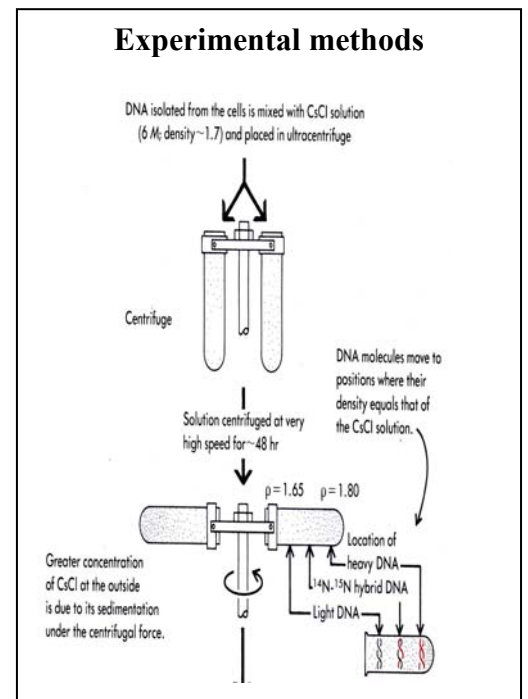
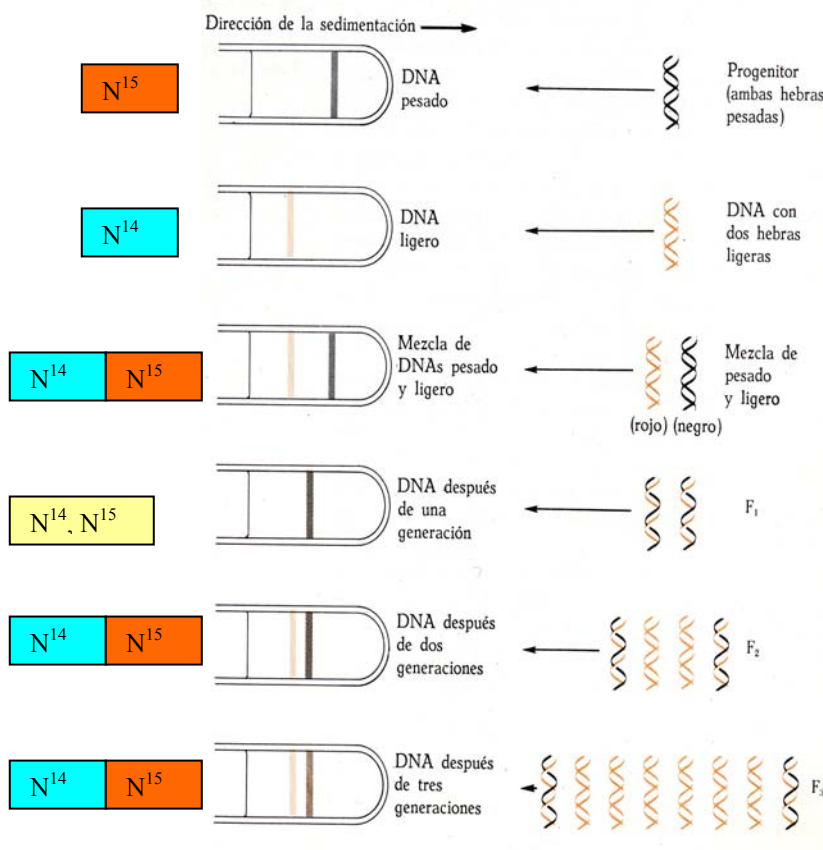
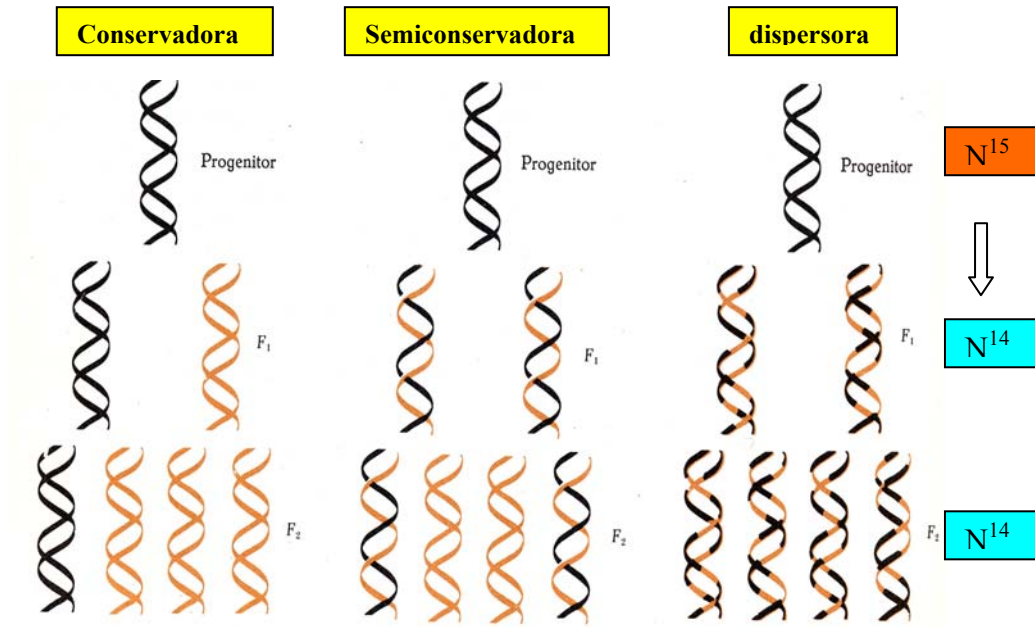


## Replicación del DNA

Meselson and Stahl in 1957 gave experimental evidence that each DNA strand served as a template for new synthesis, a process called semi-conservative replication

### Experiment

- E. coli grow in  $N^{15}$  nitrogen (heavy isotope).
- Switch to  $N^{14}$  nitrogen (light) and after one, two or three generations take samples of DNA.
- Mix with cesium chloride and separate heavy and light DNA.



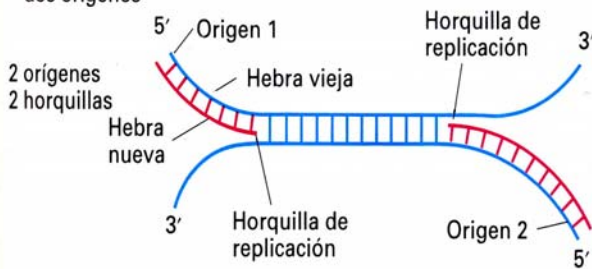
## Replicación del DNA

- Requiere un gran complejo de enzimas
  1. Las helicasas desenrollan la doble hélice
  2. Las proteínas SSB estabilizan las cadenas sencillas de DNA
  3. La DNA primasa sintetiza un primer de RNA
  4. Las DNA polimerasas sintetizan DNA nuevo y lo corrigen
  5. La DNA ligasa sella nucleótidos adyacentes
- La dirección de la síntesis es 5' - 3' y comienza con un primer de RNA
- Las dos cadenas antiparalelas son replicadas simultáneamente en ambas direcciones
- La cadena parental de extremo 3' en el molde determina la cadena hija guía de síntesis continua
- La cadena parental de extremo 5' en el molde determina la cadena hija retrasada de síntesis discontinua en forma de fragmentos (100 a 200 nucleótidos en eucariotas)
- Los fragmentos pequeños en la cadena retrasada se denominan fragmentos de Okazaki.
- Los primers de RNA son eliminados por la DNA polimerasa y los fragmentos son unidos por la DNA ligasa.

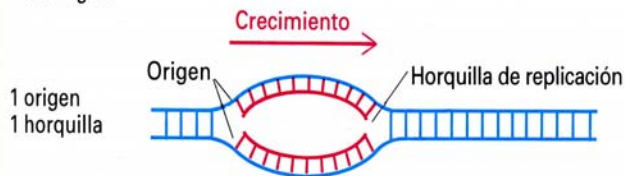
## LA REPLICACION ES BIDIRECCIONAL

Mecanismos de crecimiento de las cadenas durante la replicación compatibles con el modelo semiconservativo

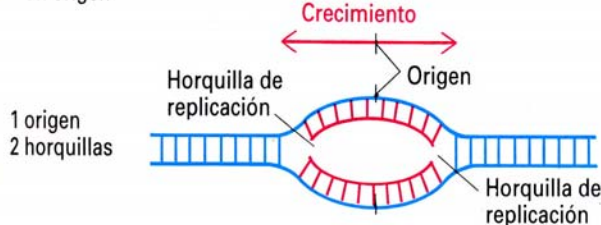
(a) Crecimiento unidireccional de cadenas sencillas a partir de dos orígenes



(b) Crecimiento unidireccional de ambas cadenas a partir de un origen

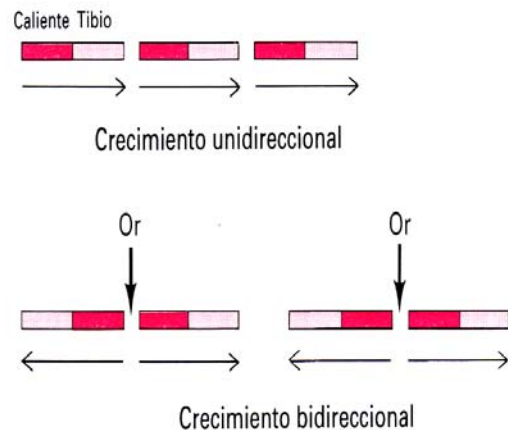


(c) Crecimiento bidireccional de ambas cadenas a partir de un origen

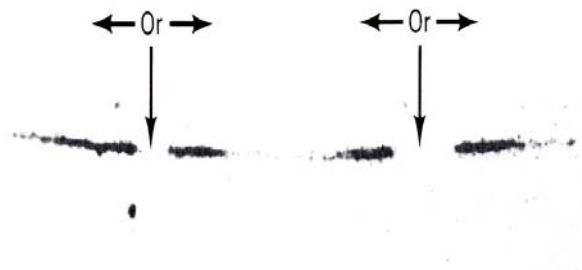


Demostración del crecimiento bidireccional de las cadenas de DNA celular

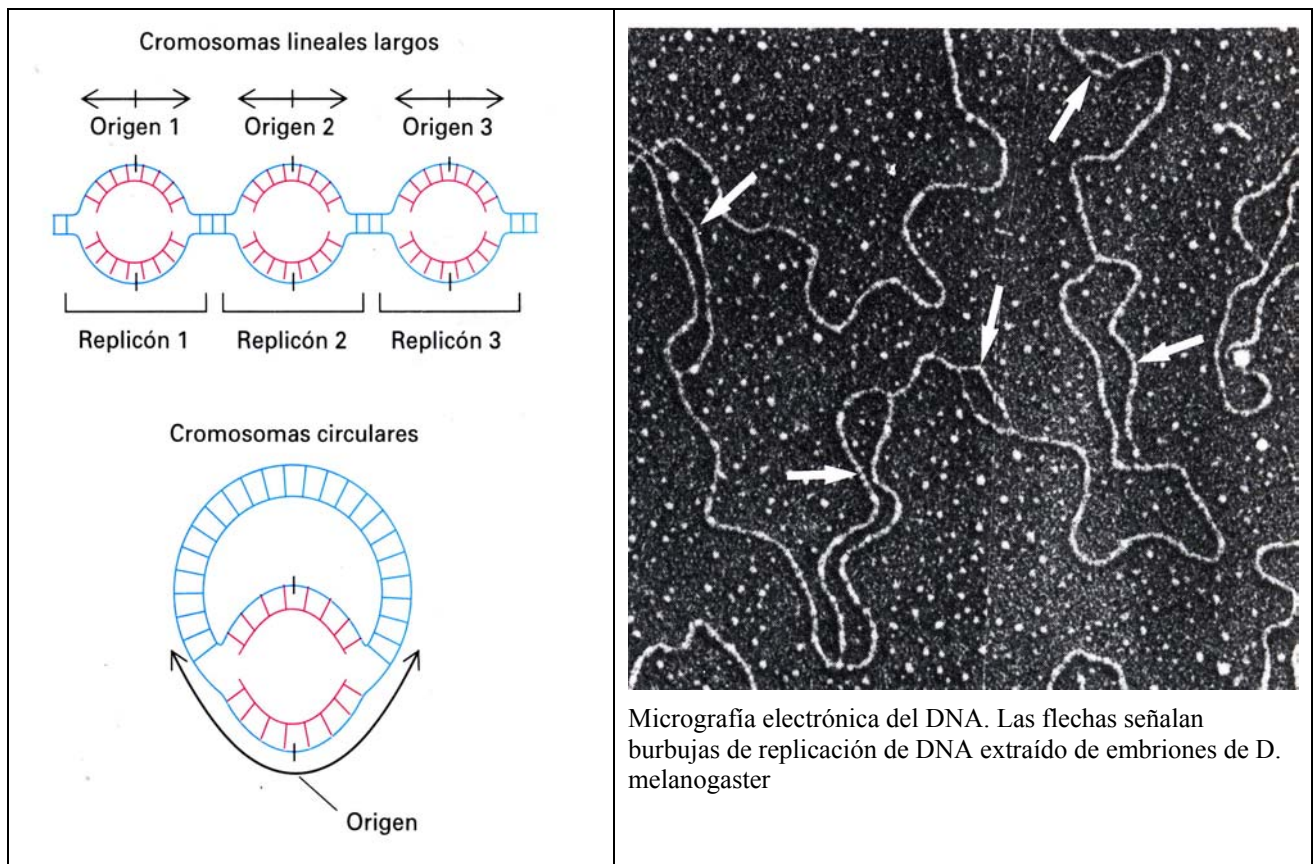
(a) Patrón autorradiográfico de fibras predicho



(b) Patrón autorradiográfico de fibras observado



La síntesis de DNA en cromosomas lineales largos comienza en varios orígenes y avanza en ambas direcciones, hasta que las horquillas de replicación de los replicones adyacentes se encuentran. En los cromosomas circulares con un solo origen, la síntesis de DNA avanza en ambas direcciones alrededor del círculo, hasta que se unen las horquillas de replicación.



Micrografía electrónica del DNA. Las flechas señalan burbujas de replicación de DNA extraído de embriones de *D. melanogaster*

## DNA Polymerases

It turns out that in *E. coli* there are three DNA polymerases. Their properties and functions are summarized in the following table, again adapted from Mathews and van Holde.

| Characteristic                 | Polymerase I                                  | Polymerase II      | Polymerase III                     |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| Structural gene                | <i>polA</i>                                   | <i>polB</i>        | <i>polC</i>                        |
| Molecular weight               | 103,000                                       | 90,000             | 130,000                            |
| Number of molecules/cell       | 400                                           | 100                | 10                                 |
| $V_{max}$ , nucleotides/second | 16–20                                         | 2–5                | 250–1000                           |
| 3' exonuclease                 | Yes                                           | Yes                | No <sup>a</sup>                    |
| 5' exonuclease                 | Yes                                           | No                 | No                                 |
| Processivity <sup>b</sup>      | 3–200                                         | 10,000             | 500,000                            |
| Mutant phenotype               | <sup>c</sup> UV <sup>s</sup> MMS <sup>s</sup> | None               | <i>dna<sup>t</sup>s</i>            |
| Biological function            | DNA repair,<br>RNA primer<br>excision         | SOS DNA<br>repair? | Replicative<br>chain<br>elongation |

<sup>a</sup>The 3' exonuclease is carried on a separate polypeptide chain, the DnaQ protein.

<sup>b</sup>The number of nucleotides incorporated per encounter between polymerase and DNA (see page 894).

<sup>c</sup>MMS (methylmethane sulfonate) is a DNA-alkylating agent.

# Estructura y actividades de la DNA polimerasa I

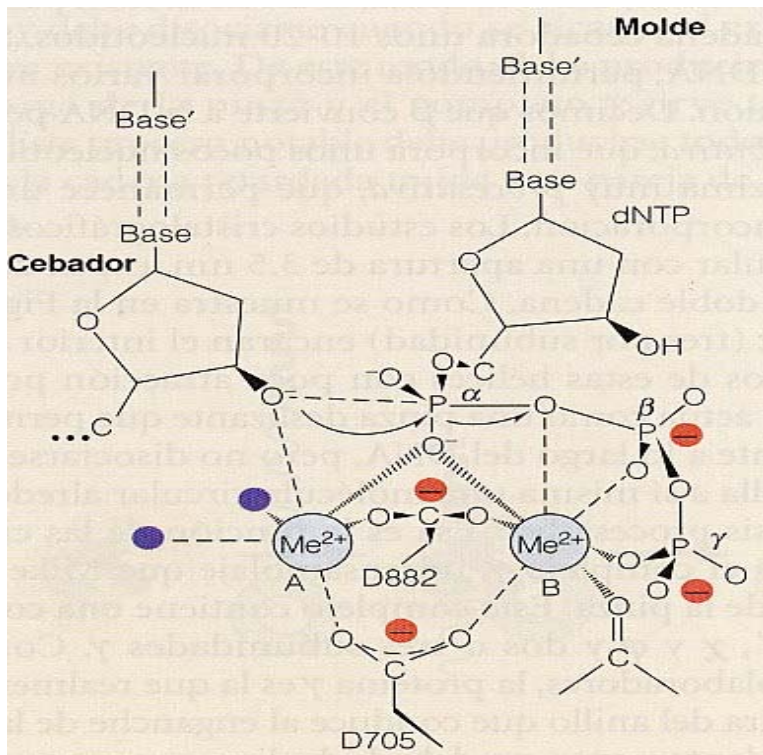
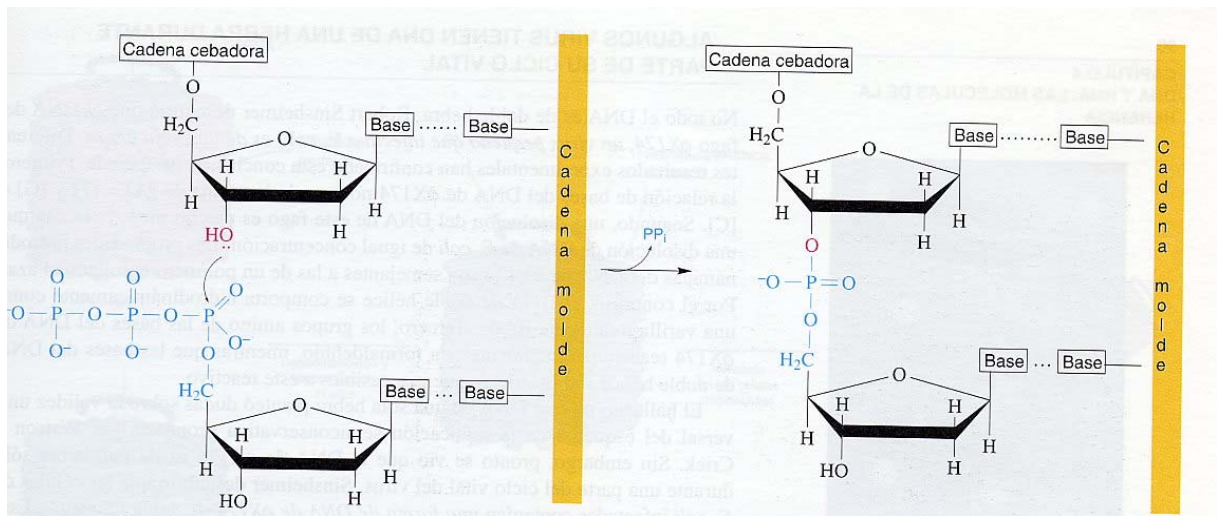
## 1) Actividad polimerasa 5' --- 3'.

La DNA polimerasa I es una única cadena polipeptídica de 103 kDa. Cataliza la adición, paso a paso, de las unidades desoxirribonucleotídicas a la cadena de DNA.



La DNA polimerasa I requiere los siguientes componentes para sintetizar una cadena de DNA.

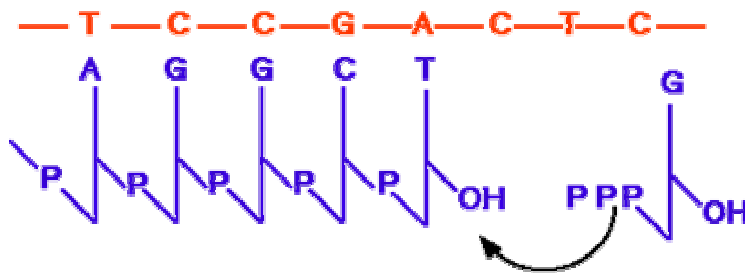
- 1) Mezcla de los 4 dNTP
- 2) Un cebador con un extremo con un grupo 3'-OH libre
- 3) Un molde de DNA
- 4) Un ión divalente preferentemente  $\text{Mg}^{2+}$



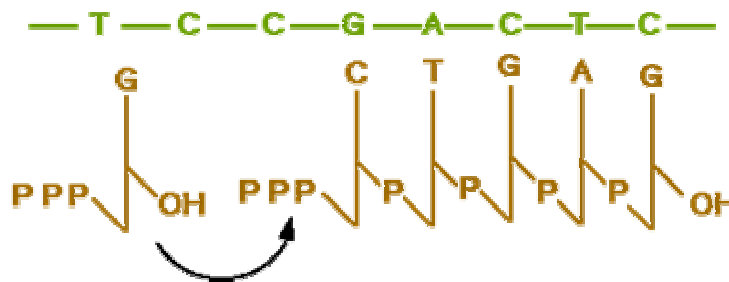
Mecanismo de los dos metales de la reacción de la DNA polimerasa, según sugiere la estructura del complejo del fago T7 DNA polimerasa-sustrato. D705 y D882 son residuos conservados de aspartato, y los puntos azules son moléculas de agua unidas al ión metálico A

La dirección de la síntesis es  $5' \rightarrow 3'$

### 5' to 3' synthesis

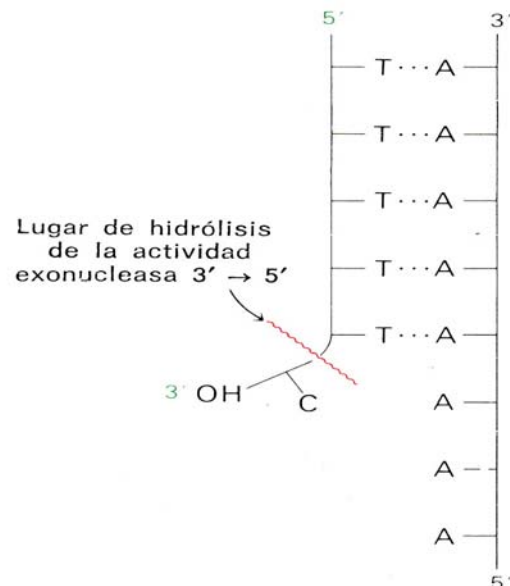


### 3' to 5' synthesis



## 2) Actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$

La  $3'$  exonucleasa separa los nucleótidos mal apareados del extremo  $3'$  de las cadenas en crecimiento, incrementando la fidelidad durante la replicación.



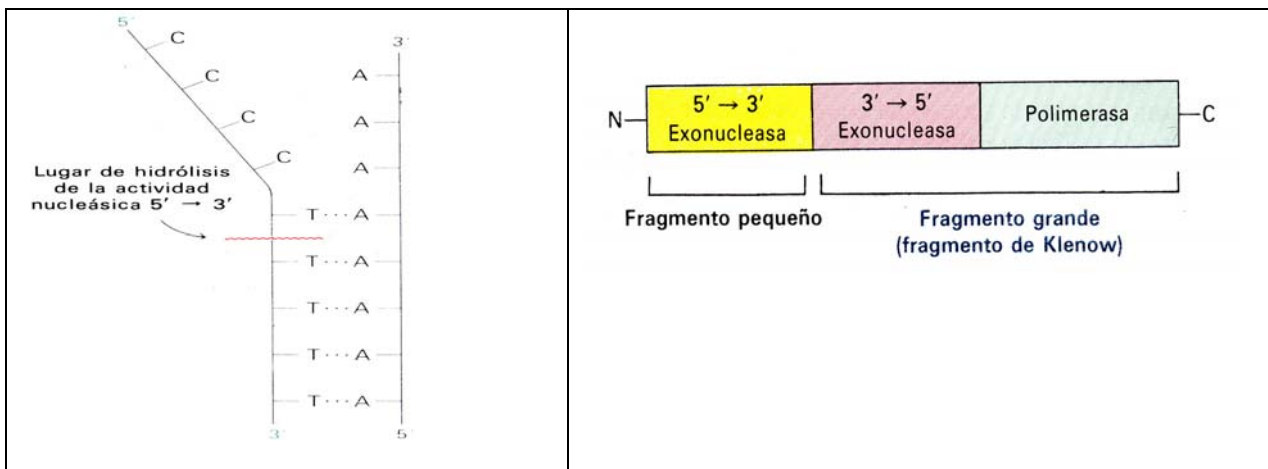
Actividad exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  de la DNA polimerasa I

**La DNA polimerasa I también es una exonucleasa 5' → 3' que corrige errores.**

La actividad 5' → 3' exonucleasa puede también hidrolizar DNA a partir del extremo 5' de la cadena (separa ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos del extremo 5'). Actúa en la reparación del DNA y la eliminación del RNA cebador en la replicación.

### Características:

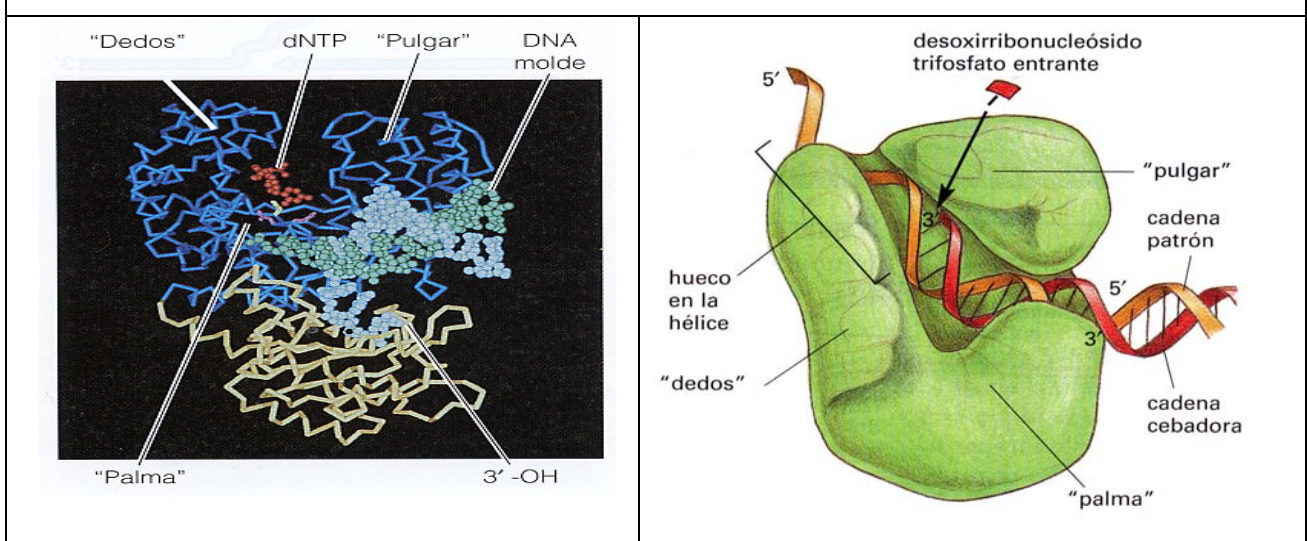
- El enlace hidrolizado debe estar situado dentro de una estructura helicoidal
- La escisión puede ocurrir en el enlace fosfodiéster terminal o a varios residuos de distancia del extremo 5'
- Esta actividad se incrementa cuando hay síntesis simultánea de DNA
- El centro activo de esta actividad está netamente separado de los otros dos
- Corrige errores de diferente tipo que la actividad 3' → 5' (dímeros de timina, ver figura)



### Estructura

La pol I puede digerirse mediante proteasa en un fragmento pequeño de 36 kd con la actividad exonucleasa 5' → 3' original y un fragmento grande de 67 Kd (fragmento Klenow) que conserva la actividad polimerasa y la actividad exonucleasa 3' → 5'.

Estructura de una molécula de DNA polimerasa de *E. coli*, determinada por cristalografía de rayos X



## El holoenzima DNA plimerasa III.

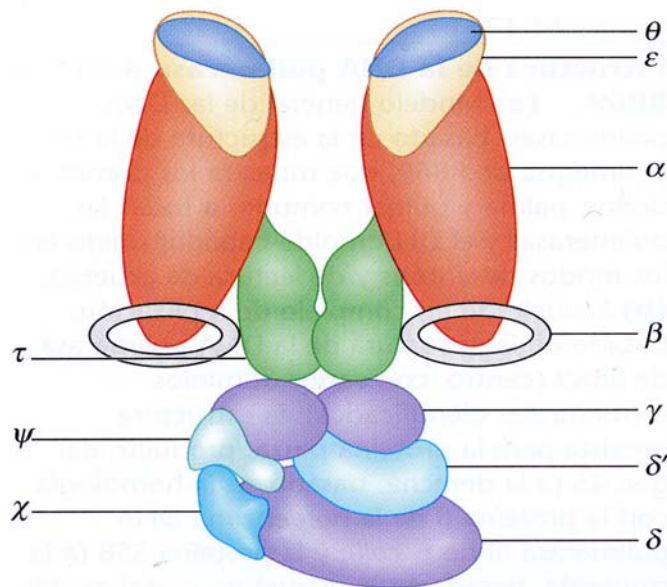
Este complejo multienzimático se caracteriza por una elevada progresividad, efectividad catalítica y fidelidad. El holoenzima está formado por 10 cadenas polipeptídicas diferentes.

tabla 25-2

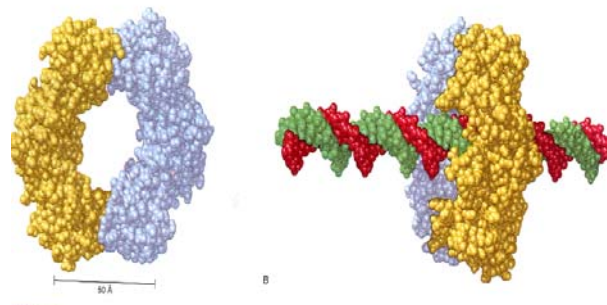
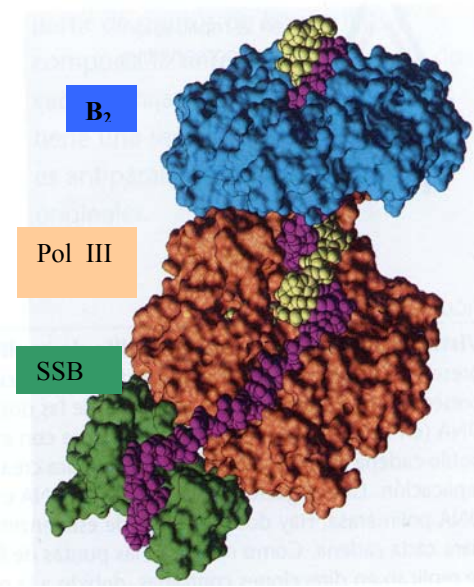
| Subunidad  | Número de subunidades por holoenzima | $M_r$ de la subunidad | Gen                         | Función de la subunidad                                                                                                 |
|------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$   | 2                                    | 132.000               | <i>polC</i> ( <i>dnaE</i> ) | Actividad polimerizante<br>Exonucleasa 3'→5' de corrección de pruebas                                                   |
| $\epsilon$ | 2                                    | 27.000                | <i>dnaQ</i> ( <i>mutD</i> ) |                                                                                                                         |
| $\theta$   | 2                                    | 10.000                | <i>holE</i>                 | Unión estable del molde;<br>dimerización del enzimas núcleo                                                             |
| $\tau$     | 2                                    | 71.000                | <i>dnaX</i>                 |                                                                                                                         |
| $\gamma$   | 2                                    | 52.000                | <i>dnaX</i> *               | Complejo de carga de la abrazadera que carga las subunidades $\beta$ en la hebra reza-gada en cada fragmento de Okazaki |
| $\delta$   | 1                                    | 35.000                | <i>holA</i>                 |                                                                                                                         |
| $\delta'$  | 1                                    | 33.000                | <i>holB</i>                 |                                                                                                                         |
| $\chi$     | 1                                    | 15.000                | <i>holC</i>                 |                                                                                                                         |
| $\psi$     | 1                                    | 12.000                | <i>holD</i>                 | Abrazadera del DNA necesaria para una procesividad óptima                                                               |
| $\beta$    | 4                                    | 37.000                | <i>dnaN</i>                 |                                                                                                                         |

\*La subunidad  $\gamma$  está codificada por una porción del gen de la subunidad  $\tau$ , de modo que el 80 % del amino-terminal de la subunidad  $\tau$  tiene la misma secuencia de aminoácidos que la subunidad  $\gamma$ . La subunidad  $\gamma$  es generada por un mecanismo de corrimiento del marco de lectura de la traducción (véase Recuadro 28-1) que provoca la terminación prematura de la traducción.

Estructura de subunidades del holoenzima DNA polimerasa III de E.coli



Complejo de replicación del DNA



Dímero  $\beta_2$

| <i>SIGNO</i>          | <i>NOMBRE</i> | <i>PRONUNCIACIÓN</i> |
|-----------------------|---------------|----------------------|
| A , $\alpha$          | alfa          | a                    |
| B , $\beta$           | beta          | b                    |
| $\Gamma$ , $\gamma$   | gamma         | g (como gato)        |
| $\Delta$ , $\delta$   | delta         | d                    |
| E , $\epsilon$        | épsilon       | e (breve)            |
| Z , $\zeta$           | dseta         | ds                   |
| H , $\eta$            | eta           | e (larga)            |
| $\Theta$ , $\theta$   | zeta          | z                    |
| I , $\iota$           | iota          | i                    |
| K , $\kappa$          | kappa         | k                    |
| $\Lambda$ , $\lambda$ | lambda        | l                    |
| M , $\mu$             | mi            | m                    |
| N , $\nu$             | ni            | n                    |
| $\Xi$ , $\xi$         | xi            | ks                   |
| O , $\omicron$        | ómicron       | o (breve)            |
| $\Pi$ , $\pi$         | pi            | p                    |
| P , $\rho$            | ro            | r                    |
| $\Sigma$ , $\sigma$   | sigma         | s                    |
| T , $\tau$            | tau           | t                    |
| Y , $\upsilon$        | ípsilon       | ü                    |
| $\Phi$ , $\phi$       | fi            | f                    |
| X , $\chi$            | ji            | j                    |
| $\Psi$ , $\psi$       | psi           | ps                   |
| $\Omega$ , $\omega$   | omega         | o (larga)            |

## DNA polimerasas eucariotas

Las células eucariotas contienen cinco DNA polimerasas. Y se clasifican de acuerdo a:

- 1) localización celular
- 2) propiedades cinéticas
- 3) respuesta a los inhibidores ( afidicolina, producto fúngico de estructura similar a los esteroides inhibe la síntesis específica del DNA eucariótico.

Las polimerasas alfa, delta y epsilon participan en la replicación del DNA cromosómico, la beta en la reparación del DNA, y la gamma en la replicación mitocondrial.

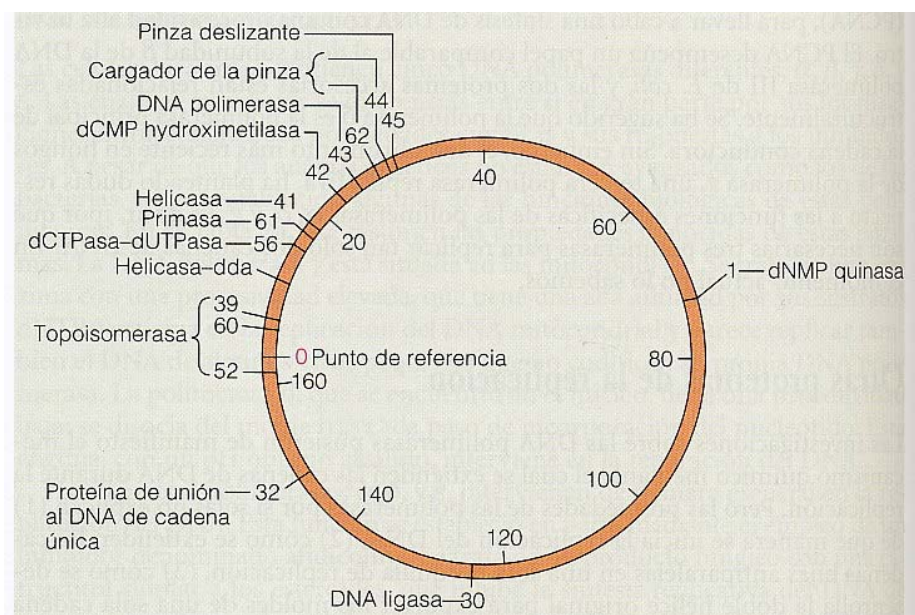
TABLA 24.3 Propiedades de las DNA polimerasas de los eucariotas

|                                              | $\alpha$                        | $\beta$            | $\gamma$                         | $\delta$                            | $\epsilon$         |
|----------------------------------------------|---------------------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| Compartimiento celular                       | Núcleo                          | Núcleo             | Mitocondria                      | Núcleo                              | Núcleo             |
| Primasa asociada                             | Sí                              | No                 | No                               | No                                  | No                 |
| Función biológica                            | Replicación de cadena retardada | Reparación del DNA | Replicación del DNA mitocondrial | Replicación de la cadena conductora | Replicación        |
| Número de subunidades                        | 4                               | 1                  | 4 (idénticas)                    | 2                                   | ?                  |
| $M_r$ de la subunidad catalítica, kilodalton | 160-185                         | 40                 | 125                              | 125                                 | 210-230 or 125-140 |
| $K_M$ para los dNTPs, $\mu M$                | 2-5                             | $10^a$             | 0.5                              | 2-4                                 | ?                  |
| Procesividad (intrínseca)                    | Moderada                        | Baja               | Alta                             | Baja                                | Alta               |
| Procesividad (con PCNA)                      | Moderada                        | Baja               | Alta                             | Alta                                | Alta               |
| 3' exonucleasa                               | No <sup>b</sup>                 | No                 | Sí                               | Sí                                  | Sí                 |
| Sensibilidad a 2',3'-didesoxi-NTPs           | Baja                            | Alta               | Alta                             | Baja                                | Moderada           |
| Sensibilidad a arabinosil-CTP                | Alta                            | Baja               | Baja                             | Alta                                | ?                  |
| Sensibilidad a afidicolina                   | Alta                            | Baja               | Baja                             | Alta                                | Alta               |

<sup>a</sup> Los valores de  $K_M$  para la síntesis de reparación en células permeabilizadas son muy inferiores.

<sup>b</sup> Una actividad 3' exonucleasa críptica o enmascarada se asocia con la polimerasa  $\alpha$  de *Drosophila*.

## Mapa parcial del genoma del virus T4



**Primasa** : Cataliza la formación de iniciadores de RNA para la síntesis de DNA

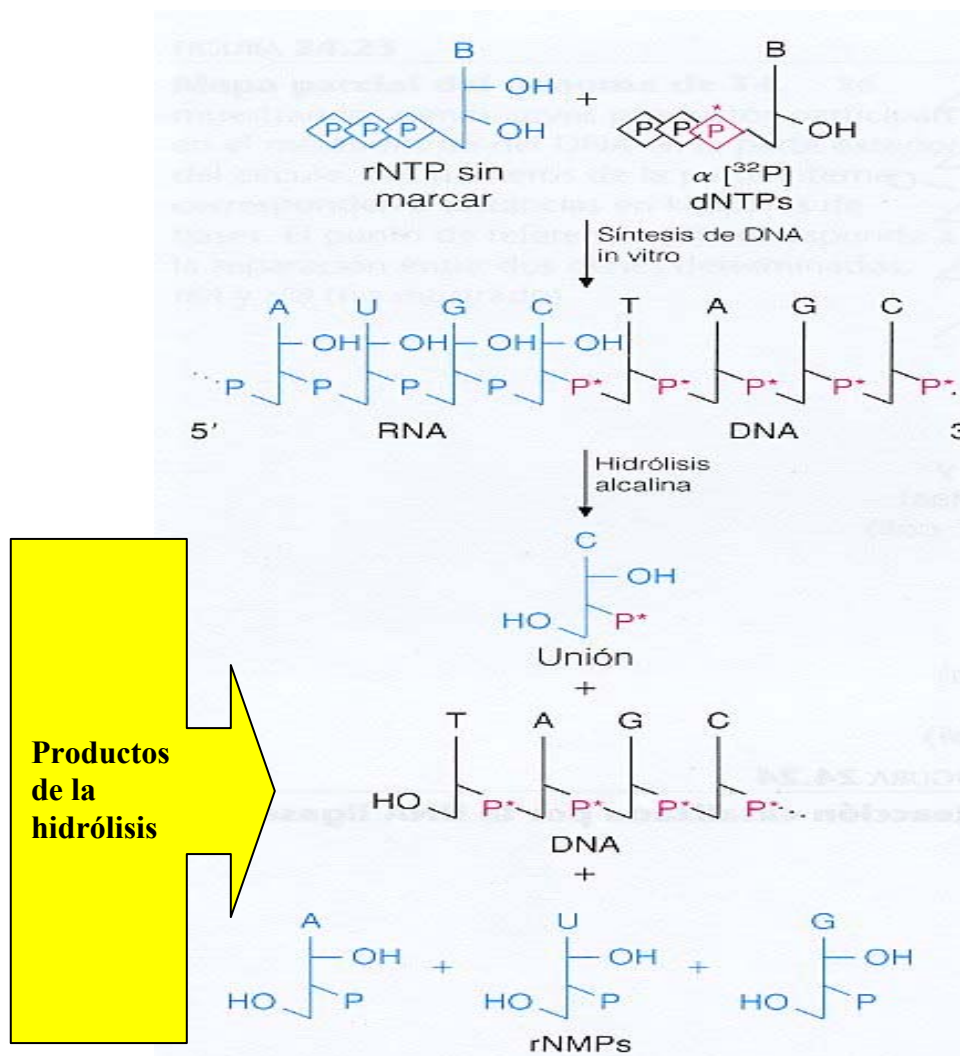
Los iniciadores utilizados durante la replicación del DNA tanto en procariontes como en eucariontes son cortas moléculas de RNA, cuya síntesis es catalizada por una RNA polimerasa llamada primasa; que es el producto del gen *dnaG*, esta enzima suele asociarse con el producto del gen ***dnaB*** formando lo que se conoce como **primosoma**.

Cebadores de RNA (productos de la primasa)

| DNA replicativo         | Oligonucleótido de RNA *                       |
|-------------------------|------------------------------------------------|
| Bacteriófago T4         | pppAC (N) <sub>3</sub>                         |
| Bacteriófago T7         | pppACCA<br>pppACCC                             |
| Levadura                | pppA (N) <sub>8-12</sub>                       |
| <i>Drosophila</i>       | pppA (N) <sub>7-9</sub>                        |
| Células linfoblastoides | pppA (N) <sub>8</sub><br>pppG (N) <sub>8</sub> |

N = cualquier ribonucleótido. Las longitudes indicadas de los cebadores de las células eucarióticas son valores promedio. Los cebadores de RNA de levadura y de *D. melanogaster* son ricos en adenina, que llega a ser de hasta el 75 %.

**Experimento de transferencia que demostró la existencia de RNA cebadores en la replicación del DNA.** Cada fragmento de okazaki genera un ribonucleótido marcado radioactivamente como consecuencia de su unión RNA-DNA tras hidrólisis alcalina.

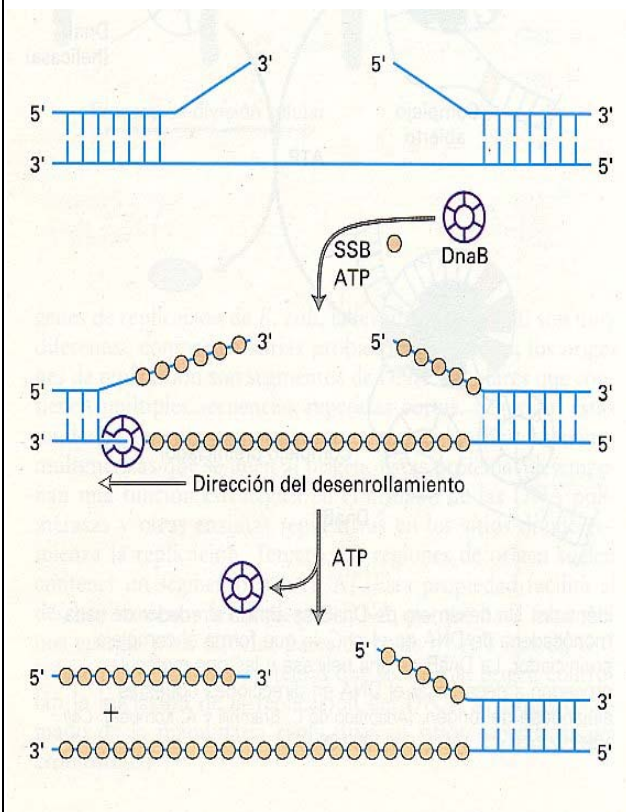


## DNA helicasa

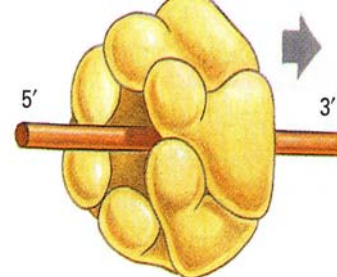
La separación de las dos cadenas del cromosoma de *E. coli* es mediada por el producto del “locus” *dnaB* (la forma funcional es un hexámero), una helicasa esencial para la replicación del DNA. Las helicasas son una clase de enzimas capaces de desplazarse a lo largo de un DNA duplex utilizando la energía de hidrólisis del ATP para separar las cadenas. Como muchas proteínas que se unen al DNA, las helicasas exhiben una direccionalidad con respecto a la reacción de desenrollamiento. La *dnaB* se mueve a lo largo de una monocadena de DNA a la que está unida en dirección hacia su extremo 3' libre. Su actuación es procesiva.

### Actividad helicasa de la proteína DnaB de

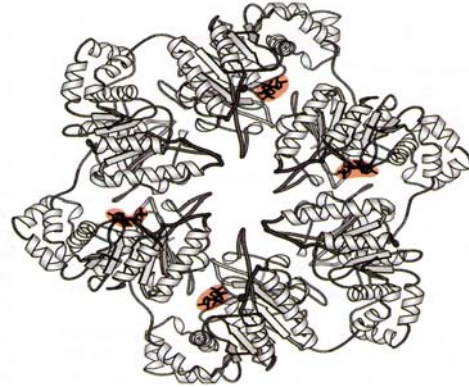
**E.coli.** En presencia de ATP y de proteínas SSB, la DnaB purificada puede desenrollar in vitro un duplex de DNA cortado. El desenrollamiento se lleva a cabo predominantemente en dirección hacia el extremo 3' de la cadena. Esta hebra actúa como molde para la síntesis de la cadena retrasada del DNA. La proteína SSB se une a las hebras de DNA no apareadas impidiendo que éstas se reasocien. En el esquema no se representa la otra molécula de DnaB desplazándose hacia la derecha.



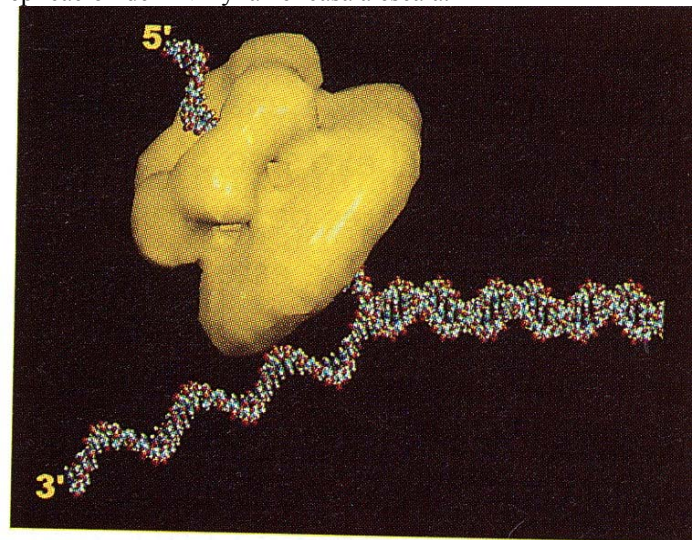
### Representación esquemática como un anillo hexámero



Estructura detallada de la helicasa replicativa del bacteriófago T7 determinada por difracción de rayos x. En rojo las moléculas de ATP unidas a la estructura de seis subunidades idénticas

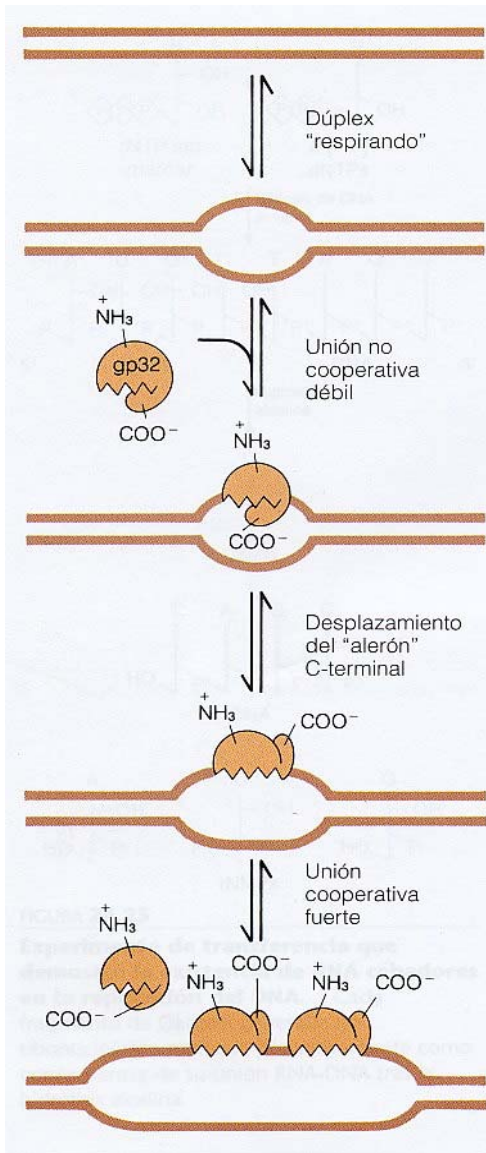


Representación esquemática mostrando la horquilla de replicación de DNA y la helicasa a escala.



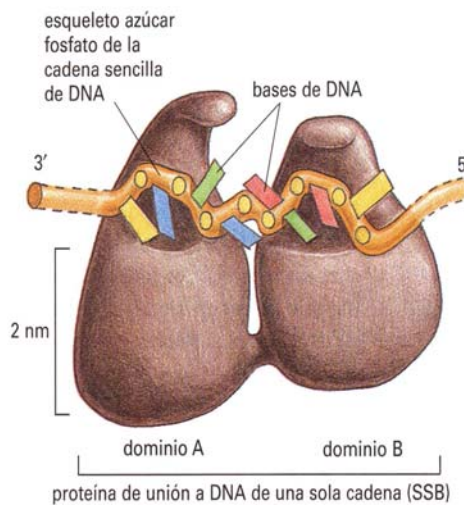
## Proteínas de unión al DNA de cadena sencilla (SSB).

Las proteínas de unión al DNA de cadena sencilla son esenciales en la replicación, reparación y recombinación del DNA, debido a su capacidad para mantener el molde en la conformación óptima para la desnaturalización y renaturalización del DNA ( Ej. gp 32 del virus T 4)

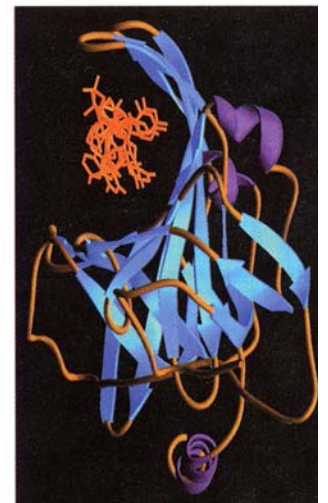


**Facilitación de la desnaturalización y la renaturalización del DNA por la gp32.** Cuando tan sólo se expone una longitud corta de DNA de una cadena, la gp32 se une débilmente. La configuración plegada del dominio C-terminal impide la unión cooperativa de otras moléculas de gp32 y, por tanto, el desenrollamiento de la cadena ("respiración"). Si se expone una región más larga del DNA de una cadena tras la unión de la primera molécula de gp32, el dominio C-terminal puede pasar a su configuración "alta", agrandando el lugar de unión del DNA, lo que permite la unión cooperativa de otras moléculas de gp32 y, por tanto, ampliando más la región desnaturalizada.

**Estructura de la proteína de unión al DNA de cadena sencilla en humanos.** (A) vista frontal de los dos dominios de unión al DNA de la proteína RPA, que cubre un total de ocho nucleótidos. Las bases del DNA permanecen expuestas en este complejo de proteína-DNA. (B) Diagrama que muestra la estructura tridimensional, con la cadena de DNA (rojo) vista desde su parte final.



(A)



(B)

La proteína procedente de *E. coli* se une también cooperativamente al DNA de cadena sencilla, pero por un mecanismo diferente al de T4. En *E. coli* el DNA se enrolla alrededor de la proteína SSB tetramérica. Además, en ciertas condiciones la unión presenta una cooperatividad negativa. La proteína se une de maneras diferentes según participe en la replicación, la reparación o la recombinación.

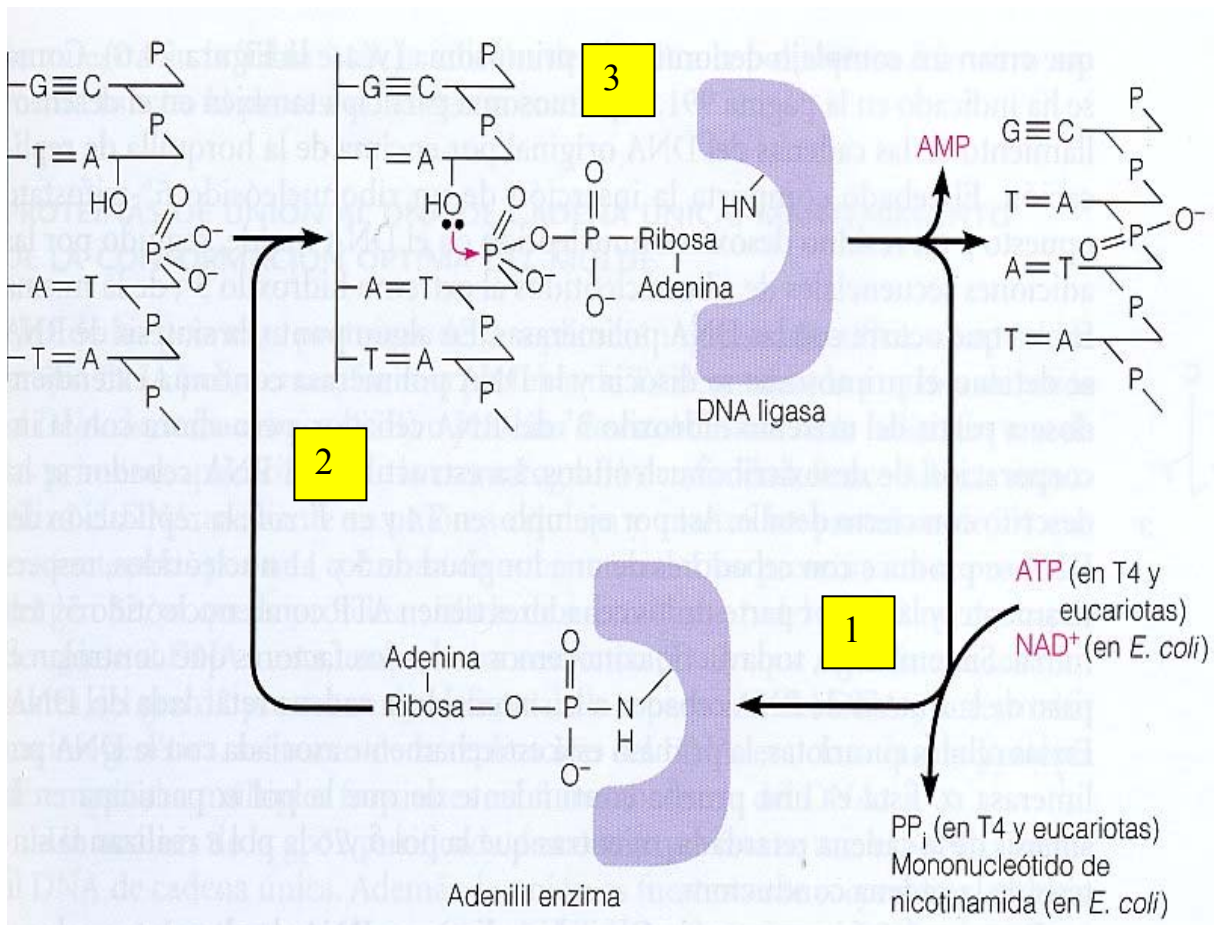
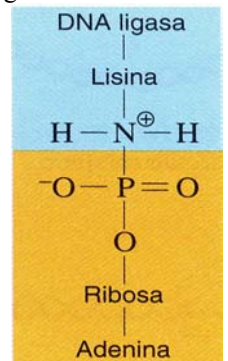
## DNA ligasa

Este enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo 3'-OH del extremo de una cadena de DNA con el extremo 5' fosfato del extremo de la otra. Para realizar esta reacción endergónica se necesita una fuente de energía. En procariotas el  $\text{NAD}^+$  ejerce esta función, mientras que en eucariotas y virus esta función la realiza el ATP. Este proceso de ligado es esencial para la existencia de DNAs circulares, y procesos fundamentales como la replicación, reparación y recombinación del DNA.

### Mecanismo de reacción catalizada por la ligasa

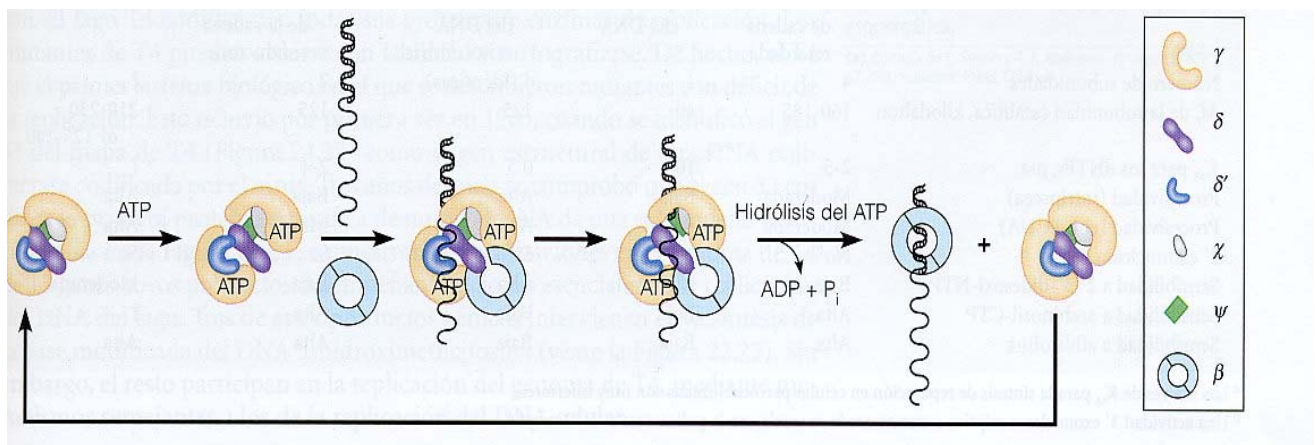
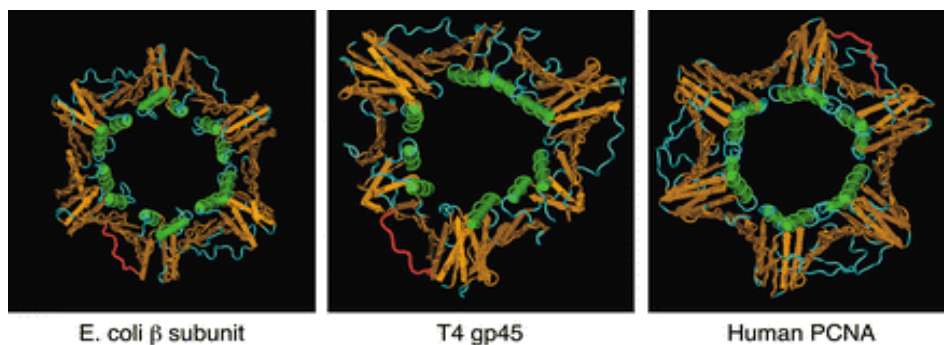


Intermediario covalente  
ligasa-AMP



## Pinzas y cargadores de pinza: procesividad

La replicación del DNA es un proceso muy eficaz. *E. coli* replica la totalidad de su cromosoma en 40 minutos, con sólo dos horquillas de replicación, cada una de las cuales implica la acción de dos moléculas de DNA polimerasa III. Resulta ventajoso para la célula completar cada ciclo de replicación, una vez iniciado. Para que se complete, la DNA polimerasa debe permanecer unida a su molde, es decir, debe actuar con procesividad. La pinza beta es la proteína accesoria de la polimerasa directamente responsable de potenciar la procesividad y el complejo gamma como el cargador de la pinza en *E. coli*. En el fago T4, el producto del **gen 45 (gp 45)**, es la pinza deslizante para la replicación procesiva del DNA, y el cargador de la pinza comprende dos proteínas, la **gp 44 (hidrólisis del ATP)** y la **gp 62**. En eucariotas, una proteína con varias subunidades, denominada **factor C de replicación o RF-C**, es el cargador de la pinza; y la **PCNA**, o **antígeno nuclear de proliferación celular**, es la pinza deslizante.



In the cell, 2  $\gamma$ 's are replaced by  $\tau$ 's.

Cell 106:417-428, 2001  
and preceding paper

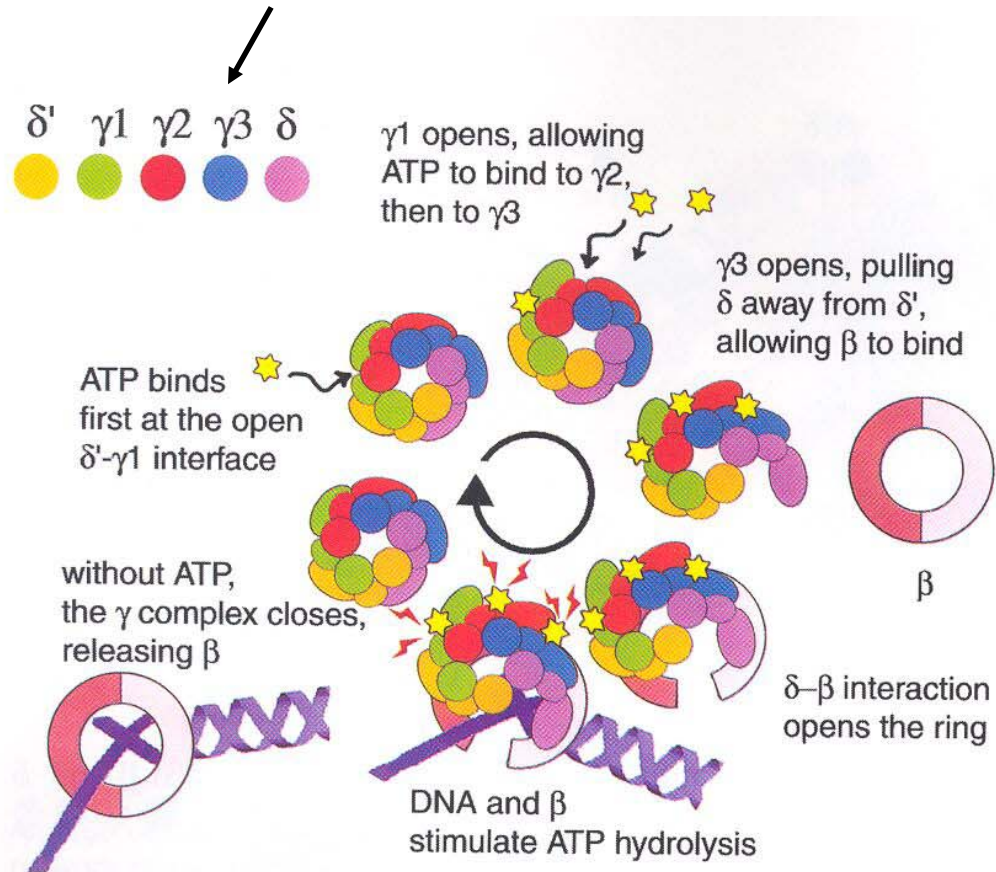


Figure 6. Schematic diagram of the clamp loading cycle

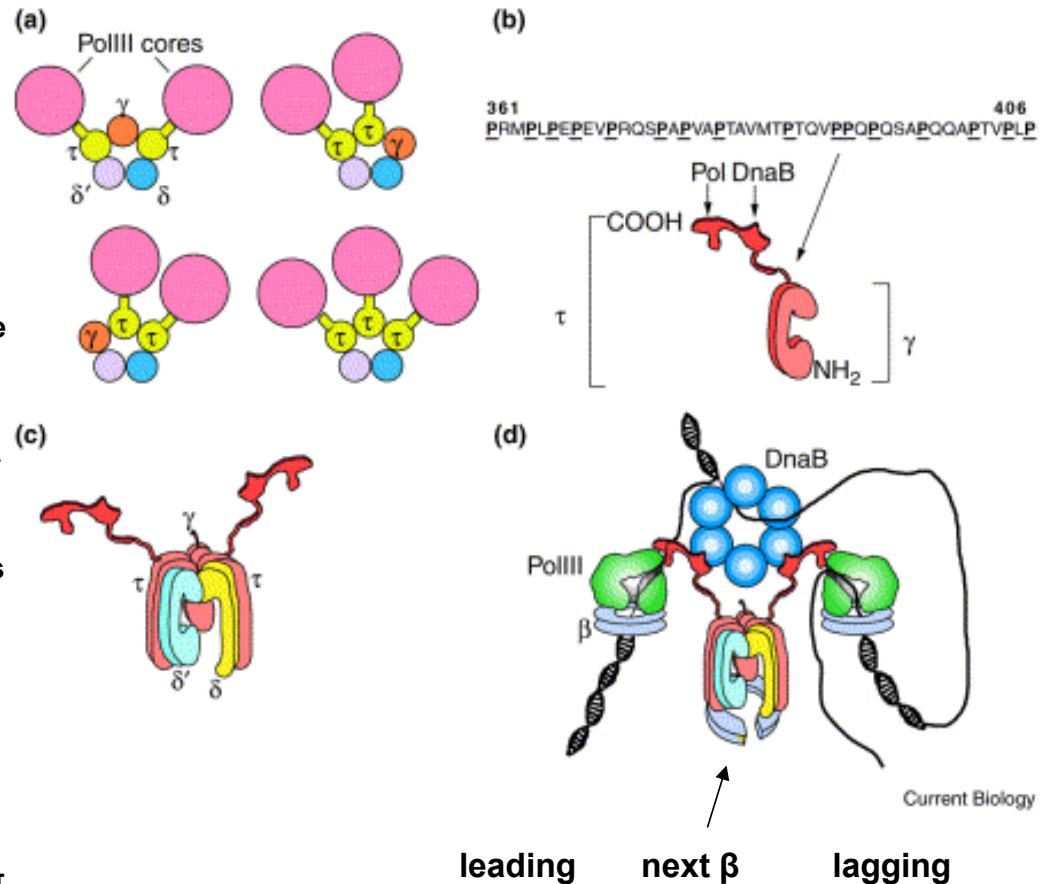
A cartoon of the reaction cycle performed by the clamp loader, based on a combination of biochemical data (see, for example, Turner et al., 1999) and structural information presented in this paper and the accompanying one.

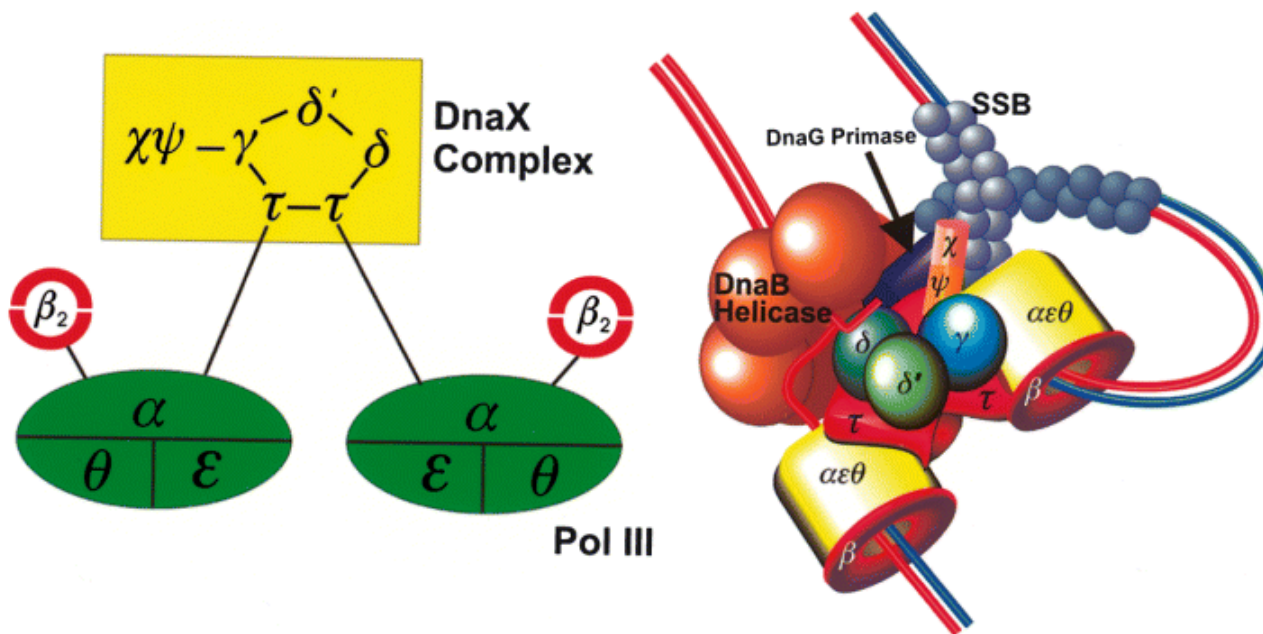
# Clamp loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC

Mike O'Donnell, David Jeruzalmi and John Kuriyana

Current Biology 11:1729-1814 (2001)

**Fig. 6. The  $\gamma$  complex organizes the replisome. The  $\gamma$  complex in the DNA polymerase III (Pol III) holoenzyme contains at least two  $\tau$  subunits in place of two  $\gamma$  subunits. The carboxyl terminal sequences of  $\tau$  contain a domain for binding Pol III core and therefore each  $\tau$  is shown with one core. The illustration shows three different  $\gamma$  complexes, each of which contain two  $\tau$  subunits; the structures only differ with respect to which  $\gamma$  subunits are replaced by  $\tau$ . Also shown is a holoenzyme form containing three  $\tau$  subunits (and cores) in place of the  $\gamma$  trimer. (b) The motor domains of  $\tau$  are separated from the Pol III and DnaB binding domains of  $\tau$  by a sequence which may be flexible. (c) The carboxyl termini of  $\gamma$  subunits in  $\gamma_3\delta\delta'$  protrude from the top, implying the approximate location of the protein binding domains in the  $\gamma_1\tau_2\delta\delta'$  complex. (d) Architecture of the *E. coli* replisome in which the DnaB hexamer attaches to carboxy-terminal sequences in  $\tau$  adjacent to the polymerases. Both cores are shown with their  $\beta$  clamps, and  $\gamma/\tau$  complex has hold of a  $\beta$  clamp for the repeated clamp loading events that occur on the lagging strand [63].**





McHenry, Charles S. Chromosomal replicases as asymmetric dimers: studies of subunit arrangement and functional consequences.

Molecular Microbiology 49 (5), 1157-1165.

Fig. 1. Structural models of Pol III holoenzyme.

Left. Diagram showing Pol III holoenzyme subunit stoichiometry and major protein-protein contacts. The subunits in the yellow rectangle are the components of the DnaX complex, including the ATPase subunits encoded by the *dnaX* gene: tau and gamma. The green ovals represent Pol III. The red ring represents the beta 2 sliding clamp processivity factor. It is shown bound to the alpha subunit, as when assembled on DNA. beta 2 is bound to delta during the 'loading' reaction prior to placement on DNA (Jeruzalmi et al., 2001b).

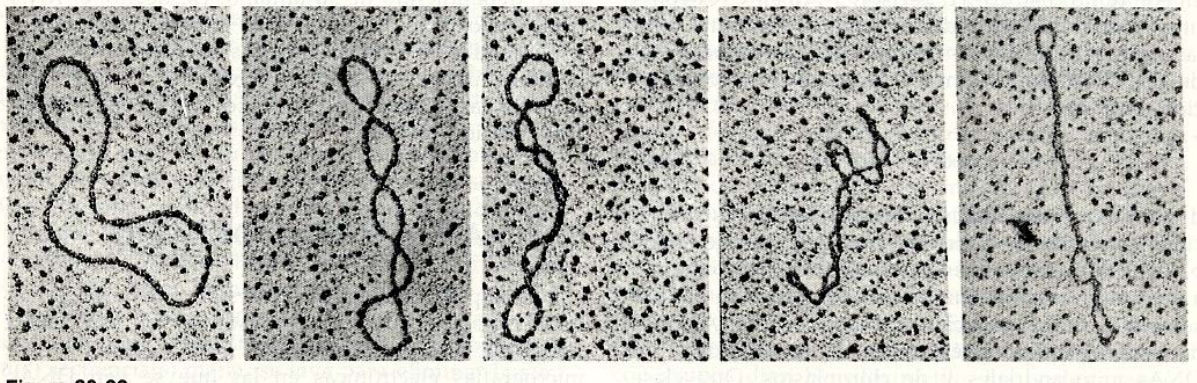
Right. A model for holoenzyme subunit arrangements at the replication fork showing the tau-DnaB interaction, placement of chi-psi on the lagging strand side of the replication fork, and the chi-SSB interaction on the lagging strand. Parental DNA is in red; newly synthesized DNA is blue.

## TOPOISOMERASAS. Superenrollamiento

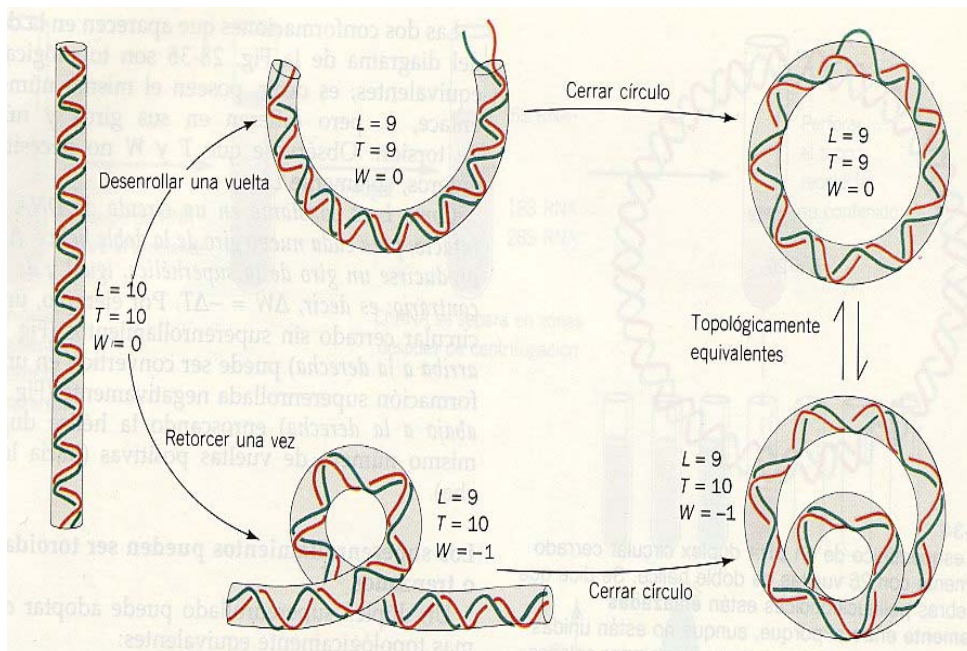
- a) Empaquetamiento
- b) Distribución de la tensión entre la torsión y el retorcimiento

### Vueltas de superhélice

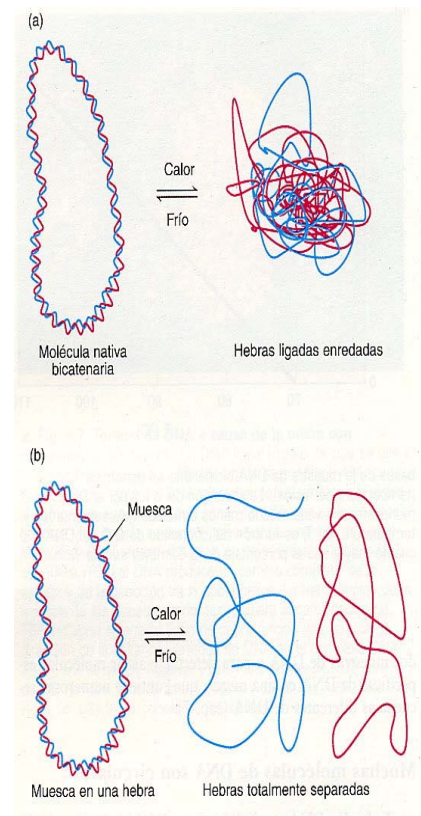
- a) A la derecha ----- superenrollamiento positivo
- b) A la izquierda --- superenrollamiento negativo



Topoisómeros y formas interconvertibles



Dos maneras de introducir un superenrollamiento en un DNA con 10 vueltas dúplex. Las dos formas circulares cerradas que se muestran (derecha) son equivalentes topológicamente; es decir, se puede pasar de una a otra sin romper ningún enlace covalente. Para cada forma, se indican el número de enlace  $L$ , el giro  $T$  y el número de torsión  $W$ . En rigor, el número de enlace sólo se define para un círculo cerrado covalentemente.

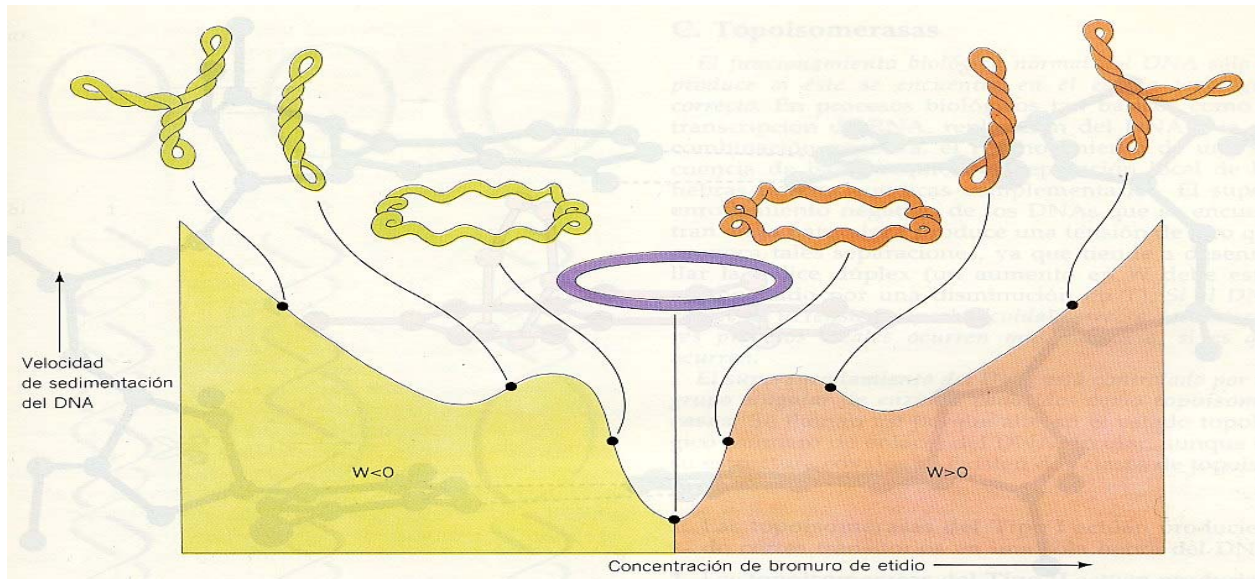


## Medidas del superenrollamiento

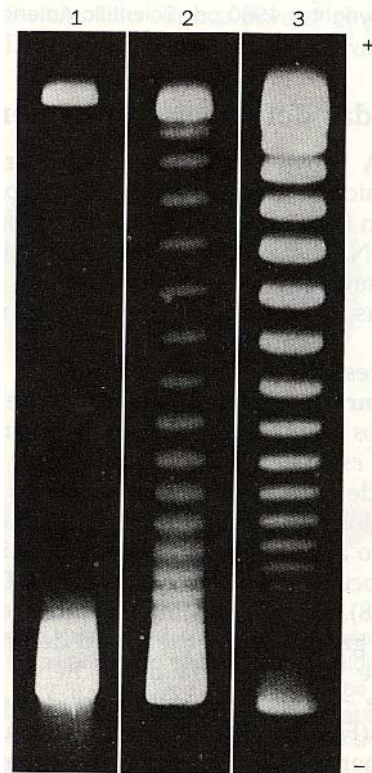
Todos los DNAs circulares que se encuentran en la naturaleza están enrollados negativamente, es decir, sus número de enlace son menores que los de los círculos relajados correspondientes.

Los agentes intercalantes como el etidio alteran el grado de superhelicidad de un DNA circular porque hacen que la doble hélice de DNA se desenrolle aprox.  $26^\circ$  en el punto donde se intercala la molécula.

**Por tanto, cuando se valora un DNA circular con etidio, se desenrolla el duplex (disminuye T) lo que debe venir acompañado de un aumento en W para compensar.**



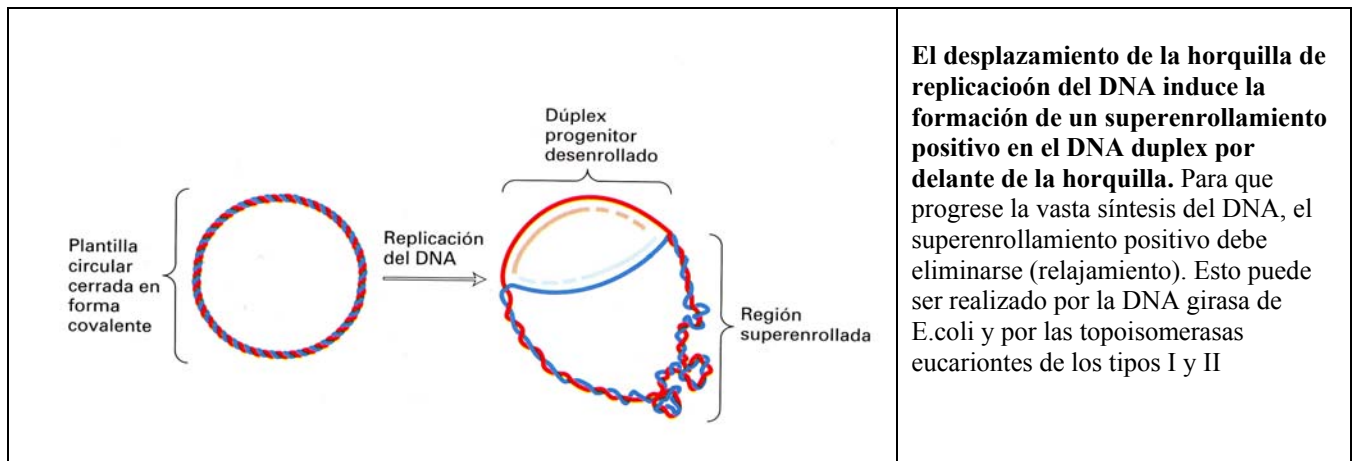
## Los DNAs se separan según su número de enlace mediante electroforesis en gel



**Patrón de la electroforesis en gel de agarosa del DNA de SV40.** El carril 1 contiene el DNA nativo superenrollado negativamente (banda inferior). En los carriles 2 y 3, el DNA se trató durante 5 y 30 min, respectivamente, con un enzima, conocido como topoisomerasa Tipo I, que relaja los superenrollamientos de uno en uno. Las bandas adyacentes contienen DNAs que difieren en  $\Delta L = \pm 1$

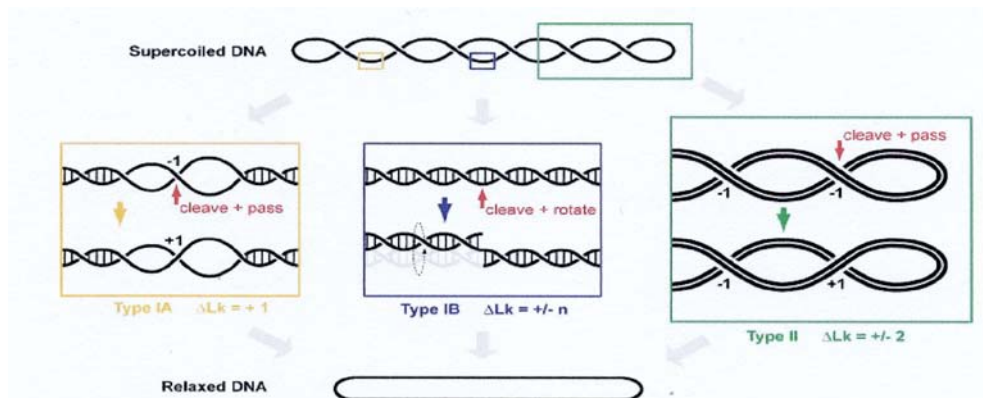
La comparación de los patrones de bandas electroforéticas del DNA de SV 40 que ha sido relajado enzimáticamente en diversos grados, revela que 26 bandas separan el DNA de SV 40 nativo del completamente relajado. Por tanto, el DNA de SV 40 posee  $W = -26$ . Como el DNA del SV 40 está constituido por 5243 bp, tiene un giro superhelicoidal por cada 19- 20 vueltas de hélice. Esta densidad de superhélice es típica de los DNAs circulares procedentes de distintos materiales biológicos.

**En el proceso de replicación, se producen superenrollamientos positivos.**



**El funcionamiento biológico normal del DNA sólo se produce si éste se encuentra en el estado topológico correcto. El superenrollamiento del DNA está controlado por un grupo de enzimas conocidos como topoisomerasas. Se denominan así porque alteran el estado topológico ,número de enlace, del DNA circular. Existen dos clases de topoisomerasas: topoisomerasas tipo I y topoisomerasas tipo II.**

| <b>Topoisomerasas tipo I</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Topoisomerasas tipo II</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>-proteínas monoméricas de 100 a 120 kD</li> <li>-relajan el DNA de forma gradual</li> <li>-relajan los superenrollamientos negativos, aumentan <math>L = + 1</math></li> <li>-corta una cadena sin aporte de energía (transesterificación)</li> <li>-concatena reversiblemente círculos de una sola hebra</li> <li>-se unen al extremo 5' de la hebra cortada mediante un residuo de tirosina (procariotas). En eucariotas se unen al extremo 3'</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-heterotetrámeros de 400 kD. ( <math>A_2 B_2</math> ) ó Homodímeros (A-B)<sub>2</sub></li> <li>-introducen superenrollamientos negativos, disminuyen <math>L = - 2</math> hidrolizando ATP</li> <li>-cortan las 2 cadenas de un duplex</li> <li>-concatenan círculos de doble cadena</li> <li>-forman las fosfotirosinas con los extremos 5' de ambas cadenas cortadas</li> <li>-las eucariotas, sólo relajan superenrollamientos negativos, ni los generan ni hidrolizan ATP.</li> <li>-las DNA girasas procariotas son inhibidas por: <ul style="list-style-type: none"> <li>*novobiocina bloquea las subunidades B impidiendo la fijación de ATP</li> <li>* ac. oxolínico bloquea las subunidades A</li> </ul> </li> </ul> |

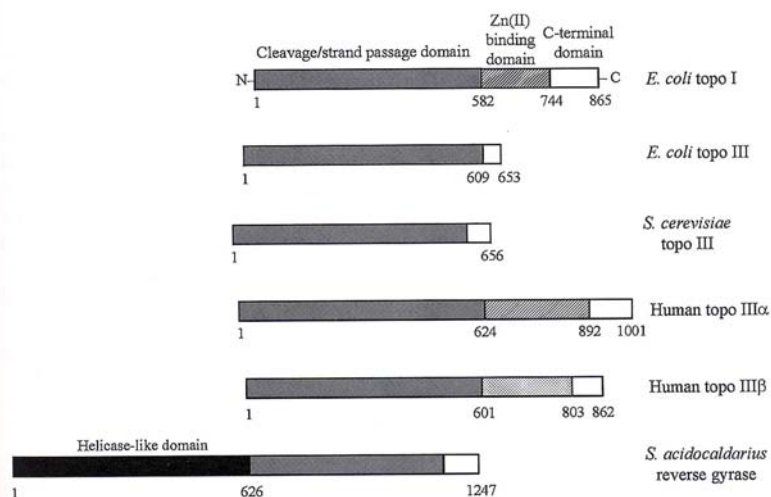


**Figure 1** Activities of topoisomerases. The superhelicity of DNA can be altered by topoisomerases through three different mechanisms. Type IA topos (yellow box, left) pass one strand of a melted duplex DNA through the second strand, increasing DNA's linking number (Lk) in steps of +1. Type IB topos (blue box, center) cleave one strand of a duplex and allow rotation of the duplex around the remaining strand, changing the linking number by either a positive or negative integral number of turns. Type II topos (green box, right) pass one duplex DNA through another duplex, changing the linking number in steps of +/- 2.

**TABLE 1** Topoisomerase classifications and characteristics

|                               | Topoisomerase family                        |                            |                              |               |
|-------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------|
|                               | IA                                          | IB                         | IIA                          | IIB           |
| <b>Catalytic domains</b>      |                                             |                            |                              |               |
| DNA cleavage                  | toprim/CAP                                  | IB/Int                     | toprim/CAP                   | toprim/CAP    |
| ATP hydrolysis                | —                                           | —                          | GHKL                         | GHKL          |
| <b>Mechanistic properties</b> |                                             |                            |                              |               |
| Metal dependent?              | Yes                                         | No                         | Yes                          | Yes           |
| ATP dependent?                | No                                          | No                         | Yes                          | Yes           |
| DNA cleavage                  | Single strand                               | Single strand              | Double strand                | Double strand |
| Cleavage polarity             | 5'                                          | 3'                         | 5'                           | 5'            |
| $\Delta Lk$                   | +1                                          | +/- n                      | +/- 2                        | +/- 2         |
| <b>Representative enzymes</b> |                                             |                            |                              |               |
|                               | <i>E. coli</i> topo I & III, reverse gyrase | h-topo I, v-topo I, topo V | topo II, topo IV, DNA gyrase | topo VI       |

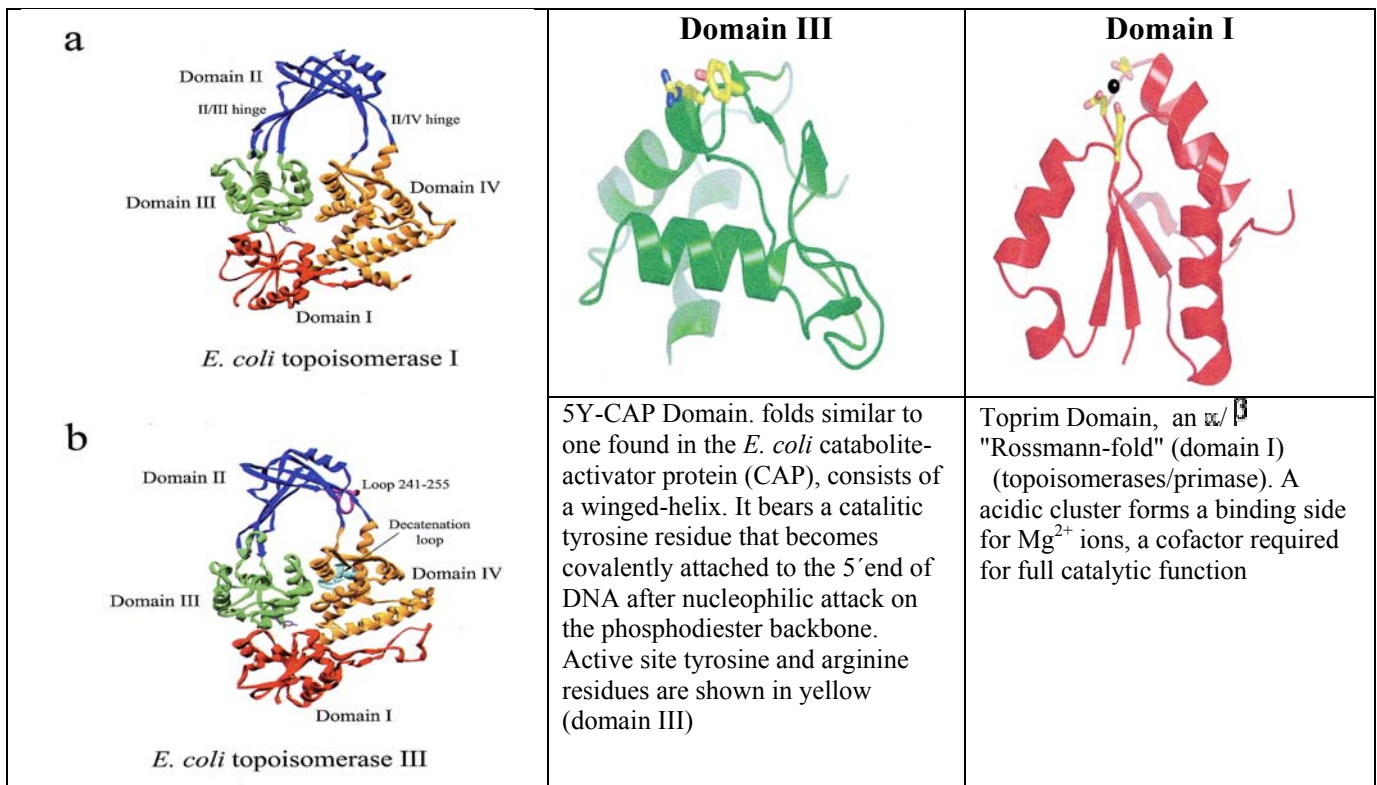
### Topoisomerases tipo IA



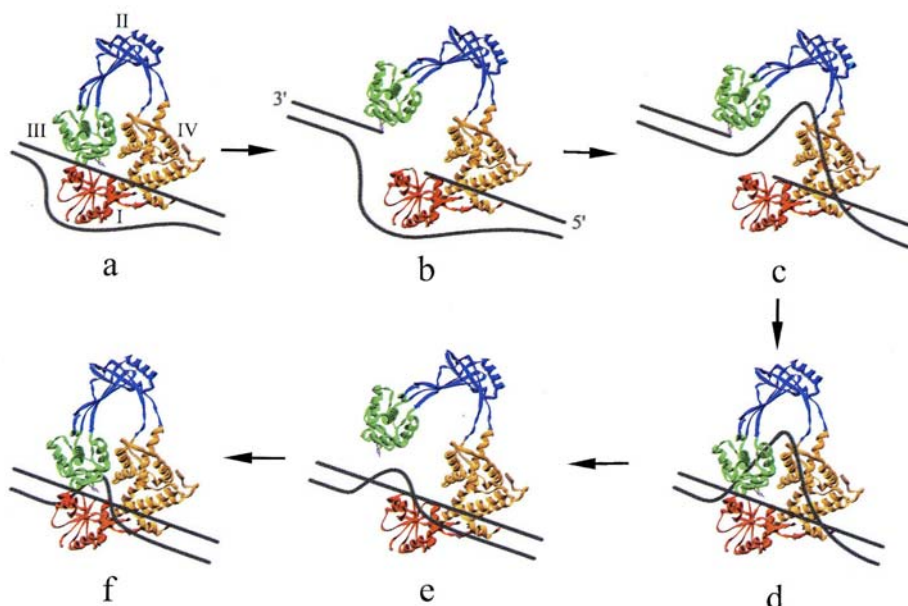
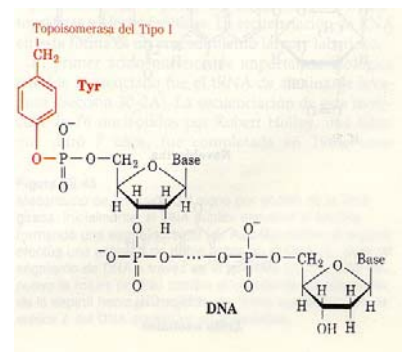
**Figure 1** Domain structure of type IA topoisomerases. The sequences of the type IA topoisomerases from the indicated organisms were aligned based on homology to the cleavage/strand passage domain of *E. coli* topoisomerase I, and the domains are drawn approximately to scale (18, 65, 70). The boxes corresponding to the various domains are coded as follows: gray, cleavage/strand passage domain; black, "helicase-like domain" of reverse gyrase; unfilled, basic C-terminal domain; diagonal striping, *E. coli*-like Zn(II) binding domain; stippling, Zn(II) binding domain found in human and *Drosophila* (not shown) topoisomerases IIIβ (65). Although all of the type IA enzymes possess a basic C-terminal domain, only *E. coli* topoisomerase I and human topoisomerase IIIα exhibit significant sequence homology throughout this region. The domain boundaries lacking numerical labels are only approximate.

## Shared modules in topoisomerases

Type IA, IIA and IIB topos share two domains that are required for DNA binding and cleavage: 5Y-CAP and toprim.

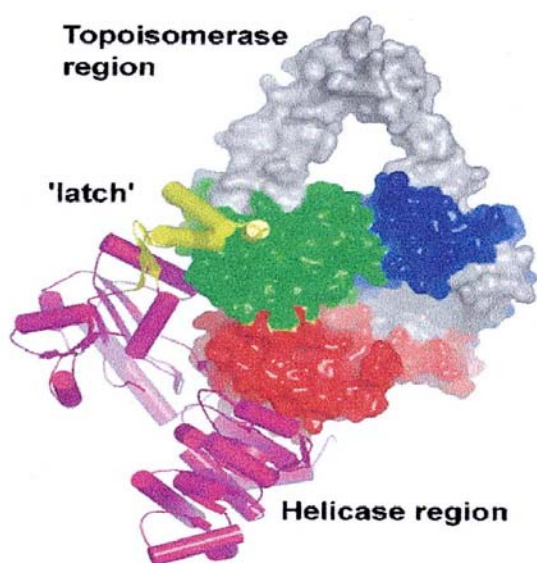


**Figure 2** Crystal structures of *E. coli* topoisomerases I and III. The toroidal structure of *E. coli* topoisomerase I (aa 32–509, pdb entry 1ECL) (panel *a*) and topoisomerase III (aa 1–609, pdb entry 1D6M) (panel *b*) are shown looking directly through the hole. For *E. coli* topoisomerase I (81), domains I (residues 32–63, 72–157), II (214–278, 406–433, 438–475), III (279–405, 434–437), and IV (64–71, 158–213, 476–590) are colored red, blue, green, and orange, respectively. The domains for *E. coli* topoisomerase III follow the same convention as described for topoisomerase I (81). The two hinge points between domain II and the other domains are labeled II/III hinge and II/IV hinge in panel *a*. The active site tyrosines are shown in ball and stick and colored magenta. For *E. coli* topoisomerase III in panel *b*, Loop 241–255 is colored magenta and the decatenation loop is shown in cyan. The drawings in this and subsequent structure figures were created using Swiss-Pdb Viewer software (v3.51) (Glaxo Wellcome Experimental Research) (85a).



**Figure 3** Proposed mechanism of relaxation by *E. coli* topoisomerase I. Shown schematically is a series of proposed steps for the relaxation of one turn of a negatively supercoiled plasmid DNA. The same mechanism would apply in the case of decatenation or knotting by substituting a DNA segment from another molecule or from another region of the same molecule for the intact strand in the figure, respectively. The two strands of the DNA are shown as dark gray lines (not to scale). The four domains of the protein are labeled in panel *a* and colored as described for Figure 2*a*. The strand to be cleaved is shown bound to the surface of the protein at the approximate location of the large cleft, and its polarity is indicated in panel *b*. In panels *a*–*d*, the length of the intact strand that is passed through the open gate is exaggerated to simplify the drawing. The conformational change that occurs upon binding the substrate to expose the active site Tyr319 has not been characterized and is not shown. The protein is proposed to oscillate between a closed conformation (panels *a*, *d*, and *f*) and an open conformation (panels *b*, *c*, and *e*) that provides access of the DNA to the central hole. For the purposes of generating the figure, the open conformation was modeled by allowing movement at both the II/III and II/IV hinges shown in Figure 2*a*. See text for detailed description of each step of the cycle.

### Reverse gyrase: Type IA topoisomerases



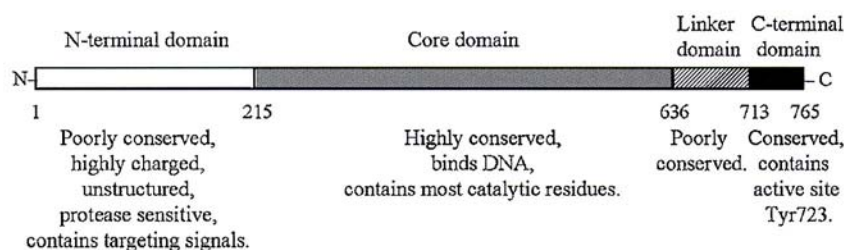
The type IA toporegion is shown in surface and colored in red, green and blue. The helicase region is shown in magenta, with the latch in yellow.

\*Reverse gyrase possesses the unique ability to use ATP as an energy source to positively supercoil DNA

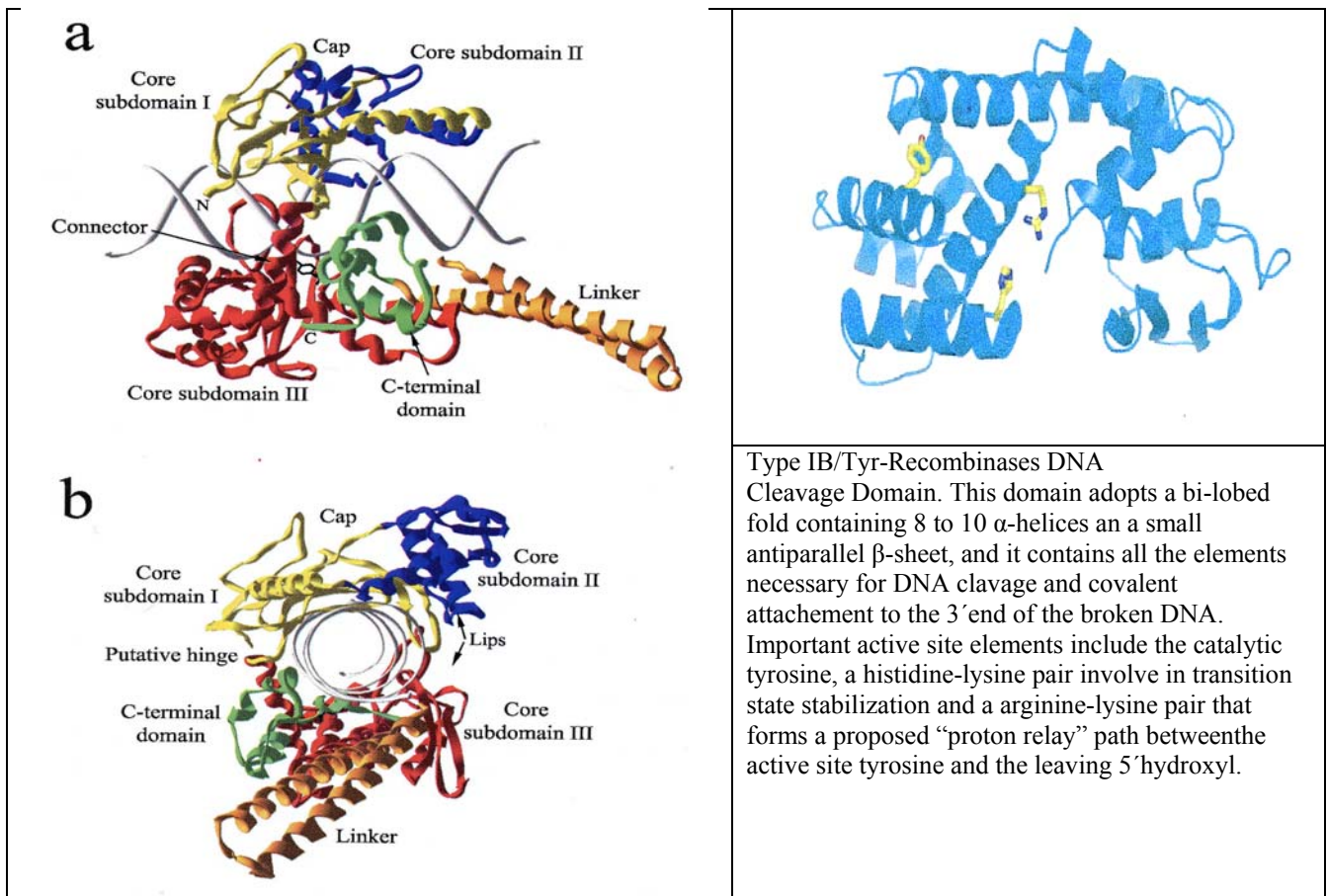
\*It is a remarkable fusion of two functional elements an N-terminal ATPase region homologous to superfamily 2 helicase, and C-terminal region homologous to type IA topoisomerase.

One striking structural feature of reverse gyrase is a small motif, termed the latch, which is proposed to move in response to ATP binding or hydrolysis

### Topoisomerases IB

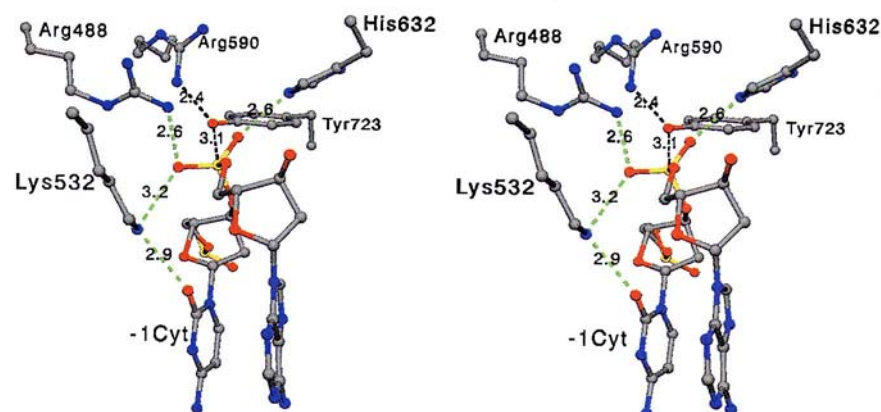


**Figure 4** Domain structure of human topoisomerase I. Human topoisomerase I comprises an N-terminal domain (open box), a core domain (gray box), a linker domain (diagonally striped box), and a C-terminal domain (black box). The domain boundaries are based on sequence alignments, limited proteolysis studies, and the crystal structures of the protein. The solution of the crystal structure led to the division of the core domain into three subdomains (see Figure 5). The properties of the four domains are summarized in the lower portion of the figure.

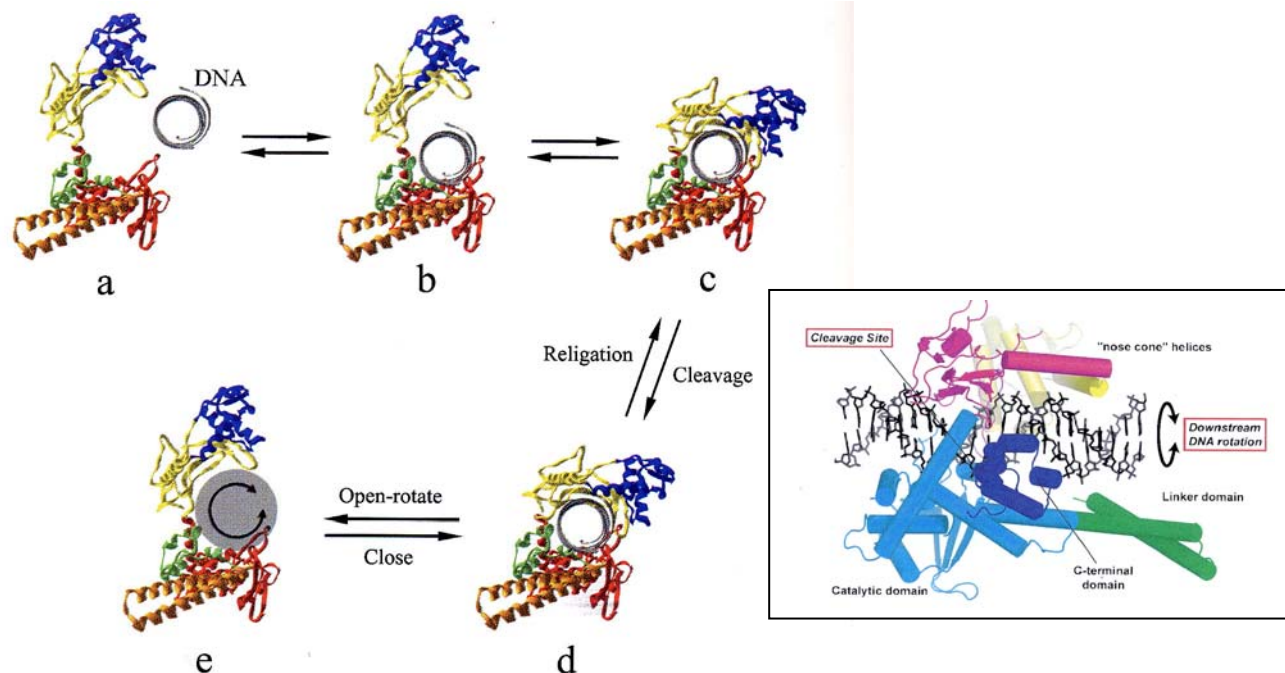


**Figure 5** Two views of the structure of human topoisomerase I. The structure of the enzyme (pdb entry 1A36) is viewed from the side with the DNA axis horizontally oriented (*a*) and looking down the axis of the DNA (*b*). Core subdomains I (residues 215–232 and 320–433), II (residues 233–319) and III (residues 434–633) are colored yellow, blue, and red, respectively. The linker (residues 641–712) and C-terminal domain (residues 713–765) are shown in orange and green, respectively. In panel *a*, the amino terminus (N) and carboxyl terminus (C) of the protein are indicated, and the active site tyrosine is shown in black ball and stick. The long  $\alpha$ -helix that connects the cap to the base of the core is labeled "Connector" in panel *a*. In panel *b*, the "Lips" region where the protein opens during DNA binding and unbinding is shown with opposing arrows, and the hinge region at the top of the connector helix is labeled "Putative hinge."

Eukaryotic enzymes  
Human DNA topoisomerase I core region includes three core subdomains, C-terminal domain and linker domain

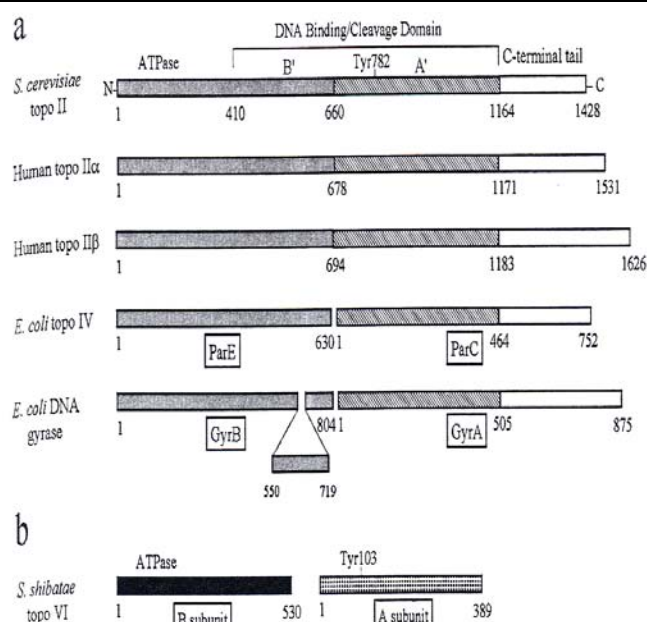


**Figure 6** Stereoview of the amino acid side chains in the active site of human topoisomerase I. The three-dimensional relationship between the side chains of the active site residues Tyr723, Arg488, Arg590, His632, and Lys532 and the scissile phosphate is shown for the structure containing a cytosine at the –1 position in the DNA (–1Cyt) (pdb entry 1EJ9). Hydrogen bonds are shown as dashed green lines; other distances as dashed black lines. Bond distances are indicated in angstroms. Figure was generated with Swiss-Pdb Viewer software (v. 3.51) in combination with POV-Ray for Windows (v. 3.1).

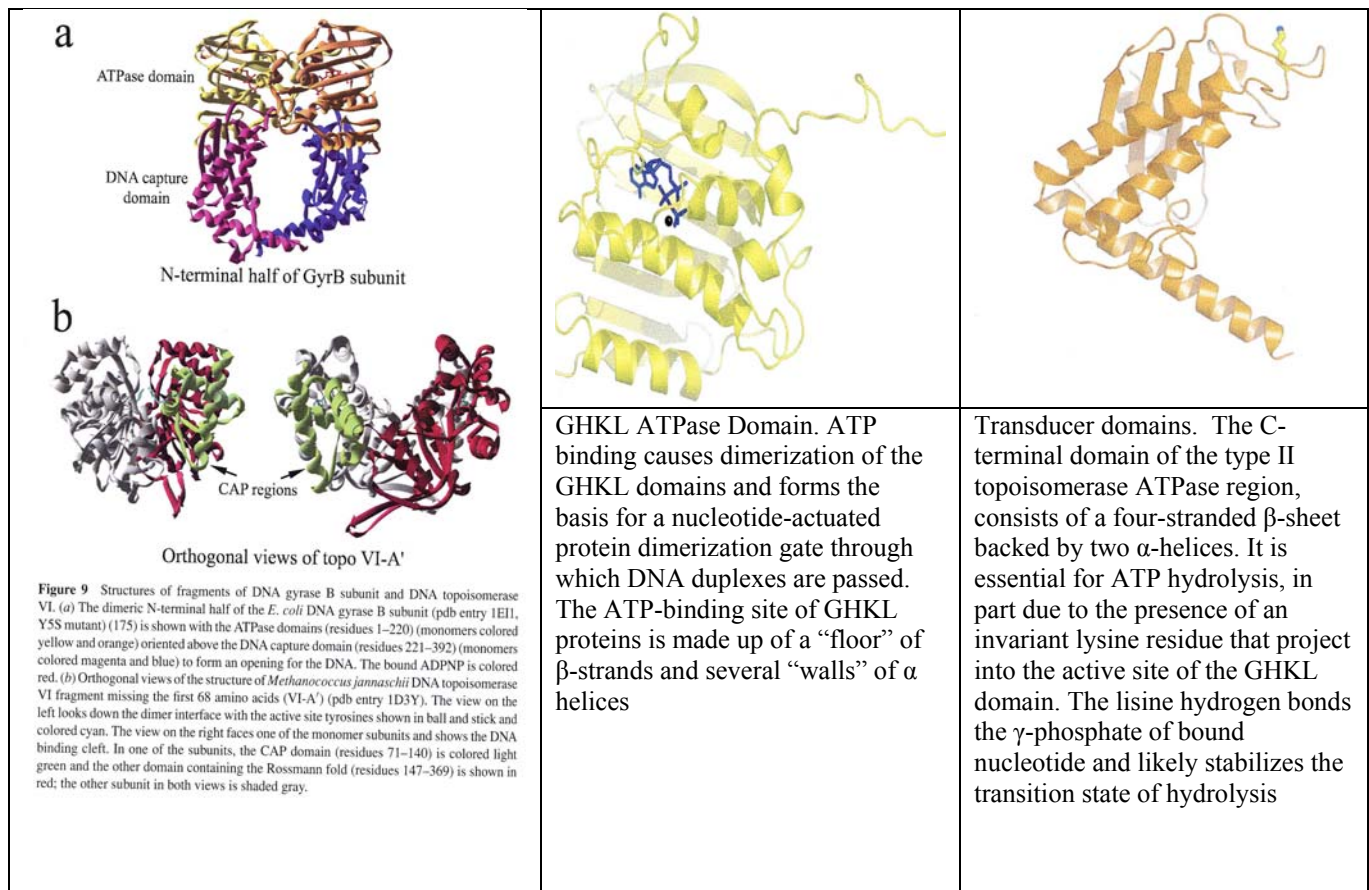


**Figure 7** A possible mechanism of DNA relaxation by human topoisomerase I. The enzyme is viewed looking down the axis of the bound DNA. The enzyme is modeled into an open configuration for DNA binding by allowing upward movement at the hinge point identified in Figure 5b. Upon binding the DNA (*a* and *b*), the closed form of the enzyme catalyzes cleavage of the scissile strand (*c* and *d*). In this model, rotation of the DNA is proposed to occur in the open conformation of the enzyme (*e*), although the protein may not be as open as depicted here (see text). The cleaved DNA rotates about a series of bonds in the intact strand (*e*); the gray transparent circle depicts the approximate cross section circumscribed by the rotating DNA (127, 128). Multiple rotations are possible before the steps are reversed, and the DNA is either cleaved again or released.

## Topoisomerasas tipo II

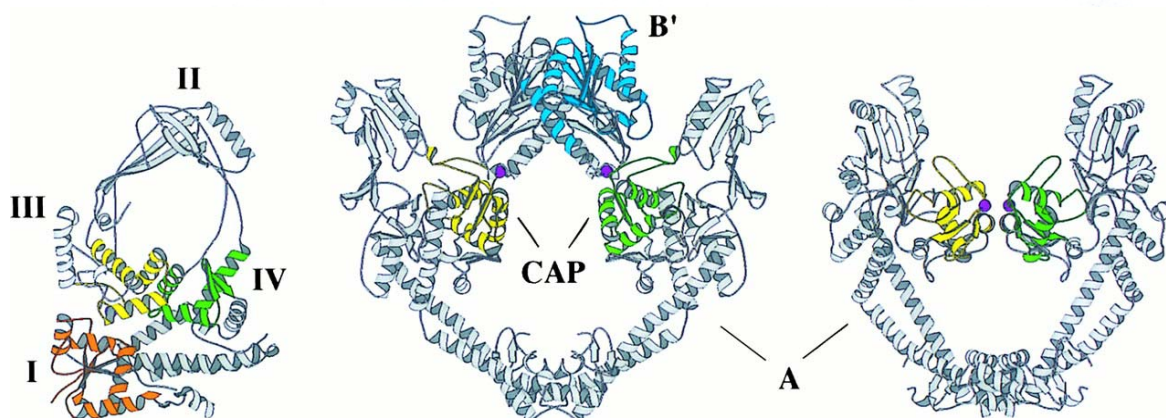


**Figure 8** Sequence comparisons among type II topoisomerases. (*a*) The three-domain structure of the type IIA subfamily of topoisomerases is shown based on amino acid sequence homologies with *E. coli* DNA gyrase (18). In each case, the region or subunit that is homologous to the GyrB subunit (excluding the insertion from 550–719) is shown with sequence coordinates and a gray shaded box. The region homologous to the highly conserved first 505 amino acids of GyrA is depicted by a box with diagonal striping. For the *S. cerevisiae* enzyme, the C-terminal half of the GyrB-like region (residues 410–660) is referred to as B' and the region homologous to GyrA as A' (residues 661–1164); the combined B'-A' regions constitute the DNA binding/cleavage domain containing the active site Tyr782. The N-terminal half of GyrB and the corresponding regions in the other type IIA enzymes contain the ATPase domain (and the DNA capture domain, not indicated). The C-terminal tail domains of the enzymes are depicted as open boxes. The ParC and ParE subunits of *E. coli* topoisomerase IV are also referred to as the A and B subunits, respectively, to denote their relationship to the gyrase subunits. (*b*) The subunit structure of *S. shibatae* topoisomerase VI, the prototype of the type IIB subfamily, is shown with the B and A subunits in black and stippled boxes, respectively, to indicate that they are structurally distinct from any of the domains in the type IIA subfamily. The positions of the ATPase region and the active site Tyr103 are indicated.

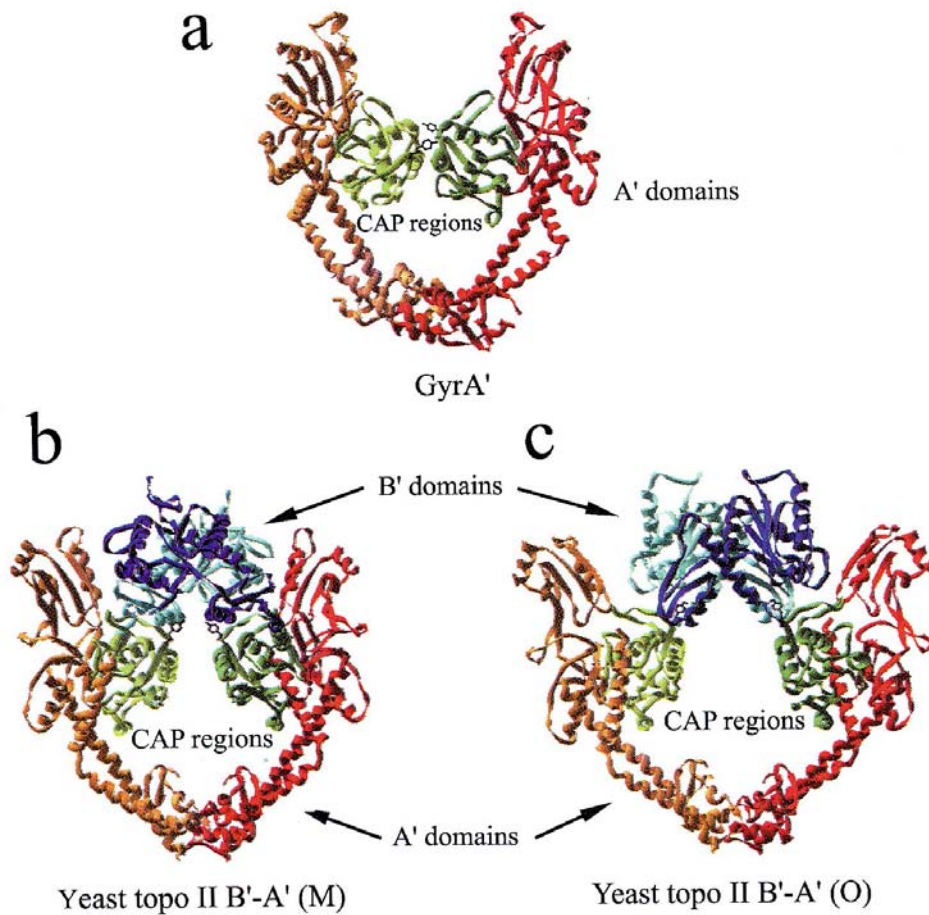


**Figure 9** Structures of fragments of DNA gyrase B subunit and DNA topoisomerase VI. (a) The dimeric N-terminal half of the *E. coli* DNA gyrase B subunit (pdb entry 1EII, Y5S mutant) (175) is shown with the ATPase domains (residues 1–220) (monomers colored yellow and orange) oriented above the DNA capture domain (residues 221–392) (monomers colored magenta and blue) to form an opening for the DNA. The bound ADPNP is colored red. (b) Orthogonal views of the structure of *Methanococcus jannaschii* DNA topoisomerase VI fragment missing the first 68 amino acids (VI-A') (pdb entry 1D3Y). The view on the left looks down the dimer interface with the active site tyrosines shown in ball and stick and colored cyan. The view on the right faces one of the monomer subunits and shows the DNA binding cleft. In one of the subunits, the CAP domain (residues 71–140) is colored light green and the other domain containing the Rossmann fold (residues 147–369) is shown in red; the other subunit in both views is shaded gray.

**Figure 9** Structures of fragments of DNA gyrase B subunit and DNA topoisomerase VI. (a) The dimeric N-terminal half of the *E. coli* DNA gyrase B subunit (pdb entry 1EII, Y5S mutant) (175) is shown with the ATPase domains (residues 1–220) (monomers colored yellow and orange) oriented above the DNA capture domain (residues 221–392) (monomers colored magenta and blue) to form an opening for the DNA. The bound ADPNP is colored red. (b) Orthogonal views of the structure of *Methanococcus jannaschii* DNA topoisomerase VI fragment missing the first 68 amino acids (VI-A') (pdb entry 1D3Y). The view on the left looks down the dimer interface with the active site tyrosines shown in ball and stick and colored cyan. The view on the right faces one of the monomer subunits and shows the DNA binding cleft. In one of the subunits, the CAP domain (residues 71–140) is colored light green and the other domain containing the Rossmann fold (residues 147–369) is shown in red; the other subunit in both views is shaded gray.

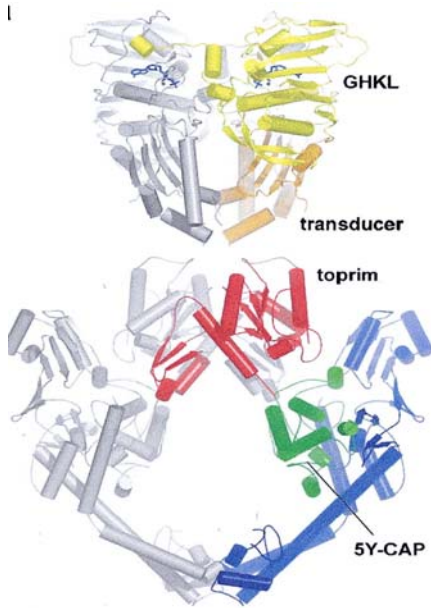


Comparison of *E. coli* DNA topoisomerase I (Left), *S. cerevisiae* DNA topoisomerase II (Middle), and *E. coli* GyrA (Right). CAP-like part of DNA topoisomerase I domain III (yellow), CAP-like part of DNA topoisomerase I domain IV (green), DNA topoisomerase II and GyrA CAP-like domains (yellow and green), Rossmann fold of DNA topoisomerase I domain I (orange), Rossmann fold of DNA topoisomerase II B' domain (blue), and active-site tyrosines of all topoisomerases (magenta spheres).



**Figure 10** Structures of *E. coli* DNA gyrase subunit A fragment and yeast topoisomerase II regions B'-A'. (a) The GyrA' fragment (residues 30–522) (pdb entry 1AB4) is shown facing the large DNA-binding cavity. The CAP regions of the two monomers of GyrA' are colored light and dark green with the remainder of the two A' fragment monomers shown in orange and red. The active site tyrosines are shown in black ball and stick. (b) and (c) The dimeric structures of fragments of *S. cerevisiae* DNA topoisomerase II are missing the first 419 amino acids. The two structures differ with respect to the orientation of the B'-CAP region relative to the remainder of the molecule. In (b) (pdb entry 1BJT), the “gate” is opened midway (M) between the configuration shown in (a) for DNA gyrase A' (designated C in text) and that shown in (c) for the open (O) (pdb entry 1BGW) form of the yeast topoisomerase B'-A' fragment. The color schemes in (b) and (c) are identical. The B' domains (residues 420–633) of the two monomers are shown in cyan and dark blue. The CAP regions of the A' domains of the two monomers (residues 683–819) are shown in light and dark green with the remainder of the A' domains (residues 820–1178) of the two monomers shown in orange and red. The active site tyrosines are shown in black ball and stick.

## Type IIA Topoisomerases

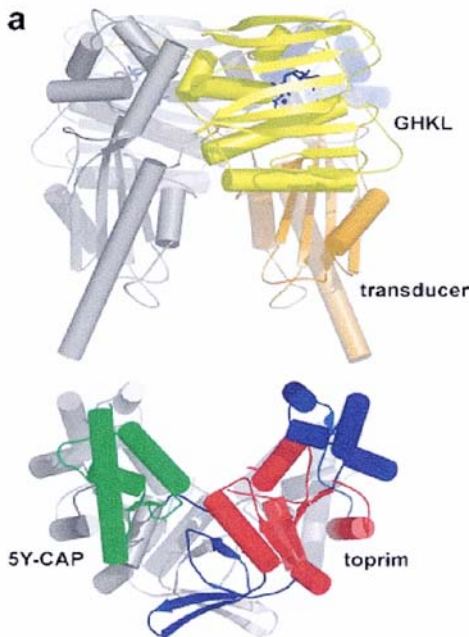


\*Type IIA topos are constructed as a series of catalytic modules linked by flexible hinge regions. There are at least three distinct sets of separable protein-protein interfaces that govern interactions between these modules in different subunits of the holoenzyme.

\*The three interfaces create two internal holes in the enzyme that are thought to temporarily store a DNA segment during the transport reaction.

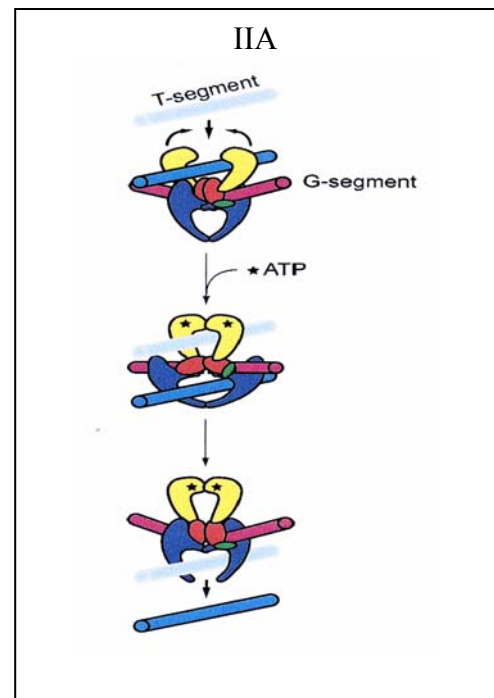
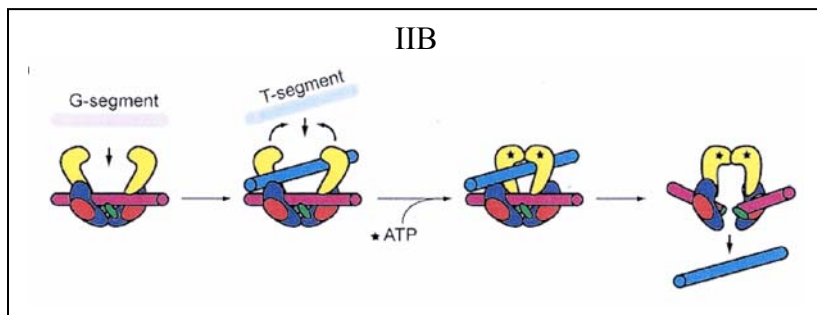


## Type IIB Topoisomerases



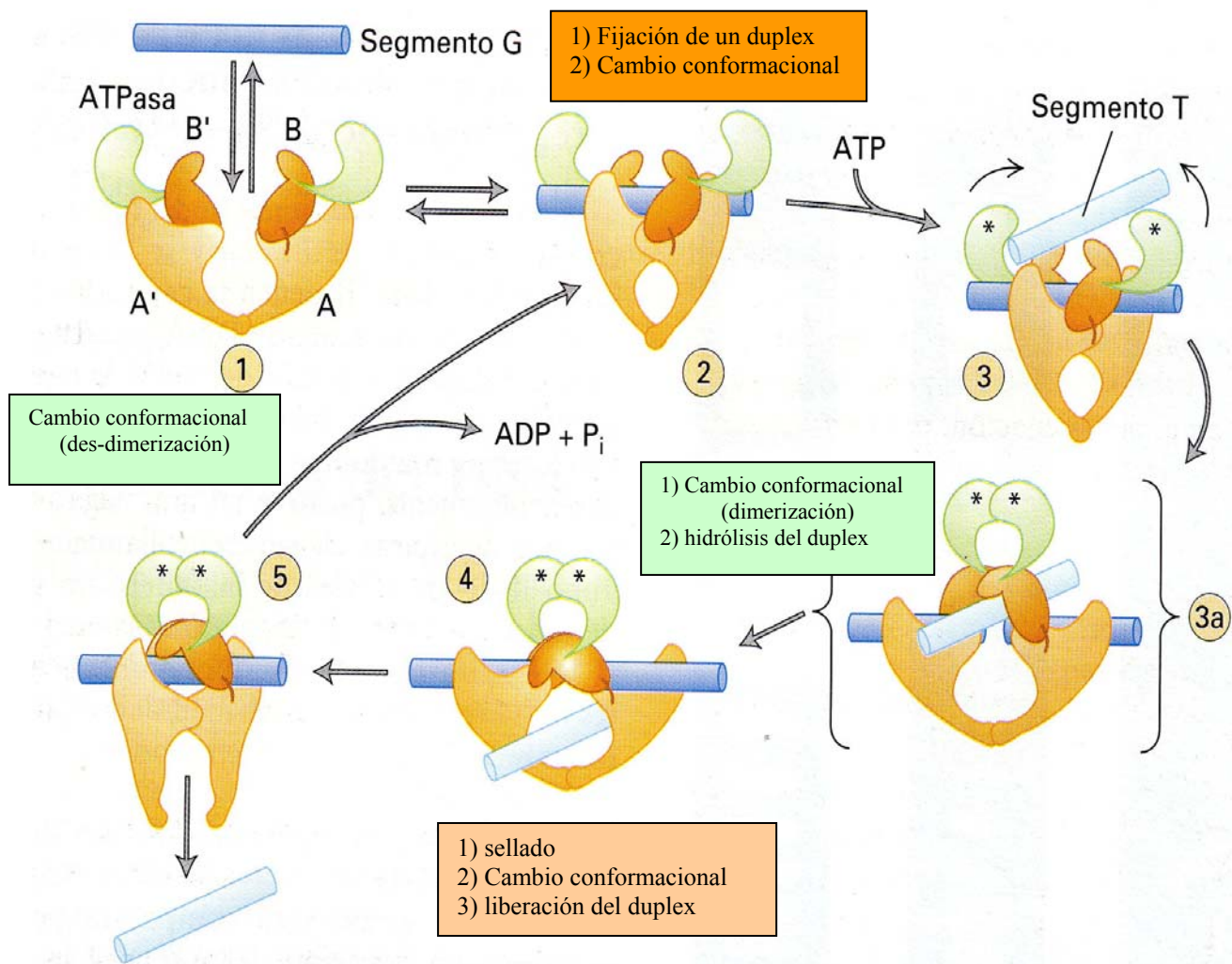
Type IIB Topoisomerases

\*The tertiary structure of the A-subunit is significantly rearranged from the catalytic DNA-binding and cleavage cores of other topoisomerase type, forming a compact, U-shaped dimer with a putative DNA-binding groove running across the dimer interface between the two subunits. The linker regions between the ATPase and 5Y-CAP/toprim regions also appear to be unique

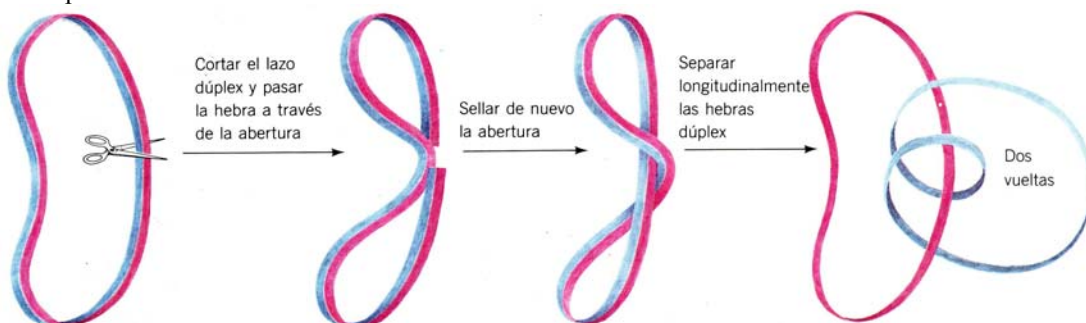


\*Two gate mechanism: The T-segment passes through the entirety of the topoisomerase holoenzyme, an action that necessitates at least two differentially separable protein-protein interface.

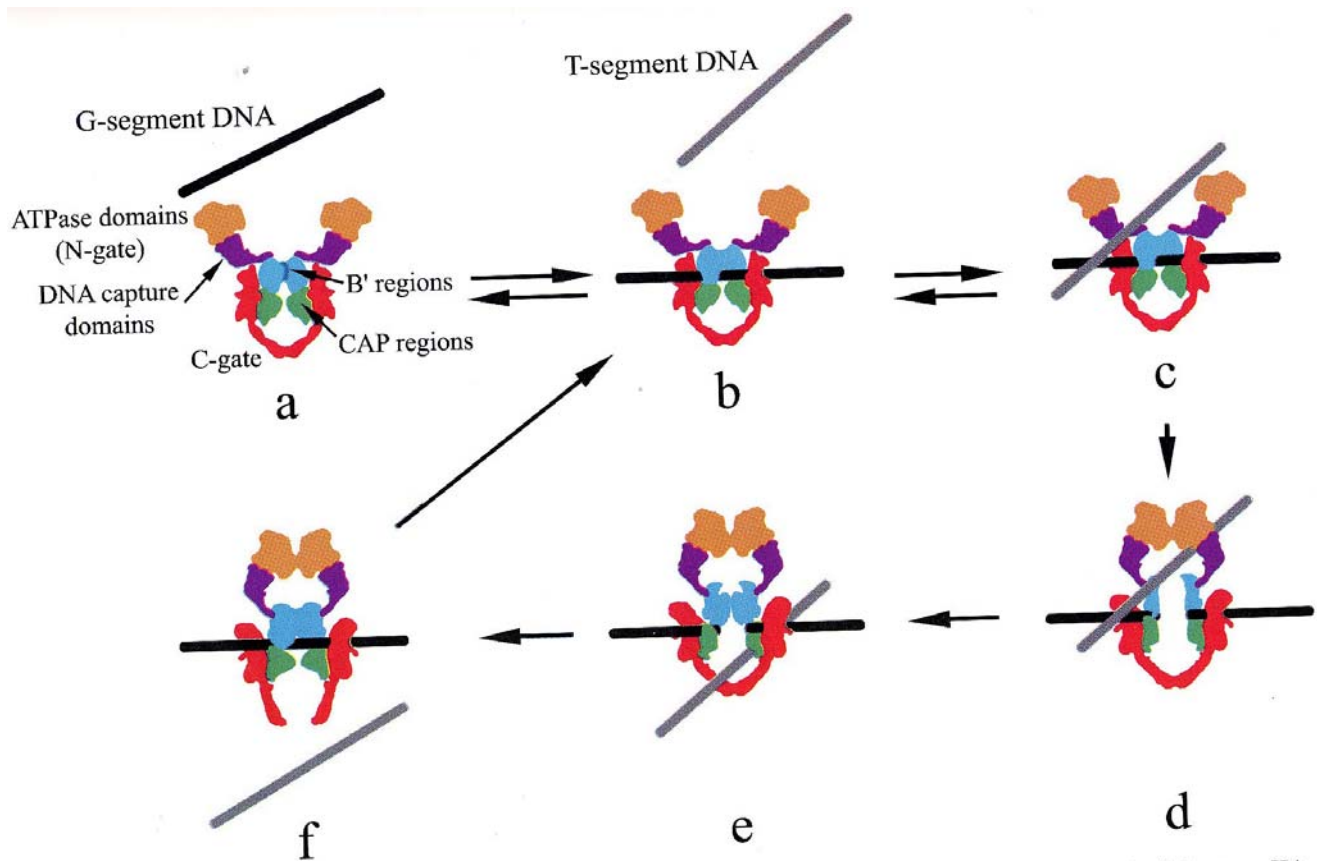
## Modelo molecular de la actividad catalítica de la topoisomerasa II de *E. coli* (DNA girasa)



La enzima es un dímero de dos subunidades idénticas. (1) Primero se une a una parte de una cadena de DNA, el segmento G (en azul), lo que induce un cambio de la conformación en los dominios B, B', A y A' de la enzima. (2) Tras la unión de ATP (indicado por los asteriscos) y otra parte de la cadena de DNA, el segmento T (en celeste), se produce una serie de reacciones en las que el segmento G es cortado por los dominios A y A' de la enzima (en naranja claro) y los extremos del DNA de G se unen de manera covalente a residuos de tirosina en estos dominios (3) y (3a). Al mismo tiempo, los dominios fijadores de ATP (en verde) se acercan entre sí y transportan al segmento T a través del corte hacia el hueco central (4). Luego el segmento G cortado se reconecta y el segmento T se libera mediante un cambio conformacional que separa los dominios A y A' en el fondo de la enzima (5). La interfase entre los dominios A y A' después se vuelve a formar (una reacción que requiere la hidrólisis de ATP) y así se regenera el estado inicial (2). En este momento el segmento G puede disociarse de la enzima mediante la conversión de (2) en (1). De modo alternativo, la enzima puede proseguir con otro ciclo, pasando otra vez el segmento T a través del segmento G y eliminando así dos espiras de superenrollamiento más.



Demostración, en la que el DNA se representa por una cinta, de que al cortar un círculo dúplex, pasar la hebra a través de la abertura resultante, y después sellar de nuevo la rotura, cambia el número de enlace en dos unidades. Al separar las hebras resultantes (abriendo la cinta longitudinalmente; derecha se observa como una de las hebras efectúa dos revoluciones completas alrededor de la otra.



**Figure 11** Proposed mechanism for DNA transport by type IIA topoisomerases. A schematic model of the type IIA topoisomerase is shown with the following color scheme: ATPase domains, orange; DNA capture domains, purple; B' domains corresponding to the C-terminal half of GyrB, cyan; CAP regions, green; and the remainder of the A' domains, red. The N-gate is shown in the open configuration in panels *a–e* and is closed in panels *d–f*. The C-gate is closed in panels *a–e* and is open in panel *f*. The G-segment and T-segment DNAs are shown as black and gray rods, respectively (DNA not drawn to scale). See text for an explanation of the individual steps of the DNA transport reaction.

## Telomerasas

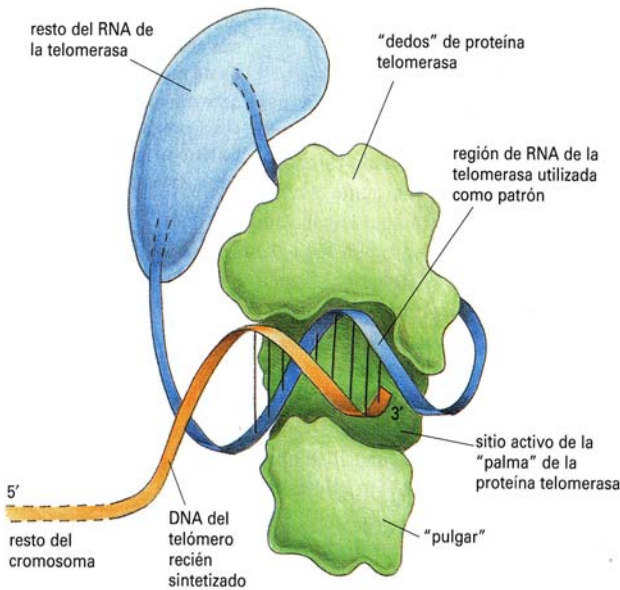
### Secuencias teloméricas repetidas representativas de diversos organismos

| Organismo                                  | Repetición <sup>a</sup>                              |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>Tetrahymena thermophila</i> (protista)  | TTGGGG                                               |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levadura) | T(G) <sub>2-3</sub> (TG) <sub>1-6</sub> <sup>b</sup> |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> (planta)       | TTTAGGG                                              |
| <i>Bombyx mori</i> (gusano de seda)        | TTAGG                                                |
| Ser humano                                 | TTAGGG                                               |

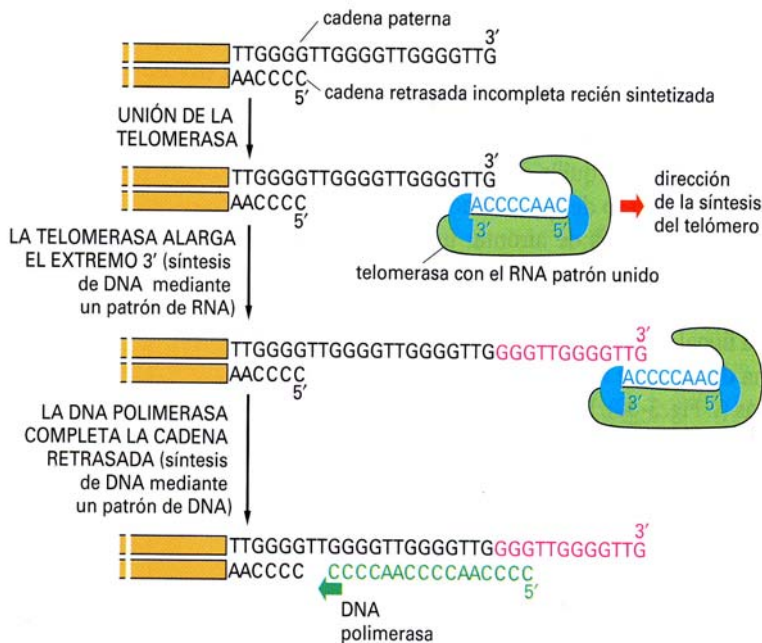
<sup>a</sup> Escrita en la dirección 5'→3'.

<sup>b</sup> Las levaduras son atípicas en que tienen repeticiones teloméricas algo variables.

**El DNA telomérico está formado por secuencias simples repetidas en tándem**, lo habitual es que una cadena tenga abundante G y la otra abundante C. La cadena con abundante G forma un saliente 3' terminal que suele tener una longitud de unos 15 residuos. Estas secuencias se añaden de forma repetida a los extremos 3' de los DNAs cromosómicos mediante enzimas denominadas **telomerasas**. Esta elongación deja espacio para que se una un cebador y se complete la síntesis de la cadena retardada, manteniendo la longitud aproximada del cromosoma e impidiendo la pérdida de secuencias codificadoras.



**Estructura de la telomerasa.** La telomerasa es un complejo proteína-RNA que contiene un patrón de RNA para la síntesis de secuencias de DNA repetitivas del telómero ricas en G.



**Replicación del telómero** se muestran las reacciones implicadas en la síntesis de las secuencias repetitivas ricas en G que forman los extremos de los cromosomas (telómeros) de varios organismos eucariotas. El extremo 3' de la cadena de DNA paterna se alarga mediante la síntesis de DNA utilizando un patrón de RNA; ello permite el alargamiento en dirección 5' de la cadena de DNA hija incompleta que está apareada con la primera. Parece que esta cadena retrasada incompleta se acaba mediante la la DNA polimerasa  $\alpha$ , una de cuyas subunidades es una DNA primasa. La secuencia de telómero que se muestra pertenece al ciliado *Tetrahymena*, en el que fueron descubiertas estas reacciones.

## Replicación del cromosoma de *E. coli*

### a) Iniciación

El origen de la replicación en *E. coli*, denominado *ori C*, consta de 245 pb, y en la fase de iniciación participan al menos 8 proteínas diferentes.

### Características estructurales del origen de replicación de *E. coli*

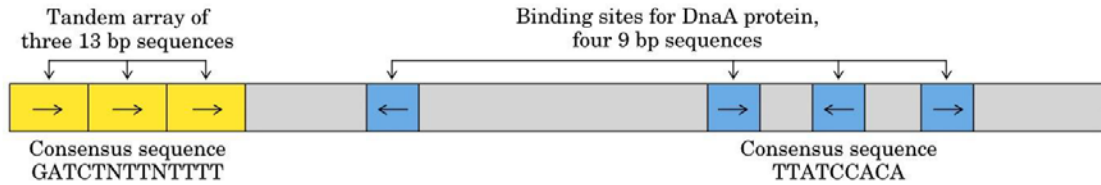
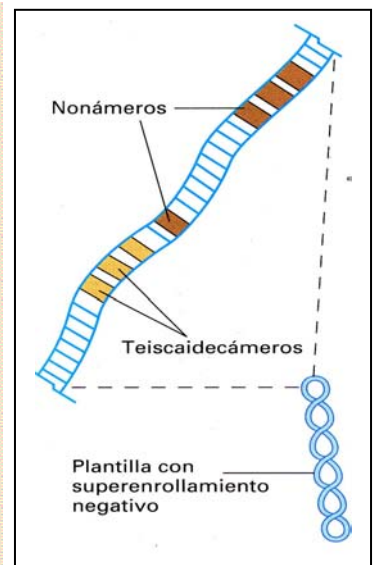
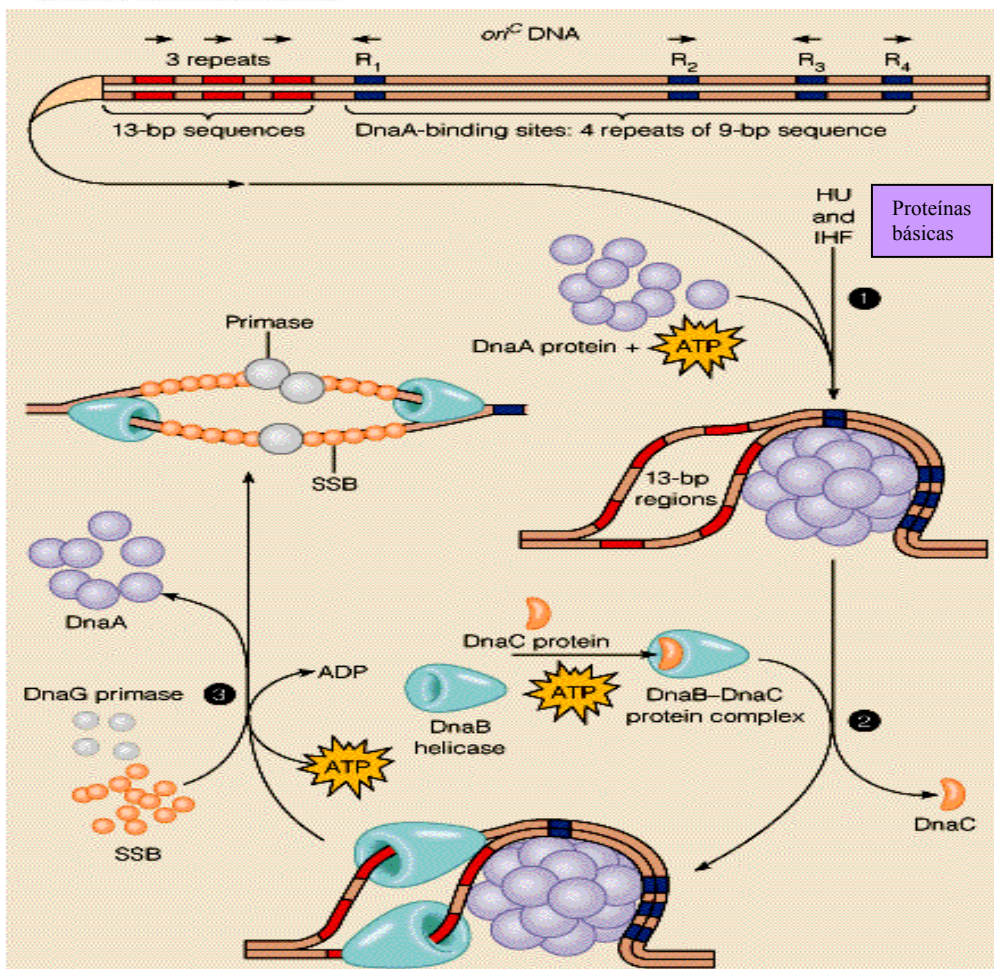


table 25-3

Proteins Required to Initiate Replication at the *E. coli* Origin

| Protein                                   | $M_r$   | Number of subunits | Function                                                             |
|-------------------------------------------|---------|--------------------|----------------------------------------------------------------------|
| DnaA protein                              | 52,000  | 1                  | Recognizes origin sequence; opens duplex at specific sites in origin |
| DnaB protein (helicase)                   | 300,000 | 6*                 | Unwinds DNA                                                          |
| DnaC protein                              | 29,000  | 1                  | Required for DnaB binding at origin                                  |
| HU                                        | 19,000  | 2                  | Histonelike protein; DNA bending protein; stimulates initiation      |
| Primase (DnaG protein)                    | 60,000  | 1                  | Synthesizes RNA primers                                              |
| Single-stranded DNA-binding protein (SSB) | 75,600  | 4*                 | Binds single-stranded DNA                                            |
| RNA polymerase                            | 454,000 | 5                  | Facilitates DnaA activity                                            |
| DNA gyrase (DNA topoisomerase II)         | 400,000 | 4                  | Relieves torsional strain generated by DNA unwinding                 |
| Dam methylase                             | 32,000  | 1                  | Methylates (5')GATC sequences at <i>oriC</i>                         |

\*Subunits in these cases are identical.



## Elongación

En la fase de elongación en la replicación consiste en dos operaciones similares en apariencia que son mecanísticamente muy diferentes:

- Síntesis de la cadena conductora o avanzada
- Síntesis de la cadena rezagada

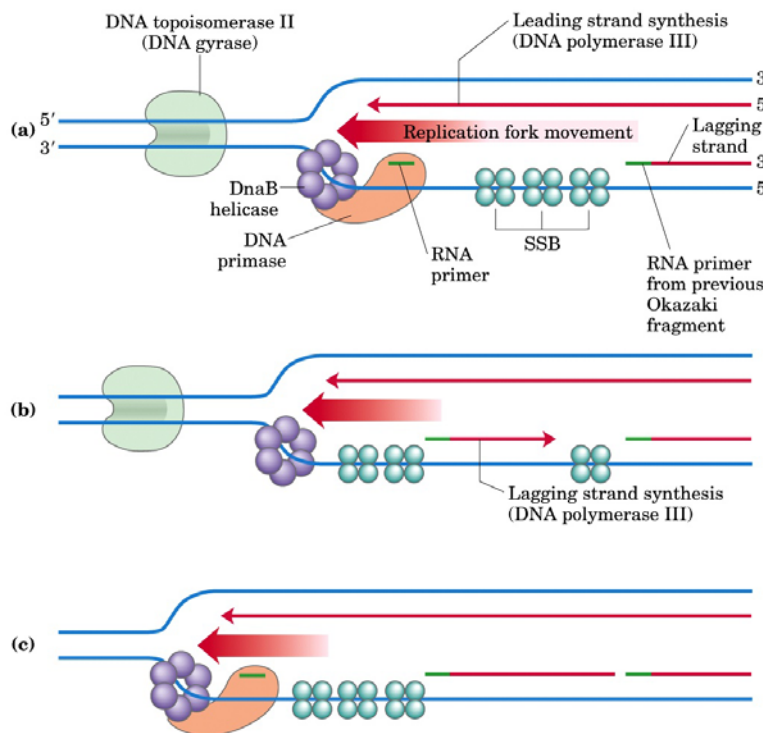
En la síntesis de ambas cadenas son importantes varios enzimas que se encuentran en la horquilla de replicación.

table 25-4

Proteins at the *E. coli* Replication Fork

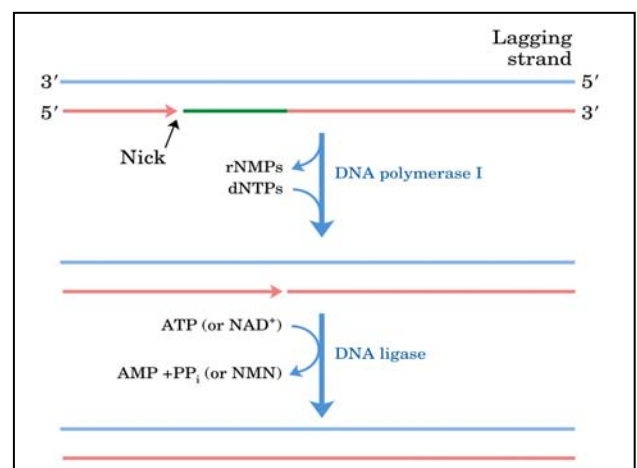
| Protein                           | $M_r$   | Number of subunits | Function                                    |
|-----------------------------------|---------|--------------------|---------------------------------------------|
| SSB                               | 75,600  | 4                  | Binding to single-stranded DNA              |
| DnaB protein (helicase)           | 300,000 | 6                  | DNA unwinding; primosome constituent        |
| Primase (DnaG protein)            | 60,000  | 1                  | RNA primer synthesis; primosome constituent |
| DNA polymerase III                | 900,000 | 18-20              | New strand elongation                       |
| DNA polymerase I                  | 103,000 | 1                  | Filling of gaps, excision of primers        |
| DNA ligase                        | 74,000  | 1                  | Ligation                                    |
| DNA gyrase (DNA topoisomerase II) | 400,000 | 4                  | Supercoiling                                |

Modified from Kornberg, A. (1982) *Supplement to DNA Replication*, Table S11-2, W.H. Freeman and Company, New York.

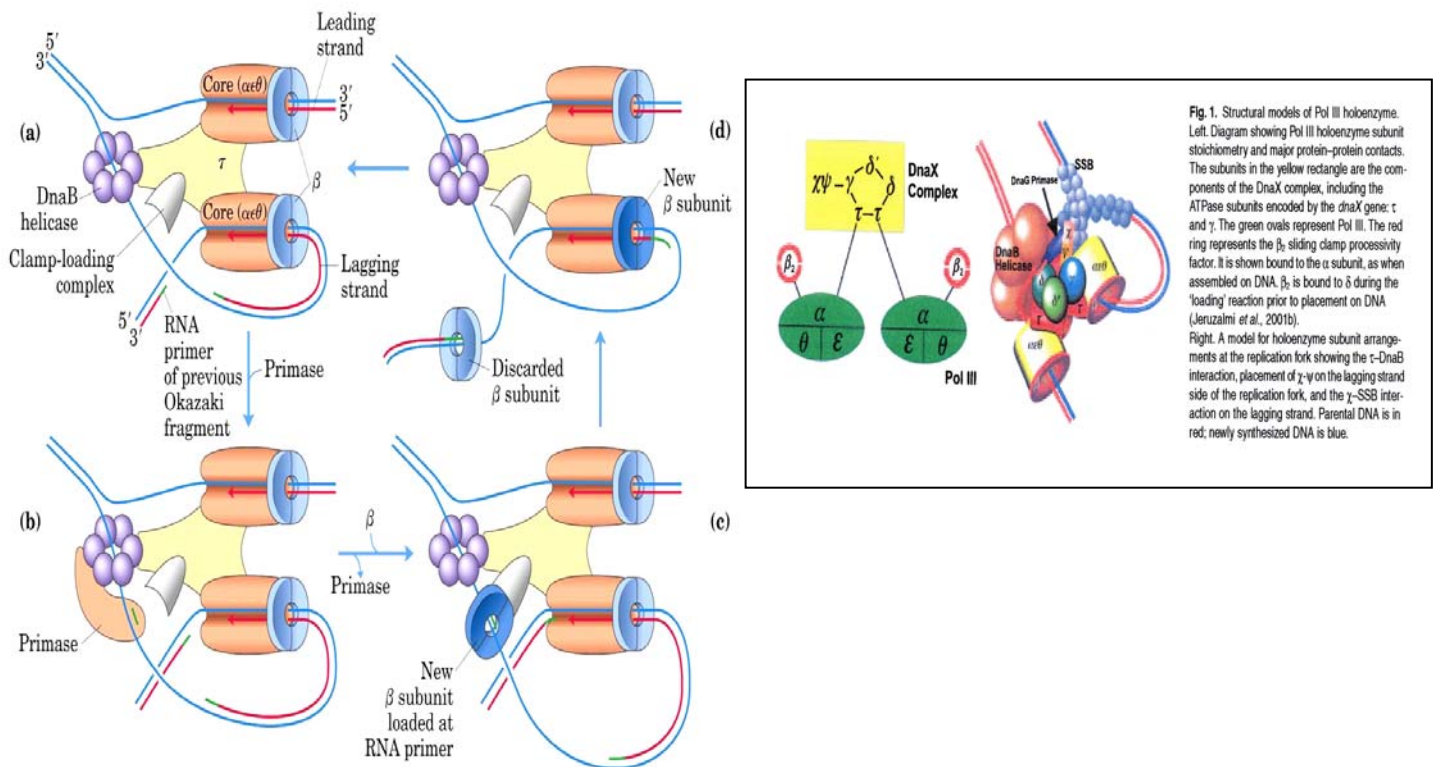


**Síntesis de fragmentos de Okazaki. (a)** A intervalos, la primasa sintetiza un cebador de RNA para un nuevo fragmento de Okazaki. Si consideramos formalmente que las dos hebras molde están dispuestas paralelamente, la síntesis de la hebra rezagada transcurre en dirección opuesta al movimiento de la horquilla. **(b)** Cada cebador es extendido por la DNA polimerasa III. **(c)** La síntesis de DNA continúa hasta que el fragmento se extiende hasta el cebador del fragmento de Okazaki añadido previamente. Un nuevo cebador es sintetizado cerca de la horquilla de replicación para empezar de nuevo el proceso.

Los cebadores de RNA de la hebra rezagada son eliminados por la actividad exonucleasa 5' → 3' de la DNA polimerasa I, siendo reemplazados con DNA por el mismo enzima. La mella restante es sellada por la DNA ligasa.

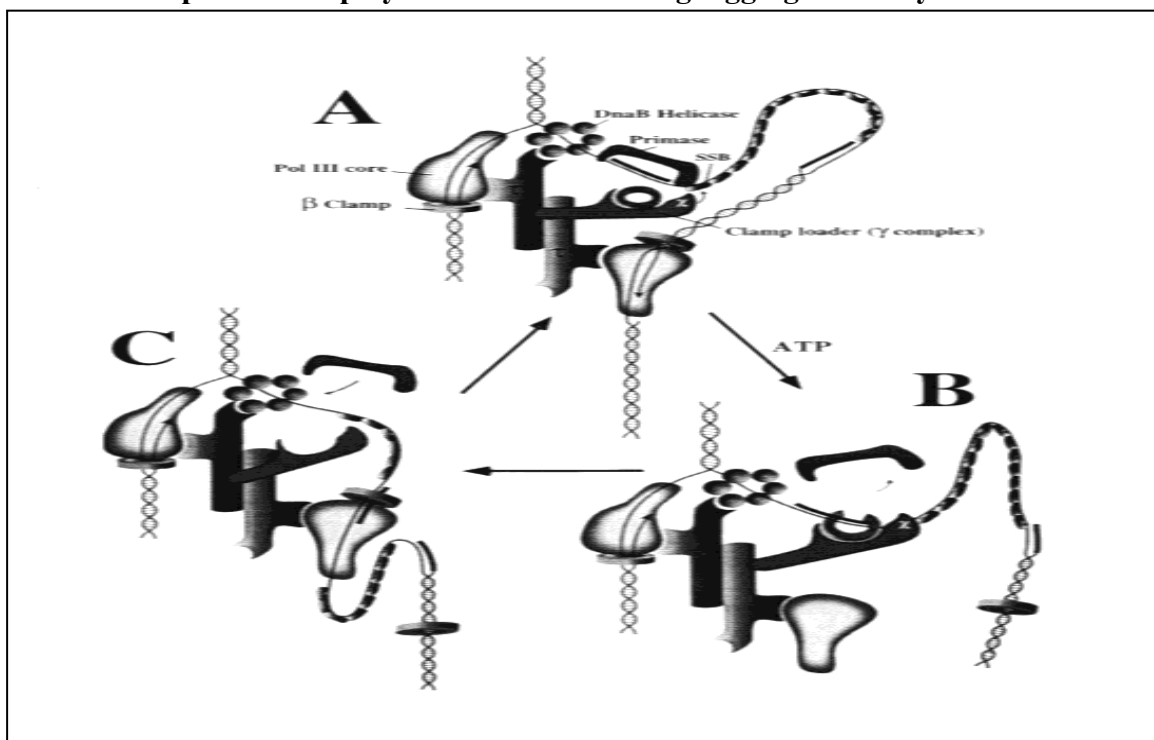


## Síntesis de DNA en las hebras conductora y rezagada



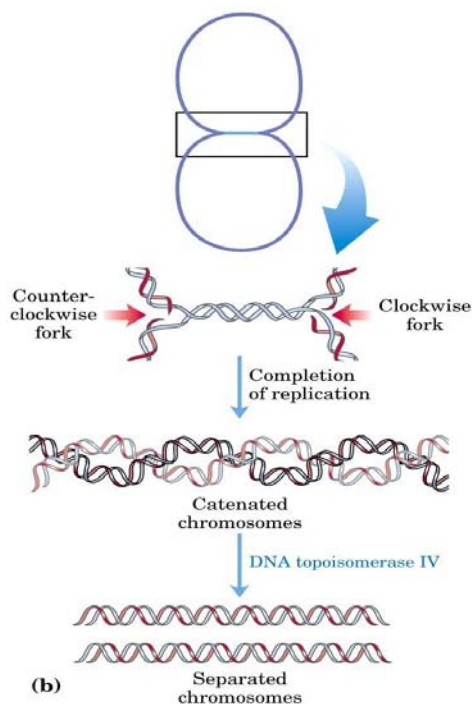
Las reacciones en la horquilla de replicación están coordinadas por un único dímero de DNA polimerasa III, integrado en un complejo con la helicasa DnaB. La figura muestra la replicación ya en curso. La hebra rezagada forma un bucle para que la síntesis de DNA progrese uniformemente en ambos moldes, conductor y rezagado, al mismo tiempo, catalizada por los dos grupos de subunidades núcleo de la DNA polimerasa III. Las flechas indican el extremo 3' de las dos hebras nuevas y la dirección de la síntesis de DNA. Un fragmento de Okazaki está siendo sintetizado en la hebra rezagada. **(a)** La síntesis continua de la hebra conductora progresa a medida que el DNA es desenrollado por la helicasa DnaB. **(b)** La primasa se une a DnaB, sintetiza un nuevo cebador y acto seguido se disocia. **(c)** El complejo de carga de la abrazadera de la DNA polimerasa III cataliza la carga de una nueva abrazadera  $\beta$  deslizante (azul oscuro) en el nuevo cebador de RNA. Mientras, se completa el fragmento de Okazaki que estaba siendo sintetizado. **(d)** Las subunidades núcleo de la DNA polimerasa III que han sintetizado la hebra rezagada liberan el fragmento de Okazaki completado y la abrazadera  $\beta$  deslizante usada en su síntesis. Las mismas subunidades núcleo se unen luego a una nueva abrazadera  $\beta$  deslizante y comienza la síntesis de otro fragmento de Okazaki en su cebador.

### The primase-to-polymerase switch during lagging strand synthesis



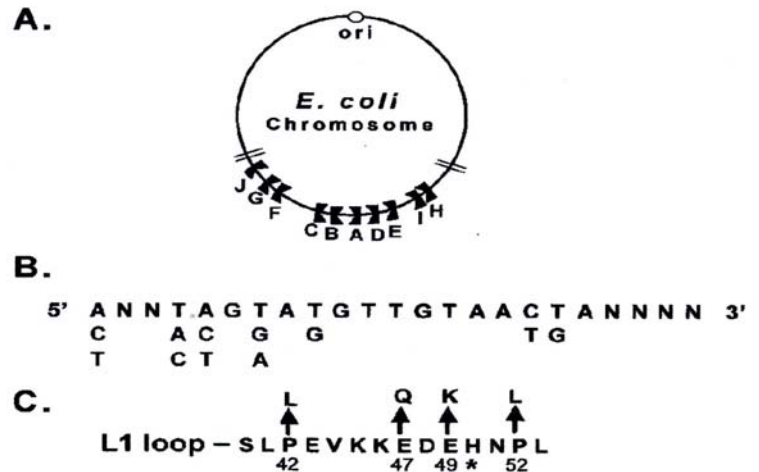
## Terminación

Las dos horquillas de replicación se encuentran en el lado opuesto del cromosoma circular de *E. coli* esta fase es la menos conocida, aunque parece necesaria la acción de una topoisomerasa tipo II, denominada topoisomerasa IV, para la separación final de dos moléculas completas de DNA circular.

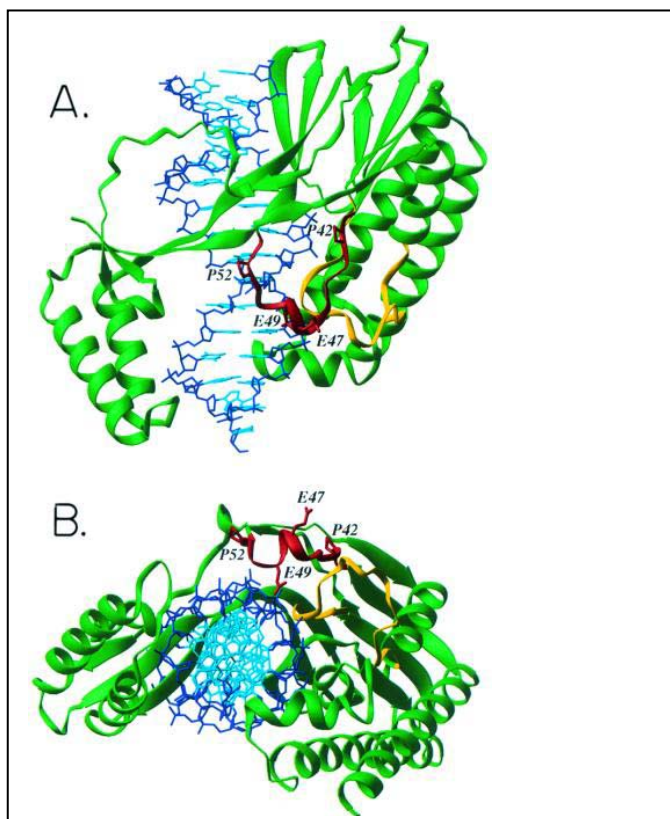


### Mechanism of termination of DNA replication of *Escherichia coli* involves helicase-contrahelicase interaction

Termination of DNA elongation by the two forks at *Ter* sequences by the Tus protein



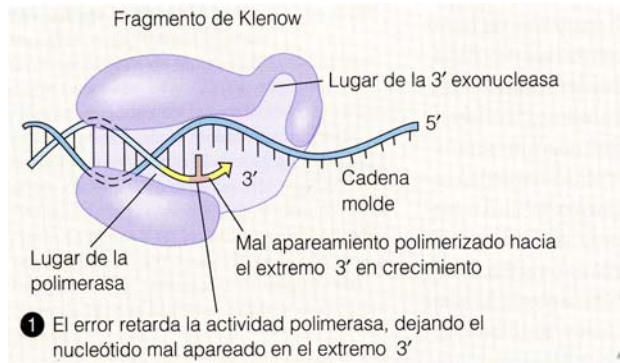
Locations and sequences of the replication termini of *E. coli*. (A) Map showing the *ori* and the 10 *Ter* sites. (B) The consensus sequence of *Ter*. (C) Location of the mutations in the L1 loop of Tus that were investigated in the present work. The asterisk shows the location of the single protein-sugar-phosphate contact at H50.



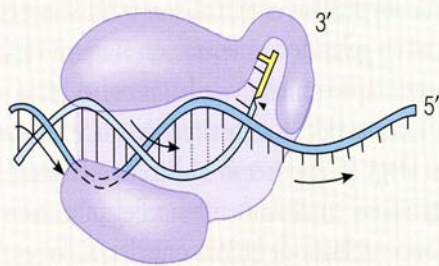
**Fig. 2.** The crystal structure of the *Ter* DNA-Tus protein complex (8) showing the nonblocking and the fork-blocking faces of Tus. (A) The L1 (red) and L2 (yellow) loops are shown along with the locations of four of the mutants. Note that the L1 loop is projecting from the helicase-blocking surface and is available for contact with the DnaB helicase. (B) A cross-sectional view of the helicase-arresting surface.

## Fidelidad de la replicación del DNA

### Base cinética de la escisión preferente de los nucleótidos mal apareados por el lugar de la 3' exonucleasa distante del lugar de la polimerasa

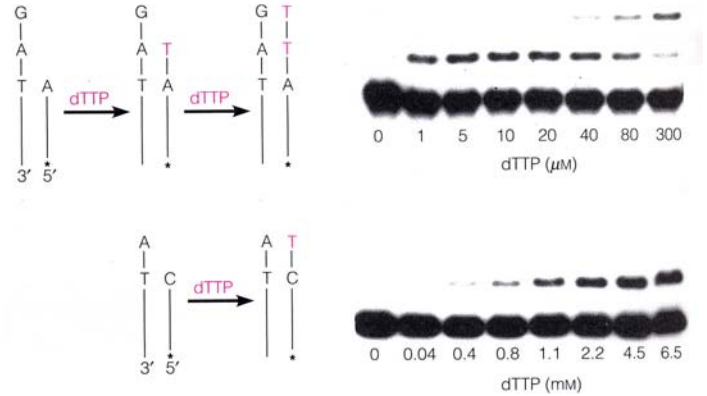


#### Retroceso del enzima



- 2 El retardo permite la fusión espontánea y libera el extremo 3' para que contacte con el lugar de la exonucleasa, que elimina el mal apareamiento

### Sistema "In Vitro" para el estudio de la fidelidad de la replicación del DNA



La cadena cebadora se marca radiactivamente en el extremo 5' (asterisco) y es la especie de las marcadas radiactivamente que migra más rápidamente. La dependencia de la concentración de dTTP para la extensión a partir de un nucleótido apareado correctamente (A en el par de bases A-T) se muestra en la parte superior, y la correspondiente a la extensión a partir de un apareamiento erróneo C-T se muestra en la parte inferior. El dTTP era el único dNTP presente durante las incubaciones. En cada caso, los productos obtenidos tras la incubación y desnaturalización se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y autorradiografía. En el cuadro superior se muestra que la velocidad de la extensión fue máxima con dTTP 1  $\mu\text{M}$  y que podía detectarse una nueva extensión a concentraciones de dTTP más elevadas. Sin embargo, como se observa en el cuadro inferior, son necesarias concentraciones de dTTP del orden mM para observar alguna extensión de cadena a partir del error de apareamiento.

## Virus de RNA: la replicación de genomas de RNA

Casi todos los virus vegetales que se conocen contienen RNA en vez de DNA; al igual que ocurre con varios bacteriófagos y muchos virus animales importantes. Los retrovirus, causantes en muchas ocasiones de tumores y del SIDA contienen también genomas de RNA.

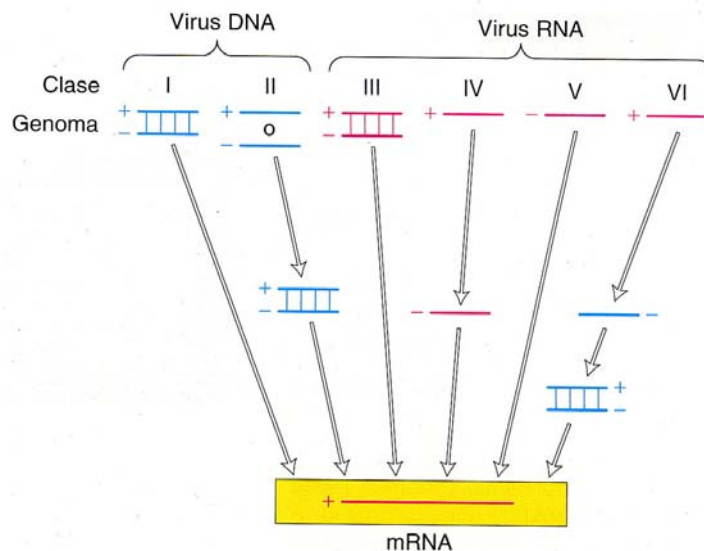
Estrategias diferentes para la replicación del genoma

### Virus de cadena positiva .

- a) Replicasas RNA polimerasas dependientes de RNA; carecen de actividad correctora
- b) Transcriptasa inversa

### Virus de cadena negativa

#### Genoma de RNA de doble cadena o segmentado



#### Clasificación de virus animales sobre la base de la composición de sus genomas y vía de formación de mRNA

Se muestra el DNA en azul y el RNA en rojo. El mRNA viral se denomina hebra positiva, que es sintetizada a partir de una cadena menos de DNA o de RNA. Los virus de la clase VI (retrovirus) tienen dos hebras positivas idénticas de RNA genómico, aunque el motivo se desconoce.

**CUADRO 6-3** Virus animales de uso común en biología molecular

| Clase*/Virus                                 | Huéspedes conocidos              | Tamaño del genoma (kb) <sup>†</sup> | Envoltura | Otras propiedades                                                                                                                   | Áreas de la investigación en las que se aplican los virus                                                  |
|----------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CLASE I (DNA)                                |                                  |                                     |           |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| Adenovirus (clase Ia)                        | Vertebrados                      | 36                                  | No        | Se replica en el núcleo de la célula huésped; usa las enzimas del huésped para la síntesis de mRNA viral                            | Síntesis y regulación de mRNA; replicación de DNA; transformación celular; terapia génica (como vectores)  |
| Herpesvirus (clase Ia)                       | Vertebrados                      | 150                                 | Sí        |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| SV40 (clase Ia)                              | Primates                         | 5,5                                 | No        |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| Virus vacuna (clase Ib)                      | Vertebrados                      | 200                                 | Sí        |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| CLASE II (DNA)                               |                                  |                                     |           |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| Parvovirus                                   | Vertebrados                      | 5                                   | No        | Tiene genoma DNA monocatenario lineal                                                                                               | Replicación de DNA; terapia génica (como vectores)                                                         |
| CLASE III (RNA)                              |                                  |                                     |           |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| Retrovirus                                   | Vertebrados                      | 1,2–4,00 <sup>‡</sup>               | No        | Tiene un genoma de 10 segmentos de RNA bicatenario; usa las enzimas virales para la replicación                                     | Síntesis de mRNA por enzimas virales; traducción de mRNA                                                   |
| CLASE IV (RNA)                               |                                  |                                     |           |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| Virus de la polio (clase IVa)                | Primates                         | 7                                   | No        | Sintetiza un único mRNA, el cual se traduce a una poliproteína que es escindida para dar proteínas funcionales                      | Replicación de RNA viral; interrupción de traducción de mRNA del huésped; escisión de poliproteína         |
| Virus Sindbis (clase IVb)                    | Vertebrados, insectos            | 10                                  | Sí        | Sintetiza por lo menos dos mRNA, cada uno de los cuales se traduce a una poliproteína que se escinde para dar proteínas funcionales | Formación de membrana; biosíntesis y transporte intracelular de glucoproteínas                             |
| CLASE V (RNA)                                |                                  |                                     |           |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| Virus de la estomatitis vesicular (clase Va) | Vertebrados, insectos            | 12                                  | Sí        | Posee una RNAPolimerasa específica del virus, que produce varios mRNA a partir del genoma no segmentado                             | Formación de membrana; biosíntesis y transporte intracelular de glucoproteínas                             |
| Influenza virus (clase Vb)                   | Mamíferos, aves                  | 1,0–3,3 <sup>‡</sup>                | Sí        | Posee un genoma de 8 segmentos de RNA monocatenario; utiliza una RNAPolimerasa específica del virus para producir mRNA              | Formación de membrana; biosíntesis y transporte intracelular de glucoproteínas; prevención de enfermedades |
| CLASE VI (RNA)                               |                                  |                                     |           |                                                                                                                                     |                                                                                                            |
| Retrovirus                                   | Vertebrados, insectos, levaduras | 5–8                                 | Sí        | Copia el genoma RNA a DNA mediante la transcripción inversa viral; integra el DNA viral al genoma del huésped                       | Transformación celular; función de oncogenes; SIDA; terapia génica (como vectores)                         |

\* La clasificación se basa en la composición del genoma y en la estrategia para la síntesis de mRNA según se muestra en la figura 6-20.

<sup>†</sup> Tamaño en kilobases (1 kb = 1.000 nucleótidos) para los ácidos nucleicos monocatenarios y en kilopares de bases para los bicatenarios.

<sup>‡</sup> Los reovirus y el virus influenza tienen genomas de RNA segmentado; la longitud de cada segmento se encuentra en el rango indicado.