

# Medicina Veterinaria y Zootecnia

*Materia:  
Bioquímica II*

*Tema:  
Unidad Fundamental Replicón*

*Profesor:  
DR. José Miguel Culebro Ricaldi*

*Alumno:  
Daniel Bezares Aguilar*

*15 de Febrero de 2021*

## 1. El modelo del replicón

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 colaboradores propusieron el modelo del replicón; 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.

El modelo del replicón, pronto se extendió como posible mecanismo de la replicación de los eucariontes. 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. Más tarde, se encontró que tanto el replicador como el iniciador están muy conservados entre los procariontes por lo que pronto comenzó la búsqueda del replicador e iniciador eucarionte. Así, además de observar múltiples sitios de arranque de la replicación (orígenes de replicación) a lo largo del dna extendido, se encontró que la duplicación del genoma eucarionte se lleva a cabo por horquillas de replicación adyacentes que progresan de manera bidireccional.

Los experimentos de autoradiografía revelaron que cada cromosoma eucarionte se duplica mediante el disparo de cientos a miles de orígenes de replicación y que el tamaño de los replicones de mamífero es muy heterogéneo, de 30 a 450 kilobases (kb) medido en la señal de autoradiografía del extremo de una horquilla a la otra. Además, se observó que normalmente replicones adyacentes muestran patrones similares de marcaje, lo que sugiere que las unidades de replicación de los eucariontes podrían estar organizadas en grupos y que cada agrupamiento dispara de manera sincronizada en tiempos particulares durante la fase s.

## 2. El replicón de la levadura

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). Los elementos ars, además de permitir la replicación de los plásmidos, dependen de secuencias específicas y funcionan como sitios de inicio de la síntesis del dna en su contexto nativo por lo que constituyen los replicadores de la levadura.

Una vez caracterizado el replicador de la levadura, las investigaciones se enfocaron en la identificación del iniciador. Así, se descubrió un complejo proteico que se une de manera específica a la secuencia ars 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.

A pesar de la evidente complejidad de la replicación en eucariontes, el descubrimiento del replicador de levadura y más tarde la identificación de su iniciador 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.

### 3. El replicón de los metazoarios

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; 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.

En el caso de los mamíferos se observó una escasa actividad de replicación en los plásmidos transfectados que era poco reproducible. Además, se observó que al integrarse el plásmido transfectado de manera estable en cromosomas endógenos la replicación puede iniciar de manera aleatoria dentro de la secuencia del plásmido. Estas evidencias sugieren que la determinación del sitio de inicio de la replicación en el genoma de los metazoarios no depende de secuencias específicas.

#### 3.1 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. Se han encontrado homólogos del *orc* de levadura que son necesarios para la iniciación de la replicación en *X*; y en células de humano el homólogo del *orc* es necesario para la replicación del genoma de virus infecciosos.

Por otro lado, se ha observado en todos los eucariontes que la iniciación de la replicación está restringida a una vez por origen de replicación y por ciclo celular. El control de replicación que evita que un origen se active más de una vez por ciclo celular depende de modificaciones en el *orc* que desestabilizan su interacción con el origen de replicación. En levaduras estas modificaciones consisten en la fosforilación del *orc* por medio de la actividad de la cinasa *Cdk1/Clb5*; además *Cdc6* es fosforilada al liberarse del pre-*rc* y posteriormente se ubiquitina y degrada. En *X. laevis* el ensamblaje del pre-*rc* libera al *orc* que es fosforilado y degradado. En mamíferos el *cdc6* fosforilado es exportado del núcleo durante la fase *S* y el *orc* es degradado después de su ubiquitinación (DePamphilis, 2003).

#### 3.2 La búsqueda del replicador metazoario

Con el surgimiento de nuevas herramientas de la biología molecular se han diseñado diversas técnicas para el mapeo de los orígenes de replicación, esto ha hecho mucho más sensible la detección; sin embargo, hasta ahora no se ha tenido éxito en la búsqueda del replicador de los metazoarios.

#### 3.3 Replicadores en mamíferos

Investigaciones más recientes han identificado orígenes de replicación en el locus del *c-myc* humano en una región de 2.4 kb. En vectores transitorios o integrados se ha observado que esta región funciona como replicador con múltiples sitios de inicio. Se ha propuesto que esta región está conformada por diversos elementos que cooperan para regular el inicio de la replicación. Hasta ahora se han descrito cerca de 20 orígenes de replicación en mamíferos y, aunque se ha demostrado que algunos de ellos pueden funcionar como replicadores, no se ha observado alguna secuencia consenso que los defina.

## 4. El contexto de la replicación

El proceso de la replicación en los organismos vivos no ocurre como en el tubo de ensayo. 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.

### 4.1. 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. Sin embargo, estudios posteriores indicaban que los orígenes de replicación no se unen preferencialmente a la mn (Ortega y DePamphilis, 1998). Más tarde, se demostró que los orígenes de replicación están en una región del bucle que se une a la mn en la fase G1 tardía y que es liberada después de la síntesis del dna. Una de las evidencias más notable que sugiere que la replicación tiene lugar en sitios fijos sobre la mn es el descubrimiento de las fábricas de replicación en el interior del núcleo.

Finalmente, evidencias experimentales con elementos de las fábricas de replicación fusionados a proteínas fluorescentes, demuestran que estos complejos se ensamblan y desensamblan durante la fase s. Más aun, se ha demostrado que las fábricas ensambladas sobre los focos de replicación se disocian al completar su duplicación. Posteriormente, los complejos proteicos se establecen de novo en focos de replicación adyacentes que disparan en tiempos posteriores durante la fase s.

## 5. Hacia un modelo del replicón metazoario

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. 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. 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.

Debido a que durante la duplicación del genoma existe un recambio incompleto del octámero de histonas (las nuevas cadenas se empaquetan con una mezcla de histonas recién sintetizadas e histonas viejas de las cadenas madre), las modificaciones de las histonas pueden heredarse fácilmente y la interacción del Orc2 con las proteínas de heterocromatina puede permitir la condensación inmediatamente después de la replicación. En el caso de la eucromatina, la ausencia de estas modificaciones de histonas puede permitir el ensamblaje del complejo Orc2-5, cuya función podría ser la de mantener la descondensación de la eucromatina al impedir la interacción del Orc2 con las proteínas de heterocromatina.