

6. PROTEINAS RESPONSABLES DE LA REPLICACION DEL DNA

ESQUEMA. Proteínas responsables de la replicación del DNA

1. Proteínas implicadas en la replicación del DNA

2. DNA-polimerasa I

- **Características de la DNA Polimerasa I**
- **Estructura del fragmento Klenow**
- **Funciones *in vivo* de la DNA polimerasa I**

3. DNA-polimerasa III

- **Estructura del holoenzima Pol III**
- **Propiedades catalíticas del núcleo de la Pol III**

4. Otras proteínas

- **Helicasas**
- **Proteínas de unión al ssDNA**
- **Ligasas**

PROTEINAS IMPLICADAS EN LA REPLICACION DEL DNA (I)

DNA girasa (Topoisomerasa II)

Introduce superenrollamientos negativos y mantiene el DNA en su conformación topológica correcta. Elimina tensiones

Helicasa (Dna B)

Rompe puentes de hidrógeno, separando las dos cadenas de DNA

Proteínas de unión al ssDNA (SSBs)

Evitan la resociación de las dos cadenas de ssDNA y la formación de dsDNA
Estabilizan el DNA monocatenario

RNA primasa (Dna G) / RNA polimerasa

Síntesis de los cebadores de RNA

Ligasa

Enzima que une los diversos fragmentos de Okazaki entre sí

Proteínas implicadas en la replicación del DNA (II)

DNA polimerasas

Polimerización de dNTPs para formar una nueva cadena de DNA

Autocorrección de errores

Funciones conservadas en todos los organismos

Alta divergencia en las secuencias proteicas

DNA polimerasa I actividad exonucleasa 5' → 3' que elimina los cebadores de RNA

DNA polimerasa III: verdadera replicasa (holoenzima DNA Pol III)

DNA-polimerasa I

DNA-polimerasa DNA-dependiente

Descubierta por Kornberg (1957): cataliza la síntesis de DNA en extractos de *E. coli*

Necesita: dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP

DNA molde

Cebador

Mg²⁺ como cofactor

CARACTERÍSTICAS DE LA DNA POLIMERASA I (I)

- Polipéptido de 928 $\alpha\alpha$
- Cataliza el ataque nucleofílico del 3' -OH sobre el grupo α fosforilo del dNTP
 $(DNA)_n + dNTP \rightarrow (DNA)_{n+1} + PPI$
- La reacción está favorecida por la hidrólisis del pirofosfato ($PPI \rightarrow 2Pi$)
- Incorporación de los nucleótidos cuya base es complementaria a la del molde
La timina puede ser sustituida por 5-BrdU y la guanina por hipoxantina
- **Procesividad moderada**
Incorporación de 20 dNTPs sin despegarse del molde
- **Baja velocidad:** 16-20 dNTPs / segundo
- **Baja tasa de error**

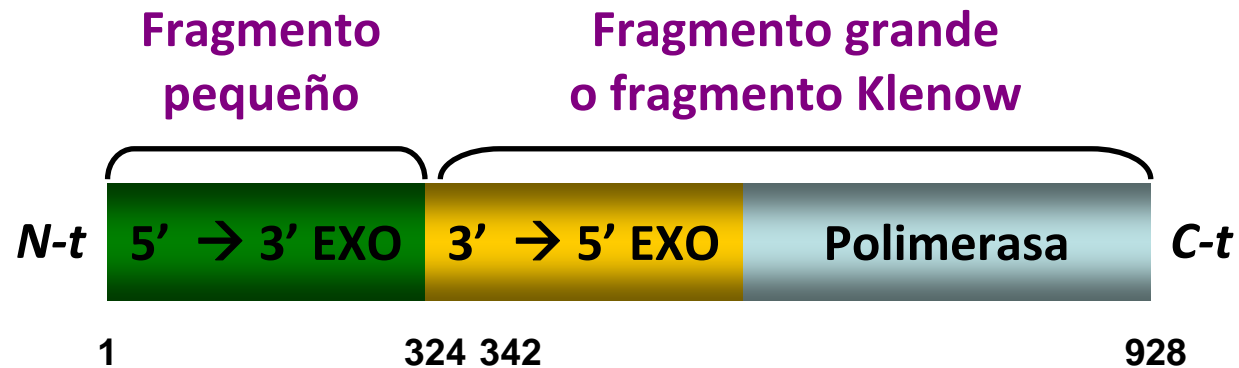
Características de la DNA polimerasa I (II)

3 sitios activos diferentes en el mismo polipéptido

Polimerasa
Exonucleasa 3'→5' } Fragmento Klenow ($\alpha\alpha$ 324-928)
Exonucleasa 5'→3' ($\alpha\alpha$ 1-323)

Actividad polimerasa

Función: Cataliza la formación de los nuevos enlaces fosfodiéster



Características de la DNA polimerasa I (III)

Actividad Exonucleasa 3'→5'

Función: **Actividad correctora de errores (*proofreading*)**

- hidrólisis de un nucleótido desapareado en 3' -OH → se libera un dNMP
- la actividad polimerasa se bloquea hasta que se elimina el nucleótido erróneo

Actividad Exonucleasa 5'→3'

Funciones:

Eliminación de los cebadores de RNA

Reparación del DNA

1. Unión a dsDNA en puntos de rotura (*nicks*)
2. Escisión de unos 10 nucleótidos, como mononucleótidos o como oligonucleótidos
3. El nucleótido 5' puede estar fosforilado ó no, con base apareada ó no

Estructura del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (I)

Determinación de la estructura por rayos X

Parecida a una mano, con palma, dedos y pulgar, asiendo un cilindro (=B-DNA)

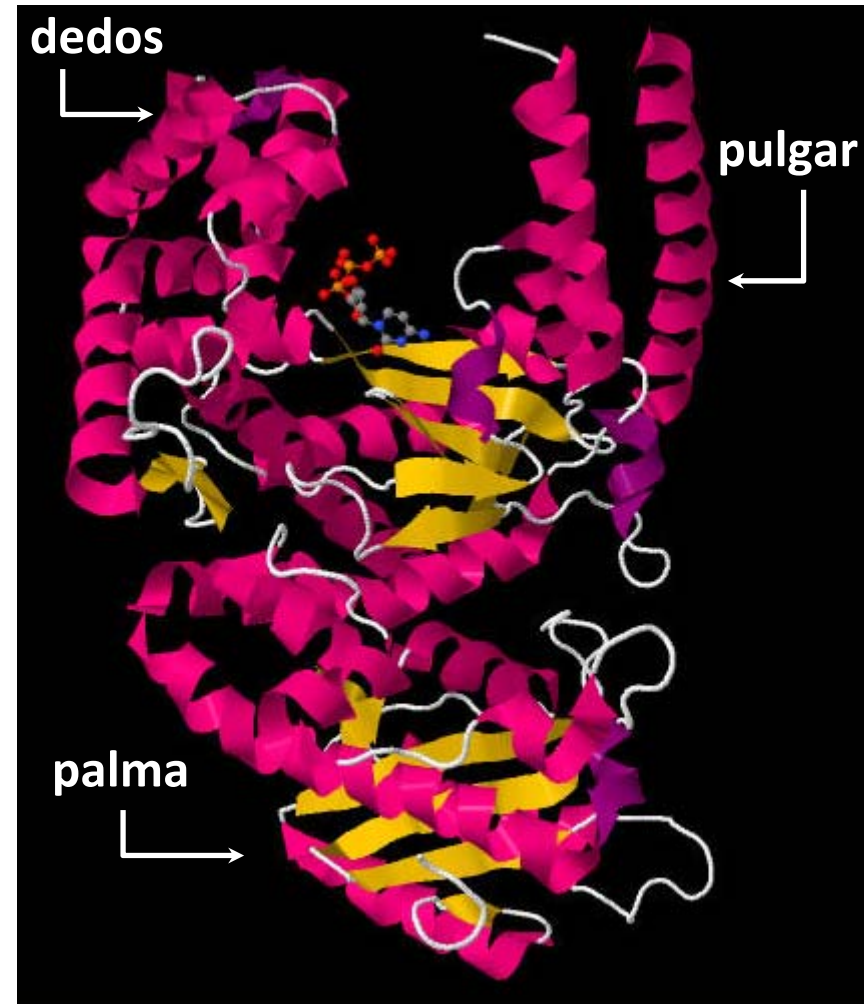
2 Dominios

Dominio mayor - **polimerasa (P)**

- en el “*pulgar*”
- hendidura profunda con $\alpha\alpha$ Q+ unión del dsDNA
- centro catalítico (P) y de unión a ssDNA

Dominio menor - **exonucleasa 3'→5' (E)**

- en la “*palma*”
- lejos de (P)
- disminuye x1000 la tasa de error (de 10^{-6} hasta 10^{-9})

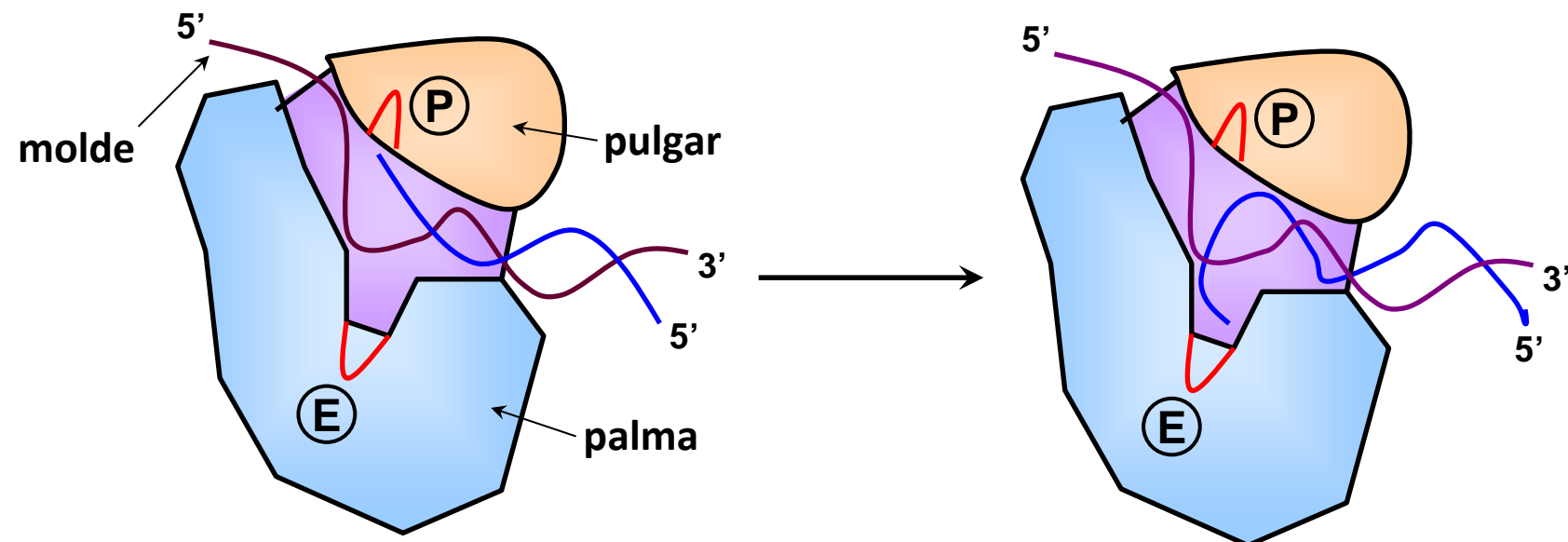


Mecanismo de reacción de la DNA polimerasa I

1. La cadena naciente interacciona con el centro “polimerasa (P)”
2. Enlace de un nuevo nucleótido sobre la cadena naciente
3. El nucleótido recién incorporado alterna entre los sitios polimerasa (P) y exonucleasa (E) sin disociarse de la enzima
4. Si este nucleótido es erróneo, la actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ lo escinde

“Pros”: gran fidelidad en la replicación = Replicación: proceso libre de errores
vs.

“Cons”: el 3% de los nucleótidos correctos también son escindidos, con el correspondiente gasto de ϵ



Funciones *in vivo* de la DNA polimerasa I (I)

Mutante de la DNA polimerasa I sin problemas en la replicación, pero más susceptible a la acción mutagénica de los rayos UV ó de ciertos agentes químicos

Reparación de errores en el DNA

1. La maquinaria de reparación detecta los errores en el DNA y produce un corte en el extremo 5' de la lesión
2. DNA Pol I: la actividad exonucleasa 5'→3' retira los nucleótidos erróneos
3. La actividad polimerasa rellena los huecos

Ventajas

1. La unión de un nucleótido correcto aumenta la movilidad de la polimerasa sobre la cadena molde
2. El DNA es protegido de la acción de otras nucleasas endógenas
3. Es más fácil eliminar un nucleótido erróneo antes de unirlo covalentemente

Funciones *in vivo* de la DNA polimerasa I (II)

“Nick translation”

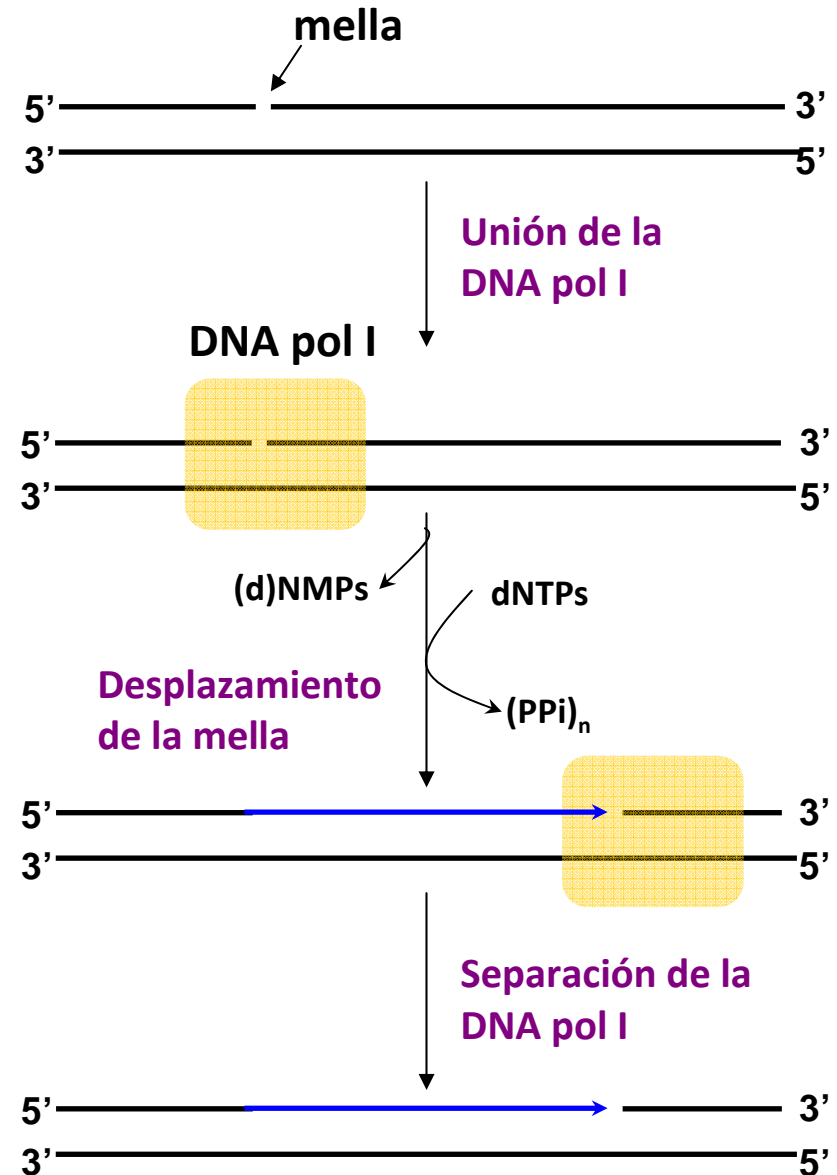
o desplazamiento de mella

Las actividades exonucleasa 5'→3' y polimerasa acopladas permiten sustituir los nucleótidos situados en el lado 5' de una mella en el DNA

1. La DNA pol I se sitúa sobre la mella
2. Eliminación de (d)NMPs y sustitución por dNTPs
3. Polimerización de dNTPs por la actividad polimerasa. El punto de corte se mueve hacia 3' sin modificar el DNA
4. Separación de la DNA pol I

Eliminación de los cebadores de RNA y relleno de los huecos

* *Importancia en la generación de sondas*



DNA POLIMERASAS DE *E. coli*

Características	DNA pol I	DNA pol II	DNA pol III
Gen estructural	<i>polA</i>	<i>polB</i>	<i>polC</i> (<i>dnaE</i>)
Subunidades	1	≥ 4	≥ 10
Act. 3'→5' EXO (proofreading)	si	si	Si
Act. 5'→3' EXO	si	no	no
Velocidad (nt/s)	16 - 20	40	250 – 1000
Procesividad	3 - 200	1500	≥ 500.000 (= ilimitada)
Funciones <i>in vivo</i>	Reparación de errores. Eliminación de cebadores de RNA	Reparación del DNA (respuesta SOS)	Replicación (verdadera replicasa)

Estructura del holoenzima DNA polimerasa III -Pol III- (I)

Complejo multimerico DNA polimerasa III

Holoenzima con al menos 10 actividades enzimáticas y 900 KDa

Formación de un **dímero asimétrico** para replicar las dos hebras de DNA de forma simultánea

Núcleo de la Pol III: $\alpha\epsilon\theta$

α . *polC* o *dnaE*: contiene la actividad **polimerasa**

ϵ . *dnaQ*: actividad **exonucleasa 3'→5'**. Editor ó corrector
aumenta x200 la fidelidad de la replicación

Proteínas que modulan la actividad del núcleo de Pol III y actúan como lugares de interacción de la polimerasa con el DNA y con otras proteínas

Complejo γ : $\gamma\delta\delta'\chi\psi$

Subunidad γ : ATPasa que aporta la ϵ necesaria “cargar” la pinza sobre el DNA

Subunidad τ : dimerización

Subunidad β : “pinza”

Estructura del holoenzima DNA polimerasa III -Pol III- (II)

Esquema de la estructura de la DNA polimerasa III

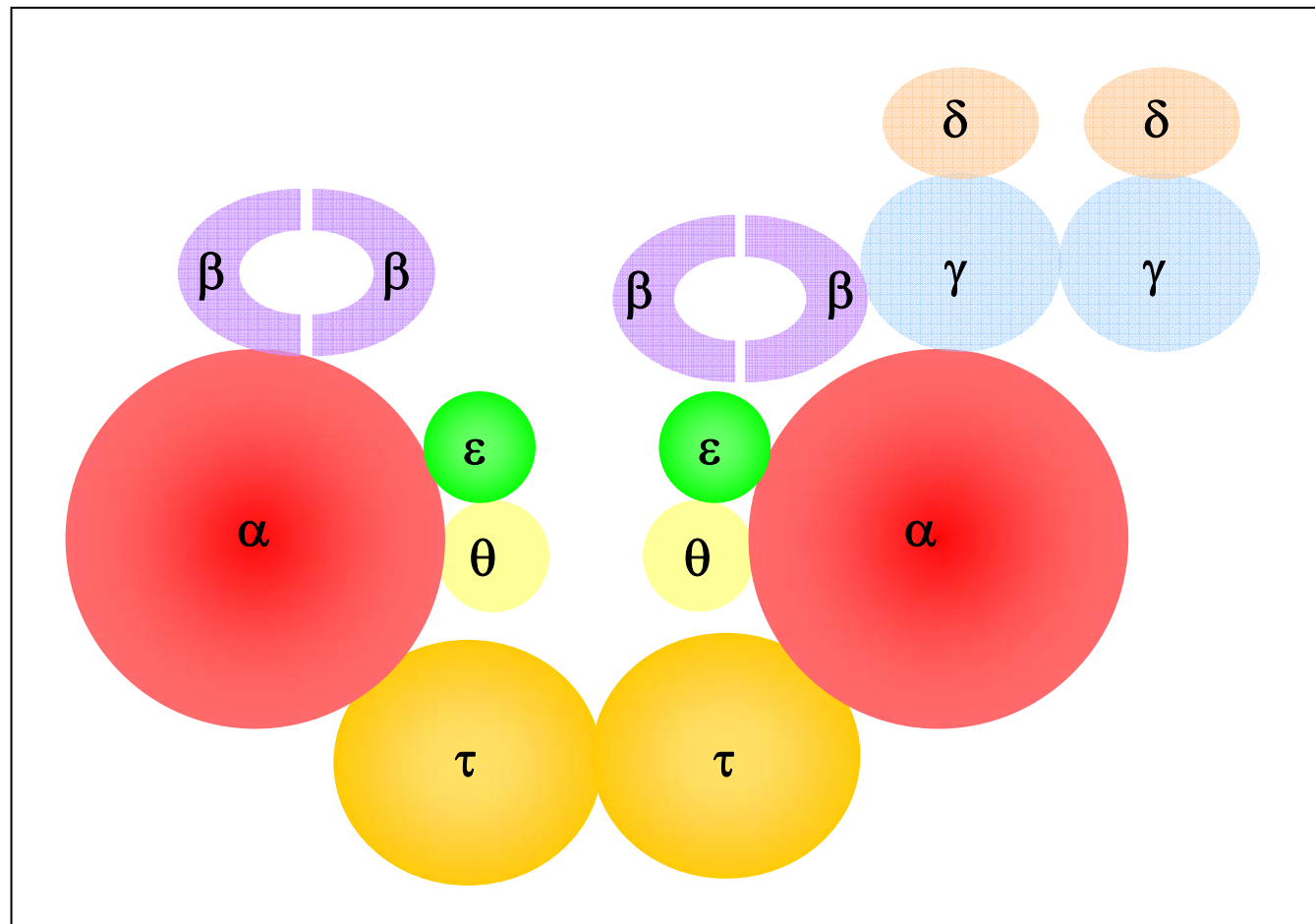
Núcleo de la polimerasa $\alpha\epsilon\theta$

Otras subunidades que modulan la actividad del núcleo de Pol III

subunidad β

complejo γ ($\gamma\delta\delta'\chi\psi$)

subunidad τ



La subunidad β de la DNA polimerasa III

Subunidad β

Homodímero que se cierra sobre el DNA en forma de “*pinza*” o “*anilla*”

Cada monómero tiene **forma de “C”**: estructura formada por α -hélices y β -láminas que se asemejan a una estrella de 6 puntas

La superficie interior está recubierta por $\alpha\alpha$ Q+, mientras que el exterior, $\alpha\alpha$ Q-

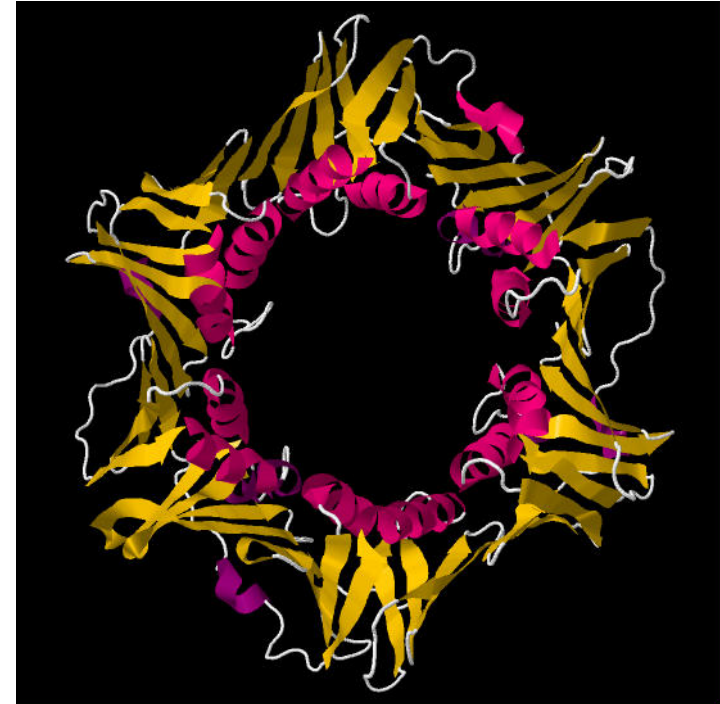
Función: estabilizar la hélice de DNA

La subunidad β se puede mover a lo largo del eje del DNA \rightarrow interacción débil

Complejo γ

Necesario para **abrir ó cerrar la subunidad β**

Actúa como una **ATPasa**



Estructura de un monómero de la subunidad β de la DNA pol III

Fuente de la imagen: RCSB PDB
N. acceso: 1MMI

Propiedades catalíticas del núcleo de la Pol III

Similares a Pol I: **Polimerasa**
Exonucleasa 3'→5'

El **molde** no puede ser dsDNA con cebador o DNA mellado, sino fragmentos de ssDNA de 100 nucleótidos incluidos dentro de dsDNA

→ **similar a una horquilla de replicación**

El **núcleo presenta una procesividad baja**: 10-15 nucleótidos / segundo

→ sólo puede rellenar pequeños huecos de ssDNA

Asociación del núcleo con la subunidad β y el complejo γ ($\gamma\delta\delta'\chi\psi$)

aumento de la procesividad → aprox. 5000 nucleótidos / segundo

= **procesividad ilimitada**

Mecanismo

1. El complejo γ transfiere la subunidad β sobre el molde con un cebador con gasto de ATP → β – **clamp** & γ – **clamp loader**
2. Unión del núcleo de Pol III con la subunidad β y el DNA

HELICASAS (I)

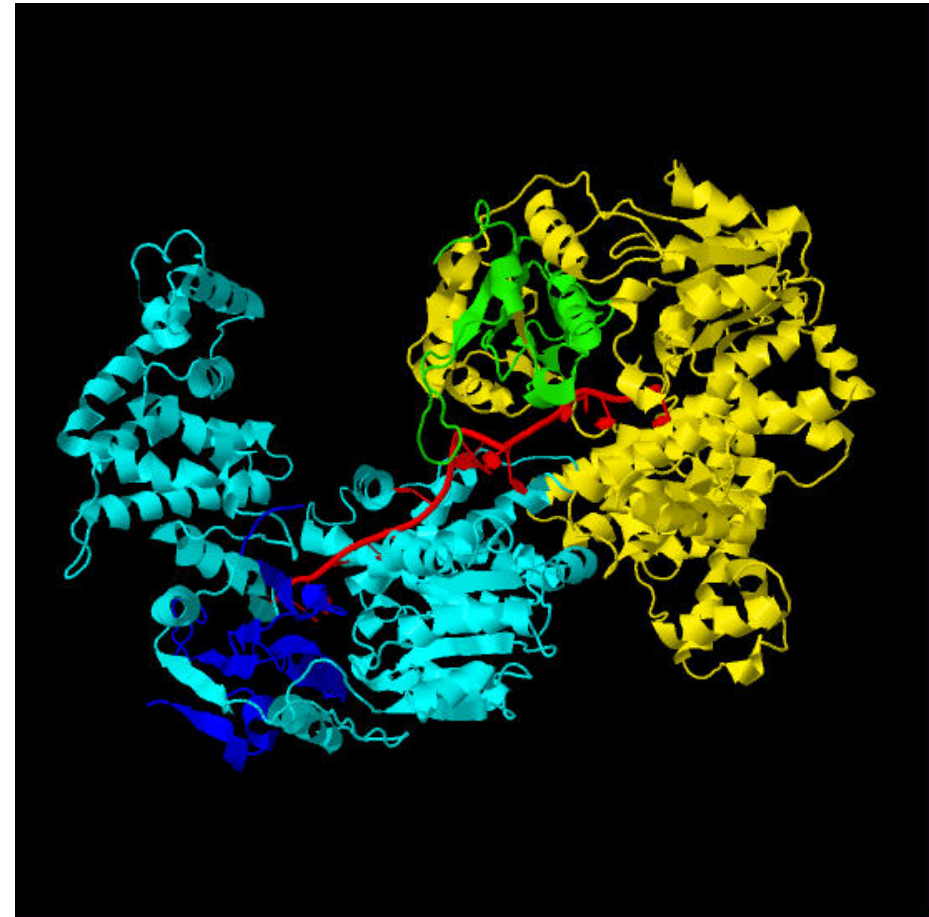
Las helicadas abren las dos cadenas de dsDNA delante de la horquilla de replicación

La DNA Pol III no puede desenrollar el dsDNA

→ debe haber otras proteínas delante de la horquilla de replicación

dsDNA T_m aprox. 95 C

→ es necesario aportar ϵ para abrir la cadena



Estructura de la helicasa unida a un fragmento de DNA

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

Helicasas (II)

Helicasa DnaB

Hexámero que separa dsDNA traslocándose en sentido 5' → 3' sobre el molde de la cadena rezagada, con gasto de ATP

Helicasas Rep A & PriA

Monómeros que se traslocan 3' → 5' (ATP)

↑ velocidad de propagación de las horquillas de replicación

La acción de las helicasas provoca superenrollamientos positivos que han de ser eliminados por la DNA girasa

PROTEINAS DE UNION AL ssDNA (SSB)

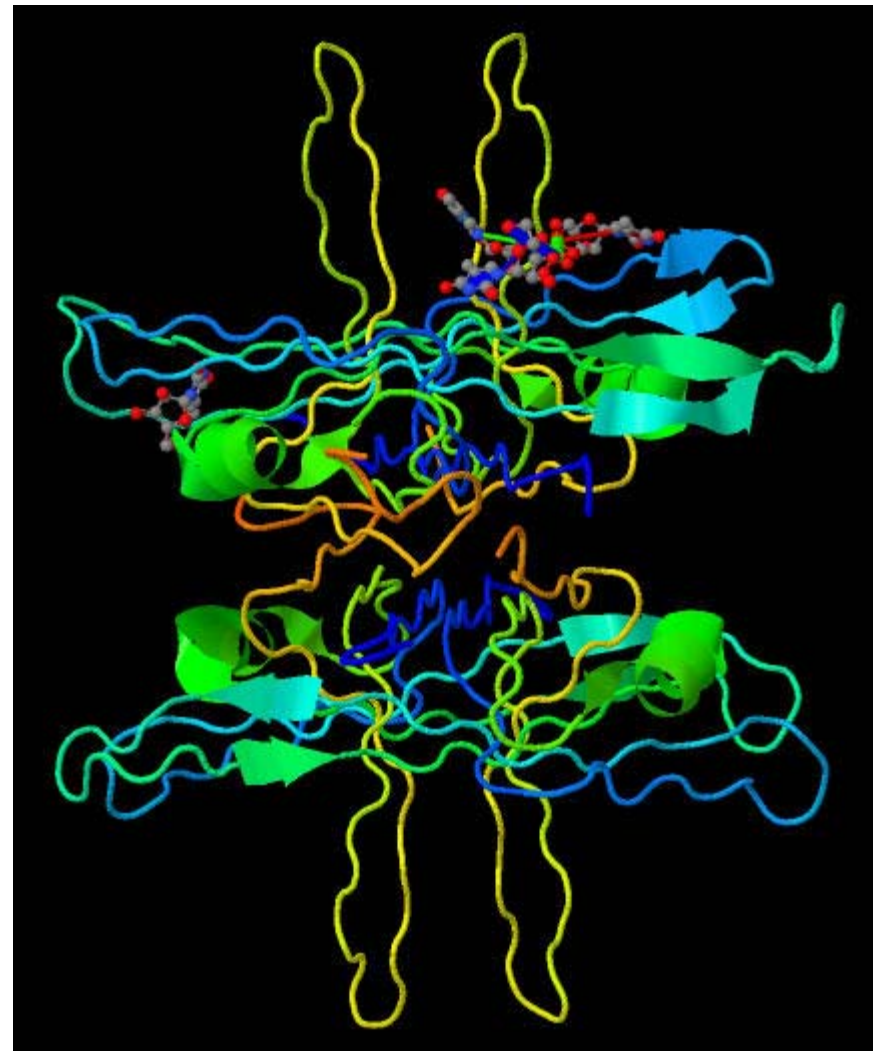
Monómero de 19 Kda

Tetrámero que evita la reasociación de las cadenas de ssDNA que han sido abiertas por la helicasa

Asociación cooperativa de varias SSBs para mantener del ssDNA de la horquilla de replicación

Las SSBs se disocian del ssDNA cuando la Pol III replica esa zona del DNA

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



Estructura de un monómero de SSB unida a ssDNA

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 ϵ : Bacterias: **NAD⁺** \rightarrow NMN + P_{pi}

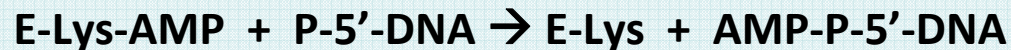
Animales: **ATP** \rightarrow AMP + P_{Pi} (P_{Pi} \rightarrow 2P_i)

Mecanismo catalítico de la DNA ligasa eucariótica y del bacteriófago T4

1. Activación de la enzima:



2. Formación del enlace fosfoanhidro



3. Transesterificación

