

Premio Nobel en Química 2015 Mecanismos de reparación del ADN, desde las bacterias a los tumores

*"Men work together," I told him from the heart,
"Whether they work together or apart"*

Robert Frost

El genoma codifica la información necesaria para crear un organismo y cada célula que se divide replica su genoma por completo para transmitir esa información a sus células hijas. El proceso tiene ocasionales errores que se van acumulando en el tiempo y si bien la mayoría de las veces permanecen silenciosos, algunos generan cambios funcionales que, al expresarse, pueden ocasionar un amplio espectro de manifestaciones: desde graves enfermedades hasta mejoras evolutivas en generaciones futuras.

Para poner en perspectiva el problema debemos considerar que el tamaño del genoma humano (más de tres mil millones de pares de bases de ADN) y el gran número de células en un cuerpo humano (aproximadamente 37 billones) hacen que la probabilidad de que ocurra un error en cada replicación sea tan alta que casi ninguna célula hija sea similar a su progenitora. Si a ello le sumamos que las macromoléculas de ADN son químicamente inestables en el tiempo, aun en condiciones fisiológicas, una enorme cantidad de errores se acumularán inevitablemente durante el tiempo de vida de un individuo¹. La inestabilidad inherente del ADN constituye así tanto una oportunidad como una amenaza. Lesiones del ADN pueden bloquear importantes procesos celulares como la replicación y la transcripción, causando inestabilidad genómica y alteración de la expresión génica *per se*. Potenciales agentes mutagénicos externos (radiación y productos químicos) e internos (productos fisiológicos de reacciones de hidrólisis y oxidación) estimulan aún más la generación de daño en el ADN. Este potencial daño al material genético representa una amenaza y, para contrarrestarla, las células han desarrollado una serie de intrincadas vías de reparación. Esto ocurrió muy temprano en la filogenia, por lo que -con algunas modificaciones y con diferente complejidad- casi todos los organismos las poseen¹.

Hoy entendemos los mecanismos moleculares de estas vías debido a los pioneros estudios del médico y biólogo sueco Tomas Robert Lindahl, el bioquímico estadounidense Paul Lawrence Modrich y el bioquímico y biólogo molecular turco Aziz Sançar. Sus trabajos dilucidaron las vías primordiales de reparación del ADN que los hizo merecedores del Premio Nobel en química en 2015.

Lindahl (nacido en 1938) demostró en los años 70 que el ADN es una molécula inherentemente inestable que decae en el tiempo, incluso bajo condiciones fisiológicas normales, por reacciones químicas como oxidación, desaminación hidrolítica y metilación no enzimática que modifican sus bases y, como consecuencia, aumentan el riesgo de mutaciones. Utilizó el término *DNA decay* (descomposición) para describir estos procesos y mostró que, en condiciones fisiológicas, sufre depurinación hidrolítica espontánea estimulando la escisión de las cadenas de ADN². Tal vez su más fascinante descubrimiento fue la formación de uracilo por la desaminación espontánea de citosina. Este proceso es altamente mutagénico ya que el uracilo (base nitrogenada que reemplaza a la timina en el ARN) se aparea complementariamente con adenina, por lo que la desaminación de citosina cambia la codificación del material genético, que se basa en la complementariedad de citosina-guanina y adenina-timina (memorizadas

como Carlos-Gardel y Aníbal-Troilo, respectivamente). Así, los codones que contengan citosina serán “leídos” y “heredados” durante la transcripción y replicación como si fueran una timina. Sobre la base de esa observación, Lindahl conjeturó que debía existir una vía enzimática para este y otros tipos de lesiones. En su clásico estudio, identificó la enzima uracil-ADN glicosilasa en la bacteria *Escherichia coli*³, miembro fundador de la gran familia de proteínas que orquestan la reparación por escisión de nucleótido (REN), y delineó sus conceptos básicos. El proceso se inicia cuando la glicosilasa reconoce y escinde hidrolíticamente el glicosilo de un nucleótido dañado (Fig.1A). Una vez identificado, la uracil-ADN glicosilasa corta la hebra, escinde el nucleótido anormal y, a menudo, permanece unida al sitio abásico hasta ser sustituida por la siguiente enzima en el ciclo de reacción, la endonucleasa apurínica/apirimidínica, que escinde la cadena principal de ADN. Por último, la ADN-polimerasa β llena el vacío con la base correcta y la une a la cadena de ADN.

Sin embargo, desde mediados del siglo XX se sabía que el ADN se «rompía» debido a radiaciones, como las producidas por los rayos ultravioletas (UV), causando muerte celular y, también, que se «curaba» por la exposición a la luz visible con la consecuente recuperación de la viabilidad. Este primer mecanismo de reparación del ADN por el cual la enzima fotoliasa corrige los daños del ADN producidos por los UV, al ser dependiente de la presencia de luz, se lo llamó fotorreactivación. En 1978, Aziz Sancar (nacido en 1946) caracterizó el gen de la fotoliasa y su producto proteico *in vivo*, además de describir un mecanismo de corrección de mutaciones luego de la irradiación con UV independiente de la luz. A su vez, desarrolló una técnica por la cual identificó las proteínas implicadas y reconstruyó los pasos esenciales de la REN en *E. coli*. En resumen, la REN se inicia cuando un heterotrímero de dos UvrA y una UvrB localiza el daño del ADN y se sitúa sobre el mismo, desplegando y desenrollando parcialmente el ADN por un mecanismo dependiente de ATP. Las UvrAs se liberan

del complejo UvrB-ADN para que se una UvrC, activando a UvrB para escindir el oligómero de 12-13 nucleótidos que contiene la mutación. El oligómero es luego liberado por la helicasa UvrD para que, simultáneamente, la ADN-polimerasa I complete la cadena y se aparee con la cadena sana en perfecta complementariedad⁴ (Fig.1B). En la actualidad, sabemos que existen numerosos tipos de lesiones que interfieren con el normal apareamiento de bases que distorsionan la estructura helicoidal del ADN que REN reconoce y corrige por su mecanismo de “corte y pegue”. En células de mamífero, los procesos de reconocimiento de daños, incisión bilateral de la lesión, eliminación del oligómero dañado y resíntesis de la cadena son muy similares a los descritos en las bacterias. Sin embargo, las proteínas responsables son distintas; por ejemplo, la función de UvrA, UvrB y UvrC en el mecanismo descrito para la *E. coli* en el párrafo anterior es desarrollada por al menos quince proteínas en el humano⁵.

Como se señaló anteriormente, la maquinaria de replicación del ADN no está libre de errores. Siempre existe la posibilidad de introducir un nucleótido incorrecto durante la síntesis de una nueva cadena

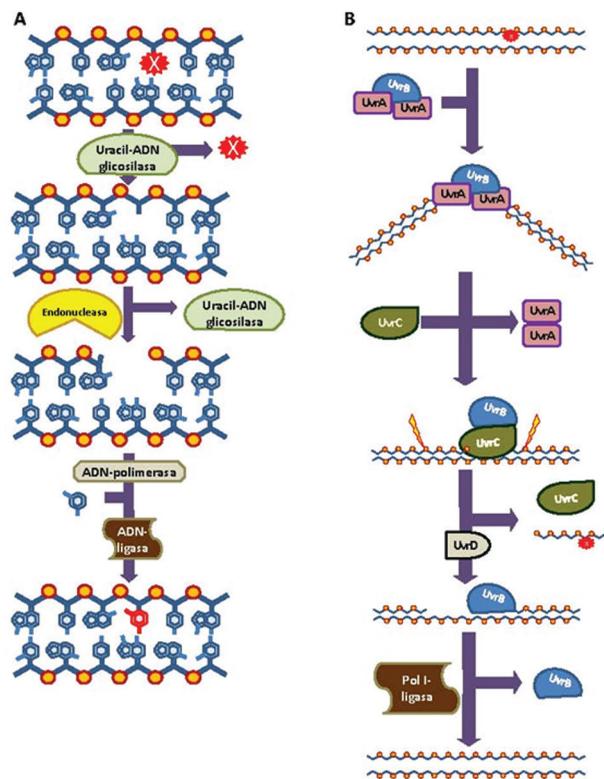


Fig. 1.– Mecanismos de escisión de nucleótidos. Reparación de nucleótido único mediante uracil-ADN glicosilasa (A) y por reemplazo de fragmentos largos (B).

con un apareamiento de bases *no-Watson & Crick* (diferente a las duplas adenina-timina y citosina-guanina) que distorsiona la hélice de la doble cadena y presenta la capacidad de cambiar la secuencia. Este tipo de error se conoce como *mismatch* o “mal apareamiento” de bases. Como primera línea de defensa, las ADN polimerasas con su actividad exonucleasa les permite corregir la cadena en síntesis mediante la escisión *ipso facto* del nucleótido incorrecto.

Sin embargo, algunos pares de bases *no-Watson & Crick* pueden subsistir y para corregirlos se utiliza el mecanismo de reparación de mal apareamiento de bases (RMA) con disminución en aproximadamente tres órdenes de magnitud en la tasa de mutación. Robert Wagner y Matthew Meselson propusieron que las bases mal apareadas son reparadas por un mecanismo dirigido hacia una hebra en especial, que permite la reparación de fragmentos largos de ADN durante su síntesis⁶. Paul Modrich (nacido en 1946) demostró que la reparación de bases mal apareadas se dirigía hacia la cadena recién sintetizada por no estar metilada; que mutaciones en los genes involucrados en la maquinaria (*mutH*, *mutL*, *mutS* y *uvrD*) impedían la correcta reparación e identificó sus componentes en *E. coli*, generando un modelo *in vitro* con el cual describió el proceso *in vivo*⁷. La enzima MutS, eje del complejo RMA, reconoce y se une al par de bases mal apareadas, mientras que MutH identifica a la hebra naciente. Luego, MutL se incorpora como mediador entre ambas para que MutS active la función endonucleasa de MutH y corte dicha hebra. El siguiente paso es la separación de las cadenas mediante la helicasa UvrD para clivar “río abajo” del sitio del error y liberar el fragmento que lo contiene.

Finalmente, la ADN polimerasa III resintetiza el fragmento utilizando la cadena madre como template (Fig. 2). Los componentes involucrados se encuentran conservados evolutivamente y, si bien en los mamíferos este mecanismo juega el mismo rol que en *E. coli*, el reconocimiento de la hebra naciente pareciera no depender del estado de metilación. En humanos es especialmente importante debido a que alteraciones en los componentes de esta vía causan cáncer colorrectal hereditario.

En este número de MEDICINA, Cajal y col. comunican un caso de síndrome cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis o síndrome de Lynch tipo II. Para conocer la causa genética que lo originó se analizaron los genes que codifican para homólogos de los componentes de la RMA de *E. coli* MutL (*MLH1* y *PMS2*), de MutS (*MSH2* y *MSH6*) y de una endonucleasa específica (*MUTYH*) en humanos. El hallazgo de la mutación c.2252_2253delAA en el gen *MLH1*, que participa como mediador entre mutS y MutH en el clivado de la cadena portadora de la base mal apareada, les permitió correlacionar el genotipo con el fenotipo hallado y discutir el posible efecto fundador de dicha mutación⁸. Esta contribución a la clínica, y otras que surgirán en el tiempo, se encuentran fundadas en mecanismos básicos que

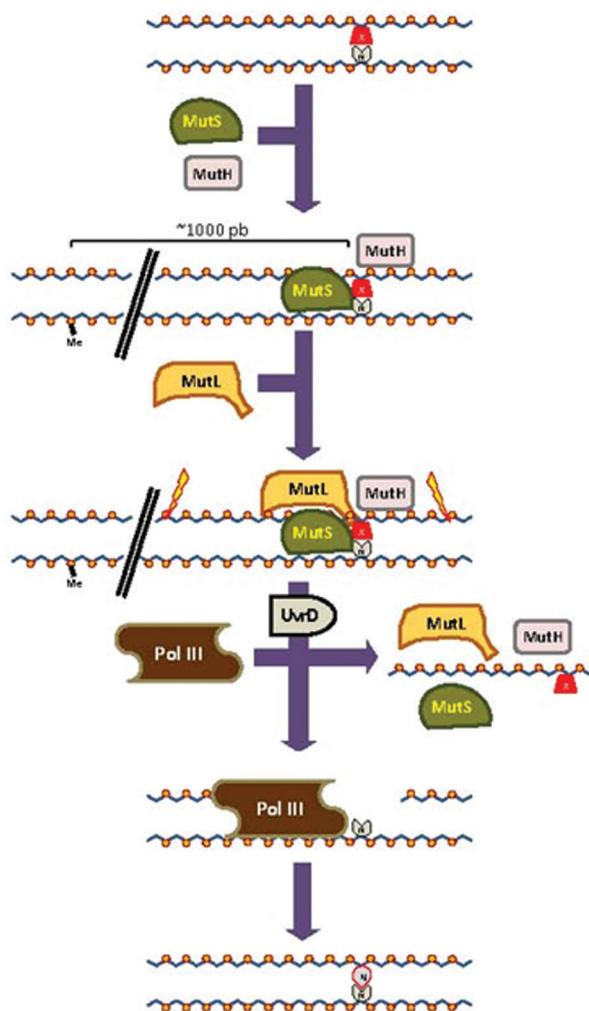


Fig. 2.- Mecanismo de reparación de nucleótidos mal apareados.

estos tres investigadores estudiaron en bacterias y sus extractos, un buen ejemplo de la importancia del flujo bidireccional del conocimiento entre las ciencias básicas y clínicas. Nos recuerda, como actores del ámbito científico, el compromiso de la constante interrelación como herramienta para favorecer el desarrollo de la llamada "medicina traslacional".

Pablo J. Azurmendi

Laboratorio de Nefrología Experimental y Bioquímica Molecular,
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Buenos Aires, Argentina
e-mail: azurmendi.pablo@lanari.fmed.uba.ar

1. Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2015. Mechanistic studies of DNA repair. Compiled by the Class for Chemistry of the Royal Swedish Academy of Sciences. En: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2015/advanced-chemistry_prize2015.pdf; consultado el 16/3/2016.
2. Lindahl T, Andersson A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1972; 11: 3618-23.
3. Lindahl T. An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci* 1974; 71: 3649-53.
4. Husain I, Van Houten B, Thomas DC, Abdel-Monem M, Sancar A. Effect of DNA polymerase I and DNA helicase II on the turnover rate of UvrABC excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 6774-8.
5. Petit C, Sancar A. Nucleotide excision repair: from E. coli to man. *Biochimie* 1999; 81: 15-25.
6. Wagner R, Meselson M. Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 4135-9.
7. Lahue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science* 1989; 245: 160-4.
8. Cajal AR, Piñero TA, Verzura A, et al. Mutación fundadora en síndrome de Lynch. A propósito de un caso. *Medicina (B Aires)* 2016; 76: 180-2.

130. Hacer, y hacer parecer. Las cosas no pasan por lo que son, sino por lo que parecen: valer, y saberlo mostrar, es valer dos veces; lo que no se ve es como si no fuese, no tiene su veneración la razón mínima, donde no tiene cara de tal; son muchos mas los engañados, que los advertidos, prevalece el engaño, y júzganse las cosas por fuera; hay cosas que son muy otras de lo que parecen; la buena exterioridad es la mejor recomendación de la perfección interior.

[Baltasar] Lorenzo Gracián (1601-1658)

Oráculo Manual y Arte de Prudencia (1647). Impresión facsimilar de la edición príncipe (Huesca), por Jorge M. Furt. Buenos Aires: Coni, 1958. Con ligeras modificaciones ortográficas.