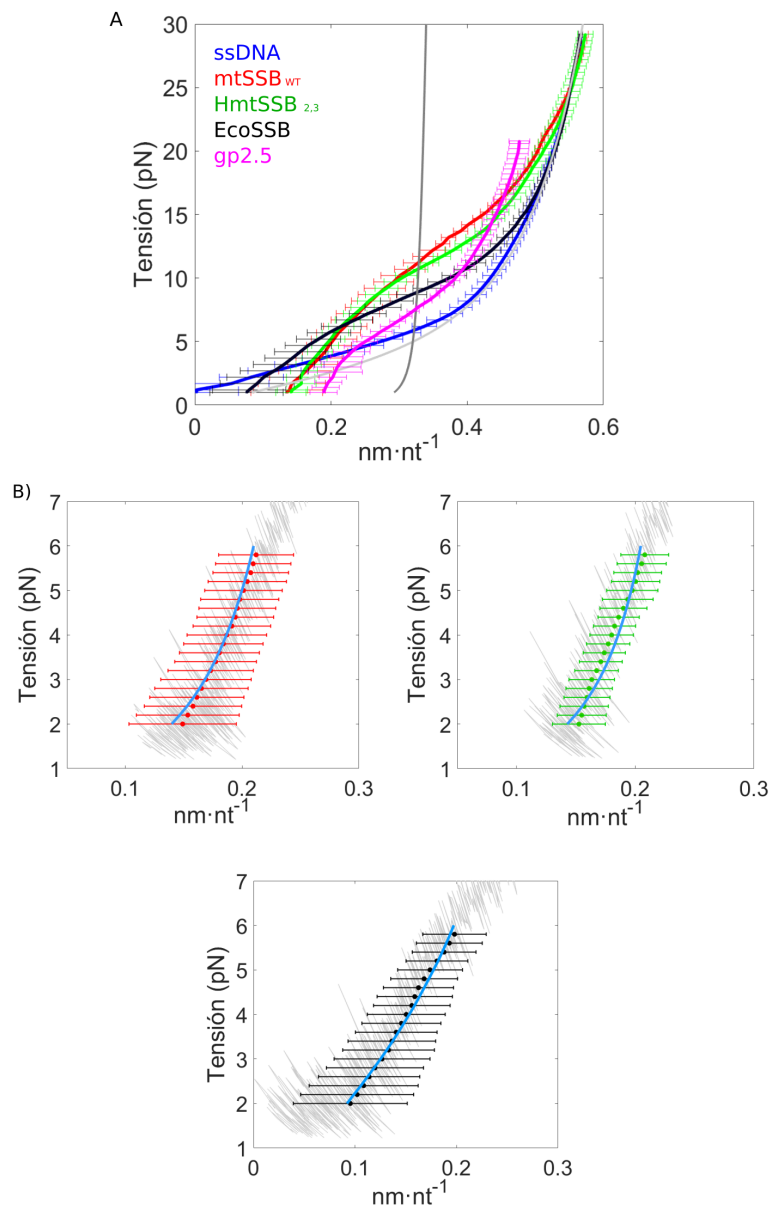


Figura 4.6: Resultados experimentales para las CFE del ssDNA en presencia de la SSB. A) CFE en presencia de todas las SSB estudiadas en esta tesis. B) Ajustes del modelo de (Jarillo y col. 2017) y (Morín y col. 2017) a los resultados experimentales, siempre por debajo de 8pN. Imágenes modificadas de Cerrón y col. 2019.

En estos experimentos se usó el sistema experimental explicado en la sección 3.3.3 y la

figura 3.11. Se llevaron a cabo en las condiciones experimentales apropiadas para la replicación del ADN (ver sección 3.3, 30mM KCl, 4mM MgCl₂), con 50nM SSB para cada uno de los tres tipos de proteína. Estas condiciones son conocidas por estimular la unión de la SSB en el modo *bajo* al ADN de cadena sencilla (Antony y Lohman 2018; Lohman y Ferrari 1994; Qian y Johnson 2017; Morín y col. 2017). De hecho, el análisis de CFE de los complejos SSB-ADN para los tres tipos de tetrámero estudiados en esta tesis (ver figura 4.6A indicaron que, en nuestras condiciones experimentales y a las fuerzas por debajo de las cuales la SSB permanece establemente unida al tetrámero ($\sim 8-10$ pN), las tres proteínas se unen al ADN en el modo *bajo* de unión (~ 30 nt/tetrámero), cubriendo casi la totalidad del sustrato (80-90%). En la figura 4.6B se muestran las regiones de las CFE en las cuales se aplicó el modelo desarrollado en las referencias (Jarillo y col. 2017) y (Morín y col. 2017); en rojo se muestran los valores promedio de las Curvas de Fuerza-Extensión para la mtSSB, junto a una traza representativa experimental, en verde se muestran los valores de las CFE para la mtSSB_{2,3}, y en negro para las CFE de EcoSSB. En gris se muestran ejemplos de curvas experimentales representativas para cada uno de los casos, y en azul se indican los ajustes a los modelos.

Como se ha comentado anteriormente estos ajustes siempre se realizaron a fuerzas por debajo de ~ 8 pN, ya que a tensiones superiores la fuerza favorece la suelta de la SSB de la ssDNA, y el ADN tiende a salirse por los extremos del tetrámero (Suksombat y col. 2015; Morín y col. 2017).

Las Curvas de Fuerza-Extensión nos permitieron obtener el número de nucleótidos replicados por unidad de tiempo de la polimerasa en las distintas condiciones. En la figura 4.7 se ven unos ejemplos de actividades de replicación de la pol γ llevadas a cabo en las distintas condiciones de SSB. Como se puede comprobar presentan regiones donde la pol γ replica a su velocidad máxima (V_{Max}) (el número de nucleótidos replicados aumentan con el tiempo) y regiones de pausa donde la enzima permanece inactiva.

4.2.1. La estructura secundaria formada en el ADN de cadena sencilla ralentiza la velocidad máxima de replicación de la polimerasa γ

El primer paso consistió en estudiar y analizar el comportamiento de la polimerasa γ cuando replica el sustrato de ADN en ausencia de SSB. Se analizaron un total de N=100 actividades independientes, que demostraron que a las fuerzas más bajas (~ 1 pN) el número promedio de nucleótidos replicados por actividad (también llamado procesividad) está en torno a 450 ± 25 nt, con una velocidad de replicación promedio que oscila entre ~ 6 y ~ 13 nt/s, tal y como se muestra en la figura 4.8, donde se pueden ver los resultados para la procesividad y velocidad promedio de replicación (V_{Media}).

Estos valores coinciden con lo obtenido en estudios *in vitro* llevados a cabo con las mismas condiciones salinas que en los experimentos de esta tesis, donde experimentos con la holoenzima reconstituida dieron resultados de procesividad en torno a ~ 560 nt (Ciesielski y col. 2015; Fan y col. 2006) y velocidad promedio de replicación de ~ 6 nt/s (Kaguni 2004; Graziewicz, Longley

y Copeland 2005).

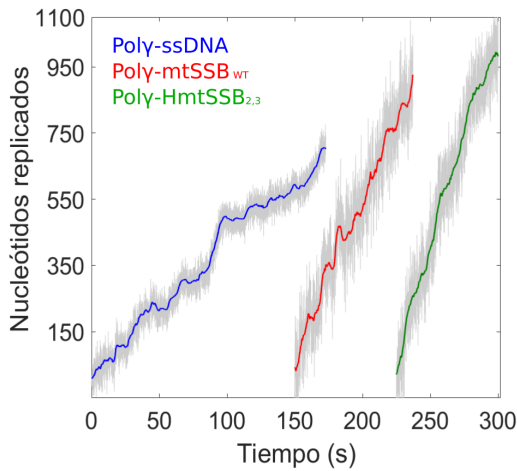


Figura 4.7: Ejemplos representativos de actividades de replicación de la pol γ en ausencia y presencia de variantes de mtSSB. Imagen obtenida de la referencia de Cerrón y col. 2019.

Por otra parte, el proceso de preparación del ADN *ssds* detallado en la sección 3.2.2 podría dar lugar a pequeños residuos de ssDNA que podrían estar generando extremos 3' libres en el fragmento de ADN de cadena sencilla presente en el sustrato utilizado. Esto hace que en nuestros experimentos pudiera darse la circunstancia de ocurrir varios eventos de replicación sobre el ADN estirado al mismo tiempo. Por esto, para garantizar que la actividad registrada en las pinzas ópticas fuera debida a una única polimerasa, se mantuvo la concentración de la misma lo más baja posible (2nM). Además se repitió el experimento variando la concentración de la enzima hasta 50 veces (de 0.2nM a 10nM), y como se puede ver en la

figura 4.9 los resultados tanto de V_{Media} como de procesividad no cambian, lo que demuestra que en estos experimentos cada actividad de replicación se debe a una sola polimerasa.

En la figura 4.7 se ha podido comprobar que las actividades de replicación presentan regiones de pausa y regiones de movimiento, siendo estas últimas zonas donde la enzima está replicando el ADN a su velocidad máxima. Para calcular la velocidad en estas regiones, donde se puede estudiar la polimerasa cuando está activamente replicando el ADN, desarrollamos un

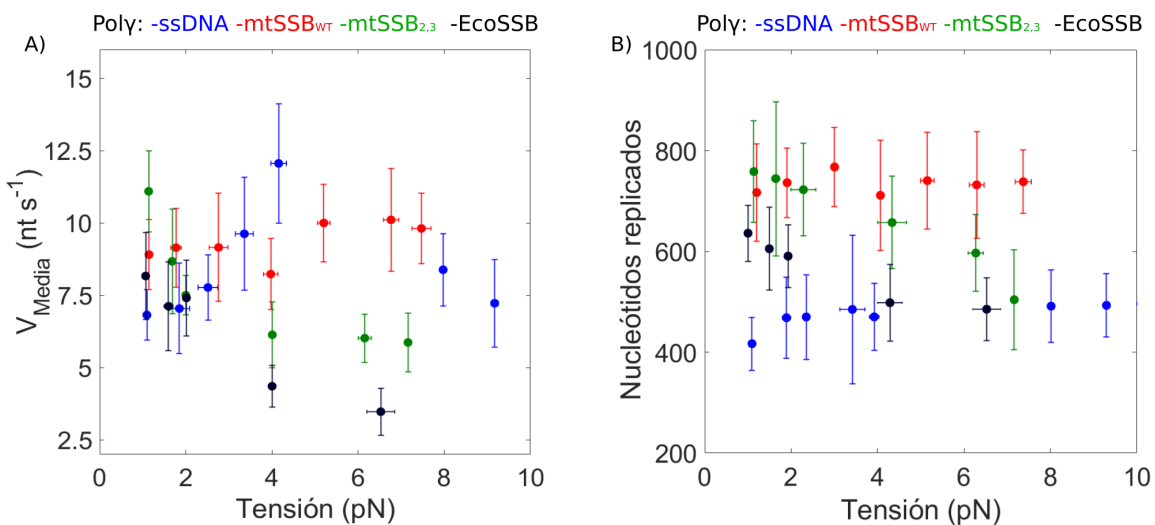


Figura 4.8: Resultados obtenidos para los experimentos de replicación sobre cadena sencilla de ADN. A) Resultados experimentales para la velocidad media de replicación de la polimerasa γ en las distintas condiciones. B) Procesividad de la enzima. Figura obtenida de Cerrón y col. 2019.

nuevo método (el método de *las prominencias*) que permite obtener la velocidad instantánea (o velocidad máxima, V_{Max}) en polimerasas con velocidades de replicación lentas, como es el caso de la pol γ . Debido a lo novedoso del método, en el Anexo A.2 se incluyen ejemplos de obtención de la V_{Max} en actividades de replicación simuladas con velocidad conocida. Con estos datos descubrimos que la aplicación del método de *las prominencias* subestima las velocidades de replicación en torno a un $\sim 13\%$, pero sin embargo permite obtener el valor de la V_{Max} con mayor exactitud que con el método tradicionalmente empleado de la doble gaussiana, válido para polimerasas que replican a mayor velocidad (Maier, Bensimon y Croquette 2000; Wuite y col. 2000; Morín y col. 2012; Manosas y col. 2012).

Como en el caso de la velocidad media de replicación, V_{Media} , los resultados obtenidos para V_{max} también presentan una dependencia fuerte con la tensión aplicada en el ADN, ya que aumenta con la velocidad a tensiones menores que ~ 6 pN (de ~ 15 nt/s a ~ 25 nt/s) y disminuye gradualmente hasta pararse a tensiones mayores que ~ 6 pN. Este comportamiento no es nuevo en este tipo de enzimas, ya que ha sido visto con anterioridad en determinados estudios (Maier, Bensimon y Croquette 2000; Manosas y col. 2012; Wuite y col. 2000; Nauffer y col. 2017). Para fuerzas menores a ~ 6 pN, la tensión produce un aumento en V_{max} , lo que podría estar relacionado con la presencia de estructura secundaria en el ssDNA, ya que el porcentaje de nucleótidos que no forman estructura secundaria es cercano al $\sim 100\%$ para esas fuerzas, tal y como se muestra en la figura A.1 del anexo A.1 (calculado siguiendo el procedimiento descrito en la referencia de Bosco, Camunas-Soler y Ritort (2014)). Además, hay estudios previos que demuestran que la estructura secundaria tiene un efecto relevante en la actividad de determinadas polimerasas similares a la estudiada en esta tesis (Hacker y Alberts 1994; Johnson y O'Donnel 2005; Kaguni y Clayton 1982). Por ello, decidimos desarrollar un modelo en el que V_{max} está modulada por el trabajo de convertir un nucleótido de cadena sencilla (que mide una distancia $x_{ssDNA}(f)$) a un

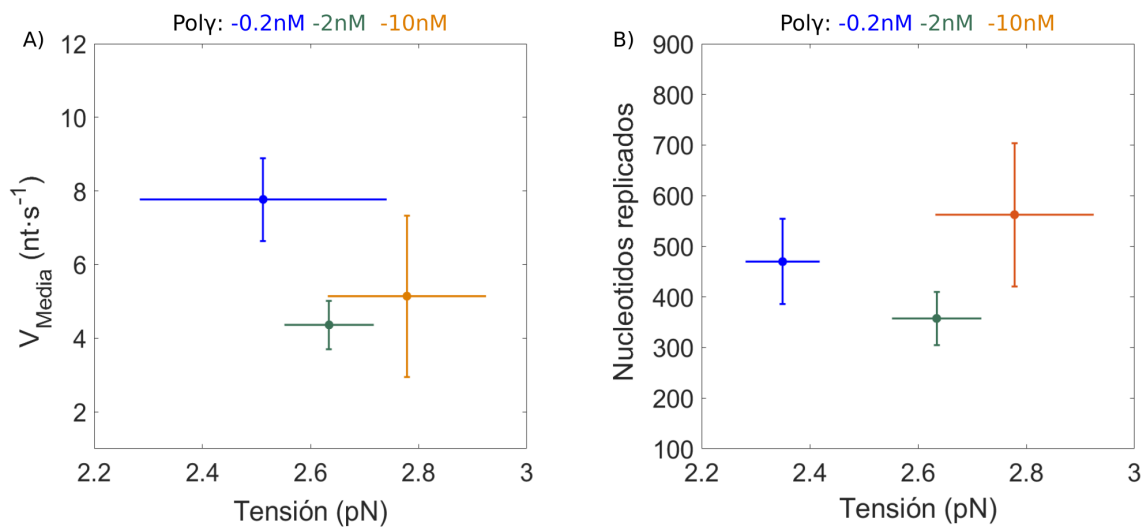


Figura 4.9: Experimentos de replicación del ssDNA a diferentes concentraciones de pol γ . A) Velocidad de replicación media. B) Procesividad. La figura proviene de la referencia Cerrón y col. 2019.

nucleótido de cadena doble (cuya distancia a una fuerza f es $x_{dsDNA}(f)$), y además un trabajo extra empleado en deshacer la estructura secundaria característica del ADN de cadena sencilla a cada fuerza. Así, ajustamos la curva fuerza- V_{max} a la ley de Arrhenius (Bustamante y col. 2004):

$$V_{max}(f) = k_{max}(0) \cdot e^{-\frac{\delta \cdot f \cdot (x_{ss}(f) - x_{ds}(f)) + \Delta G_{eff} \cdot (1 - \phi(f))}{k_B T}} \quad (4.3)$$

Donde $k_{max}(0)$ es la velocidad máxima de replicación sin fuerza aplicada sobre el sustrato y en ausencia de estructura secundaria, δ es el tamaño de paso cinético de la polimerasa, ΔG_{eff} es la barrera energética que genera la estructura secundaria al avance de la polimerasa. $\phi(f)$ va de 0 a 1 y representa el porcentaje de nucleótidos desapareados que tiene el ADN de cadena sencilla a una fuerza f y en nuestras condiciones experimentales. Por otro lado k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. Las variables $\phi(f)$, $x_{ssDNA}(f)$ y $x_{dsDNA}(f)$ son empíricas, es decir, provienen de las CFE en las distintas condiciones experimentales (figura 4.6). Además decidimos fijar δ como 1, ya que según diversos estudios de estructura de proteínas y bioquímica en *bulk*, un tamaño de paso cinético de 1 nucleótido sería lo esperable para este tipo de proteínas (Li, Korolev y Waksman 1998; Berman y col. 2007; Morín y col. 2015; Pandey y Patel 2014). Por otra parte, las variables $k_{max}(0)$ y ΔG_{eff} se obtienen tras ajustar la ecuación 4.3 a los datos experimentales minimizando el error cuadrático medio. Tal y como se muestra en la figura 4.10A encontramos que el modelo ajusta para todo el rango de fuerzas estudiado, dando como resultado un $k_{max}(0)=23\pm 0.7$ nt/s y $\Delta G_{eff}=1.4\pm 0.2k_B T$.

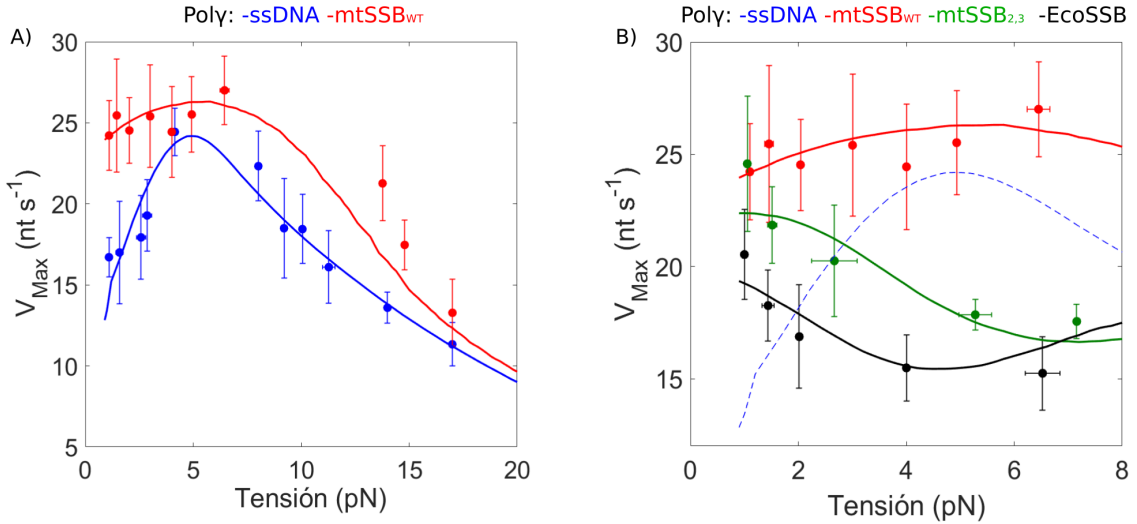


Figura 4.10: Velocidad de replicación de la polimerasa γ en función de la fuerza y de la concentración de SSB. A) V_{Max} en ausencia y presencia de SSB, en azul y rojo respectivamente. B) V_{Max} para los distintos SSB usadas. En ambas figuras las líneas continuas representan los ajustes a los distintos modelos explicados en el texto principal. Figura originaria de Cerrón y col. 2019.

En concreto, el valor de $k_{max}(0)$ es similar a la velocidad de incorporación intrínseca de nucleótidos encontrada anteriormente en experimentos *in vitro* de la polimerasa de la mitocondria

de la *Drosophila melanogaster*, 15 nt/s, y de la humana, 37nt/s (Lee y Johnson 2006; Johnson y Johnson 2001a; Williams y Kaguni 1995).

Además, este modelo demuestra la importancia que tiene la estructura secundaria en la modulación de V_{max} a bajas fuerzas, ya que representa una barrera de $1.4k_B T$, lo que hace que sea el principal impedimento al avance de la polimerasa γ a fuerzas por debajo de ~ 6 pN. Sin embargo a fuerzas mayores es el trabajo mecánico de convertir un nucleótido de cadena sencilla a uno de cadena doble la mayor contribución a la barrera energética, ya que a ~ 6 pN se ha desestabilizado casi toda la estructura secundaria tal y como se muestra en la figura A.1, $\phi \sim 1$.

En este punto, conviene destacar que aunque la polimerasa γ tiene capacidad exonucleolítica y de corrección de errores, nosotros no fuimos capaces de detectar actividades de exonucleólisis a fuerzas por debajo de ~ 60 pN, tal y como se ha observado para otras polimerasas similares (Naufer y col. 2017; Ibarra y col. 2009; Wuite y col. 2000) ya que la velocidad a la que ocurre dicho proceso podría no ser detectable al encontrarse por debajo del límite de resolución de nuestro equipo.

4.2.2. La SSB impide la formación de la estructura secundaria de la cadena sencilla de ADN favoreciendo la replicación por parte de la pol γ

El siguiente paso de la investigación fue incluir la SSB de la mitocondria humana en los experimentos de replicación, para ello se siguió el mismo procedimiento que en la sección anterior pero añadiendo la SSB en la disolución con la polimerasa. Se analizaron un total de 109 curvas que demostraron que la presencia de la SSB aumenta tanto la procesividad como la velocidad de replicación en el rango en el que la SSB permanece establemente unida al sustrato (8-10pN)(Morín y col. 2017; Suksombat y col. 2015), tal y como se muestra en las figura 4.8. Esta estimulación ya se ha visto anteriormente en estudios de replicación *in vitro*, como se explica los estudios de Korhonen y col. (2004), Ciesielski y col. (2015) y Williams y Kaguni (1995). En estas condiciones la polimerasa γ replica unos ~ 900 nt y la velocidad promedio de replicación sube a ser unos ~ 9 nt/s, manteniéndose aproximadamente constante para el rango de fuerzas estudiado (figura 4.8). La SSB de mitocondria humana también tiene un efecto en V_{max} , ya que como se puede ver en la figura 4.10 cuando la replicación se produce en presencia de SSB en el sustrato, la velocidad máxima sube hasta ~ 24 nt/s a 1pN, manteniéndose también aproximadamente constante para todo el rango de fuerzas en el cual la SSB permanece unida, 8-10pN. Además, el valor de V_{Max} alcanzado es similar al que tiene la pol γ a ~ 6 pN cuando la replicación se produce en ausencia de SSB, lo cual significa que a las tensiones en las que la SSB permanece establemente unida, desempeña un rol fundamental impidiendo la formación de estructura secundaria en la cadena sencilla de ADN, permitiendo así que la polimerasa alcance la velocidad instantánea de replicación máxima medida en nuestras condiciones experimentales. De hecho, si ajustamos los datos experimentales a la ecuación 4.3 asumiendo que no hay estructura

secundaria ($\phi(f) \sim 1$) y fijando $k_{max}(0)$ al valor obtenido en los ajustes en ausencia de SSB ($\sim 23\text{nt/s}$), modelo ajusta a nuestros datos experimentales. Cabe señalar que la dependencia de V_{Max} con la fuerza viene exclusivamente del trabajo mecánico de convertir un nucleótido de cadena sencilla cubierto por SSB (x_{SSB}) a uno de cadena doble (x_{dsDNA}) en cada ciclo de incorporación del nucleótido ($\delta=1$):

$$V_{max}(f) = k_{max}(0) \cdot e^{-\frac{\delta \cdot f \cdot (x_{SSB}(f) - x_{ds}(f))}{k_B T}} \quad (4.4)$$

Como se indica en la figura 4.10, este modelo describe nuestros resultados experimentales, indicando que a pesar de la alta afinidad de la SSB al ssDNA, debe existir algún mecanismo de interacción entre la SSB y la polimerasa para lograr la liberación *activa* de la SSB de mitocondria humana del sustrato. Con la intención de averiguar qué mecanismo gobierna estas interacciones, hicimos los experimentos descritos en la sección siguiente.

4.2.3. Las interacciones entre la polimerasa y la SSB son necesarias para la disociación *activa* de la SSB

Basándonos en los resultados obtenidos en la sección anterior, decidimos repetir los experimentos de replicación en presencia de la SSB de mitocondria humana mutante 2,3 (mtSSB_{2,3}), y de esta forma analizar el rol de las interacciones SSB-polimerasa en el proceso de liberación *activa* de la SSB del sustrato de ADN. La mtSSB_{2,3}, carece de 9 residuos que corresponden al lazo 2,3 del tetrámero (S51-L58), y que se sabe que contribuyen a la estimulación de la actividad de la pol γ pero su mutación no afecta a la afinidad de la SSB por el ADN (Oliveira y Kaguni 2011). Para comprobar que el tetrámero mutante mantiene el mecanismo de unión al ADN, obtuvimos las CFE del sustrato ADN-mtSSB_{2,3}, resultando en una curva prácticamente idéntica a la CFE obtenida en presencia mtSSB_{WT}. Ambas curvas se pueden ver en la figura 4.6A, donde se puede comprobar que solapan para todo el rango de fuerzas estudiado.

Como se hizo con la mtSSB_{WT}, estos experimentos se llevaron a cabo a fuerzas donde la mtSSB_{2,3} permanece establemente unida ($<8\text{-}10\text{pN}$), pero en este caso la curva fuerza- V_{Max} (mostrada en la figura 4.10) varía con respecto al caso de la mtSSB_{WT}: a fuerzas bajas ($\sim 1\text{pN}$) la V_{Max} tiene un valor similar a la obtenida para la mtSSB_{WT} ($V_{Max}=23\pm 2\text{nt/s}$) pero según incrementa la tensión V_{Max} cae un $\sim 30\%$ (ver figura 4.10). Estos resultados demuestran que el lazo 2,3 es muy importante para el mecanismo de desplazamiento de la SSB del sustrato de ADN.

Para averiguar si este efecto en V_{Max} se debe a alguna particularidad del complejo mtSSB_{2,3}-ssDNA, o es específico de la eliminación del lazo2,3, decidimos llevar a cabo los mismos experimentos pero en este caso con la SSB de E.Coli. Tal y como se comentó en la introducción, esta SSB comparte homología estructural, de secuencia y funcional con la SSB de la mitocondria humana (Lohman y Ferrari 1994; Raghunathan y col. 2000; Bell, Liu y Kowalczykowski 2015;

Suksombat y col. 2015): las dos proteínas se unen al ADN de cadena sencilla como tetrámeros, con constantes de disociación y unión al ADN similares, y además responden de forma similar a la tensión aplicada en el sustrato, tal y como se puede ver en la figura 4.6A. Sin embargo la SSB de E.Coli (EcoSSB) no tiene unos residuos equivalentes al lazo 2,3 característico de la SSB de mitocondria animal. En la figura 4.8 se muestran los resultados obtenidos con esta SSB, y se puede ver que curiosamente tienen una curva de fuerza- V_{Max} similar a la obtenida para la mtSSB_{2,3}: a bajas fuerzas (~ 1 pN) la velocidad máxima de replicación son 21 ± 2 nt/s, pero decrece rápidamente según la fuerza aumenta hasta ~ 8 pN.

Como se puede suponer, este comportamiento característico de la mtSSB_{2,3} y EcoSSB indica que cuando se introducen en el experimentos SSBs carentes del lazo 2,3, podría estar produciéndose un cambio conformacional significativo que provoca la caída de V_{Max} a fuerzas mayores a ~ 2 pN, por lo que las SSB pasan a ser un obstáculo para la capacidad de replicación de la polimerasa γ y no una ayuda. Esto indica que las interacciones específicas entre la mtSSB_{WT} y la polimerasa γ mediadas por el lazo2,3 son necesarias para amortiguar el efecto que la tensión pueda ejercer sobre la velocidad de replicación máxima. Es resumen, se puede concluir que el lazo2,3 parece tener un rol fundamental en la liberación activa de la SSB de mitocondria humana del sustrato de ADN de cadena sencilla.

4.2.4. Obtención de los cambios conformacionales y energías implicadas en la liberación *activa* de la SSB

Dados los resultados obtenidos en las secciones anteriores, en esta parte de la tesis se desarrolló un modelo simple para explicar qué posibles cambios conformaciones inducidos con fuerza podrían estar implicados en la interacción polimerasa-SSB, así como para cuantificar las posibles energías de interacción existentes entre ambas proteínas y cómo las tensiones aplicadas sobre el ADN modulan la cinética de interacción polimerasa-SSB para los tres tipos de SSB analizados.

Este modelo se basa en la ecuación 4.4, que explica la curva de fuerza-velocidad para la replicación del ADN en presencia de la mtSSB_{WT}, pero propone que la velocidad de replicación de la pol γ sobre el complejo ssDNA-SSB viene descrita por dos factores adicionales de modulación:

- 1) La probabilidad del complejo polimerasa-SSB de establecer interacciones funcionales que favorezcan la liberación de la SSB del ssDNA, $P_{Int}(f)$. Esta probabilidad se puede escribir como:

$$P_{Int}(f) = \frac{e^{-\frac{\Delta G_{Int} + f \cdot d}{k_B T}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G_{Int} + f \cdot d}{k_B T}}} \quad (4.5)$$

Donde ΔG_{Int} es la diferencia en energía libre entre el estado en el que las interacciones funcionales polimerasa-SSB favorecen la liberación de la SSB (es decir, ambas proteínas presentan una interacción activa) y el estado en el que las interacciones no se han establecido. Por lo tanto ΔG_{Int} es la energía de interacción entre ambas proteínas. d es la distancia entre el estado en el que ambas proteínas interactúan y el estado de transición al estado de no interacción, por lo que puede interpretarse como la magnitud del cambio conformacional inducido por la fuerza f que produce un decaimiento en la probabilidad de interacción entre la polimerasa γ y la SSB.

- 2) La barrera energética necesaria para liberar n nucleótidos unidos a la SSB más cercana a una fuerza f , $n\Delta G_{SSB}(f)$. La presencia de esta barrera provocaría un decaimiento en la velocidad de replicación al involucrar un trabajo mecánico extra. $\Delta G_{SSB}(f)$ se calculó experimentalmente de las CFE de los complejos ssDNA-SSB que muestran en la figura 4.6, y si tenemos en cuenta este trabajo extra, la ecuación 4.4 se reescribe como:

$$V_{Max}(f) = V_{Max,0} \cdot e^{-\frac{\delta \cdot f \cdot (x_{SSB}(f) - x_{dsDNA}(f))}{k_B T}} \cdot \left[P_{Int} + (1 - P_{Int}) e^{-\frac{n \cdot \Delta G_{SSB}}{k_B T}} \right] \quad (4.6)$$

Con $\Delta G_{SSB}(f)$:

$$\Delta G_{SSB}(f) = \int_0^\infty (x_{ssDNA}(f) - x_{SSB}(f)) df - \left[\int_0^f x_{ssDNA}(f) df - \int_0^f x_{SSB}(f) df \right] \quad (4.7)$$

En esta ecuación los valores de δ , $k_{max}(0)$, x_{SSB} , x_{ssDNA} , x_{dsDNA} y ΔG_{SSB} provienen de los ajustes de la ecuación 4.3 a las curvas de replicación sobre cadena sencilla (figura 4.6) y de las CFE obtenidas experimentalmente. Por lo tanto la ecuación 4.6 requiere obtener los valores de ΔG_{Int} , n y d de los ajustes con el modelo a las curvas fuerza- V_{Max} obtenidas para las tres condiciones de SSB estudiadas: mtSSB_{WT}, mtSSB_{2,3} y EcoSSB.

Estos ajustes dieron como resultado un cambio conformacional $d \sim 2.7$ nm que es inducido por fuerzas similares en los tres sistemas polimerasa-SSB estudiados. La única diferencia observada está en el valor de la energía de interacción de cada pareja polimerasa-SSB, ΔG_{Int} . Así, si la replicación ocurre en presencia de la SSB de la mitocondria humana carente de los aminoácidos del lazo 2,3, mtSSB_{2,3}, la energía de interacción será de $-2.3 \pm 0.8 k_B T$, mientras que para la EcoSSB es $-1.0 \pm 0.4 k_B T$. Estos valores de la energía de interacción son relativamente bajos, y combinados con un cambio conformacional razonablemente grande, ~ 2.7 nm, hacen que la probabilidad de interacción decrezca rápidamente por debajo de 1 en cuanto la tensión crece por encima de ~ 1 pN. Como consecuencia de este fenómeno la interacción entre ambas proteínas

se debilita, provocando la aparición de la barrera energética impuesta por las SSB, $n\Delta G_{SSB}(f)$, reduciendo así V_{Max} de forma concomitante. Por otra parte, los ajustes con la ecuación 4.6 a los datos de Fuerza- V_{Max} obtenidos con la mtSSB_{WT} dieron como resultado un $\Delta G_{Int} = -12k_B T$. En este caso la fuerza de la interacción es lo suficientemente grande como para contrarrestar el efecto del cambio conformacional inducido por la tensión, asegurando así una probabilidad de interacción próxima a 1 ($P_{Int} \sim 1$) durante un rango grande de fuerzas comprendido entre ~ 1 y ~ 10 pN (ver figura 4.12 para ver en detalle la evolución de la probabilidad de interacción con la fuerza para las proteínas utilizadas en los experimentos).

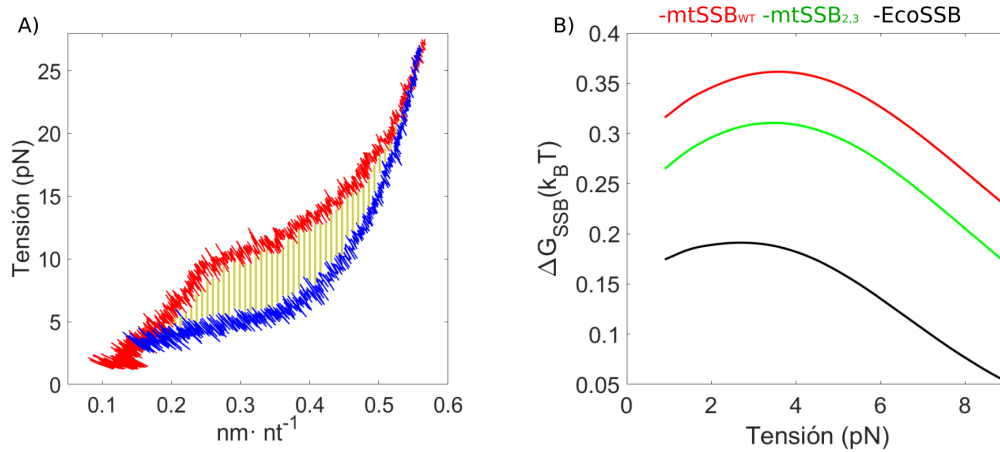


Figura 4.11: Obtención del coste energético de quitar un nucleótido unido a una SSB. A) La energía se calcula como el área encerrada entre las CFE del ssDNA y de la SSB. B) Energías calculadas para las tres SSB empleadas en función de la fuerza. Figura obtenida de la referencia de Cerrón y col. 2019.

Por otra parte, los valores de n obtenidos fueron $n \sim 2$ y $n \sim 5$ para la mtSSB y la EcoSSB, respectivamente, mientras que los valores de $\Delta G_{SSB}(0)$ obtenidos a $f=0$ de forma experimental fueron $\sim 0.3k_B T$ para la SSB de la mitocondria humana y $\sim 0.18k_B T$ para la SSB de E.Coli. Estos valores varían en función de la fuerza a la que se sujeta el sustrato ADN-SSB, ya que como se puede ver en la figura 4.12, dependiendo de la tensión que se ejerce sobre el sistema la pol γ tendrá que llevar a cabo mayor o menor trabajo para retirar la SSB del ssADN.

4.2.5. Efecto de SSB homóloga y no homóloga en la actividad de la polimerasa de T7

Uno de los objetivos de esta tesis es entender cual es el mecanismo de interacción entre las SSB y la polimerasa y analizar si este mecanismo es generalizable a otros tipos de sistemas replicativos. Para ello decidimos medir el efecto que tiene la presencia de SSB homólogas (gp2.5) y no homólogas (mtSSB_{WT} y EcoSSB) sobre la V_{Max} de la polimerasa del bacteriófago T7 (T7DNAp) cuando se ejerce tensión sobre el sistema. Además, tal y como se puede ver en la figura 4.6, la CFE de la T7SSB presenta una forma distinta a las otras SSB, ya que al tratarse de un dímero tiene diferencias considerables en la estructura y forma de unión al ADN (Hernandez y Richardson 2018; Hollis y col. 2001).

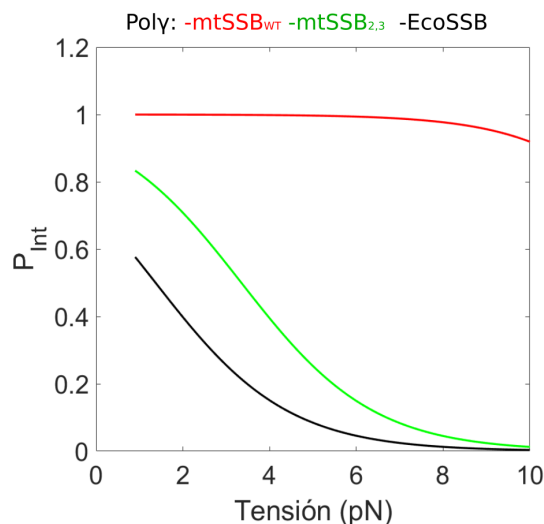


Figura 4.12: Evolución de la probabilidad de interacción de las tres proteínas con la tensión aplicada en el sustrato. Figura modificada de Cerrón y col. 2019.

El primer paso consistió en analizar la cinética de replicación de la T7DNAp en las mismas condiciones que en los experimentos de la $pol\gamma$. Tal y como se ha demostrado en otros estudios (Maier, Bensimon y Croquette 2000; Wuite y col. 2000; Hoekstra y col. 2011), la velocidad de replicación y la velocidad instantánea sin pausas (V_{Max}) son dependiente de la tensión aplicada en el ADN.

Como en el caso de la $pol\gamma$, entre 1 y 6pN V_{Media} aumenta con la fuerza, mientras que por encima de 6pN la velocidad de replicación desciende con la tensión (ver figura 4.13).

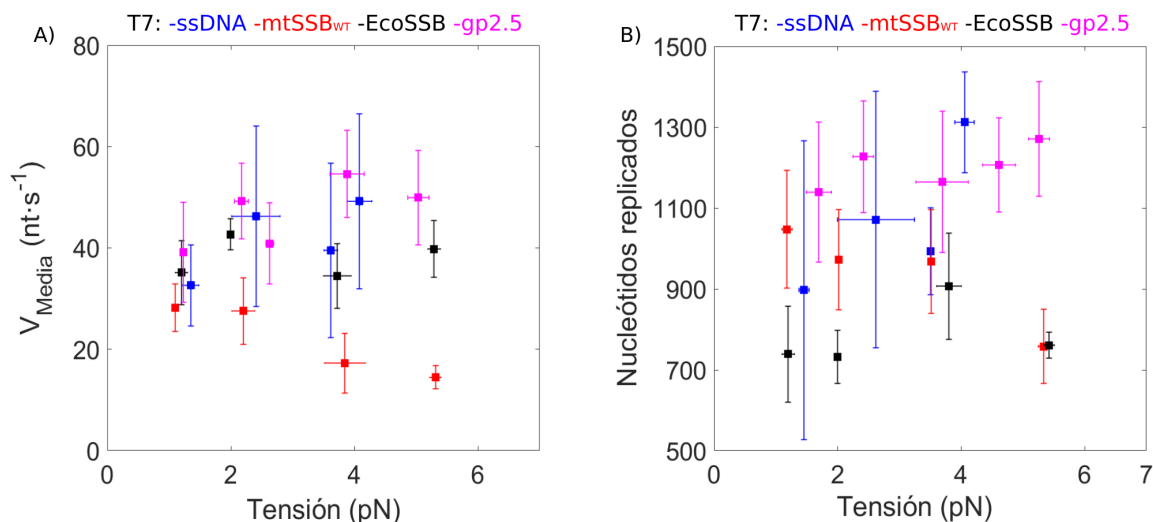


Figura 4.13: Resultados obtenidos para los experimentos de replicación de la T7DNAp. A) Velocidad media. B) Procesividad. Imagen originaria de Cerrón y col. 2019.

Por otra parte, el análisis de la velocidad instantánea de replicación dio un resultado similar. La fuerza produce un aumento en V_{Max} hasta unos ~ 6 pN, y partir de este valor la tensión tiene un efecto inhibitorio sobre la velocidad máxima de replicación. Como se puede ver en

la figura 4.14, y al igual que pasaba con la $\text{pol}\gamma$, toda la curva de Fuerza- V_{Max} se puede explicar con el modelo propuesto en la sección 4.2.1, ecuación 4.3, que considera el efecto combinado de la tensión y la estructura secundaria en la velocidad de replicación, V_{Max} . Los ajustes que se muestran en la figura 4.14 dieron como resultado un $k_{Max}(0)=90\pm 6\text{nt/s}$ y un $\Delta G_{eff}=2.6\pm 0.5k_B T$ para $\delta=1$.

También analizamos actividades de replicación de la T7DNAP sobre sustratos de ADN cubiertos por la SSB gp2.5, la mtSSB_{WT} y la EcoSSB en las mismas condiciones que los experimentos anteriores y en un rango de fuerzas comprendido entre ~ 1 y $\sim 8\text{pN}$. En la figura 4.14B se muestran los resultados de estos nuevos experimentos, donde se ve que en presencia de su SSB homóloga, la gp2.5, la T7DNAP replica con una $V_{Max}\sim 90\text{nt/s}$ a fuerzas por debajo de $\sim 8\text{pN}$. Esta velocidad coincide con la velocidad máxima de replicación alcanzada por esta enzima cuando no hay SSB presente en el ssDNA y las fuerzas aplicadas son lo suficientemente altas como para deshacer la estructura secundaria ($\sim 6\text{pN}$). Además estos datos se explican bien con nuestro modelo propuesto en la ecuación 4.6 cuando $P_{Int}\sim 1$, lo que significaría que ambas proteínas establecen interacciones funcionales entre ellas. Esto significaría que el efecto que la gp2.5 produce sobre la velocidad máxima de replicación de la T7DNAP es similar al que produce la mtSSB_{WT} sobre la V_{Max} de la $\text{pol}\gamma$.

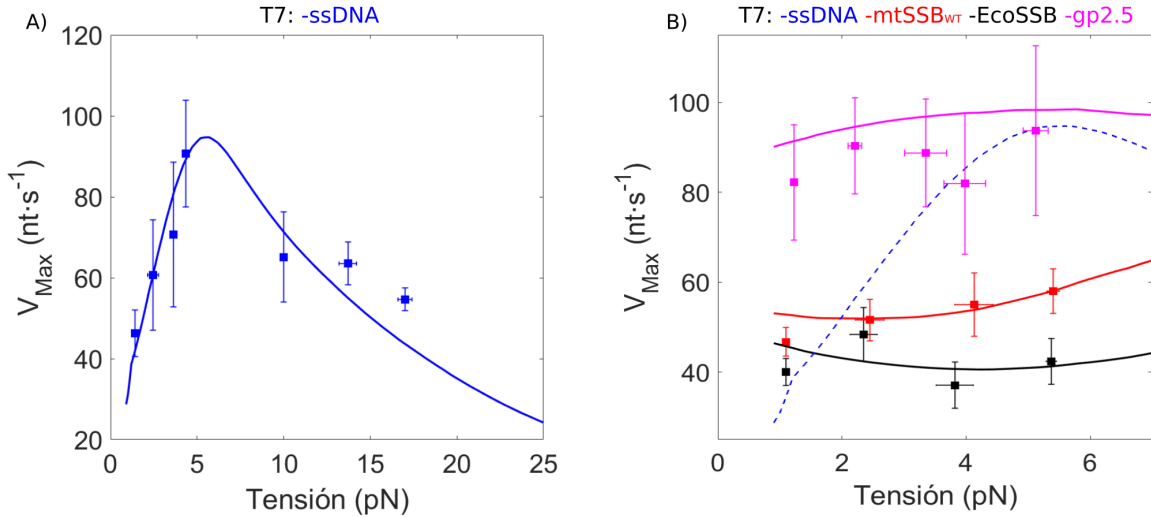


Figura 4.14: Ajuste de los modelos a los resultados experimentales. A) V_{Max} en ausencia de SSB. B) Ajustes a los datos en presencia de la mtSSB_{WT} y EcoSSB. Figura modificada de la referencia de Cerrón y col. 2019.

Sin embargo, cuando la replicación se produce en presencia de proteínas no homólogas (mtSSB_{WT} y EcoSSB), la T7DNAP no es capaz de alcanzar su velocidad máxima de replicación, sino que la V_{Max} coincide con la medida en ausencia de SSB ($\sim 45\text{nt/s}$). Este comportamiento se puede explicar con el modelo de la ecuación 4.6 asumiendo una probabilidad de interacción igual a cero ($P_{Int}=0$). Es decir, en presencia de SSB no homólogas deshacer la estructura secundaria no estimula la T7DNAP, sino que además estas proteínas realentizan la polimerasa ya que tiene que llevar a cabo un trabajo extra para superar la barrera energética impuesta por $n\Delta G_{SSB}(f)$.

Para estos experimentos n vuelve a tener valores similares a los obtenidos para la $\text{pol}\gamma$, ya que $n \sim 3$ y $n \sim 5$ son los valores que explican nuestros resultados experimentales. Estos resultados implican que la ausencia de interacciones funcionales relevantes para el desplazamiento de la SSB hace que estas dos proteínas tetraméricas sean una barrera para el avance de la T7DNAP. Esto significa que la estimulación que estas dos proteínas ejercen sobre la T7DNAP observada en algunos estudios *in vitro* (Myers y Romano 1988; Nakai y Richardson 1988) debe deberse a otros factores distintos a la estimulación de la velocidad máxima de replicación.

Discusión

5.1. Unión de la SSB al sustrato

Para entender el sistema de replicación del ADN mitocondrial humano, es necesario comprender el funcionamiento de las proteínas implicadas en el proceso, por ello durante el desarrollo de esta tesis, se utilizaron modelos teóricos y datos experimentales obtenidos con las pinzas ópticas para obtener los distintos modos de unión de la SSB al sustrato de cadena sencilla de ADN¹. Estos experimentos permitieron averiguar cómo se une la SSB de mitocondria humana a un sustrato de ADN de cadena desnuda formado antes de la unión, y generado de forma paralela a la unión del tetrámero, así como obtener las energías implicadas en el proceso y la respuesta del complejo SSB-ssDNA a tensiones externas (Morín y col. 2017). Nuestros datos demuestran que la SSB de la mitocondria humana se une al sustrato en dos modos de unión estadísticamente diferentes: uno *alto* (~ 60 nt) y otro *bajo* (~ 30 nt), y además, estos resultados se repiten para todos los valores de L_{ends} estudiados ($5\text{nm} \leq L_{ends} \leq 8\text{nm}$). En promedio el modo *bajo* une un $\sim 30\%$ menos nucleótidos por tetrámero que el modo *alto* para todas las condiciones experimentales estudiadas (Morín y col. 2017).

Además, los modos de unión descubiertos se unen de formas similares a los descubiertos para la SSB de E.Coli, ya que el modo bajo para ambas enzimas prevalece a concentraciones bajas de sal (10mM NaCl) y alta concentración de proteína, tal y como se describió para el modo 35 de la SSB de E.Coli (Lohman y Ferrari 1994; Shereda y col. 2008). Además, para $L_{ends}=5\text{nm}$ los valores obtenidos para los modos de unión de la SSB de mitocondria humana (~ 31 y ~ 53 nt/tetramero) son análogos a los encontrados para la EcoSSB (35 y 56 nt/tetramero). También es importante señalar que uno de los efectos de la tensión es desplazar el ADN a los extremos del tetrámero (Suksombat y col. 2015; Maffeo y Aksimentiev 2017) por lo que cabría esperar que el número de nucleótidos unidos por cada tetrámero sea ligeramente mayor al obtenido en nuestro sistema experimental.

Por otra parte, otro de los resultados obtenidos indica que cuando la unión al ADN se realiza en el modo *bajo* de unión, se cubre un $\sim 90\%$ del sustrato, mientras que en el modo *alto* la cobertura es aproximadamente un 20% menor. Este comportamiento se ha podido ver anteriormente en experimentos de Microscopia de Electrónica de Transmisión o Microscopia de Fuerzas Atómicas, donde los complejos SSB-ADN muestran un comportamiento similar para la EcoSSB (Griffith, Harris y Register 1984; Chrysogelos y Griffith 1982; Hamon y col. 2007): el modo 35 produce unos complejos proteína-ADN con un contorno suave cubriendo de forma homogénea todo el sustrato, mientras que en el modo 65 la SSB aparece distribuida por el sustrato en grupos, dejando huecos de la molécula de ADN de cadena sencilla libres de tetrámero.

Además, durante el desarrollo de la tesis se ha descubierto que si la unión de la SSB y la apertura de la cadena doble por la pol ϕ 29 ocurren al mismo tiempo (por lo tanto la cadena sencilla se genera de forma progresiva) y en condiciones iónicas similares a las fisiológicas (esto

¹Como se ha comentado, esta parte de la tesis supuso la continuación al proyecto iniciado por José Antonio Morín (Morín y col. 2017).

es, en presencia de MgCl_2), el modo de unión predominante es el modo *bajo*. Esto puede deberse a que la generación gradual de ADN limita la cantidad de sustrato disponible para la unión de SSB, lo que produce un incremento de la concentración efectiva de SSB por fragmento de ADN disponible, favoreciendo así la unión en el modo *bajo*. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que si la unión se produce a un ADN de cadena sencilla ya preformado, por debajo de 50nM predominaría el modo *alto* de unión y dado que la concentración de SSB en la célula oscila entre 19nM y $762\mu\text{M}$ *in vivo* dependiendo del tipo celular y condiciones fisiológicas (Fusté y col. 2014; Takamatsu y col. 2002; Wang y Bogenhagen 2006), este modo podría llegar a darse *in vivo*. Sin embargo, dado que la replicación del ADN mitocondrial ocurre a unos $\sim 10\text{nt/s}$ (Clayton 1982) que es una velocidad comparable a la que se da en nuestros experimentos ($\sim 30\text{nt/s}$), podríamos esperar que el modo más relevante en la célula sea el modo *bajo* de unión, ya que nuestros experimentos reproducen las condiciones que se esperarían *in vivo*.

Estos resultados sugieren que la SSB se une al ADN de una forma específica con la función de organizar la cadena y generar un sustrato adecuado para la replicación. Además, su baja energía de unión al ADN por nucleótido podría favorecer la liberación progresiva de la SSB por parte de la polimerasa, tal y como se ha visto en la sección de resultados y como se discutirá en la siguiente sección.

5.2. El rol de la SSB en la replicación sobre cadena sencilla

Los resultados anteriores demuestran que el modo de unión es clave para favorecer la organización del ADN. Las SSB proporcionan un sustrato adecuado para que las polimerasas puedan procesar los fragmentos de cadena sencilla de ADN que se generan durante la replicación (como los fragmentos de Okazaki), pero hasta la fecha el mecanismo por el cual las polimerasas son capaces de liberar las SSB a pesar de su alta capacidad de unión al ADN permanece desconocido. De hecho, debido a su afinidad por el ADN, la densidad de SSB que permanecen unidas al ADN restringe su capacidad de difusión a lo largo del sustrato. De hecho en los intermediarios generados en la replicación no hay extremos libres de cadena doble, por lo que las SSB no pueden expulsarse a través de un final de ADN de cadena sencilla tal y como se ha propuesto en estudios anteriores (Sokoloski y col. 2016). Debido a esto debería existir algún mecanismo de liberación *activa* de forma que la SSB pueda ser disociada por las polimerasas a lo largo de todo el sustrato.

Para tratar de entender dicho procedimiento, hemos medido el efecto que tiene la tensión mecánica y la SSB en la V_{Max} de dos polimerasas distintas, la $\text{pol}\gamma$ y la T7DNAp.

Primero analizamos las CFE presentadas en la figura 4.6 en la que se muestran en unidades de extensión por nucleótido frente a la tensión. En estas condiciones las SSB tetraméricas se unen en el modo *bajo* de unión (en torno a $\sim 30\text{nt}$), que es el modo que se ha propuesto como

el biológicamente relevante en esta tesis (publicado en Morín y col. (2017)). Después hemos mostrado los resultados de la dependencia de la velocidad máxima de replicación de la pol γ y la T7DNAp con la tensión aplicada en el sustrato. Estos resultados demuestran que el efecto de la tensión sobre V_{Max} se puede explicar con un modelo en el que la velocidad instantánea de replicación está modulada por el trabajo mecánico de convertir un nucleótido de cadena sencilla a uno de cadena doble más el coste energético de deshacer la estructura secundaria característica del ADN de cadena sencilla a fuerzas bajas, cuya expresión matemática viene descrita por la ecuación 4.3 de la sección 4.2.1. V_{Max} aumenta con la fuerza hasta ~ 6 pN, donde se encuentra el pico de velocidad y donde la tensión aplicada desestabiliza todas las posibles configuraciones que caracterizan la fase condensada del ADN de cadena sencilla, en favor a un sustrato estirado. Por encima de ~ 6 pN, cuando ya no hay estructura secundaria, la velocidad de replicación disminuye con la fuerza debida a que el trabajo de convertir un nucleótido de cadena sencilla a uno de cadena doble es cada vez mayor al hacerse en contra de la tensión (ya que el dsDNA es más corto que el ssDNA, lo que implica que la enzima debe ejercer una fuerza extra para acortar la cadena y acomodar el nucleótido en el núcleo catalítico). Los resultados del ajuste indican que la barrera energética para el avance de las enzimas es distinta en ambas polimerasas, ya que $\Delta G_{eff}=2.6k_B T$ y $\Delta G_{eff}=1.4k_B T$ para la T7DNAp y la pol γ , respectivamente; esto sugiere que la pol γ es capaz de lidiar mejor con la entropía característica del ADN de cadena sencilla a fuerzas bajas. En otros estudios se han propuesto modelos similares para explicar la curva Fuerza- V_{Max} (Wuite y col. 2000; Maier, Bensimon y Croquette 2000; Manosas y col. 2012; Goel, Astumian y Herschbach 2003; Andricioaei y col. 2004; Nong, DeVience y Herschbach 2012) basados en suposiciones con respecto al paso limitante en el ciclo de incorporación del nucleótido o a la organización del ADN por parte de la polimerasa para lograr insertar el nucleótido en su posición; sin embargo, nuestro modelo se basa en medidas experimentales por lo que no requiere suposiciones adicionales, y además ajusta a todo el rango de fuerzas de la curva con un tamaño de paso cinético $\delta=1$, que es lo esperable para dicho parámetro como se ha demostrado en estudios anteriores (Berman y col. 2007; Li, Korolev y Waksman 1998; Morín y col. 2015; Pandey y Patel 2014).

Por otra parte, para el caso de la pol γ no fuimos capaces de detectar actividad exonucleasa a fuerzas inferiores a ~ 60 pN, mientras que para la T7DNAp detectamos actividades de corrección de errores a fuerzas mayores que ~ 30 pN con velocidades de ~ 200 nt/s (en la figura ?? se pueden ver algunos ejemplos de trazas típicas). Estos datos son coherentes con estudios anteriores (Wuite y col. 2000; Hoekstra y col. 2011) donde se ha observado que la velocidad de reparación de errores de la pol γ es unas 100 veces más lenta que la velocidad de la T7DNAp (Johnson y Johnson 2001a), lo que podría estar evitando la detección de dichas actividades en nuestras pinzas ópticas, ya que ocurren a una velocidad comparable a las fluctuaciones térmicas del sistema. Además, la pol γ tiene una probabilidad muy pequeña de introducir un nucleótido incorrecto (%), según Johnson y Johnson (2001a) y Lee y Johnson (2006) y Johnson y Johnson (2001b)), lo que implicaría que comete un error cada $\sim 2 \cdot 10^{-6}$ nucleótidos incorporados. Esto

significa que los eventos de corrección de errores estarían detectados como eventos de pausa, lo que hace que puedan no ser detectables individualmente en nuestras condiciones experimentales.

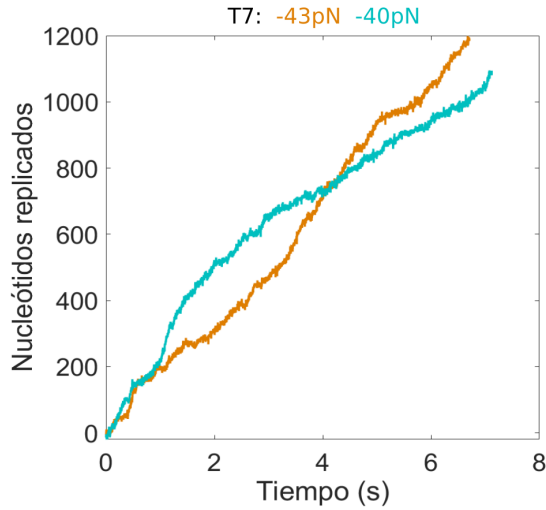


Figura 5.1: Actividad exonucleasa de la T7DNAP ($\sim 200\text{nt/s}$).

respectivamente, para poder llevar a cabo el ciclo de incorporación del nucleótido. Sin embargo la magnitud de la barrera energética que tienen que sobrepasar es muy similar ($\sim 1k_B T$) ya que el coste energético de liberar un nucleótido de la mtSSB es unos $\sim 0.3k_B T$, mientras que para la EcoSSB es de unos $\sim 0.18k_B T$.

Según nuestro modelo, para superar esta barrera energética debe existir una interacción funcional entre ambas proteínas (SSB y polimerasa) de forma que el coste energético de liberar los nucleótidos de la SSB no produzca una reducción de la velocidad instantánea de replicación. El modelo explica la interacción entre ambas proteínas con el parámetro $P_{Int}(f)$, descrito en la ecuación 4.5, en el que la existencia o no de dichas interacciones funcionales depende de la energía de interacción entre ambas proteínas (ΔG_{Int}) y el cambio conformacional que produce la fuerza en el complejo SSB-polimerasa, d . Este cambio conformacional explica la caída de V_{Max} con la tensión en los casos en los que la pol γ replica el ADN en presencia de la mtSSB_{2,3} y la EcoSSB. Además, dicha caída se puede explicar con un cambio conformacional de $\sim 2.7\text{nm}$, tanto para en la curva de Fuerza- V_{Max} de la mtSSB_{2,3}, como en el caso de la EcoSSB. El hecho de que la tensión genere un cambio conformacional de la misma magnitud en ambos sistemas (pol γ -mtSSB_{2,3} y pol γ -EcoSSB) refleja la similitud existente en las propiedades de unión al ADN de ambas proteínas tetraméricas y además demuestra que dicho cambio conformacional afecta principalmente al complejo SSB-polimerasa, ya que en caso contrario habría aparecido un efecto medible en los experimentos de replicación en ausencia de SSB. De hecho en algunos estudios como los de Suksombat y col. (2015) o Maffeo y Aksimentiev (2017) se demuestra, mediante el uso de PO y dinámica molecular, que estirar un complejo ssDNA-SSB por debajo

Como se ha podido ver en las figuras 4.10 y 4.14 la presencia de las SSB homólogas tiene un efecto importante en la V_{Max} de ambas polimerasas y cómo varía con la tensión aplicada en el sustrato. En el rango de fuerzas en el que ambos tetrámeros permanecen unidos al ADN ($i \sim 8\text{pN}$) ambas enzimas se mueven a su velocidad máxima y prácticamente independiente de la tensión. Sin embargo, la presencia de SSB no homólogas o mutantes hace que aparezca una barrera energética ($n \cdot \Delta G_{SSB}(f)$) que disminuye la velocidad máxima en ambas polimerasas a fuerzas superiores a $\sim 1\text{pN}$. Esta barrera energética implica que tanto la pol γ como la T7DNAP tienen que liberar entre $n \sim 2-3$ y 5 nt de la mtSSB y la EcoSSB,

de $\sim 8\text{pN}$ alinea la SSB en la dirección de la tensión a la vez que se produce la liberación de algunos nucleótidos de los extremos de la SSB. Estos cambios en distancia observados debido al alineamiento y liberación de los nucleótidos son de una distancia similar al cambio conformacional obtenido en este estudio, por lo que podrían ser los causantes de la pérdida de la interacción entre la polimerasa y la SSB. Si consideramos la liberación de unos $\sim 3\text{nt}$ de cada extremo de la SSB $[(3\text{nt} \cdot 0.34\text{nm/nt}) \cdot 2 \approx 2\text{nm}]$, y la orientación del eje más largo de la SSB en la dirección de la fuerza, podría dar lugar a un cambio en distancia de unos $\sim 3\text{nm}$, que es similar al cambio conformacional observado en este trabajo. Es importante destacar que el valor de d obtenido no significa que haya una separación física entre ambas proteínas de $\sim 2.7\text{nm}$, sino que el cambio conformacional implica una reorganización del complejo SSB-polimerasa que produce la disminución en la velocidad instantánea de replicación, debido a la aparición de una barrera energética extra para la $\text{pol}\gamma$. También conviene destacar que el cambio conformacional inducido por la tensión no provoca la aparición directa de una barrera energética para la $\text{pol}\gamma$, sino que afecta a la probabilidad que tienen ambas proteínas de establecer interacciones funcionales, relevantes para permitir la liberación *activa* de las SSB por parte de la polimerasa en el proceso de replicación.

Sin embargo el parámetro que genera las diferencias entre las curvas de Fuerza- V_{Max} correspondiente a cada SSB estudiada es la energía de interacción, ΔG_{Int} . Cuando la replicación ocurre en presencia de la mtSSB_{WT} , y el sistema polimerasa-SSB forma un sistema homólogo, la energía de interacción entre ambas proteínas asciende a $\sim 12k_B T$, lo que asegura una probabilidad de interacción alta ($P_{Int} \sim 1$, ver figura 4.12) para todo el rango de fuerzas en las que la SSB permanece establemente unida ($< 10\text{pN}$). Esto significa que el estado más probable que se puede encontrar en el complejo $\text{mtSSB}_{WT}\text{-pol}\gamma$ es un estado en el que ambas proteínas interactúan de forma funcional, y la polimerasa es capaz de conseguir una liberación *activa* de la SSB. En el diagrama de la figura 5.2 se explica gráficamente cómo afecta la fuerza al balance energético entre los estados de interacción (indicado como A en la imagen) y no-interacción (indicado como B en la imagen) del complejo SSB-polimerasa, así como cual es el estado más probable que cabría esperar tras aplicar tensión en el sistema. El diagrama representa tres de los casos estudiados en esta tesis: $\text{mtSSB}_{WT}\text{-pol}\gamma$ (con un salto energético entre los estados A y B agrande), $\text{mtSSB}_{2,3}\text{-pol}\gamma$ (un salto energético pequeño), $\text{mtSSB}_{WT}\text{-T7DNAP}$ (no hay salto energético como tal, sino que dicho sistema favorece la no interacción).

Para comprobar si esta teoría se puede extrapolar a otros sistemas biológicos, repetimos los experimentos con la T7DNAP y la gp2.5 (la SSB de la T7DNAP), dando como resultado un $P_{Int} \sim 1$ para el rango de fuerzas estudiado. Aparte de demostrar que el complejo polimerasa-SSB debe pertenecer al mismo sistema biológico para lograr una liberación *activa* de la SSB, estos resultados indican que debe existir una energía de interacción amplia entre ambas proteínas que permite a la T7DNAP replicar a su velocidad máxima a lo largo de un ADN de cadena sencilla cubierto por la SSB de la T7 (gp2.5).

Sin embargo, si se estudian sistemas no homólogos la tensión modula de distinta forma

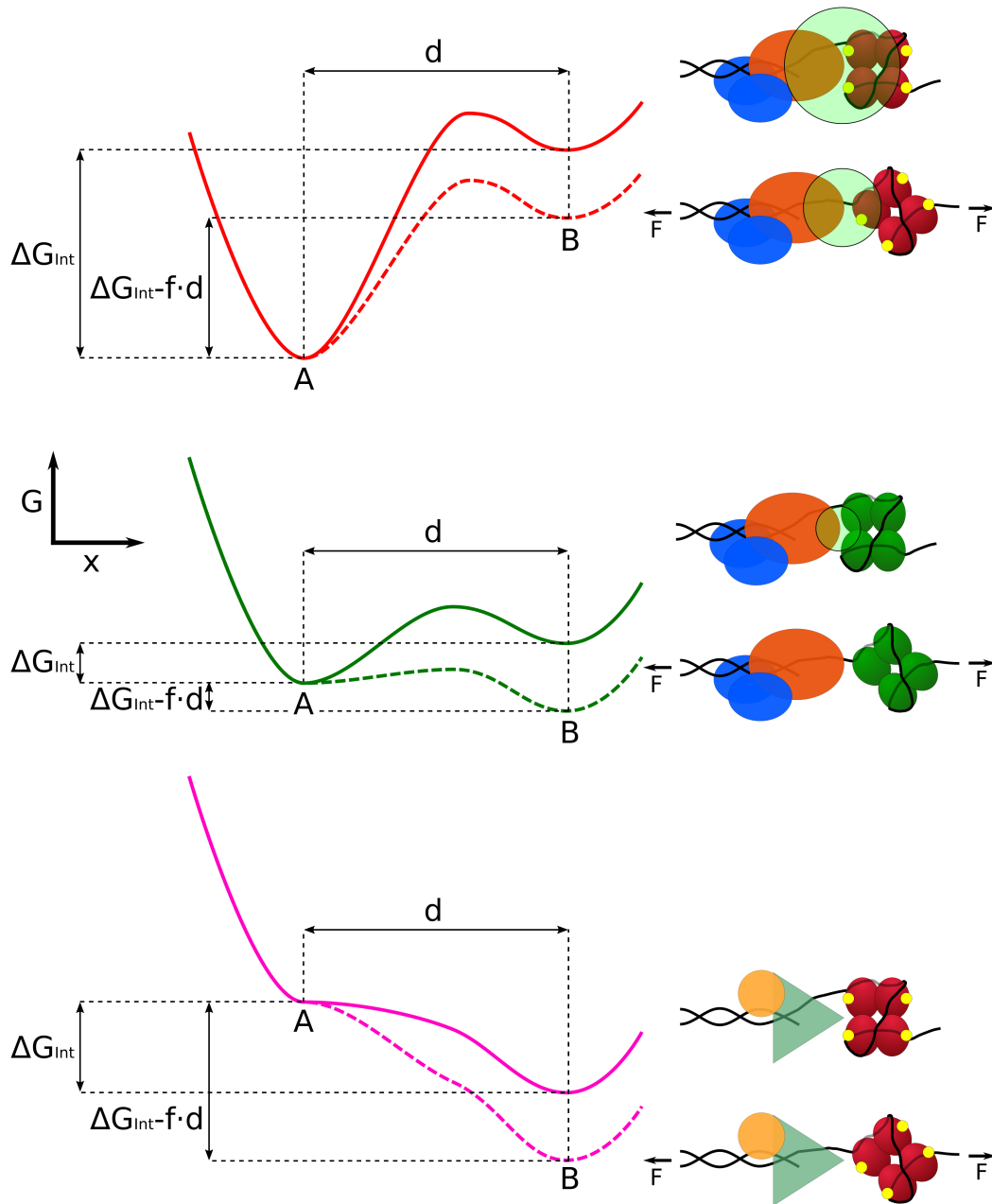


Figura 5.2: Interpretación del modelo. Izquierda: diagramas energéticos que conectan el estado de interacción (A) y el estado de no-interacción (B) del complejo polimerasa-SSB con la coordenada de la reacción, en este caso el cambio conformacional inducido por la tensión, d . Las líneas sólida y punteada representan los diagramas energéticos antes y después de aplicar la fuerza, respectivamente. Derecha: representación gráfica del estado de organización más probable del complejo SSB-polimerasa. Los distintos colores representan las combinaciones SSB-polimerasa empleadas: mtSSB_{WT}-pol γ en rojo (arriba), mtSSB_{2,3}-pol γ en verde (centro) y representando mtSSB_{WT}-T7DNAp en rosa (abajo). Los puntos amarillos representan el lazo_{2,3} de la mtSSB. La magnitud de $P_{int}(f)$ se representa gráficamente con el tamaño del círculo verde. Esta imagen se puede encontrar en la referencia de Cerrón y col. 2019.

la V_{Max} . En estas condiciones la probabilidad de interacción es significativa a bajas fuerzas, pero los valores de ΔG_{Int} son de 6 a 12 veces más bajos ($\sim 2k_B T$ para la mtSSB_{2,3} y ~ 1

para la EcoSSB). Por esto el cambio conformacional hace que P_{Int} decrezca rápidamente con la fuerza, al ser la probabilidad de interacción más sensible a factores externos como la tensión aplicada sobre el ADN. Este decrecimiento provoca que la velocidad instantánea de replicación disminuya debido a la aparición de la barrera energética impuesta por la presencia de la SSB, $n \cdot \Delta G_{SSB}(f)$.

Por otra parte, si se analiza la T7DNAp con SSB completamente distintas a su SSB homóloga, como son la mtSSB_{WT} o la EcoSSB, las energías de interacción están completamente desfavorecidas, lo que implica que la probabilidad de interacción es prácticamente nula para todas las fuerzas ($P_{Int} \sim 0$). Este hecho significa que una SSB tetramérica constituye una barrera al avance de la T7DNAp, disminuyendo su V_{Max} incluso a las fuerzas más bajas (ver la figura 4.14, aunque organice el ADN mientras deshace la estructura secundaria).

En base a estos resultados podemos afirmar que la SSB estimula la velocidad máxima de la polimerasa mientras replica la cadena retrasa de forma indirecta: mediante la eliminación de la estructura secundaria del ADN de cadena sencilla. Sin embargo, para que este proceso ocurra debe existir una energía de interacción entre ambas proteínas que permita a la polimerasa liberar de forma activa la SSB del sustrato de ADN. No obstante nuestros experimentos no revelan la naturaleza de las interacciones entre estas proteínas, y aunque en estudios anteriores se ha reportado que la mtSSB es capaz de interactuar con proteínas involucradas en la reparación y replicación celular (Wong y col. 2008; Sharma y col. 2018), no hay evidencia de la existencia de interacciones físicas entre la pol γ y la mtSSB. Por otra parte, es sabido que la T7DNAp es capaz de tener una interacción física con el C-terminal de la gp2.5 (homóloga) y la EcoSSB (no homóloga) (Hernandez y Richardson 2018; Ghosh, Hamdan y Richardson 2010), pero nuestros resultados afirman que esta interacción es insuficiente para producir un desplazamiento activo de la EcoSSB, ya que en presencia del tetrámero la polimerasa es incapaz de alcanzar su velocidad máxima. Esto quiere decir que debe existir algún tipo de interacción extra (no puramente física) que regule la comunicación entre parejas polimerasa-SSB homólogas, y que además es necesaria para llevar a cabo la replicación de la cadena retrasada.

Con estos resultados, y teniendo en cuenta estudios como el de Ghosh, Hamdan y Richardson (2010), nosotros proponemos un mecanismo de interacción en el que la liberación activa de la SSB se produce gracias a repulsiones electrostáticas. Para el caso concreto del sistema mitocondrial humano, esta repulsión puede venir del lazo 2,3 que está localizado en la superficie de cada uno de los monómeros que componen el tetrámero (en concreto de unos residuos cargados negativamente: S51, S54, Y57, D53, 55E y Q58), y de la subunidad catalítica de la pol γ cuyo punto isoelectrónico a pH 8.5 es 6.15, lo que podría estar generando una repulsión electrostática mutua. Además, cabe la posibilidad de que otros residuos estén jugando un papel menor en la interacción, ya que a fuerzas bajas (~ 1 pN) la pol γ conserva la habilidad de desplazar activamente el tetrámero en aquellos casos en los que se usaron tanto la mtSSB_{2,3} como la EcoSSB. Sin embargo, estos residuos no garantizarían una interacción lo suficientemente robusta como para lograr superar la barrera energética de liberar la SSB bajo condiciones de estrés, donde la

probabilidad de interacción disminuye rápidamente.

Basándonos en estos resultados y de las similitudes encontradas entre los sistemas del bacteriófago T7 y la pol γ , podríamos especular que otros sistemas eucariotas y procariotas podrían estar utilizando mecanismos de interacción similares para lograr el desplazamiento activo de la SSB por parte de las polimerasas durante el proceso de replicación de la cadena retrasada.

Conclusiones

- 1) Hemos empleado el sistema de las pinzas ópticas para determinar las propiedades elásticas de polímeros de cadena sencilla de ADN organizados por las SSB de mitocondria humana. Estas propiedades nos han permitido obtener dos modos predominantes de unión de la mtSSB al ADN de cadena sencilla: el modo *alto*, que une entre 50 y 80 nucleótidos, y el modo *bajo*, que organiza un $\sim 30\%$ menos que el modo *alto*.
- 2) Hemos determinado el modo de unión de la SSB de mitocondria humana relevante durante el proceso de replicación *in vitro*. Este modo ha resultado ser el modo *bajo* de unión, que organiza $\sim 30-50$ nucleótidos en nuestras condiciones experimentales.
- 3) Hemos recreado la replicación de la cadena retrasada del sistema mitocondrial humano en experimentos *in vitro*, lo que nos ha permitido explorar la cinética instantánea de replicación de la polimerasa γ . Hemos modificado un modelo físico-matemático ya existente y le hemos añadido la contribución de la estructura secundaria del ADN para explicar la curva de fuerza-velocidad de la polimerasa γ cuando replica un ADN desnudo. Este mismo modelo ha podido explicar la curva para otro sistema como es el de la polimerasa del bacteriófago T7. En ambos casos se ha conseguido explicar dicha curva considerando un número de nucleótidos incorporados por cada ciclo de reacción igual a 1, algo hasta ahora inédito.
- 4) Nuestros resultados indican que la presencia de la SSB de mitocondria humana en la cadena retrasada permite a la polimerasa γ alcanzar su velocidad de replicación máxima, ya que no tiene que invertir energía en deshacer la estructura secundaria. Además, hemos podido comprobar que este comportamiento se repite para otros sistemas SSB-polimerasa como es el caso de la polimerasa de bacteriófago T7, donde se repite el mismo efecto pese a tener una SSB estructuralmente distinta.
- 5) Hemos demostrado que si bien la mtSSB deshace la estructura secundaria del ADN, se requiere una energía de interacción de unos $\sim 12k_B T$ entre ésta y la polimerasa γ para poder llevar a cabo la liberación *activa* de la mtSSB. Si dicha interacción no existe, la mtSSB pasa de ser una ayuda, a ser un impedimento, ya que liberar la mtSSB se convierte en un trabajo energético extra que la polimerasa debe llevar a cabo en cada ciclo de incorporación de un nucleótido.
- 6) La interacción entre la polimerasa y la SSB que permite la liberación *activa* de la SSB es específica de cada sistema polimerasa-SSB, ya que si se trata de sistemas no-homólogos la SSB es un impedimento para la replicación al no existir una interacción entre ambas enzimas.
- 7) Esta tesis sienta las bases para futuros proyectos como son el estudio de la replicación de la cadena líder del sistema mitocondrial humano, en la que además de la polimerasa y la SSB, interviene también la helicasa. Además hemos aportado herramientas útiles en el

campo como son un nuevo algoritmo para obtener la velocidad máxima de replicación, que ha resultado ser muy útil para este tipo de experimentos en los que el ruido experimental puede dificultar el cálculo de V_{Max} .

Bibliografía

- Ahlqvist, K.J. y col. (2012). “Somatic progenitor cell vulnerability to mitochondrial DNA mutagenesis underlies progeroid phenotypes in PolG mutator mice”. En: *Cell Metab* (1), págs. 100-109.
- Alberts, B. y col. (2007). *Molecular biology of the cell*. Garland Publisher.
- Anderson, S. y col. (1981). “Sequence and organization of the human mitochondrial genome”. En: *Nature* 290, págs. 457-465.
- Andricioaei, I. y col. (2004). “Dependence of DNA polymerase replication rate on external forces: a model based on molecular dynamics simulations”. En: *Biophysical Journal*, págs. 1478-1497.
- Antony, E. y T.M. Lohman (2018). “Dynamics of *E.Coli* single stranded DNA binding (SSB) protein-DNA complexes”. En: *Semin. Cell. Dev. Biol.*, págs. 1-10.
- Ardail, D. y col. (1990). “Mitochondrial contact sites: lipid composition and dynamics”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 31, págs. 18797-18802.
- Ashkin, A. (1970). “Acceleration and trapping of particles by radiation pressure”. En: *Phys. Rev. Lett* 4, págs. 156-159.
- Ashkin, A. y J.M. Dziedzic (1987). “Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria”. En: *Science* 4795, págs. 1517-1520.
- Ashkin, A., J.M. Dziedzic y T. Yamane (1987). “Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams”. En: *Nature*, págs. 769-771.
- Ashkin, A. y col. (1986). “Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles”. En: *Opt. Lett* 5, págs. 288-290.
- Atanassova, N. y col. (2011). “Sequence specific stalling of DNA polymerase γ and the effects of mutations causing progressive ophthalmoplegia”. En: *Human Molecular Genetics* 6, págs. 1212-1223.
- Barazzoni, R., K.R. Short y K.S. Nair (2000). “Effects of aging on mitochondria DNA copy number and cytochrome *c* oxidase gene expression in rat skeletal muscle, Liver and Heart”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 5, págs. 3343-3347.
- Barthelemy, C. y col. (2001). “Late-onset mitochondrial DNA depletion: DNA copy number, multiple deletions and compensation”. En: *Ann. Neurol* 5, págs. 607-617.

- Baysall, B.E. y col. (2000). "Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma". En: *Science* (5454), págs. 848-851.
- Bell, J.C., B. Liu y S.C. Kowalczykowski (2015). "Imaging and energetics of single SSB-ssDNA molecules reveal intramolecular condensation and insight into RecOR function". En: *eLife*, págs. 1-21.
- Berg, O.G. y C.G. Kurland (2000). "Why mitochondrial genes are most often found in nuclei". En: *Mol. Biol. Evol* 6, págs. 951-961.
- Berman, A.J. y col. (2007). "Structures of ϕ 29 polymerase complexed with substrate: the mechanism of translocation in B-family polymerases". En: *The EMBO Journal* 14, págs. 3494-3505.
- Blanco, L. y col. (1989). "Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase". En: *The Journal of Biological Chemistry* 15, págs. 8935-8940.
- Block, S.M., L.S.B. Goldstein y B.J. Schnapp (1990). "Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers". En: *Nature*, págs. 348-352.
- Bogenhagen, D.F. y col. (2003). "Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes". En: *Mol. Cell. Proteomics*, págs. 1205-1216.
- Bosco, A., J. Camunas-Soler y F. Ritort (2014). "Elastic properties and secondary structure formation of single-stranded DNA at monovalent and divalent salt conditions". En: *Nucleic Acids Research* 3, págs. 2064-2074.
- Bustamante, C., Z. Bryant y S.B. Smith (2003). "Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics". En: *Nature*, págs. 423-427.
- Bustamante, C. y S.B. Smith (2005). *Lighe-force sensor and method for measuring axial optical-trap forces from changes in light momentum along an optic axis*. Inf. téc. 0146718 A1. US. Patent.
- Bustamante, C. y col. (2004). "Mechanical processes in biochemistry". En: *Annu. Rev. Biochem*, págs. 705-748.
- Cadenas, E. y K.J.A. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging". En: *Free. Radic. Biol. Med.* Págs. 222-230.
- Carrion-Vazquez, M. y col. (1999). "Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison". En: *PNAS* 7, págs. 3694-3699.
- Carrodeguas, J.A. y col. (2001). "Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase γ , pol γ B, functions as homodimer". En: *Cell* (1), págs. 43-54.
- Cerrón, F. y col. (2019). "Replicative DNA polymerase promote active displacement of SSB proteins during lagging strand synthesis". En: *Nucleic Acids Research* (11), págs. 5723-5734.
- Chrysogelos, S. y J. Griffith (1982). "Escherichia Coli single-strand binding protein organizes single-stranded DNA in nucleosome-like units". En: *PNAS*, págs. 5803-5807.
- Ciesielski, G.L. y col. (2015). "Mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins stimulate the activity of DNA polymerase γ by organization of the template DNA". En: *The Journal of Biological Chemistry* 48, págs. 28697-28707.

- Clayton, D.A. (1982). "Replication of animal mitochondrial DNA". En: *Cell* (4), págs. 693-705.
- (1991). "Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA". En: *Annu. Rev. Cell Biol.*, págs. 453-478.
- Cohen, A., S. Holmen y H. Colman (2013). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas". En: *Curr. Neurol. Neurosci. Rep* 5, pág. 345.
- Cooper y Hausman (2017). *La célula*. Marbán.
- Curth, C.Y.U., C. Urbanke y C. Kang (1997). "Crystal structure of human mitochondrial single-stranded DNA binding protein at 2.4Å resolution". En: *Nature* 2, págs. 153-157.
- Curth, U. y col. (1994). "Single-stranded-DNA-binding proteins from human mitochondria and *Escherichia coli* have analogous physicochemical properties". En: *Eur. J. Biochem.*, págs. 435-443.
- Donlin, J.M., S.S. Patel y K.A. Johnson (1991). "Kinetic partitioning between the exonuclease and polymerase sites in DNA error correction". En: *Biochemistry*, págs. 537-546.
- Egelman, E.H. y col. (1995). "Bacteriophage T7 helicase/primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggest a general structure for hexameric helicases". En: *PNAS*, págs. 3869-3873.
- Ernster, L. y G. Schatz (1981). "Mitochondria: A historical review". En: *The Journal of Cell biology* 3, págs. 227-255.
- Euro, L. y col. (2011). "Clustering of Alpers disease mutations and catalytic defects in biochemical variants reveal new features of molecular mechanism of the human mitochondrial replicase, pol γ ". En: *Nucleic Acids Research* 21, págs. 9072-9084.
- Fan, L. y col. (2006). "A novel processive mechanism for DNA synthesis revealed by structure, modeling and mutagenesis of the accessory subunit of human mitochondrial DNA polymerase". En: *Journal of Molecular Biology*, págs. 1229-1243.
- Farr, C.L., Y. Wang y L.S. Kaguni (1999). "Functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and single-stranded DNA-binding protein". En: *The Journal of Biological Chemistry* 21, págs. 14779-14785.
- Fernández-Millán, P. y col. (2015). "The hexameric structure of the human mitochondrial replicative helicase Twinkle". En: *Nucleic Acids Research* 8, págs. 4284-4295.
- Ferrari, M.E., W. Bujalowski y T.M. Lohman (1994). "Co-operative binding of *Escherichia coli* SSB tetramers to single-stranded DNA in the (SSB₃₅) binding mode". En: *Journal of Molecular Biology* 1, págs. 106-123.
- Flynn, R.L. y L. Zou (2010). "Oligonucleotide/oligosaccharide Binding (OB) fold proteins: a growing family of genome guardians". En: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol* 4, págs. 266-275.
- Frick, D.N. y C.C. Richardson (2001). "DNA primases". En: *Annual Review of Biochemistry*, págs. 39-80.
- Friedman, J.R. y J. Nunnari (2014). "Mitochondrial form and function". En: *Nature* 505, págs. 335-343.

- Fusté, J.M. y col. (2014). “*In vivo* occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication”. En: *PLOS Genetics* 12.
- Gautheron, D.C. (1984). “Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain: review”. En: *Journal of Inherited Metabolic Disease*, págs. 57-61.
- Ghosh, S., S.M. Hamdan y C.C. Richardson (2010). “Two models of interaction of the single-stranded DNA-binding protein of bacteriophage T7 with the DNA polymerase-Thioredoxin complex”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 23, págs. 18103-18112.
- Goel, A., R.D. Astumian y D. Herschbach (2003). “Tuning and switching a DNA polymerase motor with mechanical tension”. En: *PNAS* 17, págs. 9699-9704.
- Gonzalez, R.A. (2013). *Optical tweezers to study viruses*. Springer, págs. 273-304.
- Gray, M.W., G. Burguer y B. F. Lang (1999). “Mitochondrial evolution”. En: *Science*, págs. 1478-1481.
- Gray, M.W., G. Burguer y B.F. Lang (2001). “The origin and early evolution of mitochondria”. En: *Genome Biology* 6, págs. 1-5.
- Graziewicz, M.A., M.J. Longley y W.C. Copeland (2005). “DNA polymerase γ in mitochondrial DNA replication and repair”. En: *Chem. Rev*, págs. 383-405.
- Graziewicz, M.A. y col. (2004). “Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia”. En: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 8, págs. 770-776.
- Griffith, J.D., L.D. Harris y J. Register (1984). “Visualization of SSB-ssDNA complexes active in the assembly of stable RecA-DNA filaments”. En: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* Págs. 553-559.
- Gustafsson, Claes M., Maria Falkenberg y Nils-Göran Larsson (2016). “Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA”. En: *Annu. Rev. Biochem* 85, págs. 133-160.
- Ha, T., A.G. Kozlov y T.M. Lohman (2012). “Single-molecule views of protein movement on single-stranded DNA”. En: *Annu. Rev. Biophys*, págs. 295-319.
- Hacker, K.J. y B.M. Alberts (1994). “The rapid dissociation of the T4 DNA polymerase holoenzyme when stopped by a DNA hairpin helix. A model for polimerase release following termination of each Okazaki fragment”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 39, págs. 24221-24228.
- Hamon, L. y col. (2007). “High-resolution AFM imaging of single-stranded DNA-binding (SSB) protein-DNA complexes”. En: *Nucleic Acids Research* 8, e58.
- Hernandez, A.J. y C.C. Richardson (2018). “Gp2.5, the multifunctional bacteriophage T7 single-stranded DNA binding protein”. En: *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Hoekstra, T.P. y col. (2011). “Switching between exonucleolysis and replication by T7 DNA polymerase ensures high fidelity”. En: *Biophysical Journal* 47, págs. 40649-30658.
- Hollis, T. y col. (2001). “Structure of the gene 2.5 protein, a single stranded DNA binding protein encoded by bacteriophage T7”. En: *PNAS* 17, págs. 9557-9562.

- Holt, I.J. y A. Reyes (2012). "Human mitochondrial DNA replication". En: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, págs. 1-15.
- Holt, I.J. y col. (2007). "Mammalian mitochondrial nucleoid: organizing an independently minded genome". En: *Mitochondrion* 5, págs. 311-321.
- Hormeño, S. y R.A. Gonzalez (2006). "Exploring mechanochemical processes in the cell with optical tweezers". En: *Biol. Cell* 12, págs. 679-695.
- hudson, G. y P.F. Chinnery (2006). "Mitochondrial DNA polymerase γ and human disease". En: *Human Molecular Genetics* 2, págs. 244-252.
- Ibarra, B. y col. (2009). "Proofreading dynamics of a processive DNA polymerase". En: *The EMBO Journal*, págs. 2794-2802.
- Itsathitphaisarn, O. y col. (2012). "The hexameric helicase DnaB adopts a nonplanar conformation during translocation". En: *Cell*, págs. 267-277.
- Jarillo, J. y col. (2017). "Mechanics, thermodynamics and kinetics of ligand binding to biopolymers". En: *Plos One* 12, págs. 1-17.
- Jeong, Y.J., M.K. Levin y S.S. Patel (2004). "The DNA-unwinding mechanism of the ring helicase of bacteriophage T7". En: *PNAS* 19, págs. 7264-7269.
- Jeong, Y.J., V. Rajagopal y S.S. Patel (2013). "Switching from single-stranded to double-stranded DNA limits the unwinding processivity of ring-shaped T7 DNA helicase". En: *Nucleic Acids Research* 7, págs. 4219-4229.
- Johnson, A. y M. O'Donnel (2005). "CELLULAR DNA REPLICASES: Components and dynamics at the replicacion fork". En: *Annual Review of Biochemistry*, págs. 283-315.
- Johnson, A.A. y K.A. Johnson (2001a). "Exonuclease proofreading by human mitochondrial DNA polymerase". En: *The Journal of Biological Chemistry* 41, págs. 38097-38107.
- (2001b). "Fidelity of nucleotide incorporation by human mitochondrial DNA polymerase". En: *The Journal of Biological Chemistry*, págs. 38090-38096.
- Johnson, A.A. y col. (2000). "Human mitochondrial DNA polymerase holoenzyme: reconstitution and characterization". En: *Biochemistry*, págs. 1702-1708.
- Kaguni, L.S. (2004). "DNA polymerase γ , the mitochondrial replicase". En: *Annu. Rev. Biochem*, págs. 293-320.
- Kaguni, L.S. y D.A. Clayton (1982). "Template-directed pausing in *in vitro* DNA synthesis by DNA polymerase α from *Drosophila melanogaster* embryos". En: *PNAS*, págs. 983-987.
- Kamtekar, S. y col. (2004). "Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage ϕ 29". En: *Mol. Cell*, págs. 609-618.
- Keller, D. y C. Bustamante (2000). "The mechanochemistry of molecular motors". En: *Biophysical Journal*, págs. 541-556.
- Korhonen, J.A., M. Gaspari y M. Falkenberg (2003). "Twinkle has 5' \rightarrow 3' helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein". En: *Journal of biological chemistry* 49, págs. 48627-48632.

- Korhonen, J.A. y col. (2004). "Reconstruction of a minimal mtDNA replisome *in vitro*". En: *The EMBO Journal* 12, págs. 2423-2429.
- Kornberg, A. y T. Baker (1992). *DNA replication*. W.H. Freeman y Company. NY.
- kuchta, R.D. y G. Stengel (2010). "Mechanism and evolution of DNA primases". En: *Biochimica et Biophysica Acta* 5, págs. 1180-1189.
- Lee, H.R. y K.A. Johnson (2006). "Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase". En: *The Journal of Biological Chemistry* 47, págs. 36236-36240.
- Lee, Y.S. y col. (2010). "Each monomer of the dimeric accessory subunit protein for human mitochondrial DNA polymerase has a distinct role in conferring processivity". En: *The Journal of Biological Chemistry* 2, págs. 1490-1499.
- Li, Y., S. Korolev y G. Waksman (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". En: *The EMBO Journal* 24, págs. 7514-7525.
- Lim, S.E., M.J. Longley y W.C. Copeland (1999). "The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase γ enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance". En: *The Journal of Biological Chemistry*, págs. 38197-38203.
- Lohman, T.M. y M.E. Ferrari (1994). "*Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: Multiple DNA-binding modes and cooperativities". En: *Annu. Rev. Biochem*, págs. 527-570.
- Lohman, T.M. y L.B. Overman (1985). "Two binding modes in *Escherichia coli* single strand binding protein-single stranded DNA complexes". En: *The Journal of Biological Chemistry* 6, págs. 3594-3603.
- Longley, M.J., L.A. Smith y W.C. Copeland (2009). "Preparation of human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein". En: *Methods Mol. Biol*, págs. 73-85.
- Longley, M.J. y col. (1998). "Characterization of the native and recombinant catalytic subunit of human DNA polymerase γ : identification of residues critical for exonuclease activity and dideoxynucleotide sensitivity". En: *Biochemistry*, págs. 10529-10539.
- Lorenzo, S. De (2015). *Single Molecule Studies in a temperature-jump optical trap*. Tesis doctoral.
- Luoma, P y col. (2004). "Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase γ mutations: clinical and molecular study". En: *The Lancet* (9437), págs. 875-882.
- Maffeo, C. y A. Aksimentiev (2017). "Molecular mechanism of DNA association with single-stranded DNA binding protein". En: *Nucleic Acids Research* 21, págs. 12125-12139.
- Maier, B., D. Bensimon y V. Croquette (2000). "Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA". En: *PNAS* 22, págs. 12002-12007.
- Maier, D. y col. (2001). "Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*". En: *Mol. Biol Cell*, págs. 820-830.

- Malik, O. y col. (2017). "Pause kinetics dominates strand-displacement polymerization by reverse transcriptase". En: *Nucleic Acids Research* 17, págs. 10190-10205.
- Manosas, M. y col. (2012). "Mechanism of strand displacement synthesis by DNA replicative polymerases". En: *Nucleic Acids Research* 13, págs. 6174-6186.
- Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells*. Yale Univ. Press, Haven, CT.
- (1981). *Symbiosis in cell evolution*. Freeman, San Francisco.
- McKinney, E.A. y M.T. Oliveira (2013). "Replicating animal mitochondrial DNA". En: *Genetics and Molecular Biology* 3, págs. 308-315.
- Miller, F.J. y col. (2003). "Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age". En: *Nucleic Acids Research* 11, e61.
- Moffitt, J.R. y col. (2008). "Recent advances in optical tweezers". En: *Annu. Rev. Biochem.*, págs. 205-228.
- Morín, J.A. y col. (2012). "Active DNA unwinding dynamics during processive DNA replication". En: *PNAS* 21, págs. 8115-8120.
- Morín, J.A. y col. (2015). "Mechano-chemical kinetics of DNA replication: identification of the translocation step of a replicative DNA polymerase". En: *Nucleic Acids Research* 7, págs. 3643-3652.
- Morín, J.A. y col. (2017). "DNA synthesis determines the binding mode of the human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein". En: *Nucleic Acids Research* 12, págs. 7237-7248.
- Murzin, A.G. (1993). "OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences". En: *The EMBO Journal* 3, págs. 861-867.
- Myers, T.W. y L.J. Romano (1988). "Mechanism of stimulation of T7 DNA polymerase by *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein (SSB)". En: *The Journal of Biological Chemistry* 32, págs. 17006-17015.
- Nakai, H. y C.C. Richardson (1988). "The effect of the T7 and *Escherichia Coli* DNA-binding proteins at the replication fork of bacteriophage T7". En: *The Journal of Biological Chemistry* 20, págs. 22190-22197.
- Naranjo, T. y col. (2017). "Mechanical measurement of hydrogen bonded host-guest system under non-equilibrium, nearphysiological conditions". En: *Chem. Sci.*, págs. 6037-6041.
- Naufer, M.N. y col. (2017). "Single-molecule mechanochemical characterization of *E.Coli* pol III core catalytic activity". En: *Protein Science*, págs. 1413-1426.
- Neuman, K.C., E.A. Abbondanzieri y S.M. Block (2005). "Measurement of the effective focal shift in an optical trap". En: *Opt. Lett* 11, págs. 1318-1320.
- Neuman, K.C. y A. Nagy (2008). "Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy". En: *Nature Methods* 6, págs. 491-505.
- Neuman, K.C. y col. (1999). "Characterization of photodamage to *Escherichia Coli* in optical traps". En: *Biophysical Journal* 5, págs. 2856-2863.

- Nicholls, D.G. (2002). “Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease”. En: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, págs. 1372-1381.
- Nicholls, D.G. y K. Akerman (1982). “Mitochondrial calcium transport”. En: *Biochimica et Biophysica Acta*, págs. 57-88.
- Nong, E.X., S.J. DeVience y D. Herschbach (2012). “Minimalistic model for force-dependent DNA replication”. En: *Biophysical Journal*, págs. 810-818.
- Nunnari, J. y A. Suomalainen (2012). “Mitochondria: In sickness and in health”. En: *Cell* 148, págs. 1145-1159.
- O’Connor, C.M. y J.U. Adams (2010). *Essentials of Cell Biology*. NPG Education.
- Oliveira, M.T. y L.S. Kaguni (2010). “Functional roles of the N-and C-terminal regions of the human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein”. En: *PLOS one* 10.
- (2011). “Reduced stimulation of recombinant DNA polymerase γ and mitochondrial DNA (mtDNA) helicase by variants of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (mtSSB) correlates with defects in mtDNA replication in animal cells”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 47, págs. 40649-30658.
- Olson, M.W. y L.s. Kaguni (1992). “3’ \rightarrow 5’ exonuclease in *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 32, págs. 23136-23142.
- Overman, L.B. y T.M. Lohman (1994). “Linkage of pH, anion and cation effects in protein-nucleic acid equilibria”. En: *Journal of Molecular Biology*, págs. 165-178.
- Pandey, M. y S.S. Patel (2014). “Helicase and polymerase move together close to the fork junction and copy DNA in one-nucleotide steps”. En: *Cell Reports* (6), págs. 1129-1138.
- Patel, S.S. (2009). “Steps in the right direction”. En: *Nature* 3, págs. 581-584.
- Picha, K.M. y S.S. Patel (1998). “Bacteriophage T7 DNA helicase binds dTTP, form hexamers, and binds DNA in the absence of Mg²⁺”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 42, págs. 27315-27319.
- Pietiläinen, K.H. y col. (2008). “Global transcript profiles of fat in monozygotic twins discordant for BMI: pathways behind acquired obesity”. En: *PLoS Med* (3), e51.
- Pohjoismaki, J.L. y col. (2010). “Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid”. En: *Journal of Molecular Biology* 5, págs. 1144-1155.
- Pätsy, J. y col. (2008). “Leber hereditary optic neuropathy mutations in the ND6 subunit of the mitochondrial complex I affect ubiquinone reduction kinetics in a bacterial model of the enzyme”. En: *Biochem. Journal* 1, págs. 129-137.
- Qian, Y. y K.A. Johnson (2017). “The human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein displays distinct kinetics and thermodynamics of DNA binding and exchange”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 31, págs. 13068-13084.
- Raghunathan, S. y col. (1997). “Crystal structure of the homo-tetrameric DNA binding domain of *Escherichia Coli* single-stranded DNA-binding protein determined by multiwave-

- length x-ray diffraction on the selenomethionyl protein at 2.9Å resolution”. En: *PNAS*, págs. 6652-6657.
- Raghunathan, S. y col. (2000). “Structure of the DNA binding domain of *E.Coli* bound to ssDNA”. En: *Nature Structural Biology*, págs. 648-652.
- Rief, M. y col. (1997). “Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM”. En: *Science* (5315), págs. 1109-1112.
- Rodríguez, I. y col. (2005). “A specific subdomain in ϕ 29 DNA polymerase confers both processivity and strand displacement activity”. En: *PNAS* 18, págs. 6407-6412.
- Rothwell, P.J. y G. Waksman (2005). “Structure and mechanism of DNA polymerases”. En: *Advances In Protein Chemistry*, págs. 401-440.
- Roy, R. y col. (2009). “SSB protein diffusion on single-stranded DNA stimulates RecA filament formation”. En: *Nature*, págs. 1092-1097.
- Ruhanen, H. y col. (2010). “Mitochondrial single-stranded binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial DNA organization”. En: *Biochimica et Biophysica Acta*, págs. 931-939.
- Saiki, R.K. y col. (1988). “Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase”. En: *Science* (4839), págs. 487-491.
- Salas, M. (1991). “Protein-priming of DNA replication”. En: *Annu. Rev. Biochem.* 60, págs. 39-71.
- Scott, I. y R.J. Youle (2010). “Mitochondrial fission and fusion”. En: *Essays Biochem*, págs. 85-98.
- Sen, D. y col. (2012). “Human mitochondrial DNA helicase TWINKLE is both an unwinding and annealing helicase”. En: *The Journal Of Biological Chemistry* 18, págs. 14545-14556.
- Sharma, N. y col. (2018). “The C-terminal tail of the NEIL1 DNA glycosylase interacts with the human mitochondrial single-stranded DNA binding protein”. En: *DNA Repair*, págs. 11-19.
- Shereda, R.D. y col. (2008). “SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes”. En: *Crit Rev Biochem Mol Biol* (5), págs. 289-318.
- Simbeni, R. y col. (1991). “Mitochondrial membrane contact sites of Yeast: characterization of lipid components and possible involment in intramitochondrial translocation of phospholipids”. En: *The Journal of Biological Chemistry* 16, págs. 10047-10049.
- Smith, S.B., Y. Cui y C. Bustamante (1996). “Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules”. En: *Science* 5250, págs. 795-799.
- (2003). “Optical-trap force transducer that operates by direct measurment of light momentum”. En: *Methods enzymol*, págs. 134-162.
- Sokoloski, J.E. y col. (2016). “Chemo-mechanical pushing of proteins along single-stranded DNA”. En: *PNAS* 22, págs. 6194-6199.
- Spelbrink, J.N. y col. (2001). “Human mitochondrial DNA deleteins associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria”. En: *Nature Genetics*, págs. 223-231.

- Steitz, T.A. (2006). "Visualizing polynucleotide polymerase machines at work". En: *The EMBO Journal*, págs. 3458-3468.
- Suksombat, S. y col. (2015). "Structural dynamics of E.Coli single-stranded DNA binding protein reveal DNA wrapping and unwrapping pathways". En: *eLife*, págs. 1-23.
- Sun, B. y col. (2011). "ATP-induced helicase slippage reveals highly coordinated subunits". En: *Nature*, págs. 132-135.
- Svoboda, K. y S.M. Block (1994). "Force and velocity measured for single kinesin molecules". En: *Cell* (5), págs. 773-784.
- Szczepanowska, K. y F. Foury (2010). "A cluster of pathogenic mutations in the 3'→5' exonuclease domain of DNA polymerase gamma defines a novel module coupling DNA synthesis and degradation". En: *Hum. Mol. Genet* 18, págs. 3516-3529.
- Takamatsu, C. y col. (2002). "Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein". En: *EMBO Reports* 5, págs. 451-456.
- Thommes, P. y col. (1995). "Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein from *Drosophila* Embryos. Physical and biochemical characterization". En: *The Journal of Biological Chemistry* 36, págs. 21137-21143.
- Tinoco, I. y C. Bustamante (2002). "The effect of force on thermodynamics and kinetics of single molecule reactions". En: *Biophysical Chemistry*, págs. 513-533.
- Tuppen, H.A.L. y col. (2010). "Mitochondrial DNA mutations and human disease". En: *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, págs. 113-128.
- Vega, M. de, L. Blanco y M. Salas (1999). "Processive proofreading and spatial relationship between polymerase and exonuclease active sites of bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase". En: *Journal of Molecular Biology*, págs. 39-51.
- Vogel, F. y col. (2006). "Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane". En: *The Journal of Cell Biology* 2, págs. 237-247.
- Wang, Y. y D.F. Bogenhagen (2006). "Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane". En: *The Journal of Biological Chemistry* 35, págs. 25791-25802.
- Williams, A.J. y L.S. Kaguni (1995). "Stimulation of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase by single-stranded DNA binding protein". En: *The Journal of Biological Chemistry* 2, págs. 860-865.
- Williams, M.C. (2002). *Optical tweezers: measuring piconewton forces*. Department of physics y center for interdisciplinary research on complex systems.
- Wong, T.S. y col. (2008). "Physical and functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumor suppressor p53". En: *Nucleic Acids Research* 2, págs. 568-581.
- Wuite, G.J.L y col. (2000). "Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity". En: *Nature*, págs. 103-106.

- Yakubovskaya, E. y col. (2006). "Functional human mitochondrial DNA polymerase γ forms a heterotrimer". En: *The Journal of Biological Chemistry* 1, págs. 374-382.
- Yakubovskaya, E. y col. (2007). "The EM structure of human DNA polymerase γ reveals a localized contact between the catalytic and accessory subunits". En: *The EMBO Journal* 19, págs. 4283-4291.
- Ye, F., J.A. Carrodeguas y D.F. Bogenhagen (1996). "The γ subfamily of DNA polymerases: cloning of a developmentally regulated cDNA encoding *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase γ ". En: *Nucleic Acids Research* 8, págs. 1481-1488.
- Ylikallio, E. y A. Suomalainen (2011). "Mechanism of mitochondrial diseases". En: *Ann. Med* (1), págs. 41-59.
- Zhou, R. y col. (2011). "SSB functions as a sliding platform that migrates on DNA via reptation". En: *Cell*, págs. 222-232.

Publicaciones del doctorando durante la tesis

- Teresa Naranjo, Fernando Cerrón, Belén Nieto-Ortega, Alfonso Latorre, Alvaro Somoza, Borja Ibarra y Emilio Pérez. Mechanical measurement of hydrogen bonded host-guest system under non-equilibrium, nearphysiological conditions. *Chemical Science*. Volumen 8. Pags 6037-6041. 2017.
- José A. Morín*, Fernando Cerrón*, Javier Jarillo*, Elena Beltran-Heredia, Grzegorz L. Ciesielski, Ricardo Arias-Gonzalez, Laurie S. Kaguni, Francisco J. Cao y Borja Ibarra. DNA synthesis determines the binding mode of the human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *Nucleic Acids Research*. Volumen 45, número 12. Pags 7237-7248. 2017. Los autores señalados con * comparten autoría como co-primeros autores.
- Fernando Cerrón, Sara de Lorenzo, Kateryna M. Lemishko, Grzegorz L. Ciesielski, Laurie S. Kaguni, Francisco J. Cao y Borja Ibarra. Replicative DNA polymerases protome active displacement of SSB proteins during lagging strand wyntesis. *Nucleic Acids Research*. Volumen 47, número 11. Pags 5723-5734. 2019.

A

Anexos

A.1. Dependencia de la estructura secundaria del ADN de cadena sencilla con la fuerza

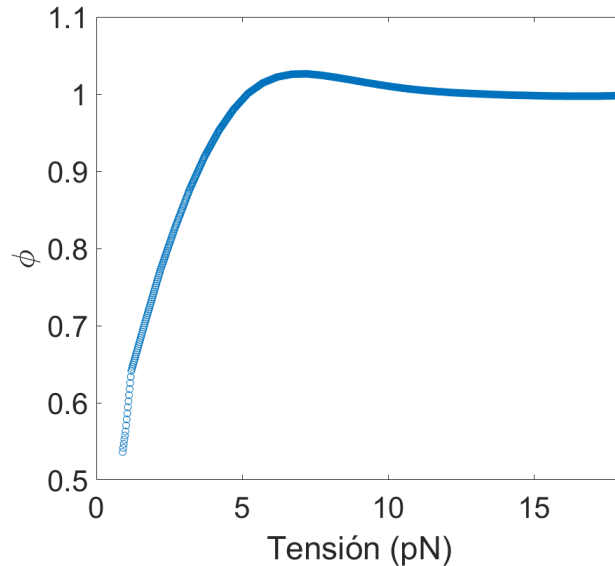


Figura A.1: Dependencia de la proporción de nucleótidos desapareados con la fuerza.

En la figura A.1 se muestra cómo depende la fracción de nucleótidos que no forman estructura secundaria con la fuerza. $\phi(f)$ representa la proporción de nucleótidos desapareados, y fue calculado con la fórmula utilizada en la referencia de Bosco, Camunas-Soler y Ritort (2014). Se utilizó el modelo *WLC* para estimar la longitud de contorno efectiva, L_c^{eff} , como función de la tensión. Primero se hizo un ajuste del modelo *WLC* a la curva experimental de Fuerza-Extensión del ADN de cadena sencilla en el rango de fuerzas entre 10 y 30 pN, donde no se espera que haya estructura secundaria, y por lo tanto todos los nucleótidos estén desapareados (esto es, $\phi(f)=1$). En los ajustes a esa región se obtuvieron los valores de la longitud de persistencia y longitud de contorno sin estructura secundaria, L_c^{10-30} y L_p^{10-30} respectivamente. Así, manteniendo el valor de la longitud de persistencia y dejando el valor de L_c como variable fija, se determinó el valor de la longitud de contorno para cada fuerza, $L_c^{eff}(f)$, mediante los ajustes del modelo *WLC* a la CFE experimental para cadena sencilla. Finalmente, para cada valor de f , la proporción de nucleótidos desapareados viene dada por:

$$\phi(f) = \frac{L_c^{eff}(f)}{L_c^{10-30}} \quad (\text{A.1})$$

A.2. Validación del método de obtención de V_{Max} .

Descripción del método.

Hasta ahora, los métodos tradicionales de identificación de la velocidad en ausencia de pausas (V_{Max}) se han basado en el estudio de los histogramas de velocidad obtenidos en las actividades de replicación, es decir, en obtener la distribución de probabilidades de velocidad de dichas actividades. Estos histogramas suelen mostrar una distribución bimodal de velocidades en la que una gaussiana corresponde al estado de movimiento (centrado en un valor mayor que cero) y otra al estado de pausa (centrada en cero). No obstante, este método *de las distribuciones* es útil para identificar V_{Max} cuando los estados de pausa y velocidad son suficientemente distintos, o lo que es lo mismo, están caracterizados por velocidades altas de replicación y pausas bien definidas, como es el caso de los resultados obtenidos en las referencias Ibarra y col. (2009), Manosas y col. (2012) y Morín y col. (2012). En la figura A.2A se muestran ejemplos de actividades de replicación de $\phi 29$ que tienen lugar a una velocidad media de ~ 50 nt/s, así como de la distribución de probabilidad obtenidas con el método *de las distribuciones* (A.2A, panel central) en la que se ven claramente dos máximos centrados en velocidad 0 (correspondiente al estado de pausa) y otra en una velocidad en torno a ~ 80 nt/s, que se corresponde con el estado de movimiento. Sin embargo, si el mismo método se aplica a polimerasas más lentas como es el caso de la pol γ estudiada en esta tesis, cuya velocidad de replicación es unas 10 veces menor a la de la $\phi 29$, las fluctuaciones térmicas dificultan la identificación de las dos gaussianas, tal y como se puede ver en el panel derecho de la figura A.2A. Este hecho nos obligó a desarrollar un nuevo método de identificación de la velocidad máxima de replicación para aquellos casos de polimerasas lentas como la pol γ . Este método se basa en el cálculo de la velocidad instantánea de replicación V_{Max} haciendo un ajuste lineal al número de nucleótidos replicados por unidad de tiempo pero con un tamaño variable de ventana temporal (τ) sobre la que hacer el ajuste. En la figura A.2B (panel izquierdo) se muestra un ejemplo del cálculo de la velocidad instantánea de replicación de una actividad de pol γ con un tamaño de ventana de 1 segundo. En esta gráfica se puede comprobar que en una actividad de replicación estándar habrá regiones donde la enzima esté pausada, y por lo tanto la velocidad instantánea oscila en torno a 0nt/s, y regiones donde estará en un estado de movimiento, y la velocidad instantánea será mayor que 0nt/s. Así, por cada actividad, y para asegurarnos de no tomar las fluctuaciones térmicas como estados de movimiento de la enzima, para cada τ se hace una selección de aquellos máximos que sobresaliesen por encima del resto un valor determinado, P . Es decir, el valor de P representa la prominencia del pico por encima del resto, y como se verá a continuación, puede utilizarse para calcular V_{Max} . En la figura A.2B, panel izquierdo, se muestra un ejemplo de la selección para un $P=9$ nt/s (puntos azules claro). Una vez seleccionados estos valores se promedian y se almacenan en una nueva variable, $V_{Media,Pico}(\tau)$. Si dibujamos los valores de $V_{Media,Pico}(\tau)$ para distintos valores de P se puede ver que valores comprendidos entre 6 y 10nt/s presentan tres regiones diferentes (figura A.2B panel derecho):

1) Si τ es menor que 0.5-1s, $V_{Media,Pico}(\tau)$ tiene una fuerte dependencia con el tamaño de ventana utilizado para el cálculo, ya que a esas escalas temporales, los cambios en distancia se corresponden con los que provocan las fluctuaciones térmicas, y por lo tanto las velocidades a las que ocurren son muy elevadas. Esto quiere decir que para estos rangos de τ estamos obteniendo la velocidad instantánea de las fluctuaciones térmicas y el ruido experimental. Si aumenta el valor de τ , el ruido térmico se promedia, dando lugar a la siguiente región.

2) En tamaños de ventana intermedios (1-5s) el valor de $V_{Media,Pico}(\tau)$ es independiente del τ empleado (véase la figura A.2B, el panel derecho). En esta región el valor de $V_{Media,Pico}(\tau)$ no contiene ni las fluctuaciones térmicas, ni tampoco se promedian las pausas como ocurre con tamaños de ventana más grandes (ver el punto 3)). Esto implica que el valor de $V_{Media,Pico}(\tau)$ en esta región es una aproximación acertada del valor de V_{Max} . Además esta región está en general bien definida para todas las trazas experimentales.

3) Para valores del tamaño de ventana mayores que ~ 5 segundos, inevitablemente se incluyen las pausas en los ajustes lineales al número de nucleótidos replicados en función del tiempo, por lo que $V_{Media,Pico}(\tau)$ tiende al valor de la velocidad de replicación media, tal y como se muestra en la figura A.2B, en el panel derecho.

Teniendo esto en cuenta, un valor de P variable entre 6 y 10 nt/s fue el valor necesario para identificar V_{Max} en nuestros caso, variando en función de las condiciones experimentales de cada actividad en particular. No obstante, para el $\sim 80\%$ de nuestros datos un valor de $P=9$ nt/s fue el adecuado para determinar V_{Max} . Si $P < 6$ nt/s estaremos incluyendo ruido experimental en el cálculo, lo que hará difícil diferenciar las fluctuaciones en la velocidad, y por lo tanto se obtendrá un valor de V_{Max} menor del real. Por otra parte, valor de P mayores que 10nt/s estarán aislando sólo los evento de replicación más rápidos, por lo que en cuanto el valor de τ incremente y se comience a promediar los eventos de pausa, no habrá máximos con mayor prominencia que 10nt/s, lo que inevitablemente produce la caída de $V_{Media,Pico}(\tau)$ hacia la velocidad promedio de replicación. Este efecto dificulta la obtención de V_{Max} , resultando en una sobreestimación de la velocidad máxima de replicación.

Para comprobar si este método funciona para enzimas rápidas, se aplicó sobre los datos de replicación de la $\phi 29$ (obtenidos de la referencia de Morín y col. (2012)), cuya velocidad de replicación oscila entre ~ 50 y ~ 100 nt/s. Tal y como se puede ver en la figura A.2C (panel izquierdo), las velocidades obtenidas tanto con el método *de las prominencias* como con el método *de las distribuciones* son compatibles (en naranja las velocidades obtenidas con el método *de las gaussianas* (Morín y col. 2012), en azul las obtenidas con el método *de las prominencias*). No obstante, el cálculo de V_{Max} obtenido para la pol γ utilizando los dos métodos demostró que el método *de las distribuciones* subestima V_{Max} , ya que como se puede ver en el panel derecho de la figura A.2C, da un resultado similar a la velocidad media, inferior al obtenido con el método *de las prominencias*.

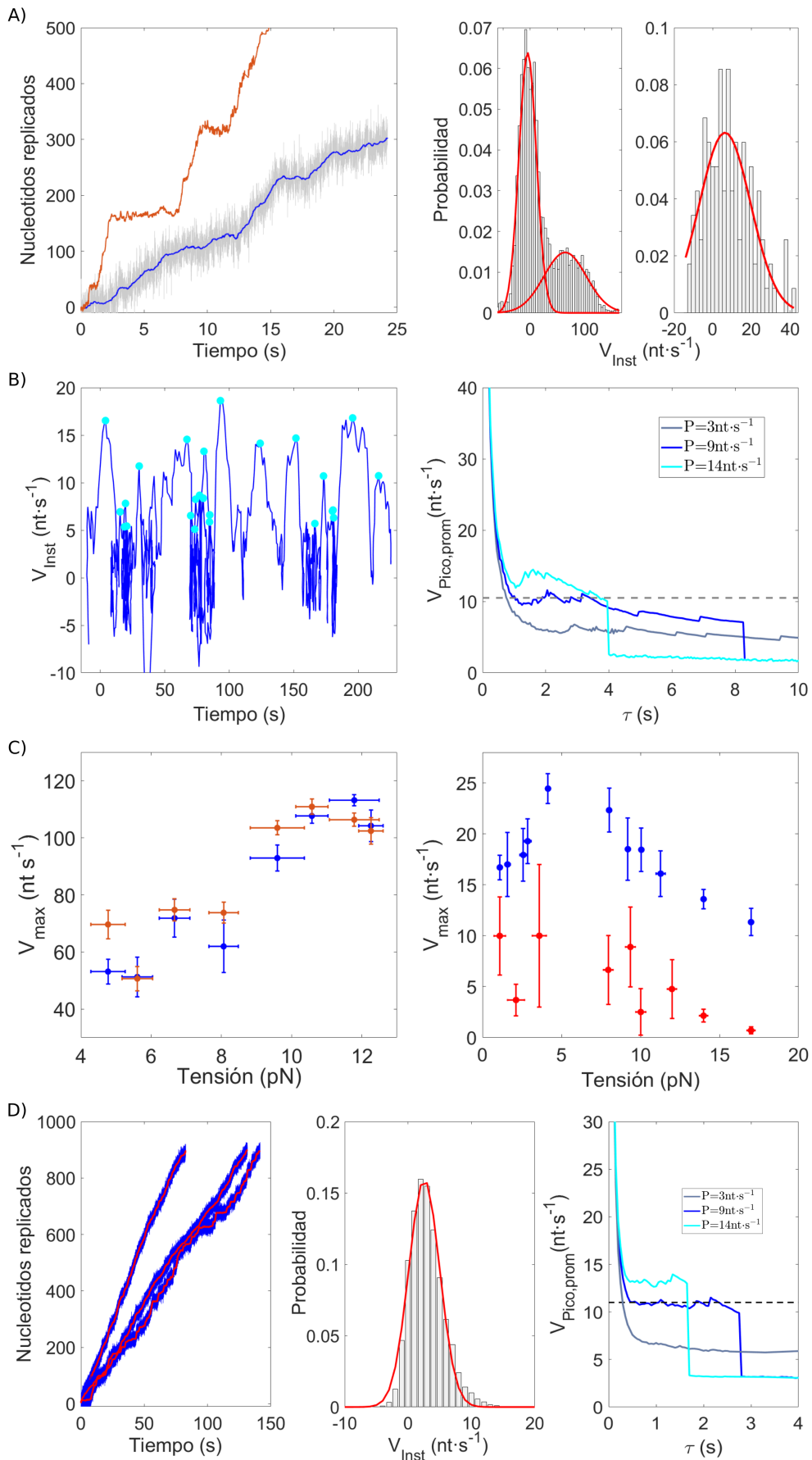


Figura A.2: Obtención de V_{Max} . Comparación entre métodos. A) Panel izquierdo: actividades de replicación sobre cadena sencilla de la $\phi 29$ (en naranja, y de la $pol\gamma$, en gris, con un promediado a 1 segundo en azul. Panel derecho: histograma de velocidades de ambas enzimas, a la izquierda la $phi29$ y a la derecha la $pol\gamma$. B) Obtención de $V_{Media,Pico}(\tau)$. Panel izquierdo: velocidad instantánea de replicación de la $pol\gamma$ en una actividad. Los puntos azules representan máximos seleccionados con $P=9nt/s$. Panel derecho: $V_{Media,Pico}(\tau)$ para distintos valores de P . La línea discontinua representa el valor seleccionado como velocidad máxima. C) Panel izquierdo: comparación entre métodos para una enzima de velocidad de replicación rápida ($\phi 29$). En naranja los datos obtenidos con el método *de las prominencias*, en azul los datos obtenidos con el método *de las distribuciones*. Panel izquierdo: comparación entre los métodos para una enzima lenta como la $pol\gamma$. En azul los valores calculados con el método *de las prominencias*, y en rojo con el método *de las distribuciones*. D) Cálculo de V_{Max} en las actividades simuladas. Panel izquierdo: actividades de replicación simuladas con las distintas condiciones. Panel central: obtención del histograma de velocidades con el método *de las distribuciones*. Panel central: histograma de velocidades para una actividad simulada. En el histograma sólo se ve una gaussiana. Panel derecho: obtención de $V_{Media,Pico}(\tau)$ para las actividades simuladas y distinto valor de P . La línea discontinua representa la velocidad máxima calculada.

Validación del método con actividades generadas computacionalmente.

Para comprobar la validez del método *de las prominencias* generamos unas actividades de replicación de forma computacional. Estas actividades se caracterizan por simular las actividades de replicación que encontramos en nuestras condiciones experimentales. En la tabla A.1 se muestran los parámetros que se utilizaron para las simulaciones: V_{max}^S representa la velocidad máxima simulada, que se sitúa en el rango 12-26nt/s. k_P y k_{-P} representan las tasas de entrada y salida del estado de pausa, respectivamente, y todas las actividades tienen una procesividad de 900nt. Así, todas tienen una velocidad media de replicación que oscila entre 3 y 12nt/s; por otra parte, el ruido experimental se simuló utilizando ruido Gaussiano de 10nt de anchura sin correlación temporal en cada posición, por lo que estas trazas emulan nuestras condiciones experimentales. En la figura A.2D (panel izquierdo) vienen indicados algunos ejemplos de estas simulaciones en diferentes condiciones en las que las trazas originales se muestran en azul, y los promediados ($\sim 1s$) en rojo.

V_{max}^S (nt s ⁻¹)	26	20	12	12	12
k_P (s ⁻¹)	3	10	3	30	300
k_{-P} (s ⁻¹)	1	10	1	10	100
V_{max}^{S1} (nt s ⁻¹)	21,6	18,4	11,8	10,7	8,6
Error ^{S1} (%)	-17	-8	-2	-11	-29
V_{max}^{S2} (nt s ⁻¹)	17,6	10,2	6,0	12,7	16,1
Error ^{S2} (%)	-32	-49	-50	6	35

Tabla A.1: Tabla de valores empleados en las simulaciones. En fondo verde van los resultados asociados al método *de las prominencias* y en fondo amarillo los del método *de las distribuciones*.

Estas trazas se analizaron también con el método *de las distribuciones* para llevar a cabo una comparación entre métodos. Para calcular las distribuciones, se utilizó un tamaño de ventana de 1 segundo. Los resultados de V_{Max} se muestran en la tabla A.1, donde V_{max}^{S1} y V_{max}^{S2} representan las velocidades máximas obtenidas con el método *de las prominencias* y el método *de las distribuciones*, respectivamente. Las variables error^{S1} y error^{S2} representan el error cometido (en %) con cada método a la hora de calcular el valor real de la velocidad máxima, V_{max}^S . Para todos los casos estudiados, el error promedio cometido con el método *de las prominencias* es un $\sim 13\%$ (promedio del error^{S1}) cuando se utilizó un P de 9nt/s, que es el empleado en la mayoría de los experimentos de replicación de esta tesis, frente al $\sim 50\%$ que se comete con el método *de las distribuciones*. Como era de esperar cuanto mayor es la cantidad de eventos de pausa en las actividades, menor rendimiento tendrá el método *de las prominencias*, pero tal y como se ha comentado tiene una mejor estimación del valor de la velocidad máxima. El método *de las prominencias* da un mejor rendimiento principalmente por dos factores, por una parte, no requiere diferenciar entre dos picos correspondientes a dos gaussianas (como es el caso del método *de las distribuciones*), ya que si la velocidad de replicación es pequeña, no siempre son resolubles. Por otra parte, el método *de las prominencias* permite utilizar infor-

mación sobre la altura de un pico de velocidad instantánea sobre el resto de valores de pico, lo que nos permite diferenciar con mayor precisión las regiones de replicación activa con respecto a las regiones de ruido experimental.