

DAÑO Y REPARACIÓN DEL ADN

Amanda Maestre MD, Esp, PhD¹, Pablo Javier Patiño MD, MSc, Dr. Sci²

¹Profesora Asistente, Grupo de Malaria

*²Profesor Asociado, Grupo Inmunodeficiencias Primarias, Corporación Biogénesis
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia*

Introducción

La supervivencia, tanto de una especie como de los organismos que hacen parte de ella, depende en gran medida de la transmisión precisa de la información genética de una célula a sus descendientes. Esto requiere no solo de extrema exactitud en la replicación del material genético y de la exacta distribución de los cromosomas, si no también de habilidad para reparar los daños del ADN con el fin de reducir al mínimo el número de mutaciones heredables y garantizar la supervivencia del organismo y de la especie.

El daño en la molécula de ADN es un evento común en la vida de una célula y es responsable de la aparición de mutaciones, que pueden desencadenar un crecimiento incontrolado o la muerte de la célula o del organismo. Cuando ocurre, el daño en el ADN desencadena una serie de respuestas celulares que tienen como objeto eliminar o corregir el daño o activar el proceso de muerte celular programada y de esta manera eliminar células con mutaciones potencialmente catastróficas. Estas respuestas al daño del ADN incluyen (Figura 1): a) eliminación del daño en el ADN y restauración de la continuidad de la doble hélice; b) activación de los puntos de control de daño del ADN, los cuales detienen el ciclo celular para permitir la reparación y prevenir la transmisión de un cromosoma dañado o parcialmente duplicado; c) respuesta transcripcional, la cual produce cambio en el perfil de

genes que se transcriben de manera que se expresan genes beneficiosos para la célula; y d) apoptosis, la cual elimina las células con daño severo.

Las mutaciones pueden ocurrir en cualquier célula, sin embargo, el efecto de ellas depende del tipo de célula afectada, la fase del ciclo de vida en el que se encuentre, el estado de desarrollo del organismo y, en el caso de organismos diploides, de la dominancia o no del alelo mutante. En organismos multicelulares, las mutaciones que ocurren en las células germinales, esto es, aquellas que formarán gametos, se denominan mutaciones germinales, mientras que las que ocurren en el resto de las células o sea las células somáticas, se denominan mutaciones somáticas. La importancia de las primeras radica en que solo éstas son heredadas de padres a hijos. Sin embargo, en organismos multicelulares carentes de una separación entre células somáticas y germinales, como es el caso de muchas plantas, las mutaciones que ocurren en cualquier célula pueden, potencialmente, ser heredadas a generaciones futuras. Pero los cambios en el ADN no siempre corresponden a mutaciones con un efecto deletéreo para la célula o el organismo, pues dependiendo de las circunstancias una mutación puede implicar una ventaja para el individuo al permitir una mejor adaptación a los cambios ambientales. Algunas mutaciones solo se expresan cuando se cumplen determinadas condiciones ambientales, por ejemplo, hay mutaciones termo-sensibles, lo que

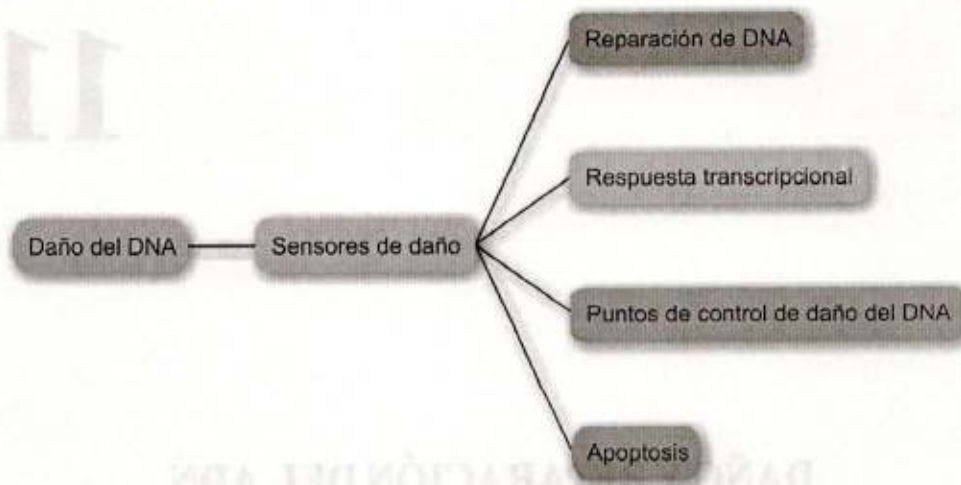


Figura 1. Cuando ocurre un daño en el ADN se presentan varias respuestas celulares que tienen como objeto eliminar o corregir el daño o activar el proceso de apoptosis, las cuales incluyen: a) eliminación del daño y reparación del ADN la continuidad de la doble hélice; b) inducción de la transcripción de genes necesarios para la respuesta al daño; c) activación de los puntos de control de daño del ADN, los cuales detienen el ciclo celular para permitir la reparación; y d) apoptosis para la eliminación de las células con daño severo.

significa que los efectos solo pueden ser evidentes con los cambios de temperatura. Esta situación se presenta, por ejemplo, en los gatos Siameses, que poseen una mutación en el gen denominado C, el cual codifica para la pigmentación oscura del pelo. El alelo *ch* de este gen es sensible al calor y resulta en la producción de pigmento a bajas temperaturas, por lo tanto en las extremidades se produce una mayor pigmentación debido a la menor temperatura de estas zonas del cuerpo, mientras que la temperatura del torso restringe la pigmentación.

Tipos de daño del ADN

Existe un número muy diverso de tipos de daño que afectan la molécula de ADN; estos daños pueden ser consecuencia de procesos celulares endógenos o producidos por mecanismos exógenos. En esta sección nos referiremos a los tipos de daño del ADN independientemente de su causa, pero dedicaremos un párrafo separado a los daños producidos por la radiación ya que estos tienen efectos muy particulares sobre el ADN.

Sustituciones de nucleótidos

La sustitución de un nucleótido por otro es una mutación puntual que constituye la forma más simple de daño de ADN. Las sustituciones pueden ser de dos tipos: **transición**, cuando una purina es reemplazada por otra purina ($A \rightarrow G$ o $G \rightarrow A$) o una pirimidina es reemplazada por otra ($C \rightarrow T$ o $T \rightarrow C$), y **transversión**, cuando una purina reemplaza una pirimidina o viceversa. Este último tipo de mutaciones puntuales generalmente son más drásticas, ya que ocurre entre bases químicamente más diferentes

entre sí, lo cual tiene mayor probabilidad de resultar en el cambio del aminoácido codificado originalmente. De otra parte, la mayoría de las transiciones que ocurren en la tercera posición de un codón no resultan en un cambio de aminoácido, esto se ha denominado sustituciones **silentes** ya que no modifican la secuencia de la respectiva proteína y por tanto no afectan el fenotipo. En forma similar, muchas mutaciones que ocurren en regiones no codificantes o en intrones, no tienen ningún efecto sobre el fenotipo del organismo. Sin embargo, mutaciones en secuencias no codificantes que actúan como promotores, potenciadores, señales de terminación de la transcripción o sitios de reconocimiento para el procesamiento del RNA, si pueden modificar efectos importantes sobre el fenotipo.

Las sustituciones de bases que resultan en un cambio en la secuencia que codifica un aminoácido se denominan mutaciones con sentido alterado. El ejemplo clásico de este fenómeno lo constituye la anemia de células falciformes, en donde una sustitución de un ácido glutámico por una valina en la secuencia del gen que codifica la hemoglobina da origen a alteraciones de los glóbulos rojos en las personas afectadas. En un porcentaje importante las sustituciones de nucleótidos cambian el codón de un aminoácido por un codón de finalización; éstas se denominan mutaciones sin sentido.

Inserciones y deleciones

Las deleciones o las inserciones de un solo nucleótido también se pueden considerar como mutaciones puntuales, y cuando afectan la región codificadora casi siempre

tienen efectos drásticos para el organismo pues producen un corrimiento en el marco de lectura del RNA mensajero. Otras deleciones o inserciones pequeñas de nucleótidos pueden resultar en la pérdida o adición de un aminoácido de una determinada proteína si el daño involucra un número de nucleótidos que sea múltiplo de tres. Si éste no es el caso, dichas modificaciones pueden resultar en un cambio en el marco de lectura por parte del RNAm. En general, el cambio del marco de lectura en el RNAm resulta en una proteína no funcional.

Rupturas

La naturaleza química de la molécula de ADN hace que esta molécula pueda sufrir rupturas, ya sea de una o de las dos cadenas. La ruptura de una de las cadenas generalmente se produce como consecuencia del proceso de reparación de otro daño sufrido por el ADN, y esta secuela es fácilmente reparada en la mayoría de los casos. Por su parte, la ruptura de las dos cadenas puede ser el resultado de la acumulación de bases oxidadas como ocurre con la exposición a altas dosis de radiación ionizante. Sin embargo, estas dosis elevadas de radiación también son capaces de generar rupturas de una o las dos cadenas en forma directa, sin necesidad de que haya daño de las bases. La falla en el proceso de reparación en forma rápida y precisa de las rupturas de las dos cadenas de ADN puede resultar en fragmentación, deleciones de grandes

fragmentos de ADN, así como en gran variedad de aberraciones cromosomales.

Daño producido por radiación ultravioleta

La luz ultravioleta puede producir una amplia gama de lesiones en el ADN, ya sea en forma primaria, esto es, directamente, o secundaria, por defecto en los mecanismos de reparación. De esta forma, la exposición a este rango del espectro de luz puede resultar en sustituciones de bases, ruptura de las cadenas, fragmentación, deleciones cromosomales, re-arreglos cromosomales y uniones proteína-ADN (esta última alteración se presenta solo en el daño secundario). La radiación UV produce, además, puentes covalentes entre residuos de pirimidina (generalmente timina) adyacentes, estos se denominan dímeros de pirimidina que resultan en distorsión de la conformación del ADN y en la inhibición de su replicación y transcripción (Figura 2).

Detección y reparación del daño del ADN

El ADN es uno de los componentes de la célula más susceptible al daño ambiental; como se ha mencionado, cuando el ADN es expuesto a radiación ionizante, su estructura sufre alteraciones. Las bases nitrogenadas también pueden alterarse por sustancias químicas, incluyendo aquellas resultantes del propio metabolismo celular. Si los cam-

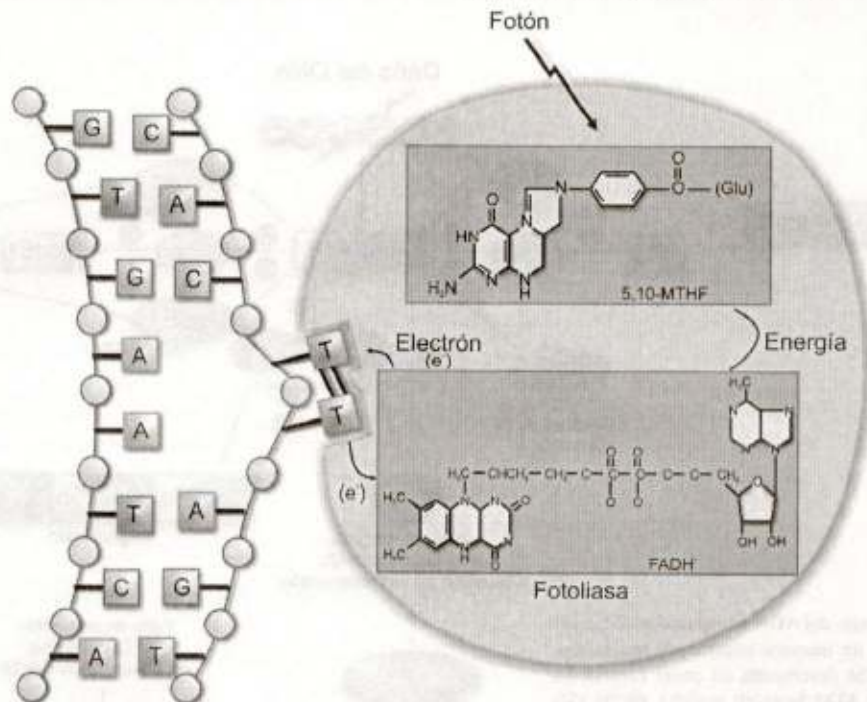


Figura 2. Entre los daños que produce la radiación UV en el ADN se encuentra la formación de puentes covalentes entre residuos de pirimidina (generalmente timina) adyacentes, formando los denominados dímeros de pirimidina que resultan en distorsión de la conformación del ADN, lo que conduce a inhibición la replicación y de la transcripción de genes. Este tipo de daño en *E.coli* es corregido por la fotoliasa, una enzima que usa energía lumínica para formar un estado excitado que corta el dímery en sus bases originales.

bios en la secuencia del ADN no se corrigen, tanto las células somáticas que están en crecimiento como las que no lo están, pueden acumular un número suficiente de mutaciones que desencadena la muerte o que altera su función. Adicionalmente, el ADN de las células germinales puede acumular mutaciones que hacen imposible la reproducción o dan origen a alteraciones en la descendencia. Por tanto, la corrección de los errores de secuencia del ADN en todos los tipos de células es esencial para la supervivencia de la célula, del organismo y de la especie. Esta respuesta al daño del ADN compromete diferentes fases, un número enorme de moléculas, así como distintos posibles resultados (Figura 3).

Un ejemplo claro de la importancia de estos mecanismos de reparación en los organismos multicelulares es el cáncer. Todos los agentes responsables de producir cáncer producen cambios en el ADN, ya sea por daño directo sobre el ADN o como consecuencia de alteración de la maquinaria de reparación que normalmente corrige los defectos o modificaciones que están ocurriendo permanentemente en dicha molécula.

En la tabla 1 se resumen los diferentes tipos de lesiones que afectan la estructura del ADN, los cuales tienen causas muy diversas, lo que implica que deben existir diferentes mecanismos de reparación que aseguren la permanencia de la información genética.

Tanto las células procariotes como las eucariotes poseen una variedad de enzimas que patrullan el ADN buscando alteraciones en esta molécula. En algunos casos el daño en el ADN puede ser reparado directamente, pero en términos generales se requiere que la sección de ADN dañada sea removida selectivamente (excisión).

La eficiencia en el proceso de reparación se debe fundamentalmente la ventaja que tiene el ADN al encontrarse en una estructura de cadena doble, de esta manera cada una de las cadenas posee la información necesaria para construir una cadena complementaria. Esto permite que si uno o más nucleótidos son removidos de una cadena, la otra sirve de molde para la reconstrucción de la otra.

Detección del daño en el ADN

La estabilidad genética en la célula depende de una variedad de funciones celulares interrelacionadas que se superponen entre sí; las más importantes corresponden a los diversos mecanismos de replicación, reparación y recombinación del ADN. Para asegurar la fidelidad durante estos eventos, se han desarrollado mecanismos de vigilancia que revisan el ADN en búsqueda de daños y en forma temporal suspenden la transcripción o la replicación, y coordinan la reparación y la progresión del ciclo celular. Este control genético en respuesta al daño celular fue descrito por primera vez en la vía SOS de

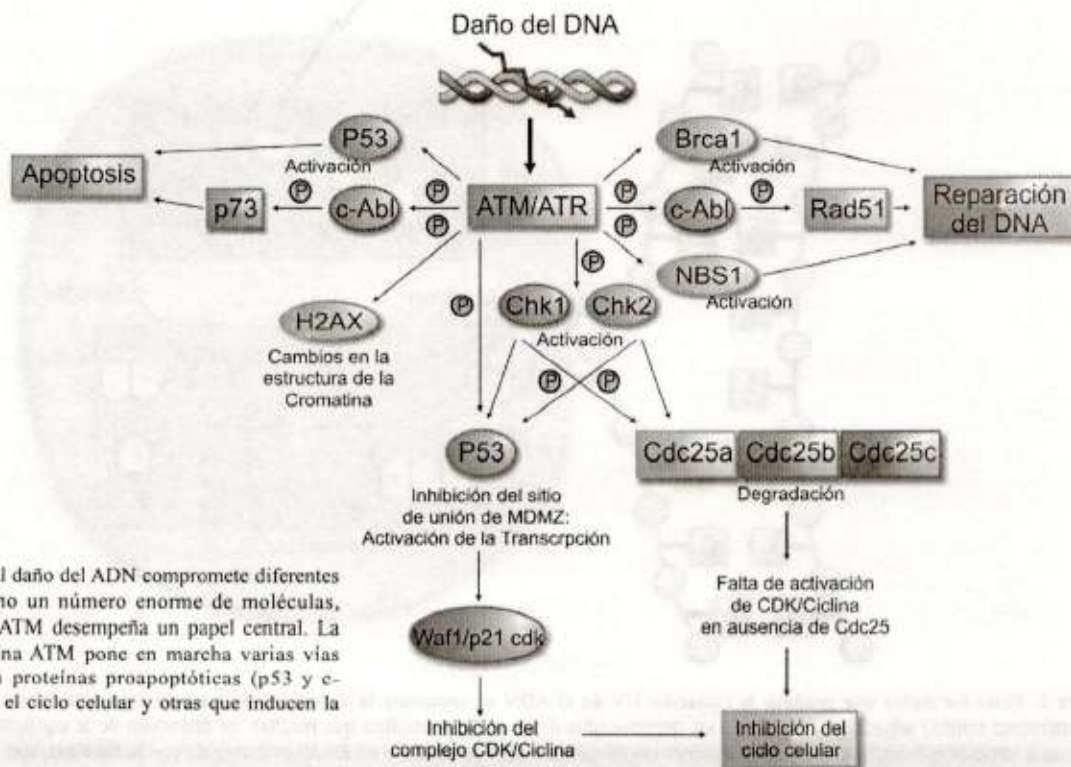


Figura 3. La respuesta al daño del ADN compromete diferentes vías celulares, así como un número enorme de moléculas, entre éstas la proteína ATM desempeña un papel central. La activación de la proteína ATM pone en marcha varias vías celulares que incluyen proteínas proapoptóticas (p53 y c-Abl), otras que inhiben el ciclo celular y otras que inducen la reparación celular.

Tabla 1. Lesiones del ADN que deben ser reparadas

| Lesión | Causa |
|--|--|
| Ausencia de una base | Remoción de purinas por calor y ácidos, remoción de bases alteradas (uracilo) por las glicosilasas. |
| Alteración de bases | Radiación ionizante, agentes alquilantes (etilmetanosulfonato) |
| Incorporación incorrecta de bases | Mutaciones que afectan la lectura de las bases incorrectas por la exonucleasa |
| Abultamiento debido a eliminación de una base o inserción de un nucleótido | Agentes que se intercalan (acridinas) y producen adición o pérdida de un nucleótido durante la recombinación o replicación |
| Unión de pirimidinas | Dímeros de ciclotubilo (usualmente dímeros de timidina) que resultan por irradiación UV |
| Rupturas de una o dos cadenas | Ruptura de uniones fosfodiéster por radiación ionizante o agentes químicos (bleomicina) |
| Cadenas cruzadas | Unión covalente de dos cadenas secundaria a agentes de alquilación bifuncional (mitomicina C) |
| Fragmentos de 3' desoxirribosa | Ruptura de la estructura de desoxirribosa por radicales libres que resulta en ruptura de las cadenas |

daño de ADN en *E. coli* y en células de mamíferos con el gen ataxia-telangiectasia mutado (ATM) (Figura 3). Inicialmente, estos puntos de vigilancia del daño del ADN fueron definidos como **vías reguladoras no esenciales**, las cuales controlan la capacidad de las células de parar el ciclo celular en respuesta al daño lo que permite tener tiempo para la reparación. Sin embargo, recientemente se pudo confirmar que adicionalmente controlan la activación de las vías de reparación del ADN, la composición de la cromatina telomérica, el movimiento de proteínas de reparación del ADN hacia sitios con daño, la activación de programas de transcripción, la longitud del telómero y, en algunos tipos de células, la apoptosis. Hay evidencia que confirma que muchos de los genes involucrados en este sistema de vigilancia son esenciales para la supervivencia de la célula y del organismo, lo que significa que estas rutas no son utilizadas ocasionalmente, si no que son componentes integrados y permanentemente activos en la fisiología celular.

Dos ejemplos importantes del papel esencial de estas rutas, son las proteínas codificadas por los genes supresores p53 y ATM. La expresión y la función de la p53 se activan por daños en el ADN, lo cual induce el inhibidor p21 cdk (*waf 1*) que a su vez media la detención del ciclo celular. Esta p53 también es considerada importante en

las vías de apoptosis. Cuando este gen se encuentra inactivado, como es el caso en cierto tipo de tumores, el organismo pierde una función importante que le permite la eliminación de células defectuosas y la regulación de la progresión del ciclo celular. De otro lado, la inactivación del producto del gen ATM, causa una enfermedad de carácter recesivo denominada síndrome ataxia telangiectasia, que se caracteriza por un elevado riesgo de cáncer, alteración del control motor por pérdida de células de Purkinje, inmunodeficiencia, hipersensibilidad a la radiación ionizante y defecto en la suspensión del ciclo celular ante el daño en el ADN. La proteína ATM desempeña un papel central en la respuesta al daño del ADN (Figura 3), y por lo tanto, las células que carecen de ella son incapaces de responder apropiadamente a inductores de daño en el ADN. Sin embargo, los defectos en estos pacientes no se limitan a una reparación defectuosa en respuesta a la exposición a agentes inductores de daño, ya que muchos de los defectos estructurales que ocurren en los cromosomas durante la replicación tampoco pueden ser reparados.

La respuesta al daño de ADN resulta en la activación de una serie de moléculas que incluyen detectores, traductores y efectores, lo que constituye una verdadera red de elementos que interactúan para ejecutar una respuesta adecuada (Figura 4). Los puntos de control de daño del

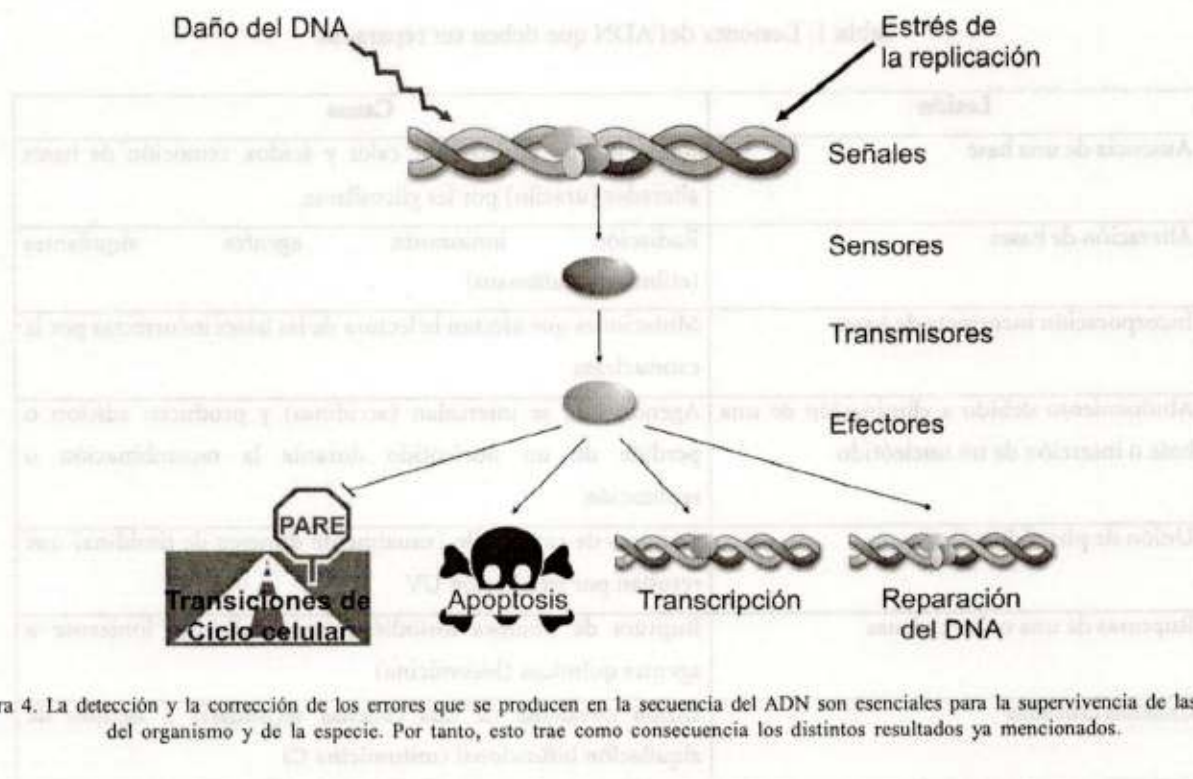


Figura 4. La detección y la corrección de los errores que se producen en la secuencia del ADN son esenciales para la supervivencia de las células, del organismo y de la especie. Por tanto, esto trae como consecuencia los distintos resultados ya mencionados.

ADN emplea una serie de proteínas denominadas **detectores** (sensores) tales como ATM, ATR, el complejo Rad17-RFC y el complejo 9-1-1, las cuales detectan el daño y activan la señalización subsecuente. Dicha señalización es transmitida por las cascadas de proteínas **traductoras** (transmisores), que incluyen dos familias de Ser/Thr quinazas de control (Chk, del inglés checkpoint kinases), Chk1 y Chk2 y sus homólogos. Otro grupo de estas traductoras está representado por proteínas con la secuencia repetida BRCT, entre las que se incluyen las Rad9 y Crb2 de levaduras, y sus posibles ortólogos en mamíferos; BRCA1 y 53BP1. A continuación en la ruta de respuesta al daño del ADN se encuentran las moléculas **efectoras** que ejecutan las funciones específicas. Estas incluyen sustratos de las quinazas PIK y CHK y de las proteínas involucradas en la reparación, en la regulación de la transcripción y en el control del ciclo celular como BRCA1, Nbs1, p53 y Cdc25C (Figura 3). La activación de estas proteínas tienen como consecuencia la inactivación de las quinazas dependientes de ciclinas de forma que se inhibe la progresión del ciclo celular de G1 a S (punto de control G1/S), la replicación del ADN (punto de control intra-S) o de G2 a mitosis (punto de control G2/M).

Reparación del ADN

El daño progresivo de la célula, generalmente como resultado de traumas por oxidación, radiación y químicos, se cree que es la principal causa de la aparición de tumo-

res, del proceso de senescencia y envejecimiento del organismo. Debido a que la molécula de ADN es el blanco de muchos de estos agentes nocivos, la reparación se convierte en un evento esencial para garantizar la integridad estructural del genoma. De esta manera los defectos en la reparación pueden resultar en la muerte de la célula o incluso del organismo.

Como se muestra en la tabla 1 existen diferentes tipos de lesiones que afectan la estructura del ADN, lo cual depende de una amplia diversidad de agentes causales. Esta variedad en el daño del ADN trae como consecuencia una amplia gama de mecanismos de reparación que se involucran para garantizar la permanencia y copia fiel de la información genética. Estos mecanismos incluyen reparación directa, reparación de bases por escisión, reparación mediante escisión de nucleótidos, reparación de ruptura de doble cadena, y reparación por entrecruzamiento.

Reparación directa

En la mayoría de los organismos existen dos mecanismos de reparación directa del ADN: la fotorreversión de dímeros de pirimidina inducidos por radiación UV mediante la fotoliasa (Figura 2) y la remoción del grupo O₆-metilo de la O₆-metilguanina (O₆MeGua) en el ADN por medio de la metilguanina ADN metiltransferasa. La fotoliasa está restringida a ciertos organismos, particularmente bacterias, mientras que la metilguanina ADN metiltransferasa presenta una distribución casi universal.

La fotoliasa repara los dímeros de pirimidina mediante el uso de fotones de luz azul como fuente de energía. Esta es una proteína monomérica de 55-65 kDa que tiene dos cofactores cromóforos: una pterina en forma de meteniltetrapiridrolato y una flavina en la forma FADH. El folato, que está ubicado en la superficie de la enzima funciona como una antena que absorbe la luz (350-450 nm) y transfiere la energía de excitación al FADH. El FADH excitado transfiere un electrón al dímero de pirimidina para generar un dímero radical que se divide en dos pirimidinas

La metilguanina ADN metiltransferasa es una proteína ubicua de 20 kDa. Al igual que la fotoliasa parece reconocer el daño del ADN por una interacción tridimensional, lo que le permite formar un complejo con el esqueleto de ADN en el sitio del daño. En este sitio introduce la O_6 MeGua en la cavidad de su sitio activo donde el grupo metilo se transfiere a una cisteína de la enzima. La proteína se disocia del ADN reparado, llevando consigo un enlace estable C-S de metilcisteína, lo cual hace que la enzima se inactive, por esta razón ésta se conoce como una enzima suicida. Se ha demostrado que los ratones que no tienen O_6 MeGua metiltransferasa son altamente susceptibles a la tumorigénesis por agentes alquilantes.

Reparación de bases mediante escisión

El método de reparación de ADN por escisión de bases (REB) es responsable de remover bases dañadas que son reconocidas específicamente por las glicosilasas del ADN. Las principales lesiones sometidas a este proceso son bases oxidadas que resultan dentro de la célula durante respuestas inflamatorias o como consecuencia de la exposición a agentes exógenos, entre los cuales se incluye la radiación ionizante y la luz ultravioleta. Otra fuente importante de lesiones que se reparan por este sistema es la modificación del ADN por agentes alquilantes carcinogénicos como las nitrosaminas, así como muchos medicamentos utilizados para el tratamiento del cáncer. Las lesiones que pueden ser reparadas por escisión de bases incluyen incorporación de un uracilo, presencia de pirimidinas fragmentadas, purinas alquiladas, dihidroguanidina, glicol timina, entre otras. La principal purina oxidada, 8-oxoG, es altamente mutagénica porque se une a adenina, mientras que las N-alquilpurinas son vulnerables a hidrólisis de la unión N-glicosil dando origen a sitios apurínicos/apirimidínicos (AP) que son muy frecuentes y altamente nocivos.

Los pasos necesarios para que se lleve a cabo este proceso de reparación son los siguientes (Figura 5):

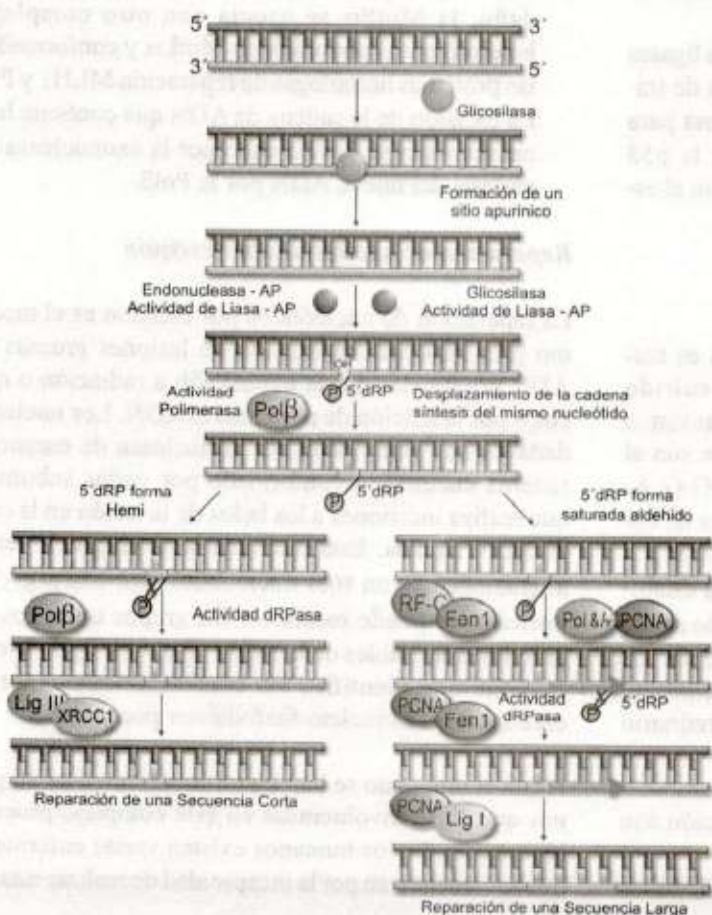


Figura 5. El método de reparación de ADN por escisión de bases (REB) es responsable de remover bases dañadas que son reconocidas específicamente por las glicosilasas del ADN. Este proceso puede realizar reparación de fragmentos tanto cortos como largos en el ADN (Ver el texto para los detalles).

1. Reconocimiento y remoción de la base. Este primer paso es llevado a cabo por acción de glicosilasas específicas de ADN que reconocen y remueven las bases dañadas o incorrectas mediante la hidrólisis de la unión N-glicosil, lo que da origen a sitios AP. En mamíferos se han descrito más de una decena de glicosilasas diferentes, cada una de ellas con especificidad de sustrato y modo de acción diferentes.
2. Inserción del nucleótido. La inserción del primer nucleótido es independiente de la estructura química del sitio AP. En el proceso que involucra la reparación de tramos cortos, el residuo resultante de la acción de la glicosilación, 5'-deoxirribosa-5-fosfato (5'dRP), es desplazado por la polimerasa β del ADN (Pol β), la cual inserta un solo nucleótido. La misma enzima se encarga de la inserción del primero de una serie de nucleótidos en casos de reparaciones más extensas.
3. Desplazamiento de la cadena y síntesis del ADN. En casos de reparaciones de solo una base, después de la inserción por la Pol β , la estructura del ADN es sellada directamente, pero se requieren varios pasos adicionales en casos de incorporación de más de una base, de tal modo que después de la disociación por Pol β hay desplazamiento de la cadena y síntesis de ADN adicional por las Pol ϵ , Pol γ y otras enzimas, lo que resulta en reparaciones de tramos de ADN de hasta 10 nucleótidos.
4. Ligación. Ese paso se ejecuta por la acción de las ligasas I y III; la primera es necesaria para la ligación de tramos largos mientras que la segunda es necesaria para la ligación de tramos cortos. En este punto, la p53 desempeña un papel importante en la regulación al estimular directamente la REB.

Reparación de bases únicas no apareadas

El sistema de reparación de bases no apareadas es responsable de la remoción de bases que han sufrido desaminación inducida o espontánea, oxidación o metilación. Las lesiones que más frecuentemente son el blanco de este proceso son la presencia de G-T, G-G, A-C y C-C. Adicionalmente la modificación química de bases es objeto de reparación mediante este proceso. La importancia del sistema en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la disminución del número de mutaciones se evidencia claramente por la severidad de los síndromes con déficit en esta forma de reparación del ADN, como por ejemplo el cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis.

Los pasos involucrados en esta forma de reparación son los siguientes:

1. Detección de las lesiones. El reconocimiento de bases

no apareadas o químicamente modificadas se lleva a cabo por el complejo denominado MutS α que se une al sitio de la lesión. MutS α está conformado por las proteínas homólogas MSH2 y MSH6 (o proteína ligadora de GT). El complejo MutS α se fosforila con el fin de unirse en forma eficiente al sitio de la lesión. Un complejo diferente denominado MutS β puede formarse por la unión de MSH2 con MSH3. Dependiendo de la proteína con la cual se asocian, los heterodímeros poseen especificidad para un sustrato diferente y en consecuencia presentan una acción diferente en la reparación. De tal forma que el complejo MutS α es capaz de unirse tanto a base-base no apareadas como a sitios no apareados resultantes de inserciones o deleciones, mientras que MutS β solo es capaz de hacerlo a estos últimos.

2. Discriminación de la cadena. Aunque no está completamente esclarecido cómo el sistema de reparación discrimina la cadena madre intacta, de la cadena hija que tiene el daño, se cree que el proceso ocurre como consecuencia de la activación de una endonucleasa denominada MutH. Cuando ésta es activada se corta transitoriamente la base no metilada de la cadena hija y se marca para su remoción. El papel de la unión e hidrólisis del ATP en este proceso parece ser crucial.
3. Escisión y reparación. Una vez que se une al sitio del daño, la MutS α se asocia con otro complejo de heterodímeros denominado MutL α y conformado por las proteínas homólogas de reparación MLH1 y PMS2. La escisión de la cadena de ADN que contiene la base no apareada se lleva a cabo por la exonucleasa I y la síntesis del nuevo ADN por la Pol δ .

Reparación de nucleótidos por escisión

La reparación de nucleótidos por escisión es el mecanismo principal para reparación de lesiones gruesas en el ADN producidas por la exposición a radiación o químicos o por la adición de proteínas al ADN. Los nucleótidos dañados son removidos por la nucleasa de escisión, un sistema enzimático conformado por varias subunidades que realiza incisiones a los lados de la lesión en la cadena de ADN dañada. Esta nucleasa también puede remover alteraciones de un solo nucleótidos. Sin embargo, dicha nucleasa no puede reconocer los grupos químicos específicos responsables de la lesión en el ADN, por lo cual se propone que identifica las conformaciones anormales creadas en el esqueleto fosfodiéster por el daño.

Hasta el momento se han identificado cerca de 30 proteínas que están involucradas en este complejo proceso de reparación. En los humanos existen varias enfermedades que se caracterizan por la incapacidad de realizar esta forma

de reparación, entre éstas están síndromes como xeroderma pigmentosum (XP), síndrome de Cockayne (CS), tricotiodistrofia (TTD) y síndrome de sensibilidad a la luz ultravioleta.

La reparación de nucleótidos por escisión se lleva a cabo por dos vías diferentes denominadas reparación genómica global y reparación ligada a la transcripción (Figura 6). La primera se considera independiente de la transcripción y es capaz de remover lesiones en regiones que no se transcriben o en cadenas no transcritas de regiones que se transcriben. Entre tanto, la reparación ligada a la transcripción remueve lesiones en la cadena de genes activos que bloquean la RNA polimerasa. La ruta de la reparación ligada a la transcripción ha sido delineada pero aún no se encuentra bien caracterizada. En contraste, la ruta de la reparación genómica global se comprende en forma más detallada e involucra los siguientes pasos:

1. Detección del daño del ADN. Los complejos de proteínas XPX-HR23B y RPA-XPA identifican la lesión. Cada uno reconoce diferentes tipos de daño.

2. Desenrollamiento del ADN. Después del reconocimiento de la lesión, el factor de transcripción TFIIH conformado por siete proteínas diferentes (XPB, XPD, GTF2H1, GTF2H2, GTF2H3, GTF2H4, CDK7, CCNH y MNAT1) es reclutado al sitio de la lesión. TFIIH posee actividad de helicasa mediante las subunidades XPB y XPD y es responsable del desenrollamiento del ADN alrededor de la lesión.

3. Escisión. Después de la formación de un complejo abierto, la escisión de la lesión se lleva a cabo en el extremo 3' por la proteína XPG, y en el extremo 5', por el complejo XPF-ERCC1. En los procariotes se forma un oligómero de 12-13 nucleótidos, mientras que en eucariotes es de 24-32 nucleótidos.

4. Reparación. El defecto en la cadena es reparado mediante la acción de Pol δ y Pol ϵ y es sellado por la ligasa I y otros factores.

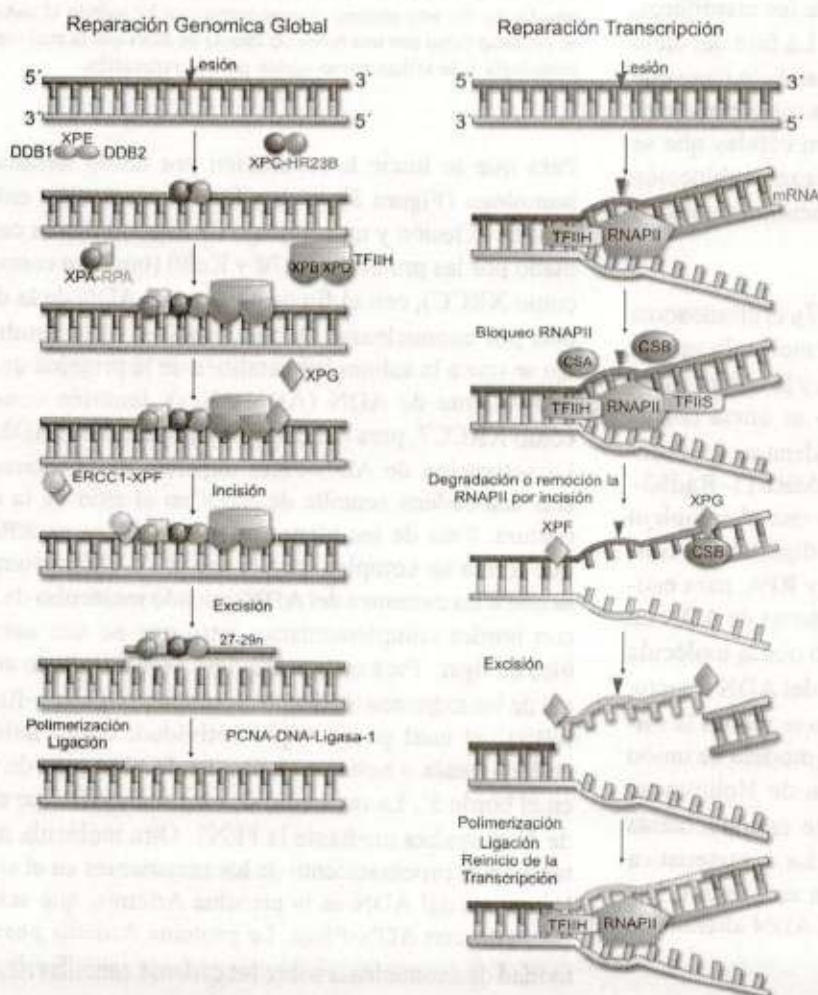


Figura 6. Durante la reparación de nucleótidos por escisión los nucleótidos dañados son removidos por una nucleasa de escisión, la cual introduce cortes a ambos lados de la lesión en la cadena de ADN dañada. Este mecanismo de reparación se puede realizar por dos vías diferentes: reparación genómica global y reparación ligada a la transcripción. La primera se independiente de la transcripción y es capaz de remover lesiones en regiones que no se transcriben, mientras la reparación ligada a la transcripción remueve lesiones en la cadena de genes activos que bloquean la RNA polimerasa.

Reparación de rupturas de la doble cadena y reparación recombinacional

Las rupturas de la doble hélice del ADN se pueden producir por especies reactivas de oxígeno, radiación ionizante y por agentes químicos que generan especies reactivas de oxígeno. En los vertebrados, las rupturas de doble cadena también son el resultado del proceso de recombinación de las regiones V(D)J de las inmunoglobulinas y de los receptores de los linfocitos T. También se pueden presentar de forma anormal como consecuencia de un fallo en la horquilla de replicación del ADN. Las rupturas de la doble cadena de ADN poseen gran efecto genotóxico, pues pueden desencadenar intercambios cromosomales y muerte celular. Una sola ruptura de la doble cadena es capaz de desencadenar apoptosis en ciertas células eucarióticas.

Hay dos rutas principales de reparación de este tipo de lesiones: la recombinación homóloga y la unión terminal no homóloga. En general, se considera que la primera ruta, más frecuentemente utilizada en los eucariotes, resulta en alta fidelidad en la reparación, mientras que la segunda, que predomina en las células de los mamíferos, corrige pero con un alto índice de error. La fase del ciclo en el que se encuentra la célula afectada también tiene que ver con la utilización de alguna de las dos rutas, por ejemplo la unión no homóloga predomina en células que se encuentran en fases G0/G1, entretanto, la recombinación homóloga ocurre en células que se encuentran en fase S tardía o en G2.

Durante la reparación homóloga (Figura 7), el cromosoma dañado entra en contacto físico con una molécula intacta de ADN con la cual comparte homología y la utiliza como molde para la reparación. Este proceso se inicia con la resección de nucleótidos de la doble cadena en la dirección 5'-3' por el complejo de proteínas MRE11-Rad50-NBS1. La cadena de ADN resultante se une al complejo de proteínas Rad52 que lo protege de la digestión. A continuación Rad 52 interactúa con Rad51 y RPA, para estimular la actividad de intercambio de cadenas de ADN en un proceso dependiente de ATP, de modo que la molécula dañada de ADN invade la doble cadena del ADN intacto, desplazando una de estas cadenas. Luego se realiza la síntesis de ADN y la ligación, siguiendo el modelo de unión de Holliday. Finalmente, esta estructura de Holliday se resuelve en dos doble hélices mediante endonucleasas específicas de estructura (resolvasas). La característica distintiva de este tipo de recombinación es que la información que se pierde en la molécula de ADN alterada se recupera de la molécula homóloga.

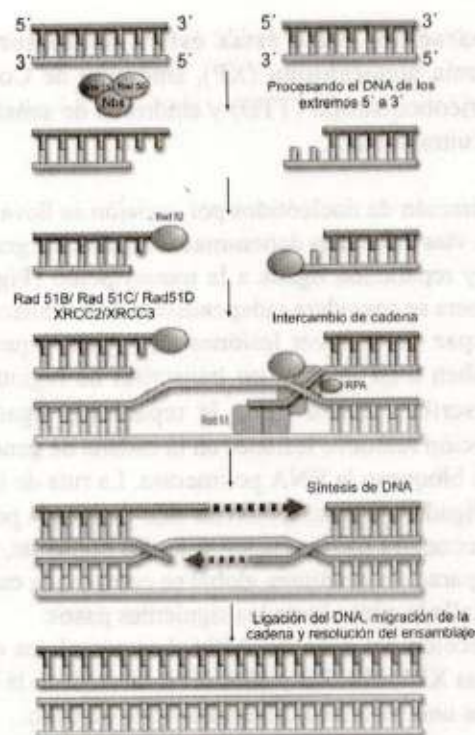


Figura 7. Las rupturas de la doble hélice del ADN pueden repararse mediante el mecanismo de reparación homóloga que se presenta en esta figura. En este proceso el cromosoma que ha sufrido el daño entra en contacto físico con una molécula intacta de ADN con la cual comparte homología y la utiliza como molde para la reparación.

Para que se inicie la reparación por unión terminal no homóloga (Figura 8) se requiere la asociación entre el sitio de la lesión y un complejo de heterodímeros conformado por las proteínas Ku70 y Ku80 (también conocidas como XRCC), con el fin de proteger al ADN de la digestión por exonucleasas. A continuación, el heterodímero Ku se une a la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PKcs), también conocida como XRCC7, para dar origen a la holoenzima ADN-PK. La activación de ADN-PKcs depende de la interacción con una cadena sencilla de ADN en el sitio de la doble ruptura. Uno de los blancos de ADN-PKcs es XRCC4, que forma un complejo con la ligasa IV. Dicho complejo se une a los extremos del ADN uniendo moléculas de ADN con bordes complementarios pero que no son susceptibles de ligar. Para esto se requiere procesamiento adicional de los extremos mediante el complejo MRE11-Rad50-NBS1, el cual posee triple actividad: como helicasa, endonucleasa y helicasa, removiendo el exceso de ADN en el borde 3'. La remoción de exceso de ADN en el borde 5' se realiza mediante la FEN1. Otra molécula importante en el procesamiento de los remanentes en el sitio de la ruptura del ADN es la proteína Artemis, que actúa en conjunto con ADN-PKcs. La proteína Artemis posee actividad de exonucleasa sobre las cadenas sencillas de ADN,

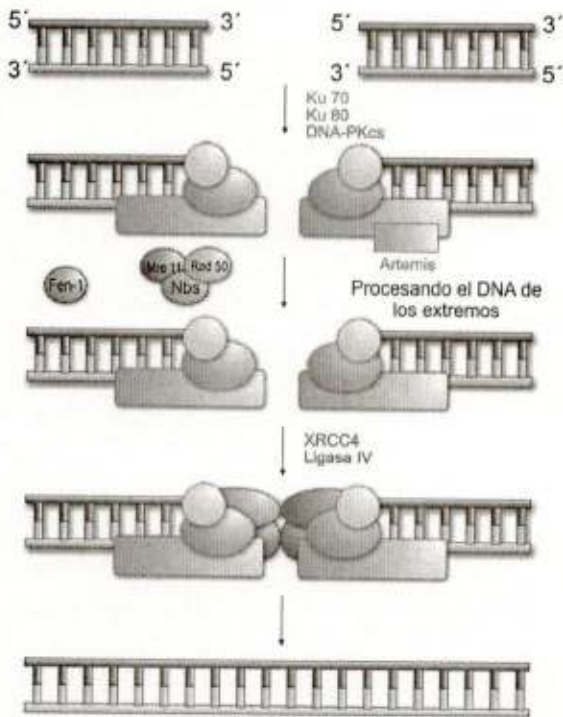


Figura 8. Otro mecanismo para la reparación de rupturas en el ADN es la reparación por unión terminal no homóloga. Para este proceso se requiere la asociación entre el sitio de la lesión y una serie de proteínas que incluyen Ku70 y Ku80, la proteína Artemis, una proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK), XRCC4, y la ligasa IV.

después de ser fosforilada adquiere actividad de endonucleasa y es capaz de degradar también horquillas de ADN, lo que es esencial para el procesamiento durante la reparación no homóloga. Este mecanismo de reparación es esencial para la recombinación V(D)J y parece ser la principal vía de reparación de los quiebres de ADN inducidos por radiación ionizante.

Reparación de entrecruzamiento

Muchos agentes químicos inducen entrecruzamiento de las cadenas de ADN. En *E. coli* y en *Saccharomyces cerevisiae* los sistemas de reparación de nucleótidos por escisión y de recombinación homóloga trabajan de forma coordinada para eliminar estos entrecruzamientos. En los humanos no se sabe si la reparación por escisión de nucleótidos es importante para la reparación del entrecruzamiento del ADN, sin embargo, existen evidencias que indican que la nucleasa XPF•ERCC1 es necesaria para la reparación de este tipo de daño del ADN.

Conclusión

En el presente capítulo hemos revisado los distintos tipos de daño del ADN, así como los principales mecanismos moleculares que permiten la reparación de esta molécula. Sin embargo, es importante resaltar que dicha reparación es solo un aspecto de la respuesta al daño del ADN, pues la célula pone en marcha diferentes vías bioquímicas que constituyen un panorama mucho más amplio que apenas está siendo comprendido. Primero, las enzimas de reparación del ADN reconocen y eliminan el daño. Segundo, el daño del ADN activa los puntos de control de daño del genoma, lo cual suspende la progresión del ciclo celular. Tercero, el daño del ADN activa la transcripción de ciertos genes, que en general se consideran importantes para la supervivencia de la célula. Finalmente, en los organismos metazoarios, puede activarse la muerte celular programada en respuesta al daño del ADN de manera que se eliminen las células que han sufrido un daño irreversible o peligroso para el individuo.

