

## ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD REPARADORA DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA RUTA DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES

**ALUMNADO:** López- Rico, E.<sup>1</sup> Cabezas-Ordoñez, N.<sup>1</sup> Posadas- Zaragoza, E.<sup>2</sup> Rodríguez- Cruz, P.<sup>2</sup> 1º Bachillerato.

**INVESTIGADORES:** León-Rodríguez, E.<sup>1</sup> Moreda- Moreno, M.<sup>1</sup> Jordano-Raya, M.<sup>3</sup>

**CENTROS:** 1 IES FIDIANA; 2 CES LOPE DE VEGA SCA; 3 DEPARTAMENTO DE GENÉTICA "GRUPO GC22 EPIGENÉTICA" IMIBIC.

Pese a que el ADN es la molécula portadora de la información genética, posee una estabilidad química limitada. Su composición estructural puede verse amenazada por diversos factores tanto exógenos como endógenos. Uno de los daños más comunes es el que se produce en las bases nitrogenadas. La ruta de Reparación por Escisión de Bases (BER) es esencial en la reparación celular y mantenimiento del genoma. Este mecanismo, que consta de varias etapas, es iniciado por la acción de ADN glicosilasas que escinden la base dañada y generan un sitio abásico (sitioapurínico/apirimidínico o sitio AP). Posteriormente, el sitio AP puede ser procesado mayormente por AP endonucleasas que rompen el esqueleto azúcar-fosfato que finalmente será reparado. El objetivo de este proyecto ha sido analizar la actividad reparadora de dos tipos de enzimas pertenecientes a esta ruta de reparación (Uracil ADN glicosilasa y AP endonucleasa) a distintos tiempos para obtener una curva cinética. Para llevar a cabo estos análisis, se sintetizaron sustratos de ADN con dos tipos de daño (uracilo y sitio AP), dichos sustratos se encontraban marcados con fluorescencia en el extremo 5' de la cadena superior. Posteriormente, estos sustratos se incubaron en presencia de enzima Uracil-ADN Glicosilasa y AP Endonucleasa humana 1 y, su actividad se analizó a distintos tiempos. Tras la reacción, se purificó el ADN y se realizó la electroforesis en geles de acrilamida. Una vez finalizada, los geles fueron revelados mediante un escáner de fluorescencia, analizados y cuantificados mediante el software Multigaugue obteniéndose así los datos para obtener las cinéticas enzimáticas. Nuestros resultados muestran el sustrato de 51 nt sin procesar y la acumulación de producto procesado de 28 nt con respecto al tiempo. La cantidad de sustrato y enzimas utilizadas fueron adecuadas para realizar el estudio, las cuales también pudieron reconocer y procesar correctamente los sustratos ensayados. Los datos finales presentan que la Uracil ADN glicosilasa presenta una mayor eficiencia que la AP endonucleasa humana 1.

**Palabras clave:** daño, reparación, eficiencia, ADN, enzima, electroforesis.

Although DNA is the molecule that carries genetic information, it has limited chemical stability. Its structural composition can be threatened by various exogenous and endogenous factors. One of the most common types of damage is damage to the nitrogenous bases. The Base Excision Repair (BER) pathway is essential in cellular repair and genome maintenance. This multi-step mechanism is initiated by the action of DNA glycosylases that cleave the damaged base and generate an abasic site (apurinic/apyrimidinic site or AP site). Subsequently, the AP site can be processed mostly by AP endonucleases that cleave the sugar-phosphate backbone that will eventually be repaired. The aim of this project has been to analyse the repair activity of two types of enzymes belonging to this repair pathway (Uracil DNA glycosylase and AP endonuclease) at different times to obtain a kinetic curve. To carry out these analyses, DNA substrates with two types of damage (uracil and AP site) were synthesised and fluorescently labelled at the 5' end of the upper strand. Subsequently, these substrates were incubated in the presence of Uracil-DNA glycosylase enzyme and human AP endonuclease 1 and their activity was assayed at different times. After the reaction, DNA was purified and electrophoresis was performed on acrylamide gels. Once finished, the gels were revealed by a fluorescence scanner, analysed and quantified using Multigaugue software, thus obtaining the data to obtain the enzymatic kinetics. Our results show the substrate of 51 nt unprocessed and the accumulation of processed product of 28 nt with respect to time. The amount of substrate and enzymes used were adequate for the study, which were also able to recognise and process the tested substrates correctly. The final data show that Uracil DNA glycosylase is more efficient than human AP endonuclease 1.

**Keywords:** damage, repair, efficiency, DNA, enzyme, electrophoresis.