

# 5. BIOSINTESIS DEL DNA

---

# **ESQUEMA. Biosíntesis del DNA**

---

## **1. Introducción**

- **Hitos en la investigación en el DNA**
- **Importancia en la investigación en DNA**
- **El DNA: estructura y funciones**

## **2. El DNA superenrollado y topoisomerasas**

- **El DNA superenrollado (supercoiled)**
- **Topoisomerasas: topoisomerasas tipo I y tipo II ó DNA girasas**

## **3. La horquilla de replicación**

- **Las estructuras  $\theta$**
- **La DNA girasa**
- **Modelo de replicación semidiscontinua**

## HISTORIA. Hitos en la investigación en el DNA (I)

<http://www.dnai.org/timeline/index.html>

---

### **1869. Miescher:** Aislamiento de los **ácidos nucleicos**

Sustancia de carácter débilmente ácido presente en leucocitos y de función desconocida. Se llamó ácido desoxirribonucleico o DNA

### **1886. Mendel:** **Leyes de la herencia**

2 factores determinan un carácter & cada uno de ellos es heredado de un progenitor

### **1912. Bragg:** **Difracción de rayos X**

La estructura atómica de un cristal puede deducirse a partir del patrón de difracción de rayos X

Fue una técnica clave para determinar la estructura del DNA

### **1924.** Estudios de microscopía indican que tanto el DNA como las proteínas se encuentran presentes en los cromosomas

## HISTORIA. Hitos en la investigación en el DNA (II)

---

### 1928. Griffith: Transformación

La información genética puede transmitirse desde una bacteria muerta por calor a otra viva. El material genético es una molécula termoestable

### 1930. Beadle & Tatum: relación entre genes y proteínas

Hipótesis de “un gen – una proteína”

### 1944. Avery, McLeod & McCarty: El agente transformador de las bacterias de Griffith es el DNA

### El DNA, y no las proteínas, es la molécula de la herencia

Gran escepticismo en la comunidad científica debido a la que el DNA presenta un estructura “demasiado simple”

## Historia. Hitos en la investigación en el DNA (III)

---

### 1949. Chargaff: Leyes de Chargaff

La composición del DNA es específica para cada especie, pero varía de una especie a otra

Siempre se cumple que la cantidad de **A = T** & **G = C**

### 1952. Franklin & Wilkins: Imágenes de difracción de rayos X del DNA

Claves para elucidar la estructura del DNA

### 1953. Watson & Crick: Estructura del DNA

Basada en las leyes de Chargaff y en la fotografía 51 de Franklin

La estructura del DNA implica también un posible modelo de replicación

### 1957. Crick: Dogma central de la Biología Molecular

**DNA → RNA → Proteína**

## Historia. Hitos en la investigación en el DNA (IV)

---

**1958. Meselson & Stahl: Modelo semiconservativo** de la replicación del DNA

**1961. Jacob & Monod: RNA**

Es la molécula intermediaria en la síntesis de proteínas

**Hall & Spiegelman:** Hibridación de DNA & RNA

**Crick & Brenner. El código genético**

El código genético está formado por tripletes no solapantes

**Yanofky:** Los genes son colineales con los polipéptidos que codifican

**1962. Crick, Watson & Wilkins:** Premio Nobel

Concedido por determinar la estructura del DNA

**1961-65. Descifrado del código genético.** Papel de Ochoa

**1968. Okazaki: Fragmentos de Okazaki**

Modelo para la síntesis de la hebra rezagada

## Historia. Hitos en la investigación en el DNA (V)

---

**1970. Hamilton Smith:** Aislamiento de la primera **enzima de restricción**

**Temin and Baltimore:** Descubrimiento de la **retrotranscriptasa**

Replanteamiento del dogma central de la Biología Molecular

**1972. Cohen & Boyer:** Tecnología del DNA recombinante

**1975. Kronberg:** Estructura de la cromatina

**1975-1977. Método de Sanger**

Perfeccionamiento de las técnicas de secuenciación del DNA

**1978. Clonación** del primer gen humano (insulina)

**1980s.** Empleo de insulina humana recombinante para el tratamiento de la diabetes

**Prusiner:** Acuña el término de **prion**

**Mullis. PCR**

## Historia. Hitos en la investigación en el DNA (VI)

---

### 1990s. Fodor & Brown: DNA chips & Microarrays

**Venter:** 1° secuencia completa de un organismo vivo (*H. influenzae*)

**Ingeniería genética:** Era de los organismos transgénicos

### 2000s. Proyecto Genoma Humano. Controversia Craig Venter & Celera

Avance muy rápido del conocimiento y de las técnicas en Biología Molecular

Aplicaciones Biomédicas & Biotecnológicas

### 2010. Venter

Generación del primer organismo cuyo DNA es completamente artificial (*Mycoplasma mycoides*)



# IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION EN EL DNA

---

## **Comprender las bases moleculares de la herencia**

Determinar la transmisión de caracteres hereditarios

**Creación de organismos genéticamente modificados (GMOs)** que presenten ciertas ventajas: terapia génica, alimentos transgénicos, producción de fármacos, bioingeniería, biorremediación etc

**Aplicaciones biomédicas:** enfermedades hereditarias

## **Nuevos avances y técnicas en investigación**

**La información genética** ha de pasar de una generación a otra con la mayor fidelidad posible, tanto en organismos sencillos (ej. bacterias) como en complejos (ej. animales)

# ESTRUCTURA DEL DNA (I)

---

**El DNA** es el portador de la información genética

## Funciones

**Replicación:** transmisión de los caracteres hereditarios a la descendencia

Paso de la información genética de una generación a otra sin errores, tanto en organismos sencillos (ej. bacterias) como en complejos (ej. mamíferos)

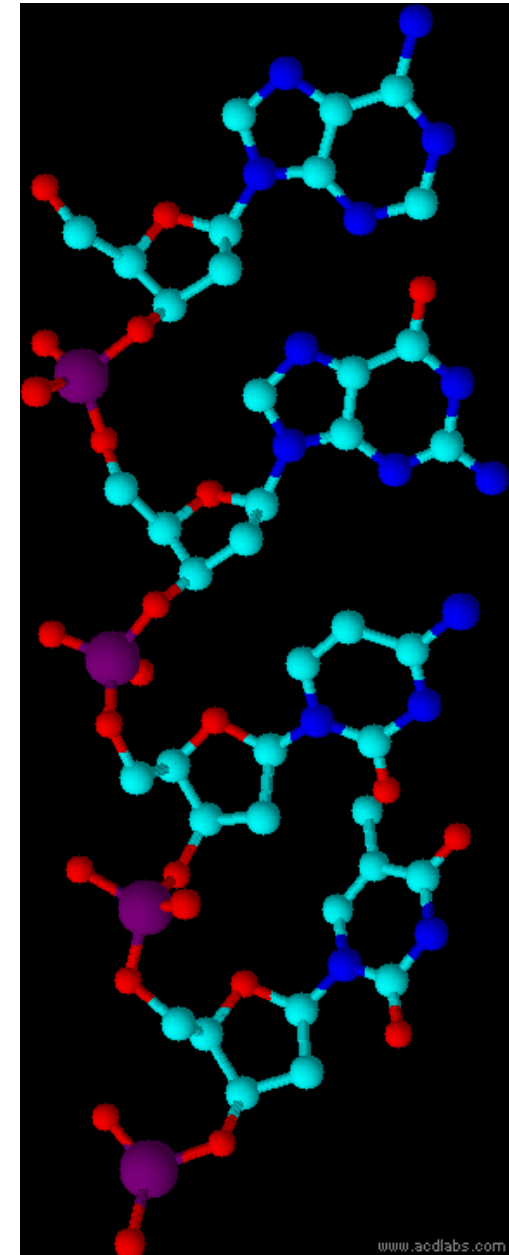
Errores en la replicación: mutaciones y posibilidad de evolución

**Transcripción DNA → RNA**

## Composición química

Desoxirribonucleótidos con 4 bases nitrogenadas:  
A, G, T & C

La composición química exacta es específica de cada especie, y difiere de una especie a otra



## Estructura del DNA (II)

**Polímero lineal** de desoxirribonucleótidos unidos entre sí mediante enlaces fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' de la desoxirribosa

### Doble hélice antiparalela

Una cadena es 5' → 3' y la otra, 3' → 5'

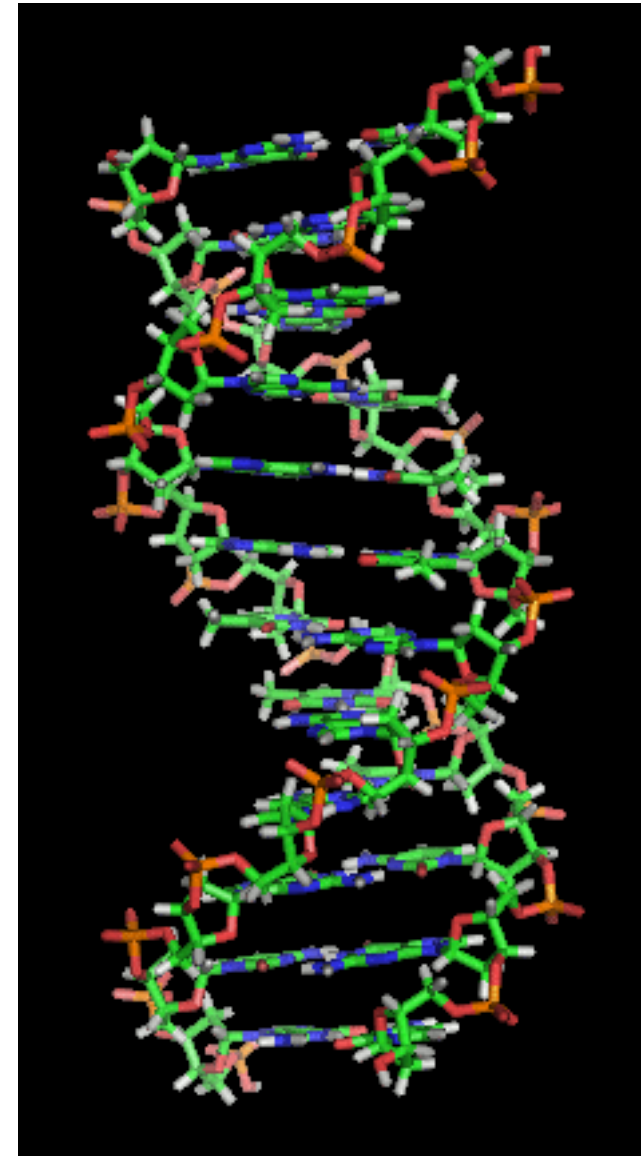
$$\Phi = 20 \text{ \AA}$$

Enrollamiento plectonómico dextrógiro: las dos hebras no pueden separarse sin desenrollar la hélice

El esqueleto carbonado y los grupos fosfato se sitúan en la parte externa para evitar las repulsiones electrostáticas

Las bases nitrogenadas se sitúan en el interior

10 bases por vuelta de hélice



*Fuente de la imagen*

<http://en.wikipedia.org/wiki/Category:Biochemistry>  
Creative Commons Attribution-Share Alike license

# Estructura del DNA (III)

---

## Apareamiento de bases por puentes de hidrógeno

**A = T:** 2 puentes de hidrógeno

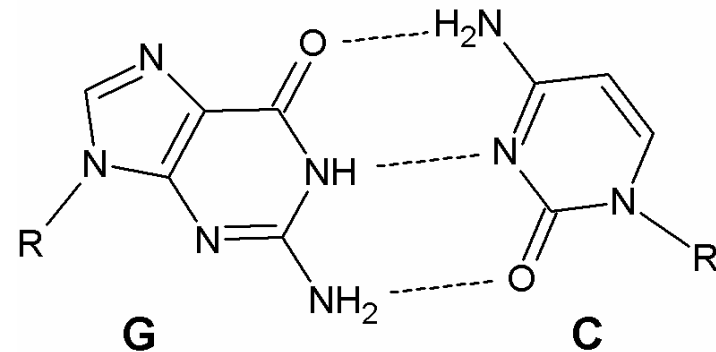
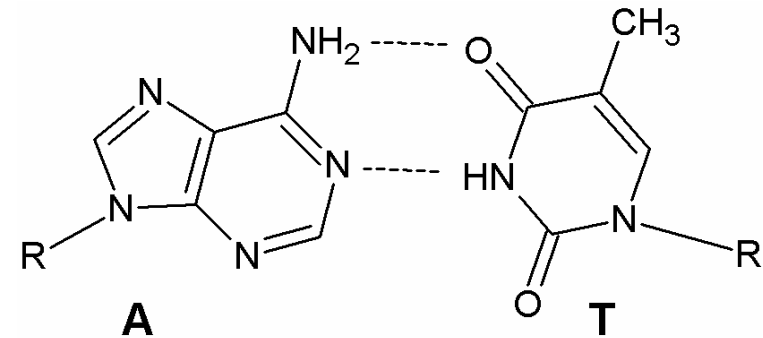
**G = C:** 3 puentes de hidrógeno

Los residuos aromáticos de las bases nitrogenadas son planares

Las bases se sitúan paralelamente entre sí, y perpendicularmente al eje de la hélice

Interacciones hidrofóbicas entre las bases de la misma cadena ayudan a la estabilización de la hélice

## Complementariedad de bases



## Estructura del DNA (IV)

---

### **La doble hélice del DNA presenta dos tipos de surco: mayor y menor**

Dichos surcos, junto con alteraciones en la conformación del DNA debido a la secuencia específica de bases nitrogenadas, juegan un papel determinante en el acceso de diversas proteínas al DNA

### **3 conformaciones posibles para el DNA: A, B & Z**

Las distintas conformaciones que puede adoptar el DNA dependen de:

- la composición en  $\%(G+C)$  y  $\%(A+T)$
- el grado de solvatación
- la presencia de distintos cationes en el medio

**La información hereditaria** se localiza en la secuencia de bases de cada cadena nucleotídica

**La propia estructura del DNA** aporta un posible mecanismo de replicación

# LA REPLICACION DEL DNA ES SEMICONSERVATIVA

---

## 3 posibles modelos de replicación del DNA

- conservativo
- semiconservativo
- disperso

## Experimento de Meselson y Stahl

Marcaje radiactivo del DNA con  $N^{15}$  y centrifugación en gradiente de densidad de CsCl

DNA parental:  $N^{15}$

Cada molécula de DNA “hijo” posee una cadena paterna y otra de nueva síntesis ( $\frac{1}{2} N^{14}$  &  $\frac{1}{2} N^{15}$ ), por lo que presenta una densidad intermedia

En la siguiente ronda de replicación, hay cadenas con densidad intermedia y otras con densidad de  $N^{14}$

→ **El modelo semiconservativo es el correcto**

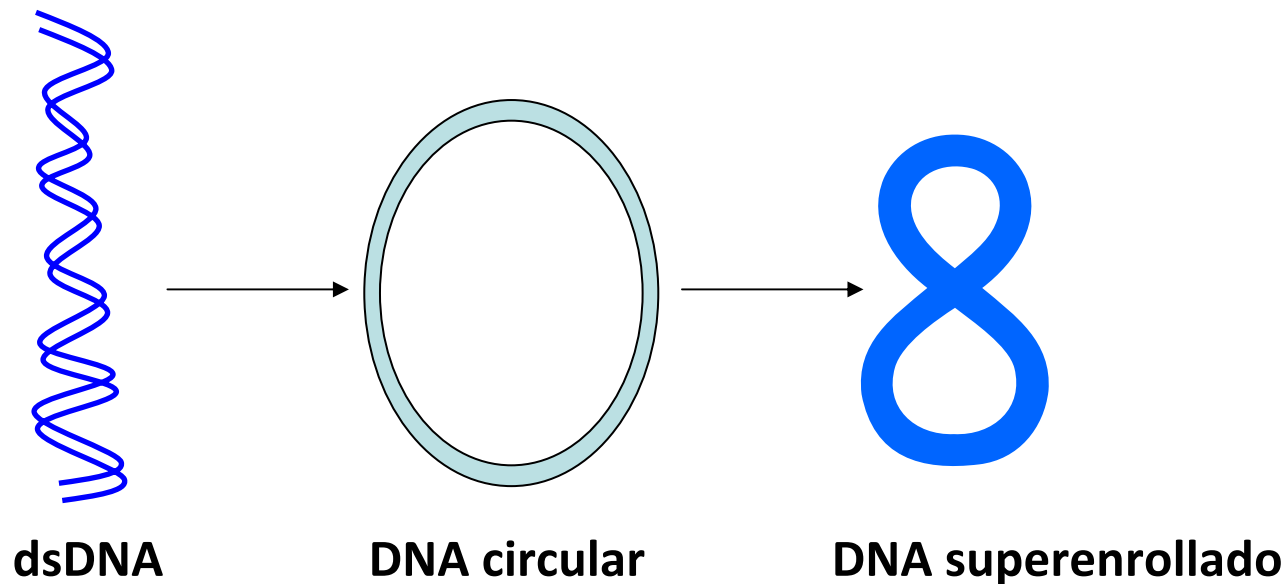
Cada una de las cadenas de la doble hélice original actúa como molde para la síntesis de la cadena complementaria

## DNA SUPERENROLLADO = *supercoiled DNA* (I)

---

Los DNAs circulares suelen adoptar una conformación superenrollada

En estos DNAs, el número de vueltas no puede alterarse sin romper al menos un enlace covalente de una hebra



## DNA superenrollado = *supercoiled DNA* (II)

---

La topología de una superhélice puede expresarse como  $L = T + W$

### **L: número de enlace o “*linking number*”**

Número de veces que una hebra de DNA se enrolla sobre la otra

Permanece inalterado siempre que no se rompan los enlaces covalentes

Es una propiedad topológica de la molécula

### **T: número de giro o “*twist*”**

Número total de vueltas de una hebra de DNA sobre el eje del dúplex en una determinada conformación

### **W: número de torsión o “*writhing number*”**

Número de vueltas que el eje dúplex realiza sobre el eje de la hélice en una determinada conformación



## DNA superenrollado = *supercoiled DNA* (III)

---

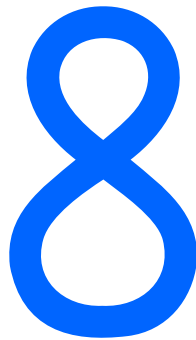
### Superenrollamiento hacia la derecha = negativo

Ayuda a abrir la hélice ó a relajarla

### Superenrollamiento hacia la izquierda = positivo

Aumenta la torsión

Los superenrollamientos pueden ser *trenzados (= interwound)* ó *toroidales*



**trenzado = interwound**  
sobre el propio eje dúplex



### **toroidal**

el eje dúplex se enrolla sobre otra estructura cilíndrica

Ejemplo: sobre una estructura proteica

## DNA superenrollado = *supercoiled DNA* (IV)

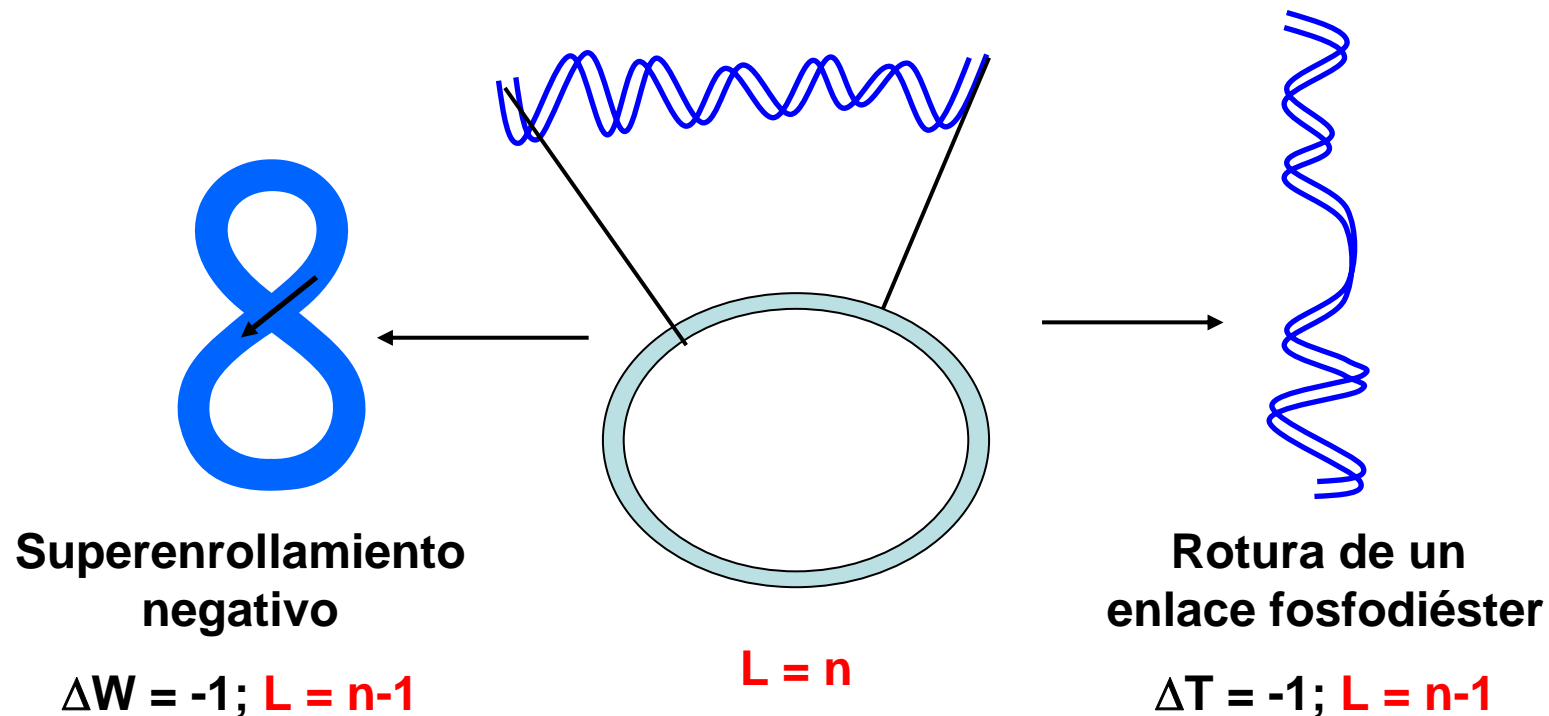
---

Existen **conformaciones topológicamente equivalentes**

### Topoisómeros

Conformaciones del DNA topológicamente equivalentes

Por ejemplo: desenrollar una vuelta el DNA ó introducir un superenrollamiento negativo disminuyen el numero de enlace en una unidad:  $\Delta L = -1$



# TOPOISOMERASAS

---

Enzimas que eliminan ó introducen superenrollamientos

Determinan el grado de superenrollamiento del DNA

→ **Alteran el estado topológico, pero no la estructura covalente**

Acción imprescindible para que la replicación y la transcripción tengan lugar

## 2 Tipos de topoisomerasas

### Tipo I

Rotura de una sola cadena de DNA

No necesitan aporte  $\epsilon$

### Tipo II ó DNA girasas

Roturas en las dos cadenas de DNA

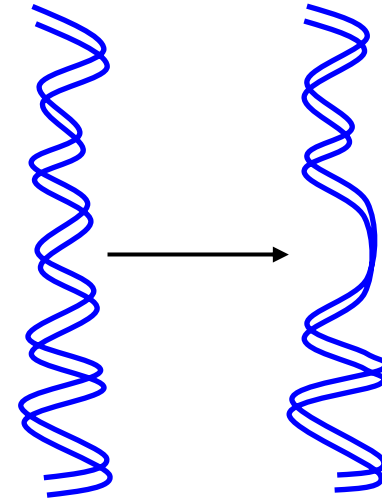
Hidrólisis de ATP

## Topoisomerasas tipo I o “nicking-closing enzymes” (I)

---

### Relajan el DNA superenrollado

- catalizan la introducción de superenrollamientos negativos
- **reducen el número “L” en una vuelta** ó unidad por ciclo, hasta que el superenrollamiento está completamente relajado
- no necesitan de aporte  $\varepsilon$



### Pasos

1. La enzima rompe un enlace covalente en una de las cadenas
2. Unión de la cadena de DNA a la proteína a través de un **enlace fosfodiéster** con un residuo de **Tyr** (ataque nucleofílico del  $-OH$  de la Tyr a un enlace fosfodiéster y posterior trans-esterificación) y un grupo  $-OH$  libre en el DNA  
→ **se preserva la  $\varepsilon$**  almacenada en el enlace fosfodiéster
2. Paso de una vuelta de la cadena intacta por la rotura
3. La enzima repara el enlace

# Estructura de las topoisomerasas tipo I

---

**Monómeros** de 100 Kda

Presentes en procariontes y eucariontes

## Estructura

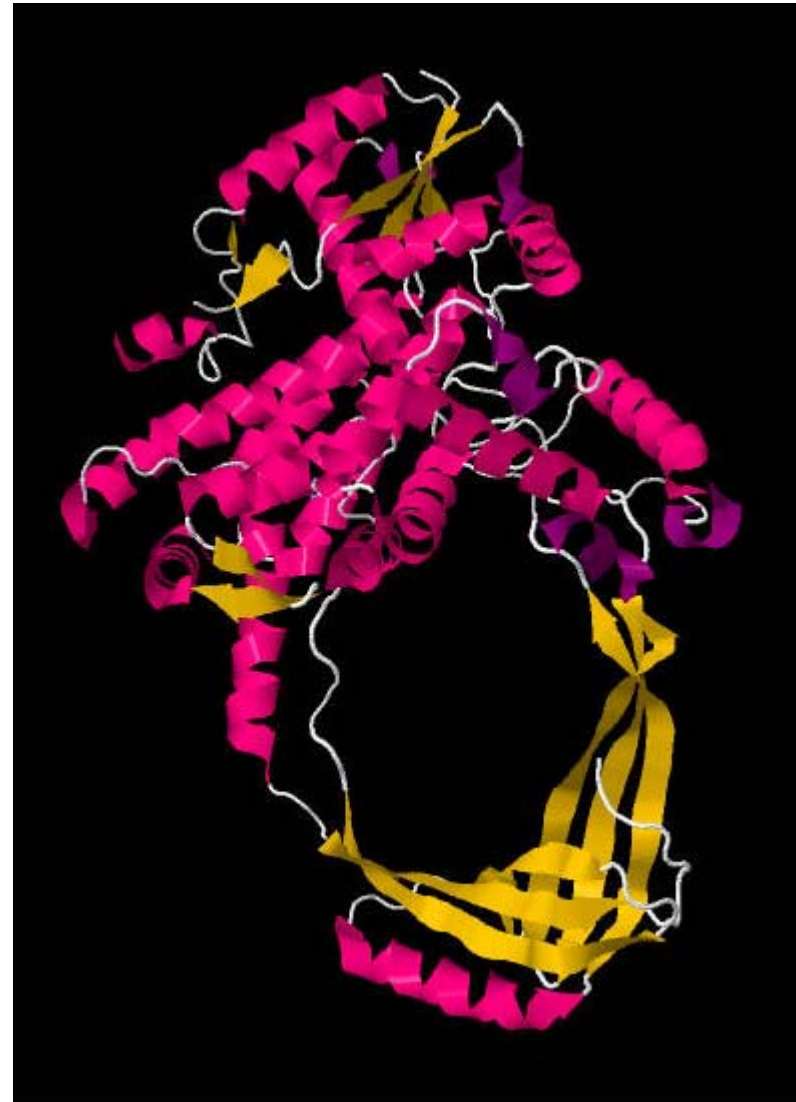
- formada por 4 dominios
- forma de “pinza”
- una cavidad central que permite acomodar una doble hélice de DNA
- la superficie interna de dicha cavidad presenta cargas  $Q^+$ , lo que permite la estabilización del DNA

## Camptotecina

Inhibidor de la Topo I

Impide la religación del DNA

Empleado en Quimioterapia



*Fuente de la imagen: RCSB PDB. N. acceso: 1CY0*

## Topoisomerasas tipo II o DNA girasas

---

**Heterodímero de 375 KDa** (subunidad A -105 KDa- & B -95 KDa-)

Cataliza superenrollamientos negativos acoplados a la **hidrólisis de ATP**

→ la **DNA girasa convierte la  $\epsilon$  del ATP en  $\epsilon$  de torsión del superenrollamiento**

### Estructura

Los extremos C-terminales presentan gran cantidad de residuos de Arg que actúan como superficie de unión al DNA

**En procariontes:** genera superenrollamientos negativos (9 Kcal/mol)

**En eucariontes:** relaja superenrollamientos positivos (importancia en la replicación)

### Importancia de la DNA girasa

- La replicación del DNA implica la apertura de la doble hélice, por lo que se producen superenrollamientos en otras partes de la molécula
- Estos superenrollamientos han de ser eliminados por medio de la DNA girasa con gasto de ATP

## Topoisomerasas tipo II o DNA girasas (II)

---

### Mecanismo de inversión de signo

Conversión de un superenrollamiento toroidal hacia la derecha en otro enrollado hacia la izquierda

→ **El número de enlace disminuye en dos unidades**

= se introducen dos vueltas por reacción

1. Se unen **dos heterodímeros** y **200bp del DNA** se enrollan sobre la DNA girasa
2. Unión del **ATP** y **corte** en las **dos cadenas**  
Se producen roturas en las dos cadenas del DNA
3. **Unión covalente** a residuos de **Tyr** de la subunidad A  
Este anclaje evita la libre rotación de la hélice de DNA
3. **Paso del DNA** dúplex por la rotura
4. **Sellado** de la rotura
5. **Hidrólisis del ATP** y separación de la girasa del DNA

## Topoisomerasas tipo II o DNA girasas (III)

---

### DNA girasas bacterianas

Dianas farmacológicas para antibióticos: se inhibe la replicación y la transcripción

- **Novobiocina**

se une a la subunidad B de la DNA girasa y evita la unión del ATP a la enzima

- **Acido oxolínico**

se une a la subunidad A de la DNA girasa y parece que bloquea el sellado de la rotura

- **Acido nalidíxico**: bloquea el corte y religación de las cadenas de DNA

- **Ciprofloxacina**

### DNA girasas eucarióticas

Dianas farmacológicas en quimioterapia

- **Doxorubicina**

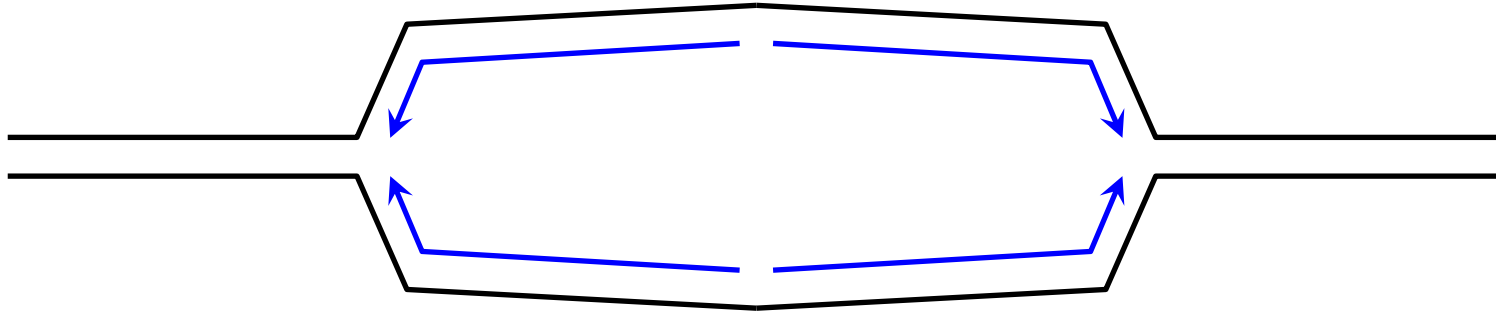
Inhibidor de la Topo II

Se intercala en el DNA e impide la progresión de la enzima



# LA HORQUILLA DE REPLICACION

---



## Estructuras $\theta$

Autorradiografías con [ $^3\text{H}$ ]-timina: en la replicación del DNA circular de bacterias aparecen estructuras en forma de ojo ó burbuja → **Estructuras  $\theta$**

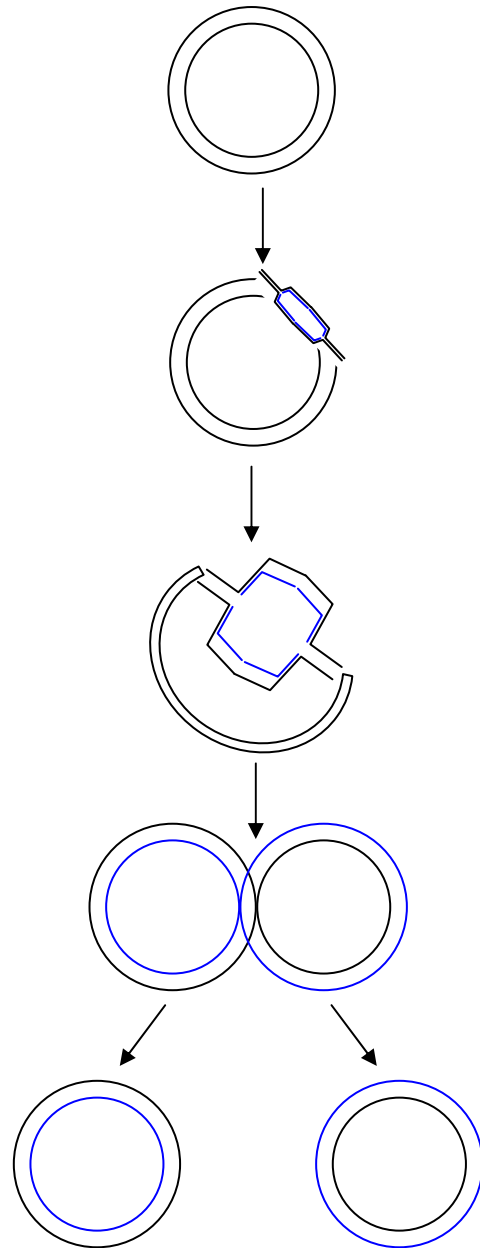
Las dos cadenas del dsDNA paterno se separan y se sintetizan las cadenas complementarias en las dos direcciones → **Replicación bidireccional**

Cada burbuja de replicación presenta dos **horquillas de replicación**

Las horquillas de replicación de la burbuja se mueven en sentidos opuestos hasta completar la replicación del cromosoma circular bacteriano (al lado opuesto del origen)

## La horquilla de replicación (II)

---



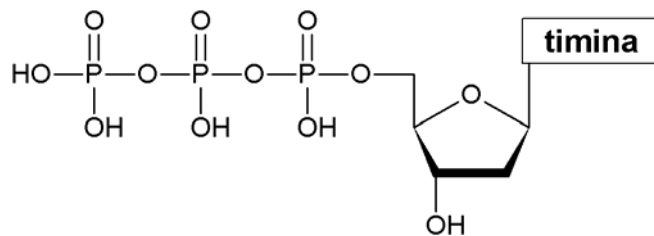
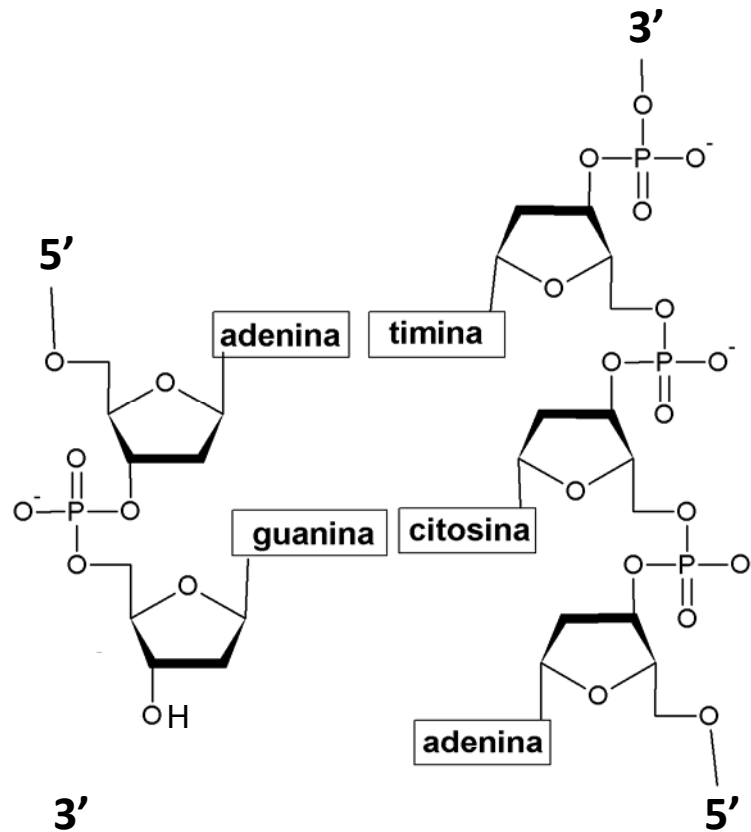
### Replicación del cromosoma de *E. coli*

- Existe **un solo origen de replicación** por cromosoma con 2 horquillas (= 1 estructura  $\theta$ )
- Punto donde comienza la replicación: **Ori C**
- Replicación bidireccional
- Separación de las dos hebras hijas de dsDNA con la ayuda de una **topoisomerasa**

### Superenrollamientos

- Replicación del DNA  $\rightarrow$  apertura de la doble hélice y formación de superenrollamientos
- Eliminación por la DNA girasa con gasto de ATP

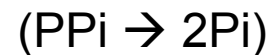
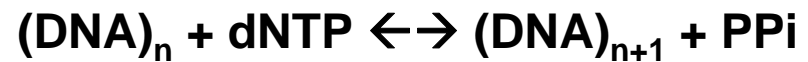
# DNA-POLIMERASAS



El DNA es replicado por

**DNA polimerasas (DNA-dependientes)**

Polimerización de **dNTPs**



Unión del dNTP al extremo -OH 3' de la cadena naciente

## Mecanismo

Ataque nucleofílico del 3' -OH de la cadena cebadora sobre el  $\alpha$ -fosfato y formación de un enlace fosfodiéster

# DNA-polimerasas (II)

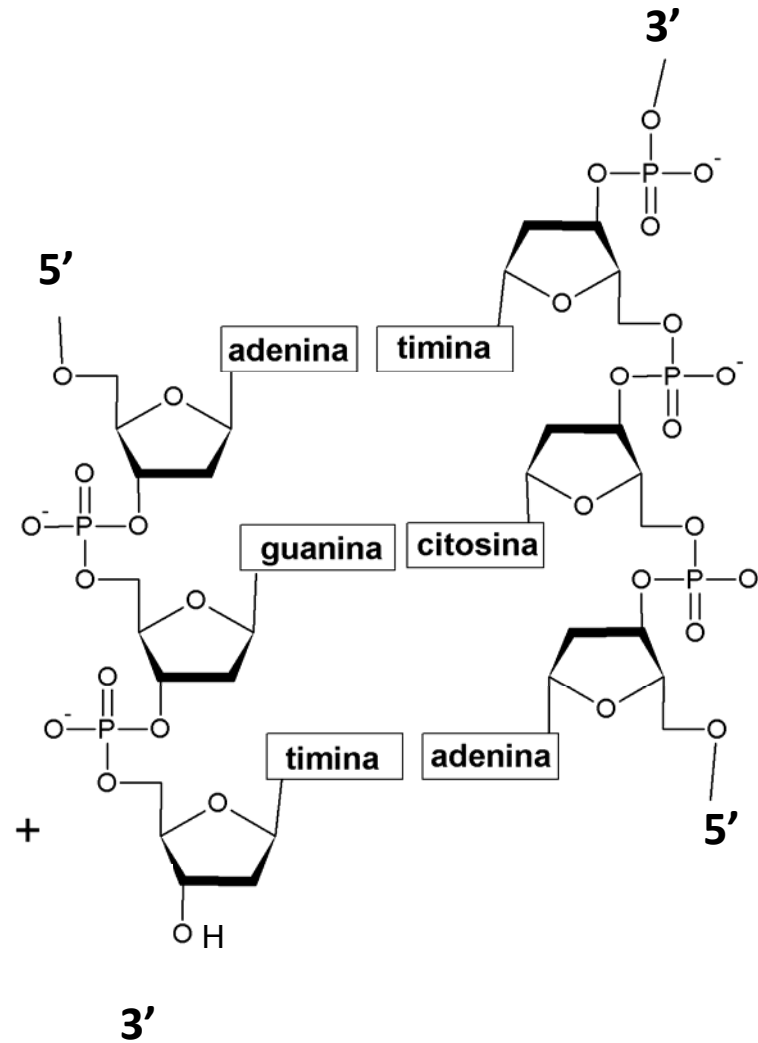
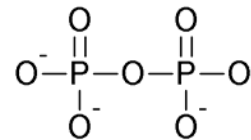
## Requisitos de la DNA polimerasa

Catión divalente:  $Mg^{2+}$

NO puede sintetizar una cadena de DNA *de novo*

**Molde ssDNA** : se añaden los nucleótidos con la base complementaria al presente en el molde

**Cebador**: extremo  $-OH$  libre en 3'



# MODELO DE REPLICACION SEMIDISCONTINUA

---

**Problema 1:** las dos cadenas del dsDNA son antiparalelas y la replicación sólo transcurre en sentido 5'→3'

**Solución:** dos sistemas distintos de replicación para cada hebra

## *Cadena conductora (leading strand)*

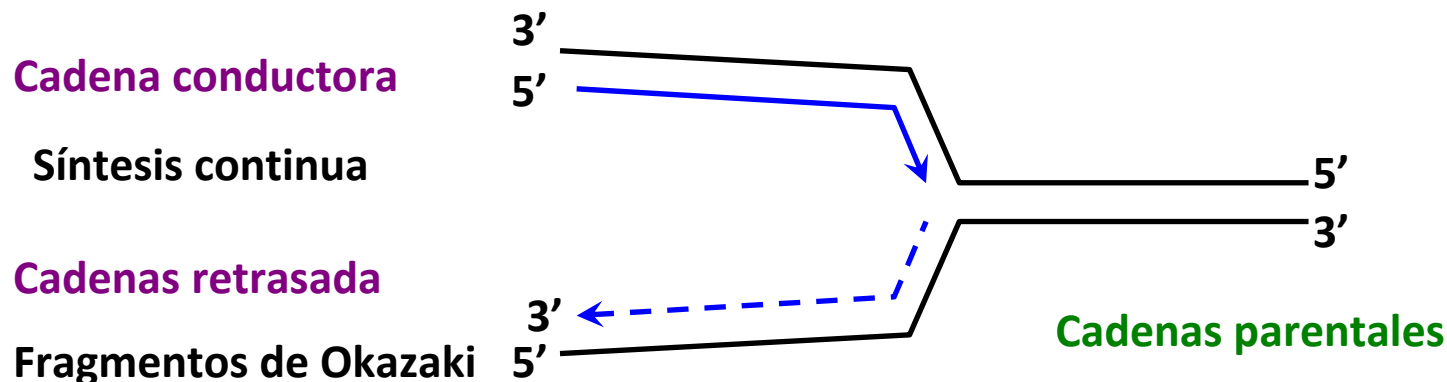
### Síntesis continua

El molde es 3'→5' y la nueva cadena de DNA se sintetiza 5'→3' de forma continua

## *Cadena rezagada (lagging strand)*

### Síntesis por Fragmentos de Okazaki

El molde es 5'→3' y la cadena de DNA se sintetiza de manera discontinua en fragmentos de 1000-2000 nucleótidos en dirección 5'→3' (100-200 nt en eucariontes)



## Biosíntesis de los cebadores de RNA

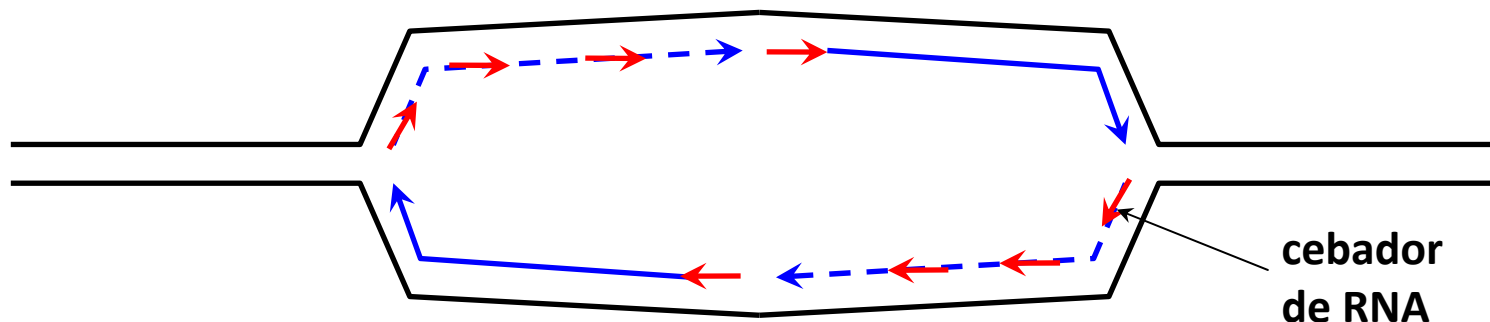
---

**Problema 2:** ¿Cómo se inicia la replicación si las DNA polimerasas necesitan un extremo  $-OH$  libre en  $3'$ ?

**Solución:** cebador de RNA en  $5'$  (“primer”) = oligonucleótido (1-60 bases) complementario al DNA al que se van uniendo los dNTPs

- En la cadena conductora:  
sintetizado por la **RNA primasa** (gen *dnaG*)  
**RNA polimerasa**
- En la cadena retrasada con fragmentos de Okazaki: los cebadores son sintetizados por la **RNA primasa**

La RNA polimerasa y la primasa forman parte del primosoma, y actúan de manera sinérgica en la replicación



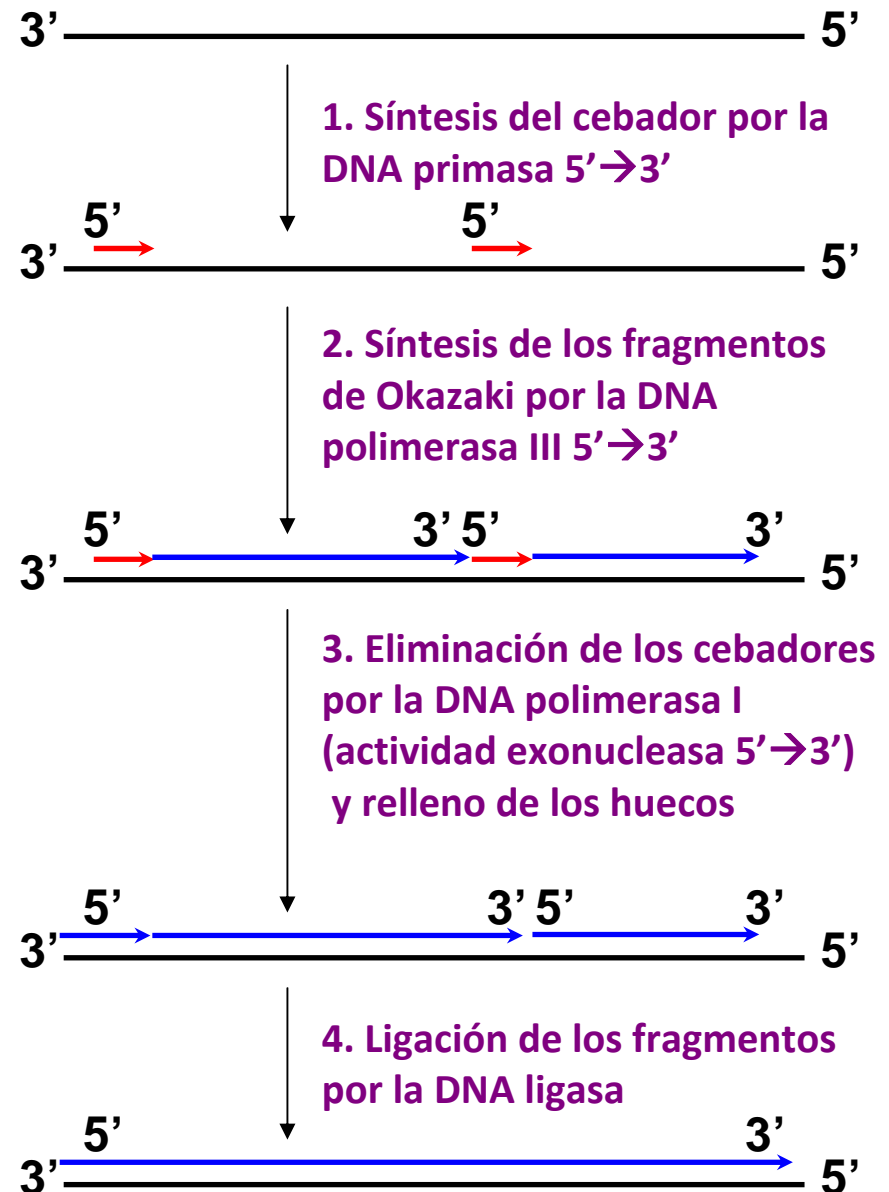
# Degradación de los cebadores de RNA

## Problema 3

Si el DNA no contiene ribonucleótidos, ¿cómo se eliminan los cebadores de RNA?

## Mecanismo

1. Eliminación de los cebadores de RNA por la **DNA polimerasa I**  
→ actividad **exonucleasa 5'→3'**
2. Los huecos en el DNA son rellenados por la **DNA polimerasa I**
3. Unión de los diversos fragmentos por la **DNA ligasa**



## Mecanismo de acción de las DNA ligasas

---

Catalizan la formación del enlace covalente fosfodiéster entre el grupo 3' –OH de un extremo y el grupo fosfato 5' del otro. Siempre en dsDNA

Necesidad de aporte  $\epsilon$ : Bacterias: **NAD<sup>+</sup>**  $\rightarrow$  NMN + Ppi

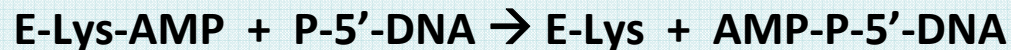
Animales: **ATP**  $\rightarrow$  AMP + PPI ( PPI  $\rightarrow$  2Pi)

### Mecanismo catalítico de la DNA ligasa eucariótica y del bacteriófago T4

1. Activación de la enzima:



2. Formación del enlace fosfoanhidro



3. Transesterificación

