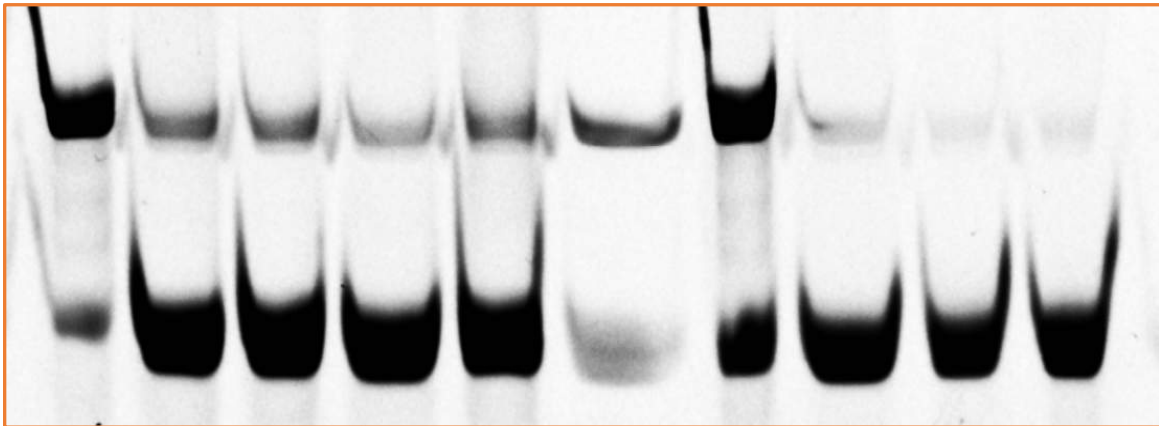


*ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD REPARADORA  
DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA RUTA DE  
REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES*



**ALUMNADO**

*Elena López Rico (1º Bachillerato, IES Fidiana, Córdoba)*

*Natalia Cabezas Ordoñez (1º Bachillerato, IES Fidiana, Córdoba)*

*Elisabeth Posadas Zaragoza (1º Bachillerato, CES Lope de Vega, Córdoba)*

*Pilar Rodríguez Cruz (1º Bachillerato, CES Lope de Vega, Córdoba)*

**INVESTIGADORES**

*Marina Jordano Raya*

*Teresa Roldan Arjona*

**PROFESORAS COORDINADORAS**

*Dra Elena León Rodríguez*

*Mar Moreda Moreno*

**CENTROS**

**IES FIDIANA**

**CES LOPE DE VEGA SCA**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA "GRUPO GC22 EPIGENÉTICA" IMIBIC**

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1.- Mecanismo de acción enzimática .....</b>	<b>5</b>
<b>3.2.- Electroforesis .....</b>	<b>6</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
<b>4.1.- Asignación de variables .....</b>	<b>7</b>
<b>4.2.-Planificación de la investigación .....</b>	<b>7</b>
<b>3.3.- Materiales empleados.....</b>	<b>8</b>
<b>3.4.- Métodos .....</b>	<b>9</b>
PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE ADN CON LAS LESIONES A ESTUDIAR.....	9
ENSAYOS DE ACTIVIDAD REPARADORA DE ADN .....	10
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN .....	11
ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADN .....	12
ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES REPARADORAS .....	13
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>14</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>16</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>17</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>17</b>

## 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 (sitio apurínico/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 Multigaue 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.

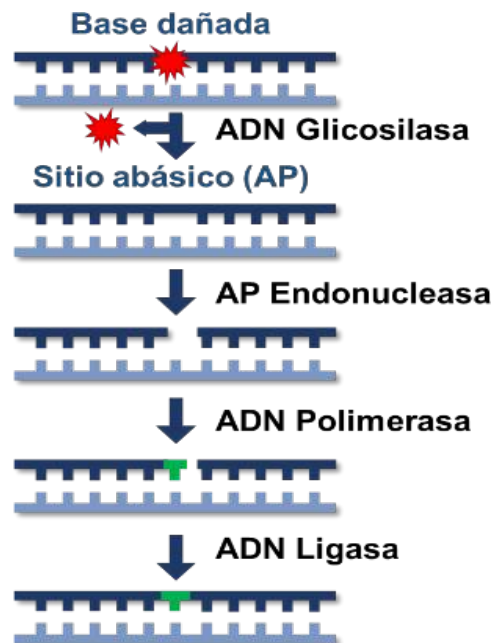
**Palabras clave:** daño, reparación, eficiencia, ADN, enzima, electroforesis.

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 Multigaue 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.

## 1.INTRODUCCIÓN

Pese a que el ADN es el portador de la información genética, su estabilidad química es limitada, y su integridad estructural se encuentra continuamente amenazada por factores tanto endógenos como exógenos. Algunos sucesos que perturban la estabilidad y correcto funcionamiento del ADN son, por ejemplo; los errores introducidos durante la replicación, o la alteración de la estructura de la molécula de ADN por su interacción con especies reactivas de oxígenos generadas como consecuencia de un metabolismo aerobio, o el efecto de la radiación ultravioleta. Una de las lesiones más frecuentes en el ADN afecta a las bases, portadoras de la información genética. Estos daños deben ser reparados ya que, de lo contrario, pueden tener graves consecuencias para la célula. Por ello, la reparación del ADN es un proceso esencial para la viabilidad de la célula y para asegurar la fidelidad en la transmisión del ADN. Una de las vías más importantes para el mantenimiento de la integridad del genoma es la ruta de Reparación por Escisión de Bases (Base Excision Repair, BER)



**Figura 1: Mecanismo de reparación por escisión de bases.** La ruta BER es iniciada por ADN glicosilasas que reconocen y escinden la base dañada, representada en rojo. El sitio abásico generado puede ser procesado mayormente por AP endonucleasas. Finalmente, la cadena es rellena por una ADN polimerasa y restaurada por la acción de una ADN ligasa.

El mecanismo BER consta de varias etapas, y se inicia con la acción de una clase específica de enzimas reparadoras llamadas ADN glicosilasas, que catalizan la hidrólisis del enlace N-glicosílico que une la base alterada con el esqueleto azúcar-fosfato. Existen distintos tipos de ADN glicosilasas, cada una de las cuales reconoce un tipo específico de lesión o un rango de lesiones relacionadas químicamente. Tras este paso inicial, que libera la base dañada como una base libre y se genera un sitio abásico (AP). Este sitio AP es procesado por una AP endonucleasa que cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster al lado 5' del residuo sin

base, generando un extremo 3'-OH que será utilizado en una etapa posterior de la reparación. Adicionalmente, se produce un extremo bloqueado en 5' con un residuo desoxirribosofosfato sin base (dRP), este es eliminado por acción de una desoxirribosa-fosfato diesterasa (dRPasa). Finalmente, la continuidad de la cadena dañada es restaurada por acción de una ADN polimerasa y una ADN ligasa.

En este contexto, la finalidad de esta investigación es estudiar la actividad reparadora de ADN glicosilasas y AP endonucleasas, para ello se analizará mediante reacciones enzimáticas la capacidad de procesar un sustrato de ADN dañado.

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos son:

- Analizar la actividad reparadora de dos enzimas, la **Uracil ADN glicosilasa** y la **AP endonucleasa** a distintos tiempos
- Obtener dos curvas de cinética enzimática, una para cada enzima en función de los tiempos utilizados.

## 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 3.1.- Mecanismo de acción enzimática

La **cinética enzimática** es el estudio de los mecanismos de las enzimas mediante la determinación de su velocidad de reacción en distintas condiciones. La velocidad de reacción depende de varios factores: la concentración del sustrato y de la enzima, la temperatura, el pH y la presencia de inhibidores.

La **reparación por escisión de bases (BER)** es una vía de reparación del ADN que corrige daños en las bases como oxidaciones, alquilaciones, desaminaciones, adiciones de grupos químicos o pérdida de bases. A lo largo de la evolución las células han seleccionado mecanismos para preservar y reducir el daño en el ADN, tal es el caso de la ruta de reparación BER, donde la base alterada es retirada del ADN por enzimas llamadas ADN glicosilasas, que reconocen y escinden las bases con daños específicos. Dichas enzimas rompen el enlace N-glicosídico que une la base con el azúcar, originando así un sitio AP. Posteriormente, el sitio AP es reconocido por una AP endonucleasa, produciendo la incisión del esqueleto azúcar fosfato en la región cercana al extremo 5' del sitio AP generando así un hueco mononucleotídico y un extremo 5'-desoxirribosa-5-fosfato bloqueado (dRP). Para que la ruta pueda continuar, este extremo bloqueado debe ser procesado por una desoxirribosa-fosfato diesterasa (dRPasa). Posteriormente, el hueco en la cadena es

rellenado por la ADN polimerasa y finalmente sellado por la ligasa, que restaura la integridad de la molécula.

Por un lado, la enzima **Uracil ADN Glicosilasa (UDG)** tiene como función principal la escisión mediante hidrólisis del enlace N-glicosídico entre un uracilo y el esqueleto azúcar-fosfato en el ADN de cadena sencilla o bicatenaria, pero no así en ARN u oligonucleótidos. Esta característica causa la fragmentación del ADN pudiéndose usar también para detener la amplificación en PCR. La UDG es activa en un amplio rango de pH con un óptimo a pH 8,0, no requiere un catión divalente como cofactor, y es inhibida por una alta fuerza iónica (> 200 mM).

Por otro lado, la función principal de la enzima **AP endonucleasa (AP)** es procesar los sitios AP encontrados en moléculas de ADN de cadena doble o simple mediante incisión en el esqueleto azúcar-fosfato generando un hueco mononucleotídico. Contienen residuos de aminoácidos que le permiten reaccionar selectivamente con los sitios AP. Las AP endonucleasas son enzimas dependientes de magnesio que cortan en el lado 5' del sitio AP.

### 3.2.- Electroforesis

La electroforesis es un método por el cual se separan moléculas por tamaño o peso molecular usando un campo eléctrico. La separación se realiza comúnmente en un gel que funciona como filtro poroso y está constituido habitualmente de materiales como agarosa o poliacrilamida. Su principal uso es la separación de mezclas de biopolímeros especialmente de ácidos nucleicos (ADN o ARN) o proteínas. En el caso de los ácidos nucleicos, como el ADN, disponen de una carga eléctrica negativa y cuando son separados en el gel mediante una corriente eléctrica, se dirigen al polo positivo. Las moléculas de menor tamaño se moverán más rápidamente atravesando los poros del gel con facilidad, mientras que las moléculas de mayor tamaño migrarán menos ya que su tamaño impide que atraviesen los poros del gel fácilmente.

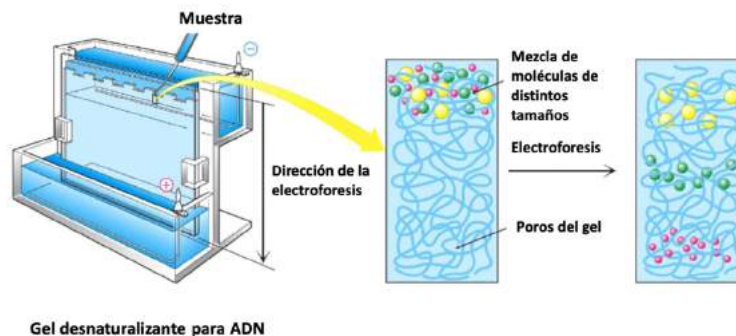


Figura 2: Esquema de electroforesis.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.- Asignación de variables

En este estudio se han empleado las siguientes variables:

- Las variables independientes son las enzimas empleadas, la AP endonucleasa y Uracil ADN glicosilasa.
- La variable dependiente es la actividad enzimática con respecto al tiempo, 5, 10, 20 y 30 min, es decir, la cinética enzimática.

### 4.2.-Planificación de la investigación

- **1ª Sesión 30/11/22.** Presentación institucional del IMIBIC y visitas a las instalaciones del grupo “GC22 Epigenética”, del IMIBIC. Presentación de las normas de laboratorio, objetivos del proyecto e introducción a la reparación de ADN y su importancia en los procesos tumorales
- **2ª Sesión 11/01/23.** Se realizó en el Campus de Rabanales de la UCO. Aprendizaje de los fundamentos de análisis de la actividad reparadora de las enzimas que participan en la ruta BER y metodologías más utilizadas. Síntesis de sustratos de ADN con un daño en posición determinada. Ensayo de actividad. Precipitación y purificación de ADN.
- **3ª Sesión 08/02/23.** Se realizó en el Campus de Rabanales de la UCO. Observación de los resultados mediante electroforesis en gel de acrilamida de las muestras obtenidas en la sesión anterior y análisis de resultados. Realización de gráficas y figuras.
- **4ª Sesión 08/03/23.** Se realizó en el IMIBIC. Asesoramiento sobre la elaboración de un póster científico (estructura, número de elementos gráficos, colores, letra)
- **Sesiones online mediante documentos compartidos en Google-Drive.** Se trabajaron los documentos en forma plantilla en carpetas compartidas online. De esta manera todo el grupo trabaja en el desarrollo y van siguiendo las indicaciones de las tutoras IES coordinadoras.
  - Preparación de un resumen/abstract
  - Preparación de una memoria de investigación
  - Preparación de un póster/panel
  - Preparación de una presentación en diapositivas
  - Preparación del texto de la exposición para la defensa en el congreso

### 3.3.- Materiales empleados

Entre otros se han utilizado los siguientes materiales:



*Tubo eppendorf*



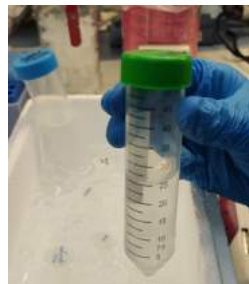
*Micropipetas*



*Puntas de pipeta*



*Tubo Falcon con faldón*



*Tubo Falcon sin faldón*



*Centrífuga*



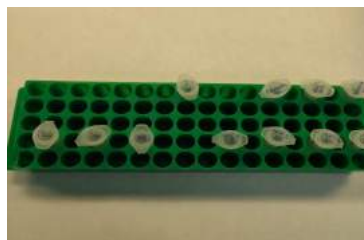
*Termobloque*



*Autoclave*



*Congelador*



*Gradilla de tubos eppendorf*

*Figura 3: Material de laboratorio*

- **Tubo eppendorf.** Instrumento de centrifugación y viales de almacenamiento para sustancias químicas y otros tipos de muestras.
- **Micropipetas.** Instrumentos utilizados para la recolección de muestras en volúmenes muy pequeños.
- **Puntas de pipeta.** Sirven para transferir volúmenes precisos de líquido de un recipiente a otro.



- **Tubo Falcon con faldón.** Generalmente usado para almacenar muestras o compuestos de laboratorio.
- **Tubo Falcon sin faldón.** Tubo de centrifuga. Se utilizan para centrifugar, y almacenar muestras o compuestos de laboratorio.
- **Centrífuga.** Es un equipo que separa partículas de una solución homogénea mediante un movimiento de rotación y una aceleración centrífuga, provocando la sedimentación de sus componentes.
- **TermoBloque.** Empleado para incubar muestras a una temperatura específica.
- **Autoclave.** Empleado para esterilizar material
- **Congelador.** Se utilizan para almacenar muestras entre  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que incluyen materiales farmacéuticos, biológicos y otros materiales de laboratorio utilizados habitualmente.
- **Gradilla de tubos eppendorf.** Soporte de tubos que facilita su transporte y manejo.

### 3.4.- Métodos

#### PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS DE ADN CON LAS LESIONES A ESTUDIAR

Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo eppendorf:

Componentes	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Cadena dañada	2
Cadena complementaria	2
TN (buffer)	6
Volumen total	10

1. Se incubaron todos los sustratos 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . Esto hace que el ADN se desnaturalice.
2. Se pasó a un recipiente con agua a  $95^{\circ}\text{C}$  y se dejó enfriar hasta que se alcanzó una temperatura por debajo de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La bajada gradual de temperatura favorece la renaturalización del ADN sin crear bucles en su estructura.
3. Se centrifugó con un spin antes de usar.



Figura 4. Preparación de sustratos



Figura 5. Centrifugación

1. Se prepararon los tubos eppendorfs rotulados de la siguiente manera:
  - **Mix**: mezcla de todos los componentes con excepción de la enzima
  - **0**: Control SIN enzima
  - **Enzima**: Reacción con enzima
  
2. Se repartió 10 µl de la mix de proteinasa K a 4 eppendorfs que se rotularon como:
  - a) Enzima 5
  - b) Enzima 10
  - c) Enzima 20
  - d) Enzima 30
  
3. En el tubo Mix se añadieron los componentes de la reacción tal y como se indica en la columna sombreada y se mezclaron con ayuda de una pipeta.

Componentes	Cf	Volumen (µl) x1	Volumen (µl) x8
Sustrato de ADN	20 nM	1	8
10x Buffer Kubota	1x	5	40
Enzima		1	8
H2O (mQ)	-	43	344
Volumen total	-	50	400

4. En el tubo 0 se añadió:
  - 49 µl del tubo **Mix**
  - 1 µl de H2O (mQ)
5. En el tubo enzima se añadió:
  - 294 µl del tubo **Mix**
  - 6 µl de la enzima correspondiente bien Uracil ADN glicosilasa o la AP endonucleasa.
6. Se incubó a 37 °C para que la enzima actuara.
7. Se tomaron muestras a los tiempos en los que se quiso observar la actividad de la enzima.
8. Se pararon las reacciones a los tiempos elegidos: 5, 10,20 y 30 minutos.
  - a. Se cogieron 50 µl del tubo **ENZIMA** cuando pasaron 5 minutos y se pasó a **ENZIMA 5** y se mantuvo 30 min a 37 °C para que la proteinasa K actuara.
  - b. Se cogieron 50 µl del tubo **ENZIMA** cuando pasaron 10 minutos y se pasó a **ENZIMA 10** y se mantuvo 30 min a 37 °C para que la proteinasa K actuara.
  - c. Se cogieron 50 µl del tubo **ENZIMA** cuando pasaron 20 minutos y se pasó

- a **ENZIMA 20** y se mantuvo 30 min a 37 °C para que la proteinasa K actuara.
- d. Se cogieron 50 µl del tubo **ENZIMA** cuando pasaron 30 minutos y se pasó a **ENZIMA 30** y se mantuvo 30 min a 37 °C para que la proteinasa K actuara.
- e. Se añadieron 10 µl de mix proteinasa K en el tubo **0** cuando pasaron 30 minutos y se mantuvo 30 min a 37 °C para que la proteinasa K actuara.
9. Se dio un spin a todas las muestras.
10. Tras la incubación de la proteinasa K, en el caso de las reacciones con UDG, añadir 6 µl de NaOH 1 M e incubar 10 min a 70 °C para promover la rotura de los sitios AP generados y poder observar la actividad de dicha enzima.
11. Finalmente, se dio un nuevo spin.

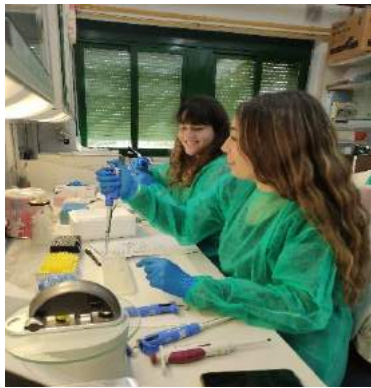


Figura 6. Preparación de los tubos eppendorfs con las muestras



Figura 7. Preparaciones sometidas a choque térmico

## AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ADN

1. Se añadió 60µl de buffer TE a cada muestra.
2. Se repartió 8.2 µl de la mix glicógeno en los cinco tubos de la reacción. La mix de glicógeno está compuesta por glucógeno + NaCl.
3. Se añadieron 360µl de Etanol 100% frío (-20 °C).
4. Se incubó 30 minutos a -20 °C.
5. Se centrifugó a 4°C 15 min a 13400 rpm.
6. Se eliminó el sobrenadante volcando el eppendorf para formar el pellet.
7. Se añadieron 120 µl de Etanol 70% frío para lavar el pellet:
8. Se centrifugó 5 min a 4°C 13400 rpm (se utilizó la centrifuga colocada en la cámara de frío)
9. Se eliminó el sobrenadante con pipeta dejando el pellet lo más seco posible.
10. Se terminó de secar el pellet en SpeedVac o en la estufa a 37°C (aproximadamente 10 min).
11. Se resuspendió el pellet en 10 µl formamida al 90%.

12. Finalmente, se guardaron los tubos con las muestras de ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente realizar la electroforesis a las muestras obtenidas.



*Figura 8. Aislamiento y purificación de ADN*



*Figura 9. Mantenimiento de muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$*

## **ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADN**

### **Composición de los geles**

Componentes	Cantidad
Urea	4.8 g
TBE 10x	1 ml
Acrilamida 40% 19:1	3.75 ml
H <sub>2</sub> O (mQ)	1.8 ml
APS 10%	100 $\mu\text{l}$
TEMED	10 $\mu\text{l}$

1. Se pesó la urea y se añadieron los elementos líquidos menos el APS y el TEMED.
2. Se agitó con una mosca hasta que quedó disuelta la urea. Mientras se disolvía, se procedió al lavado, secado y montura de los cristales.
3. Se colocó el equipo para añadir la solución del gel y se añadió APS al 10% y el TEMED
4. La mezcla se introdujo entre los cristales con ayuda de una pipeta. Finalmente, se puso el peine de forma que no quedaran burbujas por la zona superior.
5. Una vez polimerizado se sacaron los cristales con el gel del equipo y se quitó el peine con cuidado bajo un chorro de agua.
6. Se preparó TBE 1x: 100 ml TBE 10x y 900 ml de H<sub>2</sub>O (mQ).
7. Se montó el gel en el soporte, se añadió TBE 1x a la cubeta de electroforesis y se hizo un pre-run: 15 min a 450V.

8. Las muestras se desnaturalizaron en el termobloque durante 5 min a 95 °C y se dio un spin. Posteriormente, se cargaron una en cada pocillo. En uno de los pocillos vacíos se añadió un colorante que ayuda como frente de carga para saber por dónde va la electroforesis. Se dejó correr durante 45 a diferentes voltajes.

9. Finalmente se sacaron los cristales con el gel de la cubeta, se limpió y se secó muy bien.

### **Revelado de gel**

Se preparó el equipo para escanear el gel. Se utilizaron los programas “Fujifilm” y “Multigaue” para escanear el gel y modificar la imagen obtenida.



Figura 10. Preparación de la electroforesis



Figura 12. Preparación de programas para escanear el gel

### **ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LAS ACTIVIDADES REPARADORAS**

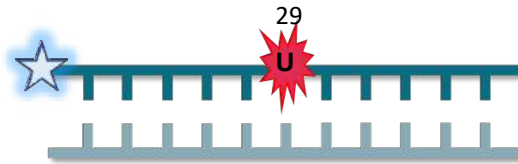
1. Utilizando el programa “Multigaue” se cuantificó la intensidad de las bandas pasando los datos a una tabla EXCEL.
2. Se calculó el porcentaje de producto obtenido y se representó en una gráfica de dispersión el porcentaje de producto con respecto al tiempo.
3. Se calculó el promedio y error típico entre las dos réplicas realizadas para cada enzima y se representó en una gráfica.



Figura 13. Análisis y cuantificación

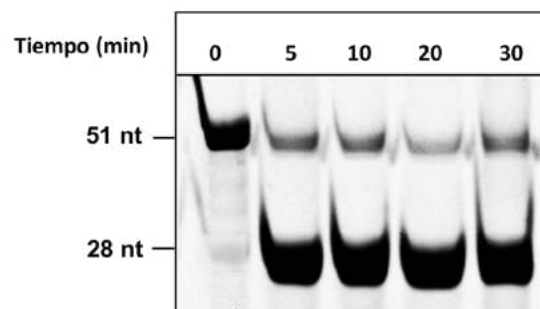
#### 4. RESULTADOS

Respecto a la actividad de la Uracil ADN glicosilasa, se incubó 20 nM de sustrato de ADN dañado con un uracilo en posición 29 en presencia de **Uracil ADN glicosilasa (UDG)** 0,2 U a los tiempos 5, 10, 20 y 30 minutos.

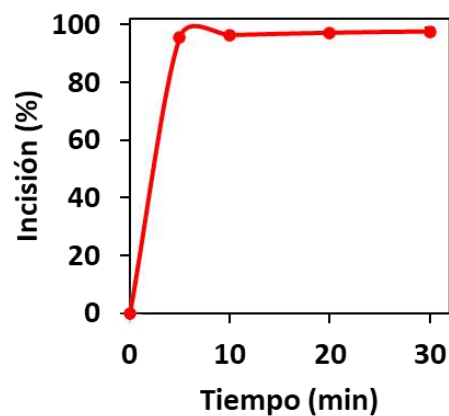


**Figura 14. Sustrato de ADN empleado para analizar la actividad ADN glicosilasa.** Se sintetizaron sustratos de 51 nucleótidos con una lesión por Uracilo en la posición 29, marcados en su extremo 5' con fluorescencia en la cadena superior.

Tras el análisis de los datos, los resultados indicaron que esta enzima presenta una gran eficiencia, llegando al 100% del sustrato procesado a los 5 minutos del comienzo de la reacción enzimática.



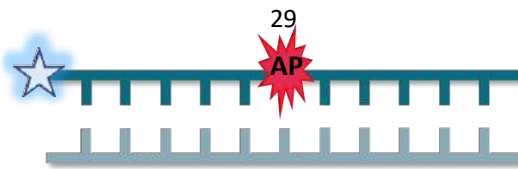
**Figura 15: Actividad Uracil ADN glicosilasa (UDG).** El sustrato dañado con Uracilo se incubó con la enzima UDG (0.2U) durante 5, 10, 15, 20 y 30 min.



**Grafica 1: Cinética enzimática de UDG.** Los datos obtenidos son el promedio y error típico obtenido tras realizar dos réplicas

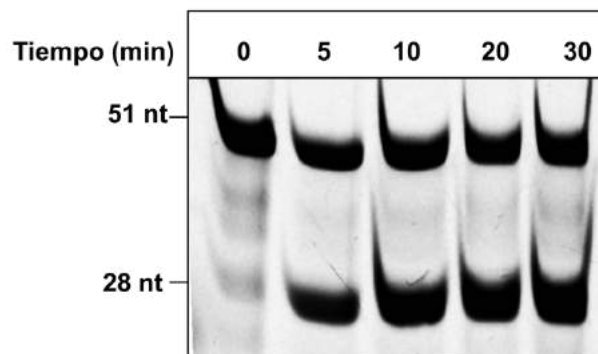
La **Figura 15** muestra los resultados de la electroforesis donde se revela el proceso llevado a cabo por la enzima Uracil ADN Glicosidasa, pudiéndose observar el sustrato 51nt sin procesar y la acumulación de producto 28 nt procesado con respecto al tiempo y en la imagen. Como puede observarse la Uracil ADN Glicosilasa tiene una gran eficacia, ya que todo el sustrato se procesa al cabo de los primeros 5 minutos de la reacción. En la **Grafica 1**, se muestran los datos cuantitativos obtenidos pudiéndose observar el 100% del sustrato procesado a los 5 minutos de la reacción.

Respecto a la actividad de la AP endonucleasa, se incubó 20 nM de sustrato de ADN dañado con un sitio AP en posición 29 en presencia de **AP endonucleasa humana 1 (APE1)** 0,2 U a los tiempos 5, 10, 20 y 30 minutos.

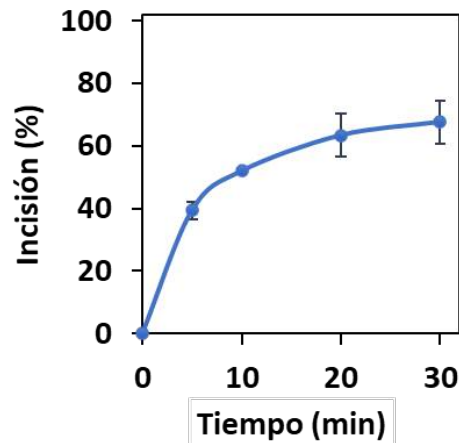


**Figura 16.** Sustrato de ADN empleado para analizar la actividad AP endonucleasa. Se sintetizaron sustratos de 51 nucleótidos con una lesión por sitio AP en la posición 29, marcados en su extremo 5' con fluorescencia en la cadena superior.

La **Figura 17**, muestra los resultados de la electroforesis, donde se revela el proceso llevado a cabo por la enzima AP endonucleasa humana 1, pudiéndose observar el sustrato 51nt sin procesar y la acumulación de producto 28 nt procesado con respecto al tiempo. Por otro lado, en la **Gráfica 2**, se observa el porcentaje de incisión con respecto al tiempo contabilizado a los 5, 10, 20 y 30 minutos.



**Figura 17:** Actividad AP endonucleasa humana 1 (APE1). El sustrato dañado con un sitio AP se incubó con la enzima APE1 (0.2U) durante 5, 10, 15, 20 y 30 min.



**Grafica 2: Cinética enzimática de APE1.** Los datos obtenidos son el promedio y error típico obtenido tras realizar dos réplicas

A partir de los datos obtenidos se concluye que APE1 presenta una menor eficiencia que UDG, ya que en el primer intervalo de 5 minutos APE1 procesa el 40% del sustrato de 51 nt.

## 8. CONCLUSIONES

1. La cantidad de sustrato y enzimas utilizadas en el proyecto fueron las adecuadas para su estudio.
2. La AP Endonucleasa humana 1 y la Uracil ADN glicosilasa son capaces de reconocer y procesar los sustratos analizados.
3. La Uracil ADN glicosilasa es una enzima más eficiente que la AP Endonucleasa humana 1.
4. La Uracil ADN glicosilasa en el primer intervalo de 5 minutos procesó el 100% del sustrato, mientras que la AP Endonucleasa humana 1 procesó un 40% del sustrato.

### CONCLUSIÓN FINAL

El estudio de la cinética de las dos enzimas demuestra que la Uracil ADN Glicosilasa presenta mayor eficiencia que la AP Endonucleasa humana 1. Lo que indicaría que el procesamiento de las bases dañadas por la Uracil ADN Glicosilasa no sería un paso limitante en la ruta de Reparación por Escisión de Bases (BER).



## 9. AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer...

- Al departamento de genética “Grupo GC22 EPIGENÉTICA” por habernos facilitado los instrumentos y el lugar para realizar el proyecto. Especialmente a nuestra investigadora Marina Jordano Raya, por habernos enseñado y explicado todo lo que necesitábamos para sacar adelante este proyecto.
- A las tutoras del IES Fidiana, Elena León Rodríguez y M<sup>a</sup> del Mar Moreda Moreno por toda la ayuda que hemos recibido por su parte en todo momento.
- A los centros de investigación, IMIBIC y CSIC por su colaboración
- A los proyectos Fidiciencia 2.0 y Erasmus + por un año más ayudando a los alumnos a expandir su campo de aprendizaje y a la Junta de Andalucía por la concesión del Proyecto de Innovación Educativa Fidiciencia 2.0.
- Al IES Fidiana y al CES Lope de Vega por facilitarnos el acercamiento a un proyecto de investigación.
- A nuestros padres y familias por su apoyo incondicional.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Friedberg, E.C., Friedberg, E., Walker, G., Walker, G.C., Siede, W., Wolfram, and Wolfram, s. (1995). DNA Repair and Mutagenesis. (Washington, DC: American Society for Microbiology)
- Roldán-Arjona, Teresa, Ariza, Rafael R, Córdoba-Cañero, Dolores (2019). "DNA Base Excision Repair in Plants: An Unfolding Story With Familiar and Novel Characters." *Frontiers in Plant Science* 10(1055)
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.