

2ej
85



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**“ASPECTOS GENERALES DE LA
REPLICACION DEL DNA EN EUCARIOTES”**

(TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION)

Sustentante: DULCE CONSUELO ELISA NERI SPINOLA

Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo

Año 1986



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"ASPECTOS GENERALES DE LA REPLICACION DEL DNA EN EUCARIOTES"

CONTENIDO

	<u>Hoja</u>
INTRODUCCION	02
CAPITULO I	
GENERALIDADES	04
1.1. Iniciación de la cadena	06
1.2. Elongación de la cadena	07
1.3. Terminación de la cadena	20
CAPITULO II	
SISTEMAS DE ESTUDIO	21
2.1. Virus con genoma lineal	21
2.2. Virus con genoma circular	24
2.3. Plásmidos de levadura	24
CAPITULO III	
INICIACION DE LA REPLICACION	26
3.1. Secuencias de origen y mecanismos cebadores	26
3.2. Proteínas involucradas en la iniciación	35
CAPITULO IV	
ELONGACION DE LA CADENA	43
4.1. Síntesis continua	44
4.2. Síntesis discontinua y RNA cebadores	49
4.3. Enzimología de la elongación	55
4.3.1. DNA Polimerasas	58
4.3.2. DNA Primasas	74
4.3.3. Proteínas que desdoblan el DNA dúplex	80

	<u>Hoja</u>
4.3.4. Proteínas desestabilizadoras de la hélice	80
4.3.5. DNA Topoisomerasas	84
4.3.6. Ribonucleasa H (Hibridasa)	88
4.3.7. DNA Ligasa	88
4.3.8. DNA Metilasa	89
CAPITULO V	
TERMINACION DE LA CADENA	92
5.1. Intermediarios de segregación	92
5.2. Papel de la topoisomerasa tipo II en la etapa final	96
5.3. Ensamblaje de la cromatina	98
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFIA	108

INTRODUCCION

Durante los últimos 20 años aproximadamente, la mayor parte de la investigación que ha revelado nuevos aspectos sobre la base molecular de la transferencia de la información genética se ha llevado a cabo con virus bacterianos y con organismos procariotes, particularmente con *Escherichia coli*.

Los procariotes contienen un solo cromosoma, formado por una molécula de DNA de doble hebra y generalmente se multiplican por un proceso asexual de división celular, según el cual las células hijas normalmente reciben un genoma idéntico al de la célula madre.

Debido a la relativa simplicidad de los virus y bacterias y a la rapidez y eficiencia con que los experimentos de genética pueden realizarse con ellos, actualmente se dispone de conocimientos seguros de muchos de los fundamentales procesos de la transferencia de información genética, que con cierta confianza pueden considerarse como biológicamente universales.

La genética molecular se encuentra actualmente ante un nuevo umbral, el que se abre en los sondeos por el amplio abismo en tamaño, complejidad y capacidad de diferenciación y evolución, existente entre las células procariotas y las eucariotas.

De este modo, se presentan nuevos y difíciles problemas para definir la genética molecular de los organismos eucariotes, aunque existen datos experimentales que actualmente apoyan la teoría de que los patrones básicos moleculares pueden ser esencialmente idénticos, tanto en los organismos procariotes como en los eucariotes.

La estructura molecular de los complejos cromosomas de

los organismos eucariotes, así como la información genética mucho mayor que ellos contienen, constituyen colosales e ilimitados desafíos para la bioquímica de hoy y del mañana.

El presente trabajo intenta recopilar algunos de los avances genéticos y bioquímicos que han sido reportados por diversos Autores acerca del mecanismo de síntesis del DNA en eucariotes, con el propósito de comprender, hasta donde sea posible, el proceso de replicación en este tipo de organismos, a los cuales pertenece el hombre.

I.- GENERALIDADES

El proceso de duplicación del DNA ocurre de manera secuencial y ordenada y se ha dividido en 3 etapas: iniciación, elongación y terminación.

Las enzimas y otras proteínas participantes en cada una de estas etapas son, seguramente, unos de los más notables catalizadores biológicos conocidos. Una descripción completa de su acción debe explicar la transmisión exacta de información genética, desde la hebra patrón a la nueva hebra en forma de una secuencia nucleotídica exactamente complementaria. Por otra parte, también debe proporcionar una explicación a los complejos problemas geométricos, mecánicos y cinéticos, que presenta el desenrollamiento del DNA dúplex progenitor, que es indispensable para exponer a la acción de las enzimas de replicación la información contenida en el código de la estructura dúplex.

En procariotes, los eventos que definen cada una de las etapas han sido ampliamente estudiados, mientras que en eucariotes los conocimientos son escasos. La complejidad de estos últimos ha sido un obstáculo para el desarrollo de estudios más profundos. Tomando en cuenta lo anterior, es indispensable conocer el proceso de replicación del DNA en sistemas procariotes, para sentar bases que permitan la comprensión, al menos en parte, de la síntesis del material genético en organismos eucariotes.

El proceso de replicación del DNA en *E.coli* ha sido caracterizado extensamente *in vivo*. El cromosoma de *E.coli* es una molécula de DNA circular, doble cadena, con un peso molecular de 2.5×10^9 . La replicación se inicia en un solo sitio del

genoma y procede bidireccionalmente por un mecanismo semiconservativo. Una o quizá ambas cadenas son sintetizadas en forma discontinua (Wickner 1978).

Estudios genéticos han definido varias funciones esenciales para la replicación del cromosoma. Estas han sido identificadas por el aislamiento de mutantes sensibles a temperatura para la síntesis del DNA. Tales mutantes son fenotípicamente de 2 clases:

- 1) Mutantes bloqueadas en la iniciación o terminación de la replicación del cromosoma, las cuales terminan la síntesis del DNA ya comenzada, a pesar de ser transferidas a temperaturas no permisibles. Los genes *dnaA*, *dnaB* y *dnaC* están incluidos entre los que son requeridos para la iniciación.
- 2) Mutantes bloqueadas en la elongación cesan la síntesis de DNA inmediatamente que son transferidas a temperaturas no permisibles. Los genes *dnaB*, *dnaC(D)*, *dnaG*, *dnaZ* y *pol C* (antes llamado *dnaE*) están incluidos entre los necesarios para la elongación. Los productos de los genes *dnaG*, *dnaZ* y *pol C* pueden requerirse también para la iniciación de la síntesis.

Otra técnica de estudio para la replicación del DNA es el uso de inhibidores de la síntesis del genoma. Así, se conoce que cloranfenicol y rifampicina inhiben la iniciación de la síntesis mas no la elongación de la misma, lo cual indica que se necesita síntesis de proteínas y/o acción de las RNA polimerasas para el proceso. La novobiocina y el ácido nalidíxico inhiben la elongación del DNA en *E.coli* mediante su acción sobre la DNA girasa (ver hoja 19).

La microscopía electrónica y el uso de endonucleasas de restricción han sido instrumentos de gran utilidad en la dilucidación de la región de inicio de la duplicación. Este sitio ha sido localizado para *E.coli* y se le ha llamado *oriC*. La porción del DNA que contiene este origen es peculiar en el

sentido de que, en la mayoría de los sistemas estudiados, presenta regiones de apareamiento intracatenario, lo que ocasiona la formación de "asas" que podrán ser reconocidas por proteínas específicas para el inicio de la duplicación (Vázquez Ramos 1985).

1.1. INICIACIÓN DE LA CADENA

La iniciación de la replicación sobre el origen (*oriC*) en *E. coli*, es un evento regulatorio en el ciclo celular de la bacteria. Es posible hacer estudios bioquímicos del mecanismo de iniciación gracias a la construcción de plásmidos que contienen el fragmento *oriC* y el desarrollo de un sistema soluble de enzimas que inicia la replicación en estos plásmidos sobre el origen (revisado por Vander Ende 1985). Los estudios genéticos sobre la iniciación del proceso están fundamentados básicamente en la disponibilidad de mutantes sensibles a temperatura descritos en un principio.

De esta manera se ha encontrado que al menos los productos de los genes *dnaA*, *dnaC*, *dnaB* y la RNA polimerasa desarrollan alguna función durante la replicación (Tomizawa 1979). Las mutaciones en el gene estructural para la subunidad β de la RNA polimerasa suprimen las mutaciones en el gene *dnaA*, lo que hace pensar en una posible interacción entre la RNA polimerasa y la proteína Dna A (producto del gene *dnaA*) para la iniciación de la síntesis (Bagdasarian et al 1977).

Las funciones tanto para la RNA polimerasa como para la proteína DnaA aún no han sido esclarecidas, aunque es posible que participen en el reconocimiento de la región del origen y su activación produciendo el primer fragmento de RNA cebador. Se sugiere inclusive que el producto de *dnaA* podría ser el evento limitante para el inicio de la duplicación en el origen (LeDuca y Helmstetter 1983).

Un modelo que se ha propuesto para explicar la iniciación

de la duplicación en el sitio de origen en *E. coli*, basado en los conocimientos obtenidos es el siguiente (Vázquez Ramos 1985):

La RNA polimerasa se encargará de activar el origen (*oriC*) abriendo la doble cadena y permitiendo el paso a otras proteínas. El reconocimiento del origen podría ser determinado por el producto del gene *dnaA*, probablemente en contacto con una proteína de membrana β' . Una vez abierto el origen, la DNA primasa podría sintetizar el primer cebador que sería utilizado por la DNA polimerasa. Alternativamente, la RNA polimerasa misma podría sintetizar el primer cebador de la cadena continua y la DNA primasa los cebadores en la cadena discontinua, produciéndose así fragmentos de Okazaki (ver: Elongación de cadena).

La proteína β' es una proteína que se une al DNA preferentemente sobre la región *oriC*. Al parecer, β' deriva de membrana celular la cual se encuentra en constante asociación con la región de origen para la replicación en sistemas bacterianos (Jacq et al 1983).

1.2. ELONGACIÓN DE LA CADENA.

La etapa posterior a la activación del origen y síntesis del primer cebador, es la formación de las cadenas complementarias al DNA progenitor, utilizando como molde ambas integrantes de la hélice del genoma bacteriano. Esta tarea se dificulta tomando en cuenta que, de acuerdo a la estructura propuesta para la molécula bifilar del DNA, las cadenas que la forman son antiparalelas, es decir, una corre en dirección 5'-3' y la otra 3'-5'.

Si en los sistemas de replicación se dispusiera de DNA polimerasas que elongaran las cadenas en ambas direcciones, la síntesis sería continua en las dos cadenas pero, hasta el momento, todas las DNA polimerasas detectadas sólo tienen

actividad en la dirección 5'-3' y no catalizan la polimerización de nucleótidos en sentido 3'-5'.

El hallazgo de fragmentos cortos de DNA de 1,000 a 2,000 nucleótidos de largo (10S) durante la duplicación, dió una alternativa para la síntesis de ambas cadenas a la vez (Okazaki et al 1968). De acuerdo a este mecanismo, una de las cadenas (la que corre en sentido 3'-5') será elongada en forma continua por las DNA polimerasas que actúan en sentido 5'-3', en tanto que la otra cadena (que tiene sentido 5'-3') será sintetizada mediante fragmentos cortos en forma discontinua, también en dirección 5'-3'. Estos fragmentos son denominados Fragmentos de Okazaki en honor a su descubridor.

Para facilitar la diferenciación entre las cadenas del DNA en este trabajo, aquélla que sea sintetizada en forma continua se le denominará "cadena continua" (leading), en tanto que la cadena que es sintetizada en forma discontinua se le denominará "cadena discontinua" (lagging) (Fig. # 1).

Otra característica general de las DNA polimerasas es que ninguna de ellas puede iniciar la adición de nucleótidos para la síntesis de la cadena complementaria, sin la existencia previa de un extremo 3'-OH cebador sobre el templado que le permita añadir el primer nucleótido sobre el extremo 5'P.

En el caso de *E. coli* este extremo es proporcionado por un oligorribonucleótido formado sobre la cadena progenitora a partir del cual se inicia la elongación de la cadena y que en este microorganismo parece tener una longitud de 1-5 nucleótidos.

Un mecanismo propuesto para la síntesis del RNA cebador (Nossal 1983) involucra al menos 6 proteínas en la etapa pre-cebadora que, junto con el producto del gene *dnaG*, producen el cebador para la elongación de cadena. El producto del gene *dnaG* es la DNA primasa, una enzima capaz de sintetizar oligorribonucleótidos a partir de rNTPs y/o dNTPs y que además presenta resistencia a rifampicina (Rowan y Kornberg 1978).

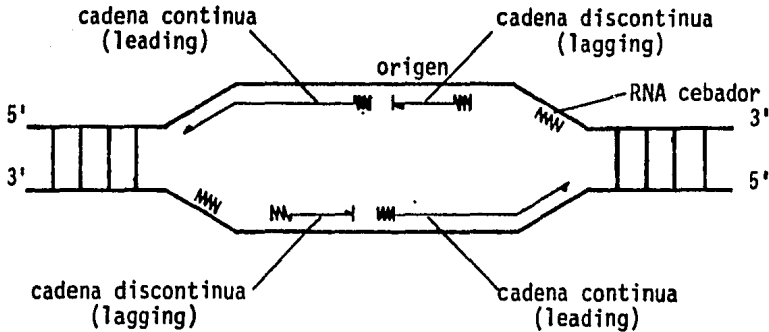


FIG. No. 1.- Esquema de la síntesis de ambas cadenas del genoma a partir del origen (Kornberg 1979).

Las otras 6 proteínas mencionadas son los productos de los genes *dnaB*, *dnaC* y los factores *n*, *n'*, *n''*, e *i* (Low-et al 1982).

De acuerdo a este mecanismo, la proteína *n'* se une a DNA que se encuentra cubierto por proteínas que se unen a DNA de cadena sencilla (SSB single strand binding protein), el cual contiene un sitio de reconocimiento para la proteína *n'*, estimulando así la unión de la proteína *n+n''*. Por otro lado, los productos de los genes *dnaB* y *dnaC* forman un complejo proteico a partir del cual la proteína *DnaB* es transferida al DNA que se ha unido previamente a las proteínas *n*, *n'* y *n''*. Esta reacción requiere ATP y la proteína *i* para llevarse a cabo.

De esta manera queda estructurado el complejo precebador del DNA que puede utilizarse por la primasa de *dnaG* para cebar la elongación de la cadena (Fig. # 2).

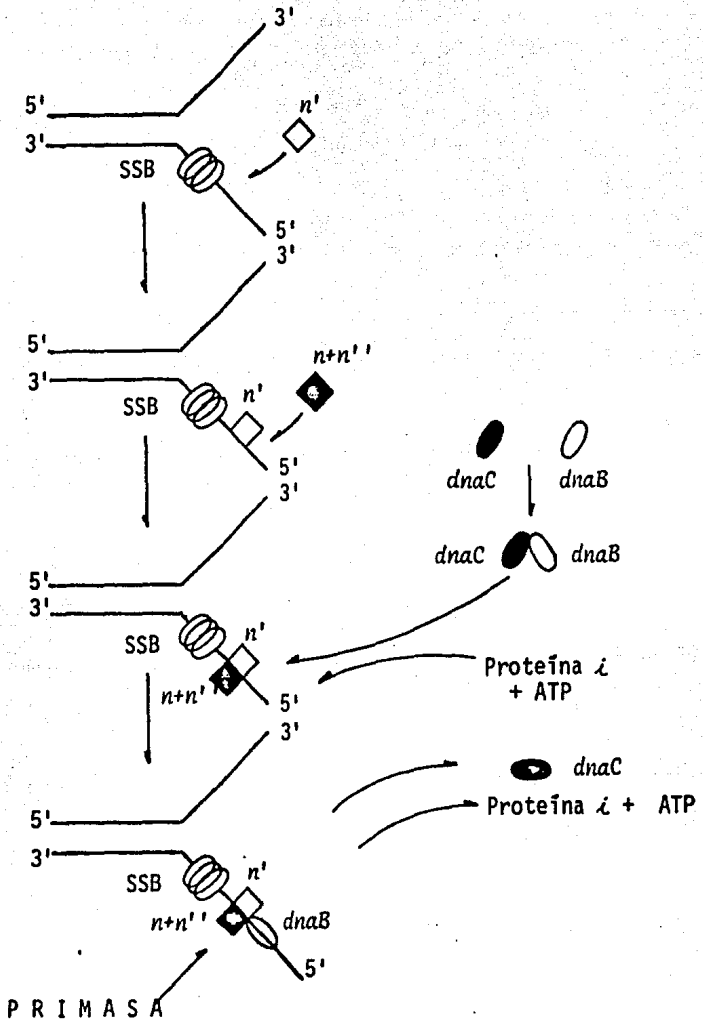
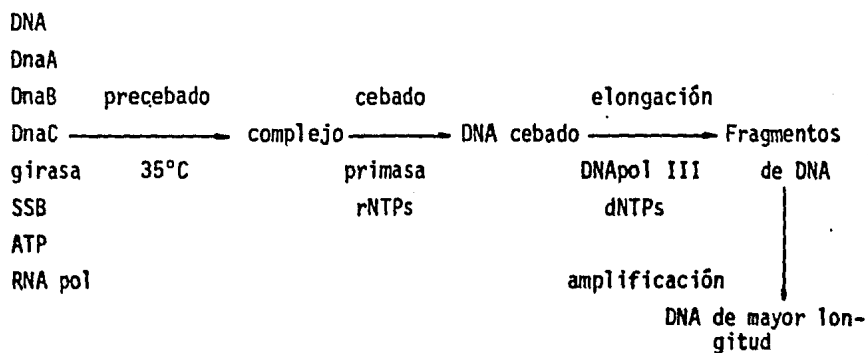


FIG. No. 2.- Secuencia de eventos propuesta para explicar la formación del complejo precebador por el primosoma (Vázquez Ramos 1985).

La proteína π es una ATPasa que aparentemente reconoce una estructura tridimensional del DNA, más que una secuencia determinada del mismo (Zipursky y Marian 1980).

Estudios basados en el uso de plásmidos que portan el origen de replicación de *E.coli*, han mostrado que otro mecanismo de iniciación es capaz de soportar la formación de un precebador sobre el cual actúe la primasa de *dnaG* (van der Ende et al 1985). En este caso, un complejo sería formado a 35°C y requeriría la participación de las proteínas DnaA, DnaB, DnaC, girasa, proteínas SSB y ATP.

El complejo aislado soporta la formación de un RNA cebador por primasa. Presumiblemente, la unión de la proteína DnaA a secuencias sobre el *oriC*, la acción de la girasa y la interacción con las proteínas DnaB y DnaC genera un complejo precebador estable. La dependencia de SSB es debida a la necesidad de una estructura de DNA abierta, lo que también involucra a la RNA polimerasa en el proceso. La secuencia de sucesos para este último mecanismo postulado puede resumirse de la siguiente manera:



Una vez formado el cebador sobre la cadena del DNA, queda establecido el extremo 3'-OH necesario para la acción de las DNA polimerasas.

Las DNA polimerasas tienen un papel relevante en la elongación de cadenas nacientes pues, como ya se mencionó anteriormente, catalizan la adición de desoxirribonucleótidos complementarios a la secuencia de la cadena progenitora del DNA formando así las cadenas hijas.

Tres tipos de DNA polimerasas han sido descritas para procariotes y designadas como DNA polimerasas I, II y III, de acuerdo al orden en que fueron descubiertas.

La DNA polimerasa I es la que se ha estudiado más extensamente y consiste de un solo polipéptido (codificado por el gene polA), que contiene 1,000 residuos de aminoácidos aproximadamente, con un peso molecular de 109,000 para la enzima homóloga. La molécula presenta un enlace disulfuro y un grupo sulfhidrilo que probablemente no forman parte del sitio activo. Un átomo de zinc localizado por molécula de enzima puede tener importancia en el mecanismo catalítico de polimerización (Kornberg 1980).

Las principales actividades descritas para la DNA pol I son: polimerización en dirección 5'-3', degradación exonucleolítica 3'-5' y degradación exonucleolítica 5'-3'. La actividad de polimerización es dictada por la especificidad de 2 substratos: el 3'-OH del extremo cebador y el desoxinucleósido 5' trifosfato; esta actividad no es la que lleva a cabo la duplicación cromosomal. La actividad de polimerasa de esta enzima está relacionada estrechamente con funciones de reparación del DNA.

El aspecto más importante de la DNA pol I es su habilidad para degradar cadenas de DNA sintetizadas que contengan nucleótidos mal apareados. La enzima puede degradar DNA hasta el extremo del cebador en dirección 3'-5'. La actividad de exonucleasa 3'-5' forma parte integral de la actividad de polimerización tanto en estructura como en función. La actividad de esta exonucleasa representa solo el 2% de la actividad de la DNA polimerasa bajo condiciones óptimas. Esta enzima actúa

como corrector precisamente para evitar cualquier error durante la polimerización.

Un segundo mecanismo, que posee la DNA pol I para asegurar la entrada de la base correcta, es el reconocimiento altamente específico no del nucleótido entrante sino del par que se forma. Así por 2 mecanismos complementarios, esta enzima asegura la duplicación del DNA con alta fidelidad (Vázquez Ramos 1985).

La exonucleasa 5'-3' difiere de la exonucleasa 3'-5' no solamente en el extremo seleccionado y la dirección, sino que la primera rompe un enlace fosfodiéster sólo en una región de bases apareadas; en cambio la segunda corta un enlace solamente en regiones de bases no apareadas. Más aún la nucleasa 5'-3' puede escindir oligonucleótidos hasta de 10 residuos de longitud del extremo 5', mientras que la nucleasa 3'-5' remueve un solo nucleótido a la vez. La exonucleasa 5'-3' también degrada templados cebados que son inactivos para la polimerización. Utilizando esta misma actividad de exonucleasa, la DNA polimerasa I también puede remover los cebadores de RNA que se utilizan para la síntesis del DNA en la cadena discontinua, utilizando la actividad de polimerasa para rellenar los huecos producidos.

El producto de proteólisis de la DNA pol I (109 Kd) son 2 fragmentos: uno grande (76Kd) que contiene la actividad de polimerasa y la de exonucleasa 3'-5', y otro pequeño (36 Kd) que porta solamente la actividad de exonucleasa 5'-3'. En el fragmento mayor también se encuentran los sitios de unión para los dNTPs y para los extremos 3'-OH; a este último es al que se le conoce como Fragmento de Klenow.

La función de la DNA polimerasa II no es clara todavía. Las proteínas que se unen a cadena sencilla de DNA (SSB), son esenciales para la replicación cromosomal y a su vez estimulan a la DNA pol II, lo cual aporta una evidencia circunstancial de algún papel para esta enzima durante la duplicación.

El templado óptimo para la DNA pol II es una estructura dúplex con intervalos cortos, y su acción es más susceptible a inhibición por análogos de arabinosil que la sensibilidad de las otras polimerasas (Hubscher 1983).

La DNA pol II, a diferencia de la I y la III, no tiene actividad de exonucleasa 5'-3', pero sí 3'-5'. Las mutaciones en *pol B*, el gene que codifica para la polimerasa II, son inocuas para la célula en cuanto a la síntesis del DNA.

La polimerasa II es un polipéptido con peso molecular de 120 Kd cuyo papel dentro del funcionamiento celular es desconocido pero no por ello necesariamente dispensable.

La principal DNA polimerasa replicativa de *E.coli* es la DNA polimerasa III que en realidad es un complejo multiproteínico cuyo centro catalítico es producto del gene *dnaE* (*pol C*). Además de la actividad de polimerasa, la enzima tiene acción como exonucleasa tanto en dirección 5'-3' como en sentido 3'-5'.

La DNA polimerasa III puede ser purificada como una holoenzima de al menos 7 subunidades denominadas α , β , γ , δ , ξ , θ , τ . De acuerdo a la asociación de subunidades, la holoenzima puede ser dividida en complejos más pequeños con diferente composición y propiedades distintas resumidas en la Tabla # 1.

La DNA pol III o núcleo enzimático es la asociación de las subunidades α (*dnaE*), ξ (*dnaQ*) y θ (aún no asociada con algún gene). La polimerasa III' está constituida por la anterior más la subunidad τ (que aparentemente es el producto de los genes *dnaZ+X*). La DNA polimerasa III" es la polimerasa III' más dos subunidades adicionales: la γ (*dnaZ*) y la δ (*dnaX*). Por último, la holoenzima propiamente dicha, corresponde a la polimerasa III" más un factor adicional que es la subunidad β (*dnaN*). Las primeras 3 formas requieren regiones de DNA de cadena doble a las que se les ha producido un hueco de mayor o menor tamaño, en tanto que la holoenzima puede llevar a cabo la síntesis de DNA a partir de un molde de cadede

na sencilla al cual se le ha añadido un cebador (Nossal 1983).

Estudios enfocados a dilucidar la función de cada subunidad integrante de la holoenzima de la DNA pol III, mostraron que la subunidad α posee actividad de polimerización por sí sola. Ningún papel funcional se encontró para las subunidades ξ y θ , en tanto que la adición de τ al sistema aumenta la procesividad de la enzima. La presencia de $\gamma + \delta$ tiene un efecto semejante al producido por τ ; además, estas dos subunidades son necesarias para la subsecuente unión de la subunidad β (copol III) que es activa en forma de dímero (Johanson y McHenry 1982). La subunidad β se queda unida al complejo e incrementa notablemente la actividad de la holoenzima; es probable que se requiera para formar el complejo de iniciación.

En resumen, las características por las que la polimerasa III es favorecida sobre otras polimerasas para la función principal de duplicación del DNA, reside en las asociaciones específicas con otras proteínas que incrementan su afinidad por el molde y su actividad, más que por sus propiedades catalíticas básicas (Vázquez Ramos 1985). En la tabla # 2 se resumen algunas de las propiedades de las DNA polimerasas detectadas en *E. coli*.

TABLA No. 1

Formas de la DNA polimerasa III en *E. coli*.

Subunidad	α	ξ	θ	τ	γ	δ	β
Tamaño (Kd, desnaturalizado)	140	25	10	83	52	32	37
Gene que la codifica	<i>dnaE</i>	<i>dnaQ</i>	(?)	(<i>dnaZ+X</i>)	<i>dnaZ</i>	<i>dnaX</i>	<i>dnaN</i>
<u>Designación de la polimerasa</u>							
PoI III (núcleo)	+	+	+				
PoI III'	+	+	+	+			
PoI III''	+	+	+	+	+	+	
Holoenzima	+	+	+	+	+	+	+

TABLA No. 2

Algunas propiedades de las DNA polimerasas de *E. coli*.

Polimerasa de <i>E. coli</i>	P.M. (Kd)	No. de sub-unidades	Homogeneidad	Exonucleasa 3'-5' asociada	Otra actividad asociada
DNA pol I	109	1	+	+	+
DNA pol II	120	1	+	+	-
DNA pol III	180	3	+	+	+

De acuerdo a lo antes mencionado, la DNA polimerasa sintetizará continuamente solo una de las 2 cadenas; la otra será sintetizada en fragmentos de Okazaki, significando esto que la polimerasa, después de haber sintetizado un fragmento sobre la cadena continua, se regresará a sintetizar sobre la cadena discontinua (Kornberg 1980). Para llevar a cabo la translocación, la enzima requiere de una señal que le indique en qué momento debe iniciar la síntesis de la cadena discontinua. La presencia de un cebador es, posiblemente, la señal reconocida por la polimerasa para cambiar de cadena.

Un modo alternativo para la polimerización del DNA naciente es que la DNA polimerasa sea liberada después de cada etapa de polimerización; pero por razones de economía, velocidad y fidelidad, el primer mecanismo postulado es el aceptado en forma general (Hübscher 1983).

Es necesario no perder de vista que el proceso de síntesis del DNA requiere la apertura de las cadenas del genoma para permitir el paso a la maquinaria de replicación. Esto es un trabajo que involucra la ruptura de los puentes de hidrógeno entre bases apareadas, que es realizado por enzimas denominadas helicadas.

Las DNA helicadas ejercen su función independientemente de otras enzimas y en *E. coli* se ha detectado la presencia de 4 helicadas: I, II, III y el producto del gene *rep*. Los pesos moleculares de estas enzimas son de 180,000; 75,000; 20,000 y 65,000; respectivamente.

La helicasa I es una molécula con tendencia para formar agregados, en tanto que las otras enzimas son proteínas globulares. Todas ellas presentan una sola subunidad, a excepción de la helicasa III que probablemente es un dímero.

Las helicadas I, II y III poseen actividad de ATPasa dependiente del DNA y se unen específicamente a DNA de cadena sencilla, el que además es necesario para que la enzima inicie la separación. La acción de estas enzimas es en dirección

5'-3'.

La proteína *rep* en cambio, es capaz de iniciar la separación de cadenas a partir de un corte sobre el templado y con la ayuda de una proteína auxiliar. Esta enzima rompe puentes de hidrógeno en dirección 3'-5' (Geider y Hoffmann-Berling 1981).

Conjuntamente con la acción de las helicasas, es necesaria la presencia de enzimas que se unan al DNA de cadena sencilla formado por la ruptura de puentes de hidrógeno entre bases apareadas para: a) mantener al DNA en la conformación propia para la síntesis del cebador, b) separar las regiones de doble cadena para evitar un bloqueo de la elongación, c) proteger al DNA de cadena sencilla del ataque de endonucleasas y d) estimular la actividad de las proteínas de duplicación mediante interacciones directas proteína-proteína.

Las proteínas que se unen a DNA de cadena sencilla se encuentran codificadas en el gene *SSB* tienen un peso molecular de 20 Kd y actúan como tetrámero, el cual se une con cinética cooperativa al DNA de cadena sencilla (Champoux 1978).

Abierta la cadena de DNA, se sintetiza el cebador y procede la elongación de la cadena, pero este oligorribonucleótido cebador no puede quedarse unido a las nuevas cadenas de DNA; por lo tanto, la acción de una enzima que escinda el RNA cebador es necesaria. Esta acción es realizada por la DNA polimerasa I gracias a sus propiedades de exonucleasa y, aparentemente es auxiliada por la RNasa H, enzima que reconoce regiones híbridas de RNA-DNA.

La misma polimerasa I resintetiza con dNTPs el fragmento removido y finalmente la DNA ligasa (codificada por el gene *lig*) une los extremos 5'P y 3'-OH resultantes, dando como producto final un DNA covalentemente unido a la fracción de alto peso molecular.

Conforme prospera la replicación del DNA, el grado de enrollamiento se ve incrementado en forma local; para contrarres-

tar este efecto, se hace necesaria la presencia de actividades que reduzcan el grado de torsión mediante la relajación del DNA. Este es el papel de las topoisomerasas.

Se le ha dado el nombre de topoisomerasas a las enzimas que catalizan el corte y posterior unión de enlaces en el DNA. Estas enzimas, al parecer, almacenan la energía de la unión internucleotídica en una unión enzima-DNA, por lo que la reunión del esqueleto de DNA es independiente de algún cofactor nucleotídico (Nossal 1983).

Las topoisomerasas tipo I incluyen la proteína ω que se encuentra codificada por el gene *top* y su acción requiere la presencia de Mg^{2+} en el medio. Este tipo de topoisomerasa solo es capaz de cortar y sellar DNA de cadena sencilla.

Las topoisomerasas tipo II en bacterias están representadas por la girasa, enzima que es capaz de relajar y también de enrollar la doble hélice de DNA mediante la acción de cortar y reunir cadenas dobles de DNA en un mecanismo dependiente de ATP.

La DNA girasa ha sido purificada de *E. coli* y es un tetramero A_2B_2 donde A y B tienen un peso molecular de 100,000 y 90,000 respectivamente.

Aparentemente la girasa enrolla el substracto de DNA para modular la conformación del mismo, manteniendo una tensión torcional necesaria para la replicación (Gellert 1981).

Las subunidades A y B contribuyen a diferentes características de la enzima. La subunidad A (codificada por el gene *gyr A*) determina la resistencia a ácido nalidixico y ácido oxolínico, en tanto que B (codificada por *gyr B*) determina resistencia a cumericina A I y novobiocina. Todas las actividades de girasa requieren la presencia de ambas subunidades (Geider y Hoffman-Berling 1981).

1.3. TERMINACIÓN DE LA CADENA.

Cuando las horquillas de duplicación se reúnen se manifiesta el mecanismo de terminación de la duplicación, cuyos eventos aún son desconocidos. Al menos para *E.coli* se sugiere que la región de terminación está representada por una zona que impide el movimiento de la horquilla de duplicación; esta región de DNA se supone que está estrechamente asociada a la membrana celular (Vázquez Ramos 1985).

Aún falta mucho por estudiarse para tener una idea completa de todos los eventos que están involucrados en la replicación del DNA en procariotes y de todas las proteínas que participan, así como su regulación.

II.- SISTEMAS DE ESTUDIO

Los numerosos y complejos eventos que ocurren durante la replicación del DNA en eucariotes no se conocen todavía. La información básica sobre el proceso en estos organismos se ha obtenido por el estudio de la replicación del genoma de algunos virus que infectan a células eucariotas y utilizando la replicación de otros elementos extracromosomales como modelo. Cada uno de estos sistemas posee características únicas que permiten ahondar en aspectos particulares de la replicación.

2.1. VIRUS CON GENOMA LINEAL.

Entre los virus con genoma lineal que infectan a eucariotes, los dos grupos mejor caracterizados son: parvovirus y adenovirus.

Parvovirus.- Su genoma es de cadena sencilla y poseen una capacidad genética limitada ya que, al parecer, requieren por completo de la maquinaria celular de replicación para su multiplicación. Como su nombre lo indica son los más pequeños y menos complejos de los virus que infectan animales; su molécula de DNA de cadena sencilla contiene de 4,500 a 5,500 nucleótidos (Challberg y Kelly 1982).

Los parvovirus que infectan vertebrados han sido clasificados en dos grupos principales: a) parvovirus autónomos y b) parvovirus defectuosos.

a) Parvovirus autónomos.- Aunque poseen genoma de cadena sencilla, sus extremos 3' y 5' están doblados formando estructuras dúplex (Salzman y Fabisch 1979). El tamaño de esta estructura en el extremo 5' ha sido estimado entre 70-130 pares

de bases. La secuencia de nucleótidos en el extremo 3' de varios parvovirus de roedores presenta alta complementación en sí misma dentro de los primeros 115-116 nucleótidos; el máximo apareamiento de bases está dado por una estructura en forma de gancho que semeja "Y" (Fig. # 3) (Astell et al 1979). El posible papel de esta estructura en la replicación del DNA de parvovirus aún es discutido. Ejemplos de virus que integran este grupo son: virus H-1 y virus de rata de Kilham.

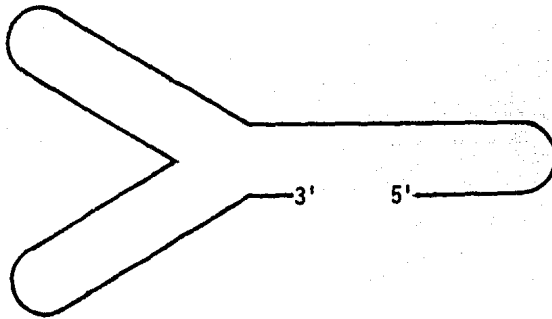


FIG. No. 3.-Representación del genoma de parvovirus que muestra una estructura en forma de "Y" en el extremo 3' (Litvak et al 1985).

b) Parvovirus defectuoso o virus adenoasociados (AAV).- La multiplicación de virus pertenecientes a este grupo requiere la coinfección con un virus acarreador.-por ejemplo adenovirus- o con un herpes virus (revisado por Challberg y Kelly 1982). A diferencia de los parvovirus autónomos, la progenie de AAV presenta DNA encapsidado con diferente polaridad en cantidades aproximadamente iguales, debido a que en las formas replicativas de estos virus, la probabilidad de iniciar la síntesis por desplazamiento es la misma para ambos extremos de la molécula (ver "Síntesis continua"); en cambio, para los

parvovirus autónomos, la proporción de iniciación para los ex tr e m o s de las formas replicativas es diferente, dando como re s u l t a d o q u e o u e n c a p s i d a D N A con una polaridad pre o n d e r a n t e (Lusby et al 1981).

Se ha detectado la presencia de una secuencia invertida repetida en los extremos del genoma de estos virus, lo cual permite su circularización bajo ciertas condiciones. Analizando los extremos de las cadenas, se ha demostrado que las secuencias anteriores tienen una longitud de 145 nucleótidos, de los cuales los primeros 125 muestran alta complementación en sí mismos, formando una estructura en forma de "Y" en la cual 107 de los 125 nucleótidos son bases apareadas (Lusby et al 1980). La topología de esta estructura en forma de gancho es similar a la presentada en el extremo 3' del genoma de par v o v i r u s autónomos de roedores, aunque la secuencia de nucleótidos terminales de los dos grupos de virus son completamente diferentes (Challberg y Kelly 1982).

Adenovirus.- Presentan genoma lineal con moléculas de DNA bi ca te n a r io que contienen entre 35,000 - 45,000 pares de bases. Semejante al genoma de parvovirus, el genoma de adenovirus po see estructuras terminales especializadas que tienen una función importante en la replicación del DNA (Challberg y Kelly 1979). Su capacidad para formar estructuras circulares indica la presencia de secuencias repetidas invertidas en los extremos de las cadenas del DNA (Challberg y Kelly 1982). La longitud de estas secuencias varía en diferentes adenovirus de 103-162 pares de bases, aunque muestra un alto grado de homología entre sí, especialmente en los primeros 50 pares de bases. En todos los casos, la secuencia de nucleótidos de los dos extremos del genoma fue la misma. La secuencia comprendida entre los nucleótidos 9-22 fue conservada en todos los adenovirus estudiados, incluyendo aquellos que infectan a cé l u l u l u s humanas (Arrand y Roberts 1979, Shinigawa y Padmanabhan

1980). Otro aspecto importante con respecto a la estructura del genoma de adenovirus, es la presencia de una proteína covalentemente unida al extremo 5' de ambas cadenas del DNA (ver "Iniciación de la replicación. Proteínas involucradas").

2.2. VIRUS CON GENOMA CIRCULAR.

Los genomas circulares de papovavirus son modelos más complejos que semejan a un replicón sencillo de células de mamífero.

Todos ellos son organizados por histonas celulares dentro de un orden periódico de nucleosomas, similar a aquellos de la cromatina celular formando un "minicromosoma" (Shelton et al 1978).

Los papovavirus pueden ser divididos en 2 grupos en base a su morfología: virus de papiloma y virus de polioma. Entre este último grupo se encuentra el virus de simio 40 (SV40), uno de los más utilizados para dilucidar la replicación del DNA en eucariotes (revisado por Fareed y Davoli 1977).

El genoma de SV40 consta de moléculas circulares de DNA dúplex con un peso molecular de aproximadamente 3.3×10^6 daltones y constituido por 5.5 Kb para cada cadena (Challberg y Kelly 1982).

Este virus, debido a su tamaño pequeño, puede codificar solamente para 4 ó 5 proteínas, por lo que requiere de la maquinaria celular para su replicación. Por esta razón, la interacción virus-célula hospedante ha sido utilizada para dilucidar el proceso de síntesis del DNA en eucariotes.

2.3. PLÁSMIDOS DE LEVADURA.

Los avances genéticos logrados en la replicación del DNA en levaduras, hacen de estos organismos un sistema útil para el estudio del proceso en eucariotes. Además se han identifi-

cado dos clases de DNA extracromosomal, los cuales permiten profundizar en el análisis de la replicación: el plásmido 2 μ m, presente en forma natural en la mayoría de las levaduras (Livingston 1979), y plásmidos quiméricos, producidos por recombinación *in vitro* (Strulh et al 1979, Hsiao y Carbon 1979, Chan y Bik-Kwoontye 1980).

El plásmido 2 μ m de levadura es una molécula circular de DNA de aproximadamente 6 Kpb, presente en un número de 50-100 copias por célula en la mayoría de las cepas (Challberg y Kelly 1982). El plásmido consiste de 2 segmentos de DNA (2.7 y 2.3 Kbp) separados por dos copias de 599 pares de bases que son secuencias invertidas repetidas una de otra (Hartley y Donelson 1980). La función fisiológica de este plásmido no se conoce y, de acuerdo a los datos reportados por Livingston y Hahne (1979), Nelson y Fangman (1979) y Zakian et al (1979), el plásmido está localizado -por lo menos una sola vez- en el núcleo, y su replicación es regulada por los mismos genes que controlan la iniciación y terminación del DNA nuclear.

Algunos plásmidos híbridos han sido probados por su habilidad para servir como templados para la replicación del DNA *in vitro* (Jazwinski y Edelman 1979; Kojo et al 1981). Estos plásmidos se construyen uniendo diferentes fragmentos de DNA, obtenidos por la acción de enzimas de restricción a cadenas de DNA de origen diverso. Aparentemente, la replicación que ocurre en estos sistemas *in vitro* es similar a la que ocurre *in vivo*.

La existencia de estos sistemas, junto con la disponibilidad de levaduras mutantes con defectos en la replicación del DNA, pueden proporcionar avances bioquímicos y genéticos en el aislamiento y caracterización de las proteínas de replicación.

Además, el número de sistemas de estudio puede ser ampliado y su explotación hará posible análisis más detallados y descriptivos del proceso de síntesis del DNA en eucariotes.

III.- INICIACION DE LA REPLICACION

La iniciación de la replicación abarca una serie de eventos que "encienden" la síntesis del DNA, tales como el reconocimiento de él o los sitios de origen y su activación mediante mecanismos que aún no están totalmente esclarecidos.

3.1. SECUENCIAS DE ORIGEN Y MECANISMOS CEBADORES.

Se sabe que el genoma de algunos virus de eucariotes inicia su replicación sobre un sitio único llamado "origen de replicación", pero los cromosomas de mayores dimensiones, como es el caso de células eucariotas, inician la replicación en varios sitios a la vez, de los cuales se conoce poco hasta el momento.

Numerosos estudios acerca de patrones de iniciación (revisados por Hand 1978), presentan dos conclusiones básicas: 1) La iniciación es regulada tanto en espacio como en tiempo y 2) Los patrones de iniciación varían dentro de una misma especie, dependiendo de las condiciones de crecimiento.

Aparentemente, los orígenes de replicación de DNA en parvovirus se localizan en los extremos 5' y 3' del genoma, presentando forma de "ganchos" (Faust y Mord 1979). La presencia de estructuras en forma de gancho, tanto en el DNA viral maduro como en las formas replicativas (RF) intracelulares, sugieren que la iniciación involucra un mecanismo autocebador (Challberg y Kelly 1979), aunque también se han obtenido evidencias de la posible intervención de una proteína en el mecanismo de cebado (ver "Proteínas involucradas" en este capítulo).

Estudios basados en la incorporación de radioactividad

sobre intermediarios replicativos de AAV, mostraron que el origen de cada una de las cadenas complementarias del monómero RF es, o se encuentra cercano a su extremo 5', y la dirección de síntesis de la nueva cadena es 5'-3' ya que ésta desplaza a la cadena de la RF que posee su misma polaridad (ver Fig. #7). Para formar la RF, modelos de estudio *in vitro* mostraron que el extremo 3' del genoma viral es capaz de servir como cebador para la síntesis de la cadena complementaria para varias DNA polimerasas diferentes; por lo tanto, la replicación de DNA en AAV aparentemente involucra un mecanismo autocebador como en el caso anterior (Challberg y Kelly 1982).

Debido a la relativa facilidad para obtener el genoma lineal intacto de doble cadena en adenovirus, y a su estructura y organización genética bien definida, estos microorganismos representan un buen modelo de estudio para la replicación del DNA eucariótico. Estudios realizados *in vivo* muestran que la iniciación de la replicación ocurre sobre o cerca de los extremos 5' del genoma viral, vía una RF formada por una de las cadenas progenitoras y la nueva cadena sintetizada a partir del extremo 5' de la cadena progenitora a la cual desplazó y que poseía la misma polaridad que ella (Fig. # 4).

La cadena progenitora liberada es capaz de servir como molde para la formación de otro intermediario replicativo, cuya síntesis se inicia sobre o cerca del extremo 3' de la cadena progenitora. En todos los procesos de síntesis, la dirección del crecimiento es 5'-3' (Challberg y Kelly 1979). (Fig. # 8). No han tenido bases experimentales los modelos para iniciación en adenovirus que postulan un mecanismo autocebador. Hasta la fecha, diversas investigaciones han conducido a postular que la replicación en adenovirus está cebada por una proteína terminal (Rekosh et al 1977, Challberg y Kelly 1979, Desiderio y Kelly 1981).

Conclusiones aportadas por Desiderio y Kelly (1981), indicaron que el evento primario en la iniciación de la replica

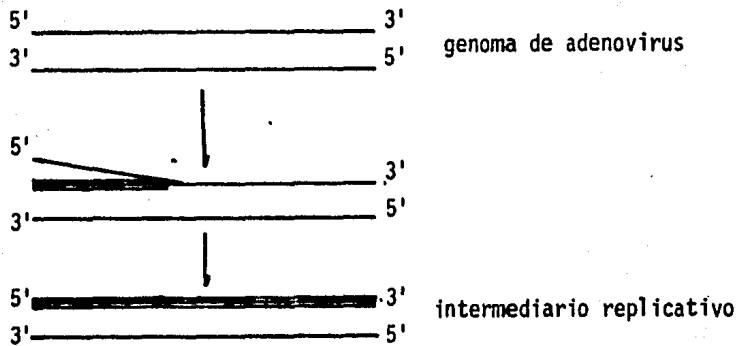


FIG. No. 4.- Formación del Intermediario replicativo durante la replicación del genoma de adenovirus.

ción es la formación de un enlace tipo ester entre el grupo α -fosforil de dCTP, y el β -OH de un residuo de serina del precursor de la proteína terminal (de 80kd). Como resultado de esta interacción, el 3'-OH del residuo de dCMP, el cual está unido covalentemente a la proteína 80 Kd, puede servir como cebador para la subsecuente elongación de la cadena.

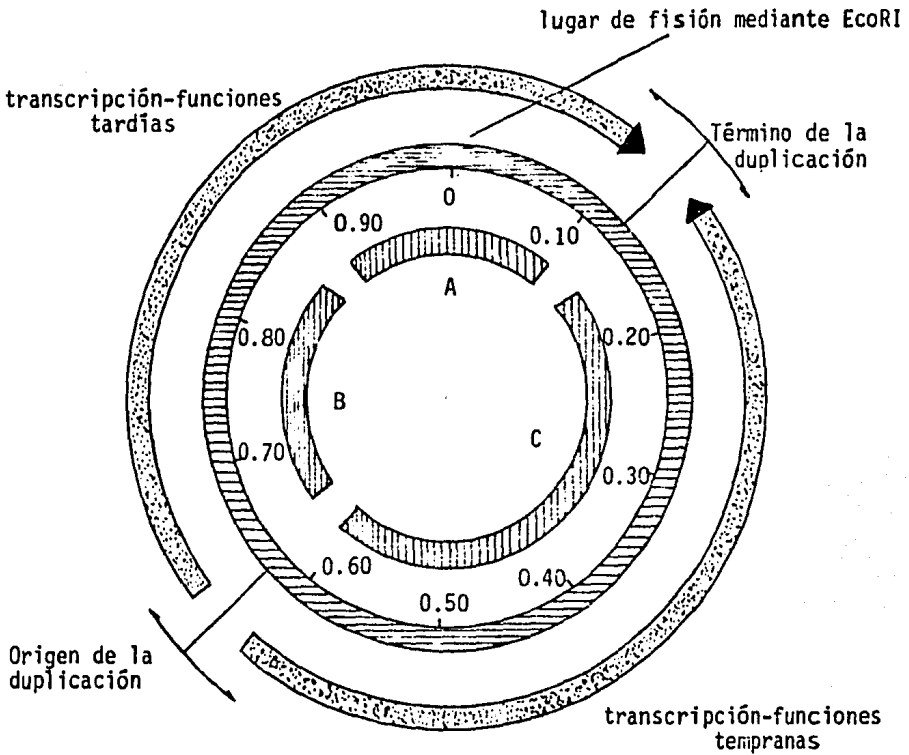
En forma semejante a como ocurrió *in vivo*, los sistemas de replicación *in vitro* para adenovirus procedieron por un mecanismo de desplazamiento y se iniciaron en o cerca de, los extremos del genoma (Challberg y Kelly 1979). Lo anterior tuvo su base en estudios de distribución de radioactividad en el genoma con respecto al tiempo de incubación. Resultados que también apoyaron esta homología de acción, fueron aportados por el uso de mutantes sensibles a temperatura (Chen et al 1980) los cuales permitieron obtener cultivos sincronizados *in vitro* para la localización del origen de replicación y la forma en que procedió la misma.

Los virus de simio 40 (SV40) y virus de polioma, son dos miembros del grupo de papovavirus que han sido intensamente estudiados durante los últimos 10 años. El ciclo de desarrollo de SV 40 en células de mono involucra expresión secuencial de elementos genéticos virales localizados en su DNA circular dúplex en el siguiente orden (Farred y Davoli 1977):

- Transcripción de genes tempranos.
- Procesamiento y traducción de RNAs tempranos.
- Replicación del DNA viral.
- Transcripción de genes tardíos.
- Procesamiento y traducción de RNAs tardíos.

La replicación del DNA de SV 40 en células infectadas comenzó en un sitio específico localizado entre los genes tempranos y genes tardíos, procediendo en forma bidireccional. En la mayoría de los casos, el origen (ori) se localizó cerca del sitio de acción de la endonucleasa Bgl I ubicado en la posición 0.66-0.67 sobre el mapa genético estandar de SV 40 (Fig. # 5), abarcando aproximadamente 75 pares de bases (Nathans y Danna 1972).

Martin y Setlow (1980) reportaron observaciones, utilizando microscopía electrónica sobre intermediarios replicativos de SV40, las cuales establecieron que el 98% de los intermediarios iniciaron la replicación aproximadamente a 35 nucleótidos de uno de los lados del sitio Bgl I, en tanto que aproximadamente el 1% de las moléculas iniciaron el proceso aproximadamente a 2,400 nucleótidos del sitio Bgl I. Las moléculas restantes comenzaron en sitios diversos.






- Clave:  DNA  RNA  Proteínas
- A= Proteína principal de la cubierta o cápside
 B= Proteína menor de la cubierta o cápside
 C= Antígeno T.

FIG. No. 5.- Cromosoma circular del SV40, en el que se indican sus tres genes, los puntos de iniciación y terminación para la duplicación del DNA y la pauta de transcripción de sus genes tempranos y tardíos (Watson 1978).

Dentro del mapa estandar de SV 40 el centro de replicación para el segundo sitio de iniciación se encontró en la posición 0.18, el cual corresponde a un sitio de unión de alta afinidad para el antígeno T (ver "Iniciación de la replicación. Proteínas involucradas").

Los orígenes de replicación de SV 40, virus de poliooma y virus Bk, presentaron sorprendente homología (Laskey y Harland 1981), incluyendo un palíndromo de 27 pares de bases, constituido principalmente por G+C (una secuencia que puede ser dibujada como estructura cruciforme), el cual puede estar relacionado con el mecanismo bidireccional de la iniciación (Fig. #6). Dentro de esta secuencia simétrica del origen de SV 40 se encontró el sitio de unión para el antígeno T, una proteína necesaria para la iniciación de la replicación.

Gracias a la disponibilidad de mutantes de SV 40 se ha podido analizar el origen de replicación y la importancia de su alteración durante el proceso viral. Shortle y Nathans (1979) construyeron mutantes con substitución de bases sobre o cerca del origen de replicación y las correlacionaron con la proporción de replicación observada en ellas. Los investigadores llegaron a la conclusión de que no es esencial una secuencia única de nucleótidos sobre el sitio de origen para que la replicación se lleve a cabo, pero la proporción de replicación del replicón viral depende de la secuencia precisa sobre el sitio determinado como el origen; es decir, entre más alterada sea la secuencia de bases sobre la zona de iniciación, menor será la cantidad de síntesis de DNA que se lleve a cabo.

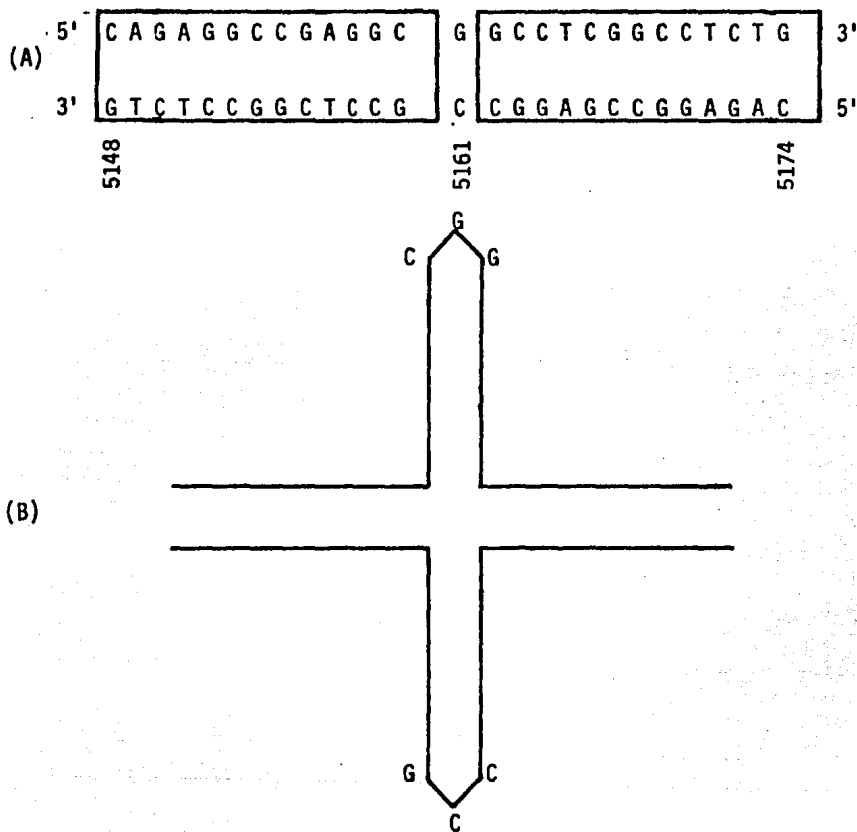


FIG. No. 6.- (A) Secuencia de bases en el palíndromo de 27 p.b. sobre el origen de replicación.

Los números muestran la posición del nucleótido asignado. BgII corta dentro de este palíndromo (Shortle y Nathans 1979).

(B) Representación cruciforme de la secuencia antes descrita.

Es consecuencia de la complementación de bases presentes en esta estructura (Tijan 1978).

Recientemente, Tseng y Ahlem (1984) efectuaron estudios más detallados sobre los sitios de iniciación en la región de origen de SV 40, utilizando la DNA primasa purificada de ratón sobre este origen (la DNA primasa es el nombre genérico para una RNA polimerasa que sintetiza oligorribonucleótidos que ceban la iniciación de la síntesis de DNA). Este análisis reportó sitios de iniciación sobre las dos cadenas del genoma viral. Utilizando como templado la cadena continua (leading), los principales sitios de unión para primasa consistieron de 4 puntos de encendido localizados en un fragmento de 10 nucleótidos a los que se les asignaron los nucleótidos 5210, 5214, 5218 y 5220. En la cadena discontinua (lagging), seis sitios de unión fueron detectados cada uno dentro de la secuencia 3'C-C-C-G-C-C 5' la cual está repetida 2 veces dentro de fragmentos de 21 pares de bases idénticos que se encuentran en el genoma de SV 40 por triplicado. Estas secuencias de 21 pares de bases se localizaron cercanas al origen de replicación del genoma viral.

A pesar de encontrarse sitios de unión para primasa en ambas cadenas, aparentemente los primeros eventos para la síntesis del DNA se localizan en la cadena continua.

Como se mencionó anteriormente, el antígeno T es una proteína necesaria para la replicación de SV 40 y de acuerdo a estudios *in vitro*, la interacción directa del antígeno T con el origen de replicación puede ser el evento inicial en la síntesis del DNA viral (Tijan 1978).

En vista de la estructura dúplex de la molécula de DNA en SV40, una de las cadenas integrantes es sintetizada en forma continua y la otra en manera discontinua ya que las DNA polimerasas solo actúan en dirección 5'-3'. En la cadena continua se reportó la presencia de RNAs cebadores en forma esporádica a lo largo de la misma (Challberg y Kelly 1982), en tanto que para la cadena discontinua la presencia de tales RNA cebadores fue detectada en una cantidad mucho mayor pues, prácticamente,

cada fragmento que fue sintetizado *in vitro* a partir de la horquilla de replicación (Fragmentos de Okazaki), portaba un oligorribonucléotido cebador en su extremo 5' (Eliasson y Reichard 1978). En forma general, estos cebadores fueron de longitud uniforme (aproximadamente 10 nucleótidos) y composición diversa (ver: "Elongación de cadena. Síntesis discontinua y RNA cebadores"). La enzima responsable para la síntesis del RNA cebador recibió el nombre genérico de DNA primasa, ya que aparentemente las RNA polimerasas conocidas no fueron responsables de tal actividad.

Aunque los papovavirus representan un modelo útil para el estudio del mecanismo por el cual la replicación del DNA puede iniciar en sitios internos, existen diferencias entre iniciación viral e iniciación cromosomal (Laskey y Harland 1981): primero, el cromosoma de eucariotes no requiere antígeno T para replicar y segundo, la replicación viral ocurre varias veces durante el ciclo celular en tanto que la síntesis de DNA cromosomal está finamente regulada y las moléculas no se replican mas que una sola vez durante el ciclo celular.

Una alternativa para analizar los sitios de iniciación fue el uso de mecanismos de replicación autónomos en plásmidos de levadura.

El plásmido natural 2 μ m de levadura se replica solamente en la fase S del ciclo celular y cada molécula lo hace por una sola vez. Su replicación es regulada por los mismos genes que controlan la iniciación y conclusión del proceso en DNA nuclear. Experimentos en DNAs quiméricos que contienen todo o parte del plásmido de levadura, indican que posiblemente el origen de replicación de esta estructura extracromosomal se localice dentro de una de las 2 secuencias repetidas invertidas que lo caracterizan (revisado por Hartley y Donelson 1980).

Mutaciones auxotróficas tales como *trp I* en levaduras, fueron complementadas por transformación con plásmidos bacterianos que contenían el gene de la cepa salvaje (Struhl et al

1979). La frecuencia de transformación fue baja pero pudo incrementarse hasta 100 veces, si se unía al plásmido un subgrupo de segmentos de DNA eucarióticos que permitían la replicación extracromosomal del plásmido. Este tipo de segmentos recibieron el nombre de secuencias autónomas replicativas o elementos *ars* y han sido aislados de *Saccharomyces*, *Neurospora*, *Dictyostelium*, *Caenorhabditis*, *Drosophila* y *Zea*, pero no han sido detectados en *E.coli* (Stinchcomb et al 1980). La importancia de este hallazgo se basa en que una molécula de DNA puede ser replicada independientemente de su integración dentro del genoma del huésped, sólo si contiene un sitio de iniciación que sea reconocido por las enzimas y factores esenciales para la replicación.

Por otro lado, Chambers et al (1982) trabajando con DNA de vertebrados en un sistema a base de huevos infertilizados de *Xenopus laevis*, presentaron evidencias acerca de regiones específicas de inicio para la replicación cromosomal. La naturaleza de estas regiones no es clara pero los sitios incluían el total o parte de las secuencias repetidas típicas del DNA de animales superiores. Muchas de estas secuencias repetidas están caracterizadas por abrigar promotores que conducen a su transcripción *in vitro* por la RNA polimerasa III. No obstante, la relación entre iniciación de la replicación y la transcripción requiere de estudios mas exhaustivos.

3.2. PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA INICIACIÓN.

Algunos de los sistemas que han sido utilizados para el estudio de la replicación del DNA en eucariotes presentan un requerimiento protéico específico para la iniciación de síntesis del DNA.

Revie et al (1979) aislaron formas replicativas bicatenarias a partir de células infectadas con parvovirus H-1, las cuales se encontraban covalentemente unidas a una proteína en su extremo 5'. La proteína mencionada presentó un peso mole-

cular entre 60,000-70,000. La función de esta proteína en la replicación viral es desconocida hasta el momento.

Por otra parte, los estudios realizados en adenovirus en los últimos años han indicado la presencia de una proteína relacionada estrechamente con el mecanismo cebador. Lo anterior incitó el estudio de las proteínas relacionadas principalmente con los eventos de iniciación en la síntesis del DNA. De acuerdo a datos anteriores (Desidero y Kelly 1981), la interacción del DNA de adenovirus con un residuo de serina del precursor proteico 80 Kd fue esencial para el inicio de la replicación. Para estudios mas a fondo, diversos autores utilizaron métodos variados en sus investigaciones.

Challberg y Kelly (1979) trabajaron con un sistema de enzimas solubles de células infectadas con adenovirus 5 (Ad 5) que fue capaz de replicar moléculas de DNA de adenovirus exógeno añadido. Este sistema *in vitro* mostró requerimientos específicos por proteínas codificadas por el virus y/o proteínas celulares inducidas por el virus. En el caso específico para Ad5, la proteína unida al extremo del genoma tuvo un peso molecular de 55,000. Es posible que esta proteína facilite la iniciación de la replicación por interactuar con proteínas presentes en el extracto de células infectadas.

Técnicas basadas en el trabajo con cepas mutantes termosensibles, que pueden restaurar sus características naturales por medio de la adición de un componente específico, han sido utilizadas para esclarecer qué genes están involucrados en la replicación del DNA.

Horwitz (1978) trabajó con una mutante Δ de Ad5 aislada del extracto de células HeLa infectadas. El producto del gene mutado fue un polipéptido de 72,000 daltones que se unió fuertemente a cadenas sencillas de adenovirus. Observaciones realizadas en la mutante Δ sugirieron que el defecto involucra solamente la iniciación de la síntesis, ya que el extremo soluble fue incapaz de iniciar nuevas rondas de síntesis a

temperaturas restrictivas pero sí completó los procesos ya iniciados. El defecto pudo ser restaurado por la adición de una proteína de unión a DNA de cadena sencilla de 72,000 daltones, purificada de células infectadas con virus no mutados pero no de células infectadas con virus ts. Sin embargo, si la incubación a temperatura restrictiva duraba 60 min. en estos mutantes, la adición de la proteína mencionada no era capaz de corregir la lesión aunque proviniera de virus no mutados. Esto posiblemente se debió a cambios irreversibles ocurridos en el extracto después de este intervalo de tiempo y que afectaron otros factores termolábiles presentes en el medio.

Experimentos utilizando el genoma de adenovirus (36,000 pares de bases) unido covalentemente a la proteína de 55 Kd en sus extremos 5', establecieron que la replicación *in vitro* necesitaba de 5 proteínas altamente purificadas (Nagata et al 1983), tres de las cuales eran codificadas por el genoma viral; éstas incluían a) una proteína de unión al DNA (DBP) con peso molecular de 72 Kd, b) el precursor de la proteína 55 Kd unida al extremo 5' y que tiene un peso molecular de 80 Kd, y c) una DNA polimerasa de 140 Kd dependiente de DNA (AdPol1). Las otras dos proteínas restantes purificadas de células HeLa, se designaron como Factor nuclear I (Nagata et al 1982) y Factor nuclear II (Guggenheimer et al 1984).

El Factor nuclear I es una proteína de 47 Kd que está involutada en la iniciación de la síntesis y en las etapas tempranas de la elongación. Nagata et al (1983) mostraron que el sitio específico de unión para el Factor I sobre el DNA estaba localizado entre los nucleótidos 17 y 48 del genoma de Ad5.

El Factor nuclear II es un tipo de DNA topoisomerasa I que se requiere en la elongación de intermediarios replicativos (Nagata et al 1983 bis).

Plásmidos que albergaban el origen de la replicación de adenovirus pero que carecían de la proteína 55 Kd unida al extremo 5' también llevaban a cabo la síntesis *in vitro* del

DNA, pero la eficiencia de los mismos era considerablemente menor que los sistemas que sí contenían unida la proteína (revisado por Guggenheimer et al 1984). El proceso fue semejante en ambos casos en que:

- a) Los dos sistemas requirieron secuencias específicas en los extremos del genoma lineal de adenovirus para llevar a cabo la replicación.
- b) La replicación necesitaba el precursor 80 Kd, la AdPol, la proteína de unión al DNA de 72 Kd y el Factor nuclear I.
- c) La iniciación de la replicación estuvo sujeta a la formación del complejo promotor 80Kd-dCMP.

Con respecto a este último inciso, fue necesario añadir una proteína del hospedante (denominada Factor pL) para que se llevara a cabo la formación del complejo promotor 80 Kd-dCMP en ausencia de la proteína 55 Kd unida al extremo 5'.

Los datos anteriores muestran a la proteína de 55 Kd implicada no solamente en la iniciación, sino posiblemente también en la elongación del genoma de adenovirus. Estas observaciones aún necesitan estudiarse más ampliamente.

Además de las proteínas ya mencionadas, la iniciación de la síntesis en adenovirus requirió regiones específicas del genoma viral; una de ellas se designó como Dominio I (revisado por Guggenheimer et al 1984), localizado entre los nucleótidos 9-18. La secuencia de este dominio se conservó entre los adenovirus que infectan células humanas. Tentativamente, el intervalo se identificó como un sitio de unión para el precursor de 80 Kd de la proteína unida al extremo 5'.

Guggenheimer et al (1984) reportaron una región adicional que se encuentra localizada en el extremo 3' de la secuencia de 10 pares de bases antes mencionada, a la cual designaron como Dominio II. Este dominio, consistente de 32 pares de bases, abarcó del nucleótido 17 - 48 en el genoma de Ad5 y fue esencial para la unión del factor nuclear I. Plásmidos que

portaban el Dominio II incompleto eran inactivos como templados en la síntesis del DNA.

Hasta el momento no es claro si el Factor Nuclear I actúa en reacciones tanto de iniciación y elongación de cadena o solamente en la iniciación.

Tanto el Dominio I como el II forman parte de los 50 pares de bases terminales del genoma de adenovirus que tienen la capacidad de formar una estructura con apariencia de "gancho" y que contienen la secuencia de origen para la replicación.

Otro sistema de estudio que presentó funciones relevantes para proteínas es el ejemplificado por el genoma de SV 40.

Evidencias genéticas indicaron que el producto del gene A, denominado antígeno tumoral (T), se requería para la iniciación de la síntesis del DNA viral (revisado por Fareed y Davoli 1977). Estudios bioquímicos revelaron que el antígeno T es una fosfoproteína de 96 Kd la cual es expresada en altos niveles poco después de la infección y se encuentra predominantemente en el núcleo de la célula infectada por SV 40. Se ha sugerido que el antígeno T puede usar la energía libre derivada de la hidrólisis de ATP para promover el desdoblamiento de la hélice del DNA sobre el origen, como preludeo a la iniciación de síntesis de DNA (Challberg y Kelly 1982).

Mediante el uso de plásmidos recombinantes, Myers y Tijan (1980) establecieron que el mecanismo para la iniciación en SV40 involucra una interacción directa del antígeno T con la secuencia de origen, pero que esta interacción no basta para encender la síntesis del genoma viral; una proteína híbrida denominada D2 también está relacionada con la iniciación de la replicación. Datos de microscopía electrónica indicaron que la forma predominante de la proteína D2 es un tetrámero con peso molecular de 107 Kd.

Los datos mostrados por Tijan (1978) mostraron que la proteína D2 y el antígeno T se unen secuencialmente a 3 sitios específicos dispuestos uno tras otro sobre la región de origen.

El sitio de unión I está localizado entre el codón de iniciación de proteínas tempranas y el palíndromo de 27 pares de bases; el sitio de unión II se encontró centrado en el palíndromo en posición adyacente al sitio I; en tanto que el sitio III, adyacente al sitio II, estaba cercano a la región que codifica para proteínas tardías (ver Fig. # 5). El que la proteína D2 se uniera a uno u otro sitio de los antes mencionados, dependía de la concentración en que ella se encontrara. Así, a bajas concentraciones se unía al sitio I, a concentraciones mas elevadas al sitio II y en el caso de concentraciones muy elevadas se unía al sitio III.

Aparentemente, la interacción entre el antígeno T y el sitio de unión II es necesaria para la iniciación de la síntesis del DNA viral (Shortle et al 1979). Mutaciones letales producidas en el sitio de unión II para antígeno T pudieron ser suprimidas por una segunda mutación en la región que codifica para el antígeno T (geneA). Los autores propusieron que las mutantes con antígeno T alterado interactuaban con sus respectivas mutantes de origen más eficientemente que aquellas que poseían su antígeno T natural. Así, como sucedió para el sitio de unión II de antígeno T, puede esperarse que cambios en los elementos genéticos -cuyos productos están relacionados con la iniciación de la replicación- puedan suprimir una mutación inicial en el origen.

Recientemente se han obtenido evidencias de que existen complejos proteicos de replicación en eucariotes. Algunos de ellos son complejos sencillos formados por una DNA polimerasa y una primasa (ver "Elongación de cadena. Enzimología de la elongación"); otros aparentemente contienen varias proteínas y en tal caso se les asigna el nombre de replisomas (Jazwinski et al 1983).

Estudios sobre replicación *in vitro* utilizando el plásmido de levadura 2µm permitieron dilucidar la existencia de complejos proteicos necesarios para la replicación.

Durante la obtención de fracciones a partir de extractos proteicos de levadura, Jaxwinski et al (1983) identificaron una forma de actividad replicativa de DNA de $2\mu\text{m}$, parcialmente purificada que presentaba un peso molecular aproximadamente de 2×10^6 . Cuando las fracciones contenidas en este complejo replicativo fueron incubadas con DNA de $2\mu\text{m}$, se encontraron complejos proteicos que semejaban "nudos" sobre la cadena de DNA vistos por microscopía electrónica, asociados específicamente con el origen de replicación del plásmido.

Asimismo, cuando plásmidos quiméricos que portaban un segmento autorreplicativo de levadura (*ars*) fueron incubados con este extracto de alto peso molecular, el sitio en el cual se unió el complejo coincidió con la ubicación del origen de replicación incluido en *ars* (Jazwinski et al 1983). La asociación del complejo proteico con el DNA fue sensible a KCl en concentración de 0.2 M y requería rATP y desoxirribonucleótidos trifosfatados. No obstante este último requisito, la unión no fue bloqueada por afidicolina (un inhibidor de DNA polimerasa), ni tampoco por α -amanitina (un inhibidor de RNA polimerasa), lo cual sugiere que los desoxirribonucleótidos trifosfatados pueden funcionar como cofactores en la unión del complejo proteico al DNA o bien como sustrato para la actividad de una polimerasa o primasa. Usando ensayos para otras enzimas, varias proteínas asociadas con la replicación (incluyendo la DNA polimerasa I de levadura, la DNA ligasa, la DNA primasa y la DNA topoisomerasa II) se identificaron directamente dentro de esta fracción de peso molecular elevado (Jazwinski y Edelman 1984).

Todos estos resultados son consistentes con la idea que un complejo proteico está involucrado en la replicación tanto del DNA extracromosomal de $2\mu\text{m}$ como del DNA cromosomal en levaduras.

Por otra parte, estudios con eucariotes superiores señalaron la intervención de proteínas en la inducción de síntesis

del DNA cromosomal. Gutowski et al (1985) mostraron que células linfocitarias proliferativas contenían una proteína citoplásmica capaz de inducir síntesis de DNA en núcleos aislados estáticos (quiescent). El activador de la replicación (ADR) estuvo presente en líneas celulares proliferativas y leucocitos humanos con actividad mitógena pero no se detectó en el citoplasma de leucocitos humanos estáticos. La falta de actividad en el citoplasma de estos últimos que estimulara la síntesis de DNA pudo deberse a: 1) ausencia del ADR en células estáticas, 2) presencia de ADR inactivo o del precursor, 3) presencia de señales de inhibición. Ensayos con leucocitos humanos estáticos apoyaron esta última opción, ya que detectaron una proteína estable al calor (56°C, 20 minutos) con peso molecular mayor de 50 Kd la cual inhibía la acción de ADR. El inhibidor fue igualmente efectivo sobre ADR obtenido de células normales o tumorales. Por lo tanto, es posible que el crecimiento incontrolado de células cancerosas sea debido a una falta de la habilidad para producir o responder a moléculas endógenas que inhiben a los activadores de la replicación.

IV.- ELONGACION DE LA CADENA

Semejante a como ocurre en procariotes, una vez que ha sido activado el origen para la síntesis del DNA en eucariotes, la etapa siguiente consiste en formar nuevas cadenas mediante la adición de desoxinucleótidos complementarios a la secuencia de la cadena progenitora que sirve como templado. El crecimiento de las cadenas hijas involucra la acción de varias enzimas que lleva a cabo el proceso de manera ordenada (Watson 1978).

En un principio se pensó que todas las moléculas de DNA eran de cadena doble excepto durante la duplicación, cuando parte de ella se encuentra temporalmente en forma de hebra única, no ligada por puentes de hidrógeno. En consecuencia, muchos se sorprendieron cuando ciertos experimentos revelaron concluyentemente que el DNA de varios grupos de virus pequeños existe normalmente como moléculas de hebra sencilla en los que la concentración detectada de adenina es diferente a la de timina, y lo mismo ocurre para las concentraciones de guanina y citosina. Entre los virus de este tipo se encuentran parvovirus autónomos y parvovirus defectuosos.

Este descubrimiento planteó de inmediato el interrogante acerca de la posible existencia de un mecanismo adicional de copia, en el que una hebra única de DNA sirva como matriz para generar una réplica idéntica. Este tipo de duplicación no se puede efectuar mediante la formación de una hélice doble en la que se ligen bases idénticas entre sí con puentes de hidrógeno, debido a que tal estructura es estereoquímicamente imposible.

Cuando la cadena de DNA de hebra única penetra en la célula

la, inmediatamente comienza a funcionar como matriz para el desarrollo de la hebra complementaria. La doble hélice resultante sirve a su vez como matriz para la formación de cadenas simples nuevas que luego se incorporan a partículas virales.

La importancia de conocer el mecanismo de replicación de genomas con estas características, adquirió relevancia cuando se estableció que los extremos del cromosoma de levadura están unidos por estructuras en forma de "gancho". La similitud de estas estructuras con las formas intracelulares del DNA de parvovirus, establece la posibilidad de que estos virus tomen "prestado" un mecanismo celular que opera normalmente para replicar los extremos del cromosoma (revisado por Challberg y Kelly 1982).

4.1. SÍNTESIS CONTINUA.

La replicación de parvovirus autónomos toma lugar en el núcleo de las células infectadas. La primera etapa consiste en la conversión de la cadena infectante a una forma replicativa dúplex (RF). Estas RFs producen progenie RFs mediante replicación, la cual se acumula en el núcleo y sirve como template para la síntesis de nuevo genoma viral. Análisis con endonucleasas de restricción han aportado evidencias de que los extremos de los monómeros RFs tienen dos posibles estructuras: una, en la cual la secuencia terminal forma "ganchos" y otra, en que las mismas secuencias están en configuración dúplex.

Como se mencionó anteriormente, los orígenes de replicación del DNA en parvovirus residen en los extremos del genoma y por análisis con marcaje parece probable que la síntesis del DNA proceda de un extremo del genoma al otro mediante un mecanismo netamente continuo llevado a cabo por una o más DNA polimerasas celulares en dirección 5'-3', que acoplan su acción con otras proteínas de replicación. La síntesis procede con el desplazamiento concomitante de la hebra de la RF que presen

te la misma polaridad que la cadena naciente (Fig. # 7) (Tseng et al 1978).

Semejante a los parvovirus autónomos, los parvovirus defectuosos (AAV), se replican en el núcleo de las células infectadas. La primera etapa en la infección puede proceder en ausencia del virus acarreador, pero la replicación viral y la síntesis de RNA requieren la presencia de adenovirus o herpes virus (Challberg y Kelly 1982). Formas intracelulares de AAV fueron caracterizadas, reportándose estructuras completamente similares a las reportadas para parvovirus autónomos. Moléculas RF de doble cadena fueron identificadas por análisis de sedimentación. Análisis con enzimas de restricción mostraron que los extremos de las RF pueden existir como estructuras en forma de ganchos o bien como estructuras extendidas en las cuales las dos cadenas están separadas. Los resultados arrojados por incorporación de radioactividad indicaron que el origen de replicación es o está cercano al extremo 5' del genoma y, estudios de sedimentación no revelan la presencia de fragmentos de Okazaki. Así la síntesis de AAV probablemente sea un proceso totalmente continuo. Varios intentos fueron realizados para definir la función o funciones de adenovirus para el auxilio en la infección por AAV. Algunas evidencias indicaron que la expresión de uno o mas genes tempranos de adenovirus es suficiente para la replicación de parvovirus defectuoso. Por ejemplo, mutantes de adenovirus que no pueden expresar genes tardíos son aptos como auxiliares. Además, la multiplicación de AAV se efectúa en células que han sido inyectadas con mRNAs tempranos de adenovirus (Myers et al 1980, Richardson et al 1980). Más específicamente, se estableció que el mRNA codificado por la región temprana E₄ de adenovirus fue suficiente para proveer actividad auxiliar, pero que la expresión de E₄ requiere a su vez la expresión de los genes E₁ y E₂ (Myers y Carter 1981). La naturaleza precisa del producto del gene E₄ responsable para la ayuda en la infección

por AAV, así como su mecanismo de acción son desconocidos.

Los datos disponibles acerca del modelo de replicación del DNA de parvovirus defectuosos fueron consistentes con el esquema general ilustrado en la Fig. # 7. De acuerdo a la representación esquemática, la conversión de cadena sencilla a RF dúplex ($SS \rightarrow RF$) es iniciada en el extremo 3' mediante un mecanismo autocebador y procede al extremo del templado, produciendo un monómero RF cuyas cadenas complementarias están covalentemente unidas a través de una estructura en forma de gancho. Posteriormente se introduce un corte en el sitio opuesto al extremo 3' original, creándose un nuevo 3'-OH cebador. La síntesis de DNA iniciada en este sitio genera un monómero RF con extremos extendidos.

La producción de cadenas sencillas por síntesis de desplazamiento ($RF \rightarrow SS$) inicia cuando el monómero RF con extremos extendidos es rearrreglado para producir una estructura que se semeja "orejas de conejo" (rabbit eared). La síntesis se inicia en ambos extremos 3' produciendo desplazamiento de las cadenas progenitoras. Los productos obtenidos en esta etapa son una estructura de cadena sencilla y un monómero RF con extremos en forma de gancho. La molécula de cadena sencilla puede producir nuevamente un monómero RF o bien ser encapsidada para la producción de progenie viral (revisado por Challberg y Kelly 1982).

Otra especie de virus que infecta a eucariotes y cuya síntesis de DNA se lleva a cabo en forma continua está representada por adenovirus. Como ya se mencionó, el mecanismo de cebado está mediado por proteínas, y el origen de replicación aparentemente reside en los extremos del genoma. La estructura básica de los intermediarios replicativos ha sido definida por microscopía electrónica y otros métodos físicos. Sumarizando los datos reportados, puede obtenerse el diagrama de la Fig. # 8 (Challberg y Kelly 1982). De acuerdo a él, la replicación puede iniciarse en cualquiera de los extremos 5' del

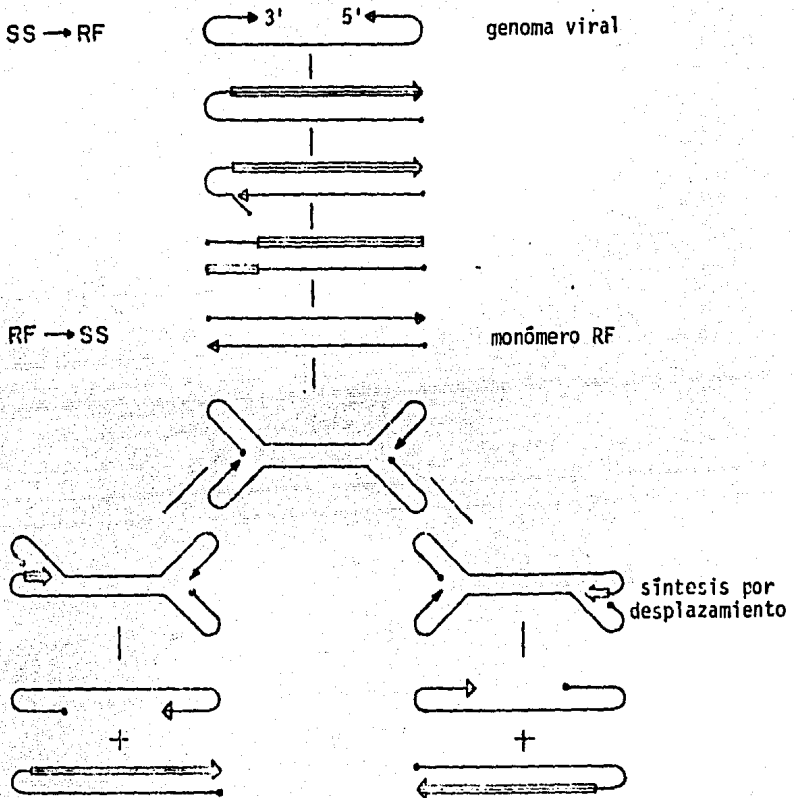


FIG. No. 7.- Modelo para la replicación del DNA de AAV:

$SS \rightarrow RF$: conversión de cadena sencilla a formas dúplex a partir del extremo 3' del genoma y posterior resolución del gancho que los une.

$RF \rightarrow SS$: formación de cadena sencilla a partir del RF, mediante el rearreglo del monómero y síntesis por desplazamiento de la cadena progenitora que presentó la misma polaridad que la cadena naciente. Los productos de esta etapa son una cadena sencilla y un monómero RF con un extremo en forma de gancho (Challberg y Kelly 1982).

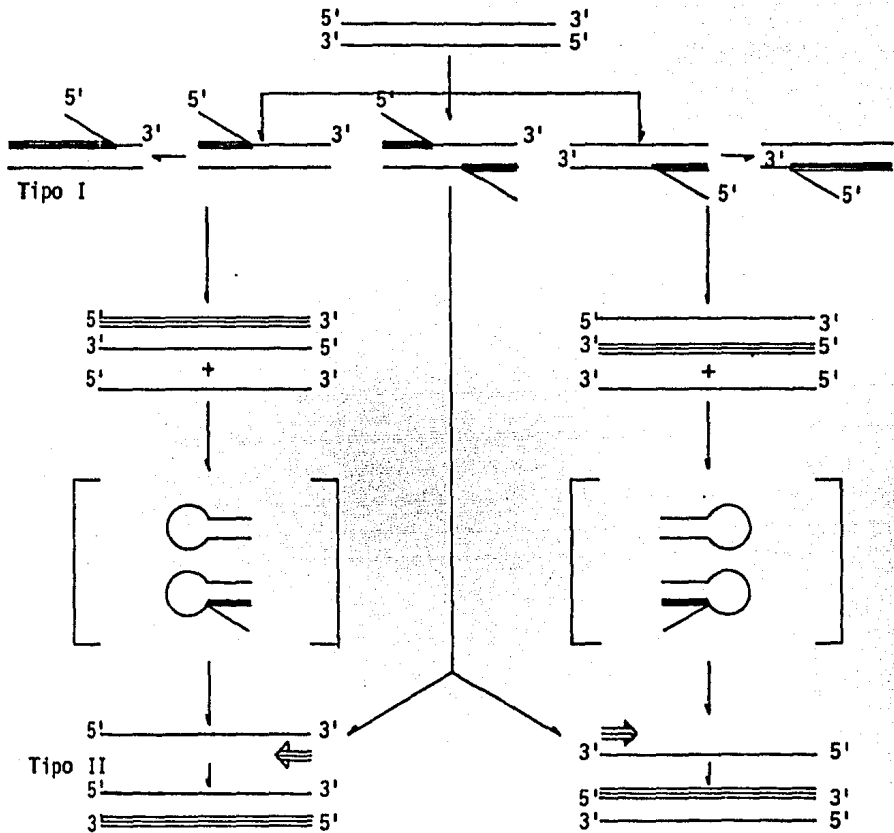


FIG. 10. 8.- Modelo de replicación de adenovirus.

La síntesis puede comenzar sobre alguna de las dos cadenas del genoma para formar intermediarios de tipo I ó bien puede iniciar en ambas cadenas a la vez, formándose 2 intermediarios tipo II. La cadena progenitora es desplazada por una nueva que presenta la misma polaridad. La cadena desplazada puede circularizarse, pues contiene secuencias complementarias en sus extremos y posteriormente sirve de molde para formar otro intermediario replicativo, mediante la síntesis de la cadena complementaria (Challberg y Kelly 1982).

genoma de doble cadena. Junto con cada evento de iniciación se sintetiza una cadena hija, con el desplazamiento concomitante de la cadena paterna de la misma polaridad, produciéndose un intermediario de replicación tipo I. La frecuencia de iniciación de los dos extremos del genoma viral es aproximadamente la misma. De acuerdo al esquema, existen dos posibles rutas para la síntesis de la cadena complementaria: Una de ellas, la principal, procede de un solo extremo hasta completar la cadena, resultando la formación de una molécula hija dúplex y la liberación de una cadena sencilla (esta última sirve como templado para iniciar síntesis de DNA, formando así un intermediario replicativo lineal tipo II); la otra ruta parte del hecho que la síntesis puede iniciarse en ambos extremos del genoma a la vez (en este caso ambas cadenas sirven como templado para la síntesis de cadenas hijas y se producen los intermediarios tipo II).

De acuerdo al modelo desarrollado, no hay necesidad para síntesis discontinua durante cualquier fase de la replicación de adenovirus. Todas las cadenas hijas crecen de su extremo 5' hacia el 3' sin necesidad de producir fragmentos de Okazaki.

4.2. SÍNTESIS DISCONTINUA Y RNA CEBADORES.

La elongación de cadena en DNA de papovavirus, virus de polioma y DNA nuclear procede en forma continua sobre la cadena continua (leading) de la horquilla de replicación, y en forma discontinua para la otra cadena (lagging); la designación de una y otra cadena será la misma que para el caso de *E. coli* revisada en la introducción.

Como sucede con la elongación en procariotes, el problema de sintetizar ambas cadenas del genoma en forma simultánea, a pesar de ser antiparalelas entre sí, se resolvió argumentando síntesis discontinua sobre aquella progenitora que corre en dirección 5'-3' (Fig. # 9).

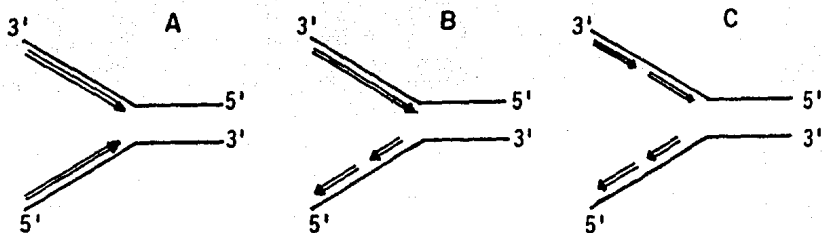


FIG. No. 9.- Posibles reacciones de polimerización sobre la horquilla de replicación.

- A = Ambas cadenas son sintetizadas en forma continua con actividades de polimerización opuestas.
- B = La elongación de la cadena naciente 3'-5' (lagging) es en forma discontinua y la cadena naciente 5'-3' se sintetiza en forma continua.
- C = Ambas cadenas son sintetizadas en modo discontinuo.

Los fragmentos producto de la síntesis discontinua (Fragmentos de Okazaki) posteriormente pasarán a formar el DNA completo, por lo que se les considera unidades fundamentales de la replicación discontinua. Tales unidades tenían una longitud promedio de 100-200 nucleótidos en eucariotes que, comparados con sus homólogos en procariotes, son 10 veces menores (Hand 1978).

Los Fragmentos de Okazaki han sido demostrados en la replicación del DNA celular, en SV40 y en virus de polio. En los 2 últimos parecen formarse principalmente en la cadena discontinua (lagging). Con los datos recopilados recientemente, aún es motivo de controversia si los Fragmentos de Okazaki provienen solamente de la cadena progenitora que corre en sentido 5'-3' o bien de ambas integrantes del genoma (DePamphilis y Wasarman 1980). La explicación que aportan algunos autores a la aparición de Fragmentos de Okazaki sobre la cadena continua es que estos resultan por la excisión de bases equivocadas durante el proceso de replicación (revisado por DePamphilis y Wasarman 1980).

La necesidad de síntesis discontinua de, por lo menos, la cadena 5'-3' de la hélice del DNA y el hecho de que las DNA polimerasas requieran un extremo 3'-OH para su acción, hizo pensar que sitios frecuentes "cebadores" son un pre-requisito para la síntesis del DNA en forma discontinua (Kornberg 1964).

El modelo de RNA cebador, el cual asume la síntesis de un oligorribonucleótido que se une al templado de DNA existente, proporcionando así el extremo 3'-OH necesario para la acción de la DNA polimerasa, fue propuesto por varios autores (revisado por Kornberg 1980). El mecanismo detallado para la síntesis de este RNA cebador puede ser diferente de un organismo a otro; no obstante, la replicación discontinua en general puede ser subdividida en las siguientes etapas representadas en la Fig. # 10 (Ogawa y Okazaki 1980):

- 1) Desdoblamiento de las cadenas progenitoras.

- 2) Síntesis de un RNA cebador utilizando una señal sobre el templado de DNA.
- 3) Extensión de una cadena de DNA en la dirección 5'-3' a partir del cebador.
- 4) Remoción del RNA cebador.
- 5) Unión de intervalos entre fragmentos de DNA.
- 6) Unión de los fragmentos del DNA.

En el caso específico de Fragmentos de Okazaki en SV 40, éstos no tienen una longitud uniforme, pues variaron entre 40 - 290 nucleótidos por cada una. Esta observación y el hecho de que los RNA cebadores fueran sintetizados a lo largo del genoma sin una preferencia obvia por secuencias específicas del DNA, hizo pensar que las cadenas nacientes tienen una cierta probabilidad de iniciarse en varios sitios dentro de una región de aproximadamente 290 nucleótidos (denominada zona de iniciación de Fragmentos de Okazaki), de la cadena 5'-3' del templado de DNA expuesto (revisado por DePamphilis et al 1979).

Estudios inherentes a identificar RNA cebadores en células humanas (Tseng et al 1978, Kowalski y Denhardt 1979), establecieron la existencia de oligorribonucleótidos de tamaño uniforme (9[±] 1 nucleótidos) y composición variable, cuyo ribonucleótido inicial covalentemente unido al extremo 5' del DNA fue una purina 5'-trifosfato.

Los 4 ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos conocidos estuvieron presentes, aproximadamente con la misma frecuencia, en la unión RNA-DNA establecida por la presencia del cebador.

Además, algunos autores propusieron que la señal de "encendido" del RNA para la síntesis del DNA durante la elongación puede estar dada por el tamaño del RNA más que por su secuencia de bases específica.

Una enzima específica diferente a las RNA polimerasas conocidas, parece ser la responsable de la síntesis del RNA cebador ya que su acción no fue inhibida por α -amanitina (un inhibidor específico de RNA pol II y III), y además rNTPs pudieron subs-

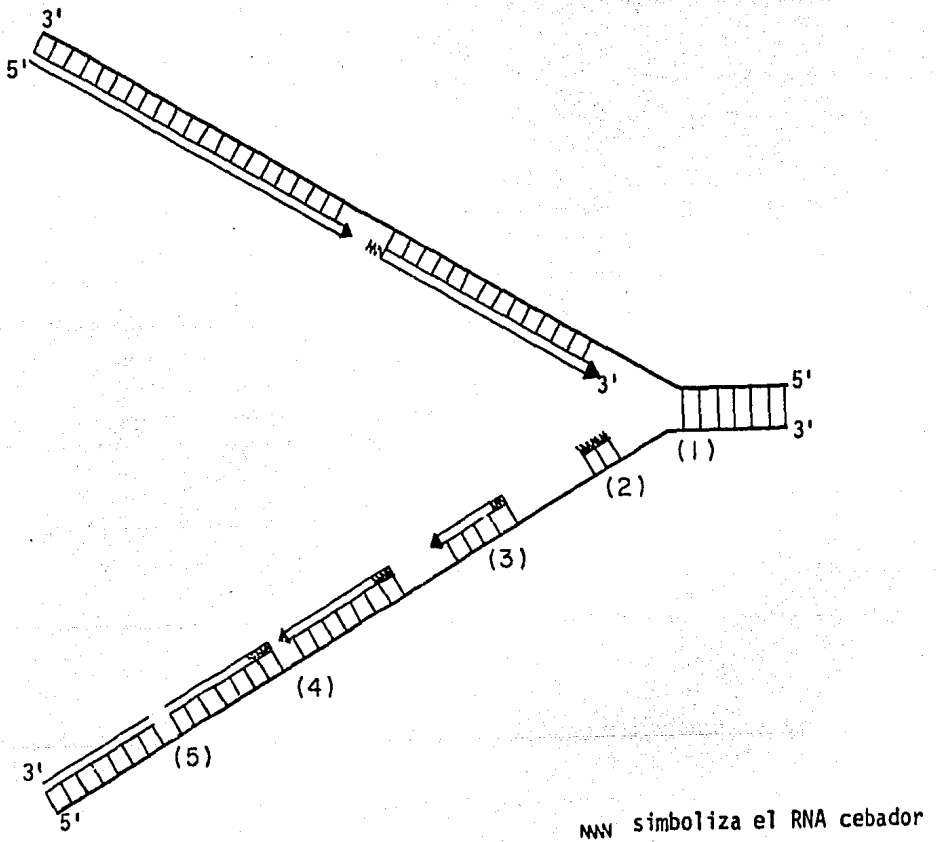


FIG. No. 10.- Esquema para la síntesis discontinua.

- (1) Desdoblamiento de las cadenas progenitoras y ruptura de puentes de hidrógeno.
- (2) Síntesis del cebador.
- (3) Elongación de la cadena del DNA.
- (4) Remoción del cebador y unión de intervalos.
- (5) Unión de los fragmentos del DNA.

tituirse por dNTPs como en el caso de la primasa de *E. coli*. No obstante, Brun y Wissabch (1978) sugirieron que la RNA pol I podría ser considerada para el proceso de cebado del DNA, pues la replicación era inhibida en presencia de suero anti-RNA pol I.

Con el fin de obtener evidencias acerca de la unión de RNA cebadores al extremo 5' de los nuevos fragmentos de DNA sintetizado, diversos métodos experimentales fueron empleados. Por ejemplo: a) transferencia de fosfato del desoxirribonucleótido al ribonucleótido vecino, b) ensayos con exonucleasa de bazo, c) digestión con DNAsa pancreática (revisados por Ogawa y Okazaki 1980, Vázquez Ramos 1985).

En el primer método, un fosfato marcado fué introducido en la unión RNA- DNA. La síntesis del DNA se llevó a cabo con un [$\alpha^{32}\text{P}$] dNTP, que es el primer desoxirribonucleótido de la cadena de DNA. Mediante hidrólisis alcalina se transfiere este fosfato radioactivo a la posición 2' ó 3' del último ribonucleótido del RNA cebador. El método no puede ser utilizado *in vivo*; no obstante, utilizado en sistemas *in vitro* de eucariotes mostró las 16 posibles combinaciones de nucleótidos en la unión DNA-RNA cebador.

Uno de los mas empleados es el que usa la exonucleasa de bazo y es como sigue: El tratamiento alcalino del DNA naciente que contiene un cebador de RNA expone un extremo de DNA 5'-OH (en lugar de 5' P) en la unión DNA-RNA. La exonucleasa de bazo degrada los extremos 5'-OH pero no los oligonucleótidos con un extremo 5'P (Fig. # 11). Así los extremos 5' de fragmentos nacientes de DNA y marcados con (^3H) son fosforilados mediante la polinucleótido cinasa y ATP; luego son tratados con álcali y entonces sometidos a la exonucleasa de bazo. El RNA es degradado por la hidrólisis alcalina, exponiendo el extremo del DNA 5'OH. De no haber RNA, la hidrólisis alcalina no afectará al DNA, que mantendrá su extremo 5'P y por tanto no habrá degradación por la exonucleasa de bazo.

Una vez que el Fragmento de Okazaki ha sido sintetizado totalmente por la DNA polimerasa, el RNA cebador es liberado de la cadena naciente a la misma velocidad que los fragmentos se unen para aumentar la longitud de la cadena. La escisión del cebador en DNA de SV 40 ocurrió en las dos etapas (DePamphilis y Wassarman 1980) siguientes: 1) Se liberó el RNA cebador, probablemente mediante la acción de la RNasa H, con excepción del ribonucleótido que se encuentra unido al DNA y 2) La remoción del ribonucleótido unido a la cadena del DNA que posiblemente requiere la acción de una exonucleasa 5'-3' (Fig. # 12).

La unión de los Fragmentos de Okazaki entre sí involucra diferentes enzimas, dependiendo de la longitud del intervalo que los separa. Si la separación entre uno y otro es la falta de un enlace fosfodiéster, la unión la cataliza la DNA ligasa sola, pero si están separados por un intervalo de DNA de cadena sencilla, entonces la acción de una DNA polimerasa y la DNA ligasa son necesarias para unirlos. Aparentemente, la DNA polimerasa α es la encargada de esta función.

El patrón de síntesis para la elongación de las cadenas del DNA se repite a lo largo del genoma, aumentando la longitud de las cadenas hijas conforme las horquillas de replicación avanzan hasta encontrarse una con otra.

En vista de que las enzimas que intervienen en la elongación son las más accesibles a ser analizadas, varios investigadores han enfocado sobre ellas su atención, proporcionando así informes más amplios que los que se registran para las etapas de iniciación y terminación de la síntesis del DNA en eucariotes.

4.3. ENZIMOLOGÍA DE LA ELONGACIÓN.

Eventos tales como replicación, reparación y recombinación requieren la acción conjunta de muchas proteínas, actuando so

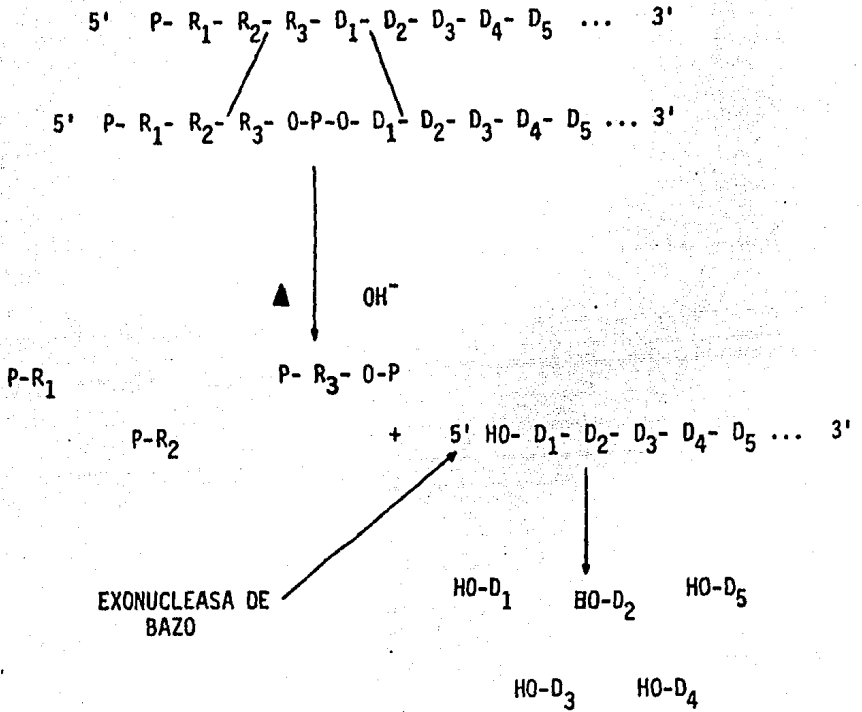


FIG. No. 11.- Método de la exonucleasa de bazo para determinar la presencia de RNA en una cadena naciente (Vázquez Ramos 1985).

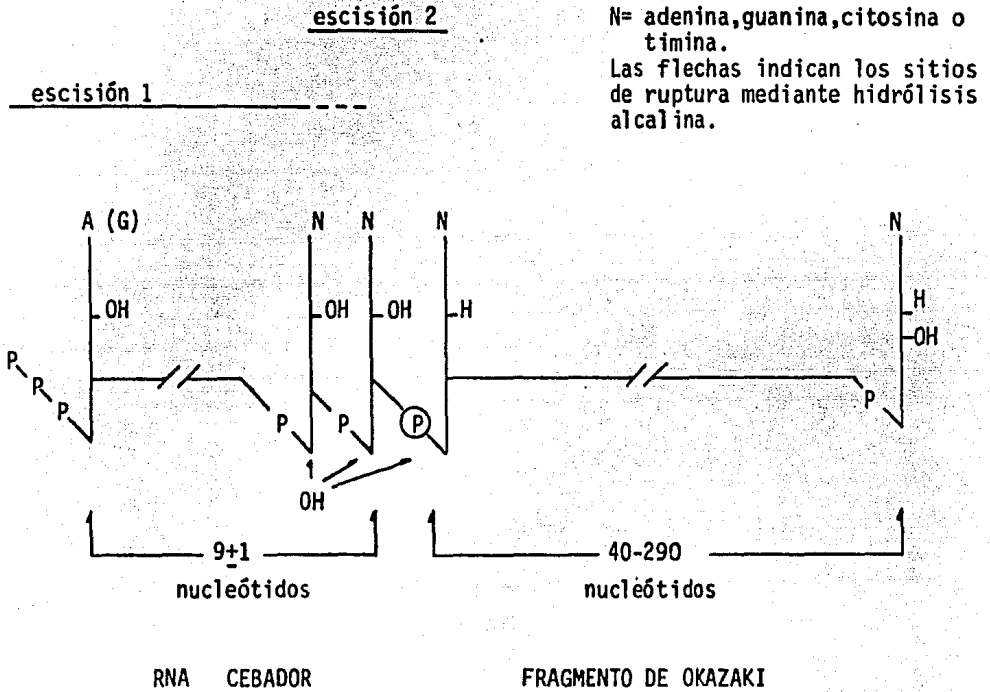


FIG. No. 12.- Escisión de RNA cebador.

La liberación del cebador se realizó en dos etapas:

Escisión 1.- Liberación del RNA menos el ribonucleótido unido al DNA (acción de RNasa).

Escisión 2.- Liberación del ribonucleótido unido al DNA (acción de exonucleasa).

las o en complejos. A continuación se enuncian las enzimas involucradas en la elongación de la cadena nascente de DNA hasta hoy conocidas, así como algunas de sus principales características.

4.3.1. DNA POLIMERASAS.

Entre todas las enzimas necesarias para esta etapa, las DNA polimerasas juegan un papel central. A partir del descubrimiento de la primera DNA polimerasa (hace 25 años), estas enzimas han sido encontradas en todos los organismos procariotes y eucariotes estudiados, guardando ciertas similitudes entre sí (Hübscher 1983):

- a) Incorporan un desoxirribonucleótido trifosfato complementario como monofosfato sobre un templado, por hidrólisis del enlace α - β -fosfodiéster en presencia de cofactores (catión divalente y DNA).
- b) Necesitan un pequeño fragmento complementario de ácido nucleico (DNA o RNA), llamado cebador, con un grupo hidroxilo libre en el carbono en posición 3 de la desoxirribonucleasa para atacar el primer nucleótido.
- c) Causan polimerización en la dirección 5'-3' de la cadena nascente.

Los estudios mas extensos sobre las DNA polimerasas en eucariotes se han realizado en:

* Eucariotes unicelulares.- *Ustilago maydis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Euglena gracilis*, *Physarum polycephalum*, *Paramecium*, *Tetrahymena pyriformis*, *Dictyostelium discoideum*.

* Insectos.- *Drosophila melanogaster*.

* Equinodermos.- Erizo de mar.

* Anfibios.- *Xenopus laevis*.

* Aves.- Embriones de pollo.

* Mamíferos.- Rata, carnero, células HeLa.

* Plantas superiores.- Trigo.

Debido a la complejidad del proceso de replicación del

DNA en eucariotes, sólo evidencias experimentales *in vitro* han sido conseguidas para estos organismos.

En algunos eucariotes se ha esclarecido que existen al menos 3 diferentes enzimas de polimerización del DNA, denominadas α , β y γ y cuyas propiedades se estudiarán más adelante. Finalmente, Byrnes (1976) presentó datos que sugieren la presencia de una cuarta polimerasa llamada δ .

La Tabla # 1 se reportó como un intento por comparar variedades de DNA polimerasas en eucariotes con respecto a 4 criterios: Peso molecular, número de subunidades, homogeneidad (una DNA polimerasa es definida como homogénea si una banda se distingue claramente sobre un gel de poliacrilamida y esta banda corresponde a la actividad de la enzima) y actividad enzimática asociada.

De la tabla antes mencionada se establecieron las siguientes observaciones:

-Peso molecular: En el caso de la DNA polimerasa replicativa, ésta posee un peso molecular elevado ($\geq 100,000-120,000$). De equinodermos a mamíferos se reportó una β polimerasa de bajo peso molecular ($< 50,000$), en tanto que para eucariotes inferiores se detectó una polimerasa semejante a β con un peso molecular de más de 70,000 dal. Para la DNA polimerasa γ de aves y mamíferos se sugirió un peso molecular bajo ($< 50,000$) para la subunidad catalítica de la enzima.

-Número de subunidades: La DNA polimerasa α en eucariotes existe como un complejo multipolipeptídico, y la DNA polimerasa γ aparentemente existe como un complejo tetrámero.

-Homogeneidad: Sólo algunas DNA polimerasas de eucariotes inferiores (*U.maydis*, *T.pyriiformis*) y superiores (*D.melanogaster*, embriones de pollo, mamíferos) han sido obtenidas, aparentemente, en forma homogénea.

-Actividad enzimática asociada: De acuerdo a la Tabla # 1, en este aspecto aún existen muchas interrogantes por responder, pero en general las evidencias indican que las DNA polimerasas

de eucariotes inferiores y superiores pueden poseer al menos una actividad enzimática adicional, además de su capacidad de polimerización (Chen et al 1979, Lee et al 1981). Capacidad de exonucleasa en dirección opuesta a la polimerización fue reportada en *Ustilago maydis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Euglena gracilis*, así como en mamíferos superiores, sólo que en este último caso se denomina a esta enzima como DNA polimerasa δ .

La identificación de las respectivas funciones de las 4 DNA polimerasas con mayor interés en eucariotes ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) ha permanecido rezagada debido a la carencia de mutantes eucariotes defectuosos en la replicación del DNA, pero algunas de las características bioquímicas han sido ampliamente ensayadas.

DNA polimerasa α .- Esta enzima es la más activa de las polimerasas de eucariotes y la más relacionada con la replicación del cromosoma. En células en crecimiento, la DNA pol α lleva a cabo el 85% de la actividad de polimerización, en tanto que para células humanas KB es de 140 Kd y su coeficiente de sedimentación de 7S. La enzima está constituida de 2 subunidades de aproximadamente 76 y 66 Kd. La DNA pol α contiene grupos sulfhidrilo esenciales para su acción y el templado sobre el cual presenta actividad óptima es un DNA cebado que contiene intervalos de 30-70 nucleótidos. Existen similitudes entre la DNA pol III de procariotes y la pol α de eucariotes en cuanto a su función, tamaño y grupos sulfhidrilo presentes en la molécula.

Durante mucho tiempo la localización de la enzima fue motivo de controversia, aunque varios autores mostraron su localización nuclear (revisado por Shioda et al 1980). Erchler et al (1977) sugirió una localización citoplásmica de la enzima además de su localización nuclear. Más tarde Bollum (1979) comprobó por inmunofluorescencia que la localización predomi-

TABLA No. 3.

Características distintivas de algunas DNA polimerasas en eucariotes con respecto a: (1) Peso molecular, (2) número de subunidades, (3) homogeneidad, (4) exonucleasa 3'-5' asociada y (5) otra actividad asociada.

<u>O r g a n i s m o</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
Eucariotes inferiores:					
<i>S. cerevisiae</i> DNA pol I	70	2	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> DNA pol II	70	2	-	+	+
<i>U. maydis</i> DNA pol A	50-55	2-4	+	+	+
<i>U. maydis</i> DNA pol B	?	?	-	?	?
<i>E. gracilis</i> DNA pol A	142-150	1-2	-	-	-
<i>P. polycephalum</i> DNA pol "α"	98-136	2-4	-	+	-
<i>P. polycephalum</i> DNA pol "β"	81	?	-	?	?
<i>T. pyriformis</i> DNA pol "α"	80	?	+	?	+
<i>T. pyriformis</i> DNA pol "β"	70	?	-	?	?
<i>D. discoideum</i> DNA pol "α"	127	?	-	?	?
<i>D. discoideum</i> DNA pol "β"	70	?	-	?	?
Insectos:					
<i>D. melanogaster</i> DNA polα	148	4	+	-	+
<i>D. melanogaster</i> DNA polβ	?	?	-	?	?
Equinodermos:					
Erizo de mar DNA polα	150	2	-	?	?
Erizo de mar DNA polβ	34	2	-	?	?
Erizo de mar DNA polγ	?	?	-	?	?
Anfibios:					
<i>X. laevis</i> DNA polα	76	?	-	?	?
<i>X. laevis</i> DNA polβ	45	1	-	?	?
<i>X. laevis</i> DNA polγ	?	?	-	?	?
Aves:					
Embriones de pollo DNA polα	148	1	+	-	-
Embriones de pollo DNA polβ	40	1	+	?	?
Embriones de pollo DNA polγ	47	4	+	?	?
Mamíferos:					
DNA polα	47-156	2-8	+	+	+
DNA polβ	39-45	1	+	-	-
DNA polγ	140-180	4	+	?	?
DNA polδ	49-60	2-4	+	+	+

Nota: Las DNA polimerasas entre comillas significan que son semejantes a la polimerasa designada en eucariotes superiores.

nante de la DNA pol α es citoplásmica en fibroblastos de bovino. Ensayos realizados con huevos infertilizados de erizo marino sugirieron que la DNA polimerasa α en el citoplasma migra hacia el núcleo durante la embriogénesis; los huevos de erizo contienen grandes cantidades de la enzima, suficiente para mantener la replicación del DNA durante las primeras etapas de embriogénesis. Trabajando con esta misma especie, Shioda et al (1980) mostraron que el organelo citoplásmico al cual se asocian las DNA polimerasas es el retículo endoplásmico rugoso; esta asociación se propuso que actúa como una forma de almacén de enzimas de polimerización. Las DNA polimerasas α y β disminuyen en el citoplasma durante las primeras etapas de la embriogénesis con su incremento concomitante en la región nuclear.

Métodos inmunocitoquímicos indicaron que la polimerasa α puede ser localizada en la región perinuclear del citoplasma.

Nakamura et al (1984) estudiaron la localización y metabolismo de la DNA pol α en células humanas, demostrando un cambio dinámico en el contenido de la enzima en fibroblastos normales y linfocitos, los cuales fueron estimulados a proliferar. Durante la fase estacionaria, las células poseían baja cantidad de la DNA pol α , pero ésta aumentó drásticamente al ser expuestas las células a estimulación para la proliferación; el contenido de DNA pol α incrementó continuamente a través de la fase S alcanzando niveles elevados en la fase G_2 y M. Posteriormente se distribuyó en las células hijas y se conservó en la fase G_1 después de la mitosis. Es decir, la DNA polimerasa α estuvo presente durante todo el ciclo celular.

La DNA polimerasa α fue la única enzima en mamíferos capaz de llevar a cabo la síntesis de DNA mediante la elongación de los RNA cebadores sintetizados por la DNA primasa (ver: "Enzimología de la elongación. DNA primasa"). La interacción de la DNA pol α con el sustrato respectivo fue un proceso secuencial y ordenado, en el cual la enzima se unió primero a la región cebador-templado de DNA. El reconocimiento de la región

antes mencionada, por la enzima, requirió un fragmento de cadena de DNA de cadena sencilla (producido por la separación de las integrantes de la hélice) de longitud mínima de 12 nucleótidos, para registrar acción de la enzima sobre el templado y una longitud de cadena sencilla entre 30-70 nucleótidos, para obtener su actividad máxima (revisado por Pritchard et al 1983).

La mayoría, si no el total, de las DNA pol α activas en células humanas y de mono han sido extraídas como un complejo con, al menos, 2 cofactores proteicos (denominadas C₁ y C₂) que juntos permitieron a la DNA pol α utilizar DNA desnaturalizado tan efectivamente como un DNA activado por DNAsa I. C₁ y C₂ interactuaron solamente con enzima de la misma fuente (Pritchard et al 1983). Este autor definió un papel específico para C₁ y C₂ como favorecedores del reconocimiento de cebadores en sustratos de DNA que contienen extensas regiones de cadena sencilla en el templado de DNA. Los cofactores mencionados no incrementaban la afinidad de la pol α por la región cebador-templado, más bien favorecían la unión a dicha región mediante la prevención de enlaces no productivos de la DNA pol α a DNA de cadena sencilla. Los enlaces no productivos reducen la velocidad de reacción al disminuir la concentración de enzima disponible.

También se han descrito factores estimuladores para levadura y *Tetrahymena*, los que estimularon específicamente sus DNA polimerasas homólogas en la iniciación de la elongación de cadenas de DNA sobre sustratos con baja proporción cebador/templado.

En cuanto a la región del cromosoma que codifica para la DNA pol α es poco conocida. Recientemente Wang et al (1985) aplicaron ensayos basados en el uso de anticuerpos monoclonales que discriminan la actividad de la DNA polimerasa α humana para identificar un locus genético, que fuera necesario y suficiente para la expresión de la DNA pol α . Este locus fue mapeado en la rama corta del cromosoma "X" humano, pero la naturaleza del ensayo no permitió esclarecer si el locus identifi-

cado era el gene estructural de la enzima, o bien un gene regulador cuya expresión fuera requerida para la actividad de la DNA polimerasa α .

DNA polimerasa β . - El nivel de actividad para polimerasa β en células en crecimiento, fue solamente una décima parte de la actividad de polimerasa α registrada en las mismas células y por lo tanto no se correlacionó a esta enzima con la replicación; en cambio se le relacionó con funciones de reparación y recombinación de DNA (Kornberg 1980), pues los niveles de actividad más elevados para esta enzima se registraron en periodos de máxima actividad de reparación en linfocitos.

La DNA polimerasa β consiste de un polipéptido sencillo con peso molecular de aproximadamente 40 Kd y un coeficiente de sedimentación de 4 S. La enzima es menos sensible que las polimerasas α y γ a la acción de agentes que bloqueen grupos sulfhidrilo y es estimulada por sales (Tabla # 2).

Ni la DNA pol α ni la DNA pol β exhiben actividad de nucleasa asociada con su capacidad de polimerización y la β no es capaz de extender cadenas de DNA a partir de un cebador.

La DNA polimerasa β aparentemente no se encuentra en eucariotes inferiores, tales como hongos y protozoarios (ver Tabla # 3) pero está presente en erizo de mar.

Los detalles enzimáticos de la reparación por escisión en células de mamíferos son poco conocidos. La etapa susceptible de análisis enzimológico está representada por la síntesis de nuevo DNA, que se requiere para substituir los nucleótidos que son removidos durante la reparación.

Se han obtenido varios datos acerca de los agentes que lesionan al DNA y su consiguiente reparación. Muchos de estos ensayos utilizaron radiaciones UV (a dosis de 5-40 J/m²) contra el DNA, observándose la necesidad de DNA pol α para el proceso de reparación. Dosis moderadas de agentes alquilantes como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina o N-metil-N-nitrosourea

inducían síntesis de reparación dependiente de DNA pol α (revisado por Mosbaugh y Linn 1983); en cambio, la síntesis de reparación inducida por bleomicina involucró DNA polimerasa β .

Atendiendo a estos datos controversiales, Dresler y Liberman (1983) realizaron un estudio en el cual inducían síntesis de reparación en fibroblastos humanos mediante diferentes agentes dañinos, cada uno administrado en un rango de dosis. Estos autores encontraron que la reparación por escisión involucró DNA pol α y una polimerasa diferente de α (probablemente polimerasa β). El grado en que cada una fue responsable de la reparación del daño fue dependiente del agente dañino utilizado y la dosis administrada del mismo. Los agentes usados fueron: radiaciones UV, N-acetoxi-2-acetilaminofluoreno, N-metil-N-nitrosourea y bleomicina. Las 4 sustancias, a dosis bajas, promovieron la reparación mediada principalmente por una DNA pol distinta de α , en tanto que a dosis elevadas la principal enzima de reparación fue DNA pol α .

Utilizando células HeLa permeables, que habían sido expuestas a bleomicina, Seki y Ohashi (1982) mostraron que la reparación del DNA involucró tanto a la DNA pol α como a la β .

DNA polimerasa γ .- Probablemente la DNA polimerasa γ sea la responsable de la replicación del DNA mitocondrial en forma preponderante, así como también de la síntesis de las RF involucradas en la replicación del DNA de parvovirus y adenovirus (Kollek y Goulian 1981, van der Werf 1980) *in vitro*. La demostración de que pol γ pueda llevar a cabo la síntesis de las RF para parvovirus y adenovirus *in vitro* no establece que esto ocurra también *in vivo*.

El peso molecular de la DNA pol γ es de aproximadamente 150,000 y, al igual que las otras polimerasas para mamíferos, no presenta actividad de exonucleasa asociada.

DNA polimerasa δ .- El primer reporte que se tuvo de esta enzima fue dado por Byrnes et al (1976), quienes detectaron acti-

vidad de exonucleasa 3'-5' asociada con la capacidad de polimerización. Similar a la DNA pol α , la pol δ presentó también un peso molecular elevado y alta sensibilidad a inhibidores que bloquean grupos sulfhidrilo (Tsang et al 1980). El peso molecular de la enzima fue estimado en 152,000 y su coeficiente de sedimentación en 7 S (igual que para DNA pol α). Si la DNA pol δ es un precursor de la DNA pol α δ si es una enzima distinta la cual tiene una función especial, aún no se esclarece; pero posiblemente con propiedad adicional de exonucleasa 3'-5', su función principal esté relacionada con la fidelidad de la replicación en eucariotes (Abbots y Lawrence 1984).

En la Tabla # 4 (Kornberg 1980) se resumen algunas características de las polimerasas α , β y γ acerca de las cuales se tiene mayor información en mamíferos.

Los inhibidores han sido de gran utilidad para dilucidar las funciones de las polimerasas, especialmente en vertebrados y mamíferos. El principal argumento para discutir los inhibidores de las DNA polimerasas es su acción selectiva entre ellas.

En la Tabla # 5 se establece la acción de algunos de los inhibidores más utilizados sobre las 3 principales polimerasas en eucariotes (HÜbscher 1983).

De acuerdo a los datos en la tabla, la DNA pol α es inactivada por todos los inhibidores, excepto 2'-3'-didesoxinucleósidos trifosfatados; en cambio, éstos fueron eficaces para inhibir la acción de las DNA pol β y γ . Para distinguir entre estas dos enzimas puede utilizarse la resistencia de la pol β a altas concentraciones (10mM) de N'-etilmaleimida.

Los 6-(arilamino)uracilos y N²-arilguaninas son análogos de dGTP y pueden ser catalogados como inhibidores específicos de las DNA polimerasas. La potencia de estos inhibidores deriva principalmente del sustituyente arilo, el cual se une fuertemente a la polimerasa sensible en la vecindad de su sitio activo, secuestrando a la enzima en un complejo no produc

tivo.

La selectividad de las arilguaninas y los arilaminouracilos, por una DNA polimerasa específica, es determinada por la naturaleza del arilo sustituyente, mostrando mayor relevancia en posiciones para y meta (Fig. # 13).

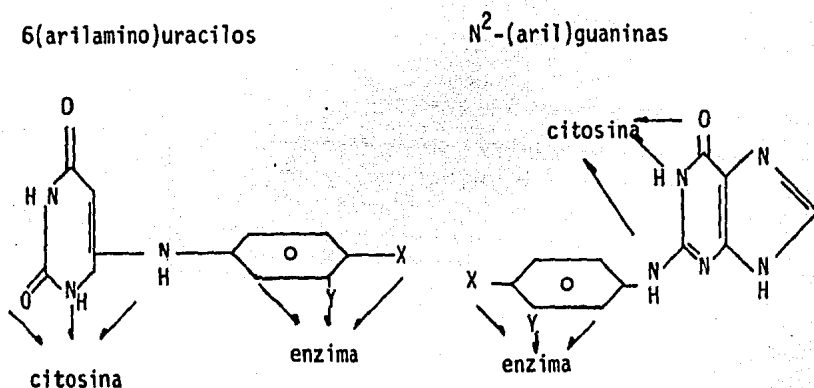


FIG. No. 13.- Estructura de inhibidores prototipo de las DNA polimerasas que muestran sub^ustituyentes involucrados en apareamiento de bases con templados de citosina y en la determinación de la selectividad por la enzima (representados como X y Y) (Khan et al 1984).

Los inhibidores 6-(p-n-butilanileno)uracilo (BuAu) y N^2 -(p-n-butilfenil)guanina (BuPG), en los cuales X =n-butilo y Y =H, fueron inhibidores altamente selectivos para la DNA pol α en mamíferos, sin actividad específica contra otras polimerasas de eucariotes o procariotes.

Posteriormente Khan et al (1984) desarrollaron la conver-

TABLA No. 4.

Características distintivas de las DNA polimerasas α , β y γ de mamíferos.

	α	β	γ
Localización	nuclear	nuclear	mitocondria
Función propuesta	replicación	reparación	rep.mtDNA
Peso molecular (Kd)	120-220	30-50	150-300
Coef. de sedimentación	6-8	3-4	7-9
Punto isoeléctrico	ácido	básico	ácido
pH óptimo	7.2	8.5	8.0
Catión preferido	Mg	Mg ó Mn	Mg ó Mn
Nucleasas	no	no	?
Actividad relativa en: células en crecimiento	100%	10%	2%
células estáticas	0-5%	100%	10%

TABLA No. 5.

Acción de algunos inhibidores sobre la actividad de las DNA polimerasas α , β y γ .

Inhibidor	α	DNA	polimerasas	γ
Arabinosil NTP's	++	-	-	-
Didesoxi NTP's	-	++	++	++
Afidicolina	++	-	-	-
N'-etilmaleimida	++	-	-	++
Fosfonoacetato	++	-	-	-

Nota: ++ significa fuerte inhibición
+ significa inhibición ligera
- significa sin inhibición.

sión del inhibidor BuPG a su correspondiente 2'desoxirribonucleósido 5'-di y trifosfatado, creando así un inhibidor de gran potencia específico para la DNA pol α : BuPdGTP. Este compuesto pudo inhibir pol α en modo tal que no involucró el secuestro de la enzima como un complejo no productivo.

La polimerasa α de células HeLa utilizada en el experimento por Khan, fue sensible al inhibidor formado en el rango na nomolar, en tanto que las polimerasas β y γ fueron completamente resistentes a concentraciones mayores de 400 micromoles.

Estudios sobre la cinética de las polimerasas durante el ciclo celular, así como sus condiciones óptimas de temperatura, pH y fuerza iónica, fueron reportados por Delfini et al (1985). La mayoría de los ensayos para las DNA polimerasas α , β y γ se llevaron a cabo por 30-60 minutos de incubación a 37°C, usando 20-40 mM de solución amortiguadora Tris (Hübscher 1983).

Los datos aportados por Delfini mostraron que cada una de las polimerasas de mamíferos tiene condiciones óptimas propias para temperatura y pH, así como una cinética especial durante el ciclo celular. Los datos para condiciones óptimas fueron: a) para la DNA polimerasa α , 4 horas de incubación a 38.1°C y pH 8.0 en 60 mM Tris/10mM MgCl₂; b) para la DNA polimerasa β , 1 hora de incubación a 36.2°C y pH 7.4 en 60 mM Tris/10 mM MgCl₂; c) para la DNA polimerasa γ , 1 hora de incubación a 38.1°C y pH 7.7 en 60 mM Tris/10mM MgCl₂.

Los datos presentados para la cinética de las enzimas durante el ciclo celular mostraron que la actividad de polimerasa α aumentó conforme la célula avanzaba a través de la fase S y disminuyó cuando entraba en la fase G₂. En la etapa temprana de la fase S se detectó una actividad de polimerización semejante a la de polimerasa β . Durante el resto del ciclo celular tanto pol α como pol β estuvieron presentes con la enzima β en forma preponderante. A la mitad de la fase G₂ se observó un incremento apreciable en la actividad total

de polimerización, el cual posiblemente se debía a pol γ , aunque un incremento de esta enzima durante la última etapa de la fase S no puede ser descartado, ya que la actividad de la polimerasa α durante esa etapa podría oscurecerlo.

Las levaduras son de especial interés para el estudio de la actividad de las DNA polimerasas, pues las características presentadas por estas enzimas en levaduras son completamente distintas de los patrones reportados para eucariotes superiores.

Chang (1977) reportó la existencia de 2 tipos de DNA polimerasas en *Saccharomyces cerevisiae*, que no presentan reacción cruzada con antisuero preparado contra una de ellas.

Ambas polimerasas de levadura, denominadas DNA pol I y DNA pol II, tuvieron un peso molecular elevado ($\geq 100,000$) y necesitaron de la presencia de un templado previamente formado y de un catión divalente. La actividad máxima para las enzimas se registró en presencia de los 4 dNTPs, con un pH óptimo de 8.2 para la enzima I y de 7.6 para la enzima II. La enzima I no presentó asociada ninguna actividad de nucleasa pero la enzima II si mostró una actividad 3'asociada, lo cual podría permitirle actuar en procesos de reparación. Si la DNA pol I tiene un papel biológico similar al de DNA pol α , esto aún no se conoce.

Los huevos del anfibio *Xenopus laevis* presentan otro patrón de polimerasas interesante, debido a los cambios que sufren estas enzimas durante la formación del embrión.

Zierler et al (1985) determinaron la cantidad de cada una de las 4 formas de DNA polimerasas (α_1 , α_2 , β y γ) presentes durante la oogénesis, maduración del oocito y embriogénesis de *X. laevis*, observando que la síntesis de las polimerasas no estuvo acoplada a la síntesis del DNA durante la oogénesis y etapas tempranas de la embriogénesis. Al parecer el oocito almacena enzimas relacionadas con la replicación del DNA, para usarlas en etapas específicas de su desarrollo. De

acuerdo a las conclusiones de los Autores, el almacenamiento es un mecanismo universal aplicable a cualquier producto genético necesario durante las primeras etapas del proceso de replicación, ya que el requerimiento del producto tendrá una demanda muy elevada, difícil de compensar si su síntesis comienza en el momento que se necesite su acción. Estas conclusiones necesitan ser apoyadas por más experimentos en éste y otros organismos eucariotes.

Mientras que los patrones de DNA polimerasas en vertebrados y en eucariotes inferiores han sido relativamente bien caracterizados, la naturaleza de las DNA polimerasas en plantas superiores presenta muchas confusiones. Algunos investigadores (revisado por Bryant 1980) sugirieron que las plantas superiores semejan a eucariotes inferiores en cuanto a sus DNA polimerasas, ya que ellas no poseen una enzima semejante a DNA pol β , pero que tienen una o más enzimas que guardan homología con DNA pol α y DNA pol γ . Otros investigadores establecieron equivalencias directas entre las DNA polimerasas de plantas y las polimerasas α , β y γ de vertebrados.

De acuerdo a la técnica descrita por Castroviejo et al (1982), 4 DNA polimerasas fueron aisladas de embriones de trigo: la DNA A, B, C_I y C_{II}. La DNA pol C fue separada en 2 fracciones, después de ser centrifugada en gradientes de glicerol. Algunas propiedades de estas polimerasas se resumen en la Tabla # 6. Conforme a estos datos, la DNA pol B y la C_{II} pudieron ser clasificadas como semejantes a la DNA pol α de vertebrados, en tanto que la DNA pol A tiene muchas características semejantes a la DNA pol γ de los mismos. El hecho sorprendente fue que ninguna de las dos enzimas semejantes a la polimerasa α pudo elongar la cadena de DNA naciente a partir de un cebador; en cambio, la DNA pol A de plantas superiores sí fue capaz de hacerlo. La cuarta enzima, la DNA pol C_I es una polimerasa de bajo peso molecular (50 Kd) que no debe ser considerada como una polimerasa β , ya que es extremadamente sen-

TABLA No. 6

Algunas propiedades de las DNA polimerasas de embriones de trigo (Litvak 1984).

	DNA polimerasas			
	A (γ)	B (α)	C _I ($\beta?$)	C _{II} (α)
Peso molecular (Kd)	140	110	50	150
Reconocimiento de polirA-oligodT	+	-	-	-
Reconocimiento de polidt-oligorA	+	-	-	-
% de inhibición				
Afidicolina (50 μ g/ml)	0	83	0	92
ddTP (ddTP/TTP = 10)	78	0	66	0
Bromuro de etidio (10 μ M)	65	10	5	14
N-etilmaleimida(1 mM)	55	61	94	54

sible a N-etilmaleimida.

La DNA polimerasa A podría ser la enzima encargada de la síntesis del DNA en forma preferencial pues, aparte de que pudo extender la cadena del DNA a partir de un cebador, esta enzima se encontró asociada con la actividad de primasa (ver "Enzimología de la elongación. DNA primasa").

Para poder establecer otras comparaciones son necesarios mayores estudios con respecto a plantas y sus patrones de replicación.

Recientemente se encontró que una etapa de transcripción reversa estaba involucrada en la replicación del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Este virus ha sido de particular interés, siendo uno de los pocos virus capaces de infectar plantas que presenta DNA en vez de RNA. Para el proceso de replicación, la RNA polimerasa II del hospedante transcribió el DNA del CaMV que se encontraba dentro del núcleo, en la forma de un minicromosoma, produciendo un mRNA de 19 S y uno más largo de 35 S (Guilley et al 1982). Aparentemente, el CaMV se replica por transcripción reversa del RNA de 35 S, aunque no es claro todavía si la transcriptasa reversa involucrada en el proceso es codificada en el genoma celular o en el genoma viral (Lityak et al 1984). Sin embargo, Tho et al (1983) y Volovitch et al (1983) reportaron una extensa homología entre la secuencia de aminoácidos de la transcriptasa reversa de retrovirus y el polipéptido codificado por el gene V de CaMV.

Más tarde Pfeiffer et al (1984) mostraron que la polimerasa asociada con la replicación de CaMV tenía un peso molecular aproximado de 75 Kd, pero sin llegar a concluir que dicha polimerasa fuera ciertamente la responsable, pues la enzima no fue aislada en forma homogénea. Esta interrogante puede contestarse mediante el uso de identificación inmulógica.

4.3.2. DNA PRIMASAS

Ninguna DNA polimerasa en procariotes y eucariotes ha sido reportada que catalice síntesis de DNA *de novo* (Kornberg 1980).

En procariotes una enzima conocida como DNA primasa ha mostrado sintetizar pequeños oligorribonucleótidos cebadores, que normalmente son extendidos por la DNA polimerasa para formar Fragmentos de Okazaki (Ogawa y Okazaki 1980).

En células eucariotas, el mecanismo de cebado ocurre a través de la síntesis de secuencias heterogéneas de oligorribonucleótidos, con 9-10 nucleótidos de longitud (DePamphilis y Wassarman 1980). Enzimas que sintetizan cebadores (DNA primasas) han sido aisladas recientemente de estos organismos.

Las DNA primasas difieren de las RNA polimerasas dependientes del DNA en que las primeras: a) poseen un peso molecular bajo, b) los productos de las primasas son cadenas cortas de oligorribonucleótidos, y c) son insensibles a α -amanitina, un inhibidor específico de las RNA pol II y III (ver "Síntesis discontinua y RNA cebadores"). Además, las DNA primasas son capaces de incorporar dNTPs en cierto límite, en tanto que las RNA polimerasas nucleares son específicas para ribonucleósidos trifosfatados (revisado por Graveline 1984).

La relación entre las DNA primasas y la síntesis discontinua en la cadena del dúplex del DNA que corre en dirección 5'-3' es muy importante, pues con estas enzimas que ceban al DNA en regiones específicas puede explicarse la elongación en ambas integrantes de la doble hélice a la vez.

La mayoría de las DNA primasas de células animales han sido encontradas asociadas con la DNA pol α , la enzima responsable para la replicación del genoma nuclear. Al ensamblaje funcional de la DNA primasa y la DNA polimerasa se le denominó DNA replicasa (Yagura y Tanaka 1983).

Recientemente, diversos Autores han reportado actividad de DNA replicasa en diferentes organismos eucariotes, tales como levaduras, anfibios, vertebrados y plantas.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo muy útil para estudiar la replicación del DNA cromosomal en eucariotes. Avances bioquímicos permitieron aislar y caracterizar una DNA polimerasa principal en levaduras (revisado por Badaracco 1983). Singh y Dumas (1984) reportaron una actividad de DNA primasa que copurificó con la actividad de la DNA polimerasa antes mencionada. En presencia de precursores de RNA y DNA de cadena sencilla, la DNA primasa sintetizó oligorribonucleótidos de longitud discreta (8-12 nucleótidos), así como cadenas largas de RNA múltiples de un segmento promedio de 11-12 nucleótidos. La DNA primasa de levadura pudo distinguirse cromatográficamente de las RNA polimerasas transcripcionales en virtud de que aquélla coeluye y cosedimenta con la DNA polimerasa principal. Estas características sugirieron la asociación de la polimerasa y la primasa en un complejo físico, el cual puede funcionar en la síntesis de Fragmentos de Okazaki.

Estudios realizados *in vitro*, a partir de huevos infertilizados del anfibio *X.laevis*, detectaron 4 polimerasas para este organismo (α_1 , α_2 , β , γ), demostrando que una de ellas catalizó la síntesis de DNA dependiente de ribonucleótidos sobre templados de DNA de cadena sencilla (Shioda y Nelson 1982). Esta síntesis fue dependiente de ATP y copurificó con la DNA polimerasa α_1 durante todos los estados de purificación. Los Autores postularon que la DNA primasa de *X.laevis* está asociada con la DNA pol α_1 y no con alguna otra de las polimerasas presentes en este organismo. En apoyo a estos datos, König y Riedel (1983) purificaron una DNA polimerasa de huevos de *X.laevis*, la cual eficientemente convirtió el DNA de cadena sencilla de fagos a una forma de doble cadena, mediante una reacción que requirió la mezcla de los 4 rNTPs.

La replicasa (DNA pol-DNA primasa) presentó una estructura cuaternaria compleja y consistió de una subunidad con peso molecular mayor de 100,000 y 3 ó 4 subunidades en un rango de

20,000 a 65,000; la actividad de primasa asociada reside probablemente sobre la subunidad catalítica mayor de la polimerasa de *Xenopus*, pues una proteólisis en la subunidad con mayor peso molecular destruyó una parte esencial de la función cebadora, pero no afectó la función polimerizadora.

El DNA complementario sintetizado por la replicasa de *X.laevis* tuvo una longitud promedio de 600-2,000 nucleótidos (Chambers et al 1982). Además, los sitios del genoma con una estructura secundaria fuerte (por ejemplo, estructuras en forma de gancho) bloquearon la acción de la enzima. Incidentalmente, König et al encontraron un doble papel para el ATP en la replicación: 1) se requiere para la síntesis del cebador y 2) para la elongación de cadena, probablemente para sortear estructuras secundarias en el templado.

Kaguni et al (1983) aislaron una DNA replicasa de embriones de *Drosophila melanogaster* la cual consistió, al menos, de 3 subunidades con valores de peso molecular de 182,000 (α), 60,000 (β) y 50,000 (γ). Al parecer, la subunidad α se requirió para la actividad de polimerización. En estudios posteriores, Kaguni et al (1984) mostraron que la actividad de DNA primasa no residió en la subunidad α sino que estaba asociada con la subunidad β y/o γ .

Ensayos de inmunoabsorción, usando dos anticuerpos monoclonales que reaccionaron con la DNA pol α de mieloma de ratón, dieron evidencias de una estrecha asociación entre actividad de DNA primasa y una subespecie de la DNA pol α de ratón. Más aún, los resultados de Yagura et al (1983) sugirieron que el sitio catalítico de la actividad de primasa y el de la actividad de polimerasa residieron en diferentes porciones de la enzima. Es probable que la DNA primasa (o una subunidad con el sitio catalítico para iniciar síntesis de RNA) sea asociada temporalmente con la polimerasa α para iniciar síntesis de DNA sobre templados no cebados (Yagura et al 1983 bis). Si esto es un hecho, la asociación y diso-

ciación de esta primasa (o subunidad) puede regular las funciones de la DNA polimerasa en células eucariotas. Los resultados de estos Autores no necesariamente indican que la DNA primasa esté asociada con la polimerasa α sobre la horquilla de replicación.

Tseng y Ahlem (1983) purificaron una DNA primasa de células de ratón en forma casi homogénea. La actividad enzimática coincidió con 2 proteínas de 56 y 46 Kd que copurificaron en una proporción estequiométrica de 1:1 y registraron un coeficiente de sedimentación de 5.5 S en gradientes de glicerol.

Ninguna actividad de polimerasa fue detectada en la fracción de mayor pureza. Tampoco fue detectada ninguna actividad de ATPasa. Los rATP y Mg^{2+} fueron absolutamente necesarios para la acción de esta enzima, la cual sintetizó oligorribonucleótidos en segmentos de 9-10 nucleótidos o múltiplos de los mismos. La mayoría de la actividad de la DNA pol α de ratón fue separada de primasa mediante hidroxilapatita, en contraste a la copurificación de polimerasa-primasa en *Drosophila melanogaster*.

El timo de carnero ha sido la fuente original para la purificación de la DNA pol α de eucariotes a gran escala, lo que permitió demostrar: a) su alto peso molecular, b) la necesidad de oligorribonucleótidos de iniciación que permitan la acción de esta enzima y c) la ausencia de actividad exonucleasa asociada (revisado por Chang et al 1984).

Los métodos tradicionales de purificación demostraron múltiples especies de la DNA pol α . Yoshida et al (1983) reportaron 3 especies distintas de las DNA pol α de timo de carnero, denominadas 10 S α , 6.5 S α_1 y 6.5 α_2 . Estas enzimas varían en su tamaño, en su capacidad para utilizar poli (rA)-oligo(dT) y su antigenicidad a un anticuerpo monoclonal. La actividad de primasa fue reportada por estos Autores en asociación con la especie 10 S α solamente. La longitud de los productos sintetizados por la primasa fueron entre 3-20 nucleótidos,

aunque predominaron los de 9-10.

Masaki (1982) mostró que la DNA pol 10 S α de timo de carnero estaba compuesta principalmente de varias subunidades, con peso molecular entre 140-150 Kd y 43-50 Kd.

Hübscher (1983) detectó la actividad de polimerasa y la de primasa asociadas con un polipéptido de 125 Kd que forma parte de la DNA pol α de timo de carnero.

Recientemente Chang et al (1984) sugirieron que la replicación del DNA en timo de carnero se lleva a cabo mediante la acción de un complejo multipolipeptídico, en donde la subunidad catalítica para la polimerización estuvo asociada con un péptido de 160 Kd, siendo un péptido de 68 Kd el responsable de la actividad de la DNA primasa.

Utilizando preparaciones de células HeLa humanas, fue posible aislar actividad de la DNA primasa, capaz de iniciar síntesis de DNA sobre homopolímeros de pirimidina de cadena sencilla mediante la síntesis de pequeños RNAs cebadores (Gronostajski et al 1984). Dicha actividad no pudo ser separada físicamente de la DNA polimerasa α , pero es menos estable al calor que esta última. La longitud de los RNAs cebadores sintetizados (10-15 nucleótidos) fue similar a los producidos por primasa de embriones de *D.melanogaster*, células de ratón y linfocitos humanos. Solamente ATP y GTP soportaron la síntesis del DNA *in vitro* por la primasa de células HeLa. Hasta el momento se desconoce si la primasa mencionada es una subunidad de la polimerasa α , capaz de trabajar en ausencia del fragmento responsable de polimerización en la enzima, o bien ambas actividades son localizadas en la misma cadena polipeptídica o si son diferentes.

En estudios más generales, Yagura et al (1983 bis) reportaron una forma de la DNA pol α asociada con la DNA primasa que fue parcialmente purificada para varios vertebrados: anfibios, salmón, erizo de mar, aves y células humanas. En todos los vertebrados examinados, 2 formas de la DNA pol α fueron sepa

radas por cromatografía de intercambio iónico; una forma (la DNA replicasa) estuvo asociada con primasa, pues utilizaba DNAs de cadena sencilla que carecían de cebador como templado. El coeficiente de sedimentación de ésta nueva forma fue ligeramente mayor al de la polimerasa carente de actividad de primasa excepto en los embriones de pollo, donde el coeficiente de sedimentación para ambas formas fue semejante.

El RNA iniciador sintetizado por primasa y obtenido de salmón, aves, erizo de mar y células HeLa tuvo una longitud de 8-10 nucleótidos.

Estos Autores también reportaron un factor estimulador obtenido de células de ascitis de Erlich, que es una proteína que consiste de 2 subunidades de aproximadamente 63,000 daltones, la cual estimula la síntesis de DNA y RNA cebador para replicasa de ratón sobre DNAs de cadena sencilla, pero no así la actividad de la DNA pol con DNA de timo de carnero activado.

Este factor estimulador también incrementó marcadamente todas las replicasas de los vertebrados estudiados por los Autores. Ante esta evidencia, puede concluirse que existe un mecanismo común para iniciar la síntesis de DNA en el núcleo celular de vertebrados.

Ensayos sobre extractos parcialmente purificados de embriones de trigo (Graveline et al 1984) demostraron la presencia de una actividad enzimática similar a las DNA primasas encontradas en procariotes y otros eucariotes. Esta enzima pudo sintetizar pequeños oligorribonucleótidos (2-15 nucleótidos) que sirvieron como cebadores para la DNA polimerasa A de trigo. Algunas de sus características se encuentran en la Tabla # 7.

De acuerdo a la tabla, la primasa de trigo tuvo un peso molecular de 110,000 y fue completamente resistente a α -amanitina, indicando que esta actividad que sintetiza RNA es diferente a las RNA polimerasas conocidas.

La primasa de trigo pudo ser separada de la masa de las DNA polimerasas mediante cromatografía en fosfocelulosa, mien

tras que en el caso de sistemas animales, el complejo DNA pol-DNA primasa copurifica a través de múltiples etapas de cromatografía.

Los resultados de Graveline et al apoyan la idea de que es la DNA pol A la encargada de llevar a cabo la síntesis del DNA nuclear en plantas superiores.

4.3.3. PROTEÍNAS QUE DESDOBLAN EL DNA DÚPLEX.

Para permitir el acceso de la maquinaria enzimática a la información contenida en el interior de la doble hélice, es necesario desenrollar el DNA dúplex para poder, posteriormente, separar la doble cadena del DNA, quedando así la secuencia de bases expuesta a la acción de las enzimas necesarias para la síntesis del DNA. Las enzimas encargadas de desdoblar el DNA fueron aisladas de mamíferos, anfibios, insectos y de levaduras (Champoux 1978). En estos casos, las enzimas fueron capaces de relajar positiva y negativamente la superhélice del DNA, algunas veces sin la hidrólisis concomitante del ATP y otras mostrando actividad de ATPasa dependientes del DNA:

La relajación del DNA se llevó a cabo mediante un corte transitorio y el subsecuente resellado de una cadena de la doble hélice.

Posteriormente, debido a su modo de acción, estas enzimas fueron consideradas como un tipo de DNA topoisomerasas involucradas en las etapas iniciales de la replicación del DNA en eucariotes (ver más adelante).

4.3.4. PROTEÍNAS DESESTABILIZADORAS DE LA HÉLICE.

Una vez desdoblada la porción del DNA por replicar, es necesario separar ambas cadenas del DNA unidas por un puente de hidrógeno y evitar que estas cadenas vuelvan a unirse. Estas acciones son llevadas a cabo por un grupo de proteínas que desestabilizan la conformación dúplex de la hélice y está for-

TABLA No. 7. ALGUNAS PROPIEDADES DE PRIMASA DE TRIGO.

Peso molecular (Kd)	110
Tamaño del RNA cebador	2-5 nucleótidos
Inhibición de síntesis de DNA (dependiente de primasa) por	DidesoxiTTP
Resistencia a	{ Afidicolina α-amanitina
Síntesis de RNA por DNA primasa resistente a	{ α-amanitina Rifampicina Afidicolina DidesoxiTTP

mado por dos tipos de enzimas: aquellas que promueven la ruptura de los puentes de hidrógeno entre bases (equivalente a helicasas en procariotes) y aquellas que mantienen las cadenas separadas, por unirse al DNA monohebra formado (Fig. # 14).

Dentro del primer tipo de enzimas, ATPasas dependientes de DNA de cadena sencilla con pesos moleculares alrededor de 130,000 y 110,000 fueron purificadas de células de *Lilium* y células humanas respectivamente (Geider y Hoffman-Berling 1981). La enzima de *Lilium* se unió al extremo 3'-OH dúplex y abrió 400 a 500 pares de bases, por extremo de dúplex en presencia de ATP. Ninguna estimulación para la DNA polimerasa fue reportada. Aparentemente la enzima realizó la separación de bases en dirección 5'-3'.

Las proteínas de unión a DNA de cadena sencilla o SSB (single strand binding protein) son enzimas que previenen la realineación de cadenas de DNA complementarias por unirse a DNA uncatenario. Estas proteínas estimularon la síntesis del DNA efectuada por la DNA polimerasa del mismo organismo, debido a que disminuyen la velocidad de disociación de enzima-templado y aumentan la fidelidad de muchas polimerasas *in vitro*. En mamíferos, esta estimulación fue confinada a la DNA pol α (Bryant 1980).

También fueron reportadas de levadura, hongos, roedores, carnero, células humanas y de una planta superior, *Lilium* (revisado por Heider y Hoffman-Berling 1981). Su peso molecular varió entre 20,000 y 36,000 Da. La actividad de estas enzimas fue modulada en algunos casos por el grado de fosforilación de las mismas.

No obstante, aún no se esclarece si estas enzimas se unen o no en forma cooperativa al DNA y -en ausencia de mutantes- poco se conoce acerca de su papel *in vivo*.

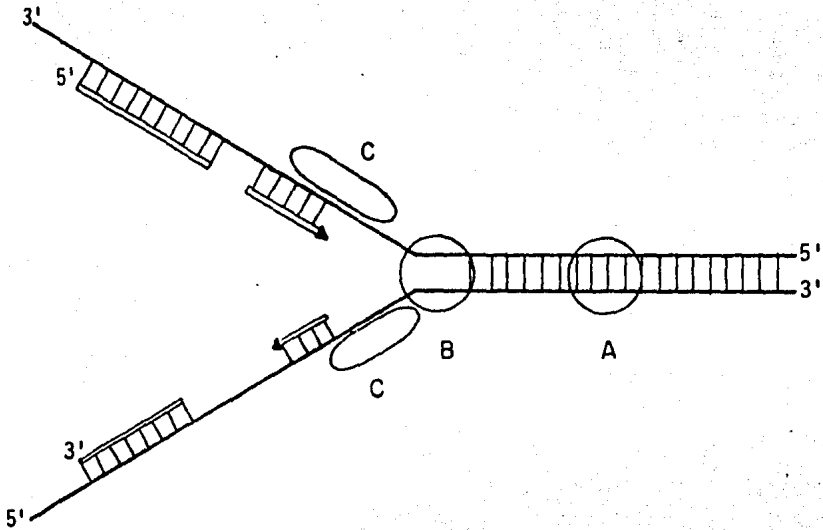


FIG. No. 14.- PROTEÍNAS NECESARIAS PARA LA APERTURA DE LA HÉLICE.

- A = Proteínas que desdoblan la doble hélice mediante corte y resellado de una cadena de la doble hélice (recientemente catalogadas como topoisomerasas)
- B = Proteínas que separan las bases de la doble hélice por ruptura de puentes de hidrógeno (tipo helicasas de procariotes)
- C = Proteínas de unión a DNA de cadena sencilla (SSB) que estabilizan el DNA monocatenario.

4.3.5. DNA TOPOISOMERASAS.

Las DNA topoisomerasas son enzimas que catalizan la conversión de un isómero topológico del DNA a otro (Fig. # 15).

Se describió la existencia de esta clase de enzimas hace varios años, pero su importancia en la mayoría de los procesos genéticos solamente ha sido elucidada en fechas recientes. La primera etapa en el estudio de estas enzimas fue el aislamiento de las enzimas que desdoblan el DNA (ya antes mencionadas) en el proceso de replicación. Así, un número de isómeros topológicos del DNA fueron descubiertos, realzando su importancia biológica.

Estas conversiones, descritas en la Fig. # 15, incluyen: la remoción o introducción de giros en el DNA circular (A); la formación o remoción de "nudos" en círculos de DNA bicatenario o uncatenarario (B); la reasociación de anillos de cadena sencilla de secuencias complementarias (C) y finalmente la formación de cadenas o el desencadenamiento de anillos de DNA dúplex (D). Todas estas diferentes reacciones pueden ser catalizadas por un mecanismo general, que consiste en la introducción de cortes transitorios dentro del DNA (Duguet 1981).

Dos tipos de enzimas pueden ser distinguidas, dependiendo del corte realizado: topoisomerasa tipo I, que involucra cortes temporales sobre cadena sencilla y topoisomerasa tipo II, que implica cortes en cadena doble.

Topoisomerasa tipo I.- La idea inicial acerca de cómo esta enzima relaja DNA superhélice infería un corte temporal en una de las cadenas, acompañado de la rotación del extremo libre alrededor de la otra cadena y el sellado posterior; este mecanismo estuvo basado en la ausencia de un cofactor energético. Información reciente, así como el estudio de la topoisomerasa tipo II, sugirieron un nuevo modelo de acción para topoisomerasa I. Este modelo supone que la enzima se une a las dos cadenas del DNA y una de ellas es cortada de tal manera que ambos extremos

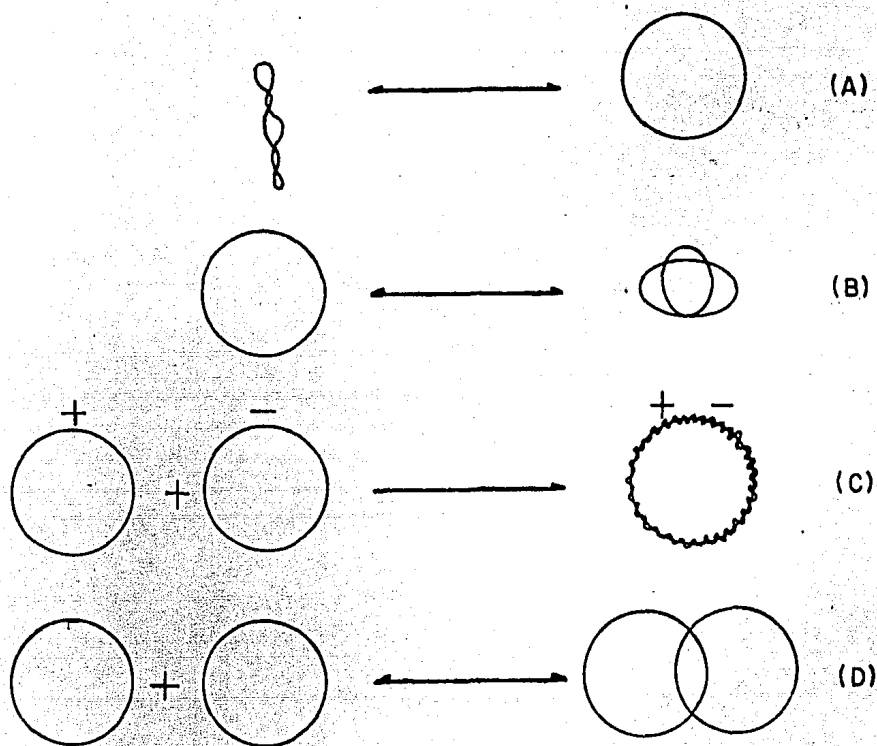


FIG. No. 15.- ISÓMEROS TOPOLÓGICOS EN DNA CIRCULAR.

- (A): Relajación y superenrollamiento
 (B): Formación de "nudos" o extensión de círculos de DNA con una o dos cadenas.
 (C): Asociación y complementación de círculos de cadena sencilla complementarios.
 (D): Formación de cadenas o desensamblaje de las mismas.

permanecen unidos a la proteína y la otra cadena pasa a través del corte temporal; finalmente, la cadena es resellada y la enzima liberada del DNA (Duguet 1981).

La mayoría de las DNA topoisomerasas tipo I detectadas en eucariotes presentaron un peso molecular de aproximadamente 70,000. Análisis con gradientes de sacarosa demostraron la presencia de una cantidad menor de topoisomerasa I con peso molecular de 140,000.

La enzima relaja la superhélice de DNA en forma positiva o negativa en ausencia de ATP y Mg, y con una actividad máxima cuando la fuerza iónica presente es moderada. Ya que el topoisomero I puede cortar y unir DNA sin necesidad de un cofactor energético, un intermediario que conserve la energía del enlace fosfodiéster del DNA fue propuesto por Gellert (1981).

Adicionalmente, se ha reportado que el topoisomero I de *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de catalizar la formación de largas cadenas de DNA doble.

Topoisomerasa tipo II.- Esta enzima cataliza varias isomerizaciones, mediante el uso de cortes transitorios en moléculas de DNA bicatenario. El descubrimiento de esta nueva clase de enzimas fue a consecuencia de un estudio extenso de las propiedades de DNA girado (Gellert 1981), una proteína que puede tratarse como un caso especial de topoisomerasa II, ya que es la única descrita hasta el momento, capaz de introducir giros en la molécula de DNA (Fig. # 15, parte A).

La enzima topoisomerasa tipo II parece estar en todas las células de procariontes y eucariotes; fue aislada de *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, células HeLa y células de timo de carnero. A pesar de que las enzimas reportadas en estos organismos no fueron capaces de producir espirales a partir de un círculo extendido de DNA, todas las demás topoisomerizaciones representadas en la Fig. # 15 las pueden realizar.

Una topoisomerasa dependiente de ATP fue purificada de

embriones de *Drosophila* (Hsieh y Brutlag 1980), mostrando que relajaba la hélice del DNA mediante un corte en la doble cadena, aunque no necesariamente este corte fue simultáneo en ambas cadenas. Esta enzima pudo relajar al DNA, tanto positiva como negativamente superenrollado. En presencia de un segundo componente protéico, la topo II fue capaz de formar largas cadenas de DNA circular; el componente mencionado no ha sido purificado pero su acción es remplazada por la histona H-1, la cual se sabe que posee la capacidad de condensar al DNA (Gellert 1981) y posiblemente funcione aumentando la concentración local de las cadenas sobre un punto determinado, incrementando la probabilidad de unión entre ellas. La acción de esta enzima fue inhibida por novobiocina pero no le afectó el ácido nalidixico (Hsieh y Brutlag 1980).

Una topoisomerasa dependiente de ATP fue parcialmente purificada de vesículas germinales de *Xenopus laevis* (Baldi et al 1980), la enzima necesitó Mg^{2+} y, en presencia de espermidina, estimuló la formación de cadenas de DNA. La misma fracción también llevó a cabo la disolución de cadenas y esta acción fue favorecida por una fuerza iónica elevada en el medio.

Topoisomerasas tipo II fueron reportadas en fracciones parcialmente purificadas de células HeLa y de timo de carnero (Gellert 1981) y, al parecer, este tipo de enzimas se encuentran distribuidas ampliamente en eucariotes. El papel del ATP en la actividad de las topoisomerasas tipo II descritas hasta el momento no ha sido esclarecido aún.

Recientemente DiNardo et al (1984) reportaron, mediante el uso de mutantes, que la DNA topoisomerasa II es necesaria para la segregación de cromosomas en la etapa final de la replicación del DNA de levaduras (ver "Terminación. Papel de la topoisomerasa tipo II en la etapa final").

4.3.6. RIBONUCLEASA H (HIBRIDASA)

Como se mencionó anteriormente, la existencia de fragmentos cortos de oligorribonucleótidos cebadores en el extremo 5' del DNA naciente, indica asimismo la presencia de una enzima que elimine los cebadores de la cadena del DNA. Esta función es llevada a cabo por la ribonucleasa H, una enzima que específicamente degrada moléculas de RNA, las cuales están unidas por puente de hidrógeno a DNA monocatenario. Esta enzima fue detectada por primera vez en timo de carnero (Hausen y Stein 1970) y a partir de entonces varios reportes se hicieron acerca de su hallazgo en organismos eucariotes, tales como mamíferos, insectos, levaduras y zanahoria (revisado por Bryant 1980). La enzima presentó un peso molecular de $7-15 \times 10^4$ Da dependiendo del organismo estudiado, requirió cationes divalentes para su actividad y tuvo un modo de acción endonucleolítico.

No existen evidencias directas de que la ribonucleasa H degrade oligorribonucleótidos cebadores en el extremo 5' de fragmentos nuevos de DNA. Solamente en tejido linfóide de bovino (Busen 1976) y en hígado de rata (Sawai y Tsukada 1977) los cambios en la actividad de ribonucleasa H ocurren en forma paralela con los cambios en la síntesis de DNA. Del mismo modo, en cultivo de células de zanahoria (Sawai 1978), la actividad de la hibridasa fue paralela con la de la DNA pol soluble, la cual a su vez es un reflejo de la replicación del DNA.

Cabe señalar que en bacterias no es absolutamente necesaria la acción de esta enzima sobre los cebadores, ya que la actividad de exonucleasa 5'-3' de la DNA pol I tiene esta función.

4.3.7. DNA LIGASA.

La DNA ligasa es una enzima que une los fragmentos nacientes de DNA al formar un enlace fosfodiéster entre el extremo 3' terminal de un fragmento y el 5' terminal del siguiente.

El primer reporte de la existencia de la DNA ligasa en eucariotes fue realizado por Lindahl y Edelman (1968), quienes

detectaron la enzima en núcleos preparados de médula y bazo de conejo. Al igual que otras enzimas asociadas con la replicación, su actividad se incrementó en periodos precedentes a la síntesis de DNA (Sawai 1977). Su actividad requirió la presencia de iones magnesio y ATP (Fig. # 16).

En todas las especies de vertebrados estudiados, 2 poblaciones diferentes de ligasa fueron distinguidas: una con peso molecular de 8×10^4 daltones, ubicada en la fracción molecular, y otra con peso molecular de $17.5-20 \times 10^4$ daltones, que aparentemente es soluble en el citoplasma, aunque no se excluye su presencia en el núcleo *in vivo* (Bryant 1980).

En vista de que la DNA ligasa se requirió tanto en replicación como en reparación del DNA, algunos Autores especularon que las dos diferentes ligasas operan en situaciones diferentes, aunque hasta el momento no se tengan evidencias para ello.

Estudios realizados con huevos infértiles de ajolote (Signoret et al 1981) revelaron que la actividad de ligasa en este sistema correspondía a una forma ligera con coeficiente de sedimentación de 6 S, pero cuando estos huevos iniciaban su división mediante una activación, la ligasa presente era remplazada por una forma pesada con coeficiente de sedimentación de 8.2 S, la cual es característica del desarrollo. El cambio mencionado ocurrió entre 3 y 9 horas después de la fertilización y solamente el genoma materno gobernó este cambio.

4.3.8. DNA METILASA.

Después de su síntesis, el DNA es sujeto a modificación por adición de grupos metilo a una porción de los residuos de citosina. Esta reacción es llevada a cabo por la enzima denominada DNA metilasa. El donador de grupos metilo es S-adenosilmetionina.

Poco se ha estudiado a esta enzima pero se sabe que está presente en el núcleo de varios mamíferos y de algunas plantas superiores. La metilasa es eficiente sobre DNA homólogo

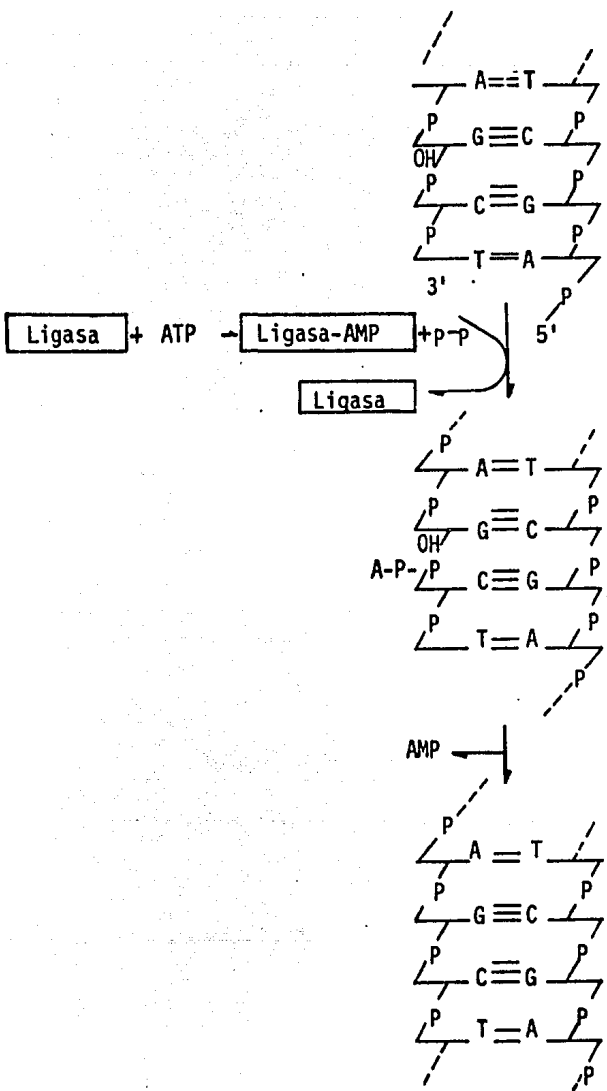


FIG. No. 16.- MODO DE ACCIÓN DE LA DNA LIGASA.

La enzima ligasa forma un complejo con el AMP (derivado del ATP por eliminación del pirofosfato). El AMP se transfiere al grupo 5'P sobre el lado 3' del corte. El corte se sella por eliminación de H₂O para formar un enlace fosfodiéster entre desoxirribonucleótidos adyacentes. La reacción requiere la presencia de iones Mg²⁺ (Bryant 1980).

y aquellos provenientes de otras fuentes.

La especificidad de la metilación parece regularse por algo más que la secuencia de bases; posiblemente algunos aspectos estructurales en la cromatina determinen la posición de los sitios de metilación de tal manera que, para que ocurra la metilación, debiera formarse primero el complejo DNA-histonas (Bryant 1980).

La importancia del proceso de metilación sobre el DNA naciente es que de esta manera la célula modifica su propio DNA, para protegerlo de la acción de enzimas restrictivas que pudieran destruirlo. Una vez que el DNA de la célula se ha metilado, las enzimas capaces de degradar DNA no tienen acceso a él (Lehninger 1978).

Como se puede observar, cada una de las enzimas citadas tiene una acción específica, que conduce a la formación de las cadenas de nuevo DNA a partir de la horquilla de replicación.

A pesar de que la elongación ha sido la etapa más accesible a ensayos bioquímicos y genéticos en células de eucariotes, son necesarias muchas más investigaciones para tener una idea más clara del proceso.

V.- TERMINACION DE LA CADENA

Se entiende como terminación a la serie de eventos que permiten completar replicones y separar los cromosomas hijos producto de la replicación del material genético. Hasta el momento, es poca la información que se posee con respecto a esta última etapa.

El mecanismo mediante el cual los cromosomas humanos realizan este proceso terminal es desconocido. Más aún, en eucariotes no se han detectado sitios específicos para la culminación de la síntesis.

Tomando en cuenta que existen varios sitios de origen para la replicación del cromosoma en eucariotes y además considerando la naturaleza bidireccional del movimiento de las horquillas de replicación, es de esperarse diversos sitios de terminación ubicados a lo largo del genoma celular; pero hasta el momento se desconoce la o las señales reconocidas por la maquinaria enzimática para dar fin al proceso de elongación de la cadena.

Uno de los hallazgos más importantes para la terminación es el descubrimiento de intermediarios de segregación, a través de los cuales se lleva a cabo la separación de las moléculas de DNA formadas.

5.1. INTERMEDIARIOS DE SEGREGACIÓN.

Una de las estructuras más estudiadas para los estados finales de la replicación es el DNA de SV 40. Durante el proceso de infección lítica, el DNA de SV 40 prolifera dentro del núcleo de la célula hospedante semejando un replicón de cromosoma de mamíferos. La característica particular de este "minicromosoma", es que presenta histonas de la célula que lo hos-

peda arregladas a lo largo del DNA viral, formando patrones análogos a los establecidos para la cromatina celular.

Como ya se mencionó anteriormente, la replicación de SV 40 se inicia sobre un sitio específico, prosigue en forma bidireccional y las 2 horquillas avanzan a velocidades semejantes, hasta que al menos el 90% de la molécula es replicada (Shortle et al 1979). El cese de síntesis en la cadena discontinua se observó que ocurre en un intervalo localizado en el sitio de acción para Hind G, que se encuentra a 180° aproximadamente del sitio de inicio; la longitud de este intervalo fue entre 22-75 nucleótidos (Farred y Davoli 1977). La separación de moléculas hijas no ocurrió sobre una secuencia única del DNA y esta variación en el punto de terminación parece resultar de la llegada desincronizada de ambas horquillas. El tiempo que transcurrió entre el inicio de la replicación y el encuentro de ambas horquillas fue aproximadamente de 10 minutos (Sundin y Varshysky 1981).

Moléculas de DNA de SV 40 circulares, separadas, pero con uniones covalentes (100-200 pares de bases de DNA no replicado), aparecieron poco después de que las horquillas convergieron. Estas estructuras tipo Cairns (Fig. # 18) sufrieron con tracciones topológicas, las cuales dieron origen a intermediarios de replicación de SV 40.

Sundin y Varshysky (1980) descubrieron y analizaron estos intermediarios y los agruparon en 3 familias (llamadas A, B y C) que comprendían múltiples dímeros de DNA encadenados y entrelazados.

DNAs con forma A.- Consisten de 2 círculos abiertos, monoméricos de DNA de SV 40, entrelazados mediante un corte o un intervalo.

DNAs con forma B.- Poseen un círculo abierto y otro covalentemente cerrado y superenrollado.

DNAs con forma C.- Ambos círculos son cerrados y superenrollados.

Para poder describir mejor la estructura de los intermediarios de segregación, los Autores añadieron un número que representará las veces que los dímeros que forman el intermediario son entrelazados uno con otro (Fig. # 17). Así pudo definirse, sin ambigüedad, la estructura de los intermediarios que fueron observados con microscopía electrónica.

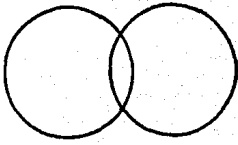
El descubrimiento reciente de estos intermediarios es de particular importancia en las etapas finales de la replicación, pues su existencia y conducta proveen mecanismos para la segregación de los 2 cromosomas hijos celulares.

La Fig. # 18 ilustra las principales formas de DNA de SV 40 que se presentaron durante el ciclo replicativo en el núcleo de una célula infectada. La forma I de esta figura es tanto la que inició la replicación como el producto de la misma. Estructuras de replicación tipo Cairns crecieron progresivamente, conforme el movimiento de las horquillas se extendió. Una vez que ambas horquillas se encontraron, la última estructura tipo Cairns presentó entre 100-200 pares de bases del DNA sin replicar. Mediante cambios topológicos, esta última estructura se convirtió directamente a dímeros entrelazados. La síntesis del DNA sella el intervalo que no había sido replicado, convirtiendo los dímeros tipo A en dímeros con forma B y posteriormente a forma C.

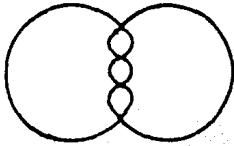
Una topoisomerasa catalizó la conversión final de la forma CI a dos monómeros separados superenrollados. Esta última etapa en la segregación de células hijas (CI \rightarrow Forma I en diagrama) pudo ser inhibida en forma selectiva por medios hipertónicos (Sundin y Varshavski 1981). Aparentemente el shock hipertónico bloquea selectivamente una topoisomerasa tipo II, cuya actividad está involucrada en desenredar los 2 círculos presentes en la estructura.

Las posibles alternativas que dieron los Autores para esta inactividad de la enzima fueron:

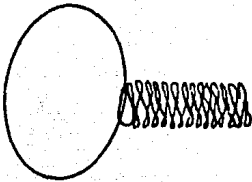
- a) El shock hipertónico actuó solamente sobre la enzima, ya



Intermediario de segregación A1:
círculos abiertos de DNA entrela-
zados una sola vez.



Intermediario de segregación A2:
círculos abiertos de DNA entrela-
zados 2 veces.



Intermediario de segregación B1:
un círculo abierto y el otro
superenrollado de DNA, entrela-
zados una vez.

FIG. No . 17.- DESCRIPCIÓN DE INTERMEDIARIOS DE SEGREGACIÓN
(SUNDIN Y VARSHAVSKI 1980).

sea provocando su disociación en subunidades inactivas, por proporcionar un ambiente iónico incompatible con la catálisis o bien por privar a la topoisomerasa II de cofactores necesarios para su acción.

b) El shock interfirió en el reconocimiento de la enzima, por la región del DNA que sirve como sustrato para la misma.

c) La enzima permaneció totalmente funcional y reconoció los sitios adecuados de unión en el sustrato, pero este sustrato era inactivo. El término "inactivo" se refiere a que el intermediario de segregación presente no es capaz de llevar a cabo ningún movimiento requerido para desenredar las cadenas del dímero.

SV 40 es el primer sistema replicativo en el cual múltiples dímeros entrelazados han sido implicados directamente como intermediarios de segregación. Es posible que mecanismos análogos operen durante los estados finales de replicación en una variedad de replicones de eucariotes.

5.2. PAPEL DE LA TOPOISOMERASA TIPO II EN LA ETAPA FINAL.

El esquema de intermediarios de segregación, demostrado por Sundin y Varshavski (1980) para la etapa final de la replicación del DNA en SV 40, implicaba la necesidad de una enzima que permitiera el paso de una doble hélice de DNA a través de un corte transitorio en cadena dúplex. Enzimas de tipo topoisomerasas II pueden desarrollar tal actividad; por lo tanto, existen fuertes evidencias para involucrar a estas enzimas en la terminación de la replicación del DNA.

La identificación y caracterización de un mutante, sensible a temperatura para la topoisomerasa II (Dinardo et al 1984), vino a reforzar los datos que se poseían acerca del papel de esta enzima en la etapa final de la replicación. La mutante aislada mostró un defecto en la segregación de los cromosomas hijos, cuando fue observada por microscopía electrónica. En

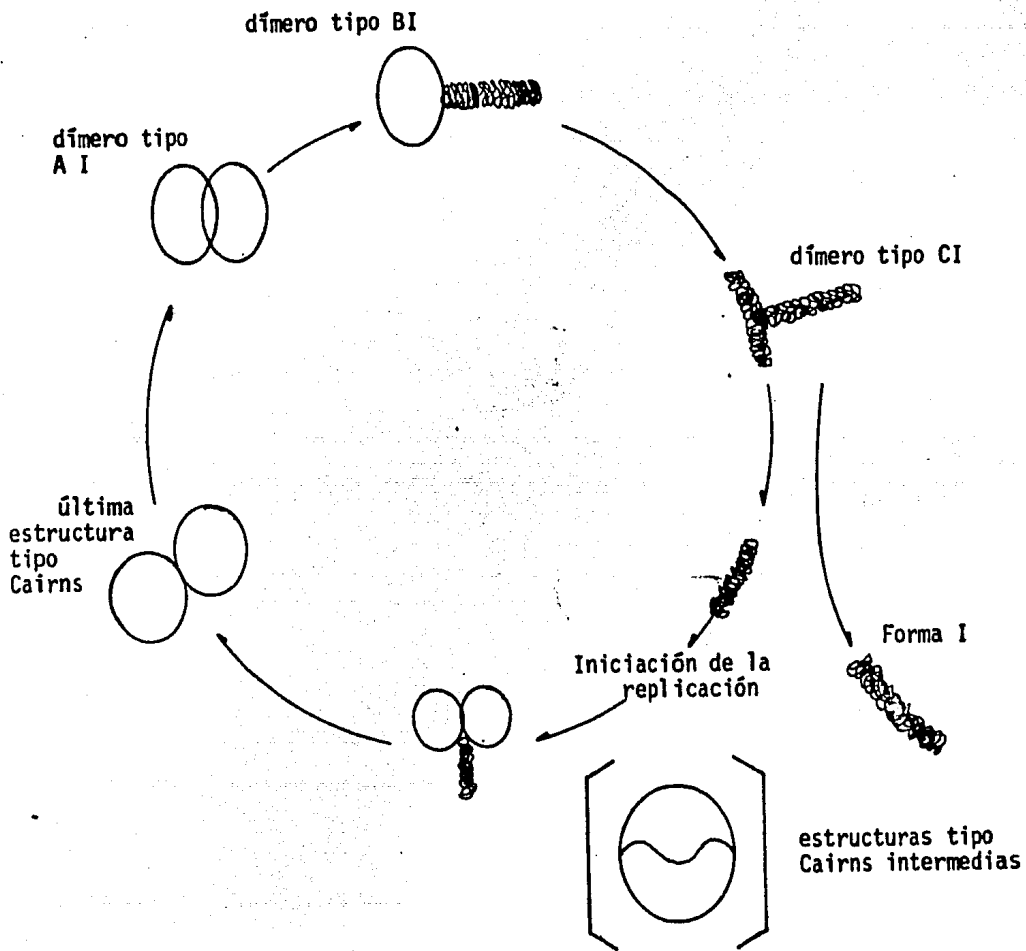


FIG. No. 18.- Dímeros encadenados de DNA durante la replicación del DNA en SV 40.

La forma I inicia la replicación formando estructuras tipo Cairns intermedias; una vez que cesa la replicación en las horquillas, la última estructura Cairns se altera topológicamente para formar dímeros tipo A, B y C formándose de este último las 2 cromátidas hijas.

ausencia de la topo II la separación de las cromátidas hermanas no ocurrió y por lo tanto la división celular no se llevó a cabo.

La disponibilidad de mayor cantidad de este tipo de mutantes, para la terminación de la cadena sintetizada, aportará valiosa información respecto a las enzimas implicadas en el proceso que -semejante a los anteriormente descritos- debe estar finamente regulado dentro del ciclo celular.

La relajación del DNA debida a la acción de las topoisomerasas conduce a una disminución en el número de enlaces entre las cadenas por separar. Este mecanismo puede provocar la ausencia de tensión torsional en el DNA nuclear de eucariotes y quizá reducir su funcionalidad.

Los procariotes pueden también llegar a tener este problema pero ellos lo resuelven gracias a que poseen la DNA girasa, una enzima capaz de introducir giros en la molécula que se está sintetizando (ver "Generalidades"), para que esta tensión no se pierda.

Hasta el momento, la DNA girasa o una topoisomerasa capaz de "enrollar" el DNA no ha sido detectada en eucariotes. Al parecer, la tensión torsional en el DNA de eucariotes se mantiene gracias a la unión entre histonas y el DNA (Gellert 1981).

5.3. ENSAMBLAJE DE LA CROMATINA.

La organización del DNA por histonas en el material cromosomal (cromatina) es crucial en la duplicación del DNA, su segregación y su modo de expresión en el ciclo celular.

Las diferencias entre la replicación del DNA de eucariotes y la de procariotes (tales como movimiento de la horquilla de replicación más lento, fragmentos de replicación más cortos y limitación del proceso a solo una parte del ciclo celular), pueden ser explicadas por la presencia de histonas en los primeros (Kornberg 1980).

Nucleosoma ha sido el término generalmente aceptado para

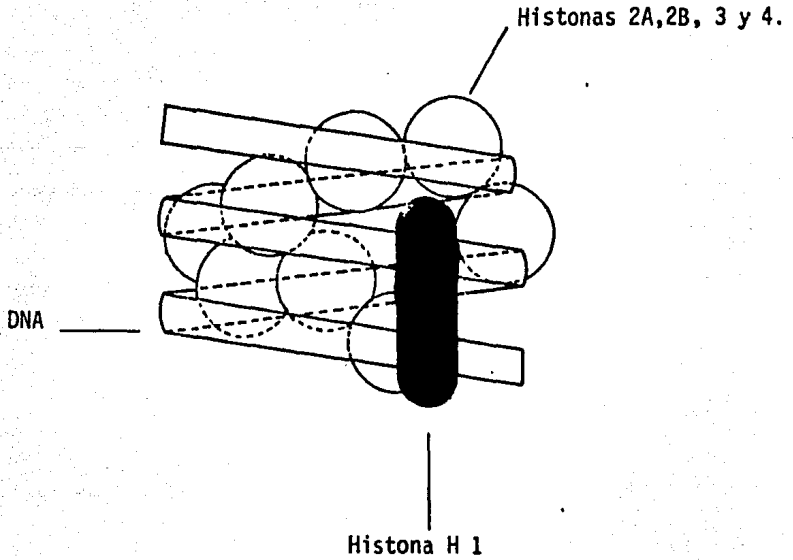


FIG. No. 19.- DIAGRAMA DE UN NUCLEOSOMA.

El DNA se enrolla alrededor del octámero de histonas compuesto por 2 moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. A pesar de que se represente la histona H1 de esta manera en la figura, su localización es aún incierta (Kornberg 1980).

designar la subunidad de cromatina. El nucleosoma está compuesto de un "cuerpo del nucleosoma", bien protegido y una región sensible a nucleasa de longitud variable (Fig. # 19). El cuerpo consiste de aproximadamente 146 pares de bases de DNA enrollado alrededor de un grupo de 8 histonas. El grupo de histonas comprende dos de cada una de las proteínas H2A, H2B, H3 y H4 (Igo-Kemenes et al 1982). La histona H I aparentemente se encuentra localizada en la región existente entre un cuerpo del nucleosoma y otro.

Los nucleosomas son desensamblados para el progreso de eventos en la replicación del DNA, tales como la separación de cadenas. Este desensamblaje puede ser una etapa limitante para el movimiento de la horquilla de replicación, lo cual permite explicar por qué las regiones sin replicar (intervalos de cadena sencilla) y los fragmentos de Okazaki -formados sobre la horquilla de replicación- son más pequeños en eucariotes (aproximadamente 200 bases) que sus homólogos en procariotes (aproximadamente 1,000 bases) (Kornberg 1980).

La desintegración de los nucleosomas es solamente parcial, ya que las histonas permanecen asociadas entre sí como octámeros sin permitirse la mezcla de histonas "nuevas" (producto de la replicación del cromosoma) e histonas "viejas" en el mismo complejo. La distribución de los octámeros entre las cadenas del DNA mostró que las histonas "nuevas" tuvieron cierta preferencia por las cadenas de DNA recientes y, consecuentemente, se vió favorecida la unión de cadenas progenitoras con histonas "viejas".

El principal factor para el ensamblaje del DNA con las histonas fue la nucleoplasmina, una proteína ácida, termoestable, aislada por primera vez de huevos de *Xenopus* (Laskey et al 1978) y presente en grandes cantidades en el nucleosoma de varios tipos de células (Krohne and Franke 1980, Mills et al 1980). La nucleoplasmina formó un complejo con los 4 tipos de histonas e intervino en su asociación con el DNA. Si el ensam

blaje de la cromatina ocurre sobre la horquilla de la replicación o en un lugar alejado de la misma, es todavía controversial.

La cromatina naciente presentó una mayor sensibilidad a la acción de DNasa I, que aparentemente se debió a la acetilación de histonas (Igo-Kemenes et al 1982).

Recientemente Annunziato y Seale (1983) demostraron que la desacetilación de histonas era un proceso necesario para la maduración de la cromatina y -a la vez- la acetilación y desacetilación de histonas regulaba transiciones reversibles entre estructuras complejas del DNA y fibras de DNA extendidas.

Acerca del esquema de ensamblaje de la cromatina, estudios con *Drosophila* mostraron que las histonas H3 y H4 fueron las primeras en unirse a la nueva cadena de DNA sobre el sitio de la síntesis; conforme la replicación continuaba, las histonas H2A y H2B eran añadidas, produciéndose el cuerpo del nucleosoma. Finalmente, la histona H1 se asoció con los nucleosomas hijos. Un esquema similar también fue propuesto para el ensamblaje en células de mamífero (revisado por DePamphilis y Wassarman 1980).

La separación de las células hijas y la maduración de la cromatina en ambas cromátidas representan la culminación del proceso de replicación en eucariotes. Los mecanismos bioquímicos y genéticos relacionados con la síntesis del DNA en estos organismos permanecen aún en la oscuridad, pero las investigaciones al respecto cada día toman más relevancia. Por lo tanto, grandes avances se esperan sobre este tema en los próximos años.

CONCLUSIONES

Se establecieron algunas de las principales características de la replicación del DNA en procariotes y eucariotes, durante la introducción y el desarrollo de este trabajo, encontrándose grandes semejanzas y diferencias entre los mismos. Del estudio realizado, pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

- 1) Los procariotes pueden ser estudiados directamente, debido a la relativa simplicidad de la estructura de su genoma y a la posibilidad de obtener los mutantes apropiados, en tanto que para estudiar a los eucariotes es necesario recurrir a sistemas más sencillos (virus o plásmidos), en los cuales la maquinaria de replicación utilizada por estos sistemas sea la misma que replica al cromosoma de la célula eucariota que los contiene.
- 2) Algunos de los sistemas utilizados para el estudio del DNA en eucariotes guardan homología con ciertas regiones del cromosoma celular, éste es el caso específico del DNA de parvovirus y los extremos del cromosoma de levaduras. Por tal razón es importante conocer los eventos en la duplicación para parvovirus y establecer semejanzas con levaduras.
- 3) La iniciación de la duplicación del genoma en procariotes está bastante más estudiada que en eucariotes. En algunos virus y bacterias ya ha sido asignado el origen de la replicación a un segmento dado del cromosoma. Por otro lado, para eucariotes no puede considerarse un solo punto de origen, pues esto implicaría mucho tiempo para completar la duplicación. Por lo tanto, y de acuerdo a estudios con microscopía

electrónica, el cromosoma celular debe iniciar la replicación en varios puntos a la vez y aparentemente el reconocimiento del origen en cada punto está estrechamente relacionado con la estructura de la molécula.

● 4) Acerca de la enzimología de la iniciación, los estudios más recientes señalan una serie de enzimas agrupadas en un complejo que interviene directamente en el reconocimiento del origen en levaduras.

Para procariotes también se ha señalado la posible interacción de más de una proteína (DnaA + proteína β' + RNA polimerasa en *E. coli*) para el reconocimiento del sitio de origen.

● 5) En eucariotes y algunos procariotes se propone un modelo de síntesis para el DNA semicontinua; es decir, una de las cadenas será sintetizada en forma continua (la que lleva dirección 3'-5') y la otra (la que corre en dirección 5'-3') en forma discontinua, mediante fragmentos cortos de DNA (fragmentos de Okazaki) que después darán origen a largas cadenas al unirse uno con otro.

● 6) El punto anterior es consecuencia de que todas las polimerasas registradas hasta el momento, sólo ejercen su acción polimerizante en sentido 5'-3'.

● 7) Otro aspecto general de las DNA polimerasas es que requieren un extremo 3'-OH para poder iniciar su acción.

● 8) El extremo 3'OH citado es proporcionado, tanto en *E. coli* como en el cromosoma celular, por un oligorribonucleótido llamado RNA cebador que varía en longitud entre bacterias y eucariotes y más aún su composición es totalmente distinta aunque se trate del mismo tipo de organismos. Esta carencia de homología en las bases que forman el cebador hace suponer

que lo importante de este RNA no es su secuencia de bases y más bien podría ser la longitud del mismo.

● 9) La síntesis del RNA cebador está a cargo de una enzima denominada primasa, tanto en procariotes como eucariotes. Esta enzima es diferente de las RNA polimerasas descubiertas, pues su acción no es inhibida por rifampicina ó α -amanitina y puede utilizar rNTP y/o dNTP para la síntesis del cebador. En la mayoría de los organismos estudiados se encuentra asociada la primasa con la polimerasa replicativa.

● 10) Una gran diferencia que existe entre las polimerasas de procariotes y las de eucariotes es que las primeras generalmente tienen asociada una actividad de exonucleasa, en tanto que las segundas carecen de ella. La excepción está representada por la DNA pol δ de células eucariotas con actividad de exonucleasa asociada. La DNA pol δ presenta propiedades fisicoquímicas semejantes a la DNA pol α , pero la relación entre ambas aún no está bien definida.

● 11) Las DNA polimerasas de vegetales superiores (DNA pol A, B, C_I y C_{II} de trigo) tienen características propias, que no permiten identificarlas totalmente con alguna de las polimerasas de procariotes o de mamíferos conocidas. Es decir, que aunque presenten homologías fisicoquímicas con alguna de ellas, el papel que desempeñan durante la replicación es diferente al de la enzima homóloga, desde el punto de vista fisicoquímico.

● 12) Con respecto a las enzimas que modifican la configuración del DNA para permitir el acceso a la información contenida en él (las topoisomerasas, helicasas y SSB), éstas se han detectado en *E.coli* y en organismos superiores, guardando cierta homología entre sí, pero un aspecto peculiar se encuentra

en el caso de las topoisomerasas tipo II.

● 13) Las topoisomerasas tipo II se encuentran representadas por la DNA girasa en bacterias y la característica distintiva de esta enzima es su capacidad de introducir giros a la doble hélice del genoma, cosa que las topoisomerasas tipo II en eucariotes no pueden realizar. La razón aceptada para introducir giros en el DNA es mantener una adecuada tensión torsional en la doble hélice, necesaria para el desarrollo óptimo de la replicación. En eucariotes se presume que esta tensión torsional se mantiene mediante la unión de histonas al DNA, las cuales no permiten su total relajación.

● 14) Acerca de los mecanismos de terminación de la síntesis del DNA, poco se sabe para bacterias y menos aún para el cromosoma de eucariotes. Secuencias específicas son desconocidas para ambos casos y sólo la existencia de intermediarios de segregación ha sido observada. Las enzimas hasta hoy relacionadas con esta última etapa son las topoisomerasas tipo II, que realizan los cambios topológicos requeridos para poder separar las cadenas de DNA ya sintetizadas.

— 0 —

Si se relacionan las observaciones anteriores con la hipótesis evolutiva sobre el origen de la vida, pueden explicarse las semejanzas entre las enzimas relacionadas con la replicación tanto en procariotes como en eucariotes, pensando que ambas provienen de un solo tronco evolutivo, en tanto que las diferencias estarían relacionadas con los cambios a que estuvieron sujetos los organismos para poder acoplarse al ambiente que los rodeaba.

Es lógico suponer que entre mayor sea el grado evolutivo, la complejidad de la duplicación del DNA aumente, pues la in-

formación que contiene es más abundante y requiere de un proceso más minucioso para poder ser transmitida sin errores a la progenie que de él se derive.

Por lo tanto las enzimas existentes en eucariotes deberán ser más especializadas en sus funciones, así como estar sujetas a un mecanismo de regulación más fino, pues en este tipo de organismos ya no solamente se trata de dar origen a 2 células hijas iguales a la célula madre, sino que también entra en juego la ulterior diferenciación que de ellas se realicen para delimitar aún más su papel fisiológico. Un caso representativo sobre los efectos que ocasiona la ausencia de control sobre la replicación del DNA en eucariotes es el cáncer, padecimiento en el cual las células se dedican a reproducirse en forma alterada, sin control alguno sobre su crecimiento, provocando graves daños al organismo que las contiene.

Se necesitan muchas investigaciones más para poder llegar a conocer cómo se maneja la síntesis del DNA por la célula, pero es importante recordar que no estamos tratando con un proceso en el cual cada enzima trabaje ajena a las demás, sino que -por el contrario- el trabajo conjunto de todas ellas es quizá el principal regulador presente durante la replicación del material genético en eucariotes.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Annunziato A. and Seale F. (1983). "Histone deacetylation is required for the maturation of newly replicated chromatin". *J.Biol.Chem.* 258:12675-85.
- 2) Arrand J. and Roberts R. (1979). "The nucleotide sequences at the termini of adenovirus 2 DNA". *J.Mol. Biol.* 128:577-94.
- 3) Astell C.R., Smith M., Chow M.B. and Ward D.C. (1979). "Structure of the 3' harpin termini of four rodent parvovirus genomes: nucleotide sequence homology at origins of DNA replication". *Cell.* 17:691-703.
- 4) Badaracco G., Plevani P., Ruyechan W.T. and Chang L. (1983). "Purification and characterization of yeast topoisomerase I". *J.-Biol. Chem.* 258:2022-026.
- 5) Bagdasarian M.M., Izakowska M. and Bagdasarian M. (1977). "Suppression of the DnaA phenotype by mutations in the *xpoB* cistron of ribonucleic acid polymerase in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*". *J.Bacteriol.* 130:577-582.
- 6) Baldi M.I., Benedetti P., Mattoccia E. and Tocchini-Valentini (1980). "In vitro catenation and decatenation of DNA a novel eucaryotic ATP-dependent topoisomerase". *Cell.* 20:461-467.
- 7) Brun G. and Weissbach A. (1978). "Initiation of HeLa cell DNA synthesis in a subnuclear system". *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75:5931-35.
- 8) Bryant J.A. (1980). "Biochemical aspects of DNA replication with particular reference to plants". *Biol.Rev.* 55:237-84.
- 9) Byrnes J., Downey K., Black V. and So A. (1976). "A new mammalian DNA polymerase with 3'-5' exonuclease activity: DNA polymerase δ ". *Biochemistry* 15:2817-23.
- 10) Castroviejo M., Fournier M., Gattus M., Gandor J.C., Labouesse B. and Litvak S. (1982). "Tryptophanyl tRNA synthetase is found closely associated with and stimulates DNA polymerase α -like activity from wheat embryos". *Biochem and Biophysical Res.* 107:294-301.
- 11) Challberg M. and Kelly T. (1979). "Adenovirus DNA replication in vitro". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76:655-59.

- 12) Challberg M. and Kelly T. (1982). "Eucaryotic DNA replication: viral and plasmid model system". Ann.Rev.Biochem. 51:901-934.
- 13) Chambers J., Watanabe S. and Taylor J. (1982). "Dissection of a replication origin of *Xenopus* DNA". Proc.Natl.Acad.Sci-USA 79:5572-76.
- 14) Champoux J.J. (1978). "Proteins that affect DNA conformation". Ann.Rev.Biochem. 47:449-79.
- 15) Chan C. and Bik-Kwoontye (1980). "Autonomously replicating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*". Proc.Natl.Acad.Sci-USA 77:6329-33.
- 16) Chang L. (1977). "DNA polymerases from Baker's yeast". J.Biol.Chem. 252:1873-80.
- 17) Chang L.M., Rafter E., Augl C. and Bollum F.J. (1984). "Purification of a DNA polymerase-DNA primase complex from calf thymus glands". J.Biol.Chem. 259:14679-687.
- 18) Chen S., Zubay G. and Ginsberg H. (1980). "The replication pattern of adenovirus DNA *in vivo* reproduced *in vitro*." Eur. J.Biochem. 104:587-94.
- 19) Chen Y.C., Bohn E.W., Planck S.R. and Wilson S.H. (1979). "Mause DNA polymerase ". J.Biol.Chem. 254:11678-94.
- 20) Delfini C., Alfani E., De Venezia V., Oberholtzer G., Tomasello C., Eremenko T. and Volpe P (1985). "Cell-cycle dependence and properties of the HeLa cell DNA polymerase system". Proc.Natl.Acad.Sci-USA 82:2220-224.
- 21) Desiderio S.V. and Kelly T.J. (1981). "Estructure of the linkage between adenovirus DNA and the 55,000 molecular wight protein". J.Mol.Biol. 145:319-37.
- 22) DePamphilis M. and Wassarman P. (1980). "Replication of eucaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork". Ann.Rev.Biochem. 49:627-666.
- 23) DePamphilis M.L., Anderson S., Bar-Shaviat R., Collins E., Edenberg H., Hermant., Karos B., Kaufmann G., Krokan H., Shelton E., Su R., Tapper D. and Wassarman P. (1979). "Replication and structure of simian virus 40 chromosome". Cold-Spring Harb. Symp-Quant Biol. 43:678-692.
- 24) DiNardo S., Voelkel K. and Sternglanz R. (1984). "DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: TopoII

somerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2616-620.

- 25) Dresler S.L. and Lieberman M.W. (1983). "Identification of DNA polymerase involved in DNA excision repair in diploid human fibroblasts". J. Biol. Chem. 258:9990-9994.
- 26) Duguet M. (1981). "Proteins that shape DNA". Biochimie 63:649-669.
- 27) Eliasson R. and Reichard P. (1978). "Replication of polyoma DNA in isolated nuclei". J. Biol. Chem. 253:7469-475.
- 28) Erchler D.C., Fisher P.A. and Korn K. (1977). "Effect of calcium on the recovery and distribution of DNA polymerase α from cultured human cells". J. Biol. Chem. 252:4011-14.
- 29) Fareed G.C. and Davoli D. (1977). "Molecular Biology of papovaviruses". Ann. Rev. Biochem. 46:471-485.
- 30) Faust E. and Mord D. (1979). "Incomplete genomes of the parvovirus mimete virus of mice: selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication". J. Virol. 32:276-92.
- 31) Geider K. and Hoffman-Berling H. (1981). "Proteins controlling the helical structure of DNA". Ann. Rev. Biochem. 50:233-60.
- 32) Gellert Marin (1981). "DNA Topoisomerases". Ann. Rev. Biochem. 50:879-910.
- 33) Graveline J., Tarrage L., Castroviejo M. and Litvak S. (1984). "DNA primase activity from wheat embryos". Plant. Mol. Biol. 3:207-215.
- 34) Gronostaiski R.M., Field J. and Hurwitz J. (1984). "Purification of a primase activity associated with DNA polymerase α from HeLa cells". J. Biol. Chem. 259:9479-86.
- 35) Guggenheimer R., Stillman B., Nagata K., Tamanoi F. and Hurwitz J. (1984). "DNA sequences required for the in vitro replication of adenovirus DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3069-073.
- 36) Guilley H., Dudley R.K., Jonard G., Balazs E. and Richards K.E. (1982). "Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences and characterization of transcripts". Cell 30:763-73.

- 37) Gutowski J., West A. and Cohen S. (1985). "The regulation of DNA synthesis in quiescent lymphocytes by cytoplasmic inhibitors". Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:5160-164.
- 38) Hand R. (1978). "Eukaryotic DNA organization of the genome for replication". Cell 15:317-25.
- 39) Hartley J. and Donelson J. (1980). "Nucleotide sequence of the yeast plasmid". Nature 286:860-64.
- 40) Hausen P. and Stein H. (1970). "Ribonuclease H: an enzyme degrading the RNA moiety of DNA-RNA hybrids". Eur.J. Biochem.14:278-83.
- 41) Horwitz M. (1978). "Temperature-sensitive replication of H5ts125 adenovirus DNA *in vitro*". Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:4291-95.
- 42) Hsiao Chen-Lai and Carbon J. (1979). "High-frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast ARG 4 gene". Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:3829-33.
- 43) Hsieh T. and Brutlag D. (1980). "ATP-dependent DNA topoisomerase from *D.melanogaster* reversibly catenates duplex DNA rings". Cell 21:115-125.
- 44) Hubscher U. (1983). "DNA polymerases in procaryotes y euca ryotes: Mode of action and biological implications". Experientia 39:1-126.
- 45) Igo-Kemenes T., Horz W. and Zachau H. (1982). "Chromatin". Ann.Rev.Biochem.51:89-121.
- 46) Jacq A., Kohiyama M., Lothar H. and Messer W. (1983). "Recognition sites for a membrane-derived DNA binding protein preparation in the *E.coli* replication origin". Mol.Gen. Genet.191:460-65.
- 47) Jazwinski M. and Edelman G. (1979). "Replication *in vitro* of the 2 μ m DNA plasmid of yeast". Proc.Natl.Acad.Sci. 76:1223-27.
- 48) Jazwinski M. and Edelman G. (1984). "Evidence for participation of a multiprotein complex in yeast DNA replication *in vitro*". J.Biol.Chem.259:6852-57.
- 49) Jazwinski M., Niedzwiecka A. and Edelman G. (1983). "In vitro associaton of a replication complex with a yeast chromosomal replicator". J.Biol.Chem.258:2754-57.
- 50) Johanson K. O. and McHenry C.S. (1982). "The subunit β

of the DNA polymerase III holoenzyme becomes inaccessible to antibody after formation of an initiation complex with primed DNA". *J. Biol. Chem.* 257:12310-315.

- 51) Kaguni L., DiFrancesco R.A. and Lehman R.I. (1984). "The DNA polymerase-primase from *D.melanogaster* embryos". *J. Biol. Chem.* 259:9314-19.
- 52) Kaguni L.S., Rossignol J.M., Conaway R.C., Banks G.R. and Lehman I.R. (1983). "Association of DNA primase with the β/γ subunits of DNA polymerase α from *D.melanogaster* embryos". *J. Biol. Chem.* 258:9037-039.
- 53) Khan N., Wright G., Dudyetz L. and Brown N (1984). "Butyl-phenyl dGTP: a selective and potent inhibitor of mammalian DNA polymerase alpha". *Nucleic Acid Research* 12:3695-3706.
- 54) Kojo H., Greenberg B. and Sugino A. (1981). "Yeast 2 μ m plasmid DNA replication *in vitro*: origin and direction". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7261-65.
- 55) Kollek R. and Goulian M. (1981). "Synthesis of parvovirus H-1 replicative form from viral DNA by DNA polymerase γ ". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6206-210.
- 56) Konig H., Riedel H. D. and Knippers R. (1983). "Reactions *in vitro* of the DNA polymerase-primase from *Xenopus laevis* eggs". *Eur. J. Biochem.* 135:435-442.
- 57) Kornberg A. (1979). "Aspects of DNA replication". *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 43:1-9.
- 58) Kornberg A. (1980). DNA replication. Mechanisms and Operations in DNA replication. W. H. Freeman and company eds., San Francisco.
- 59) Kowalski J. and Denhardt D.T. (1979). "Ribonucleotides in DNA newly synthesised in 3T6 cells *in vivo*". *Nature* 281:704-706.
- 60) Laskey R. and Harland R. (1981). "Replication origins in the eukaryotic chromosome". *Cell* 24:283-284.
- 61) Laskey R.A., Handa B.M., Mills A.D. and Finck J.T. (1978). "Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA". *Nature* 275:416-420.
- 62) LeDuca R.J. and Helmstetter C.E. (1983). "Expression of accumulated capacity for initiation of chromosome and

- minichromosome replication in *dnaA* mutants of *E.coli*".
J.Bacteriol. 154:1371-1380.
- 63) Lehninger A. (1978). *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* Ediciones Omega S.A. Barcelona; segunda edición.
- 64) Lindahl T. and Edelman G.M. (1968). "Polynucleotide ligase from myeloid and lymphoid tissues". *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 61:680-87.
- 65) Litvak S., Graveline J., Zourgui L., Carvallo P., Solari A., Aoyama H., Castroviejo M. and Tarrago-Litvak L. (1984). "Studies on the initiation of DNA synthesis in plant and animal cells". *Adv.Exp.Med.Biol.* 179:249-62.
- 66) Livingston D.M. and Hahne S. (1979). "Isolation of a condensed intracellular form of the 2µm DNA plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 76:3727-731.
- 67) Low R., Shlomai J. and Kornberg A. (1982). "Protein *n*, a primosomal DNA replication protein of *E.coli*". *J.Biol.Chem.* 257:6242-250.
- 68) Lusby E., Bolenzky R. and Berus I. (1981). "Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: Independence of the orientation at either end of the genome". *J.Virol.* 37:1083-86.
- 69) Lusby K.H., Fife and Berns K.I. (1980). "Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA". *J.Virol.* 34:402-09.
- 70) Martin R. and Setlow V. (1980). "The initiation of SV 40 DNA synthesis is not unique to the replication origin". *Cell* 20:381-91.
- 71) Masaki S., Loiwai O. and Yoshida S. (1982). "The DNA polymerase α of calf thymus shows a microheterogeneity in its large polypeptide component". *J.Biol.Chem.* 257:7172-177.
- 72) Mills A.O., Laskey R., Black P. and DeRobertis E.M. (1980). "An acidic protein which assembles nucleosomes in vitro is the most abundant protein in *Xenopus* oocyte nuclei". *J.Mol.Biol.* 139:561-68.
- 73) Morris and Rutter. (1976). "Nucleic acid polymerizing in developing". *Biochemistry* . 15:3106-113.
- 74) Mosbaugh D.W. and Linn S. (1983). "Excision repair and

- DNA synthesis with a combination of HeLa DNA polymerase β and DNase V". *J. Biol. Chem.* 258:108-118.
- 75) Myers M.W. and Tijan R. (1980). "Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: effect of temperature-sensitive mutations in adenovirus early gene region 2". *J. Virol.* 35:65-75.
 - 76) Myers M. W. and Carter B.J. (1981). "Adeno-associated virus replication". *J. Biol. Chem.* 256:567-70.
 - 77) Myers R. and Tijan R. (1980). "Construction and analysis of simian virus 40 origins defective in tumor antigen binding and DNA replication". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6491-95.
 - 78) Nagata K., Guggenheimer R.A., Enomoto T., Lichy J.H. and Hurwitz J. (1982). "Ad DNA replication *in vitro*: Identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6438-42.
 - 79) Nagata K., Guggenheimer R.A. and Hurwitz J. (1983). "Ad DNA replication *in vitro*: Synthesis of full-length DNA with purified protein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4266-70.
 - 80) Nagata K., Guggenheimer R.A. and Hurwitz J. (1983 bis). "Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6177-81.
 - 81) Nakamura H., Morita T., Masaki S. and Yoshida S. (1984). "Intracellular localization and metabolism of DNA polymerase α in human cells visualized with monoclonal antibody". *Experimental Cell Research* 151:123-33.
 - 82) Nathans D. and Danna K.J. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69:3097-3100.
 - 83) Nelson R.G. and Fangman W.L. (1979). "Nucleosome organization of the yeast 2μ m DNA plasmid; a eukaryotic minichromosome". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76:6515-19.
 - 84) Nossal N. (1983). "Prokaryotic DNA replication systems". *Ann. Rev. Biochem.* 53:581-615.
 - 85) Ogawa T. and Okazaki T. (1980). "Discontinuous DNA replication". *Ann. Rev. Biochem.* 49:421-57.
 - 86) Okazaki T. and Okazaki R. (1969). "Mechanism of DNA chain

- grows". Proc.Natl.Acad.Sci.USA 64:1241-48.
- 87) Pfeiffer P., Laquel P. and Hohn T. (1984). "Cauliflower mosaic virus replication complexes: characterization of the associated enzymes and of the polarity of the DNA synthesized *in vitro*". Plant Mol.Biol. 3:261-270.
 - 88) Pritchard C.G., Weavers D.T., Baril E.F. and DePhamphilis M.L. (1983). "DNA polymerase α cofactors C₁ and C₂ function as primer recognition proteins". J.Biol. Chem. 258:9810-19.
 - 89) Rekosh D.M., Russel W.C. and Bellet A.J. (1977). "Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA". Cell 11:283-96.
 - 90) Revie D., Tseng B.Y., Grafstrom R.H. and Goulian M. (1979). "Covalent association of protein with replicative form DNA of parvovirus H-1". Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:5539-43.
 - 91) Richardson W.D., Carter B.J., Westphal H. (1980). "Vero cells injected with adenovirus typ 2 mRNA produce authentic viral polypeptide patterns: early mRNA promoter growth of AAV". Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:931-35.
 - 92) Rowan L., and Kornberg A. (1978). "Primase, the *dnaG* protein of *E.Coli*". J.Biol.Chem. 253:758-764.
 - 93) Salzman L. and Fabisch P. (1979). "Nucleotide sequences of the selfpriming 3' terminus of the single-stranded DNA extracted from the parvovirus Kilham rat virus". J.Virol. 30:946-50.
 - 94) Sawai Y. and Tsukada K. (1977). "Change of ribonuclease-H activity in dividing and regenerating rat liver". Biochem.et Bioph.Acta 479:126-33.
 - 95) Sawai Y., Sugano N. and Tsukada K. (1978). "Ribonuclease-H activity in cultured plant cells". Biochem.et Bioph. Acta 518:181-185.
 - 96) Seki S., Ohashi M., Ogura H., and Oda T. (1982). "Possible involvement of DNA polymerase α and β in bleomycin-induced unscheduled DNA synthesis in permeable HeLa cells". Biochemical and Biophysical research Communications. 104:1502-08.
 - 97) Shelton E., Wassarman P. and DePamphilis M. (1978). "Structure of SV 40 chromosomes in nuclei from infected monkey cells". J.Mol.Biol. 125:491-514.

- 98) Shinigawa M. and Padmanabhan R. (1980). "Comparative sequence analysis of the inverted terminal repetitions from different adenovirus". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3831-35.
- 99) Shioda M., Nagano H. and Mano Y. (1980). "Association of DNA polymerase α and β with rough endoplasmic reticulum in sea-urchin eggs and changes in subcellular distribution during early embryogenesis". Eur. J. Biochem. 108:345-55.
- 100) Shioda M., Nelson E.M., Bayne M. L. and Benbow R.M. (1982). "DNA primase activity associated with DNA polymerase α from *Xenopus laevis* ovaries". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7209-13.
- 101) Shortle D., Magolskee R. and Nathans D. (1979). "Mutation analysis of the simian virus 40 replicon: Pseudorevertants of mutants with a defective replication origin". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:6128-31.
- 102) Shortle D. and Nathans D. (1979). "Regulatory mutants of simian virus 40: constructed mutants with base substitutions at the origin of DNA replication". J. Mol. Biol. 131:801-17.
- 103) Signoret J., Lefresn J., Vinson D. and David J.C. (1981). "Enzymes involved in DNA replication in the axolotl. II Control of DNA ligase activity during very early development". Developmental Biol. 87:126-132.
- 104) Singh H. and Dumas L.B. (1984). "A DNA primase that copurifies with the major DNA polymerase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". J. Biol. Chem. 259:7936-40.
- 105) Struh K., Stinchcomb D., Scherer S. and David R. (1979). "High-frequency transformation of yeast autonomously replicating of hybrid DNA molecules". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1035-39.
- 106) Sundin O. and Varshavski A. (1980). "Terminal stages of SV 40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers". Cell 21:103-114.
- 107) Sundin O. and Varshavski A. (1981). "Arrest of segregation leads to accumulation of highly intertwined catenated dimers; Dissection of the final stages of SV 40 DNA replication". Cell 25:659-69.
- 108) Tijan R. (1978). "The binding site on SV 40 DNA for a T antigen-related protein". Cell 13:165-79.

- 109) Tijan Robert (1978). "Protein-DNA interactions at the origin of simian virus 40 DNA replication". Col Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 48:655-62.
- 110) Toh H., Hayashida H. and Miyata T. (1983). "Sequence homology between retroviral reverse transcriptases and putative polymerases of hepatitis B virus and cauliflower mosaic virus". Nature 305:827-29.
- 111) Tomizawa J. and Selzer G. (1979). "Initiation of DNA synthesis in *E. coli*." Ann. Rev. Biochem. 48:999-1034.
- 112) Tsang Lee, Cheng-Keat T., So A. and Downey K. (1980). "Purification of deoxyribonucleic acid polymerase δ from calf thymus partial characterization of physical properties". Biochemistry 19:2096-101.
- 113) Tseng B. and Ahlem C. (1984). "Mouse primase initiation sites in the origin region of simian virus 40". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2342-46.
- 114) Tseng B.Y., Grafstrom R.H., Revie D., Oertel W. and Goulian M. (1978) "Studies on early intermediates in the synthesis of DNA in animal cells". Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 43:263-70.
- 115) Tseng B.Y. and Ahlem C.N. (1983). "A DNA primase from mouse cells". J. Biol. Chem. 258:9845-49.
- 116) Van der Ende A., Baker T., Ogawa T. and Kornberg A. (1985). "Initiation of enzymatic replication at the origin of the *E. coli* chromosome: Primase as the sole priming enzyme". J. Biol. Chem. 260:134-38.
- 117) Van der Werf S., Bouché J., Michali M. and Girard M. (1980). "Involvement of both DNA polymerase α and γ in the replication of adenovirus deoxyribonucleic acid *in vitro*". Virology 104:56-72.
- 118) Vázquez Ramos J. (1985). Duplicación y reparación del DNA. Mensaje Bioquímico. División de Estudios de Posgrado. UNAM.
- 119) Wang T., Pearson B., Suomalaine H., Mohands T., Shapiro L., Schroder J. and Korn D. (1985). "Assignment of the gene for human DNA polymerase α to the X chromosome". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5270-5274.
- 120) Watson J. (1978). Biología molecular del gene. Fondo educativo interamericano. Segunda edición. España.

- 121) Wickner S. (1978). "DNA replication proteins of *E.coli*". *Ann.Rev.Biochem.*47:1163-91.
- 122) Yagura T., Tanaka S., Tomoko K., Seno T. and Korn D. (1983). "Tight association of DNA primase with a subspecies of mouse DNA polymerase α ". *J.Biol.Chem.*258:6698-700.
- 123) Yagura T., Kozu T., Seno T., Saneyoshi M., Hiraga S. and Nagano H. (1983) bis". Novel form of DNA polymerase α associated with DNA primase activity of vertebrates". *J. Biol. Chem.*258:13070-075.
- 124) Yoshida S., Suzuki R., Masaki S. and Koiwai O. (1983). "DNA primase associated with 10 S DNA polymerase α from calf thymus". *Biochimica et Biophysica Acta* 741:348-57.
- 125) Zakian V.A., Breger B.J. and Fangman W.L. (1979). "Replication of each copy of the yeast 2 micron DNA plasmid occurs during the S phase". *Cell* 17:923-34.
- 126) Zierler M., Marini N., Stowers B. and Benbow R. (1985). "Stockpiling of DNA polymerase during oogenesis and embryogenesis in the frog *Xenopus laevis*". *J.Biol.Chem.* 260:974-81.
- 127) Zipursky and Marians (1980). "Identification of two *E.coli* factor Y effector sites near the origins of replication of the plasmids ColEI and pBR322". *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:6521-25.