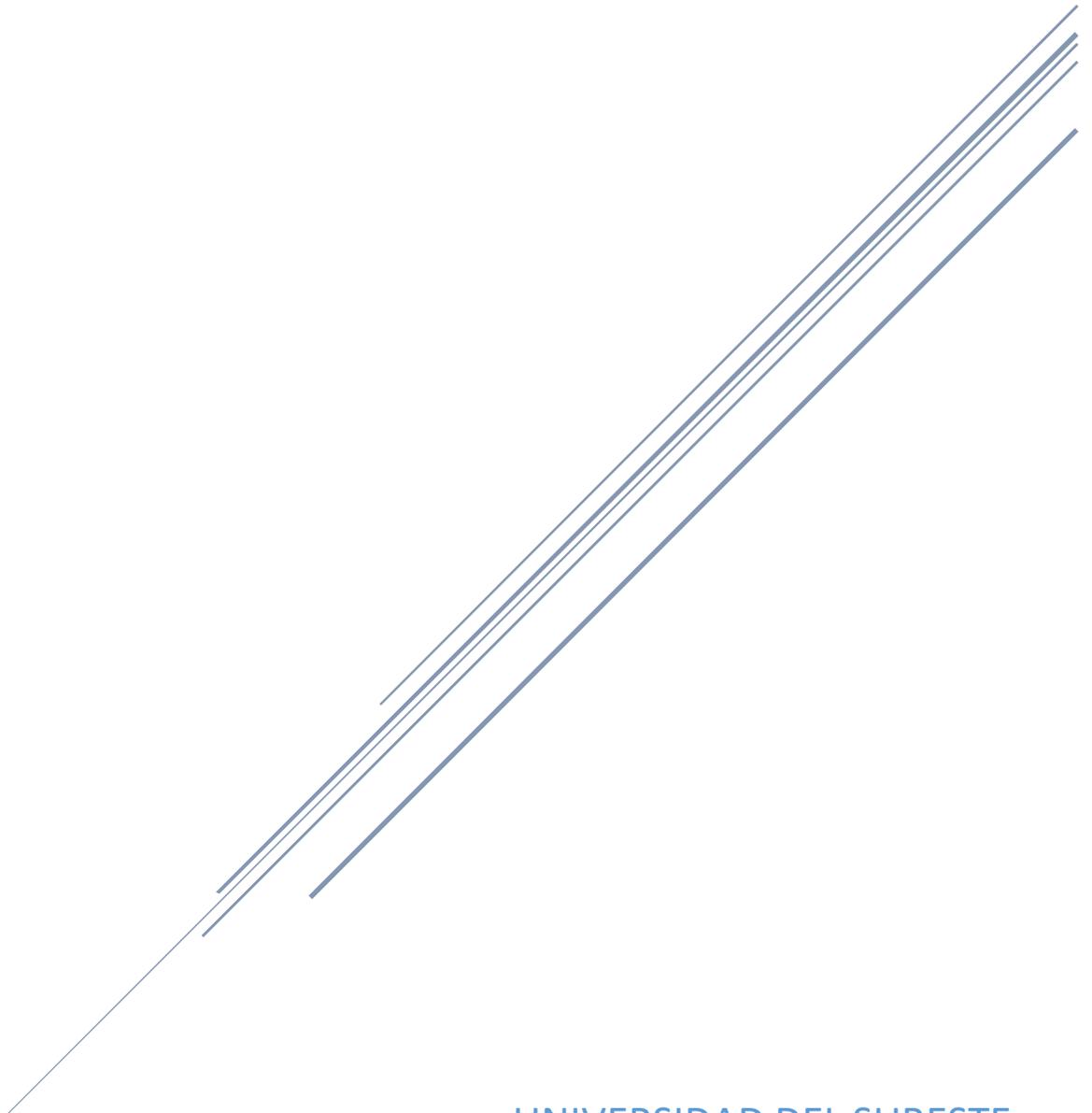


BIOLOGIA MOLECULAR

RESUMEN



UNIVERSIDAD DEL SURESTE
ITZEL JAQUELINE RAMOS MATAMBU

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

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. Con el propósito de comprender los mecanismos de duplicación del genoma en las bacterias se propuso el modelo del replicón. Este modelo plantea la existencia de unidades funcionales de replicación, las cuales están reguladas por elementos proteícos y secuencias de dna específicas que determinan los sitios de arranque de la síntesis del dna.

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). El valor heurístico del modelo se hizo evidente con el desarrollo de nuevas estrategias experimentales que permitieron la identificación en *Escherichia coli* de la secuencia de inicio de replicación OriC (Yasuda e Hirota, 1977) y de la proteína dnaA (Chakraborty et al., 1982) como replicador e iniciador, respectivamente, del cromosoma bacteriano. Las arss de la levadura se conforman por tres o cuatro repeticiones de una secuencia consenso acs (ars consensus sequence) y varios elementos "B". La secuencia acs es rica en a-t y consiste en 11 pb ([a/t] tttat [a/g] ttt [a/t]), 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. 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. Al comienzo de la fase G1 la proteína Cdc6 se asocia al orc y entonces recluta seis proteínas Mcm (proteínas de mantenimiento de minicromosomas).

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. laevis*. y en células de humano el homólogo del *orc* es necesario para la replicación del genoma de virus infecciosos.

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.

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 (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. 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 (de secuencia conocida), asumiendo que el replicador debe estar cerca de estas regiones.

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. 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, mientras que la heterocromatina se replica en la fase *S* tardía.

La replicación en los eucariontes

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. Al poco tiempo se demostró que la cromatina presenta un comportamiento helicoidal similar al de las moléculas circulares de *dna* (como los

cromosomas bacterianos y mitocondriales), es decir, que el dna humano está dividido en subunidades superenrolladas en forma de asas o bucles (Cook y Brazell, 1975; Cook y Brazell 1976). Este comportamiento sugirió que el dna está formando bucles anclados a la mn, lo que es consistente con las observaciones por microscopía de fluorescencia de nucleoides (mns extraídas sin el uso de nucleasas para conservar el dna). Al teñir estas estructuras con agentes intercalantes del dna los bucles se desenrollan formando halos fluorescentes que rodean a la mn.

Para determinar si los orígenes de replicación están anclados a la mn se realizó el marcaje del dna recién replicado en células sincronizadas y se analizó su asociación a la mn. Diversos experimentos en células distintas aportaron evidencias que sugieren que los orígenes de replicación permanecen unidos a la mn (Aelen et al., 1983; van der Velden et al., 1984; Dijkwel et al., 1986; Razin et al., 1986; Lagarkova et al., 1998). Por lo que se propuso que los lars son los orígenes de replicación de los metazoarios. 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. Además, al utilizar el ori-b de la dhfr que replica en la fase S temprana y el origen de replicación de la b-globina que se dispara en la fase S tardía (en células no-eritroides) se demostró que los orígenes se asocian con la mn antes de que inicien la replicación (fase G1 tardía) y se separan después de que se han activado (fase S temprana para el ori-b y S tardía para el origen de la b-globina) (Djeliova et al., 2001; Djeliova et al., 2001b).

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.