

15-2-2021

Estructura y función de la  
unidad fundamental de  
replicación del DNA (el  
replicón) en eucariontes  
BIOQUIMICA 2



CATEDRÁTICO: JOSE MIGUEL CULEBRO RICALDI  
PRESENTA: CARLOS FRANCISCO LEON GOMEZ

# Estructura y función de la unidad fundamental de replicación del DNA (el replicón) en eucariontes

La generación de nuevas células, desde los organismos procariontes hasta los humanos, requiere de mecanismos que dupliquen con exactitud el material genético antes de cada división celular. La replicación es el proceso mediante el cual se copia el genoma, constituido fundamentalmente por el ácido desoxirribonucleico (dna) y consiste en una serie de pasos regulados durante el ciclo celular.

El modelo de Replicon plantea la existencia de unidades funcionales de replicación, las cuales están reguladas por elementos proteicos y secuencias de dna específicas que determinan los sitios de arranque de la síntesis del dna.

Diez años después del descubrimiento de la estructura del dna y poco después de sugerir los mecanismos de control de la expresión génica en procariontes (Jacob y Monod, 1961), Jacob y colaboradores propusieron el modelo del replicón (Jacob et al., 1964; Jacob, 1993); el cual trataba de explicar los mecanismos de regulación de la síntesis del dna en las bacterias.

En este modelo el replicón es una molécula circular de dna (como los cromosomas bacterianos) que contiene dos elementos específicos determinados genéticamente. El primero se expresa a partir de un gen estructural y es un componente que difunde y regula el inicio de la polimerización: el iniciador, el cual interactúa con el segundo elemento, que es una secuencia específica de nucleótidos en el dna que determina el sitio en el que comienza la síntesis: el replicador.

A pesar de que el modelo del replicón se planteó originalmente para comprender la síntesis del dna de las bacterias, pronto se extendió como posible mecanismo de la replicación de los eucariontes (Gilbert, 2004). De esta manera, se visualizó a cada cromosoma eucarionte como un conjunto de unidades de replicación (replicones), en cada uno de los cuales podría regularse el inicio de la polimerización a través de la interacción del iniciador y del replicador

## El replicón de la levadura

Poco después de la identificación de los elementos del replicón en bacterias se realizó el ensayo de replicación autónoma en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los organismos más estudiados como modelo de los eucariontes. Así, se obtuvo la clonación de secuencias autónomas replicantes (ars por sus siglas en inglés).

Las arss de la levadura se conforman por tres o cuatro repeticiones de una secuencia consenso acs y varios elementos "B". La secuencia acs es rica en a-t y consiste en 11 pb, mientras que los elementos b son secuencias conservadas que probablemente contribuyen al desenrollamiento de la doble hélice en el inicio de la replicación, al funcionar como secuencias de fácil desenrollamiento denominadas elementos due: dna Unwinding Element.

Se descubrió un complejo proteico que se une de manera específica a la secuencia acs y que fue denominado complejo de reconocimiento del origen de replicación, orc por sus siglas en inglés (Bell y Stillman, 1992). Además, se ha demostrado que el complejo orc se une preferentemente a secuencias que contienen orígenes de replicación (Lee y Bell, 1997). El orc es un hetero-hexámero compuesto por las proteínas Orc1- Orc6 e interactúa específicamente con los elementos acs y B de la levadura en una región de aproximadamente 30 pb. La unión del orc con el dna requiere al menos de las proteínas Orc1-Orc5 y aunque la Orc6 sólo parece requerirse durante la replicación; la interacción del orc con el dna permanece estable durante todo el ciclo celular.

A pesar de la evidente complejidad de la replicación en eucariontes, el descubrimiento del replicador de levadura (Struhl et al., 1979) y más tarde la identificación de su iniciador (Bell y Stillman, 1992) apoyaron la generalización del modelo no sólo a los eucariontes inferiores, sino a los vertebrados superiores con la expectativa incluso de llegar a comprender el mecanismo de duplicación del genoma humano.

## El replicón de los metazoarios

Al demostrar que las predicciones del modelo del replicón se cumplían en eucariontes inferiores, como la levadura, las investigaciones se enfocaron en la búsqueda del replicador y del iniciador de los metazoarios. Sin embargo, el ensayo de replicación autónoma no produjo los resultados esperados, ya que durante el desarrollo de *Drosophila melanogaster* existen múltiples orígenes de replicación que no dependen de secuencia específica (Blumenthal *et al.*, 1974); asimismo, los primeros experimentos realizados en ovocitos de *Xenopus laevis* demostraron que cualquier secuencia podría funcionar como origen de replicación, incluso secuencias de origen bacteriano. Más tarde se realizaron observaciones que iniciaron una controversia sobre la necesidad de secuencias específicas para el replicador metazoario.

Por un lado, se generaron evidencias que sugieren que la iniciación de la replicación ocurre en sitios específicos (Burhans *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1998); mientras que en otros ensayos se demostró que la replicación puede iniciar en cualquier sitio (Vaughn *et al.*, 1990; Dijkwel *et al.*, 2002). Debido a estas discrepancias, se ha propuesto que algunos de los métodos de mapeo son menos sensibles y únicamente detectan los sitios que se activan con mayor frecuencia (Gilbert, 2001; Dijkwel *et al.*, 2002; Gilbert, 2004).

#### El iniciador

A pesar de las dificultades para caracterizar el replicador de los metazoarios, parece que la estructura y función del iniciador están conservadas en todos los eucariontes (Bell y Dutta, 2002; Diffley y Labib, 2002). Se han encontrado homólogos del *orc* de levadura que son necesarios para la iniciación de la replicación en *X. laevis* (Romanowski *et al.*, 1996; Rowles *et al.*, 1996; Carpenter *et al.*, 1996), en *D. melanogaster* (Pflum y Botchman, 2001; Landis *et al.*, 1997; Chesnokov *et al.*, 1999) y en células de humano el homólogo del *orc* es necesario para la replicación del genoma de virus infecciosos (Dahr *et al.*, 2001).

En la levadura, además del *orc*, existen cerca de 20 proteínas involucradas en la regulación del inicio de la replicación y hasta ahora se han identificado homólogos para la mayoría de éstas en eucariontes superiores. Mediante mutaciones genéticas se ha demostrado que los homólogos son requeridos para iniciar la replicación en todos los eucariontes analizados (DePamphilis, 1998; 2003). No obstante, existen diferencias entre los metazoarios y la levadura: en *X. laevis* y en mamíferos el *orc* únicamente se asocia con el dna en G1 y es liberado de la cromatina en la mitosis.

#### La búsqueda del replicador metazoario

Al fallar el ensayo de replicación autónoma, surgió la necesidad de desarrollar nuevas herramientas para llevar a cabo el mapeo de los orígenes de replicación en metazoarios.

Una de las primeras técnicas utilizadas para detectar los sitios de arranque de la replicación fue la identificación del dna recién sintetizado en un locus de interés, asumiendo que el replicador debe estar cerca de estas regiones. Para ello, las células se cultivan en presencia de análogos radioactivos de nucleótidos, el dna purificado es digerido con enzimas de restricción y posteriormente se analiza por autoradiografía cuáles fragmentos incorporaron el marcaje. Al dar pequeños pulsos del nucleótido radioactivo en células sincronizadas es posible identificar las regiones de inicio de la replicación (Heintz y Hamlin, 1982; Dijkwel y Hamlin, 1996).

Más tarde surgieron diversas estrategias experimentales, entre las cuales una de las más utilizadas fue el mapeo de orígenes de replicación por electroforesis en dos dimensiones en agarosa.

#### **Replicadores en mamíferos**

A pesar de la intensa búsqueda del replicador de los metazoarios, hasta ahora sólo se han logrado caracterizar unos cuantos sitios de inicio de la replicación relativamente específicos. El locus del gen que codifica para la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) es uno de ellos y se ha estudiado en una cepa peculiar de las células CHO.

Uno de los sitios de inicio de la replicación más específicos, en cuanto a la longitud de la secuencia, identificados en metazoarios es el del locus de la lámina B2. El origen de replicación fue identificado en una región de 1.2 kb (Giacca *et al.*, 1994; Abdurashidova *et al.*, 2000) y es activo en líneas celulares de diferentes orígenes, así como en células primarias de humano (Kumar *et al.*, 1996). Además, se ha observado la interacción de este origen de replicación con proteínas que conforman el *orc* humano (Abdurashidova *et al.*, 2003); asimismo, la región de 1.2 kb puede

funcionar como replicador en otros sitios del genoma y parece contener varios elementos que en conjunto regulan el arranque de la síntesis del dna.

### **El contexto de la replicación**

El proceso de la replicación en los organismos vivos no ocurre como en el tubo de ensaye. Las bacterias tienen que replicar su cromosoma de una manera coordinada al crecimiento de la membrana y la pared celular para poder segregar el genoma duplicado de manera adecuada en la siguiente generación (Dingman, 1974; Jacob, 1993). En los eucariontes la replicación tiene lugar sobre un templado que está muy organizado en el interior del núcleo; más aun, la interacción del dna con el octámero de histonas debe removerse conforme avanza la polimerización, lo cual reduce notablemente la tasa de replicación. Además, el genoma de los eucariontes se replica siguiendo un patrón temporal regulado durante la fase S del ciclo celular; esta fase puede dividirse al menos en dos períodos, durante la primera mitad se replican las regiones ricas en genes que normalmente son regiones abiertas de la cromatina (eucromatina), mientras que la heterocromatina se replica en la fase S tardía (Berezney *et al.*, 2000; Woodfine *et al.*, 2004)

### **La replicación en los eucariontes**

Las primeras evidencias que indicaban que la polimerización del dna se lleva a cabo en sitios fijos provinieron de una línea de investigación diferente. Estudios de la década de 1940 mostraron la existencia de una estructura que aparentemente era la responsable de mantener la forma y el volumen nuclear (Zbarskii, 1998). Sin embargo, fue hasta 1974 que se denominó *matriz nuclear* (mn) a la estructura que se obtenía al lisar las células utilizando detergentes, sales y nucleasas (Berezney y Coffey, 1974). La mn está constituida por las láminas nucleares, complejos residuales del poro, una red interna de ribonucleoproteínas y el nucleolo residual (Berezney *et al.*, 1995; Nickerson, 2001).

En la replicación del virus de Epstein-Barr el *orc* humano que se une al origen de replicación del virus interactúa con la proteína viral *ebna1* (Schepers *et al.*, 2001). En *D. melanogaster* existe una asociación del *orc* con factores de transcripción *e2f* que parece requerirse para la replicación durante el desarrollo (Bosco *et al.*, 2001). Sin embargo, diversas evidencias sugieren que el número de sitios en los que se ensambla el pre-rc es mucho mayor que el número de orígenes de replicación que se activa en cada ciclo celular. En la levadura, muchas de las secuencias *ars* no se activan, o bien rara vez son utilizadas en diferentes ciclos celulares (Yamashita *et al.*, 1997; Friedman *et al.*, 1997). Asimismo, se han detectado pre-rcs en orígenes de replicación inactivos (Santocanale y Diffley, 1996).

En el caso de los mamíferos se ha observado que el ensamblaje del pre-rc en el dna no es suficiente para iniciar la replicación (Okuno *et al.*, 2001). Así, se ha planteado que existen más orígenes potenciales de replicación de los que se necesitan (Gilbert, 2001). Además, la replicación del dna en los embriones de *D. melanogaster* y *X. laevis* muestra que la iniciación de la polimerización puede llevarse a cabo independientemente de la secuencia.

### **Conclusion**

La replicación del material genético de los metazoarios requiere la subdivisión del genoma en subunidades estables e involucra la organización de la maquinaria de replicación en dominios funcionales dentro del núcleo celular. De acuerdo con las evidencias experimentales, se sugiere que la organización topológica del dna en forma de bucles anclados a la mn es el factor que establece las unidades de replicación de los metazoarios. De esta manera se propone un modelo del replicón metazoario en el cual el iniciador (*orc*) se une de manera inespecífica al dna, con cierta preferencia a secuencias ricas en *at* ubicadas en regiones con hiperenrollamiento negativo y así es relocalizado a regiones cercanas a los sitios de anclaje a la mn (*lars*) donde inicia la replicación de manera bidireccional. De esta manera, se propone que a diferencia de los procariontes en los metazoarios no existe un replicador que determine el sitio de inicio de la replicación.

Asimismo, se plantea que el establecimiento del tiempo de replicación depende del grado de condensación de la cromatina, el cual a su vez puede establecerse a partir de modificaciones epigenéticas preexistentes. Sin embargo, la validez del modelo depende del análisis de la replicación en conjunto con el establecimiento de los patrones de asociación del dna con la mn. Asimismo, el modelo parte de un patrón de organización preestablecido, por lo que surge la

incógnita de cómo es que se establecen los patrones diferenciales de organización de la cromatina que determinarían los sitios de inicio de la replicación, el tamaño de los replicones y el tiempo en el que se replica cada región del genoma