

Facultad Politécnica - Universidad Nacional de Asunción

Rol de las topoisomerasas de tipo II en la regulación del superenrollamiento y el pre-encadenamiento en intermediarios de replicación de DNA

por

Victor Manuel Martínez Chamorro

Orientador: Dra. María José Fernandez De Nestosa

Para la obtención del título de
Máster en Ciencias de la Computación

en el
Laboratorio de Computación Científica y Aplicada - Facultad Politécnica

Universidad Nacional de Asunción

03 de enero de 2014

Facultad Politécnica - Universidad Nacional de Asunción

Resumen

Laboratorio de Computación Científica y Aplicada - Facultad Politécnica

por Victor Manuel Martínez Chamorro

Durante la replicación, las moléculas de DNA sufren cambios topológicos que afectan su superenrollamiento, encadenamiento y anudamiento. Con el fin de entender mejor la función de las enzimas que controlan la topología del DNA durante la replicación, se utilizó un abordaje multidisciplinario con técnicas de biología molecular y simulaciones computacionales para examinar un plásmido bacteriano con sus horquillas replicativas detenidas tras haber replicado el 60% de la molécula. El DNA se aisló y se trató *in vitro* con dos enzimas topoisomerasas de tipo II: topoisomerasa IV (Topo IV) y DNA girasa. El efecto de estas enzimas sobre la topología de los intermediarios de replicación (RIs) en presencia o ausencia de un agente intercalante se analizó mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Se realizaron simulaciones computacionales basadas en el método de Metropolis Monte Carlo (MC) con el fin de predecir la estabilidad termodinámica de estas moléculas, donde la energía elástica está dada por potenciales cuadráticos dependientes del desplazamiento angular de torsión y de doblado. Los resultados de las simulaciones incluyen la curva de energía potencial en función del índice de ligamiento para determinar la energía potencial que puede ser almacenada en la región no replicada y la curva de energía potencial en función de el número de encadenamiento para obtener la energía que puede ser almacenada en la región ya replicada. Una vez obtenidas las curvas de energía para superenrollamiento y encadenamiento se pudo estimar la conformación más estable para un RI bajo los efectos de ambos fenómenos topológicos. El método desarrollado en la presente tesis podría ser útil para interpretar las señales observadas en geles bidimensionales de agarosa.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Computación Científica y Aplicada de la Facultad Politécnica de la Universidad Nacional de Asunción (San Lorenzo - Paraguay).

Al Laboratorio de Biología Molecular de los Cromosomas del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid - España).

A la Dra. María José Fernandez De Nestosa, Dr. Christian Schaerer, Dr. Bernardo Schwartzman, Dra. Dora B. Krimer y Msc. Jorge Cebrián por el apoyo, orientación y mucha paciencia que me han brindado durante el proceso del desarrollo de esta Tesis.

A mis amigos, Cristina Parra, Bernardo Seiferheld y Diego Noguera por su ayuda con la programación y optimización de los algoritmos utilizados para esta Tesis.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Agradecimientos	ii
Lista de Figuras	vi
Símbolos	viii
1 Introducción	1
1.1 Definición del problema	1
1.2 Originalidad	2
1.3 Relevancia	2
1.4 Estructura de la obra	3
1.5 Objetivos de la tesis	3
2 Marco biológico y matemático	5
2.1 Estructura de las moléculas de DNA	5
2.2 DNA en células procariotas	5
2.3 DNA en células eucariotas	6
2.4 Topología del DNA	7
2.4.1 Índice de ligamiento	8
2.4.2 Índice de torsión	11
2.4.3 Índice de superenrollamiento	13
2.4.4 Teorema de Calugareanu	16
2.5 Propiedades topológicas del DNA: Superenrollamiento	16
2.6 DNA topoisomerasas	19
2.6.1 DNA topoisomerasas de tipo I	19
2.6.2 DNA topoisomerasas de tipo II	20
2.7 Encadenamiento	22
2.8 Anudamiento	24
2.9 Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación: topología de los intermediarios de replicación	25
2.9.1 Quiralidad y signo topológico de los RIs	27
2.10 La paradoja de la Topoisomerasa IV	30
2.11 Análisis de RIs mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa	32

2.12 Agentes intercalantes	33
3 Simulación por el método de Monte Carlo	35
3.1 Simulación computacional de la topología del DNA	35
3.1.1 Simulación para superenrrollamiento de DNA	36
3.1.1.1 Selección de número de segmentos y rigidez de doblado	38
3.1.1.2 Cálculo de ángulos de doblado	39
3.1.1.3 Ángulos de cruce y yuxtaposición de segmentos del plásmido	39
3.1.1.4 Diámetro efectivo en las simulaciones	40
3.1.1.5 Cálculo numérico del índice de ligamiento	41
3.1.1.6 Cálculo numérico del índice de superenrrollamiento	42
3.1.2 Control del estado topológico en las conformaciones	43
3.1.3 Propiedades termodinámicas del superenrrollamiento y encadenamiento	45
3.1.4 Simulación de moléculas de DNA	46
4 Materiales y métodos	47
4.1 Parte experimental	47
4.1.1 Estirpes bacterianas	47
4.1.2 Plásmidos	47
4.1.3 Condiciones de cultivo	47
4.1.4 Tratamiento de los plásmidos	48
4.1.4.1 Digestión con Topoisomerasa IV	49
4.1.4.2 Digestión con DNA Girasa	49
4.1.5 Agente intercalante	49
4.1.6 Geles bidimensionales de agarosa	49
4.2 Métodos de simulación computacional	50
4.2.1 Simulación del supererrollamiento	50
4.2.2 Simulación del encadenamiento	51
5 Resultados	53
5.1 Resultados del análisis de RIs mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa	53
5.1.1 Análisis de los RIs del plásmido pBR322@AatII digerido con Topo IV y DNA Girasa	53
5.1.2 Análisis del plásmido pBR322@AatII digerido con Topo IV y DNA Girasa en presencia de cloroquina	56
5.1.3 Análisis del plásmido pBR322@AatII digerido con Topo IV y DNA Girasa mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina	57
5.1.4 Análisis del plásmido pBR322@AatII de la cepa termosensible ParE10 digerido con DNA Girasa y Topo IV	59
5.1.5 Análisis del plásmido pBR322@AatII de la cepa termosensible parE10 digerido con DNA Girasa y Topo IV en presencia de cloroquina	61
5.1.6 Análisis del plásmido pBR322@AatII de la cepa termosensible parE10 digerido con Topo IV y DNA Girasa mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina	63

5.2	Resultados de la simulación computacional	65
5.2.1	Simulación de la región no replicada del intermediario de replicación	65
5.2.2	Propiedades termodinámicas de la región no replicada	68
5.2.3	Simulación de la región ya replicada del intermediario de replicación	70
5.2.4	Propiedades termodinámicas de la región ya replicada	73
5.2.5	Comparación de la variación de entalpía entre las regiones no replicada y ya replicada	73
6	Discusión	76
6.1	Rol de la Topo IV en la regulación del superenrrollamiento y el pre-encadenamiento de los intermediarios de replicación	76
6.2	Rol de la DNA Girasa en la regulación del superenrrollamiento y el pre-encadenamiento de los intermediarios de replicación	79
6.3	Simulación computacional de las regiones no replicada y ya replicada de un intermediario de replicación	82
6.4	Coordinación del superenrrollamiento y el pre-encadenamiento en condiciones de equilibrio termodinámico	85
7	Conclusión	87
A	Anexo	89
A.1	Algoritmos de base	89
A.1.1	Un círculo cerrado	89
A.1.2	Un toroide	89
A.1.3	Dos curvas encadenadas	90
A.1.4	Linking number	90
A.1.5	Writhe	91
A.1.6	Diámetro efectivo	92
A.2	Simulación del superenrrollamiento	93
A.3	Simulación del encadenamiento	94
A.4	Abstracts en congresos	96
A.4.1	Wilhelm Bernhard Workshop 23th	96
A.4.2	XXXVI Congreso SEBBM	97
A.4.3	Banff International Research Station	98
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE FIGURAS

2.1	Estructura del DNA	6
2.2	Distintas formas topologicas del DNA	8
2.3	Replicación del DNA	9
2.4	Efecto topológico de la replicación del DNA	10
2.5	Dos curvas vinculadas	10
2.6	El DNA considerado como una cinta	12
2.7	Tipos de cruce y signo topológico	14
2.8	Angulo sólido y Wr	15
2.9	Teorema de Calugareanu y cintas	17
2.10	Conformaciones posibles para el DNA superenrollado	18
2.11	Modelo del mecanismo de acción de las topoisomerasas de tipo II	21
2.12	Tipos de topoisomerasa	22
2.13	Representaciones de diferentes formas de encadenados	23
2.14	Ilustración de la topología de intermediarios de replicación	26
2.15	Signos topológicos y sentido de giro para la topología del DNA	29
2.16	Signos topológicos y quiralidad de un CCRI representado con gomas elásticas	30
2.17	Topología de los signos y quiralidad de los cruces en los RIs	31
2.18	Formación de una horquilla en retroceso	34
3.1	Modelo <i>wormlike chain</i>	37
3.2	Yuxtaposición y ángulos de cruce en conformaciones pléctonemicas	40
3.3	Diametro efectivo en función a la distancia entre vértices del modelo <i>wormlike chain</i>	41
3.4	Diagrama de un nudo <i>trefoil</i>	43
4.1	Mapa del plásmido pBR322@AatII	48
4.2	Parámetros de simulación de superenrollamiento	51
4.3	Parámetros de simulación de encadenamiento	52
5.1	Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' con Topo IV	55
5.2	Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' con DNA Girasa	55
5.3	Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' con Topo IV en presencia de cloroquina	56
5.4	Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' con DNA Girasa en presencia de cloroquina	57
5.5	Electroforésis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' digerido con Topo IV	58

5.6	Electroforésis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' digerido con DNA Girasa	59
5.7	Digestión con Topo IV del plásmido pBR322@AatII de la estirpe ParE10	60
5.8	Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe ParE10 con DNA Girasa	61
5.9	Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe ParE10 con Topo IV en presencia de cloroquina	62
5.10	Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe ParE10 con DNA Girasa en presencia de cloroquina	62
5.11	Electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina del plásmido pBR322@AatII de la estirpe parE10 digerido con Topo IV .	64
5.12	Electroforesis bidimensional en un gel de agarosa en presencia de cloroquina del plásmido pBR322@AatII de la estirpe termosensible parE10 digerido con DNA Girasa	64
5.13	Gráfico de la razón $Wr/\Delta Lk$ con respecto al ΔLk	66
5.14	Gráfico de ángulos de cruce con respecto al ΔLk	67
5.15	Probabilidad de aceptación de los movimientos de prueba en función al ΔLk	67
5.16	Probabilidad de aparición de nudos en función del ΔLk	68
5.17	Conformaciones plectonémicas no anudadas	69
5.18	Conformaciones obtenidas con diámetro efectivo constante de 3 nm para $\Delta Lk = -20$	70
5.19	Propiedades termodinámicas de la región no replicada y su relación con el ΔLk	71
5.20	Variación del writhe Wr con el número de encadenamiento Ca	72
5.21	Comparación entre el Wr inducido y el Ca obtenidos para esta obra y los resultados de simulación en la literatura	72
5.22	Propiedades termodinámicas de la región ya replicada	73
5.23	Variaciones de entalpía de ambas regiones del RI	74
5.24	Comparación de las variaciones de entalpía de las regiones no replicada y ya replicada de un RI	75
6.1	Cuando dos distintos encadenados con cruces RH (+) se yuxtaponen entre ellos pueden aparecer cruces LH (+)	79
6.2	Simulación computacional de un RI mediante el método Metropolis Monte Carlo	84

Símbolos

Lk Índice de ligamiento entre dos curvas

Lk_0 Índice de ligamiento de una molécula circular de DNA relajado

ΔLk Variación del índice de ligamiento de un topoisómero respecto a uno relajado

Tw Índice de torsión de dos curvas entre sí

Tw_0 Índice de torsión de una molécula circular de DNA relajado

ΔTw Variación del índice de torsión de un topoisómero respecto a uno relajado

Wr Índice de superenrollamiento de una curva

ΔWr Variación del índice de superenrollamiento de un topoisómero respecto a uno relajado

σ Índice de ligamiento específico

Ca Número de encadenamiento entre dos moléculas circulares de DNA.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Definición del problema

Uno de los principales problemas que dificultan el estudio de la topología del DNA durante la replicación es que *in vivo* existe un complejo protéico denominado replisoma que se encuentra unido a cada intermediario de replicación. En teoría este replisoma impediría que el DNA pueda girar libremente en las horquillas de replicación, lo que dificultaría la difusión del superenrollamiento a través de las mismas [1]. Sin embargo al aislar moléculas de DNA parcialmente replicadas (intermediarios de replicación, RIs) y eliminar todas las proteínas unidas a las mismas para su análisis por electroforesis o microscopía electrónica, desaparecen las restricciones topológicas impuestas por la unión del replisoma [1]. La eliminación del replisoma permitiría que, debido a la tensión acumulada, el DNA gire libremente en las horquillas de replicación y el superenrollamiento de la región no replicada podría migrar a la región ya replicada, dando lugar a la formación de pre-encadenados. En estas condiciones *in vitro*, la topología de los RIs cambia significativamente y no representa la que tenía *in vivo*. Se ha observado que en los intermediarios de replicación examinados *in vitro*, el sentido de los cruces del superenrollamiento de la región no replicada y del pre-encadenamiento de la ya replicada es opuesto. En otras palabras, mientras que el superenrollamiento de la región no replicada es dextrógiro (RH, lo que es característico del superenrollamiento negativo), el entrelazado de las cromátidas hermanas en la región ya replicada es levógiro (LH, lo cual es característico del superenrollamiento positivo) [2]. Pero se ignora si esta conformación particular es exclusiva de las moléculas de DNA aisladas y examinadas *in vitro* o también ocurre *in vivo*. Queda por resolver cómo se coordinan el superenrollamiento y el pre-encadenamiento en un RI y qué papel juegan las topoisomerasas de tipo II en la regulación de la topología del DNA durante su replicación.

En esta obra se presenta un estudio sobre el rol de las dos topoisomerasas de tipo II de *E. coli* en plásmidos bacterianos que contienen una horquilla de replicación detenida. Por otro lado, se han simulado RIs para determinar la relación entre el superenrollamiento de la región no replicada y el encadenamiento de la región ya replicada en condiciones de equilibrio termodinámico.

1.2 Originalidad

El papel que cumplen las topoisomerasas en la regulación del superenrollamiento y el encadenamiento que afecta a los plásmidos ha sido ampliamente estudiado, tanto experimentalmente como mediante simulaciones computacionales [3] [4]. Sin embargo, sabemos poco acerca del rol que cumplen las topoisomerasas durante la replicación del DNA plasmídico y en la bibliografía no existen precedentes en la simulación de intermediarios de replicación. En esta obra se presentan los resultados experimentales y de simulación computacional sobre el efecto que tienen las topoisomerasas en la regulación de la topología del DNA de los intermediarios de replicación.

1.3 Relevancia

La topología del DNA afecta y a la vez se ve alterada por casi todos los procesos biológicos en los que el DNA participa en una célula viva: replicación, transcripción, reparación y recombinación. Las enzimas que se mueven a lo largo de una cadena de DNA, como el DNA y RNA polimerasas, tienden a provocar la acumulación de superenrollamiento por delante de su movimiento. Sin un mecanismo de control, esto haría que el DNA acumule un exceso de tensión, lo cual sería letal para las células. Las topoisomerasas alivian el estrés torsional modificando la topología del DNA por escisión y re-ligación de las moléculas de DNA. Estas enzimas topoisomerasas son el blanco de un número importante de agentes antibacterianos como las quinolonas y aminocumarinas, actualmente en uso clínico. Las topoisomerasas son también el blanco de varios de los fármacos más utilizados contra el cáncer, entre los que se encuentran las camptotecinas, que impiden el desenrollamiento del DNA por la topoisomerasa I y se emplean en tumores malignos que son resistentes a otras terapias. Casi todas las formas de cáncer que se consideran curables mediante quimioterapia utilizan inhibidores específicos de la topoisomerasa II, tales como los etopósidos, doxorrubicina, etc. En conjunto, estas observaciones refuerzan el potencial de topoisomerasas como dianas terapéuticas. Sin embargo, el conocimiento actual sobre la topología del DNA y la manera en que las topoisomerasas regulan los

cambios topológicos que tienen lugar durante la replicación, la transcripción, la reparación y la recombinación sigue siendo muy limitado. En la presente obra se utilizó un abordaje multidisciplinario, con técnicas de Biología Celular y Molecular y Simulaciones Matemáticas para investigar el mecanismo de la acción de las topoisomerasas y la coordinación entre superenrollamiento y pre-encadenamiento durante la proloferación celular. Estamos convencidos de que la comprensión de estos procesos es fundamental a la hora de desarrollar nuevos antibióticos y drogas anticancerígenas basadas en inhibidores específicos de topoisomerasas.

1.4 Estructura de la obra

En los siguientes capítulos de esta obra se presentan: en el segundo capítulo una introducción referente tanto a la parte biológica como al abordaje matemático de los temas estudiados; en el tercer capítulo se describen los métodos computacionales utilizados para la simulación de los fenómenos topológicos de interés; en el cuarto capítulo se detallan los materiales y métodos utilizados para obtener los resultados experimentales y el procedimiento estadístico para el análisis de los resultados de simulación; en el quinto capítulo se presentan los resultados experimentales y de simulación computacional; en el sexto capítulo se hace una breve discusión de los resultados obtenidos y en el séptimo capítulo se enumeran conclusiones. En el anexo se encuentran los algoritmos utilizados para realizar las simulaciones así como los resúmenes de trabajos presentados en congresos internacionales.

1.5 Objetivos de la tesis

Durante la replicación del DNA, la apertura de la doble hélice por la DNA helicasa tiende a provocar la acumulación de estrés torsional por delante de la horquilla replicativa. Sin un mecanismo de control, este exceso de tensión impediría el avance de la horquilla de replicación. Este desbalance energético entre las regiones no replicada y ya replicada de un RI provoca un intercambio de energía entre ambas regiones y, por ende, un cambio en el superenrollamiento y pre-encadenamiento. En el presente trabajo nos propusimos comprender mejor la coordinación entre superenrollamiento y pre-encadenamiento durante la replicación del DNA mediante el estudio de las propiedades termodinámicas de las regiones no replicada y ya replicada de moléculas de DNA parcialmente replicadas.

Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1-Determinar el papel de las topoisomerasas de tipo II de *E. coli* sobre la topología de

los intermediarios de replicación en presencia o ausencia de cloroquina.

2-Estudiar el efecto de una inhibición específica de la topoisomerasa IV sobre la topología de los intermediarios de replicación.

3-Characterizar la coordinación entre el superenrollamiento y el pre-encadenamiento durante la replicación del DNA.

4-Estudiar la topología de un intermediario de replicación mediante simulación computacional.

5-Analizar el equilibrio termodinámico en los intermediarios de replicación mediante simulación computacional.

Capítulo 2

Marco biológico y matemático

2.1 Estructura de las moléculas de DNA

Según el modelo de Watson y Crick, el DNA (ácido desoxirribunucleico) es una doble hélice constituida por dos cadenas de polinucleótidos complementarias y antiparalelas [5]. En él, está contenida la información genética para el funcionamiento del organismo al que pertenece. Se trata de un polímero compuesto por varias unidades más simples, unidas entre sí, llamadas nucleótidos (éstos se representan con las letras A,T,G,C). Cada nucleótido está constituido por un azúcar, llamado desoxirribosa, una base nitrogenada (A,T,G,C, que brinda su identidad al nucleótido) y un grupo fosfato que sirve para unir un nucleótido con el siguiente. La doble hélice esta formada por dos polinucleótidos, que están unidos entre sí por puentes de hidrogeno entre las bases nitrogenadas. Cada par de bases se expresa con la unidad pb y la longitud de la cadena se mide en terminos del número de pb. La doble hélice de DNA tiene un diámetro de entre 2.2 y 2.6 nm y hace una revolución completa en torno a su eje imaginario cada 10.5 nucleótidos, teniendo ésta una longitud de 3.4 nm [6]. La Figura 2.1 muestra una representación de un segmento de una molécula de DNA .

2.2 DNA en células procariotas

Basándonos en la organización de las estructuras celulares, todas las células vivientes pueden ser divididas en dos grandes grupos: Procariotas y Eucariotas. Animales, plantas, hongos y protistas poseen todos células de tipo eucariota. Sólo las bacterias (eubacterias y arqueobacterias) tienen células de tipo procariota. Se llama procariota las células sin núcleo celular definido, es decir, cuyo material genético se encuentra disperso en el citoplasma, reunido en una zona denominada nucleoide. Hay dos tipos de DNA en



FIGURA 2.1: Doble hélice de DNA. Se presenta una ilustración esquemática donde con los pares de bases nitrogenadas (A-T y C-G) en el centro de la estructura cuyos bordes están constituidos por esqueletos de azúcar-fosfato. Imagen modificada tomada de <http://zlgc.seu.edu.cn/>

las bacterias; el cromosómico y el plasmídico, este último formado por moléculas pequeñas y circulares de DNA extracromosómico que poseen mecanismos de replicación independientes. La ventaja de poseer un plásmido es que puede contener genes de resistencia a antibióticos, tolerancia a metales, tóxicos, síntesis de enzimas, etc. En las cepas bacterianas, inicialmente estudiadas, se encontró por microscopía electrónica que había un único cromosoma covalentemente cerrado y circular (CCC) [6]. Los plásmidos bacterianos también son moléculas circulares. Estudios posteriores demostraron que algunas bacterias tienen múltiples cromosomas circulares y que muchas de ellas tienen cromosomas y plásmidos lineales [6].

2.3 DNA en células eucariotas

En una célula eucariota el material genético suele estar encerrado en un órgano de la célula llamado núcleo. Pueden contener varios cromosomas lineales, es decir, con los extremos libres. Las células eucariotas son más complejas que las procariotas, conteniendo las primeras varios orgánulos especializados para cumplir alguna función vital para la célula. Algunos orgánulos de las células eucariotas también tienen su propio DNA. Dos ejemplos son las mitocondrias y los cloroplastos de las células vegetales, que poseen un DNA circular covalentemente cerrado (CCC) [7].

2.4 Topología del DNA

La topología es una rama de las matemáticas que estudia las propiedades de un cuerpo que no varían cuando éste se deforma. El descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA llevó inmediatamente a preguntarse cómo se produciría la separación de las hebras entrelazadas para permitir la replicación de la molécula y puso en evidencia el hecho de que durante la replicación surgen problemas topológicos [8][9]. En 1965, Vinograd y colaboradores observaron al microscopio electrónico que el DNA del virus del polio podía encontrarse tanto en forma lineal como circular y que estos últimos podían presentar distintas formas (relajados o enrollados sobre sí mismos) [10]. A estas moléculas con misma longitud y pero distinta forma, asociadas a la topología del DNA (de los CCCs más concretamente) se las denomina topoisómeros [10](Figura 2.2). Posteriormente esta observación se extendió a todas las moléculas de DNA circulares de doble cadena [11]. La observación de que en todos los seres vivos el DNA está superenrollado, junto con el descubrimiento de las enzimas¹ encargadas de modificar la topología *in vivo* [12], sentaron las bases de una nueva disciplina dentro de la Biología Molecular que se denominó “Topología del DNA” [13]. La topología del DNA ejerce un papel regulador sobre funciones celulares esenciales, como la replicación, transcripción, reparación y recombinación. La replicación es el fenómeno que provoca más cambios en la topología de las moléculas de DNA (Figura 2.3). Esto es debido a que la maquinaria encargada de copiar el DNA abre la doble hélice, induciendo tensiones en toda la molécula. Esto se ilustra en la Figura 2.4.

¹Una enzima es una molécula de naturaleza proteica que cataliza reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles (<http://es.wikipedia.org/wiki/Enzima>).

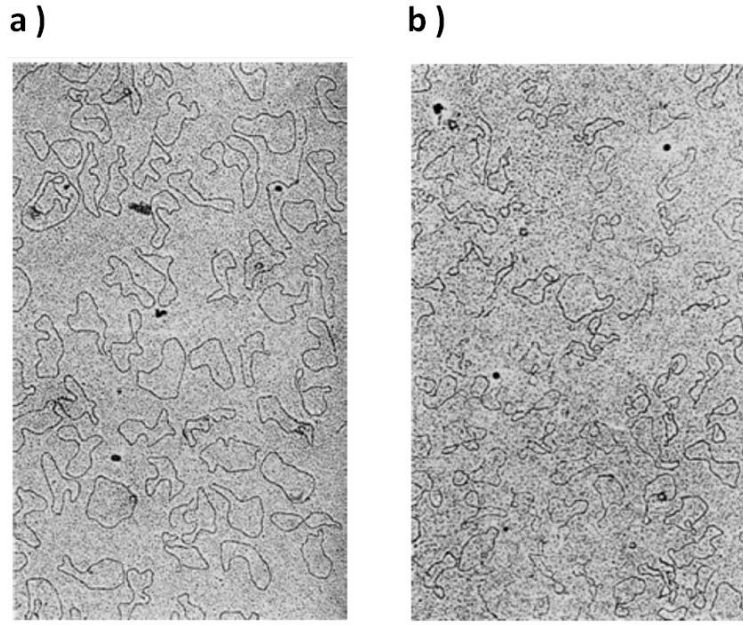


FIGURA 2.2: Micrografía electrónica del DNA aislado del virus del polio. **a)** Moléculas relajadas. **b)** Moléculas enrolladas sobre sí mismas Tomada de Vinograd et. al., 1965.

La expresión matemática que mejor describe la topología del DNA de un dominio cerrado es el llamado índice de ligamiento o *Linking number* (Lk). Es un invariante topológico que está definido a su vez por dos variables geométricas: el índice de torsión o *Twist* (Tw) y el índice de superenrollamiento o *Writhe* (Wr).

2.4.1 Índice de ligamiento

Para comprender la relación del índice de ligamiento con las moléculas CCCs de DNA repasaremos brevemente su definición. A continuación, recurrimos a una definición basada en fenómenos de electromagnetismo; suponga que tenemos un lazo cerrado, representado por la curva C , que a su vez es descrita por el vector de posición $\mathbf{r}$, que describe cada punto de la curva, en un marco de referencia O , mediante un parámetro t . El lazo transporta una corriente eléctrica I en la dirección en la que la curva C es recorrida por $\mathbf{r}$.

Según la Ley de Biot-Savart, el campo magnético en el espacio vacío creado por este lazo cerrado en cualquier punto $\mathbf{r}'$ en el marco de referencia O tiene un valor,

$$\mathbf{B} = \frac{\mu_o I}{4\pi} \oint_C \frac{(\mathbf{r}' - \mathbf{r}) \times d\mathbf{r}}{\|\mathbf{r}' - \mathbf{r}\|^3}, \quad (2.1)$$

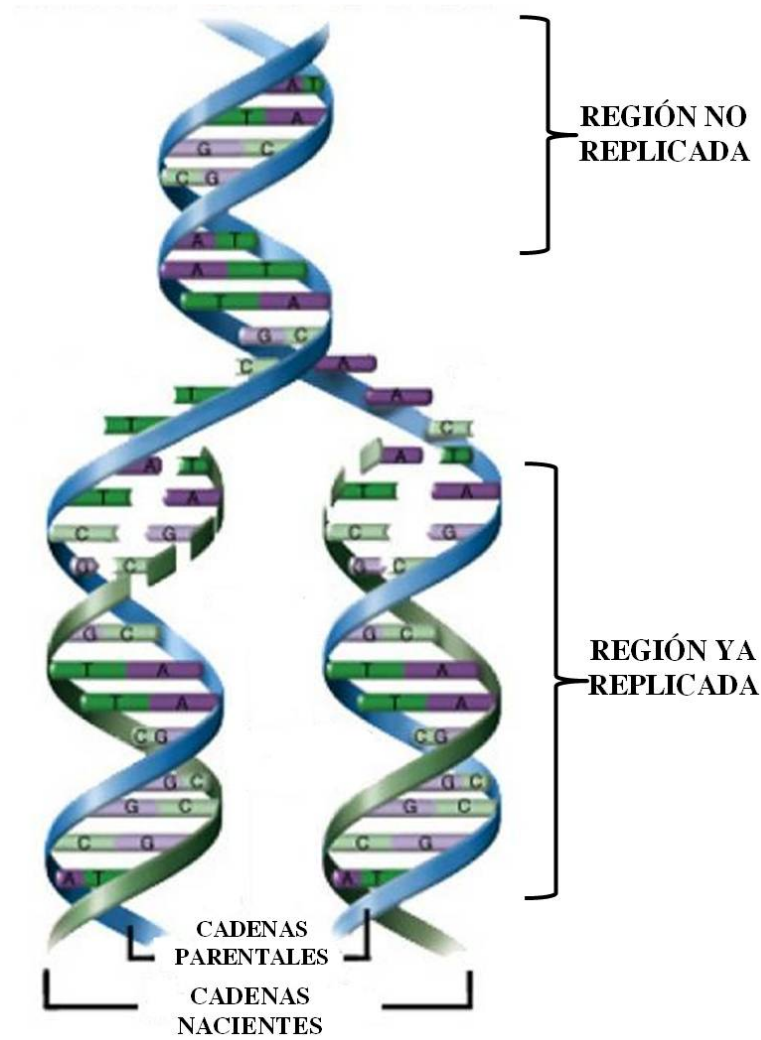


FIGURA 2.3: Replicación semiconservativa del DNA. En la horquilla de replicación las cadenas parentales (azul) se separan para permitir la síntesis de las cadenas nacientes (verdes). Imagen modificada tomada de <http://zlgc.seu.edu.cn/>

donde μ_0 es la permeabilidad del espacio libre. La Ley de Ampere nos dice que la integral del campo magnético a lo largo de una curva cerrada C' , descrita por el vector $\mathbf{r}'$ con parámetro t' , es proporcional a la corriente total que cruza por el lazo cerrado.

$$\oint_{C'} \mathbf{B} \cdot d\mathbf{r}' = \mu_0 I_{total}. \quad (2.2)$$

Si las curvas C y C' están vinculadas como se muestra en la Figura 2.5 entonces la corriente total que pasa a través del lazo C' es igual a un múltiplo entero n de la corriente I , donde este entero es un invariante topológico igual al número de veces que C pasa a través de C' , $I_{total} = nI$.

Introduciendo (2.1) en (2.2)

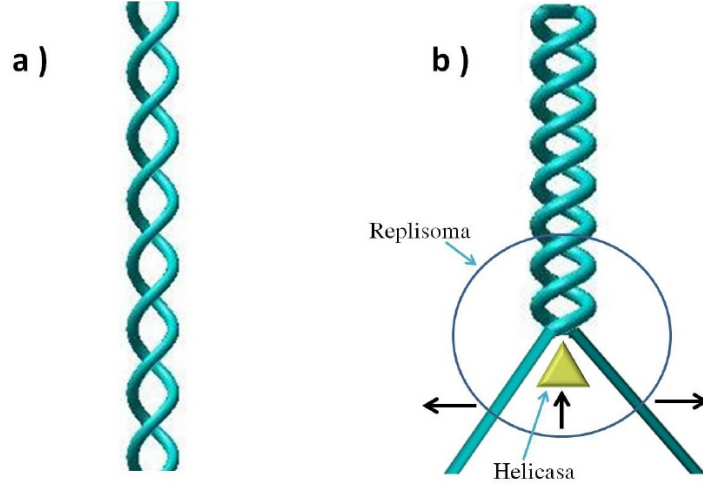


FIGURA 2.4: Representación del efecto topológico de la replicación en el DNA. a) Una molécula no replicada con índice de torsión en estado normal. b) El avance de la helicasa durante la replicación induce tensión por delante del replisoma, en la zona no replicada, provocando cambios en la topología de toda la molécula.

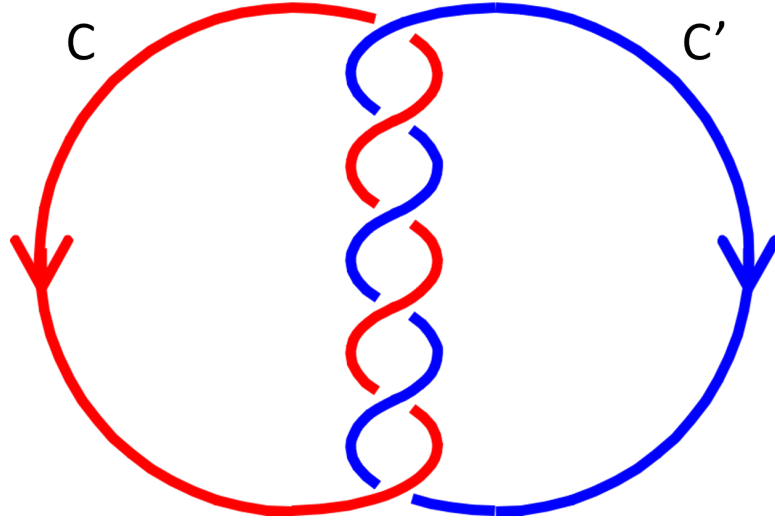


FIGURA 2.5: Dos curvas vinculadas. El índice de ligamiento Lk define el número de vínculos entre dos curvas

$$\oint_{C'} \left(\frac{\mu_o I}{4\pi} \oint_C \frac{(\mathbf{r}' - \mathbf{r}) \times d\mathbf{r}}{\|\mathbf{r}' - \mathbf{r}\|^3} \right) \cdot d\mathbf{r}' = \mu_o n I. \quad (2.3)$$

Reordenando y simplificando nos queda,

$$n = \frac{1}{4\pi} \oint_{C'} \oint_C \left(\frac{(\mathbf{r}' - \mathbf{r}) \times d\mathbf{r}}{\|\mathbf{r}' - \mathbf{r}\|^3} \right) \cdot d\mathbf{r}'. \quad (2.4)$$

Este invariante n es el Índice de ligamiento o *Linking number* Lk [14].

Una molécula de DNA circular, por su naturaleza de doble hélice, se asemeja a dos curvas vinculadas entre sí. Se puede decir que la doble hélice de DNA circular toma la forma de dos curvas encadenadas una en torno a la otra, tantas veces como la cantidad de vueltas completas de la doble hélice hay en la molécula. Es posible calcular el Lk conociendo la longitud N de la molécula y dividiéndola por la longitud de una vuelta completa de la hélice h , y de esta forma se tiene que $Lk=N/h$.

Si en la molécula circular no existe ninguna tensión torsional además de la intrínseca a su estructura molecular se dice que está relajada. En condiciones de relajamiento, una molécula de longitud N tendrá una longitud de repetición de doble hélice h_0 y su índice de ligamiento, al que llamaremos Lk relajado (Lk_0), tendrá el valor $Lk_0=N/h_0$.

2.4.2 Índice de torsión

Teniendo en cuenta la estructura de doble hélice de las moléculas de DNA, se puede considerar a sus dos cadenas complementarias como los bordes de una cinta. Asumiendo esto, hay una propiedad denominada índice de torsión o *Twist* (Tw), que describe el retorcimiento de esta cinta en torno al eje que pasa a lo largo de la molécula. Se presentan a continuación algunas características propias de las cintas y su retorcimiento tomadas de Klenin et. al. 2000 [15]:

Dada una curva cerrada C , caracterizada por el vector de posición $\mathbf{a}(t)$, que no tiene intersecciones consigo misma, podemos construir una cinta. Uno de los bordes de ésta cinta será la curva C , el otro borde estará constituido por los puntos de una curva C' , cuyos puntos estarán dados por:

$$\mathbf{b}(t) = \mathbf{a}(t) + \varepsilon \mathbf{u}(t), \quad (2.5)$$

donde ε determina el ancho de la cinta y puede ser tan pequeño como se desee. El vector $\mathbf{u}(t)$ es un versor normal a la curva C en el punto $\mathbf{a}(t)$, que apunta al punto $\mathbf{b}(t)$ sobre la curva C' .

Si en un sistema de coordenadas ortogonales fijo, xyz , el vector posición $\mathbf{a}$ está dado por el parámetro t como; $\mathbf{a}(t)=x(t)\hat{i} + y(t)\hat{j} + z(t)\hat{k}$, donde las funciones $x(t)$, $y(t)$ y $z(t)$ son continuas y tienen derivada segunda (equivale afirmar que C es una curva suave), entonces podemos definir al vector tangente unitario de $\mathbf{a}$ en el punto caracterizado por el parámetro t como:

$$\hat{\mathbf{T}} = \frac{\frac{d\mathbf{a}(t)}{dt}}{\left\| \frac{d\mathbf{a}(t)}{dt} \right\|}. \quad (2.6)$$

Este vector tiene siempre la misma dirección del vector velocidad, que es sencillamente $\frac{d\mathbf{a}(t)}{dt}$ y donde la rapidez es, por definición, el módulo del vector velocidad. Además de un plano de infinitos vectores normales a $\hat{\mathbf{T}}$ hay un vector que tiene la particularidad de apuntar siempre en la dirección en la que C presenta curvas más pronunciadas, es decir, hacia la dirección de mayor curvatura, éste vector es conocido como el vector normal principal unitario:

$$\hat{\mathbf{n}} = \frac{\frac{d\hat{\mathbf{T}}(t)}{dt}}{\left\| \frac{d\hat{\mathbf{T}}}{dt} \right\|}. \quad (2.7)$$

Se define la curvatura en el punto dado por el vector posición $\mathbf{a}(t)$ como:

$$\kappa = \frac{\left\| \frac{d\hat{\mathbf{T}}}{dt} \right\|}{\left\| \frac{d\hat{\mathbf{a}}}{dt} \right\|}. \quad (2.8)$$

El vector $\mathbf{u}$ normal con el que se genera cada punto de la cinta en la ecuación (2.5) no necesariamente es igual al vector normal principal como se muestra en la cinta de la Figura 2.6.

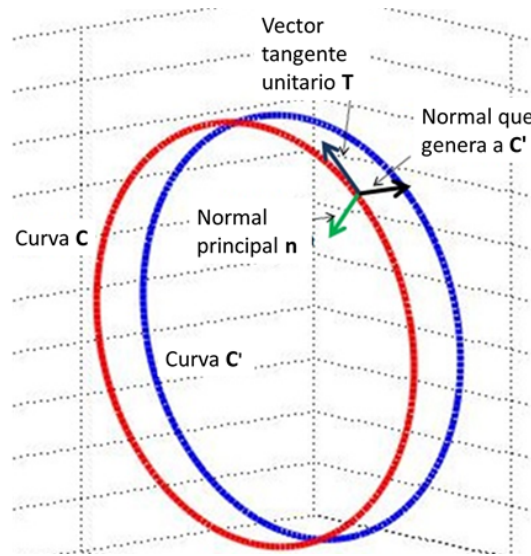


FIGURA 2.6: Cinta creada a partir de las curvas C y C' . Se observa la diferencia entre el vector normal principal $\mathbf{n}$ y el vector generador de la cinta $\mathbf{b}$.

Todas las curvas expuestas hasta ahora pueden ser parametrizadas mediante su propia longitud de arco, s :

$$s = \int_0^t \sqrt{x'(u)^2 + y'(u)^2 + z'(u)^2} du = \int_0^t \left\| \frac{d\mathbf{a}(u)}{du} \right\| du. \quad (2.9)$$

Esta parametrización tiene la característica de que la rapidez es constante e igual a 1, es decir, $\left\| \frac{d\mathbf{a}(s)}{ds} \right\| = 1$ [16]. Consecuencia de ésta propiedad son las siguientes expresiones

de los vectores tangente y normal unitario:

$$\hat{\mathbf{T}} = \frac{d\mathbf{a}(s)}{ds}; \quad (2.10)$$

$$\hat{\mathbf{n}} = \frac{1}{\kappa} \frac{d\mathbf{T}(s)}{ds}. \quad (2.11)$$

Respecto a la cinta descrita con anterioridad, el valor medio de rotación de la curva C' en torno a la curva C es llamado índice de torsión o *Twist* (Tw). Respecto a la molécula de DNA, el Tw indica el número de veces que las dos cadenas complementarias dan una vuelta alrededor del eje axial de la doble hélice. Para obtenerlo basta con medir la rotación infinitesimal del vector generador de la curva $\mathbf{b}$ en torno al vector tangente unitario de $\mathbf{a}$, $\hat{\mathbf{T}}$, para un determinado valor del parámetro s , el cuál es el parámetro longitud de arco y en el resto de esta exposición s será este parámetro. La expresión

$$\hat{\mathbf{T}} \times \hat{\mathbf{u}} = \frac{d\mathbf{a}}{ds} \times \hat{\mathbf{u}}, \quad (2.12)$$

nos da un vector unitario normal a $\hat{\mathbf{T}}$. Al haber una variación en el parámetro de ds , el versor $\mathbf{u}$ ha variado en $d\mathbf{u}$, apuntando ahora en otra dirección. Si el vector $d\mathbf{u}$ es no nulo entonces siempre tendrá una dirección distinta a la de $\frac{d\mathbf{a}}{ds} \times \hat{\mathbf{u}}$. Una medida de la magnitud de la rotación es entonces

$$\left(\frac{d\mathbf{a}}{ds} \times \hat{\mathbf{u}} \right) \cdot d\mathbf{u}, \quad (2.13)$$

y dado que cada rotación es levógira o dextrógira, el signo de la rotación esta dado por el signo que tiene este producto escalar. La suma de todas las rotaciones es entonces un promedio ponderado si se divide por la máxima rotación angular de 2π radianes. Así, integrando sobre toda la curva C , el índice de torsión está dado por la expresión

$$Tw = \frac{1}{2\pi} \int_C \left(\frac{d\mathbf{a}}{ds} \times \hat{\mathbf{u}} \right) \cdot d\mathbf{u}. \quad (2.14)$$

Para el DNA en estado relajado el Tw es igual al número total de vueltas completas de la doble hélice, esto es, en el estado relajado se tiene $Tw_0 = Lk_0$.

2.4.3 Índice de superenrollamiento

El índice de superenrollamiento o *Writhe* (Wr) de las moléculas de DNA, una de las propiedades topológicas mejor estudiadas, es una medida de la torsión del eje axial de la doble hélice sobre sí mismo. Mide el número de veces que el eje de la doble hélice se

pliega sobre sí mismo respecto a un plano o, de modo más intuitivo, es la medida del enrollamiento de la doble hélice sobre sí misma [15].

Para comprender mejor este concepto podemos recurrir al estudio de cómo se comporta el eje de la doble hélice considerándolo como una curva cerrada en el espacio [15]. Para una curva C hay ciertos puntos del espacio, denominados puntos de proyección u observación, desde donde la curva parece cruzarse sobre sí misma. Esto es, en el cruce de dos segmentos de la curva, el más cercano al punto de proyección parece pasar por encima del que está más alejado.

Hay dos tipos de cruce que se pueden llegar a diferenciar desde cualquier punto de proyección, los Positivos (antihorario) y los Negativos (horario) (Figura 2.7). Desde un punto de proyección podemos asignar un valor numérico a un cruce, $w = 1$ si es antihorario y $w = -1$ si es horario. Al sumar todos los valores de w para la dirección de proyección elegida obtenemos un número entero llamado Writhe direccional (Wr_D) [15].

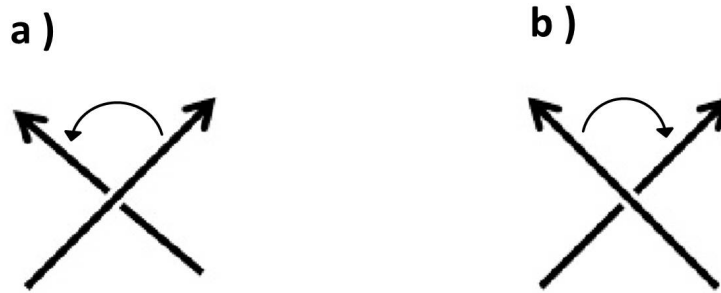


FIGURA 2.7: Tipos de cruce entre segmentos de curvas. **a)** Cruce Positivo. **b)** Cruce Negativo.

El Wr_D es un entero pero puede no tener el mismo valor para todos los puntos de proyección. Podemos definir el *Writhe* Wr como el valor promedio del writhe direccional Wr_D desde todos los posibles puntos de proyección.

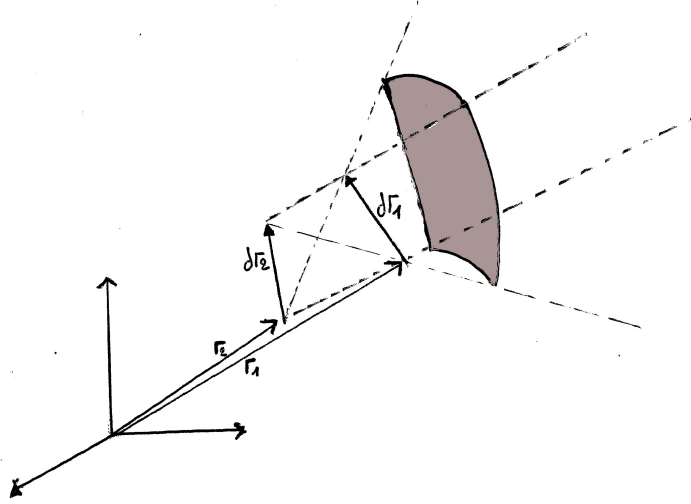


FIGURA 2.8: Ángulo sólido generado por dos segmentos de una curva. El ángulo sólido $d\Omega$ definido por todos los puntos de proyección desde los cuales los segmentos de curva $d\mathbf{r}_1$ y $d\mathbf{r}_2$ se cruzan entre sí.

Dados dos segmentos muy pequeños de la curva C , $d\mathbf{r}_1$ y $d\mathbf{r}_2$, que comienzan en los puntos $\mathbf{r}_1$ y $\mathbf{r}_2$ respectivamente, estos segmentos parecen cruzarse entre sí en un ángulo sólido² como el que se muestra en la Figura 2.8.

Para conocer este ángulo sólido debemos proyectar el área del paralelogramo formado por $d\mathbf{r}_1$ y $d\mathbf{r}_2$ sobre la esfera de radio $\|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2\|$. Esto lo hacemos haciendo la proyección del vector $d\mathbf{S} = d\mathbf{r}_1 \times d\mathbf{r}_2$ sobre el vector unitario:

$$\hat{\mathbf{r}} = \frac{(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2)}{\|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2\|}. \quad (2.15)$$

Así, el área sobre la esfera de radio $r = \|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2\|$ en la que se ve una intersección entre los segmentos estudiados está dada por:

$$\hat{\mathbf{r}} \cdot d\mathbf{S} = \frac{(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2)}{\|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2\|} \cdot (d\mathbf{r}_1 \times d\mathbf{r}_2). \quad (2.16)$$

El ángulo sólido $d\Omega$ se obtiene dividiendo (2.16) por el radio cuadrado r^2 de la esfera, para obtener el área sobre una esfera unitaria:

$$d\Omega = \frac{\hat{\mathbf{r}} \cdot d\mathbf{S}}{r^2}, \quad (2.17)$$

²El ángulo sólido es aquel que cubre un objeto visto desde un punto de observación y corresponde a la zona del espacio limitada por una superficie cónica (http://es.wikipedia.org/wiki/angulo_solido).

o de manera equivalente:

$$d\Omega = \frac{(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2) \cdot (d\mathbf{r}_1 \times d\mathbf{r}_2)}{\|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2\|^3}. \quad (2.18)$$

Cada $d\Omega$ tiene un signo que depende del tipo de cruce y un valor asociado a cuanto espacio ocupa del área de la esfera unitaria. Para conocer el promedio ponderado se debe dividir por el área total de la esfera unitaria, 4π .

Como los segmentos $d\mathbf{r}_1$ y $d\mathbf{r}_2$ pertenecen ambos a la curva C , sus puntos iniciales, $\mathbf{r}_1$ y $\mathbf{r}_2$, deben ambos describir la curva C . Entonces hay que recorrer la curva C dos veces, mediante dos vectores de posición $\mathbf{r}_1$ y $\mathbf{r}_2$ distintos, es decir, construidos con un distinto parámetro. El índice de superenrollamiento Wr es dado por:

$$Wr = \frac{1}{4\pi} \oint_C \oint_C \left(\frac{(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2) \times d\mathbf{r}_2}{\|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2\|^3} \right) \cdot d\mathbf{r}_1. \quad (2.19)$$

2.4.4 Teorema de Calugareanu

Volviendo a considerar la cinta creada por las curvas C y C' , donde C está representada por el vector posición $\mathbf{a}(s)$, y la curva C' está generada por $\mathbf{b}(s) = \mathbf{a}(s) + \varepsilon \mathbf{u}(s)$, se tiene que el índice de ligamiento, Lk , está dado por la expresión denominada Teorema de Calugareanu, que tiene la forma:

$$Lk = Wr + Tw, \quad (2.20)$$

donde, como antes, el Wr corresponde al eje central de la curva (o eje central de la cinta) y Tw es la torsión de sus bordes (Figura 2.9) [17][18][14].

2.5 Propiedades topológicas del DNA: Superenrollamiento

Hemos visto que el Lk se relaciona con el Tw y con el Wr mediante el Teorema de Calugareanu. Estas propiedades son exclusivas de dominios topológicos cerrados, puesto que si los extremos de la doble hélice estuvieran libres cualquier tensión estructural interna carecería de efecto ya que las dos cadenas de polinucleótidos podrían rotar sobre sí mismas liberando dicha tensión en los extremos [19]. Por lo tanto, el Wr sólo tiene lugar en moléculas CCCs o en moléculas lineales fijadas a membranas u otros elementos proteicos de tal manera que una región de las mismas, aunque sean lineales, se comportan como dominios topológicamente cerrados. Las moléculas CCCs son típicas del genoma

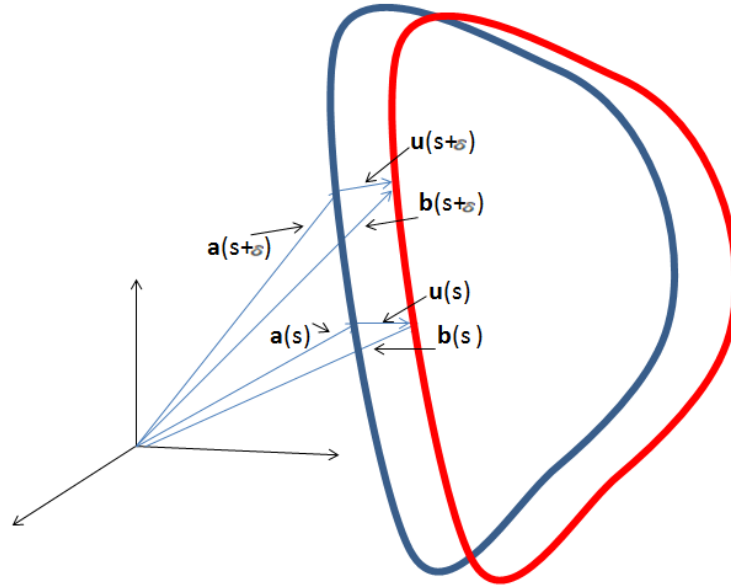


FIGURA 2.9: El teorema de Calugareanu para una cinta. El Tw está definido para una cinta, sus bordes son dos curvas con un determinado valor de Lk y el Wr queda definido por un eje que pasa a lo largo de la cinta.

de bacterias, plásmidos, mitocondrias, cloroplastos y muchos virus. Se cree que el DNA de los cromosomas eucarióticos está organizado en bucles o lazos en cuya base el DNA está unido covalentemente a un esqueleto proteico por lo que estos bucles constituirían dominios topológicos cerrados equivalentes a los CCCs [20].

Por convenio, se dice que el Wr es negativo (-) en el caso de las superhélices dextrógiras (que van en el sentido opuesto a las agujas del reloj) y positivo (+) en el de las levógiras (que van en el sentido de las agujas del reloj). El ΔWr es la diferencia entre el Wr de una molécula y el Wr de una conformación plana, la cual tiene Wr nulo. En la gran mayoría de los seres vivos las moléculas de DNA presentan un ΔWr (-) [21][22][23][24][25][26], aunque existen algunas excepciones como es el caso de las bacterias termófilas del género *Archaea*, cuyo DNA presenta un ΔWr (+) que se incrementa con el aumento de la temperatura [27].

Se han descrito dos conformaciones para el DNA superenrollado denominadas plectonémica y toroidal (véase Figura 2.10). El superenrollamiento plectonómico es un tipo de conformación en la que el eje axial del DNA sigue una trayectoria superhelicoidal alrededor de otro segmento de la misma molécula; dicho de otro modo, la doble hélice del DNA está enrollada alrededor de otra parte de la misma molécula formando una hélice de orden superior [6]. El DNA purificado y en solución presenta un superenrollamiento plectonómico [28]. El superenrollamiento toroidal es un tipo de conformación del DNA superenrollado en donde el eje axial de la molécula sigue una trayectoria superhelicoidal alrededor del eje de un toro imaginario, esto es, la doble hélice del DNA está enrollada

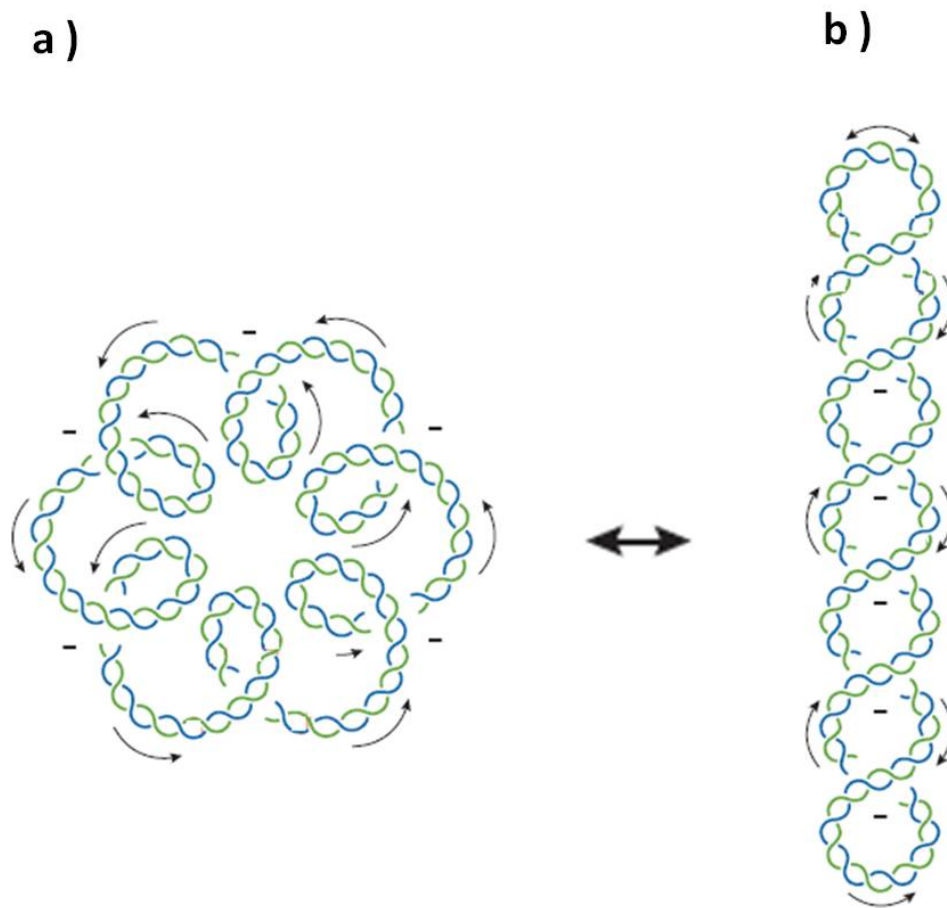


FIGURA 2.10: Conformaciones posibles el DNA superenrollado. **a)** Forma toroidal. **b)** Forma plectonémica. Tomada Tomada de Schwartzman and Stasiak, 2004.

alrededor de un toro formando una hélice de orden superior [6]. El DNA de los organismos eucariotas, enrollado alrededor de los nucleosomas, presenta un superenrollamiento toroidal que favorece la condensación del DNA necesaria para su empaquetamiento dentro del núcleo [28]. Existen además modelos que explican la unión del DNA, en su conformación toroidal, a la superficie de muchas proteínas [6]. La tensión impuesta al añadir vueltas adicionales en la hélice del DNA se distribuye entre el Tw y el Wr , es decir, ambas variables se compensan entre sí dando como resultado un valor invariante de Lk . El Lk sólo puede cambiar cuando se producen roturas en el DNA [29], las cuales pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble y que en cualquier caso dan como resultado la eliminación del Wr ya que permiten que una o ambas cadenas del polinucleótido giren la una sobre la otra liberando la tensión en los extremos. Cuando hablamos de niqueo (del inglés *nicking*) del DNA *in vitro*, nos referimos a roturas de cadena sencilla que convierten una molécula CCC en una molécula abierta y relajada llamada OC, esto es, un DNA circular de doble cadena que contiene una rotura en el enlace fosfodiéster en una de las dos cadenas.

2.6 DNA topoisomerasas

En todo dominio topológico cerrado de DNA los procesos de replicación, recombinación y transcripción alteran el Tw y el Wr pero no el Lk . Para alterar el Lk *in vivo* las células disponen de unas enzimas especializadas denominadas topoisomerasas. Estas enzimas están presentes en todos los seres vivos y crean roturas transitorias en el DNA que ayudan a resolver los problemas topológicos [20][22] [11][13]. Estas roturas transitorias en el DNA van acompañadas de la formación de un enlace fosfodiéster entre un residuo activo de tirosina presente en la enzima y un grupo fosfato de uno de los extremos de la cadena de DNA interrumpida. La topología de la molécula de DNA puede ser modificada durante el tiempo que se mantenga ese enlace. Finalmente, el enlace se rompe y la enzima vuelve a unir los extremos rotos del DNA [11].

Todas las topoisomerasas son capaces de eliminar el Wr (-), pero sólo algunas pueden eliminar también el Wr (+). En base a su mecanismo de acción las topoisomerasas se clasifican en dos grandes grupos: tipo I y tipo II, según corten una o las dos hebras de la doble hélice del DNA, respectivamente [11] [13][29].

2.6.1 DNA topoisomerasas de tipo I

Estas enzimas se clasifican en topoisomerasas de tipos IA y IB sobre la base de su secuencia de aminoácidos (AA) y mecanismos de acción. Las de tipo IA cortan una hebra simple y pasan la otra hebra a través de la hebra resultante para luego sellar la ruptura (mecanismo de pasaje de la hebra). Las topoisomerasas de tipo IB actúan por un mecanismo más sencillo, la rotación del DNA en el sitio de corte transitorio. De esta forma cambian el Lk en valores de ± 1 [30].

Las topoisomerasas de tipo I bacterianas sólo son capaces de relajar el Wr (-). Hay dos tipos de topoisomerasas de tipo I en *E. coli*: la Topoisomerasa I (Topo I) [12] y la Topoisomerasa III (Topo III) [31]. Ambas pertenecen al subtipo IA y solo son capaces de relajar $Wr(-)$.

Las topoisomerasas de tipo I de las células eucariotas, en cambio, son capaces de relajar tanto el Wr (-) como el (+). En *Saccharomyces cerevisiae* se conocen dos topoisomerasas de este tipo: la Topo I [32] que realiza un papel fundamental durante la transcripción y la Topo III [11] que podría estar implicada en el desencadenamiento del DNA junto con la helicasa Sgs1 [33]. No obstante, se ha demostrado que en ausencia de Topo III el Wr del DNA no está afectado de forma notable [34].

2.6.2 DNA topoisomerasas de tipo II

Estas enzimas cortan ambas hebras de la doble hélice del DNA y transportan otra doble hélice a través de la que está interrumpida para finalmente volver a unir los extremos cortados [11]. De esta forma hacen que el Lk cambie en valores de ± 2 [35][36]. Las topoisomerasas de tipo II, que están funcional y estructuralmente conservadas entre eucariotas y procariotas, actúan como dímeros³ y de un modo dependiente de ATP (Adenotrintrifosfato) [37] [38]. Se dividen a su vez en dos subfamilias: las de tipo IIA y las de tipo IIB [11][13]. Las topoisomerasas de tipo IIA son las que están mejor caracterizadas. Se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas y poseen estructuras similares [31][38][11]. Estas enzimas catalizan el paso de una doble hélice de DNA a través de otra doble hélice mediante un mecanismo denominado de dos puertas [31]. Su estructura es similar a la de una tenaza o pinza abierta, dentro de la cual se sitúa la doble hélice de DNA que será cortada y que constituye el denominado segmento G (del inglés *gate*). Tras la unión de ATP, la pinza se cierra capturando una segunda doble hélice de DNA, denominada segmento T (del inglés *transported*) [36], que hará pasar a través de la rotura transitoria producida en el segmento G y será expulsada de la enzima por el lado opuesto al que entró [36][31]. Este mecanismo de acción permite a estas enzimas realizar cambios topológicos en el DNA que son esenciales para la célula durante la replicación y la segregación cromosómica [13]. El mecanismo de acción de este tipo de topoisomerasas se muestra en la figura 2.11.

En *E. coli* existen dos topoisomerasas de tipo II: la DNA girasa [32] y la Topoisomerasa IV (Topo IV) [39][40]. La DNA girasa fue la primera topoisomerasa de tipo II descubierta y es la única conocida capaz de introducir Wr (-) en el DNA [32]. Por ello, ésta topoisomerasa de tipo II es el blanco de un gran número de agentes antimicrobianos, entre los que se destacan por su importancia los derivados de las quinolonas. Su estructura consiste en un heterotetrámero compuesto por dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB. Las subunidades GyrA están implicadas en la unión al DNA y en la introducción de roturas transitorias en la doble hélice, mientras que las subunidades GyrB son las responsables de la actividad ATPasa. La DNA girasa mantiene la densidad de Wr (-) necesaria para la iniciación de la replicación y la transcripción del DNA. Además, esta enzima participa en la fase de elongación de la replicación y la transcripción contribuyendo a la eliminación del Wr (+) que se genera por delante de las horquillas debido a la acción de las helicasas. De este modo, evita la acumulación de estrés torsional, lo cual podría eventualmente detener ambos procesos.

³En biología un dímero es una proteína compuesta por dos subunidades. En un homodímero las dos subunidades son idénticas, y en un heterodímero son diferentes (<http://es.wikipedia.org/wiki/Dímero>)).

La Topo IV bacteriana [39] es también un heterotetrámero cuyas subunidades ParC y ParE son homólogas de GyrA y GyrB, respectivamente. *In vivo*, la Topo IV está especializada en eliminar el encadenamiento que surge entre las cromátidas⁴ hermanas durante y después de la replicación del DNA [41][42] [43][44]. La topoisomerasa IV es capaz de relajar tanto $Wr(-)$ como $Wr(+)$, pero actúa de modo mucho menos eficiente relajando Wr negativo. Las topoisomerasas de tipo II de eucariotas son capaces de relajar tanto el $Wr(-)$ como el $(+)$, pero son incapaces de introducir $Wr(-)$. Por ejemplo, la única topoisomerasa de tipo II conocida en *S. cerevisiae* es la Topoisomerasa II (Top2) y está implicada fundamentalmente en la correcta segregación de las cromátidas hermanas [45][46].

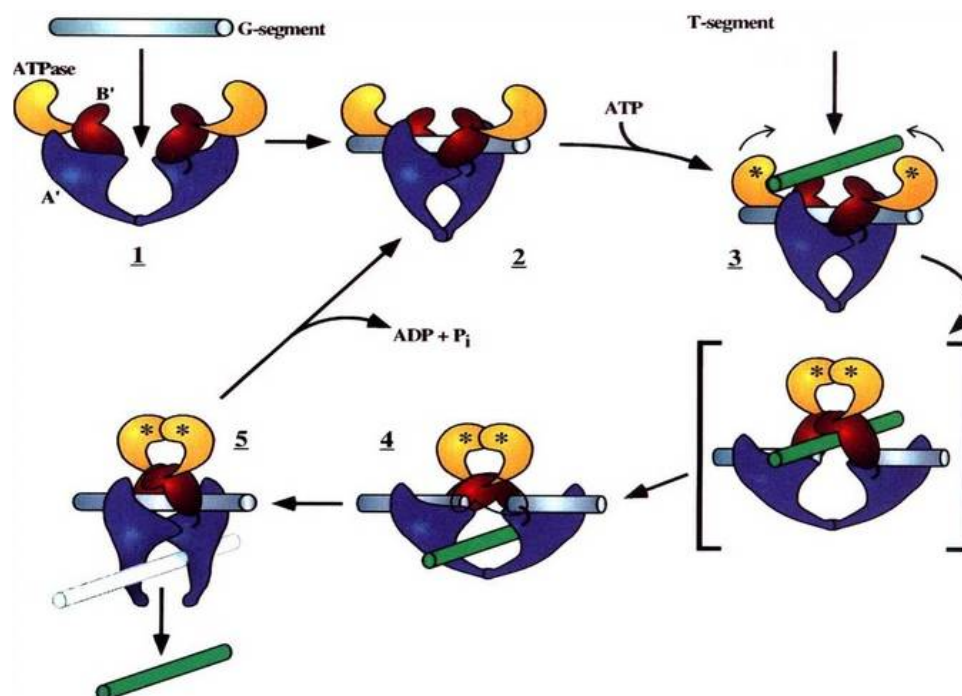


FIGURA 2.11: Modelo del mecanismo de acción de las topoisomerasas de tipo II [36].

En la figura 2.12 se muestra una tabla con distintos tipos de topoisomerasas, tanto de organismos procariotas como eucariotas.

⁴La cromátida es una de las unidades longitudinales de un cromosoma duplicado <http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatida>.

Enzyme	Type	Source	Subunit size (kDa) and composition	Remarks
Bacterial topoisomerase I (ω protein)	IA	Bacteria (e.g. <i>E. coli</i>)	97 Monomer	Cannot relax positive supercoils
Eukaryotic topoisomerase I	IB	Eukaryotes (e.g. human)	91 Monomer	Can relax both positive and negative supercoils
Vaccinia virus topoisomerase I	IB	Vaccinia virus	37 Monomer	ATP stimulates topoisomerase activity
Topoisomerase III ^a	IA	Bacteria (e.g. <i>E. coli</i>)	73 Monomer	Potent decatenating activity
Reverse gyrase	IA	Thermophilic Archaea (e.g. <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)	143 Monomer	Can introduce positive supercoils into DNA (ATP-dependent)
DNA gyrase	IIA	Bacteria (e.g. <i>E. coli</i>)	97 and 90 A ₂ B ₂	Can introduce negative supercoils into DNA (ATP-dependent)
T4 topoisomerase	IIA	Bacteriophage T4	58, 51, and 18 2 copies of each subunit	Can relax, but not supercoil, DNA (ATP-dependent)
Eukaryotic topoisomerase II	IIA	Eukaryotes (e.g. human topoisomerase II α)	174 Homodimer	Can relax, but not supercoil, DNA (ATP-dependent)
Topoisomerase IV ^a	IIA	Bacteria (e.g. <i>E. coli</i>)	84 and 70 C ₂ E ₂	Can relax, but not supercoil, DNA, potent decatenase (ATP-dependent)
Topoisomerase VI	IIB	Archaea (e.g. <i>Sulfolobus shibatae</i>)	45 and 60 A ₂ B ₂	Can relax, but not supercoil, DNA (ATP-dependent)

^a Note that topoisomerases III and IV do not represent 'types' of topoisomerase mechanism (cf. type I and type II).

FIGURA 2.12: Distintos tipos de topoisomeras encontrados en organismos procariotas y eucariotas [6].

2.7 Encadenamiento

En topología del DNA, el término encadenado alude a la unión topológica de dos o más moléculas circulares de DNA, entrelazadas como si se tratase de los eslabones de una cadena. El DNA encadenado ha sido observado en diversos sistemas biológicos tanto procariotas como eucariotas. En 1967 se observaron por primera vez, mediante microscopía electrónica, moléculas encadenadas de DNA en mitocondrias de células humanas. Posteriormente se encontraron también encadenados en mitocondrias de tripanosomas cuyo DNA es una estructura compacta, denominada cinetoplasto (kinetoplast DNA; kDNA) y que consiste de cientos de moléculas encadenadas [47]. Por otro lado, se ha demostrado la aparición de encadenados como productos o como intermediarios en procesos de recombinación [31] así como la formación y resolución de encadenados *in vitro*. La formación de encadenados es una de las consecuencias topológicas de la replicación del DNA tanto en células procariotas como eucariotas. Se han observado encadenados

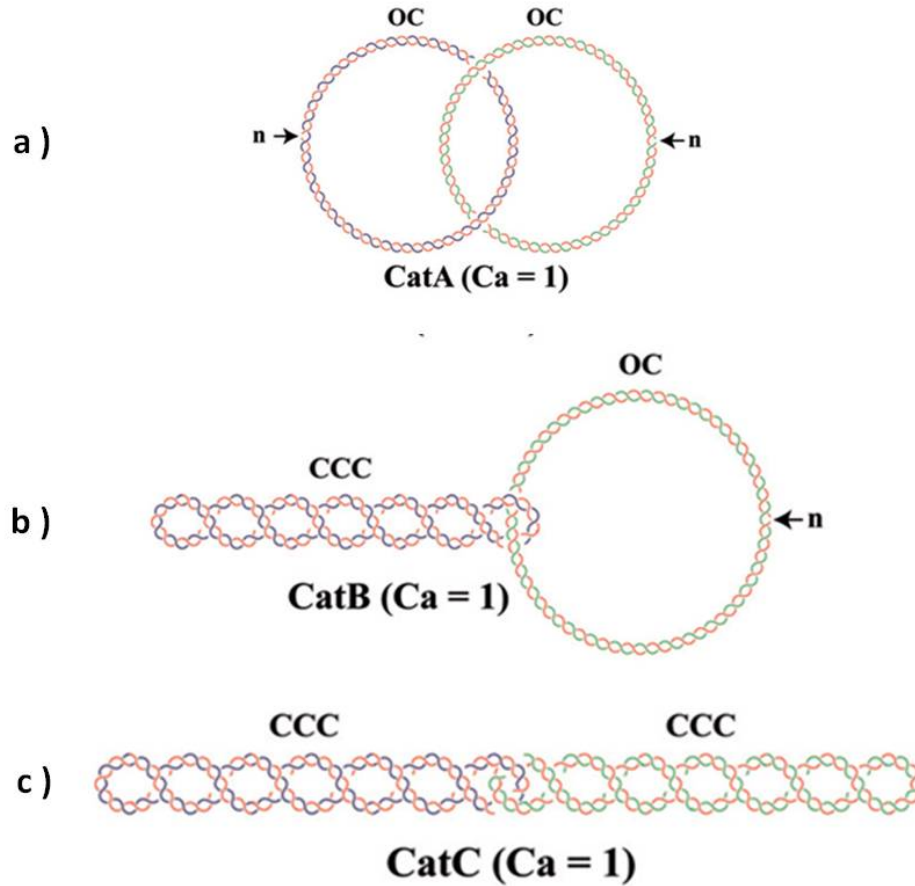


FIGURA 2.13: Representaciones de diferentes formas de encadenados con número de encadenamiento $Ca = 1$. **a)** Dos moléculas con rotura de cadena sencilla n (OCs) encadenadas. **b)** Dos moléculas encadenadas donde una de ellas tiene una rotura de cadena sencilla n (OC) y otra está covalentemente cerrada (CCC). **c)** Dos moléculas encadenadas covalentemente cerradas (CCCs) (Martínez-Robles et. al., 2009).

en el DNA del virus SV40 [48][49], también en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pero fundamentalmente se han estudiado en plásmidos bacterianos.

Existen tres tipos de encadenados: los de tipo A o CatA, en los que las dos moléculas de DNA circular están niqueadas y, por tanto, relajadas (ambas son OCs); los de tipo B o CatB en donde sólo una de las dos moléculas está niqueada (OC), mientras que la otra está covalentemente cerrada y puede albergar Wr (CCCs); y los de tipo C o CatC, en los que ambas moléculas encadenadas están covalentemente cerradas, pudiendo albergar Wr (CCCs). Estos últimos son el tipo de encadenado más abundante *in vivo* (Figura 2.12). Además, existen dos parámetros topológicos para definir los encadenados: el parámetro n , que es el número de cruces que presentan las moléculas encadenadas al proyectarlas sobre el plano; y el número de encadenamiento, Ca , cuyo valor es siempre la mitad de n [3]. La gran cantidad de encadenados con alto Ca que se acumulan al inhibir la topoisomerasas de tipo II pone en evidencia que son éstas las encargadas de eliminar el encadenamiento en el DNA [50][51][52][53]. En *E. coli* la Topo IV desencadena el DNA *in*

vivo [40][41] y recientemente se ha demostrado que el Wr (-) ayuda al desencadenamiento por parte de esta enzima [3]. En *S. cerevisiae* la encargada de desencadenar es la Top2 [43][44].

2.8 Anudamiento

Tan pronto como se descubrieron las topoisomerasas se reparó en la posibilidad de que se formen nudos en el DNA. Éstos pueden surgir de cualquier proceso que implique roturas de las cadenas de DNA (incluyendo replicación, transcripción, recombinación y reparación) y, de no ser eliminados, sus efectos resultarían devastadores para la célula [54][42] [55][56]. El anudamiento es pues otra de las propiedades topológicas del DNA [14] y, al igual que sucede con el Wr , sólo tiene lugar en dominios topológicos cerrados.

En 1976, James Wang y colaboradores fueron los primeros en observar nudos en moléculas de DNA circular de cadena sencilla del bacteriófago λ tratadas con una proteína de *E. coli* entonces llamada ω y que luego resultó ser la Topo I (Liu et. al., 1976). Posteriormente, se observó la formación de nudos en DNA de doble cadena como consecuencia de la actividad de la topoisomerasa de tipo II del fago T4 (Liu et. al., 1980) y de la DNA topoisomerasa II de *Drosophila* (Hsieh, 1983). Además, se demostró que la Topo I de *E. coli* es también capaz de formar nudos en DNA de doble cadena, siempre y cuando éste tenga una pequeña región de cadena sencilla [57][58]. Asimismo, otros estudios *in vitro* demostraron la formación de nudos en DNA de doble cadena por parte de enzimas implicadas en procesos de recombinación, como la resolvasa Tn3 (Wasserman y Cozzarelli, 1985; Wasserman et. al., 1985), codificada por el transposon del mismo nombre en bacterias, y la integrasa Int del bacteriófago λ (Griffith y Nash, 1985; Spengler et. al., 1985).

En cuanto al anudamiento *in vivo*, se observó la formación de nudos de manera natural en el DNA de doble cadena de la cápside de los bacteriófagos P2 y P4 (Liu et. al., 1981; Liu y Davis, 1981). No obstante, la información sobre el anudamiento del DNA *in vivo* sigue siendo escasa; de ahí que resultara sorprendente el descubrimiento de plásmidos bacterianos con horquillas de replicación detenidas y anudadas. Los RIs con burbujas anudadas fueron, en principio, descritos en plásmidos de *E. coli* con dos orígenes de replicación ColE1 enfrentados y en plásmidos con un origen de replicación ColE1 y una barrera para el progreso de la horquilla de replicación [59][60] [56][61][62][63]. Aún hoy día se desconoce con exactitud qué papel juega el anudamiento durante la replicación. En *E. coli* se sabe que la Topo IV es la topoisomerasa encargada de desanudar el DNA *in vivo* [42].

2.9 Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación: topología de los intermediarios de replicación

En la gran mayoría de los seres vivos para que se inicie la replicación semiconservativa⁵ del DNA éste debe estar negativamente superenrollado. De este modo se facilita la separación de las cadenas parentales que serán usadas como molde por las DNA polimerasas durante la replicación [64](Marians et. al., 1986; Funnell et. al., 1987; Kanaar y Cozzarelli, 1992). Una vez que la iniciación ha tenido lugar, la elongación es llevada a cabo por un complejo multiproteico denominado replisoma. Actualmente se cree que no es el replisoma el que avanza sino que es el DNA el que pasa a través de él [50]. Por delante del replisoma se encuentra la DNA helicasa, una proteína hexamérica responsable de la apertura de la doble hélice parental. Esa apertura genera una tensión topológica que da lugar a $\Delta Wr(+)$ por delante de la horquilla de replicación [65]. Este $Wr(+)$ debe ser eliminado o de lo contrario se acumularía impidiendo el avance de la horquilla de replicación, pues para facilitar la replicación el DNA debe tener $\Delta Wr(-)$. Por ejemplo, en bacterias, la DNA Girasa introduce $Wr(-)$ por delante (hacia la región no replicada) de la maquinaria de replicación para compensar el $Wr(+)$ que genera el avance de la horquilla [11][50] [66]. Pero la acción de la DNA girasa no es suficiente para anular ese $Wr(+)$ debido a que la procesividad de las helicasas generando $Wr(+)$ por delante de la horquilla de replicación es significativamente mayor que la de la DNA Girasa introduciendo $Wr(-)$ [67]. En estadios tempranos de la replicación, cuando la región no replicada es suficientemente grande, serían varias las DNA topoisomerasas que se podrían unir a esa región y su funcionamiento en serie podría conseguir la introducción de un nivel suficiente de $Wr(-)$. Sin embargo, a medida que la replicación progresa disminuye la longitud de la región no replicada por lo que cada vez habría menos espacio físico para la unión de las topoisomerasas al DNA en la región no replicada. Champoux y Been propusieron un modelo que asume que durante la replicación el superenrollamiento positivo ($Wr(+)$) podría migrar de la región no replicada a la ya replicada y distribuirse en estas dos regiones del intermediario de replicación (RI), de manera que las topoisomerasas podrían actuar eliminando la acumulación de $Wr(+)$, tanto por delante como por detrás de la horquilla [68]. Esta hipótesis es la que actualmente cuenta con mayor aceptación y propone que durante la replicación son varias las topoisomerasas que cooperarían para compensar el $Wr(+)$ generado en la región no replicada como consecuencia del avance de la horquilla de replicación. En 1998, Peter y colaboradores confirmaron, empleando microscopía electrónica, la difusión del Wr a través de la horquilla de replicación *in*

⁵En la replicación semiconservativa se originan dos moléculas de ADN, cada una de ellas compuesta de una hebra de el ADN original y de una hebra complementaria nueva. En otras palabras el ADN se forma de una hebra vieja y otra nueva. Es decir que las hebras existentes sirven de molde complementario a las nuevas (<http://www.biologia.edu.ar/adn/adntema1.htm>)

vivo y llamaron pre-encadenados a los cruces de las cromátidas hermanas en la región ya replicada para distinguirlo del Wr de la región aún no replicada [67]. El nombre alude al hecho de que los pre-encadenados darán lugar a moléculas encadenadas al finalizar la replicación [51] [63][67][68]. Es importante destacar que para que el superenrollamiento pueda difundirse a través de la horquilla de replicación los dobles hélices de la región ya replicada deben ser capaces de girar libremente una alrededor de la otra en la horquilla de replicación (Figura 2.13). En *E. coli*, la DNA Girasa introduciría $Wr(-)$ mientras que la Topo IV se encargaría de eliminar el $Wr(+)$ generado en la región no replicada como consecuencia del avance de la horquilla de replicación. Por otro lado la Topo IV también eliminaría el pre-encadenamiento por detrás de la horquilla una vez que el Wr haya migrado de la región no replicada a la ya replicada. Esto explicaría por qué la progresión de las horquillas de replicación está totalmente impedida sólo cuando ambas topoisomerasas de tipo II están mutadas [69][50].

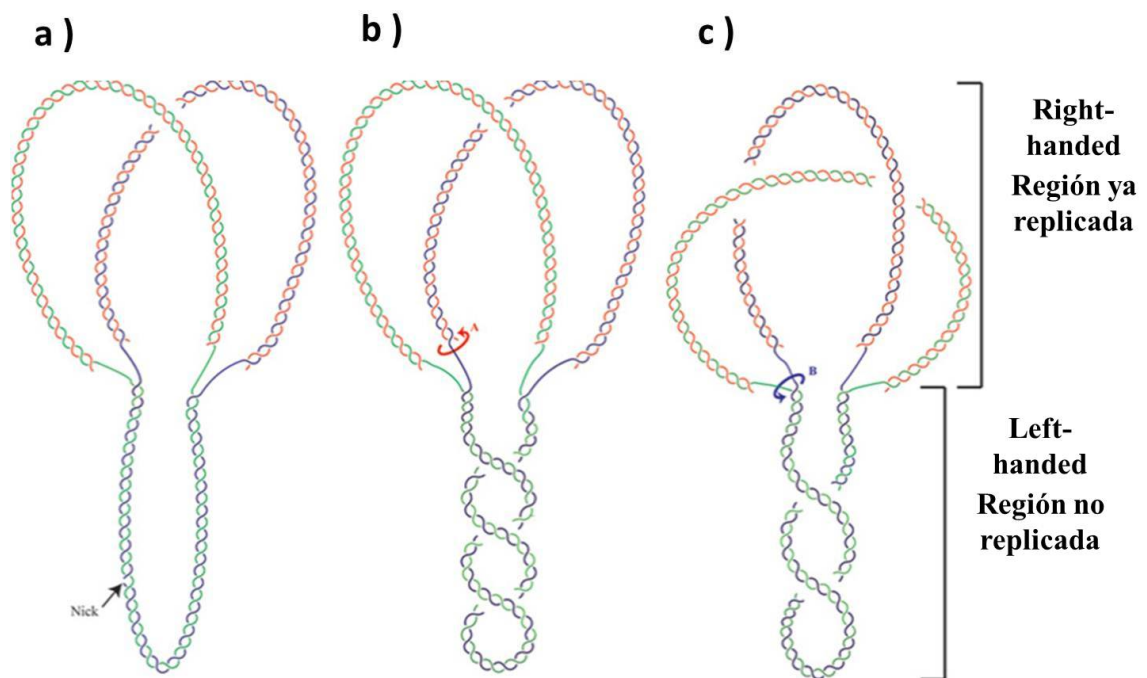


FIGURA 2.14: Ilustración de la topología de intermediarios de replicación. a) RI completamente relajado con una rotura de cadena sencilla en la región no replicada. b) Molécula CCRI parcialmente replicada con superenrollamiento positivo en la región no replicada. Ya que las cadenas nacientes (rojo) tiene extremos libres, estas pueden rotar sin restricciones en torno a sus cadenas parentales (flecha roja A). Entonces las cadenas hermanas no pueden albergar superenrollamiento. c) Si las horquillas pueden girar (flecha azul B) permite la migración de un superenrollamiento *Left-handed* positivo a la región ya replicada, creandose un pre-encadenamiento *Right-handed*. Las cadenas parentales están en verde y azul, mientras que las nacientes estan en rojo [?].

2.9.1 Quiralidad y signo topológico de los RIs

La quiralidad y los signos topológicos en los intermediarios de replicación puede presentar diversos aspectos. Para comprender la topología de estas moléculas se analizan los signos topológicos de los cruces que muestre la molécula desde algún punto de proyección u observación, y los signos dependen de la orientación de la molécula, si ésta es analizada como una curva. En la Figura 2.14 se muestra una manera de diferenciar los signos topológicos tratando a las moléculas como curvas orientadas. Dicho signo depende del sentido en que debe girar el segmento dirigido que pasa por arriba para superponerse con el que pasa debajo; si se gira en sentido horario el signo es negativo y es positivo en caso contrario. De acuerdo al sentido en que la molécula está enrollada en torno su eje imaginario, es decir su quiralidad, las moléculas se clasifican en dextrógiras o *Right-handed*(RH) y levógiras o *Left-handed*(LH) (Figura 2.14 b).

En una molécula con conformación plectonémica se tiene signo topológico negativo si la molécula está enrollada en forma dextrógira, y signo topológico positivo si está enrollada en forma levógira. Sin embargo en un intermediario de replicación los signos y la quiralidad pueden presentarse de diversas formas. Curiosamente, en un RI con superenrollamiento negativo *in vitro* la doble hélice de la región no replicada se enrolla sobre sí misma en sentido dextrógiro (RH(-)) mientras que las cadenas de la región ya replicada se enrollan sobre sí mismas en sentido levógiro (LH(-)) [70]. Lo contrario ocurre en el caso del superenrollamiento positivo con sentido levógiro. Resumiendo, al pasar el superenrollamiento de la región no replicada a la ya replicada lo hace con quiralidad opuesta pero conservando el signo topológico. Los ejemplos de estos cambios se muestran en la Figura 2.15, en la que se representa a un RI por medio de gomas elásticas. En la Figura 2.16 a se muestra un modelo de intermediario de replicación *in vivo* propuesto por Jorge B. Schvartzman et. al., en el cual las cadenas nacientes de la región ya replicada no pueden superenrollarse pero sí pueden girar una alrededor de la otra, introduciendo pre-encadenamiento [?]. La migración de cruces LH(+) de la región no replicada provoca la introducción de pre-encadenados con cruces RH(+) en la región ya replicada, los cuales serán eliminados por la Topo IV. Al terminar la replicación los pre-encadenamientos que no fueran eliminados por la Topo IV se transformarán en encadenamientos entre las cromátidas hermanas. En el caso de RIs obtenidos *in vitro* a partir de bacterias que expresan (que producen) Topo IV, éstas presentarían cruces RH(-) en la región no replicada debido al superenrollamiento negativo y cruces LH(-) en los pre-encadenados de la región ya replicada. Estos se formarían como consecuencia de la difusión del $Wr(-)$ luego de la desprotección, es decir, la eliminación del replisoma que impide la difusión del superenrollamiento negativo (Figura 2.16 b). Sin embargo, en RIs obtenidos de bacterias que no expresan Topo IV, la región no replicada se enrollaría en forma RH(-) y la ya replicada en forma RH(+) (Figura 2.16 c). En este caso

no se produciría la migración del $Wr(-)$ después de la desproteinización debido a que, en ausencia de Topo IV, se produciría una gran acumulación de pre-encadenados con cruces RH(+). Este cambio en la quiralidad pero no en el sentido del cruce se ha observado en transición de la conformación toroidal a la plectonémica [14]. *In vivo*, durante la replicación el replisoma es una barrera que mantiene las dos regiones del RI como dominios topológicos cerrados [?]. En esta etapa el $Wr(-)$ de la región no replicada no puede pasar a la región ya replicada, sin embargo sí puede pasar el $Wr(+)$ introducido por la helicasa que abre la horquilla de replicación [?].

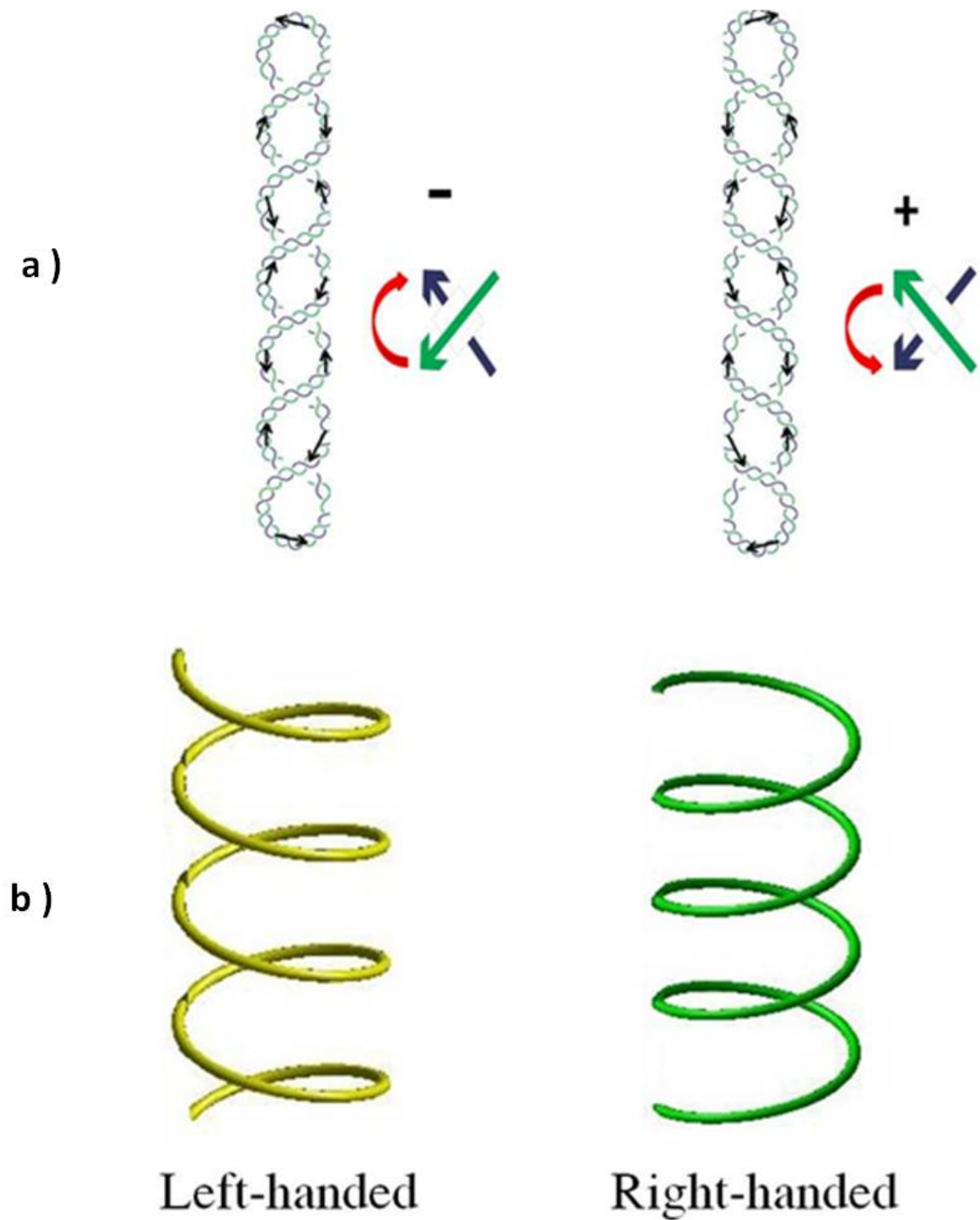


FIGURA 2.15: Nomenclatura de signos topológicos y sentido de giro para la topología del DNA. **a)** El signo topológico se obtiene observando la orientación de la curva en un cruce. **b)** El sentido de giro de una curva en torno a un eje imaginario que pasa por su eje define su quiralidad

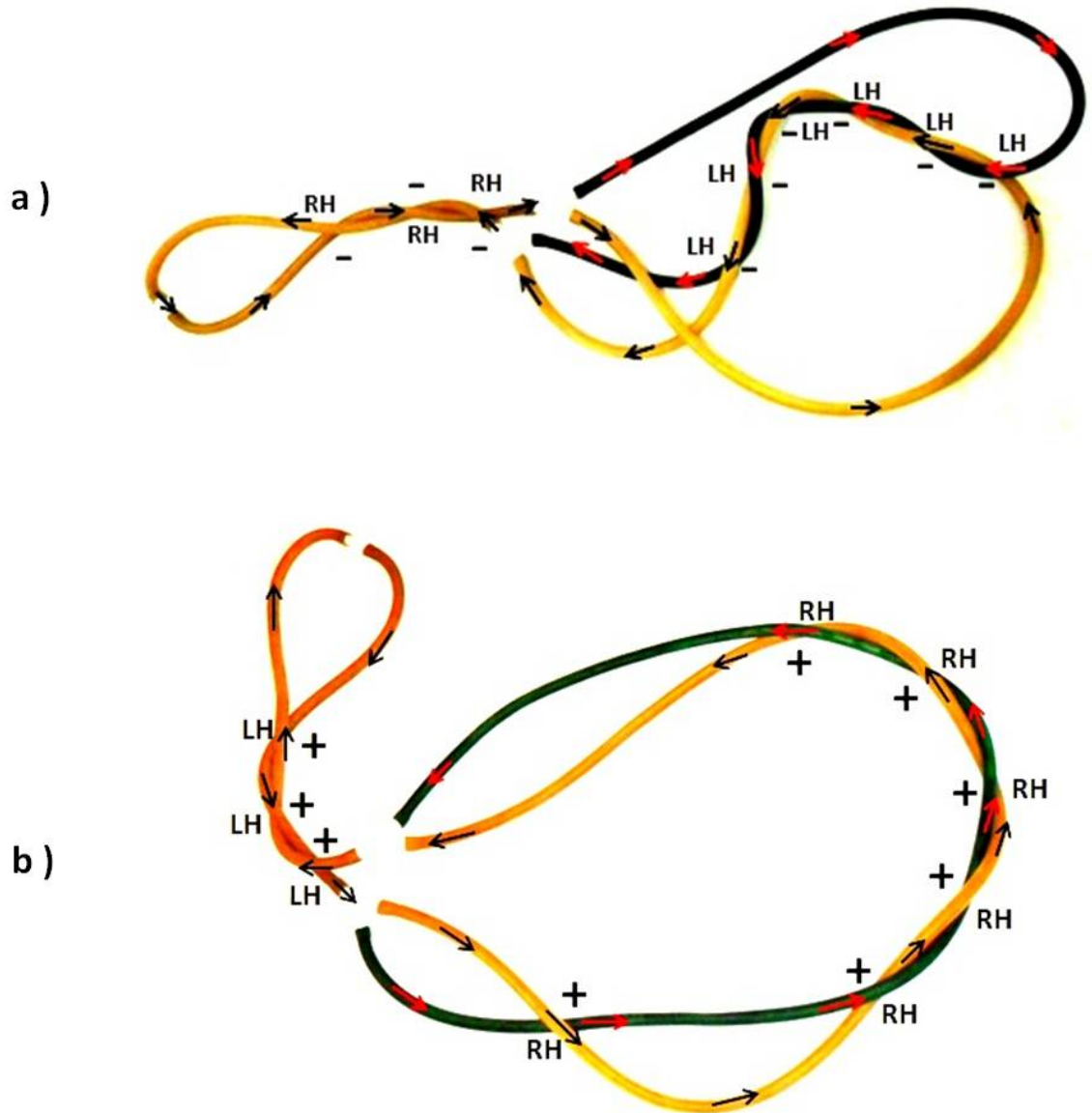


FIGURA 2.16: Signos topológicos y quiralidad de un CCR representado con gomas elásticas. **a)** Si se introducen cruces RH(-) en la región no replicada se forman cruces LH(-) en la región ya replicada. **b)** La introducción de cruces LH(+) en la región no replicada induce la formación de cruces RH(+) en la región ya replicada.

2.10 La paradoja de la Topoisomerasa IV

Se ha encontrado que la Topo IV es muy eficiente eliminando cruces LH, tales como los que se encuentran en moléculas con $Wr(+)$ [34]. Esta observación explica como es que la Topo IV remueve eficientemente el superenrollamiento positivo que se acumula frente a la horquilla de replicación y, al mismo tiempo, es prácticamente inactiva con respecto al superenrollamiento negativo necesario para el progreso de la horquilla. Por otro lado estudios previos muestran que la Topo IV puede desencadenar pre-encadenados y

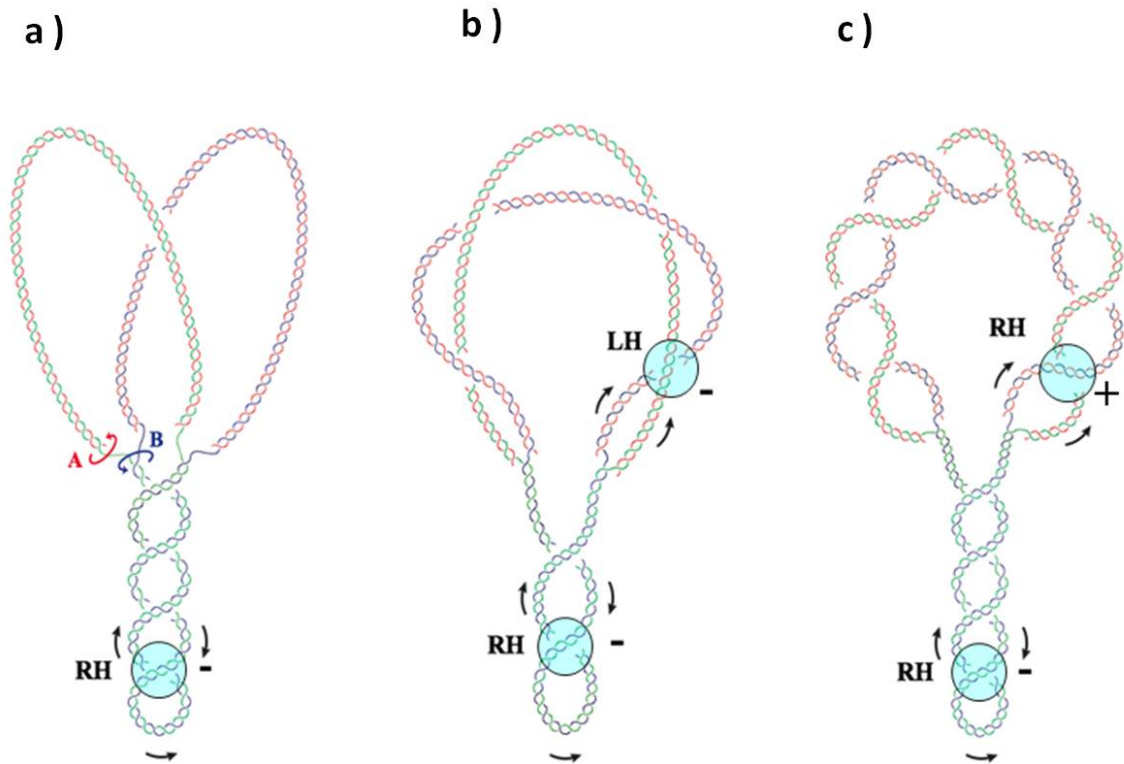


FIGURA 2.17: Topología de los signos y quiralidad de los cruces en los RIs. **a)** Intermediario de replicación CCRI de una estirpe que en la que actúa la Topo IV *in vivo* donde las cadenas nacientes son incapaces de rotar libremente una en torno a la otra en las horquillas de replicación para liberar tensión negativa desde la región no replicada. **b)** CCRI de una estirpe en la que actúa la Topo IV *in vitro* después de la desproteización. La región no replicada se enrolla en forma Right Handed con signo negativo y la región ya replicada se enrolla en forma Left Handed con signo negativo. **c)** CCRI de una estirpe deficiente en Topo IV *in vivo* después de la desproteización. La región no replicada se enrolla en forma Right Handed con signo negativo y la región ya replicada de forma Right Handed pero con signo positivo (Schvartzman and Stasiak 2004).

encadenados con quiralidad $RH(\pm)$, a pesar de no ser eficiente relajando moléculas superenrolladas con cruces $RH(-)$. Como sea, éstas observaciones hacen aún más misteriosa la cuestión de cómo los cruces $RH(+)$ de dos moléculas encadenadas pueden ser removidos eficientemente por la Topo IV. La solución a ésta paradoja aún no está resuelta [?]. Se han propuesto varios modelos para responder a esta cuestión, sin embargo ninguno ha sido confirmado *in vivo*. Una solución parcial para este problema fue propuesto a partir del estudio de moléculas relajadas, las cuales fueron trenzadas una en torno a la otra en sentido RH, igual que en los pre-encadenados y encadenados [34]. Cuando se mantenían estiradas por una alta fuerza de tensión estas trenzas no eran relajadas por la Topo IV. Sin embargo cuando la fuerza de tensión disminuía a niveles comparables con los que se encuentran en células vivas, las trenzas decrecen su energía elástica formando enrollamientos de orden superior con cruces LH. Estos cruces LH eran eficientemente reconocidos y servían como sustrato para que la Topo IV separe las moléculas. Esto

mismo podría ocurrir durante el desencadenamiento de moléculas con elevado número de encadenamiento C_a . Por otro lado algunos autores sugieren que la Topo IV es capaz de eliminar eficientemente encadenados dextrógiros *in vitro* en moléculas de DNA tan altamente encadenadas que los cruces dextrógiros modifican su geometría angular y se convierten en cruces levógiros, constituyendo así un sustrato adecuado para la Topo IV [71].

2.11 Análisis de RIs mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa

Esta técnica fue utilizada originalmente para separar intermediarios de recombinación ramificados de moléculas lineales [72] y posteriormente fue adaptada para analizar RIs lineales. Actualmente la electroforesis bidimensional en geles de agarosa es una de las herramientas más frecuentemente empleadas en el mapeo de orígenes de replicación [73][74] [75] [76] [77], términos [60][61] y barreras para el progreso de las horquillas [78][79] [80]. Además, permite resolver las distintas formas topológicas que pueden adoptar los CCCs [72] [81] [82] y ha demostrado ser la herramienta más idónea para la identificación de moléculas de DNA lineales con una burbuja interna anudada [59][83] [84]. La posibilidad de añadir un agente intercalante durante la primera y/o la segunda dimensión aumenta aún más su poder de resolución [85].

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa se basa en que la movilidad electroforética de una molécula de DNA en un gel de agarosa depende no sólo su tamaño sino también de su forma, de la concentración de agarosa presente en el gel y de la fuerza del campo eléctrico al que se somete dicha molécula. Ajustando todos estos parámetros, es posible separar los RIs y el resto de moléculas de DNA ramificadas de las moléculas no replicadas. En líneas generales, en un gel bidimensional la primera dimensión transcurre en condiciones de bajo voltaje y bajo porcentaje de agarosa en el gel. En estas condiciones se minimiza el efecto de la estructura tridimensional de las moléculas sobre su movilidad electroforética y las mismas se separan fundamentalmente en función de su masa. En cambio, la segunda dimensión transcurre en condiciones de alto voltaje y alto porcentaje de agarosa potenciando así la influencia de la estructura tridimensional de las moléculas sobre su movilidad. En estas condiciones, las moléculas ramificadas tienen menor movilidad que las moléculas lineales de igual masa. De esta forma, es posible analizar mezclas de poblaciones de moléculas con distintas masas y formas.

2.12 Agentes intercalantes

Los agentes intercalantes son sustancias capaces de alterar el retorcimiento de la doble hélice del DNA. Las moléculas de estos agentes intercalantes tienen una estructura planar, usualmente policíclica y aromática que se puede insertar entre dos pares de bases de una doble hélice de DNA. Esta inserción causa un cambio en el índice de torsión (Tw) de la molécula de DNA, resultando en una disminución del número de repeticiones helicoidales de la molécula, es decir, una disminución en el Tw . Los agentes intercalantes no alteran el índice de ligamiento (Lk) de moléculas CCCs. Si se tiene una molécula de DNA con un determinado índice de superenrollamiento $Wr(-)$ (por ende $\Delta Lk < 0$ y $\Delta Tw < 0$), conforme aumenta la concentración del agente intercalante en el medio, se produce una disminución en el Tw . De la ecuación $\Delta Lk = \Delta Tw + Wr$ se deduce que si el ΔLk se mantiene constante entonces el Wr debe aumentar. Es decir, conforme aumenta la concentración del agente intercalante, el Wr aumenta hasta alcanzar el valor $Wr = 0$, que corresponde a moléculas relajadas. Un estudio de un plásmido en estas condiciones mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa demuestra que estas moléculas adquieren la movilidad electroforética de moléculas OCs. Si la concentración del agente intercalante sigue aumentando entonces los plásmidos adquieren $Wr > 0$, y van recuperando movilidad electroforética. Entre los agentes intercalantes que producen este efecto se encuentran el bromuro de etidio (EtBr) y la cloroquina. Debido a que, con las concentraciones de EtBr normalmente utilizadas en electroforesis ($1 \mu\text{g/mL}$) el DNA está saturado y todas las moléculas CCCs adquieren mucho $Wr(+)$ y no pueden separarse, por razones prácticas, se utiliza cloroquina, la cual se une débilmente al DNA permitiendo una mejor separación de los topoisómeros.

En intermediarios de replicación, que cuentan con una región no replicada con un cierto grado de $Wr(-)$ y una región ya replicada con un determinado número de pre-encadenamientos, la presencia de un agente intercalante tiene un efecto distinto. Un aumento en la concentración del agente intercalante elimina el $Wr(-)$, a continuación la región no replicada adquiere $Wr = 0$ y, consecuentemente, pierde el pre-encadenamiento en la región ya replicada haciendo que la molécula tenga la misma movilidad que un RI relajado, es decir, que un AccRI (Accumulated RI). A partir de este punto un aumento en la concentración del agente intercalante no permite que la región no replicada adquiera $Wr > 0$ y recupere movilidad electroforética, sino que la molécula se mantiene con la movilidad de las moléculas AccRIs. Esto se debe a que en las horquillas de replicación las cadenas nacientes cuentan con extremos libres de cadena sencilla (solamente las moléculas parentales se hallan unidas a la región no replicada) y una vez que el RI se relaja, un aumento en la concentración del agente intercalante hace que las cadenas nacientes se unan entre sí (ya que son cadenas complementarias) y formen un cuarto brazo en la horquilla de replicación. Este cuarto brazo es llamado *horquilla en retroceso*

(o *chicken foot* por su aspecto cuando se observa con microscopía de fuerza atómica o electrónica). Los aumentos posteriores en la concentración del agente intercalante hacen que en lugar de introducir $Wr(+)$, la horquilla en retroceso aumente su longitud y el RI se mantenga en estado relajado. La horquilla en retroceso se forma sólo en una de las horquillas de replicación [86]. En la Figura 2.17 se muestra un esquema de un RI una horquilla en retroceso en un intermediario de replicación. Los agentes intercalantes pueden extraerse mediante dilución de manera a reducir su concentración y hacer que las moléculas vuelvan a adquirir su topología original.

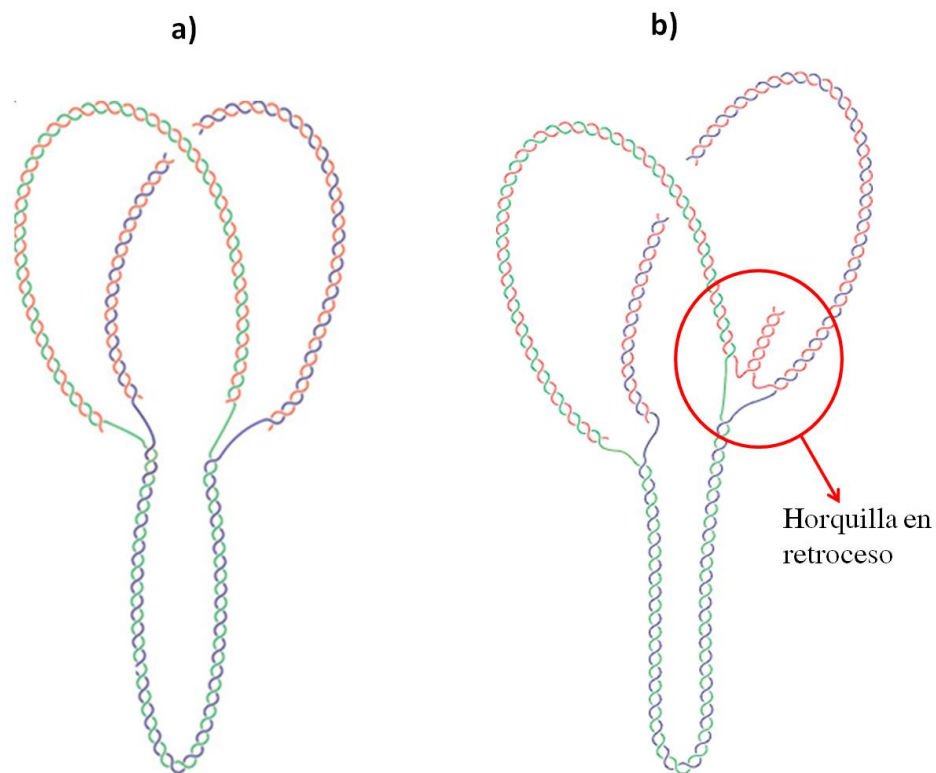


FIGURA 2.18: Formación de una horquilla en retroceso. **a)** Una concentración suficiente de agente intercalante es capaz de llevar a un RI a un estado relajado. **c)** Al aumentar la concentración del agente intercalante se forma una horquilla en retroceso en una de las horquillas de replicación. Las cadenas parentales están en verde y azul, las cadenas hijas se representan en rojo.

Capítulo 3

Simulación por el método de Monte Carlo

3.1 Simulación computacional de la topología del DNA

Las simulaciones computacionales de conformaciones recurren a métodos simplificados de la estructura de las moléculas de DNA, debido a la gran complejidad de las mismas. Los métodos de dinámica molecular no son apropiados debido al gran número de nucleótidos (del orden de 10^3 en los plásmidos) que conforman una doble hélice de DNA, si es que ésta debe ser suficientemente grande para tener el tamaño de un plásmido. Por esta razón la mayoría de las simulaciones de las conformaciones de DNA son hechas por el método de Monte Carlo (MC). En su sentido más general, el método de MC simula propiedades de un sistema utilizando algún método que implica números aleatorios y probabilidad. En el sentido más específico de simulaciones moleculares, se desarrollan modelos de conformación de una molécula de DNA que se pueden utilizar para calcular energía y a continuación se utilizan cambios aleatorios en la conformación para probar las energías de un conjunto de conformaciones, ya sea con el fin de encontrar la conformación más estable o para generar un conjunto de conformaciones posibles. El método específico usado en la mayoría de los estudios de DNA, así como en muchos otros, fue desarrollado por Metropolis y colaboradores en 1953 [6][87]. A partir de una conformación inicial se calcula su energía inicial E_1 , luego, se induce un cambio conformacional aleatorio en el modelo para dar una nueva conformación de *prueba* y se calcula una nueva energía E_2 . La conformación de prueba es aceptada inmediatamente si tiene una energía más baja que la del predecesor ($E_2 < E_1$), pero si la energía es mayor, la conformación se acepta al azar, con una probabilidad P que depende exponencialmente de la diferencia de energía entre las dos conformaciones:

$$P = e^{\frac{(E_1 - E_2)}{k_b T}}. \quad (3.1)$$

Esto representa la probabilidad de que una conformación determinada con $E_1 < E_2$ sea aceptada bajo las condiciones térmicas indicadas. Si se acepta la conformación de prueba, se utiliza como la base para la generación de una nueva conformación. Si se rechaza, la conformación anterior se utiliza para el siguiente paso. De esta manera, después de muchas conformaciones de prueba, típicamente cientos de miles, las simulaciones convergen a conformaciones de una distribución térmica de las moléculas estables. Estos métodos fueron aplicados por primera vez para una conformación circular de DNA por Le Bret y Vologodskii et al. [88][89][90][91].

3.1.1 Simulación para superenrollamiento de DNA

Para la simulación de las propiedades térmicas y conformacionales de moléculas circulares de DNA se deben tener en cuenta ciertas propiedades intrínsecas del tipo de moléculas que se quiere representar. Dos propiedades muy importantes para la simulación son el diámetro de la molécula y la rigidez en función de su longitud. Debido a la carga eléctrica negativa del DNA, dos segmentos separados se repelen entre sí. La fuerza repulsiva depende de la concentración de iones del medio en el que se encuentra la molécula. A la distancia mínima a la que pueden estar dos segmentos distintos de moléculas de DNA, a causa de la repulsión eléctrica, se le llama *diámetro efectivo* y corresponde al mismo diámetro de la doble hélice [6]. El diámetro y la longitud de la molécula definen un volumen denominado *volumen excluido*.

Una molécula de DNA se puede cerrar y formar un círculo solamente si su longitud es un múltiplo entero de su longitud de repetición helicoidal, y la energía necesaria para doblar la molécula en un círculo es menor mientras mayor es la longitud total de ésta. La flexibilidad de la molécula de DNA se describe normalmente por un parámetro llamado la longitud de persistencia, a , que describe la escala de longitud sobre la que la rigidez de la hélice de DNA es importante [6][91]. Se puede definir la longitud de persistencia como la longitud sobre la que existe una cierta correlación entre la dirección inicial y final de la hélice. Después de una distancia de una longitud de persistencia a , debido al movimiento térmico, la desviación media del eje de la hélice a partir de su dirección inicial será un radián, y después de dos longitudes de persistencia, $2a$, ya no habrá correlación entre las direcciones inicial y final, con un ángulo medio de deflexión alrededor del 90° . El valor $2a$ también se conoce como la longitud estadística *Kuhn* [6][91]. El valor de la longitud de persistencia está directamente relacionado con la rigidez de doblado de la molécula y con la temperatura absoluta del medio. Otra característica importante de

una conformación simulada de superenrrollamiento, además de su diámetro efectivo y su rigidez de doblado, es la variación de su Lk con respecto a una conformación relajada ΔLk_0 , esta variación es llamada ΔLk .

El modelo que se utiliza en esta obra para simular al DNA es conocido como *wormlike chain*, en el que molécula está representada por una serie de segmentos rectos de longitud constante [90][91]. Si se asigna a cada segmento de la curva una distancia mínima a la que se le permite estar de otro segmento, entonces se puede suponer que la curva es ahora un cilindro o tubo impenetrable. Para emular un plásmido la curva de segmentos rectos debe ser cerrada y con un número finito de segmentos. El método de Metropolis MC demanda adquirir un valor de energía para cada conformación de prueba creada. La energía potencial elástica en la molécula simulada tendrá dos componentes: una energía elástica de doblado, E_b y una energía elástica de torsión, E_t . La energía de doblado está asociada al ángulo que existe entre dos segmentos de la curva en las que éstos son aproximadamente rectos. Para un modelo en el que el eje de una molécula de DNA esta compuesta con N segmentos rectos, la energía de doblado está dada por:

$$E_b = k_b T \alpha \sum_{i=1}^N \theta_i^2, \quad (3.2)$$

donde la sumatoria se extiende a todas las uniones entre los segmentos rígidos, k_b es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta (297 K), θ_i es el desplazamiento angular (en radianes) del segmento i relativo al segmento $i + 1$ y α es la constante de rigidez de doblado [91]. La figura 3.1 nos muestra los el modelo *wormlike chain* con sus ángulos de doblado correspondiente y el tipo de movimientos de prueba utilizados en esta Tesis.

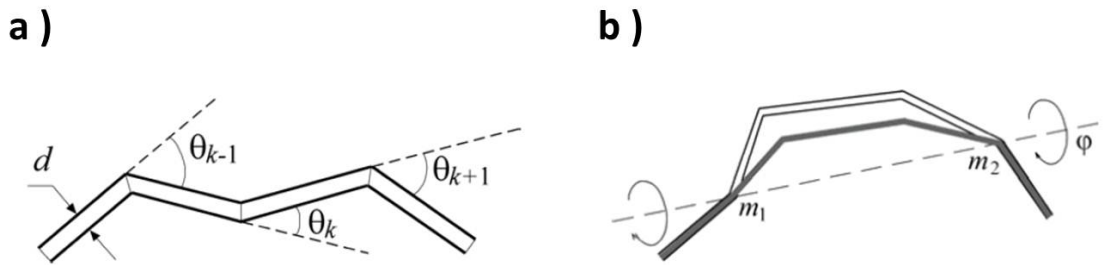


FIGURA 3.1: Modelo *wormlike chain* para la simulación del DNA. **a)** Se representa a la molécula como una sucesión de segmentos rígidos, los cuales cuentan con los ángulos de doblado θ entre dos segmentos consecutivos. **b)** Los movimientos de prueba utilizados sobre el modelo *wormlike chain* son rotaciones rígidas en un ángulo φ de todos los segmentos que se encuentran entre los puntos m_1 y m_2 .

La energía de torsión, E_t , es una función cuadrática de la variación del Tw de la cadena respecto a la configuración con Lk_0 (Lk de la molécula relajada), ΔTw_0 . No se computa ΔTw directamente porque el Tw es una propiedad de la estructura de doble hélice del DNA, la cual no está incluido en el modelo *wormlike chain*. De todas formas, para una cadena cerrada el ΔTw puede ser calculado utilizando el Teorema de Calugareanu:

$$\Delta Tw = \Delta Lk - \Delta Wr. \quad (3.3)$$

Si se considera al DNA como una cinta, en su estado relajado la conformación tiende a ser circular, lo cual corresponde a un Wr_0 nulo, por esto la ecuación anterior puede tomar la forma $\Delta Tw = \Delta Lk - Wr$. Así la energía elástica de torsión puede ser expresada como:

$$E_t = \frac{2\pi^2 C}{L} (\Delta Lk - Wr)^2, \quad (3.4)$$

donde C es la constante de torsión de la molécula y L es su longitud total [90].

Entonces, si se quiere calcular la energía potencial elástica total de una molécula circular de DNA, con un determinado valor de ΔLk , es necesario conocer el valor de su Wr para cada conformación de prueba.

3.1.1.1 Selección de número de segmentos y rigidez de doblado

La elección del número de segmentos para la simulación de la molécula con el modelo *wormlike chain* se relaciona con la cantidad de longitudes de Kuhn contenidas a lo largo de la longitud del plásmido. La relación entre el número de segmentos N , y la cantidad de longitudes de Kuhn n contenidas en la molécula es $N = kn$ [91]. El número k , se relaciona con la rigidez de doblado α mediante

$$k = \frac{1 + \langle \cos\theta \rangle}{1 - \langle \cos\theta \rangle}, \quad (3.5)$$

donde

$$\langle \cos\theta \rangle = \frac{\int_0^\pi \cos\theta \sin\theta e^{-\alpha\theta^2} d\theta}{\int_0^\pi \sin\theta e^{-\alpha\theta^2} d\theta}. \quad (3.6)$$

Las integrales son calculadas de forma numérica y el valor de α es utilizado al calcular la energía en la ecuación (3.2)[90][91].

3.1.1.2 Cálculo de ángulos de doblado

En el modelo *wormlike chain* la energía de doblado depende de los ángulos entre todos los segmentos consecutivos, como lo indica la ecuación (3.2). Si la curva está representada por una sucesión finita de puntos $\mathbf{r}_i = (x(i), y(i), z(i))$, entonces el ángulo de doblado del segmento definido por los puntos $\mathbf{r}_i$ y $\mathbf{r}_{i+1}$ y el segmento definido por los puntos $\mathbf{r}_{i+1}$ y $\mathbf{r}_{i+2}$ está dado por

$$\theta_i = \arccos\left(\frac{(\mathbf{r}_{i+2} - \mathbf{r}_{i+1}) \cdot (\mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i)}{\|(\mathbf{r}_{i+2} - \mathbf{r}_{i+1})\| \|(\mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i)\|}\right). \quad (3.7)$$

3.1.1.3 Ángulos de cruce y yuxtaposición de segmentos del plásmido

La presencia de un cruce entre dos segmentos de un plásmido depende del punto de observación, sin embargo, cuando dos segmentos se encuentran lo suficientemente cercanos entre sí, para que una topoisomerasa de tipo II pueda actuar sobre ellos, entonces decimos que hay una *yuxtaposición* entre ambos segmentos.

En las simulaciones realizadas, se produce una yuxtaposición cuando la distancia D entre los ejes axiales de dos segmentos cumple con la condición $d_{efectivo} < D \leq 2d_{efectivo}$, donde $d_{efectivo}$ es el diámetro efectivo de la molécula.

En nuestro modelo del plásmido, el mismo está representado por una curva cerrada orientada. Esa orientación define el signo de los cruces topológicos que muestre la curva para un determinado punto de proyección. Como antes, si la curva está representada por una sucesión finita de puntos $\mathbf{r}_i = (x(i), y(i), z(i))$, entonces el ángulo de cruce en una yuxtaposición entre los segmentos cuyos puntos iniciales son $\mathbf{r}_i$ y $\mathbf{r}_j$ está dado por

$$\xi = \arccos\left(\frac{(\mathbf{r}_{j+1} - \mathbf{r}_j) \cdot (\mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i)}{\|(\mathbf{r}_{j+1} - \mathbf{r}_j)\| \|(\mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i)\|}\right) \quad (3.8)$$

Un algoritmo encargado de la búsqueda de yuxtaposiciones en una curva definida por un conjunto de vectores $\{\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N\}$ puede correr en tiempo polinomial $O(N^2)$ En una conformación plectonémica, a causa de la orientación intrínseca de las curvas, los ángulos de cruce tienden a ser obtusos. Esto se ilustra en la Figura 3.2.

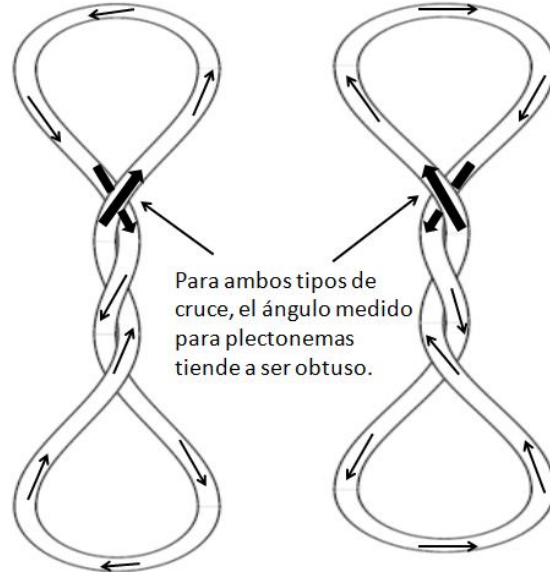


FIGURA 3.2: Yuxtaposición y ángulos de cruce en conformaciones pléctonemicas. Sin importar el tipo de estructura plectonémica el ángulo de cruce es obtuso.

3.1.1.4 Diámetro efectivo en las simulaciones

En la simulación con Metrópolis MC, con el modelo *wormlike chain*, podemos asignar valores infinitos de energía potencial elástica a una conformación que tenga dos vértices de segmentos cualesquiera separados a una distancia menor o igual al diámetro efectivo $d_{efectivo}$. Esta simple restricción permite que tres vértices consecutivos puedan estar a una distancia casi tan pequeña como $d_{efectivo}$ sin violar dicha restricción. Una conformación resultante podrá entonces tener segmentos "puntiagudos o angulosos". Una mejor restricción, implementada para esta obra, sugiere que el diámetro efectivo $d_{efectivo}$ sea una función de la diferencia $D = \|(\mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i)\|$ que hay entre dos índices de vertices cualesquiera

$$d_{efectivo}(D) = A(1 + (D - 1)^3 e^{1-D}) \quad (3.9)$$

donde A es una constante igual al valor de diámetro efectivo entre dos segmentos muy alejados. Esta función varia con D , tal como muestra la figura 3.3. En condiciones fisiológicas el diámetro efectivo entre segmentos distales de una molécula de DNA suele ser de 3 nm [3].

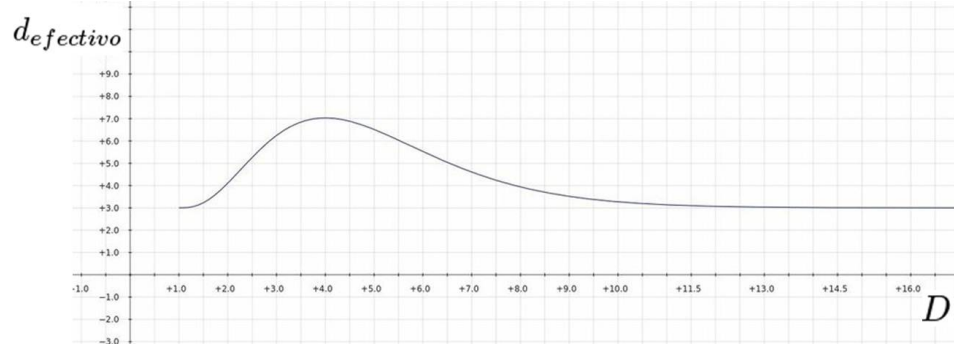


FIGURA 3.3: Dependencia del diámetro efectivo $d_{efectivo}$ con la distancia D entre vértices en el modelo *wormlike chain*.

Un algoritmo encargado de la verificación del diámetro efectivo en una curva de finida por un conjunto de vectores $\{\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N\}$ puede correr en tiempo polinomial $O(N^2)$ y la implementación de ese algoritmo en para esta Tesis se puede observar en el Anexo A.1.6.

3.1.1.5 Cálculo numérico del índice de ligamiento

Para calcular la energía potencial elástica de torsión del DNA basta con usar la ecuación (3.4). Sin embargo, también es útil tener en cuenta la forma de calcular numéricamente el Lk . El índice de ligamiento según (2.4) es

$$Lk = \frac{1}{4\pi} \oint_{C'} \oint_C \left(\frac{(\mathbf{r}' - \mathbf{r}) \times d\mathbf{r}}{\|\mathbf{r}' - \mathbf{r}\|^3} \right) \cdot d\mathbf{r}', \quad (3.10)$$

De la ecuación (2.4) se puede inferir que si dos curvas están definidas por los vectores de posición, $\mathbf{r}$ y $\mathbf{r}'$ y la distancia entre dos segmentos consecutivos está dada por $\mathbf{b} = \mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i$ y por $\mathbf{b}' = \mathbf{r}'_{j+1} - \mathbf{r}'_j$, entonces el Lk de las dos curvas se puede calcular para N segmentos mediante:

$$Lk = \frac{1}{4\pi} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left(\frac{(\mathbf{r}'_j - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{b}}{\|\mathbf{r}'_j - \mathbf{r}_i\|^3} \right) \cdot \mathbf{b}'. \quad (3.11)$$

Ya que $\mathbf{r}_i = (x_i, y_i, z_i)$, $\mathbf{r}_j = (x_j, y_j, z_j)$, $\mathbf{b} = (x_{i+1} - x_i, y_{i+1} - y_i, z_{i+1} - z_i)$ y $\mathbf{b}' = (x_{j+1} - x_j, y_{j+1} - y_j, z_{j+1} - z_j)$, el producto vectorial mixto $((\mathbf{r}'_j - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{b}) \cdot \mathbf{b}'$ se puede calcular como un determinante de 3×3 . Si renombramos a la diferencia $(\mathbf{r}'_j - \mathbf{r}_i)$ como $\mathbf{R}_{ji} = (R_{ji1}, R_{ji2}, R_{ji3})$ tendremos que:

$$(\mathbf{R}_{ji} \times \mathbf{b}) \cdot \mathbf{b}' = \text{Det} \begin{pmatrix} R_{ji1} & R_{ji2} & R_{ji3} \\ b_1 & b_2 & b_3 \\ b'_1 & b'_2 & b'_3 \end{pmatrix}$$

La implementación de un algoritmo que calcule la sumatoria doble 3.11 debe correr en tiempo polinomial $O(N^2)$.

3.1.1.6 Cálculo numérico del índice de superenrollamiento

De la ecuación (2.19)

$$Wr = \frac{1}{4\pi} \oint_C \oint_C \left(\frac{(\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2) \times d\mathbf{r}_2}{\|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2\|^3} \right) \cdot d\mathbf{r}_1. \quad (3.12)$$

podemos obtener la siguiente formula

$$Wr = \frac{1}{4\pi} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left(\frac{(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{b}_i}{\|\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i\|^3} \right) \cdot \mathbf{b}_j. \quad (3.13)$$

También podemos denotar a la diferencia $(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i)$ como $\mathbf{R}_{ji}$, pudiendo luego calcular el producto vectorial mixto como:

$$(\mathbf{R}_{ji} \times \mathbf{b}_i) \cdot \mathbf{b}_j = \text{Det} \begin{pmatrix} R_{ji1} & R_{ji2} & R_{ji3} \\ b_{i1} & b_{i2} & b_{i3} \\ b_{j1} & b_{j2} & b_{j3} \end{pmatrix}$$

A diferencia del cálculo del Lk , el cálculo del Wr requeriría que se recorra la misma curva dos veces, por ello se mide el ángulo sólido entre dos segmentos dos veces. Para disminuir el tiempo de computo del Wr entonces se puede recorrer la curva sólo una vez y luego se multiplica el resultado por dos. Esto se logra haciendo que la segunda suma comience desde i , quedando la fórmula como:

$$Wr = \frac{1}{2\pi} \sum_{i=1}^N \sum_{j=i}^N \left(\frac{(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i) \times \mathbf{b}_i}{\|\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i\|^3} \right) \cdot \mathbf{b}_j \quad (3.14)$$

Los algoritmos que calculen las sumatorias dobles 3.13 o 3.14 deben correr en tiempo polinomial $O(N^2)$.

3.1.2 Control del estado topológico en las conformaciones

El estado topológico de una conformación con superenrollamiento puede ser descrito no solo por su valor de ΔLk , sino también por la presencia de nudos. Una forma de verificar la presencia de nudos es mediante la utilización del *polinomio de Alexander* para nudos. Dicho polinomio es un *invariante* de nudos descubierto en 1923 por James Waddell Alexander [92]. La versión original del polinomio parte de la representación de un nudo mediante un diagrama bidimensional o un grafo. Una proyección plana de un nudo con n cruces genera un diagrama con $n + 2$ regiones, a cada región se le asigna un índice. No existe una indicación especial para asignar los índices a las regiones. Una de las asignaciones posibles se muestra en la Figura 3.3, donde r_i indica las regiones y c_i indica los puntos cruce del diagrama de nudo.

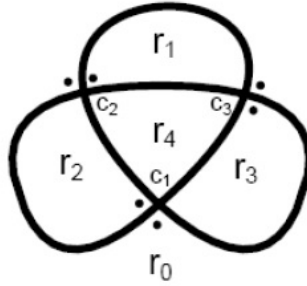


FIGURA 3.4: Diagrama de un nudo *trefoil* donde se muestran las distintas regiones r_i y los cruces c_i

Es posible asignar una serie de ecuaciones a un diagrama de nudo. Supóngase que en un cruce c_i las regiones se llaman r_j , r_k y r_m en el sentido inverso al movimiento de las manecillas del reloj y se asigna r_j y r_k a las regiones que están marcadas con un punto. Por lo tanto, la ecuación de un cruce c_i es:

$$c_i(r) = xr_j - xr_k + r_l - r_m. \quad (3.15)$$

De acuerdo a lo anterior las ecuaciones del diagrama de la Figura 3.3 son:

$$\begin{aligned} c_1(r) &= xr_2 - xr_0 + r_3 - r_4 = 0. \\ c_2(r) &= xr_1 - xr_0 + r_2 - r_4 = 0. \\ c_3(r) &= xr_3 - xr_0 + r_1 - r_4 = 0. \end{aligned} \tag{3.16}$$

Estas ecuaciones de un diagrama determinan su estructura. Con estas ecuaciones se genera la matriz de coeficientes, con n filas y $n+2$ columnas, donde las filas representan los cruces y las columnas representan las regiones. Así, la matriz de coeficientes M del ejemplo (Figura 3.3) queda como sigue

$$M = \begin{pmatrix} x & 0 & x & 1 & -1 \\ x & 1 & 0 & x & -1 \\ x & x & 1 & 0 & -1 \end{pmatrix}$$

Si se reduce la matriz M a una matriz cuadrada eliminando las dos columnas consecutivas de índices p y $p+1$, el determinante de la matriz restante M_0 será independiente de las dos columnas eliminadas, dentro de un factor de la forma $\pm x^n$. El determinante obtenido es el llamado polinomio de Alexander y es un invariante para nudos. En la matriz M , removiendo las primeras dos columnas el determinante resultante es

$$\text{Det} \begin{pmatrix} x & 1 & -1 \\ 0 & x & -1 \\ 1 & 0 & -1 \end{pmatrix} = -x^2 + x - 1$$

Si se eliminan las dos últimas filas el determinante resulta ser

$$\text{Det} \begin{pmatrix} x & 0 & x \\ x & 1 & 0 \\ x & x & 1 \end{pmatrix} = -x^3 + x^2 - x$$

Se observa que estos dos resultados difieren solamente en un factor $\pm x^n$. El resultado obtenido para este nudo, que es conocido como trefoil (trébol) tiene entonces el polinomio de Alexander $\Delta(x) = x^2 - x + 1$. Este es el nudo más simple que existe. El valor del polinomio de Alexander para una curva sin nudos (*unknot*) es $\Delta(x) = 1$.

Para obtener el polinomio de Alexander para curvas más complejas en esta obra se recurre al mismo algoritmo utilizado por Vologodskii y colaboradores [90].

3.1.3 Propiedades termodinámicas del superenrollamiento y encadenamiento

Un sistema se encuentra en estado de equilibrio termodinámico cuando no es capaz de cambiar de estado espontáneamente, o, sus variables macroscópicas como presión, temperatura y composición toman un valor constante, independiente del tiempo. El equilibrio es aquel estado al cual tiende espontáneamente un sistema [93]. Para ello ha de encontrarse simultáneamente en equilibrio térmico (la temperatura en todos los puntos del sistema es la misma), mecánico (la presión en todos los puntos del sistema es la misma) y químico (la composición química es la misma en todos los puntos del sistema). Por otro lado, es indispensable que todas las fuerzas en el sistema estén balanceadas [93].

La energía libre es un potencial termodinámico, una función de estado extensiva, que determina la condición de equilibrio y espontaneidad para una reacción química (a presión y temperatura constantes). La entalpía H de un sistema y entropía S definen la energía libre del mismo mediante $G = H - TS$, donde T es la temperatura absoluta del sistema [93]. La variación de energía libre para un proceso termodinámico toma la forma

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (3.17)$$

En su estado relajado, una plásmido tendrá un valor de Wr cercano a cero. En la simulación con el modelo *wormlike chain* siempre se tendrá una energía de doblado distinta de cero, en el estado de equilibrio. Se definen la entalpía en este modelo de DNA como la diferencia entre la energía potencial elástica total para un valor dado de ΔLk y el valor de la energía potencial elástica en estado relajado [90]:

$$H(\Delta Lk) = E(\Delta Lk) - E(\Delta Lk_0). \quad (3.18)$$

En el caso de que se tengan moléculas relajadas, con $\Delta Lk = 0$, proponemos la siguiente definición de la entalpía en función al número de encadenamientos, Ca , como $H(Ca) = E(Ca) - E(Ca_0)$, donde Ca_0 es la ausencia de encadenamiento.

La variación de energía libre que debe introducir una topoisomerasa para cambiar el índice de ligamiento de una molécula, desde Lk_0 hasta adquirir cierto valor de ΔLk es

$$\Delta G(\sigma) \cong 13LRT\sigma^2, \quad (3.19)$$

donde L es la longitud de la molécula, R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta y σ es denominado índice de ligamiento específico y está dado por $\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0}$ [6].

3.1.4 Simulación de moléculas de DNA

Se manejaron moléculas de DNA plasmidico con horquillas de replicación detenidas, es decir, intermediarios de replicación (RIs), con una región no replicada y una región ya replicada. Uno de los principales problemas que dificultan el estudio de la topología de los RIs es que *in vivo* existe un complejo protéico denominado replisoma que se encuentra unido a el RI. Como se explicó anteriormente, la unión del replisoma a los RIs en las horquillas de replicación actuaría como una barrera regulando la difusión de la tensión torsional entre las regiones no replicada y ya replicada. Sin embargo, al aislar el DNA y eliminar todas las proteínas unidas al mismo (para su análisis por electroforesis o microscopía electrónica) desaparecen las restricciones topológicas impuestas por la unión del replisoma. Esto hace que el DNA pueda girar libremente en las horquillas, permitiendo la libre difusión del superenrollamiento a través de las mismas. En el presente trabajo, valiéndonos de esta "separación" en dominios topológicos entre la región no replicada y la ya replicada, se simularon RIs compuestos por dos partes: i) la región no replicada que se comporta como una molécula con un determinado valor de ΔLk , y ii), la ya replicada como dos moléculas encadenadas, con un determinado valor de Ca y $\Delta Lk = 0$.

Debido a que *in vitro* la región ya replicada está permanentemente relajada, debido a la eliminación del proteosoma, se puede simular el encadenamiento sin superenrollamiento. En condiciones controladas de laboratorio, el plásmido tratado se encuentra almacenado a presión y temperatura constante. Considerando a cada intermediario de replicación como un sistema de dos partes, la región ya replicada y la no replicada, y asumiendo que no interactúa con el medio circundante, entonces existe equilibrio termodinámico en el sistema. De esta forma, cada exceso de energía en una región pasará a la otra en forma de variación de entalpía. Mecánicamente, un exceso de energía en la región no replicada inducirá que algunos cruces de esta región pasen a la región ya replicada en forma de más pre-encadenamiento. De forma opuesta, un exceso de energía en la región ya replicada inducirá una pérdida del pre-encadenamiento y la introducción de nuevos cruces en la región no replicada.

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1 Parte experimental

4.1.1 Estirpes bacterianas

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo fueron:

DH5 α F': [F'/ endA1 hsdR17 (r_k^- , m_k^+) supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96 (*nal^r*) relA1 deoR Δ (lacZYA-argF)-U169 ϕ 80dlacZ Δ M15].

parE10: W3110 [parE10 recA], [94]. Cedida por el Dr. Ian Grainge. Si se cultiva a 43° C es deficiente en TopoIV.

4.1.2 Plásmidos

pBR322@AatII (4449 pb): Contiene la secuencia terminadora de la replicación TerE en el sitio AatII de pBR322. Debido a la posición del terminador respecto al origen, en este plásmido se acumulan RIs con la horquilla detenida cuando ha alcanzado el 60 por ciento de su replicación. Por tanto, los RIs acumulados contienen una burbuja interna y su masa es 1.60 veces la masa del plásmido no replicado.

4.1.3 Condiciones de cultivo

Los cultivos en medio líquido de las estirpes se realizaron en LB (triptona %, extracto de levadura 0.5%, cloruro sódico 1%, pH 7.5) a 37°C con agitación orbital (250 rpm). Para la selección de transformantes se utilizó ampicilina (Roche) a 75 μ g/ml , tetraciclina a 12.5 μ g/ml (Sigma). Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas Petri con LB al

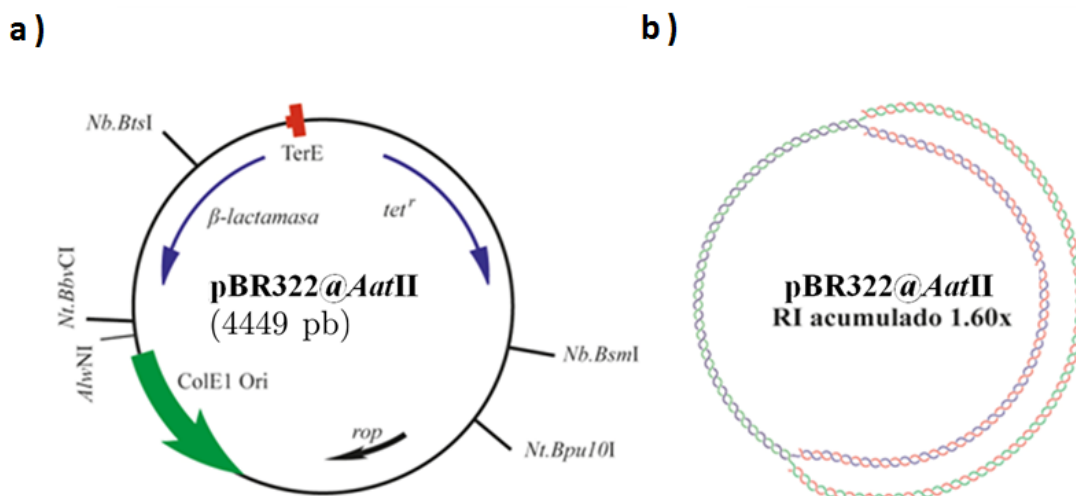


FIGURA 4.1: Mapa del plásmido pBR322@AatII. A: Mapa en donde se indica la posición y orientación del origen ColE1 (flecha verde) y del terminador TerE (en rojo) así como los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas. En el interior del mapa se muestra la posición y orientación los genes que confieren resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda) y tetraciclina (flecha azul a la derecha), y del gen *rop* (flecha negra). B: Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla se detiene al llegar al terminador. En azul y verde se representa la doble hélice parental y en rojo las cadenas nacientes (Virginia Lopez et. al.)

que se añadió agar al 2%. Las placas se incubaron invertidas entre 16 y 18 horas a 37°C en estufa. La densidad celular en los cultivos se determinó midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro a 600 nm (OD600) frente a un blanco que contenía el medio LB sin células bacterianas. Las estirpes bacterianas se conservaron diluidas al 50% en una solución de glicerol (glicerol 65%, MgSO₄ 0.1 M, Tris-HCl 0.025 M, pH8.0) a -20°C y a -80°C. La inhibición de la Topo IV en la estirpe parE10 (con mutación termosensible en el gen *parE*) se llevó a cabo creciendo los cultivos a la temperatura permisiva (30°C) hasta alcanzar la fase exponencial e incubándolos después a la temperatura restrictiva (43°C) a distintos tiempos y con agitación orbital.

4.1.4 Tratamiento de los plásmidos

Los plásmidos se trataron con distintas topoisomerasas de estudio en esta obra antes de la electroforesis en geles bidimensionales de agarosa, en presencia o en ausencia de cloroquina. En algunos de éstos tratamientos estuvieron acompañados de distintas formas con agentes intercalantes.

4.1.4.1 Digestión con Topoisomerasa IV

Para el estudio de la topología de los RIs del plásmido pBR322@AatII (de la estirpe DH5 α F' y parE10) en presencia de TopoIV, la muestra de DNA (0.2 μ g/mL) se incubó con Topo IV (30 $\frac{30U}{mL}$) durante 30 minutos a una temperatura de 37°C en presencia o ausencia de cloroquina (40 μ g/mL).

La digestión se detuvo utilizando proteinasa K durante 30 minutos a una temperatura de 37°C y luego el plásmido se almacenó a 4°C.

4.1.4.2 Digestión con DNA Girasa

Para el estudio de la topología de los RIs del plásmido pBR322@AatII (de la estirpe DH5 α F' y parE10) en presencia de DNA Girasa, la muestra de DNA plasmídico (0.2 μ g/mL). Se incubó con DNA Girasa (15 $\frac{30U}{mL}$) durante 30 minutos a una temperatura de 37°C.

Las muestras se incubaron con DNA Girasa a 37°C durante 30 minutos en presencia o en ausencia de cloroquina (40 μ g/mL).

La digestión con Girasa se detuvo utilizando proteinasa K durante 30 minutos a una temperatura de 37°C y luego el plásmido se almacenó a 4°C.

4.1.5 Agente intercalante

Como agente intercalante se utilizó cloroquina. En todos los casos se trabajó una concentración de cloroquina de 40 μ g/mL.

4.1.6 Geles bidimensionales de agarosa

El análisis de DNA se realizó mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Esta técnica, en la que tanto el tamaño como la forma de una molécula de DNA influyen en su movilidad electroforética, se realizó siguiendo el protocolo descrito originalmente por Brewer y Fangman [?].

La primera dimensión se realizó en geles de agarosa a una concentración de 0.4% de agarosa SeaKem LE en tampón TBE 1x y se corrió a 0.9 V/cm durante 25 horas a temperatura ambiente. Luego se llevaron a cabo las segundas dimensiones en geles de 1% de agarosa SeaKem LE en tampón TBE 1x que se corrieron a 5 V/cm durante 10 horas a 4°C.

En aquellos casos en los que se estudió la influencia de un agente intercalante, se utilizó cloroquina durante la primera y la segunda dimensión, tanto en el gel de agarosa como en el tampón TBE 1x de la cubeta de electroforesis.

4.2 Métodos de simulación computacional

4.2.1 Simulación del supererrolamiento

En condiciones en las que el plásmido representado no está replicando (monómero), tiene una longitud de 4449 pb. Los intermediarios de replicación tienen una masa de 1.6x respecto a las formas no replicadas, es por esto que la región no replicada tiene una longitud de 1780 pb (605 nm), que representa el 40% de la longitud del plásmido no replicado.

Como conformación inicial se tiene un polígono regular de N lados o vertices. Para grandes valores de N podemos considerar al polígono como un círculo. Una vez que se ha calculado la energía inicial E_0 se realizan los movimientos de prueba sobre la conformación inicial para ejecutar el método de Metropolis Monte Carlo. La función de energía potencial para las conformaciones es

$$E = k_b T \alpha \sum_{i=1}^N \theta_i^2 + \frac{2\pi^2 C}{L} (\Delta L k - W r)^2 \quad (4.1)$$

donde k_b es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, θ_i es el ángulo entre el segmento i y el $i + 1$, α es la rigidez de doblado, C la rigidez de torsión y L la longitud de la cadena en pb. En la expresión (4.1) está especificado el valor de Lk que debe alcanzar el plásmido simulado. El valor de Wr cambia en cada movimiento de prueba. Los movimientos de prueba se producen mediante un movimiento de rotación rígida que se logra tomando aleatoriamente dos vertices de segmentos, A y B , en el modelo *wormlike*. Todos los puntos P contenidos entre A y B son rotados en torno a un eje que pasa por A y B en un ángulo aleatorio φ . El punto P' resultante de la rotación de P es

$$P' = [\mathbf{n} \cdot (P - A)]\mathbf{n} + \cos(\varphi)[(P - A) - [\mathbf{n} \cdot (P - A)]\mathbf{n}] \pm \sin(\varphi)[\mathbf{n} \times (P - A)] \quad (4.2)$$

donde $\mathbf{n}$ es el vector que apunta desde el punto A hasta el punto B , $\mathbf{n} = \frac{(B-A)}{\|B-A\|}$. En forma contraproducente estos movimientos de rotación rígida permiten que dos segmentos se crucen o atraviesen entre sí, provocando la aparición de nudos en muchos casos. Los nudos son detectados mediante el algoritmo basado en la búsqueda

del polinomio de Alexander de la conformación. El algoritmo para obtener el superenrollamiento es presentado en el anexo A.2

Se representó la región no replicada mediante el modelo *worm like*, con 180 segmentos, diámetro efectivo con $A=3$ nm (ecuación 3.9), rigidez de torsión $C = 4,50 \cdot 10^{-19}$ J.pb, constante de doblado $\alpha = 7.4965$, temperatura absoluta $T = 297$ K.

Se realizaron simulaciones de 100 formas no anudadas para cada topoisomero desde $\Delta Lk = -1$ hasta $\Delta Lk = -20$, con 10^5 movimientos de prueba en cada simulación.

Las simulaciones fueron realizadas con MATLAB, en un computador de doble núcleo, con procesador Pentium de 2.13 GHz. En la figura 4.2 mostramos una tabla con los parámetros utilizados para la simulación del superenrollamiento.

Símbolo	Nombre	Valor
k_B	Constante de Boltzman	$1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$
T	Temperatura absoluta	297 K
C	Rigidez de torsión	$4,50 \cdot 10^{-19} \text{ J.bp}$
α	Rigidez de doblado	7.4965
$2a$	Longitud de Kuhn	295 bp

FIGURA 4.2: Parámetros constantes utilizados en la simulación del superenrollamiento.

4.2.2 Simulación del encadenamiento

Cada molécula naciente de la región ya replicada tiene una longitud de 2670 pb (939 nm), que representa el 60% de la longitud del plásmido no replicado.

Como conformación inicial para cada simulación se utilizaron toroides encadenados. Estos se obtuvieron creando dos toroides con el mismo centro, ambos de radios R y r , desfasados un ángulo β que produzca la mayor separación entre las curvas y ambos con un número de vueltas coincidente con el número de encadenamientos que se desea simular. Sobre esta conformación inicial se realizan cambios de conformación con los movimientos de rotación rígida. Se busca mantener durante toda la simulación el mismo número de encadenamiento y relajar el encadenado, hasta que ambas moléculas tengan el menor valor posible de Wr para un determinado Ca .

La función de energía potencial para cada molécula relajada ($\Delta Lk = 0$) encadenada independiente y para cada conformación de prueba es

$$E = k_b T \alpha \sum_{i=1}^n \theta_i^2 + \frac{2\pi^2 C}{L} (Wr)^2 \quad (4.3)$$

donde k_b es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, θ_i es el ángulo entre el segmento i y el $i + 1$, α es la rigidez de doblado, C la rigidez de torsión y L la

longitud de la cadena en pb. El cálculo de la energía es independiente del número de encadenamiento (Ca).

Representamos la región no replicada mediante el modelo *worm like*, con 180 segmentos, diámetro efectivo con $A=3$ nm (ecuación 3.9), rigidez de torsión $C = 4,50 \cdot 10^{-19}$ J.pb, constante de doblado $\alpha = 4.8010$, temperatura absoluta $T = 297$ K.

Se realizaron simulaciones de 10 formas relajadas ($\Delta Lk = 0$) para cada encadenado desde $Ca = 0$ hasta $Ca = 20$, con 10^5 movimientos de prueba en cada simulación.

Las simulaciones fueron realizadas con MATLAB, en un computador de doble núcleo, con procesador Pentium de 2.13 GHz. En la figura 4.2 mostramos una tabla con los parámetros utilizados para la simulación del encadenamiento.

Símbolo	Nombre	Valor
k_B	Constante de Boltzman	$1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$
T	Temperatura absoluta	297 K
C	Rigidez de torsión	$4,50 \cdot 10^{-19} \text{ J.bp}$
α	Rigidez de doblado	4.8010
$2a$	Longitud de Kuhn	295 bp

FIGURA 4.3: Parámetros constantes utilizados en la simulación del encadenamiento.

Capítulo 5

Resultados

La presente obra se centra en el estudio de los cambios topológicos en moléculas de DNA parcialmente replicadas y el papel que juegan las topoisomerasas en la coordinación entre superenrollamiento y pre-encadenamiento durante la replicación del DNA. Como modelo de estudio se utilizó el plásmido pBR322@AatII con las horquillas de replicación detenidas en la secuencia terminadora TerE y el origen de replicación unidireccional ColE1. El bloqueo de las horquillas de replicación conduce a la acumulación de RIs cuya masa es 1.6 veces la de la molécula no replicada. Para analizar la topología de los RIs se combinó la electroforesis bidimensional en geles de agarosa con simulaciones computacionales de moléculas de DNA.

5.1 Resultados del análisis de RIs mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa

5.1.1 Análisis de los RIs del plásmido pBR322@AatII digerido con Topo IV y DNA Girasa

Durante la replicación del DNA tanto la Topo IV como la DNA Girasa actúan en las regiones no replicada y ya replicada para compensar el $Wr(+)$ generado por el avance de la horquilla replicativa. Con el fin de estudiar la actividad de las DNA topoisomerasas de tipo IIA de *E. coli* sobre la topología de los RIs, se digirió el plásmido pBR322@AatII con Topo IV o DNA Girasa. Como control se utilizó el plásmido intacto. En los plásmidos aislados y desproteinizados de la estirpe DH5 α F' existe superenrollamiento negativo de tipo RH(-) en la región no replicada y pre-encadenados LH(-) en la región ya replicada (Figura 2.13 b). En primer lugar se analizaron las formas intactas de los RIs del plásmido pBR322@AatII crecido en células de la estirpe DH5 α F' de *E. coli* para comprobar la

acumulación de moléculas parcialmente replicadas con horquillas de replicación detenidas en TerE. En las Figuras 5.1 a y 5.2 a se observa la inmunodetección correspondiente junto con un esquema interpretativo. La señal que aparece en el ángulo inferior derecho corresponde a moléculas superenrolladas no replicadas, las CCCs. Estas pueden sufrir roturas tanto durante la corrida de la primera dimensión del gel como en el transcurso de la primera y la segunda dimensión, apareciendo un rastro horizontal y vertical, respectivamente. Estos rastros hacen que los CCCs formen un ángulo recto con sus formas niqueadas (moléculas con una 'rotura' de cadena sencilla), las OCs. Tanto las CCCs como los OCs corresponden a monómeros, es decir, moléculas que no están replicando. En la inmunodetección se observan además señales que forman un arco continuo de topoisómeros y que corresponden a intermediarios de replicación covalentemente cerrados (CCRIs). El arco se extiende de la parte superior izquierda de la inmunodetección hasta la zona inferior atravesando la línea horizontal de las OCs. En dicho arco se observa que las formas más abundantes corresponden a moléculas muy torsionadas (con mayor movilidad electroforética). La señal del extremo superior izquierdo del arco corresponde a la acumulación de intermediarios de replicación relajados (AccRIs).

En la Figura 5.1 b se presenta la inmunodetección y el esquema correspondiente del plásmido digerido con Topo IV. En el centro se observa un grupo de señales que corresponden a moléculas no replicadas que han perdido movilidad electroforética debido a la eliminación $Wr(-)$. En el extremo superior izquierdo se observa además una señal que corresponde a RIs relajados (AccCRIs) y que confirma que la Topo IV relajó completamente las poblaciones de RIs. Este resultado confirma que la Topo IV es capaz de eliminar el $Wr(-)$ pero no puede relajar completamente moléculas de DNA con altos niveles de superenrollamiento negativo. Por otro lado, la Topo IV relaja completamente la población de moléculas parcialmente replicadas. En la inmunodetección y el esquema correspondiente al tratamiento con DNA Girasa (Figura 5.2 b) se observa que las moléculas no replicadas negativamente superenrolladas (CCC) no cambian su movilidad electroforética con respecto al control. En el arco correspondiente a las moléculas parcialmente replicadas se observa un cambio en la movilidad electroforética y la distribución de las señales con respecto al control, lo cual se correspondería con una disminución de la tensión torsional. Este resultado demuestra que la DNA Girasa es capaz de relajar parcialmente intermediarios de replicación con pre-encadenamiento LH(-) pero no cambia la movilidad electroforética de las moléculas no replicadas con altos niveles de $Wr(-)$.

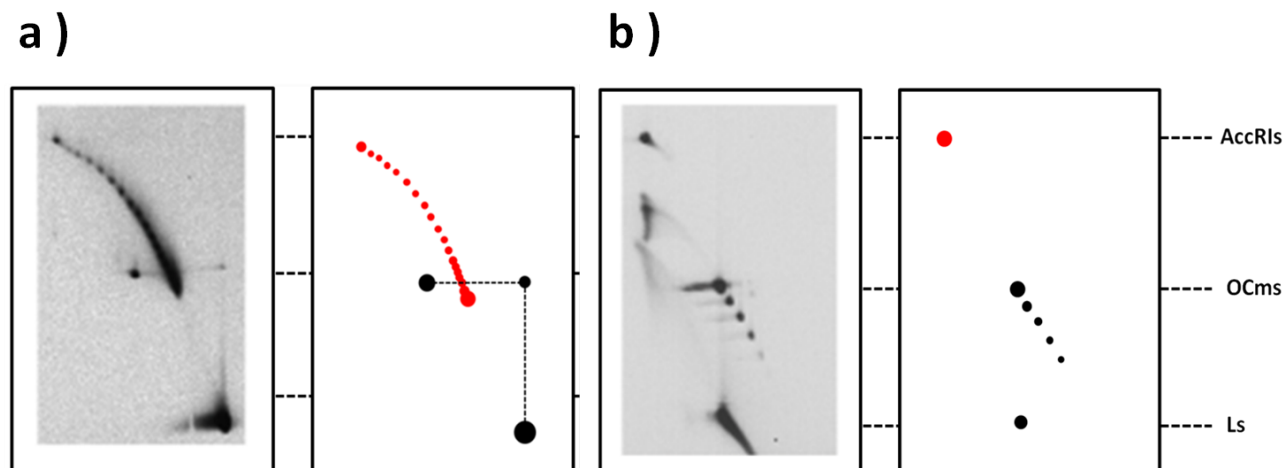


FIGURA 5.1: Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' con Topo IV. **a)** Inmunodetección obtenida mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa del plásmido intacto y esquema interpretativo correspondiente. **b)** Inmunodetección obtenida mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa del plásmido digerido con Topo IV y su esquema representativo correspondiente. Las señales correspondientes a los intermediarios de replicación se representan como puntos de color rojo y las moléculas no replicadas como puntos negros.

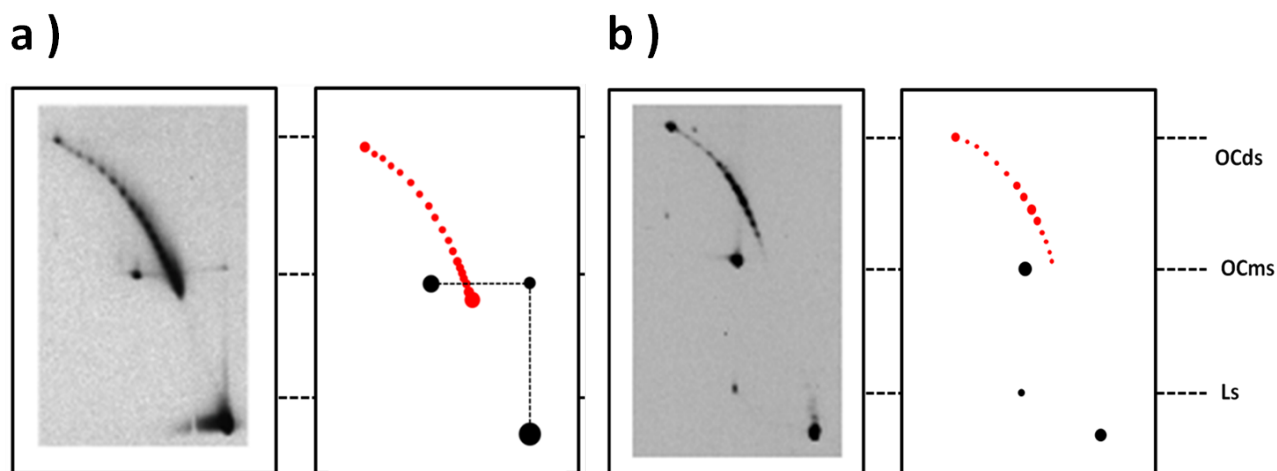


FIGURA 5.2: Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' con DNA Girasa. **a)** Inmunodetección obtenida mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa del plásmido intacto con su esquema interpretativo correspondiente. **b)** Inmunodetección obtenida mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa del plásmido digerido con DNA Girasa y su esquema representativo correspondiente. Las señales correspondientes a los intermediarios de replicación se muestran en color rojo y las moléculas no replicadas en negro.

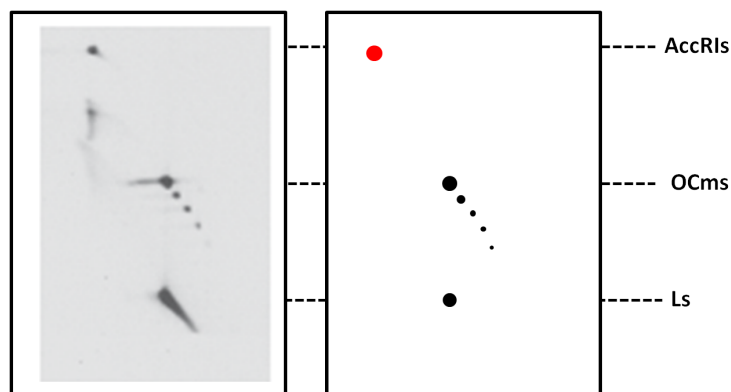


FIGURA 5.3: Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5αF' con Topo IV en presencia de cloroquina. Inmunodetección y su esquema interpretativo. Los intermediarios de replicación se representan con puntos rojos y las moléculas no replicadas con puntos negros.

5.1.2 Análisis del plásmido pBR322@AatII digerido con Topo IV y DNA Girasa en presencia de cloroquina

En el experimento anterior pudimos comprobar que tanto la Topo IV como la DNA Girasa son capaces de relajar, aunque en distinta medida, RIs con $Wr(-)$ y pre-encadenamiento LH(-). Con el objeto de comprobar el efecto de la introducción de $Wr(+)$ sobre la actividad de las topoisomerasas, decidimos llevar a cabo digestiones en presencia de un agente intercalante. La cloroquina es una molécula planar de pequeño tamaño que se intercala entre las bases nitrogenadas de la doble hélice, provocando un desenrollamiento de las moléculas con $Wr(-)$. Ese desenrollamiento hace que adquieran un $Wr=0$. Sin embargo, a partir de ese momento, la incorporación de cantidades crecientes de cloroquina hace que los plásmidos adquieran $Wr(+)$. En moléculas de DNA parcialmente replicadas y aisladas *in vitro*, el tratamiento con altas concentraciones de cloroquina induce la formación de horquillas en retroceso, es decir, el apareamiento de las cadenas nascentes en la región ya replicada (Figura 2.14).

Luego de la digestión con Topo IV en presencia de cloroquina las muestras se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa y se obtuvo la inmunodetección de la Figura 5.3. No se observan diferencias significativas con respecto a la inmunodetección del plásmido digerido con Topo IV en ausencia de cloroquina (Figura 5.1 b). Al igual que en la inmunodetección de la muestra digerida en ausencia del intercalante, se observa que una señal que corresponde a RIs relajados (AccRIs) en el extremo superior izquierdo y un grupo de señales correspondientes a moléculas no replicadas que ha perdido movilidad electroforética en el centro de la imagen.

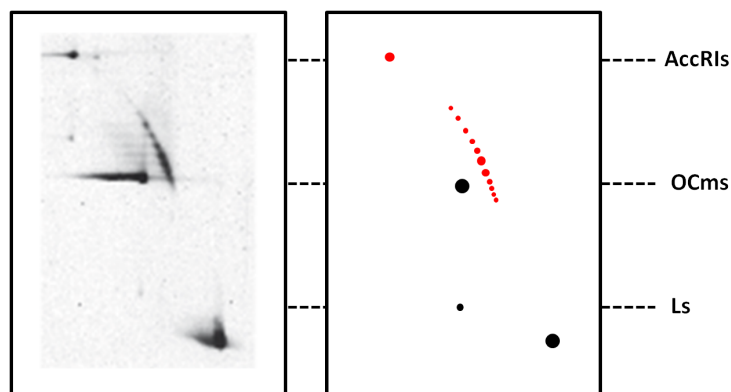


FIGURA 5.4: Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' con DNA Girasa en presencia de cloroquina. Inmunodetección y su esquema interpretativo. Los intermediarios de replicación se representan con puntos rojos y las moléculas no replicadas con puntos negros.

Paralelamente, el plásmido se digirió con DNA Girasa en presencia del agente intercalante y se analizó mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa, la inmunodetección y su esquema representativo se muestran en la Figura 5.4. En este caso tampoco se observaron diferencias significativas con respecto al plásmido digerido en ausencia de cloroquina (Figura 5.2 b). En ambos casos se observa una disminución de la movilidad electroforética junto con un cambio en la distribución de las señales del arco de RIs, lo cual se correspondería con una relajación parcial. Se observa además que las moléculas no replicadas (CCCs) no cambian su movilidad electroforética. En conjunto, estos resultados no nos permitieron determinar el efecto de la introducción de $Wr(+)$ sobre la digestión con Topo IV o DNA Girasa puesto que la cloroquina no altera la procesividad de las mismas sobre los RIs.

5.1.3 Análisis del plásmido pBR322@AatII digerido con Topo IV y DNA Girasa mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina

Los geles bidimensionales del apartado anterior no nos permitieron distinguir efecto de la introducción de $Wr(+)$ sobre los RIs relajados por la Topo IV y la DNA Girasa. Por ello decidimos digerir las muestras con las topoisomerasas y luego analizarlas mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina. Como control se utilizó el plásmido intacto. En las Figuras 5.5 a y 5.6 a se muestra la inmunodetección y el esquema interpretativo correspondiente al control. En esta inmunodetección se observa un arco de señales en el extremo inferior derecho que, de acuerdo a la concentración de cloroquina empleada, correspondería a moléculas no replicadas que han adquirido $Wr(+)$. En el extremo superior izquierdo se observa una señal correspondiente a RIs relajados con horquillas en retroceso. En la Figura 5.5 b se presenta la inmunodetección

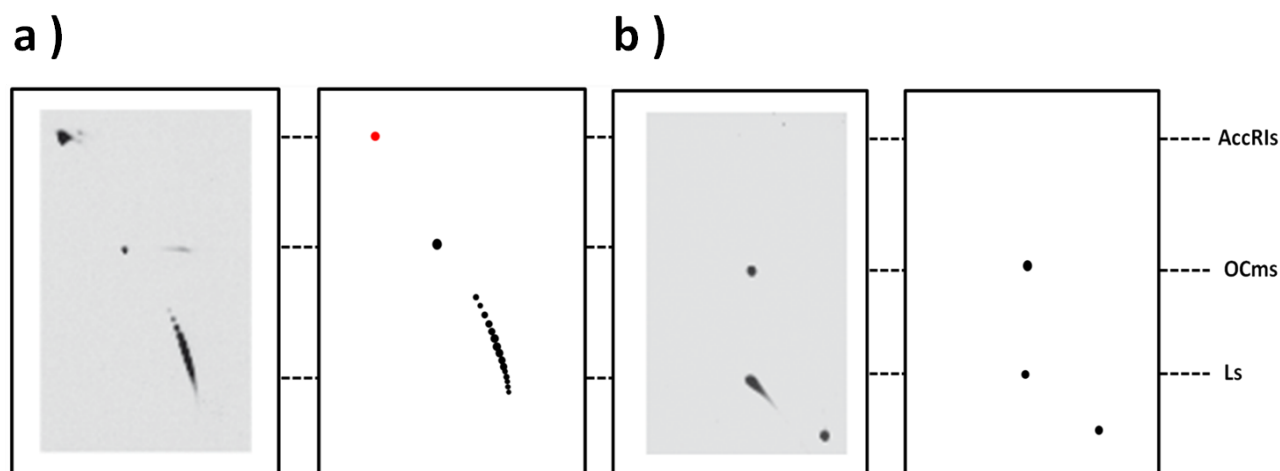


FIGURA 5.5: Electroforésis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' digerido con Topo IV. **a)** Inmunodetección del plásmido intacto con su esquema interpretativo. **b)** Inmunodetección del plásmido digerido con Topo IV acompañado de su esquema representativo correspondiente. Las señales correspondientes a los intermediarios de replicación se representan en color rojo y las moléculas no replicadas se representan en negro.

correspondiente al plásmido digerido con Topo IV y analizado mediante electroforesis bidimensional en presencia de cloroquina ($40\mu\text{g/mL}$). En el extremo inferior derecho se observa una señal correspondiente a moléculas no replicadas parcialmente relajadas por la Topo IV que en presencia de altas concentraciones de cloroquina adquieren mucho superenrollamiento positivo, y aumentan su movilidad electroforética. No se detecta la población de intermediarios de replicación, posiblemente debido a roturas de cadena sencilla en las horquillas de replicación como consecuencia de la alta concentración de cloroquina empleada. Con las muestras de DNA digeridas con DNA Girasa y analizadas mediante un gel bidimensional de agarosa en presencia de cloroquina se obtuvo la inmunodetección de la Figura 5.6 b. Se observa a todos los RIs concentrados en la zona de los AccRIs, lo cual se corresponde con la formación horquillas en retroceso. Se observa además un arco de señales formado por moléculas que han adquirido $Wr(+)$ como consecuencia de la presencia de cloroquina durante la electroforesis.

En conjunto, estos resultados demuestran que la presencia de cloroquina durante la electroforésis induce la formación de horquillas en retroceso en los RIs previamente relajados por la DNA Girasa. En el caso de los RIs previamente relajados por Topo IV, la elevada tensión en el DNA inducida por el agente intercalante produciría roturas en las formas parcialmente replicadas.

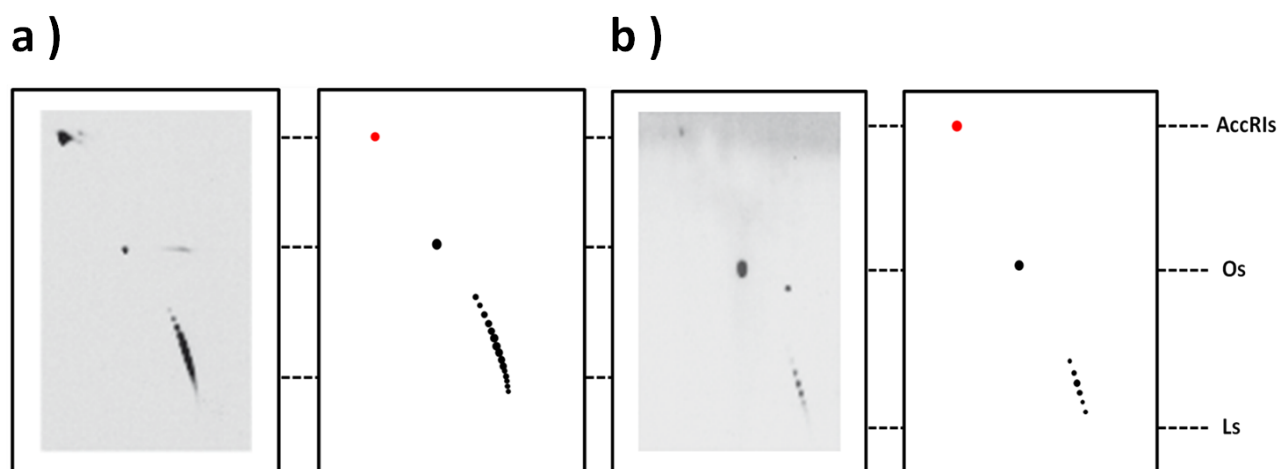


FIGURA 5.6: Electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina del plásmido pBR322@AatII de la estirpe DH5 α F' digerido con DNA Girasa. **a)** Inmunodetección del plásmido intacto con su esquema interpretativo correspondiente. **b)** Inmunodetección del plásmido digerido con DNA Girasa acompañado de su esquema representativo correspondiente. Las señales correspondientes a los intermediarios de replicación se representan en color rojo y las moléculas no replicadas se representan en negro.

5.1.4 Análisis del plásmido pBR322@AatII de la cepa termosensible ParE10 digerido con DNA Girasa y Topo IV

Durante la replicación del DNA en bacterias la Topo IV se encarga de eliminar el pre-encadenamiento generado en la región ya replicada como consecuencia de la difusión del $Wr(+)$ generado por el avance de la horquilla de replicación. En ausencia de Topo IV se produce una acumulación de pre-encadenados $RH(+)$ que impiden la migración del $Wr(-)$ de la región no replicada a la ya replicada (Figura 2.13 c).

Con el objeto de analizar el efecto de la ausencia de la Topo IV sobre la capacidad de la DNA Girasa y la Topo IV para relajar los RIs *in vitro*, se aislaron plásmidos de la estirpe ParE10, mutante termosensible para la Topo IV. Los mismos crecieron inicialmente crecidas a la temperatura permisiva (30° C) y luego se incubaron a la temperatura restrictiva (43° C) para inhibir la expresión de la Topo IV. Como control se utilizó el plásmido intacto. Tal como era de esperar en el plásmido intacto, en ausencia de Topo IV se produce una acumulación de moléculas encadenadas (CatAs, CatBs y CatCs). Se observa además el arco de señales correspondiente a la acumulación de RIs (Figuras 5.7 a y 5.8 a) con distinto grado de estrés torsional.

Tras la digestión del plásmido con Topo IV se obtuvo la inmunodetección de la Figura 5.7 b. En el extremo superior izquierdo, se puede observar una señal correspondiente a RIs relajados así como la desaparición de las señales correspondientes a las distintas familias de encadenados. Se observa además un grupo de señales en el centro que corresponde

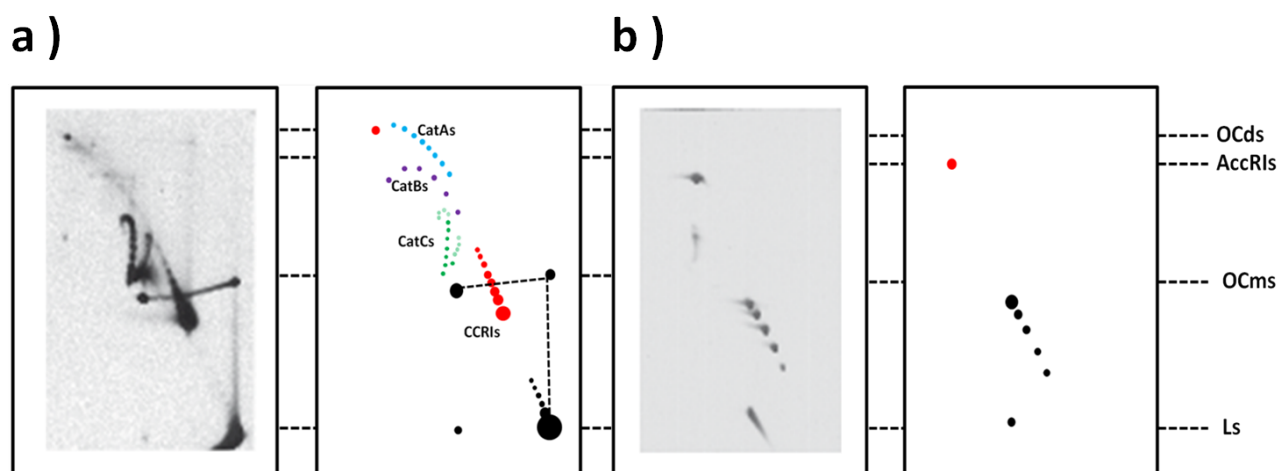


FIGURA 5.7: Digestión con Topo IV del plásmido pBR322@AatII de la estirpe ParE10. a) Inmunodetección del plásmido intacto y esquema interpretativo correspondiente. b) Inmunodetección del plásmido digerido con Topo IV y su esquema representativo correspondiente. Las poblaciones de RIs se representan como puntos rojos, las poblaciones de encadenados CatAs, CatBs y CatCs en celeste, lila y verde respectivamente y los monómeros se representan con puntos negros.

a moléculas no replicadas negativamente superenrolladas que han perdido movilidad electroforética. En conjunto estos resultados confirman la actividad desencadenante de la Topo IV así como su baja efectividad para resolver superenrollamiento negativo. Por otra parte se demostró que la Topo IV es también capaz de resolver completamente RIs con pre-encadenamiento RH(+).

En las muestras digeridas con DNA Girasa (Figura 5.8 b). Se observa que al igual que en el control, hay una acumulación de las distintas familias de encadenados. Contrariamente a lo observado con la estirpe DH5 α F', la movilidad y distribución del arco de señales de los RIs no cambia con respecto al control (Figura 5.8 a). Por otro lado, tal como se constató anteriormente, la movilidad de los monómeros con superenrollamiento negativo no se ve afectada por la acción de la DNA Girasa. Este resultado confirma que la DNA Girasa no es capaz de relajar moléculas no replicadas con SC(-) así como tampoco actúa sobre moléculas encadenadas. Al contrario de lo que se observa *in vitro* en los RIs de la estirpe DH5 α F', la DNA Girasa no relaja los RIs con una acumulación de pre-encadenamientos RH (+) aislados de la cepa mutante para la Topo IV.

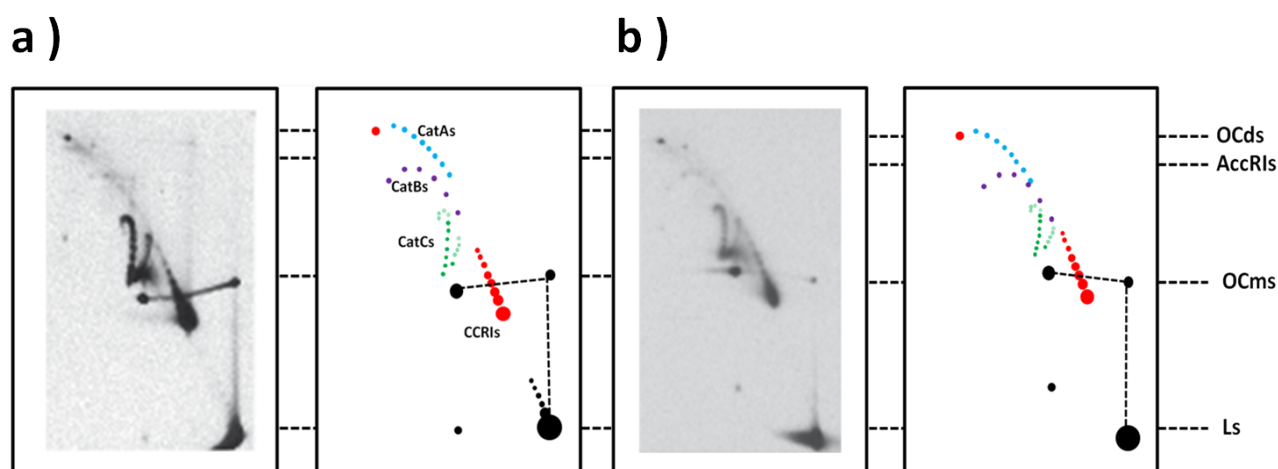


FIGURA 5.8: Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe ParE10 con DNA Girasa. **a)** Inmunodetección del plásmido intacto con su esquema interpretativo. **b)** Inmunodetección del plásmido digerido con DNA Girasa y su esquema representativo. Las poblaciones de RIs se presentan como puntos de color rojo, así también se observan las poblaciones de encadenados CatAs, CatBs y CatCs en celeste, lila y verde respectivamente y los monómeros se representan con puntos negros.

5.1.5 Análisis del plásmido pBR322@AatII de la cepa termosensible parE10 digerido con DNA Girasa y Topo IV en presencia de cloroquina

En el experimento anterior se demostró que la Topo IV desencadena moléculas replicadas y relaja intermediarios de replicación con pre-encadenamientos RH(+). También se comprobó que la DNA Girasa no es capaz de resolver pre-encadenados de RIs provenientes de una estirpe mutante para la Topo IV. Con el objeto de comprobar el efecto de la introducción de *Wr*(+) en la actividad de estas topoisomerasas sobre los RIs con pre-encadenamientos RH(+) decidimos llevar a cabo digestiones en presencia de cloroquina.

Luego de la digestión con Topo IV en presencia del agente intercalante, las muestras se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa y se obtuvo la inmunodetección de la Figura 5.9. No se observan diferencias relevantes en la migración de los RIs con respecto a la inmunodetección de la Figura 5.7 b, que se obtuvo de la misma manera a diferencia de que el plásmido no estaba bajo los efectos del agente intercalante durante la digestión. En ambas inmunodetecciones las poblaciones de RIs se encuentran concentradas en la zona superior izquierda. En ambas inmunodetecciones los monómeros están agrupados en el centro. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en ausencia de cloroquina donde se observa monómeros con *Wr*(-) parcialmente relajados por la Topo IV. En presencia del agente intercalante las formas no replicadas adquieren *Wr*(+) el

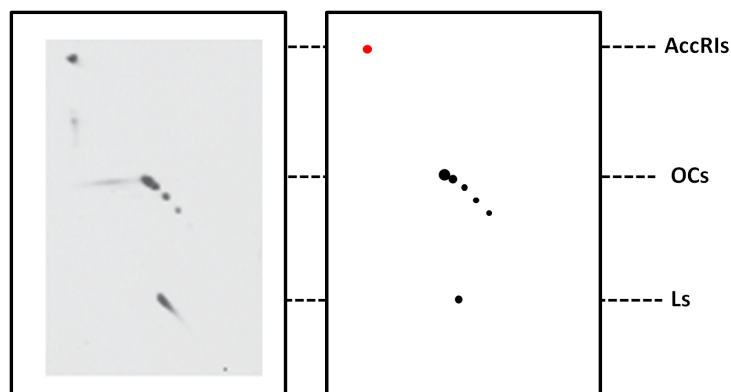


FIGURA 5.9: Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe ParE10 con Topo IV en presencia de cloroquina. Inmunodetección y su esquema representativo. Los RIs se representan en rojo y las moléculas no replicadas en negro.

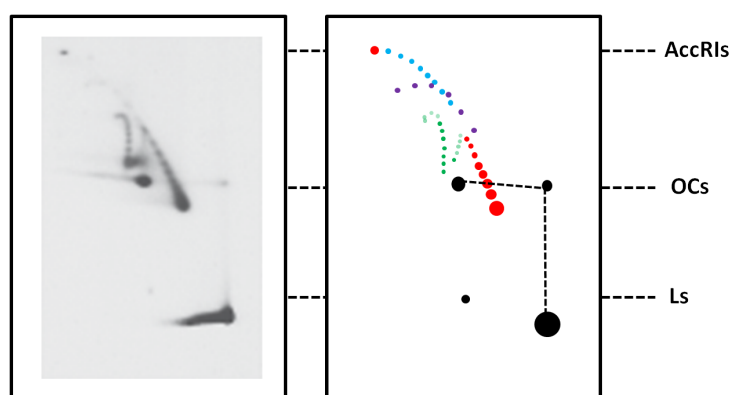


FIGURA 5.10: Digestión del plásmido pBR322@AatII de la estirpe ParE10 con DNA Girasa en presencia de cloroquina. Inmunodetección y su esquema representativo. Los RIs se representan en rojo y las moléculas no replicadas en negro.

cual se pierde al correr las muestras en ausencia de cloroquina.

Por otro lado el plásmido se digirió con DNA Girasa en presencia del agente intercalante, y luego de correr una electroforesis bidimensional, se obtuvo la inmunodetección que se muestra en Figura 5.10. En este caso tampoco fue posible observar ninguna diferencia significativa respecto a la inmunodetección obtenida tras tratar al plásmido con la DNA Girasa en ausencia de la cloroquina (Figura 5.8 b), pues todas las poblaciones de RIs, encadenados y monómeros se mantienen sin ningún cambio detectable.

Todos estos resultados demuestran que la presencia de cloroquina durante la digestión con Topo IV o DNA Girasa no altera la procesividad de las mismas sobre los RIs que provienen de la estirpe de *E. coli* mutante para la Topo IV.

5.1.6 Análisis del plásmido pBR322@AatII de la cepa termosensible parE10 digerido con Topo IV y DNA Girasa mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina

Los geles bidimensionales del apartado anterior no nos permitieron distinguir efecto que tiene la introducción de $Wr(+)$ sobre la relajación de los RIs de la estirpe ParE10 digeridos con Topo IV y DNA Girasa. Por esta razón se decidió digerir las muestras con las topoisomerasas y luego analizarlas mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina ($40 \mu\text{g/mL}$). Como control se utilizó el plásmido intacto analizado mediante electroforesis bidimensional con un gel de agarosa en presencia de un agente intercalante, de esto se obtuvo la inmunodetección mostrada en las Figuras 5.11 a y 5.12 a. Se puede apreciar las señales de las CCCs formando un arco desde la parte inferior derecha de la figura hasta la región de las OCs. La alta concentración de cloroquina provoca el retroceso de las horquillas en los y estos se agrupan en la región de los AccRIs. Las poblaciones de las distintas familias de encadenados aparecen muy difusas. A continuación el plásmido se digirió con Topo IV y se analizó mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina. En la inmunodetección de la Figura 5.11 b se puede observar una señal en el extremo superior izquierdo, la misma corresponde a RIs relajados con horquillas en retroceso. Las señales correspondientes a encadenados desaparecen y las moléculas no replicadas están concentradas en la región de los CCCs. Las mismas han sido previamente relajados de forma parcial por la Topo IV y luego han adquirido $Wr(+)$ en presencia de cloroquina.

Después de digerir al plásmido con DNA Girasa y luego de analizarlo mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia del agente intercalante, se obtuvo la inmunodetección de la Figura 5.12 b con su correspondiente esquema interpretativo. Los RIs con horquillas en retroceso se encuentran agrupados en la región de los AccRIs. Las poblaciones de encadenados se muestran difusas, a causa de presencia del agente intercalante, y las moléculas no replicadas forman un arco en la región inferior.

Estos resultados demuestran que la concentración de cloroquina utilizada en estos experimentos induce la formación de horquillas en retroceso en los RIs con pre-encadenamiento $RH(+)$ previamente digeridas con las topoisomerasas de tipo II de *E. coli*.

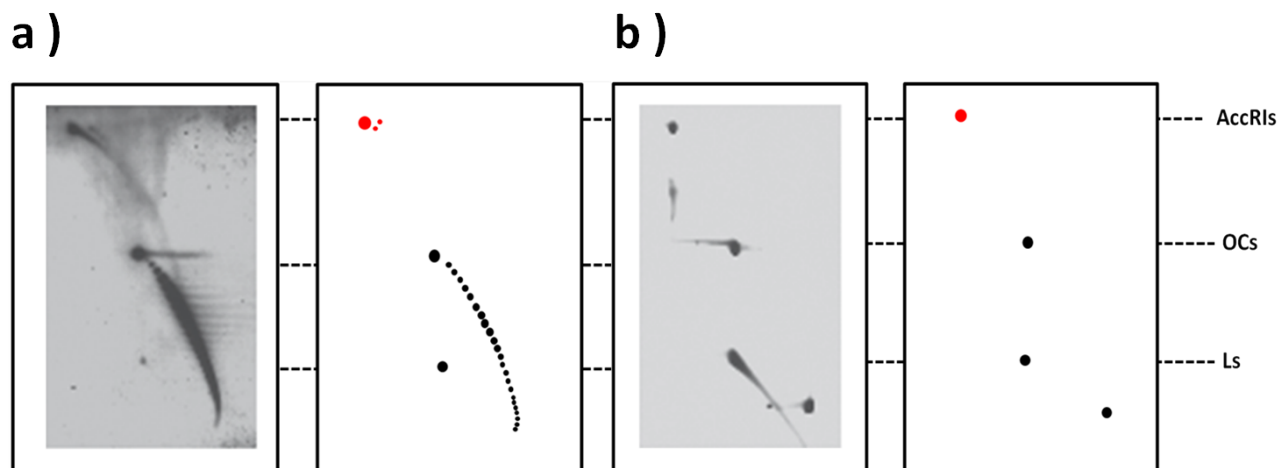


FIGURA 5.11: Inmunodetección obtenida mediante una electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de cloroquina del plásmido pBR322@AatII de la estirpe parE10 digerido con Topo IV. **a)** Inmunodetección de control obtenida del plásmido intacto con un esquema interpretativo correspondiente. **b)** Inmunodetección del plásmido digerido con Topo IV acompañado de su esquema representativo. Las señales correspondientes a los intermediarios de replicación se representan en color rojo y las moléculas no replicadas se representan en negro.

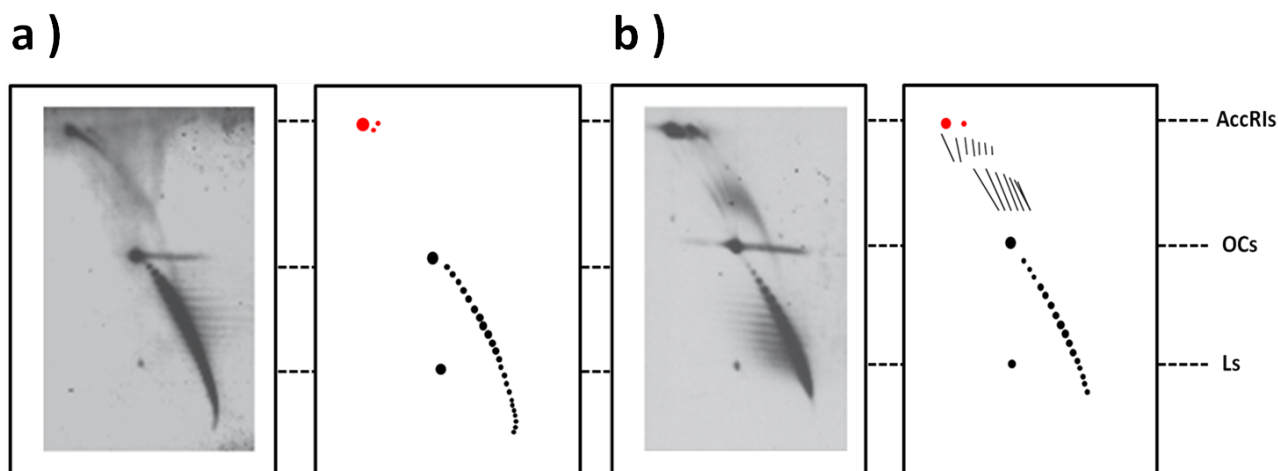


FIGURA 5.12: Inmunodetección obtenida mediante una electroforesis bidimensional en un gel de agarosa en presencia de cloroquina del plásmido pBR322@AatII de la estirpe termosensible parE10 digerido con DNA Girasa. **a)** Inmunodetección de control obtenida del plásmido intacto con su esquema interpretativo correspondiente. **b)** Inmunodetección del plásmido digerido con DNA Girasa acompañado de su esquema representativo correspondiente. Las señales correspondientes a los intermediarios de replicación se representan en color rojo y las moléculas no replicadas en negro.

5.2 Resultados de la simulación computacional

Para comprender mejor la naturaleza conformacional de los RIs bajo condiciones de equilibrio termodinámico se realizaron simulaciones computacionales de las regiones no replicada y ya replicada del plásmido pBR322@AatII con una horquilla de replicación detenida al alcanzar el 60% de su replicación total. Valiéndonos de la separación del RI en dos dominios topológicos interconectados, los RIs se simularon como dos partes, la región no replicada como una molécula con un determinado valor de ΔLk y la región ya replicada como dos moléculas encadenadas relajadas ($\Delta Lk = 0$) con un determinado número de encadenamiento Ca .

5.2.1 Simulación de la región no replicada del intermediario de replicación

El plásmido no replicado tiene una longitud de 4490 pb por lo tanto a la región no replicada, con una masa que es 0.4 veces la del plásmido, le correspondería una longitud de 1780 pb. Se realizaron 100 simulaciones de 100000 movimientos de prueba para topoisómeros desde $\Delta Lk = 0$ a hasta $\Delta Lk = -20$. Con el fin de validar nuestra implementación de modelo *wormlike* con el método Metropolis MC, nuestros resultados se compararon con los que encontramos en la literatura. Primeramente se determinó la contribución del Wr dentro del ΔLk . En la Figura 5.13 se observa la razón $Wr/\Delta Lk$ en función del ΔLk . Cada valor de $Wr/\Delta Lk$ es el promedio de los 100 valores medidos para cada topoisómero. El promedio de todos los valores de $Wr/\Delta Lk$ es 0.7 con una desviación estandar de 0.1. La alta dispersión del valor de $Wr/\Delta Lk$ para los primeros tres topoisómeros. Obviando los valores de $Wr/\Delta Lk$ de estos primeros topoisómeros se obtiene el resultado $Wr/\Delta Lk = 0.75 \pm 0.03$. Este resultado indica que en el estado de equilibrio térmico el índice de superenrollamiento (Wr) tiende a un valor que corresponde al 75% de la variación del índice de ligamiento (ΔLk). El algoritmo utilizado para calcular el Wr de una curva con N segmentos, la doble integral de línea de Gauss, tiene un tiempo computacional del orden $O(N^2)$ y es mostrado en el anexo A.1.5. Nuestra implementación del algoritmo utilizado para calcular el Wr demora 6.2×10^{-3} s para una curva de 180 segmentos y 24.6×10^{-3} s para 360 segmentos. Este resultado está en concordancia con el tiempo computacional teórico. Nuestra implementación del algoritmo para crear conformaciones con cierto grado de superenrollamiento con una curva de 180 segmentos requiere aproximadamente 8.2×10^{-3} s para realizar un movimiento de prueba y calcular su energía, diámetro efectivo y Wr . Esto significa que crear una conformación con un determinado valor de ΔLk requiere el 75% del tiempo computacional total para calcular el Wr .

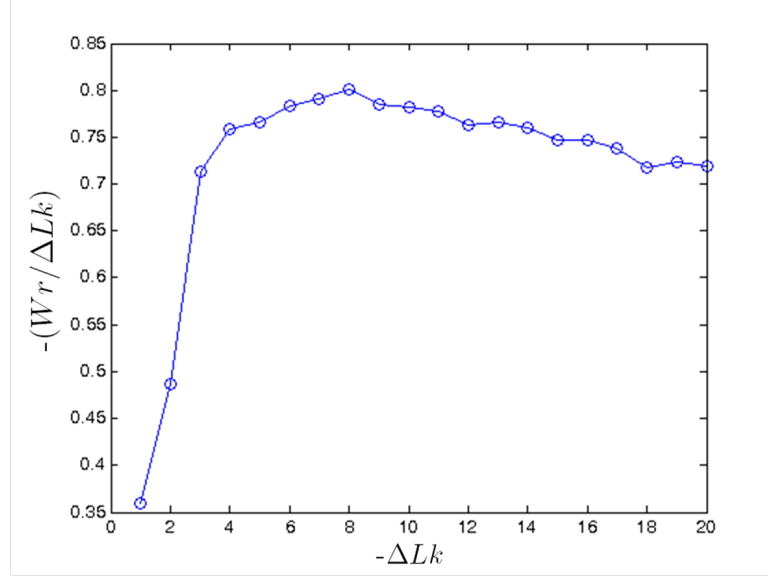


FIGURA 5.13: Gráfico de la razón $Wr/\Delta Lk$ con respecto al ΔLk . Datos de 100 simulaciones de 10^5 movimientos de prueba para topoisómeros desde $\Delta Lk = 0$ a hasta $\Delta Lk = -20$

Continuando con la validación de nuestra implementación del modelo *wormlike chain* para la simulación de moléculas superenrolladas de DNA con el método de Metropolis MC se calculó el promedio de los ángulos de cruce de para cada topoisómero y se elaboró un gráfico de los ángulos de cruce promedio de cada topoisómero en función del ΔLk , tal como se muestra en la Figura 5.14. Teniendo en cuenta la alta dispersión de los ángulos promedio de los primeros tres topoisómeros y si se tienen en cuenta los siguientes 17 valores, se obtiene que el valor promedio del ángulo de cruce sobre el total de topoisómeros es de $140^\circ \pm 10^\circ$. Debido al elevado número de movimientos de prueba utilizados en las simulaciones (movimientos de rotación rígida), del orden de 10^5 , la cantidad de segmentos seleccionados para la rotación disminuye conforme transcurren los movimientos de prueba, así también los ángulos de rotación disminuye para aumentar la probabilidad de aceptación de las conformaciones. La probabilidad de aceptación para las corridas completas de todos los topoisómeros simulados se muestra en la Figura 5.15, en ella se observa que la aceptación disminuye conforme aumenta el índice de ligamiento del topoisómero.

La aparición de nudos a causa de los movimientos de prueba se identificó a partir del cálculo del polinomio de Alexander para cada conformación y los datos obtenidos se utilizaron para calcular la probabilidad de que aparezcan conformaciones anudadas en función de la variación del índice de ligamiento (ΔLk) de los topoisómeros. La relación entre la probabilidad de anudamiento de las conformaciones y el ΔLk en la simulación se presenta en la Figura 5.16. Se observa que para los primeros topoisómeros no aparecen nudos y que la probabilidad de que estos aparezcan aumenta casi de forma lineal

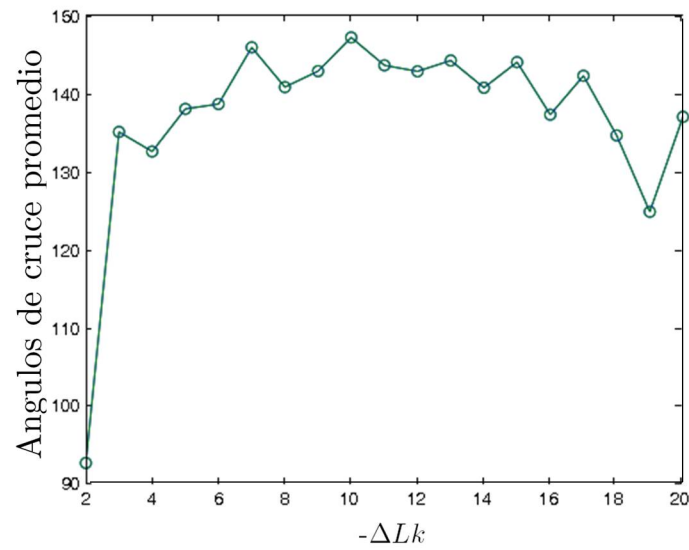


FIGURA 5.14: Gráfico de ángulos de cruce con respecto al ΔLk . Datos de 100 simulaciones de 10^5 movimientos de prueba para topoisómeros desde $\Delta Lk = 0$ a hasta $\Delta Lk = -20$

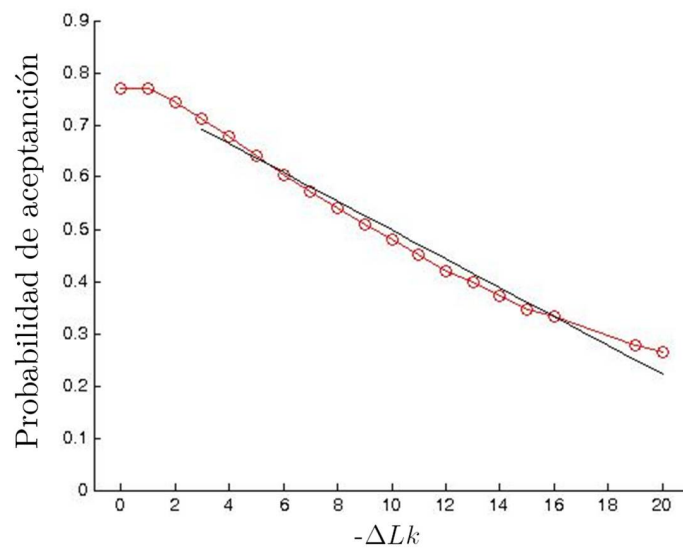


FIGURA 5.15: Probabilidad de aceptación de los movimientos de prueba en función al ΔLk . Datos de 100 simulaciones de 10^5 movimientos de prueba para topoisómeros desde $\Delta Lk = 0$ a hasta $\Delta Lk = -20$

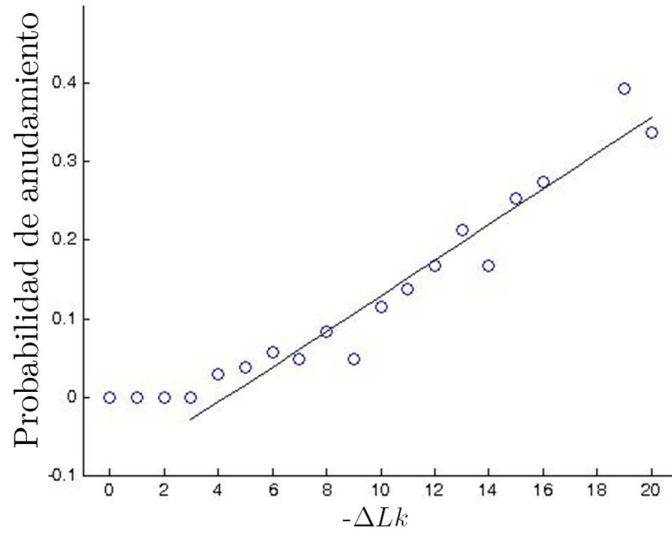


FIGURA 5.16: Probabilidad de aparición de nudos en función del ΔLk . Datos de 100 simulaciones de 10^5 movimientos de prueba para topoisómeros desde $\Delta Lk = 0$ a hasta $\Delta Lk = -20$

conforme va aumentando el índice de ligamiento (Lk).

Los topoisómeros simulados presentan como conformación estable la forma plectonémica, tanto simple como ramificada. Esto se puede apreciar para algunos topoisómeros en la Figura 5.17

Se simularon también conformaciones con $\Delta Lk = -20$ con una función de diámetro efectivo constante de $d_{efectivo} = 3$ nm para cada par de segmentos en nuestra implementación del modelo *wormlike chain*. Algunos ejemplos de las conformaciones obtenidas se pueden apreciar en la Figura 5.18.

5.2.2 Propiedades termodinámicas de la región no replicada

Con el método de Metropolis MC se corrieron simulaciones con una cantidad de movimientos de prueba que permitiera obtener una distribución de topoisómeros en estado de equilibrio termodinámico y a continuación se analizaron sus propiedades termodinámicas. Para cada topoisómero simulado se calculó el promedio de energía potencial elástica (ΔE) y se graficó en función del ΔLk . Tal como se puede observar en la Figura 5.19, existe una tendencia cuadrática de la energía respecto al ΔLk . Este resultado confirma que la energía de cada topoisómero es mayor conforme aumenta su valor de ΔLk .

Los datos de energía potencial elástica (ΔE) se utilizaron para obtener los valores de variación de entalpía (ΔH) para cada valor de ΔLk . La ΔH se calculó tomando el valor

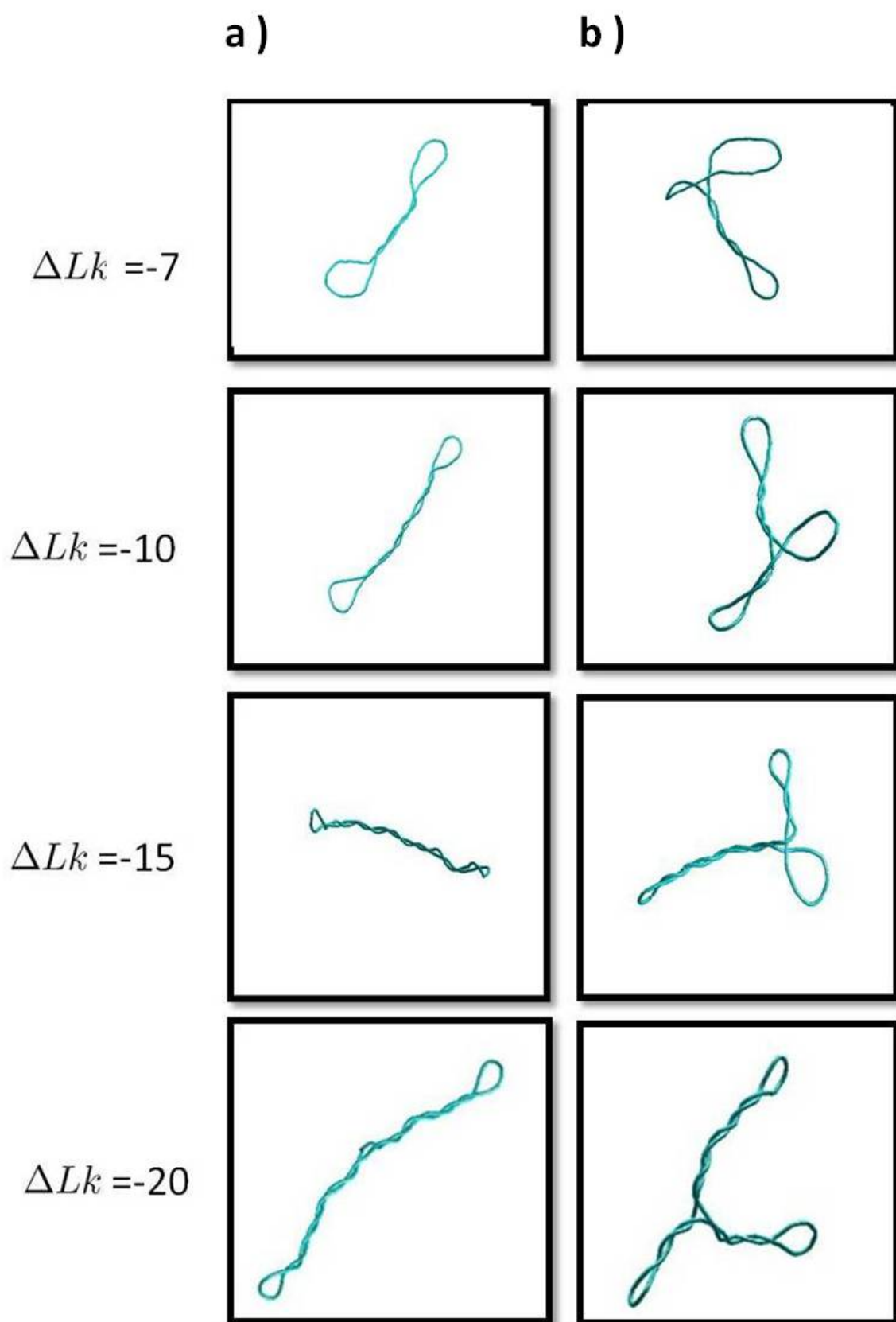


FIGURA 5.17: Conformaciones plectonémicas no anudadas obtenidas por simulación para topoisómeros con ΔLk de valores -7, -10, -15 y -20. **a)** Formas plectonémicas simples. **b)** Formas plectonémicas ramificadas.

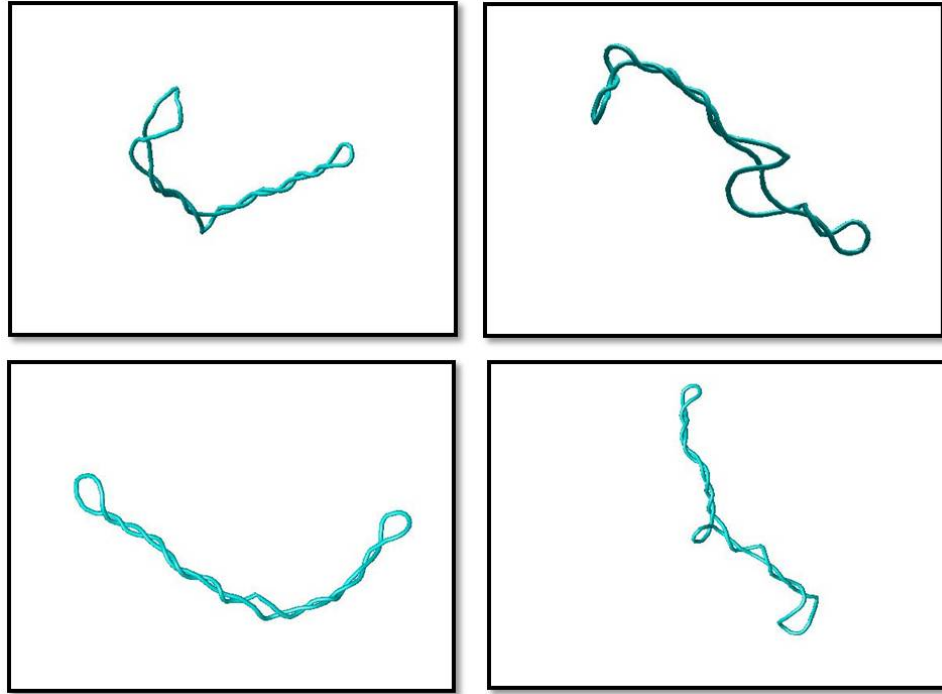


FIGURA 5.18: Conformaciones obtenidas con diámetro efectivo constante de 3 nm para $\Delta Lk = -20$.

de energía del topoisómero con $\Delta Lk = 0$ y sustrayéndola de la energía de los demás topoisómeros (mediante la ecuación 3.18). Un gráfico de los valores de ΔH en función del ΔLk se muestra también en la Figura 5.19. Utilizando la ecuación (3.19) se calculó la energía libre ΔG para cada topoisómero. En la Figura 5.19 se muestra la relación entre la energía libre (ΔG) y el ΔLk . En la figura se observa que la variación de entalpía (ΔH) y la energía libre (ΔG) toman valores similares para los primeros cuatro topoisómeros. A partir de este punto los valores de ΔH disminuyen significativamente respecto a los de ΔG . De acuerdo con la ecuación (3.13), $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, el hecho de que la variación de entalpía (ΔH) tenga un valor menor que la energía libre (ΔG) implica que la variación de entropía (ΔS) es negativa. Este resultado sugiere un menor grado de desorden a medida que las moléculas adquieren un mayor grado de superenrollamiento.

5.2.3 Simulación de la región ya replicada del intermediario de replicación

El plásmido no replicado tiene una longitud de 4490 pb, por lo tanto a cada molécula nascente de la región ya replicada, cuya masa es 0.6 veces la del plásmido, le corresponde una longitud de 2700 pb. Se realizaron 10 simulaciones de 100000 movimientos de prueba para cada valor de encadenamiento con $\Delta Lk = 0$, desde $Ca = 1$ a hasta $Ca = 20$. Para ello, con el objeto de estudiar la relación entre el índice de superenrollamiento inducido

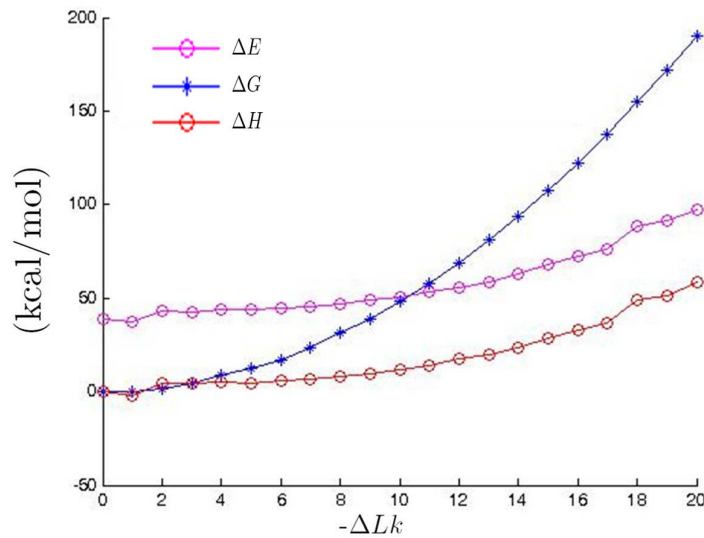


FIGURA 5.19: Propiedades termodinámicas de la región no replicada y su relación con el ΔLk . La energía potencial elástica ΔE se muestra en lila, la variación de entalpía ΔH en rojo, y energía libre ΔG en azul. Datos de 100 simulaciones de 10^5 movimientos de prueba para topoisómeros desde $\Delta Lk = 0$ a hasta $\Delta Lk = -20$

por el encadenamiento, se determinó el valor de la variación del Wr con respecto al Ca , tal como se muestra en la Figura 5.20. Cada valor de Wr es el promedio de los 10 valores medidos para cada número de encadenamiento Ca . Se observó una alta correlación cuadrática entre Wr y Ca en nuestros resultados, mostrando estos un índice de correlación $R^2 = 0.9996$. Estos resultados indican que a pesar de la condición de encadenamiento entre las moléculas con ΔLk nulo, éstas mantienen un índice de superenrollamiento Wr inducido en su estado de equilibrio termodinámico. Una comparación entre los valores de Wr vs Ca de nuestros resultados y los obtenidos por Vologodskii et. al. (Vologodskii et. al. 1993) muestra claramente una gran discrepancia entre ambas simulaciones, tal como se muestra en la Figura 5.21. Esto podría deberse, en parte, a diferencias en la longitud de los plásmidos simulados en ambos trabajos.

El tiempo computacional para la simulación de encadenados con $\Delta Lk = 0$, representados con N segmentos, demandó la utilización de algoritmos de tiempo polinomial $O(N^2)$. Cada movimiento de prueba requirió el cálculo del Wr para dos curvas, demorando esto $6.4 \times 10^{-3}s$, y también se requirió el cálculo del Lk asociado a las dos curvas para verificar el número de encadenamientos entre éstas, demorando así $6.4 \times 10^{-3}s$. La realización de un movimiento de prueba se efectuó en $15.2 \times 10^{-3}s$, por lo que nuestra implementación del algoritmo para crear curvas encadenadas relajadas invierte 84% del tiempo computacional total en el cálculo del Wr y el Lk .

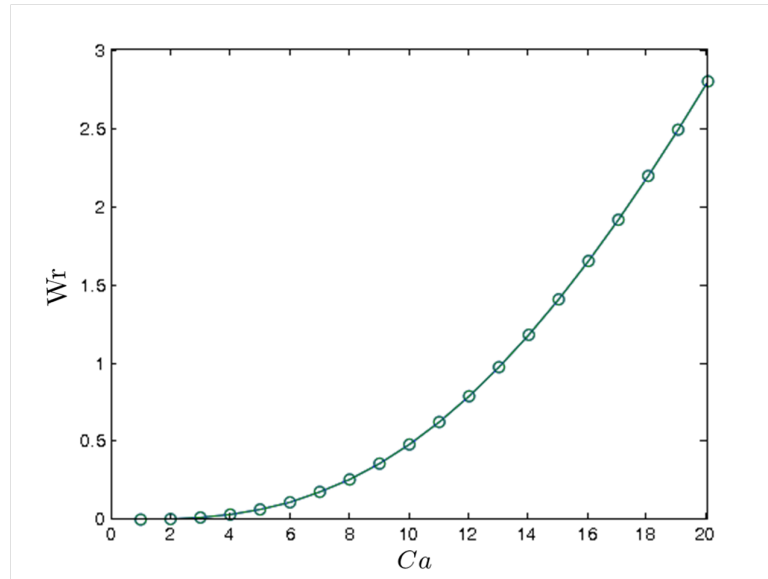


FIGURA 5.20: Variación del writhe Wr con el número de encadenamiento Ca . Datos de 10 simulaciones de 10^5 movimientos de prueba para cada valor de encadenamiento con $\Delta Lk = 0$, desde $Ca = 1$ a hasta $Ca = 20$.

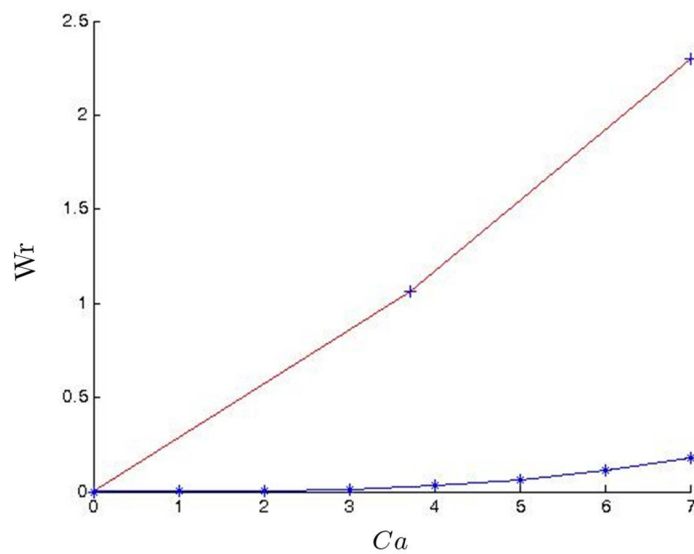


FIGURA 5.21: Comparación entre el Wr inducido y el número de encadenamiento Ca obtenidos para esta obra (azul y asteriscos) y los resultados de simulación de Vologodskii (rojo y signo positivo) (Vologodskii et. al. 1993).

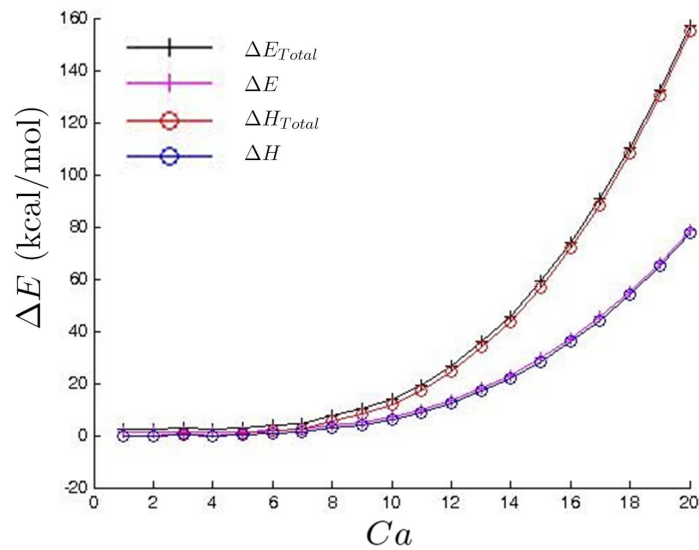


FIGURA 5.22: Propiedades termodinámicas de la región ya replicada. La curva violeta representa la energía potencial elástica ΔE de una sola molécula naciente y la curva negra es la energía potencial elástica total ΔE_{Total} de la región ya replicada. En azul se muestra la variación de entalpía de una sola molécula y en rojo la variación de entalpía total de la región ya replicada. Datos de 10 simulaciones de 10^5 movimientos de prueba para cada valor de encadenamiento con $\Delta Lk = 0$, desde $Ca = 1$ a hasta $Ca = 20$.

5.2.4 Propiedades termodinámicas de la región ya replicada

Se calculó el promedio de energía potencial elástica (ΔE) para cada encadenado y se graficó en función del Ca , como se puede observar en la Figura 5.22. La correlación cuadrática entre ΔE y Ca tiene un índice de correlación de $R^2 = 0.9881$, que es menor que el índice de correlación $R^2 = 0.9996$ existente entre el Wr inducido y Ca (figura 5.20). La energía total de la región ya replicada debe ser el doble de la energía de una sola de las moléculas y la obtuvimos, precisamente, tomando el doble valor de los valores de energía de una sola curva (Figura 5.22). En este gráfico también se pueden constatar los bajos valores de energía de los primeros encadenados. En la misma figura también se muestra la variación de entalpía, tanto para una molécula sólo como para las dos encadenadas (la variación de entalpía total de la región ya replicada).

5.2.5 Comparación de la variación de entalpía entre las regiones no replicada y ya replicada

Con el fin de comprobar la existencia algún balance energético entre las regiones ya replicada y no replicada, sus respectivos valores de variación de entalpía (ΔH) se graficaron juntos. Basándonos en la relación $Wr/\Delta Lk = 0.75 \pm 0.03$ obtenida a partir los datos

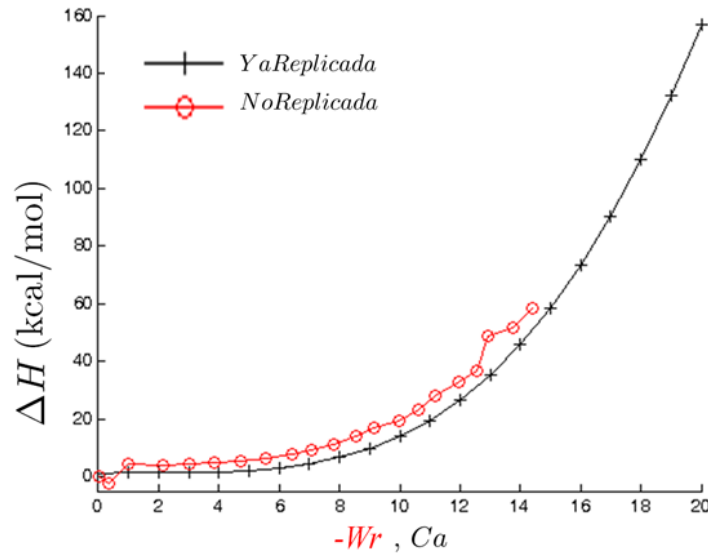


FIGURA 5.23: Variaciones de entalpía de ambas regiones del RI. La ΔH de la región no replicada (en rojo) se grafica respecto al Wr y la ΔH de la región ya replicada (negro) con respecto al Ca .

para la región no replicada de la Figura 5.13 se muestran en función al Wr en lugar del ΔLk . En la representación gráfica se utilizó el mismo eje de abscisas para el Wr y el Ca asumiendo que una variación de una unidad en el Wr (una vuelta completa de la doble hélice respecto a su eje en la región no replicada) equivale a un cambio en una unidad del Ca (un encadenamiento en la región ya replicada)[?]. La determinación de las variaciones de entalpía (ΔH) en función del Wr para la región no replicada y en función del Ca para la región ya replicada se presenta en la Figura 5.23, donde podemos apreciar que ambas variaciones de entalpía son similares (condición para el equilibrio termodinámico) y de eso se deduce que el número de cruces (Wr) de la región no replicada es muy cercano al número de encadenamiento Ca de la región ya replicada

Paralelamente, se compararon entre sí las variaciones de entalpía de las regiones no replicada y ya replicada. En la Figura 5.24 se puede constatar que hay equilibrio energético cuando el número de cruces en la región no replicada es muy similar al número de pre-encadenamientos en la región ya replicada. Un ajuste lineal entre la energía almacenada en la región ya replicada y la almacenada en la región no replicada muestra que entre ellas existe un índice de correlación $R^2 = 0.9893$. El ajuste se muestra en la Figura 5.23. Estos resultados sugieren que, bajo la condición de equilibrio termodinámico entre ambas regiones de un RI, el índice de superenrollamiento en la región no replicada es numéricamente muy cercano al número de pre-encadenamientos en la región ya replicada.

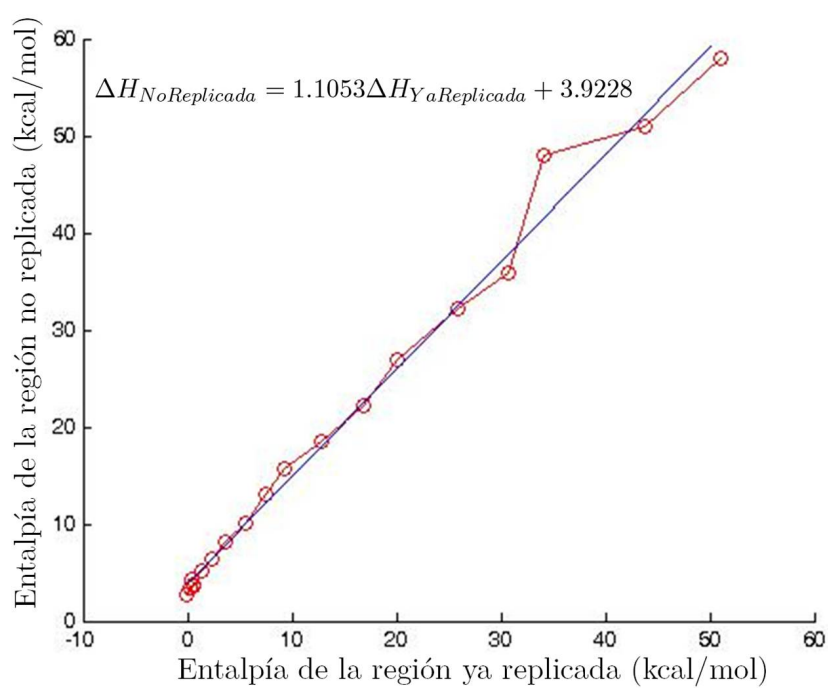


FIGURA 5.24: Comparación de las variaciones de entalpía de las regiones no replicada y ya replicada de un RI. Ajuste lineal que muestra la correlación existente entre las entalpías en simulación computacional.

Capítulo 6

Discusión

En la presente obra nos propusimos comprender el papel que juega cada topoisomerasa en la regulación de la topología del DNA a lo largo del proceso replicativo. Durante la replicación del DNA las helicasas generan superenrrollamiento positivo por delante de la horquilla replicativa. El exceso de $Wr(+)$ que se genera por el avance del replisoma podría migrar de la región no replicada a la ya replicada, dando lugar a la formación de pre-encadenados, que al terminar la replicación, se convertirían automáticamente en encadenamiento de las dos cromátidas resultantes. La comprensión de esta interacción entre superenrrollamiento y pre-encadenamiento es una cuestión clave para resolver la Paradoja de la Topo IV. Nuestros estudios experimentales utilizando plásmidos bacterianos como modelo junto con electroforesis bidimensional han puesto de manifiesto los distintos roles desempeñados por las topoisomerasas de tipo II de *E. coli* en la regulación *in vitro* del superenrrollamiento y pre-encadenamiento en intermediarios de replicación con una horquilla de replicación detenida. Paralelamente, hemos realizado simulaciones computacionales con el método de Metropolis Monte Carlo para estudiar la dinámica de los cambios topológicos durante la replicación del DNA. Los resultados obtenidos nos permitieron determinar la energía potencial de las regiones no replicada y ya replicada y predecir el estado topológico de un RI en condiciones de equilibrio termodinámico

6.1 Rol de la Topo IV en la regulación del superenrrollamiento y el pre-encadenamiento de los intermediarios de replicación

El análisis de la digestión de los RIs con Topo IV nos permitió comprobar que ésta relaja completamente los RIs con pre-encadenados LH(-). Por otra parte, nuestros resultados

confirman que la Topo IV relaja fundamentalmente el superenrollamiento positivo de las formas no replicadas pero también relaja, aunque con menor eficacia, el superenrollamiento negativo. Se ha demostrado que la Topo IV relaja el superenrollamiento positivo hasta 20 veces más rápido que el negativo [64]. Ensayos *in vitro* sugieren que la Topo IV reconoce la quiralidad de los cruces LH(+) y que esta relajación asimétrica del superenrollamiento resulta principalmente de diferencias en la procesividad de la enzima [95] [96]. Se ha observado que la capacidad de la Topo IV para discriminar entre el superenrollamiento positivo y negativo depende del dominio C-terminal (CTD) de la subunidad ParC de la enzima [97]. En un estudio reciente, Vos et. al. presentaron resultados de una disección sistemática de residuos claves del dominio CTD, donde se demuestra que cada una de las cinco regiones de dicho dominio contribuyen diferencialmente a la discriminación del sustrato por la Topo IV [97]. Uno de los hallazgos más significativos es que la región cinco (*blade* 5) inhibe específicamente la relajación del superenrollamiento negativo. Paralelamente, se ha demostrado que MukB, una condensina bacteriana, interacciona físicamente con la región cinco del dominio CTD de la Topo IV estimulando la relajación del DNA con superenrollamiento negativo [98] [99] [100]. Se ha sugerido que mediante la estabilización del superenrollamiento negativo, MukB facilitaría la formación de nudos por la Topo IV y que, de esta manera la interacción de MukB-Topo IV podría jugar un rol en la organización de los cromosomas. El hecho de que la Topo IV halla podido relajar totalmente los RIs aislados *in vitro* indica que esta enzima puede haber actuado sobre la región ya replicada, resolviendo los pre-encadenamientos LH(-), una acción que no es propia de la Topo IV pues estudios previos demuestran que esta enzima se especializa en cruces LH(+). Por otro lado, hemos constatado que la Topo IV también relaja las formas parcialmente replicadas con cruces RH(-) en la región no replicada y cruces RH(+) en la región ya replicada del plásmido pBR322@AatII obtenido de bacterias en las que se inhibió la acción de la Topo IV. Los plásmidos obtenidos de la estirpe parE10, deficiente en Topo IV, presentan además una acumulación de moléculas encadenadas que tienen cruces RH(+). La digestión con Topo IV resuelve completamente estos encadenamientos, tal como se había observado previamente [3]. Cabe destacar que ninguno de estos tipos de cruce es el sustrato preferido por esta enzima. Por otro lado, cabe la posibilidad de que la Topo IV también relaje cruces en la región no replicada de los RIs. Esto provocaría un desbalance energético entre las regiones no replicada y ya replicada del RI, causando la migración del pre-encadenamiento de la región ya replicada a la región no replicada, lo cual resultaría en la relajación del intermediario de replicación.

Un estudio previo de Stone et. al. propone que la Topo IV actúa de acuerdo al arreglo geométrico de cada yuxtaposición de dos segmentos de DNA. Sus resultados demuestran

que la Topo IV relaja preferentemente los cruces LH(+) (Stone et. al. 1994). Los pre-encadenados con cruces LH(-), generados después de la desproteización de los RIs, podrían ser reconocidos y eliminados por la Topo IV. Pero, cómo podría la Topo IV resolver los pre-encadenados y los encadenados con cruces RH(+) producidos tanto *in vivo* como en ausencia de Topo IV? (fig 2.13). Esto es lo que se conoce como la paradoja de la Topo IV. Se han propuesto varios modelos teóricos para resolver esta cuestión pero ninguno se ha confirmado experimentalmente *in vivo*. Una propuesta para explicar como desencadena los pre-encadenamientos y los encadenamientos RH(+) es que en moléculas con elevados niveles de encadenados RH(+) se produce un estrés torsional que pliega el encadenado sobre sí mismo causando la aparición de una superhélice con cruces LH que favorece la acción de la Topo IV [97] [?]. Cuando la enzima ya relajó la molécula lo suficiente, es decir, ya no se produce una superhélice con cruces LH, la elasticidad de la misma favorecería la aparición de una conformación geométrica que facilita la acción de la enzima. De esta manera, la Topo IV terminaría de desencadenar las moléculas hermanas a pesar de que no serían inicialmente el sustrato ideal para la enzima. Otra propuesta consiste en que dos moléculas encadenadas se encuentran y se juxtaponen de tal manera que la Topo IV encuentra en esa juxtaposición un sustrato favorable para su acción (figura 6.1) [?] .

La cloroquina es un agente intercalante del DNA que induce Wr(+) a elevadas concentraciones. A la concentración de cloroquina empleada en el presente trabajo, los plásmidos, que están negativamente superenrollados, primero pierden su Wr(-) y luego adquieren Wr(+). Esto es lo que ocurrió con las formas monoméricas no replicadas. Pero las formas parcialmente replicadas no pueden adquirir Wr(+) porque éste da lugar al retroceso de las horquillas de replicación [3][56][86]. El resultado del análisis de la digestión con Topo IV del plásmido de la estirpe DH5 α F' en presencia de cloroquina no nos permitió distinguir el efecto de la introducción de Wr(+) en la procesividad de la Topo IV. En presencia de 40 μ g/mL de cloroquina la Topo IV tendría como sustrato plásmidos ya relajados con horquillas en retroceso, siendo innecesaria la acción de esta topoisomerasa. Luego de correr la muestra en una electroforesis bidimensional en geles de agarosa en ausencia cloroquina se constató que la Topo IV relajó los RIs, obteniéndose resultados similares a los de las muestras digeridas en ausencia de cloroquina. Exactamente el mismo fenómeno se observó en el análisis de la digestión con Topo IV de plásmidos provenientes de la estirpe termosensible parE10. En el análisis de la digestión con Topo IV de plásmidos provenientes de la estirpe DH5 α F' en geles de agarosa en presencia del agente intercalante. No se detectaron RIs debido presumiblemente a que la alta concentración del agente intercalante generó roturas de cadena sencilla en las horquillas de replicación de los RIs previamente relajados con la Topo IV, reduciendo así la cantidad de estas moléculas al punto no poder detectarlas tras la electroforesis. Los

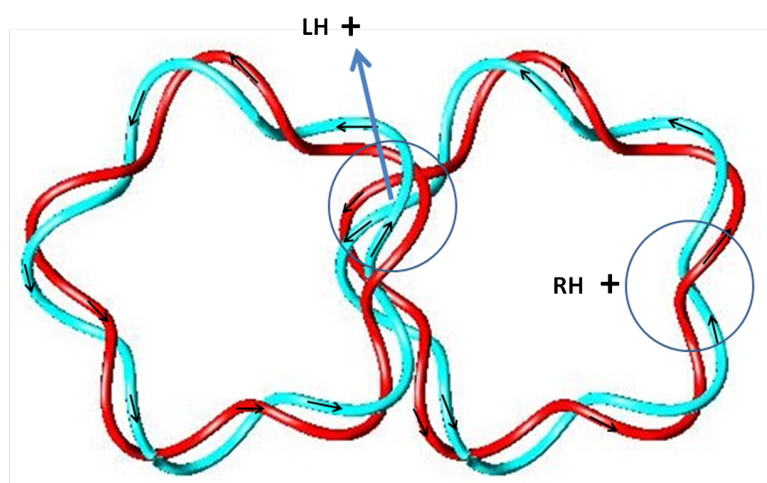


FIGURA 6.1: Cuando dos distintos encadenados con cruces RH (+) se yuxtaponen entre ellos pueden aparecer cruces LH (+).

plásmidos obtenidos de la estirpe termosensible *parE10*, deficiente en Topo IV, también se digirieron con Topo IV y se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa en presencia de $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ de cloroquina. En este caso sí se observaron las poblaciones de RIs agrupadas en la región de las AccRIs y que corresponden a formas parcialmente replicadas con horquillas en retroceso.

6.2 Rol de la DNA Girasa en la regulación del superenrollamiento y el pre-encadenamiento de los intermediarios de replicación

La DNA Girasa es la única topoisomerasa capaz de introducir $\text{Wr}(-)$, los resultados obtenidos mediante el análisis por electroforesis bidimensional en geles de agarosa del plásmido pBR322@AatII digerido con DNA Girasa confirman esta característica específica de la enzima. También confirmamos la incapacidad de esta topoisomerasa para introducir $\text{Wr}(-)$ en los OCs, esto se debe a que las OCs presentan roturas de cadena sencilla que imposibilitan la acumulación de estrés torsional. Siendo que la DNA Girasa es la enzima especializada en introducir $\text{Wr}(-)$ en los plásmidos procariotas, es de esperar que aumente el superenrollamiento negativo en las moléculas no replicadas. Cabría esperar que la DNA Girasa también introduzca $\text{Wr}(-)$ en la región no replicada de los RIs, tal como lo hace durante la replicación [?]. La introducción de $\text{Wr}(-)$ en esta región debería provocar un aumento en la tensión elástica produciendo un desequilibrio energético entre ambas regiones del RI lo que favorecería la difusión de tensión hacia la región ya replicada, provocando así un aumento del número de pre-encadenamientos. Por lo tanto,

se esperaba que el efecto final de la digestión con DNA Girasa fuera un incremento en el número total de cruces de todos los topoisómeros de los RIs, causando así un aumento en su movilidad electroforética. Contrariamente a lo esperado, nuestros resultados con la estirpe DH5 α F' sugieren que la digestión con DNA Girasa relaja parcialmente los RIs. Existen antecedentes que sugieren que la DNA Girasa podría desencadenar cromátidas hermanas [69](Hiasa et. al. 1994; Espeli et. al., 1996; Zecheidrick et. al., 1995). Por otro lado se ha demostrado que la DNA Girasa es capaz de sustituir parcialmente a la Topo IV en las estirpes termosensibles parC o parE (Kato et. al., 1992). En ausencia de Topo IV se produciría una alta acumulación de cruces RH(-) en la región no replicada y cruces RH(+) en la región ya replicada (figura 2.13) y como consecuencia la tensión torsional no puede distribuirse *in vitro* como en el caso de los RIs de la estirpe DH5 α F' con LH(-) en la región ya replicada. Nuestros resultados en la estirpe parE10 demostraron que a la temperatura restrictiva (ausencia de Topo IV) la DNA Girasa no relaja las formas parcialmente replicadas con cruces RH(-) en la región no replicada y cruces RH(+) en la región ya replicada, en contraste con lo observado en los RIs de la estirpe DH5 α F'. De igual manera, no se observó ningún efecto sobre las moléculas encadenadas (CatAs, CatBs y CatCs) con cruces de tipo RH(+).

En conjunto nuestros resultados demuestran que la DNA Girasa introduce Wr(-) en las formas no replicadas y elimina, aunque con muy poca eficiencia, los pre-encadenados LH(-). En ausencia de Topo IV la DNA Girasa es incapaz de resolver los pre-encadenados y los encadenados con una alta acumulación de cruces RH(+). Esto se debe a que la acumulación de pre-encadenamientos con cruces RH(+) en la región ya replicada impide la redistribución de la tensión a diferencia de lo que ocurre con la estirpe DH5 α F' *in vitro* [?]. Utilizando un sistema de pinzas magnéticas, Nollman y col, demostraron que en condiciones de elevada tensión la DNA Girasa relaja los cruces LH pero no los cruces RH (Nollman et. al., 2007). De manera consistente con esta observación, nuestros resultados en la estirpe DH5 α F' confirman que la DNA Girasa relaja parcialmente los RIs con cruces LH, actuando principalmente sobre aquellos que están muy torsionados, pero es incapaz de eliminar los cruces RH que se acumulan en ausencia de Topo IV.

En conjunto nuestros resultados sugieren que la DNA Girasa podría eliminar el pre-encadenamiento LH(-) *in vitro* en RIs aislados de la estirpe DH5 α F'. En RIs de esta estirpe, cabe la posibilidad de que la DNA Girasa pudiera introducir cruces RH en la región ya replicada, compitiendo con los cruces LH que ya se encuentran ahí y en consecuencia disminuyendo el número de pre-encadenamientos de esta región, provocando al final una disminución en la movilidad electroforética de los topoisómeros. Esto no ocurriría para los plásmidos de la estirpe parE10, ya que la región ya replicada tiene cruces RH (+) y la Girasa ya no sería capaz de introducir muchos más, y como se mencionó

anteriormente, los cruces RH (-) de la región no replicada ya no pueden migrar hacia la región ya replicada.

El resultado del análisis de la digestión con DNA Girasa del plásmido de la estirpe estirpe DH5 α F' en presencia de cloroquina no nos permitió distinguir ningún efecto del agente intercalante sobre la procesividad de esta enzima. En presencia de 40 $\mu\text{g/mL}$ de cloroquina se producen formas parcialmente replicadas con horquillas en retroceso las cuales son incapaces de acumular estrés torsional en forma de superenrollamiento en la región no replicada y pre-encadenamiento en la región ya replicada. Por lo tanto esperábamos que, en presencia del agente intercalante, el tratamiento *in vitro* con DNA Girasa no tuviera efecto sobre los RIs. Nuestros resultados confirman que cuando se elimina la cloroquina, las formas no replicadas y los RIs tienden a recuperar su forma original. Tras correr la muestra en una electroforesis bidimensional en geles de agarosa en ausencia de cloroquina tanto las formas no replicadas como las parcialmente replicadas tienden a recuperar su forma original, es decir, adquieren superenrollamiento negativo. En el caso de la digestión con DNA Girasa de los plásmidos provenientes de la estirpe parE10 también se observó el mismo efecto del agente intercalante. La diferencia se observó cuando las muestras se analizaron mediante electroforesis bidimensional en presencia de cloroquina. En este caso la DNA Girasa podía actuar directamente sobre los plásmidos pero la presencia de cloroquina durante la electroforesis induce la aparición de RIs con horquillas en retroceso y la consecuente acumulación de estos en la región de las AccRIs. También en el caso de los plásmidos provenientes de la estirpe parE10 se observaron RIs agrupados en la región de las AccRIs. En cuanto a las formas no replicadas, se comprobó que en ausencia del agente intercalante, las muestras digeridas con DNA Girasa no ganaban movilidad electroforética. Esto podría deberse a que la DNA Girasa introduce $Wr(-)$ en los monómeros.

Los resultados de los experimentos con cloroquina no nos permitieron comprobar el efecto de la introducción de $Wr(+)$ sobre la actividad de las topoisomerasas. En el futuro nos plateamos utilizar la DNA Girasa reversa para introducir $Wr(+)$ de forma estable en los RIs y así poder analizar su influencia sobre la actividad de las topoisomerasas de tipo IIA.

Los resultados obtenidos mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa demuestran que la DNA Girasa y la Topo IV reconocen la geometría (quiralidad y signo topológico) de los cruces entre las moléculas de DNA. Esta geometría difiere entre las regiones no replicada y ya replicada de los RIs *in vitro* e *in vivo* así como en estirpes deficientes para la Topo IV.

6.3 Simulación computacional de las regiones no replicada y ya replicada de un intermediario de replicación

En esta obra implementamos el modelo *wormlike chain* que consiste en representar una molécula de DNA mediante una sucesión de segmentos rígidos unidos entre sí. Se ha demostrado que esta simplificación es aceptable mientras existan suficientes segmentos por longitud de persistencia (a) (Vologodskii and Kamenetskii, 1974; Le Bret, 1980; Kamenetskii 1985; Vologodskii 1992). La implementación del modelo *wormlike chain* mediante el método Metropolis Monte Carlo consiste en efectuar movimientos de prueba que conserven la longitud de los segmentos. En esta obra se utilizaron movimientos de rotación rígida para efectuar perturbaciones en las conformaciones, estos movimientos conservan de manera perfecta la longitud de los segmentos. Las conformaciones iniciales, creadas utilizando el modelo *wormlike chain*, fueron corridas con el método Metropolis MC. Los intermediarios de replicación se representan como dos dominios topológicos separados, la región no replicada y la región ya replicada.

Una vez desarrollado el modelo computacional de las regiones no replicada y ya replicada de un RI se procedió a la comparación de nuestros resultados de la simulación con los encontrados en la literatura. Entre los parámetros analizados en la región no replicada se encuentran el índice de superenrollamiento (Wr) promedio para un conjunto de topoisómeros, los ángulos de yuxtaposición entre dos segmentos y la probabilidad de formación de nudos. Los trabajos de simulación de Vologodskii [90] [101] han sido considerados como patrón para la validación de nuestros resultados en la simulación computacional del superenrollamiento en la región no replicada y encadenamiento en la región ya replicada. Nuestros resultados confirman que bajo las condiciones de equilibrio termodinámico, en las moléculas superenrolladas con un determinado valor de ΔLk el índice de superenrollamiento alcanza el valor $Wr = (0.75 \pm 0.03)\Delta Lk$, lo cual es congruente con los resultados obtenidos por Vologodskii et. al., donde se comprobó que el índice de superenrollamiento Wr mantiene una relación constante con la variación del índice de ligamiento (ΔLk), alcanzando el Wr el 75% del valor del ΔLk , por lo que la variación del índice de torsión ΔTw alcanza sólo el 25% del valor del ΔLk [90]. Los resultados de Vologodskii de medición de el aporte del Wr en el ΔLk utilizando el modelo *wormlike chain* para un determinado topoisómero para distintos números de segmentos [90]. Nuestras mediciones se tuvo en cuenta el aporte del Wr en el ΔLk para un número fijo de segmentos y distintos topoisómeros.

En nuestras simulaciones se encontró que los ángulos de yuxtaposición tienen una media en torno a los 140° , lo que discrepa con los resultados de estudios previos, en los cuales se determinó que los ángulos que forman los segmentos de DNA en las yuxtaposiciones

tienen una media cercana a 120° [95][97]. Pensamos que esta discrepancia podría deberse a la verificación del diámetro efectivo de las conformaciones durante la simulación (ecuación 3.9). Para verificar si esta era la causa se realizaron simulaciones utilizando una función de diámetro efectivo constante, $d_{\text{efectivo}}(D) = A$. Sin importar el valor de la diferencia D que hay entre los índices de cada segmento entre los que se calculó la distancia. Las conformaciones obtenidas de esta forma no presentan diferencias significativas con respecto a las obtenidas usando el diámetro efectivo con la ecuación 3.9. Sin embargo, eventualmente, se observó la aparición de conformaciones con extremos angulosos.

Los movimientos de prueba utilizados en las simulaciones fueron los de rotación rígida (ecuación 4.2). Estos movimientos permiten que dos segmentos del modelo *wormlike chain* se atraviesen entre sí provocando la aparición eventual de nudos. Utilizamos el polinomio de Alexander para verificar la presencia de nudos en las conformaciones simuladas, pues en este estudio sólo interesan las conformaciones que carecen de nudos. Nuestros resultados demuestran que la probabilidad de que se produzca una conformación anudada aumenta a medida que se incrementa el ΔLk . Esto podría deberse a que un mayor retorcimiento de los segmentos facilitaría la formación de nudos y este resultado está de acuerdo a resultados de investigaciones previas [88]. Este hecho sólo ocurriría en las simulaciones, ya que estudios realizados por Olavarrieta et. al. indican que la aparición de nudos *in vivo* disminuye conforme va aumentando el número de pre-encadenamientos en los intermediarios de replicación [63]. Se ha sugerido que un menor número de pre-encadenamientos facilitaría el acercamiento entre dos segmentos distantes de DNA de manera que éstos puedan yuxtaponerse con la intervención de la Topo IV, este sería el mecanismo mediante el cual se forman nudos *in vivo* [?].

Nuestra implementación del algoritmo para calcular la integral de Gauss para el Wr efectivamente corre en tiempo $O(n^2)$. El tiempo que la función que calcula el superenrollamiento se demora en crear una conformación se debe principalmente al tiempo que esta se demora en calcular el Wr y por esto es importante como trabajo futuro mejorar el tiempo computacional del algoritmo que calcula el índice de superenrollamiento Wr . La verificación del estado topológico de conformaciones encadenadas se puede realizar fácilmente mediante el cálculo del Lk de las curvas. Sin embargo, ese algoritmo con tiempo computacional $O(n^2)$ requiere más tiempo de ejecución que el que calcula el Wr , que debe recorrer dos curvas distintas para resolver la integral doble de Gauss, y por ello en futuros trabajos se buscará mejorar el tiempo computacional del algoritmo para encontrar numéricamente el Lk y también se implementarían métodos diferentes para verificar el estado topológico de curvas encadenadas.

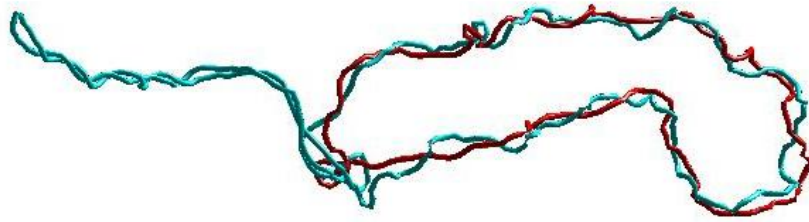


FIGURA 6.2: Simulación computacional de un RI mediante el método Metropolis Monte Carlo. La región no replicada se halla unida físicamente a la región ya replicada.

La implementación del algoritmo que crea conformaciones con superenrollamiento utiliza el algoritmo para calcular el Wr sólo una vez para cada movimiento de prueba mientras que la implementación del algoritmo que crea conformaciones encadenadas relajadas debe realizar, por cada movimiento de prueba, dos veces el cálculo del Wr , una vez por cada curva encadenada, y también debe utilizar el algoritmo que calcula el Lk para verificar el estado topológico de las curvas. Por esto, el algoritmo que crea encadenados relajados se demora más del doble de tiempo computacional que el que crea conformaciones superenrolladas.

El análisis de la simulación de la región ya replicada mostró una correlación cuadrática entre el Wr inducido por el encadenamiento y el número de encadenamientos Ca . Este resultado discrepa notoriamente con el resultado obtenido por Vologodskii et. al [101]. En dicho estudio se encontró que entre moléculas con números de encadenamiento de 3,4 y 7 existe una correlación lineal entre el Wr y el Ca . La diferencia fundamental entre las simulaciones en ambos trabajos radica en la longitud de los plásmidos simulados para el encadenamiento. Los plásmidos simulados por Vologodskii et. al. tienen una longitud ≈ 1.3 veces mayor que los plásmidos simulados para esta tesis, por lo que sería importante como trabajo futuro realizar simulaciones con plásmidos de la misma longitud que los simulados por Vologodskii et. al.

Como los RIs simulados en esta obra se representaron en dos partes separadas e independientes, la región no replicada y la ya replicada, en un trabajo futuro se modelaría a un RI como una sola molécula la cual contaría con dos regiones con propiedades topológicas diferentes, pero con una horquilla de replicación que permitiría el intercambio directo de energía entre ambas regiones de la molécula. En la figura 6.2 se muestra la estructura por simulación computacional de un RI, ajustado a las características del plásmido pBR322@AatII, cuya implementación aún no ha sido terminada satisfactoriamente durante la realización de esta obra.

6.4 Coordinación del superenrollamiento y el pre-encadenamiento en condiciones de equilibrio termodinámico

Basándonos en que un RI *in vitro* está compuesto por dos dominios topológicos interrelacionados, correspondientes a sus regiones no replicada y ya replicada, éstas se simularon por separado y se analizó la naturaleza topológica de ambas en condiciones de equilibrio termodinámico. La variación de entalpía (ΔH) es la diferencia de energía potencial elástica entre el plásmido relajado y el que tiene un determinado índice de superenrollamiento [90]. Del estudio del equilibrio termodinámico en la región no replicada (considerada como una molécula que sólo tiene superenrollamiento) se encontró que la energía potencial elástica de un plásmido aumenta conforme aumenta su estrés torsional, es decir, que un mayor índice de superenrollamiento produce un mayor almacenamiento de energía potencial dentro de la molécula. En la figura 5.18 se puede observar que la energía libre (ΔG) que debería introducir una topoisomerasa para cambiar el ΔLk se hace mayor que la variación de entalpía conforme aumenta el índice de ligamiento del topoisómero. Esto se puede interpretar como que las moléculas más relajadas se encuentran en un estado termodinámico más aleatorio, con un espacio de conformaciones posibles mucho más amplio, y por ende presentan un mayor grado de desorden. Las moléculas con mayor índice de ligamiento cuentan con menos estados accesibles por lo cual presentan un menor grado de desorden. Estos resultados coinciden con los observados previamente por el grupo de Vologodskii [90].

Nuestros resultados de simulación indican que si la variación de entalpía (ΔH) en la región no replicada es la misma que la de la región ya replicada entonces, el Wr en la región no replicada tiene un valor muy similar al número de pre-encadenamientos de la región ya replicada. De este resultado podemos deducir que en equilibrio termodinámico la eliminación de un cruce en la región no replicada tendría como consecuencia la reducción de un de pre-encadenamiento en la ya replicada, y viceversa.

A la variación de entalpía ΔH en la región ya replicada le corresponde una tendencia cuadrática respecto al número de pre-encadenamientos de la región ya replicada. Este es un resultado esperable teniendo en cuenta a la naturaleza cuadrática de la función de energía potencial elástica utilizada para esta región del RI (ecuación 4.3), y además ya teníamos el antecedente de que un aumento en el Ca induce un aumento equivalente en el Wr . Por lo tanto, el resultado obtenido es congruente con nuestras observaciones previas y con las de Vologodskii et. al. [101].

La comparación entre la entalpía introducida en ambas regiones, respecto al índice de superenrollamiento Wr de la región no replicada y al número de encadenamientos Ca (pre-encadenamientos en este contexto) de la región ya replicada puso de manifiesto una

alta similitud entre ambas regiones. Por otro lado en la comparación entre las dos variaciones de entalpía (ΔH) el ajuste lineal de la correlación entre ambas energías presenta una pendiente con valor 1.1053, lo cual corresponde a una buena correspondencia 1 a 1 de las energías. Estos resultados dan la pauta de que existe equilibrio termodinámico bajo la condición de que el número de vueltas o cruces en la región no replicada debe ser similar al número de pre-encadenamientos en la región ya replicada. Cada cambio de una unidad en el Wr requiere un cambio en un cruce en la región no replicada y cada cambio en el Ca de la región ya replicada implica un cambio en dos cruces.

Los resultados de los experimentos con RIs purificados junto con las simulaciones computacionales confirman y aportan nuevas evidencias que apoyan la existencia de una coordinación entre superenrollamiento y pre-encadenamiento. Sabemos que, hacia el final de la replicación no existe espacio suficiente delante de la horquilla para que actúen las topoisomerasas. El avance de la horquilla incrementaría la densidad de $Wr(+)$ a medida que disminuye la longitud de la región no replicada. Por lo tanto, es de esperar que las topoisomerasas actúen por detrás de la horquilla (en la región ya replicada) eliminando pre-encadenados para facilitar la terminación del proceso replicativo. Por otro lado, se ha demostrado tanto en la presente obra como en otros estudios que la inhibición de las topoisomerasas de tipo II provoca la acumulación de moléculas encadenadas inhibiendo así la segregación cromosómica. También se ha comprobado que la procesividad de las helicasas generando $Wr(+)$ por delante de la horquilla replicativa era significativamente mayor que la de cualquier topoisomerasa eliminándolo [68]. Por lo tanto, es bastante improbable que estas enzimas permitan mantener una velocidad de elongación constante eliminando sólo $Wr(+)$ en la región no replicada. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de la existencia de un mecanismo que permite difundir el ΔLk de la región no replicada a la ya replicada. Si bien la presencia del replisoma en la frontera entre las regiones no replicada y ya replicada del RI limitaría la difusión del ΔLk . Se ha sugerido que podría funcionar como una barrera selectiva permitiendo sólo la difusión del $Wr(+)$, el cual se transforma en pre-encadenados $RH(+)$, que serían eliminados por la acción de la Topo IV.

Capítulo 7

Conclusión

En esta obra se utilizó un abordaje multidisciplinario con técnicas de biología molecular y simulaciones computacionales para entender mejor la función de las enzimas que controlan la topología del DNA durante la replicación de un plásmido bacteriano que tiene sus horquillas replicativas detenidas tras haber replicado el 60% de la molécula. El DNA aislado se trató *in vitro* con topoisomerasa IV y DNA girasa y su efecto se analizó mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Simulaciones computacionales basadas en el método de Metropolis Monte Carlo fueron realizadas para predecir la estabilidad termodinámica de estas moléculas.

De acuerdo con los resultados experimentales y de simulación computacional obtenidos nuestras conclusiones son las siguientes:

- 1- La Topo IV relaja completamente los RIs aislados de la estirpe DH5 α F', los cuales poseen cruces RH(-) en la región no replicada y LH(-) en la ya replicada.
- 2- La DNA Girasa relaja parcialmente a los RIs aislados de la estirpe DH5 α F', los cuales poseen cruces RH(-) en la región no replicada y LH(-) en la ya replicada.
- 3- La inhibición *in vivo* de la Topo IV provoca una acumulación de RIs con cruces RH(-) en la región no replicada y RH(+) en la ya replicada, los cuales son completamente relajados por la Topo IV pero no por la DNA Girasa.
- 4- La simulación computacional por el método de Metropolis Monte Carlo de la región no replicada demuestra que la misma adquiere la conformación plectonémica en su estado de equilibrio termodinámico. Se confirmó además que el Wr contribuye en un 75% al valor final del ΔLk .
- 5- La simulación computacional por el método de Metropolis Monte Carlo de la región ya replicada demuestra que aún en estado relajado ($\Delta Lk = 0$) las cadenas nacientes adquieren un índice de superenrollamiento Wr inducido debido al encadenamiento.

6- La simulación computacional de un RI, representando sus regiones no replicada y ya replicada por separado, confirma que bajo la condición de equilibrio termodinámico, el índice de superenrollamiento Wr y el número de pre-encadenamiento se mantienen con valores numéricos similares en todo momento.

ANEXO A

Anexo

A.1 Algoritmos de base

A.1.1 Un círculo cerrado

Un polígono regular con N segmentos es creado para utilizarlo como conformación inicial en el modelo *wormlike chain* que luego será modificado con perturbaciones mediante el método de Metropolis Monte Carlo.

Algorithm 1 PoligonoInicial

Require: N número de vertices o segmentos del poligono

Ensure: Vectores de coordenadas x, y, z de cada vertice del poligono regular de radio R .

t Vector de N valores equiespaciados entre 0 y 2π

for $i = 1$ hasta N **do**

$x(i) = R\cos[t(i)]$

$y(i) = R\sin[t(i)]$

end for

z es un vector de ceros de tamaño N .

return x, y, z

A.1.2 Un toroide

Se crea una curva toroidal para control de la función que calcula el índice de superenrollamiento y también para poder crear dos curvas encadenadas mediante dos toroides.

Algorithm 2 Curva toroidal

Require: N numero de segmentos del toroide**Ensure:** Vectores de coordenadas x, y, z de cada vertice del toroide de radio mayor R , radio menor r , y número de vueltas v . t Vector de N valores equiespaciados entre 0 y 2π **for** $i = 1$ hasta N **do**

$$x(i) = \cos[t(i)](R + r\cos(v * t(i)))$$

$$y(i) = \sin[t(i)](R + r\cos(v * t(i)))$$

$$z(i) = r\sin(v * t(i))$$

end for**return** x, y, z

A.1.3 Dos curvas encadenadas

Se crean dos toroides iguales pero desfasados para formar dos curvas cuyo número de encadenamiento coincide con el número de vueltas de los toroides. Estas curvas encadenadas son útiles también para controlar el desempeño de la función que calcula el Lk

Algorithm 3 Encadenados

Require: N número de segmentos de cada curva toroidal**Ensure:** Vectores de coordenadas x, y, z de un toroide, y x', y', z' de otro toroide, ambos de radio mayor R , radio menor r , y número de vueltas v . t Vector de N valores equiespaciados entre 0 y 2π φ : Desfasaje entre los dos toroides, necesario para que una curva no esté muy unida a la otra.**for** $i = 1$ hasta N **do**

$$x(i) = \cos[t(i)](R + r\cos(v * t(i)))$$

$$y(i) = \sin[t(i)](R + r\cos(v * t(i)))$$

$$z(i) = r\sin(v * t(i))$$

$$x'(i) = \cos[t(i) + \varphi](R + r\cos(v * t(i)))$$

$$y'(i) = \sin[t(i) + \varphi](R + r\cos(v * t(i)))$$

$$z'(i) = r\sin(v * t(i))$$

end for**return** x, y, z, x', y', z'

A.1.4 Linking number

El siguiente algoritmo calcula el índice de ligamiento Lk entre dos curvas.

Algorithm 4 Calculo del índice de ligamiento

Require: N número de segmentos de las curvasVectores de coordenadas x, y, z de una curva y los vectores de coordenadas x', y', z' de la otra**Ensure:** Linking number Lk entre las dos curvas $Lk = 0$ Inicializa a cero el valor de Lk **for** $i = 1$ hasta N **do** $b_i = [x(i+1) - x(i), y(i+1) - y(i), z(i+1) - z(i)]$ **for** $j = 1$ hasta N **do** $b_j = [x'(j+1) - x'(j), y'(j+1) - y'(j), z'(j+1) - z'(j)]$ $R_{ji} = [x'(j) - x(i), y'(j) - y(i), y'(j) - y(i)]$ $Mixto = Productovectorial_{Mixto}(b_i, b_j, R_{ji})$ $Lk = Lk + \frac{Mixto}{\|R_{ji}\|^{\frac{3}{2}}}$ **end for****end for** $Lk = -\frac{Lk}{4\pi}$ **return** Lk

A.1.5 Writhe

Este algoritmo calcula el índice de superenrollamiento de una curva.

Algorithm 5 Calculo del Writhe

Require: N número de segmentos de la curvaVector de coordenadas x, y, z de la curva**Ensure:** Writhe Wr de la curva $We = 0$ Inicializa a cero el valor de Wr **for** $i = 1$ hasta $N - 1$ **do** $b_i = [x(i+1) - x(i), y(i+1) - y(i), z(i+1) - z(i)]$ **for** $j = i + 1$ hasta N **do** $b_j = [x(j+1) - x(j), y(j+1) - y(j), z(j+1) - z(j)]$ $R_{ji} = [x(j) - x(i), y(j) - y(i), y(j) - y(i)]$ $Mixto = Productovectorial_{Mixto}(b_i, b_j, R_{ji})$ $Wr = Wr + \frac{Mixto}{\|R_{ji}\|^{\frac{3}{2}}}$ **end for****end for** $Wr = -\frac{Wr}{2\pi}$ **return** Wr

A.1.6 Diámetro efectivo

Este algoritmo verifica si dos puntos cualquiera de la curva C están a una distancia d mayor que el diámetro efectivo $d_{efectivo}$.

Algorithm 6 Verificación del diámetro efectivo

Require: N número de segmentos de la curva C

Vector de coordenadas x, y, z de la curva

Ensure: *FALSE* si no hay ninguna violación del $d_{efectivo}$, *TRUE* caso contrario.

$count = 0$ Inicializa a cero un contador

for $i = 1$ hasta $N - 1$ **do**

for $j = i + 1$ hasta N **do**

$d_{efectivo} = A(1 + (i - j - 1)^3 e^{(1-i+j)})$

$d = \|(x(i) - x(j)), (y(i) - y(j)), (z(i) - z(j))\|$

if $d \leq d_{efectivo}$ **then**

$count = count + 1$

end if

end for

end for

return $count$

A.2 Simulación del superenrollamiento

Algorithm 7 SuperCoiling

Require: Número de segmentos N de la curva, su ΔLk , cantidad $Iter$ de movimientos de prueba.

T : Temperatura absoluta; k_b : Constante de Boltzman; C : Constante de rigidez de torsión; a : Constante de rigidez de doblado; L : Longitud de la cadena en pb

$Min = \infty$ Inicializa la energía a un valor muy grande Min

$(x, y, z) = \text{PoligonoInicial}(N)$

for $l = 1$ hasta $Iter$ **do**

if $l = 1$ **then**

$x = X_{\text{aceptado}}, y = Y_{\text{aceptado}}, z = Z_{\text{aceptado}}$

end if

I, F : índices aleatorios entre 1 y N para una rotación rígida;

φ : ángulo aleatorio.

$\text{RotacionRigida}(x, y, z, I, F, \varphi)$: Rotación de los puntos entre I y F

$\text{DiametroEfectivo}(x, y, z, di - ef)$

$E_b = \text{EnergiaDoblado}(x, y, z)$: El valor de la energía de doblado de la conformación

$W_r = \text{Writhe}(x, y, z)$: Calcula el writhe de la curva

$E_t = \frac{2\pi^2}{L}(\Delta Lk - W_r)^2$: La energía de torsión de la conformación

$E = E_b + E_t$

$Prob = e^{-\frac{(E - Min)}{k_b T}}$

$\Delta = \text{PolinomioAlexander}(x, y, z)$: Verifica la topología de la conformación

if $\Delta \neq 1$ **then**

$E = \infty$

end if

if $E > Min$ **then**

if $Prob > \text{ProbabilidadMinimaAceptada}$ **then**

$Min = E$

end if

end if

if $E \leq Min$ **then**

$Min = E$

$X_{\text{aceptado}} = x, Y_{\text{aceptado}} = y, Z_{\text{aceptado}} = z,$

end if

end for

return $X_{\text{aceptado}}, Y_{\text{aceptado}}, Z_{\text{aceptado}}$

A.3 Simulación del encadenamiento

Algorithm 8 Encadenamiento: parte 1

Require: Número de segmentos N de cada curva, su Ca , y la cantidad $Iter$ de movimientos de prueba.

T : Temperatura absoluta; k_b : Constante de Boltzman; C : Constante de rigidez de torsión; a : Constante de rigidez de doblado; L : Longitud de cada cadena en pb

$Min = \infty$; $Min' = \infty$ Inicializa las energías a un valor muy grande Min

$(x, y, z, x', y', z') = \mathbf{Encadenado}(N)$

for $l = 1$ hasta $Iter$ **do**

if $l = 1$ **then**

$x = X_{aceptado}$, $y = Y_{aceptado}$, $z = Z_{aceptado}$; $x' = X'_{aceptado}$, $y' = Y'_{aceptado}$, $z' = Z'_{aceptado}$

end if

I, F, I', F' : índices aleatorios entre 1 y N para una rotación rígida

$\varphi; \varphi'$: ángulo aleatorio de rotación para una rotación rígida

$\mathbf{RotacionRigida}(x, y, z, I, F, \varphi)$: Hace la rotación rígida entre los puntos de la curva comprendido entre I y F

$\mathbf{RotacionRigida}(x', y', z', I', F', \varphi')$: Hace la rotación rígida entre los puntos de la curva comprendido entre I' y F'

$\mathbf{DiametroEfectivo}(x, y, z, di - ef)$: Asigna un valor alto de energía si encuentra dos puntos con distancia menor al diámetro efectivo di-ef

$\mathbf{DiametroEfectivo}(x', y', z', di - ef)$

$\mathbf{DiametroEfectivo2}(x, y, z, x', y', z', di - ef)$: Asigna un valor alto de energía si encuentra dos puntos entre ambas curvas con distancia menor al diámetro efectivo di-ef

$\mathbf{Eb} = \mathbf{EnergiaDoblado}(x, y, z)$: Devuelve el valor de la energía de doblado total de la conformación

$\mathbf{Eb}' = \mathbf{EnergiaDoblado}(x', y', z')$

$\mathbf{Wr} = \mathbf{Writhe}(x, y, z)$: Calcula el writhe de la curva

$\mathbf{Wr}' = \mathbf{Writhe}(x', y', z')$

$\mathbf{Et} = \frac{2\pi^2}{L} Wr^2$: La energía de torsión de la conformación

$\mathbf{Et}' = \frac{2\pi^2}{L} Wr'^2$

$\mathbf{E} = \mathbf{Eb} + \mathbf{Et}$

$\mathbf{E}' = \mathbf{Eb}' + \mathbf{Et}'$

end for

Algorithm 9 Encadenamiento: parte 2

```

for  $l = 1$  hasta  $Iteraciones$  do
   $Prob = e^{-\frac{(E - Min)}{k_b T}}$ 
   $\Delta = \text{PolinomioAlexander}(x, y, z)$  : Verifica el estado topológico de la confor-
  mación
  if  $\Delta \neq 1$  then
     $E = \infty$ 
  end if
   $Prob' = e^{-\frac{(E' - Min')}{k_b T}}$ 
   $\Delta' = \text{PolinomioAlexander}(x', y', z')$  : Verifica el estado topológico de la confor-
  mación
  if  $\Delta' \neq 1$  then
     $E' = \infty$ 
  end if
   $\text{VerificaEncadenamiento}(x, y, z, x', y', z')$  : Devuelve energías infinitas si las cur-
  vas tienen un encadenamiento distinto de  $Ca$ , si no, no hace nada.
  if  $E > Min$  then
    if  $Prob > \text{ProbabilidadMinimaAceptada}$  then
       $Min = E$ 
    end if
  end if
  if  $E \leq Min$  then
     $Min = E$ 
     $X_{aceptado} = x, Y_{aceptado} = y, Z_{aceptado} = z,$ 
  end if
  if  $E' > Min'$  then
    if  $Prob' > \text{ProbabilidadMinimaAceptada}$  then
       $Min' = E'$ 
    end if
  end if
  if  $E' \leq Min'$  then
     $Min' = E'$ 
     $X'_{aceptado} = x', Y'_{aceptado} = y', Z'_{aceptado} = z',$ 
  end if
end for
return  $X_{aceptado}, Y_{aceptado}, Z_{aceptado}, X'_{aceptado}, Y'_{aceptado}, Z'_{aceptado}$ 

```

A.4 Abstracts en congresos

A.4.1 Wilhelrn Bernhard Workshop 23th

University of Debrecen, Hungary
19th August 2013 – 23rd August 2013

D3. GEOMETRY AND PLASTICITY OF DNA DURING REPLICATION: THE BENEFIT OF DNA ENTANGLEMENTS

Jorge Cebrián¹, Víctor Martínez², María José Fernández², Christian Schaerer², Pablo Hernández¹, Dora B.Krimer¹, Jorge B. Schvartzman¹

¹*Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, España;*

²*Laboratorio de Computación Científica y Aplicada, FP-UNA, San Lorenzo, Paraguay*

During replication, DNA molecules undergo topological changes that affect supercoiling, catenation and knotting. To better understand this process and the role of topoisomerases, the enzymes that control DNA topology in vivo, two-dimensional agarose gel electrophoresis (2Dgels) and atomic force microscopy (AFM) were used to examine partially replicated bacterial plasmids containing replication forks stalled at specific sites. The results obtained and computer simulations based on Metropolis Monte Carlo helped us to predict the thermodynamic stability of these molecules and to determine the potential energy that can be stored in the replicated and unreplicated regions.

Altogether, these observations strongly suggest that type II DNA topoisomerases recognize the geometry (sign and handedness) of DNA duplex crossings. This geometry changes continuously during replication and in partially replicated molecules differs also between the replicated and non-replicated regions. In addition, the data obtained revealed that DNA entanglements (supercoils and catenanes) play an active role in preventing the formation of deleterious knots.

A.4.2 XXXVI Congreso SEBBM

30/09/13

Libro de Resúmenes online

[Buscador de comunicaciones aceptadas]

XXXVI Congreso SEBBM

Madrid, 4-6 de septiembre de 2013

Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular

P16r-16

Role of type II DNA topoisomerases in the regulation of supercoiling and precatenation of DNA replication intermediates

Jorge Cebrián¹, Víctor Martínez², María José Fernández-Nestosa², Christian Schaerer²,

Pablo Hernández¹, Dora B. Krimer¹, Jorge B. Schwartzman¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, ES, ²Laboratorio de Computación Científica y Aplicada, FP-UNA, San Lorenzo, PY

During replication, DNA molecules undergo topological changes that affect supercoiling, catenation and knotting. To better understand the function of these enzymes that control the topology of DNA during replication, two-dimensional agarose gel electrophoresis (2Dgels) was used to examine a bacterial plasmid containing the replication fork stalled after replication of ~60 percent of the molecule. The DNA was isolated from a Topoisomerase IV (Topo IV) proficient or deficient *E. coli* strain and then treated *in vitro* with two type II DNA topoisomerases: Topo IV and DNA gyrase.

Our results confirmed that Topo IV recognizes and efficiently eliminates precatenanes and catenanes.

However, when we exposed replication intermediates (RIs) *in vitro* to DNA gyrase -which is known to introduce right-handed crosses in covalently closed domains (CCCs) both *in vivo* and *in vitro*- the RIs showed less precatenanes than in undigested conditions only for RIs isolated from Topo IV proficient cells. In addition, the effects of these enzymes on the topology of RIs in the presence of an intercalating agent and computer simulations based on Metropolis Monte Carlo helped us to predict the thermodynamic stability of these molecules and to determine the potential energy that can be stored in the replicated as well as in the non-replicated regions.

The results obtained indicated that type II DNA topoisomerases recognize the geometry (sign and handedness) of the crossings and this geometry changes continuously during DNA replication and differs also between the replicated and non-replicated regions.

A.4.3 Banff International Research Station



ENTANGLEMENTS IN BIOLOGY; HOW NATURE CONTROLS THE TOPOLOGY OF PROTEINS AND DNA

DNA dynamics during replication: the benefit of entanglement

Jorge Cebrián¹, Víctor Martínez², María José Fernández², Christian Schaerer², Pablo Hernández¹, Dora B. Krimer¹, Jorge B. Schwartzman¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, España

² Laboratorio de Computación Científica y Aplicada, FP-UNA, San Lorenzo, Paraguay

During replication, DNA molecules undergo topological changes that affect supercoiling, catenation and knotting. To better understand this process and the role of topoisomerases, the enzymes that control DNA topology *in vivo*, high resolution two-dimensional agarose gel electrophoresis (2Dgels) and atomic force microscopy (AFM) were used to examine partially replicated bacterial plasmids containing replication forks stalled at specific sites. The exposure of these replication intermediates (RIs) isolated from *Escherichia coli* mutant cells proficient or deficient for Topo IV to various topoisomerases *in vitro* generated surprising observations. The results obtained together with computer simulations based on Metropolis Monte Carlo helped us to predict the thermodynamic stability of the molecules and to determine the potential energy that can be stored in the replicated and unreplicated regions. Altogether, these observations strongly suggest that type II DNA topoisomerases recognize the geometry of DNA duplex crossings, probably throughout their interaction with other proteins. The geometry of the crosses differs between the unreplicated and replicated regions, changes continuously as replication forks advance and is dramatically altered by deproteinization.

Comunicación oral: <http://www.birs.ca/events/2013/5-day-workshops/13w5133/videos>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Jorge B. Schwartzman and Andrzej Stasiak. A topological view of replicon. *EMBO reports*, 5(3):256–261, 2004.
- [2] Pablo Hernández Jorge B. Schwartzman Andrzej Stasiak María Luisa Martínez-Robles, Dora B. Krimer and Dora B. Krimer. The benefit of dna supercoiling during replication. *Biochem. Soc. Trans*, 41:8219–8226, 2013.
- [3] Pablo Hernández Jorge B. Schwartzman Andrzej Stasiak María Luisa Martínez-Robles, Guillaume Witz and Dora B. Krimer. Interplay of dna supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Research*, 37(15):5126–5137, 2009.
- [4] Alexander V. Vologodskii. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled dna. *J. Mol. Biol.*, 227(15):1224–1243, 1992.
- [5] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, (161):737–738, 1953.
- [6] Andrew D Bates and Anthony Maxwell. *DNA Topology*. Oxford Biocience, Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP, 2005.
- [7] Bruce Alberts and Denis Bray. *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, 2010.
- [8] J. Cairns. The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J Mol Biol*, (6):208–213, 1963.
- [9] A. Worcel and E. Burgi. The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J Mol Biol*, 71:127–147, 1972.
- [10] Lebowitz J. Radloff R. Watson R. Vinograd, J. and P. Laipis. Twisted circular form of polyoma viral dna. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 53:1104–1111, 1965.

- [11] N. R. Cozzarelli. Dna gyrase and the supercoiling of dna. *Cience*, 207:1104–1111, 1980.
- [12] J. C. Wang. Interaction between dna and an escherichia coli protein ω . *J Mol Biol*, 55:523–533, 1971.
- [13] J. C. Wang. Cellular roles of dna topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3:430–440, 2002.
- [14] Calugareanu G. L'intégral de gauss et l'analyse des noeuds tridimensionnels. *Czechoslovak Math J*, 11:588–625, 1959.
- [15] Konstantin Klenin and Jörg Langowski. Computation of writhe in modeling of supercoiled dna. *Division Biophysics of Macromolecules, German Cancer Research Center*, 3:430–440, 2000.
- [16] Bruce H. Edwards Roland E. Larson, Robert Paul Hostetler. *Cálculo II*. Mc Graw Hill, 2006.
- [17] M. R. Dennis and J. H. Hannay. Geometry of calugareanu's theorem. 2005. URL <http://arxiv.org/abs/math-ph/0503012v2>.
- [18] Mitchell A Berger and Chris Prior. The writhe of open and closed curves. *UCL Mathematics Dept. J. Phys. A*, 39:8321–8348, 2006.
- [19] Crick F. H. C. Bauer, W. R. and J. H. Wihte. Supercoiled dna. *Sci Am*, 243: 100–118, 1980.
- [20] M. P. Marsden and U. K. Laemmli. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell*, 17:849–858, 1979.
- [21] M. Gellert. Dna topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 50:879–910, 1981.
- [22] H. P. Vosberg. Dna topoisomerases: enzymes that control dna conformation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 114:19–102, 1985.
- [23] J. C. Wang. Dna topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 54:665–697, 1985.
- [24] J. C. Wang. Recent studies of dna topoisomerases. *Biochim Biophys Acta*, 909: 1–9, 1987.
- [25] Snyder L. Giaever, G. N. and J. C. Wang. Dna supercoiling in vivo. *Biophys Chem*, 29:7–15, 1988.
- [26] G. N. Giaever and J. C. Wang. Supercoiling of intracelular dna can occur in eukaryotic cells. *Cell*, 55:849–856, 1988.

- [27] Duquet M. Mirambeau, G. and P. Forterre. Atp-dependent dna topoisomerase from the archaeobacterium *sulfolobus acidocaldarius*. relaxation of supercoiled dna at high temperature. *J Mol Biol*, 179:559–563, 1984.
- [28] White J.H. Boles, T.C. and N.R. Cozzarelli. Structure of plectonemically supercoiled dna. *J Mol Biol*, 213:931–951, 1990.
- [29] J. C. Wang. Dna topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 65:635–692, 1996.
- [30] P.O. Brown and N.R. Cozzarelli. Catenation and knotting of duplex dna by type i topoisomerases: a mechanistic parallel with type ii topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:843–847, 1981.
- [31] Krasnow M. A. Otter R. Matzuk M. M. Spengler S. J. Dean, F. and N. R. Cozzarelli. *Escherichia coli* type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 47:769–777, 1983.
- [32] Goto T. Wang J. C. Holm, C. and Botstein. Dna topoisomerase ii is required at the time of mitosis in yeast. *Cell*, 41:553–563, 1985.
- [33] DiGate R. J. Harmon, F.G. and S. C Kowalczykowski. Recq helicase and topoisomerase iii comprise a novel dna strand passage function: a conserved mechanism for control of dna recombination. *Mol Cell*, 3:611–620, 1999.
- [34] R. A. Kim and J. C. Wang. Identification of the yeast top3 gene product as a single strand-specific dna topoisomerase. *J Mol Biol*, 3:559–563, 1992.
- [35] Mizuuchi K. O’Dea M. H. Gellert, M. and H. A. Nash. Dna gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into dna. *PNAS*, 73:3872–3876, 1976.
- [36] Berger J. M. Harrison S. C. Roca, J. and J. C. Wang. Dna transport by a type ii topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:4057–4062, 1996.
- [37] W. M. Huang. Bacterial diversity based on type ii dna topoisomerase genes. *Annu Rev Genet*, 30:79–107, 1996.
- [38] W. M. Huang. Type ii dna topoisomerase genes. *Ad Pharmacol*, 1994.
- [39] Nishimura Y. Imamura R. . Hiraga S. Kato, J. and H. Suzuki. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *e. coli*. *Cell*, 63:393–404, 1990.
- [40] Nishimura Y. Yam M. H. Suzuki H. Kato, J. and S. Hiraga. Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *e. coli*. *J Bacteriol*, 170:3967–3977, 1988.

- [41] Shekhtman E. M. Zechiedrich L. E. Schmid M. B. Adams, D. E. and N. R. Cozzarelli. The role of topoisomerase iv in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in dna replication. *Cell*, 71:277–288, 1992.
- [42] E. L. Zechiedrich and N. R. Cozzarelli. Roles of topoisomerase iv and dna gyrase in dna unlinking during replication in escherichia coli. *Genes and Dev*, 9:2859–2869, 1995.
- [43] Khodursky A. B. Zechiedrich, E. L. and N. R. Cozzarelli. Topoisomerase iv, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in escherichia coli. *Genes and Dev*, 11:2580–2592, 1997.
- [44] Rahmati S. Deibler, R. W. and E. L. Zechiedrich. Topoisomerase iv alone unknots dna in e. coli. *Genes and Dev*, 15:748–761, 2001.
- [45] Voelkel K. DiNardo, S. and R. Sternglanz. Dna topoisomerase ii mutant of saccharomyces cerevisiae: topoisomerase ii is required for segregation of daughter molecules at the termination of dna replication. *PNAS*, 81:2616–2620, 1984.
- [46] Goto T. Wang J. C. Holm, C. and D. Botstein. Dna topoisomerase ii is required at the time of mitosis in yeast. *Cell*, 41:553–563, 1985.
- [47] Hajduk S. L. Englund, P. T. and J. C. Marini. The molecular biology of trypanosomes. *Annu Rev Biochem*, 51:695–726, 1982.
- [48] O. Sundin and A. Varshavsky. Terminal stages of sv40 dna replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell*, 21:103–114, 1980.
- [49] O. Sundin and A. Varshavsky. Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers: dissection of the final stages of sv40 dna replication. *Cell*, 25:659–669, 1981.
- [50] Shekhtman E. M. Zechiedrich L. E. Schmid M. B. Adams, D. E. and N. R. Cozzarelli. The role of topoisomerase iv in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in dna replication. *Cell*, (71):277–288, 1992.
- [51] Russell J. DiGateg Hiroshi HiasaS and Kenneth J. Marian. Decatenating activity of escherichia coli dna gyrase and topoisomerases i and iii during oric and pbr322 dna replication in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(3):2093–2099, January 1984.
- [52] Marians KJ Levine C, Hiasa H. Dna gyrase and topoisomerase iv: Biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *BBA Gene Struct Express*, pages 29–43, 1998.

- [53] Germe T. Chevrier-Miller M. Lucas, I. and O. Hyrien. Topoisomerase ii can unlink replicating dna by precatenane removal. *EMBO*, 20:6509–6519, 2001.
- [54] J. Portugal and A. Rodriguez-Campos. T7 rna polymerase cannot transcribe through a highly knotted dna template. *Nucleic Acid Res*, 24:4890–4894, 1996.
- [55] Mann J. K. Summers D. W. L. Deibler, R. W. and E. L. Zechiedrich. Hin-mediated dna knotting and recombining promote replicon dysfunction and mutation. *BMC Mol Biol*, 44(8), 2007.
- [56] Martínez-Robles M.L. Sogo J.M. Stasiak A. Hernández P. Krimer D.B. Olavarrieta, L. and J.B. Schwartzman. Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. *Nucleic Acid Res*, 30(8):656–666, 2002.
- [57] Stasiak A. Koller T. Dean, F. B. and N. R. Cozzarelli. Duplex dna knots produced by escherichia coli topoisomerase i. *J Biol Chem*, 260:4975–4983, 1985.
- [58] F. B. Dean and N. R. Cozzarelli. Mechanism of strand passage by escherichia coli topoisomerase i. *J Biol Chem*, 260:4984–4994, 1985.
- [59] Hernández P. Krimer D. B. Boistov A. Lurz R. Alonso J. C. Viguera, E. and J. B. Schwartzman. The cole1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J Biol Chem*, 271:22414–22421, 1996.
- [60] Stasiak A. Martínez-Robles M. L. Krimer D. B. Hernández P. Sogo, J. M. and J. B. Schwartzman. Formation of knots in partially replicated molecules. *J Biol Chem*, 286:637–643, 1999.
- [61] Viguera E. Martínez-Robles-M. L. Hyrien O. Hernández P. Krimer D. B. Santamaría, D. and J. B. Schwartzman. Bi-directional replication and random termination. *Nucleic Acid Res*, 28:2099–2107, 2000.
- [62] Hernández P. Martínez-Robles-M. L. Krimer D. B. Santamaría, D. and J. B. Schwartzman. Premature termination of dna replication in plasmids carrying two inversely oriented cole1 origins. *J Mol Biol*, 300:75–82, 2000.
- [63] Hernández P. Krimer-D.B. Olavarrieta, L. and J.B. Schwartzman. Dna knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J Mol Biol*, 322:1–6, 2002.
- [64] David Bensimon Vincent Croquette Nancy J. Crisona, Terence R. Strick and Nicholas R. Cozzarelli.
- [65] A. Kornberg and T Baker. Dna replication. *New York: W. H. Freeman and Co.*, 1992.

- [66] Marians KJ. Prokaryotic dna replication. *Annu Rev Biochem*, 61:673–719, 1992.
- [67] Hiroshi Hiasa Kenneth J. Marians Brian J. Peter, Chris Ullsperger and Nicholas R. Cozzarelli. The structure of supercoiled intermediates in dna replication. *Cell*, 94: 819–827, 1998.
- [68] Champoux JJ. Been MD. Pbreakage of single-stranded dna by rat liver nicking-closing enzyme with the formation of a dna-enzyme complex. *Nucleic Acids Res*, 8:676129–676142, Dec 1980.
- [69] Russell J. DiGateg Hiroshi HiasaS and Kenneth J. Marian. Decatenating activity of escherichia coli dna gyrase and topoisomerases i and iii during oriC and pbr322 dna replication in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(3):93–2099, 1994.
- [70] Peter BJ Hardy CD Cozzarelli NR Postow L, Crisona NJ. Topological challenges to dna replication: Conformations at the fork. *Proc Natl Acad Sci*, 98(3):8219–8226, 2001.
- [71] Croquette V. Charvin G, Bensimon D. Single-molecule study of dna unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-ii topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci*, 100(17): 9820–9825, April 2003.
- [72] L. Bell and B. Byers. Separation of branched from linear dna by two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 130(17):527–535, 1983.
- [73] Fangman WL Brewer BJ. The localization of replication origins on ars plasmids in *S. cerevisiae*. *PubMed*, 51(3):463–471, Nov 1987.
- [74] Carl L. Schildkraut Toni A. Gahn. The epstein-barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of dna replication. *Cell*, 58(3):527–535, August 1989.
- [75] Martín-s L Schildkraut CL. Schwartzman JB, Adolph S. Evidence that replication initiates at only some of the potential origins in each oligomeric form of bovine papillomavirus type i dna. *Mol Cell Biol*, 10(6):3078–3086, Jun 1990.
- [76] Foster TJ Vaughan L, Smith P. Aromatic-dependent mutants of *Acromonas salmonicida*. *Microbiol*, 141:941–943, 1990.
- [77] Martínez-Robles ML Schwartzman JB. Martín-Parras L, Hernández P. Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 220(4), August 1991.

- [78] Fangman WL. Brewer BJ. A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal rna genes. *Cell*, 55(4):637–643, Nov 1988.
- [79] M.H.K. Linskens and J.A. Huberman. Organization of replication of ribosomal dna in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 8:4927–4935, 1988.
- [80] Theo Koller Barbara Wiesendanger, Renzo Lucchini and José M. Sogo. Replication fork barriers in the *xenopus* rdna. *Nucleic Acids Reseach*, 22(23):38–5046, 1994.
- [81] Martínez-Robles ML Schwartzman JB. Martín-Parras L, Hernández P. Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 220(4):843–853, August 1991.
- [82] Joaquim Roca Ryo Hanai. Two-dimensional agarose-gel electrophoresis of dna topoisomers. 94:19–27, Mar 1999.
- [83] Krimer DB-Boistov AS Lurz R Alonso JC Schwartzman JB. Viguera E, Hernández P. The *cole1* unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J Biol Chem*, 271(37):22414–22421, Sep 1996.
- [84] Martínez-Robles ML Krimer DB Hernández P Schwartzman JB. Sogo JM, Stasiak A. Formation of knots in partially replicated dna molecules. *J Biol Chem*, 286(3):637–643, Fep 1999.
- [85] Martínez-Robles ML Hernández P Krimer DB Hyrien O Schwartzman JB. Martín-Parras L, Lucas I. Topological complexity of different populations of pbr322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 26(14):3424–3432, Jul 1998.
- [86] Krimer DB Stasiak A Schwartzman JB. Fierro-Fernández M, Hernández P. Topological locking restrains replication fork reversal. *Proc Natl Acad Sci*, 104(5):1500–1505, Jan 2007.
- [87] Rosenbluth M. Teller A. Metropolis N., Rosenbluth A. Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Phisycs*, 21(6):1500–1505, 1953.
- [88] Anshelevich V.V. Lukashin A.V. Vologodskii, A.V. and M.D. Frank-Kamenetskii. Statistical-mechanics of supercoils and the torsional stiffness of the dna double helix. *Nature*, 280:294–298, 1979.
- [89] M. Le Bret. Monte carlo computation of the supercoiling energy, the sedimentation constant and the radius of gyration of unknotted and knotted circular dna. *Biopolymers*, page 619–637, 1980.

- [90] Levene S.D. Klenin K.V. Frank-Kamenetskii M. Vologodskii, A.V. and N.R. Cozzarelli. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled dna. *J. Mol. Biol.*, 227:1224–1243, 1992.
- [91] Lukashin A. V.-Anshelevich V. V. Vologodskii A. V. Frank-Kamenetskii, M. D. Torsional and bending rigidity of the double helix from data on small dna rings. *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 2:1005–1012, 1985.
- [92] J.W. Alexander. Topological invariants of knots and links. *Transactions of the American Mathematical Society*, 30(2), 1928.
- [93] José Luis Movilla Fernando Rajadell. *Termodinámica química*. Universitat Jaume, Av de Vicent Sos Baynat, s/n, 12071 Castelló de la Plana, Castellón, España, 2008.
- [94] Nishimura Y. Imamura R. -Hiraga S. Kato, J. and H. Suzuki. New topoisomerase essential for chromosome segregation in e. coli. *Cell*, 63:393–404, 1990.
- [95] D. Bensimon K. C. Neuman, G. Charvin and V. Croquette. Mechanisms of chiral discrimination by topoisomerase iv. *PNAS*, 106(17):6986–6991, 2009.
- [96] Nancy J. Crisona Steven B. Smith Alexander Vologodskii Carlos Bustamante Michael D. Stone, Zev Bryant and Nicholas R. Cozzarelli. Chirality sensing by escherichia coli topoisomerase iv and the mechanism of type ii topoisomerases. *PNAS*, 100(15):8654–8659, July 2003.
- [97] Nancy J. Crisona Steven B. Smith Alexander Vologodskii Carlos Bustamante Michael D. Stone, Zev Bryant and Nicholas R. Cozzarelli. Chirality sensing by escherichia coli topoisomerase iv and the mechanism of type ii topoisomerases. *PNAS*, 100(15):8654–8659, July 2003.
- [98] Ryo Hayamaa and Kenneth J. Mariani. Physical and functional interaction between the condensin mukb and the decatenase topoisomerase iv in escherichia coli. *PNAS*, 107(44):18826–18831, Nov 2010.
- [99] Mehmet E. Karasu Ryo Hayama, Soon Bahng and Kenneth J. Mariani. The mukb-parc interaction affects the intramolecular, not intermolecular, activities of topoisomerase iv. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), Mar 2013.
- [100] Schoeffler A. J. Berger J. M. Li, Y. and M. G. Oakley. The crystal structure of the hinge domain of the escherichia coli structural maintenance of chromosomes protein mukb. *J. Mol. Biol.*, 395:11–19, 2010.
- [101] Vologodskii A. V. Monte carlo analysis of the conformation of dna catenanes. *J. Mol. Biol.*, 232:1130–1140, 1993.