

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Dinámica de la topología del DNA durante la replicación

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alicia Castán García

Director

Jorge Bernardo Schwartzman Blinder

Madrid, 2018



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

DINÁMICA DE LA TOPOLOGÍA DEL DNA DURANTE LA REPLICACIÓN

Alicia Castán García

Director: Dr. Jorge Bernardo Schvartzman Blinder

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

DINÁMICA DE LA TOPOLOGÍA DEL DNA DURANTE LA REPLICACIÓN

Memoria presentada por Alicia Castán García,
para optar al grado de Doctor

Director de Tesis:
Dr. Jorge Bernardo Schwartzman Blinder

Madrid, 2017

La presente Tesis Doctoral titulada “Dinámica de la topología del DNA durante la replicación” ha sido realizada por Alicia Castán García, bajo la dirección del Dr. Jorge Bernardo Schwartzman Blinder, en el Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC), con la financiación concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad a través de los proyectos BFU2011-22489 y BFU2014-56835.

Opta al grado de Doctor

Alicia Castán García

Vº Bº del Director de la Tesis

Vº Bº del Tutor de la Tesis

Dr. Jorge Bernardo Schwartzman Blinder

Dra. Mª Belén Yélamos López

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN / SUMMARY.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Topología del DNA	13
1.2 Propiedades topológicas del DNA	14
1.2.1 Superenrollamiento.....	14
1.2.2 Encadenamiento.....	16
1.2.3 Anudamiento	18
1.3 DNA topoisomerasas.....	18
1.3.1 DNA topoisomerasas de tipo I	19
1.3.2 DNA topoisomerasas de tipo II	20
1.4 Topología de los intermediarios de replicación (RIs) de plásmidos bacterianos ...	22
1.5 Organización y estructura del DNA en eucariotas	25
1.5.1 DNA ribosómico y barreras para las horquillas de replicación	26
1.5.2 Cromosomas artificiales de levaduras (YACs).....	28
1.5.3 Minicromosomas derivados de genomas víricos.....	29
1.6 Replicación del DNA.....	31
1.7 Métodos de análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas	34
1.7.1 Electroforesis bidimensional en geles de agarosa	35
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1 Material biológico y medios de cultivo	47
3.1.1 Bacterias	47
3.1.2 Levaduras.....	47
3.1.3 Células humanas.....	49
3.2 Plásmidos y minicromosomas	50
3.2.1 Plásmidos bacterianos	50

3.2.2	Minicromosomas artificiales de <i>S. cerevisiae</i>	52
3.2.3	Minicromosomas derivados de genomas víricos.....	56
3.3	Transformación celular	59
3.4	Extracción del DNA	59
3.4.1	Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	59
3.4.2	Extracción de DNA plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	60
3.4.3	Extracción de DNA plasmídico de HEK293.....	61
3.5	Digestiones enzimáticas	61
3.6	Análisis del DNA.....	61
3.6.1	Electroforesis en geles de agarosa	61
3.6.2	Transferencia del DNA a soporte sólidos.....	63
3.6.3	Hibridación de ácidos nucleicos con sondas no radiactivas	63
3.6.4	Densitometrías	64
3.7	Extracción y análisis de proteínas.....	64
4.	RESULTADOS	67
4.1	Estudio de la dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos.....	69
4.1.1	Análisis de los RIs de plásmidos bacterianos aislados de células DH5 α F' y ParE10 69	
4.1.2	Análisis de los RIs de plásmidos bacterianos aislados de células DH5 α F' y ParE10 en presencia de Chl durante la segunda dimensión	72
4.1.3	Comparación de los RIs anudados de plásmidos bacterianos aislados de células DH5 α F' y ParE10.....	75
4.2	Estudio del rDNA en <i>S. cerevisiae</i>	78
4.2.1	Análisis del número de barreras presentes en el rDNA y estudio de su estabilidad 78	
4.2.2	Análisis de la eficiencia de las rRFBs de <i>S. cerevisiae</i> y su modulación mediante la sobreexpresión de la proteína Fob1.....	85
4.3	Estudio de los cambios topológicos del DNA derivados de la unión de las proteínas iniciadoras de la replicación	89

5. DISCUSIÓN	97
5.1 Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos	99
5.1.1 Anudamiento de las cromátidas hermanas durante el proceso de replicación .	106
5.2 Estudio del número de barreras presentes en el rDNA y su estabilidad	107
5.2.1 Eficiencia de las rRFBs y su modulación mediante la sobreexpresión de la proteína Fob1	109
5.3 Iniciación de la replicación del DNA	111
5.4 Cómo enmarcar la presente Tesis Doctoral en el contexto teórico actual de la replicación y perspectivas futuras.	115
6. CONCLUSIONES	119
7. BIBLIOGRAFÍA	123
8. PUBLICACIONES	153

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS DISTINTAS FORMAS QUE PUEDE ADOPTAR UNA MOLÉCULA DE DNA CIRCULAR.	16
FIGURA 2. TIPOS DE ENCADENADOS DE DNA.	17
FIGURA 3. ESQUEMA DE UN CCRI.	24
FIGURA 4. FIBRA DE CROMATINA.	25
FIGURA 5. ESQUEMA DE LA ORGANIZACIÓN DEL rDNA EN <i>S. CEREVISIAE</i>	28
FIGURA 6. MODELO DE GENERACIÓN DE SUPERENROLLAMIENTO (+) POR DELANTE DEL REPLISOMA Y RELAJACIÓN DEL MISMO DURANTE EL PROCESO DE ELONGACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL DNA... ..	33
FIGURA 7. ESQUEMAS DE LOS PATRONES DE HIBRIDACIÓN GENERADOS POR TOPOISÓMEROS DE MOLÉCULAS CIRCULARES DE DNA INTACTAS (A) Y POR RIS LINEALES (B) AL ANALIZARLOS POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.	38
FIGURA 8. MAPA DEL PLÁSMIDO pBR-TerE@STYI.....	51
FIGURA 9. MAPA DEL PLÁSMIDO pBR-TerE@AATII.....	51
FIGURA 10. MAPA DEL PLÁSMIDO pBR-TerE@DRAI.....	52
FIGURA 11. MAPA DEL MINICROMOSOMA pYAC_MEM.	53
FIGURA 12. MAPA DEL MINICROMOSOMA pYAC_MEM_RFB+.....	54
FIGURA 13. MAPA DEL MINICROMOSOMA pYAC_AC_3'rRFBs+..	55
FIGURA 14. MAPA DEL MINICROMOSOMA pYAC_AC_10rRFBs+.....	56
FIGURA 15. MAPA DEL MINICROMOSOMA pEco3'Δ.....	57
FIGURA 16. MAPA DEL MINICROMOSOMA pAC_SV40ORI.....	57
FIGURA 17. MAPA DEL MINICROMOSOMA pAC_EBVORI.P.	58
FIGURA 18. INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LOS GELES BIDIMENSIONALES DE LAS FORMAS INTACTAS DE LOS PLÁSMIDOS pBR-TerE@STYI, pBR-TerE@AATII Y pBR-TerE@DRAI AISLADOS DE LAS ESTIRPES DH5αF' Y PARE10 DE <i>E. COLI</i>	71

- FIGURA 19.** INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LOS GELES BIDIMENSIONALES DE LAS FORMAS INTACTAS DE LOS PLÁSMIDOS pBR-TerE@STyI, pBR-TerE@AATII Y pBR-TerE@DraI AISLADOS DE LAS ESTIRPES DH5 α F' Y PARE10 DE E. COLI EN LOS QUE LA SEGUNDA DIMENSIÓN SE DESARROLLÓ EN PRESENCIA DE 5 μ G/ML DE CHL..... **74**
- FIGURA 20.** ANÁLISIS DE LOS RIS DE LOS PLÁSMIDOS pBR-TerE@STyI, pBR-TerE@AATII Y pBR-TerE@DraI AISLADOS DE CÉLULAS DH5 α F' Y DIGERIDOS CON LA ENZIMA ALwNI. **76**
- FIGURA 21.** ANÁLISIS DE LOS RIS DE LOS PLÁSMIDOS pBR-TerE@STyI, pBR-TerE@AATII Y pBR-TerE@DraI AISLADOS DE CÉLULAS PARE10 Y DIGERIDOS CON LA ENZIMA ALwNI. **77**
- FIGURA 22.** INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LOS GELES BIDIMENSIONALES DE LAS FORMAS DIGERIDAS DEL MINICROMOSOMA pYAC_MEM..... **79**
- FIGURA 23.** INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LOS GELES BIDIMENSIONALES DE LAS FORMAS DIGERIDAS DEL MINICROMOSOMA pYAC_MEM_3RRFBs+ Y PERFIL DENSITOMÉTRICO DEL FRAGMENTO SwaI-BAMHI..... **82**
- FIGURA 24.** INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LOS GELES BIDIMENSIONALES DE LAS FORMAS DIGERIDAS DEL MINICROMOSOMA pYAC_AC_3'RRFBs+. **83**
- FIGURA 25.** PERFILES DENSITOMÉTRICOS DE LOS FRAGMENTOS SwaI-BAMHI DE LOS MINICROMOSOMAS pYAC_MEM_3RRFBs+ Y pYAC_AC_3'RRFBs+. **84**
- FIGURA 26.** INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LOS GELES BIDIMENSIONALES DE LAS FORMAS DIGERIDAS DEL MINICROMOSOMA pYAC_AC_10RRFBs+. **86**
- FIGURA 27.** INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LOS GELES BIDIMENSIONALES DE LAS FORMAS DIGERIDAS DEL MINICROMOSOMA pYAC_AC_10RRFBs+ EXTRAÍDO DE CÉLULAS GAL-3HA-FOB1 DONDE LA PROTEÍNA FOB1 ESTÁ SOBREEXPRESADA Y WESTERN BLOT DE LA EXPRESIÓN DE FOB1. **87**
- FIGURA 28.** PERFILES DENSITOMÉTRICOS DE LOS FRAGMENTOS SwaI-BAMHI DEL MINICROMOSOMA pYAC_AC_10RRFBs+ EXTRAÍDO DE CÉLULAS TOP2-TD O GAL-3HA-FOB1, DONDE LA PROTEÍNA FOB1 ESTÁ SOBREEXPRESADA. **88**
- FIGURA 29.** INMUNODETECCIÓN CORRESPONDIENTE AL GEL BIDIMENSIONAL DE FORMAS DIGERIDAS DEL MINICROMOSOMA pYAC_AC_10RRFBs+ EXTRAÍDO DE CÉLULAS BY4741. **89**
- FIGURA 30.** INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LOS GELES BIDIMENSIONALES DE LAS FORMAS INTACTAS DE LOS PLÁSMIDOS pAC_EBVORIP Y pAC_SV40ORI AISLADO DE LA ESTIRPE DH5 α F' DE E. COLI. **90**
- FIGURA 31.** INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LAS FORMAS INTACTAS DE LOS MINICROMOSOMAS pAC_SV40ORI Y pAC_EBVORIP ANALIZADOS MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GELES DE AGAROSA DONDE LA PRIMERA DIMENSIÓN OCURRIÓ EN AUSENCIA O PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CHL. **91**

FIGURA 32. HISTOGRAMA DE LA EFICIENCIA QUE PRESENTAN DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CHL INTRODUCIENDO SUPERENROLLAMIENTO (+) EN LOS MINICROMOSOMAS PAC_SV40ORI Y PAC_EBVORIP.	92
FIGURA 33. INMUNODETECCIONES CORRESPONDIENTES A LAS FORMAS INTACTAS DEL MINICROMOSOMA PECO3'Δ AISLADO DE CÉLULAS HEK293T EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE EBNA1, ANALIZADO MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL EN GELES DE AGAROSA Y SUS CORRESPONDIENTES WESTERN BLOTS.	94
FIGURA 34. ESQUEMA DE LOS INTERMEDIARIOS DE REPLICACIÓN, ILUSTRANDO EL GRADO Y DISTRIBUCIÓN DE LA TORSIÓN ESPERABLES TANTO EN LA REGIÓN NO REPLICADA COMO EN LA YA REPLICADA AISLADOS DE DOS ESTIRPES DISTINTAS DE E. COLI (UNA PROFICIENTE Y OTRA DEFICIENTE EN TOPO IV), CONSIDERANDO QUE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN PUEDEN GIRAR IN VIVO.	102
FIGURA 35. ESQUEMA DE LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS EN EL GRADO Y DISTRIBUCIÓN DE LA TORSIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pBR-TerE@STYI, pBR-TerE@AATII Y pBR-TerE@DRAI AISLADOS DE LAS CÉLULAS DH5αF' (TOPO IV ACTIVA) O PARE10 (TOPO IV INACTIVA).	105
FIGURA 36. MODELO ESQUEMÁTICO DE LA INTERACCIÓN, EN DOS PASOS INDEPENDIENTES, DE EBNA1 CON LA DS Y LA FR DEL ORIP.	114

ABREVIATURAS

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas, en la presente Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes abreviaturas:

ARS	Secuencia de replicación autónoma de <i>S. cerevisiae</i> (<i>Autonomous Replication Sequence</i>)
ATP	Adenosín trifosfato (<i>Adenosine TriPhosphate</i>)
Ca	Número de encadenamiento (<i>Catenation number</i>)
CatA	Encadenado de tipo A (<i>Type A catenate</i>)
CatB	Encadenado de tipo B (<i>Type B catenate</i>)
CatC	Encadenado de tipo C (<i>Type C catenate</i>)
CCC	Molécula circular covalentemente cerrada (<i>Covalently Closed Circle</i>)
CCCm	Monómero circular covalentemente cerrado (<i>Monomeric Covalently Closed Circle</i>)
CCCd	Dímero circular covalentemente cerrado (<i>Dimeric Covalently Closed Circle</i>)
CCRI	Intermediario de replicación covalentemente cerrado (<i>Covalently Closed Replication Intermediate</i>)
Chl	Cloroquina (<i>Chloroquine</i>)
DS	Diada simétrica (<i>Dyad Symmetry</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético (<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>)
EthBr	Bromuro de etidio (<i>Ethidium Bromide</i>)
FR	Familia de repeticiones (<i>Family of Repeats</i>)
HEK	Células embrionarias humanas de riñón (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
IGS	Regiones no codificantes del rDNA (<i>Intergenic Spacer</i>)
Kb	Kilopares de bases (<i>Kilobase pairs</i>)
Kn	Nudo (<i>Knot</i>)
Knn	Monómero anudado (<i>Knotted monomer</i>)

Knd	Dímero anudado (<i>Knotted dimer</i>)
LB	Medio de cultivo Luria Bertani (<i>Culture medium Luria Bertani</i>)
Lms	Lineales de monómeros (<i>Monomers linears</i>)
Lds	Lineales de dímeros (<i>Dimeric linears</i>)
Lk	Índice de ligamiento (<i>Linking number</i>)
ΔLk	Variación del índice de ligamiento con respecto al índice de ligamiento del DNA relajado (<i>Linking number difference</i>)
OC	Molécula circular con una o más roturas de cadena sencilla (<i>Open Circle</i>)
OCm	Molécula monomérica circular con una o más roturas de cadena sencilla (<i>Monomeric Open Circle</i>)
OCd	Molécula dimérica circular con una o más roturas de cadena sencilla (<i>Dimeric Open Circle</i>)
OCRI	Intermediario de replicación relajado (<i>Open Circle Replication Intermediate</i>)
Ori	Origen de replicación (<i>Replication origin</i>)
pb	Pares de bases (<i>Base Pairs</i>)
PBS	Solución de fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (<i>Polyvinylidene Fluoride</i>)
rDNA	DNA ribosómico (<i>Ribosomic DNA</i>)
rRNA	RNA ribosómico (<i>Ribosomic RNA</i>)
RFB	Barrera natural para las horquillas replicativas (<i>Replication Fork Barrier</i>)
RI	Intermediario de replicación (<i>Replication intermediate</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
Scd	Dímero superenrollado (<i>SuperCoiled Dimer</i>)
Scm	Monómero superenrollado (<i>SuperCoiled Monomer</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SSC	Solución salina de citrato sódico (<i>Saline Sodium-Citrate</i>)

SSPE	Solución salina de fosfato de sodio (<i>Saline Sodium-Phosphate-EDTA</i>)
Ter	Sitio de terminación de la replicación del DNA (<i>DNA replication terminus site</i>)
TBE	Tris-Borato-EDTA (<i>Tris-Borate-EDTA</i>)
TBS	Solución Tris salina (<i>Tris-Buffered Saline</i>)
Topo 2	Topoisomerasa 2 de <i>S. cerevisiae</i> (<i>Topoisomerase 2</i>)
Topo I	Topoisomerasa I de <i>E. coli</i> (<i>Topoisomerase I</i>)
Topo III	Topoisomerasa III de <i>E. coli</i> (<i>Topoisomerase III</i>)
Topo IV	Topoisomerasa IV de <i>E. coli</i> (<i>Topoisomerase IV</i>)
Tris	Tris hidroximetil aminometano (<i>Tris hydroxymethyl aminomethane</i>)
Tus	Proteína de unión a Ter (<i>Terminator utilization substance</i>)
Tw	Índice de torsión (<i>Twist</i>)
Wr	Índice de superenrollamiento (<i>Writhe</i>)
YEP	Extracto de levadura y peptona (<i>Yeast Extract Peptone</i>)
YNB	Base de nitrógeno de levadura (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
(+)	Positivo (<i>Positive</i>)
(-)	Negativo (<i>Negative</i>)

RESUMEN / SUMMARY

Comprender cómo replica el DNA es una cuestión crítica para entender la vida. La replicación del DNA es un proceso muy complejo y altamente regulado, en el que están implicadas una gran cantidad de moléculas. Hoy por hoy, este proceso no está plenamente caracterizado. En la presente Tesis Doctoral se ha intentado profundizar en la comprensión de la replicación del DNA utilizando diferentes aproximaciones a lo largo de sus distintas etapas.

Actualmente no existe un consenso entre los miembros de la comunidad científica acerca de si las horquillas replicativas pueden girar libremente *in vivo* durante la replicación con la consecuente formación de pre-encadenados. En una primera fase de la presente Tesis Doctoral se aportó información acerca de esta cuestión, tratando de contestar a la pregunta de si las horquillas pueden girar durante la replicación. Para ello se analizó la topología de tres plásmidos bacterianos derivados de pBR322 que contenían la secuencia para la terminación *TerE* clonada a distintas distancias del origen de replicación. Con estos plásmidos se transformaron dos estirpes distintas de *E. coli*, una proficiente y otra deficiente en la Topoisomerasa IV (Topo IV). Se aislaron intermediarios de replicación (RIs) que se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Los resultados obtenidos indican que los RIs aislados de las células con la Topo IV inactiva presentan un nivel de torsión mayor que los aislados de la estirpe con la Topo IV activa. Esta observación sugiere que las horquillas pueden girar libremente *in vivo* a medida que avanza la replicación.

En una segunda etapa, se estudiaron diferentes características de las barreras replicativas naturales (RFBs) presentes en el rDNA. Estas barreras, que están presentes en todos los organismos eucariotas estudiados hasta el momento, son sumamente importantes para las células ya que en el rDNA los procesos de transcripción y replicación se llevan a cabo de forma simultánea. La replicación del rDNA ocurre mientras estos genes son transcripcionalmente activos. Por tanto, si una horquilla de replicación intenta atravesar una unidad de rDNA en la dirección opuesta a la transcripción, el complejo de replicación podría colisionar con el de transcripción, pudiendo tener consecuencias letales para la célula. Para estudiar dichas barreras se han utilizado varios minicromosomas artificiales de levaduras, a los cuales se les clonaron distinto número de RFBs. Se transformaron células de *S. cerevisiae* y se extrajeron intermediarios de replicación los cuales se digirieron con distintas enzimas de restricción para obtener dos fragmentos

lineales de DNA, que fueron analizados por electroforesis bidimensional. Los resultados obtenidos permitieron concluir que las barreras replicativas naturales clonadas en minicromosomas artificiales de levaduras, detienen de manera permanente las horquillas. Sin embargo, no son capaces de detener el 100% de las mismas.

Por último, se intentó profundizar en el conocimiento de la primera fase del proceso de replicación: la iniciación. Concretamente se trató de determinar si la unión de proteínas iniciadoras de la replicación induce cambios topológicos en el DNA. Para ello se utilizaron minicromosomas derivados de genomas víricos transfectados en células humanas (HEK293). Este sistema es ampliamente utilizado para estudiar la replicación en organismos eucariotas, ya que los minicromosomas están sometidos a restricciones muy similares a las de la célula huésped, pero representan un sistema mucho más simple y mejor caracterizado. Se utilizaron dos minicromosomas, uno derivado del genoma del virus de Epstein-Barr (EBV) y otro derivado del virus del simio 40 (SV40). Ambos necesitan la presencia de sendas proteínas víricas para replicar de forma autónoma y extracromosómicamente. Dichas proteínas, EBNA1 y el Antígeno T, respectivamente, son las responsables de la iniciación de la replicación. Se transfectaron dos subtipos de células HEK293, que expresan de manera constitutiva EBNA1 (HEK293E) o el Antígeno T (HEK293T). Posteriormente, se aisló el DNA extracromosómico que se analizó mediante electroforesis bidimensional. Se pudo concluir que la unión de distintas proteínas iniciadoras no afecta a la topología de estos minicromosomas.

How DNA replicates is a critical question to understand life. The replication process is very complex and is highly regulated. Many molecules are implicated in this process which is not fully characterized. In this Doctoral Thesis, we tried to improve the knowledge about replication using different approaches.

Nowadays, in the scientific community, there is not a consensus as to whether or not swiveling of the replication fork and formation of pre-catenanes can occur *in vivo*. In the first part of this Thesis we tried to find out if replication forks can swivel during replication. To achieve this goal, we examined the topology of three bacterial plasmids with the fork stalled at different sites after initiation. These plasmids were used to transform two different *E. coli* strain, one of which had Topoisomerase IV (Topo IV) active *in vivo* and the other one had it inactive. We isolated replication intermediates (RIs) which were analyzed by high-resolution two-dimensional agarose gel electrophoresis. The results obtained indicated that RIs were more torsionally tensioned when they were isolated from cells without Topo IV. This observation strongly suggests that forks can swivel *in vivo* leading to the formation of pre-catenanes as replication progresses.

In a second part, we studied different characteristics about replication fork barriers (RFBs). These barriers are in the rDNA of all eukaryotic organisms and they are very important for the cells because in the rDNA transcription and replication occur at the same time. If there would be no RFBs, the replication and transcription machineries could collide. RFBs block those replication forks moving in the opposite direction to transcription. We investigated and quantified the efficiency of RFBs to stall replication forks. To this end, we transfected *S. cerevisiae* cells with circular artificial yeast minichromosomes containing different copies of RFBs. To identify fork stalling we used two-dimensional agarose gel electrophoresis to analyze the RIs. We obtained several results that allowed us to conclude that blockage of replication forks at the budding yeast's RFBs when occurred were permanent, but this blockage only occurred in some cases.

In the last stage, we tried to improve the knowledge about the replication process' first step: the initiation. We wanted to know if the binding of initiator proteins to DNA is related to changes in DNA topology. We used minichromosomes derived from viral

genomes in Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells. This system is frequently used as a model to study DNA eukaryotic replication because it is very simple and it is well characterized. We used two minichromosomes: one derivative of the Epstein-Barr Virus (EBV) and the other one derivative of the Simian Virus 40 (SV40). In both of them replication initiates at a precise site upon binding of a specific protein: the Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) and the large tumor (T) antigen, respectively. We transfected HEK293 variant cells that constitutively express either the EBNA1 protein (HEK293E) or SV40 large T antigen (HEK293T). We isolated extrachromosomal DNA and use two-dimensional agarose gel electrophoresis to analyze them. We concluded that the union of initiator proteins to DNA does not affect the minichromosomes DNA topology.

1. INTRODUCCIÓN

El DNA es el principal constituyente del material genético de todos los seres vivos. En él se encuentra almacenada y codificada toda la información genética de una célula. De acuerdo al modelo postulado por Watson y Crick el DNA está formado por dos cadenas de polinucleótidos complementarias y antiparalelas que interactúan formando una doble hélice. Su conformación más frecuente es la denominada DNA-B, una doble hélice dextrógira con una periodicidad de aproximadamente 10,5 pares de bases (pb) (Watson and Crick, 1953).

1.1 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. Por ejemplo, un paralelepípedo rectangular puede sufrir una serie de deformaciones continuas hasta adoptar la forma de un cubo. El paralelepípedo original y el cubo resultante tienen distinta forma, pero mantienen una serie de propiedades comunes como el número de caras o aristas. Estas propiedades invariantes son las que estudia la topología.

El descubrimiento de la estructura en doble hélice del DNA llevó a cuestionarse cómo se produce la separación de las dos hebras entrelazadas durante la replicación de la molécula y cómo la célula resuelve los problemas topológicos derivados de este proceso (Cairns, 1963). El estudio de las distintas formas que puede adoptar el DNA comenzó en 1965 cuando Vinograd y colaboradores examinaron al microscopio electrónico el DNA del virus del polio (Vinograd et al., 1965). Observaron que dicho DNA podía encontrarse tanto en forma lineal como circular. Estas formas, además, podían presentar distinto grado de complejidad, desde moléculas totalmente relajadas a otras enrolladas sobre sí mismas un número variable de veces. A cada una de estas isoformas se les denominó topoisómeros, que se definen como las diferentes conformaciones espaciales que pueden adoptar las moléculas de DNA circular covalentemente cerradas sin que cambie su masa. Posteriormente, esta observación fue ampliada a todas las moléculas de DNA circulares de cadena doble (Cozzarelli, 1980).

La observación de que en todos los seres vivos el DNA se encuentra superenrollado junto con el descubrimiento de las enzimas encargadas de modular su topología *in vivo*

(Wang, 1971), sentaron las bases para la creación de una nueva disciplina denominada “Topología del DNA” la cual se encuentra a mitad de camino entre las Matemáticas y la Biología Molecular (Wang, 2002). Esta nueva disciplina surgió de la necesidad de estudiar el DNA a nivel topológico, siendo los cambios en la topología de la molécula cruciales para el correcto desarrollo de la mayoría de los procesos celulares, como la replicación, la transcripción o la segregación celular.

1.2 Propiedades topológicas del DNA

1.2.1 Superenrollamiento

Una de las propiedades topológicas del DNA mejor estudiada en la actualidad es el superenrollamiento. Se define como el número de veces que el eje de la doble hélice se cruza sobre sí mismo cuando se proyecta sobre un plano (Bates and Maxwell, 1997). El superenrollamiento es una propiedad exclusiva de dominios topológicos cerrados, es decir, moléculas circulares de DNA en las que los extremos de la doble hélice están unidos (CCCs, del inglés *Close Covalent Circles*). Sin embargo, también pueden albergar superenrollamiento moléculas lineales de DNA asociadas a membranas u otros complejos proteicos en las que un dominio de las mismas se comporta como topológicamente cerrado. Actualmente, se cree que el DNA de los cromosomas eucarióticos está organizado en bucles o lazos en cuya base el DNA está unido a un esqueleto proteico dando lugar a dominios topológicos cerrados equivalentes a los CCCs (Marsden and Laemmli, 1979; Schiessel et al., 2001).

Se han descrito dos conformaciones para el DNA superenrollado (Figura 1A):

- Plectonémica: característica de organismos procariotas. En esta conformación la doble hélice de DNA se enrolla alrededor de otra parte de sí misma, dando lugar a una hélice de orden superior (Bates and Maxwell, 2005).
- Toroidal: en este tipo de superenrollamiento la doble hélice de DNA se enrolla alrededor de un *torus* o aro imaginario formando también una hélice de orden superior (Bates and Maxwell, 2005). Esta conformación es la que está presente en

organismos eucariotas donde el DNA se enrolla alrededor de los nucleosomas. Este hecho favorece la condensación del DNA necesaria para su empaquetamiento dentro del núcleo (Boles et al., 1990).

El parámetro que mejor define la topología de una molécula CCC es el índice de ligamiento (Lk, del inglés *Linking Number*). Este parámetro se define como el número de veces que una cadena de la doble hélice cruza a la otra en un plano (Bates and Maxwell, 1997; Kornberg and Lorch, 1992). El Lk es una constante y corresponde siempre a un número entero. Esta constante topológica está definida por dos variables geométricas: el índice de torsión (Tw, del inglés *Twist*) y el índice de superenrollamiento (Wr del inglés *Writhe*).

El Tw indica el número de veces que las dos hebras del DNA giran una vuelta completa alrededor del eje axial de la doble hélice. Para el caso de moléculas de DNA-B relajadas el valor del Tw viene dado por la siguiente ecuación:

$$Tw = N / 10,5 \quad (1)$$

Siendo N el número total de pb de la molécula de DNA y 10,5 el número de pb de una vuelta completa de cada una de las dos hebras de la doble hélice.

El Wr es la medida del grado de superenrollamiento del DNA, por tanto, como ya se ha mencionado con anterioridad, mide el número de veces que el eje de la doble hélice se cruza sobre sí mismo. Por convenio, el Wr es negativo (-) en superhélices dextrógiras y positivo (+) en levógiras (Bates and Maxwell, 1997; Schwartzman and Stasiak, 2004).

Estos tres parámetros están relacionados mediante la siguiente ecuación:

$$Lk = Tw + Wr \quad (2)$$

El Tw y el Wr están directamente relacionados y ambas variables se compensan entre sí dando como resultado el valor del Lk, que se mantiene constante. El valor del Lk solo puede cambiar si se producen roturas en el DNA (Wang, 1996). Estas roturas pueden ser de cadena sencilla o doble, pero en ambos casos el resultado es el mismo: la eliminación

del superenrollamiento debido a que la rotura permite a la hebra implicada girar libremente sobre la otra disipando toda la tensión y dando lugar a una molécula completamente relajada (OC, del inglés *Open Circle*) (Figura 1B). En todo dominio topológico cerrado *in vivo* los procesos de replicación, transcripción y recombinación alteran el Tw y el Wr pero no el Lk. Para cambiar el Lk *in vivo*, las células disponen de enzimas especializadas denominadas DNA topoisomerasas, de las cuales se hablará más adelante.

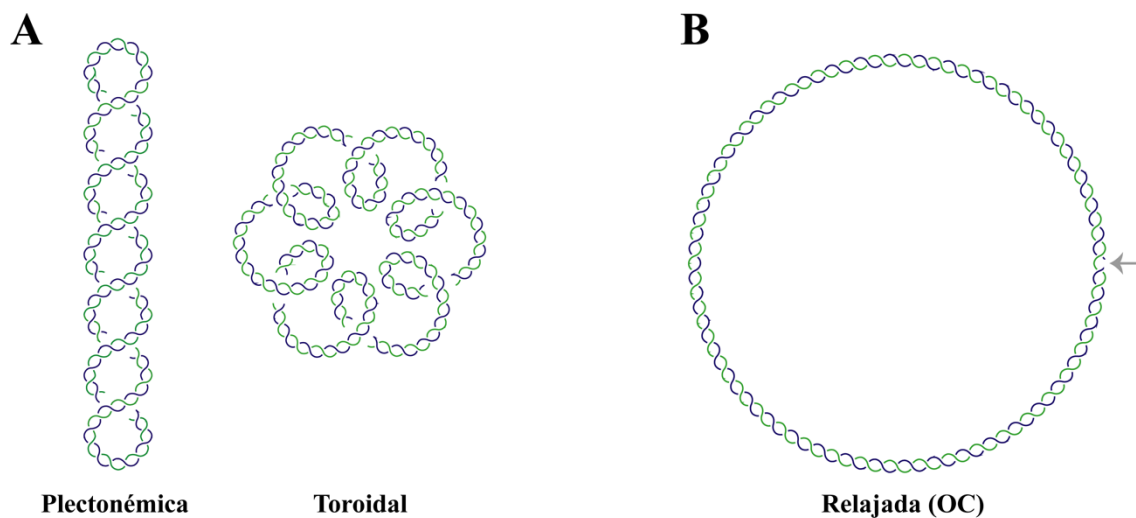


Figura 1. Esquema representativo de las distintas formas que puede adoptar una molécula de DNA circular. A: Forma superenrollada con una conformación plectonémica (a la izquierda) y toroidal (a la derecha). B: Forma relajada (OC). La flecha gris indica una rotura de cadena sencilla en la doble hélice.

1.2.2 Encadenamiento

El encadenamiento es otra forma topológica que puede adoptar el DNA *in vivo*. Se define como la unión de dos o más moléculas circulares de DNA entrelazadas entre sí un número variable de veces. Este tipo de moléculas se encuentran en varios sistemas biológicos como, por ejemplo, formando parte del genoma mitocondrial de tripanosomas (Englund et al., 1982). También aparecen como productos o intermediarios en procesos de recombinación (Mizuuchi et al., 1980). Pero sin duda, lo más común es que los encadenados surjan como producto final de la replicación de moléculas de DNA

circulares; de hecho, la formación de encadenados es una de las consecuencias topológicas de la replicación de este tipo de moléculas.

Los encadenados de DNA se clasifican atendiendo a la naturaleza de las moléculas que los forman (Figura 2). Existen tres tipos:

- Tipo A o CatA: las dos moléculas de DNA circular poseen una rotura de cadena sencilla y, por tanto, están completamente relajadas (ambas son OCs).
- Tipo B o CatB: solo una de las moléculas esta relajada (OC), mientras que la otra se encuentra covalentemente cerrada (CCC) y, por tanto, puede albergar superenrollamiento.
- Tipo C o CatC: ambas moléculas se encuentran covalentemente cerradas (CCC), pudiendo albergar superenrollamiento (Sundin and Varshavsky, 1980).

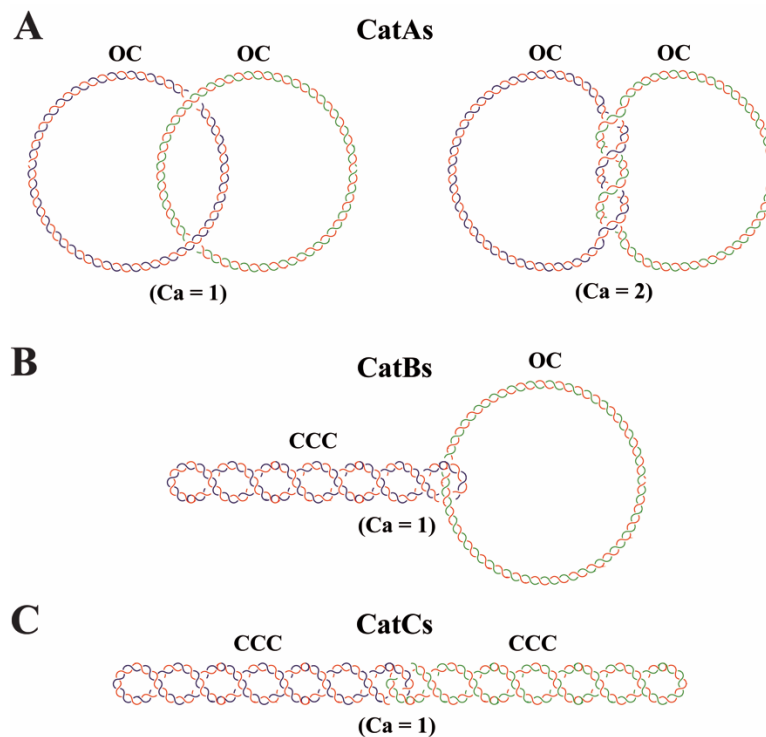


Figura 2. Tipos de encadenados de DNA. **A:** Encadenados tipo A (CatAs), formados por dos moléculas relajadas u OCs, con un encadenamiento (a la izquierda) y con dos encadenamientos (a la derecha). **B:** Encadenados tipo B (CatBs), formados por una molécula relajada (OC) y una superenrollada (CCC). **C:** Encadenados tipo C (CatCs) formado por dos moléculas superenrolladas (CCC) con un encadenamiento entre ellas. Ca = número de encadenamiento que presenta la molécula (Martinez-Robles et al., 2009).

Para definir estos encadenados se utilizan dos parámetros topológicos: el parámetro n , definido como el número de cruces que presentan las moléculas encadenadas al proyectarlas en un plano; y el parámetro Ca o número de encadenamiento, cuyo valor es siempre la mitad del número de cruces (Martinez-Robles et al., 2009).

1.2.3 Anudamiento

Otra propiedad topológica del DNA es el anudamiento (Bauer et al., 1980). Los nudos en el DNA pueden surgir de cualquier proceso que implique roturas en la doble hélice (replicación, transcripción, recombinación y reparación). Cuando se forma un nudo es esencial que sea eliminado, de lo contrario, sus efectos podrían resultar devastadores para la célula (Deibler et al., 2007; Olavarrieta et al., 2002a). Existen nudos con distinto número de cruces y complejidad. El tipo de nudo más simple es el nudo de tres cruces, llamado nudo en forma de hoja de trébol.

En 1976 James Wang y colaboradores fueron los primeros en observar nudos. Éstos estaban presentes en moléculas de DNA circular de cadena sencilla del bacteriófago fd que habían sido tratadas con una proteína de *Escherichia Coli* (*E. coli*) entonces llamada ω y que luego resultó ser la topoisomerasa I (Liu et al., 1976). Años más tarde, de nuevo James Wang y colaboradores fueron los primeros en observar nudos de manera natural en el DNA de doble cadena del bacteriófago P2 (Liu et al., 1981). Posteriormente, varios autores han demostrado, con estudios *in vitro*, la formación de nudos en DNA de cadena doble por enzimas implicadas en procesos de recombinación. (Wasserman and Cozzarelli, 1985; Wasserman et al., 1985). Pese a estos estudios, la información en cuanto al anudamiento *in vivo* sigue siendo escasa.

1.3 DNA topoisomerasas

Las DNA topoisomerasas son las enzimas encargadas de modificar la topología del DNA *in vivo*, modificando el valor del Lk . Estas enzimas catalizan las inter-conversiones entre las distintas formas topológicas (Bates and Maxwell, 2005). Wang las definió como

las auténticas magas del mundo del DNA (Wang, 2002) ya que ayudan a solucionar todos los problemas topológicos derivados de los procesos celulares de replicación, transcripción, reparación, recombinación y segregación. (Champoux, 2001; Wang, 2002). Así pues, las topoisomerasas son esenciales para el crecimiento celular de todos los seres vivos, por lo que actualmente se utilizan como dianas de numerosas drogas citotóxicas. Las topoisomerasas procariotas constituyen dianas de diferentes compuestos antibacterianos y antibióticos, mientras que las eucariotas se utilizan como dianas terapéuticas en muchos tratamientos antitumorales (Froelich-Ammon and Osheroff, 1995; Kathiravan et al., 2013).

Todas las topoisomerasas conocidas hasta la fecha actúan produciendo roturas transitorias en el DNA acompañadas de la formación de un enlace fosfodiéster entre un residuo activo de tirosina presente en la proteína y un grupo fosfato de uno de los extremos de la cadena de DNA interrumpida. La topología de la molécula de DNA podrá ser modificada siempre y cuando se mantenga este enlace. Finalmente, cuando el enlace se rompe, la enzima vuelve a unir los extremos rotos (Champoux, 2001). En base a su mecanismo de acción las topoisomerasas se clasifican en dos grandes grupos según corten una (tipo I) o ambas hebras (tipo II) de la doble hélice del DNA (Champoux, 2001; Wang, 1996).

1.3.1 DNA topoisomerasas de tipo I

Las topoisomerasas de tipo I cortan una única cadena de la doble hélice y la hacen rotar una vuelta completa sobre la hebra intacta para, finalmente, volver a unir los extremos cortados modificando el Lk en valores de ± 1 (Brown and Cozzarelli, 1981).

Las topoisomerasas de tipo I bacterianas sólo son capaces de relajar superenrollamiento (-). *E. coli* posee dos topoisomerasas de este tipo: la topoisomerasa I (Topo I) (Wang, 1971) y la topoisomerasa III (Topo III) (Dean et al., 1983). La Topo I relaja el superenrollamiento (-) generado por detrás de la horquilla durante la transcripción (Liu and Wang, 1987). En cuando a la Topo III, a pesar de que su papel biológico aún no está del todo claro, se sabe que cuando interacciona con la helicasa RecQ es capaz de encadenar y desencadenar *in vitro* (Harmon et al., 2003; Nurse et al., 2003).

Además, está implicada en procesos de recombinación y reparación (Plank et al., 2006; Seki et al., 2006)

Las topoisomerasas de tipo I de las células eucariotas son capaces de relajar tanto superenrollamiento (-) como (+). En *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) se conocen dos topoisomerasas de este tipo: la Topo I (Goto and Wang, 1985) y la Topo III (Kim and Wang, 1992). La Topo I realiza un papel fundamental durante la transcripción mientras que la Topo III actúa en el mantenimiento de la estabilidad genómica y está implicada en la resolución de intermediarios de replicación (RIs) durante la reparación del DNA (Goodwin et al., 1999; Maftahi et al., 1999). También se ha visto que forma parte en el proceso de desencadenamiento *in vitro* del DNA junto con la helicasa Sgs1 (Cejka et al., 2012; Harmon et al., 1999).

1.3.2 DNA topoisomerasas de tipo II

Las topoisomerasas de tipo II cortan ambas cadenas de la doble hélice y pasan otra doble hélice intacta por el hueco formado en la ruptura. Finalmente, vuelven a unir los extremos cortados (Champoux, 2001; Nitiss, 1998; Wang, 1998) modificando el Lk en valores de +/- 2 (Roca and Wang, 1994). Todas las enzimas de este tipo son dependientes de ATP (Huang, 1994).

En *E. coli* existen dos topoisomerasas de tipo II:

- DNA girasa (Gellert et al., 1976). Esta enzima es la única topoisomerasa conocida capaz de introducir superenrollamiento (-) en el DNA *in vivo*, utilizando para ello la energía de la hidrólisis del ATP (Gellert et al., 1976). Se trata de un heterotetrámero compuesto por dos subunidades GyrA y dos subunidades GyrB (Klevan and Wang, 1980). 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. Esta enzima es la encargada del mantenimiento de la densidad de superenrollamiento (-) necesaria para la iniciación de la replicación y la transcripción del DNA. También participa en la fase de elongación de ambos procesos, contribuyendo a la

eliminación del superenrollamiento (+) que se genera por delante de las horquillas debido a la acción de las helicasas. Si la DNA girasa no eliminara esta tensión torsional ambos procesos podrían llegar a detenerse. Se ha descrito también que la DNA girasa tiene cierta capacidad para relajar superenrollamiento (-) de un modo independiente de ATP (Higgins et al., 1978; Strick et al., 1998). Además, esta enzima es capaz de eliminar superenrollamiento (+) del DNA en sistemas de replicación *in vitro*, requiriendo ATP para ello (Hiasa and Marians, 1996). La eliminación del superenrollamiento tanto (-) como (+) es mucho menos eficiente que la introducción de superenrollamiento (-), por tanto, se requieren entre 20 y 40 veces más enzima para que las tasas sean comparables (Gellert et al., 1979; Higgins et al., 1978).

- Topoisomerasa IV (Topo IV) (Kato et al., 1990; Kato et al., 1988). Esta enzima también es un heterotetrámero y sus subunidades ParC y ParE son homólogas a GyrA y GyrB, respectivamente (Peng and Marians, 1993). Está especializada en eliminar el encadenamiento que surge entre las cromátidas hermanas durante y, especialmente, al final del proceso de replicación del DNA (Deibler et al., 2001; Zechiedrich and Cozzarelli, 1995). Se suele definir como la desencadenasa procariota. Además, es capaz de eliminar ambos tipos de superenrollamiento, sin embargo, es 20 veces más eficiente eliminando los cruces levógiros, presentes en el superenrollamiento (+), que los cruces dextrógiros del superenrollamiento (-) (Crisona et al., 2000; Stone et al., 2003).

Las topoisomerasas de tipo II eucariota son capaces de relajar ambos tipos de superenrollamiento, pero son incapaces de introducir superenrollamiento (-). La única topoisomerasa de tipo II conocida actualmente en *S. cerevisiae* es la Topo 2 y permite la correcta segregación de las cromátidas hermanas una vez finalizada la replicación del DNA (DiNardo et al., 1984; Holm et al., 1985).

1.4 Topología de los intermediarios de replicación (RIs) de plásmidos bacterianos

Tanto *in vivo* como *in vitro* los plásmidos bacterianos se encuentran negativamente superenrollados, presentando cruces intramoleculares dextrógiros (parte izquierda Figura 1A) (Bednar et al., 1994; Bliska and Cozzarelli, 1987). Este tipo de superenrollamiento es necesario para que la replicación del DNA pueda llevarse a cabo, facilitando la separación de las cadenas parentales (Crisona et al., 2000; Marians et al., 1986). Al separarse, ambas cadenas podrán ser usadas como molde por las DNA polimerasas durante la replicación. Una vez iniciada la replicación, el superenrollamiento (-) también juega un papel importante a la hora de que la elongación progrese correctamente. Este proceso lo lleva a cabo un complejo multiproteico denominado replisoma, el cual está liderado por la DNA helicasa, una proteína hexamérica responsable de la apertura de la doble hélice parental (Schvartzman and Stasiak, 2004). Dicha apertura crea una tensión topológica que genera superenrollamiento (+) por delante de la horquilla de replicación (Alexandrov et al., 1999; Peter et al., 1998). Si este superenrollamiento (+) persiste y se acumula podría llegar a detener el avance de la horquilla, ya que impediría la separación de las dos cadenas parentales. En bacterias, para evitar que esto suceda, existen dos topoisomerasas de tipo II (DNA girasa y Topo IV) que actúan conjuntamente por delante de la horquilla. Ambas topoisomerasas pueden relajar moléculas positivamente superenrolladas, sin embargo, su mecanismo de acción es completamente diferente (Zechiedrich and Cozzarelli, 1995). La DNA girasa introduce superenrollamiento (-) mientras que la Topo IV es capaz de eliminar parte del superenrollamiento (+) que genera el avance de la horquilla (Cozzarelli, 1980; Levine et al., 1998; Marians, 1992). De esta forma debería mantenerse la región no replicada del DNA negativamente superenrollada y debería ser suficiente para que la replicación se completase (Sundin and Varshavsky, 1980). Sin embargo, debido a la alta procesividad que presenta la DNA helicasa y al rápido avance de la horquilla, la actuación de estas enzimas no es suficiente para compensar todo el superenrollamiento (+). En los primeros estadios de la replicación, la región no replicada sería lo suficientemente grande como para que varias de estas topoisomerasas se unan al mismo tiempo. Su funcionamiento en serie podría conseguir introducir el suficiente nivel de superenrollamiento (-) para que la horquilla continuara avanzando. Sin embargo, a medida que la replicación progresa, la región no replicada va disminuyendo de tamaño, por lo que cada vez es menor el espacio en el que estas enzimas

podrían actuar (Champoux and Been, 1980). Este déficit de topoisomerasas podría conducir a una eventual acumulación de superenrollamiento (+) por delante de la horquilla en las etapas más avanzadas de la replicación. Para resolver este problema, Champoux y Been sugirieron que el superenrollamiento (+) que se acumula transitoriamente por delante de las horquillas de replicación haría girar dichas horquillas, difundiéndose parte de este superenrollamiento (+) de la región no replicada a la ya replicada (Champoux and Been, 1980). Los cruces que se formarían entre las cromátidas hermanas en la región ya replicada se denominaron pre-encadenados, para distinguirlos de los cruces de superenrollamiento de la región no replicada (Peter et al., 1998). Este nombre alude al hecho de que si esos pre-encadenados no son eliminados darán lugar a moléculas encadenadas al finalizar la replicación. Por otra parte, en la región ya replicada, la Topo IV (principal desencadenasa bacteriana) podría actuar eliminando estos pre-encadenados. De esta forma ayudaría a la DNA girasa a compensar la acumulación de superenrollamiento (+) (Alexandrov et al., 1999; Peter et al., 1998; Ullsperger et al., 1995). No obstante, la formación de pre-encadenados *in vivo* sigue siendo un tema controvertido. Algunos estudios afirman su formación (Cebrian et al., 2015; Hiasa et al., 1994; Postow et al., 1999; Sogo et al., 1999), mientras que otros apoyan que el replisoma está anclado a la membrana bacteriana, impidiendo girar a las horquillas y que, por tanto, no habría formación de pre-encadenados (Levine et al., 1998). Los que apoyan esta teoría afirman que varias moléculas de DNA girasa y Topo IV podrían unirse a la región no replicada de los RIs y su funcionamiento en serie podría compensar completamente el superenrollamiento (+) para que la horquilla pudiera seguir avanzando. Esto sería así hasta llegar, aproximadamente, a las últimas 200 pb, cuando ya no queda espacio físico para que ninguna enzima pueda unirse. La replicación de esta última región se realizaría mediante un sistema no convencional dando lugar a moléculas encadenadas con cruces dextrógiros (Sundin and Varshavsky, 1980). En cualquier caso, si el encadenamiento entre dos moléculas de DNA es dextrógiro, como se asume generalmente (Adams et al., 1992), no constituye un sustrato adecuado para la Topo IV, ya que esta enzima actúa preferentemente sobre cruces levógiros. Esta paradoja, conocida como la “Paradoja de la Topo IV”, sigue sin tener aún una explicación convincente y aceptada de forma unánime.

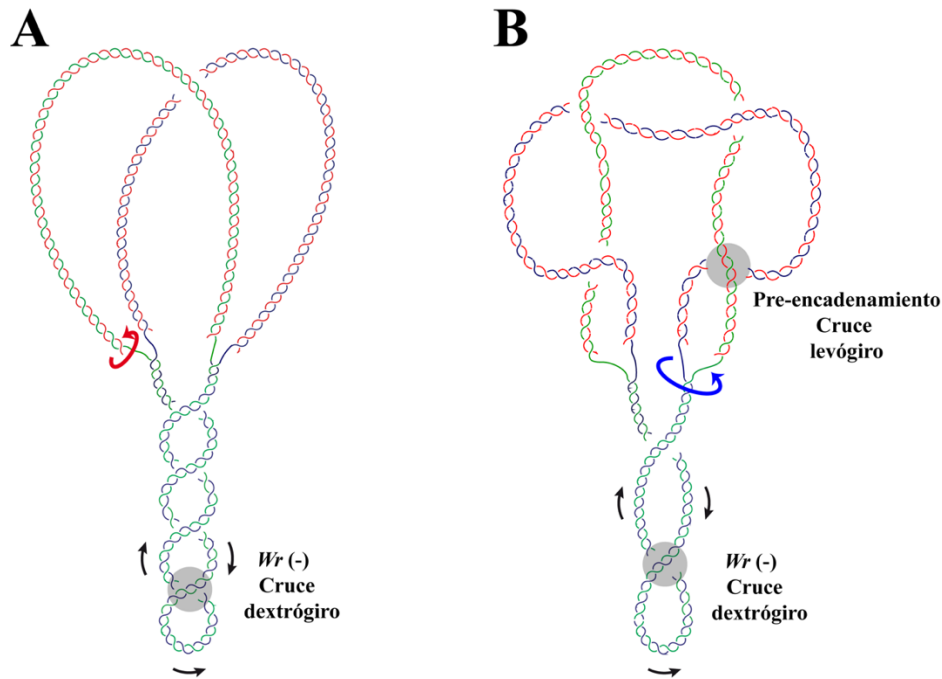


Figura 3. Esquema de un CCRI. A: CCRI cuya región no replicada presenta superenrollamiento (-) con cruces dextrógiros. La región ya replicada está totalmente relajada. Esta región no puede albergar superenrollamiento ya que las cadenas nacientes son discontinuas y, por tanto, pueden girar sobre las cadenas parentales (flecha roja) disipando cualquier tipo de tensión torsional. **B:** CCRI tras la desproteinización. La flecha azul indica el giro de las horquillas de replicación *in vitro*, con el consiguiente paso de superenrollamiento (-) de la región no replicada a la región ya replicada en forma de pre-encadenamiento con cruces levógiros. Las dos cadenas parentales se representan en verde y azul y las hebras nacientes en rojo.

Hay que tener en cuenta que el DNA examinado *in vitro* podría no reflejar la situación *in vivo*, ya que durante el proceso de aislamiento todas las proteínas son eliminadas. En esta situación las horquillas no tienen ningún impedimento y pueden girar libremente permitiendo que la tensión torsional difunda de la región no replicada a la ya replicada (y viceversa) hasta conseguir un equilibrio termodinámico (Ullsperger et al., 1995). En la Figura 3 se muestra un RI covalentemente cerrado (CCRI) antes (Figura 3A) y después (Figura 3B) del proceso de aislamiento. Se puede observar cómo parte del superenrollamiento (-) de la región no replicada migra a la ya replicada, dando lugar a la formación de pre-encadenados. Esta redistribución ocurre de tal forma que los cruces dextrógiros de la región no replicada pasan a la región ya replicada como pre-encadenados levógiros.

1.5 Organización y estructura del DNA en eucariotas

A diferencia de las bacterias, los organismos eucariotas tienen sus cromosomas organizados en fibras de cromatina. Este término fue usado por primera vez por el científico W. Flemming, alrededor del año 1880 (Flemming, 1882). Pocos años después, A. Kossel descubrió unas proteínas que estaban presentes en extractos de ácidos nucleicos y las denominó histonas (Kossel, 1911). Hoy en día se sabe que la cromatina es un complejo de DNA e histonas, cuya principal función es empaquetar el DNA para que ocupe el menor espacio posible en el interior del núcleo. La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma. Un nucleosoma está compuesto por dos partes: una parte central o *core*, que consiste en un octámero de histonas y DNA, y un conector o *linker* de DNA, que interacciona con la histona H1 para conectar diferentes *cores*. El *core* de histonas consta de dos copias de las proteínas H2A, H2B, H3 y H4, alrededor del cual se unen 147 pb de DNA (1,7 vueltas). Sin embargo, el DNA que forma parte del *linker* tiene una longitud variable, de alrededor de 50 pb (Happel and Doenecke, 2009) (Figura 4).

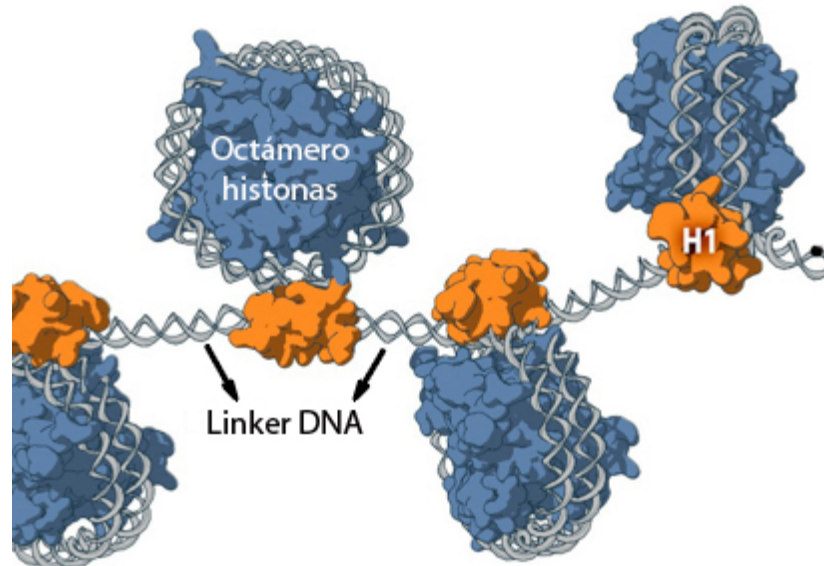


Figura 4. Fibra de cromatina. Los nucleosomas son la unidad estructural de la cromatina y están formado por un octámero de histonas (en color azul) al cual se enrolla el DNA (doble hélice gris). Los distintos nucleosomas se encuentran conectados entre sí por un *linker* de DNA, que interacciona con la histona H1 (en color naranja). Adaptada de MBI (Universidad Nacional de Singapur).

Durante muchos años se pensó que las histonas eran meros componentes estructurales necesarios para la compactación del DNA y que la cromatina era una estructura estática. Esta idea empezó a cambiar a finales de los años ochenta del siglo XX, cuando los grupos de A. Kornberg y M. Grustein describieron una función represora de los nucleosomas en la transcripción (Han and Grunstein, 1988; Lorch et al., 1988). Actualmente se sabe que la cromatina es una estructura muy dinámica y que representa un mecanismo muy potente en la regulación de la expresión génica (Hebbar and Archer, 2008).

Otra diferencia notable entre procariotas y eucariotas es que los cromosomas bacterianos son circulares y el DNA está organizado en dominios topológicos cerrados independientes que pueden presentar distintos niveles de superenrollamiento (Delius and Worcel, 1974; Postow et al., 2004). En células eucariotas, en cambio, los cromosomas son lineales y el DNA se encuentra plegado en fibras de cromatina complejas. En estos casos es difícil la identificación de dominios topológicos cerrados. De hecho, actualmente, es un tema aún por resolver (Eissenberg et al., 1985; Freeman and Garrard, 1992).

En células eucariotas, al igual que en las procariotas, se acumula superenrollamiento (+) por delante de horquilla de replicación. En este caso, dicho superenrollamiento, está provocado por el enrollamiento del DNA alrededor de las histonas. Esta acumulación de superenrollamiento es eliminada gracias a la acción de dos topoisomerasas: la Topo I y la Topo II eucariotas (Kim and Wang, 1992). Además, la asociación casi inmediata de los nucleosomas a las dos cromátidas hermanas detrás de la horquilla permite el correcto avance de la horquilla de replicación (Lucchini et al., 2001).

1.5.1 DNA ribosómico y barreras para las horquillas de replicación

El DNA ribosómico (rDNA) es el DNA que contiene los genes necesarios para la síntesis del RNA ribosómico (rRNA). En los organismos eucariotas el rDNA está formado por un número variable de repeticiones, dependiendo de la especie. Dichas repeticiones están dispuestas en tándem y pueden estar organizadas en uno o varios *loci* (López-Estraño et al., 1997).

En *S. cerevisiae* el rDNA está formado por entre 100 y 200 copias de genes ribosómicos que se encuentran agrupados en un único *locus*, en el cromosoma XII (Petes, 1979). Cada una de las repeticiones contiene secuencias codificantes para el rRNA 5S y el pre-rRNA 35S. Estas secuencias, que tienen sentido de transcripción opuesto, (Szostak and Wu, 1980) están separadas por dos regiones no codificantes o IGS (del inglés, *InterGenic Spacer*) (Figura 5). En el IGS2 se encuentra el origen de replicación o ARS (del inglés, *Autonomously Replication Sequence*) donde comienza la replicación del rDNA de manera bidireccional (en verde, en la Figura 5). No todos los orígenes de replicación se activan en cada ciclo celular (Ivessa and Zakian, 2002). El IGS1 contiene las barreras replicativas naturales (en rojo, en la Figura 5). Estas barreras, presentes en todos los organismos eucariotas estudiados hasta el momento (Linskens and Huberman, 1988; Little et al., 1993; Lopez-Estrano et al., 1999; Rothstein et al., 2000; Wiesendanger et al., 1994), son necesarias ya que la replicación del rDNA ocurre mientras estos genes son transcripcionamente activos (Saffer and Miller, 1986). Si una horquilla de replicación intenta atravesar una unidad de rDNA en dirección opuesta a la transcripción, el complejo de replicación podría colisionar con el de transcripción (Brewer and Fangman, 1988) pudiendo tener consecuencias letales para la célula (Liu and Alberts, 1995). Para evitar que esto suceda, las horquillas de replicación que se mueven hacia el extremo 3' de la secuencia codificante del pre-rRNA 35S son detenidas por las barreras naturales o RFBs (del inglés, *Replication Fork Barriers*) (Brewer and Fangman, 1988).

Las RFBs son barreras polares, ya que solo bloquean las horquillas de replicación que se desplazan en sentido contrario a la transcripción del pre-rRNA 35S. Las horquillas de replicación que viajan en la misma dirección que la transcripción podrán atravesar las barreras sin problemas (Brewer and Fangman, 1988; Linskens and Huberman, 1988). De esta forma se consigue que la replicación del rDNA sea unidireccional evitando la colisión frontal entre el complejo replicativo y el transcripcional. Para que las RFBs sean funcionales necesitan una proteína de unión a DNA llamada Fob1. En el IGS1 existen tres sitios potenciales de unión para esta proteína: RFB1, RFB2 y RFB3 (Kobayashi, 2003). Sin embargo, cuando esta secuencia se analiza en geles bidimensionales de agarosa solo se detectan dos paradas (Kobayashi, 2003; Ward et al., 2000).

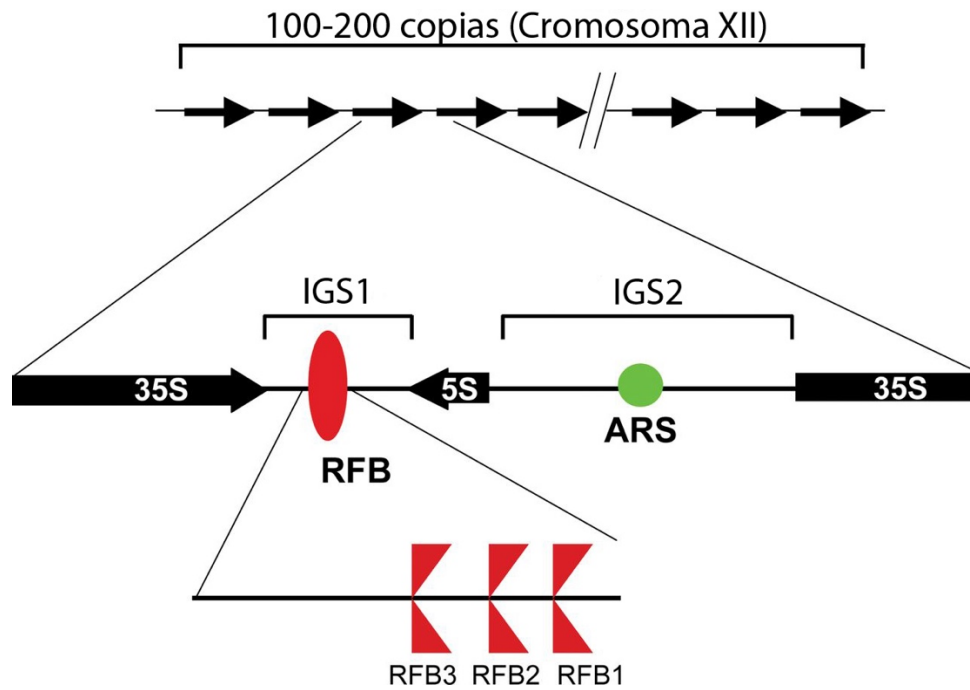


Figura 5. Esquema de la organización del rDNA en *S. cerevisiae*. Cada una de las repeticiones que forman el rDNA contiene secuencias codificantes para el rRNA 5S y el pre-rRNA 35S. Estas secuencias están separadas por dos regiones no codificantes o IGS. En el IGS1 se encuentran las barreras replicativas naturales o RFBs (en rojo) y en el IGS2 está el origen de replicación o ARS (en verde). Adaptada de (Rouse, 2009).

1.5.2 Cromosomas artificiales de levaduras (YACs)

En 1983, Murray y Szostak construyeron el primer cromosoma artificial de levaduras o YAC (del inglés, *Yeast Artificial Chromosome*) (Murray and Szostak, 1983). Los YACs se definen como vectores que contienen los elementos mínimos necesarios de un cromosoma normal requeridos para su replicación y mantenimiento extracromosómico en células de levadura. Los YACs contienen un origen de replicación, un centrómero y secuencias teloméricas en ambos extremos. También contienen marcadores de selección para el crecimiento por auxotrofia. Para facilitar su amplificación y manipulación en *E. coli* poseen además un origen de replicación bacteriano y un gen de resistencia a un antibiótico.

1.5.3 Minicromosomas derivados de genomas víricos

Algunos genomas víricos, o minicromosomas derivados de los mismos, son ampliamente utilizados como modelo para estudiar la replicación del DNA (Borowiec et al., 1990; Hammerschmidt and Sugden, 2013). Una característica importante que deben tener es que una vez introducidos dentro de la célula huésped se mantengan como elementos extra-cromosómicos. A pesar de ello, su replicación siempre dependerá de las proteínas del huésped y estará sujeta a restricciones similares a las del genoma de la célula hospedadora durante la fase S del ciclo celular. De esta forma proporcionan un modelo de estudio más simple y mejor caracterizado que el genoma completo de una célula eucariota (Dhar and Schildkraut, 1991).

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un herpesvirus humano que infecta linfocitos B. Está relacionado con distintos tipos de cánceres en humanos, ya que cuando una célula es infectada por este virus se vuelve inmortal, pudiendo proliferar indefinidamente (Yates and Guan, 1991). Tiene un genoma circular, de cadena doble y 172 Kb, que se mantiene como un elemento extracromosómico en la mayoría de las células infectadas (Yates et al., 1985). Para poder mantenerse como un episoma requiere la presencia de una proteína viral llamada EBNA1 (del inglés, *Epstein-Barr Nuclear Antigen 1*). Se vio que esta proteína se unía a una región del genoma de EBV, provocando la iniciación de la replicación. A dicha región, de aproximadamente 1700 pb, se le denominó *oriP*. El *oriP* está formado por dos elementos esenciales: una familia de repeticiones o FR (del inglés, *Family of Repeats*) y una diada simétrica o DS (del inglés, *Dyad Symmetry*). Ambos elementos están separados entre sí, aproximadamente, 1 Kb (Dhar and Schildkraut, 1991). La familia de repeticiones está formada por 21 copias, dispuestas en tándem, de una secuencia de 30 pb que incluye motivos de unión para EBNA1. 4 de estos motivos también están presentes en las 120 pb que forman la DS (Hammerschmidt and Sugden, 2013; Langle-Rouault et al., 1998). Se sabe que la iniciación de la replicación ocurre en o muy cerca de la diada y que es bidireccional (Gahn and Schildkraut, 1989; Wysokenski and Yates, 1989). Sin embargo, la horquilla que viaja en sentido opuesto a las agujas del reloj y se dirige hacia la FR es detenida rápidamente, ya que la FR actúa como una barrera para la replicación. Por tanto, la replicación se lleva a cabo, mayoritariamente, de manera unidireccional (Dhar and Schildkraut, 1991). Para que un minicromosoma derivado del genoma de EBV replique de manera autónoma en una célula es necesario que contenga

el *oriP* y que EBNA1 esté presente. El gen que codifica para EBNA1 puede estar en el propio minicromosoma, en otro minicromosoma o en el genoma de la célula huésped (Yates et al., 1985).

Minicromosomas derivados del genoma del virus SV40 (del inglés, *Simian Vacuolating Virus 40*) también son ampliamente utilizados (Borowiec et al., 1990; Waga and Stillman, 1994). Este virus es un poliomavirus que, aunque inicialmente fue encontrado en simios, hoy en día se sabe que también infecta a humanos. Recientemente, se ha visto una relación directa entre este virus y varios tipos de cánceres humanos (Vilchez et al., 2003). Tiene un genoma circular, de doble cadena y 5243 pb de longitud. Codifica para la única proteína vírica requerida para la replicación del genoma vírico: el Antígeno T (del inglés, *large Tumor antigen*). Esta proteína se puede unir a tres regiones diferentes en el origen de replicación, pero se ha visto que 64 pb forman la región mínima, necesaria para que la iniciación tenga lugar (Borowiec et al., 1990). Esta región, llamada *site II* o *core* contiene 4 sitios potenciales de unión (P1-P4) para la proteína (Meinke et al., 2007). La unión del Antígeno T a estos sitios provoca la iniciación de la replicación de manera bidireccional (Stillman and Gluzman, 1985), por tanto, la terminación tiene lugar en el lado opuesto del minicromosoma, a 180° de la iniciación (Dhar and Schildkraut, 1991). Para que un minicromosoma derivado del genoma de SV40 replique de manera autónoma es necesario que contenga la región *core* del origen de replicación y que el Antígeno T esté presente. Al igual que pasaba en los minicromosomas derivados del genoma de EBV con EBNA1, el gen que codifica para el Antígeno T puede estar presente en el mismo minicromosoma o ser proporcionado en *trans*.

Estos minicromosomas recombinantes derivados de genomas víricos, normalmente son aislados de bacterias para obtener gran cantidad de material con el que poder transfectar las células eucariotas. Sin embargo, existen grandes diferencias entre la organización del DNA antes y después de la transfección. Como ya se ha mencionado anteriormente el DNA en procariontes se encuentra negativamente superenrollado. Este superenrollamiento está causado por la acción de distintas topoisomerasas y no es necesaria la unión de proteínas al DNA. Por el contrario, el superenrollamiento del DNA en eucariotas está formado por el enrollamiento del DNA en los nucleosomas (Bates and Maxwell, 2005). Por tanto, cuando se introduce DNA en células eucariotas, procedente de bacterias, éste tendrá que ensamblarse con los nucleosomas para dar lugar a cromatina.

Este proceso puede dividirse en dos subprocesos independientes: en una primera etapa las topoisomerasas eucariotas relajan el superenrollamiento (-) nativo. Una vez que el DNA se encuentra totalmente relajado se puede asociar con los nucleosomas para formar la fibra de cromatina. Ambas etapas se completan 36 horas después de la transfección y son independientes de la replicación (Cereghini and Yaniv, 1984; Shen and Hu, 1986).

1.6 Replicación del DNA

El proceso de replicación del DNA es imprescindible para la vida. Durante este proceso el material genético de una célula se duplica para que la información contenida en él pueda ser transmitida a la descendencia. En este proceso los desoxirribonucleótidos libres son ensamblados linealmente para dar lugar a una secuencia idéntica a la estructura original (Jacob et al., 1963). La replicación del DNA, tiene que llevarse a cabo de manera completa y exacta, sin errores, para que la transmisión de la información genética sea correcta. Por tanto, la replicación es un proceso altamente coordinado y regulado que asegura una duplicación génica precisa y eficiente (Waga and Stillman, 1998).

Desde finales de la década de los 50 del siglo pasado, se sabe, gracias a los experimentos realizados por Meselson y Stahl (Meselson and Stahl, 1958), que la replicación del DNA se lleva a cabo de forma semiconservativa: la doble hélice se abre y cada cadena parental sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena. De esta forma, cada una de las dos nuevas moléculas de DNA estará compuesta por una cadena de la molécula parental original y una cadena nueva recién sintetizada.

El proceso de replicación puede dividirse en tres fases: iniciación, elongación y terminación. La primera de ellas se lleva a partir de elementos cromosómicos denominados orígenes de replicación. Estos orígenes varían de manera significativa entre los distintos organismos, aunque suelen compartir características comunes. En primer lugar, los sitios de origen son segmentos de DNA concretos que contienen secuencias cortas repetidas. En segundo lugar, dichas secuencias repetidas son ricas en adeninas y timinas, para facilitar el desenrollamiento de la doble hélice. Y tercero, las secuencias repetitivas son reconocidas por una o varias proteínas específicas de unión a DNA, denominadas proteínas iniciadoras, las cuales son necesarias para que se ensamble toda

la maquinaria de replicación o replisoma (Patiño and López, 2006). Una vez que la doble hélice se abre y se une toda la maquinaria enzimática se forman una o dos estructuras denominadas horquillas replicativas, dependiendo de si la replicación se va a llevar a cabo de manera unidireccional o bidireccional, respectivamente.

Una vez se ha completado la fase de iniciación, comienza la elongación. En esta fase se inicia y continua la polimerización de la nueva cadena de DNA mediante la actuación de una enzima denominada DNA polimerasa. Para que pueda completarse la elongación la doble hélice del DNA va abriéndose a medida que avanzan las horquillas. Dicho avance genera una acumulación de superenrollamiento (+) por delante de las horquillas, que si no se elimina llegará a impedir la apertura de la doble hélice y por tanto, la replicación se verá comprometida. La eliminación de la tensión que se acumula en la zona no replicada puede ser eliminada por dos mecanismos. El primero se basa en la actuación de diferentes topoisomerasas por delante de la horquilla, directamente sobre la zona que presenta el exceso de superenrollamiento. El segundo mecanismo consiste en la rotación de las horquillas replicativas, consiguiendo que el exceso de superenrollamiento difunda a la región ya replicada en forma de pre-encadenados. Los pre-encadenados deberán ser eliminados por las topoisomerasas antes de que finalice la replicación, ya que si no darán lugar a moléculas encadenadas causando problemas en la segregación. Ambos mecanismos parecen ser usados por las células de forma combinada durante el proceso de elongación (Figura 6) (Schalbetter et al., 2015).

Sin embargo, en la actualidad no hay un consenso entre la comunidad científica acerca de si esto sucede realmente así. Hay un grupo de autores que afirman que la maquinaria de replicación se encuentra anclada a la membrana y que por tanto, las horquillas replicativas no pueden girar *in vivo* nunca (Levine et al., 1998).

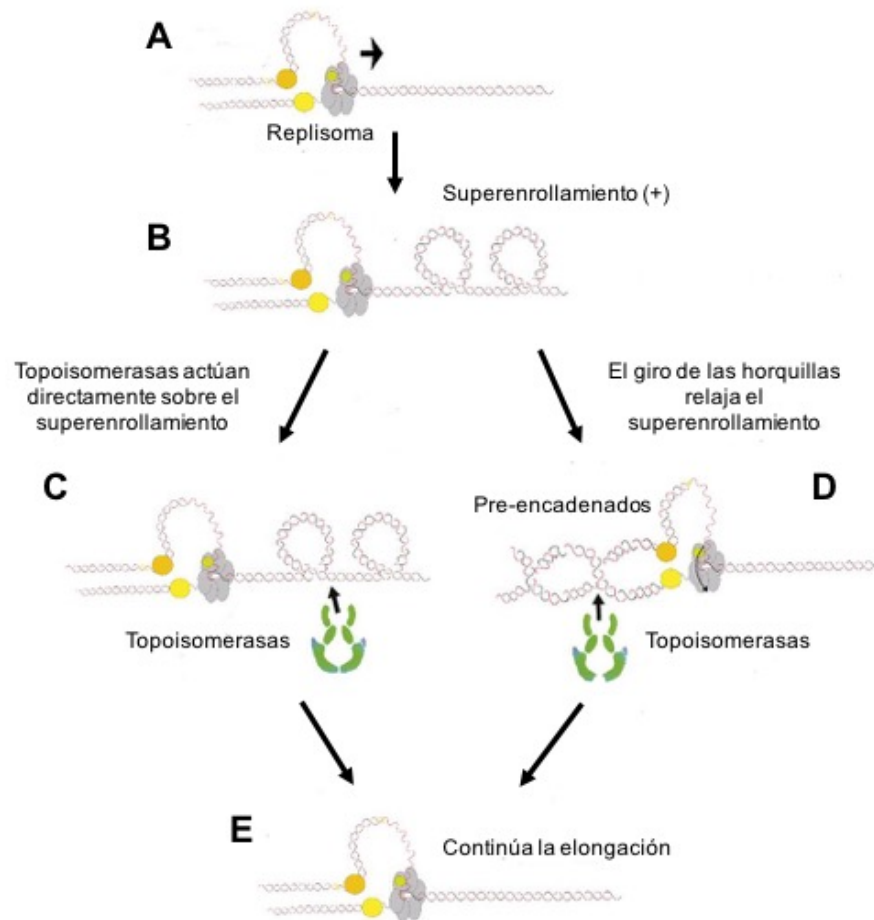


Figura 6. Modelo de generación de superenrollamiento (+) por delante del replisoma y relajación del mismo durante el proceso de elongación de la replicación del DNA. **A:** Durante el proceso de elongación se separan las dos hebras del DNA parental. **B:** Esta separación provoca la acumulación de superenrollamiento (+) por delante de la horquilla replicativa. Dicho superenrollamiento puede ser eliminado de dos formas. **C:** Distintas topoisomerasas actúan directamente sobre el superenrollamiento o **D:** la tensión acumulada hace que las horquillas giren, difundiendo el superenrollamiento a la región ya replicada en forma de pre-encadenados, donde actúan las topoisomerasas. **E:** Cuando la tensión acumulada es liberada, la elongación puede continuar. Adaptada de (Schalbetter et al., 2015).

Cuando el proceso de elongación finaliza el DNA está completamente copiado y se puede llevar a cabo la última fase: la terminación. Esta fase varía en función de si la molécula de DNA que ha sido duplicada es circular o lineal. Cuando el DNA es lineal, como es el caso de los cromosomas eucariotas, posee unos extremos especiales llamados telómeros. Los telómeros consisten en secuencias repetitivas ricas en guanina, que necesitan una enzima especial, la telomerasa, para ser replicados. En moléculas de DNA circulares, la terminación tiene lugar cuando las dos horquillas se encuentran a 180° de la

iniciación, siempre y cuando la replicación se haya llevado a cabo de manera bidireccional y no haya habido ningún impedimento durante la fase de elongación. Por el contrario, si la replicación ha sido unidireccional, la terminación tendrá lugar cuando la horquilla alcance otra vez el origen de replicación. Finalmente, una enzima denominada ligasa, une covalentemente las dos hebras hijas, creando dos moléculas circulares de doble cadena (Lewin et al., 1993; O'Donnell et al., 2013). Cuando finaliza el proceso de replicación en una molécula de DNA circular, el resultado son dos moléculas encadenadas. Estas moléculas tienen que ser desencadenadas por la acción de las topoisomerasas para que la segregación pueda llevarse a cabo correctamente y no surjan problemas de aneuploidía.

1.7 Métodos de análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas

Uno de los primeros métodos utilizados para el análisis de moléculas de DNA con distintas formas topológicas fue la centrifugación en gradientes de densidad (Vinograd et al., 1965) utilizando por ejemplo gradientes de Cloruro de Cesio. Años más tarde este método fue sustituido por la electroforesis en geles de agarosa, técnica mucho más versátil que permite diferenciar no solo moléculas superenrolladas sino también encadenadas y/o anudadas con distinto número de cruces (Shishido et al., 1989; Shishido et al., 1987; Stasiak et al., 1996; Sundin and Varshavsky, 1980, 1981; Vologodskii et al., 1998). Dentro de la electroforesis en geles de agarosa, merece especial atención la electroforesis bidimensional, ya que es la única que permite la identificación simultánea de todos los topoisómeros de una población (Martin-Parras et al., 1998).

Existen otras técnicas que permiten el estudio de moléculas individuales. Las dos técnicas más usadas son: la microscopía electrónica y, más recientemente, la microscopía de fuerza atómica. En ambas técnicas es muy importante engrosar el DNA con la proteína RecA para poder determinar correctamente el signo de cada cruce en moléculas superenrolladas, encadenadas y/o anudadas (Lopez et al., 2012; Sogo et al., 1999; Yamaguchi et al., 2000).

1.7.1 Electroforesis bidimensional en geles de agarosa

La electroforesis bidimensional en geles de agarosa fue utilizada originalmente para separar intermediarios de recombinación ramificados de moléculas lineales (Bell and Byers, 1983). Posteriormente, esta técnica fue adaptada para analizar RIs lineales (Brewer and Fangman, 1987). Hoy en día tiene múltiples utilidades: mapeo de orígenes de replicación (Brewer and Fangman, 1987; Gahn and Schildkraut, 1989; Schwartzman et al., 1990; Vaughn et al., 1990; Villwock and Aparicio, 2014), términos (Santamaria et al., 2000a; Santamaria et al., 2000b; Zhu et al., 1992) y barreras para el progreso de las horquillas (Brewer and Fangman, 1988; Hernandez et al., 1993; Linskens and Huberman, 1988; Little et al., 1993; Wiesendanger et al., 1994). Además, permite resolver las distintas formas que adquieren las CCCs (Lucas et al., 2001; Martin-Parras et al., 1991; Schwartzman et al., 1990). La posibilidad de añadir un agente intercalante durante el desarrollo de la primera y/o la segunda dimensión aumenta aún más su poder de resolución (Martin-Parras et al., 1998).

Esta técnica, que se realiza en dos etapas, se basa en que la movilidad electroforética de una molécula de DNA en un gel de agarosa depende no solo de 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 la molécula. La primera dimensión transcurre en condiciones de bajo voltaje y bajo porcentaje de agarosa. De esta forma se consigue que las moléculas de DNA se separen, fundamentalmente, en función de su masa. La segunda dimensión, que corre perpendicular a la primera, transcurre en condiciones de alto voltaje y alto porcentaje de agarosa, separándose las moléculas, principalmente, en función de su forma (Martin-Parras et al., 1998). De este modo se consigue analizar mezclas de poblaciones de moléculas con distintas masas y formas. Además, la intensidad de las señales indica la abundancia relativa de cada población en la mezcla. Las poblaciones más abundantes darán lugar a señales más intensas.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el análisis por electroforesis bidimensional el superenrollamiento enmascara las moléculas anudadas. Por tanto, para visualizar nudos en una electroforesis es necesario producir roturas de cadena sencilla que eliminen el superenrollamiento (Stasiak et al., 1996).

1.7.1.1 Análisis de moléculas de DNA intactas

Las moléculas circulares de DNA pueden adoptar distintas conformaciones *in vivo*. Utilizando distintos métodos se han podido caracterizar monómeros, multímeros y diferentes tipos de encadenamientos y anudamientos (Dean et al., 1985; Shishido et al., 1989; Sundin and Varshavsky, 1980, 1981). Como ya se mencionó anteriormente, la electroforesis bidimensional permite el análisis e identificación simultánea de los distintos topoisómeros de todas estas poblaciones (Martin-Parras et al., 1998).

Las moléculas intactas de DNA, tras ser sometidas a una electroforesis bidimensional, generan los patrones que se representan en la Figura 7A. La señal que aparece en la parte inferior derecha corresponde a las formas superenrolladas de monómeros, que no están replicando en el momento en que se detiene el cultivo, y se denominan CCCms (Martin-Parras et al., 1998; Schwartzman et al., 1990). Durante el proceso de extracción del DNA, estas moléculas pueden sufrir roturas de cadena sencilla, dando lugar a moléculas monoméricas relajadas, OCms. Uniendo ambas señales se observa un arco que corresponde a los distintos topoisómeros de monómeros con distinto grado de superenrollamiento, los Scms (en color negro). En caso de que haya multímeros, éstos aparecen formando un segundo arco (en color azul) que parte de la señal de OCms. Los distintos tipos de monómeros encadenados (CatAs, CatBs y CatCs, en verde) dan lugar a tres arcos alrededor de los OCms. Por último, si el material de DNA se trata con una endonucleasa de restricción de cadena sencilla, se revelan las moléculas anudadas: los monómeros anudados (Knms), en color naranja, y los dímeros anudados (Knds), en magenta.

1.7.1.2 Análisis de moléculas de DNA digeridas

Otra aplicación de la electroforesis bidimensional es separar los RIs y el resto de moléculas ramificadas de las moléculas no replicadas. Para conseguir esto de una manera más eficiente, se añade un agente intercalante, generalmente bromuro de etidio (EthBr), durante la segunda dimensión. De esta forma se consigue que las moléculas de DNA pierdan elasticidad y se vuelvan más rígidas potenciando la influencia de su estructura

tridimensional. Bajo estas condiciones, las moléculas ramificadas tienen menos movilidad que las moléculas lineales de igual masa.

Las moléculas de DNA digeridas, tras haberlas sometido a una electroforesis bidimensional, dan lugar a una serie de patrones básicos que se muestran en la Figura 7B. Si el fragmento analizado no contiene un origen de replicación y, por tanto, es replicado por una horquilla que entra por un extremo, recorre el fragmento y sale por el otro extremo dará lugar a un patrón denominado arco de Y simples (Figura 4B, en color verde). Este arco parte de la señal 1,0x, que corresponde al fragmento de DNA lineal no replicado, y termina en la señal del 2,0x, correspondiente a las moléculas completamente replicadas y cuya masa es el doble del fragmento no replicado. Las señales de 1,0x y 2,0x están unidas mediante el arco de lineales (Figura 7B, en color negro). El punto de inflexión del arco de Y simples indica el sitio donde migran las moléculas que han sido replicadas al 50%, es decir 1,5 veces (1,5x) de su masa. Estas moléculas son las más complejas, con tres brazos de la misma longitud, por lo que su movilidad en segunda dimensión es menor. Cuando el fragmento en estudio no contiene un origen de replicación y es replicado por dos horquillas que entran a la vez por ambos extremos y progresan a la misma velocidad, el encuentro de las mismas se produce exactamente en el centro del fragmento, obteniéndose la forma de una X. El patrón que se observa en este caso se denomina arco de Y dobles (Figura 7B, en color morado). Este patrón parte de la señal 1,0x y describe una línea recta inclinada que finaliza sobre el arco de recombinantes, que se describe más adelante. Otra posibilidad es que el fragmento en estudio contenga un origen de replicación bidireccional en el centro del fragmento. En este caso el movimiento de las horquillas hacia ambos lados genera RIs con una burbuja interna cuyo tamaño aumenta a medida que el fragmento es replicado. El patrón generado en este caso se denomina arco de burbujas (Figura 7B, en color rojo) y tiene su origen en el 1,0x. Este arco tiene una inflexión característica hacia el final de la línea, debido a que cuando la masa de los RIs con una burbuja interna se aproxima al 2,0x su estructura se hace menos compleja lo que provoca un ligero aumento de su movilidad electroforética. También puede suceder que el fragmento en estudio contenga un origen de replicación que no se encuentre situado en el centro del fragmento. En este caso el patrón esperado es un patrón mixto, entre burbuja e Y simples, que variará en función de la posición del origen.

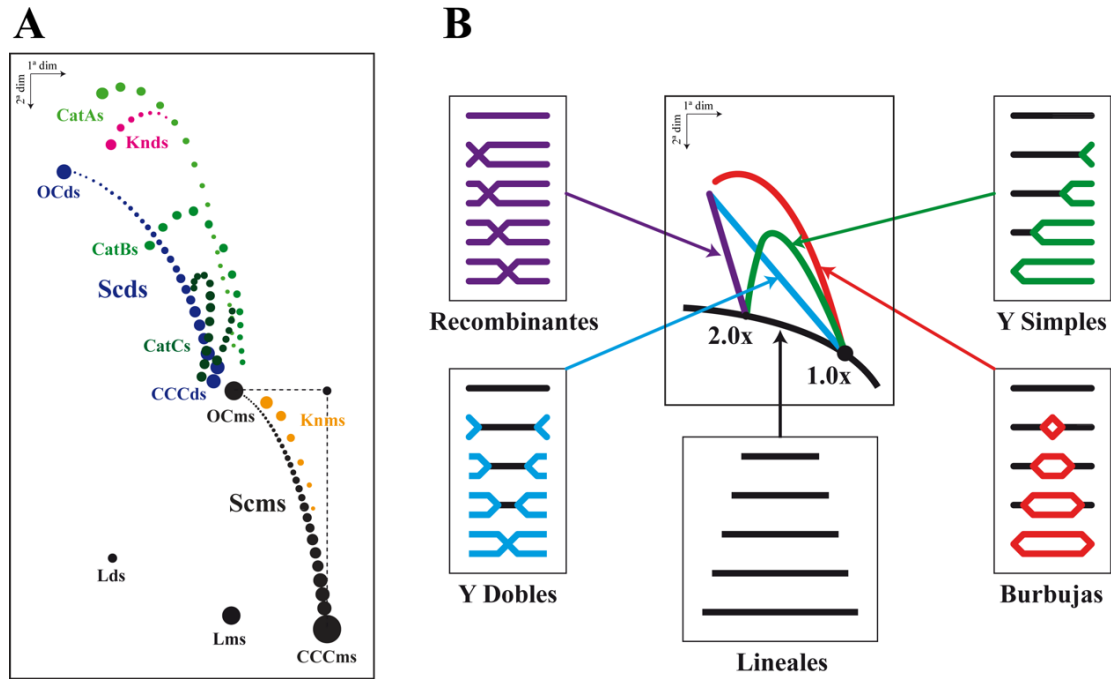


Figura 7. Esquemas de los patrones de hibridación generados por topoisómeros de moléculas circulares de DNA intactas (A) y por RIs lineales (B) al analizarlos por electroforesis bidimensional.
A: En color negro se representan los monómeros superenrollados (Scms) y los lineales de monómeros y dímeros (Lms y Lds). En color azul se representan los dímeros superenrollados (Scds). En color verde se ilustran las tres poblaciones de moléculas encadenadas (CatAs, CatBs y CatCs). En color naranja se muestran los monómeros anudados (Knms) y, por último, en color magenta los dímeros anudados (Knds).
B: En color rojo se muestra el arco de burbujas resultante cuando los fragmentos son replicados a partir de un origen bidireccional situado en posición central. En color verde se ilustra el arco de Y simples generado cuando el origen de replicación se encuentra fuera del fragmento analizado y éste es replicado por una horquilla que recorre el fragmento de un extremo al otro. En azul se representa el arco de Y dobles que tiene lugar cuando el fragmento es replicado por dos horquillas que entran simultáneamente por los dos extremos, progresan a la misma velocidad y se encuentran en el centro del fragmento, donde tiene lugar la terminación. En color morado se representa el arco de recombinantes y en negro el arco formado por las moléculas lineales no replicadas de diferentes tamaños.

Además de analizar los distintos RIs, utilizando geles bidimensionales, también es posible estudiar los intermediarios de procesos de recombinación. En este caso, la señal correspondiente al arco de recombinantes (Figura 7B, en color azul) se observa como una línea recta ligeramente inclinada que parte de la señal del 2,0x situada sobre el arco de lineales. Está constituida por moléculas con una masa 2,0x que presentan distinta movilidad electroforética durante la segunda dimensión en función del sitio donde se haya producido la recombinación. La molécula en la cual la recombinación ha tenido lugar en el centro de los dos fragmentos recombinantes es la que presenta una menor movilidad, ya que es la más compleja al estar formada por 4 brazos de la misma longitud. Por el

contrario, la más sencilla, y que por tanto presenta una mayor movilidad es aquella en la que la recombinación ha tenido lugar en uno de los extremos de los dos fragmentos (Bell and Byers, 1983). Esta molécula es casi lineal y migra prácticamente sobre el arco de lineales.

Los geles bidimensionales también permiten detectar barreras para el progreso de las horquillas de replicación. La existencia de una barrera de replicación dentro del fragmento analizado implica la acumulación de un RI porcentualmente más representado que el resto en la población. Por tanto, la barrera se detecta como una señal puntual de mayor intensidad sobre el arco correspondiente.

2. OBJETIVOS

1. Comprobar si las horquillas de replicación pueden girar libremente *in vivo* durante el proceso de replicación en *E. coli*.
2. Confirmar el número de barreras presentes en las rRFBs de *S. cerevisiae* y analizar su estabilidad.
3. Estudiar la eficiencia de las rRFBs deteniendo horquillas y su modulación mediante la sobreexpresión de la proteína Fob1.
4. Determinar si la unión de proteínas iniciadoras de la replicación induce cambios en la topología del DNA en minicromosomas derivados de genomas víricos en células humanas (HEK293).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material biológico y medios de cultivo

3.1.1 Bacterias

Las estirpes de *E. coli* utilizadas 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*. Cedida por el Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba.
- **parE10**: W3110 F- excepto [*parE10 recA-*]. Cedida por el Dr. Ian Grainge (Kato et al., 1990).

Ambas estirpes fueron crecidas en LB líquido (triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y cloruro sódico 1%, pH 7,5) con agitación orbital (250 rpm) a 30 °C en el caso de células parE10 y a 37 °C en el caso de células DH5 α F'. Para la selección de transformantes se utilizó ampicilina a una concentración de 75 μ g/ml.

La inhibición de la Topo IV en la estirpe parE10, la cual posee una mutación termosensible en el gen parE, se consiguió creciendo el cultivo a 30 °C (temperatura permisiva) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial e incubándolo después 1 h a 43 °C (temperatura restrictiva), temperatura a la cual la Topo IV se inactiva.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio LB al que se añadió agar (Pronadisa) al 2 %. Las placas se incubaron invertidas en estufa a 30 °C ó 37 °C durante 16-18 h.

3.1.2 Levaduras

Las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas fueron:

- **top2-td** (Y1818): YST114 *kanMX-tTA-tetO2-UB-DHFRts-myc-top2*. Esta estirpe proviene de YST114, la cual ha sido modificada para poder inhibir la topo 2 mediante un degrón inducible por temperatura (Diffley, 2004; Tanaka and

Diffley, 2002). Estas estirpes fueron cedidas por el Dr. Jonathan Baxter. YST114: W303-1a *ubr1Δ::GAL1, 10p-Myc-UBR1::HIS3 leu2::pCM244 x3*

- **BY4741:** *MATa his3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ*. Cedida por el Dr. Luis Aragón.
- **GAL-3HA-FOB1:** *MATa his3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ Gal-Fob1-3HA*. Esta cepa deriva de la anterior. El gen *FOB1* está clonado bajo el promotor inducible de galactosa. Además, a continuación del gen *FOB1* se han añadido tres epítomos de hemaglutinina (HA), que permiten utilizar un anticuerpo anti-HA para detectar mediante inmunodetección la cantidad de Fob1. Cedida por el Dr. Luis Aragón.

Los cultivos en medio líquido se crecieron en agitación orbital (250 rpm), a 25 °C en el caso de células top2-td o a 30 °C en el caso de las otras dos estirpes. Para crecer las células sin transformar y para sincronizarlas cuando ya estaban transformadas con los minicromosomas se utilizó medio completo YEP (extracto de levadura 1 %, bactopectona 2%, adenina 60 mg/ml, pH 5,6). Para la selección de la auxotrofia de las células transformadas se usó un medio YNB selectivo sin uracilo (Ura⁻) que contenía bases nitrogenadas de levaduras sin aminoácidos 0,7 % y mezcla de aminoácidos a excepción de uracilo (pH 4,5). A ambos medios se les añadió rafinosa al 2% en el caso de células top2-td, glucosa al 2 % para células BY4741 o galactosa al 2 % en el caso de células GAL-3HA-FOB1 para sobreexpresar Fob1.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro con el medio correspondiente al cual se añadió agar (Pronadisa) al 2 %. Las placas se incubaron invertidas en una estufa a la temperatura requerida entre 2 y 3 días.

3.1.2.1 Sincronización de los cultivos de *S. cerevisiae*

Las tres estirpes de levaduras utilizadas en la presente Tesis Doctoral son haploides del tipo sexual a y, por tanto, responden a la feromona α -factor (Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Pro-Met-Tyr) que provoca una parada en la fase G1 del ciclo celular. Cuando las células quedan detenidas en G1 adquieren una morfología característica que se denomina *shmoo* (células sin gema, alargadas y con el núcleo

también alargado), que es detectable por microscopía óptica (Pruyne and Bretscher, 2000).

La sincronización de los cultivos en crecimiento exponencial se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Breeden (Breeden, 1997), incluyendo algunas modificaciones. Las células se crecieron hasta saturación en medio selectivo Ura⁻ con el azúcar adecuado al 2 %, en agitación orbital (250 rpm) y a la temperatura requerida según la estirpe. Seguidamente, las células se diluyeron en medio completo YPD y se dejaron crecer hasta alcanzar la fase exponencial (aproximadamente 1×10^7 células/ml). En este punto, las células se detuvieron en fase G1 añadiendo *α -factor* (síntesis en el servicio de Química de Proteínas en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC)) al cultivo a una concentración final de 10 μ g/ml. Tras 150-180 minutos de incubación, se comprobó en el microscopio óptico que más del 90% de las células presentaban morfología *shmoo*. Las células se liberaron del bloqueo con 4 lavados con medio de cultivo completo YPD (centrifugando 2 min a 4.000 rpm) y se colocaron en un matraz para su crecimiento. Las células se recogieron a los 30-40 minutos (tomando tiempo 0 como el momento del primer lavado), deteniendo el crecimiento con azida sódica al 0,1 % y centrifugando el cultivo a 4 °C durante 10 min a 4.000 rpm. Finalmente, se realizaron dos lavados con agua destilada, estéril y fría centrifugando en las mismas condiciones.

3.1.3 Células humanas

La línea celular utilizada fue la HEK293. Esta línea celular, creada en el laboratorio del Dr. Alex van der Eb, deriva de células embrionarias de riñón humano, las cuales fueron transformadas con fragmentos de DNA del adenovirus de tipo 5 (Graham et al., 1977). Años más tarde se supo que la transformación resultó de la incorporación de 4,5 Kb del brazo izquierdo del genoma viral en el cromosoma 19 de las células HEK (Louis et al., 1997). En la presente Tesis Doctoral, se han utilizado dos líneas celulares que derivan de la original:

- **HEK293T**: expresan el Antígeno T del virus SV40 de manera constitutiva. Cedida por la Dra. Marta Fierro.

- **HEK293E**: expresan la proteína EBNA1 del virus EBV constitutivamente. Cedida por el Dr. John Jates.

Estas células fueron crecidas en medio básico Eagle Modificado por Dubelco, DMEM (Gibco), complementado con suero fetal bovino (Sigma) inactivado a 65 °C durante 30 min a una concentración final del 10 % (v/v), 100 U/ml de penicilina (Life Technologies, Inc.), 100 µg/ml de estreptomicina (Life Technologies, Inc.) y L-glutamina 2 mM (Gibco). Las células se incubaron a 37 °C, en una atmósfera de 95 % de humedad y 5 % de CO₂.

3.2 Plásmidos y minicromosomas

3.2.1 Plásmidos bacterianos

pBR-*TerE*@*StyI* (4385 pb): es un derivado de pBR322-*TerE*@*StyI* (Olavarrieta et al., 2002a) construido por V. López y M.L. Martínez-Robles (Lopez et al., 2012). Contiene la secuencia terminadora de la replicación *TerE* del cromosoma de *E. coli* en el sitio *StyI*. Dicha secuencia se encuentra en la posición adecuada para bloquear el progreso de las horquillas de replicación que se inicial en el origen unidireccional ColE1 (Figura 8A). Esta estrategia permite obtener un número significativo de RIs con la horquilla de replicación detenida en la secuencia *TerE*, cuando ha alcanzado el 26 % de su replicación. De este modo los RIs acumulados contienen una burbuja interna y su masa es 1,26 veces la masa del plásmido no replicado (Figura 8B y C).

pBR-*TerE*@*AatII* (4449 pb): es un derivado de pBR322-*TerE*@*AatII* (Olavarrieta et al., 2002a) construido por V. López y M.L. Martínez-Robles (Lopez et al., 2012). En este caso, la secuencia terminadora de la replicación *TerE* está clonada en el sitio *AatII* (Figura 9A). Por tanto, se acumularán RIs con la horquilla detenida cuando esta ha alcanzado el 60 % de su replicación, teniendo una masa 1,60 veces la masa del plásmido no replicado (Figura 9B y C).

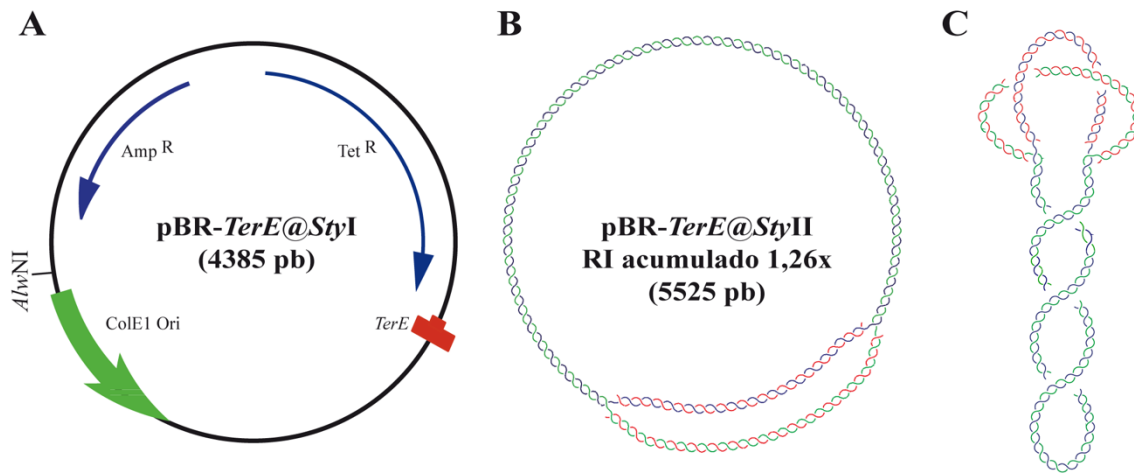


Figura 8. Mapa del plásmido pBR-TerE@StyI. A: Mapa del plásmido donde se indica la posición y orientación de los elementos principales: origen de replicación ColE1 (en color verde), secuencia terminadora de la replicación *TerE* (en color rojo) y los genes que confieren resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda) y a tetraciclina (flecha azul a la derecha). El sitio de corte de la enzima de restricción *AlwNI* aparece señalado en el mapa. B y C: Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla de replicación se detiene al alcanzar la secuencia *TerE*. Dicho intermediario se representa en estado relajado (B) y con un $\Delta LK = -4$ (C). La doble hélice parental se representa en azul y verde y las cadenas nacientes en rojo.

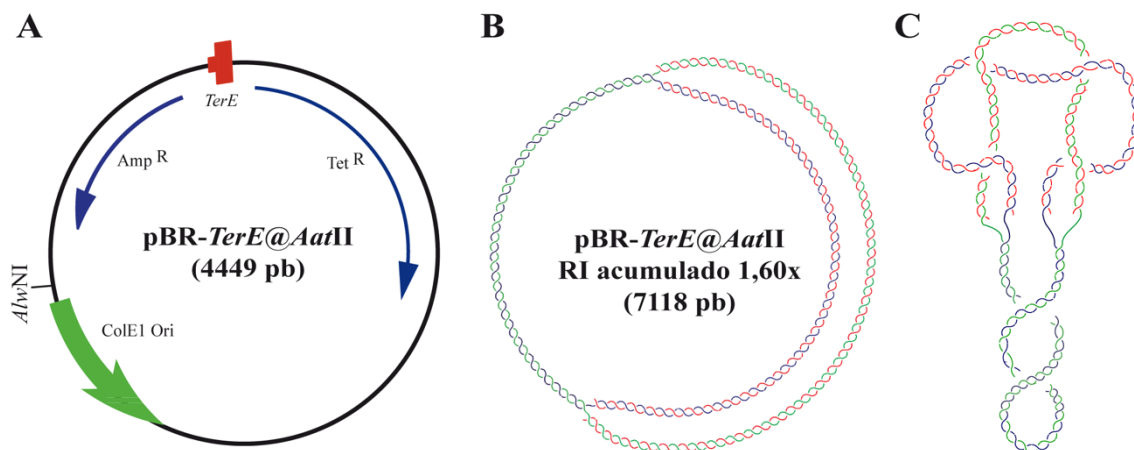


Figura 9. Mapa del plásmido pBR-TerE@AatII. A: Mapa del plásmido donde se indica la posición y orientación de los elementos principales: origen de replicación ColE1 (en color verde), secuencia terminadora de la replicación *TerE* (en color rojo) y los genes que confieren resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda) y a tetraciclina (flecha azul a la derecha). El sitio de corte de la enzima de restricción *AlwNI* aparece señalado en el mapa. B y C: Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla de replicación se detiene al alcanzar la secuencia *TerE*. Dicho intermediario se representa en estado relajado (B) y con un $\Delta LK = -4$ (C). La doble hélice parental se representa en azul y verde y las cadenas nacientes en rojo.

pBR-*TerE*@*DraI* (4433 pb): es un derivado de pBR322-*TerE*@*DraI* (Olavarrieta et al., 2002a) construido por V. López y M.L. Martínez-Robles (Lopez et al., 2012). Contiene la secuencia terminadora *TerE* en el sitio *DraI* (Figura 10A). En este plásmido la horquilla se detiene cuando los RIs han alcanzado el 80 % de la replicación y su masa es 1,80 veces la masa del plásmido no replicado (Figura 10B y C).

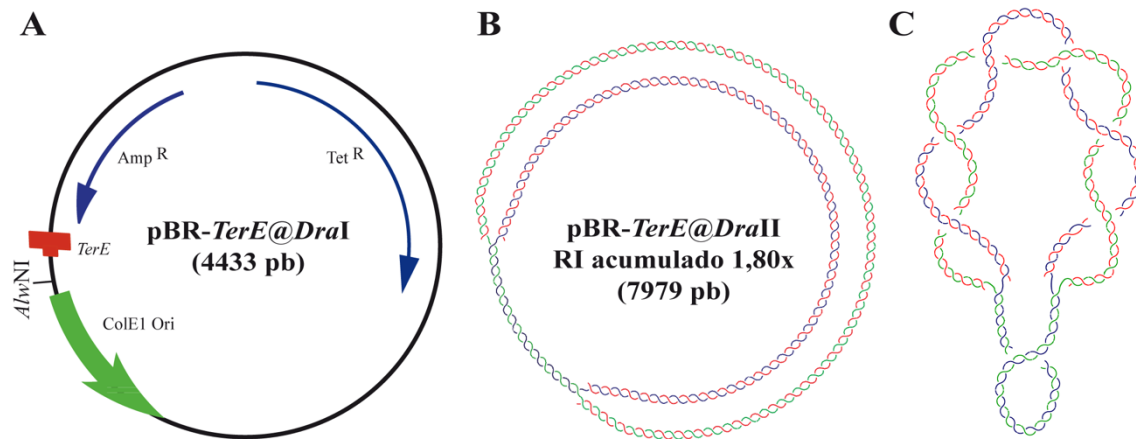


Figura 10. Mapa del plásmido pBR-*TerE*@*DraI*. A: Mapa del plásmido donde se indica la posición y orientación de los elementos principales: origen de replicación ColE1 (en color verde), secuencia terminadora de la replicación *TerE* (en color rojo) y los genes que confieren resistencia a ampicilina (flecha azul a la izquierda) y a tetraciclina (flecha azul a la derecha). El sitio de corte de la enzima de restricción *AlwNI* aparece señalado en el mapa. B y C: Esquema del RI que se acumula cuando la horquilla de replicación se detiene al alcanzar la secuencia *TerE*. Dicho intermediario se representa en estado relajado (B) y con un $\Delta LK = -4$ (C). La doble hélice parental se representa en azul y verde y las cadenas nacientes en rojo.

3.2.2 Minicromosomas artificiales de levaduras

Minicromosoma pYAC_MEM (7966 pb): deriva de un plásmido replicativo de levadura llamado pRS316 (Sikorski and Hieter, 1989). Sobre este plásmido se realizaron una serie de manipulaciones (Cebrián et al., 2014) hasta conseguir el pYAC_MEM (Figura 11).

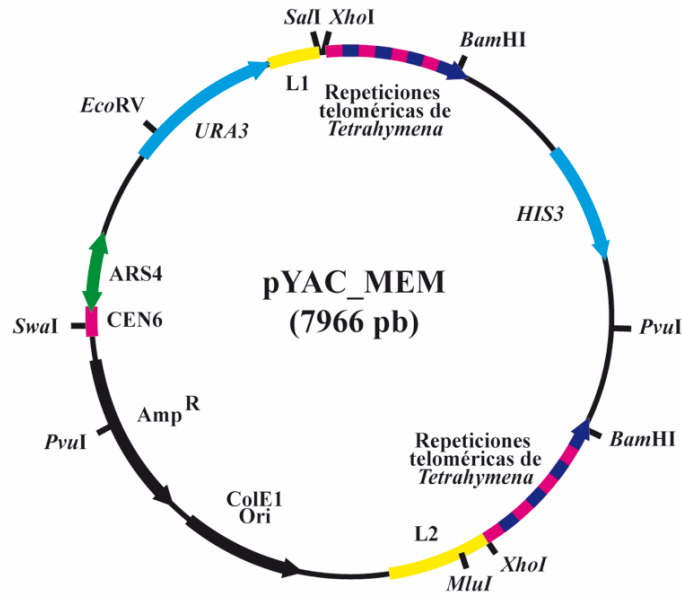


Figura 11. Mapa del minicromosoma pYAC_MEM. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes: secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde) la cual funciona como origen bidireccional de replicación en levaduras, centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del minicromosoma durante la división celular de las levaduras, origen de replicación bacteriano (ColE1 Ori, en color negro), gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, en color negro), genes URA3 e HIS3 (en color azul), las dos secuencias teloméricas de *Tetrahymena Thermophila* (en color rosa y morado) y dos secuencias que derivan del fago λ (L1 y L2, en color amarillo). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de algunas enzimas de restricción.

Minicromosoma pYAC_MEM_RFB+ o pYAC_MEM_3rRFBs+ (8908 pb): es un derivado de pBB6-RFB+ (Benguria et al., 2003; Brewer et al., 1992). pBB6-RFB+ se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* para aislar el fragmento que contiene la RFB. Dicho fragmento se insertó en el sitio *SalI* del minicromosoma pYAC_MEM, obteniéndose pYAC_MEM_RFB+, también llamado pYAC_MEM_3rRFBs+ (Figura 12).

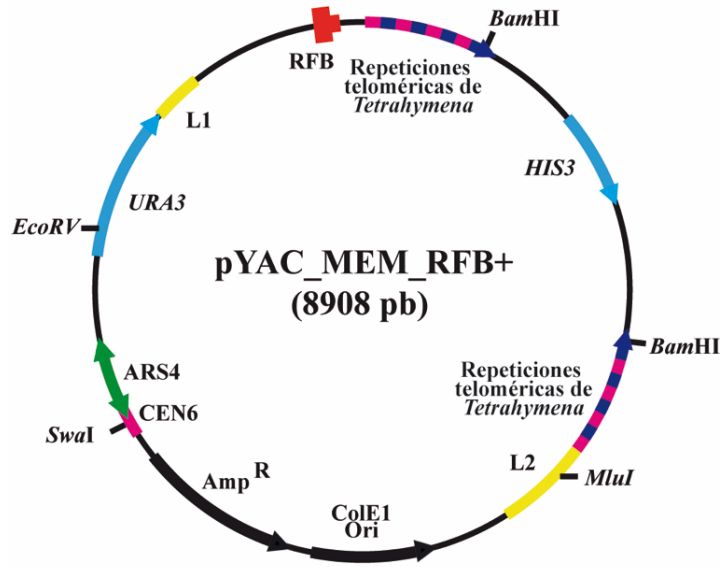


Figura 12. Mapa del minicromosoma pYAC_MEM_RFB+. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes: secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde), la cual funciona como origen bidireccional de replicación en levaduras, centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del minicromosoma durante la división celular de las levaduras, origen de replicación bacteriano (ColE1 Ori, en color negro), gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, en color negro), genes URA3 e HIS3 (en color azul), las dos secuencias teloméricas de *Tetrahymena Thermophila* (en color rosa y morado), dos secuencias que derivan del fago λ (L1 y L2, en color amarillo) y la secuencia que contiene la RFB (en color rojo). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de algunas enzimas de restricción.

Minicromosoma pYAC_AC_3'rRFBs+ (8175 pb): para construir este minicromosoma se sintetizó un fragmento de DNA de 209 pb (*GeneWiz Service*, Sigma). Dicho fragmento contenía las 186 pb que forman el subfragmento 7 descrito por Kobayashi (Kobayashi, 2003) pero se añadieron 23 pb entre la RBF2 y la RFB 3 (subrayadas en la siguiente secuencia de DNA):

```

GTAACTATAGGAAATGAGCTTTTCTCAATTCTCTAAACTTATAACAAGCACT
CATGTTTGCCGCTCTGATGGTGC GGAAAAACTGCTCCATGAAGCAA ACTG
TCCGGGCAAATCCAAGTGGTATTC CGTAAGAACA ACTTTCACGCTCGGGAA
GCTTTGTGAAAGCCCTTCTCTTTCAACCCATCTTTGCAACGAAAAAAA
  
```

Este fragmento de DNA se clonó en el sitio *SaI* de pYAC_MEM obteniéndose el minicromosoma que se muestra en la Figura 13.

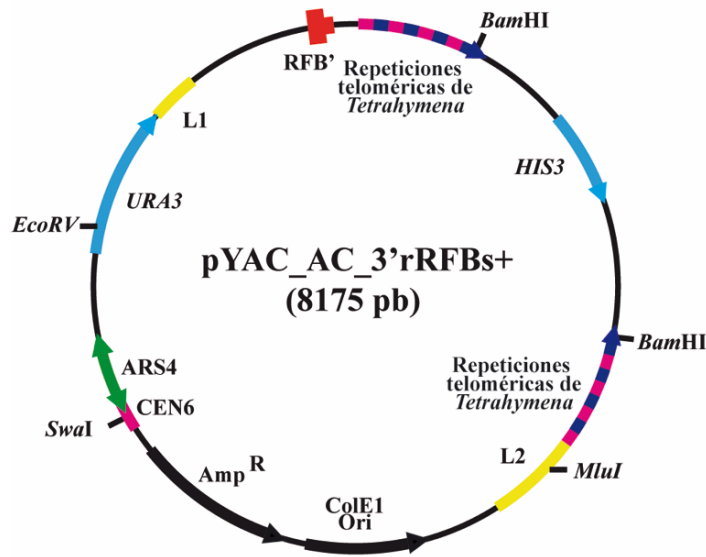


Figura 13. Mapa del minicromosoma pYAC_AC_3'rRFBs+. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes: secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde), la cual funciona como origen bidireccional de replicación en levaduras, centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del minicromosoma durante la división celular de las levaduras, origen de replicación bacteriano (ColE1 Ori, en color negro), gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, en color negro), genes URA3 e HIS3 (en color azul), las dos secuencias teloméricas de *Tetrahymena Thermophila* (en color rosa y morado), dos secuencias que derivan del fago λ (L1 y L2, en color amarillo) y la secuencia que contiene la RFB modificada (en color rojo). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de algunas enzimas de restricción.

Minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+ (8914 pb): se sintetizó (*GeneWiz Service*, Sigma) una secuencia de 948 pb que contenía 5 repeticiones en tándem de las 186 pb que forman el subfragmento 7 descrito por Kobayashi (Kobayashi, 2003). Este fragmento de DNA se insertó en el sitio *SalI* de pYAC_MEM. El minicromosoma resultante se muestra en la figura 14.

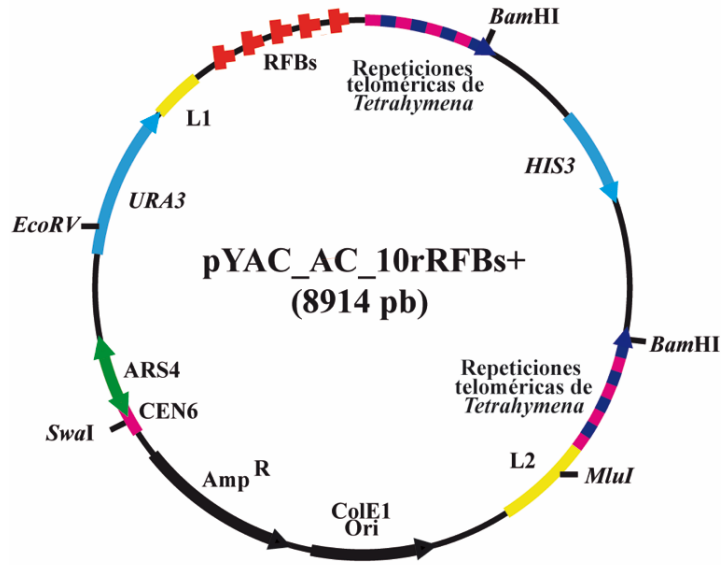


Figura 14. Mapa del minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+. Esquema representativo en el que se detallan los elementos más importantes: secuencia de replicación autónoma (ARS4, en color verde), la cual funciona como origen bidireccional de replicación en levaduras, centrómero (CEN6, en color magenta) que permite la segregación del minicromosoma durante la división celular de las levaduras, origen de replicación bacteriano (ColE1 Ori, en color negro), gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^R, en color negro), genes URA3 e HIS3 (en color azul), las dos secuencias teloméricas de *Tetrahymena Thermophila* (en color rosa y morado), dos secuencias que derivan del fago λ (L1 y L2, en color amarillo) y la secuencia que contiene 5 repeticiones en tándem de la RFB (en color rojo). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de algunas enzimas de restricción.

3.2.3 Minicromosomas derivados de genomas víricos

pEco3' Δ (6377 pb): deriva del genoma de los virus SV40 y EBV (Dhar and Schildkraut, 1991). Contiene elementos cromosómicos de ambos virus: el origen de replicación de SV40 y la familia de repeticiones presente en el *oriP* de EBV (Figura 15). Cedido por el Dr. Carl Schildkraut.

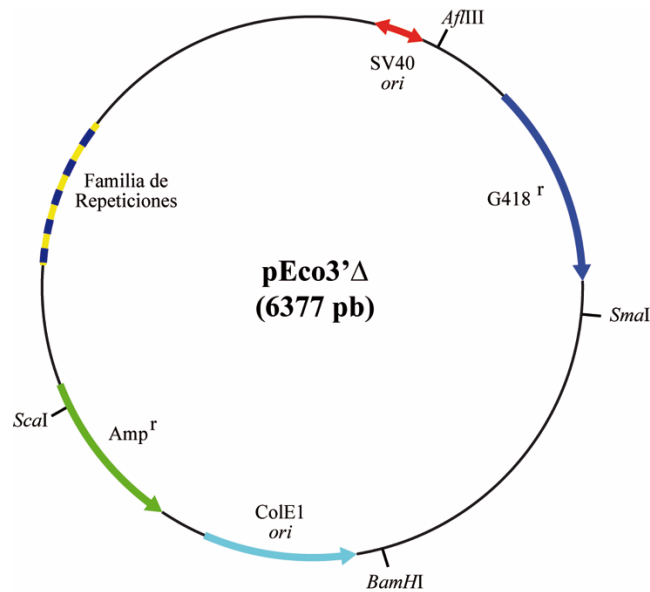


Figura 15. Mapa del minicromosoma pEco3'Δ: En él se muestran los elementos más importantes: origen bidireccional de SV40 (en color rojo), familia de repeticiones del *oriP* de EVB (en color azul y amarillo), origen de replicación bacteriano (ColE1 ori, en color turquesa), gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r , en color verde) y gen que confiere resistencia a geneticina ($G418^r$, en color azul oscuro). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de algunas enzimas de restricción.

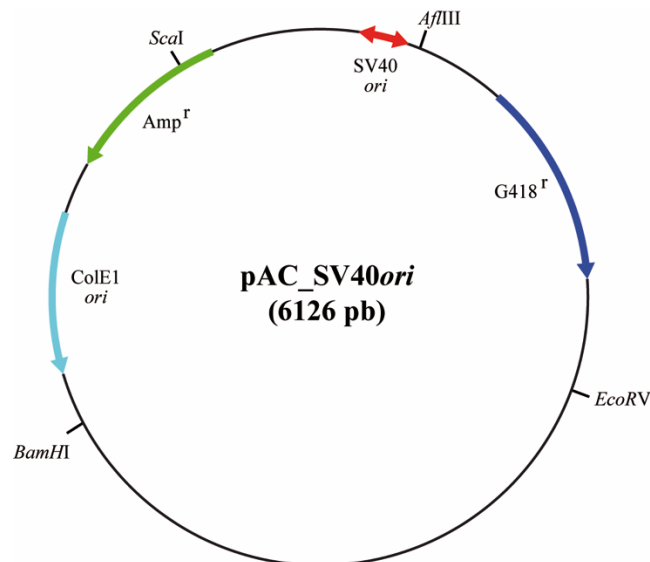


Figura 16. Mapa del minicromosoma pAC_SV40ori: En él se muestran los elementos más importantes: origen bidireccional de SV40 (en color rojo), origen de replicación bacteriano (ColE1 ori, en color turquesa), gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r , en color verde) y gen que confiere resistencia a geneticina ($G418^r$, en color azul oscuro). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de algunas enzimas de restricción.

pAC_SV40ori (6126 pb): es un derivado de pEco3'Δ. Se obtuvo eliminando el fragmento *EcoRI-XhoI* (1680 pb), el cual contenía la familia de repeticiones del *oriP*. Posteriormente, se insertó el fragmento *AvaI* (1437 pb) de pBR18 en el sitio *AvaI* de pEco3'Δ, para aumentar el tamaño del minicromosoma. Se obtuvo el vector que se muestra en la figura 16.

pAC_EBVoriP (6162 pb): deriva de pHEBO (Sugden et al., 1985), cedido por el Dr. Jonh Yates. Este minicromosoma deriva del genoma del virus EBV. Se eliminó el fragmento *SalI-SspI* (842 pb) que no contenía ninguna secuencia de interés. El vector resultante se muestra en la figura 17.

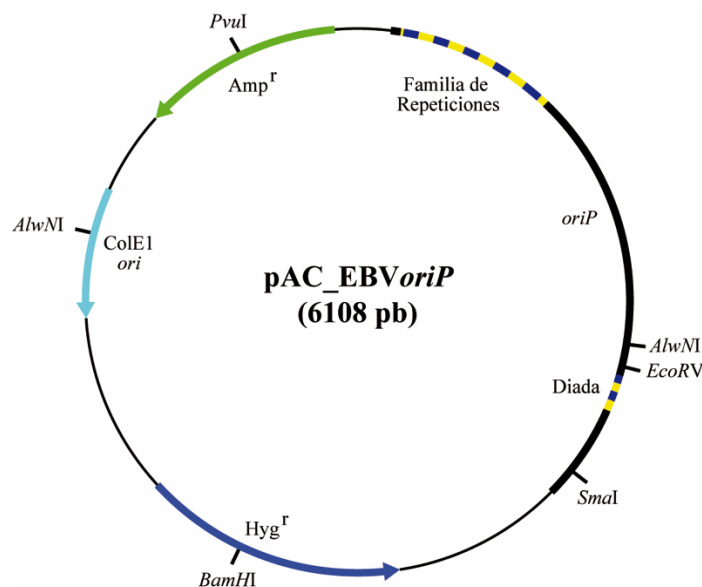


Figura 17. Mapa del minicromosoma pAC_EBVoriP: En él se muestran los elementos más importantes: origen bidireccional de EBV (*oriP*, en color negro) el cual incluye la familia de repeticiones y la diada (ambas en color amarillo y azul), origen de replicación bacteriano (ColE1 ori, en color turquesa), gen que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r , en color verde) y gen que confiere resistencia a higromicina (Hyg^r , en color azul oscuro). En el exterior se indican los sitios de reconocimiento de algunas enzimas de restricción.

pCXWB-EBNA1 (7037 pb): contiene la secuencia que codifica para la proteína vírica EBNA1 (Addgene number: #37624).

3.3 Transformación celular

La preparación de células de *E. coli* competentes y su posterior transformación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de choque térmico descrito por Hanahan (Hanahan, 1983).

En el caso de *S. cerevisiae* la transformación se realizó utilizando acetato de litio, siguiendo el protocolo descrito por Ito y colaboradores (Ito et al., 1983).

Por último, para llevar a cabo las transfecciones en las células HEK293, se cultivaron, el día anterior a la realización del protocolo, 1×10^6 células en una placa de 10 cm (60-70 % de confluencia). El día de la transfección, se inoculó 20 μ l de Lipofectamina 2000 (Life Technologies) en 200 μ l de OptiMEM (Gibco) durante 30-45 min a temperatura ambiente. Se agregó a la mezcla 5-7 μ g de plásmido diluido en 200 μ l de OptiMEM y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se retiró el medio a las células y se lavó con 3 ml de PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na_2HPO_4 8,1mM, KH_2PO_4 1,5 mM, pH 7,4). Se añadió 2 ml de OptiMEM y la solución de Lipofectamina-DNA plasmídico preparada con anterioridad. Se incubó a 37 °C durante 6 h. Pasado este tiempo se añadió 7 ml de medio DMEM completo y se incubó durante 40 h (a las 24 h se reemplazó el medio).

3.4 Extracción del DNA

3.4.1 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

La extracción a pequeña escala de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó mediante la utilización del kit *Nucleo Spin Plasmid* (Nacherey-Nagel). Para la extracción a gran escala se empleó el kit *NucleoBond® Xtra Midi/Maxi* (Nacherey-Nagel). En ambos casos se partió de cultivos saturados.

Para conseguir DNA plasmídico enriquecido en RIs, se utilizaron cultivos de *E. coli* en crecimiento exponencial y se siguió el método de extracción descrito por Viguera y colaboradores (Viguera et al., 1996).

3.4.2 Extracción de DNA plasmídico de *S. cerevisiae*

El protocolo utilizado para la extracción de formas replicativas de DNA en *S. cerevisiae* está basado en el descrito por Huberman y colaboradores (Huberman et al., 1987), al cual se le han introducido algunas modificaciones.

Se partió de células sincronizadas con α -factor, tal y como se ha descrito en el apartado 3.1.2.1 de la presente Tesis. Tras lavar las células dos veces con agua destilada, estéril y fría, se resuspendieron en solución NIB fría (del inglés, *Nuclear Isolation Buffer*; glicerol 17 %, MOPS 50 mM, cloruro de magnesio 2 mM, espermidina 500 μ M y espermina 150 μ M, pH 7,2). La rotura mecánica de la pared celular se realizó a 4 °C, añadiendo esferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec Products) y alternando períodos de 30 segundos de vórtex a máxima velocidad con 30 s de reposo en hielo. Se realizaron el número de ciclos vórtex-descanso necesarios para conseguir que un 90% de las células presentaran su pared rota. Se comprobó utilizando un microscopio óptico. Se dejaron reposar las esferas de vidrio en el fondo del tubo por gravedad y se recogió el sobrenadante que contenía los protoplastos. Las esferas de vidrio se lavaron dos veces con NIB frío y se juntaron con el sobrenadante original. Los protoplastos se recogieron por centrifugación a 8.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Seguidamente se lisaron las células incubándolas durante 1 h a 37 °C en 500 μ l de TEN₅₀₋₅₀₋₁₀₀ (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) conteniendo Sarkosyl NL-30 (Sigma) al 1,5 % y proteinasa K (Roche) a 300 μ g/ml. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. El cual se trató con un volumen de PCIA (Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico; 25:24:1) varias veces, para eliminar las proteínas. Para eliminar los restos de fenol, se trató una vez con CIA 24:1. El DNA se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol 100% frío y se mantuvo a -20°C durante al menos 16 h. Se centrifugó a 9.000 rpm durante 1 h a 4 °C y se lavó con etanol 70 % frío. Finalmente se dejó secar el pellet y se resuspendió en agua destilada estéril durante, al menos, 16 h a 4 °C. La cantidad de DNA obtenida se determinó utilizando un fluorímetro (*Qubit®3.0 Fluorometer*, Thermo Fisher Scientific).

3.4.3 Extracción de DNA plasmídico de HEK293

Para realizar la extracción de DNA plasmídico de HEK293, se incubaron las células durante 40 h después de la transfección. Pasado este tiempo se siguió el protocolo descrito por Follonier y colaboradores (Follonier and Lopes, 2014), realizando algunos cambios.

Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron resuspendiéndolas en 1,5 ml del *Buffer P1* Qiagen (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, 100 µg/ml RNasa A) y 750 µl de SDS 2 %. A continuación, la muestra se trató con proteinasa K (Roche) durante 90 min a 37 °C. Se añadió 750 µl de NaOH 0,1 M durante 20 s y se precipitaron las proteínas añadiendo 1 ml de *Buffer N3* Qiagen (Gu-HCl 5 M, Acetato potásico 0,9 M, pH 4,8). Las células se centrifugaron a 39.000 g durante 1 h y se pasó el sobrenadante por una columna de *miniprep* (*Miniprep spin column*, Qiagen). La columna se lavó con 500 µL del *buffer PB* Qiagen (HCl-Gu 5 M, etanol 30 %, pH 6,6) y con 750 µl del *Buffer PE* Qiagen (Tris-HCl 10 mM, etanol 80%, pH 7,5). El DNA plasmídico se eluyó utilizando 40 µl del *Buffer EB* Qiagen (Tris-HCl 10 mM pH 8,5). El DNA obtenido se cuantificó utilizando un fluorímetro (*Qubit®3.0 Fluorometer*, Thermo Fisher Scientific).

3.5 Digestiones enzimáticas

Se realizaron digestiones enzimáticas con diferentes endonucleasas de restricción de doble cadena: *AlwNI*, *BamHI*, *SwaI*, *EcoRV* y *MluI* (New England Biolabs). Las reacciones se llevaron a cabo durante al menos 2 h a 37 °C, a excepción de *SwaI*, cuya temperatura de incubación fue de 25 °C.

3.6 Análisis del DNA

3.6.1 Electroforesis en geles de agarosa

El análisis del DNA por electroforesis bidimensional en geles de agarosa se realizó siguiendo el protocolo descrito originariamente por Brewer y Fangman (Brewer

and Fangman, 1988) ligeramente modificado de acuerdo al tamaño de las moléculas y dependiendo de si éstas son formas intactas o digeridas.

3.6.1.1 Electroforesis bidimensional de formas intactas

En todos los estudios la primera dimensión se llevó a cabo bajo las mismas condiciones. La concentración de los geles fue de 0,4 % de agarosa (Seakem® LE, Lonza) en TBE 1x y se corrió a 1 V/cm durante 24-26 horas, a temperatura ambiente.

Las condiciones de segunda dimensión se mantuvieron constantes a lo largo de todos los experimentos. Se llevaron a cabo a 4 °C, 1 % de agarosa (Seakem® LE, Lonza) en TBE 1x y se corrieron a 5 V/cm durante 10 h.

En los casos indicados, se añadió Chl (Sigma) tanto al gel como al tampón TBE 1x, durante la primera y/o la segunda dimensión, a diferentes concentraciones (0,25-5 µg/ml).

3.6.1.2 Electroforesis bidimensional de formas digeridas

Para analizar los fragmentos obtenidos tras la digestión con *A/w*MI de los plásmidos con la horquilla detenida a diferentes distancias del origen de replicación, en la primera dimensión se utilizaron geles a una concentración de 0,4 % de agarosa y se corrieron a 1 V/cm durante 22 h a temperatura ambiente. La segunda dimensión se realizó en geles a una concentración del 1 % de agarosa, a 5 V/cm durante 8 h a 4 °C en presencia de 0,3 µg/ml de Bromuro de Etidio (EthBr). En el caso de moléculas digeridas se utilizó EthBr durante la segunda dimensión ya que este compuesto aporta rigidez a las moléculas, favoreciendo la separación de las mismas atendiendo a su forma.

Para analizar los fragmentos obtenidos tras la digestión con diferentes endonucleasas de restricción de los minicromosomas de *S. cerevisiae* las condiciones tanto de primera como de segunda dimensión difirieron según el tamaño de los

fragmentos a estudiar. Así, la primera dimensión para fragmentos comprendidos entre 4 y 6,2 Kb se realizó en geles a una concentración de 0,4 % de agarosa a 1 V/cm durante 24-27 horas a temperatura ambiente. En cambio, para fragmentos menores de 4 Kb las condiciones fueron: 0,5 % de agarosa, 1 V/cm, 27 h. La segunda dimensión se realizó siempre a 4 °C y en presencia de 0,3 µg/ml de EthBr. Para fragmentos de DNA de un tamaño de 4-6,2 Kb las condiciones fueron: 1%, 5 V/cm y 8-12 horas. En el caso de fragmentos menores de 4 Kb se realizó a una concentración de 1,2 % de agarosa y se corrieron a 5 V/cm durante 11 h.

3.6.2 Transferencia del DNA a soporte sólidos

Una vez finalizada la electroforesis, los geles de agarosa se transfirieron a membranas de nailon cargadas positivamente (*Zeta-Probe® GT Blotting Membranes*, Bio-Rad) según el método descrito por Southern (Southern, 1975) y de acuerdo al protocolo de transferencia alcalina descrito por López-Estraño y colaboradores (Lopez-estrano et al., 1998).

3.6.3 Hibridación de ácidos nucleicos con sondas no radiactivas

Las membranas de nailon se incubaron en botellas cilíndricas, durante 4-6 h a 65 °C, en 20 ml de una solución de SSPE 2x (del inglés, *Saline-Sodium Phosphate-EDTA*; NaCl 360 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 20 mM y EDTA 2 mM, pH 8,0), leche descremada al 0,5 %, sulfato de dextrano (Sigma) al 10 %, SDS (del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate*) al 1 % y DNA de esperma de salmón (AppliChem) 0,5 mg/ml, sonificado y desnaturalizado. Para la hibridación, la sonda (marcada con digoxigenina mediante el kit *DIG-High-Prime* (Roche)) se desnaturalizó y se añadió a una concentración de 20 ng/ml. Las botellas se incubaron a 65 °C durante 16 h más. Transcurrido ese tiempo las membranas se lavaron dos veces con SSC 2x (del inglés, *Saline-Sodium Citrate*; NaCl 3M, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 300mM, pH 7,0) / SDS 0,1 % durante 5 min y dos veces más con SSC 0,1x / SDS 0,1 % precalentado a 68 °C, durante 15 min cada lavado. Finalmente, la detección se realizó con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (*Anti-digoxigenin-AP*,

Roche) y un sustrato quimioluminiscente (*CDP-Star*®, PerkinElmer) siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

3.6.4 Densitometrías

Los análisis densitométricos de las inmunodetecciones se realizaron utilizando el programa *ImageJ 64* (NIH).

3.7 Extracción y análisis de proteínas

La extracción de proteínas de *S. cerevisiae* se realizó tratando las células con TCA (Ácido tricloroacético) (Foiani et al., 1999). Las células se centrifugaron a 3.000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en TCA 20 %. La ruptura celular se produjo añadiendo esferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec Products) y sometiendo la mezcla a agitación intensa en vórtex a máxima velocidad durante varios minutos. El sobrenadante se centrifugó en las mismas condiciones y el pellet se resuspendió en 100 µl de Laemmli *Buffer* 1x. Se añadieron 50 µl de Tris Base 1 M y se hirvió la mezcla a 95 °C durante 3 min. Pasado este tiempo se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min y 15 µl del sobrenadante se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida para realizar la inmunodetección.

En el caso de HEK293 la obtención de extractos proteicos totales se obtuvo lisando las células con *buffer* NP-40 (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, glicerol 10% (Roche), NaCl 137 mM, NP40 1 %, cóctel de inhibidores de proteasas 0,1 µg/ml, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro sódico 10 mM, EDTA 2 mM (Sigma)). Las muestras se incubaron durante 20 min a 4 °C y se separaron los restos celulares de las proteínas mediante una centrifugación a 15.000 rpm durante 25 min a 4 °C.

Tabla I: Anticuerpos primarios utilizados en las inmunodetecciones de proteínas.

Anticuerpo Primario	Referencia	Dilución	Información
HA	Roche 12CA5	1:50000	
PSTAIR	Sigma P7962	1:4000	Control de carga
EBV EBNA1	Santa Cruz sc-81581	1:500	
α-Tubulina	ABClonal AC007	1:1000	Control de carga

En ambos casos la separación proteica se realizó en geles SDS-poliacrilamida al 12 % y se transfirió a una membrana de PVDF (Bio-Rad) mediante electrotransferencia húmeda durante 90 min a 200 mA. Se realizó un bloqueo con leche en polvo diluida en T-TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0,1 %) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (Tabla I) durante 16 h a 4 °C, se hicieron 5 lavados secuenciales de 5 min en T-TBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa *anti-mouse* (Santa Cruz sc-2005, 1:3000) o anti-rabbit IgG (DAKO P0448, 1:1000). Se lavó 5 veces durante 5 min con T-TBS y se procedió a la detección utilizando el quimioluminiscente *LiteAbiot Plus Enhanced Chemiluminescent Substrate* (Euroclone).

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de la dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos

Para comprobar si las horquillas de replicación pueden girar libremente *in vivo* durante el proceso de replicación, se analizó, mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa, la topología de tres plásmidos derivados de pBR322 con la secuencia terminadora de la replicación *TerE* situada a diferentes distancias del origen de replicación (Figuras 8, 9 y 10). Estos plásmidos, denominados pBR-*TerE@StyI*, pBR-*TerE@AatII* y pBR-*TerE@DraI*, se aislaron de dos estirpes distintas de *E. coli*: DH5 α F' y ParE10. La estirpe ParE10 se caracteriza por tener una mutación termosensible en el gen *ParE* de la Topo IV, además esta estirpe es *recA*- (Kato et al., 1990; Zechiedrich et al., 1997). La estirpe W110, isogénica de parE10, fue descartada como control por ser una estirpe *recA*+ (Kato et al., 1990) y, por tanto, los multímeros generados complicarían la identificación de los RIs en las inmunodetecciones. En sustitución de esta estirpe, se utilizó DH5 α F', ya que es una estirpe *recA*-, con lo que se evita la formación de multímeros (Martin-Parras et al., 1991). En distintos estudios se observó que el nivel de superenrollamiento (-) de los plásmidos aislados de la estirpe W3110 es el mismo que en los aislados de la estirpe DH5 α F' (Cebrian et al., 2015; Mayan-Santos et al., 2008; Zechiedrich et al., 2000), por tanto esta estirpe es adecuada para utilizarla como control en el presente estudio.

4.1.1 Análisis de los RIs de plásmidos bacterianos aislados de células DH5 α F' y ParE10

Se analizaron los RIs de los plásmidos pBR-*TerE@StyI*, pBR-*TerE@AatII* y pBR-*TerE@DraI* aislados de células DH5 α F' y ParE10 en crecimiento exponencial, mediante electroforesis bidimensional. En la Figura 18 se muestran las inmunodetecciones obtenidas, con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. La señal de la parte inferior derecha de todas las inmunodetecciones corresponde a las CCCs, formas monoméricas superenrolladas que no estaban replicando en el momento en el que se detuvo el cultivo (Martin-Parras et al., 1998; Schwartzman et al., 1990). Cuando estas moléculas sufren roturas de cadena sencilla durante la extracción del

DNA, dan lugar a moléculas relajadas, los OCs. Los CCCs también pueden sufrir roturas durante el desarrollo de la electroforesis bidimensional, en la primera o la segunda dimensión, apareciendo en las inmunodetecciones un rastro horizontal y vertical, respectivamente. Ambos rastros hacen que los CCCs formen un ángulo recto con los OCs.

En las inmunodetecciones correspondientes a los RIs del plásmido pBR-*TerE@StyI* aislados de DH5 α F', se detecta un segundo ángulo recto desplazado ligeramente hacia la izquierda y hacia arriba del primero. Este segundo ángulo recto se corresponde con CCCs y OCs de moléculas parcialmente replicadas con la horquilla detenida en el sitio *TerE*, denominados CCRI (del inglés, *Close Circles Replication Intermediates*) y OCRI (del inglés, *Open Circles Replication Intermediates*). En el caso de los otros dos plásmidos los CCRI describen un arco. Cada uno de los elementos que forman esos arcos es un topoisómero con distinto grado de superenrollamiento.

En el caso de las inmunodetecciones correspondientes a los RIs aislados de las células paE10, aparte de las señales que se detectaban en las inmunodetecciones de los RIs aislados de DH5 α F', se observan tres arcos más. Estos arcos se corresponden con moléculas encadenadas, ya que al no estar activa la Topo IV, los plásmidos que escapan al bloqueo de la replicación de *Ter-Tus*, no son capaces de segregarse, acumulándose moléculas encadenadas (Adams et al., 1992; Lopez et al., 2012). En las tres inmunodetecciones se aprecian los tres tipos de encadenados: CatAs, muy minoritarios ya que su formación se debe a una rotura excesiva en el proceso de extracción del DNA, CatBs y CatCs (representados en distintas tonalidades de color verde en los esquemas interpretativos). Estas señales sirven como control para corroborar la correcta inhibición de la Topo IV. En cuanto a los arcos de los CCRI de pBR-*TerE@StyI* y pBR-*TerE@DraI* no se observan diferencias significativas al compararlos con los aislados de células DH5 α F'. Sin embargo, en el caso de pBR-*TerE@AatII*, el patrón correspondiente al arco de CCRI es significativamente diferente. La mayoría de los topoisómeros muestran una elevada movilidad electroforética durante la segunda dimensión. Esta observación indica que, al menos para pBR-*TerE@AatII*, los CCRI aislados de células paE10 (con la Topo IV inactiva *in vivo*) están más torsionados que los aislados de DH5 α F' (con la Topo IV activa *in vivo*).

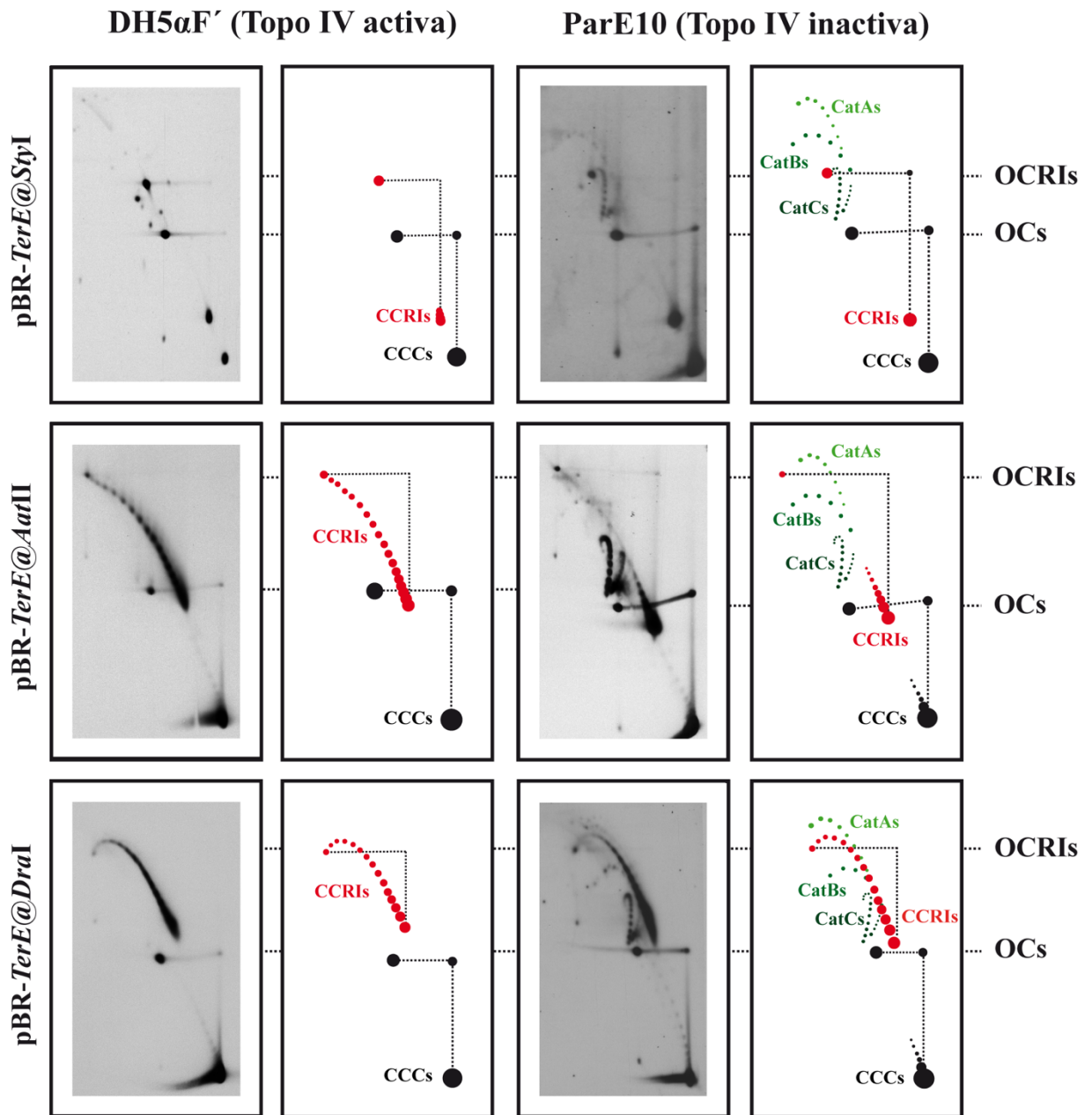


Figura 18. Inmunodetecciones correspondientes a los gels bidimensionales de las formas intactas de los plásmidos pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII y pBR-TerE@DraI aislados de las estirpes DH5 α F' y parE10 de *E. coli*. A la derecha de cada inmunodetección se muestra un esquema interpretativo en donde las señales de las moléculas no replicadas se representan en color negro, las señales de las moléculas parcialmente replicadas en rojo y los tres tipos de moléculas encadenadas en diferentes tonalidades de color verde.

4.1.2 Análisis de los RIs de plásmidos bacterianos aislados de células DH5 α F' y ParE10 en presencia de Chl durante la segunda dimensión

Para tratar de comparar a mayor resolución la tensión torsional de los distintos RIs, se analizaron los CCRIs en geles bidimensionales de agarosa en donde la segunda dimensión se llevó a cabo en presencia de 5 μ g/ml de Chl. La elección de dicha concentración se llevó a cabo teniendo en cuenta los resultados obtenidos en trabajos previos (Martinez-Robles et al., 2009; Olavarrieta et al., 2002c). La Chl es una molécula planar que se intercala en el DNA, provocando un desenrollamiento parcial de la molécula y, por tanto, una variación del Tw. En el caso de plásmidos que se encuentran negativamente superenrollados, este desenrollamiento conlleva una disminución del superenrollamiento (-) hasta que los plásmidos se relajan completamente. A partir de ese momento, la incorporación de cantidades crecientes de Chl provocará que los plásmidos adquirieran superenrollamiento (+) (Olavarrieta et al., 2002c).

A diferencia de lo que ocurre con las formas no replicadas, cuando se analizan RIs con la horquilla detenida en geles bidimensionales en presencia de Chl durante la segunda dimensión, los CCRIs no adquieren superenrollamiento (+). En estos intermediarios, una vez que se ha eliminado todo el superenrollamiento (-) nativo que poseían, no pueden adquirir superenrollamiento (+). Esto se debe a que las cadenas nacientes se emparejan formando un cuarto brazo y dando lugar a moléculas con horquillas en retroceso. Estas moléculas tienen alterada su movilidad electroforética (Fierro-Fernández et al., 2007; Fierro-Fernandez et al., 2007; Postow et al., 2001). Los CCRIs con horquillas en retroceso muestran la misma movilidad electroforética en segunda dimensión que los OCRIs. Como el intercalamiento de la Chl solo tiene efecto en la región no replicada de los CCRIs, afectará de distinta manera a los tres plásmidos. pBR-*TerE@StyI* será el más afectado, ya que es el que posee la región no replicada más grande. Por el contrario, en pBR-*TerE@DraI*, apenas tendrá efecto la Chl, ya que su región no replicada es muy pequeña.

En la Figura 19 se muestran las inmunodetecciones obtenidas de los tres plásmidos, aislados de células DH5 α F' y parE10 y analizados en presencia de 5 μ g/ml de Chl durante el desarrollo de la segunda dimensión. A la derecha de cada

inmunodetección se adjunta un esquema interpretativo. Si se observan las moléculas no replicadas, se ve que la Chl tuvo un efecto similar en todos los casos. Sin embargo, el efecto en la forma de los arcos correspondientes a CCRIIs fue diferente para cada plásmido. En el caso de los RIIs aislado de DH5 α F', para pBR-*TerE@StyI*, la movilidad de los CCRIIs cambió de una manera muy similar a lo que sucede con las CCCs. Teniendo en cuenta que los CCRIIs no pueden adquirir superenrollamiento (+) y, por tanto, no pueden recuperar movilidad electroforética después de haber perdido todo su superenrollamiento (-) nativo, se puede concluir que la mayoría de los CCRIIs de pBR-*TerE@StyI* están próximos a un $\Delta Lk = 0$. En el caso de pBR-*TerE@AatII*, el arco de CCRIIs cambió drásticamente su forma, pasando de un arco curvo en ausencia de Chl (Figura 18) a un arco con un ángulo muy pronunciado en presencia del agente intercalante. Para pBR-*TerE@DraI*, el cambio en la forma del arco fue muy sutil.

También se analizaron RIIs aislados de células parE10 en las que se había inactivado *in vivo* la Topo IV. Como en el caso de los aislados de DH5 α F' estos RIIs también presentan diferencias. En el caso de pBR-*TerE@StyI* los CCRIIs no llegan a estar completamente relajados y la mayoría de los topoisómeros muestran una movilidad electroforética mayor que los OCRIIs. Para pBR-*TerE@AatII*, las diferencias que se observan no son tan notables como en el caso de los RIIs aislados de DH5 α F'. La mayoría de los CCRIIs permanecen todavía torsionados y, por tanto, con una movilidad electroforética superior a la de los OCRIIs. Por último, en pBR-*TerE@DraI*, el cambio en la forma del arco fue, de nuevo, muy sutil. Todas estas observaciones sugieren que los CCRIIs aislados de parE10 están más torsionados que los aislados de DH5 α F'.

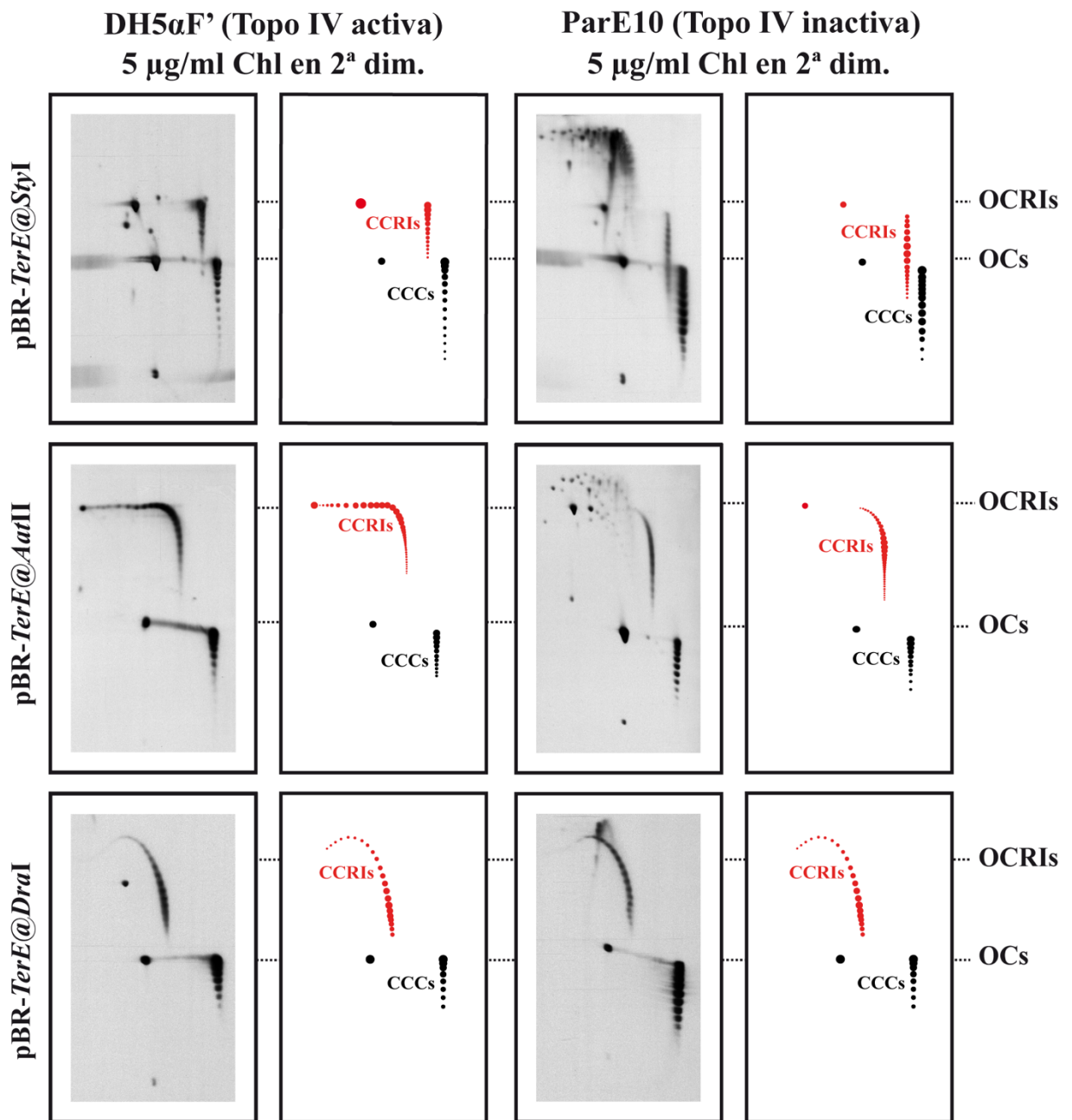


Figura 19. Inmunodetecciones correspondientes a los gels bidimensionales de las formas intactas de los plásmidos pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII y pBR-TerE@DraI aislados de las estirpes DH5 α F' y parE10 de *E. coli* en los que la segunda dimensión se desarrolló en presencia de 5 μ g/ml de Chl. A la derecha de cada inmunodetección se muestra un esquema interpretativo en donde las señales de las moléculas no replicadas se representan en color negro y las señales de las moléculas parcialmente replicadas en rojo.

4.1.3 Comparación de los RIs anudados de plásmidos bacterianos aislados de células DH5 α F' y ParE10

Para analizar, desde otra perspectiva, si los CCRIIs aislados de parE10 están más torsionados que los aislados de DH5 α F', se midió el anudamiento del DNA en la región ya replicada de los RIs aislados de ambas estirpes; ya que, recientemente, ha sido demostrado que la tensión torsional reduce la probabilidad de que la Topo IV genere nudos en RIs plasmídicos (Lopez et al., 2012; Schwartzman et al., 2013; Witz et al., 2011; Witz and Stasiak, 2010). Además, también se sabe, que el nivel de anudamiento del DNA es directamente proporcional a la masa molecular (Olavarrieta et al., 2002b). Para identificar los nudos, se digirieron los RIs de los tres plásmidos con la enzima *A/w*NI que corta en la región no replicada. Las moléculas resultantes son moléculas lineales de DNA que contienen una burbuja interna. Esta burbuja acumulada se puede observar en una electroforesis bidimensional. Además, también se pueden detectar burbujas anudadas o RIs anudados (Santamaria et al., 2000a; Sogo et al., 1999; Viguera et al., 1996). En las Figuras 20 y 21 se muestran los resultados de la electroforesis bidimensional para cada uno de los plásmidos aislados de la estirpe DH5 α F' (con la Topo IV activa *in vivo*) y parE10 (con la Topo IV inactiva *in vivo*). En todos los casos se detectó una señal muy prominente en la parte inferior derecha de las inmunodetecciones, la cual corresponde a moléculas lineales. La señal que le sigue en intensidad y que está desplazada a la izquierda se debe a RIs con una burbuja interna acumulada no anudada. Las señales que aparecen como cuentas de collar son las burbujas anudadas (Santamaria et al., 2000a; Sogo et al., 1999; Viguera et al., 1996). Se puede observar cómo la movilidad electroforética de las señales de burbujas anudadas es diferente para cada uno de los plásmidos. Esto es así ya que, durante la primera dimensión, cuando la electroforesis transcurre en un gel de baja concentración de agarosa y bajo voltaje, la movilidad de las burbujas anudadas depende de la masa total de la molécula. Sin embargo, en segunda dimensión, cuando la electroforesis se lleva a cabo en un gel de alta concentración de agarosa y a alto voltaje, la movilidad aumenta en función de la complejidad de la molécula, es decir, en función del tamaño de la burbuja y del número de cruces que tengan los nudos de las mismas (Olavarrieta et al., 2002a; Stasiak et al., 1996).

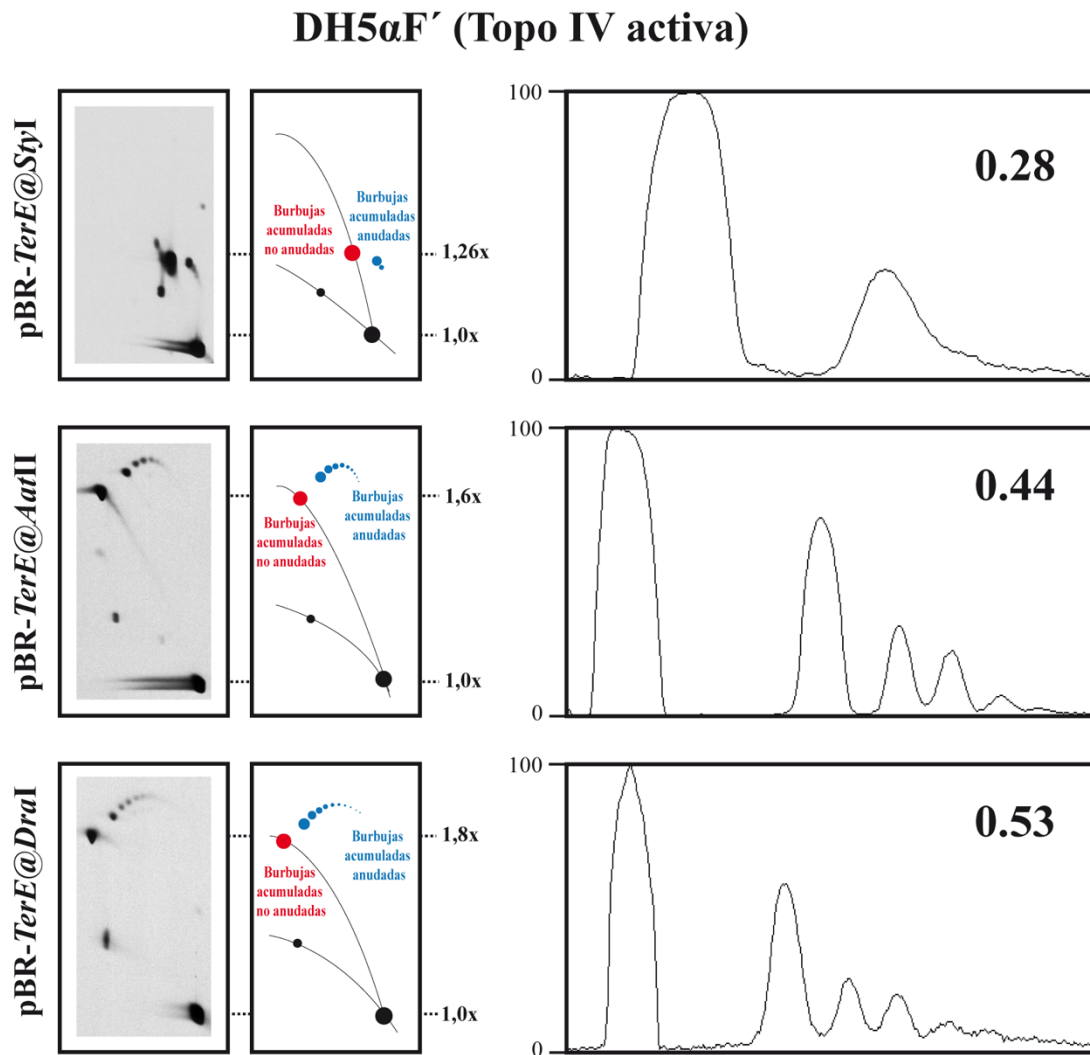


Figura 20. Análisis de los RIs de los plásmidos pBR-*TerE@StyI*, pBR-*TerE@AatII* y pBR-*TerE@DraI* aislados de células DH5 α F' y digeridos con la enzima *AlwNI*. A la izquierda se muestran las inmunodetecciones de los geles bidimensionales y su correspondiente esquema interpretativo, donde están representadas las burbujas no anudadas (en color rojo) y las anudadas (en color azul). A partir de las inmunodetecciones se obtuvieron los perfiles densitométricos que se muestran a la derecha, con la proporción de burbujas anudadas en cada caso.

Tanto las señales correspondientes a las burbujas no anudadas como a las anudadas se cuantificaron por densitometría. Los perfiles obtenidos se muestran a la derecha de cada inmunodetección en las Figuras 20 y 21. Estos resultados demuestran que el número y complejidad de burbujas anudadas aumenta con el tamaño de la burbuja; es mayor en el caso de pBR-*TerE@DraI* y menor en el de pBR-*TerE@StyI* en ambas estirpes. Además, si se compara cada plásmido en ambas estirpes se observa que el

porcentaje de burbujas anudadas es mayor cuando el DNA es aislado de DH5 α F'. Es decir, la inhibición de la Topo IV produce una ligera disminución de la señal de burbujas anudadas, lo que indica que el grado de pre-encadenamiento es mayor en los plásmidos aislados de células *parE10*.

ParE10 (Topo IV inactiva)

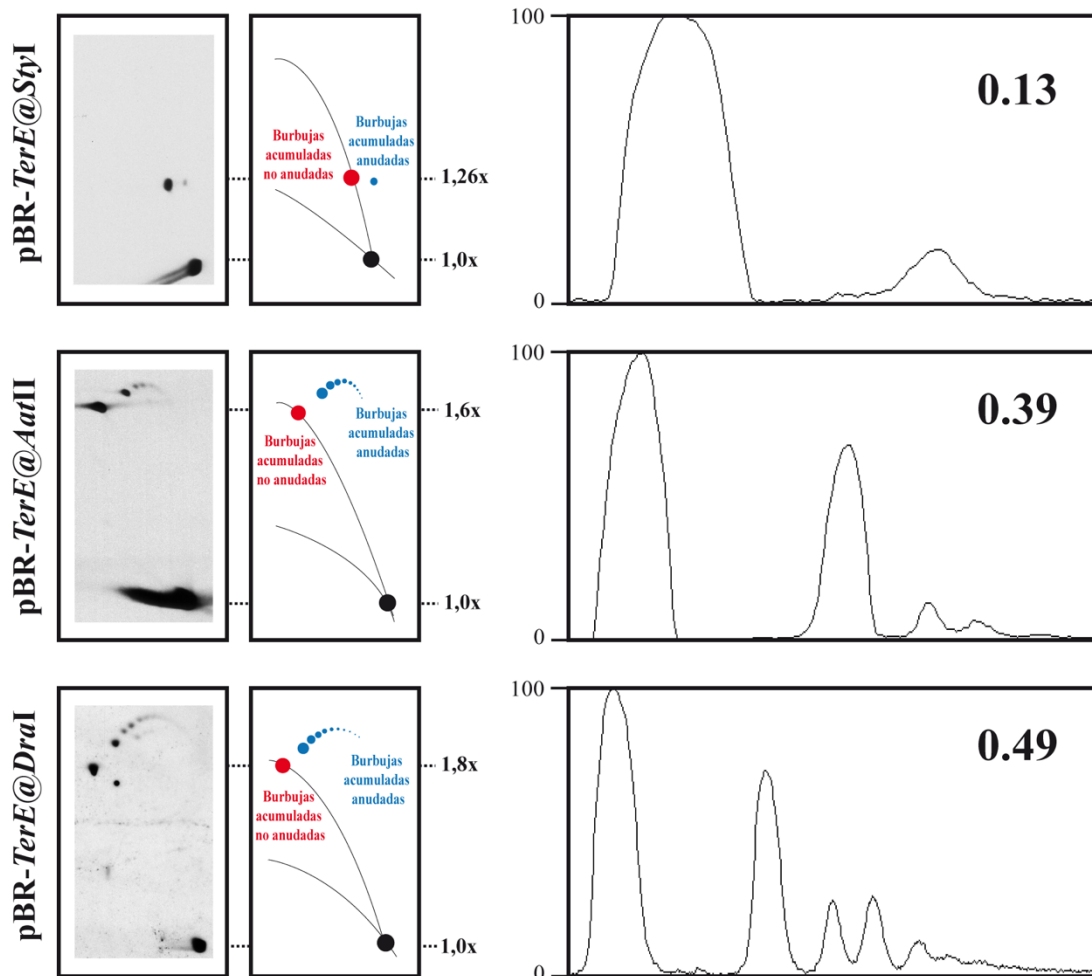


Figura 21. Análisis de los RIs de los plásmidos *pBR-TerE@StyI*, *pBR-TerE@AatII* y *pBR-TerE@DraI* aislados de células *parE10* y digeridos con la enzima *AlwNI*. A la izquierda se muestran las inmunodetecciones de los geles bidimensionales y su correspondiente esquema interpretativo, donde están representadas las burbujas no anudadas (en color rojo) y las anudadas (en color azul). A partir de las inmunodetecciones se obtuvieron los perfiles densitométricos que se muestran a la derecha, con la proporción de burbujas anudadas en cada caso.

4.2 Estudio del rDNA en *S. cerevisiae*

Para estudiar el número de barreras presente en las rRFBs de *S. cerevisiae* y analizar su estabilidad y eficiencia deteniendo horquillas de replicación, se transfectaron células de *S. cerevisiae* con diferentes minicromosomas. Éstos contenían un número variable de copias de la región mínima del rDNA que contiene los tres potenciales sitios de unión a la proteína Fob1. Se aislaron los RIs de los distintos minicromosomas y se digirieron con varias enzimas de restricción, obteniendo dos fragmentos lineales que se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa.

4.2.1 Análisis del número de barreras presentes en el rDNA y estudio de su estabilidad

Para comprobar el número de barreras presentes en el rDNA de *S. cerevisiae* se utilizó como control el minicromosoma circular pYAC_MEM, el cual no contiene ninguna rRFB (Figura 11). Se analizaron dos fragmentos lineales de RIs de este minicromosoma mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Uno de los fragmentos, digerido con *SwaI-BamHI* (2764 pb), contiene el origen de replicación y el centrómero. Por el contrario, el otro fragmento, digerido con *EcoRV-MluI* (4245 pb), no contiene ni el origen de replicación ni el centrómero (Figura 22A). Las inmunodetecciones de ambos fragmentos, hibridados con la sonda L1, se muestran en la Figura 22B y C, con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha.

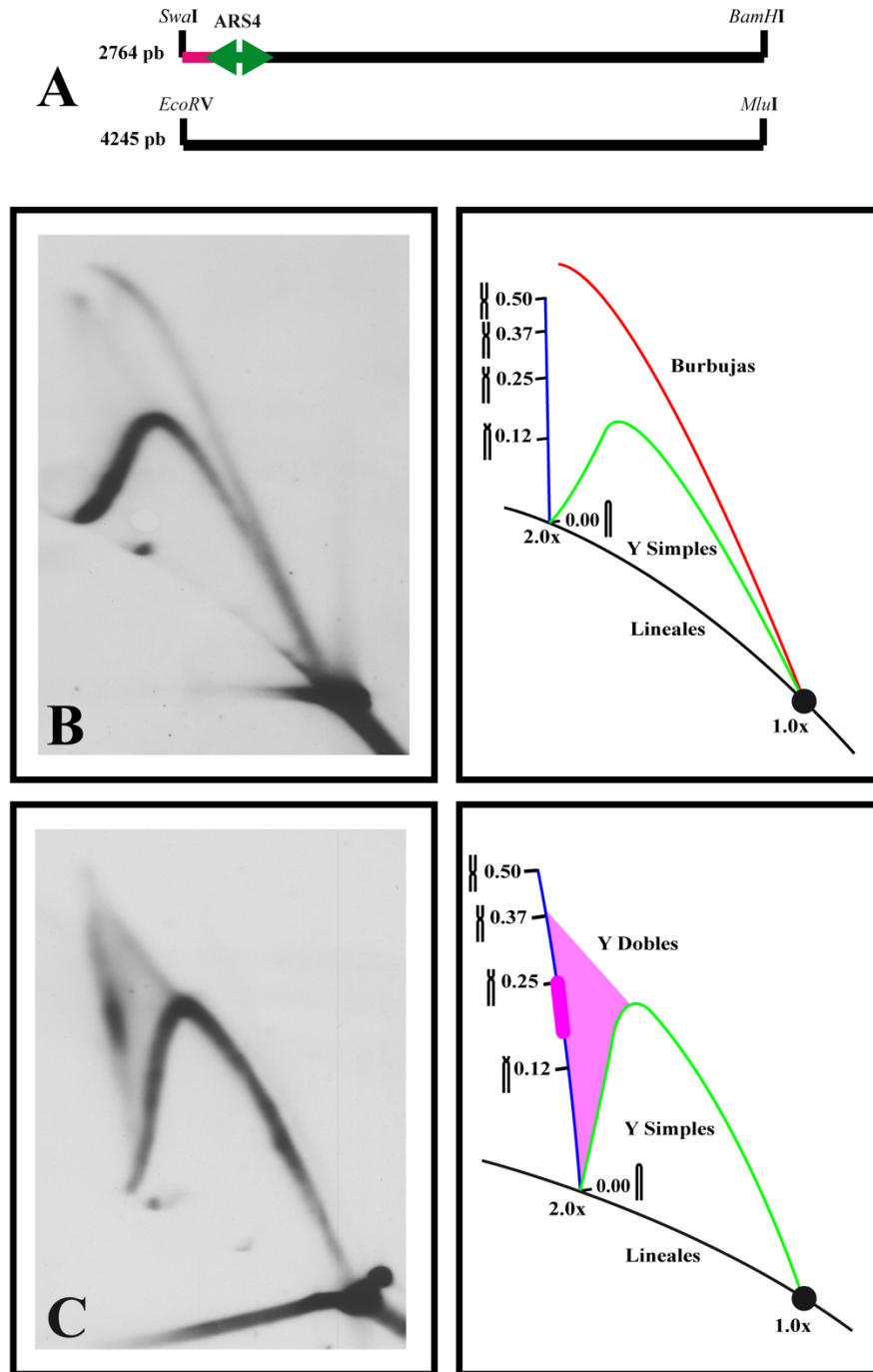


Figura 22. Inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales de las formas digeridas del minicromosoma pYAC_MEM. A. Mapas de los fragmentos lineales *SwaI*-*BamHI* (2764 pb) y *EcoRV*-*MluI* (4245 pb) del minicromosoma pYAC_MEM. B. Inmunodetección correspondiente al fragmento *SwaI*-*BamHI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. C. Inmunodetección correspondiente al fragmento *EcoRV*-*MluI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. El arco de burbujas está representado en color rojo, el de Y simples en verde y el de recombinantes en azul. Las señales correspondientes a la terminación se representan en magenta.

El centrómero, en algunas ocasiones, puede representar un impedimento para las horquillas de replicación. Éstas pueden comportarse de tres maneras distintas al atravesarlo (Cebrián et al., 2014). En algunos casos el centrómero, el CEN6 en los minicromosomas utilizados en este estudio, actúa como barrera permanente. En otros casos detiene las horquillas solo de manera temporal, durante diferentes periodos de tiempo. Y, por último, el CEN6 puede no representar un obstáculo para las horquillas. Los resultados obtenidos en el control (pYAC_MEM) son consistentes con esta hipótesis. En la inmunodetección correspondiente al fragmento *SwaI-BamHI* (Figura 22B) se observa un arco completo de Y simples (en color verde en el esquema interpretativo), lo que significa que en algunos casos el CEN6 no ha supuesto ningún impedimento para las horquillas. Se observa también un arco de burbujas casi completo (en color rojo), lo que indica que en este caso el CEN6 está actuando como barrera permanente. En el otro fragmento (*EcoRV-MluI*), al no contener el ARS4, no se observa arco de burbuja. Se detecta el arco completo de Y simples (en color verde), lo que significa que el CEN6 se comporta como barrera permanente, ya que la horquilla que viaja en sentido antihorario quedará detenida en el centrómero y será la otra horquilla la que replique el fragmento completo. Sobre el arco de recombinantes (en color azul) se observa una señal de terminación (indicada en color magenta) entre las posiciones de 0,12 y 0,25. Esto indica que la horquilla que viaja en sentido antihorario no encuentra ningún impedimento y por tanto, ambas horquillas se encuentran a 180° del ARS4. Se percibe también una mancha difusa entre el arco de recombinantes y el de Y simples. Esto sucede cuando la transición de Y simple a Y doble ocurre en diferentes posiciones dependiendo de cuánto tiempo ha estado detenida alguna de las horquillas. Ésto indica que en algunos casos el CEN6 está actuando como barrera temporal.

Posteriormente, se estudió un minicromosoma derivado de pYAC_MEM que contenía la secuencia de una rRFB de *S. cerevisiae*. El mapa genético de este minicromosoma se muestra en la Figura 12. Se estudiaron los mismos fragmentos que en el caso control (Figura 23A) y las inmunodetecciones obtenidas se muestran en la Figura 23B y C con sus correspondientes esquemas interpretativos. Además de todos los patrones identificados en el fragmento *SwaI-BamHI* del minicromosoma control, en este caso se detectan dos puntos en la parte descendente del arco de Y simples (en color verde en el esquema interpretativo y numerados como 1 y 2). También se detectan dos puntos sobre el arco de recombinantes (en color azul). Una línea muy fina (en color magenta)

conecta ambas señales. Cabe destacar que a pesar de haber 3 potenciales sitios de unión para Fob1 solo se detectan dos puntos correspondientes a las paradas de la rRFB. El primer punto generado por el avance de las horquillas (numerado como 1 en la Figura 23) es ligeramente más intenso que el segundo (2). Estos resultados se muestran en la densitometría de la Figura 25. Los patrones obtenidos analizando el otro fragmento (*EcoRV-MluI*) son claramente diferentes. Aparte de los patrones identificados en este mismo corte en el control, se observan dos puntos en la parte ascendente del arco de Y simples (en color verde en el esquema interpretativo y numerados como 1 y 2). También se detectan dos puntos en el arco de recombinantes (en azul). En este caso, ambas señales se encuentran conectadas a través de un arco (en color magenta) que muestra una inflexión cerca del arco de recombinantes. Si las horquillas que alcanzan la rRFB se detienen de forma permanente, la replicación finalizará cuando la horquilla que se mueve en dirección opuesta se encuentre con la que ha quedado bloqueada en la rRFB. En este fragmento la terminación tendrá lugar alrededor de las posiciones 0,29, 0,30 y 0,32 sobre el arco de recombinantes, tal y como se observa en la Figura 23B. En este caso, también se detectan solo dos paradas.

Se observó que el número de pb que separa la RFB1 de la RFB2 es mayor que el que separa la RFB2 de la RFB3. Por tanto, existe la posibilidad de que en las inmunodetecciones se detecten solo dos acumulaciones debido a que las condiciones utilizadas no sean capaces de resolver dos paradas que se encuentran tan próximas. Para corroborar esta hipótesis se construyó el minicromosoma llamado pYAC_AC_3'rRFBs+ (Figura 13) en el cual la distancia entre la RFB2 y la RFB3 se incrementó 17 pb para hacerla idéntica a la distancia que separa la RFB1 de la RFB2 (40 pb). Se realizaron los mismos cortes en los RIs aislados (Figura 24A), y se observó que en las inmunodetecciones seguían apareciendo dos acumulaciones (Figura 24B y C). Se realizó un perfil densitométrico que mostró que la distancia que separa las dos acumulaciones que se detectaban en la parte descendente del arco de Y simples había aumentado respecto al minicromosoma anterior (Figura 25). También se observó que la acumulación número 1 era más fuerte que la 2, como ya se había percibido en el caso anterior. Estos resultados parecen indicar que no es un problema de la resolución de la técnica.

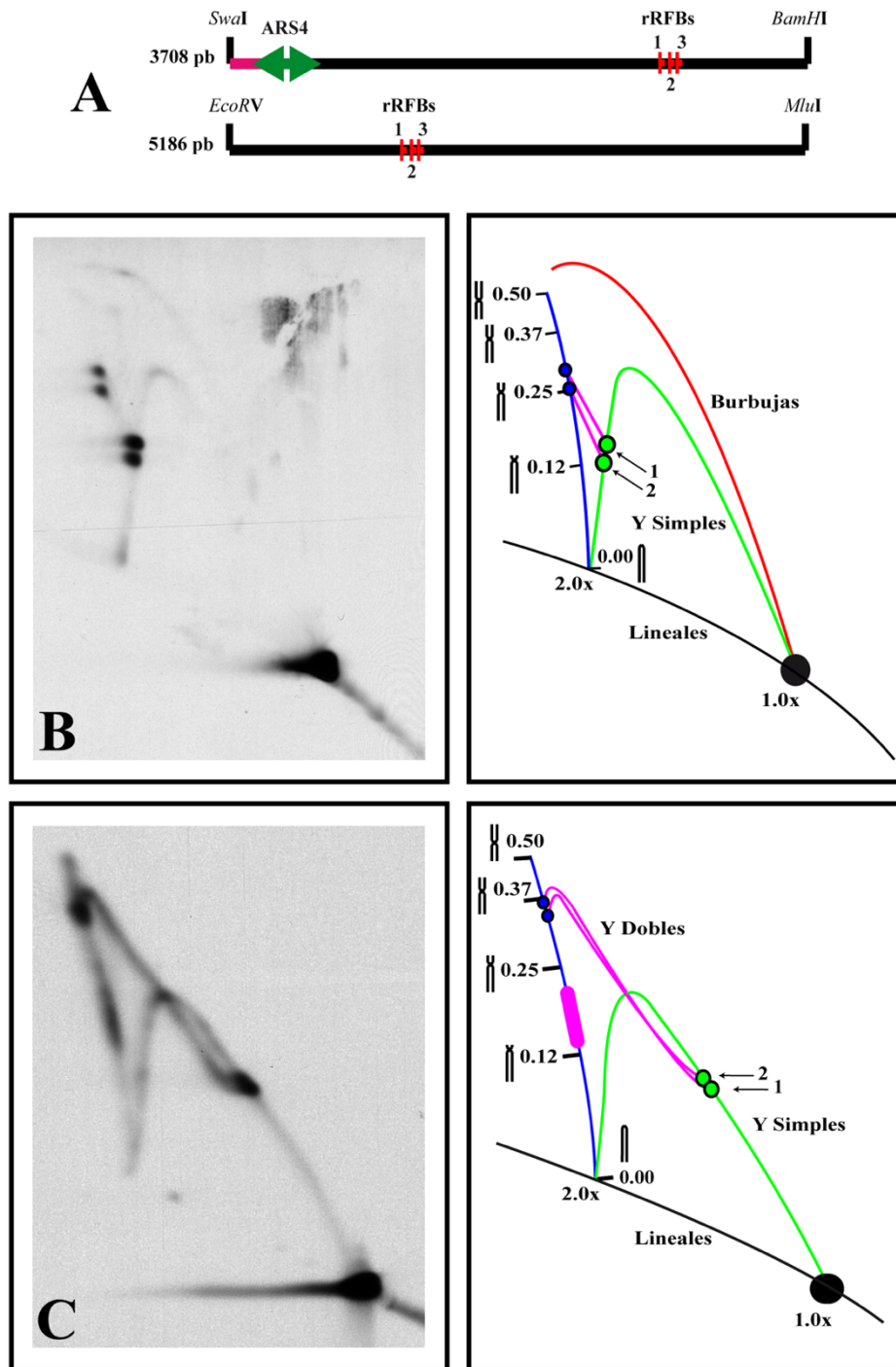


Figura 23. Inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales de las formas digeridas del minicromosoma pYAC_MEM_3rRFBs+ y perfil densitométrico del fragmento *SwaI*-*BamHI*. A. Mapas de los fragmentos lineales *SwaI*-*BamHI* (3708 pb) y *EcoRV*-*MluI* (5186 pb) del minicromosoma pYAC_MEM_3rRFBs+. **B.** Inmunodetección correspondiente al fragmento *SwaI*-*BamHI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. **C.** Inmunodetección correspondiente al fragmento *EcoRV*-*MluI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. El arco de burbujas está representado en color rojo, el arco de Y simples en verde y el arco de recombinantes en azul. Las señales correspondientes a la terminación se representan en magenta y las señales de acumulación se simbolizan como puntos verdes y azules.

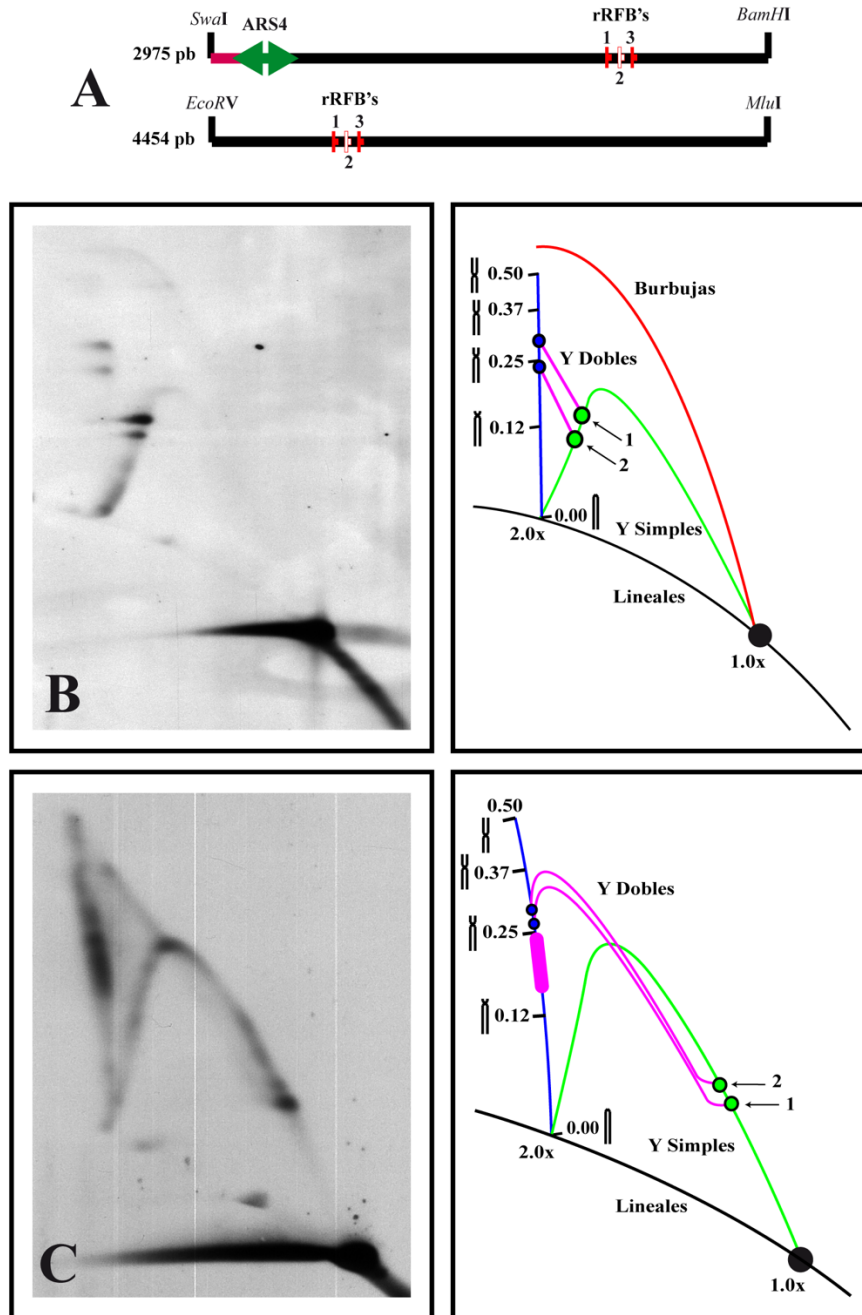


Figura 24. Inmunodetecciones correspondientes a los gels bidimensionales de las formas digeridas del minicromosoma pYAC_AC_3'rRFBs+. **A.** Mapas de los fragmentos lineales *SwaI-BamHI* (2975 pb) y *EcoRV-MluI* (4454 pb) del minicromosoma pYAC_AC_3'rRFBs+. **B.** Inmunodetección correspondiente al fragmento *SwaI-BamHI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. **C.** Inmunodetección correspondiente al fragmento *EcoRV-MluI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. El arco de burbujas está representado en color rojo, el arco de Y simples en verde y el arco de recombinantes en azul. Las señales correspondientes a la terminación se representan en magenta y las señales de acumulación se simbolizan como puntos verdes y azules.

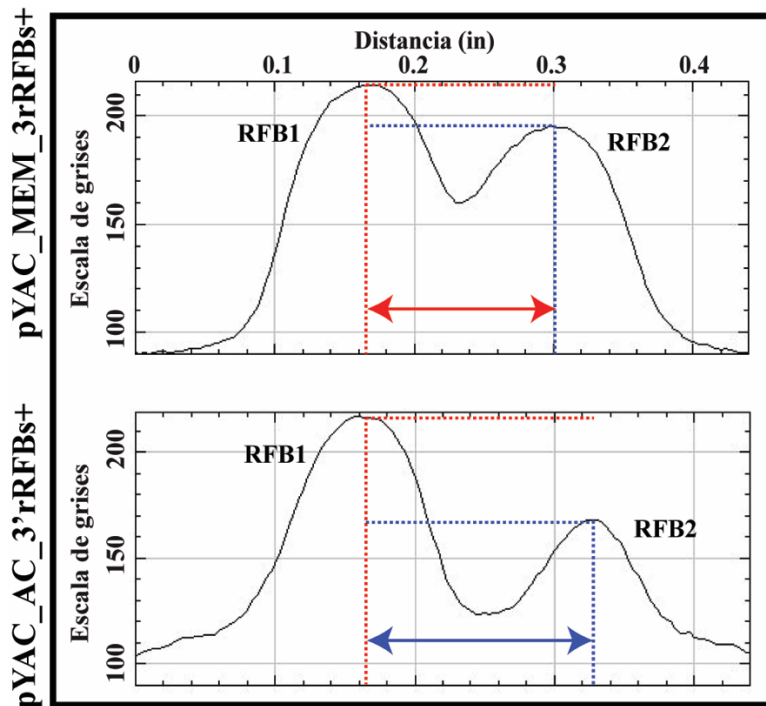


Figura 25. Perfiles densitométricos de los fragmentos *SwaI-BamHI* de los minicromosomas pYAC_MEM_3'rRFBs+ y pYAC_AC_3'rRFBs+. Comparación de los perfiles densitométricos de las acumulaciones causadas por la rRFBs que aparecen sobre el arco de Y simples en el corte *SwaI-BamHI* de los minicromosomas pYAC_MEM_3'rRFBs+ (en la parte superior) y pYAC_AC_3'rRFBs+ (en la parte inferior).

Una de las observaciones más importantes que han revelado las inmunodetecciones que se muestran en las Figuras 23 y 24 es que se detecta el arco completo de Y simples, a pesar de que existe un bloqueo para las horquillas de replicación. Esta observación indica que, en los minicromosomas estudiados, algunas horquillas de replicación son capaces de atravesar las RFBs. Por otra parte, las señales de Y dobles (en color magenta en los esquemas interpretativos) indican que, en los casos en que las RFB actúan como barrera y detienen las horquillas, la terminación tiene lugar cuando la horquilla que gira en sentido antihorario alcanza la horquilla que ha quedado retenida en las RFBs. Es decir, el bloqueo de las horquillas causado por las RFBs es permanente, pero solo ocurre en algunos casos.

4.2.2 Análisis de la eficiencia de las rRFBs de *S. cerevisiae* y su modulación mediante la sobreexpresión de la proteína Fob1

Tras realizar la observación de que las RFBs no detienen el 100% de las horquillas, se planteó la posibilidad de mejorar su eficiencia. Para ello se sintetizó un fragmento de DNA de 948 pb que contenía 5 repeticiones en tándem de las 186 pb del subfragmento 7 descrito por Kobayashi (Kobayashi, 2003). Este subfragmento de la secuencia completa del rDNA, se encuentra en el IGS1 y contiene los tres sitios potenciales de unión a Fob1. Dicho fragmento se clonó en el sitio *SalI* de pYAC_MEM, obteniendo un nuevo minicromosoma denominado pYAC_AC_10rRFBs+ (Figura 14). Se realizaron las mismas digestiones que se habían utilizado anteriormente (Figura 26A) y se obtuvieron las inmunodetecciones que se muestran en la Figura 26B y C. En ellas se observan 10 acumulaciones tanto en el arco de Y simples como en el de Y dobles en ambas digestiones. Sin embargo, continúa apareciendo en ambos casos el arco completo de Y simples, lo que indica que hay horquillas que son capaces de atravesar 10 potenciales sitios de unión a Fob1 consecutivos.

Esto podría indicar que no todos los sitios de unión a Fob1 unen la proteína, y, por tanto, no actúan como barrera. Esto puede ser causado por una escasez de Fob1 en la célula, ya que se están introduciendo varias secuencias nuevas de unión a Fob1. Para incrementar la cantidad de Fob1 disponible se transformó con el minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+ una nueva estirpe de *S. cerevisiae*: GAL-3HA-FOB1. Esta estirpe tiene el gen *FOBI* clonado bajo el promotor inducible de galactosa. Se añadieron además tres epítomos de hemaglutinina (HA). Los cuales se utilizaron para confirmar, mediante *Western blot*, la sobreexpresión de Fob1 en células cultivadas en presencia de galactosa (Figura 27D). Las inmunodetecciones de los geles bidimensionales obtenidas de las mismas digestiones que se habían utilizado anteriormente, se muestran en la Figura 27B y C. A pesar de haber sobreexpresado Fob1 se continúa observando el arco completo de Y simples en ambos cortes. Sin embargo, la intensidad de las 10 acumulaciones varió de manera significativa. Se realizó un perfil densitométrico, del corte *SwaI-BamHI*, que se comparó con el obtenido en el mismo corte, del mismo minicromosoma, pero extraído de la cepa top2-td (Figura 28). Se observa cómo ambos perfiles son claramente distintos. En el caso del minicromosoma aislado de células GAL-3HA-FOB1 (crecidas en presencia de galactosa) se observa una alternancia muy pronunciada de la intensidad entre las RFBs

pares y las RFBs impares, siendo más fuertes estas últimas. Esta alternancia no es tan evidente para el minicromosoma extraído de células top2-td

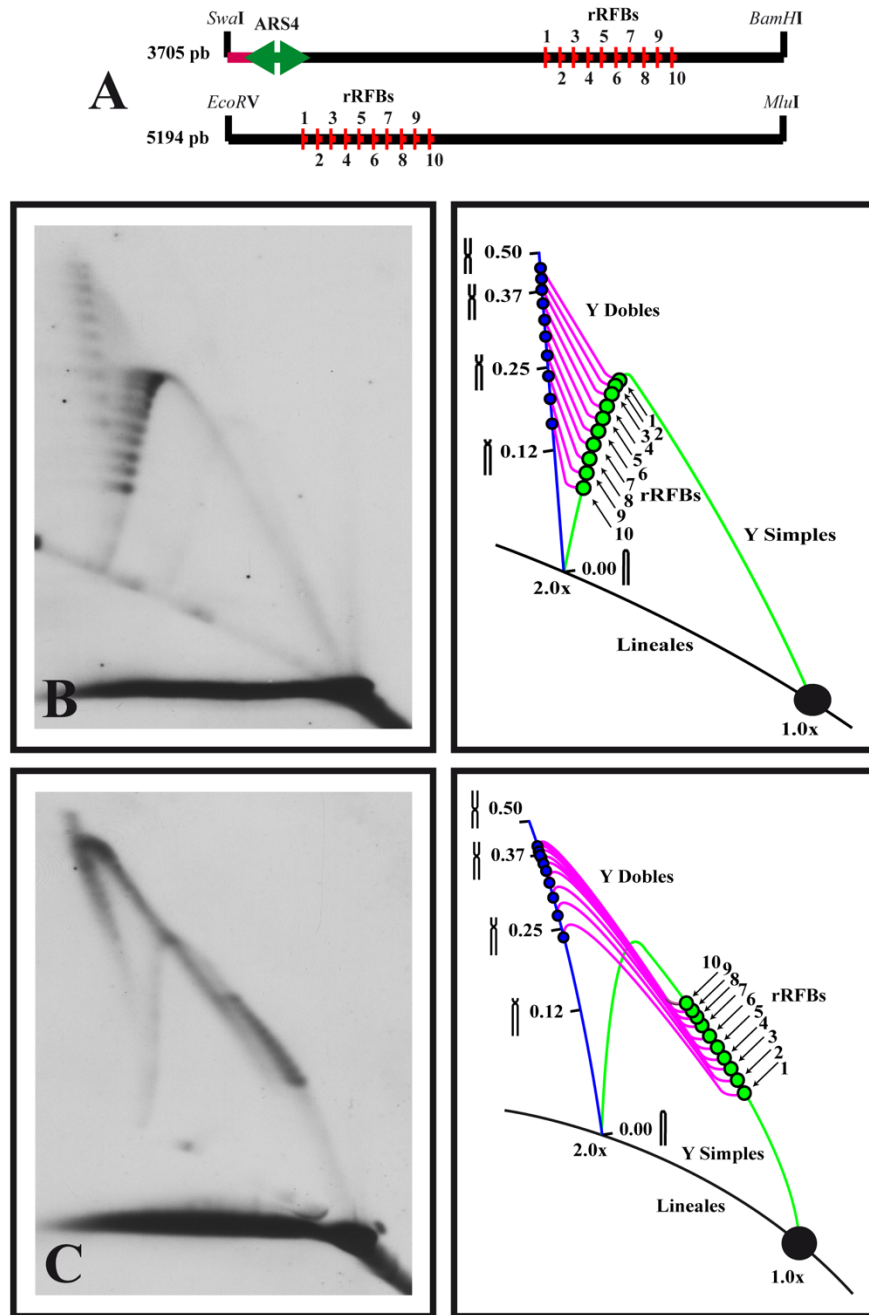


Figura 26. Inmunodetecciones correspondientes a los gels bidimensionales de las formas digeridas del minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+. A. Mapas de los fragmentos lineales *SwaI-BamHI* (3705 pb) y *EcoRV-MluI* (5194 pb) del minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+. B. Inmunodetección correspondiente al fragmento *SwaI-BamHI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. C. Inmunodetección correspondiente al fragmento *EcoRV-MluI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. El arco de burbujas está representado en color rojo, el arco de Y simples en verde y el arco de recombinantes en azul. Las señales correspondientes a la terminación se representan en magenta y las señales de acumulación se simbolizan como puntos verdes y azules.

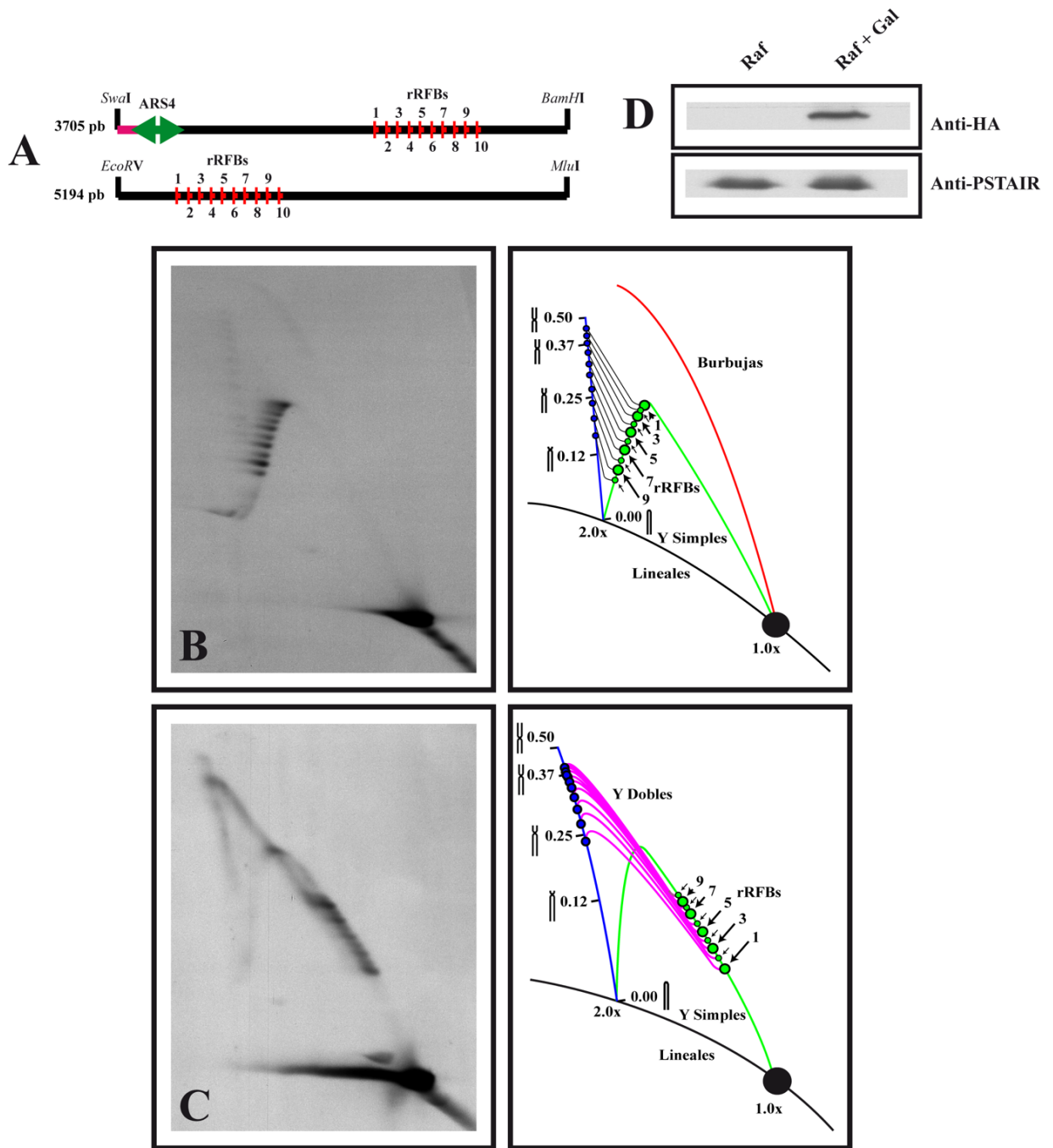


Figura 27. Inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales de las formas digeridas del minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+ extraído de células GAL-3HA-FOB1 donde la proteína Fob1 está sobreexpresada y Western blot de la expresión de Fob1. A. Mapas de los fragmentos lineales *SwaI-BamHI* (3705 pb) y *EcoRV-MluI* (5194 pb) del minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+. **B.** Inmunodetección correspondiente al fragmento *SwaI-BamHI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. **C.** Inmunodetección correspondiente al fragmento *EcoRV-MluI* con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. El arco de burbujas está representado en color rojo, el arco de Y simples en verde y el arco de recombinantes en azul. Las señales correspondientes a la terminación se representan en magenta y las señales de acumulación se simbolizan como puntos verdes y azules. **E.** Western blot de la expresión de la proteína Fob1 en células GAL-3HA-FOB1 cultivadas en presencia de galactosa. Se utilizó el anticuerpo anti-PSTAIR como control de carga.

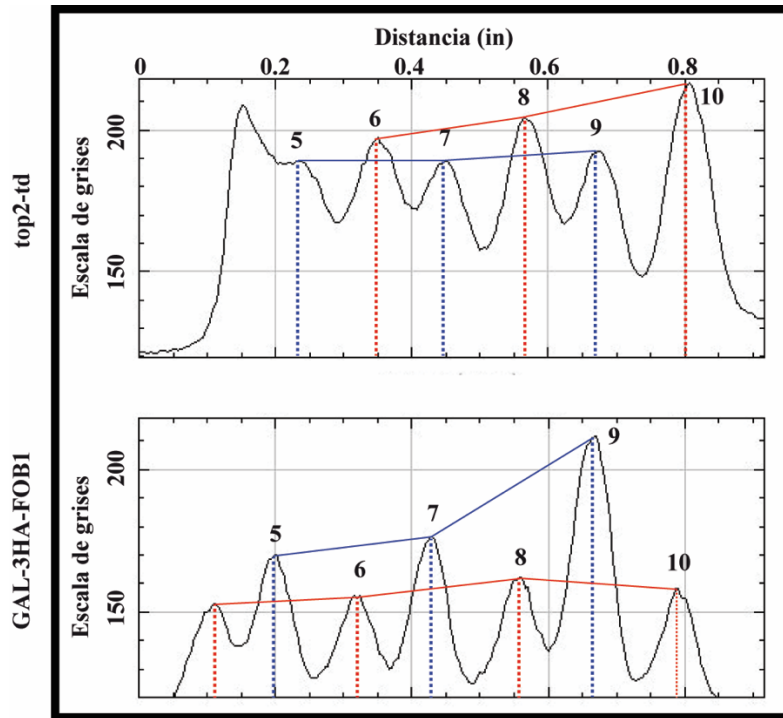


Figura 28. Perfiles densitométricos de los fragmentos *SwaI-BamHI* del minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+ extraído de células top2-td o GAL-3HA-FOB1, donde la proteína Fob1 está **sobreexpresada** Comparación de los perfiles densitométricos de las últimas 6 acumulaciones causadas por las rRFBs que aparecen sobre el arco de Y simples en el corte *SwaI-BamHI* del minicromosomas pYAC_AC_10rRFBs+ extraído de células top2-td (en la parte superior) y de células GAL-3HA-FOB1, con la proteína Fob1 sobreexpresada (en la parte inferior).

Para corroborar que estas diferencias de intensidad en las acumulaciones se debían a la sobreexpresión de Fob1, se utilizó el mismo minicromosoma para transfectar la cepa BY4741, la cual es isogénica de GAL-3HA-FOB1. Se analizó el fragmento *SwaI-BamHI* (Figura 29A), obteniéndose la inmunodetección que se muestra en la Figura 29B. Se puede observar como en este caso no aparece la alternancia de intensidades en las RFBs. Estos resultados confirman que la sobreexpresión de Fob1 es la responsable de las diferencias observadas.

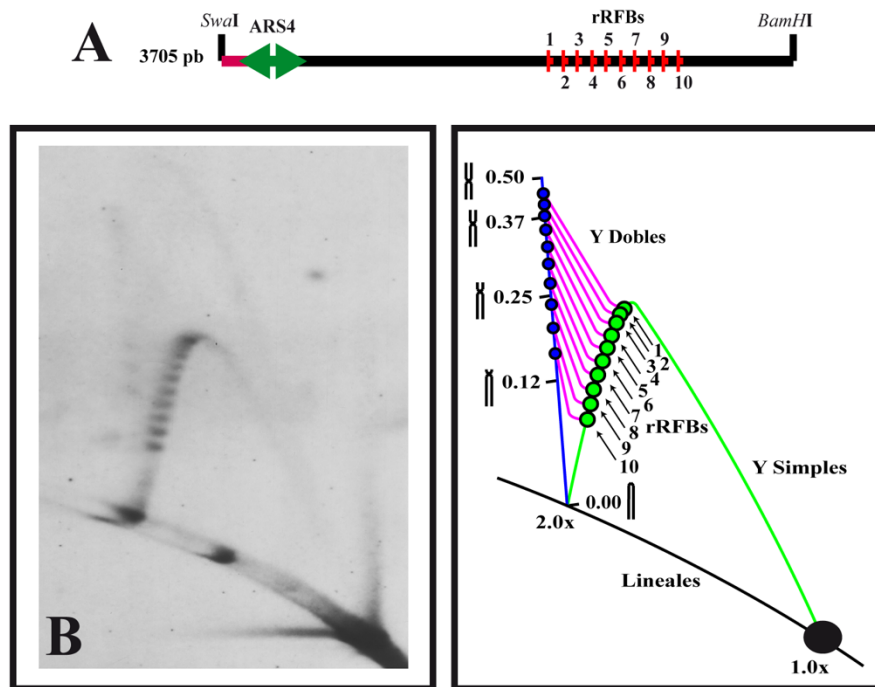


Figura 29. Inmunodetección correspondiente al gel bidimensional de formas digeridas del minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+ extraído de células BY4741. **A.** Mapa del fragmento lineal *SwaI*-*BamHI* (3705 pb) del minicromosoma pYAC_AC_10rRFBs+. **B.** Inmunodetección correspondiente al fragmento con su correspondiente esquema interpretativo a la derecha. El arco de burbujas está representado en color rojo, el arco de Y simples en verde y el arco de recombinantes en azul. Las señales correspondientes a la terminación se representan en magenta y las señales de acumulación se simbolizan como puntos verdes y azules.

4.3 Estudio de los cambios topológicos del DNA derivados de la unión de las proteínas iniciadoras de la replicación

Para estudiar el efecto de la unión de distintas proteínas iniciadoras de la replicación sobre la topología del DNA se analizaron dos minicromosomas derivados de genomas víricos, aislados de células humanas (HEK293). El primero de ellos, pAC_SV40ori (Figura 16) deriva del genoma del virus SV40 y necesita la proteína Antígeno T para iniciar la replicación. El segundo, pAC_EBVoriP (Figura 17) deriva del virus de EBV y necesita que la proteína vírica EBNA1 esté presente para poder replicar.

Se aislaron ambos minicromosomas de células de *E. coli* de la estirpe DH5 α F' y se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa. Los resultados se

muestran en la Figura 30, donde se puede observar como en ambas inmunodetecciones solo se detectan dos señales. La señal superior izquierda corresponde a los OCs (moléculas que han sufrido una rotura de cadena sencilla durante el proceso de aislamiento del DNA) mientras que la señal inferior derecha corresponde a los CCCs. Esto indica que el DNA se encuentra altamente superenrollado.

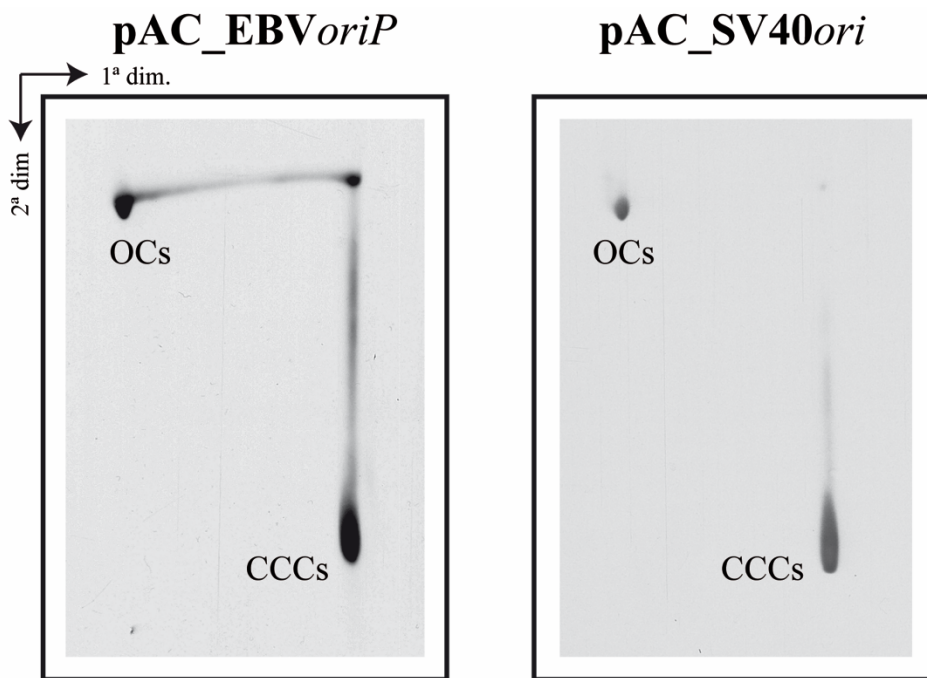


Figura 30. Inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales de las formas intactas de los plásmidos pAC_EBVoriP y pAC_SV40ori aislado de la estirpe DH5 α F' de *E. coli*. En la parte superior izquierda de ambas inmunodetecciones se pueden observar las OCs (moléculas niueadas) y en la parte inferior derecha las CCCs, moléculas con alto grado de superenrollamiento.

Con los minicromosomas pAC_SV40ori y pAC_EBVoriP, aislados de células de *E. coli*, se transfectaron células HEK293T (expresan el Antígeno T) y HEK293E (expresan EBNA1), respectivamente. Tras cultivar las células transfectadas durante 40 h en un medio adecuado, se extrajo el DNA extracromosómico y se analizó mediante geles bidimensionales de agarosa. En primer lugar, dichas electroforesis, se llevaron a cabo en ausencia de ChI (parte izquierda de la Figura 31). En ambas inmunodetecciones se detectan tanto las formas negativamente como las positivamente superenrolladas. Cabe destacar la diferencia existente entre las inmunodetecciones correspondientes a los minicromosomas extraídos de células de *E. coli* y los extraídos de células HEK293. En

la parte superior izquierda de todas las inmunodetecciones se detecta la señal correspondiente a las formas niqueadas (OCs).

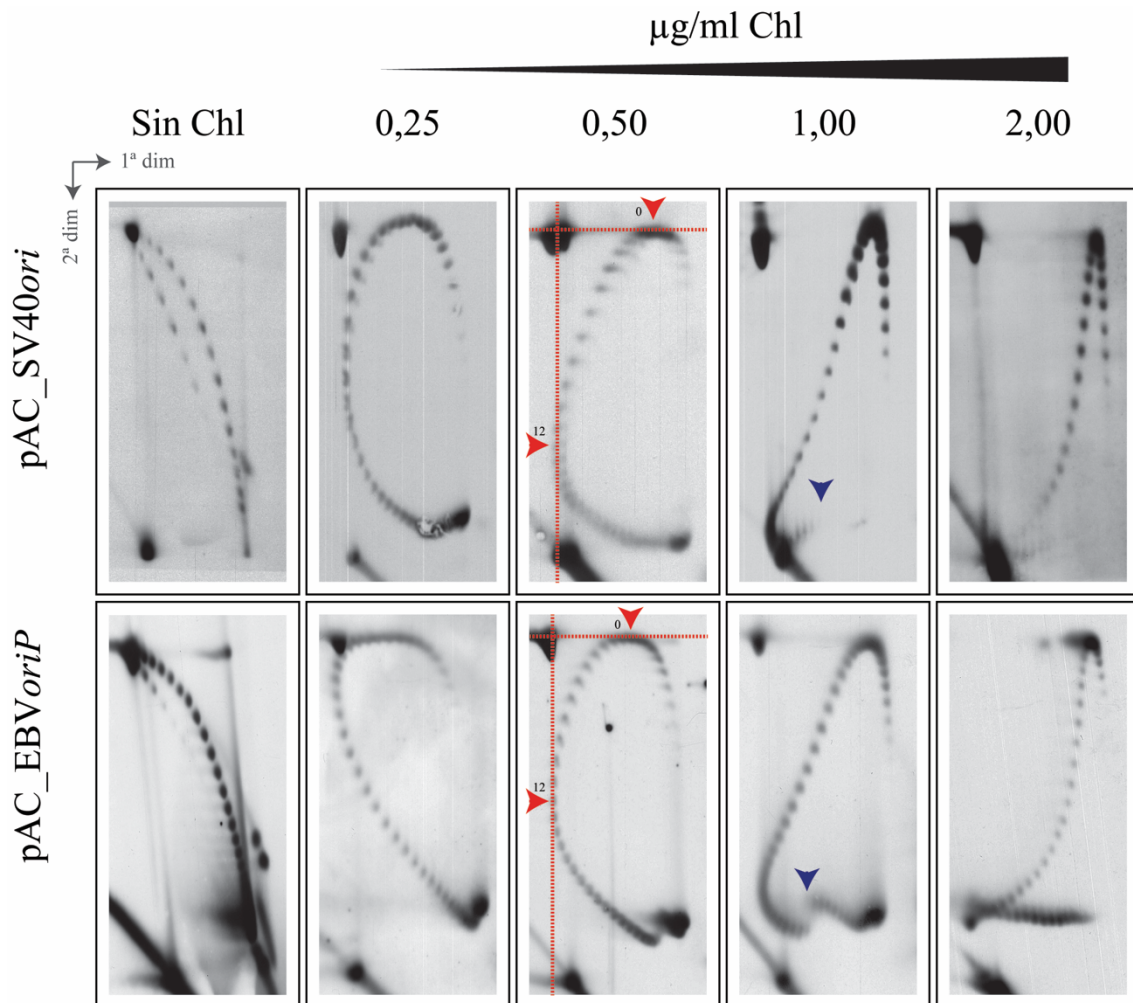


Figura 31. Inmunodetecciones correspondientes a las formas intactas de los minicromosomas pAC_SV40ori y pAC_EBVoriP analizados mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa donde la primera dimensión ocurrió en ausencia o presencia de distintas concentraciones de Chl. La movilidad electroforética de los topoisómeros con $\Delta Lk = 0$ durante la primera y la segunda dimensión se indica con una línea de puntos de color rojo en las inmunodetecciones correspondientes a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de Chl. La transición del DNA a formas distintas a la B se señala con una flecha de color azul.

Al observar que apenas existían diferencias entre los dos minicromosomas, se corrieron varios geles bidimensionales en presencia de concentraciones crecientes de Chl (0,25, 0,5, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$) durante el desarrollo de la primera dimensión, resolver mejor toda la población de topoisómeros. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31. Este protocolo permite calcular cuantas vueltas de superenrollamiento (+) introduce la Chl en cada caso, ya que se corresponde con el número de topoisómeros que hay entre el

topoisómero que ha migrado con un $\Delta Lk = 0$ tras la primera dimensión y el topoisómeros que ha migrado con un $\Delta Lk = 0$ al finalizar la segunda dimensión. Para identificar estos topoisómeros se utilizó como guía la movilidad electroforética de las formas niqueadas (señalado con una línea roja punteada en las inmunodetecciones expuestas a $0,5 \mu\text{g/ml}$ de Chl en la Figura 31). La tensión inicial del minicromosoma puede influir en la eficiencia de la Chl introduciendo vueltas de superenrollamiento. No tendrá el efecto mismo tratar con Chl una molécula relajada que una altamente superenrollada. En el primer caso, la Chl tendrá una accesibilidad mayor al DNA y, por tanto, será más eficiente introduciendo superenrollamiento.

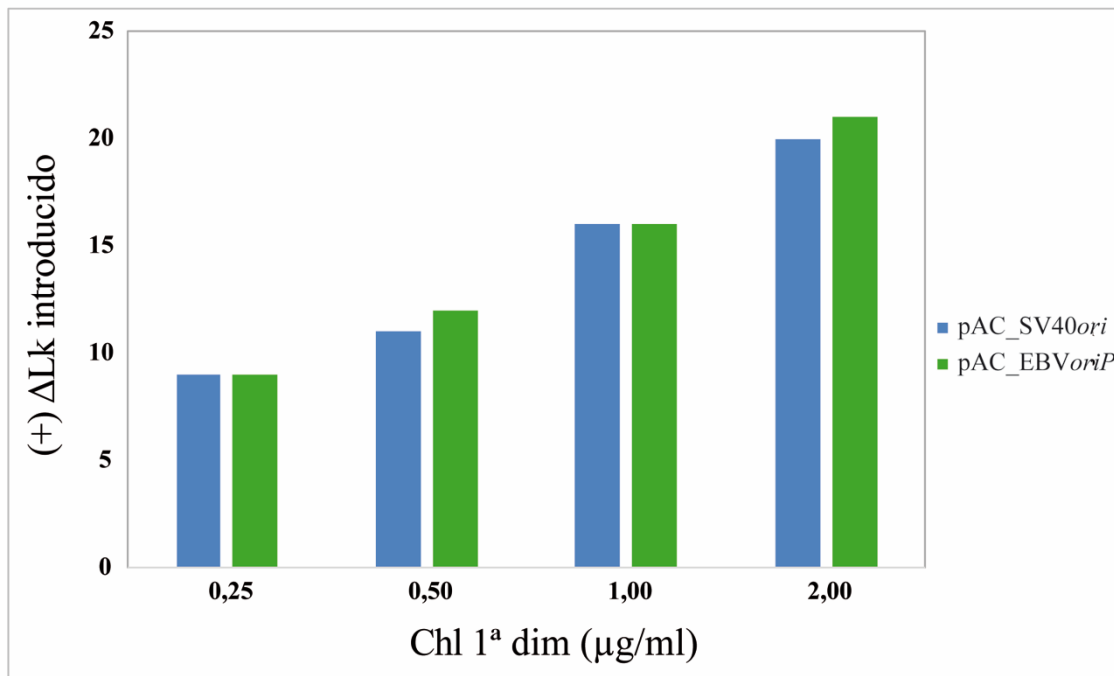


Figura 32. Histograma de la eficiencia que presentan distintas concentraciones de Chl introduciendo superenrollamiento (+) en los minicromosomas pAC_SV40ori y pAC_EBVoriP. El número de vueltas de superenrollamiento (+) que introduce la Chl se corresponde con el número de topoisómeros presentes entre el topoisómero que migró con un $\Delta Lk = 0$ después de la primera dimensión y el topoisómero que migró con un $\Delta Lk = 0$ tras la segunda dimensión (indicados mediante unas líneas punteadas de color rojo en la figura 31).

En la Figura 32 se muestra un histograma comparativo entre los resultados obtenidos en ambos minicromosomas. Se puede observar como las diferencias entre los dos minicromosomas son prácticamente inexistentes. La eficiencia de la Chl introduciendo superenrollamiento (+) es prácticamente idéntica en los dos

minicromosomas analizados. Esto indica que ambos minicromosomas partían inicialmente de un nivel de torsión similar, por lo que la unión de las distintas proteínas iniciadoras no modifica la topología de los minicromosomas. Esta observación es consistente con los experimentos realizados por Avolio-Hunter y colaboradores, los cuales concluyeron que EBNA1 es capaz de unirse a cromatina, sin desplazar o eliminar los nucleosomas (Avolio-Hunter and Frappier, 2003).

Si se observan las inmunodetecciones correspondientes a los geles bidimensionales expuestos a 1 $\mu\text{g/ml}$ de Chl en la Figura 31, se detecta una discontinuidad en el arco de topoisómeros (señalada con una flecha azul). Se sabe que cuando el DNA se encuentra muy negativamente superenrollado puede adoptar conformaciones distintas a la B. Este cambio de conformación suele ir acompañado de la aparición de regiones de cadena sencilla, lo que provoca una disminución en la movilidad electroforética de ese topoisómero en concreto (Bates and Maxwell, 2005). Durante el desarrollo de la primera dimensión en presencia de Chl, la transición a conformaciones distintas a la B está inhibida, ya que la tensión general del DNA disminuye por el efecto del agente intercalante. Sin embargo, cuando se corre la segunda dimensión en ausencia de Chl, el DNA recupera su torsión original, pudiendo adoptar conformaciones distintas a la B causando una variación de la movilidad en un topoisómero con un ΔLk específico. Los resultados obtenidos indican que la densidad de superenrollamiento nativa para ambos minicromosomas es prácticamente idéntica, ya que la adopción de conformaciones distintas a B, y, por tanto, la discontinuidad en el arco, se llevan a cabo en el mismo topoisómero.

Para tratar de corroborar estos resultados se analizó otro minicromosoma: pEco3' Δ , en presencia y ausencia de la proteína vírica EBNA1. Este minicromosoma es un híbrido entre pAC_SV40*ori* y pAC_EBV*oriP*, ya que contiene el origen de replicación de SV40 y la FR del *oriP* de EBV (Figura 15). Al no contener la diada, el *oriP* no puede actuar como origen de replicación, aunque EBNA1 esté presente (Dhar and Schildkraut, 1991). Por tanto, este minicromosoma no podrá replicar en células HEK293E. Sin embargo, replica de manera muy eficiente en HEK293T. Mediante la realización de estudios *in vitro*, se ha visto que en este minicromosoma la iniciación de la replicación tiene lugar de manera bidireccional a partir del origen de replicación de SV40 y que la FR de EBV actúa

tanto de barrera para las horquillas replicativas como de sitio de terminación, siempre y cuando la proteína EBNA1 sea proporcionada en *trans* (Dhar and Schildkraut, 1991; Platt et al., 1993).

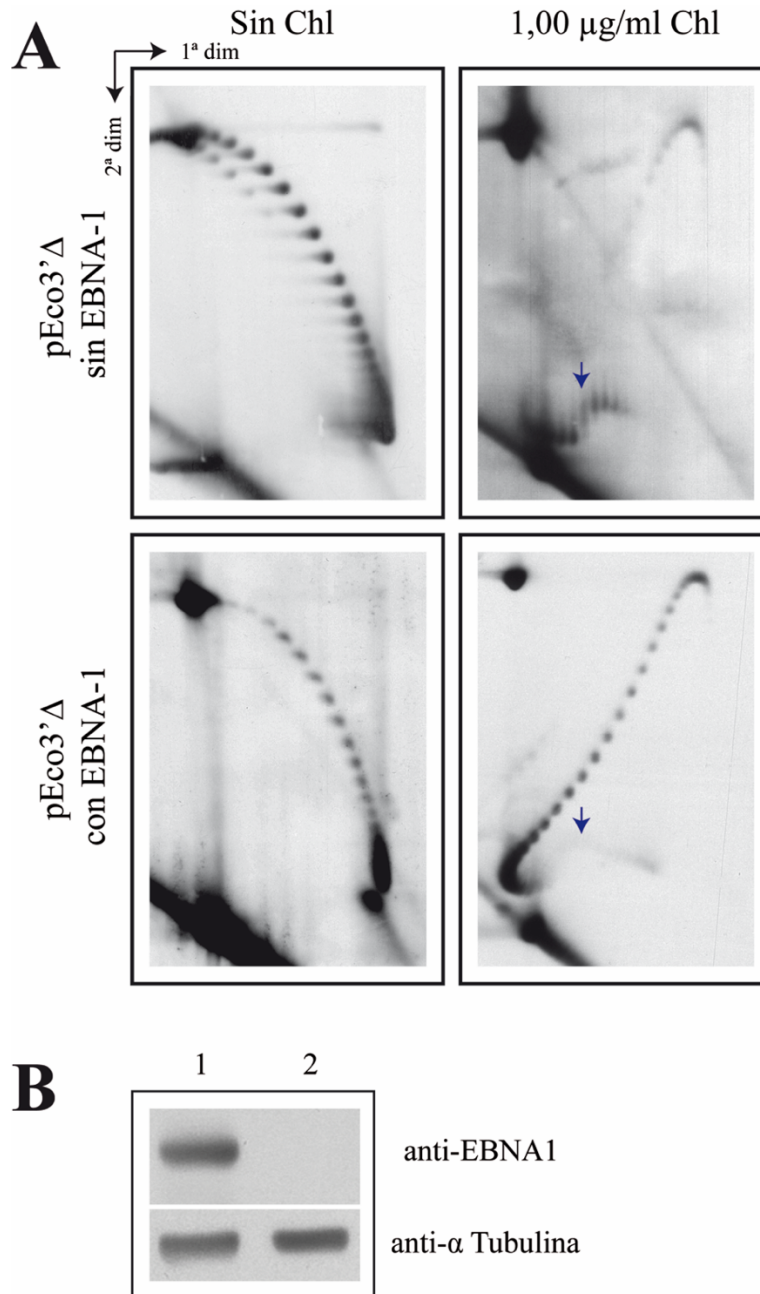


Figura 33. Inmunodetecciones correspondientes a las formas intactas del minicromosoma pEco3'Δ aislado de células HEK293T en presencia y ausencia de EBNA1, analizado mediante electroforesis bidimensional en geles de agarosa y sus correspondientes *Western blots*. A. Las inmunodetecciones que aparecen a la izquierda se llevaron a cabo sin Chl. En las que se muestran a la derecha se utilizó 1 $\mu\text{g/ml}$ de Chl durante la primera dimensión. Las flechas azules señalan la transición del DNA a formas distintas a la B. B. *Western blot* de la expresión de la proteína EBNA1 en células HEK293T cotransfectadas con pEco3'Δ y pCXWB-EBNA1 (columna 1) o transfectadas solo con el minicromosoma pEco3'Δ (columna 2). Se utilizó α -tubulina como control de carga.

Se transfectaron células HEK293T con pEco3' Δ o se cotransfectaron con el mismo minicromosoma más pCXWB-EBNA1, que contiene el gen que codifica para la proteína EBNA1. Las células transfectadas se cultivaron como en los casos anteriores y se extrajo el DNA extracromosómico para analizarlo por geles bidimensionales de agarosa, utilizando, en algunos casos, 1 μ g/ml de Chl durante la primera dimensión. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la Figura 33A, donde las transiciones a conformaciones distintas a la B se encuentran señaladas con una flecha en color azul. Se observa como la presencia de EBNA1 no modifica este hecho. Esto parece indicar que la unión de EBNA1 a la FR del *oriP* de EBV no conlleva consecuencias topológicas.

Para confirmar la presencia de EBNA1 en las células cotransfectadas con pEco3' Δ y pCXWB-EBNA1 se aislaron proteínas de las mismas células utilizadas para realizar la extracción del DNA extracromosómico. Dichas proteínas fueron analizadas mediante *Western Blot*, obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 33B. Se observa como EBNA1 está presente en las células cotransfectadas (columna 1) pero no se detecta proteína cuando las células se transfectaron solamente con pEco3' Δ (columna 2). Se utilizó un anticuerpo contra la proteína α -tubulina como control de carga.

5. DISCUSIÓN

5.1 Dinámica de los cambios topológicos durante la replicación de plásmidos bacterianos

Actualmente existe un debate abierto sobre la formación de pre-encadenados durante el proceso de replicación (Schvartzman and Stasiak, 2004). Por un lado, algunos autores sostienen que la maquinaria de replicación se encuentra anclada a la membrana bacteriana, impidiendo que las horquillas de replicación puedan girar libremente *in vivo*. En este caso no se formarían pre-encadenados a medida que avanza la horquilla. Estos autores afirman que la formación de moléculas encadenadas tendría lugar solo al final de la replicación, cuando quedaran alrededor de 200 pb sin replicar y ni la DNA girasa ni la Topo IV pudieran actuar por delante de la horquilla (Hiasa and Marians, 1996; Sundin and Varshavsky, 1980). Por el contrario, otros autores sostienen que las horquillas pueden girar libremente *in vivo*, con la consiguiente formación de pre-encadenados a lo largo del proceso de replicación (Lucas et al., 2001; Peter et al., 1998; Postow et al., 1999). En la presente Tesis Doctoral se han aportado pruebas para intentar resolver la incógnita de si las horquillas de replicación pueden girar libremente *in vivo* y, por tanto, si hay formación de pre-encadenados a lo largo del proceso de replicación en plásmidos bacterianos.

Hay que tener en cuenta que existen dos situaciones claramente diferenciadas: lo que sucede *in vivo* y lo que sucede *in vitro*, una vez que el DNA ha sido extraído de las células y ha sufrido un proceso de desproteización. Cuando tenemos el DNA aislado, las horquillas de replicación podrán girar libremente, ya que no tendrán ningún impedimento físico. Esta rotación permitirá que la tensión torsional difunda entre la región no replicada y la ya replicada y viceversa, hasta conseguir el equilibrio termodinámico de la molécula (Ullsperger et al., 1995). Además, al trabajar con plásmidos que tienen una secuencia *TerE*, hay que distinguir también dos situaciones *in vivo*: lo que sucede antes y después de que la horquilla se detenga al alcanzar el complejo *Ter-Tus*. Una vez que la horquilla se ha detenido, y, hasta el momento de la extracción del DNA, las distintas topoisomerasas podrán seguir actuando sobre los RIs, modificando su topología. Además el proceso de replicación de estos plásmidos bacterianos *in vivo* ocurre a gran velocidad por tanto, para poder estudiar RIs hay que detener la horquilla de manera artificial; en este caso, incorporando una secuencia *TerE* en los plásmidos objeto de nuestro estudio. Por ello, a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en este trabajo

hay que tener en cuenta que no se trata de una situación que suceda *in vivo* de manera natural.

Teniendo en cuenta estas consideraciones previas se pueden interpretar y discutir los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados en la presente Tesis.

Si suponemos que la maquinaria de replicación se encuentra anclada a la membrana impidiendo el giro de las horquillas *in vivo*, la tensión generada por delante de la horquilla (en la región no replicada) no podría difundir a la región ya replicada. En los plásmidos utilizados en esta Tesis, una vez que la horquilla se detiene en el complejo *Ter-Tus* y, hasta el momento de la extracción del DNA, la DNA girasa seguiría introduciendo superenrollamiento (-) en la región no replicada. Al no poder girar las horquillas, este superenrollamiento (-) no podría difundir a la región ya replicada en forma de pre-encadenados y, por tanto, la Topo IV no podría actuar a este nivel siendo irrelevante si la estirpe es deficiente (*parE10*) o proficiente (*DH5 α F'*) en esta enzima. *In vitro*, durante el proceso de aislamiento y desproteización del DNA, los cruces dextrógiros del superenrollamiento (-) de la región no replicada podrían difundir a la región ya replicada en forma de pre-encadenados con cruces levógiros, hasta que se equilibrara la tensión entre ambas regiones (Figura 3). En los plásmidos *pBR-TerE*, el grado de torsión variaría dependiendo únicamente del tamaño de la región no replicada. Dicha región no replicada representa el 20% en el caso de los RIs para *pBR-TerE@DraI*, el 40% para *pBR-TerE@AatII* y el 80% para *pBR-TerE@StyI* (Figuras 8, 9 y 10). Cuanto más pequeña sea la región no replicada de los RIs, menos espacio tendrá la DNA girasa para introducir superenrollamiento (-) después de la parada en *TerE*. Esta torsión introducida por la DNA girasa se redistribuiría entre la región no replicada y la ya replicada solamente *in vitro*, después del proceso de desproteización. Por tanto, los RIs de *pBR-TerE@StyI* mostrarían el mayor grado de torsión. Mientras que los RIs de *pBR-TerE@DraI* mostrarían el menor.

En resumen, si las horquillas no giraran libremente *in vivo*, los RIs aislados de la estirpe salvaje (*DH5 α F'*) estarían igual de torsionados que los aislados de la estirpe deficiente en Topo IV (*parE10*).

Si por el contrario se considera que las horquillas pueden girar libremente *in vivo*, el superenrollamiento (+) (con cruces levógiros) que se acumula por delante de la horquilla a medida que avanza la replicación, podría difundir transitoriamente a la región ya replicada, en forma de pre-encadenados (con cruces dextrógiros) (Champoux and Been, 1980; Peter et al., 1998; Ullsperger et al., 1995). En el caso de la estirpe salvaje (DH5 α F'), la Topo IV podría eliminar dichos pre-encadenados con cruces dextrógiros, aunque lo haría de manera menos eficiente que si fueran cruces levógiros (Crisona et al., 2000). Una vez que la horquilla alcanzara la secuencia *TerE* y se detuviera, los pre-encadenados de la región ya replicada y el superenrollamiento (-) de la región no replicada (ambos con cruces dextrógiros), se equilibrarían hasta alcanzar el equilibrio termodinámico de la molécula. La DNA girasa podría seguir introduciendo superenrollamiento (-) con cruces dextrógiros en la región no replicada. Esta torsión difundiría a la región ya replicada en forma de pre-encadenados con cruces levógiros, sustrato sobre el cual la Topo IV actúa de manera muy eficiente. Este “tira y afloja” entre la DNA girasa, que introduce superenrollamiento (-) en la región no replicada, y la Topo IV, que elimina los pre-encadenados que han difundido a la región ya replicada, comenzaría en el momento en que la horquilla se detuviese en el complejo *Ter-Tus* y continuaría hasta interrumpirse el crecimiento celular, para llevar a cabo la extracción del DNA. La eficiencia de la DNA girasa introduciendo superenrollamiento (-) es similar a la Topo IV eliminando pre-encadenados con cruces levógiros (Hiasa and Marians, 1996; Ullsperger and Cozzarelli, 1996). Por tanto, los RIs aislados de las células con la Topo IV activa (DH5 α F') no estarían saturados en ninguna de las dos regiones. En cambio, en los RIs aislados de ParE10, con la Topo IV inactiva, en el momento en que la horquilla se detuviera al alcanzar el complejo *Ter-Tus*, la DNA girasa también seguirá introduciendo superenrollamiento (-) con cruces dextrógiros, que difundirá a la región ya replicada en forma de pre-encadenados levógiros, sin embargo, en este caso la Topo IV no eliminaría dichos pre-encadenados dando lugar a RIs completamente saturados en ambas regiones. Por ello, el nivel de torsión en estos RIs sería mayor que en los aislados de las células DH5 α F'.

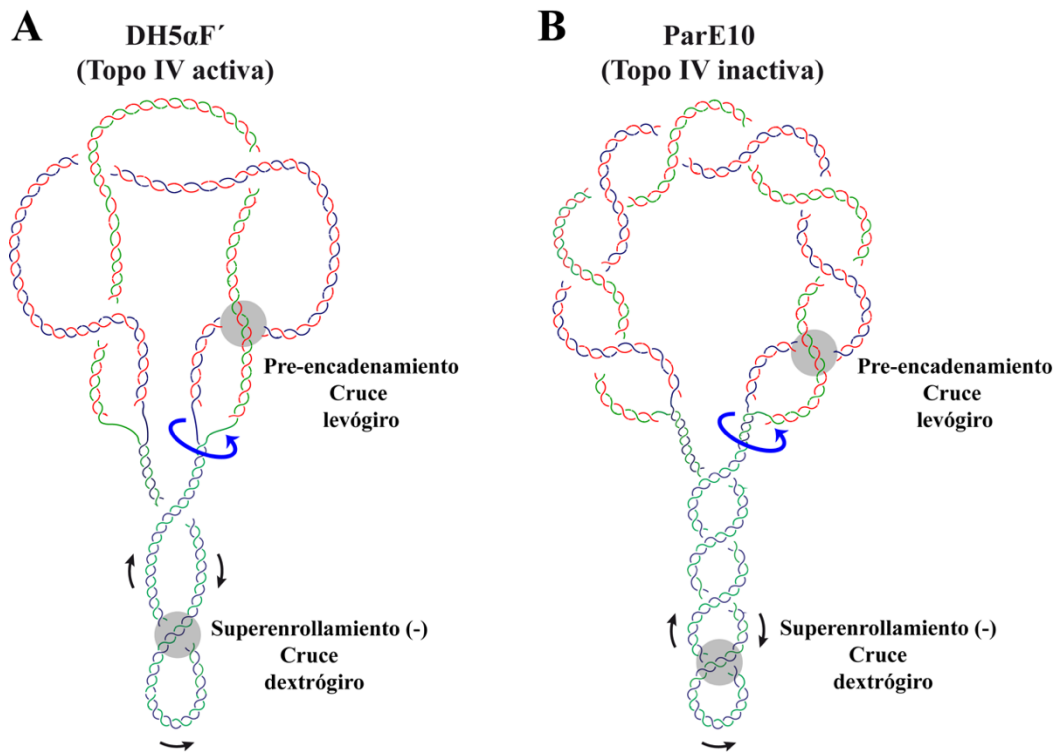


Figura 34. Esquema de los intermediarios de replicación, ilustrando el grado y distribución de la torsión esperables tanto en la región no replicada como en la ya replicada aislados de dos estirpes distintas de *E. coli* (una proficiente y otra deficiente en Topo IV), considerando que las horquillas de replicación pueden girar *in vivo*. Para simplificar solo se representan los CCRIs del plásmido pBR-*TerE@AatII*. **A:** CCRi aislado de células donde la Topo IV está activa (DH5αF'). **B:** CCRi aislado de células *parE10* crecidas a temperatura restrictiva donde la Topo IV está inactiva. La flecha azul hace referencia al giro de las horquillas de replicación tanto *in vivo* como *in vitro*. En la región no replicada, las dos hebras parentales se representan en azul y verde. En la región replicada las hebras nacientes se representan en rojo.

En resumen, si las horquillas giraran *in vivo* cabría esperar una diferencia en el nivel de torsión de los RIs aislados de ambas estirpes. En la estirpe DH5αF' la Topo IV podría eliminar pre-encadenados y, por lo tanto, los RIs nunca llegarían a saturarse de superenrollamiento (en la región no replicada) ni de pre-encadenamiento (en la región ya replicada). En la estirpe *parE10*, por el contrario, la Topo IV no podría eliminar el pre-encadenamiento, y, por tanto, ambas regiones quedarían saturadas. En la Figura 34 se ilustran las diferencias en el grado de torsión esperables en los RIs aislados de las dos estirpes considerando que las horquillas de replicación de plásmidos bacterianos pudieran girar libremente *in vivo*.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral indican que las horquillas de replicación pueden girar libremente *in vivo*, y que, por tanto, hay formación de pre-encadenados a lo largo del proceso de replicación.

En la Figura 34 se observa cómo los RIs aislados de la estirpe con la Topo IV inactiva (*parE10*) están más torsionados que los aislados de *DH5 α F'*, donde la Topo IV permanece activa. Comparando la movilidad electroforética de los RIs de los plásmidos con la parada en *AatII*, observamos que los topoisómeros de los RIs de *DH5 α F'* describen un arco que abarca desde la zona donde migran los CCRIIs que poseen mayor movilidad electroforética hasta los OCRIIs. En cambio, los topoisómeros aislados de las células deficientes en Topo IV se encuentran acumulados en la zona de mayor movilidad electroforética, lo que indica que están altamente torsionados. Sin embargo, esta observación es menos pronunciada para los plásmidos con la parada en *StyI* y *DraI*, ya que apenas hay diferencia en la distribución de los topoisómeros de los RIs. Esto puede ser debido a que en el caso de *pBR-TerE@AatII* aproximadamente la mitad de la molécula permanece sin replicar mientras que la otra mitad ya ha sido replicada. Por esta razón, cambios sutiles en su tensión tienen un efecto inmediato en la movilidad electroforética. En cambio, en *pBR-TerE@StyI* la mayor parte de la molécula se compone de superenrollamiento (-) en la región no replicada y *pBR-TerE@DraI* la mayor parte se compone de pre-encadenados (al tener la región ya replicada muy grande). Por tanto, en ambos casos, se necesitarían diferencias muy pronunciadas de torsión para poder detectar cambios significativos en la movilidad electroforética de estos plásmidos.

Para tratar de confirmar la observación de que los RIs aislados de células *parE10* se encuentran más torsionados que los aislados de células *DH5 α F'*, se utilizó la cloroquina (Chl) como agente intercalante durante el desarrollo de la segunda dimensión. Cabe destacar que la Chl no tiene ningún efecto en la región ya replicada, ya que las cadenas nacientes tienen los extremos libres (Postow et al., 2001; Schwartzman and Stasiak, 2004). Los resultados obtenidos mediante la utilización de este agente intercalante, enfatizan la hipótesis de que las horquillas pueden girar libremente durante la replicación. Si los RIs de los plásmidos aislados de ambas estirpes tuvieran el mismo grado de torsión utilizando la misma cantidad de Chl se conseguiría el mismo nivel de relajación. En las inmunodetecciones de la Figura 19 se observó que la presencia de Chl en el plásmido *pBR-TerE@DraI* tenía un efecto insignificante, ya que la región no replicada sólo comprende el 20% del plásmido. En cambio, en *pBR-TerE@StyI*, donde la región no replicada es el 80% de la molécula, el efecto de la Chl fue claramente visible. A pesar de que sin Chl no se observaban diferencias en el nivel de torsión entre los RIs

aislados de ambas cepas, al tratar con este agente intercalante aparecen diferencias significativas, dejando en evidencia que los RIs aislados de parE10 están más torsionados que los aislados de DH5 α F'. La Chl relajó completamente un número significativo de CCRIIs en el caso de las moléculas aisladas de DH5 α F', mientras que aún era posible detectar topoisómeros con una elevada movilidad electroforética en el caso de los aislados de parE10. Una observación similar es evidente en el caso de los plásmidos pBR-TerE@AatII.

Los datos experimentales correspondientes a las Figuras 18 y 19 indican que los RIs aislados de células parE10 tienen un nivel de torsión mayor que los aislados de células DH5 α F'. En la Figura 35 se representan los esquemas de los RIs de los tres plásmidos aislados de ambas estirpes según la interpretación basada en los resultados que se muestran en las Figuras 18 y 19. Las diferencias observadas indican que las horquillas de replicación pueden girar *in vivo* y que, por lo tanto, hay formación de pre-encadenados en plásmidos bacterianos durante la replicación.

5.1.1 Anudamiento de las cromátidas hermanas durante el proceso de replicación

Inicialmente se atribuyó a la DNA girasa las funciones de anudamiento y desanudamiento del DNA bacteriano. Esta hipótesis surgió porque Shishido y colaboradores observaron un aumento de los nudos formados *in vivo* en plásmidos de pBR322 crecidos en estirpes de *E. coli* defectivas para la DNA girasa (Shishido et al., 1987). Sin embargo, posteriormente, se descubrió que las funciones de anudar y desanudar recaen sobre la Topo IV (Deibler et al., 2001; Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997). El aumento de nudos observado en el DNA cuando la DNA girasa está inactiva sugiere que el nivel de superenrollamiento ayuda a la Topo IV a mantener el DNA desanudado *in vivo* (Lopez et al., 2012; Witz et al., 2011; Witz and Stasiak, 2010). En otras palabras, la probabilidad de anudamiento aumenta a medida que disminuye el superenrollamiento. Por otro lado, se ha descrito que el nivel de anudamiento del DNA es directamente proporcional a la masa molecular del mismo, es decir, una molécula con más masa presentará un mayor número de nudos (Olavarrieta et al., 2002b).

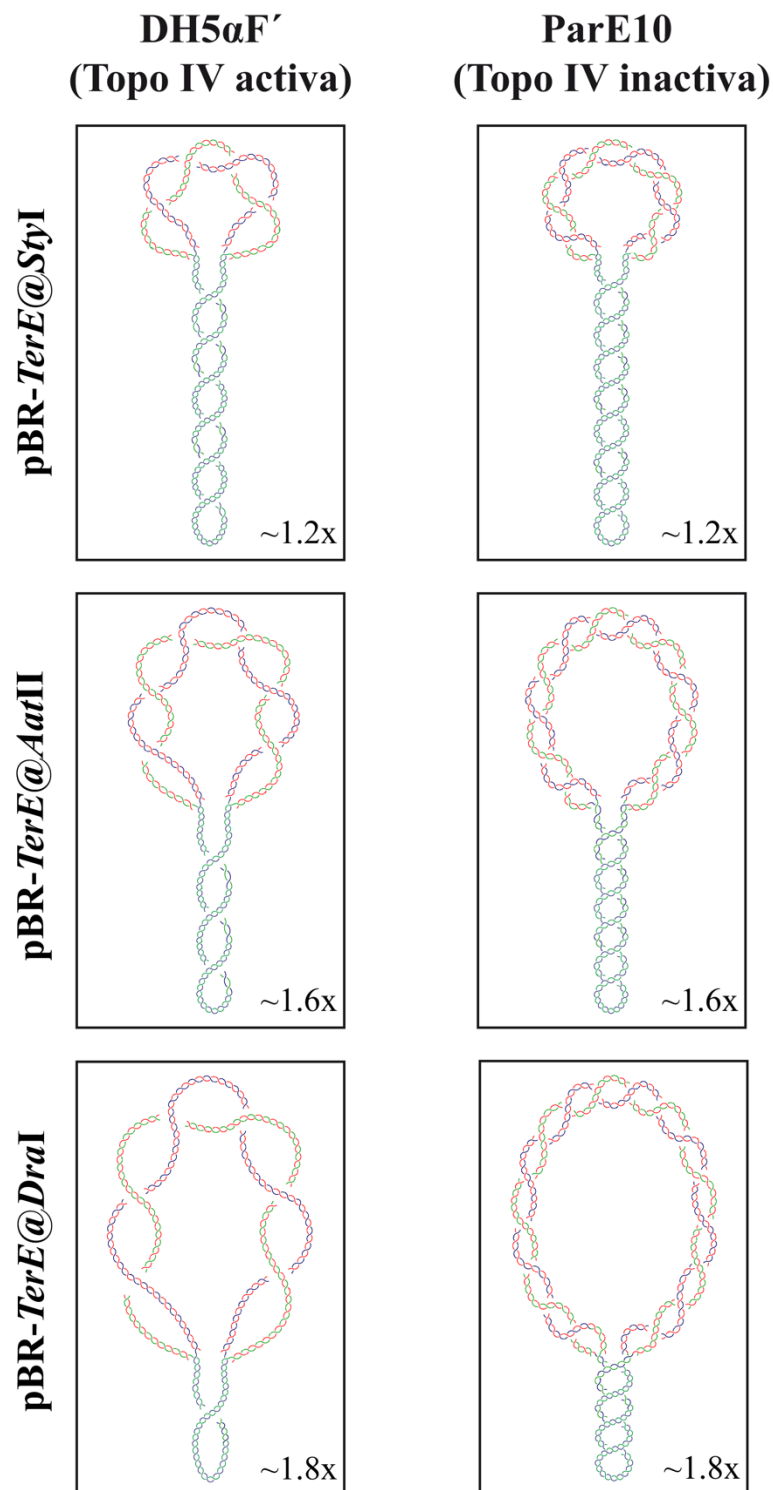


Figura 35. Esquema de las diferencias observadas en el gradoy distribución de la torsión de los plásmidos pBR-TerE@StyI, pBR-TerE@AatII y pBR-TerE@DraI aislados de las células DH5 α F' (Topo IV activa) o parE10 (Topo IV inactiva). En el caso del plásmido pBR-TerE@StyI la mayoría de los cruces son superenrollamiento, mientras que para pBR-TerE@DraI son pre-encadenados. En pBR-TerE@AatII hay una distribución similar entre ambos tipos de cruces. En los tres plásmidos, la torsión general es mayor en los aislados de la estirpe parE10. En todos los casos, las dos hebras parentales se representan en color verde y azul y las hebras nacientes en rojo.

5.1.2 Anudamiento de las cromátidas hermanas durante el proceso de replicación

Inicialmente se atribuyó a la DNA girasa las funciones de anudamiento y desanudamiento del DNA bacteriano. Esta hipótesis surgió porque Shishido y colaboradores observaron un aumento de los nudos formados *in vivo* en plásmidos de pBR322 crecidos en estirpes de *E. coli* defectivas para la DNA girasa (Shishido et al., 1987). Sin embargo, posteriormente, se descubrió que las funciones de anudar y desanudar recaen sobre la Topo IV (Deibler et al., 2001; Zechiedrich and Cozzarelli, 1995; Zechiedrich et al., 1997). El aumento de nudos observado en el DNA cuando la DNA girasa está inactiva sugiere que el nivel de superenrollamiento ayuda a la Topo IV a mantener el DNA desanudado *in vivo* (Lopez et al., 2012; Witz et al., 2011; Witz and Stasiak, 2010). En otras palabras, la probabilidad de anudamiento aumenta a medida que disminuye el superenrollamiento. Por otro lado, se ha descrito que el nivel de anudamiento del DNA es directamente proporcional a la masa molecular del mismo, es decir, una molécula con más masa presentará un mayor número de nudos (Olavarrieta et al., 2002b).

Teniendo en cuenta lo anterior, se midió el grado de anudamiento de los RIs aislados de las estirpes DH5 α F' (Figura 20) y parE10 (Figura 21) de los tres plásmidos de nuestro estudio, para analizar las posibles diferencias de torsión en los RIs desde otro enfoque. Como cabía esperar, los RIs aislados del plásmido con la parada en *StyI*, al tener la región ya replicada muy pequeña, presentan pocos nudos y muy sencillos. Por el contrario, pBR-*TerE@DraI*, alberga un mayor número de nudos y de mayor complejidad. Además, se observa como tanto el número de nudos como la complejidad de los mismos, es mayor en los RIs aislados de DH5 α F', apuntando que el grado de pre-encadenamiento es mayor para los aislados de parE10. Esto indica que las horquillas de replicación pueden girar libremente *in vivo*, permitiendo la formación de pre-encadenados.

Los datos experimentales recogidos en esta Tesis Doctoral, basándose en los resultados obtenidos utilizando tres criterios distintos, muestran que, *in vivo*, los RIs aislados de células DH5 α F' (Topo IV activa) están menos torsionados que los aislados de células parE10 (Topo IV inactiva). Esta observación apoya la idea de que las horquillas de replicación pueden girar libremente *in vivo*, con la consiguiente formación de pre-encadenados durante el proceso de replicación. No obstante, no hay que perder de vista

que esta conclusión se basa en observaciones realizadas en plásmidos bacterianos artificiales, de pequeño tamaño y con un bloqueo para la horquilla de replicación; de manera que es posible que el giro de las horquillas sólo se produzca *in vivo* si la progresión de la horquilla está impedida o afectada de alguna manera. La generalización a otros sistemas como el cromosoma de *E. coli* o los cromosomas de los organismos eucariotas entraña una mayor dificultad.

5.2 Estudio del número de barreras presentes en el rDNA y su estabilidad

En 1992 Kobayashi y colaboradores definieron la unidad mínima necesaria del rDNA de *S. cerevisiae* para detener las horquillas de replicación. Se trata de la región *HpaI-HindIII*, de 129 pb, presente en el IGS1 del rDNA (Kobayashi et al., 1992). Posteriormente, Ward y colaboradores identificaron las dos regiones concretas (RFB1 y RFB2) responsables del bloqueo de las horquillas en ese fragmento. Para ello realizaron un experimento de mutagénesis sistemática sobre regiones consecutivas de 10 pb a lo largo de todo el fragmento (Ward et al., 2000). Pero no fue hasta el año 2003 cuando Kobayashi identificó la RFB3 (Kobayashi, 2003). Delecionó el fragmento *HpaI-HindIII* del IGS1 y observó que seguía habiendo bloqueo de las horquillas, aunque de manera mucho más débil. Realizó varios experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y DNaseI *footprinting* y confirmó que existen tres sitios potenciales de unión para Fob1: RFB1, RFB2 y RFB3. Sin embargo, al realizar geles bidimensionales de agarosa solo observó dos acumulaciones. Kobayashi, para intentar explicar este hecho, hipotetizó que la segunda acumulación que él veía correspondía a la RFB2 y la RFB3 juntas, ya que al estar tan cerca ambas secuencias la técnica no tenía la suficiente resolución como para separarlas. En la presente Tesis Doctoral, para tratar de averiguar si esta hipótesis es correcta, se construyó un minicromosoma en el cual los tres sitios de unión a Fob1 (RFB1, RFB2 y RFB3) están equidistantes, separados entre sí por 40 pb (distancia que separa la RFB1 de la RFB2 *in vivo*) (Figura 13). Esto se consiguió introduciendo 17 pb entre la RFB2 y la RFB3. Tras analizar dicho minicromosoma por electroforesis bidimensional se observaron únicamente dos acumulaciones (Figuras 24B y C). Dichas acumulaciones están más separadas entre sí que en el caso control (Figuras 23B y C), donde la RFB1, RFB2 y RFB3 están colocadas en la misma posición que se encuentran *in vivo*. Esto nos permite concluir que, el hecho de observar solamente dos acumulaciones no es problema

de la resolución de la técnica. Quizá la RFB2 sea más fuerte o forme un complejo más estable con Fob1 que la RFB3, es decir, la RFB2 predomina sobre la RFB3. Cuando están presentes ambas secuencias solo actuaría como barrera la RFB2, y por eso se observarían solamente dos acumulaciones a pesar de la existencia de tres potenciales sitios de unión a Fob1. En cambio, si se eliminan la RFB1 y la RFB2, como hizo Kobayashi (Kobayashi, 2003), la RFB3 actúa como barrera.

Otra observación destacable es que, independientemente del número de RFBs presentes en el minicromosoma de estudio, se detecta el arco completo de Y simples (Figuras 23, 24, 26 y 27); lo que indica que hay horquillas que atraviesan las RFBs, aparentemente, sin problemas. Por otra parte, en las mismas inmunodetecciones, también se detecta señal de Y dobles, indicando que la replicación del minicromosoma termina cuando la horquilla que gira en sentido antihorario alcanza la horquilla que ha quedado bloqueada en las RFBs. Ambas observaciones sugieren que no todas las horquillas quedan detenidas al alcanzar las RFBs, pero las que se detienen lo hacen de forma permanente. Hay que tener en cuenta que el bloqueo de las horquillas puede ocurrir de forma natural o estar causado por factores exógenos, como daño en el DNA (Mirkin and Mirkin, 2007). Cuando existen impedimentos naturales, por ejemplo, la unión de proteínas específicas al DNA, como Fob1, se sabe que otras proteínas (Tof1 y Csm3 en *S. cerevisiae*) se unen al complejo proteína-DNA para proteger y estabilizar las horquillas detenidas (Calzada et al., 2005). En cambio, cuando las horquillas se detienen debido a factores exógenos, en la mayoría de los casos, colapsan inmediatamente, provocando procesos de recombinación y reparación del DNA. Cuando esto sucede la estabilidad genómica puede verse comprometida (Friedberg et al., 2005). Independientemente de lo que cause el bloqueo de las horquillas, la estabilidad de las mismas es un tema que actualmente se encuentra en debate (Cox et al., 2000; Labib and Hodgson, 2007; Mettrick and Grainge, 2016). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apoyan la idea de que las horquillas detenidas en el complejo RFB-Fob1 no colapsan inmediatamente y que permanecen estables, al menos, hasta que la horquilla que se mueve en sentido contrario completa la replicación del minicromosoma.

5.2.1 Eficiencia de las rRFBs y su modulación mediante la sobreexpresión de la proteína Fob1

Brewer y colaboradores realizaron un experimento para determinar la eficiencia con la que el complejo RFB-Fob1 detenía las horquillas (Brewer et al., 1992). Para ello realizaron una digestión enzimática del DNA entre la primera y la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional y estudiaron el porcentaje de horquillas que viajaban hacia la izquierda tras haber atravesado las RFBs. Concluyeron que las RFBs cromosómicas presentes en el rDNA de *S. cerevisiae* detenían más del 90% de las horquillas. Sin embargo, observaron una disminución significativa de dicha eficiencia cuando las RFBs eran extraídas de su entorno nativo e integradas en otra parte del genoma. En este caso, tan solo el 20-30% de las horquillas quedaban bloqueadas. Clonaron una segunda RFB a continuación de la primera y vieron que la eficiencia aumentaba hasta detener alrededor de un 50% de las horquillas. Por otra parte, Krings y colaboradores trabajando con la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) observaron que, aparte de las tres paradas causadas por las secuencias Ter1-3 presentes en el IGS1 del rDNA (Sanchez-Gorostiaga et al., 2004), había una cuarta parada (RFP4) (Krings and Bastia, 2004). Concluyeron, tras realizar varios experimentos, que esta cuarta parada se debía a la colisión entre las horquillas que conseguían atravesar las Ter1-3 y la maquinaria de transcripción que progresaba en dirección opuesta. Observaron que cuando las tres primeras paradas no eran funcionales la acumulación en RFP4 se hacía más prominente. Hay que tener en cuenta que, aunque este estudio se realizó en *S. pombe*, las proteínas implicadas en la formación y estabilización de las barreras están conservadas entre las distintas especies de levaduras (Krings and Bastia, 2004).

Basándose en la afirmación de Brewer y colaboradores de que más del 90% de las horquillas quedan retenidas en cada barrera resultaría complicado observar la cuarta parada (RFP4, causada por la colisión entre la maquinaria de replicación y la de transcripción) ya que la inmensa mayoría de las horquillas deberían haber quedado bloqueadas. Para intentar aportar datos nuevos a este tema que actualmente sigue en debate, en la presente Tesis Doctoral se han clonado en un minicromosoma 5 rRFBs consecutivas, es decir, 15 potenciales sitios de parada. Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, en las inmunodetecciones de las Figuras 26 y 27, se detecta el arco completo de Y simples, lo que significa que hay horquillas que atraviesan todas las RFBs.

Esto sugiere que en estos minicromosomas las rRFBs son ineficientes, ya que hay horquillas que, aparentemente, son capaces de atravesar 10 sitios consecutivos de paradas potenciales. Hay que considerar que para que una rRFB sea funcional es imprescindible que Fob1 se una al DNA. Se ha observado que en cepas deficientes para la proteína Fob1 las horquillas no se detienen al alcanzar las rRFBs (Kobayashi and Horiuchi, 1996), lo que indica que las RFB solo serán funcionales en presencia de Fob1. Teniendo en cuenta esta premisa se planteó la posibilidad de que no hubiese suficiente Fob1 para que todas las RFBs fueran funcionales, es decir, que la escasez de Fob1 limite la eficiencia de las potenciales barreras. Para tratar de comprobar esta hipótesis se usó el mismo minicromosoma con las 5 rRFBs para transformar una cepa de *S. cerevisiae* que sobreexpresa Fob1. En la Figura 27 se puede observar, a pesar de estar Fob1 sobreexpresada, el arco completo de Y simples, lo que indica que continúa habiendo horquillas que son capaces de atravesar las rRFBs sin, aparentemente, ninguna dificultad. Sin embargo, observando la densitometría de los RIs aislados de la cepa con niveles de Fob1 nativos (Figura 28), se ve que la última parada (#10) causada por el avance de las horquillas es más fuerte que la inmediatamente anterior (#9). Curiosamente, cuando se sobreexpresa Fob1, la situación que se observa es la contraria (Figura 28); en este caso es más fuerte la parada #9. De hecho, cuando se sobreexpresa Fob1, en cada pareja de barreras aparece más intensa la primera de ellas, es decir, las barreras impares. Esta observación no es tan obvia cuando el nivel de Fob1 es el basal. Cabe destacar el hecho de que en los minicromosomas que albergan una única parada (Figuras 12 y 13), ambos aislados de la cepa con niveles basales de Fob1, la primera barrera es la que aparece más fuerte en las inmunodetecciones (Figuras 23 y 24). Esta misma situación se ha observado en el rDNA de otros seres vivos (Gerber et al., 1997; Krings and Bastia, 2004; Mejía-Ramírez et al., 2005). Esto podría ser debido a que como la primera barrera recibe más cantidad de horquillas, quedarían detenidas un número mayor de ellas y, por tanto, la acumulación aparecería más fuerte (Brewer et al., 1992). Esta hipótesis permitiría explicar por qué se ve la segunda parada más débil cuando se analizan los dos minicromosomas con una única rRFB (Figuras 23 y 24). Sin embargo, no explica porque en el caso del minicromosoma con 5 rRFBs (extraído de la misma cepa) la última de ellas es la que aparece más fuerte (Figura 26). Otra hipótesis que plantearon Brewer y colaboradores era la existencia de otras secuencias en el DNA, aparte de la región a la que se une Fob1, necesarias para que las barreras fuesen totalmente funcionales. Al extraer la rRFB de su ubicación original, estas secuencias, o al menos parte de ellas,

podrían perderse, dando lugar a la formación de una barrera más débil (Brewer et al., 1992). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que la segunda hipótesis que plantearon Brewer y colaboradores es la correcta, y que, por tanto, existen secuencias adicionales, aparte de la región a la que se une Fob1, que son esenciales para que las RFBs sean completamente activas. Además, se puede concluir que no solo otras secuencias afectan a la eficiencia de las rRFBs deteniendo horquillas, sino que también la abundancia relativa de Fob1 modula dicha eficiencia. Ya que al sobreexpresar Fob1 se observa una variación en la intensidad de las acumulaciones causadas por las distintas rRFBs.

5.3 Iniciación de la replicación del DNA

Cómo se inicia la replicación del DNA es una cuestión clave para entender la división celular. A pesar de la gran cantidad de laboratorios que actualmente se encuentran estudiando el mecanismo por el cual se inicia la replicación (Brasil et al., 2017; DePamphilis, 1993; Mechali, 2001) este proceso todavía no está plenamente caracterizado en organismos eucariotas. Esto puede ser debido a la gran cantidad de proteínas que se encuentran involucradas en este proceso o a que existen múltiples secuencias en el origen de replicación implicadas que no están perfectamente definidas. Por tanto, para estudiar el proceso de replicación de manera más simple se utilizan sistemas virales, donde las secuencias de DNA en el origen de replicación se encuentran totalmente caracterizadas y solamente una o dos proteínas son necesarias para que la iniciación de la replicación se lleve a cabo (Meinke et al., 2007).

En 1963, Jacob y colaboradores propusieron el primer modelo de iniciación de la replicación. Afirmaban que se necesitaba la unión de una proteína a una secuencia específica del DNA para que la iniciación tuviera lugar. A esta proteína la llamaron proteína iniciadora (Jacob and Brenner, 1963). Tuvieron que pasar varios años hasta que en 1988, Bramhill y colaboradores propusieran un modelo que explicara como actuaba dicha proteína iniciadora (Bramhill and Kornberg, 1988). La idea principal de este modelo es que la unión de la proteína iniciadora al DNA provoca cambios topológicos, generando un aumento de la tensión torsional en esa región. Esto provoca la desnaturalización de secuencias cercanas ricas en A+T, permitiendo que la maquinaria de

replicación pueda unirse al DNA de cadena sencilla e iniciar el proceso de replicación. Este modelo, que inicialmente fue formulado para explicar el funcionamiento del origen de replicación bacteriano *oriC*, fue posteriormente adaptado para explicar cómo funciona el ARS1 en *S. cerevisiae* (Bielinsky and Gerbi, 1998). Actualmente, se sigue utilizando para explicar los primeros estadios de la iniciación del DNA en diferentes sistemas. De hecho, a pesar de que han pasado casi 30 años, este modelo sigue siendo el más popular.

En el caso concreto del virus SV40, Meinke y colaboradores (Meinke et al., 2007) propusieron un modelo para explicar como sucede el inicio de la replicación. Resolvieron la estructura cristalina del dominio de unión al DNA de la proteína iniciadora (Antígeno T) en su conformación libre o unida al DNA. Esto les permitió observar que el Antígeno T se une al DNA en forma de dos anillos hexaméricos y postularon, que es precisamente ese proceso de multimerización el que causa distorsiones locales en el DNA, dando lugar a la separación de la doble hélice (Meinke et al., 2007). Además, esta proteína iniciadora actúa como DNA helicasa en los pasos posteriores de la replicación (Hsieh et al., 1993). Por tanto, en SV40, el proceso de iniciación de la replicación no conlleva cambios topológicos.

En EBV, por el contrario, cabría pensar que el proceso de iniciación de la replicación sí que lleva asociados cambios topológicos significativos. En 1993, Hsieh y colaboradores observaron que cuando EBNA1 se une a la región de la diada del *oriP* provoca distorsiones en la estructura secundaria del DNA, como “*bending*” (doblar o curvar el DNA) (Hsieh et al., 1993). Además, dos años antes Orłowski y colaboradores habían observado, que en presencia de EBNA1, se detectaban varias regiones de cadena sencilla en *oriP*. Sugirieron que estas regiones desenrolladas podían estar causadas por un exceso de superenrollamiento (-). Concluyeron que este proceso de iniciación se lleva a cabo de manera muy similar a lo que sucede en el *oriC* bacteriano (Orłowski and Miller, 1991).

Sin embargo, años más tarde Avolio-Hunter y colaboradores demostraron que EBNA1 se une a la cromatina, es decir, EBNA1 puede reconocer y unirse a las secuencias específicas de unión presentes en el *oriP* sin necesidad de que se eliminen o desplacen los nucleosomas (Avolio-Hunter and Frappier, 2003). Este hecho daría pie a pensar que la unión de EBNA1 al DNA no provoca modificaciones topológicas. Además, Dean y colaboradores en 1996, habían postulado que el modelo propuesto por Bramhill y

Kornberg no era del todo correcto para EBV (Dean and O'Donnell, 1996). Realizaron estudios estructurales de la unión de EBNA1 a *oriP* e hipotetizaron que dicha unión es un proceso que se lleva a cabo en dos pasos independientes: el primero de ellos consiste en el reconocimiento de las secuencias específicas y unión de EBNA1 al DNA. En el segundo paso es donde se llevan a cabo los cambios estructurales necesarios para la iniciación de la replicación. Este segundo paso es dependiente del ciclo celular, es decir, solo se lleva a cabo en determinados momentos del ciclo (Dean and O'Donnell, 1996). Ambas observaciones sugerían que la unión de EBNA1 al *oriP* no tiene consecuencias topológicas significativas, como se pensó en un primer momento. No obstante, hasta el momento, no se ha realizado una comparación de la topología de minicromosomas que llevan el origen de replicación de SV40 o el *oriP* de EBV.

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo dicha comparación y, además, se ha utilizado un tercer minicromosoma híbrido entre los dos anteriores (pEco3' Δ). El cual contiene el origen de replicación de SV40 y la familia de repeticiones de *oriP* (Figura 15). Gahn y colaboradores observaron que en este minicromosoma la familia de repeticiones actúa como una barrera para las horquillas replicativas (Gahn and Schildkraut, 1989), lo que sugiere que la unión de EBNA1 a la FR genera una estructura que no pueden resolver las DNA helicasas y, por tanto, las horquillas quedan detenidas al alcanzar ese punto. Por el contrario, cuando EBNA1 se une a la DS las horquillas de replicación pueden atravesar esa estructura DNA-proteína sin, aparentemente, ningún problema. Si a este hecho le sumamos las fotografías realizadas en el microscopio electrónico de *oriP* en presencia de grandes cantidades de EBNA1 (Frappier and O'Donnell, 1991; Su et al., 1991), se puede concluir que se forma un lazo o *loop* entre la FR y la DS. En dicho *loop* es donde tendría lugar el inicio de la replicación. Esta observación está respaldada por los experimentos que llevaron a cabo Reisman y colaboradores. Estos autores realizaron un estudio en el que variaban la distancia entre la FR y la DS, y observaron que dicha distancia podía modificarse, pero siempre dentro de unos límites, ya que sobrepasados esos límites la iniciación de la replicación no tenía lugar (Reisman et al., 1985).

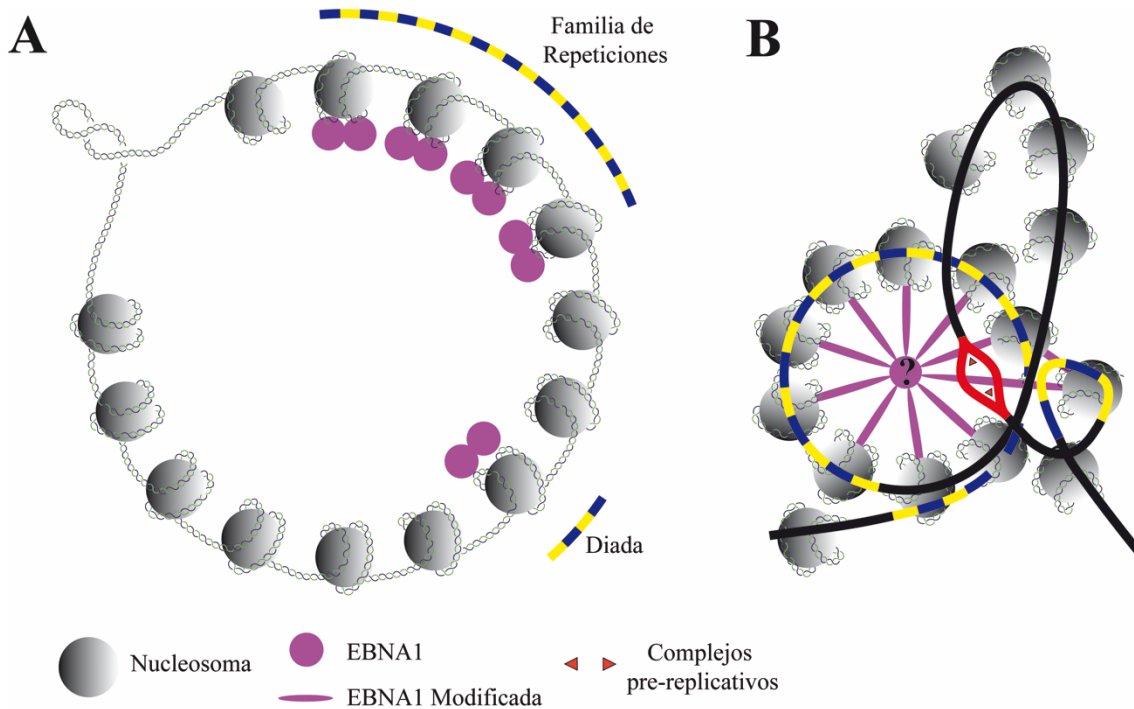


Figura 36. Modelo esquemático de la interacción, en dos pasos independientes, de EBNA1 con la DS y la FR del *oriP*. **A.** En un primer paso EBNA1, a lo largo del todo el ciclo celular, reconoce y se une a las secuencias de unión del DNA. Esta unión no desplaza o elimina a los nucleosomas. **B.** En el segundo paso, el cual es ciclo-dependiente, un factor desconocido (indicado con un signo de interrogación) provoca cambios estructurales que promueven la formación de un *loop* entre la DS y la FR. Estos cambios conformacionales facilitan la desnaturalización de regiones ricas en A+T para que se puede iniciar la replicación cerca de la DS. La posición relativa de la DS y la FR está representada con una línea azul y amarilla y el sitio donde supuestamente se inicia la replicación se muestra en color rojo.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que en células HEK293, dos minicromosomas de la misma masa molecular, uno con el origen de replicación de SV40 y otro con el *oriP* de EBV, presentan una topología muy similar. Además, utilizando un tercer minicromosoma (pEco3' Δ) híbrido entre los dos anteriores, en presencia o ausencia de EBNA1, también se ha demostrado que la unión de EBNA1 a la FR no induce cambios significativos en el nivel de superenrollamiento. Estas observaciones apoyan el modelo (Figura 36) que explica la iniciación de la replicación en EBV mediante dos pasos independientes, donde solamente en el segundo paso tienen lugar cambios estructurales en el DNA, de una manera ciclo-dependiente (Dean and O'Donnell, 1996). En un primer paso (Figura 36A) EBNA1 reconoce y se une a las secuencias de unión presentes tanto en la FR como el DS. Esto sucede a lo largo de todo el ciclo celular. En un segundo paso (Figura 36B), independiente del primero, un factor aún desconocido, desencadena cambios estructurales en las proteínas unidas al DNA que

promueven la formación de un *loop* entre la FR y la DS. Estos cambios conformacionales facilitan la desnaturalización de regiones ricas en A+T para que se puede iniciar la replicación cerca, o en la misma DS.

5.4 Cómo enmarcar la presente Tesis Doctoral en el contexto teórico actual de la replicación y perspectivas futuras.

Entender cómo replica el DNA es una cuestión crítica para entender la vida. En la presente Tesis Doctoral se ha intentado profundizar en la comprensión del proceso de replicación utilizando diferentes aproximaciones, a lo largo de las distintas etapas del proceso replicativo.

En una primera etapa se aportó información para tratar de contestar a la pregunta de si las horquillas replicativas pueden girar libremente *in vivo* durante el proceso de replicación. Como ya se ha mencionado con anterioridad, la comunidad científica no llega a un consenso unánime sobre este tema y actualmente existen varias posturas claramente diferenciadas. Se realizaron diversos experimentos utilizando dos cepas bacterianas, una proficiente y otra deficiente en Topo IV, y tres plásmidos, en los cuales la horquilla se detenía de manera artificial a distinta distancia del origen de replicación. Estos experimentos permitieron concluir que las horquillas pueden girar *in vivo*, con la consiguiente formación de pre-encadenados, a lo largo de toda la replicación. Sin embargo, algunos meses después de la publicación de este trabajo (Cebrian et al., 2015), Schalbetter y colaboradores publicaron un artículo en el que afirmaban que en *S. cerevisiae* el giro de las horquillas está inhibido *in vivo* por la actuación de dos proteínas, Tof1 y Csm3 (Schalbetter et al., 2015). Concluyeron que, aunque el giro de las horquillas y la consiguiente formación de pre-encadenados facilita la eliminación del exceso de superenrollamiento, las horquillas solo giran cuando es absolutamente necesario para mantener la estabilidad genómica, por ejemplo, durante la terminación. Cuando los dos replisomas convergen al final de la elongación, no queda espacio físico entre ellos para que actúen las topoisomerasas, por lo que en esta situación es imprescindible que las horquillas giren para relajar las últimas vueltas del DNA y se pueda completar el proceso de replicación. Intentaron aplicar este modelo a contextos cromosómicos diferentes de la replicación del DNA y postularon que una situación parecida podría darse cuando una

horquilla se encuentra un complejo estable DNA-proteína que detiene su avance. En este caso tampoco habría espacio para que las topoisomerasas actuaran entre el replisoma detenido y el complejo DNA-proteína, por tanto, se dispararía el giro de las horquillas para resolver este obstáculo y que la replicación pudiera continuar. Para corroborar esta hipótesis clonaron en diferentes plásmidos varias estructuras que se sabe que pausan la replicación: centrómeros, tRNAs y orígenes de replicación inactivos (Ivessa et al., 2003). Concluyeron que estos sitios de pausa disparan la rotación de las horquillas *in vivo* para que éstas puedan atravesar el complejo DNA-proteína y pueda continuar el avance de la replicación. Las tres estructuras utilizadas para detener el avance de la horquilla no lo hacen de forma permanente, sino que son mecanismos que detienen las horquillas de forma temporal, lo que causa una ralentización de la replicación (Cebrián et al., 2014; Ivessa et al., 2003).

A raíz de esta observación, nos planteamos la pregunta de qué sucedería si las horquillas se detuvieran de forma permanente, y no temporal. Para ello se intentó encontrar una barrera absoluta, es decir, que detuviera el 100% de las horquillas y lo hiciera de forma permanente. Se decidió utilizar las RFBs, ya que son barreras naturales presentes en el genoma de *S. cerevisiae*. Estas barreras previenen la colisión entre la maquinaria de replicación y la de transcripción en el rDNA. En un segundo capítulo de esta Tesis Doctoral, se clonó una RFB en un minicromosoma artificial de levadura. Al analizarlo, se observó que había horquillas que atravesaban la RFB sin, aparentemente, ningún problema (Figura 23). Para tratar de aumentar la eficiencia de parada se clonaron cinco RFBs en serie, sin embargo, el resultado final fue el mismo (Figura 26). Como utilizando RFBs no se consiguió el objetivo de encontrar una barrera absoluta, se decidió utilizar un sistema de barreras que fuera absoluto de manera intrínseca, en la naturaleza. Para ello se cambió de sistema y se empezó a trabajar con un minicromosoma derivado del genoma vírico de EBV (Figura 17). En el origen de replicación del genoma de este virus, *oriP*, se encuentra la familia de repeticiones, a la cual se unen varias unidades de la proteína EBNA1. Esta unión genera un complejo DNA-proteína que causa una barrera impenetrable para las horquillas (Dhar and Schildkraut, 1991). Se transfectaron células humanas que expresaban EBNA1 (HEK293E) con dicho minicromosoma y varias horas después se realizó la extracción del mismo. Una vez extraído, se digirió el minicromosoma con diferentes enzimas de restricción para tratar de visualizar la parada, pero no se consiguió digerir el DNA. Quizá el método de extracción utilizado (Follonier

and Lopes, 2014) no desproteína correctamente el DNA causando que las enzimas de restricción no puedan acceder a sus sitios específicos de corte. En un futuro, se podría intentar realizar la extracción del DNA por el método tradicional: extracción de HIRT (Hirt, 1967) que, a pesar de ser un protocolo mucho más largo y laborioso, quizá se obtenga un DNA más limpio, capaz de ser digerido por enzimas de restricción.

Por tanto, el hecho de si las horquillas pueden girar o no *in vivo* durante el proceso de replicación y si lo hacen siempre o solo en circunstancias especiales, sigue siendo una cuestión aún sin resolver. Además, no parece que se vaya a resolver a corto plazo, ya que los métodos utilizados hasta el momento, son todos métodos indirectos, una vez que el DNA ha sido extraído de la célula. En ningún caso se puede visualizar *in vivo*, mientras la replicación está teniendo lugar, si las horquillas giran y cuando lo hacen. Se tendría que buscar un método directo que permitiera medir el giro de las horquillas a lo largo de todo el proceso de replicación. Se podría intentar marcar un dominio concreto de alguna proteína polar que formara parte del replisoma y observar *in situ*, mediante la utilización de técnicas microscópicas, la orientación de dicho dominio mientras avanza la horquilla. Esto permitiría ver si el replisoma se mantiene en la misma orientación durante todo el proceso de replicación o, por el contrario, las horquillas giran, provocando un cambio de orientación del replisoma. Hay que tener en cuenta que la replicación sucede muy rápido, así que es probable que se tuviera que utilizar métodos que ralentizaran el proceso.

6. CONCLUSIONES

1. Los RIs aislados de células de la estirpe parE10, con la Topo IV inhibida *in vivo*, presentan un nivel de torsión mayor que los aislados de la estirpe DH5 α F', lo que sugiere que las horquillas pueden girar *in vivo* durante la replicación dando lugar a la formación de pre-encadenados.
2. A pesar de la existencia de tres sitios potenciales de unión para la proteína Fob1 presentes en la secuencia de las rRFBs, solo dos ellos detienen las horquillas de replicación.
3. En minicromosomas artificiales de levadura las rRFBs detienen las horquillas de replicación de forma permanente, sin embargo, no son capaces de detener el 100% de las mismas.
4. La sobreexpresión de la proteína Fob1 modula la eficiencia de las rRFBs de *S. cerevisiae* clonadas en minicromosomas artificiales de levadura.
5. La unión de distintas proteínas iniciadoras al origen de replicación de minicromosomas derivados de los genomas víricos del virus de Epstein-Barr y SV40, no induce cambios topológicos en el DNA.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B., and Cozzarelli, N. R., 1992, The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication: *Cell*, v. 71, no. 2, p. 277-288.
- Alexandrov, A. I., Cozzarelli, N. R., Holmes, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Postow, L., Rybenkov, V., and Vologodskii, A. V., 1999, Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication: *Genetica*, v. 106, no. 1-2, p. 131-140.
- Avolio-Hunter, T. M., and Frappier, L., 2003, EBNA1 efficiently assembles on chromatin containing the Epstein-Barr virus latent origin of replication: *Virology*, v. 315, no. 2, p. 398-408.
- Bates, A. D., and Maxwell, A., 1997, DNA topology: topoisomerases keep it simple: *Curr Biol*, v. 7, no. 12, p. R778-781.
- Bates, A. D., and Maxwell, A., 2005, DNA topology, Oxford University Press, USA.
- Bauer, W. R., Crick, F. H., and White, J. H., 1980, Supercoiled DNA: *Sci Am*, v. 243, no. 1, p. 100-113.
- Bednar, J., Furrer, P., Stasiak, A., Dubochet, J., Egelman, E. H., and Bates, A. D., 1994, The twist, writhe and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. Possible implications for DNA structure in vivo: *J Mol Biol*, v. 235, no. 3, p. 825-847.
- Bell, L., and Byers, B., 1983, Separation of branched from linear DNA by two-dimensional gel electrophoresis: *Anal Biochem*, v. 130, no. 2, p. 527-535.
- Benguria, A., Hernandez, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B., 2003, Sir2p suppresses recombination of replication forks stalled at the replication fork barrier of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*: *Nucleic Acids Res*, v. 31, no. 3, p. 893-898.
- Bielinsky, A. K., and Gerbi, S. A., 1998, Discrete start sites for DNA synthesis in the yeast ARS1 origin: *Science*, v. 279, no. 5347, p. 95-98.
- Bliska, J. B., and Cozzarelli, N. R., 1987, Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism in vivo: *J Mol Biol*, v. 194, no. 2, p. 205-218.
- Boles, T. C., White, J. H., and Cozzarelli, N. R., 1990, Structure of plectonemically supercoiled DNA: *J Mol Biol*, v. 213, no. 4, p. 931-951.
- Borowiec, J. A., Dean, F. B., Bullock, P. A., and Hurwitz, J., 1990, Binding and unwinding-how T antigen engages the SV40 origin of DNA replication: *Cell*, v. 60, no. 2, p. 181-184.
- Bramhill, D., and Kornberg, A., 1988, A model for initiation at origins of DNA replication: *Cell*, v. 54, no. 7, p. 915-918.
- Brasil, J. N., Costa, C. N., Cabral, L. M., Ferreira, P. C., and Hemerly, A. S., 2017, The plant cell cycle: Pre-Replication complex formation and controls: *Genet Mol Biol*, p. 0.
- Breeden, L. L., 1997, Alpha-factor synchronization of budding yeast: *Methods Enzymol*, v. 283, p. 332-341.
- Brewer, B. J., and Fangman, W. L., 1987, The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*: *Cell*, v. 51, no. 3, p. 463-471.
- , 1988, A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes: *Cell*, v. 55, no. 4, p. 637-643.

- Brewer, B. J., Lockshon, D., and Fangman, W. L., 1992, The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription: *Cell*, v. 71, no. 2, p. 267-276.
- Brown, P. O., and Cozzarelli, N. R., 1981, Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 78, no. 2, p. 843-847.
- Cairns, J., 1963, The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography: *J Mol Biol*, v. 6, p. 208-213.
- Calzada, A., Hodgson, B., Kanemaki, M., Bueno, A., and Labib, K., 2005, Molecular anatomy and regulation of a stable replisome at a paused eukaryotic DNA replication fork: *Genes Dev*, v. 19, no. 16, p. 1905-1919.
- Cebrian, J., Castan, A., Martinez, V., Kadomatsu-Hermosa, M. J., Parra, C., Fernandez-Nestosa, M. J., Schaerer, C., Hernandez, P., Krimer, D. B., and Schvartzman, J. B., 2015, Direct Evidence for the Formation of Precatenanes during DNA Replication: *J Biol Chem*, v. 290, no. 22, p. 13725-13735.
- Cebrián, J., Monturus, E., Martínez-Robles, M.-L., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schvartzman, J. B., 2014, Topoisomerase 2 Is Dispensable for the Replication and Segregation of Small Yeast Artificial Chromosomes (YACs): *PloS one*, v. 9, no. 8, p. e104995.
- Cejka, P., Plank, J. L., Dombrowski, C. C., and Kowalczykowski, S. C., 2012, Decatenation of DNA by the *S. cerevisiae* Sgs1-Top3-Rmi1 and RPA complex: a mechanism for disentangling chromosomes: *Mol Cell*, v. 47, no. 6, p. 886-896.
- Cereghini, S., and Yaniv, M., 1984, Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication: *EMBO J*, v. 3, no. 6, p. 1243-1253.
- Champoux, J., and Been, M., 1980, Topoisomerases and the swivel problem: Mechanistic studies of DNA replication and genetic recombination, p. 809-815.
- Champoux, J. J., 2001, DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism: *Annu Rev Biochem*, v. 70, p. 369-413.
- Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., and Marians, K. J., 2000, The importance of repairing stalled replication forks: *Nature*, v. 404, no. 6773, p. 37-41.
- Cozzarelli, N. R., 1980, DNA gyrase and the supercoiling of DNA: *Science*, v. 207, no. 4434, p. 953-960.
- Crisona, N. J., Strick, T. R., Bensimon, D., Croquette, V., and Cozzarelli, N. R., 2000, Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements: *Genes Dev*, v. 14, no. 22, p. 2881-2892.
- Dean, F., Krasnow, M. A., Otter, R., Matzuk, M. M., Spengler, S. J., and Cozzarelli, N. R., 1983, *Escherichia coli* type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, v. 47 Pt 2, p. 769-777.
- Dean, F. B., and O'Donnell, M., 1996, Two steps to binding replication origins? DNA-protein interactions: *Curr Biol*, v. 6, no. 8, p. 931-934.
- Dean, F. B., Stasiak, A., Koller, T., and Cozzarelli, N. R., 1985, Duplex DNA knots produced by *Escherichia coli* topoisomerase I. Structure and requirements for formation: *J Biol Chem*, v. 260, no. 8, p. 4975-4983.

- Deibler, R. W., Mann, J. K., Summers de, W. L., and Zechiedrich, L., 2007, Hin-mediated DNA knotting and recombining promote replicon dysfunction and mutation: *BMC Mol Biol*, v. 8, p. 44.
- Deibler, R. W., Rahmati, S., and Zechiedrich, E. L., 2001, Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*: *Genes Dev*, v. 15, no. 6, p. 748-761.
- Delius, H., and Worcel, A., 1974, Letter: Electron microscopic visualization of the folded chromosome of *Escherichia coli*: *J Mol Biol*, v. 82, no. 1, p. 107-109.
- DePamphilis, M. L., 1993, Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin: *Annu Rev Biochem*, v. 62, p. 29-63.
- Dhar, V., and Schildkraut, C. L., 1991, Role of EBNA-1 in arresting replication forks at the Epstein-Barr virus oriP family of tandem repeats: *Mol Cell Biol*, v. 11, no. 12, p. 6268-6278.
- Diffley, J. F., 2004, Regulation of early events in chromosome replication: *Curr Biol*, v. 14, no. 18, p. R778-786.
- DiNardo, S., Voelkel, K., and Sternglanz, R., 1984, DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 81, no. 9, p. 2616-2620.
- Eissenberg, J. C., Cartwright, I. L., Thomas, G. H., and Elgin, S. C., 1985, Selected topics in chromatin structure: *Annu Rev Genet*, v. 19, p. 485-536.
- Englund, P. T., Hajduk, S. L., and Marini, J. C., 1982, The molecular biology of trypanosomes: *Annu Rev Biochem*, v. 51, p. 695-726.
- Fierro-Fernández, M., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B., 2007, Replication fork reversal occurs spontaneously after digestion but is constrained in supercoiled domains: *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, no. 25, p. 18190-18196.
- Fierro-Fernandez, M., Hernandez, P., Krimer, D. B., Stasiak, A., and Schwartzman, J. B., 2007, Topological locking restrains replication fork reversal: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, no. 5, p. 1500-1505.
- Flemming, W., 1882, *Zellsubstanz, kern und zelltheilung*, Vogel.
- Foiani, M., Liberi, G., Piatti, S., and Plevani, P., 1999, *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study DNA replication: *Eukaryotic DNA Replication. A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, UK, p. 185-200.
- Follonier, C., and Lopes, M., 2014, Combined bidimensional electrophoresis and electron microscopy to study specific plasmid DNA replication intermediates in human cells: *Functional Analysis of DNA and Chromatin*, p. 209-219.
- Frappier, L., and O'Donnell, M., 1991, Epstein-Barr nuclear antigen 1 mediates a DNA loop within the latent replication origin of Epstein-Barr virus: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, no. 23, p. 10875-10879.
- Freeman, L. A., and Garrard, W. T., 1992, DNA supercoiling in chromatin structure and gene expression: *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, v. 2, no. 2, p. 165-209.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., and Wood, R. D., 2005, *DNA repair and mutagenesis*, American Society for Microbiology Press.
- Froelich-Ammon, S. J., and Osheroff, N., 1995, Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism: *J Biol Chem*, v. 270, no. 37, p. 21429-21432.

- Gahn, T. A., and Schildkraut, C. L., 1989, The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication: *Cell*, v. 58, no. 3, p. 527-535.
- Gellert, M., Fisher, L. M., and O'Dea, M. H., 1979, DNA gyrase: purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, no. 12, p. 6289-6293.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Nash, H. A., 1976, DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 73, no. 11, p. 3872-3876.
- Gerber, J. K., Gogel, E., Berger, C., Wallisch, M., Muller, F., Grummt, I., and Grummt, F., 1997, Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I: *Cell*, v. 90, no. 3, p. 559-567.
- Goodwin, A., Wang, S. W., Toda, T., Norbury, C., and Hickson, I. D., 1999, Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in *Schizosaccharomyces pombe*: *Nucleic Acids Res*, v. 27, no. 20, p. 4050-4058.
- Goto, T., and Wang, J. C., 1985, Cloning of yeast TOP1, the gene encoding DNA topoisomerase I, and construction of mutants defective in both DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 82, no. 21, p. 7178-7182.
- Graham, F., Smiley, J., Russell, W., and Nairn, R., 1977, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5: *Journal of General Virology*, v. 36, no. 1, p. 59-72.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B., 2013, Replication of Epstein-Barr viral DNA: *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 5, no. 1, p. a013029.
- Han, M., and Grunstein, M., 1988, Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo: *Cell*, v. 55, no. 6, p. 1137-1145.
- Hanahan, D., 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids: *J Mol Biol*, v. 166, no. 4, p. 557-580.
- Happel, N., and Doenecke, D., 2009, Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function: *Gene*, v. 431, no. 1-2, p. 1-12.
- Harmon, F. G., Brockman, J. P., and Kowalczykowski, S. C., 2003, RecQ helicase stimulates both DNA catenation and changes in DNA topology by topoisomerase III: *J Biol Chem*, v. 278, no. 43, p. 42668-42678.
- Harmon, F. G., DiGate, R. J., and Kowalczykowski, S. C., 1999, RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination: *Mol Cell*, v. 3, no. 5, p. 611-620.
- Hebbar, P. B., and Archer, T. K., 2008, Altered histone H1 stoichiometry and an absence of nucleosome positioning on transfected DNA: *J Biol Chem*, v. 283, no. 8, p. 4595-4601.
- Hernandez, P., Martin-Parras, L., Martinez-Robles, M. L., and Schwartzman, J. B., 1993, Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes: *EMBO J*, v. 12, no. 4, p. 1475-1485.
- Hiasa, H., DiGate, R. J., and Marians, K. J., 1994, Decatenating activity of *Escherichia coli* DNA gyrase and topoisomerases I and III during oriC and pBR322 DNA replication in vitro: *J Biol Chem*, v. 269, no. 3, p. 2093-2099.

- Hiasa, H., and Marians, K. J., 1996, Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication: *J Biol Chem*, v. 271, no. 35, p. 21529-21535.
- Higgins, N. P., Peebles, C. L., Sugino, A., and Cozzarelli, N. R., 1978, Purification of subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 75, no. 4, p. 1773-1777.
- Hirt, B., 1967, Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures: *Journal of molecular biology*, v. 26, no. 2, p. 365-369.
- Holm, C., Goto, T., Wang, J. C., and Botstein, D., 1985, DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast: *Cell*, v. 41, no. 2, p. 553-563.
- Hsieh, D. J., Camiolo, S. M., and Yates, J. L., 1993, Constitutive binding of EBNA1 protein to the Epstein-Barr virus replication origin, oriP, with distortion of DNA structure during latent infection: *EMBO J*, v. 12, no. 13, p. 4933-4944.
- Huang, W. M., 1994, Type II DNA topoisomerase genes: *Adv Pharmacol*, v. 29A, p. 201-225.
- Huberman, J. A., Spotila, L. D., Nawotka, K. A., el-Assouli, S. M., and Davis, L. R., 1987, The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid: *Cell*, v. 51, no. 3, p. 473-481.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A., 1983, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations: *J Bacteriol*, v. 153, no. 1, p. 163-168.
- Ivessa, A. S., Lenzmeier, B. A., Bessler, J. B., Goudsouzian, L. K., Schnakenberg, S. L., and Zakian, V. A., 2003, The *Saccharomyces cerevisiae* helicase Rrm3p facilitates replication past nonhistone protein-DNA complexes: *Molecular cell*, v. 12, no. 6, p. 1525-1536.
- Ivessa, A. S., and Zakian, V. A., 2002, To fire or not to fire: origin activation in *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA: *Genes Dev*, v. 16, no. 19, p. 2459-2464.
- Jacob, F., and Brenner, S., 1963, [On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon]: *C R Hebd Seances Acad Sci*, v. 256, p. 298-300.
- Jacob, F., Brenner, S., and Cuzin, F., On the regulation of DNA replication in bacteria, *in* *Proceedings Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1963, Volume 28, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 329-348.
- Kathiravan, M. K., Khilare, M. M., Nikoomanesh, K., Chothe, A. S., and Jain, K. S., 2013, Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery: *J Enzyme Inhib Med Chem*, v. 28, no. 3, p. 419-435.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., and Suzuki, H., 1990, New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*: *Cell*, v. 63, no. 2, p. 393-404.
- Kato, J., Nishimura, Y., Yamada, M., Suzuki, H., and Hirota, Y., 1988, Gene organization in the region containing a new gene involved in chromosome partition in *Escherichia coli*: *J Bacteriol*, v. 170, no. 9, p. 3967-3977.
- Kim, R. A., and Wang, J. C., 1992, Identification of the yeast TOP3 gene product as a single strand-specific DNA topoisomerase: *J Biol Chem*, v. 267, no. 24, p. 17178-17185.
- Klevan, L., and Wang, J. C., 1980, Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an alpha 2 beta 2 protein core: *Biochemistry*, v. 19, no. 23, p. 5229-5234.

- Kobayashi, T., 2003, The replication fork barrier site forms a unique structure with Fob1p and inhibits the replication fork: *Mol Cell Biol*, v. 23, no. 24, p. 9178-9188.
- Kobayashi, T., Hidaka, M., Nishizawa, M., and Horiuchi, T., 1992, Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*: *Molecular and General Genetics MGG*, v. 233, no. 3, p. 355-362.
- Kobayashi, T., and Horiuchi, T., 1996, A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities: *Genes Cells*, v. 1, no. 5, p. 465-474.
- Kornberg, R. D., and Lorch, Y., 1992, Chromatin structure and transcription: *Annu Rev Cell Biol*, v. 8, p. 563-587.
- Kossel, A., 1911, *Ueber die chemische Beschaffenheit des Zellkerns*, PA Norstedt.
- Krings, G., and Bastia, D., 2004, swi1- and swi3-dependent and independent replication fork arrest at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, no. 39, p. 14085-14090.
- Labib, K., and Hodgson, B., 2007, Replication fork barriers: pausing for a break or stalling for time?: *EMBO Rep*, v. 8, no. 4, p. 346-353.
- Langle-Rouault, F., Patzel, V., Benavente, A., Taillez, M., Silvestre, N., Bompard, A., Sczakiel, G., Jacobs, E., and Rittner, K., 1998, Up to 100-fold increase of apparent gene expression in the presence of Epstein-Barr virus oriP sequences and EBNA1: implications of the nuclear import of plasmids: *J Virol*, v. 72, no. 7, p. 6181-6185.
- Levine, C., Hiasa, H., and Marians, K. J., 1998, DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities: *Biochim Biophys Acta*, v. 1400, no. 1-3, p. 29-43.
- Lewin, B., Jensen, W. A. W. A., Hartman, P. E. S., and Sigmund, R., 1993, *Genes*, Centro Regional de Ayuda Técnica.
- Linskens, M. H., and Huberman, J. A., 1988, Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 8, no. 11, p. 4927-4935.
- Little, R. D., Platt, T. H., and Schildkraut, C. L., 1993, Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes: *Mol Cell Biol*, v. 13, no. 10, p. 6600-6613.
- Liu, B., and Alberts, B. M., 1995, Head-on collision between a DNA replication apparatus and RNA polymerase transcription complex: *Science*, v. 267, no. 5201, p. 1131-1137.
- Liu, L. F., Depew, R. E., and Wang, J. C., 1976, Knotted single-stranded DNA rings: a novel topological isomer of circular single-stranded DNA formed by treatment with *Escherichia coli* omega protein: *J Mol Biol*, v. 106, no. 2, p. 439-452.
- Liu, L. F., Perkocha, L., Calendar, R., and Wang, J. C., 1981, Knotted DNA from bacteriophage capsids: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 78, no. 9, p. 5498-5502.
- Liu, L. F., and Wang, J. C., 1987, Supercoiling of the DNA template during transcription: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, no. 20, p. 7024-7027.
- Lopez, V., Martinez-Robles, M. L., Hernandez, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B., 2012, Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication: *Nucleic Acids Res*, v. 40, no. 8, p. 3563-3573.
- Lopez-estrano, C., Schwartzman, J. B., Krimer, D. B., and Hernandez, P., 1998, Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA: *J Mol Biol*, v. 277, no. 2, p. 249-256.

- , 1999, Characterization of the pea rDNA replication fork barrier: putative cis-acting and trans-acting factors: *Plant Mol Biol*, v. 40, no. 1, p. 99-110.
- López-Estraño, C., Schwartzman, J., and Hernández, P., 1997, The replication of ribosomal RNA genes in eukaryotes, *Chromosomes Today*, Springer, p. 161-181.
- Lorch, Y., LaPointe, J. W., and Kornberg, R. D., 1988, On the displacement of histones from DNA by transcription: *Cell*, v. 55, no. 5, p. 743-744.
- Louis, N., Eveleigh, C., and Graham, F. L., 1997, Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line: *Virology*, v. 233, no. 2, p. 423-429.
- Lucas, I., Germe, T., Chevrier-Miller, M., and Hyrien, O., 2001, Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal: *EMBO J*, v. 20, no. 22, p. 6509-6519.
- Lucchini, R., Wellinger, R. E., and Sogo, J. M., 2001, Nucleosome positioning at the replication fork: *EMBO J*, v. 20, no. 24, p. 7294-7302.
- Maftahi, M., Han, C. S., Langston, L. D., Hope, J. C., Zigouras, N., and Freyer, G. A., 1999, The top3(+) gene is essential in *Schizosaccharomyces pombe* and the lethality associated with its loss is caused by Rad12 helicase activity: *Nucleic Acids Res*, v. 27, no. 24, p. 4715-4724.
- Marians, K. J., 1992, Prokaryotic DNA replication: *Annu Rev Biochem*, v. 61, p. 673-719.
- Marians, K. J., Minden, J. S., and Parada, C., 1986, Replication of superhelical DNAs in vitro: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, v. 33, p. 111-140.
- Marsden, M. P., and Laemmli, U. K., 1979, Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model: *Cell*, v. 17, no. 4, p. 849-858.
- Martin-Parras, L., Hernandez, P., Martinez-Robles, M. L., and Schwartzman, J. B., 1991, Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis: *J Mol Biol*, v. 220, no. 4, p. 843-853.
- Martin-Parras, L., Lucas, I., Martinez-Robles, M. L., Hernandez, P., Krimer, D. B., Hyrien, O., and Schwartzman, J. B., 1998, Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis: *Nucleic Acids Res*, v. 26, no. 14, p. 3424-3432.
- Martinez-Robles, M. L., Witz, G., Hernandez, P., Schwartzman, J. B., Stasiak, A., and Krimer, D. B., 2009, Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes: *Nucleic Acids Res*, v. 37, no. 15, p. 5126-5137.
- Mayan-Santos, M. D., Martinez-Robles, M. L., Hernandez, P., Schwartzman, J. B., and Krimer, D. B., 2008, A redundancy of processes that cause replication fork stalling enhances recombination at two distinct sites in yeast rDNA: *Mol Microbiol*, v. 69, no. 2, p. 361-375.
- Mechali, M., 2001, DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics: *Nat Rev Genet*, v. 2, no. 8, p. 640-645.
- Meinke, G., Phelan, P., Moine, S., Bochkareva, E., Bochkarev, A., Bullock, P. A., and Bohm, A., 2007, The crystal structure of the SV40 T-antigen origin binding domain in complex with DNA: *PLoS Biol*, v. 5, no. 2, p. e23.
- Mejia-Ramirez, E., Sanchez-Gorostiaga, A., Krimer, D. B., Schwartzman, J. B., and Hernandez, P., 2005, The mating type switch-activating protein Sap1 is required for replication fork arrest at the rRNA genes of fission yeast: *Mol Cell Biol*, v. 25, no. 19, p. 8755-8761.

- Meselson, M., and Stahl, F. W., 1958, The Replication of DNA in Escherichia Coli: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 44, no. 7, p. 671-682.
- Mettrick, K. A., and Grainge, I., 2016, Stability of blocked replication forks in vivo: Nucleic Acids Res, v. 44, no. 2, p. 657-668.
- Mirkin, E. V., and Mirkin, S. M., 2007, Replication fork stalling at natural impediments: Microbiol Mol Biol Rev, v. 71, no. 1, p. 13-35.
- Mizuuchi, K., Gellert, M., Weisberg, R. A., and Nash, H. A., 1980, Catenation and supercoiling in the products of bacteriophage lambda integrative recombination in vitro: J Mol Biol, v. 141, no. 4, p. 485-494.
- Murray, A. W., and Szostak, J. W., 1983, Construction of artificial chromosomes in yeast: Nature, v. 305, no. 5931, p. 189-193.
- Nitiss, J. L., 1998, Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells: Biochim Biophys Acta, v. 1400, no. 1-3, p. 63-81.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H., and Marians, K. J., 2003, Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in Escherichia coli: J Biol Chem, v. 278, no. 10, p. 8653-8660.
- O'Donnell, M., Langston, L., and Stillman, B., 2013, Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya: Cold Spring Harbor perspectives in biology, v. 5, no. 7, p. a010108.
- Olavarrieta, L., Hernandez, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B., 2002a, DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication: J Mol Biol, v. 322, no. 1, p. 1-6.
- Olavarrieta, L., Martinez-Robles, M. L., Hernandez, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B., 2002b, Knotting dynamics during DNA replication: Mol Microbiol, v. 46, no. 3, p. 699-707.
- Olavarrieta, L., Martinez-Robles, M. L., Sogo, J. M., Stasiak, A., Hernandez, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B., 2002c, Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids: Nucleic Acids Res, v. 30, no. 3, p. 656-666.
- Orlowski, R., and Miller, G., 1991, Single-stranded structures are present within plasmids containing the Epstein-Barr virus latent origin of replication: Journal of virology, v. 65, no. 2, p. 677-686.
- Patiño, P. J., and López, M. T. R., 2006, Replicación del ADN: Fondo Editorial Biogénesis, p. 119-132.
- Peng, H., and Marians, K. J., 1993, Escherichia coli topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions: J Biol Chem, v. 268, no. 32, p. 24481-24490.
- Peter, B. J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K. J., and Cozzarelli, N. R., 1998, The structure of supercoiled intermediates in DNA replication: Cell, v. 94, no. 6, p. 819-827.
- Petes, T. D., 1979, Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 76, no. 1, p. 410-414.
- Plank, J. L., Wu, J., and Hsieh, T. S., 2006, Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 103, no. 30, p. 11118-11123.
- Platt, T. H., Tcherepanova, I. Y., and Schildkraut, C. L., 1993, Effect of number and position of EBNA-1 binding sites in Epstein-Barr virus oriP on the sites of

- initiation, barrier formation, and termination of replication: *J Virol*, v. 67, no. 3, p. 1739-1745.
- Postow, L., Hardy, C. D., Arsuaga, J., and Cozzarelli, N. R., 2004, Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome: *Genes Dev*, v. 18, no. 14, p. 1766-1779.
- Postow, L., Peter, B. J., and Cozzarelli, N. R., 1999, Knot what we thought before: the twisted story of replication: *Bioessays*, v. 21, no. 10, p. 805-808.
- Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R. W., Bustamante, C., Vologodskii, A. V., and Cozzarelli, N. R., 2001, Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks: *J Biol Chem*, v. 276, no. 4, p. 2790-2796.
- Pruyne, D., and Bretscher, A., 2000, Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states: *J Cell Sci*, v. 113 (Pt 3), p. 365-375.
- Reisman, D., Yates, J., and Sugden, B., 1985, A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components: *Mol Cell Biol*, v. 5, no. 8, p. 1822-1832.
- Roca, J., and Wang, J. C., 1994, DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favor of a two-gate mechanism: *Cell*, v. 77, no. 4, p. 609-616.
- Rothstein, R., Michel, B., and Gangloff, S., 2000, Replication fork pausing and recombination or "gimme a break": *Genes Dev*, v. 14, no. 1, p. 1-10.
- Rouse, J., 2009, Control of genome stability by SLX protein complexes: *Biochemical Society Transactions*, v. 37, no. 3, p. 495-510.
- Saffer, L. D., and Miller, O. L., Jr., 1986, Electron microscopic study of *Saccharomyces cerevisiae* rDNA chromatin replication: *Mol Cell Biol*, v. 6, no. 4, p. 1148-1157.
- Sanchez-Gorostiaga, A., Lopez-Estrano, C., Krimer, D. B., Schwartzman, J. B., and Hernandez, P., 2004, Transcription termination factor reb1p causes two replication fork barriers at its cognate sites in fission yeast ribosomal DNA in vivo: *Mol Cell Biol*, v. 24, no. 1, p. 398-406.
- Santamaria, D., Hernandez, P., Martinez-Robles, M. L., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B., 2000a, Premature termination of DNA replication in plasmids carrying two inversely oriented ColE1 origins: *J Mol Biol*, v. 300, no. 1, p. 75-82.
- Santamaria, D., Viguera, E., Martinez-Robles, M. L., Hyrien, O., Hernandez, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B., 2000b, Bi-directional replication and random termination: *Nucleic Acids Res*, v. 28, no. 10, p. 2099-2107.
- Schalbetter, S. A., Mansoubi, S., Chambers, A. L., Downs, J. A., and Baxter, J., 2015, Fork rotation and DNA precatenation are restricted during DNA replication to prevent chromosomal instability: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 112, no. 33, p. E4565-4570.
- Schiessel, H., Widom, J., Bruinsma, R. F., and Gelbart, W. M., 2001, Polymer reptation and nucleosome repositioning: *Phys Rev Lett*, v. 86, no. 19, p. 4414-4417.
- Schwartzman, J. B., Adolph, S., Martin-Parras, L., and Schildkraut, C. L., 1990, Evidence that replication initiates at only some of the potential origins in each oligomeric form of bovine papillomavirus type 1 DNA: *Mol Cell Biol*, v. 10, no. 6, p. 3078-3086.
- Schwartzman, J. B., Martinez-Robles, M. L., Hernandez, P., and Krimer, D. B., 2013, The benefit of DNA supercoiling during replication: *Biochem Soc Trans*, v. 41, no. 2, p. 646-651.
- Schwartzman, J. B., and Stasiak, A., 2004, A topological view of the replicon: *EMBO Rep*, v. 5, no. 3, p. 256-261.

- Seki, M., Nakagawa, T., Seki, T., Kato, G., Tada, S., Takahashi, Y., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Aoki, A., Otsuki, M., Habermann, F. A., Tanabe, H., Ishii, Y., and Enomoto, T., 2006, Bloom helicase and DNA topoisomerase III α are involved in the dissolution of sister chromatids: *Mol Cell Biol*, v. 26, no. 16, p. 6299-6307.
- Shen, C. K., and Hu, W. S., 1986, DNA supercoiling of recombinant plasmids in mammalian cells: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 83, no. 6, p. 1641-1645.
- Shishido, K., Ishii, S., and Komiyama, N., 1989, The presence of the region on pBR322 that encodes resistance to tetracycline is responsible for high levels of plasmid DNA knotting in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I deletion mutant: *Nucleic Acids Res*, v. 17, no. 23, p. 9749-9759.
- Shishido, K., Komiyama, N., and Ikawa, S., 1987, Increased production of a knotted form of plasmid pBR322 DNA in *Escherichia coli* DNA topoisomerase mutants: *J Mol Biol*, v. 195, no. 1, p. 215-218.
- Sikorski, R. S., and Hieter, P., 1989, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*: *Genetics*, v. 122, no. 1, p. 19-27.
- Sogo, J. M., Stasiak, A., Martinez-Robles, M. L., Krimer, D. B., Hernandez, P., and Schwartzman, J. B., 1999, Formation of knots in partially replicated DNA molecules: *J Mol Biol*, v. 286, no. 3, p. 637-643.
- Southern, E. M., 1975, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis: *J Mol Biol*, v. 98, no. 3, p. 503-517.
- Stasiak, A., Katritch, V., Bednar, J., Michoud, D., and Dubochet, J., 1996, Electrophoretic mobility of DNA knots: *Nature*, v. 384, no. 6605, p. 122.
- Stillman, B. W., and Gluzman, Y., 1985, Replication and supercoiling of simian virus 40 DNA in cell extracts from human cells: *Mol Cell Biol*, v. 5, no. 8, p. 2051-2060.
- Stone, M. D., Bryant, Z., Crisona, N. J., Smith, S. B., Vologodskii, A., Bustamante, C., and Cozzarelli, N. R., 2003, Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, no. 15, p. 8654-8659.
- Strick, T. R., Allemand, J. F., Bensimon, D., and Croquette, V., 1998, Behavior of supercoiled DNA: *Biophys J*, v. 74, no. 4, p. 2016-2028.
- Su, W., Middleton, T., Sugden, B., and Echols, H., 1991, DNA looping between the origin of replication of Epstein-Barr virus and its enhancer site: stabilization of an origin complex with Epstein-Barr nuclear antigen 1: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, no. 23, p. 10870-10874.
- Sugden, B., Marsh, K., and Yates, J., 1985, A vector that replicates as a plasmid and can be efficiently selected in B-lymphoblasts transformed by Epstein-Barr virus: *Mol Cell Biol*, v. 5, no. 2, p. 410-413.
- Sundin, O., and Varshavsky, A., 1980, Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers: *Cell*, v. 21, no. 1, p. 103-114.
- , 1981, Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers: dissection of the final stages of SV40 DNA replication: *Cell*, v. 25, no. 3, p. 659-669.
- Szostak, J. W., and Wu, R., 1980, Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: *Nature*, v. 284, p. 426-430.
- Tanaka, S., and Diffley, J. F., 2002, Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase: *Nat Cell Biol*, v. 4, no. 3, p. 198-207.

- Ullsperger, C., and Cozzarelli, N. R., 1996, Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*: *J Biol Chem*, v. 271, no. 49, p. 31549-31555.
- Ullsperger, C., Vologodskii, A., and Cozzarelli, N., 1995, Unlinking of DNA by topoisomerases during DNA replication, *Nucleic acids and molecular biology*, Springer, p. 115-142.
- Vaughn, J. P., Dijkwel, P. A., and Hamlin, J. L., 1990, Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain: *Cell*, v. 61, no. 6, p. 1075-1087.
- Viguera, E., Hernandez, P., Krimer, D. B., Boistov, A. S., Lurz, R., Alonso, J. C., and Schwartzman, J. B., 1996, The ColE1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site: *J Biol Chem*, v. 271, no. 37, p. 22414-22421.
- Vilchez, R. A., Kozinetz, C. A., Arrington, A. S., Madden, C. R., and Butel, J. S., 2003, Simian virus 40 in human cancers: *The American journal of medicine*, v. 114, no. 8, p. 675-684.
- Villwock, S. K., and Aparicio, O. M., 2014, Two-dimensional agarose gel electrophoresis for analysis of DNA replication: *Methods Mol Biol*, v. 1205, p. 329-340.
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., and Laipis, P., 1965, The twisted circular form of polyoma viral DNA: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 53, no. 5, p. 1104-1111.
- Vologodskii, A. V., Crisona, N. J., Laurie, B., Pieranski, P., Katritch, V., Dubochet, J., and Stasiak, A., 1998, Sedimentation and electrophoretic migration of DNA knots and catenanes: *J Mol Biol*, v. 278, no. 1, p. 1-3.
- Waga, S., and Stillman, B., 1994, Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication in vitro: *Nature*, v. 369, no. 6477, p. 207-212.
- Waga, S., and Stillman, B., 1998, The DNA replication fork in eukaryotic cells: *Annual review of biochemistry*, v. 67, no. 1, p. 721-751.
- Wang, J. C., 1971, Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega: *J Mol Biol*, v. 55, no. 3, p. 523-533.
- , 1996, DNA topoisomerases: *Annu Rev Biochem*, v. 65, p. 635-692.
- , 1998, Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine: *Q Rev Biophys*, v. 31, no. 2, p. 107-144.
- , 2002, Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 3, no. 6, p. 430-440.
- Ward, T. R., Hoang, M. L., Prusty, R., Lau, C. K., Keil, R. L., Fangman, W. L., and Brewer, B. J., 2000, Ribosomal DNA replication fork barrier and HOT1 recombination hot spot: shared sequences but independent activities: *Mol Cell Biol*, v. 20, no. 13, p. 4948-4957.
- Wasserman, S. A., and Cozzarelli, N. R., 1985, Determination of the stereostructure of the product of Tn3 resolvase by a general method: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 82, no. 4, p. 1079-1083.
- Wasserman, S. A., Dungan, J. M., and Cozzarelli, N. R., 1985, Discovery of a predicted DNA knot substantiates a model for site-specific recombination: *Science*, v. 229, no. 4709, p. 171-174.
- Watson, J. D., and Crick, F. H., 1953, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid: *Nature*, v. 171, no. 4356, p. 737-738.

- Wiesendanger, B., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J. M., 1994, Replication fork barriers in the *Xenopus* rDNA: *Nucleic Acids Res*, v. 22, no. 23, p. 5038-5046.
- Witz, G., Dietler, G., and Stasiak, A., 2011, DNA knots and DNA supercoiling: *Cell Cycle*, v. 10, no. 9, p. 1339-1340.
- Witz, G., and Stasiak, A., 2010, DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting: *Nucleic Acids Res*, v. 38, no. 7, p. 2119-2133.
- Wysokenski, D. A., and Yates, J. L., 1989, Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus: *J Virol*, v. 63, no. 6, p. 2657-2666.
- Yamaguchi, H., Kubota, K., and Harada, A., 2000, Direct observation of DNA catenanes by atomic force microscopy: *Chemistry Letters*, v. 29, no. 4, p. 384-385.
- Yates, J. L., and Guan, N., 1991, Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells: *Journal of virology*, v. 65, no. 1, p. 483-488.
- Yates, J. L., Warren, N., and Sugden, B., 1985, Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells: *Nature*, v. 313, no. 6005, p. 812-815.
- Zechiedrich, E. L., and Cozzarelli, N. R., 1995, Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*: *Genes Dev*, v. 9, no. 22, p. 2859-2869.
- Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D. M., and Cozzarelli, N. R., 2000, Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*: *J Biol Chem*, v. 275, no. 11, p. 8103-8113.
- Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., and Cozzarelli, N. R., 1997, Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*: *Genes Dev*, v. 11, no. 19, p. 2580-2592.
- Zhu, J., Newlon, C. S., and Huberman, J. A., 1992, Localization of a DNA replication origin and termination zone on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol Cell Biol*, v. 12, no. 10, p. 4733-4741.

8. PUBLICACIONES

Direct Evidence for the Formation of Precatenanes during DNA Replication*

Received for publication, February 2, 2015, and in revised form, March 30, 2015. Published, JBC Papers in Press, March 31, 2015, DOI 10.1074/jbc.M115.642272

Jorge Cebrían^{†1}, Alicia Castán^{†1}, Víctor Martínez[§], Maridian J. Kadomatsu-Hermosa[§], Cristina Parra[§],
María José Fernández-Nestosa[§], Christian Schaerer[§], Pablo Hernández[‡], Dora B. Krimer[‡],
and Jorge B. Schwartzman^{‡2}

From the [†]Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain and the [§]Scientific and Applied Computing Laboratory, Polytechnic School, National University of Asunción, P.O. Box 2111 SL, San Lorenzo, Paraguay

Background: Changes in DNA topology during replication are still poorly understood.

Results: Classical genetics and two-dimensional agarose gel electrophoresis showed that RIs tensioned in the absence of Topo IV.

Conclusion: The results indicated that replication forks swivel *in vivo* leading to the formation of precatenanes as replication progresses.

Significance: This conclusion ends a long lasting debate on the formation of precatenanes during replication.

The dynamics of DNA topology during replication are still poorly understood. Bacterial plasmids are negatively supercoiled. This underwinding facilitates strand separation of the DNA duplex during replication. Leading the replisome, a DNA helicase separates the parental strands that are to be used as templates. This strand separation causes overwinding of the duplex ahead. If this overwinding persists, it would eventually impede fork progression. In bacteria, DNA gyrase and topoisomerase IV act ahead of the fork to keep DNA underwound. However, the processivity of the DNA helicase might overcome DNA gyrase and topoisomerase IV. It was proposed that the overwinding that builds up ahead of the fork could force it to swivel and diffuse this positive supercoiling behind the fork where topoisomerase IV would also act to maintain replicating the DNA underwound. Putative intertwining of sister duplexes in the replicated region are called precatenanes. Fork swiveling and the formation of precatenanes, however, are still questioned. Here, we used classical genetics and high resolution two-dimensional agarose gel electrophoresis to examine the torsional tension of replication intermediates of three bacterial plasmids with the fork stalled at different sites before termination. The results obtained indicated that precatenanes do form as replication progresses before termination.

Changes in DNA topology during replication are still poorly understood. Both *in vivo* (1) and *in vitro* (2) bacterial plasmids are known to be (–)³-supercoiled where duplex-duplex cross-

ings adopt an RH configuration (Fig. 1A). It is well known that this underwinding facilitates strand separation of the duplex at the origin of replication (3, 4). After initiation, (–)-supercoiling is also important for elongation to progress unimpaired (5–7). A complex ensemble of enzymes known as the replisome is responsible for the replication fork to advance. Leading this replisome, a hexameric DNA helicase separates the parental strands that are to be used as templates (8). This strand separation causes overwinding of the duplex ahead of the fork (9–11). If this overwinding persists and accumulates, it would eventually impede fork progression as (+)-supercoiling hinders separation of the duplex strands.

In bacteria, DNA gyrase and topoisomerase IV (Topo IV) are the main type II DNA topoisomerases involved in the regulation of DNA topology during replication (12, 13). Both enzymes can relax supercoiled DNA molecules. Their mechanism of action, however, differs significantly (14). Topo IV can eliminate both the LH crossings of (+)-supercoiling as well as the RH crossings of (–)-supercoiling, although it is 20× more efficient doing the former (5, 15). In contrast, DNA gyrase is unique in its ability to introduce (–)-supercoils into covalently closed domains (16). When compared for their ability to remove (+)-supercoils, Topo IV and DNA gyrase eliminate them at roughly the same rate (6). However, Topo IV is 20× more efficient removing LH than RH crossings (5, 15). In other words, DNA gyrase is 20× more efficient introducing RH crossings than Topo IV is at removing them. DNA gyrase plays a critical role in maintaining replicating DNA (–)-supercoil and is essential for replication to proceed. Moreover, in the absence of Topo IV, replication progresses at almost normal rates, but fully replicated duplexes accumulate as catenated rings (5, 17). Despite that a conclusive explanation for the preference of Topo IV for LH crossings is still debated, there is general agreement that

intermediate; L, linear form; CatA, catenane where both rings are nicked; CatB, catenanes where one ring is nicked and the other covalently closed; CatC, catenane where both rings are covalently closed.

* This work was supported by Grant BFU2011-22489 from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad and European FEDER Funds (to J. B. S.).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-837-3112 (Ext. 4232); Fax: 34-91-536-0432; E-mail: schwartzman@cib.csic.es.

³ The abbreviations used are: (–), negative or negatively; (+), positive or positively; RH, right-handed; LH, left-handed; Topo IV, topoisomerase IV; CCC, unreplicated covalently closed circle; OC, unreplicated open circle; CCRI, covalently closed replication intermediate; OCRI, open circle replication

DNA Topology during Replication

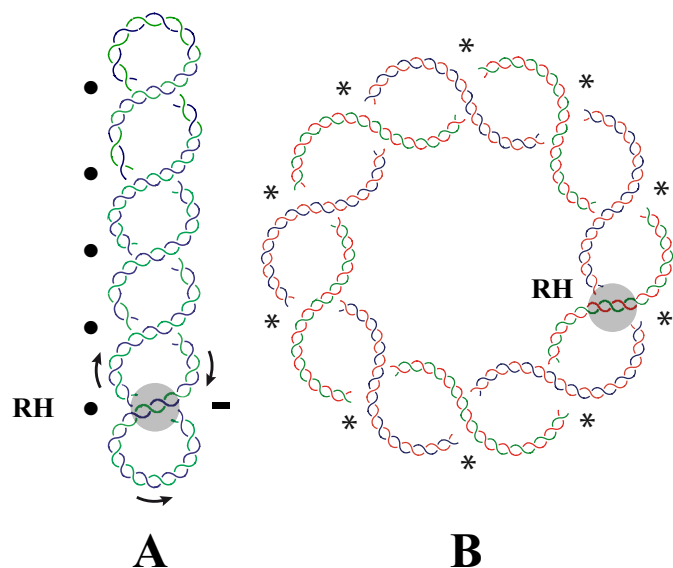


FIGURE 1. Schematics illustrating a covalently closed and supercoiled molecule and two nicked molecules heavily intertwined. Note that the covalently closed molecule is (–)-supercoiled (A) where all the crossings are RH. In the catenated rings showed to the right (B), the duplexes intertwine in an RH manner, too. In the covalently closed molecule, the DNA duplex is depicted in blue and green, and the catenated duplexes are depicted in blue and red and green and red, respectively, indicating that they are the natural products of replication where the newly synthesized strands are depicted in red. Full black dots indicate the intramolecular nodes of the supercoiled form. Asterisks indicate the intermolecular nodes of the catenane.

differences in the geometry of the crossings must play a major role (5, 8, 15, 18–23). DNA gyrase and Topo IV acting together ahead of the fork could be sufficient for replication to be completed. However, the processivity of helicase generating (+)-supercoiling might overcome DNA gyrase and Topo IV in their attempt to keep unreplicating DNA underwound. This potential problem was first recognized by Champoux and Been (24), who proposed that the (+)-supercoiling that transiently accumulates ahead of the fork could force it to swivel to diffuse this (+)-supercoiling behind the fork where Topo IV, the main decatenase in *Escherichia coli* (14, 25), would help to maintain the DNA of replicating molecules underwound. The foundations to analyze the structure of replication intermediates *in vivo* were established in the Cozzarelli and Marians laboratories in the late nineties of the last century. They called the putative intertwines of sister duplexes in the replicated region “precatenanes” to distinguish them from the supercoils of the unreplicated region (10, 11). Formation of precatenanes as replication progresses *in vivo*, however, is still questioned because if the replisome is anchored to the cell membrane, it would not be able to swivel (17, 19, 26–28). In any case, it is well known that in the absence of Topo IV fully replicated duplexes accumulate as catenated rings (17, 29). These rings intertwine in an RH manner (Fig. 1B). It should be noted, though, that once DNA is isolated and all proteins are removed, the forks have no impediment to rotate freely *in vitro*, and this rotation allows diffusion of the torsional tension from the replicated to the unreplicated regions and vice versa to achieve thermodynamic equilibrium (11). This redistribution of torsional tension occurs in such a way that the LH supercoils of the unreplicated region switch to RH precatenanes when diffused to the replicated region and

vice versa. In other words, the naked DNA examined *in vitro* does not necessarily reflect the situation *in vivo*. We are only allowed to inspect naked DNA from equilibrated replication intermediates (RIs) but ignore whether or not their geometry changes due to deproteinization. In summary, one of the most puzzling uncertainties regarding the dynamics of DNA topology during replication concerns whether or not forks can swivel *in vivo* leading to the formation of precatenanes as the replication fork advances (10, 19, 30). In an attempt to shed new light on this issue, we used classical genetics and high resolution two-dimensional agarose gel electrophoresis to examine the RIs of the following three bacterial plasmids, pBR-*terE*@StyI, pBR-*terE*@AatII, and pBR-*terE*@DraI (29), isolated from *E. coli* strains with different combinations of topoisomerases. In most cases for these three plasmids, the replicating fork stalls as it reaches the TerE-Tus complex (31, 32). This blockage leads to the accumulation of partially replicated molecules with a mass $\sim 1.2\times$, $\sim 1.6\times$, and $\sim 1.8\times$ the mass of unreplicated molecules (Fig. 3).

The first possibility indicates that forks do not swivel during replication. This hypothesis precludes the formation of precatenanes during replication. In the case of unpaired replication, fully replicated molecules would end up catenated in an RH manner solely due to the linking of the last ~ 200 bp of DNA for which it would not be possible for DNA gyrase and Topo IV to remove the links ahead of the replication fork at termination (6, 17).

According to this hypothesis, if RIs with the fork stalled at the *ter*-Tus complex were isolated from bacterial cells where Topo IV is active, molecules with the fork stalled would be (–)-supercoiled (showing RH crossings) in the unreplicated region and devoid of precatenanes (Fig. 2A). After deproteinization, though, some of the RH crossings of the unreplicated region would diffuse to the replicated one as LH precatenanes to equilibrate the torsional tension between unreplicated and replicated regions. In consequence, after deproteinization, these RIs would have RH crossings in the unreplicated region and LH precatenanes (Fig. 2B).

If RIs were isolated from cells where Topo IV is inactive, molecules would be (–)-supercoiled (showing RH crossings) in the unreplicated region and also devoid of precatenanes. As in the previous case, after deproteinization some of the (–)-supercoils of the unreplicated region would diffuse to the replicated one as LH precatenanes. In other words, if replication forks cannot rotate *in vivo*, partially replicated molecules with the fork stalled will look alike after deproteinization regardless of whether they were isolated from Topo IV-proficient or -deficient cells. The degree of torsional tension, however, would vary depending on the length of the region that remained unreplicated after fork stalling (Fig. 3). This region would represent only $\sim 20\%$ of the RIs for pBR-*terE*@DraI (full size ~ 7.98 kb), $\sim 40\%$ for pBR-*terE*@AatII (full size 7.12 kb), and $\sim 80\%$ for pBR-*terE*@StyI (full size 5.52 kb).

In summary, if the forks were not allowed to swivel during replication, the shorter RIs' unreplicated region, DNA gyrase, would have less space to introduce RH crossings. This torsional tension introduced by DNA gyrase *in vivo* once the replication fork has stalled at the *ter*-Tus complex would redistribute

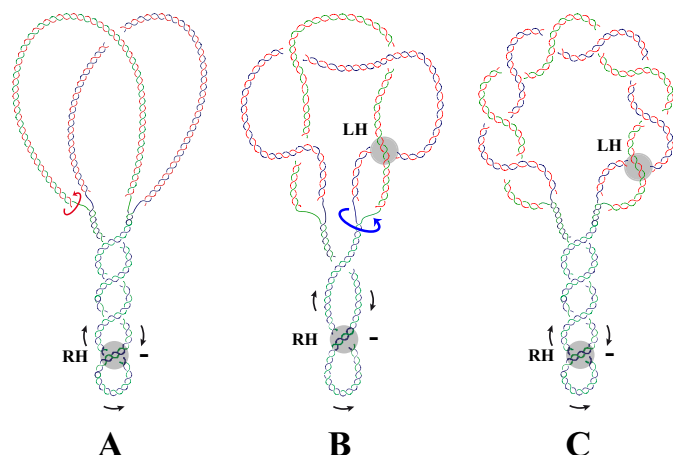


FIGURE 2. Schematics illustrating three partially replicated molecules. *A*, if the forks cannot swivel *in vivo*, the unreplicated region would be (–)-supercoiled showing RH crossings. The replicated region would be relaxed as the nascent strands of the sister duplexes are discontinuous and may rotate around its parental strand (red arrow) to dissipate any torsional tension. *B*, after deproteinization, the forks are allowed to rotate (blue arrow) freely to achieve thermodynamic equilibrium. Some of the RH crossings of the unreplicated region in *A* will diffuse to the replicated region where they will adopt the form of LH precatenanes. As the crossings in the unreplicated region contain both strands of the duplex, whereas in the replicated region the crossings contain one continuous parental strand and one discontinuous nascent strand, each crossing in the unreplicated region corresponds to two precatenane crossings. *C*, if the forks can swivel *in vivo*, partially replicated molecules would be saturated with (–)-supercoiling (showing RH crossings) in the unreplicated region and heavily intertwined (showing LH crossings) in the replicated region.

among the unreplicated and replicated regions only after deproteinization. For this reason, pBR-*terE*@StyI RIs would show the highest degree of torsional tension and pBR-*terE*@DraI the lowest. The important point here is that this would occur regardless of whether Topo IV was active or inactive *in vivo*.

The second possibility indicates that forks do swivel during replication. If true, forks would rotate clockwise or counterclockwise depending on the nature and degree of torsional tension ahead and behind the fork. If replication progresses unimpaired in a bacterial strain where Topo IV is active, (+)-supercoiling would continuously accumulate immediately ahead of the fork but only transiently. This local (+) torsional tension would force the fork to rotate in such a way to diffuse these (+)-supercoils to the replicated region as RH precatenanes (10, 11, 24). Topo IV would progressively remove these precatenanes. Upon stalling the replication fork, though, no more (+)-supercoiling would form ahead of the fork, and molecules would tend to equilibrate the torsional tension between unreplicated and replicated regions already *in vivo*. As mentioned previously, DNA gyrase is ~20× more efficient introducing RH crossings than Topo IV is in removing them (5, 6, 15). For this reason, shortly after fork stalling, the unreplicated region would become saturated with (–)-supercoiling. DNA gyrase would keep introducing (–)-supercoils in the unreplicated region, and to keep the torsional tension equilibrated, these RH crossings from the unreplicated region would diffuse to the replicated one as LH precatenanes, where Topo IV would progressively remove them. It should be noted that Topo IV is thought to remove LH crossings as efficiently as

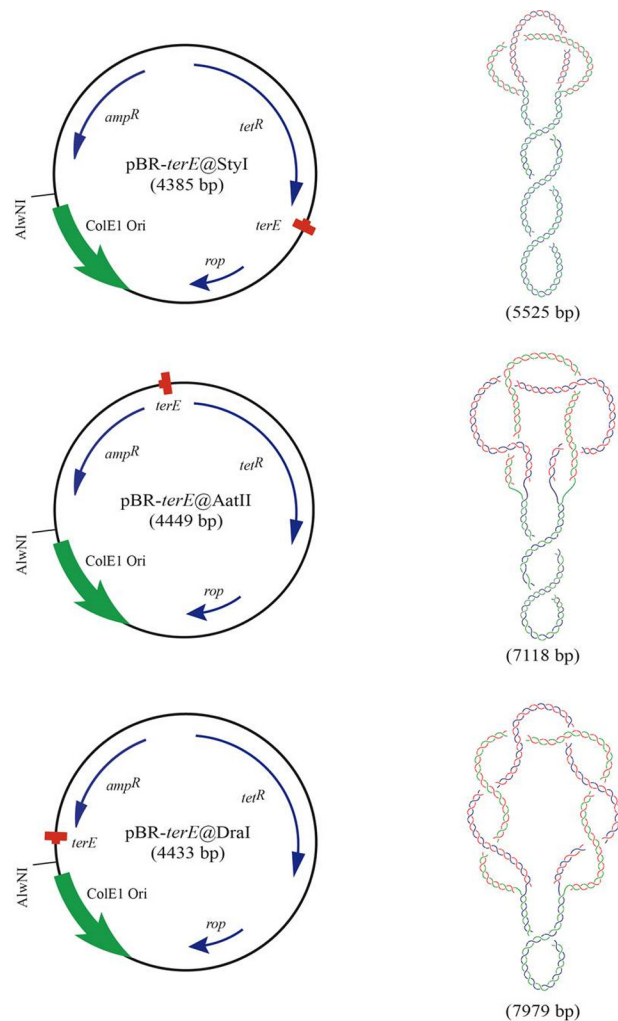


FIGURE 3. Genetic maps and cartoons illustrating the three plasmids used in this study: pBR-*terE*@StyI, pBR-*terE*@AatII, and pBR-*terE*@DraI. The genetic maps show the name and mass of each plasmid. Inside, each map shows the relative position of its most relevant features as follows: the ColE1 unidirectional origin in green (ColE1 Ori); the *E. coli* terminator sequence in red (*terE*); and the *rop* gene and the ampicillin and tetracycline resistance genes in blue (*ampR* and *tetR*). Outside, the relative position of the site recognized by AlwNI is indicated. To the right of the maps, schematics illustrate the partially replicated molecules with their corresponding masses. For comparison, all of them were drawn with a $\Delta Lk = -4$.

DNA gyrase introduces (–)-supercoiling (6, 33). This detrimental tug-of-war between DNA gyrase and Topo IV would start as soon as the replicating fork stalls at the *terE*-Tus complex and would likely continue until cell harvest. In consequence, partially replicated molecules isolated from Topo IV-proficient cells would be neither saturated with (–)-supercoiling in the unreplicated region nor heavily precatenated in the replicated one.

Note that for ColE1 plasmids in *E. coli* cells, there are 20–40 copies per cell, and this copy number is stringently regulated (34, 35). Moreover, stalling of the replication fork at the *terE*-Tus complex only occurs in ~80% of the cases. In the remaining ~20% (~5 plasmids per cell), the replicating fork goes by *terE* unimpaired probably due to a failure in the formation of a stable *terE*-Tus complex (36, 37). In these plasmids, replication is completed and segregation follows provided Topo IV is active. This small but consistent number of plasmids

DNA Topology during Replication

carrying the β -lactamase gene allows the cells to survive in the presence of ampicillin. In cells where Topo IV is inactive, however, although $\sim 20\%$ of the plasmids complete replication, the sister duplexes fail to segregate and catenanes accumulate (17, 29). As mechanical nicking is unavoidable during DNA isolation, these catenanes are detected in three different forms as follows: catenanes where both rings are nicked (CatAs); catenanes where one ring is nicked and the other covalently closed (CatBs); and catenanes where both rings are covalently closed (CatCs) (17, 29, 38, 39) together with partially replicated molecules.

If RIs were isolated from cells where Topo IV is inactive *in vivo*, upon fork stalling at the *terE*-Tus complex, no more (+)-supercoiling would form ahead of the fork. DNA gyrase, though, would keep introducing RH supercoils in the unreplicated region. As here we consider that forks do rotate *in vivo*, the RH crossings introduced by DNA gyrase in the unreplicated region would continuously diffuse to the replicated one as LH precatenanes. Here, however, Topo IV would not remove them. In consequence, these RIs would end up saturated with (-)-supercoiling in the unreplicated region and heavily precatenated (showing LH crossings) in the replicated one. In other words, if forks swivel *in vivo*, the RIs of the three plasmids isolated from Topo IV-proficient cells would be poorly torsioned as compared with those isolated from Topo IV-deficient cells. In both cases, though, the composition of the torsional tension would be different for the three plasmids. It would mainly include (-)-supercoiling for pBR-*terE*@StyI and predominantly left-handed precatenanes for pBR-*terE*@DraI (see Fig. 3).

Experimental Procedures

Bacterial Strains, Plasmids, and Culture Medium—The *E. coli* strains used in this study were DH5 α F' {F'/*gyrA96*(Nal^r) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) *glnV44 deoR* Δ (*lacZYA-argF*)U169[F80d Δ (*lacZ*)M15]}, W3110 {F⁻, SD108 Δ (*topA-cysB*)204 *acrA13 gyrB225 topA+* transduced} and parE10 {W3110 except [*parE10 recA*]}. Competent cells were transformed with monomeric forms of pBR-*terE*@StyI, pBR-*terE*@AatII, or pBR-*terE*@DraI and all derivatives of pBR322 with the polar replication terminator TerE (31, 32) cloned at variable distances from the unidirectional ColE1 origin as described before (29). DH5 α F' cells were grown in LB medium at 37 °C, and parE10 cells were grown at the restrictive temperature (43 °C). In all cases, 75 μ g/ml ampicillin was added to the LB medium. Isolation of plasmid DNA was performed as described elsewhere (40–42).

Two-dimensional Agarose Gel Electrophoresis and Southern Transfer—The first dimension was in a 0.4% agarose (Seakem[®]LE, Lonza) gel in TBE buffer (89 mM Tris borate, 2 mM EDTA) at 0.9 V/cm at room temperature for 25 h. The second dimension was in a 1% agarose gel in TBE buffer and was run perpendicular to the first dimension. The dissolved agarose was poured around the excised agarose lane from the first dimension, and electrophoresis was at 5 V/cm in a 4 °C cold chamber for 10 h. When necessary, 5 μ g/ml chloroquine (Sigma) was added to the TBE buffer in both the agarose gel and

the running buffer in the second dimension. Southern transfer was performed as described before (40–42).

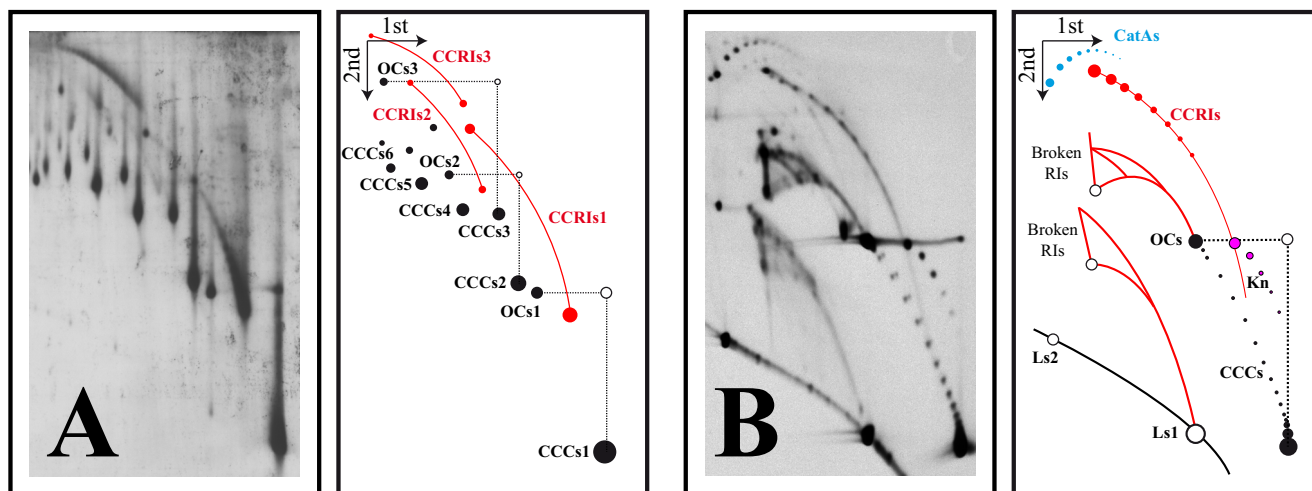
Nonradioactive Hybridization—DNA probes were labeled with digoxigenin using the DIG-High Prime kit (Roche Applied Science). Membranes (nylon membranes, positively charged, Roche Applied Science) were prehybridized in a 20-ml prehybridization solution (2 \times SSPE, 0.5% Blotto, 1% SDS, 10% dextran sulfate, and 0.5 mg/ml sonicated and denatured salmon sperm DNA) at 65 °C for 4–6 h. Labeled DNA was added, and the hybridization lasted for 12–16 h. Hybridized membranes were sequentially washed with 2 \times SSC and 0.1% SDS at room temperature for 5 min twice and with 0.1 \times SSC and 0.1% SDS at 68 °C for 15 min twice as well. Detection was performed with an antidigoxigenin-alkaline phosphatase-conjugated antibody (Roche Applied Science) and CDP-Star (PerkinElmer Life Sciences) according to the instructions provided by the manufacturer. All experiments were performed twice to confirm the results obtained were reproducible.

Densitometry—Autoradiograms were scanned, and the region where unknotted and knotted RIs migrated was analyzed by densitometry using Image J64 (National Institutes of Health) to determine the ratio of knotted to unknotted molecules (29, 43).

Results

Our primary aim was to inhibit Topo IV without affecting DNA gyrase. For this reason, we first chose *E. coli* DH5 α F' cells as they bear the mutation *gyrA96* that turns these cells resistant to derivatives of nalidixic acid (25, 44). Indeed, cells of this strain exposed to norfloxacin have been successfully used before to accumulate catenanes without affecting DNA gyrase (17, 45). In addition, DH5 α F' cells are RecA⁻ avoiding the formation of multimers (46, 47). The convenience to use a RecA⁻ strain is clearly illustrated in Fig. 4A. pBR-*terE*@AatII was used to transform W3110 cells that are RecA⁺. The combined detection of unreplicated and partially replicated forms of monomers and multimers, *i.e.* dimers, trimers, and so on, makes it difficult to identify the signals of interest. However, we found that molecules containing stalled forks tend to break in the presence of norfloxacin (Fig. 4B). The signals marked as “Broken RIs” are indicative of RIs broken at the forks (48, 49). For this reason, to inhibit Topo IV without affecting DNA gyrase we switched to parE10 cells that bear a Topo IV^{ts} mutation (25, 26, 44). To check whether the topology of bacterial plasmids was somehow affected in DH5 α F' cells in the absence of norfloxacin compared with a wild-type strain, we determined the supercoiling density (σ) of unreplicated forms of pBR-*terE*@AatII isolated from either DH5 α F' cells that are RecA⁻, Topo IV⁺, and *gyrA96* or W3110 cells that are RecA⁺, Topo IV⁺, and Gyr⁺. The results obtained are shown in Fig. 5. In both cases σ was -0.065 (modal $\Delta Lk = -27$). Therefore, in the experiments that follow, in order to determine the torsional tension of RIs in the presence and absence of Topo IV, we decided to use DH5 α F' cells and parE10 cells exposed to the restrictive temperature for the last hour.

We transformed both cell strains with the bacterial plasmids pBR-*terE*@StyI, pBR-*terE*@AatII, and pBR-*terE*@DraI, cultured the cells until they achieved logarithmic growth, and iso-



W3110 (RecA^+ Topo IV^+ Gyr^+)

DH5 α F' (RecA^- Topo IV^+ $\text{Gyr}^{\text{Nal}^r}$)
15 μM norfloxacin 15 min

FIGURE 4. Immunograms of intact forms of pBR-*terE*@AatII isolated from either *E. coli* W3110 or DH5 α F' cells (exposed to norfloxacin) analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. A, W3110 cells are RecA^+ , Topo IV^+ , and Gyr^+ (44). B, DH5 α F' cells are RecA^- and Topo IV^+ and bear the *gyrA96* mutation that turns these cells resistant to derivatives of nalidixic acid. DH5 α F' were grown until the culture achieved logarithmic growth and were then exposed to 15 μM norfloxacin for the last 15 min. To the right of each immunogram is an interpretative diagram of the most relevant features where unreplicated CCCs and OCs are depicted in black. CCRIs are depicted in red. Numbers refer to monomers (1) and multimers: dimers (2), trimers (3), etc. Broken RIs are indicated (48, 49).

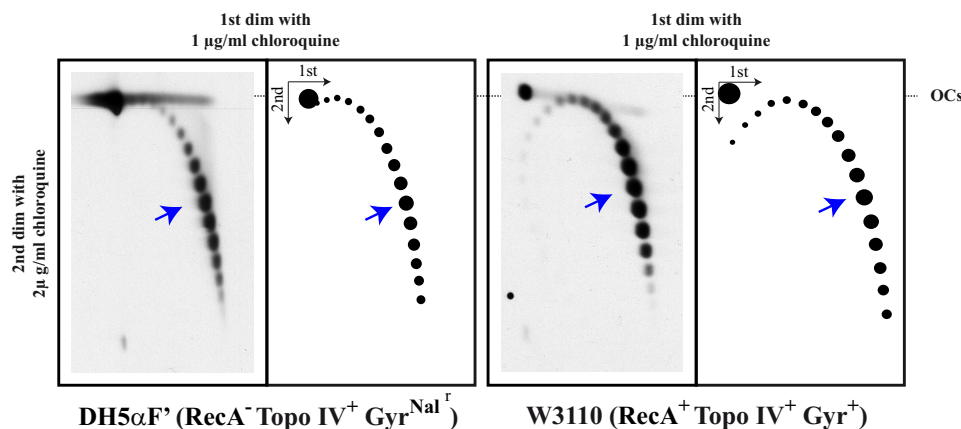


FIGURE 5. Unreplicated forms of pBR-*terE*@AatII isolated from either DH5 α F' or W3110 *E. coli* cells analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. Representative immunograms of two-dimensional gels show where the first and second dimensions occurred in the presence of different concentrations of chloroquine to resolve all the population of topoisomers. The first dimension occurred in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine, and the second dimension was in the presence of 2 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine. The most abundant topoisomer is indicated with a blue arrow. In both cases, the supercoiling density was -0.065 (modal $\Delta Lk = -27$).

lated the DNA from either *E. coli* DH5 α F' cells (where Topo IV is active) or *parE10* cells grown for the last 1 h at the restrictive temperature (where Topo IV is inactive). High resolution two-dimensional agarose gel electrophoresis and DNA hybridization with appropriate probes were used to examine intact RIs of the three plasmids.

The results obtained are shown in Fig. 6. All the immunograms were aligned attending to the mobility of OCs. Note that chloroquine's intercalation has no effect on the electrophoretic mobility of nicked unreplicated molecules (29, 37, 50).

The electrophoretic mobility of unreplicated forms of all three plasmids isolated from DH5 α F' cells analyzed without chloroquine was the same as expected for molecules almost identical in mass and shape as follows: 4385 bp for pBR-

terE@StyI; 4449 bp for pBR-*terE*@AatII; and 4433 bp for pBR-*terE*@DraI (left column in Fig. 6). The only significant difference among pBR-*terE*@StyI, pBR-*terE*@AatII, and pBR-*terE*@DraI is the location of *terE* (Fig. 3). For this reason, the electrophoretic mobility of nicked RIs (OCs) varied for the three plasmids, as their masses were 5525 bp for pBR-*terE*@StyI, 7118 bp for pBR-*terE*@AatII, and 7979 bp for pBR-*terE*@DraI, respectively. Note that the CCRIs, depicted in red in the interpretative diagrams, appeared as just a few topoisomers with an electrophoretic mobility during the second dimension close to the mobility of unreplicated CCCs for pBR-*terE*@StyI. For pBR-*terE*@AatII, CCRIs appeared as an arc formed by a series of topoisomers that extended from a spot with electrophoretic mobility during the second dimension, slightly higher

DNA Topology during Replication

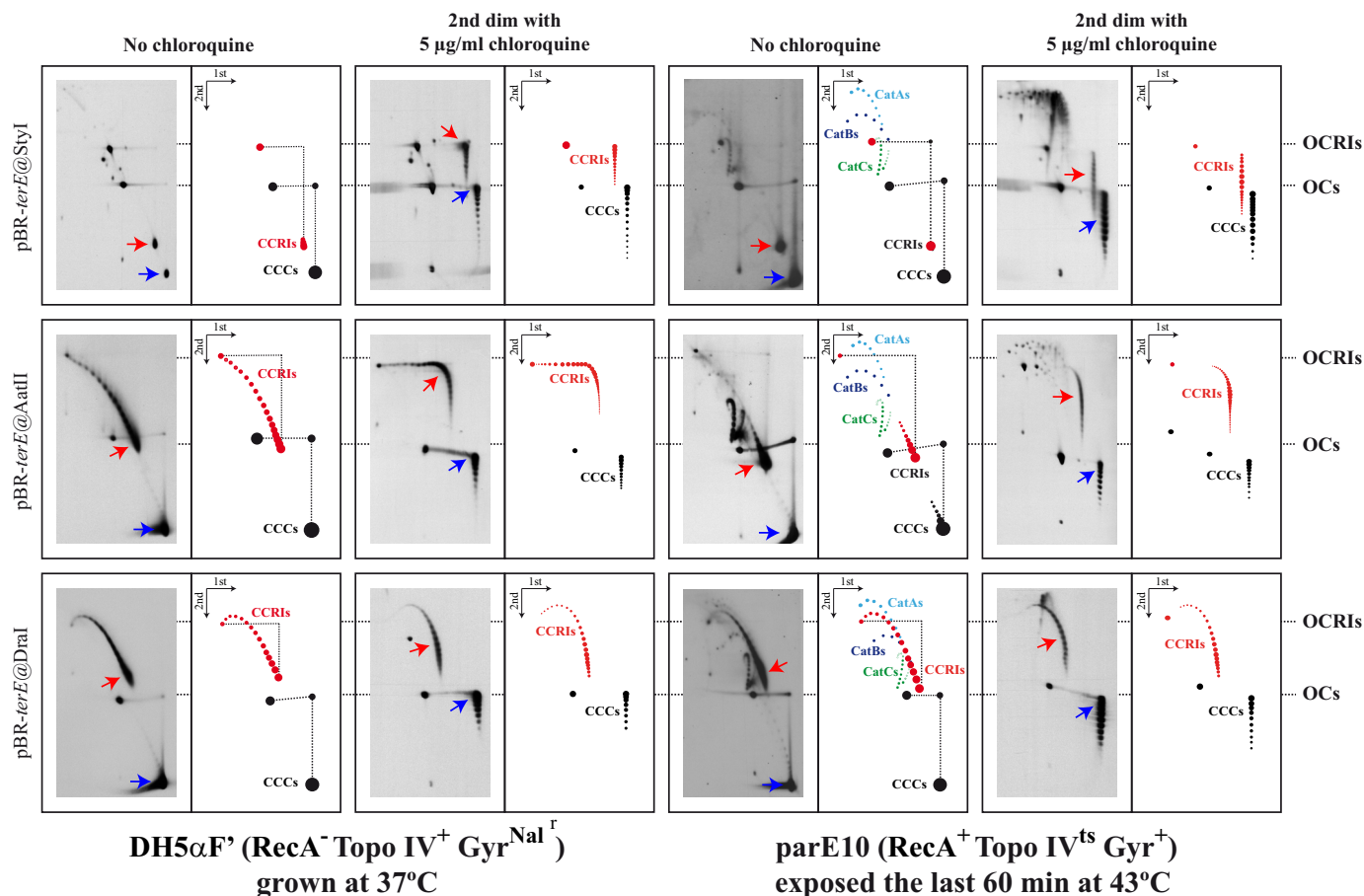


FIGURE 6. Immunograms of intact forms of the three plasmids isolated from either DH5 α F' or parE10 *E. coli* cells analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. Two-dimensional gels where the second dimension occurred in the presence of 5 μ g/ml chloroquine are indicated on top. To the right of each immunogram is an interpretative diagram of the most relevant features where CCRIs are depicted in red. Where it applies, CatAs (in light blue), CatBs (in dark blue), and CatCs (in green) are also shown. All immunograms were aligned according to the electrophoretic mobility of nicked monomers (OCs) and nicked replication intermediates (OCRIs) that are not affected by chloroquine. Blue arrows point to the most abundant topoisomer of unreplicated forms, and red arrows point to the most abundant CCRIs in all cases.

than unreplicated OCs up to OCRIs. Finally, for pBR-terE@DraI, CCRIs also appeared as an arc formed by a series of topoisomers that extended from a spot with electrophoretic mobility during the second dimension, slightly lower than unreplicated OCs up to OCRIs as well. In this case, however, the arc of RI topoisomers showed an inflection for the last poorly torsioned molecules.

The electrophoretic mobility of unreplicated forms of all three plasmids isolated from parE10 cells analyzed without chloroquine showed no difference when compared with the DNA isolated from DH5 α F' cells. In these immunograms, though, fully replicated catenanes (CatAs, CatBs, and CatCs) were clearly visible (next to the right column in Fig. 6). As mentioned previously, in the absence of Topo IV, \sim 20% of the plasmids escape the *terE*-Tus replication blockage and complete replication, but the sister duplexes fail to segregate and catenanes accumulate (17, 29). No significant difference was observed for CCRIs isolated from parE10 cells as compared with the immunograms of DNA isolated from DH5 α F' cells in the case of pBR-terE@StyI and pBR-terE@DraI. However, the pattern of the arc corresponding to CCRIs (depicted in red in the interpretative diagram) for pBR-terE@AatII was significantly different. Although in both cases the majority of RI

topoisomers showed the fastest electrophoretic mobility discernable, just a few topoisomers showing lower electrophoretic mobilities during the second dimension could be detected for the RIs isolated from parE10 cells. On the contrary, in the case of DNA isolated from DH5 α F' cells, the arc of CCRIs was almost complete. This observation strongly suggested that at least for pBR-terE@AatII, CCRIs isolated from parE10 cells (where Topo IV is inactive) were more torsionally tensioned than those isolated from DH5 α F' cells (where Topo IV is active).

In an attempt to compare the torsional tension of these RIs isolated from different cell strains in a different way, 5 μ g/ml chloroquine was added only during the second dimension of the two-dimensional gel system. Chloroquine is a planar molecule that intercalates between the two strands of the DNA double helix. This intercalation changes DNA twist. As bacterial plasmids are (–)-supercoiled, chloroquine removes (–)-supercoiling first and adds net (+)-supercoiling only after all native (–)-supercoiling has been removed (37, 51). Moreover, it was repeatedly shown that in partially replicated molecules containing three-way forks, overwinding of the unreplicated region transforms three-way into four-way junctions called reversed forks or chicken feet (37, 50–53). Molecules with these four-

way junctions where the fourth arm varies in length are not (+)-supercoiled and show the same electrophoretic mobility as nicked RIs.

As mentioned previously, only chloroquine intercalation in the unreplicated region of the RIs is expected to affect DNA topology. For this reason, it would have a profound effect on pBR-*terE*@StyI but not on pBR-*terE*@DraI (29, 37). We chose 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine as we knew that for pBR322 with a $\Delta Lk = 0$, this concentration introduces ~ 23 (+)-supercoils.⁴ Indeed, the results obtained confirmed our expectations. For the three plasmids isolated from DH5 α F' cells, the effect of chloroquine's intercalation on unreplicated molecules was alike (next to *left column* in Fig. 6). The effect on the shape of the arc corresponding to partially replicated molecules, however, differed for the three plasmids. For pBR-*terE*@StyI, the electrophoretic mobility of CCRIs during the second dimension in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine changed in a way similar to the change observed for unreplicated CCCs. Taking into account that CCRIs cannot re-gain mobility after the removal of all their native (-)-supercoiling (37, 50), we may conclude that in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine the modal topoisomer for pBR-*terE*@StyI CCRIs was close to 0 (indicated by the corresponding *red arrow* in Fig. 6). For pBR-*terE*@AatII, the arc of CCRIs changed its shape dramatically. It described a smooth arc without chloroquine. This arc, though, turned into an acute angle in the presence of chloroquine during the second dimension. In this case the modal topoisomer was -3 (indicated by the corresponding *red arrow* in Fig. 6). For pBR-*terE*@DraI, however, the change in the shape of the arc was subtle. If we compare these results with those obtained for the same three plasmids isolated from parE10 cells, the differences were obvious (see the *right column* on Fig. 6). pBR-*terE*@StyI CCRIs were not fully relaxed, and the majority of the molecules still showed an electrophoretic mobility higher than their corresponding OCRIs. The modal topoisomer in this case was -4 (indicated by the corresponding *red arrow* in Fig. 6). This means that for pBR-*terE*@StyI CCRIs isolated from parE10 cells, exposure to 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine during the second dimension was not enough to remove all the torsional tension. For pBR-*terE*@AatII, the shape of the arc of CCRIs was not as abrupt as in the case of the molecules isolated from DH5 α F' cells. Indeed, here most of the CCRIs were still torsionally tensioned and the modal topoisomer was -11 still showing an electrophoretic mobility significantly higher than their corresponding OCRIs (indicated by the corresponding *red arrow* in Fig. 6). For pBR-*terE*@DraI, however, the change in the shape of the arc was once again only subtle (the modal topoisomer was -13 for DH5 α F' versus -12 for parE10). Altogether, these observations indicated that 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine added during the second dimension affected the mobility of CCRIs differently. The results obtained confirmed that CCRIs isolated from parE10 cells were more torsionally tensioned than those isolated from DH5 α F' cells. The effect of chloroquine was notable for pBR-*terE*@StyI, less apparent for pBR-*terE*@AatII, and almost negligible for pBR-*terE*@DraI. Unreplicated plasmids isolated from

cells where Topo IV is inactive are slightly more (-)-supercoiled than those isolated from cells where Topo IV is active (44, 54). As mentioned previously, here we used the RecA⁻ DH5 α F' cells to avoid the formation of multimers due to recombination.

It was recently shown that torsional tension reduces the probability for Topo IV to create replication knots (29, 55–58). In contrast, it is well known that the level of DNA knotting is proportional to molecular mass (40, 59). To further confirm the results obtained so far, we decided to measure DNA knotting in the replicated region of the RIs isolated from DH5 α F' and parE10 cells. We anticipated that the number and complexity of replication knots would be higher for pBR-*terE*@DraI and lower for pBR-*terE*@StyI. To facilitate the quantitation of replication knots, we digested the RIs of the three plasmids with AlwNI. This restriction enzyme cuts the plasmids only once at the unreplicated region (see Fig. 3). The resulting digested molecules consisted of linear DNAs containing an internal bubble. These molecules were analyzed in two-dimensional gels allowing the identification of unknotted and knotted forms after hybridization with proper probes. Finally, the signals corresponding to unknotted versus knotted molecules were quantitated by densitometry (29, 43). The results obtained confirmed our expectations (Fig. 7). For both cell strains (DH5 α F' and parE10) the percentage of knotted bubbles increased with the size of the bubble (40). This observation suggests that torsional tension was higher for those CCRIs isolated from parE10 cells (29, 55–58).

Discussion

Formation of precatenanes as replication progresses has been discussed before (6, 8, 10, 19, 30, 33). However, the issue remains unsettled. Fully replicated molecules may become catenated just at the very end of replication before termination due to the linking of the last ~ 200 bp of DNA for which it would not be possible for DNA gyrase and Topo IV to remove the links ahead of the replication forks (6, 17, 38). However, the three major experimental observations supporting the formation of precatenanes as replication progresses are as follows: the excess of (+)-windings as a function of the extent of replication *in vitro* (6); the occurrence of knotted replication bubbles in bacterial plasmids (29, 37, 40, 43, 60, 61); and the detection of σ -shaped replication intermediates in *Xenopus* extracts after poisoning Topo II with etoposide and the purification by virtue of their covalent attachment to Topo II subunits (48).

Here, we obtained additional experimental evidence supporting the formation of precatenanes during the replication of bacterial plasmids. It is important to emphasize, however, that small bacterial plasmids are tiny topological domains significantly different from the big loops or compartments of prokaryotic and eukaryotic chromosomes (55, 62). Therefore, extrapolation of the results obtained with bacterial plasmids to bigger and more complex chromosomes should only be made with special care.

The results obtained here indicate that RIs isolated from parE10 cells grown for the last hour at the restrictive temperature (where Topo IV is inactive) were more torsionally ten-

⁴ J. B. Schwartzman, unpublished results.

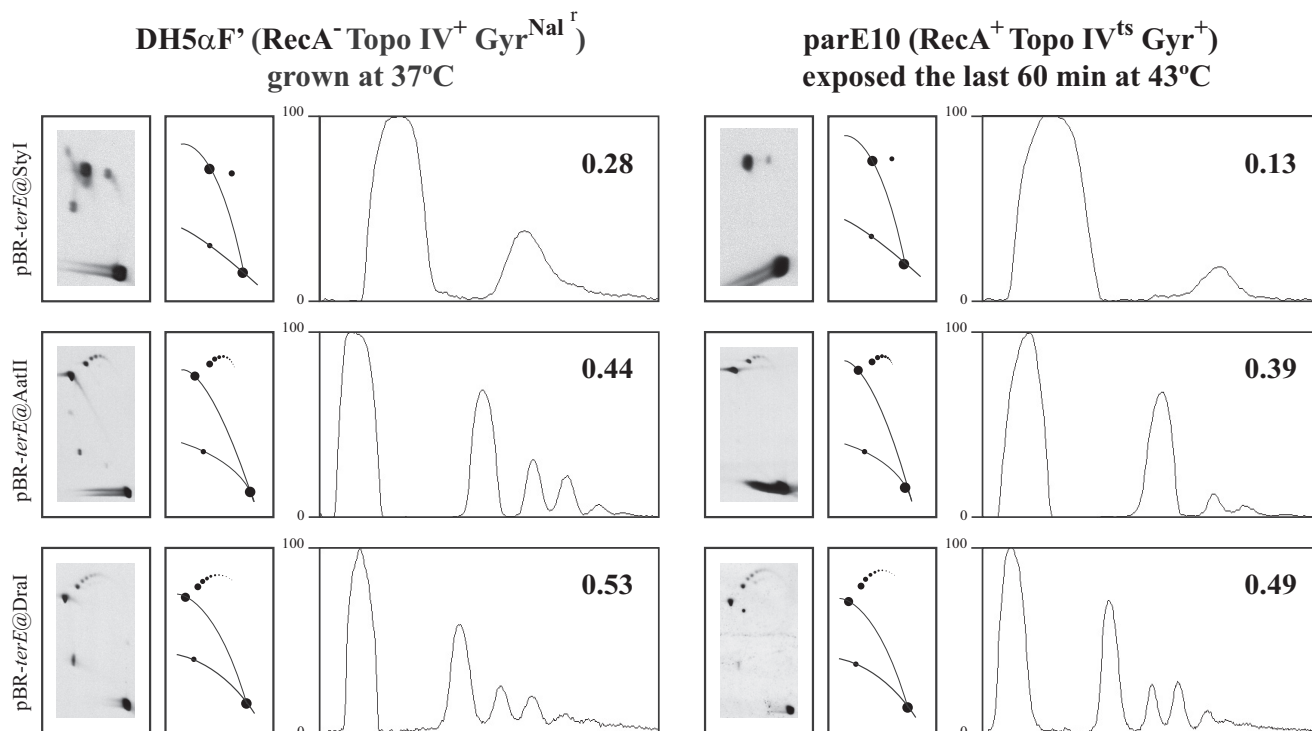


FIGURE 7. Comparison of knotted and unknotted RIs of the three plasmids isolated from either DH5 α F' or parE10 *E. coli* cells analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. DNA was isolated, digested with AlwNI, and analyzed in two-dimensional gels. The area of the immunogram where unknotted and knotted RIs migrated was scanned and analyzed by densitometry. In each case, immunograms are shown to the left, diagrammatic interpretations are in the middle, and densitometric profiles are to the right. The numbers at the top right corner of each profile indicate the ratio of knotted/unknotted molecules. Note that for both cell types, this ratio was higher for pBR-terE@DraI. For each plasmid, however, the ratio was always higher for the RIs isolated from DH5 α F' cells.

sioned than the same RIs isolated from DH5 α F' cells (where Topo IV is active). This observation was based on the electrophoretic mobility of the partially replicated molecules. As clearly observed by comparing the patterns of pBR-terE@AatII RIs analyzed in two-dimensional gels with no chloroquine (see Fig. 6), the electrophoretic mobility of these RIs was unambiguously displaced toward highly torsioned topoisomers in the case of molecules isolated from parE10 cells. As discussed above, this was expected provided the replication forks swivel *in vivo* during replication. This observation was not obvious for the other two plasmids, pBR-terE@StyI and pBR-terE@DraI. In these cases there was no significant difference in the distribution and intensity of the signals corresponding to RIs. As illustrated in Fig. 3, for pBR-terE@StyI the majority of the crossings are expected to be supercoils in the unreplicated region that contains $\sim 80\%$ of the molecule. For the same ΔLk , the electrophoretic mobility of catenanes would be roughly half that of supercoils (10, 63). These RIs migrated very close to unreplicated CCCs (see Fig. 6). For pBR-terE@DraI, however, most of the crossings are expected to be precatenanes in the replicated region because the unreplicated region contains just $\sim 20\%$ of the molecule. Huge differences of torsional tension would be needed to significantly change the electrophoretic mobility in these two cases. On the contrary, for the RIs of pBR-terE@AatII, approximately half of the molecule remained unreplicated, although the other half was replicated (see Fig. 3). For this reason, even subtle changes in torsional tension have an immediate reflection in electrophoretic mobility. We wanted to

confirm this observation and used 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloroquine during the second dimension of the two-dimensional gel system. Chloroquine's intercalation in the sister duplexes of the replicated region has no effect on the writhing because the nascent strands are already discontinuous (8). Only chloroquine's intercalation in the unreplicated region of the RIs induces relevant changes in writhing. As for pBR-terE@DraI, the unreplicated region contains only $\sim 20\%$ of the molecule, and here the effect of chloroquine's intercalation is expected to be negligible. The results obtained matched this prediction precisely. Moreover, for pBR-terE@StyI, the differences between RIs isolated from DH5 α F' and parE10 cells observed in electrophoretic mobility after chloroquine's intercalation revealed that although not evidenced without chloroquine, the RIs isolated from parE10 cells were clearly more torsionally tensioned (see Fig. 6). Chloroquine's intercalation completely relaxed a significant number of CCRIs in the case of molecules isolated from DH5 α F' cells, whereas those isolated from parE10 cells still retained significant electrophoretic mobility. A similar observation was evident for pBR-terE@AatII (Fig. 6). As mentioned previously, it should be noticed that for RIs containing three-way junctions, once all the native (-) supercoiling is removed, these molecules cannot acquire (+) supercoiling because the nascent strands of the sister duplexes form a fourth arm leading to fork reversal with changes in neither mass nor electrophoretic mobility (50, 51). Finally, the number and complexity of replication knots were higher for the RIs isolated from DH5 α F' cells,

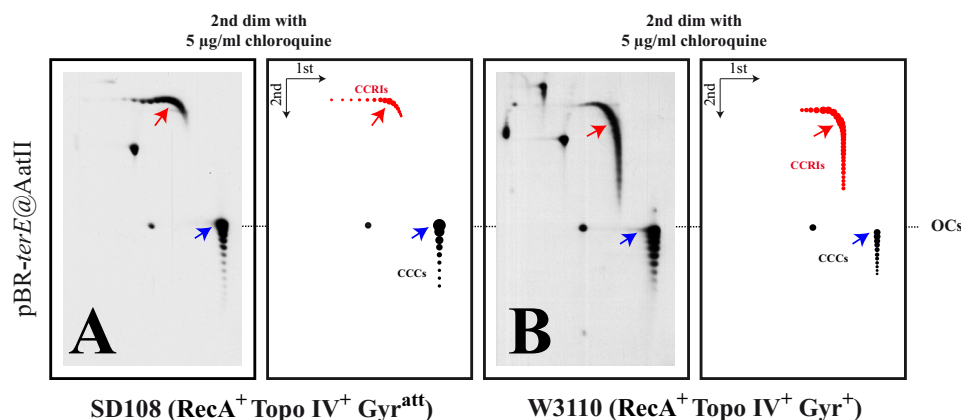


FIGURE 8. Immunograms of intact forms of pBR-terE@AatII isolated from SD108 or W3110 *E. coli* cells analyzed by two-dimensional agarose gel electrophoresis where the second dimension occurred in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine. A, SD108 cells bear the mutation *gyrB225* that turns the DNA gyrase ineffectively (72). B, W3110 cells are RecA⁺, Topo IV⁺, and Gyr⁺ (44). In both cases, the second dimension of the two-dimensional gels occurred in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine. To the right of each immunogram, an interpretative diagram of the most relevant features where unreplicated CCCs and open circles (OCs) are depicted in black. Intact replication intermediates (CCRIs) are depicted in red. The immunograms were aligned according to the electrophoretic mobility of nicked unreplicated monomers (OCs) that are not affected by chloroquine. Red arrows point to the most abundant CCRIs topoisomer, and blue arrows point to the most abundant topoisomer of unreplicated forms (CCCs).

also suggesting that the degree of precatenation was higher for the RIs isolated from parE10 cells (see Fig. 7 and Ref. 29).

It could be argued that CCRIs isolated from DH5 α F' cells (where Topo IV is active) were less torsionally tensioned due to the removal of RH crossings by Topo IV in the unreplicated region. For this to be true, the efficiency of Topo IV removing the RH crossings of (–)-supercoiling should be higher than the efficiency of DNA gyrase introducing them. On the contrary, experimental data indicate that although Topo IV removes the LH crossings of (+)-supercoiling as efficiently as DNA gyrase introduces RH ones, DNA gyrase is $\sim 20\times$ more efficient introducing RH crossings than Topo IV is in removing them (5, 6, 15). For this reason, when simultaneously exposed to both enzymes, DNA would become progressively more and not less (–)-supercoiled with time.

It could also be argued that replisomes fall apart shortly after stalling in all cases. If this were true, torsional tension would equilibrate between the unreplicated and replicated regions *in vivo* but only after fork stalling. If RIs were isolated from DH5 α F' cells, the results expected would be indistinguishable from those observed if the forks swivel regardless of fork stalling (second possibility). The tug-of-war between DNA gyrase and Topo IV would turn RIs neither saturated with (–)-supercoiling in the unreplicated region nor heavily precatenated in the replicated one. If RIs were isolated from parE10 cells grown at the nonpermissive temperature, they would end-up saturated with (–)-supercoiling in the unreplicated region and heavily precatenated in the replicated one, too. In other words, the results would be identical regardless whether replication forks swivel freely always or only after replisomes fall apart due to fork stalling. The crucial question is then how stable replisomes are after fork stalling? In other words, do replisomes stay attached to the RIs' impeding fork swiveling long enough after stalling *in vivo* or do they disassemble quickly after stalling, thus allowing forks to swivel right away? This question has been approached in many laboratories in different systems. It is important to make a clear distinction between stalling of replication forks due to “accidental” or “natural” barriers (64). Now-

adays it is generally accepted that the encounter of a replication fork with a damaged DNA template stalls the replisome and causes it to fall apart (65, 66). Moreover, stalling of replication forks at the so-called natural barriers, such as the *ter*-Tus complex during replication in *E. coli* cells, seems to be different (67, 68). Replication forks are blocked by Tus-bound *Ter* sites on the approach from one direction but not the other. In the former case, establishment of a stable locked complex involving a cytosine-specific pocket on the surface of Tus, explains Tus resistance to dissociation from *Ter* sites and the strength of the *ter*-Tus locks that are readily unlocked only when a later-arriving replication fork approaches the permissive face of the *ter*-Tus complex (69, 70). In addition, it was clearly shown that the DnaB helicase, which leads the replisome during replication, physically interacts with Tus and stabilizes it. This protein-protein interaction was confirmed *in vivo* and *in vitro* (71). Altogether, these observations indicate that replisomes stalled at *ter*-Tus complexes in the right orientation are fairly stable supporting the rationale of our approach.

We propose there are significant differences in the catalytic rate of DNA gyrase and Topo IV on the different substrates analyzed here. To confirm this idea, we investigated torsional tension in the RIs of pBR-terE@AatII isolated from *E. coli* SD108 (*topA* + *gyrB225*). These cells have an attenuated DNA gyrase (72). To this end, as SD108 cells are RecA⁺, we analyzed the corresponding RIs in two-dimensional gels where the second dimension occurred in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ chloroquine. The results obtained are shown in Fig. 8A. Notice that RIs were more relaxed when isolated from SD108 cells, which bears an attenuated version of DNA gyrase, than when they were isolated from cells with a wild-type version of this topoisomerase (W3110 cells in Fig. 8B). This observation confirmed that the catalytic rate of DNA topoisomerases is crucial to determine torsional tension during replication.

In summary, here we used three different and independent criteria to show that *in vivo* the RIs isolated from DH5 α F' cells are less torsionally tensioned than those isolated from parE10

DNA Topology during Replication

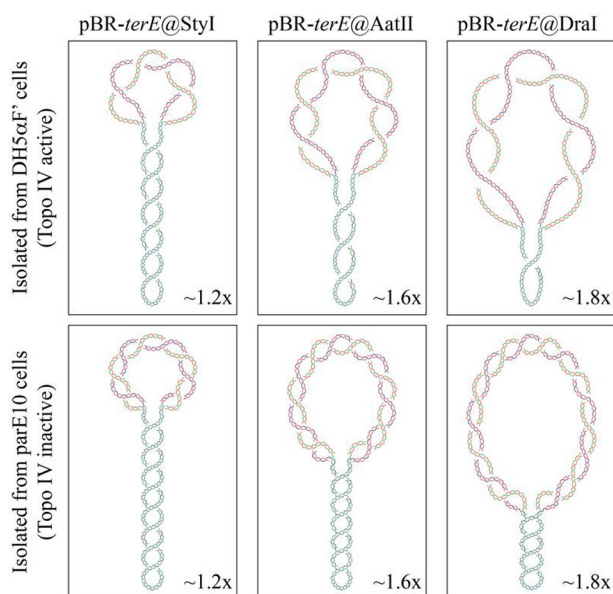


FIGURE 9. Schematics illustrating the differences observed in the degree and distribution of torsional tension in the unreplicated and replicated regions of the three plasmids isolated from either DH5 α F' or parE10 cells. Note that for pBR-terE@Styl, most of the crossings are supercoils. There is an even distribution of supercoils and precatenanes for pBR-terE@AatII, and most of the crossings are precatenanes for pBR-terE@DraI. In addition, the overall torsional tension is significantly higher for those RIs isolated from parE10 cells (where Topo IV is inactive) as compared with the RIs of the same plasmid isolated from DH5 α F' cells (where Topo IV is active).

cells (Fig. 9). This observation strongly favors the idea that replication forks do swivel *in vivo* leading to the formation of precatenanes as replication progresses.

Acknowledgments—We acknowledge Lynn Zechiedrich, Ken Mariani, Santiago Rodriguez de Córdoba, Ian Grainge, and Nancy Crisona for *E. coli* strains. We thank María-Luisa Martínez-Robles for technical advice, and we also want to stress that we could not have accomplished this work without the continuous support and constructive criticism of Andrzej Stasiak.

References

- Bliska, J. B., and Cozzarelli, N. R. (1987) Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **194**, 205–218
- Bednar, J., Furrer, P., Stasiak, A., Dubochet, J., Egelman, E. H., and Bates, A. D. (1994) The twist, writhe, and overall shape of supercoiled DNA change during counterion-induced transition from a loosely to a tightly interwound superhelix. Possible implications for DNA structure *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **235**, 825–847
- Funnell, B. E., Baker, T. A., and Kornberg, A. (1987) *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* **262**, 10327–10334
- Marians, K. J., Minden, J. S., and Parada, C. (1986) Replication of superhelical DNAs *in vitro*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **33**, 111–140
- Crisona, N. J., Strick, T. R., Bensimon, D., Croquette, V., and Cozzarelli, N. R. (2000) Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. *Genes Dev.* **14**, 2881–2892
- Hiasa, H., and Mariani, K. J. (1996) Two distinct modes of strand unlinking during θ -type DNA replication. *J. Biol. Chem.* **271**, 21529–21535
- Kanaar, R., and Cozzarelli, N. R. (1992) Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 369–379
- Schwartzman, J. B., and Stasiak, A. (2004) A topological view of the replicon. *EMBO Rep.* **5**, 256–261
- Alexandrov, A. I., Cozzarelli, N. R., Holmes, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Postow, L., Rybenkov, V., and Vologodskii, A. V. (1999) Mechanisms of separation of the complementary strands of DNA during replication. *Genetica* **106**, 131–140
- Peter, B. J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Mariani, K. J., and Cozzarelli, N. R. (1998) The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell* **94**, 819–827
- Ullsperger, C., Vologodskii, A. A., and Cozzarelli, N. R. (1995) in *Nucleic Acids and Molecular Biology* (Lilley, D. M., and Eckstein, F., eds) pp. 115–142, Springer-Verlag, Berlin
- Bates, A. D., and Maxwell, A. (2005) *DNA Topology*, Oxford University Press, Oxford
- Wang, J. (2009) *Untangling the Double Helix*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Zechiedrich, E. L., and Cozzarelli, N. R. (1995) Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **9**, 2859–2869
- Stone, M. D., Bryant, Z., Crisona, N. J., Smith, S. B., Vologodskii, A., Bustamante, C., and Cozzarelli, N. R. (2003) Chirality sensing by *Escherichia coli* topoisomerase IV and the mechanism of type II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8654–8659
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Nash, H. A. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3872–3876
- Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B., and Cozzarelli, N. R. (1992) The role of topoisomerase-IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell* **71**, 277–288
- Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2003) Single-molecule study of DNA unlinking by eukaryotic and prokaryotic type-II topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 9820–9825
- Espeli, O., and Mariani, K. J. (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol. Microbiol.* **52**, 925–931
- Liu, Z., Zechiedrich, L., and Chan, H. S. (2010) Action at hooked or twisted-hooked DNA juxtapositions rationalizes unlinking preference of type-2 topoisomerases. *J. Mol. Biol.* **400**, 963–982
- Neuman, K. C., Charvin, G., Bensimon, D., and Croquette, V. (2009) Mechanisms of chiral discrimination by topoisomerase IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6986–6991
- Timsit, Y. (2011) Local sensing of global DNA topology: from crossover geometry to type II topoisomerase processivity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8665–8676
- Trigueros, S., Salceda, J., Bermúdez, I., Fernández, X., and Roca, J. (2004) Asymmetric removal of supercoils suggests how topoisomerase II simplifies DNA topology. *J. Mol. Biol.* **335**, 723–731
- Champoux, J. J., and Been, M. D. (1980) in *Mechanistic Studies of DNA Replication and Genetic Recombination* (Alberts, B., ed) pp. 809–815, Academic Press, New York
- Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., and Cozzarelli, N. R. (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**, 2580–2592
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., and Suzuki, H. (1990) New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell* **63**, 393–404
- Levine, C., Hiasa, H., and Mariani, K. J. (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**, 29–43
- Khodursky, A. B., Peter, B. J., Schmid, M. B., DeRisi, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Cozzarelli, N. R. (2000) Analysis of topoisomerase function in bacterial replication fork movement: use of DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9419–9424
- López, V., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2012) Topo IV is the topoisomerase that knots and unknots sister duplexes during DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3563–3573
- Postow, L., Peter, B. J., and Cozzarelli, N. R. (1999) Knot what we thought before: the twisted story of replication. *BioEssays* **21**, 805–808
- Bastia, D., and Mohanty, B. K. (1996) in *DNA Replication in Eukaryotic*

- Cells* (DePamphilis, M. L., ed) pp. 177–215, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
32. Hill, T. M., Pelletier, A. J., Tecklenburg, M. L., and Kuempel, P. L. (1988) Identification of the DNA sequence from *E. coli* terminus region that halts replication forks. *Cell* **55**, 459–466
 33. Ullsperger, C., and Cozzarelli, N. R. (1996) Contrasting enzymatic activities of topoisomerase IV and DNA gyrase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 31549–31555
 34. Cesareni, G., Helmer-Citterich, M., and Castagnoli, L. (1991) Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* **7**, 230–235
 35. Tomizawa, J., and Som, T. (1984) Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein. *Cell* **38**, 871–878
 36. Santamaría, D., Hernández, P., Martínez-Robles, M. L., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2000) Premature termination of DNA replication in plasmids carrying two inversely oriented ColE1 origins. *J. Mol. Biol.* **300**, 75–82
 37. Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M. L., Sogo, J. M., Stasiak, A., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2002) Supercoiling, knotting and replication fork reversal in partially replicated plasmids. *Nucleic Acids Res.* **30**, 656–666
 38. Sundin, O., and Varshavsky, A. (1980) Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* **21**, 103–114
 39. Sundin, O., and Varshavsky, A. (1981) Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers dissection of the final stages of SV40 DNA replication. *Cell* **25**, 659–669
 40. Olavarrieta, L., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2002) Knotting dynamics during DNA replication. *Mol. Microbiol.* **46**, 699–707
 41. Santamaría, D., de la Cueva, G., Martínez-Robles, M. L., Krimer, D. B., Hernández, P., and Schwartzman, J. B. (1998) DnaB helicase is unable to dissociate RNA-DNA hybrids—its implication in the polar pausing of replication forks at ColE1 origins. *J. Biol. Chem.* **273**, 33386–33396
 42. Schwartzman, J. B., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., and Krimer, D. B. (2013) Plasmid DNA topology assayed by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.* **1054**, 121–132
 43. Olavarrieta, L., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2002) DNA knotting caused by head-on collision of transcription and replication. *J. Mol. Biol.* **322**, 1–6
 44. Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D. M., and Cozzarelli, N. R. (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 8103–8113
 45. Martínez-Robles, M. L., Witz, G., Hernández, P., Schwartzman, J. B., Stasiak, A., and Krimer, D. B. (2009) Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5126–5137
 46. Martín-Parras, L., Hernández, P., Martínez-Robles, M. L., and Schwartzman, J. B. (1991) Unidirectional replication as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **220**, 843–853
 47. Martín-Parras, L., Hernández, P., Martínez-Robles, M. L., and Schwartzman, J. B. (1992) Initiation of DNA replication in ColE1 plasmids containing multiple potential origins of replication. *J. Biol. Chem.* **267**, 22496–22505
 48. Lucas, I., Germe, T., Chevrier-Miller, M., and Hyrien, O. (2001) Topoisomerase II can unlink replicating DNA by precatenane removal. *EMBO J.* **20**, 6509–6519
 49. Martín-Parras, L., Lucas, I., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B., Hyrien, O., and Schwartzman, J. B. (1998) Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3424–3432
 50. Fierro-Fernández, M., Hernández, P., Krimer, D. B., Stasiak, A., and Schwartzman, J. B. (2007) Topological locking restrains replication fork reversal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1500–1505
 51. Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R. W., Bustamante, C., Vologodskii, A. V., and Cozzarelli, N. R. (2001) Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks. *J. Biol. Chem.* **276**, 2790–2796
 52. De Septenville, A. L., Duigou, S., Boubakri, H., and Michel, B. (2012) Replication fork reversal after replication-transcription collision. *PLoS Genet.* **8**, e1002622
 53. Fierro-Fernández, M., Hernández, P., Krimer, D. B., and Schwartzman, J. B. (2007) Replication fork reversal occurs spontaneously after digestion but is constrained in supercoiled domains. *J. Biol. Chem.* **282**, 18190–18196
 54. Mayán-Santos, M. D., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D., and Schwartzman, J. B. (2007) DNA is more negatively supercoiled in bacterial plasmids than in minichromosomes isolated from budding yeast. *Electrophoresis* **28**, 3845–3853
 55. Schwartzman, J. B., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., and Krimer, D. B. (2013) The benefit of DNA supercoiling during replication. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 646–651
 56. Witz, G., Dietler, G., and Stasiak, A. (2011) DNA knots and DNA supercoiling. *Cell Cycle* **10**, 1339–1340
 57. Witz, G., Dietler, G., and Stasiak, A. (2011) Tightening of DNA knots by supercoiling facilitates their unknotting by type II DNA topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 3608–3611
 58. Witz, G., and Stasiak, A. (2010) DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2119–2133
 59. Katritch, V., Bednar, J., Michoud, D., Scharein, R. G., Dubochet, J., and Stasiak, A. (1996) Geometry and physics of knots. *Nature* **384**, 142–145
 60. Sogo, J. M., Stasiak, A., Martínez-Robles, M. L., Krimer, D. B., Hernández, P., and Schwartzman, J. B. (1999) Formation of knots in partially replicated DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **286**, 637–643
 61. Viguera, E., Hernández, P., Krimer, D. B., Boistov, A. S., Lurz, R., Alonso, J. C., and Schwartzman, J. B. (1996) The ColE1 unidirectional origin acts as a polar replication fork pausing site. *J. Biol. Chem.* **271**, 22414–22421
 62. Higgins, N. P., and Vologodskii, A. (eds) (2004) *Topological Behavior of Plasmid DNA*, American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 63. Cebrian, J., Kadomatsu-Hermosa, M. J., Castan, A., Martínez, V., Parra, C., Fernandez-Nestosa, M. J., Schaerer, C., Martínez-Robles, M. L., Hernández, P., Krimer, D. B., Stasiak, A., and Schwartzman, J. B. (2014) Electrophoretic mobility of supercoiled, catenated and knotted DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* [10.1093/nar/gku1255](https://doi.org/10.1093/nar/gku1255)
 64. Mirkin, E. V., and Mirkin, S. M. (2007) Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 13–35
 65. Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J., and Marians, K. J. (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**, 37–41
 66. Marians, K. J. (2000) PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 185–189
 67. Bidnenko, V., Ehrlich, S. D., and Michel, B. (2002) Replication fork collapse at replication terminator sequences. *EMBO J.* **21**, 3898–3907
 68. Labib, K., and Hodgson, B. (2007) Replication fork barriers: pausing for a break or stalling for time? *EMBO Rep.* **8**, 346–353
 69. Mulcair, M. D., Schaeffer, P. M., Oakley, A. J., Cross, H. F., Neylon, C., Hill, T. M., and Dixon, N. E. (2006) A molecular mousetrap determines polarity of termination of DNA replication in *E. coli*. *Cell* **125**, 1309–1319
 70. Moreau, M. J., and Schaeffer, P. M. (2012) Differential Tus-Ter binding and lock formation: implications for DNA replication termination in *Escherichia coli*. *Mol. BioSyst.* **8**, 2783–2791
 71. Mulugu, S., Potnis, A., Shamsuzzaman, Taylor, J., Alexander, K., and Bastia, D. (2001) Mechanism of termination of DNA replication of *Escherichia coli* involves helicase-contrahelicase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9569–9574
 72. DiNardo, S., Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E., and Wright, A. (1982) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**, 43–51