

Reparación del ADN

Emilio Rojas, Regina Montero, Luis A. Herrera, Ma. Eugenia Gonsebatt y Patricia Ostrosky-Wegman
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

(Recibido, mayo 4, 1993; aceptado, agosto 31, 1993)

El ADN es la molécula encargada de almacenar la información genética que codifica las funciones celulares que se han dado durante el curso de la evolución por la selección natural¹. Esta entidad genética contiene todas las instrucciones necesarias para que una célula se reproduzca y sobreviva. El ADN está, sin embargo, en una constante lucha con fuerzas que interfieren con la integridad del código genético. Si bien los cambios en la información genética son indeseables, por otro lado constituyen mecanismos que producen cambios importantes desde el punto de vista evolutivo, generando mayor variabilidad genómica en los individuos.

Los daños al ADN son inducidos por una gran cantidad de agentes químicos, físicos y biológicos (Fig. 1) y si, además, sumamos a éstos la inestabilidad

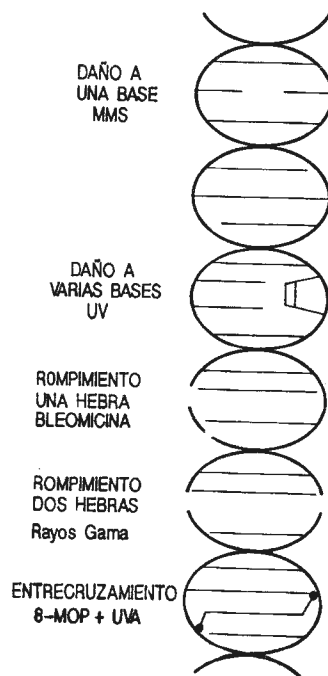


Fig 1. Diferentes tipos de daño al ADN

química inherente a la molécula de ADN, entonces la célula se enfrenta a grandes dificultades para mantener la fidelidad de la información². Se sabe, por ejemplo, que la inducción de daño al ADN por agentes químicos no es al azar, los agentes muestran una marcada preferencia por un nucleótido específico o por un nucleótido flanqueado por una secuencia específica de bases^{3,4,5}.

Las consecuencias del daño al ADN. Durante la última década, las investigaciones han proporcionado evidencias que sugieren que el daño al ADN juega un papel importante en la iniciación del proceso carcinogénico⁶. Existe una relación directa entre los daños del ADN que no son eliminados y la aparición de cáncer. Esta relación ha sido observada en las personas que sufren de algún tipo de enfermedad que involucra deficiencias en los sistemas de reparación; dentro de estos síndromes esta, por ejemplo, el xeroderma pigmentosum, la anemia de Fanconi y la ataxia telangiectasia^{7, 8}. Estos padecimientos están asociados con una falla en la reparación del ADN y el estudio de este tipo de síndromes, llamados de inestabilidad cromosómica ayuda a conocer cómo se lleva a cabo la reparación del ADN en los seres humanos. Así por ejemplo, se sabe por experimentos de fusión de fibroblastos de personas que presentan Xeroderma pigmentosum que hay por lo menos 7 diferentes "loci" involucrados, incapaces de llevar a cabo la primera etapa de la reparación por escisión; al parecer son incapaces de realizar el corte en los enlaces fosfodiéster del ADN⁹.

Por otra parte, se ha visto que las personas con ataxia telangiectasia presentan un riesgo 1,200 veces mayor de presentar cáncer que las personas normales. Se ha observado que en estos pacientes hay tres genes que son incapaces de llevar a cabo la reparación por escisión y, al parecer, una situación semejante se presenta en las personas que padecen de anemia de Fanconi⁷. En los pacientes con síndrome de Bloom, el

cual es un padecimiento autosómico recesivo caracterizado por la elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, el proceso podría estar relacionado con los mecanismos de recombinación¹⁰.

Mecanismos de reparación. Durante el curso de la evolución, se han desarrollado numerosas estrategias para salvaguardar la información genética acumulada en el núcleo celular; a estas estrategias, en general, las conocemos por el nombre de mecanismos de reparación del ADN. Estos mecanismos se descubrieron en organismos inferiores, principalmente bacterias, gracias al conocimiento que se tenía acerca de su constitución genética y a la facilidad que se tiene para manejar los cultivos de esos organismos. En los organismos superiores, poco a poco, se han ido descubriendo los mecanismos correspondientes de reparación del ADN. El daño producido por la radiación ultravioleta en el ADN, la unión de dos pirimidinas, a lo cual se le llama dímero de pirimidina (los de timidina son más frecuentes), por medio de la formación de un anillo ciclobutano entre las dos bases y su mecanismo de reparación son los procesos mejor estudiados (Fig 2). Se han identificado varios mecanismos de reparación, los principales son: el de fotorreactivación, la escisión, ya sea de bases o de nucleótidos, el de postreplicación y el llamado mecanismo "SOS" o de emergencia¹¹.

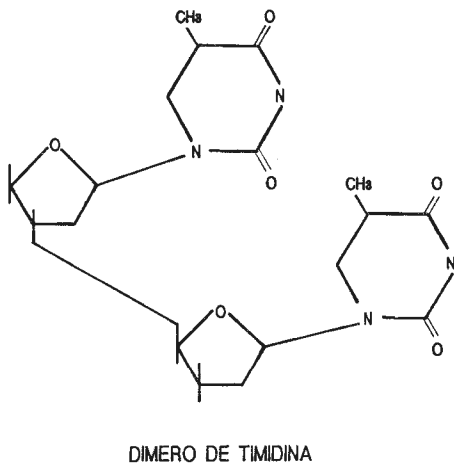


Fig. 2. Dímero de timina, daño más frecuente debido a la exposición a luz ultravioleta

El mecanismo de fotorreactivación lo llevan a cabo dos enzimas, las llamadas fotoliasas (la pterina o deazoflavina y la FADH). Estas enzimas son cromóforas; es decir son capaces de captar la energía proveniente de la luz (longitudes de onda entre los 300

y 500 nm) y transfieren la energía de sus electrones excitados hacia el dímero de timidina, lo que hace que esta alteración en el ADN se rompa y sea reparada (Fig. 3). Se necesita que las dos enzimas actúen en forma conjunta ya que, en varios experimentos, se observó que una sola enzima no podía llevar a cabo este tipo de reparación¹².

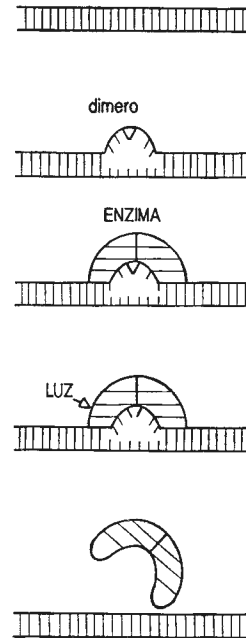


Fig. 3. Fotorreactivación, único mecanismo de reparación en el cual no se lleva a cabo ningún corte en las cadenas de ADN

Las enzimas mejor estudiadas son las de la *E. coli*, el *Saccharomyces sp.* y el *Streptomyces sp.*, aunque este tipo de reparación está presente en casi todos los organismos y al parecer juega un papel importante en las plantas¹⁰.

En ocasiones, ya sea por la acción de un agente químico o por situaciones intrínsecas de la célula, una base del ADN se altera y puede cambiarse por un análogo: este tipo de daño se repara principalmente por el mecanismo de escisión de bases (llamado también "very short patch", que quiere decir que el "hueco" que tiene que ser rellenado es muy pequeño), el cual funciona rompiendo el enlace glucosídico entre la desoxirribosa y la base, por medio de la acción de enzimas llamadas glucosilasas. Estas enzimas son pequeñas, no requieren de un cofactor para actuar y se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes. Las principales son: uracilo glucosilasa, hipoxantina glucosilasa, formamidopirimidina (FAPY). Estas enzimas, al remover la base alterada,

generan un "hueco" en el ADN. Este "hueco" en el ADN tiene que ser rellenado, pero las enzimas especializadas para llevar a cabo esta función, las polimerasas del ADN, no pueden hacerlo porque el esqueleto del ADN no fue alterado. Esta lesión, llamada generación de sitios apurínicos (sitios AP), resulta de la acción de las ADN glucosilasas y para su reparación es necesaria la acción de otras enzimas llamadas endonucleasas AP. Estas enzimas funcionan hidrolizando el enlace fosfodiéster adyacente al sitio AP y, de esta manera, permiten rellenar el hueco (Fig. 4). Las enzimas endonucleasas AP más estudiadas son las de la *E. coli*, las redoxendonucleasas y las endonucleasas humanas¹³.

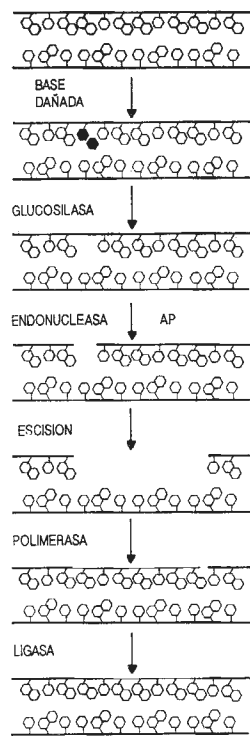


Fig. 4. Reparación por escisión de bases, mecanismo por el cual se remueve una base dañada

Quizá el mecanismo más estudiado es el de la reparación por escisión de nucleótidos, en el cual se remueven las bases dañadas como oligonucleótidos y el "hueco" es rellenado por síntesis reparativa. Se han identificado diferentes modos de reparación por escisión debido a la heterogeneidad del largo de los segmentos de la síntesis reparativa. Estas vías han sido descritas como reparación "short" y "long-patch" porque la longitud del "hueco" que hay que rellenar es variable, pueden ser segmentos cortos que involucran entre 11 y 20 pares de bases, o largos con más de 1500 pares de bases. En el caso de la reparación por

escisión de "llenado pequeño", las enzimas involucradas son la ABC exonucleasa, una helicasa (probablemente codificada por el gen *uvr D*), la ADN polimerasa I y la ADN ligasa. Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado en la *Escherichia coli*, cuya exonucleasa está codificada por tres diferentes genes del grupo *uvr*, la *uvr A*, la *uvr B* y la *uvr C* y esta enzima es dependiente de energía o sea del ATP. La exonucleasa hidroliza la octava unión fosfodiéster en la dirección 5' y la cuarta o quinta en la dirección 3' a partir del daño. Para que esto se lleve a cabo es necesario que las subunidades A y B de la exonucleasa se unan y de esta manera reconozcan el daño; unidas estas dos subunidades al ADN dañado se completa el complejo con la unión de la subunidad C: una vez unidas todas las subunidades de la exonucleasa se llevan a cabo los cortes en la cadena. Inmediatamente después de realizar los cortes en la cadena de ADN, la subunidad C se separa del complejo gracias a la ayuda de la helicasa o topoisomerasa, de esta manera queda libre esta subunidad en el medio para seguir funcionando. El pedazo de ADN en el cual se encuentra el daño es removido de la cadena para dejar paso a la ADN polimerasa I que rellena el hueco, tomando como molde la cadena complementaria. Una vez copiada la información, lo único que queda por hacer es unir este nuevo fragmento de ADN con la cadena y esto se lleva a cabo por medio de una ADN ligasa (Fig. 5). El 99% de las lesiones y dímeros que se

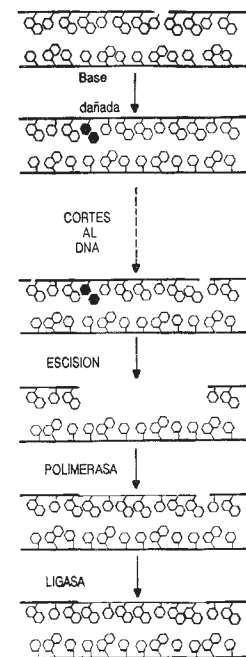


Fig. 5. Reparación por escisión de nucleótidos el mecanismo de reparación mejor estudiado. Se basa en la remoción de varios nucleótidos para reparar el daño

encuentran en el ADN son removidos por este mecanismo de "llenado pequeño" y el 1% de los daños del ADN son reparados por la vía de "llenado largo". Este modelo requiere de las mismas enzimas y, al parecer, la diferencia estriba en que este tipo de mecanismo actúa en daños que se encuentran cerca de las horquillas o tenedores de la replicación. La existencia de mecanismos de reparación que utilizan la síntesis de ADN nos lleva a considerar la existencia de controles de calidad en la reparación de la información del ADN semejantes a los de la replicación. Hasta donde se sabe, la mayoría de los sistemas que involucran a los genes *uvr* no difieren significativamente de los de la replicación de ADN en lo que respecta a frecuencia de errores.

Hasta ahora sólo se ha mencionado de la reparación que se lleva a cabo antes de que la molécula de ADN se replique, pero ¿qué sucede cuando la célula duplica su ADN antes de repararlo?. Cuando las enzimas de duplicación del ADN encuentran un daño, lo brincan y siguen replicando más adelante, lo que deja un "hueco" en el ADN que no se puede reparar por los mecanismos de escisión antes mencionados, porque se produce una hebra que contiene el daño y en la hebra complementaria está el "hueco", de tal manera que no se tiene un molde para que la ADN polimerasa copie la información. Este tipo de daño "dejado" en el ADN es preparado para repararse por medio de la enzima Rec A, que tiene actividad de endonucleasa, exonucleasa y de proteasa. Esta proteína, como se puede apreciar en la Fig. 6, genera cortes en las cromátidas hermanas, produciendo una recombinación de las mismas, de tal manera que exporta un fragmento normal de ADN al ADN dañado en vez del "hueco" y el "hueco" en vez del fragmento, quedando así una cromátida con un "hueco" y la otra cromátida con el daño. Esta situación ya se puede reparar por medio de los mecanismos de escisión.

En los años sesentas, el grupo de Howard-Flanders descubrió un mecanismo de reparación que se podía inducir. Cuando exponían bacterias a dosis altas de luz ultravioleta observaban que se producían más enzimas de reparación; a este mecanismo le llamaron de "ayuda" o mejor conocido como el de "S.O.S"¹⁴. Este tipo de reparación se debe a la interacción de la proteína Rec A con el represor Lex A. Este represor inhibe por lo menos a 11 genes diferentes involucrados en la reparación. Cuando hay un daño en el ADN, la Rec A tiene la capacidad de "activarse" y romper al represor con su actividad proteolítica, lo cual genera una sobreproducción de las proteínas codificadas por

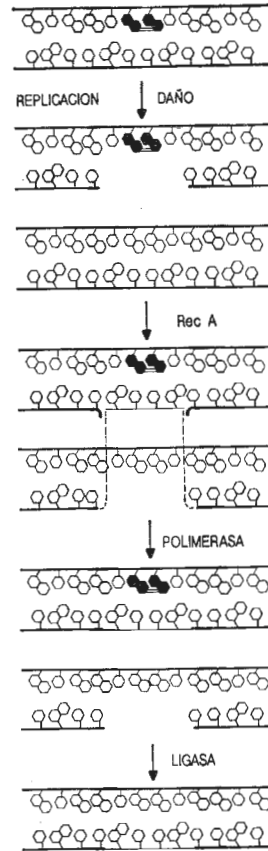


Fig. 6. Reparación postreplicativa o de recombinación, se lleva a cabo gracias a la enzima Rec A.

los genes que estaban reprimidos por Lex A. Cuando los daños son reparados, la proteína Rec A no puede activarse y por lo tanto no puede romper al represor Lex A y el sistema vuelve a su estado inicial (Fig. 7).

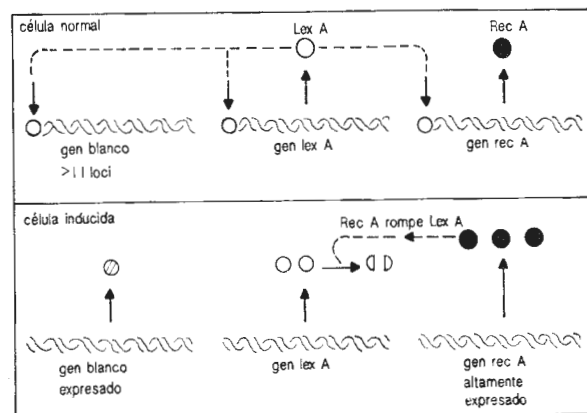


Fig 7. Reparación "SOS" o de ayuda, regulado en forma de operon, por la interacción de las proteínas Lex A y Rec A.

Con respecto a la reparación del ADN de los mamíferos poco a poco se empiezan a conocer los genes involucrados en la reparación, así como las diferentes formas por las cuales ésta se lleva a cabo^{11, 15}. En general, hay evidencias que señalan que los mecanismos de reparación están conservados evolutivamente dentro de todos los eucariontes, ya que secuencias clonadas del ADN de mamíferos son capaces de restaurar la capacidad reparadora de cepas mutadas de levaduras¹⁰.

Aunque se han hecho grandes adelantos en el campo de los mecanismos de la reparación del ADN todavía quedan más preguntas que respuestas ¿son iguales los

mecanismos de reparación en todos los organismos? ¿se reparan de la misma forma y eficiencia todos los genes? Existen algunas evidencias que indican que se reparan mejor los genes que se están transcribiendo, es decir los que están activos que los que están inactivos. Asimismo hay una mayor fidelidad en la reparación de los exones que en la de los intrones¹⁶. Sin embargo, no sabemos si esto sucede en todos los genes y si ocurre con todos los tipos de daño¹⁷. Estas son algunas de las cuestiones que se tratan de responder. Las respuestas a estas preguntas son las nuevas piezas que hay que buscar y poner en su lugar en el gran rompecabezas que es la reparación del ADN.

BIBLIOGRAFIA

1. Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribonucleic acid. *Nature* (1953) 171:737-8.
2. Friedberg, EC. ADN Repair. W.H. Freeman and Co. New York U.S.A. 1980;1-50
3. Dohi VA, Phillips DH, Hanawalt PC. Heterogeneous ADN damage and repair in the mammalian genome. 1987; *Cancer Res* 47:6426-36.
4. Chiu SM, Oleinick NL, Friedman LR, Stambrook PJ. Hipersensitividad de ADN transcripcionalmente activo a la radiación ionizante. *Biochem Biophys Acta* 1982;699:15-21.
5. Kuo MT. Preferential damage of active chromatin by bleomycin. *Cancer Res*. 1981;41:2439-43.
6. Weinstein IB. The origins of human cancer: Molecular mechanism of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. Twenty-seventh G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res*. 1988;48:4135-4143.
7. Hanawalt PC, Sarasin A. Cancer-prone hereditary diseases with ADN processing abnormalities. *TIG* 1986;2:124-9.
8. Adams RLP. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. Ed Wiley U.S.A 1981;286-96.
9. Cleaver JE. Xeroderma Pigmentosum, a human disease in which an initial stage of ADN repair is defective. *Proc Nat Acad Sci USA* 1969;63:428.
10. Lewin, B. *Genes*. Ed. Wiley USA. 1985;370-85.
11. McKay M, Hanawalt P. Workshop on DNA-repair genes. *Mutat Res* 1992;274:157-61.
12. Sancar G, Jorns B, Payne S, Fluke G, Rupert CS, Sancar A. Action mechanism of the *Escherichia coli* ADN photolyase. *J. Biol. Chem.* 1987;262:492-8.
13. Sancar A, Sancar GB. ADN repair enzymes. *Ann Rev Biochem* 1988;57:29-67
14. Howard-Flanders L. Reparación inducible del ADN. *Ciencia y Desarrollo* 1979:36-50.
15. Strike P. DNA repair and mutation: Recent advances. *Mutat Res* 1993;294:187-98.
16. Hanawalt PC. Preferential ADN repair in expressed genes. *Envir Health Persp.* 1987;76:9-14.
17. Hanawalt PC. Role of gene expression in the fine structure of ADN damage processing. En: *Biootechnology and Human Genetic Predisposition to Disease*. pp 135-145 Wiley-Liss, Inc. U.S.A. 1990.