

RESUMEN

Estructura y función de la unidad fundamental de replicación del DNA

Hecho por:

Sofía Herran Silva

Tutor:

Miguel Ricaldi Culebro



RESUMEN

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.

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 estables durante todo el ciclo celular. Al comienzo de la fase G1 la proteína Cdc6 se asocia al *orc* y entonces recluta seis proteínas Mcm (proteínas de mantenimiento de minicromosomas). Posteriormente, Cdc6 es reemplazada por Cdc4 por medio de la actividad de la kinasa Cdk1/Ckb5 para formar el complejo de pre-replicación (pre-rc), que es activado por la kinasa Cdc7/Dbf4 para iniciar la replicación (DePamphilis, 1998; Bell y Dutta, 2002).

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 (Harland y Laskey, 1980; Mechali y Kearsey, 1984; Hyrien y Mechali, 1992; Mahbubani et al., 1992).

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).

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 (DePamphilis, 1993). Sin embargo, los resultados infructuosos en la búsqueda de *ars* parecían indicar de manera clara que el replicador de eucariontes superiores no depende de una secuencia particular y que la elección del sitio de arranque de la replicación es al azar.

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*. Estas células se han seleccionado por su resistencia al metotrexato, conferida por la amplificación de uno de los alelos de la *dhfr* que se conforma por 1 000 copias arregladas en tándem (Mildbrant et al., 1981; Dijkwel y Hamlin, 1996).

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 segregarse 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 aún, 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).

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).

A pesar de que el orc no muestra una preferencia por secuencias específicas, los esfuerzos por sostener el paradigma del replicón en su propuesta original han llevado a sugerir que son otras proteínas las que dirigen al orc a sitios definidos (Bell, 2002). Esto se ha fundamentado en algunas evidencias de proteínas que interactúan con el orc y que parecen tener influencia sobre la eficiencia del inicio de la replicación.

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.