



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Revisión actualizada del dogma
central de la biología molecular**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
MEDINA NAVARRETE MARIA MICHELLE

ASESOR:
M. en C. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Revisión actualizada del dogma central de la biología molecular.

Que presenta la pasante: María Michelle Medina Navarrete
Con número de cuenta: 309291437 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/mmgm*

DEDICATORIAS

A mis papás, porque la confianza, el cariño y el apoyo han sido fundamental en mi desarrollo para alcanzar las metas que me propongo. Porque las alegrías, tristezas, esfuerzos y éxitos obtenidos a lo largo de mis estudios no hubieran sido posibles sin su apoyo incondicional, por ser un ejemplo a seguir y enseñarme a ser la persona que soy hoy en día. Por eso y más...

A mis hermanos porque sé que siempre podré contar con ellos, por hacerme sonreír, darme fuerzas, motivarme y guiarme cuando más lo necesito, por todo el apoyo y por ser mis cómplices.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y la FES Cuautitlán, por los conocimientos adquiridos y las experiencias que me brindó.

A mi asesora M. en C. Maritere Domínguez Rojas por el apoyo, consejos, conocimientos y tiempo brindados en la realización de este trabajo y a lo largo de la carrera.

A mis papás Kike y Lucy y mis hermanos Ro y Karla, porque sin mi familia no hubiera podido completar esta etapa de mi vida. Muchas gracias por el amor, motivación, libertad, paciencia, comprensión y más que me han brindado. Los amo mucho!!

A Óscar por tanto tiempo de conocernos, ser un gran amigo, confidente y por siempre hacerme reír, por todos los momentos y experiencias que hemos vivimos juntos y las que viviremos. Te amo baby.

A mis amigos Alan, Rafa, Andy, Roger, Val, Ceci y Alexis, “la banda”, por ser unos grandes amigos y compañeros, por siempre apoyarnos y porque los mejores momentos de la Uni, los más bonitos y los más divertidos fueron con ustedes, haciendo esta etapa de mi vida una que siempre recordaré con mucho cariño. Los amo.

A mis sinodales Dra. Sandra, M. en C. Maritere, Q.F.B. Alejandro, L.B.D. Ángeles y L.B.D. Larisa por tomarse el tiempo de leer mi trabajo y hacer correcciones y recomendaciones para mejorarlo.

RESUMEN

El DNA es la biomolécula que almacena toda la información génica y por lo tanto es capaz de controlar todos los procesos celulares. Sin embargo, el DNA sólo es una parte de la arquitectura de los seres vivos; ya que el RNA y las proteínas también juegan papeles igual de indispensables. La interrelación entre estos tres tipos de biomoléculas llevó a la constitución del “Dogma Central de la Biología Molecular”. El Dogma Central es una serie de eventos ordenados que conllevan a la producción de una proteína en específico, siguiendo direcciones específicas, para la transferencia de información genética; este incluye la replicación del DNA que indica que éste es su propia plantilla para su duplicación, es decir, generar más copias de ese mismo DNA, la transcripción es la síntesis de RNA a partir de una plantilla base de DNA y de manera semejante la síntesis de proteínas es dirigida por una plantilla de RNA, proceso al cual se le denominó traducción. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión bibliográfica de las etapas que involucra el Dogma Central de la Biología Molecular comparando estos eventos entre organismos eucariontes contra organismos procariontes mediante el uso de bases de datos bioinformáticas que permitan la actualización sobre este tema. Así se observó que las tres etapas son muy diferentes entre organismos e involucran diferentes factores, proteínas o etapas que ayudan a llevar a cabo los procesos del Dogma Central, encontrándose también diferencias significativas entre los mecanismos regulatorios de cada organismo y su importancia.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Justificación	2
3. Objetivos	4
3.1 Objetivo General	4
3.2 Objetivos Particulares	4
4. Metodología	5
5. Antecedentes	6
6. Dogma Central de la Biología Molecular	8
6.1 Propuesta inicial de Crick	10
6.2 Descubrimiento de la Transcriptasa Inversa	14
7. ¿Qué es el Genoma?	19
7.1 Genoma eucariota	19
7.2 Genoma procariota	23
8. ¿Qué es un Cromosoma?	28
8.1 Cromosoma eucariota	28
8.2 Cromosoma procariota	39
9. ¿Qué es el DNA?	43
10. Replicación	53
10.1 Replicación Eucariota	61
10.1.1 DNA polimerasa	61
10.1.2 Abrazadera deslizante	65
10.1.3 Cargador de la abrazadera	66
10.1.4 Enzimas involucradas en el replisoma eucariota	69
10.1.5 Replisoma eucariota	76
10.1.6 Enzimas adicionales involucradas en la replicación eucariota	78
10.1.7 Origen de replicación	82
10.1.8 Etapas de la replicación eucariota	85
10.2 Replicación Procariota	92
10.2.1 DNA polimerasa	92

10.2.2	Abrazadera deslizante	93
10.2.3	Cargador de la abrazadera	94
10.2.4	Activación del primosoma	96
10.2.5	Enzimas involucradas en el replisoma procarionta	97
10.1.6	Replisoma procarionta	100
10.1.7	Enzimas adicionales involucradas en la replicación procarionta	102
10.1.8	Origen de replicación	104
10.1.9	Etapas de la replicación procarionta	106
11.	Transcripción	110
11.1	Transcripción Eucariota	114
11.1.1	RNA polimerasa	115
11.1.2	Núcleo del promotor	117
11.1.3	Reconocimiento del promotor	120
11.1.4	Iniciación (factores de transcripción)	121
11.1.5	Elongación	126
11.1.6	Terminación	132
11.1.7	Formación del capuchón	134
11.1.8	Poliadenilación	137
11.1.9	Poliadenilación alternativa	139
11.1.10	Splicing del pre-mRNA	143
11.1.11	Splicing alternativo	149
11.1.12	Exportación núcleo→citoplasma del mRNA	150
11.1.13	Degradación del mRNA	155
11.1.14	Regulación en el extremo 3' UTR	161
11.2	Transcripción Procarionta	164
11.2.1	RNA polimerasa	164
11.2.2	Factor σ	166
11.2.3	Reconocimiento del promotor	168
11.2.4	Iniciación	169
11.2.5	Elongación	170
11.2.6	Terminación	171
12.	Traducción	174

12.1 Traducción Eucariota	186
12.1.1 Iniciación	186
12.1.2 Elongación	198
12.1.3 Terminación	199
12.1.4 Modificaciones postraduccionales	201
12.1.5 Relación entre la traducción y la degradación del mRNA	210
12.2 Traducción Procariota	213
12.2.1 Iniciación	214
12.2.2 Elongación	217
12.2.3 Terminación	219
12.2.4 Reciclaje del ribosoma	221
13. Conclusiones	223
14. Referencias bibliográficas	224

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tipos de RNA	9
Tabla 2. Tamaño de los genomas eucariontes y su relación con el número de genes	20
Tabla 3. Tamaño de los genomas procariontes y su relación con el número de genes	24
Tabla 4. Tamaño de los NRL entre organismos	35
Tabla 5. Nomenclatura de los desoxirribonucleósidos	44
Tabla 6. Diferencias estructurales entre los tipos de DNA	51
Tabla 7. DNA polimerasas en eucariontes	64
Tabla 8. Comparación de la actividad entre los diferentes complejos RFC	68
Tabla 9. Proteínas involucradas en la replicación eucariota	81
Tabla 10. DNA polimerasas en procariontes	93
Tabla 11. Subunidades del complejo Pol III HE	95
Tabla 12. Proteínas involucradas en la replicación procariota	104
Tabla 13. Comparación entre organismos de las proteínas involucradas en la replicación	109
Tabla 14. Diferencias de los fragmentos de Okazaki entre organismos eucariontes y procariontes	109
Tabla 15. Tipos de RNA polimerasas	115
Tabla 16. Elementos canónicos del núcleo del promotor eucarionte	119
Tabla 17. Enfermedades relacionadas con mecanismos APA y poliadenilación del extremo 3' del mRNA	142-143
Tabla 18. Proteínas involucradas en la remoción del capuchón	159
Tabla 19. Factores de iniciación de la traducción en eucariontes	191-192
Tabla 20. Modificaciones postraduccionales en eucariontes reversibles	203
Tabla 21. PTMs más comunes en los residuos de las cadenas laterales de las proteínas	209
Tabla 22. Comparación de los factores de elongación de la traducción entre eucariontes y procariontes	219

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Genoma humano	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema clásico del Dogma Central de la Biología Molecular	1
Figura 2. Estructura del tRNA	13
Figura 3. Esquema general del mecanismo de transcripción y traducción	13
Figura 4. Modificaciones posteriores al Dogma Central	14
Figura 5. Mecanismo de acción de la transcripción inversa	17
Figura 6. Esquema del gen eucariota	22
Figura 7. Esquema del material genético procariota	23
Figura 8. DNA procariota	24
Figura 9. Esquema del gen procariota	25
Figura 10. Operón lac de E. coli	26
Figura 11. Genes que se expresan en diferente eficiencia	27
Figura 12. Comparación entre un gen procarionte y un gen eucarionte	27
Figura 13. Estructura de la médula del nucleosoma, octámero de histonas	30
Figura 14. Nucleosoma típico	30
Figura 15. Detalles estructurales de la médula del nucleosoma	32
Figura 16. Estructura de un NRL	34
Figura 17. Modelos alternos al solenoide	36
Figura 18. Estructuras de los diferentes grados de compactación del DNA	38
Figura 19. Superenrollamiento del DNA procarionte	40
Figura 20. Esquema de superenrollamiento negativo	40
Figura 21. Estructura de un nucleoide	41
Figura 22. Mecanismo de participación de las proteínas en el de superenrollamiento del DNA procariota y formación del nucleoide	42
Figura 23. Bases nitrogenadas	43
Figura 24. Estructura de un nucleósido de Guanina	44
Figura 25. Estructura de un nucleótido	45
Figura 26. Estructura de polinucleótidos	46
Figura 27. Componentes de las cadenas de DNA y complementariedad de bases	48
Figura 28. Sentido de la doble hélice del DNA	49
Figura 29. Estructura del DNA	49
Figura 30. Estructura de los tipos de DNA	51
Figura 31. Condensación del DNA del cromosoma humano	52
Figura 32. Replicación semiconservativa del DNA	53
Figura 33. Esquema de las hipótesis sobre el mecanismo de replicación	55
Figura 34. Elementos básicos para la replicación del DNA	56
Figura 35. Mecanismo de adición de los dNTPs	57
Figura 36. Síntesis semidiscontinua y sentido bidireccional de la replicación	58
Figura 37. Formación de los fragmentos de Okazaki	59
Figura 38. Mecanismo de síntesis de la cadena principal y la cadena rezagada	60

Figura 39. Dominios de la DNA polimerasa	62
Figura 40. Cámara de apareamiento de pares de bases	62
Figura 41. Mecanismo de acción de la actividad 3' exonucleasa de la DNA polimerasa	63
Figura 42. Estructura de PCNA	66
Figura 43. Estructura de RFC unida a PCNA	67
Figura 44. Mecanismo de unión de la abrazadera deslizante	67
Figura 45. Estructura de los diferentes complejos RFC	68
Figura 46. Estructura y mecanismo de acción de la helicasa	71
Figura 47. Mecanismo de ensamblaje y activación del CMG	73
Figura 48. Función de Ctf4 en el replisoma	75
Figura 49. Estructura clásica del replisoma eucariota y sus componentes	77
Figura 50. Mecanismo de escisión del cebador en eucariontes, maduración de los fragmentos de Okazaki	80
Figura 51. Origen de replicación en eucariontes	82
Figura 52. Estructura de los dominios de ORC	83
Figura 53. ORC eucariota	84
Figura 54. Ensamblaje de preRC y RC	85
Figura 55. Fases de la replicación en eucariontes	88
Figura 56. Estructura de la RNA telomerasa	89
Figura 57. Mecanismo de acción de telomerasa	91
Figura 58. Estructura de la Pol III	93
Figura 59. Estructura de la subunidad β , abrazadera deslizante	94
Figura 60. Estructura del complejo Pol III HE	95
Figura 61. Estructura y función de los dominios de DnaA	97
Figura 62. Mecanismo de activación del primosoma e iniciación de la replicación	99
Figura 63. Estructura clásica del replisoma procariota y sus componentes	101
Figura 64. Mecanismo de escisión del cebador en procariontes	103
Figura 65. Origen de replicación en procariontes	105
Figura 66. Replicación monofocal y bidireccional en procariontes	106
Figura 67. Fases de la replicación en procariontes	108
Figura 68. Esquema general de transcripción	110
Figura 69. Etapas de la transcripción	111
Figura 70. Propiedades de la transcripción	113
Figura 71. Esquema de la estructura de la RNA Pol II	117
Figura 72. Estructura de los dominios de la RNA Pol II	117
Figura 73. Elementos canónicos y no canónicos del núcleo del promotor eucariote	119
Figura 74. Elementos canónicos del núcleo del promotor eucariote con su GTF de unión y secuencia	120
Figura 75. Orden de ensamblaje de los factores generales de transcripción y la RNA Pol II en el promotor	122
Figura 76. Ensamblaje del PIC y modificaciones del nucleosoma	126

Figura 77. Fosforilación el EC en el extremo CTD para la transición inicio→elongación que involucra el tiempo de pausa de la RNA Pol II	128
Figura 78. Ciclo de elongación	131
Figura 79. Terminación de la transcripción en eucariontes	133
Figura 80. Terminación de la transcripción vía CPF	133
Figura 81. Terminación de la transcripción vía NNS	134
Figura 82. Estructura y formación del capuchón	136
Figura 83. Esquemmatización de la adición del capuchón co-transcripcionalmente	136
Figura 84. Escisión endonucleolítica y la adición de cola Poli-A con el extremo 3' del mRNA	139
Figura 85. Mecanismos de APA	141
Figura 86. Maduración del pre-mRNA	144
Figura 87. Etapas de la reacción de empalme	144
Figura 88. Ensamblaje del spliceosoma	146
Figura 89. Maduración de los UsnRNPs/snRNPs	148
Figura 90. Tipos de splicing alternativo	150
Figura 91. Exportación nuclear del mRNA	153
Figura 92. Mecanismo de regulación del mRNA mediado por RBPs	154
Figura 93. Estructura de los dominios de Dcp2 y Dcp1	156
Figura 94. Mecanismo de degradación 5'→3' del mRNA	158
Figura 95. Estructura de los dominios de DcpS	160
Figura 96. Comparación entre mecanismos de degradación del mRNA	160
Figura 97. Elementos reguladores cis de 3' UTR	163
Figura 98. Esquema de la estructura de la RNAP	165
Figura 99. Estructura de los dominios de la RNAP	166
Figura 100. Ciclo sigma	167
Figura 101. Cambios conformacionales de RNAP	167
Figura 102. Secuencia de los elementos del promotor en eucariontes	168
Figura 103. Iniciación de la transcripción en procariontes	169
Figura 104. Mecanismos de terminación de la transcripción en procariontes	172
Figura 105. Esquema general de la transcripción en procariontes	173
Figura 106. Código genético	175
Figura 107. Un codón codifica para un aminoácido	176
Figura 108. Solapamiento del código genético	177
Figura 109. Lectura del código genético	178
Figura 110. Mecanismo de acción de la aminoacil tRNA sintetasa	180
Figura 111. Subunidades y sitios del ribosoma procariontes y eucarionte	182
Figura 112. Orígenes de replicación del mRNA en eucariontes y procariontes	183
Figura 113. Esquema general de las etapas de la traducción	185
Figura 114. Dominios de eIF4G	189
Figura 115. Mecanismo de iniciación de la traducción en eucariontes	190
Figura 116. Mecanismo de activación IRES	193

Figura 117. IRES Tipo III	195
Figura 118. IRES Tipo IV	197
Figura 119. Elongación y terminación de la traducción en eucariontes	200
Figura 120. Mecanismo de acción de algunas PTM	204
Figura 121. Mecanismo de glicosilación	205
Figura 122. Mecanismo de acetilación	205
Figura 123. Mecanismo de lipidación/acilación, palmitoilación y miristoilación	206
Figura 124. Mecanismo de fosforilación	207
Figura 125. Mecanismo de ADP-ribosilación	208
Figura 126. Mecanismo de Ubiquitinación	208
Figura 127. Relación entre la traducción y degradación del mRNA	212
Figura 128. Esquema general de la traducción en procariontes	213
Figura 129. Iniciación de la traducción en procariontes	215
Figura 130. Estructura de los dominios de IF2	216
Figura 131. Puntos de control en la iniciación de la traducción en procariontes	216
Figura 132. Mecanismo de elongación de la traducción en procariontes	218
Figura 133. Cambios conformacionales que se generan en el ribosoma al momento de la translocación	218
Figura 134. Elongación y terminación de la traducción en procariontes	220
Figura 135. Mecanismo de terminación de la traducción por los RFs clase I	221
Figura 136. Terminación de la traducción y reciclaje del ribosoma	222

ABREVIATURAS

A	Adenina
Å	Angstroms
aa	Aminoácido(s)
AAA+	Actividad ATPasa (Adenosin trifosfato ATPasa)
ABC	Cassette de unión a ATP
ABCE1	Cassette de unión a ATP de la subfamilia E miembro 1
ADLAS	Sitios de baja afinidad preferencial a ATP – DnaA
AFM	Microscopia atómica
Ala	Alanina
AMP	Aminoacil sintetasa
APA	Poliadenilación alternativa
ARE	Elementos ricos en AU
ARE-B	Proteína de unión a elementos ricos en AU
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosin tri-fosfato
AUF1	Factor de unión AU1
BAH	Sitio adyacente homólogo a Bromo
BHK	Células derivadas de riñón de hámster sirio
BPS	Secuencias del punto de ramificación
BREu/d	Elemento de reconocimiento río arriba/río abajo
Brr2	Helicasa
C	Citocina
CARE	Elementos ricos en CA
CBP	Proteínas de unión al capuchón
Cdc6	Proteína de división del ciclo celular 6
Cdc45	Proteína de división del ciclo celular 45
cDNA	DNA complementario
Cdt1	Transcrito dependiente de Cdc
CDS	Secuencia codificante
CF I y II	Factores de escisión I y II
ChIP	Técnica: Inmunoprecipitación de la cromatina
CHO	Células derivadas de ovario de hámster chino
CK2	Caseín-cinasa 2
CMG	Complejo Cdc45 – MCM – GINS
CMGE	Complejo Ctf4 – CMG – Pol ϵ
CPE	Elementos del núcleo de promotor
CPEB	Elemento citosomático de unión a cola Poli-A
CPF	Factor de escisión y poliadenilación
CPSF	Factor específico de escisión y poliadenilación
CRAPA	Poliadenilación alternativa de las regiones codificantes
crioEM	Microscopia electrónica criogénica

CRM1	Región de mantenimiento del cromosoma
CRL2^{LRR1}	Complejo adaptador de elongación B/C – proteína de repetidos ricos en leucina
CrPV	Virus de la parálisis de Cricket
Cs⁺	Cesio
CSTF	Factor estimulador de la escisión
CTD	Dominio carboxilo terminal
Ctf4	Cromosoma de transmisión fiel 4
Ctf18	Gen
CUGBP 1 y 2	Proteínas de unión a GRE
CURE	Elementos ricos en CU
CUTs	Transcriptos crípticos inestables
CV1	Células derivadas de mono verde africano
C/Cys	Cisteína
dATP	Desoxi-Adenosina trifosfato
DCE	Elementos río abajo del núcleo del promotor
Dcp 1, 2 Y S	Proteína removedora del capuchón
dCTP	Desoxi-Citidina trifosfato
DDK	Cinasa dependiente de ciclina de Dbf4
dGTP	Desoxi-Guanosina trifosfato
DHU	Dihidrouracilo
DiaA	Proteína
DICE	Elemento de control de la diferenciación
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
Dpb	Subunidades de la polimerasa
DPE	Elementos río abajo del promotor
DRB	Inhibidor de la transcripción
dsDNA	DNA de doble cadena
DSE	Elemento rico en GU
dTTP	Desoxi-Timidina trifosfato
DUE	Elemento de desenrollamiento del DNA
Dxo1	Exoribonucleasa 1 removedora del capuchón
E/Gln	Glutamina
EC	Complejo de elongación
Edc 1-4	Proteína potencializadora de la remoción del capuchón
eEF	Factor de elongación eucarionte
EF	Factor de elongación
eIF	Factor de iniciación eucarionte
ej	Ejemplo
EJC	Complejo de unión de exones
Elg1	Gen
ELR1	Factor de elongación
eRF	Factor de terminación eucarionte

FACT	Complejo de histonas chaperonas
FEN1	Endonucleasa Flap 1
FIS	Factor de estimulación de inversión
FRAP	Técnica: Recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo
FRET	Técnica: Transferencia de energía de resonancia fluorescente
G	Guanina
G-7N-MTasa	Guanina N7 metil-transferasa
GAP	Proteína de activación de eIF2, GTPasa
Gfh1	Inhibidor de la transcripción procarionte
GH1/5	Histona globular
GINS	Del japonés Go – Ichi – Nii – Sans
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GRE	Elementos ricos en GU
GTasa	Guanililtransferasa
GTF	Factores generales de transcripción
H1-5	Histona
HCV	Virus de la hepatitis C
HDAC	Histona desacetilasa
HE	Holoenzima
HeLa	Células derivadas de cáncer cervicouterino
His	Histidina
HIT	Histidina tri-aminoácido
hnRNA	RNA heterogéneo nuclear
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
H-NS	Histona tipo nucleótido
HSF	Factor de choque térmico
hTR	RNA telomerasa madura humana
HU	Proteína tipo histona
HuR	Proteína HU
ID	Dominio interno
IF	Factor de iniciación
IGR	Región intergénica
IHF	Factor de integración
Ile	Isoleucina
Impβ	Importina β
Inr	Elemento de iniciación
IRE	Elementos de respuesta a hierro
IRES	Sitios internos de entrada al ribosoma
ITAF	Factores <i>trans</i> de IRES
K/Lys	Lisina
K⁺	Potasio
KAT	Lisina acetil-transferasa
Kb	Kilobases

kDa	Kilodaltons
KMT	Lisina metil-transferasa
Larp1	Proteína relacionada a La
Leu	Leucina
LH	Histona linker/de unión
lncRNA	RNA no codificante largo
LTR	Repetidos largos terminales
m7G	Capuchón
m7GDP	Guanina metilada en posición de la amina 7 (N7) fosfatada
Mb	Megabase
Mcm	Complejo de mantenimiento de mini-cromosoma
mCRD	Región determinante de codificación
Met	Metionina
Mg⁺²	Magnesio
miRNA	micro RNA
mm	Micrómetros
mRNA	RNA mensajero
mRNP	Complejos proteicos asociados a mRNA
mtDNA	DNA mitocondrial
mTSS	Múltiple sitio de inicio de la transcripción
Na⁺	Sodio
ncRNA	RNA no codificante
NES	Señal de exportación nuclear
NF90	Factor nuclear 90
NFR	Región libre de nucleosoma
NGD	Vía sin sentido de degradación
NLS	Señal de localización nuclear
nm	Nanómetros
NMD	Vía de degradación mediada sin sentido
NNS	Complejo de proteínas Nrd1 – Nab3 – Sen1
NPC	Complejos de poro nuclear
NRL	Longitud de repetidos nucleosómicos
NSD	Vía de degradación sin codón de paro
nt	Nucleótido
NTD	Dominio amino terminal
ORC	Complejo de reconocimiento del sitio de origen
ORC	Complejo de reconocimiento del sitio de origen
ORF	Marco abierto de lectura
oriC	Complejo de reconocimiento del sitio de inicio
p	Brazo corto
P	Sitio de revisión del marco de lectura
P/Pro	Prolina
P185	Células derivadas de mastocitos de ratón
p97/VCP	Proteína

PABP	Proteína de unión a cola Poli-A
Paf1	Factor 1 asociado al complejo RNA Pol II
PAP	Poli-A polimerasa
pb	Pares de bases
PBS	Sitio de unión al primer/cebador
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PHAX	Adaptador fosforilado para exportar RNA
Phe	Fenilalanina
PHP	Fosfatasa polimerasa e histidinol
PIC	Complejo pre-iniciación
piRNA	RNA asociado a Piwi
PK	Pseudo-grupo
Pol	Polimerasa
post-TC	Complejo post-terminación
PPT	Polipurina de tracto corto
pre-30SIC	Complejo pre-iniciación en procariontes
pre-mRNP	Pre-complejos proteicos asociados a mRNA
PRMT	Arginina metil-transferasa
PTB	Proteína de unión al tracto polipirimidina
p-TEFb	Factor positivo b en la elongación de transcripción
PTM	Modificaciones postraduccionales
q	Brazo largo
R/Arg	Arginina
RAN	GTPasa
RBP	Proteína de unión a RNA
RBS	Sitio de unión al ribosoma
RecA	Recombinasa A
RF	Factor de terminación
RFC	Factor del complejo de replicación
RL1	Inhibidor de RNasa L1
RNA	Ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa procarionte
RNasa	Enzima que degrada RNA
RNP	Proteínas ribonucleares
rNTP	Ribonucleótido trifosfato
RO	Orígenes de replicación
RP	Proteínas ribosomales
RPA	Proteína de replicación A
RPB	Subunidades de RNA polimerasa B
RPL	Proteínas ribosomales grandes
RPS	Proteínas ribosomales pequeñas
RRF	Factor de reciclaje del ribosoma
rRNA	RNA ribosómico
RSV	Virus del sarcoma de Rous

RT	Retrot transcriptasa
S	Svedverg
S/Ser	Serina
SAGA	Spt – Ada – Gcn5 acetil transferasa
SAM	S-adenosil metionina
SAXS	Técnica: Dispersión de rayos X
S-CDK	Cinasa dependiente de ciclina de la fase S
scRNA	RNA pequeño condicional
SD	Secuencia Shine-Dalgarno
SHARP	Proteína
Slid 2, 3, 7	Factor de iniciación
SMN	Proteína se supervivencia
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
SNP	Factor
snRNA	RNA pequeño nuclear
SPN1	Snurportina I
SSB	Proteína de unión a ssDNA
ssDNA	DNA de cadena sencilla
STE	Elementos de término Stem
SUMO	Modificador pequeño tipo ubiquitina
Swi	Factor
T	Timina
T/Thr	Treonina
TAF	Factores asociados a TBB
TAND	Dominio N-terminal de TAF1
TBP	Proteína de unión a TATA
TC	Complejo ternario / complejo de terminación
TEM	Microscopia de transmisión electrónica
TERT	Telomerasa con actividad transcriptasa reversa
TFIIA	Factor de transcripción IIA
TFIIB	Factor de transcripción IIB
TFIIB	Factor de transcripción IIB
TFIID	Factor de transcripción IID
TFIIE	Factor de transcripción IIE
TFIIF	Factor de transcripción IIF
TFIIH	Factor de transcripción IIH
TFIIJ	Factor de transcripción IIJ
TFIIS	Factor de transcripción IIS
TIP	Plataforma de inicio de la transcripción
TOP	Tracto oligopirimidina terminal
TPasa	Trifosfatasa
TR	Radio de movimiento
tRNA	RNA de transferencia
Trp	Triptófano

TSS	Sitio de inicio de la transcripción
TTP	Fosfatasa HuR-tiamina
TTP	Tristetrapolina
TTT	Sitio de terminación de la transcripción
Tus	Proteína de termino
TΨU	Timina pseudouridina-citosina
U	Uracilo
U2AF	Factor auxiliar U2
USE	Elemento rico en U
UsnRNP/snRNP	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares ricas en uridina
UTR	Regiones sin traducir
UTRAPA	Poliadenilación alternativa de las regiones sin traducir
Val	Valina
VCX-A	Cromosoma variable X
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VSV	Virus de estomatitis vesicular
WH	Hélice con alas
Xpo1	Exportina 1
Y/Tyr	Tirosina
α	Letra griega alfa
β	Letra griegabeta
γ	Letra griega gamma
δ	Letra griega delta
ε	Letra griega épsilon
θ	Letra griega omega
τ	Letra griega tau
χ	Letra griega chi
σ	Letra griega sigma
ζ	Letra griega zeta
ψ	Letra griega psi
4E-BP	Proteína de unión a eIF4E
70SIC	Complejo de iniciación en procariontes

1. INTRODUCCIÓN

Por su función de almacenamiento de la información genética, el DNA podría ser considerado como la biomolécula más importante de los sistemas biológicos. El DNA fue descubierto por Friedrich Miescher en 1869, químicamente es un ácido nucleico que consta de 4 bases orgánicas nitrogenadas, un azúcar pentosa y un grupo fosfato (Mathews et.al, 2013).

El DNA es la biomolécula que almacena toda la información génica y por lo tanto es capaz de controlar todos los procesos celulares. Sin embargo, el DNA sólo es una parte de la arquitectura de los seres vivos ya que el RNA y las proteínas juegan papeles igual de importantes (Mathews et.al, 2013; Devlin, 2006). Por cual la interrelación entre estos tres tipos de biomoléculas llevó a la constitución del “Dogma Central de la Biología Molecular” (Figura 1).

Los procesos celulares involucrados en la transferencia y transmisión de la información genética en la célula constituyen la materia de estudio de la biología molecular. La biología molecular puede ser definida como una disciplina que se ocupa del estudio de la vida a nivel molecular, la cual está fundamentada en el Dogma Central; éste establece el flujo de la información genética en la célula involucrando los tres tipos de biomoléculas más importantes (DNA → RNA → Proteína) (Navarro, Sandoval y Armendáriz, 2008).

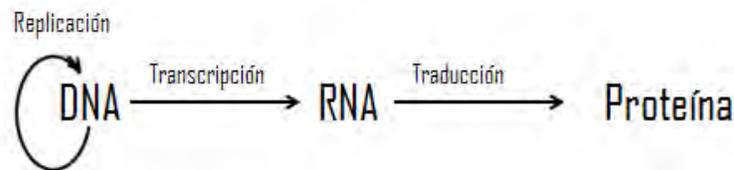


Figura 1. Esquema clásico del Dogma Central de la Biología Molecular (Modificada de Watson, 2008).

Como se muestra en la figura 1, el Dogma Central es una serie de eventos ordenados que conllevan a la producción de una proteína en específico. Así, las flechas de la figura indican las direcciones que se siguen para la transferencia de información genética. La flecha circular que rodea al DNA indica que éste es su propia plantilla para su duplicación, es decir, generar más copias de ese mismo DNA. La flecha entre DNA y RNA indica que la síntesis de RNA proviene de una plantilla base de DNA, proceso al cual se le denominó transcripción; y de manera semejante, la síntesis de proteínas es dirigida por una plantilla de RNA, proceso al cual se le denominó traducción. Cabe resaltar, que las flechas

aparecen como unidireccionales, es decir, que las secuencias del RNA nunca se determinan por plantillas de proteínas, ni que el DNA pudiera formarse a partir de RNA. Sin embargo, actualmente se sabe que el RNA puede replicarse por sí mismo y generar una transcripción inversa para generar DNA.

Las proteínas, son parte esencial de la estructura y bioquímica de una célula, y su secuencia está determinada por la secuencia del DNA, ya que éste dirige su síntesis. Sin embargo, la información no puede fluir directamente DNA → proteína, se necesita del RNA como intermediario y transporte de la información.

2. JUSTIFICACIÓN

Se eligió como tema de investigación el Dogma Central de la Biología Molecular puesto que es un tópico que se imparte en materias de la carrera de Bioquímica Diagnóstica y que le da un enfoque de aplicación futura, ya que al comprender y analizar los mecanismos de transmisión, expresión y control del material genético se podrán entender, interpretar y utilizar de manera satisfactoria tecnologías actuales de manipulación genética; comparándose entre organismos eucariontes con procariontes. Además de que al tener una recopilación de la información en una sola fuente se podrá comprender mejor el tema con un enfoque actualizado y servirá como material documental de apoyo para los alumnos de la FES Cuautitlán o cualquier persona interesada en el área de la Biología Molecular.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

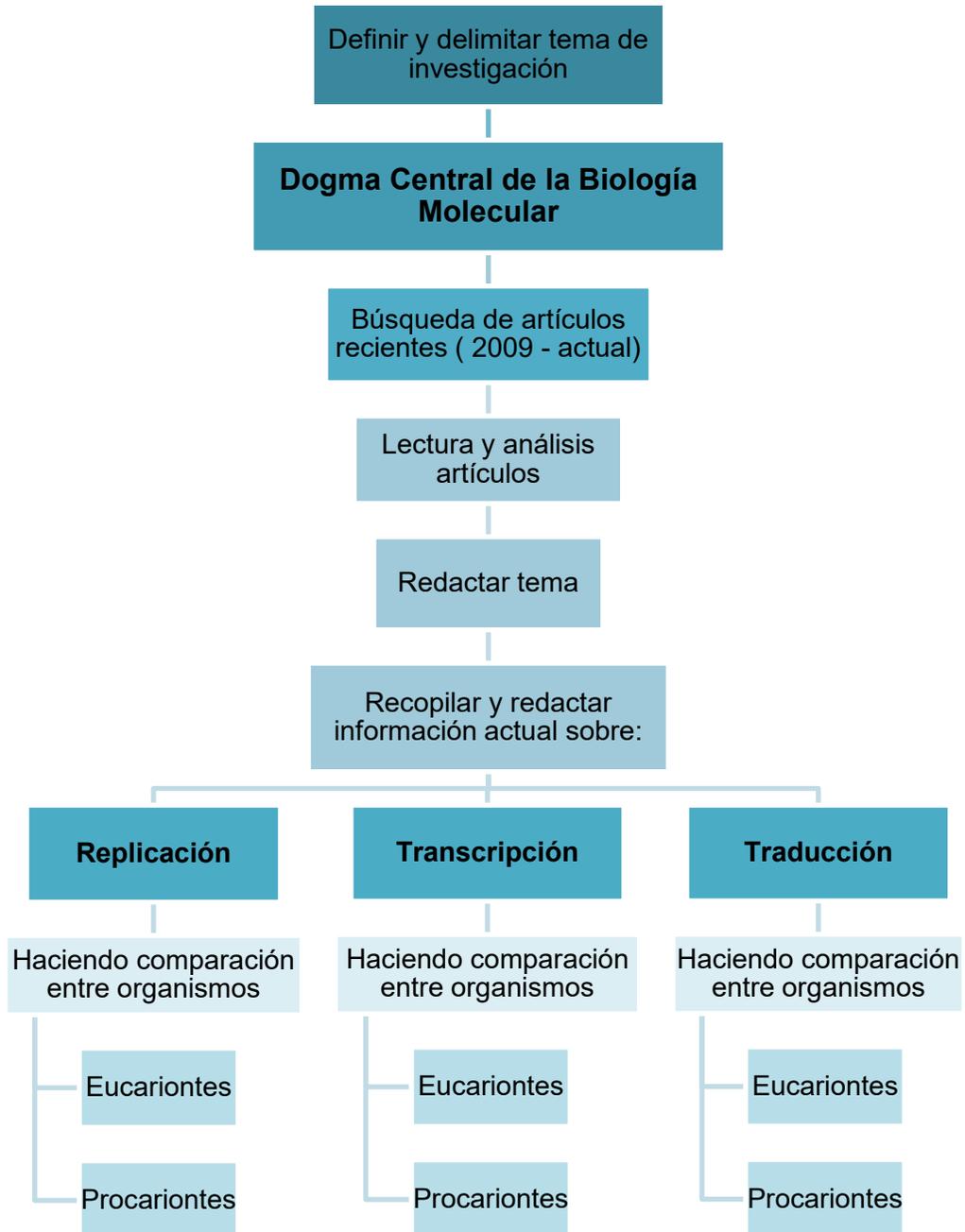
Realizar una revisión bibliográfica de las etapas que involucra el Dogma Central de la Biología Molecular (replicación, transcripción y traducción) y comparar como se lleva a cabo cada uno de estos eventos entre organismos eucariontes contra organismos procariontes mediante el uso de bases de datos bioinformáticas que permitan la actualización sobre este tema.

3.2 Objetivos Particulares

- Abarcar el Dogma Central de la Biología Molecular y discutir sobre las nuevas actualizaciones que presenta.
- Explicar y comparar la replicación del DNA entre organismos eucariontes y procariontes.
- Profundizar y extender la transcripción del DNA en organismos eucariontes, para realizar una discusión comparativa contra organismos procariontes.
- Describir y contrastar la traducción del RNA entre organismos eucariontes y procariontes.

4. METODOLOGÍA

La metodología de investigación consiste en hacer una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre las actualizaciones que hay en el Dogma Central de la Biología Molecular y las diferencias que existen entre organismos eucariontes y procariontes, para así recuperar, recopilar y redactar la información, donde se evalúe y seleccione de acuerdo a los objetivos planteados.



5. ANTECEDENTES

En 1953, fue aceptada la hipótesis de que el DNA cromosómico funcionaba como plantilla para las moléculas de RNA, y con esto, se trasladaban al citoplasma en donde determinaban la posición de los aminoácidos que generaban una proteína. Así, en 1956, Francis Crick denominó a esta hipótesis como Dogma Central (Watson, 2008).

El Dogma Central de la Biología Molecular establece que la información genética es codificada por el DNA para posteriormente ser transcrita a mRNA por medio de RNA polimerasas, y el mRNA es traducido a proteína por los ribosomas. En una célula, el DNA existe como molécula individual de la cual se origina la regulación de la expresión génica (Li y Sunney, 2011); por lo que a su vez, el DNA juega un papel esencial en la herencia y conservación de la información que contiene, y puede duplicarse para obtener más copias de esa información por medio del proceso denominado replicación.

Inicialmente, la hipótesis de Crick señalaba que las plantillas de RNA para la síntesis proteica se plegaban creando cavidades en sus superficies externas; estas cavidades adoptarían formas específicas que sólo permitieran el ajuste de un solo aminoácido, y así el RNA proveería la información para ordenar los aminoácidos durante la síntesis proteica (Watson, 2008). Sin embargo, en 1955, propuso que antes de la incorporación de las proteínas, los aminoácidos se adhieren primero a moléculas adaptadoras específicas (tRNA), que a su vez poseen superficies singulares que se pueden unir de modo específico a las bases en las plantillas de RNA (Mathews et.al, 2013; Watson, 2008).

Como se explicó brevemente, la visión clásica del Dogma Central de la Biología Molecular establece que la información genética codificada en el DNA se transcribe en casetes transportables individuales, compuestos de mRNA; y cada uno de estos casetes contiene la programación para la síntesis de una proteína en particular.

Debido a que la idea general del Dogma Central sostiene que la información genética normalmente fluye de DNA a RNA a proteína, como consecuencia se ha supuesto que los genes codifican proteínas, y que las proteínas sólo cumplen factores estructurales y catalíticos dentro de una célula. Para que el Dogma Central sea totalmente descriptivo se requieren de moléculas pequeñas, que son elementos básicos en la síntesis de proteínas (Schreiber, 2005). Se ha supuesto que los genes son similares a las proteínas, es decir, los genes son reposiciones de las secuencias que codifican a las proteínas, a excepción

de aquellas secuencias que codifican para RNAs específicos infraestructurales (rRNAs, tRNAs, snoRNAs, spliceosomal RNAs, etc.) que son directa o indirectamente requeridos para el procesamiento y traducción del mRNA. Teniéndose así que existe RNA no codificante (ncRNA) que controla la arquitectura del cromosoma, la rotación de mRNA y el tiempo en que se desarrolla y expresa una proteína (Mattick, 2003).

6. DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

El DNA de diferentes organismos se diferencia en el orden en que se disponen sus nucleótidos, es decir, el orden de la secuencia que lo constituye; para esto se debe de conocer la estructura del material genético y así estudiar su funcionamiento, lo que permitió establecer el Dogma Central.

El Dogma Central de la Biología Molecular describe cómo la información genética fluye dentro de una célula y es uno de los principios fundamentales en el área científica. Entender el flujo de la información genética es crucial para entender procesos como herencia, expresión fenotípica, evolución y biología del desarrollo (Briggs et.al., 2016).

La propuesta de Crick señalaba que “una vez que la información se había traducido a proteína no podía regresar a su forma de ácido nucleico”; es decir, él describió el dogma como una secuencia lineal de progresión de DNA a RNA (vía transcripción) a proteína (vía traducción), en donde la información no podía ser transferida de manera inversa. Esta vía secuencial unidireccional del flujo de la información genética es la base de varios procesos biológicos como división celular, cascadas de transducción de señales, mantenimiento de la homeostasis tanto en organismos procariontes como eucariontes, etc. (Briggs et.al., 2016; Koonin, 2015).

Aunque el esquema general del Dogma Central se mantiene (DNA → RNA → Proteína), la complejidad del flujo de información ha aumentado debido al descubrimiento de diversas formas de RNA con funciones particulares hasta la participación de las características dinámicas del DNA, mRNA y proteínas entre célula y célula (Jafari y Mirzaie, 2017). Pero para poder comprender este proceso, primero es necesario definir cada etapa que involucra el Dogma, teniéndose que replicación es el proceso mediante el cual una molécula de DNA sintetiza 2 copias idénticas de sí mismas. Mientras que la transcripción es el proceso por el cual la información contenida en una molécula de DNA se transmite para sintetizar una molécula de RNA; como se observa en la tabla 1 existen diferentes tipos de RNA con características y funciones diferentes, siendo el mRNA la molécula efectora para la transcripción. Por último, traducción es el proceso que hace posible la síntesis de una proteína en los ribosomas a partir del mensaje transcrito en el mRNA.

Tabla 1. Tipos de RNA (Modificada de Devlin, 2006).

Tipo de RNA	Función	Tamaño	Sitio de síntesis
mRNA	Transferencia de información genética desde el núcleo al citoplasma, o del gen al ribosoma	1000 a 10 000 nt	Nucleoplasma
tRNA	Transferencia de aminoácidos al complejo mRNA-ribosoma y corrección de la inserción en la secuencia	65 – 110 nt	Nucleoplasma
rRNA	Armazón estructural de los ribosomas	185 – 2100 nt	Nucléolo
		285 – 5400 nt	Nucléolo
		5.85 – 158 nt	Nucléolo
		55 – 120 nt	Nucleoplasma
hnRNA	Algunos son precursores de mRNA y otros RNA	Muy variable de 30S a 100S	Nucleoplasma
snRNA	RNA estructurales y reguladores de la cromatina, implicado en la maduración del mRNA	100 – 300 nt	Nucleoplasma
scRNA	Selección de proteínas para la exportación	129 nt	Citosol y retículo endoplásmico rugoso
ncRNA	Regulan la expresión génica en eucariontes	Variable	Nucleoplasma
snoRNA	Dirigen la codificación de nucleósidos de otros RNA	60 – 300 nt	Nucléolo

En 1965, Jacob y Monod demostraron que la tasa de transcripción es controlada por una retroalimentación en la que los niveles de la proteína transcrita regulan la actividad del complejo transcripcional. Sin embargo, cabe mencionar que cualquier variación fenotípica en la secuencia o estructura de una proteína, como errores en la transcripción,

modificaciones en la traducción o en el RNA o mal plegamiento proteico puede afectar su funcionalidad. A su vez, el DNA no es constante y los genes pueden ser silenciados o transcritos en formas alternas, en variantes de splicing donde los exones pueden ser totalmente omitidos o alternados; también las proteínas pueden llevar información, la ubiquitina regula los niveles de proteína y que la modificación postraduccional puede cambiar la actividad de una proteína, produciendo así proteínas carentes o de adición de funciones específicas (Jafari y Mirzaie, 2017; Koonin, 2012).

Es bien dicho que el Dogma Central se basa en principios de exclusión, como uno que involucra a la traducción, es decir, que no se puede transferir información de una proteína hacia un ácido nucleico (Figura 4). Este postulado no está basado en ninguna ley física o principio, y esencialmente todas las reacciones que involucran la traducción son reversibles. Sin embargo, no puede realizarse de tal manera porque la manera en que está diseñado el sistema de traducción dificulta que ésta sea inversa; para que la información fluya proteína → RNA/DNA sería necesario de reacciones elaboradas que hasta ahora se desconocen en cualquier forma de vida; y con la degeneración del código genético, la traducción inversa sólo podría ser un proceso estocástico que conllevaría importantes pérdidas de información. Además, el proceso de traducción va acompañado del plegamiento de la proteína sintetizada, cuando esto ocurre la proteína adquiere su forma nativa, lo que genera que los residuos de aminoácidos más distantes sean aproximados en forma tridimensional impidiendo que la secuencia de aminoácidos sea leída sin que se desnaturalice la proteína. Es decir, la célula no puede regresar al estado lineal la secuencia de aminoácidos de una proteína para que pueda existir una traducción inversa (Koonin, 2012; Koonin, 2015; Crick, 1970). Pero antes de hablar sobre las posibles traducciones inversas o no, habrá que definir la propuesta inicial que presentó Francis Crick.

6.1 Propuesta inicial de Crick

A pesar que desde 1956 se hablaba sobre la existencia de un código o clave que permitiera pasar de las cuatro bases nitrogenadas en el DNA a los 20 aminoácidos existentes en las proteínas, fue hasta 1958 cuando la hipótesis original de Crick fue aceptada. Esto significa la existencia de una serie de procesos donde tendría que haber alguna molécula intermediaria en el flujo de la información desde el DNA a las proteínas. Jacob y Monod en 1961, propusieron la hipótesis del mensajero; en ese mismo año,

Brenner y colaboradores demostraron la existencia de este intermediario al que se denominó al mRNA (Crick, 1970; Alberts et.al., 2002).

Basándose en estos trabajos, Francis Crick en 1970 planteó la idea de un sistema fundamental de mantenimiento y flujo de la información genética en los organismos vivos que denominó Dogma Central de la Biología Molecular (Figura 1).

Así, la transferencia de información genética se podía dividir en 3 grupos:

DNA → DNA

DNA → RNA

RNA → proteína

a. Replicación

De manera general, la replicación del DNA inicia con la descondensación de la cromatina, es decir, el DNA se separa de las histonas y se une a las enzimas específicas que intervienen para facilitar la replicación, como girasa, topoisomerasa y helicasa que están involucradas en la separación de la doble cadena de DNA. Al separarse, las cadenas forman la horquilla de replicación, una estructura en forma de Y; por la cual se desplazan las enzimas que catalizan la replicación del DNA (DNA polimerasa), esta va acompañada de una abrazadera deslizante y el cargador de la abrazadera que facilitan su desplazamiento a través de la cadena de DNA plantilla, así como de una primasa, enzima que genera el cebador que sirve como molde para la síntesis de la cadena complementaria. Una vez sintetizada la cadena complementaria la ligasa cierra la secuencia sintetizada (Alberts et.al., 2013; Mathews et.al., 2013).

b. Transcripción

La transcripción consiste en el paso de la información contenida en el DNA hacia el RNA; esta transferencia de información se realiza siguiendo las reglas de complementariedad de bases nitrogenadas. En las bacterias la transcripción y la traducción tienen lugar en el citoplasma bacteriano y son simultáneas. Sin embargo, en eucariontes la transcripción tiene lugar en el núcleo y la traducción en el citoplasma. Para este proceso son necesarias enzimas como la RNA polimerasa que une los nucleótidos que conformarán la nueva cadena de RNA; factores de transcripción, que reciben las señales celulares que generan el inicio de la transcripción al ser identificada la secuencia promotora, así, la RNA

polimerasa se adhiere a la secuencia del DNA, se abre la doble hélice y comienza la transcripción del gen correspondiente. El proceso termina cuando aparece la secuencia de terminación del gen que, al igual que el promotor es reconocida (Alberts et.al., 2013; Mathews et.al., 2013).

La transcripción consta de 4 etapas:

1. Iniciación: secuencia DNA promotora reconocida por el aparato de transcripción
2. Elongación: cadena en formación antiparalela
3. Terminación: mRNA transcrito primario
4. Maduración: pérdida de algunos nucleótidos

c. Traducción

Al principio, se creía que las plantillas de RNA para la síntesis proteica se plegaban para crear cavidades en superficies externas específicas para los 20 aminoácidos diferentes, así las cavidades adoptarían formas tales que sólo permitieran el ajuste de un solo aminoácido durante la síntesis de proteínas. Pero, en 1955, Crick argumentó que las bases del RNA tienen que interactuar con grupos hidrosolubles y que muchos aminoácidos prefieren las interacciones hidrófobas, además de que sería muy complicado discriminar de modo preciso la estructura química de aminoácidos que sólo difieren de la presencia de un grupo; entonces propuso que antes de la incorporación a proteínas, los aminoácidos se adhieren a moléculas adaptadoras específicas que a su vez poseen superficies que se pueden unir de modo específico a las bases en las plantillas de RNA. Con esto, Zamecnik y colaboradores descubrieron que los aminoácidos se unían al tRNA por acción de las aminoacil sintetetas; cada tRNA contiene una secuencia de bases contiguas (anticodón) que durante la síntesis proteica se unen de manera a específica a grupos de bases sucesivas (codón) (Figura 2) a lo largo de las plantillas de RNA para poder realizar la traducción (Figura 3), y así, es como Crick pudo completar su hipótesis (Watson, 2008; Jafari y Mirzaie, 2017; Alberts, 2013).

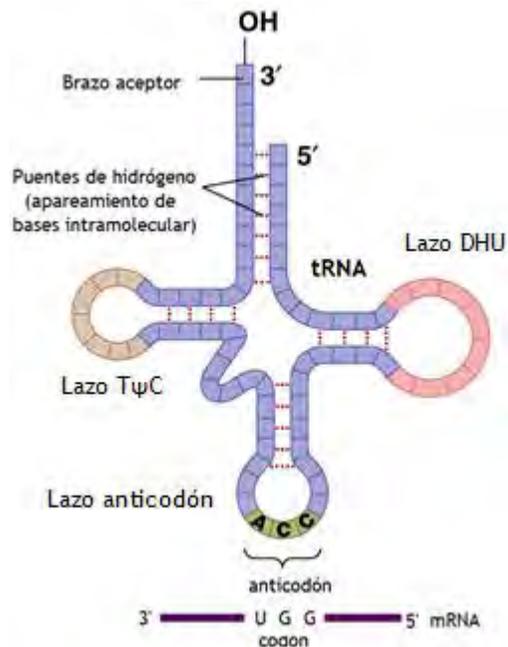


Figura 2. Estructura del tRNA. El anticodón en este tRNA reconoce el codón para un aminoácido específico en el mRNA transcrito (Modificada de Wiley, 2002; Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

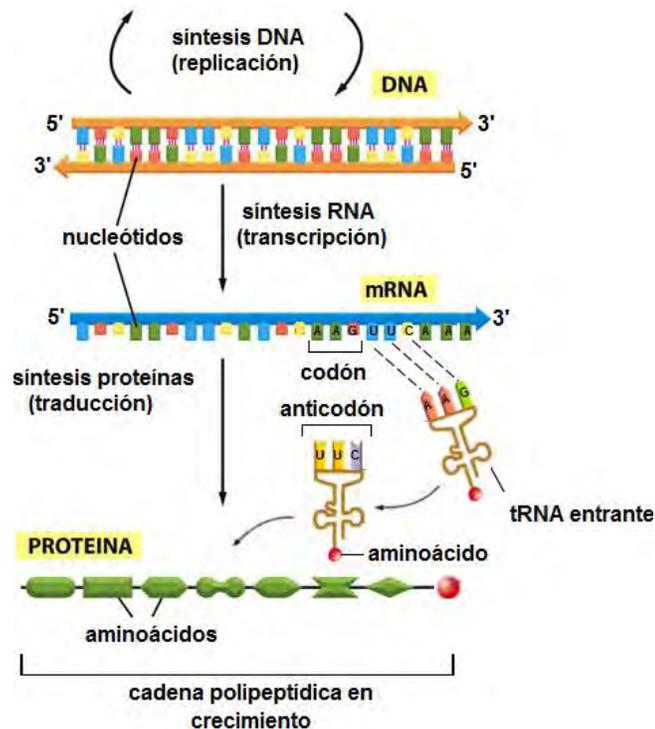


Figura 3. Esquema general del mecanismo de transcripción y traducción. Los nucleótidos del mRNA se organizan para formar una copia complementaria de la cadena de DNA, donde cada grupo de 3 nucleótidos es un codón complementario a la región anticodón de una molécula de tRNA específica. Cuando hay apareamiento de bases, el aminoácido se añade a la cadena polipeptídica (Modificada de Alberts, 2013; Watson, 2008).

Pero los descubrimientos de la transcripción inversa, moléculas de RNA catalíticamente activas y modificaciones postraduccionales hicieron que se refutara la idea general de Crick y que hubiera excepciones/modificaciones al Dogma Central, teniéndose así 5 grupos de transferencia de información genética.

- DNA → DNA
- DNA → RNA
- RNA → proteína
- RNA → RNA
- RNA → DNA

6.2 Descubrimiento de la Transcriptasa Inversa

La modificación del Dogma Central inicialmente propuesto por Crick fue en respuesta al descubrimiento de la transcripción inversa, cuando se aclaró que la información transferida de RNA a DNA (Figura 4) era una parte integral del ciclo de retro-transcripción de elementos genéticos. Así es como la transcripción inversa es fundamental para la interconversión sobre la complementariedad de bases (Koonin, 2012).

Inicialmente se proponía un sentido unidireccional en el flujo de la información genética, comenzando por el DNA, seguido por el proceso de transcripción a RNA y finalmente por la traducción a una proteína. Actualmente se sabe que el proceso de flujo de la información genética es bidireccional, con procesos de la transcripción inversa, fenómeno descubierto y utilizado en retrovirus para multiplicarse en las células infectadas. El descubrimiento de la transcriptasa inversa fue inspirado gracias al artículo original de Crick; en 1970 Howard Temin y David Baltimore independientemente descubrieron una DNA polimerasa dependiente de RNA a la que se le nombró transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. El sorprendente hallazgo de la RT creó controversia pues violaba la principal idea del Dogma Central de la biología molecular; exponiendo que la información podría fluir de RNA a DNA, lo añadió un peso considerable a los experimentos anteriores de Temin y Baltimore (Coffin y Fan, 2016; Kevles, 2010).

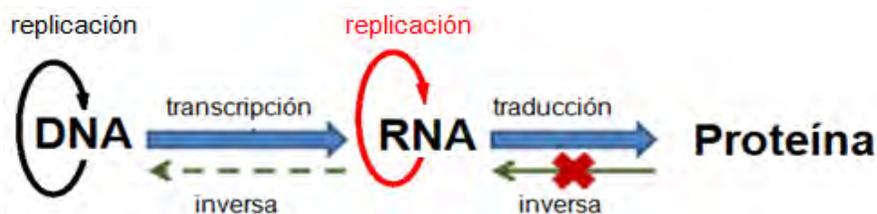


Figura 4. Modificaciones posteriores al Dogma Central (Modificada de Koonin, 2012).

Debido a la inestabilidad del RNA, Temin propuso que el genoma RNA del virus del sarcoma de Rous (RSV) era convertido a un provirus DNA, sugiriendo que la replicación viral de RNA involucraba al DNA como intermediario. Para probar su hipótesis en los experimentos iniciales, Temin utilizó inhibidores de la síntesis de DNA y RNA para investigar más directamente el mecanismo de replicación del virus. Se encontró que la actinomicina D se intercala en dsDNA bloqueando al DNA, pero no el RNA, sugiriendo que la síntesis de RNA se podría bloquear de forma reversible si éste provenía de DNA; de manera inesperada, utilizando metotrexato (inhibidor de la síntesis de DNA al bloquear la formación de timidina) observó que se inhibió la infección temprana en el proceso, pero no tuvo ningún efecto sobre la producción de virus en las células asumiendo que los virus tumorales de RNA contienen una actividad que requiere el RNA y los cuatro nucleósidos trifosfatos para sintetizar el DNA que podía ser inhibido; y con esto acumuló datos que muestran que el RSV es sensible a los inhibidores de la síntesis de DNA y sugiere que el DNA, complementario al RNA genómico del RSV, está presente en las células transformadas (Coffin y Fan, 2016; Shapiro, 2009; Anónimo, s.f.).

Mientras tanto Baltimore otro virólogo que había estado estudiando la replicación viral, tomando un enfoque bioquímico y buscando directamente la síntesis de RNA y DNA en los viriones. Previamente había aislado una enzima con actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA en viriones del virus de estomatitis vesicular (VSV), es decir, una enzima que permitía copiar el RNA genómico hacia mRNA; llegando hasta establecer el virus de la leucemia murina Rauscher (R-MLV), a lo que demostraría independientemente el modelo de Temin (Coffin y Fan, 2016; Anónimo, s.f.).

Fue hasta 1975 que Temin y Baltimore en colaboración con Dubelcco recibieron el premio Nobel por sus hallazgos en la interacción entre retrovirus y el material genético de una célula, por medio de la RT. Para mostrar finalmente que el DNA podría ser sintetizado a partir de una plantilla de RNA, Baltimore y Temin pre-incubaron los viriones con RNasa; si el RNA era realmente la plantilla entonces la degradación de la plantilla evitaría la síntesis de DNA por el virion, hecho que sucedió. Mientras más tiempo trataban los viriones con RNasa, disminuía la cantidad de DNA sintetizado, probando así que la enzima del virion podía catalizar la síntesis de DNA dependiente de RNA, la RT (Anónimo, s.f.).

La transcripción inversa consiste en el flujo inverso de información genética desde el RNA hasta el DNA. La RT es una enzima que emplea una plantilla de RNA para catalizar la síntesis de DNA.

Esta enzima muestra tres actividades enzimáticas:

- I. Síntesis de DNA usando como molde el RNA
- II. Síntesis de DNA usando como molde DNA
- III. Actividad de ribonucleasa H (degrada la cadena de RNA de un híbrido RNA – DNA)

Como todas las polimerasas, la transcriptasa inversa necesita un cebador; el proceso empieza cuando un tRNA específico celular actúa como cebador y se une al PBS, que es la parte complementaria del RNA plantilla; el DNA complementario sintetizado se une a la región U5 (región no codificante) y a la región R, así la RNasa H (dominio de la RT) degrada el extremo 5' del RNA plantilla para eliminar la región U5 y la región R. Esto conduce a la formación de un pequeño DNA monocatenario que es complementario al segmento de RNA que está en el extremo 3' del RNA plantilla; este DNA hibrida al extremo 3' del RNA plantilla (región U3) adyacente a la secuencia poli A y la hebra de DNA recién sintetizado se hibrida con la región R complementaria en el RNA plantilla; gracias al segundo cebador, polipurina de tracto corto (PPT), que se encuentra cerca del extremo 3' del RNA plantilla y es creado por escisión de la RNasa H y es utilizado para iniciar la síntesis de DNA de cadena positiva. Posteriormente la primera hebra de DNA complementario (cDNA) es extendida hasta que la mayoría del RNA plantilla es degradado por la RNasa H. Por último la RT termina de sintetizar la cadena de DNA bicatenario con largas repeticiones terminales (LTRs) en cada extremo (Figura 5). En eucariontes los tramos auto-replicantes del genoma eucariota conocidos como retrotransposones utilizan la RT para pasar de una posición en el genoma a otro a través de un intermediario de RNA (Coffin y Fan, 2016; Shapiro, 2009; Shimotohno, 2011).

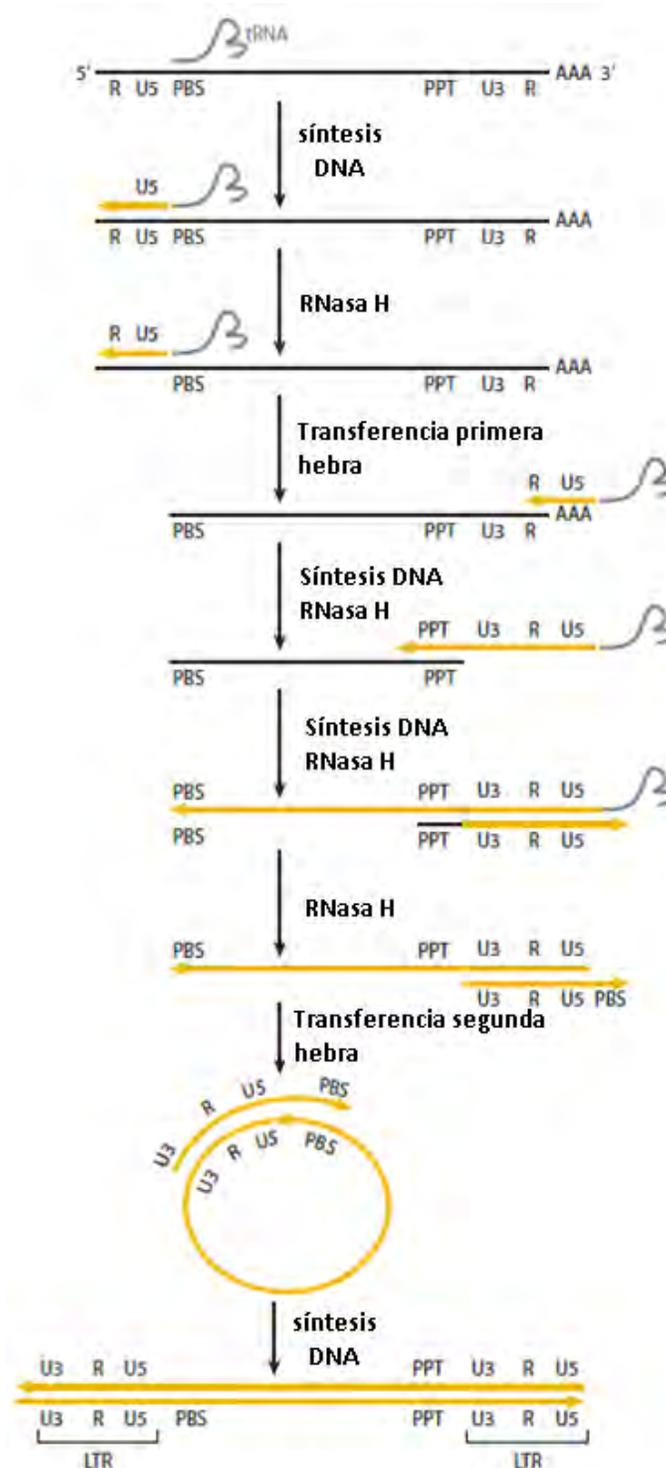


Figura 5. Mecanismo de acción de la transcripción inversa. (Modificada de Coffin y Fan, 2016)

Actualmente, está claro que la RT es necesaria para la replicación de varias clases de elementos transponibles y para ciertos virus de plantas y animales. El descubrimiento de la transcriptasa inversa remodeló la ciencia de la biología molecular de muchas maneras

permitiendo una nueva era en la investigación del cáncer, ya que con esta enzima se hizo posible entender la genética de los virus tumorales y encontrar oncogenes usando copias de RNA como sondas para secuencias de DNA. La RT también abrió el campo de la biotecnología: con esta enzima fue posible hacer DNA de todo tipo de RNA, no sólo de RNA viral, y luego insertar genes en vectores y manipularlos. A su vez, favoreció el descubrimiento del mecanismo de acción del VIH, al ser identificado por la actividad de esta enzima. Además, cuando se acopló con la reacción en cadena de la polimerasa, permitió utilizar mRNA para detectar defectos genéticos en enfermedades humanas de manera mucho más eficiente. Inicialmente, se consideró que la RT era una enzima viral única para retrovirus y para-retrovirus; posteriormente se encontró que la transcripción inversa era fundamental para la telomerasa celular. La telomerasa es un complejo multiproteico responsable de mantener los extremos de los cromosomas (telómeros) mediante la generación de copias en tándem de repeticiones de hexanucleótidos; siendo los componentes clave de la telomerasa la TERT y la RNA telomerasa (Kevles, 2010; Shapiro, 2009).

7. ¿QUÉ ES EL GENOMA?

Debido a su simplicidad el Dogma Central ha sido un atractivo esquema de deducción de flujo de información genética siendo así que los genes son el mapa de la vida. Precisamente, el Dogma Central ha guiado investigaciones para identificar las causas de la enfermedad y la relación con el fenotipo, así como construido las bases de las herramientas de laboratorio que permitan interrogar estas causas (Franklin y Vondriska, 2011; Campbell y Reece, 2011).

El genoma es todo el DNA contenido en un organismo o en una célula. Este se puede dividir en tres clases: genoma viral (que no es de importancia para esta revisión), genoma procariota y genoma eucariota.

7.1 Genoma eucariota

Al hablar de organismos eucariontes nos encontramos con dos aspectos contradictorios la variabilidad entre especies y dentro de una especie; así como la constancia de los caracteres que definen las especies, familias o grupos. Es por eso que se explica que cada uno de los seres vivos presenta un genoma en específico que le provee la característica de contener la información necesaria para construir un nuevo individuo (Campbell y Reece, 2011; Brown, 2002; Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Como se muestra en la tabla 2 no existe una correlación entre el tamaño genómico, complejidad morfológica y número de genes. Por ejemplo, los genomas de salamandras y lirios contienen más de diez veces la cantidad de DNA que el genoma humano. Sin embargo, estos organismos no son claramente diez veces más complejos que los seres humanos (Brown, 2002; Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Debido a esta amplia gama de variaciones solo nos enfocaremos en el genoma del humano. En los humanos una copia del genoma completo contiene más de 3000 millones de pares de bases del DNA y está contenido en todas las células que poseen un núcleo. El genoma humano está formado por varios segmentos lineales de DNA los cuales se organizan en doble hélice y corresponden a los cromosomas visibles durante la división celular; los cuales contienen segmentos de copias únicas (genes) y diferentes familias de DNA repetitivos (Pray, 2008; Cooper, 2010; Campbell y Reece, 2011).

Tabla 2. Tamaño de los genomas eucariontes y su relación con el número de genes
(Modificada de Brown, 2002).

Organismo eucarionte	DNA (pb)	N° de genes estimados codificantes
<i>Sacchharomyces cerevisiae</i>	12 000 000	5 800
<i>Plasmodium falciparum</i>	23 000 000	5 300
<i>Caernohabditis elegans</i>	97 000 000	19 099
<i>Arabidopsis thaliana</i>	115 000 000	25 498
<i>Drosophila melanogaster</i>	116 000 000	13 601
<i>Anopheles gambiae</i>	278 000 000	14 653
<i>Danio rerio</i>	1 560 000 000	20 000
<i>Mus musculus</i>	2 490 000 000	24 948
<i>Rattus norvegicus</i>	2 570 000 000	21 276
<i>Homo sapiens</i>	3 000 000 000	30 000

Un gen es un segmento de DNA que al expresarse/codificarse da un producto funcional que puede ser una proteína o un mRNA; así, encontramos genes que codifican para ribozimas (fragmentos de RNA que cortan y destruyen a otro RNA), RNA de transferencia (tRNA) necesarios para la síntesis de proteínas, miRNA o RNA con actividad reguladora de la expresión génica, entre otras. Principalmente, los genes están divididos en 2 regiones: la región codificante o estructural y la región promotora o reguladora. La región codificante o estructural es el segmento de DNA que contiene la información que dará origen a una proteína y contiene a los intrones y exones (Figura 6). Por otro lado, la región promotora (o promotor) es un segmento de DNA localizado inmediatamente adelante o “río arriba” de la región codificante y que posee una función reguladora de la expresión génica, está encargada de contener las secuencias necesarias para expresar el gen; el promotor es el responsable de que no todos los genes se expresen en todas las células del cuerpo. Por lo que un genoma, será el conjunto de genes que contiene la información necesaria para que una célula pueda existir y reproducirse, es decir, son todos los genes codificantes de un organismo y otras secuencias de DNA. Así, se llegó a clasificar el número de repeticiones de las secuencias que las componen donde existen dos tipos de secuencias: secuencias de DNA de copia única y secuencias de DNA repetitivo. El 50% o más del genoma eucariota está constituido por repeticiones de 15 segmentos de DNA,

mientras que la proporción de segmentos de DNA de copia única es muy escasa (Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015; Méndez y González-Tizón, s.f.; Brown, 2002).

La estructura de los genomas eucariontes corresponde a la región estructural del gen que a su vez está dividida funcionalmente en 2 tipos de segmentos: los exones y los intrones. Los exones e intrones se intercalan ordenadamente, y se presentan como regiones de genes que contienen segmentos de secuencias codificantes, los exones; así como secuencias que no codifican para ningún producto funcional (secuencias no codificantes), estas secuencias no codificantes son secuencias espaciadoras entre los genes codificantes, los intrones, que interrumpen la secuencia de genes que se repiten muchas veces en el genoma. Ambos se transcriben para producir un transcrito primario largo de RNA, pero los intrones necesitan ser removidos para la maduración del mRNA (Figura 6), dejando únicamente a los exones alineados y ordenados. Este proceso se conoce como corte y empalme o “splicing” y genera una secuencia de RNA específica, más corta y madura que su contraparte de DNA. También se presentan los sitios UTR, que son sitios que no se traducen a proteína y se encuentran en el extremo 5' del mRNA (5' UTR), éste se extiende desde el sitio de inicio de la transcripción; mientras que en el extremo 3' del mRNA (3' UTR) se encuentran secuencias que regulan la eficacia de la traducción. La señal de poliadenilación que se da en el extremo 3' implica el reconocimiento de la señal en el lugar de procesamiento necesario para madurar el mRNA a traducir (Figura 6). El sitio ORF o región codificante es la secuencia de RNA comprendida entre el codón de inicio y el codón de paro para la traducción, teniendo los eucariotas un solo ORF denominado monocistrónico (Pray, 2008; Cooper, 2010; Méndez y González-Tizón, s.f.; Brown, 2002). Por otro lado la región reguladora del gen también considerada promotora comprende la caja TATA, un sitio de unión de factores de transcripción e histonas, que está implicada en el proceso de transcripción por la RNA polimerasa. Ésta presenta una secuencia del tipo 5'-TATAAA-3' y se encuentra unida a la proteína TBP durante el proceso de transcripción para facilitar el desenrollamiento del DNA. Y por último, la caja CAAT, una secuencia de nucleótidos con la secuencia 5'-GGNCAATCT-3' que señala el sitio de unión de los factores de transcripción del RNA (Figura 6) (Yang, 2007).

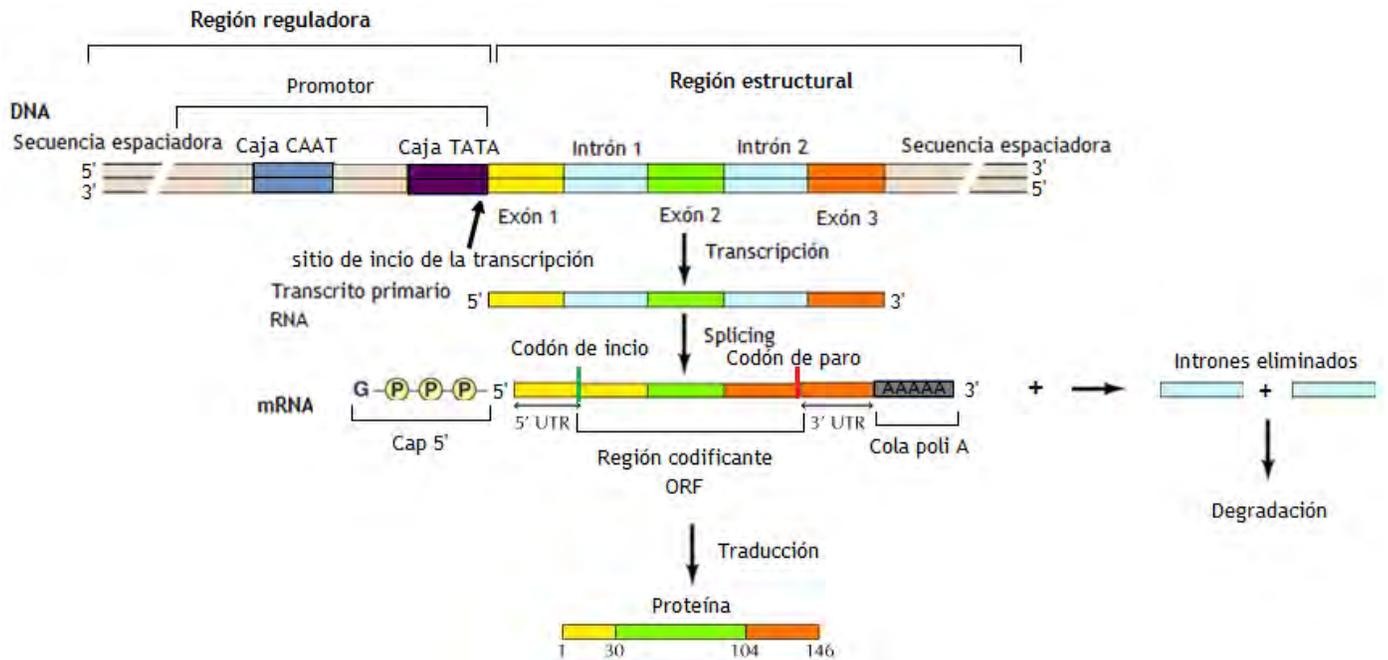
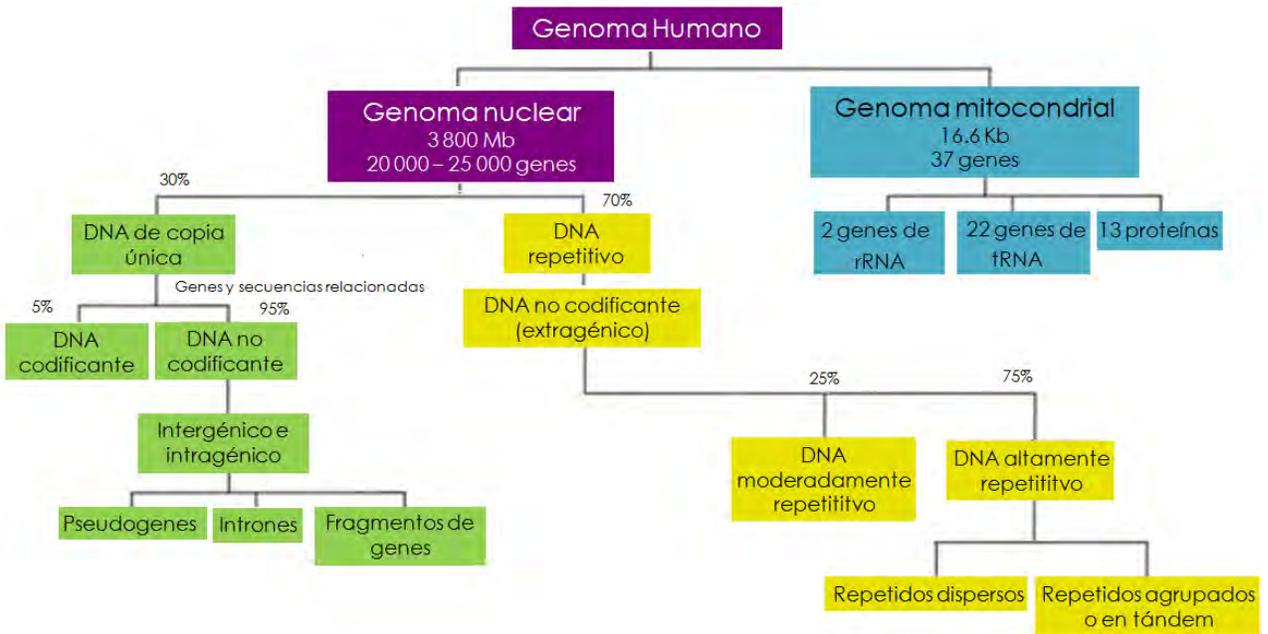


Figura 6. Esquema del gen eucariota. Secuencias codificantes y no codificantes (Modificada de Cooper, 2010; Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Hay un extraordinario grado de variación en el tamaño del genoma entre diferentes eucariotas que guarda poca relación con las diferencias en la complejidad del organismo, nivel de ploidía o número de genes que codifican para proteínas. Estas variaciones se deben a las secuencias de DNA no codificante repetitivo, por lo que la organización del genoma se daría en DNA repetitivo y DNA de copia única. Dentro de las secuencias de DNA repetitivo pueden distinguirse la categoría de no codificante (extragénico), el DNA extragénico a su vez se divide en secuencias de DNA moderadamente repetitivo o disperso y secuencias de DNA altamente repetitivo o agrupado, que comprenden repetidos agrupados o en tándem y repetidos dispersos; estos últimos comprenden la mayor parte de la secuencia del genoma humano y su función es desconocida. Por otra parte, el DNA de copia única presenta dos categorías, DNA codificante y no codificante; donde el no codificante (intragénico e intergénico) presenta tres subcategorías pseudogenes (segmentos genómicos similares estructuralmente a los genes funcionales, pero incapaces de generar productos génicos funcionales), fragmentos de genes e intrones (Cuadro 1) (Pray, 2008; Méndez y González-Tizón, s.f.; Brown, 2002).

Cuadro 1. Genoma humano (Modificada Méndez y González-Tizón, s.f.; Brown, 2002).



7.2 Genoma procariota

Por otro lado, la organización física del genoma procariota es diferente. Éste es menor, más simple y denso; presenta una organización compacta, es decir, no tiene ningún tipo de genes discontinuos pues hay poco espacio entre genes al no presentar intrones, existe <11% de DNA no codificante disperso en pequeños fragmentos, y contiene información adicional linear o circular en plásmidos (Figura 7). Los genes portados por los plásmidos son útiles, codificando propiedades tales como la resistencia a los antibióticos o la capacidad de utilizar compuestos, pero los plásmidos parecen ser prescindibles, una célula procariota puede existir muy eficazmente sin ellos. Por último la organización del material genético se da en operones, que favorecen la regulación de genes con funciones relacionadas (Vries, 2012; Brown, 2002; Griswold, 2008).

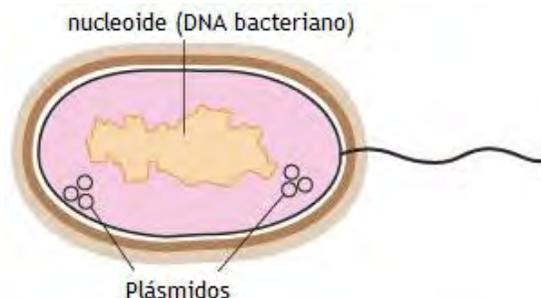


Figura 7. Esquema del material genético procariota. Los plásmidos son pequeñas moléculas de DNA circular que se encuentran dentro de las células procariotas (Modificada Brown, 2002)

El genoma procariota se encuentra en la célula entera, pero confinado en una estructura llamada nucleoide que ocupa sólo una pequeña fracción del volumen celular total; siendo este el único “cromosoma” consistente en una molécula de DNA de manera circular superenrollado (Figura 8), el nucleoide está conformado por 60% DNA, 30% RNA, 5 – 10% proteínas y 1% lípidos (Vries, 2012). El tamaño del genoma procariota es pequeño, pues no superan las 4.6 Mb, ni supera la codificación de 4 300 genes (ej. *E. coli*): como se muestra en la tabla 3, a diferencia del genoma eucariota aquí sí existe una correlación entre el tamaño genómico, complejidad morfológica/bioquímica y número de genes codificantes para proteínas (Brown, 2002; Griswold, 2008).

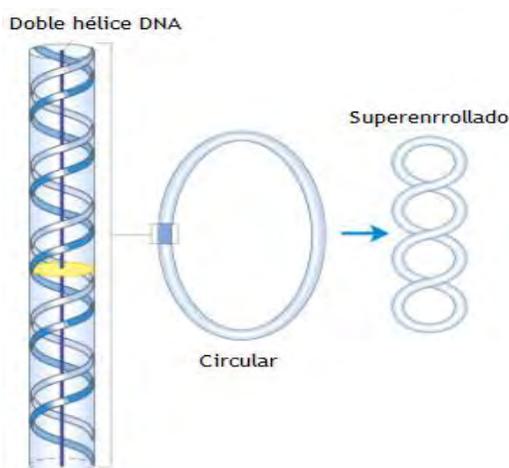


Figura 8. DNA procariota (Modificada Griswold, 2008).

Tabla 3. Tamaño de los genomas procariontes y su relación con el número de genes (Modificada de Brown, 2002).

Organismo procarionte	DNA (pb)	Nº de genes estimados codificantes
<i>Buchnera species</i>	640 681	564
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	816 394	677
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1 230 230	1 052
<i>Helicobacter pylori</i>	1 667 867	1 566
<i>Haemophilus influenzae</i>	1 830 138	1 709
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2 160 837	2 094
<i>Neisseria meningitidis</i>	2 272 351	2 250
<i>Xilella fastidiosa</i>	2 679 306	2 766
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 813 641	2 595
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4 411 529	3 918

Los genes procariontes (Figura 9) al tener una secuencia continua se va a transcribir todo contenido del DNA a codificar, y a diferencia de los eucariontes los procariontes poseen 2 o más ORF denominándose policistrónico, si se varía el ORF una misma secuencia de nucleótidos puede producir diferentes proteínas (Griswold, 2008).

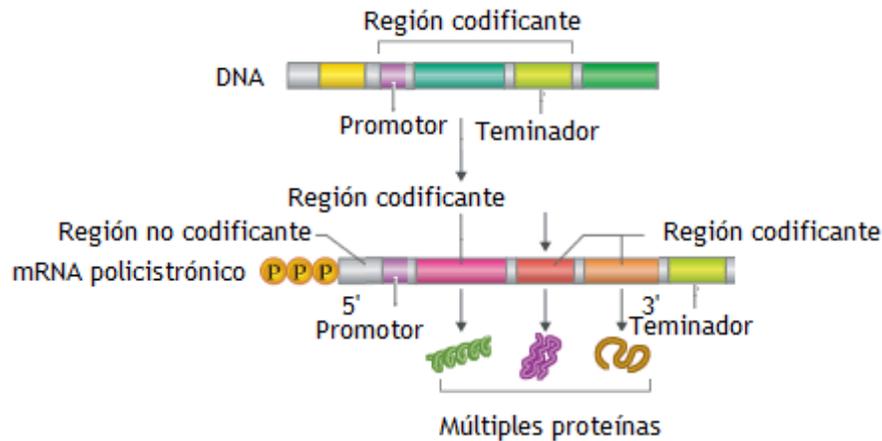


Figura 9. Esquema del gen procarionte. No presenta intrones, las pequeñas regiones no codificantes son debido a los múltiples ORF que generan diversas proteínas, es el cambio de marco de lectura (Modificada de Komaba, 2010).

Quizás debido a las restricciones de espacio de empaquetar muchos genes esenciales en un solo cromosoma, los organismos procariontes pueden ser altamente eficientes en términos de organización genómica. Además, a diferencia de los cromosomas eucariotes, una característica no presente en estos son los operones policistrónicos; los operones son rasgos característicos de los genomas procariontes. Un operón es un grupo de genes que están situados adyacentes entre sí en el genoma, es decir, más de una región codificante unidos a un solo promotor con sólo uno o dos nucleótidos entre el final de un gen y el comienzo del siguiente. Todos los genes en un operón se expresan como una sola unidad. Un ejemplo típico es el operón de lactosa de *E. coli*, el primer operón que se descubrió en 1961 por Jacob y Monod; éste contiene tres genes (β – galactosidasa, β – galactosidasa permeasa y β – galactosidasa transacetilasa) implicados en la conversión del disacárido lactosa en sus unidades de monosacárido (Figura 10). Los monosacáridos son sustratos para la vía glicolítica generadora de energía, por lo que la función de los genes en el operón de lactosa es convertir la lactosa en una forma que puede ser utilizada como fuente de energía por la bacteria. La lactosa no es un componente común del ambiente natural de *E. coli*, así que la mayor parte del tiempo el operón no se expresa y las enzimas para la utilización de la lactosa no son hechas por la bacteria; pero cuando la

lactosa está disponible, se activa el operón expresándose los tres genes juntos, dando como resultado la síntesis coordinada de las enzimas que utilizan lactosa. La función principal de los operones es la regulación génica en procariontes (Griswold, 2008; Brown 2002).

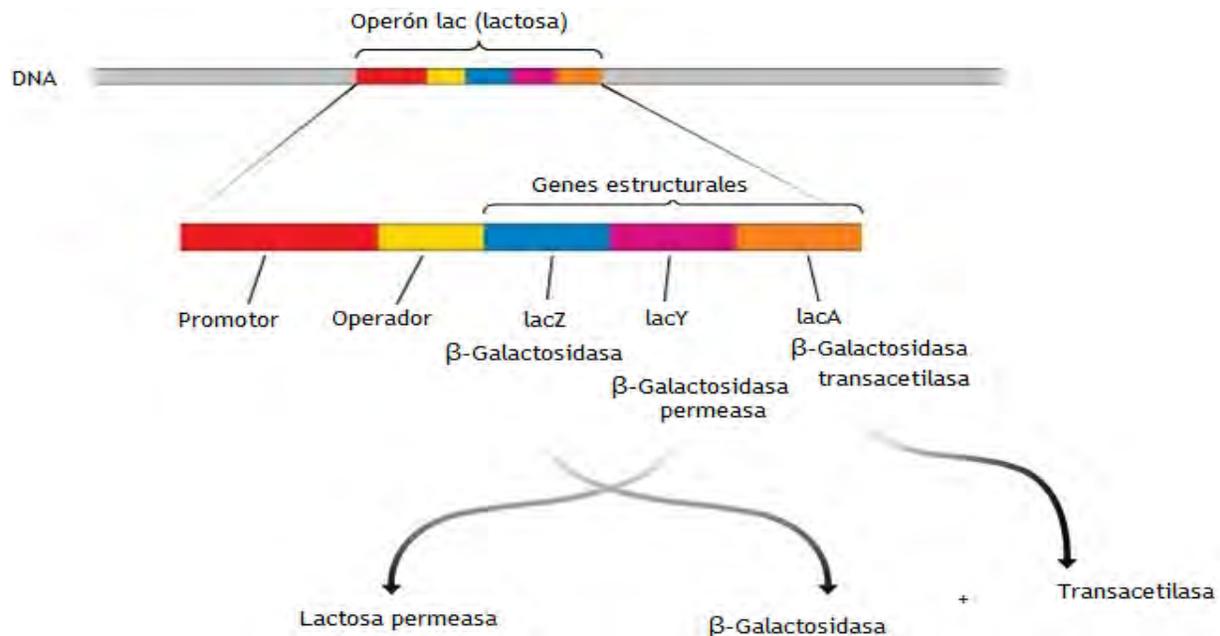


Figura 10. Operón lac de *E. coli* (Modificada de Griswold, 2008; Brown 2002).

Tanto en procariontes como eucariontes las variaciones genéticas, mutaciones, incluyendo roturas cromosómicas y reordenamientos en el material genético, ocurren al azar; y se verán reflejadas en el grado de expresión de los elementos codificados, haciendo que los genes se expresen con diferente eficiencia (Figura 11) además de que serán variables en su grado de afección al transcriptoma. El transcriptoma es el conjunto de genes que se están expresando en un momento determinado en una célula, es decir, la expresión de un gen supone que éste ha sido transcrito a mRNA maduro (eliminación de intrones en el caso de eucariontes), por lo tanto va a dar un producto final proteico. Por lo mismo, células de un mismo organismo y con un mismo genoma pueden llegar a ser tipos celulares muy diferentes dependiendo de la combinación de genes que exprese cada una, lo que sería, depender de su transcriptoma. Además de los diferentes genes activos en un momento dado, que generan un conjunto particular de mRNA, también se transcribe DNA que no es traducido a proteína, generando un RNA no codificante; éste, tiene un importante papel regulador sobre la expresión de genes (Genome Research Limited, 2016; Wilkins, 2012).

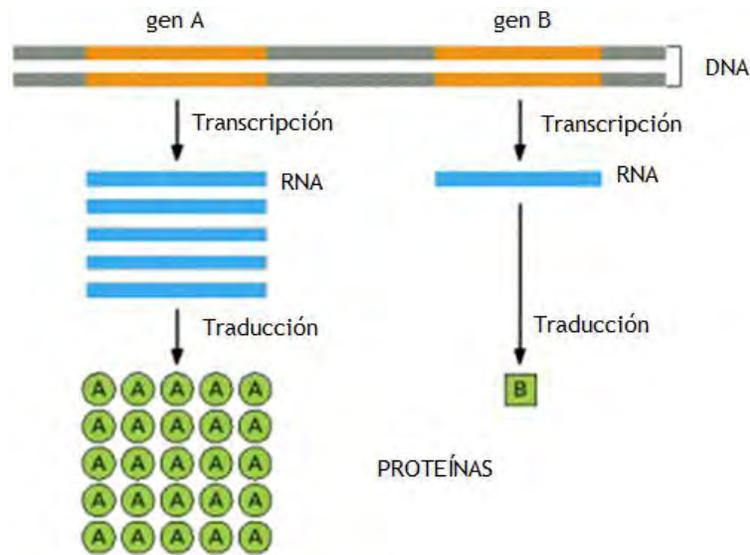


Figura 11. Genes que se expresan en diferente eficiencia (Modificada de Wilkins, 2012).

En el pasado, se creía que el genoma era estático a través de la vida de un organismo y, además era invariable entre el tipo de célula y el individuo; que los cambios que ocurren en las células somáticas no se podían heredar; y que la información necesaria y suficiente para la función celular estaba contenida en la secuencia génica. Sin embargo, la reciente acumulación de evidencia desafía la lógica lineal del Dogma Central y cuestiona todas estas creencias. Ahora está claro que el sistema de flujo de información es multidireccional; que genes, transcripciones y proteínas constituyen este sistema (Franklin y Vondriska, 2011).



Figura 12. Comparación entre un gen procariota (izquierda) y un gen eucariota (derecha) (Modificada de Franklin y Vondriska, 2011).

8. ¿QUÉ ES UN CROMOSOMA?

8.1 Cromosoma eucariota

En el núcleo de cada célula, el DNA sufre cambios durante las diversas fases del ciclo celular, para estar contenido dentro del núcleo de cada célula empaquetado en una estructura tipo bastón llamada cromosoma. Cada cromosoma está compuesto por DNA altamente condensado y enrollado alrededor de las histonas (cromatina, observable al microscopio óptico durante la interfase) (S.a., 2017; Mathews et.al., 2013; Alberts et.al., 2002). El genoma de cada organismo contiene la información completa y las bases requeridas para el desarrollo y crecimiento de dicho organismo. El almacenamiento y los mecanismos de manipulación del DNA tienen que beneficiar un alto grado de compactación para facilitar su acceso al material genético para procesos como replicación y transcripción. El almacenamiento del DNA en células eucariotas es logrado a través de la compactación en fibras de cromatina (Perišić et.al., 2010). La compactación del DNA puede clasificarse en:

- Eucromatina. Es la mayor parte de la cromatina relativamente sin condensar que se encuentra en un núcleo interfásico. Representa el 20% de la cromatina en una célula diferenciada y corresponde a las regiones metabólicamente activas (transcripción) (Jorge, 2016; Alberts et.al., 2002).
- Heterocromatina. Es la cromatina que se encuentra condensada durante la interfase. Representa el 80% de la cromatina en una célula diferenciada y corresponde a las regiones metabólicamente inactivas (sin transcripción) (Jorge, 2016; Alberts et.al., 2002).

En el nucleoplasma, la doble hélice de DNA (2 nm) (Figuras 18a y 31) se compacta hasta cromosomas gracias a la asociación de proteínas específicas denominadas histonas, proteínas que le dan soporte a la estructura y constituyen al nucleosoma. La organización del DNA en subunidades nucleosómicas de la cromatina proporciona una multitud de funciones necesarias para la célula. Los cromosomas son visibles durante la mitosis, en la interfase; esto fue descubierto en el siglo XIX por W. Flemming utilizando microscopía óptica; pero gracias a la microscopía electrónica fue posible obtener imágenes de cromosomas metafásicos en donde se observaba una estructura repetida dentro de la cromatina, lo que dirigió a la propuesta del modelo del nucleosoma (Daban, 2011).

Los nucleosomas generan inicialmente una compactación lineal de 7 veces del DNA genómico, proporcionando un mecanismo para la contención estable de genes y otras actividades dependientes del DNA, restringiendo la unión de factores que actúan con secuencias afines al DNA. Los nucleosomas están diseñados para ser meta-estables, desensamblados (y reensamblados) de una manera fácil que permita el acceso rápido al DNA subyacente durante procesos tales como transcripción, replicación y reparación del DNA. Los nucleosomas protegen al genoma de los agentes dañinos del DNA y proporcionan un cierre entre una multitud de señales epigenéticas. A su vez, vastas cadenas de nucleosomas proporcionan un marco para ensamblaje de la fibra de cromatina y estructuras de cromatina de orden superior (Culter y Hayes, 2015; Daban, 2011).

Los nucleosomas constituyen la subunidad básica de repetición de la cromatina, y su estructura está compuesta por un núcleo (médula) nucleosómico u octámero de histonas, un DNA linker o ligador y una histona de enlace (LH). Las histonas son proteínas pequeñas (11 – 15 kDa) altamente conservadas en eucariontes, ricas en aminoácidos de carga positiva, lo cual facilita su unión al DNA, pues este presenta una carga negativa. Estas se pueden clasificar en dos grupos dependiendo del tipo de control de compactación: histonas nucleosómicas o centrales, aquellas que intervienen en la constitución de los nucleosomas (octámero de histonas); perteneciendo a este grupo las histonas H2A, H2B, H3, H4 (Figura 13); e histonas que intervienen en la asociación de los nucleosomas entre sí (LH), perteneciendo a este grupo sólo la histona H1 (Figura 14) (Jansesn y Verstrepen, 2011; Culter y Hayes, 2015; Daban, 2011; Perišić et.al., 2010).

Recientemente a la familia de las histonas LH se añadió la H5, cuyo papel clave en la formación de nucleosomas está bien establecido. Las proteínas H1/H5 contribuyen no sólo a la compactación de la cromatina en una fibra de 30 nm, sino que también participan en procesos de replicación y transcripción (Pachov, Gabdoulline y Wade, 2011). Teniéndose así que el nucleosoma constituye la unidad fundamental y esencial de la cromatina, siendo un pequeño cilindro donde la médula del nucleosoma incluye un segmento de DNA de 147 pb que se enrolla alrededor de dos copias de cada uno de los cuatro grupos de histonas previamente mencionadas (4 pares de histonas) (Figura 13). Las histonas se ensamblan en una estructura tipo carrito sobre la que se envuelve el DNA central, en aproximadamente $1\frac{3}{4}$ (1.75 nm) de vuelta superhelicales hacia la izquierda, constituyendo una estructura en forma de disco de alrededor de 5.5 nm de

altura y 11 nm de diámetro. El DNA está en estrecha asociación con el núcleo de histonas y está protegido de la digestión de nucleasas, mientras que el DNA linker (de enlace); un pequeño fragmento de DNA de aproximadamente 60 pb que sirve como enlace entre el octámero y la H1, es rápidamente digerido (Figura 14) (Culter y Hayes, 2015; Jansen y Verstrepen, 2011; Daban, 2011; Jorge, 2016; Perišić et.al., 2010).

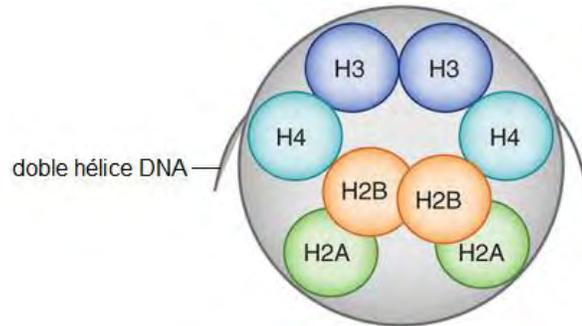


Figura 13. Estructura de la médula del nucleosoma, octámero de histonas (Modificada de Jansen y Verstrepen, 2011; Watson 2008).

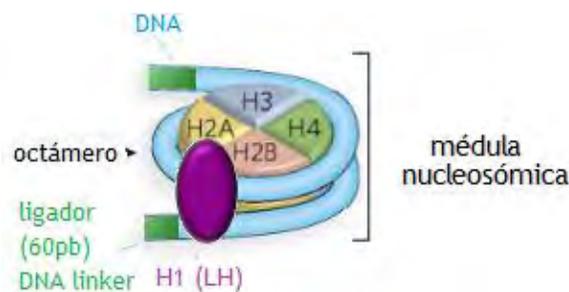


Figura 14. Nucleosoma típico (Modificada de Culter y Hayes, 2015; Jansen y Verstrepen, 2011).

El nucleosoma y la porción de DNA asociada representan la unidad elemental de la organización de la cromatina. El filamento de cromatina se compacta durante la mitosis dando lugar a cromátidas metafásicas con una alta relación de empaquetamiento lineal y una alta concentración local de DNA. La organización tridimensional del filamento de la cromatina en cromosomas condensados es una de las estructuras más desafiantes y difíciles de la biología (Daban, 2011).

Para poder formar el nucleosoma, primero las histonas deben dimerizarse y así formar el núcleo nucleosómico. Aproximadamente el 25% de la masa de cada histona central del octámero está contenida por una región con dominio N-terminal de las histonas que no interactúa con el DNA u otras macromoléculas. La mayor parte de la masa proteica de la histona está constituida por una región α helicoidal con dominio C-terminal que favorece la interacción histona – histona para formar el octámero en donde el DNA va a ser enrollado

(Pachov, Gabdoulline y Wade, 2011). Un motivo de "histona plegada" constituye la mayoría de los dominios C-terminales, éste tiene una estructura casi idéntica en las cuatro histonas de la médula núcleo y favorece su flexión para poder plegarse. Este motivo se compone de dos hélices α más cortas (α_1 y α_3) de 9 – 14 residuos de longitud, que le dan soporte a la hélice α central (α_2) de 29 residuos de longitud, estos fragmentos α están conectados por un bucle corto de segmentos β (Figura 15a). El pliegue de histonas forma un extenso puente proteína – proteína descrita como un "apretón de manos" debido a que esta interacción dirige la hetero-dimerización de las histonas H2A con H2B y H3 con H4; donde el dímero H3/H4 tiene una estabilidad moderada en comparación con el dímero H2A/H2B. Los dímeros de histona se asocian entre sí a través de 4 hélices en los puentes dímero – dímero. El dímero H3/H4 se auto-asocia mediante un puente H3:H3 para formar un tetrámero estable, mientras que un solo dímero H2A/H2B se asocia con cualquier extremo del tetrámero H4/H3:H3/H4 a través de un puente H4:H2B para formar una cadena simétrica de cuatro tetrámeros que generan una cadena helicoidal de sitios de contacto de DNA (Figura 15b). Cabe destacar que el puente H2B:H4 es mucho menos estable que el H3:H3, además de que el octámero de la histona se forma sólo cuando es envuelto por el DNA. Los dímeros H2A/H2B y H3/H4 forman una estructura simétrica en forma de arco en la que se distinguen los tres sitios de unión al DNA que están dispuestos a lo largo del borde del octámero (Culter y Hayes, 2015).

El DNA se asocia con el octámero de histonas tal que el eje central de la médula del nucleosoma pasa a través de un solo par de bases en el centro de la estructura del DNA. Las hélices del DNA se ensamblan en el puente H3:H3 con el surco menor orientado lejos de la superficie de la histona; esta posición central es denominada como la posición 0 de la doble hélice del DNA, donde posteriormente se presentan otras posiciones (± 1 , ± 2 , etc.) que se encuentran orientadas con el surco menor hacia el exterior de la estructura (Figura 15c). El DNA es muy contorsionado por el ensamblaje en nucleosomas, ya que éste debe ser plegado en $1\frac{3}{4}$ de vuelta hacia la izquierda de aproximadamente 80 pb por vuelta. Esta flexión se logra a través del enrollamiento de las pares de bases y de cómo se acomodan el surco menor y surco mayor del DNA, orientándose este último hacia la superficie del octámero (Culter y Hayes, 2015).

La doble hélice del DNA enrollado en el nucleosoma es relativamente plana con un aumento de aproximadamente 30 Å por vuelta de 80 pb y un diámetro de aproximadamente 42 Å, disminuyendo la media de pb/vuelta de aproximadamente 10.5 a

10.2 dentro del nucleosoma (Culter y Hayes, 2015). La estructura, tipos y tamaño del DNA se discute en el siguiente apartado.

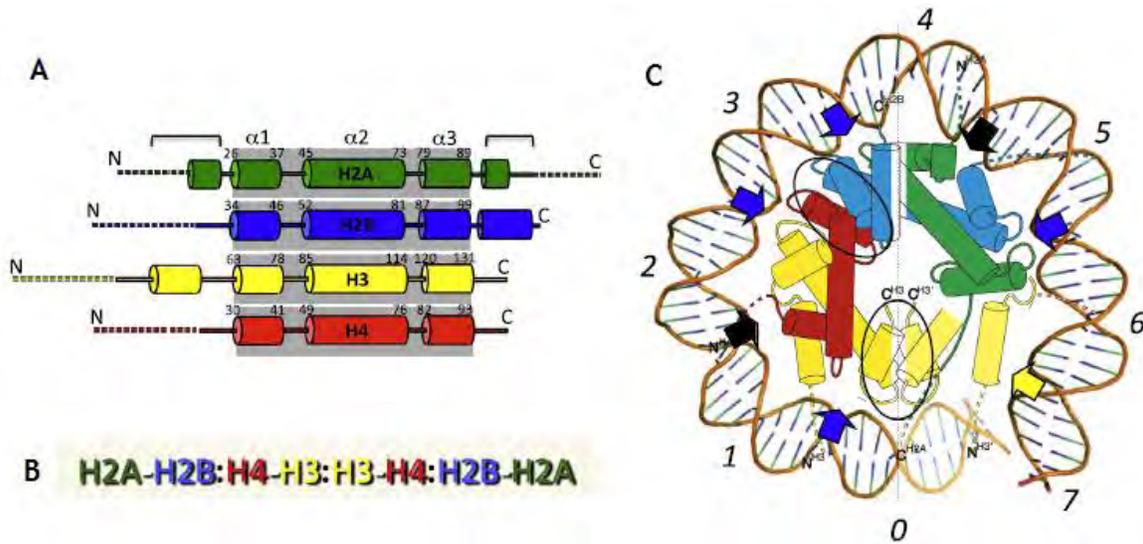


Figura 15. Detalles estructurales de la médula del nucleosoma. (A) Se observan cómo se acomodan las hélices α . (B) Se muestran las 4 hélices de los puentes dímero – dímero que se forman. (C) Las flechas azules y negras indican los sitios de unión al DNA, siendo las azules el inicio de la unión del DNA y las negras el final, la flecha amarilla indica el sitio de interacción del DNA con la H3; los óvalos negros indican los puentes H3:H3 y H4:H2B; y los números indican las posiciones de los surcos menores del DNA (Modificada de Culter y Hayes, 2015).

Una vez formada la médula del nucleosoma, la histona de enlace (H1) junto con el DNA linker completan la estructura final del nucleosoma. Las histonas de enlace son un componente primario de los nucleosomas, la familia LH es menos conservada entre las especies que las de las histonas nucleosómicas tanto en la homología de secuencia como en el número de variantes de alelos. Estas están presentes en una histona por nucleosoma, con numerosas funciones como estabilizan el DNA plegado en el nucleosoma, promueven el plegado y montaje de estructuras de cromatina de orden superior, que influyen en el espaciado del DNA en el nucleosoma, regulan la expresión génica y suprimen la transcripción de elementos repetitivos transponibles del DNA empaquetados en heterocromatina. Por otra parte, modificaciones postraduccionales específicas de las LH se han relacionado a numerosos procesos celulares, incluyendo sincronización de la replicación con la mitosis. H1 se une al exterior del nucleosoma y presentan mayor movilidad que las histonas centrales, esto ha sido demostrado por FRAP, aunque no ha podido ser demostrado cómo se une la H1 a los nucleosomas en la cromatina (Pachov, Gabdoulline y Wade, 2011; Culter y Hayes, 2015).

Estudios recientes han determinado que la H1 actúa como protector del DNA linker. La alta afinidad de la H1 para el nucleosoma requiere de una extensión de 10 pb en cada uno de los extremos del DNA del núcleo del nucleosoma, y sugiere que este único dominio conecta 3 segmentos de DNA distintos en la cromatina; indicando así, que la H1 está situada cerca de la entrada/salida del DNA enrollado y estabiliza la estructura de los nucleosomas. Empleando FRAP, también se identificaron dos sitios de unión y un sitio no vinculante en el dominio globular de la H1, la GH1, que protege los 20 pb extra de la digestión por nucleasas; mientras que para la H5, se identificaron tres sitios de unión para la GH5 (que presenta 97% de homología con GH1) con diferentes posiciones de acoplamiento al nucleosoma, donde el sitio de unión primario al DNA de GH5 se divide en dos sitios de interacción (Pachov, Gabdoulline y Wade, 2011). Aunque las LH son menos conservadas que las histonas centrales, su dominio globular es más conservado e hidrófobo que las regiones NTD o CTD, por lo cual, los GH son los sitios de unión a la médula del nucleosoma. Empleando FRET, se dedujo que la formación del complejo médula del nucleosoma – H1 (nucleosoma en sí) implica la interacción del GH1 con el surco mayor del DNA linker que se encuentra cerca del eje central; formando puentes entre la hélice $\alpha 3$ (del GH1) y el eje central del nucleosoma, involucrando el CTD de la H1 y el CTD de la H2A. De igual manera sucede con la H5, pues implica la unión de GH5 directamente al DNA linker en el eje central de la médula (Culter y Hayes, 2015; Pachov, Gabdoulline y Wade, 2011).

Pero, a su vez, el DNA asociado a las histonas presenta varios grados de compactación en el nucleoplasma donde la doble hélice de DNA asociada a las histonas (nucleosoma), con la participación de la histona H1/H5, forma la fibra nucleosómica (Figuras 18b y 31), esta estructura fue descubierta gracias a estudios de la cromatina con TEM y AFM; la fibra nucleosómica es de aproximadamente 11 nm de diámetro y 6 – 8 nucleosomas por vuelta, en donde el DNA linker es enrollado en el nucleosoma consecutivo o degradado en presencia de nucleasas, que posee el aspecto de un "collar de perlas". Es en este nivel donde se lleva a cabo la replicación y la transcripción del DNA, pues presenta un segmento corto de DNA libre y no unido a histonas nucleosómicas (Jansen y Verstrepen, 2011; Perišić et.al., 2010; Pachov, Gabdoulline y Wade, 2011; Daban, 2011; Mathews et.al., 2013).

Así, las fibras nucleosómicas (fibras de cromatina) encontradas en diversas especies y tejidos se caracterizan por formar NRLs; una estructura posterior a la fibra nucleosómica y

previa al solenoide que abarcan la longitud del DNA envuelto alrededor del núcleo nucleosómico (147 pb) más la longitud del DNA linker que conecta un nucleosoma con otro (que se disponen a enrollarse) (Figura 16), y varía entre organismos (tabla 4). Mientras que los organismos más simples presentan DNA linker corto (18 – 45 pb), la longitud típica del DNA linker para células eucariotas inactivas transcripcionalmente maduras es entre 50 – 60 pb; lo que genera un NRL de aproximadamente 197 – 207 pb. Como se observa en la tabla 4 los organismos unicelulares y células en crecimiento rápido que poseen una alta producción de proteínas presentan NRLs cortos, de 160 – 189 pb, mientras que células maduras presentan NRLs más largos, entre 190 – 220 pb. Recientemente, varios estudios experimentales han examinado el efecto de los NRLs en la organización de la fibra de la cromatina (Perišić et.al., 2010).

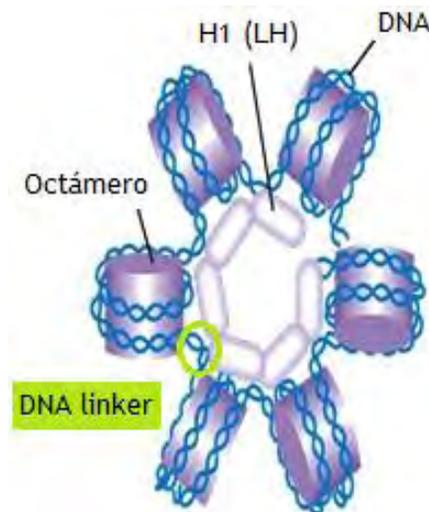


Figura 16. Estructura de un NRL (Modificada de Perišić et.al., 2010).

Tabla 4. Tamaño de los NRL entre organismos (Modificada de Perišić et.al., 2010).

Especie	NRL (pb)
<i>Aspergillus nidulans</i>	154
Neuronas de rata	162
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	165
<i>Neurospora crassa</i>	170
H1c, H1d, H1e, null ES	174
<i>Amoebae</i>	176
Células CHO	178
<i>Plasmodium</i>	181
Células HeLa	188
Células P815	188
Células de mioblasto	189
Células CV1	189
BHK	190
Cultivo primario de células de riñón de ratón	191
Médula ósea de ratón	192
Hígado fetal (14 días) de ratón	193
Hígado de ratón	195
Timo de ratón	196
Hígado de rata	196
Riñón de rata	196
Hígado de hámster sirio	196
Riñón de hámster sirio	196
Célula glial de rata	201
Eritrocito de pollo	212
Espermatozoide <i>Echinoderm</i>	220

La fibra nucleosómica se enrolla y con la participación de las LH se forma el solenoide (Figuras 18c y 31) de 30 nm, una estructura de zonas condensadas difíciles de transcribir por las RNA polimerasas que corresponden a regiones de DNA compuestas por heterocromatina; donde, la altura del solenoide se ve afectada por el número de nucleosomas que lo conforman (22 – 36 nucleosomas) (Daban, 2011; Jansen y Verstrepen, 2011). El grado de compactación del DNA es regulado estrictamente por la célula gracias a modificaciones químicas reversibles que sufren las histonas. Algunos autores difieren y refutan la estructura del solenoide clásica, pues por medio de rayos X observaron estructuras alternas al solenoide; Schalch y colaboradores en 2005, observaron una estructura de un tetranucleosoma, carente de histona H1 (pues

desconocían su función) y con un DNA linker corto (20 pb), por lo que propusieron el modelo de doble inicio para fibras largas de cromatina que se entrecruza en sí mismo (estructura en zigzag) (Figura 17a); mientras que Robinson y colaboradores en 2006, observaron un estructura entrelazada de doble inicio en donde su estabilidad dependía directamente del grado de compactación de las fibras nucleosómicas y del grado de superposición entre los nucleosomas sucesivos que interactuaban de frente, donde el DNA linker se entrecruzaba en el eje central del nucleosoma y por lo tanto promovía la interacción entre estos; los linkers rectos hacen que el ancho en este modelo sea dependiente de los NRLs, además de que la LH en este modelo tiene un papel claramente definido, atraer al DNA linker que sale/entra en los nucleosomas previos para formar tallos rígidos (Figuras 17b y 17c) (Daban, 2011; Perišić et.al., 2010).

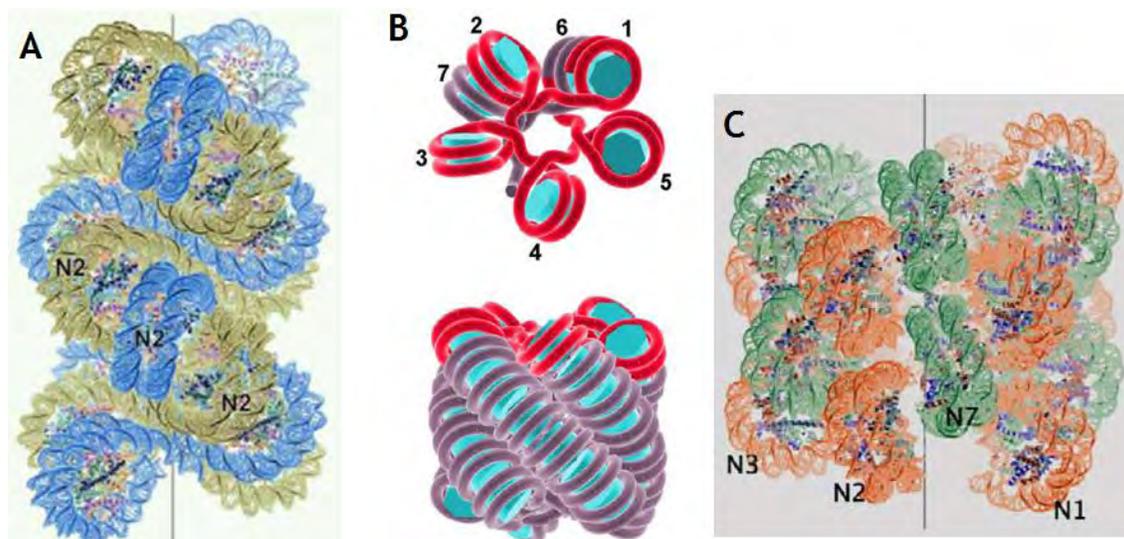


Figura 17. Modelos alternos al solenoide. (A) Propuesto por Schalch et.al., 2005; (B – C) Propuesto por Robinson et.al., 2006 (Modificada de Daban, 2011).

Con la propuesta de estos modelos se estudiaron los patrones de plegado para diferentes NRLs, con y sin histona de enlace, usando tanto el solenoide de inicio único como las estructuras en zigzag de dos inicios, así, varios autores Rhodes y colaboradores, 2009; Arya y colaboradores, 2009; Perišić y colaboradores, 2010; coinciden al encontrar que los NRLs corto a medio (173 a 209 pb) con histona de enlace se condensan irregularmente, y que las características del solenoide son viables solamente para NRLs más largos (226 pb) sin presencia de LH; los NRLs medio son más favorables para el embalaje y compactación de la cromatina en varios niveles a comparación de los NRLs más cortos y más largos, ya que presentan una estructura tipo solenoide y dependen totalmente de LH

para su empaquetamiento. El primero se dobla en fibras estrechas y tiende a adoptar una estructura en zigzag, mientras que los NRLs largos no conducen fácilmente a altos grados de empaquetamiento debido a la flexión del DNA linker (Perišić et.al., 2010). Así, con estos resultados es que fue posible llegar a definir al solenoide como la estructura de compactación primaria (rechazando los modelos en zigzag), siendo los NRLs medianos los más viables para conformar este modelo.

Posteriormente, el solenoide se vuelve a compactar en un fibra de 300 nm (Figuras 18d y 31); este nivel mayor de compactación se observa en la división celular (mitosis y meiosis) para formar el andamio (Figuras 18e y 31), que es el esqueleto central del cromosoma compuesto por la enzima topoisomerasa II (condensina) encargada de enlazar o desenlazar nudos de la cadena y mantener la estructura del cromosoma final (Figuras 18f y 31) (Jansen y Verstrepen, 2011; S.a., 2017; Pachov, Gabdoulline y Wade, 2011; Daban, 2011).

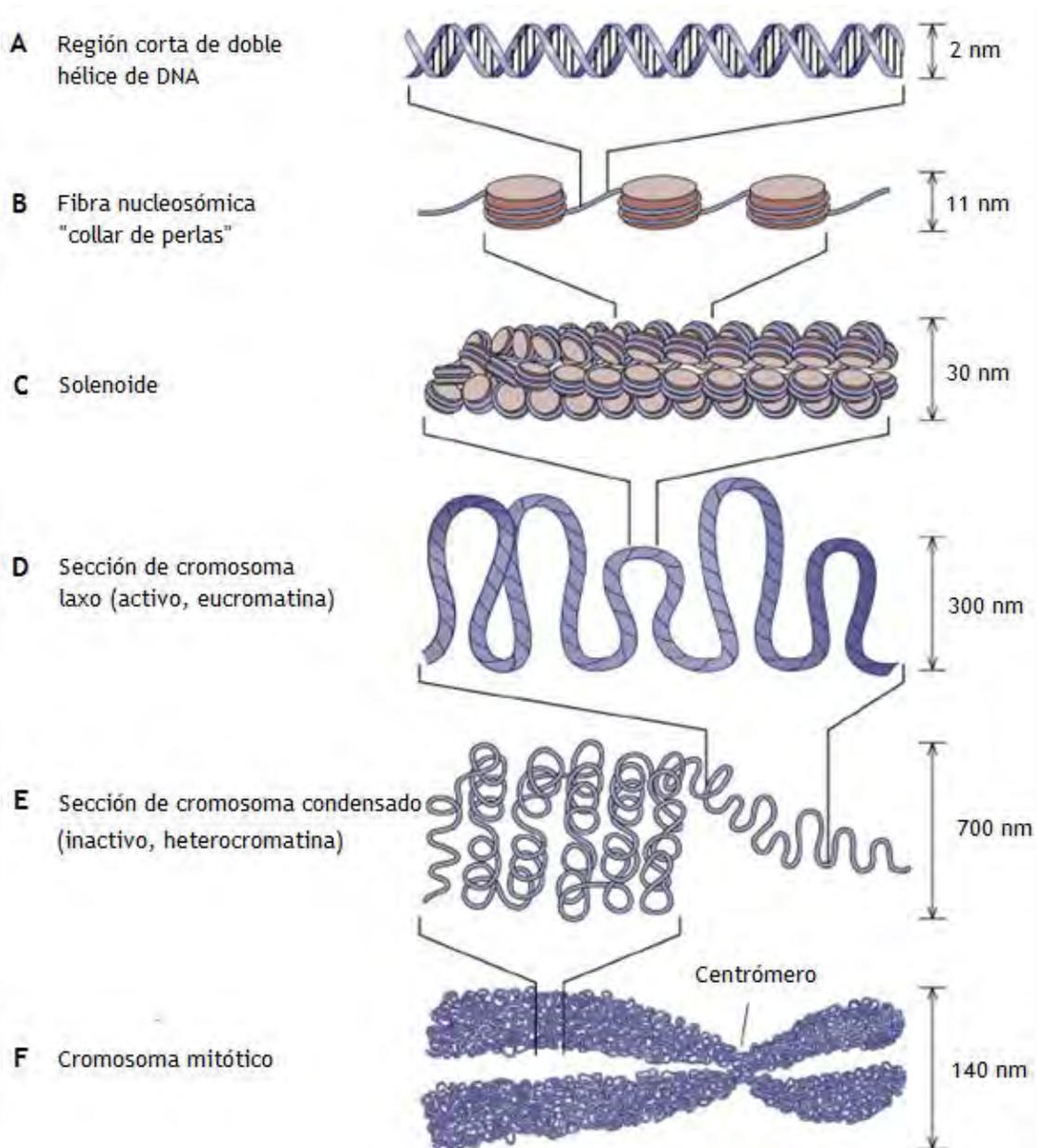


Figura 18. Estructuras de los diferentes grados de compactación del DNA (Modificada de Jansen y Verstrepen, 2011).

Cada cromosoma está constituido por un punto central llamado centrómero, que divide a este en dos secciones (brazos). El brazo corto es denominado "p" y el largo "q" (Figura 31); de acuerdo a donde se sitúa el centrómero denotará el tipo de cromosoma existente, lo que permite describir la localización específica de los genes. También presenta tres regiones caracterizadas por una secuencia de nucleótidos específica e idéntica en los miembros del mismo par cromosómico (Mathews et.al., 2013; Alberts et.al., 2002).

- Regiones de replicación, que corresponden a las regiones en las cuales la enzima DNA polimerasa comienza la replicación de una de las cadenas de DNA en la interfase, durante la fase S del ciclo.
- Región centromérica
- Región telomérica o extremidades de los brazos de los cromosomas

8.2 Cromosoma procariota

Lo anterior descrito es en el caso de la condensación en cromosomas eucariontes, para ser precisos, en el cromosoma humano; pero en procariontes la condensación del material genético ocurre de manera diferente debido al relativo tamaño pequeño del genoma procarionte. Como ya se mencionó previamente, todo el material genético procariota está incluido en una sola molécula de DNA circular localizado en el nucleoide “cromosoma”; y al igual que con los cromosomas eucariotas, un genoma procarionte se tiene que comprimir en un espacio relativamente pequeño, este debe ser compactado en una circunferencia de 1.6 mm aproximadamente. De manera similar, este grado de compactación es logrado con la ayuda de proteínas de unión al DNA que empaquetan el genoma de una manera organizada generando una estructura sin semejanzas a un cromosoma eucarionte (Vries, 2012; Brown, 2002).

La primera característica que debe tener un nucleoide es que el genoma circular debe estar superenrollado. El superenrollamiento ocurre cuando se generan vueltas adicionales en la doble hélice del DNA (superenrollamiento positivo) (Figura 19) o si se retiran dichas vueltas en sentido contrario (superenrollamiento negativo) (Figuras 19 y 20); este proceso se da gracias a las topoisomerasas, enzimas que regulan la tensión en la molécula de DNA, presentando tres tipos: el tipo I corta una de las cadenas de DNA y no requiere ATP para realizar el proceso, el tipo II corta ambas cadenas de DNA y requiere de ATP, y la girasa que se encarga de realizar un superenrollamiento negativo (Figura 20) (Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015; Brown, 2002).

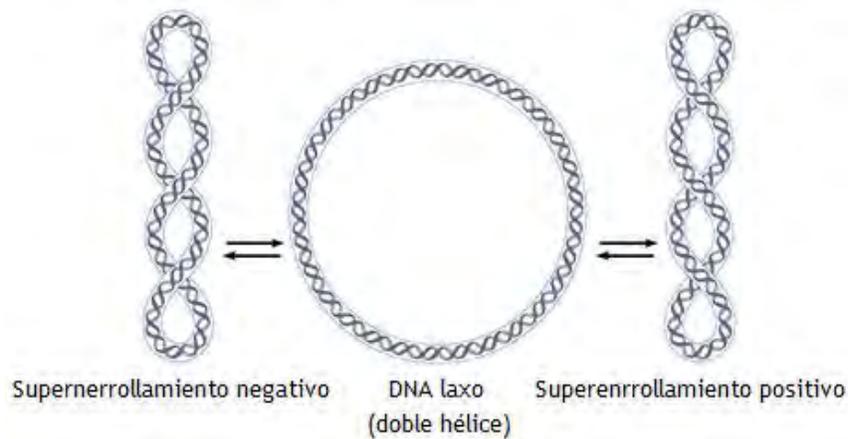


Figura 19. Superenrollamiento del DNA procarionte (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

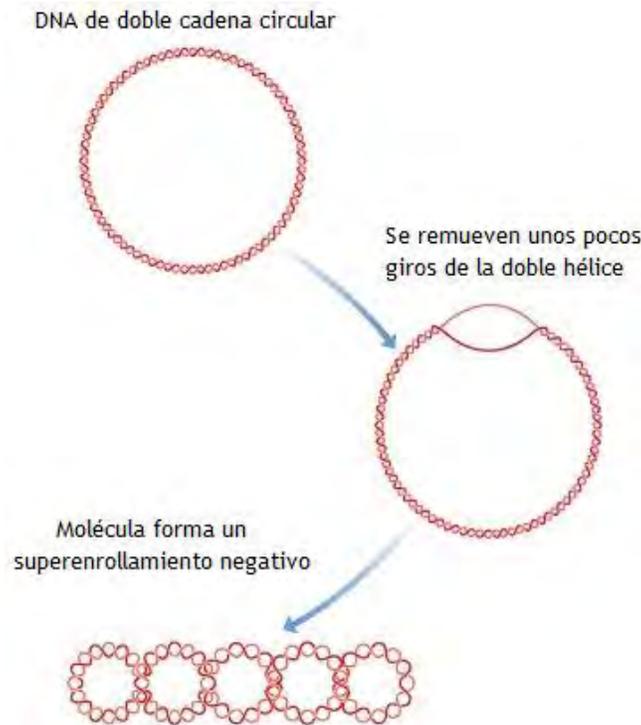


Figura 20. Esquema de superenrollamiento negativo. El diagrama muestra cómo el giro contrario de una molécula circular de DNA de doble hélice da como resultado un superenrollamiento negativo (Modificada de Brown, 2002).

Las topoisomerasas cortan las cadenas del DNA procarionte pues al ser una molécula circular, sin extremos, no se puede aplicar torsión, en su lugar, se va enrollándose alrededor de sí misma para formar una estructura más compacta. Pero ésta no tiene una capacidad ilimitada de rotación ya que el DNA procarionte está unido al núcleo de varias

proteínas (Figura 22e) que restringen su capacidad para relajarse, la rotación en un sitio de rotura producirá una pérdida del superenrollamiento de sólo un pequeño segmento de la molécula; es decir, los bucles superenrollados que se encuentran unidos a la proteína se descompactarán, así es como se forma la estructura del nucleoide de donde el DNA genómico unido al núcleo proteico radian aproximadamente 400 bucles y cada bucle contiene aproximadamente 100 Kb de DNA superenrollado (Figura 21) (Dillon y Dorman, 2010; Vries, 2012; Brown, 2002).

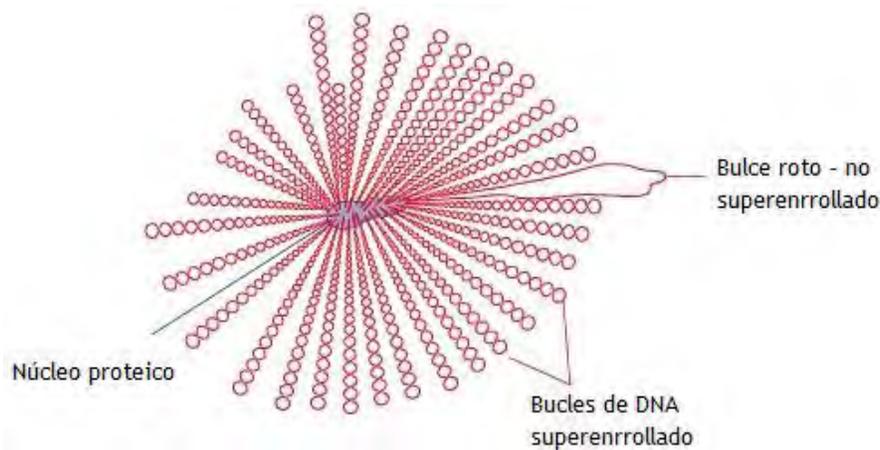


Figura 21. Estructura de un nucleoide. Se muestran entre 40 y 50 bucles superenrollados de DNA que irradian del núcleo central de la proteína. Uno de los bucles se muestra en forma circular, lo que indica que se ha producido una ruptura en este segmento de DNA resultando en una pérdida de la superenrollamiento (Modificada de Brown, 2002).

Los componentes proteicos del nucleoide incluyen a la DNA girasa y DNA topoisomerasa I, estas son las enzimas primariamente responsables de mantener el estado superenrollado, así como un conjunto de al menos cuatro proteínas participan con un papel más específico en el empaquetamiento del DNA procarionte. En particular, y la más abundante, es la proteína HU, que es estructuralmente muy diferente a las histonas eucariotas, pero actúa de manera similar formando un tetrámero alrededor del cual aproximadamente 60 pb de DNA se enrollan, la IHF puede unir secuencias específicas dentro del genoma para producir plegamientos adicionales; por último, para mantener la estructura superenrollada la H-NS actúa reforzando el superenrollamiento como un doble generador de vueltas y modulando la expresión de genes involucrados en la respuesta a estímulos de enrollamiento que junto con FIS regulan la expresión de genes que codifican para la topoisomerasa I y girasa. El mecanismo en cómo se produce el superenrollamiento puede ocurrir de dos maneras alternas: la proteína H-NS se une al

DNA manipulando su estructura, esta unión genera un cubrimiento del DNA (Figura 22a) en donde la proteína se une a dos sitios que están próximos; ó, se puede unir al DNA formando un puente entre dos sitios que están distantes formando un bucle (Figura 22b). La integridad del puente resultante se ve comprometido por la intervención de la proteína HU que envuelve al DNA y desplaza a la H-NS (Figura 22c), o por la unión de otra proteína que pliega el DNA (Figura 22d) desplazando de igual manera a la H-NS como consecuencia de las interacciones alternativas entre DNA – proteínas (HU principalmente) (Vries, 2012; Griswold, 2008; Dillon y Dorman, 2010).

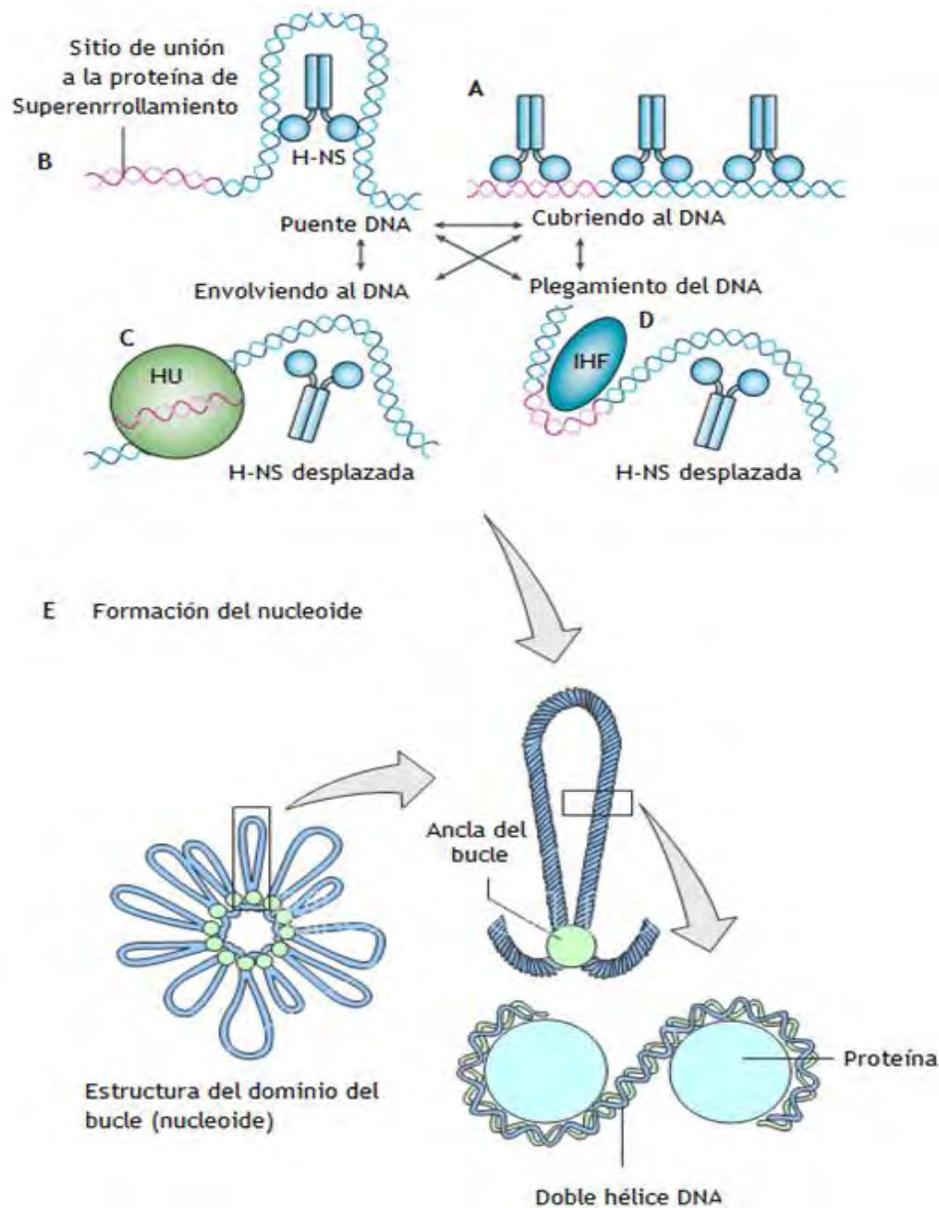


Figura 22. Mecanismo de participación de las proteínas en el empaquetamiento del DNA procariota y formación del nucleoide (Modificada de Dillon y Dorman, 2010).

9. ¿QUÉ ES EL DNA?

Para poder entender bien cómo es que funcionan todos estos mecanismos, cómo está contenido el material genético, porqué se debe compactar y cómo es que se va a replicar y transcribir el material genético, se debe explicar y comprender qué es ese material genético, contenido en todas las células nucleadas, el DNA.

El DNA es una molécula contenida en el núcleo celular (nucleoide en procariontes) encargada de portar la información genética de un organismo vivo (aunque también se puede encontrar una pequeña cantidad de DNA en las mitocondrias, mtDNA). El DNA está formado por largas cadenas de nucleótidos (unidad básica de repetición del DNA). La información genética contenida en el DNA se almacena como un código formado por cuatro bases nitrogenadas divididas en dos grupos: las bases púricas, A (adenina) y G (guanina); y las bases pirimidínicas, C (citosina) y T (timina) (Figura 23). El orden o secuencia de estas bases determina la información disponible para codificar un gen. La característica de estas bases es que son aromáticas, tanto las bases púricas como las pirimidínicas, confiriéndoles la particularidad de ser planas en su estructura, lo cual es importante para la organización de la estructura del DNA. Las purinas, derivan del heterociclo purina y son las bases que presentan dos anillos aromáticos, uno de cinco y otro de seis átomos; mientras que las pirimidinas derivan del anillo de la pirimidina y solo presentan un solo anillo de seis átomos. En el caso del RNA, también se compone de cuatro bases, las purinas A y G y las pirimidinas C y U (uracilo), una base análoga a la T (Figura 23) (Mathews et.al., 2013; Alberts et.al., 2013).

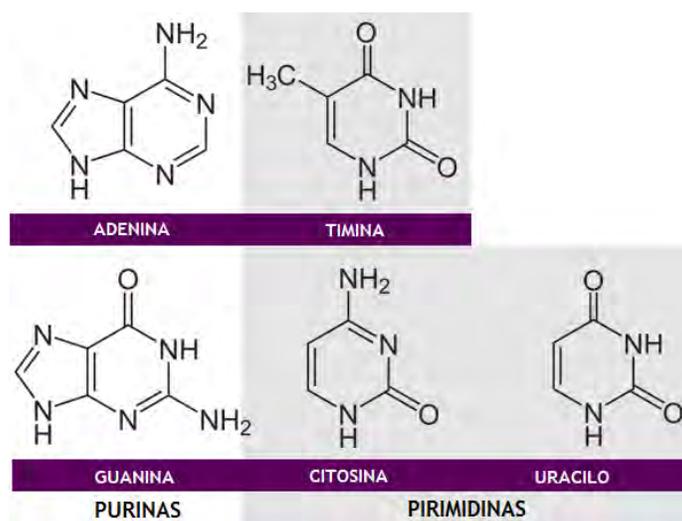


Figura 23. Bases nitrogenadas. Purinas A, G; pirimidinas T, C, U (Modificada de Alberts 2013).

Cada base se encuentra unida a una molécula de azúcar, lo que le confiere polaridad; la unión base – pentosa (desoxirribosa) se efectúa a través de un enlace N-glicosídico con configuración β entre el carbono 1 de la desoxirribosa y un nitrógeno de la base, el 1 en las pirimidinas, y el 9 en las purinas; con la pérdida de una molécula de agua, para así formar el nucleósido. Los nucleósidos son más solubles que las bases libres y los planos de la base y el azúcar son perpendiculares entre sí (Figura 24). La nomenclatura de estas estructuras cambia, utilizando el sufijo -osina sobre el nombre radical de la base en el caso de las purinas, y el sufijo -idina en el de las pirimidinas; y al tratarse de una desoxirribosa como azúcar se le agrega el prefijo desoxi a todas, como se ejemplifica en la tabla 5 (Mathews et.al., 2013; Alberts et.al., 2013; Lodish, 2009).

Tabla 5. Nomenclatura de los desoxirribonucleósidos (Modificada de Mathews et.al., 2013).

Base	Nucleósido
Purinas	
Adenina	Desoxiadenosina
Guanina	Desoxiguanosina
Pirimidinas	
Citosina	Desoxicitidina
Timina	Desoxitimidina

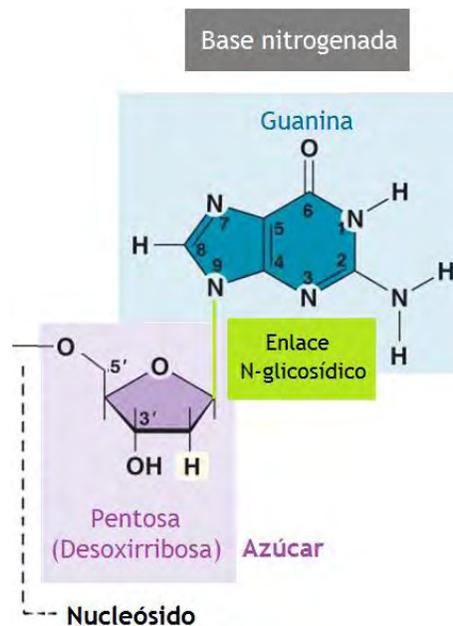


Figura 24. Estructura de un nucleósido de Guanina. Desoxiguanosina (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Los nucleótidos (Figura 25) son los ésteres fosfóricos de los nucleósidos. El DNA se compone de cuatro nucleótidos diferentes por las cuatro bases nitrogenadas que presenta A, T, G, C. Todos los nucleótidos tienen una estructura común pues están formados por la unión de un grupo fosfato al carbono 5 de una pentosa (desoxirribosa) que lleva unida al carbono 1 una base nitrogenada (Figuras 25 y 27a) (Ussery, 2012). La estructura primaria del DNA se trata de una secuencia de desoxirribonucleótidos de una de las cadenas (Figura 27b), polinucleótidos, la unión de varios nucleótidos entre sí; la formación de polinucleótidos se da pues un grupo fosfato del segundo nucleótido sirve de puente de unión entre la unión del carbono 5' con el carbono 3' de la pentosa continua, formándose un enlace fosfodiéster para poder constituir lo largo de la cadena donde la secuencia de nucleótidos se ordena desde 5' a 3' (dirección 5' → 3') (Figura 26) (Mathews et.al., 2013; Alberts et.al., 2013; Lodish, 2009).

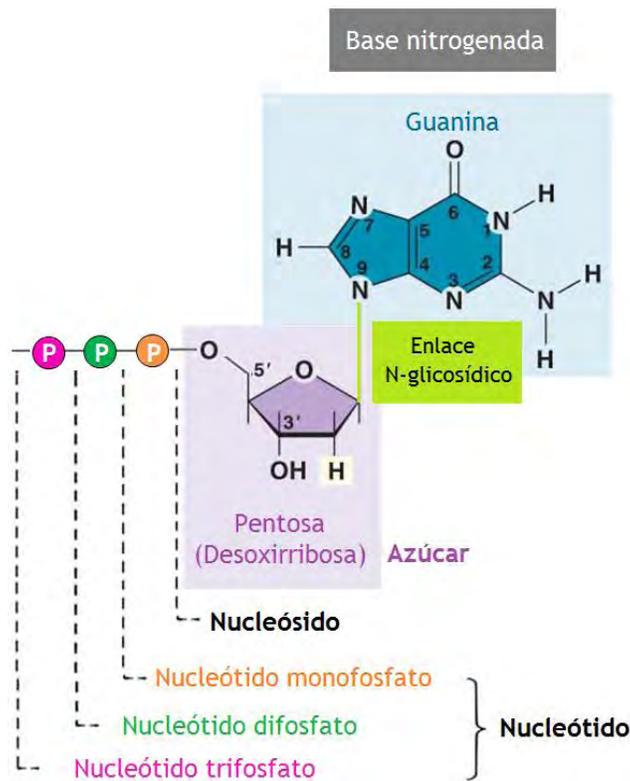


Figura 25. Estructura de un nucleótido (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

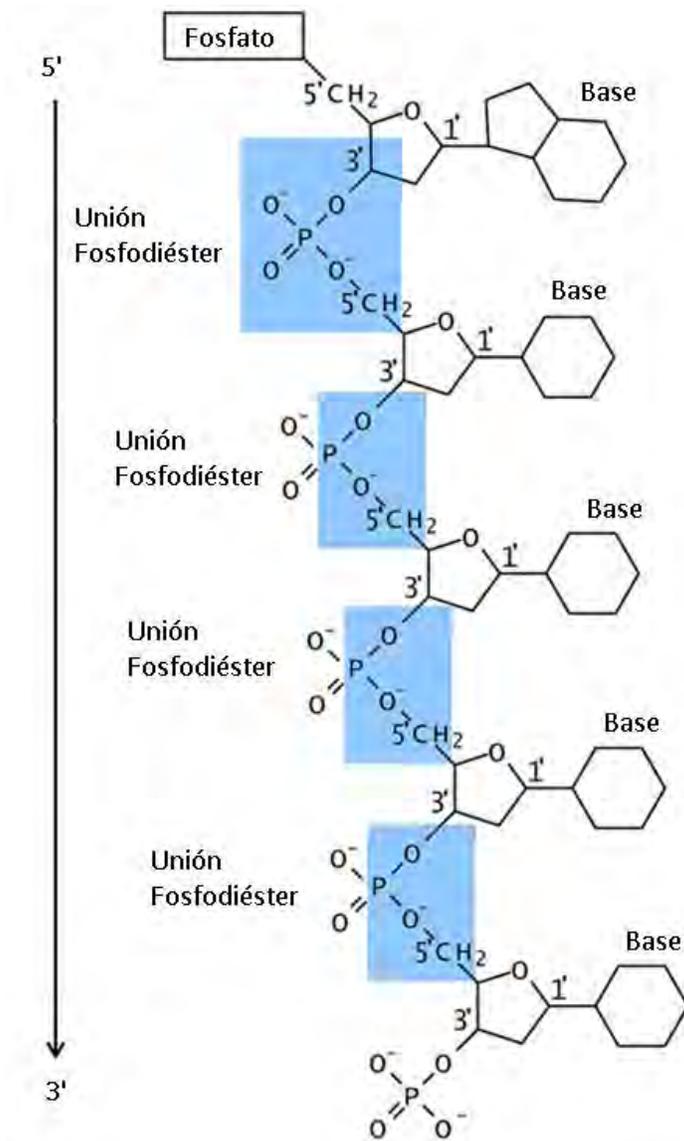


Figura 26. Estructura de polinucleótidos (Modificada de Mathews et.al., 2013; Alberts et.al., 2013).

A principios de la década de 1950, el DNA se examinó por primera vez mediante el análisis de difracción de rayos X. Los primeros resultados de difracción de rayos X indicaron que el DNA estaba compuesto por dos hebras del polímero enrolladas en una hélice, estructura secundaria (Figura 26). La observación de que el DNA era de doble hebra tenía una importancia crucial y proporcionó una de las pistas más importantes que condujeron a la estructura postulada por James Watson y Francis Crick, en 1953. La estructura secundaria del DNA se basa en la complementariedad de bases, postulada por Edwin Chargaff en 1950, donde una base purina se empareja con una base pirimidina; así

las bases, ya en cadena de polinucleótidos se acoplan unas con otras para formar pares de bases (Lodish, 2009). Estas reglas de Chargaff se cumplen siempre en los organismos cuyo material hereditario es DNA de doble hélice y enuncian lo siguiente:

- La proporción existente de A es igual a la de T en una molécula de DNA, ($A / T = 1$).
- La proporción existente de G es igual a la de C en una molécula de DNA, ($G / C = 1$).
- La proporción de bases púricas (A+G) es igual a la de las bases pirimidínicas (T+C) → $(A + G) / (T + C) = 1$.
- La proporción entre (A+T) y (G+C) es característica de cada organismo.

Indicando así que los ácidos nucleicos no son una repetición monótona de un polinucleótido, pues existe variabilidad en la composición de bases nitrogenadas (Mathews et.al., 2013; Pray, 2014). Las uniones se dan por medio de puentes de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas. La complementaridad de bases tiene como regla adicional que una adenina forma dos puentes de hidrógeno con timina ($A = T$) mientras que guanina forma tres puentes de hidrógeno con citosina ($C \equiv G$); y así por medio de estos puentes de hidrógeno forman una doble cadena complementaria (Figura 27c). Todas las bases están en el interior de la doble hélice, y las estructuras de azúcar – fosfato están en el exterior, lo que le confiere flexibilidad a la molécula (Figura 27d). El acoplamiento de base complementario permite que los pares de bases se empaqueten en la disposición energéticamente más favorable en el interior de la doble hélice (Pray, 2014; Alberts et.al., 2013).

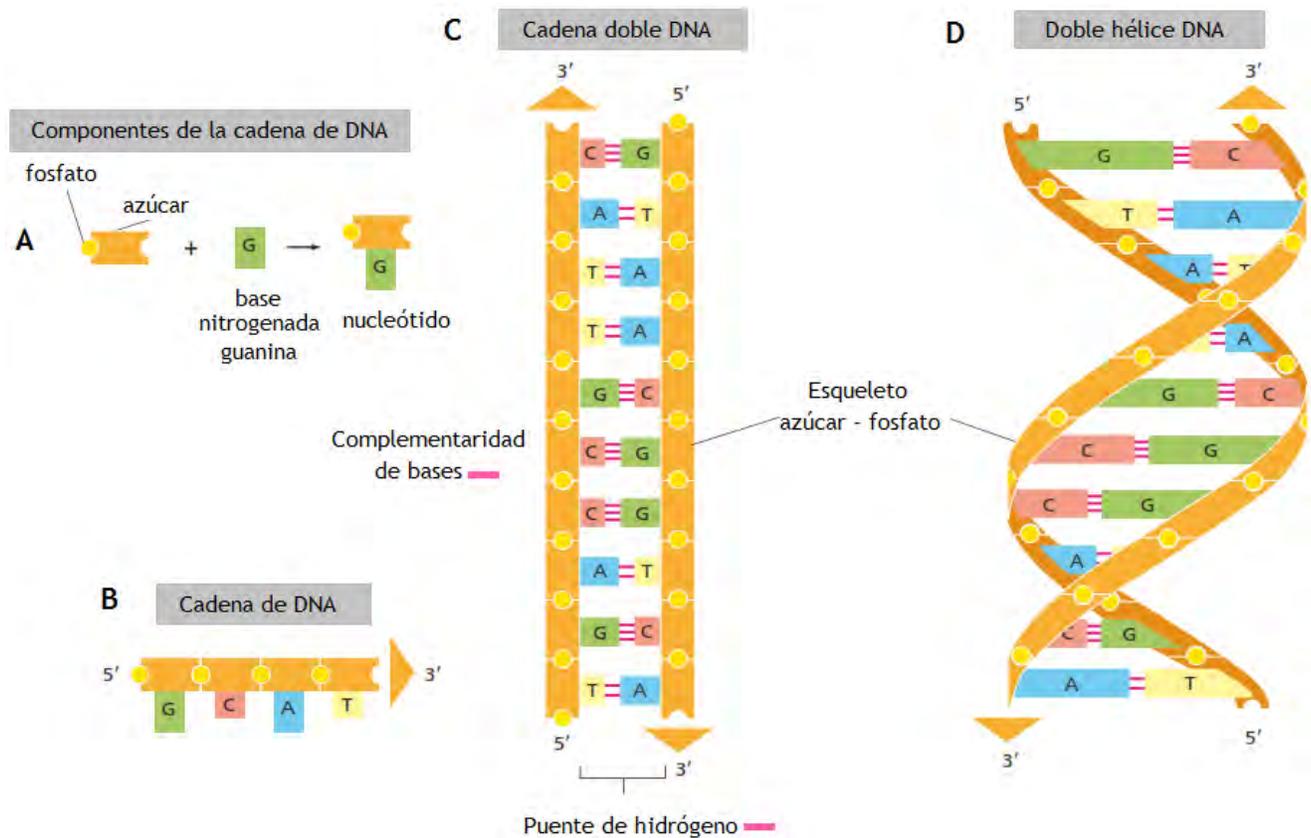


Figura 27. Componentes de las cadenas de DNA y complementariedad de bases (Modificada de Alberts et.al., 2013).

Esta complementariedad de bases es la causante de que la doble hélice se forme y de que ambas cadenas sean antiparalelas, pues el extremo 3' de una se enfrenta al extremo 5' de la otra, llevando una cadena la secuencia 5'P → 3' OH, mientras que la cadena complementaria sigue la secuencia inversa, 3'OH → 5'P (Pray, 2014). Dos cadenas polinucleotídicas pueden formar una cadena diestra o una cadena zurda (Figura 28), pero debido a la posición de las bases y la geometría del esqueleto azúcar – fosfato, el DNA común (B – DNA) es dextrógiro, aunque depende del tipo de DNA la dirección de la rotación. Una vuelta de la doble hélice presenta 10.5 pares de nucleótidos con una distancia de 3.4 nm (34 Å) por vuelta, y las bases apiladas están espaciadas a una distancia de 0.34 nm (3.4 Å) a lo largo del eje de la hélice, donde el diámetro de la molécula es de 2 nm (20 Å) (Figura 29) (Ussery, 2012). El giro de las dos cadenas alrededor de cada una crea dos hendiduras en la doble hélice, estas se denominan surco mayor y surco menor debido a que los espacios que forman las hendiduras son de diferentes anchos (22 Å y 12 Å, respectivamente) (Figura 29); como consecuencia, una

parte de cada base es accesible desde fuera de la hélice por moléculas pequeñas y grandes que se unen al DNA poniendo en contacto grupos químicos dentro de los surcos, así como que en el surco mayor se pueden distinguir los pares de bases T=A, esta característica en la estructura del DNA es utilizada por diferentes clases de proteínas de unión al DNA durante la replicación (Alberts et.al., 2013; Lodish, 2009).

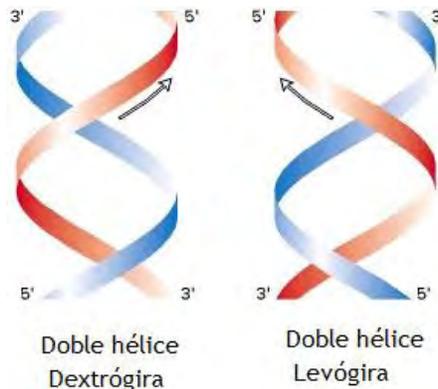


Figura 28. Sentido de la doble hélice del DNA (Modificada de Lodish, 2009).

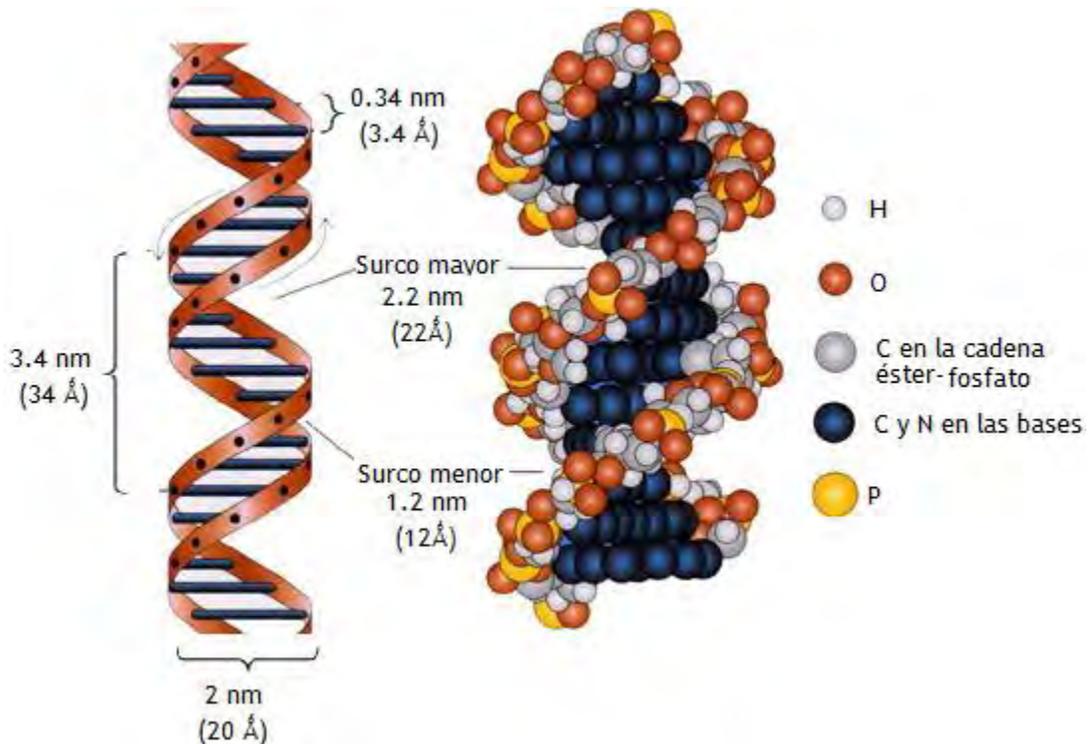


Figura 29. Estructura del DNA (Modificada de Pray, 2014).

Como se mencionó previamente, el sentido de la doble hélice depende del tipo de molécula de DNA, es decir, la molécula puede adoptar diferentes estructuras a causa de variaciones en la humedad, secuencia de las pares de bases y los iones presentes en el

ambiente creando tres clases de DNA. Estos factores afectan el tipo de secuencia, las secuencias al azar o mixtas típicamente involucran formar DNA A o DNA B (dextrógiros), mientras que secuencias especiales se definen por elementos asimétricos que son necesarios para formar estructuras alternas como el DNA Z (levógiro) (Ussery, 2012; Ohshima, 2005). Así, junto con variaciones en el empaquetamiento del DNA estas estructuras alternas proveen de un potencial de autorregulación en sus funciones. Como se muestra en la tabla 6, además del sentido de giro de la doble hélice estas estructuras presentan características particulares que las diferencian entre cada molécula (Pray, 2014; Lodish, 2009).

El ζ DNA o DNA – Z (Figura 30) es una forma transitoria de DNA, que ocasionalmente existe en respuesta a ciertos tipos de actividad biológica; fue descubierto por primera vez en 1979 y postulaciones indican que este tipo de DNA juega un papel importante como potenciador de la transcripción y en la diferenciación terminal. Su estructura se caracteriza por ser una doble hélice levógira con 12 pares de bases por giro completo, donde una vuelta mide 45 Å y 18 Å de diámetro; la distribución de sus surcos es diferente pues el surco mayor es casi idéntico al del DNA – B mientras que el surco menor es profundo y más angosto que el común (Pray, 2014; Ohshima, 2005). Es un DNA específico por contener segmentos ricos en secuencia intercalada de bases púricas y pirimidínicas (GCGCGC), debido a la conformación alternante de los residuos azúcar – fosfato sigue una dirección en zig – zag (Lodish, 2009). El segundo tipo es el β DNA o DNA – B (Figura 30), el DNA clásico; el de mayor interés biológico pues es el que presenta la interacción con las proteínas nucleares, es el más abundante, tiene un 92% de humedad relativa y se encuentra en soluciones con baja fuerza iónica. Su estructura corresponde con el modelo clásico de la doble hélice, 20 Å de diámetro con surco mayor y menor diferenciados y está favorecido por secuencias mixtas de nucleótidos (Ussery, 2012; Ohshima, 2005). Por último el α DNA o DNA – A (Figura 30), una forma más corta y más ancha que se ha encontrado en muestras deshidratadas de DNA y raramente en circunstancias fisiológicas normales. Se caracteriza por presentar 11 pares de bases por giro completo y 28 Å de diámetro, la apariencia de sus surcos es muy similar, pues el surco menor alcanza el tamaño del surco mayor y su estructura es parecida a la de los híbridos DNA – RNA; con un 75% de humedad relativa requiere de cationes como Na^+ , K^+ o Cs^+ como contraiones (Lodish, 2009; Ohshima, 2005; Ussery, 2012).

Tabla 6. Diferencias estructurales entre los tipos de DNA (Modificada de Ussery, 2012; Ohyama, 2005).

Parámetro estructural	DNA A	DNA B	DNA Z
Dirección de la rotación de la hélice	Dextrógiro	Dextrógiro	Levógiro
Pares de bases por vuelta	11	10.5	12
Distancia entre bases	2.55 Å	3.4 Å	3.7 Å
Distancia entre vuelta	28.2 Å	34 Å	44.4 Å
Inclinación entre pares de bases	20°	-6°	7°
Ángulo de rotación	32.7°	34.3°	-30°
Diámetro	23 Å	20 Å	18 Å
Secuencia	d(AGCTTGCCTTGAG)	d(CGCGAATTCGCG)	d(CGCGCGTTTTTCGCG)

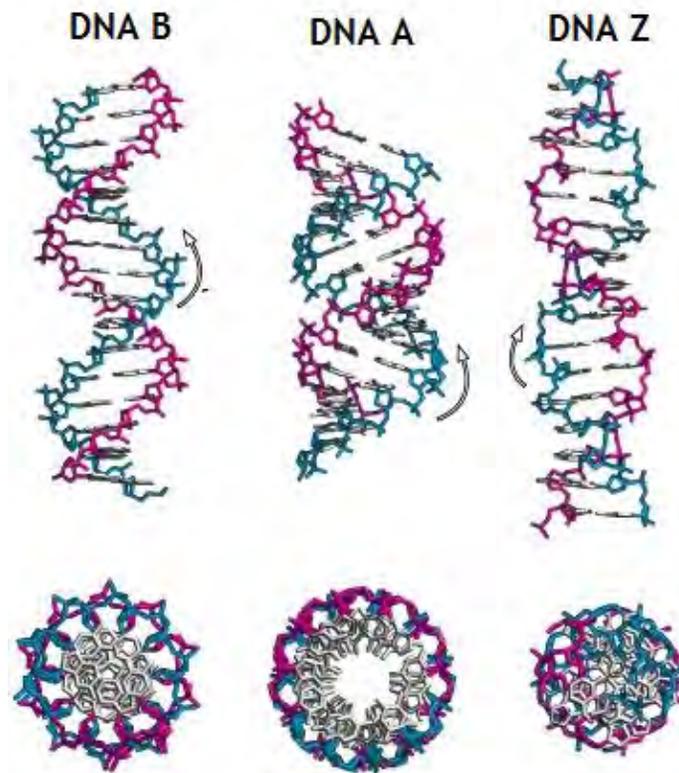


Figura 30. Estructura de los tipos de DNA (Modificada de Pray, 2014; Ussery, 2012).

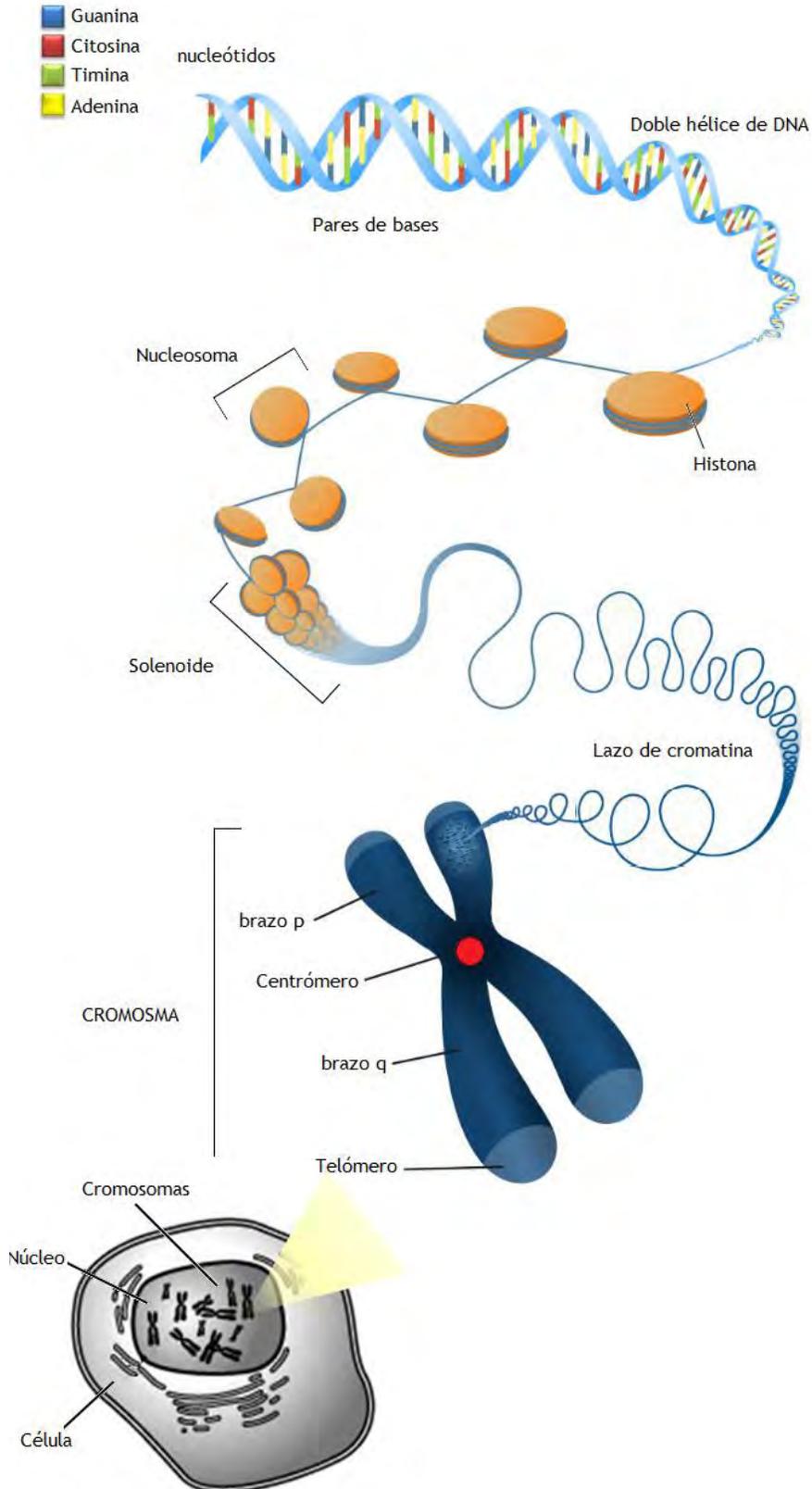


Figura 31. Condensación del DNA del cromosoma humano (Modificada de Genome Research Limited, 2016; NCBI, 2007).

10. REPLICACIÓN

Las células a lo largo de su existencia realizan una diversidad de procesos por los cuáles mantienen su material genético y lo transmiten. Estos procesos tienen lugar en el ciclo celular el cual posee 4 fases: G1, S, G2 y M. Donde la fase S es aquella en la cual se produce la síntesis de DNA. La replicación es un proceso estrictamente controlado pues para que una célula pueda duplicar su genoma antes de dividirse debe existir un mecanismo que acople la replicación con la división celular. Así, en la fase S ocurre la replicación del material genético en el núcleo de la célula; en el cual el DNA de una célula “madre” (progenitora) genera 2 copias idénticas a su molde originario para posteriormente ser distribuido en partes iguales a las 2 células “hijas” en la fase M. Esto señala que la replicación es un proceso semiconservativo (Figura 32), es decir, el nuevo DNA generado se compone de una hebra parental a partir de la cual se forma, y una hebra nueva; hecho que fue descubierto por Matthew Meselson y Franklin W. Stahl en 1957 (Cánovas, 2012; Pray, 2012; Hanawalt, 2004).

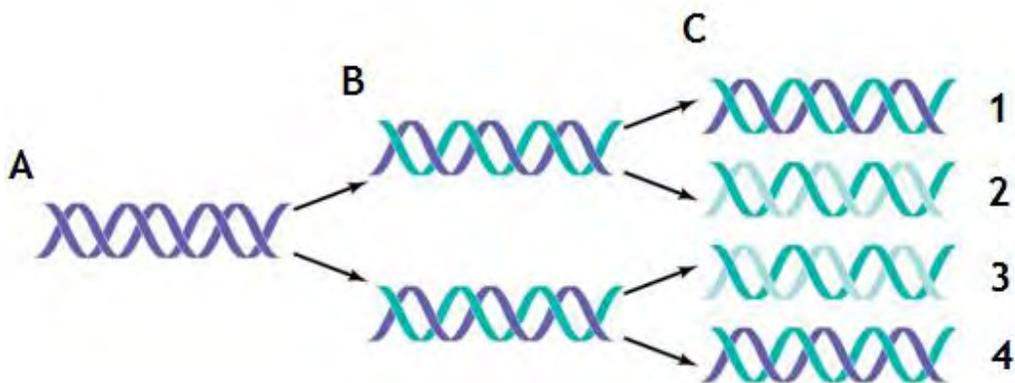


Figura 32. Replicación semiconservativa del DNA. (A) DNA parental (base), las dos cadenas moradas de las cuales se va a partir para generar más copias. (B) Primera generación. Se observa cómo cada una de las cadenas moradas forma parte del nuevo DNA generado (cadena verde) pues se forman dos copias exactas del DNA original. (C) Segunda generación. Aquí cada cadena (morada y verde) sirven como base, así; (1C y 4C) la hebra morada es la parental y por lo tanto se crea la cadena verde, (2C y 3C) aquí, la cadena verde es de cual se va a partir (original) para formar nuevo DNA y consecuentemente se crea la cadena verde tenue (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Anteriormente, se habían propuesto varias hipótesis de las posibles formas en que podría ocurrir la replicación: (Cánovas, 2012; Pray, 2012)

Replicación conservativa. Propone que el DNA se replica a partir de una hebra molde generando una hebra nueva, pero se mantiene el DNA original, de modo que en una célula hija permanece un DNA antiguo y en la otra uno completamente nuevo; es decir, la cadena original se conserva y se sintetiza otra nueva (Figura 33).

Replicación dispersiva. Este modelo plantea que el DNA se replica en fragmentos a partir de una hebra molde, generando una molécula híbrida con fracciones antiguas y fracciones nuevas al azar (Figura 33).

Replicación semiconservativa. El DNA replica sólo una de sus hebras, se abre la doble hélice y una hebra se usa como molde de síntesis para una completamente nueva, conservando en ambas células una hebra antigua (original) de la célula parental y una completamente nueva (Figura 33).

Los experimentos de Meselson y Stahl consistieron en hacer crecer cepas de *Escherichia coli* en un medio de cultivo enriquecido con isótopos de nitrógeno radioactivo (N^{14} y N^{15}); estas bacterias al duplicarse ingresarían el nitrógeno radiactivo a su estructura de DNA lo que generaría la medición de una absorbancia a una cierta longitud de onda, y así el seguimiento de este indicador molecular determinó que la replicación seguía el modelo semiconservativo ya que las moléculas de DNA resultantes poseían una cadena con solo N^{14} y otra solo con N^{15} (Pray, 2012; Cánovas, 2012; Hanawalt, 2004).

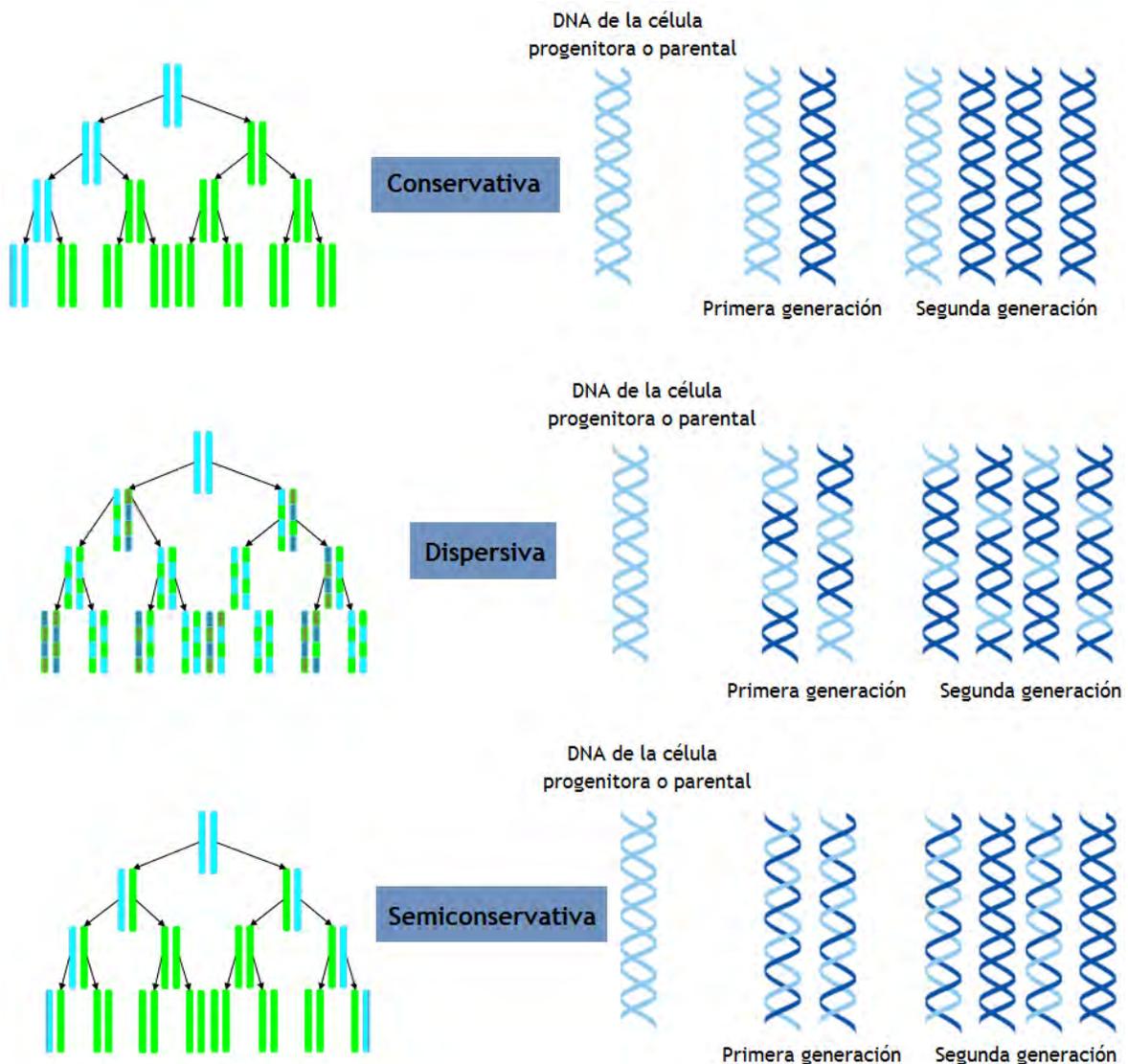


Figura 33. Esquema de las hipótesis sobre el mecanismo de replicación (Modificada de Cánovas, 2012; Solomon et.al., 2013).

Los elementos básicos para que ocurra la replicación son 4 (Figura 34); el DNA parental, el cual se va a replicar, este puede ser dsDNA (antes de abrir la doble cadena) o ssDNA el cual es donde se va a dar la unión con el primer. El primer (o cebador) es un fragmento corto de DNA/RNA que es complementario a la cadena parental y proporciona el extremo OH 3' libre para la reacción; sirve como indicador de donde va a iniciar la replicación. Este proceso es ordenado y secuencial ya que se inicia en un punto fijo (proporcionado por el primer) del DNA, donde su unión se produce de manera simultánea al desenrollamiento de la doble hélice original; así la DNA polimerasa, una enzima que sintetiza DNA puede actuar, esta proteína va incorporando dNTPs (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) en dirección 5'→ 3' complementarios a la cadena molde de DNA. La síntesis progresa siempre en esa

dirección pues el grupo OH 3' es el que va a formar el enlace fosfodiéster con el nucleótido complementario entrante; no existe ninguna DNA polimerasa capaz de iniciar la síntesis de DNA sin la presencia del primer (Lee, 2015; Cánovas, 2012).

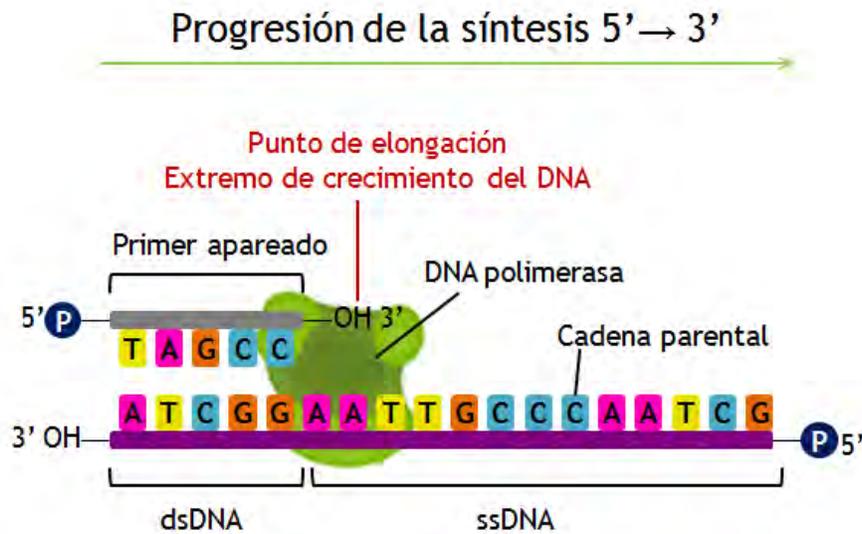


Figura 34. Elementos básicos para la replicación del DNA (Autor, 2017).

La polimerasa actúa agregando a la cadena de DNA nuevos nucleótidos que se van a adherir por enlaces fosfodiéster uniendo el grupo OH 5' de un nucleótido al OH 3' del siguiente, es por eso que estos necesitan ser trifosfatados ya que la reacción libera 2 moléculas de fosfato al momento de la unión (Figura 35); razón por la cual la replicación representa un gran gasto energético para la célula (Lee, 2015).

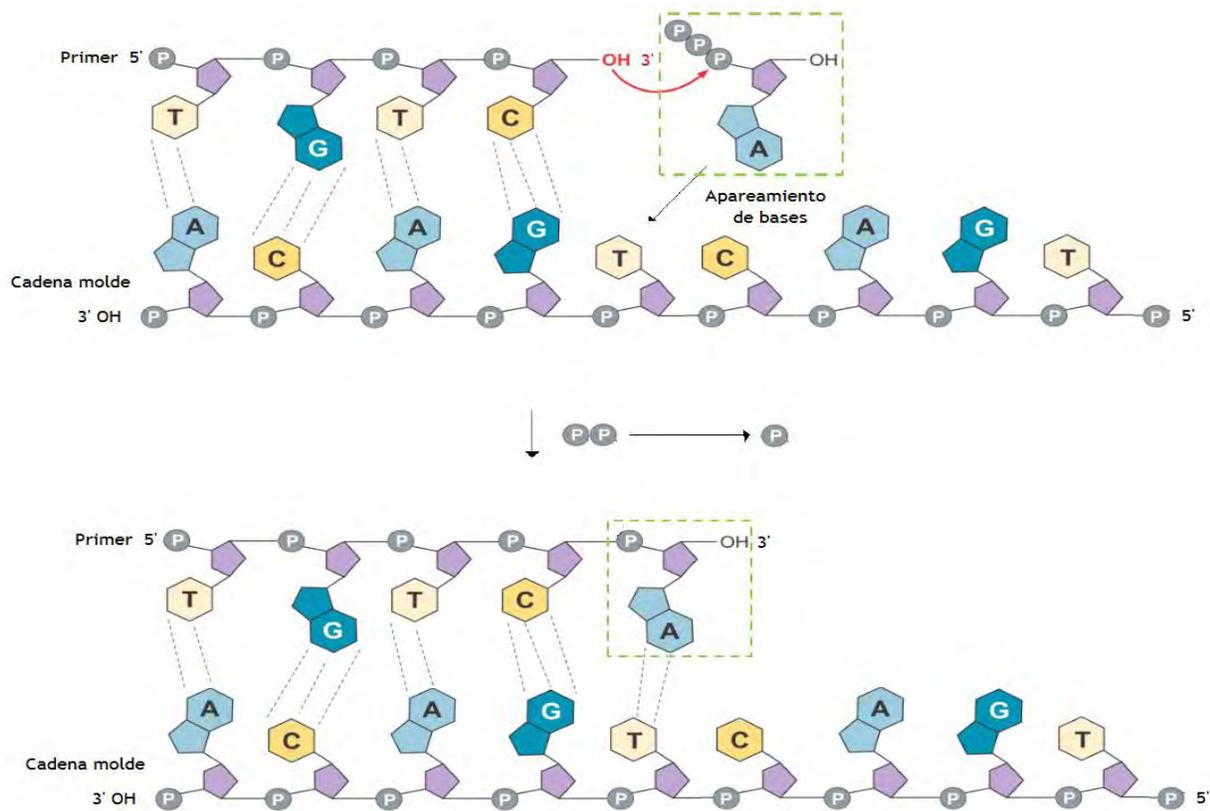


Figura 35. Mecanismo de adición de los dNTPs (Modificada de Gibiansky, 2015).

El DNA, al ser antiparalelo, implica que la cadena molde sea la que va en dirección $3' \rightarrow 5'$; razón por la cual la replicación sigue un proceso de síntesis semidiscontinua, pues a pesar de que se realiza en ambas cadenas de forma secuencial la reacción ocurre de manera bidireccional a partir del origen de replicación (Figura 36); ya que la polaridad de las dos hebras de DNA es opuesta (Zheng y Shen, 2011; Balakrishnan y Bambara, 2013; Cánovas, 2012). El proceso semidiscontinuo y bidireccional de la replicación es debido a que al momento que se va separando la doble hélice y se forma la horquilla de replicación, la polaridad de síntesis es contraria a la de su apertura, donde primero queda libre la cadena $3' \rightarrow 5'$ (la que se replica primero), y forma la cadena principal, sintetizada continuamente; conforme esta replicación avanza se va dando el proceso en la cadena $5' \rightarrow 3'$ donde se forma la cadena rezagada, que es sintetizada discontinuamente, pues esta necesita esperar a que las hebras se separen para poder colocar el primer, es decir, en esta cadena el DNA se forma a partir de pequeños fragmentos discontinuos que se sintetizan en una dirección opuesta a la del movimiento de la horquilla de replicación (Figura 37) (Zheng y Shen, 2011; Lee, 2015; Balakrishnan y Bambara, 2013; Pomerantz y O'Donnell 2017).

Estos fragmentos cortos se denominan fragmentos de Okazaki, pues en 1968, Regi Okazaki descubrió que están constituidos por aproximadamente 50 nt de RNA y entre 100 – 200 nt de DNA en células eucariotas y 1 - 2 Kb en células procariotas (Figuras 36 y 37); explicando así cómo se copia la cadena 5'→3'; a medida que el movimiento de la horquilla expone una nueva sección del DNA plantilla, se comienza un nuevo fragmento rezagado y se aleja de la horquilla hasta que se detiene por el fragmento precedente (Figura 37); además de que esto concuerda con que la DNA polimerasa necesita una cadena de RNA a la cual unir los nucleótidos. La horquilla de replicación se mueve a través del DNA de manera unidireccional mientras copia ambas cadenas de la doble hélice; la conformación antiparalela del DNA genera que esta maquinaria realice la síntesis semidiscontinua; las DNA polimerasas inician la síntesis de DNA extendiendo el primer del extremo 3' por lo que la cadena principal solo necesita de uno ya que la síntesis la realiza de manera continua, mientras que, como ya se mencionó, la replicación de la cadena rezagada lo hace en forma de fragmentos de Okazaki que involucra la posición de varios primers que es lo que dará lugar a la formación de los fragmentos que se sintetizan de manera discontinua. Es importante mencionar que mientras la cadena rezagada se va replicando ésta se va doblando en forma de bucle con la finalidad de alinear direccionalmente la síntesis de la cadena rezagada (la polimerasa) con el movimiento de la maquinaria de replicación, el replisoma, este modelo se conoce como modelo del trompo y el plegamiento tiene la función de favorecer el movimiento del replisoma a través del DNA (Figura 38) (Zheng y Shen, 2011; Lee, 2015; Balakrishnan y Bambara, 2013; Pomerantz y O'Donnell 2017).

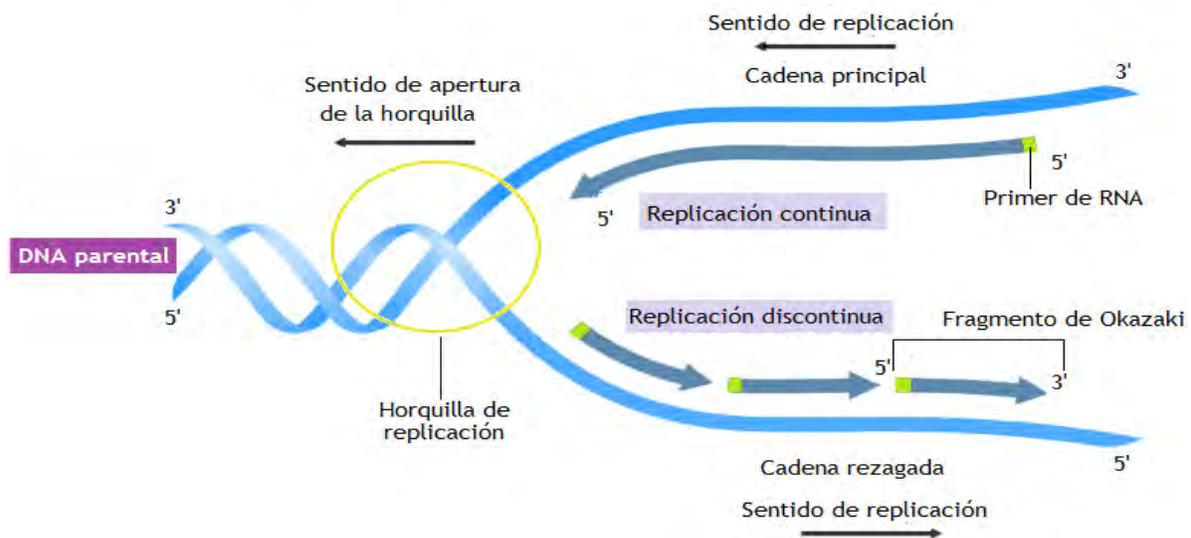


Figura 36. Síntesis semidiscontinua y sentido bidireccional de la replicación (Modificada de Cánovas, 2012).

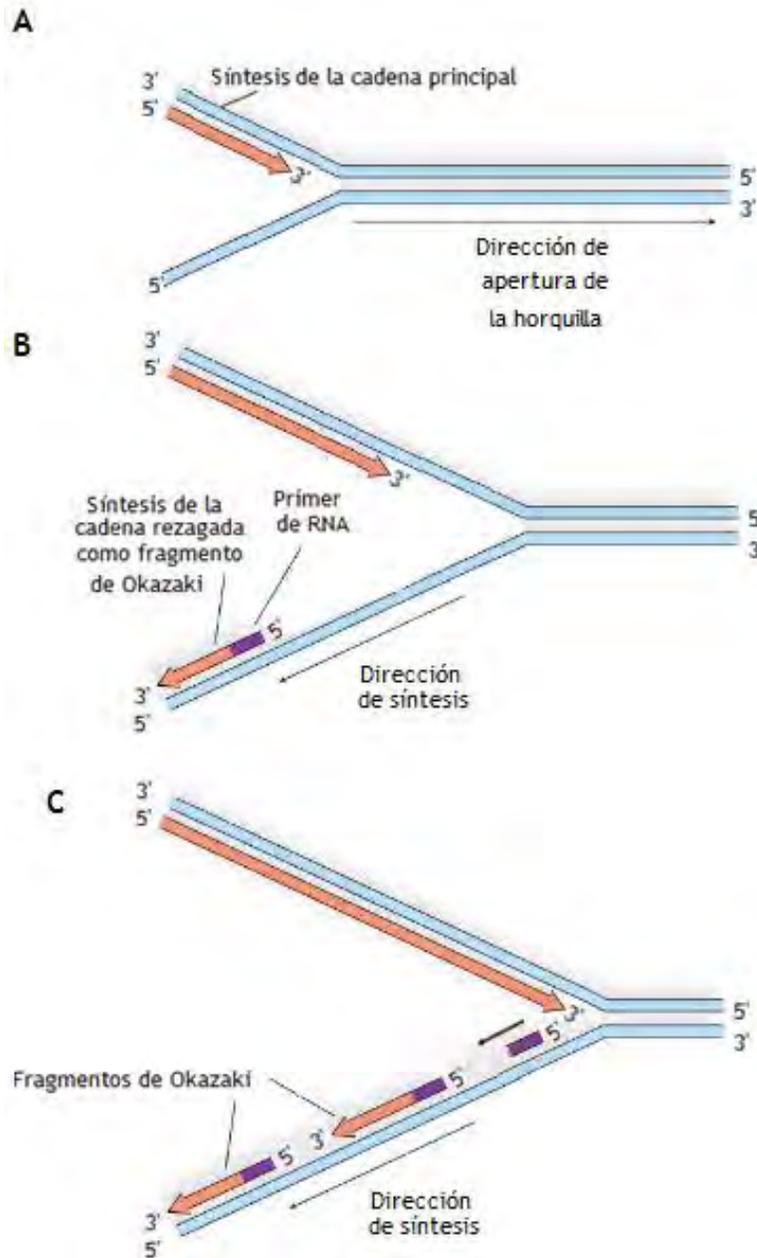


Figura 37. Formación de los fragmentos de Okazaki. (A) La síntesis de la cadena principal es continua, (B) mientras que la cadena rezagada forma varios fragmentos conforme la horquilla de replicación de va abriendo. (C) Cada que se abre mas la horquilla se forma un nuevo fragmento y la síntesis de ese DNA se da en forma opuesta. Los fragmentos de Okazaki posteriormente se ligan al DNA por medio de la enzima ligasa para tener una cadena continua (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015; Cox, Doudna y O'Donnell, 2012)



Figura 38. Mecanismo de síntesis de la cadena principal y la cadena rezagada (Modificada de Pomerantz y O'Donnell 2017).

A manera de resumen, las propiedades principales de la replicación es que ésta es semiconservativa, con una síntesis semidiscontinua, bidireccional y multifocal, pues ambas cadenas se replican. Esta propiedades aplican tanto para la replicación en eucariontes como en procariontes, y, en los siguientes apartados se abarcaran las diferencias que se presentan en estos organismos al realizar este proceso.

10.1 Replicación Eucariota

Como se mencionó previamente cuando el DNA se replica la doble hélice que forma una molécula de DNA se abre en el punto de origen de replicación formando la horquilla de replicación donde se unen una serie de enzimas que se encargan de iniciar la replicación en ambas cadenas. Pero antes de hablar sobre las enzimas participantes hay que abarcar el trabajo que cumple la DNA polimerasa y otros componentes del replisoma.

10.1.1 DNA polimerasa

Como ya se mencionó es una enzima que polimeriza la síntesis del DNA dirigida por una cadena molde y requiere de un primer de RNA para producir la elongación en dirección 5'→3', añadiendo un dNTP y liberando un pirofosfato al momento de efectuar la reacción. Presenta una procesividad y fidelidad elevada, es decir, no se disocia durante la elongación y va añadiendo 1000 nucleótidos por segundo con la capacidad de exonucleasa 3'→5' si detecta un error en el apareamiento de los dNTPs (Figura 41), lo que le genera un tasa de error baja ($10^{-8} - 10^{-9}$) al momento de efectuar la autocorrección ya que el sitio activo de la DNA polimerasa tiene una tasa de error de 1 nucleótido por cada 10 000 pares de bases. Esto se consigue mediante la verificación de la polimerasa comprobando si el nucleótido correcto se ha insertado en la plantilla (Yao y O'Donnell, 2015; Evans, 2008; Lee, 2015).

La verificación de la DNA polimerasa se da en diferentes dominios de su estructura, presentando 3 (Figura 39): los dedos, el pulgar y la palma. El dominio de los dedos, es aquel dominio que une los dNTPs entrantes y los envuelve; en este dominio se une a cada uno de los cuatro dNTPs, el paso de selección de dNTP de alta precisión de las DNA polimerasas implican un cambio de conformación en el que éste se cierra sobre la palma, envolviendo al dNTP entrante en una cámara confinada dentro de la cual sólo puede encajar los pares de bases correctos (Figura 40). Estos pares de bases con la forma correcta se unen, mientras que aquellos sin la forma evitan el cambio de conformación necesario para la catálisis, y se disocian de la polimerasa, seguido por la unión de otro dNTP. El pulgar es el dominio que interactúa con el DNA recién sintetizado y mantiene la unión primer – polimerasa – DNA molde. Por último, la palma es el dominio donde se lleva a cabo la verificación de apareamiento y el sitio catalítico de la reacción. Si esta detecta un desajuste, el DNA se transfiere desde el dominio de polimerización (pulgar) a su dominio exonucleasa 3'→ 5' N-terminal (palma); así, el nucleótido

incorrectamente incorporado es eliminado y el DNA se reincorpora al dominio de polimerización permitiendo que se reanude la copia del material genético (Figura 41) (Yao y O'Donnell, 2015; Evans, 2008; Cánovas, 2012).

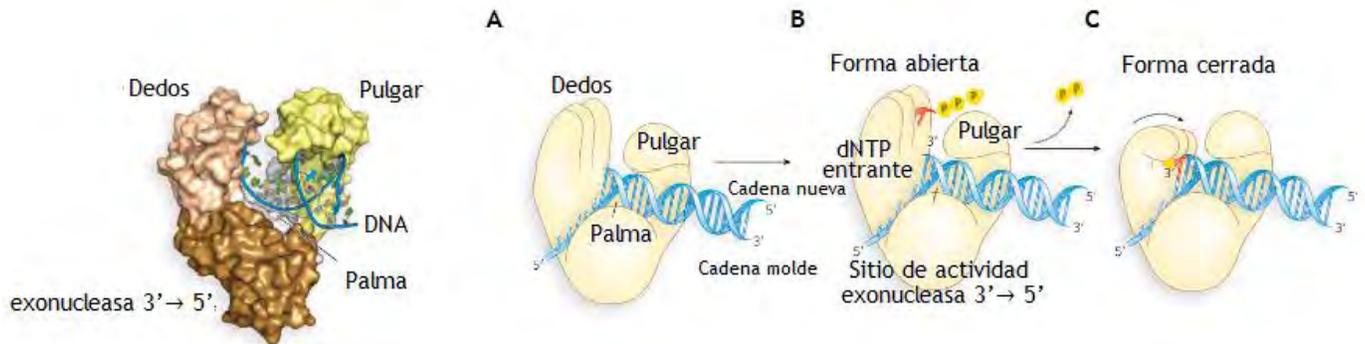


Figura 39. Dominios de la DNA polimerasa. (A) Dominios. (B) Incorporación del dNTP a los dedos. (C) En la forma cerrada los dedos envuelven al dNTP y con un movimiento de rotación de 40° lo mueven hacia el pulgar para que se dé el acoplamiento de pares de bases en la palma seguido de la translocación del DNA para seguir continuando la reacción (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015; Cox, Doudna y O'Donnell, 2012).

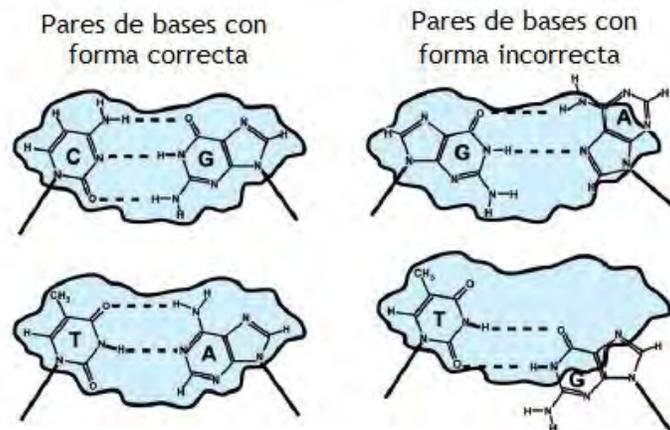


Figura 40. Cámara de apareamiento de pares de bases (Modificada de Yao y O'Donnell, 2015).

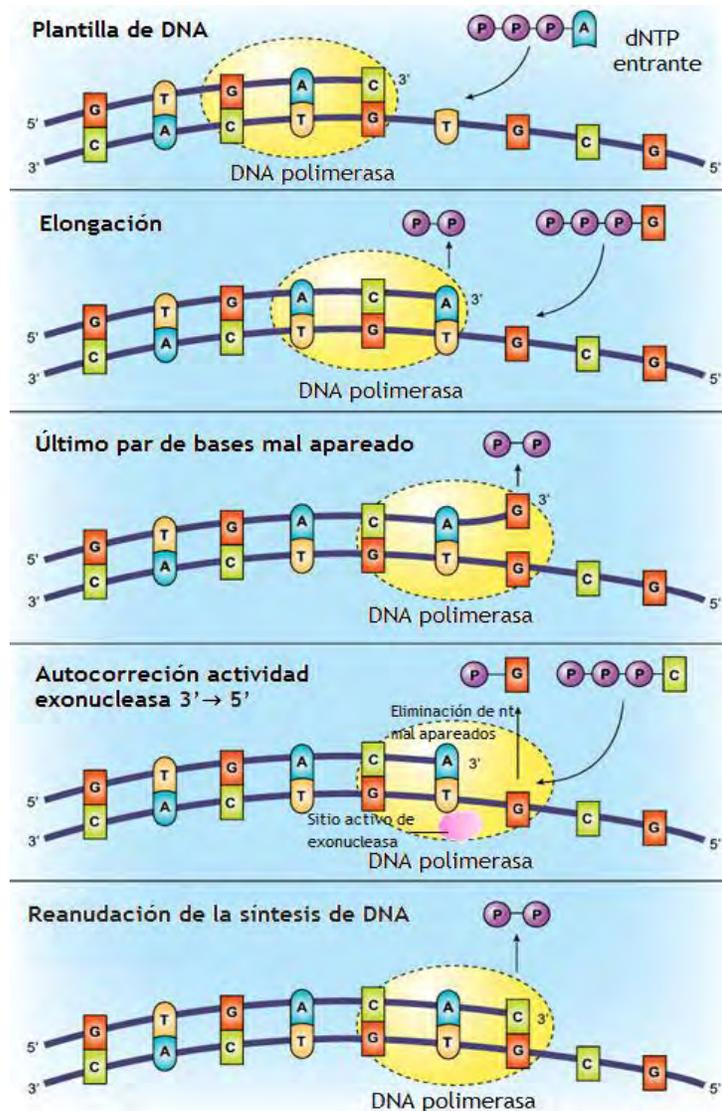


Figura 41. Mecanismo de acción de la actividad 3' exonucleasa de la DNA polimerasa (Modificada de Evans, 2008).

En células eucariotas, hay 5 tipos de polimerasas con diferente actividad y función, como se observa en la tabla 7; donde la DNA polimerasa α sintetiza la nueva hebra de DNA en sentido 5'→3' a partir de la hebra molde que va en sentido 3'→5' (síntesis continua, cadena principal) y retira los primers de RNA de la hebra discontinua. La polimerasa α consiste en cuatro subunidades, la subunidad Pol 1 es la catalítica y la mayor, la subunidad Pol 2 es la segunda más grande (con actividad desconocida) y las dos subunidades más pequeñas realizan la función de originar el primer, estas contienen el sitio catalítico de la primasa, pero la subunidad más grande es necesaria para formar el primer enlace dinucleotídico. Después de 7 nucleótidos, el primer de RNA cambia a la

subunidad de la DNA polimerasa capaz de extender estos primers otros 20 – 25 residuos para producir un cebador híbrido RNA/DNA. La DNA polimerasa δ sintetiza la nueva hebra de DNA en sentido 5'→3' a partir de la hebra molde que va en sentido 5'→3' (síntesis discontinua, hebra rezagada), aunque también actúa sobre la hebra principal y corrige errores al término de la replicación en ambas hebras recién sintetizadas. Ésta consiste en cuatro subunidades, la Pol 3 es la del sitio catalítico y la más grande, seguida de Pol 3.1 y Pol 3.2 en tamaño, siendo la Pol 3.2 la subunidad más pequeña. La DNA polimerasa ϵ es esencial para la replicación, ésta consiste en cuatro subunidades, la del sitio activo catalítico Pol 2, seguida de Dpb2 y dos subunidades pequeñas, Dpb3 y Dpb4. La secuencia de Pol 2 indica que sus extremos están enlazados, y que su mitad NTD es activa mientras que la mitad CTD es inactiva pero esencial para la viabilidad celular y actualmente se cree que tiene un papel estructural (Yao y O'Donnell, 2015; Indiani y O'Donnell, 2010; Bruck et.al., 2015).

Tabla 7. DNA polimerasas en eucariontes (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012; Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Característica	POLIMERASA				
	α	β	γ	δ	ϵ
Ubicación subcelular	Núcleo	Núcleo	Mitocondria	Núcleo	Núcleo
Actividades enzimáticas:					
Primasa (inicio)	Si	No	No	No	No
Polimerasa 5'→3' (elongación)	Si	Si	Si	Si	Si
3' Exonucleasa 3'→5' (corrección de pruebas)	No	No	Si	Si	Si
5' Exonucleasa 5'→3' (eliminación de primers)	Si	No	No	No	No
Función en la célula:					
Replicación (síntesis continuada de cadenas nuevas, principal y rezagada)	Sólo inicialmente	No	Si	Si	Si
Empalme de fragmentos de Okazaki	No	No		Si (con nucleasas)	Si
Velocidad de replicación:					
Velocidad de polimerización (nt/seg)			100 – 200		
Procesividad (nt añadidos antes de su disociación)	Baja	Baja	Elevada	Elevada con PCNA (5 000)	Elevada con/sin PCNA

10.1.2 Abrazadera deslizante

Para poder efectuar su función, la DNA polimerasa debe formar una holoenzima, que es un complejo multiproteico con una función en particular; en este caso hacer que la DNA polimerasa se desplace a lo largo de la cadena molde. Este complejo se compone de una abrazadera deslizante, la proteína PCNA (Figura 42), un cofactor esencial de la DNA polimerasa δ/ϵ que se presenta en forma de anillo la cual le confiere procesividad a la Pol para catalizar la síntesis rápida y procesada del DNA aumentando esta procesividad hasta 1 000 veces, la PCNA ancla a la polimerasa al DNA y la va empujando a través de éste. Estas proteínas cumplen una función esencial en la replicación, pero también se ven involucradas en procesos de reparación y recombinación del DNA, y se utilizan en otros procesos celulares importantes, incluyendo la regulación del ciclo celular. En la reparación del DNA, la PCNA es necesaria para el desapareamiento de nucleótidos, pues ésta dicta la especificidad en la hebra para garantizar que el nucleótido mal incorporado sea escindido de la nueva hebra y no el nucleótido parental correcto. También, PCNA ejerce una fuerte influencia en el metabolismo del DNA y la cromatina mediante el reclutamiento de varias enzimas al DNA, no sólo participa en la localización de estos factores en sus sitios de acción, además activa directamente su actividad enzimática (Yao y O'Donnell, 2016; Choe y Moldovan, 2017; Yurieva y O'Donnell, 2016; Yao y O'Donnell, 2015; Indiani y O'Donnell, 2010).

La función de PCNA es dramáticamente amplificada por modificaciones postraduccionales, debido a que ésta carece de actividad enzimática, en lugar, ejerce sus efectos a través de interacciones proteína – proteína, adición regulada y eliminación de restos de aa proveen el mecanismo ideal para controlar las funciones de PCNA. Las modificaciones postraduccionales no afectan la estructura de la proteína, sino que proveen una superficie adicional para la interacción con factores de unión al DNA. Cabe mencionar, que la unión de PCNA al DNA se da en sitios donde el nucleosoma ya fue descondensado, para esto, PCNA requiere que la cromatina esté marcada por metilación en la K56 de la H3, reacción catalizada por la metiltransferasa G9a. La estructura de la PCNA es superponible con la estructura β (Figura 59, la PCNA en procariontes, de cual se hablará posteriormente), cada subunidad de PCNA se compone de sólo dos dominios y se trimeriza para formar un anillo de seis dominios (Figura 42) (Yao y O'Donnell, 2016; Choe y Moldovan, 2017; Yurieva y O'Donnell, 2016; Yao y O'Donnell, 2015; Indiani y O'Donnell, 2010).

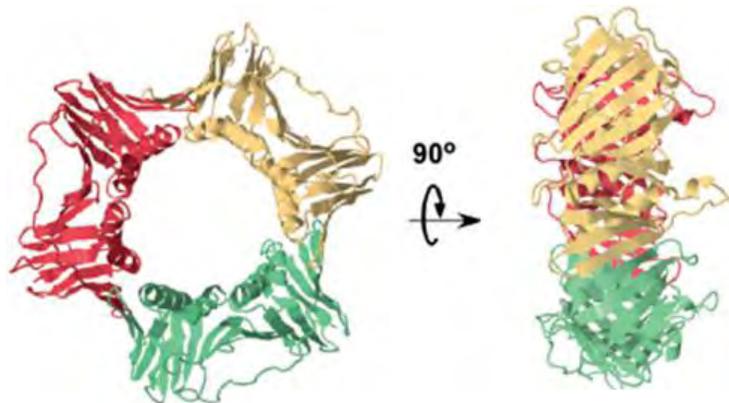


Figura 42. Estructura de PCNA La estructura de la izquierda es la cara frontal de la proteína y la de la derecha es la cara lateral (Yao y O'Donnell, 2016).

10.1.3 Cargador de la abrazadera

Unida a ésta, se encuentra un complejo henteropentamérico, la proteína RFC que utiliza ATP para montar la abrazadera (PCNA) alrededor del DNA, es una estructura en forma de pinza que cumple la función de ser el cargador de la abrazadera (RFC). La estructura clásica de RFC comprende 5 subunidades siendo RFC1 (RFCA) la más grande y esencial, y 4 subunidades pequeñas (RFC 2, 3, 4 y 5 ó B, C, D, E); la RFC1 contiene tanto el CTD y NTD del sitio activo de RFC, en donde éste complejo está alineado de tal manera que crea un espacio entre RFC1 y RFC5 adecuado para interactuar con el anillo de PCNA (Figura 43), donde RFC se une a la cara frontal de PCNA que está orientada hacia la elongación del DNA. Así en presencia de ATP este cargador se abre y cierra como pinza para montar la abrazadera alrededor del primer (extremo 3') abriendo y cerrando el anillo de la PCNA. De esta forma el complejo PCNA – RFC – ATP estimula la hidrólisis del ATP para abrir el anillo de la PCNA, y así, la disociación del cargador junto con la unión de la DNA polimerasa (Figura 44), particularmente Pol δ y Pol ϵ que son las replicasas principales que efectúan el proceso. Estudios recientes muestran que la Pol δ y la Pol ϵ actúan en diferentes hebras en la horquilla de replicación, indicando que la Pol ϵ actúa sobre la cadena principal mientras que la Pol δ actúa sobre la rezagada. Ambas interactúan con la abrazadera deslizante. También se ha demostrado que el complejo de las cuatro subunidades pequeñas de RFC pueden abrir PCNA y desanclarlo del DNA, lo que sugiere que todos los complejos RFC tienen potencial de eliminar a PCNA (Choe y Moldovan, 2017; Yao y O'Donnell, 2015; Shiomi y Nishitani, 2017; Indiani y O'Donnell, 2010; Yao y O'Donnell, 2016; Yurieva y O'Donnell, 2016).

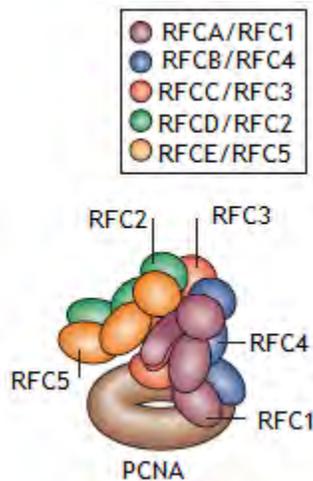


Figura 43. Estructura de RFC unida a PCNA (Modificada de Indiania y O'Donnell, 2010).

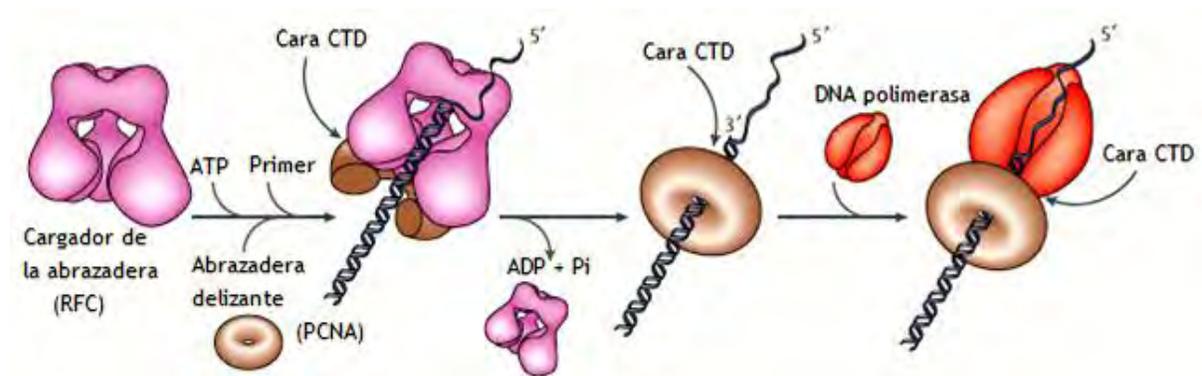


Figura 44. Mecanismo de unión de la abrazadera deslizante (Modificada de Indiani y O'Donnell, 2010).

Las células eucariotas presentan 3 complejos RFC que actúan sobre PCNA: RFC1 – RFC, Ctf18 – RFC y Elg1 – RFC (ATAD5 en células humanas) (Figura 45), éstas comparten las cuatro pequeñas subunidades y pertenecen a la familia ATPasa AAA+; su similitud morfológica sugiere que todos interactúan mediante la coacción PCNA – DNA, aunque poseen diferentes funciones como se observa en la tabla 8 (Shiomi y Nishitani, 2017). Ctf18 – RFC fue el segundo complejo identificado formado por una subunidad grande Ctf18 y dos pequeñas Dcc1 y Ctf8, que se unen a las 4 subunidades pequeñas de RFC; estas 2 subunidades adicionales son requeridas para interactuar con el CTD de Ctf18, además de que han sido relacionadas en la prevención de pérdida cromosómica, requeridas en la segregación de cromosomas y recombinación homóloga de las cromátidas hermanas. Estos hallazgos indican que el complejo Ctf18 – RFC se requiere principalmente para la cohesión entre cromátidas hermanas y podría estar involucrado en la regulación de PCNA en la cromatina. Aunque también este complejo es efectivo para

unirse y anclar PCNA al DNA en ensayos *in vitro*. Elg1 – RFC es el pentámero más recientemente identificado con una subunidad grande Elg1 que tiene el NTD más largo y las 4 subunidades pequeñas de RFC; y se ha visto involucrado en la inestabilidad genómica aunque su actividad principal es de descargar a PCNA durante y después de la replicación del DNA. La sub-expresión de Elg1 lleva a una acumulación extrema de puentes de cromatina con la PCNA en la maquinaria de replicación, mientras que la sobre-expresión reduce PCNA e incrementa el número de células en fase S indicando que los niveles anormales de PCNA en la cromatina afectan la progresión del ciclo celular (Shiomi y Nishitani, 2017; Indiani y O'Donnell, 2010; Yurieva y O'Donnell, 2016).

Tabla 8. Comparación de la actividad entre los diferentes complejos RFC (Modificada de Shiomi y Nishitani, 2017).

	RFC1 – RFC	Ctf18 – RFC	Elg1 – RFC
Principal actividad celular	Replicación, reparación y recombinación del DNA	Establecimiento de cohesión	Estabilidad genómica
Actividad principal sobre PCNA (<i>in vivo</i>)	Ancla PCNA	¿¿¿ Ancla y desancla PCNA???	Desancla PCNA
Actividad principal sobre PCNA (<i>in vitro</i>)	Ancla y desancla PCNA	Ancla y desancla PCNA	Desancla PCNA
Fenotipo de knock-out	Reduce PCNA en cromatina	Inhibe CRL4 – Cdt 2 generando re-replicación	Incrementa PCNA en cromatina

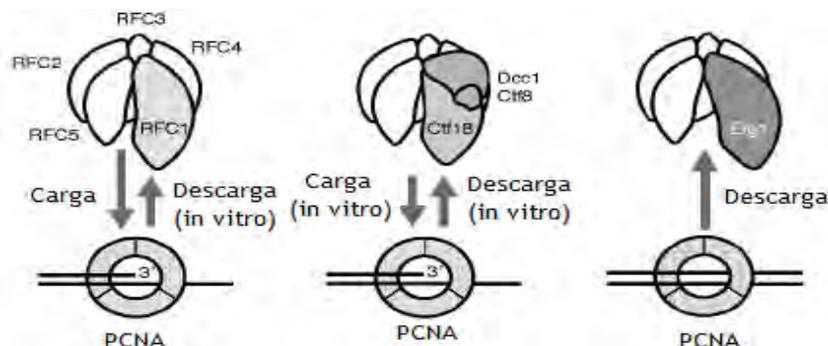


Figura 45. Estructura de los diferentes complejos RFC. La carga y descarga se refiere a la actividad que tiene sobre la PCNA (Modificada de Shiomi y Nishitani, 2017).

Es importante que la replicación ocurra solo durante la fase S del ciclo celular y que el duplicado sólo se produzca una vez, la sobre-replicación, disminución y replicación del DNA fuera de la fase S puede generar inestabilidad genómica y la posible muerte celular o cáncer. Una vez iniciada la replicación, PCNA debe ser anclada tanto en la cadena principal como en la rezagada, y se espera que ésta se encuentre dos veces más en la cadena rezagada debido a la formación de los fragmentos de Okazaki (Bruck et.al., 2015; Lerman y Noguchi, 2013)

Pero antes de que pueda actuar el complejo PCNA – polimerasa deben ser reclutadas las enzimas requeridas para formar el replisoma, la maquinaria de replicación. La estructura de la doble hélice del DNA requiere que ésta deba ser abierta mediante giros helicoidales para desenrollar su estructura durante la replicación; este proceso se realiza por medio de enzimas topoisomerasas y helicasas dependientes de ATP (Lerman y Noguchi, 2013; Bruck et.al., 2015; Yao y O'Donnell, 2016).

10.1.4 Enzimas involucradas en el replisoma eucariota

Una de ellas, la enzima topoisomerasa, es una proteína que proporciona un mecanismo giratorio para aliviar la tensión de la doble hélice e impide que el DNA se enrede debido al superenrollamiento producido al abrir la horquilla de replicación. Dependiendo del tipo de topoisomerasa, esta enzima corta 1 (topoisomerasa I) o las 2 cadenas (topoisomerasa II) del DNA para poder desenrollar la estructura (Yao y O'Donnell, 2016; Lerman y Noguchi, 2013).

La helicasa MCM es una proteína que cataliza la separación de la doble hélice del DNA una vez que fue desenrollada al romper los puentes de hidrógeno existentes entre las bases nitrogenadas de una hebra y otra pasando de dsDNA a ssDNA; y tiene la capacidad de anclarse al ssDNA permitiendo el avance de las enzimas replicadoras; estrictamente durante la fase G1 tardía pues en la fase S podría existir sobre-replicación o re-replicación del material genético. Su estructura se caracteriza por formar un hexámero en forma de anillo con 6 subunidades (Mcm2-7) homólogas a proteínas con actividad AAA+. Mcm2-7 actúa de manera 3'→5' sobre el ssDNA indicando así que actúa sobre la cadena principal para separar el DNA parental permitiendo el avance de la maquinaria replicadora. Estas helicasas replicativas (Mcm2-7) rodean la cadena principal de DNA mientras excluyen a la rezagada del motor interno de la actividad de la proteína, este fenómeno se conoce como el “mecanismo de exclusión estérico” de desenrollamiento del

DNA (Figura 46a), y está basado en la actividad ATPasa AAA+. Recientemente se descubrió que el exceso de Mcm2-7 se utiliza como un mecanismo de "respaldo" si las células son sometidas a la replicación por estrés; éste es importante porque se asegura que haya un número suficiente de Mcm2-7 activo antes de que la fase S comience. Si las células se encuentran en replicación por estrés, complejos adicionales de Mcm2-7 se activan para ayudar a la replicación completa del genoma; y asegurar que una vez que la replicación comience, termine, evitando así la inestabilidad genómica (Yao y O'Donnell, 2016; Yao y O'Donnell, 2015; Bruck et.al., 2015; Baxley y Bielinsky, 2016; Pellegrini y Costa, 2016; O'Donnell y Li, 2016; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Parker, Botchan y Berger, 2017).

A su vez, la helicasa en células eucariotas requiere de 11 subunidades diferentes para completar su actividad, las 6 diferentes subunidades de MCM (Mcm2-7) y 5 factores accesorios que se unen al anillo de la proteína para formar un complejo CMG (Figura 46b). Este complejo está conformado por la asociación con un heterotetrámero GINS que presenta 4 subunidades homólogas entre sí y la proteína Cdc45; el complejo CMG se crea durante la fase S y está compuesto por dos canales, las subunidades Mcm2-7 forman el canal que envuelve y transloca el ssDNA durante su desenrollamiento, ésta reacción es dependiente de ATP y está catalizada por Cdc6 y Cdt1; mientras que GINS y Cdc45 forman el segundo canal con función desconocida. Cada subunidad del complejo CMG posee CTD (dominio con actividad AAA+) y NTD (dominio de interacción con DNA y oligomerización) largos lo que le confiere la apariencia de dos anillos apilados uno sobre el otro a su estructura, donde CTD forma un anillo y NTD forma el otro, y la hidrólisis del ATP genera movimientos rotatorios de estos anillos para separar las cadenas (Figura 46c). Este complejo necesita formarse pues la actividad ATPasa y helicasa de la Mcm2-7 es muy débil por sí sola, por lo que este complejo aumenta la eficiencia en la hidrólisis de ATP y apertura del dsDNA (Bruck et.al., 2015; Lerman y Noguchi, 2013; Yao y O'Donnell, 2016; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Pellegrini y Costa, 2016; Baxley y Bielinsky, 2016; Yao y O'Donnell, 2015; Parker, Botchan y Berger, 2017; Ali y Costa, 2016; Yurieva y O'Donnell, 2016).

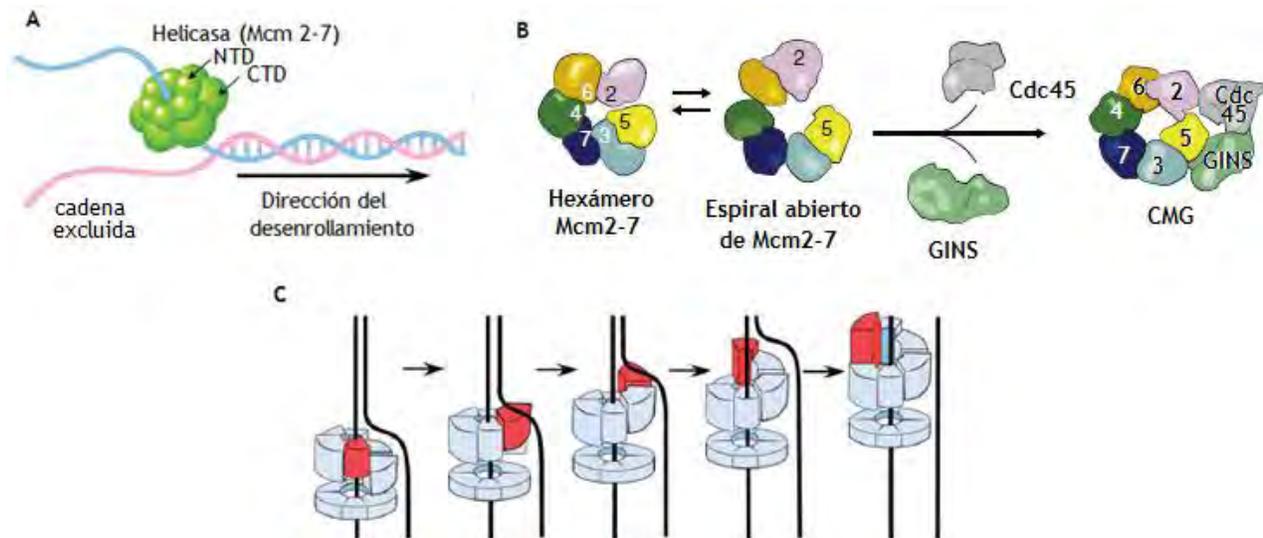


Figura 46. Estructura y mecanismo de acción de la helicasa. (A) “Mecanismo de exclusión estérico”: La helicasa Mcm2-7 consiste en un homohexámero de las proteínas motoras que rodean la cadena principal y al hidrolizarse el ATP se mueve a lo largo del ssDNA; la cadena rezagada como consecuencia se separa y se va desenrollando así el DNA. (B) Estructura del complejo CMG en eucariotas, cuando el anillo de Mcm2-7 se abre, GINS y Cdc45 se acoplan. (C) Modelo del complejo CMG en donde se propone que una subunidad (roja) se mueva a lo largo del ssDNA mientras que las otras 6 subunidades del primer anillo generen eventos de hidrólisis de ATP; la función del segundo anillo es desconocida hasta ahora (Modificada de Yao y O’Donnell, 2015; Ali y Costa 2016; Yao y O’Donnell, 2016).

El complejo CMG necesita ser activado en un sitio que haya sido reconocido como ORC, un sitio con actividad ATPasa en donde se va a reclutar ese complejo. El proceso inicia con la unión de dos moléculas de Mcm2-7 (unidas a Ctd1, pues favorece la reacción) catalizada por Cdc6 al ORC generando un doble anillo hexamérico inactivo (Figura 47a); este doble hexámero proporciona una plataforma para el montaje de dos copias del replisoma, reclutando GINS y Cdc45 para formar CMG. El ensamblaje de CMG solo puede ocurrir durante la fase S debido a que este proceso está regulado principalmente por 2 CDKs de esta fase (S-CDK y DDK), aunque también lo regulan 4 factores de iniciación (Sld2, Sld3, Sld7 y Dpb11). Estos factores no son parte del complejo CMG activo, pero si necesarios para su activación. Primero DDK fosforila tres subunidades de MCM (Mcm2, Mcm4 y Mcm6) para reclutar a Cdc45 y ensamblar a tiempo el complejo CMG pues permite la atracción de Sld3 – Sld7 que cargan a Cdc45 en el CMG creciente (Figura 47b). Posteriormente, S-CDK juega un papel importante en la inhibición del ORC para Mcm2-7, fosforilando Sld2 y Sld3 para activar la formación de un complejo con Dpb11. Aunque el papel de los factores de iniciación todavía no se ha descrito

completamente, estudios recientes muestran que la región media de Sld3 se une a Cdc45 para reclutar y estabilizar su unión con Mcm2-7. Se cree que Dpb11 es una proteína de andamiaje que atrae la fosforilación de Sld2 y Sld3 por S-CDK y así favorece la unión de GINS al complejo CMG, pues ha sido demostrado que Sld2, Sld3 y Dpb11 compiten con GINS en su unión a Mcm2-7, ya que todos se unen a las subunidades Mcm3 y Mcm5; sin embargo, cuando Mcm2-7 se une al ssDNA libera a Sld2, Sld3 y Dpb11 para permitir la unión de GINS y terminar de formar el complejo activo CMG (Figura 47c). Recientemente se descubrió otra proteína MCM, Mcm10, que participa en la activación del proceso y se mantiene unida al complejo Mcm2-7 durante la replicación. En la presencia de esta proteína y ATP el sitio de activación puede ser detectado (Figura 47d) generando la separación de las cadenas y la adición de la primasa (Pol α) (Figura 47e) (Ali y Costa, 2016; Bruck et.al., 2015; Baxley y Bielinsky, 2016; Musialek y Rybaczek, 2015; Yao y O'Donnell, 2016; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; O'Donnell y Li, 2016; Parker, Botchan y Berger, 2017).

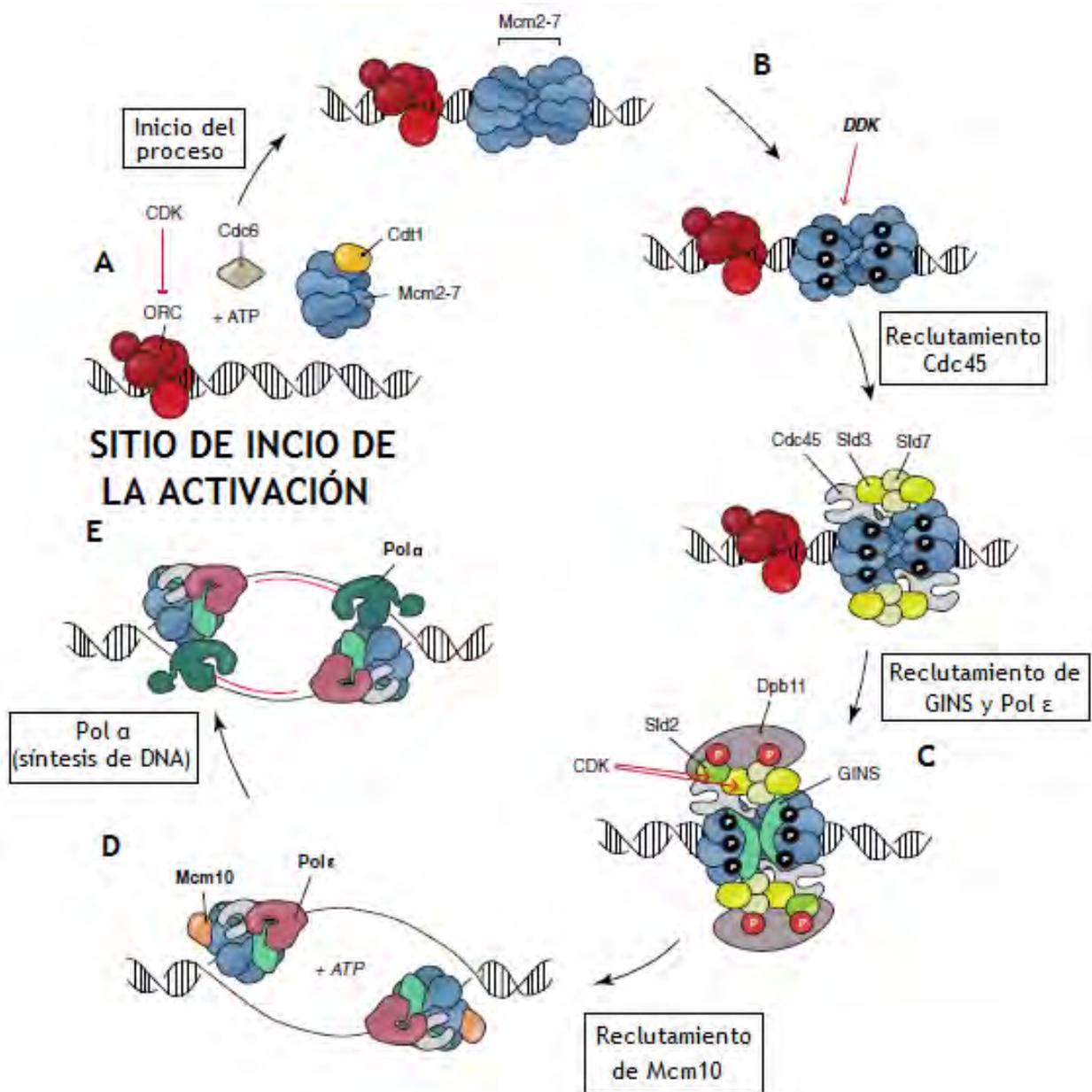


Figura 47. Mecanismo de ensamblaje y activación del CMG. (A) ORC y Cdc6 reclutan dos copias de Mcm2-7 – Ctd1 resultando en la formación de un doble anillo sobrepuesto que se envuelve alrededor del DNA. (B) DDK fosforila (flecha roja) la región NTD de Mcm2, Mcm4, y Mcm6 para promover el reclutamiento de Sld3 – Sld7 y Cdc45. (C) S-CDK fosforila (flecha roja) Sld2 y Sld3 para reclutar Dpb11 y así reclutar GINS. (D) El reclutamiento de Mcm10 y ATP son requeridos para activar el complejo y atraer a la Pol ε. (E) La adición de la Pol α resulta en la síntesis de DNA (Modificada de Ali y Costa, 2016; Baxley y Bielinsky, 2016; O'Donnell y Li, 2016; Parker, Botchan y Berger, 2017; Musialek y Rybaczek, 2015).

A pesar de que es una proteína que carece de dominios catalíticos, Mcm10 se asocia a los orígenes de replicación y facilita la activación de CMG para ser parte del replisoma.

Además, se han descubierto distintas regiones de interacciones directas entre Mcm10 y varios factores de replicación, incluyendo Mcm2-7, Cdc45, DNA Pol α , ORC, Ctf4 y PCNA; así, estos datos respaldan el modelo en el que Mcm10 coordina la actividad de CMG y la síntesis del DNA a través de la interacción con diferentes enzimas de la horquilla replicativa. Mcm10 presenta 3 dominios estructurales, CTD, NTD e ID, y cada uno contiene regiones funcionales distintas implicadas en enlaces de unión de DNA – proteína y/o proteína-proteína, siendo ID la región que media estas interacciones. A su vez, ID contiene sitios específicos de unión con Pol α , PCNA y Mcm2-7 por lo que está implicada en el replisoma (Baxley y Bielinsky, 2016; Parker, Botchan y Berger, 2017; Ravoitytè y Wellinger, 2017; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Musialek y Rybaczek, 2015).

Mientras el sitio de origen se desenrolla, es reclutada la Pol α al ssDNA, y mientras CMG progresa y genera regiones más grandes de ssDNA la proteína RPA protege esas regiones. RPA es otra proteína que participa en la constitución del replisoma, ésta estabiliza las cadenas de ssDNA separadas mediante su unión competitiva a este, pues se une a las hebras cuyas uniones entre bases nitrogenadas han sido rotas, manteniéndolas separadas e impidiendo que se vuelva a unir prematuramente, además de que protege a esas cadenas de la actividad de endonucleasas. Se ha visto que Mcm10 participa en la estabilización de ssDNA antes de reclutar a RPA junto con el factor de cohesión Ctf4 (O'Donnell y Li, 2016; Yao y O'Donnell, 2016; Ravoitytè y Wellinger, 2017; Yurieva y O'Donnell, 2016).

Adicionalmente las células contienen una enzima que participa en la replicación del DNA y conforma el replisoma para replicar simultáneamente la dos cadenas del DNA; la primasa, una proteína con acción RNA polimerasa que sintetiza los cebadores de RNA necesarios para iniciar la replicación, DNA Pol α también puede actuar como primasa, esta actividad está contenida en un heterodímero donde su subunidad pequeña va añadiendo un primer de aproximadamente 12 nt de RNA, mientras que su subunidad grande extiende esa cadena a 25 – 40 nt para formar un híbrido RNA/DNA; es por eso que su actividad de RNA Pol es la principal para empezar a formar el primer pues los rNTPs se encuentran 10 – 100 veces más en la célula que los dNTPs. La baja fidelidad de las primasas RNA (tasa de error del 1%) permiten que los primers sean identificados y los errores corregidos por enzimas que escinden el RNA y lo remplazan con DNA; como ocurre con los fragmentos de Okazaki. Pol α consiste de 4 subunidades, la subunidad más grande, Pol1, contiene la actividad de DNA polimerasa así como el CTD; la segunda subunidad más grande, Pol2 y

las dos subunidades más pequeñas Prl1 y Prl2 son las que poseen la actividad de primasa. Esta enzima se asocia con CMG, junto con otras proteínas incluyendo Ctf4, topoisomerasa I, Mcm10 y FACT. Ctf4 es un homotrímero, donde cada subunidad está compuesto por una mitad CTD y otra NTD conectadas por un enlazador flexible; esta proteína se une a Pol α o a GINS para así unirse al complejo CMG y formar parte de la maquinaria de replicación creando un puente entre la Pol α y CMG para que exista interacción entre ellas (Figura 48a). Análogo a la actividad de PCNA, Ctf4 recluta varios factores a la horquilla de replicación. También se ha visto que Ctf4 favorece la unión de la Pol ϵ a la maquinaria replicativa formando un complejo CMGE (Ctf4 – CMG – Pol ϵ) (Figura 48b) (O'Donnell y Li, 2016; Sun et.al. 2015; Baxley y Bielinsky, 2016; Pellegrini y Costa, 2016; Yao y O'Donnell, 2016; Yao y O'Donnell, 2015; Yurieva y O'Donnell, 2016).

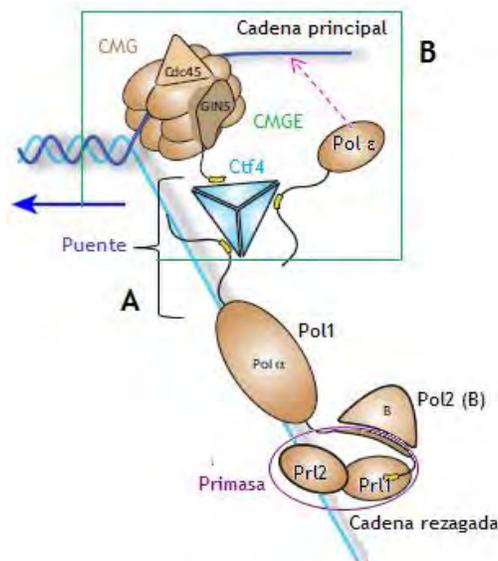


Figura 48. Función de Ctf4 en el replisoma. (A) Ctf4 crea un puente entre Pol α y CMG, el óvalo morado indica las subunidades de Pol α con actividad primasa. (B) Forma el complejo CMGE al reclutar a la Pol ϵ en la cadena principal sobre la cual actúa. La flecha azul indica la dirección en que se irán abriendo las cadenas del DNA (Modificada de Sun et.al. 2015; O'Donnell y Li, 2016; Pellegrini y Costa, 2016).

10.1.5 Replisoma eucariota

Las proteínas de replicación, que conforman el replisoma, trabajan juntas mientras éste va replicando ambas cadenas del DNA al mismo tiempo. Estudios recientes muestran que el contacto polimerasa (Pol δ/ϵ) – helicasa (Complejo CMG) es requerido para la síntesis de la cadena principal, y que la energía que se libera por la incorporación de dNTPs genera un empujón extra para que la helicasa trabaje. Los primers de RNA producidos por la primasa actúan estocásticamente entrando y saliendo del replisoma, por lo que no conforman esta estructura al 100%. Aunque la arquitectura del replisoma eucariota no está bien dilucidada, muchos estudios avalan la función de las proteínas antes mencionadas y por lo tanto se puede hablar de que conforman su estructura (Figura 49). Se ha visto que la Pol ϵ actúa sobre la cadena principal mientras que Pol δ sobre la rezagada, y que CMG forma una unidad central de organización que es referida como RPC. A parte de CMG, el complejo RPC abarca las proteínas Ctf4, Pol α , Pol ϵ , Mcm10, Tof1, Csm3, Mrc1 y FACT; sabiendo exactamente la función de la CMG y las polimerasas, sin embargo, en la mayoría de las demás proteínas de RPC se desconoce la función/actividad en el replisoma, lo único que se puede exponer es que Mcm10 es esencial para la replicación pues favorece la unión la Pol α , y que Ctf4 crea el puente Pol α – CMG, así como ayuda a formar el complejo CMGE. A diferencia del replisoma bacteriano, no hay evidencia que RFC forme parte del RPC, ya que este se disocia después de anclar a la PCNA (Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Yao y O'Donnell, 2015; Yao y O'Donnell, 2016).

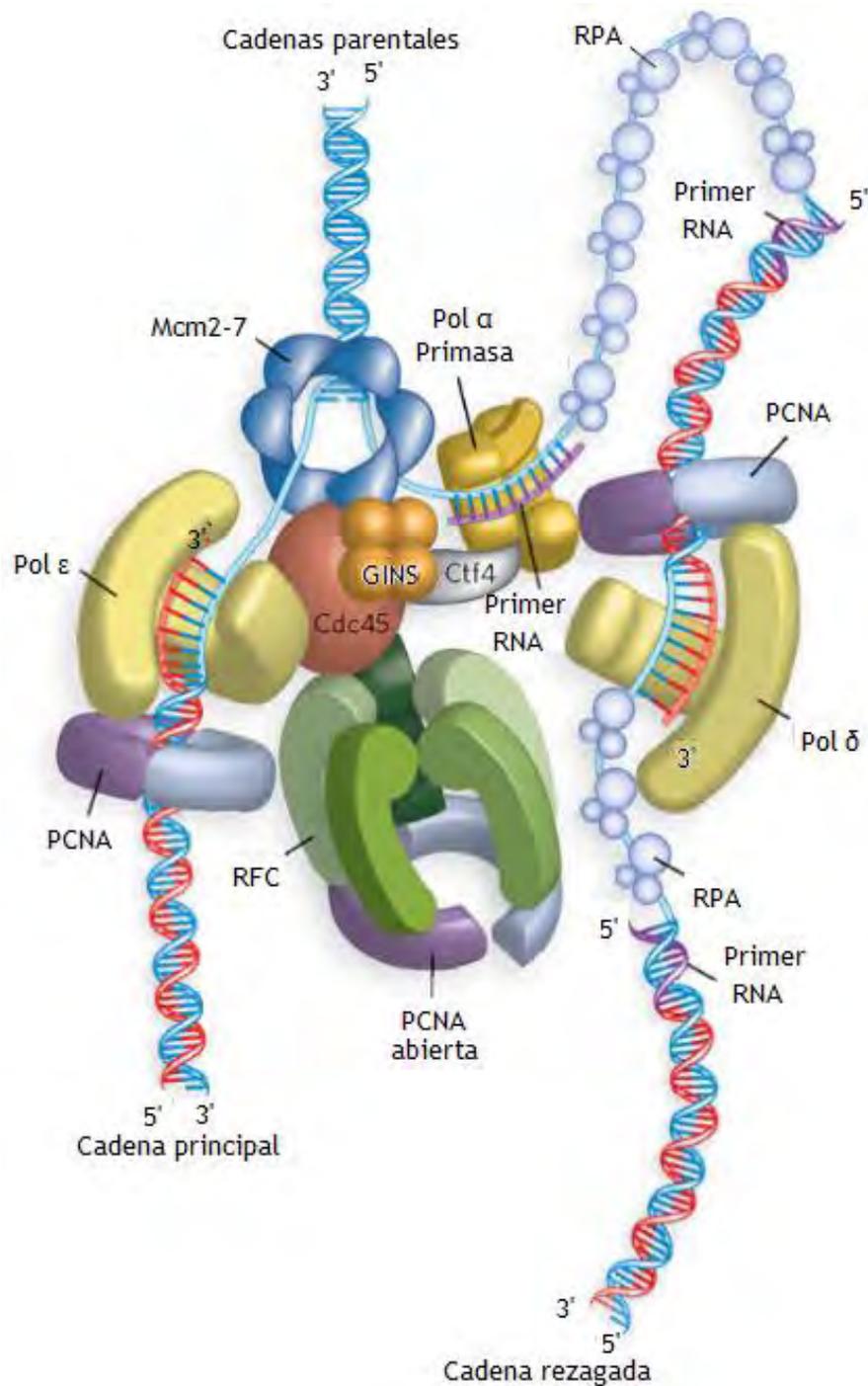


Figura 49. Estructura clásica del replisoma eucariota y sus componentes (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012; Yao y O'Donnell, 2015; Yao y O'Donnell, 2016).

10.1.6 Enzimas adicionales involucradas en la replicación eucariota

Existen otras proteínas que no son consideradas dentro del replisoma, pero que también están involucradas en la replicación del material genético y ayudan a completar el proceso, que se ven implicadas en la maduración de los fragmentos de Okazaki (Figura 50). En la cadena rezagada los fragmentos de Okazaki en células eucariotas se componen de 100 – 200 nt, esta longitud abarca el primer y la cadena sintetizada, dejando espacios de 1 – 3 nt entre cada fragmento. Para formar una cadena continua, los primers de RNA eventualmente deben ser removidos de los fragmentos de Okazaki y remplazados con DNA. Los fragmentos son removidos por acción de la proteína RNasa H, una enzima con actividad nucleasa que cataliza la hidrólisis de RNA, es decir, una enzima que escinde el RNA de los híbridos RNA/DNA de estos fragmentos; en células eucariotas esta enzima es más grande y compleja a comparación de las procariontas y presenta 2 tipos (Bubeck et.al., 2011; Cerritelli y Crouch, 2009; Choe y Moldovan, 2017).

La RNasa H1 posee un HBD, un dominio que le confiere procesividad y afinidad por el sustrato (primer RNA) donde se lleva a cabo la escisión del primer en dirección 3'→5'. Esta requiere que al menos el fragmento que va a cortar esté compuesto de 4 pb y que se haya formado previamente una solapa del primer de RNA. La solapa se forma cuando la PCNA ayuda a la Pol δ para que ésta se desplace parcialmente sobre la cadena rezagada y se vaya elongando hasta el extremo 5' del primer del siguiente fragmento de Okazaki, donde lo va empujando creando la solapa de RNA, que por hidrólisis de la RNasa H1 es removida. Mientras que la RNasa H2 se compone de tres dominios: la subunidad catalítica 2A y las subunidades estructurales 2B y 2C; la subunidad 2B media la interacción proteína – proteína entre la RNasa H2 y la PCNA, aunque la principal proteína que actúa es la RNasa H1. Cabe mencionar que esta proteína no es capaz de escindir el extremo 5' del primer (solapa) por lo que se necesita de otras proteínas para la eliminación total del primer de RNA (Bubeck et.al., 2011; Cerritelli y Crouch, 2009; Choe y Moldovan, 2017).

Un mecanismo complementario para que se dé la escisión del primer, es cuando la PCNA de igual manera, recluta a la proteína FEN1, una endonucleasa que remueve el extremo 5' del primer restante del fragmento de Okazaki, escindiendo el extremo de la solapa (Figura 50). FEN1 tiene como cofactor a la proteína Dna2, que está involucrada en procesar los fragmentos de Okazaki, pues es la encargada de cortar los fragmentos que se escaparon de la escisión de FEN1, ya que de igual manera posee actividad

endonucleasa. La Dna2 es reclutada por RPA que protege al extremo 3' de la cadena de DNA evitando que sea removida. Una vez eliminado el primer, la Pol δ continua polimerizando la cadena hasta encontrarse con el extremo 3' OH del nucleótido del siguiente fragmento de Okazaki, pero no es capaz de unir los nucleótidos dejando un hueco entre ellos (Bubeck et.al., 2011; Zhou, Pourmal y Pavletich, 2015; Yao y O'Donnell, 2016).

Para esto, PCNA es capaz de reclutar a la DNA ligasa I, una enzima que eventualmente sella estos espacios unos con otros, ya que forma enlaces fosfodiéster entre el extremo fosfato 5' del nucleótido previo con un grupo OH 3' del adyacente para unir los fragmentos de Okazaki de la hebra rezagada dándole continuidad a la cadena (Figura 50) (Bubeck et.al., 2011). Ambas enzimas, FEN 1 y ligasa I, interactúan con PCNA para activar sus funciones y así promueven la maduración de fragmento de Okazaki. Debido a que PCNA se une al primer, esta proteína se empieza a acumular en la cadena rezagada, por lo que necesita de un complejo tipo RFC para descargarla; como ya se había mencionado, este complejo se compone de Elg1 – RFC que sustituye la subunidad catalítica de RFC1 y es sumamente importante para remover la PCNA del DNA, pues si no resultaría en defectos en reparación del DNA e inestabilidad cromosómica; indicando así, que la presencia de PCNA en las fases G2/M del ciclo celular resultan tóxicas para la célula (Yao y O'Donnell, 2015; Choe y Moldovan, 2017; Yao y O'Donnell, 2016).

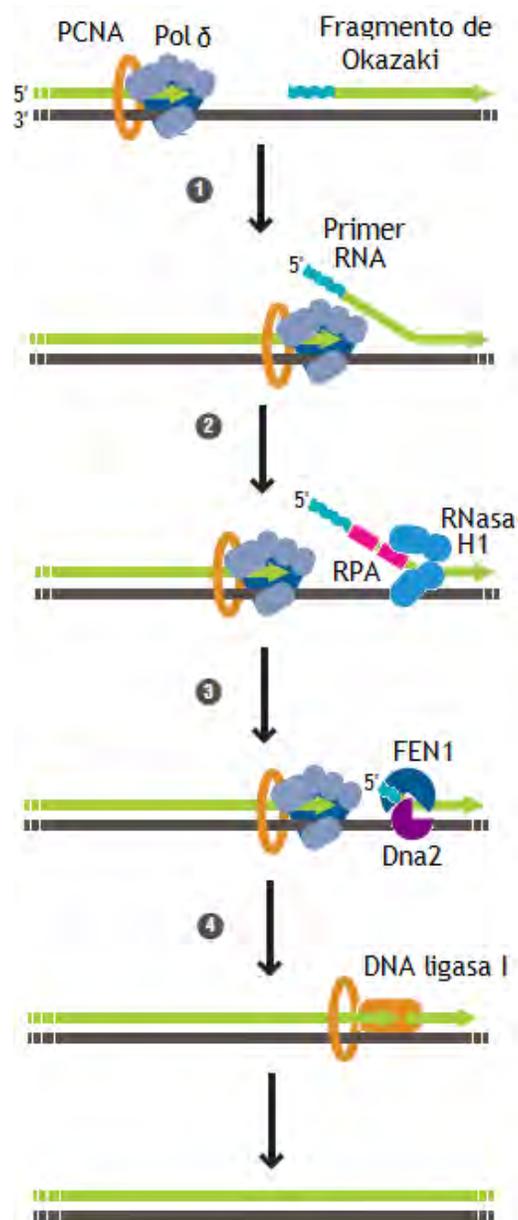


Figura 50. Mecanismo de escisión del cebador en eucariontes, maduración de los fragmentos de Okazaki. (1) La Pol δ va desplazando el fragmento de Okazaki para formar la solapa. (2) Se asocia RPA para proteger la cadena de DNA, en donde la RNasa H1 actúa dejando el extremo 5'. (3) FEN1 y Dna2 eliminan ese extremo. (4) La Pol δ continúa la síntesis dejando un hueco que la DNA ligasa I cierra para formar una cadena continua (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015; Bubeck et.al., 2011; Choe y Moldovan, 2017).

El replisoma es un mecanismo molecular complejo que lleva a cabo la replicación del DNA y comprende varios sub-componentes (proteínas) que cada uno realiza una función específica durante el proceso. Como se observa en la tabla 9 se resume la función y

características de todas las proteínas antes mencionadas que conforman esta maquinaria replicativa y están involucradas en la horquilla de replicación.

Tabla 9. Proteínas involucradas en la replicación eucariota (Modificada de Parker, Botchan y Berger, 2017; Musialek y Rybaczek, 2015; Yao y O'Donnell, 2015; Yao y O'Donnell, 2016; Cox, Doudna y O'Donnell, 2012).

Proteína	Número de subunidades	Función	Complejo que forma
ORC	6	Iniciador	Complejo pre-replicación (preRC)
Cdc6	1	Catalizan la formación CMG	
Cdt1	1		
Mcm2-7	6	Helicasa	
S-CDK	1	Fosforilan para activar y estabilizar el complejo CMG	Complejo replicativo (RC)
DDK	1		
Mcm2-7	6	Helicasa	
Polα	4	Primasa	
Polδ	3-4	Replicasa	
Polϵ	4	Replicasa	
PCNA	3	Abrazadera deslizante	
RFC	5	Cargador de la abrazadera	
RPA	3	Proteína tipo SSB	
Cdc45	1	Cargan la DNA polimerasa al ORC y forman el complejo CMG (helicasa activa y funcional)	
GIN5	4		
Sld2	1		
Sld3	1		
Dpb11	1		
Mcm10	1		
DNA ligasa I	1	Sella los fragmentos de Okazaki	
FEN1	1	Remueve primers RNA	
Dna2	1	Procesa los fragmentos de Okazaki	
Topoisomerasa I	1	Desenrolla la doble hélice	
Topoisomerasa II	2		

Como podemos ver, la creación de nuevo DNA a partir de una molécula parental depende de la acción del replisoma, un complejo multiproteico dinámico que emplea funcionalidades de desenrollamiento (helicasa) y síntesis del DNA (primasa/polimerasa),

acopladas a varios factores de procesividad (abrazadera deslizante y cargador de la abrazadera), protección (proteínas de unión a ssDNA) y anclaje del DNA.

10.1.7 Origen de replicación

La replicación tanto para organismos eucariontes como procariontes inicia en un punto denominado origen de replicación. El origen de replicación (RO) se compone de secuencias particulares en el genoma en donde la replicación del DNA se inicia y parte bidireccionalmente, esta abarca de 150 – 200 pb y contiene cuatro componentes altamente conservados, secuencia A, secuencia B1, B2 y B3; estos elementos sirven como señal de inicio al lugar donde se unirán todas las proteínas replicativas previamente mencionadas. La estructura específica del origen de replicación varía entre especies; pero en su arquitectura comparten un dominio con promotores que poseen actividad AAA+ y un CTD acoplado a WH, ambos interactúan con regiones de origen en el DNA. En células eucariotas existen múltiples orígenes de replicación (multifocal) (Figura 51) debido a que es necesario generar rápidamente copias del genoma, por lo que estos están distribuidos a lo largo de cada cromosoma. En humanos se encuentran 5×10^4 orígenes de replicación distribuidos a lo largo de 23 cromosomas para duplicar un genoma de 6×10^9 pb; obteniéndose un replicón, que es el DNA que se replica a partir de un origen de replicación específico (Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Musialek y Rybaczek, 2015; Ravoitytè y Willinger, 2017; Parker, Botchan y Berger, 2017).

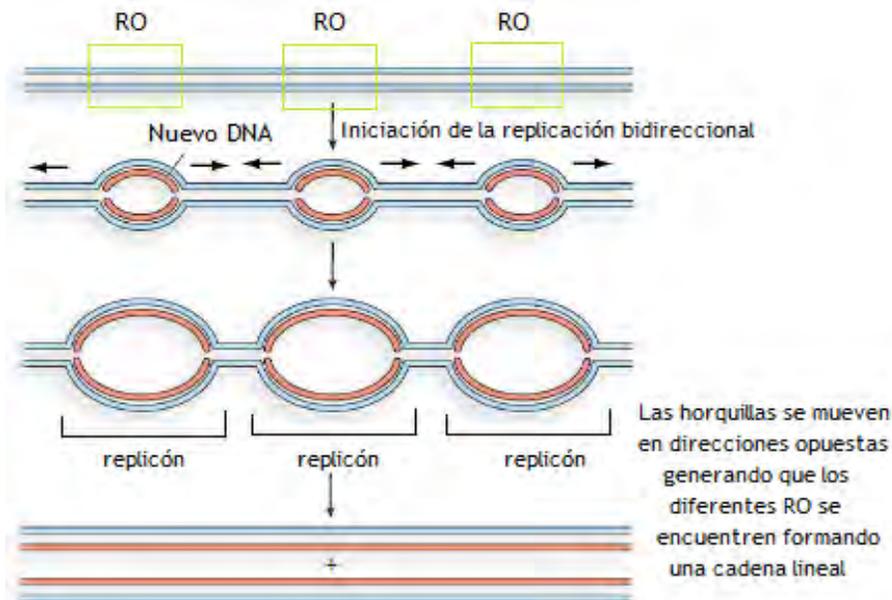


Figura 51. Origen de replicación en eucariontes (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012).

Para reconocer esas secuencias, en células eucariotas se usa un complejo proteico de seis subunidades determinado ORC (Figura 52), donde 5 subunidades (Orc 1 – 5) poseen la capacidad AAA+/WH, este elemento tiene actividades auxiliares que facilitan el reconocimiento del sitio de origen, el reclutamiento de helicasa y la iniciación de interacciones con las proteínas replicativas. La subunidad Orc1 posee actividad ATPasa, Orc4 y Orc5 tienen la capacidad de unirse a ATP pero no parecen hidrolizarlo, Orc 2 y Orc3 se asocian a los nucleótidos. ORC es una proteína de iniciación que primordialmente permite reconocer las secuencias del origen de replicación para el ensamblaje de la helicasa, la formación del preRC. Como se sabe, el ensamblaje de la Mcm2-7 a ORC requiere de proteínas accesorias como Cdc6 y Cd1t para que ocurra, integrándolas dentro del preRC. Así el origen de replicación se une al preRC para empezar a desenrollar el DNA (Ravoitytè y Wellinger, 2017; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Parker, Botchan y Berger, 2017; Musialek y Rybaczek, 2015).

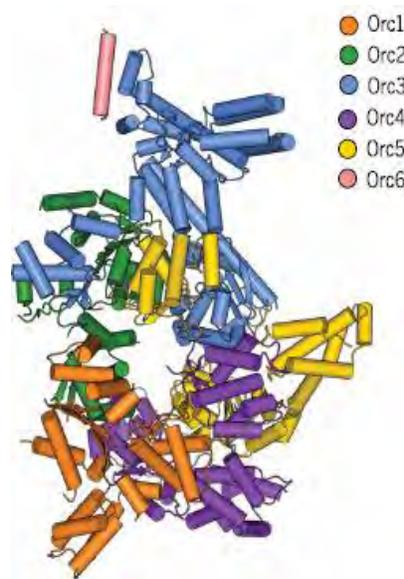


Figura 52. Estructura de los dominios de ORC (Bleichert, Botchan y Berger, 2017).

El ensamblaje de ORC es la respuesta primordial para la iniciación de la replicación, donde sus 5 subunidades con AAA+ forman un anillo con hendidura para que la subunidad Orc6 se pliegue en dirección a la molécula, así el anillo rodea al DNA usando su actividad AAA+/WH. Existe evidencia de que ORC se une primero al DNA antes de formar el complejo preRC, esto lo hace gracias a que Orc1 también tiene la capacidad de acoplarse al DNA y la cromatina (BAH), Orc6 posee TFIIB, un factor de transcripción del nucleosoma y Orc4 es capaz de reconocer repeticiones de AT (Figura 53), una secuencia

rica en adenina/timina que es fácil de romper sus puentes de hidrógeno pues solo presenta dos enlaces (Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Parker, Botchan y Berger, 2017; Ravoitytè y Wellinger, 2017).

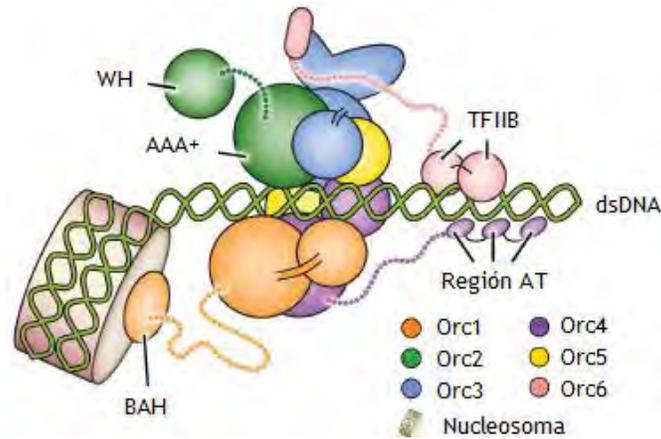


Figura 53. ORC eucariota (Modificada de Bleichert, Botchan y Berger, 2017).

El ensamblaje de pre-RC debe ocurrir antes de la fase S del ciclo celular; posterior a la unión al DNA, ORC, Cdc6 y Cdt1 anclan a Mcm2-7 al complejo, todo este mecanismo ocurre durante la fase G1; y ya en la fase S, la actividad de Mcm2-7 se completa al formar el complejo CMG, como se mencionó previamente el mecanismo conlleva a formar el RC (Figura 54). Finalmente cabe mencionar que cada RO generará una horquilla de replicación, pues cada uno es un punto unión del ORC generando un replicón, teniéndose que el replicón máximo que se genera de un solo ORC en humanos es de aproximadamente 5 Mb (Figura 51) (Parker, Botchan y Berger, 2017; Ravoitytè y Wellinger, 2017; Musialek y Rybaczek, 2015; Bleichert, Botchan y Berger, 2017).

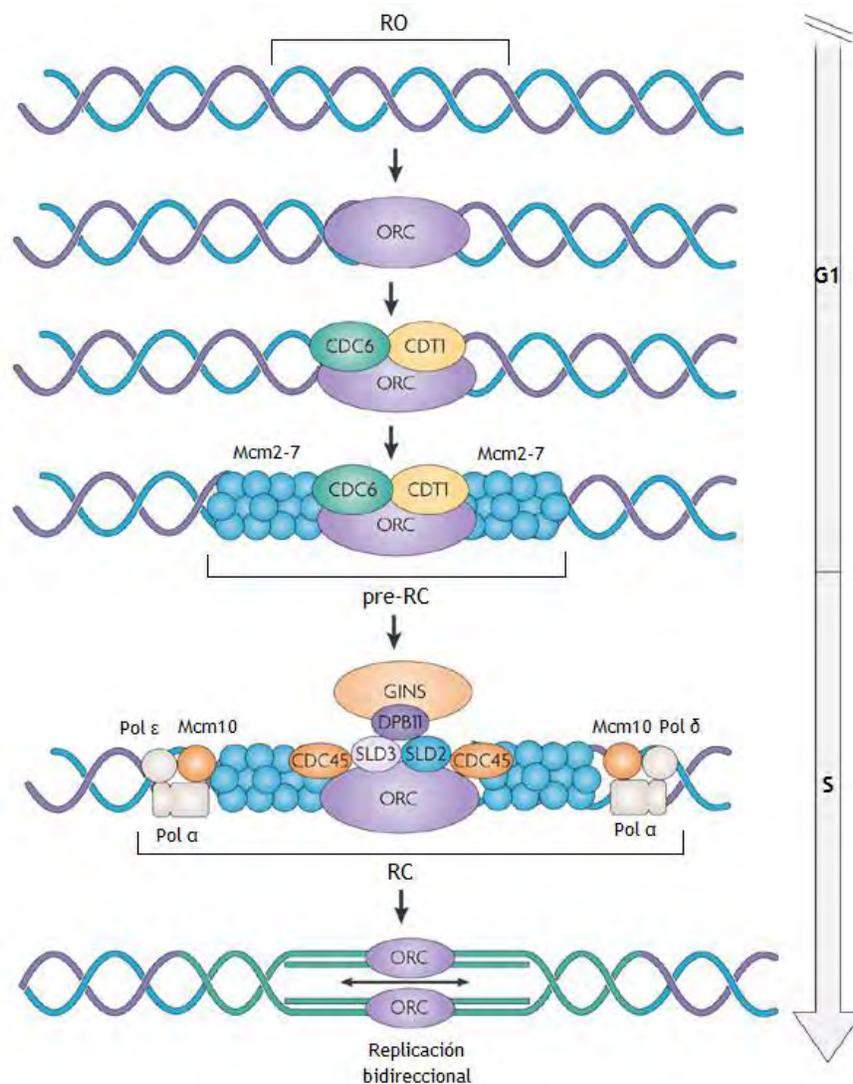


Figura 54. Ensamblaje de preRC y RC (Modificada de Parker, Botchan y Berger, 2017).

10.1.8 Etapas de la replicación eucariota

Los pasos requeridos para la replicación son 6: reconocimiento del RO, montaje de preRC, activación de helicasa (RC), formación y cargado del replisoma, replicación y terminación de la replicación; estos se pueden dividir en cinco etapas que garantizan que la replicación del DNA sólo ocurra una vez, las tres primeras ya han sido previamente descritas, pero a manera de resumen se tiene que:

i. *Pre-iniciación*

Durante la etapa de pre-iniciación se produce la unión de ORC a RO, esta etapa es conocida como la selección del replicador, un proceso que consiste en identificar las

secuencias que dirigirán la iniciación de la replicación y que se producirán en la fase G1. Esta etapa está mediada por la formación de los pre-RC; el primer paso implica el reconocimiento del replicador (secuencia) por ORC, una vez unida recluta a las proteínas Cdc6 y Cdt1, proteínas de carga que reclutan a Mcm2-7. Hasta este punto abarca la formación del pre-RC y este no conduce al desenrollamiento inmediato del DNA, es exclusivo de formación durante G1 y precede a la activación de la helicasa y reclutamiento de las DNA polimerasas (Figura 55a).

ii. *Iniciación*

En esta etapa pre-RC se activa para reclutar las dos proteínas CDK y DDK que catalizan la formación del complejo activo de la helicasa CMG (fosforilan Cdc45 y GINS), la fosforilación de estas proteínas da como resultado el ensamblaje de CMG para empezar a abrir las cadenas, cuando se tiene ssDNA la proteína RPA actúa principalmente como molécula protectora, aunque también posteriormente facilita el acceso de las polimerasas (Pol $\alpha/\delta/\epsilon$). Este acceso se da por las proteínas Sld2/3, Dpb11, Ctf4, PCNA, RFC, donde las polimerasas se reúnen en el RO en un orden particular iniciando con las Pol δ y Pol ϵ , seguido de la Pol α ; ya que esta última sintetiza el primer necesario para la activación de las polimerasas replicasas y así dar inicio a la replicación; facilitando la formación del RC (horquilla replicativa) y activación del replisoma. La acoplación de todas estas proteínas ocurre en la fase S (Figura 55b).

iii. *Elongación*

La elongación abarca desde la etapa de la unión primer – plantilla en donde PCNA y RFC ensamblan las polimerasas replicativas, hasta la síntesis de las cadenas principal y rezagada (Figura 55c). En el caso de la cadena rezagada, también abarca la maduración de los fragmentos de Okazaki en donde se necesita de escindir el primer de RNA por las enzimas RNasa H1, FEN1, Dna2 y así, la DNA ligasa I completarlas. Esta etapa también se da en la fase S (Figura 55d).

iv. *Terminación*

Esta etapa se caracteriza cuando las horquillas de replicación se encuentran entre sí, y se produce la terminación, lo que resultará en la formación de dos dsDNA. La terminación de la replicación se da cuando el complejo CMGE pasó a lo largo de toda la cadena rezagada y converge con la horquilla de la cadena principal, haciendo que el dsDNA

(replicado) se ligue, lo que conlleva al desmantelamiento del replisoma; pero al presentar RO multifocales se genera un problema indicando que la conversión entre replisomas se da de manera des-sincronizada creando múltiples eventos de terminación. Sin embargo, estudios recientes revelaron que las horquillas de replicación convergentes pasan de unas a otras sin obstáculos y se disocian solamente después de que el dsDNA se ligó y desencadenó. La disociación de CMGE se da empezando por la Pol ϵ , pues al no haber primer presente ésta no puede actuar y se separa, de igual manera ocurre con Pol δ . CMG necesita ser ubiquitinizada en Mcm7 para que se disocie el complejo del dsDNA, esto se logra por medio de la ubiquitina E3 ligasa que no degrada la proteína, sino que modifica su actividad AAA+; favorecida por el reclutamiento de p97/VCP hacia la cromatina se libera el complejo. Por medio de espectrofotometría de masas, se reveló que la ligasa E3 se compone de un dominio CRL2^{LRR1} que le confiere su actividad de ubiquitina además de ser un sitio de unión al DNA (Figura 55d) (Akopian y Rape, 2017).

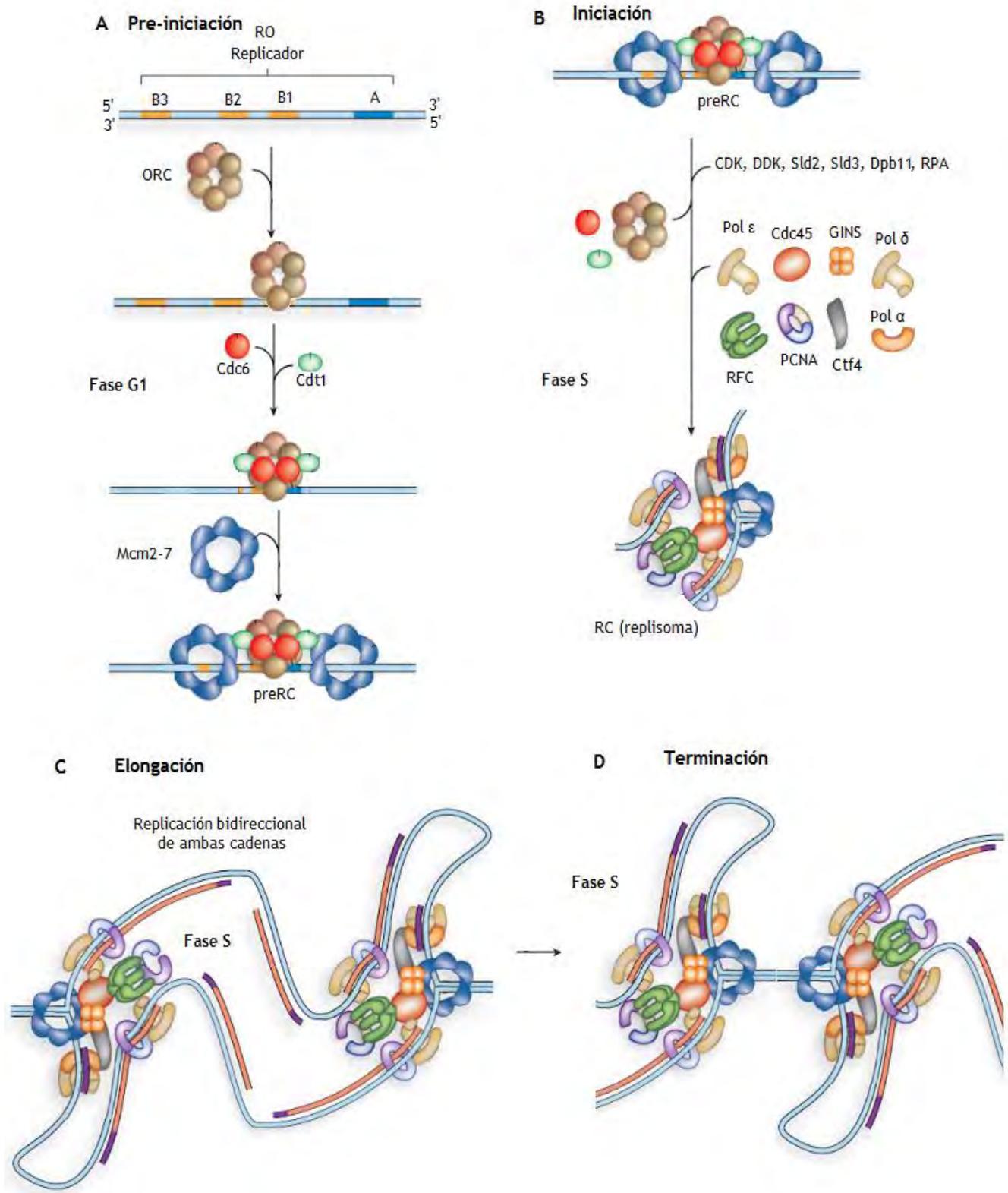


Figura 55. Fases de la replicación en eucariontes (Modificada de Cox, Doudna, O'Donnell, 2012).

v. *Replicación de telómeros*

A pesar de que la replicación terminó al encontrarse las horquilla replicativas, el extremo 5' de la parte telomérica del DNA recién sintetizado tiene una hebra de DNA más corta que la hebra madre molde; esta escasez es debido a la acción de la enzima telomerasa. La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico que posee una subunidad TERT, una subunidad polimerasa y una subunidad RNA telomerasa. La RNA telomerasa contiene una secuencia para la síntesis de telómeros y tiene una función estructural muy importante, pues actúa como marco estructural para la formación de la enzima activa; también se ve involucrada en la formación del centro activo de la telomerasa promoviendo la adición de nucleótidos durante la síntesis de repetidos teloméricos, pero requiere de factores proteicos adicionales para su estabilización, adición de nt correcta, regulación de actividad enzimática, localización y transporte dentro de la célula. Su estructura se compone de una región "plantilla de nt" que sirve como modelo para la síntesis de telómeros; un pseudo-grupo está involucrado en posicionar esta región en el sitio activo de la enzima, y juntos interactúan con elementos STE que a su vez interactúan con el dominio TERT; mientras que el extremo 3' asegura la estabilidad de la RNA telomerasa (motivo H/ACA). La RNA telomerasa madura humana (hTR) consiste de 451 nt, en donde su extremo 3' forma una estructura similar las estructuras en la familia de RNA H/ACA; esta estructura consiste en dos horquillas conectadas por un puente (caja H) que contiene un motivo 5'-ACA-3' localizado 3 nt antes del extremo 3' de hTR, y otro puente conformado por ACA al que se le asocian las proteínas NHP2, NOP 10, NAF1 y GAR1; todas estas proteínas le confieren estabilidad a la RNA telomerasa y previenen su degradación por exomas. Las horquillas están conformadas por la caja CAB, el sitio de interacción telómero – telomerasa y la caja BIO que cataliza la adición de nt; y el complejo Cr4/CR5 le confiere su actividad TERT (Figura 56) (Wu et.al., 2017; Rubtsova et.al. 2016).

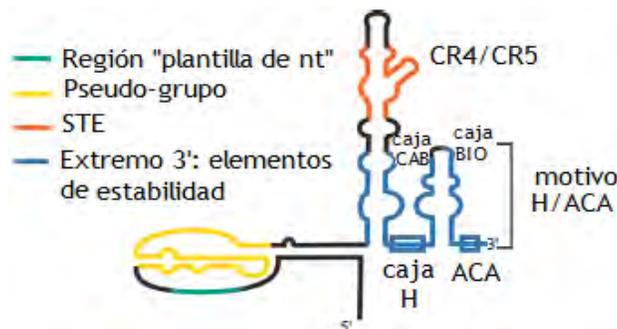


Figura 56. Estructura de la RNA telomerasa (Modificada de Rubtsova et.al., 2016).

Debido a que las DNA polimerasas solo pueden actuar en dirección 5'→3', no son capaces de copiar el extremo 5' de una cadena lineal. Los extremos de los cromosomas presentan un problema especial para el proceso de replicación, ya que en la hebra principal la adición de polinucleótidos durante la replicación puede extenderse siempre hasta el extremo porque el primer es añadido por atrás. Sin embargo, en la cadena rezagada, en el extremo 5' se presenta un punto en el que sin primer la polimerasa no puede funcionar, creando una sección no polimerizada y un cromosoma acortado sería el resultado. Para resolver este problema, los telómeros tienen repeticiones adyacentes de secuencias de DNA simples (en humanos: TTAGGG) que no codifican para ningún RNA o proteína pero tienen una función definida en la replicación que es completar la cadena. Así, la enzima telomerasa es capaz de mantener los telómeros catalizando su síntesis en ausencia de una plantilla de DNA, pues agrega estas unidades de repetición simples a la cadena; ésta posee su propia plantilla de RNA que es complementaria a la secuencia telomérica y va añadiendo nt al extremo 3' (Figura 57); y así, la cadena complementaria puede ser sintetizada por Pol α usando un primer convencional de RNA (Rubtsova et.al. 2016; Pfeiffer y Lingner, 2013; Wu et.al., 2017).

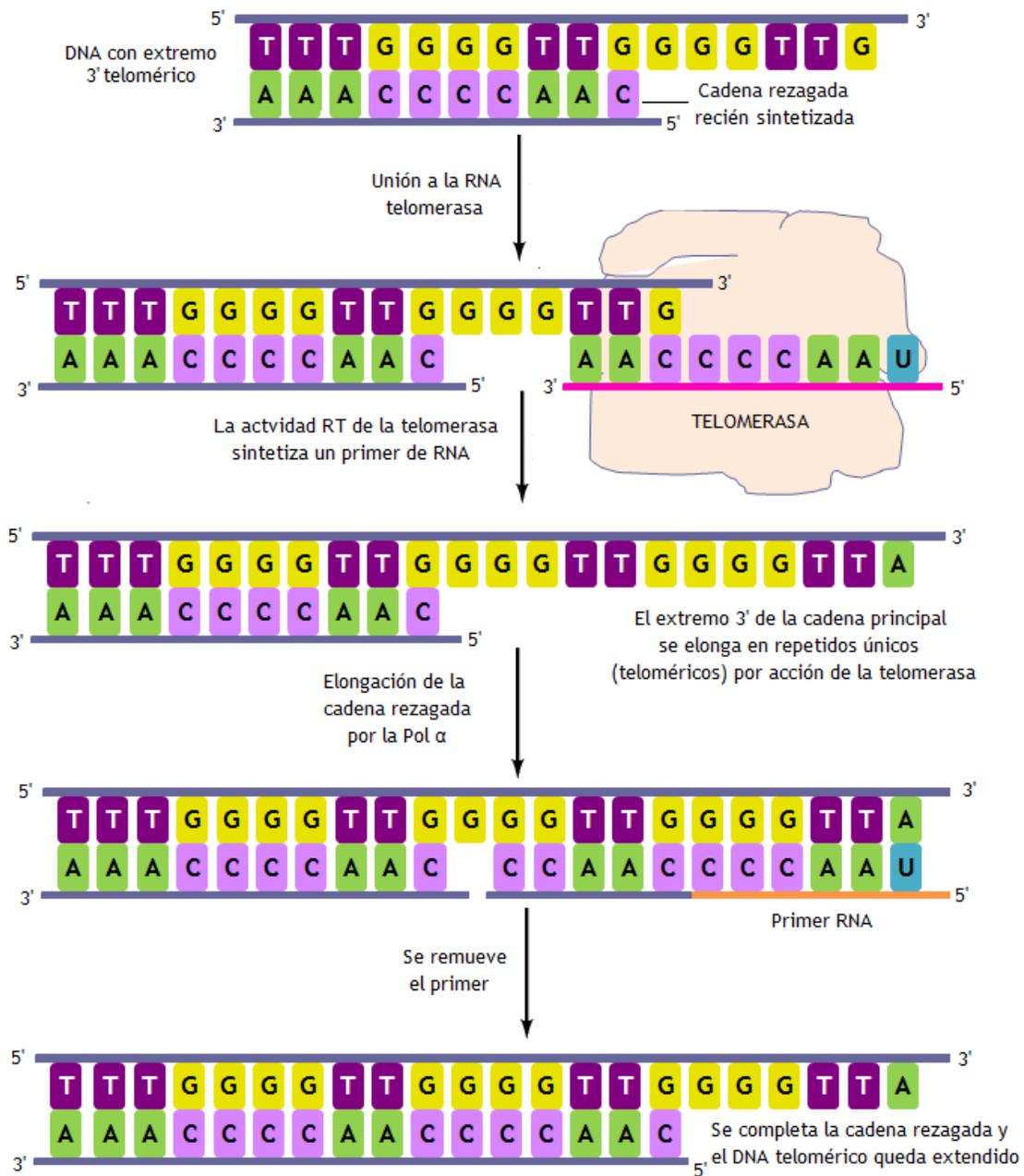


Figura 57. Mecanismo de acción de telomerasa (Autor, 2017).

10.2 Replicación Procariota

A diferencia de las células eucariotas, en organismos procariontes la maquinaria replicativa es mucho más sencilla aunque aun así requiere de la acción coordinada de diferentes tipos de proteínas para realizar el proceso. El replisoma procarionte fue descrito y está representado en el sistema de *E. coli*, y se compone de proteínas con acción similar a las encontradas en el replisoma eucarionte. Aquí se describirán las características y funciones de las proteínas que componen la maquinaria de replicación procariota, haciendo comparaciones con las de organismos más complejos.

10.2.1 DNA polimerasa

La primera proteína esencial para este proceso, la polimerasa, donde a diferencia de los organismos eucariontes la polimerasa presenta 3 subtipos con diferente actividad y función, como se observa en la tabla 10. Donde la DNA polimerasa I se encarga de la reparación y replicación del DNA y también posee actividad exonucleasa pero en dirección 5'→3', la DNA polimerasa II está exclusivamente involucrada en reparación y la DNA polimerasa III está implicada en la síntesis de DNA, siendo la polimerasa replicativa. Pol III es la responsable de replicar el cromosoma procariota y su núcleo activo se conforma por un heterodímero que contiene una subunidad α , una ϵ y una θ en cada dímero (Figura 58a); en donde su actividad de polimerasa se encuentra en la subunidad α , la subunidad ϵ posee la actividad 3' exonucleasa y el papel que juega la subunidad θ aún no está completamente descrito. Por medio de cristalografía se ha podido determinar la estructura de la subunidad Pol III y ha revelado la presencia de un dominio PHP con función desconocida, aunque se cree que la función del dominio PHP es que actúa como una pirofosfatasa, eliminando el subproducto de la síntesis de DNA con el fin de dirigir la reacción de polimerización en la dirección correcta de síntesis de DNA 5'→3'. La estructura de la proteína total se adapta a la organización de los dominios clásicos: palma, pulgar y dedos precediendo el dominio PHP (Figura 58b), esto se ha visto en estudios recientes que muestran que los sitios activos de las Pol I, II y III están estructuralmente relacionadas con la DNA Pol β de eucariontes (Dohrmann et.al., 2016; Barros et.al., 2013).

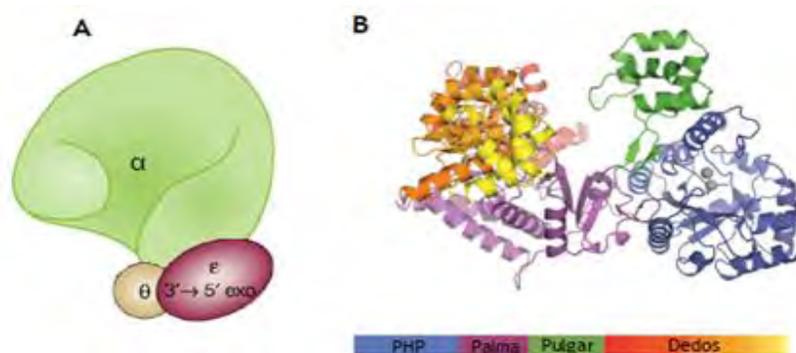


Figura 58. Estructura de la Pol III. (A) Se presentan las 3 subunidades del heterodímero. (B) Se presenta la estructura clásica de una polimerasa, incluyendo su dominio PHP (Modificada de Dohrmann et.al., 2016; Barros et.al., 2013).

Tabla 10. DNA polimerasas en procariontes (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012; Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Característica	POLIMERASA		
	I	II	III
Actividades enzimáticas:			
Primasa (inicio)	No	No	No
Polimerasa 5'→3' (elongación)	Si	Si	Si
3' Exonucleasa 3'→5' (corrección de pruebas)	Si	Si	Si
5' Exonucleasa 5'→3' (eliminación de primers)	Si	No	No
Función en la célula:			
Replicación (síntesis continuada de cadenas nuevas, principal y rezagada)	No	No	Si
Empalme de fragmentos de Okazaki	Si	No	No
Velocidad de replicación:			
Velocidad de polimerización (nt/seg)	16 – 20	2 – 7	250 – 2 000
Procesividad (nt añadidos antes de su disociación)	Baja 3 – 200	Media >10 000	Muy alta >5 x 105

10.2.2 Abrazadera deslizante

Al igual que eucariontes, la Pol III necesita ser parte un complejo holoenzimático (Pol III HE) para completar su función replicando tanto la cadena principal como la rezagada, siendo sus subunidades las que forman parte de su estructura. Pol III HE (Figura 60) se

compone de 10 subunidades clásicas: α , la subunidad catalítica de la polimerasa, ϵ la subunidad con actividad 3' exonucleasa y θ que son las tres subunidades que comprenden el núcleo de la Pol III y hay 2 presentes en cada Pol III HE. La asociación de α y ϵ incrementa la eficiencia catalítica de cada polipéptido, aumentando la incorporación de la subunidad β . β actúa como abrazadera deslizante efectuando la función de la PCNA (en eucariontes), encontrándose una subunidad β en cada núcleo Pol III. La principal diferencia entre PCNA y β es que cada subunidad de β está compuesta de tres dominios, y se dimeriza para formar un anillo de seis dominios. Tanto β como PCNA están incluidas en la horquilla replicativa y ambas tienen homología de secuencia (Figura 59), donde el lado lateral de la abrazadera es relativamente delgada y tiene dos caras distintivas (la cara C y la cara N). La abrazadera β se ensambla en el DNA por una de sus subunidades que utiliza ATP para abrir y cerrar la abrazadera. Después de anclarse al DNA, la pinza de β puede difundirse a través del ssDNA y así unirse a la Pol III para formar parte del complejo Pol III HE (Dohrmann et.al., 2016; Glover y McHenry, 2010; Marians et.al., 2008; Yao y O'Donnell, 2016).

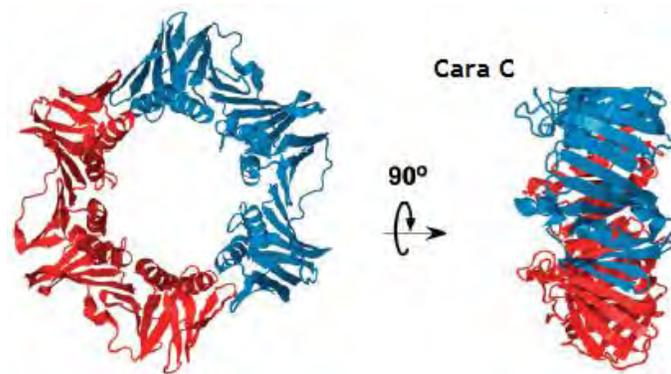


Figura 59. Estructura de la subunidad β , abrazadera deslizante. La estructura de la izquierda es la cara frontal de la proteína y la de la derecha es la cara lateral; se observa cómo es casi idéntica la estructura de PCNA (Figura 42) (Modificada de Yao y O'Donnell, 2016).

10.2.3 Cargador de la abrazadera

A estas subunidades (α , ϵ , θ , β) se le ensambla la proteína DnaX, que cumple la función de ser el cargador de la abrazadera, como el RFC en células eucariotas y anclar la subunidad β al complejo. DnaX es un complejo compuesto de seis subunidades organizadas como $\tau_2\gamma_2\delta\delta'X\psi$: dos subunidades τ con dominios CTD que sobresalen de la estructura para unirse al núcleo de la Pol III por medio de la interacción con α , también interactúa con la proteína DnaB en la horquilla de replicación favoreciendo su rápido desplazamiento; dos subunidades γ que están involucrados en el anclaje de la subunidad

β al DNA; una δ , una δ' , una X y una Ψ ; estas últimas 4 subunidades son idénticas y son llamadas Tau, contienen una extensión CTD de 24 kDa que une de dos a tres moléculas de núcleo Pol III a cada cargador de abrazadera (DnaX); esta región también conecta a la molécula con la helicasa para rodear la hebra rezagada y favorecer la replicación. La Pol III por si sola puede efectuar la síntesis de DNA, pero necesita formar el complejo Pol III HE para incrementar su síntesis a 1 Kb/seg, además de que tener dos polimerasas en un complejo facilita la coordinación de la síntesis de la cadena principal y la rezagada (Dohrmann et.al., 2016; Glover y McHenry, 2010; Marians et.al., 2008; Ravoitytè y Wellinger, 2017). En la tabla 11, se puede ver resumida la función de cada subunidad del complejo Pol III HE.

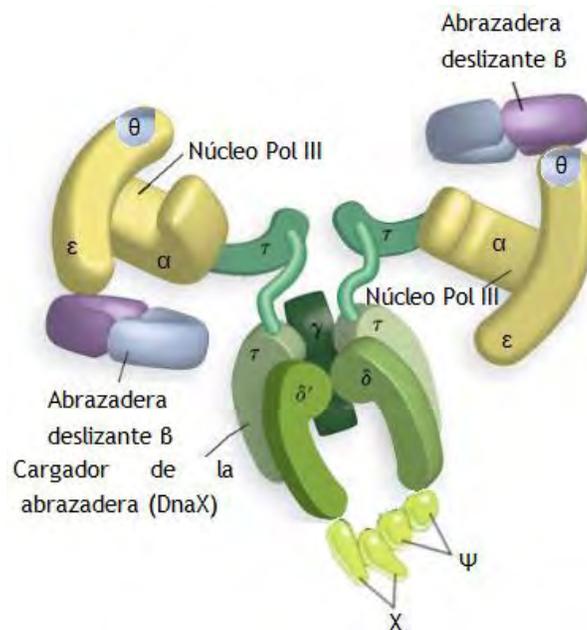


Figura 60. Estructura del complejo Pol III HE (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012; Yao y O'Donnell, 2016; Marians et.al., 2008).

Tabla 11. Subunidades del complejo Pol III HE (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012; Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Subunidad	Función
α ϵ θ	Núcleo: Sitio catalítico de la polimerización 5'→3' y actividad 3' exonucleasa
β	Abrazadera deslizando
τ	Dimeriza el núcleo y se unen a este
γ	Ayuda a anclar la subunidad β
δ δ' X Ψ	Favorece carga de la enzima en el núcleo

El inicio de la replicación del DNA cromosómico requiere de un complejo dinámico en el oriC, estos complejos se forman de una manera altamente ordenada y controlan eventos cruciales necesarios para el desenrollamiento de la doble hélice del DNA, la unión de la helicasa, y la posterior construcción de horquillas de replicación. Para seguir con el proceso el DNA se debe ir separando, empezando con la topoisomerasa II, una girasa que genera una vuelta helical para aliviar la tensión en la dsDNA y relajarlo.

10.2.4 Activación del primosoma

El primosoma es la estructura que termina de desenrollar la doble hélice del DNA parental y sintetiza los primers necesarios para iniciar la síntesis de los fragmentos de Okazaki y para la cadena principal, se podría decir que es la estructura preRC comparándola con el mecanismo eucariota. La composición del primosoma puede variar dependiendo la manera en la que la helicasa es introducida al DNA, pero sus componentes básicos son las enzimas primasa y helicasa. Para que se origine el primosoma, se debe de dar una señal en el oriC, secuencias de 9 pb, que participan en el ensamblaje de DnaA; para que así se forme una estructura nucleoproteica, pues su secuencia se pliega dando lugar al complejo inicial de replicación y por consecuencia a la horquilla de replicación. La estructura de DnaA se descubrió por medio de cristalografía con rayos X, y se reveló que posee 5 sitios de unión al DNA (cajas R1 – R5). Las cajas R1 y R4 están situadas en los extremos de la región de unión y presentan una gran afinidad (Messer et.al., 2001; Ozaki y Katamaya, 2009; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Yao y O'Donnell, 2016).

DnaA se une en forma de monómero en cuatro de sus cinco puntos de unión, formando una estructura doblada en 40° que se denomina “caja DnaA”, el complejo inicial. Ésta requiere de las proteínas accesorias FIS, IHF y HU que doblan el DNA hacia los puntos de unión de la DnaA; inicialmente genera una unión con la proteína FIS que ayuda a la acumulación de DnaA (oligomerización), posteriormente FIS abandona la caja (Figura 62). Luego, IHF se une a uno de los puntos de unión de DnaA para atraer la presencia de la proteína HU, ésta estimula la formación de la caja pues se une al NTD de DNaA; para que posteriormente una región rica en AT (13 pb DUE) sea parcialmente desenrollada por la topoisomerasa II, a este proceso se le conoce como formación del complejo abierto “caja” (Figura 62). La proteína DnaA requiere formar un puente ATP – DnaA o ADP – DnaA (ADLAS) por medio de sus cajas R2, R3 y R5 para iniciar la replicación en el oriC y formar el complejo inicial. Los sitios ADLAS son importantes para la regulación de la formación de los complejos inicial y abierto. Este complejo es replicativamente activo y contiene

aproximadamente 20 – 30 monómeros de DnaA. Para poder generar la acumulación de DnaA, FIS requiere de un cofactor, la proteína DiaA, un homotetrámero que presenta una subunidad para cada sitio de unión de DnaA y así genera la unión de múltiples DnaA, pues estabiliza la oligomerización de DnaA estimulando cooperativamente la posterior formación de ADLAS. La región rica en AT parcialmente desenrollada se extiende aproximadamente de 28 a 44 – 46 pb en presencia de la proteína SSB que la envuelve protegiéndola de su degradación por endonucleasas, esta proteína actúa como la RPA de eucariontes, su unión es cooperativa pues cuando se une un tetrámero de SSB aumenta la afinidad del DNA por la caja abierta y la afinidad de unión de DnaB a DnaA. La replicación del ssDNA envuelto por SSB requiere la unión de DnaA a la horquilla seguida de la unión del complejo DnaB/DnaC (Figura 62). Este complejo, un doble hexámero conformado se incorpora al complejo abierto de DnaA para interactuar con él (Ozaki y Katamaya, 2009; Ravoitytè y Wellinger, 2017; Kaguni, 2011; Messer et.al., 2001; Yao y O'Donnell, 2016; Bleichert, Botchan y Berger, 2017).

En su estructura DnaA presenta 4 dominios (Figura 61), siendo los dominios I y III los que poseen sitios de interacción/unión con DnaB para integrarla a la caja abierta, además el dominio I favorece la oligomerización de DnaA junto con FIS. El dominio II tiene la función de contener un enlazador flexible que le provee la capacidad a la proteína de unirse al DNA. Y en el dominio IV se encuentran motivos con actividad de AAA+ para llevar a cabo sus funciones y es donde se coordina la formación de ADLAS y el dominio por el cual se une al DNA (Martínez et.al., 2017).

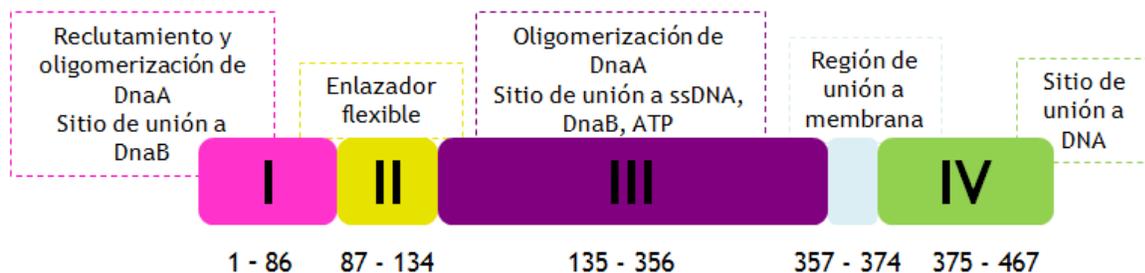


Figura 61. Estructura y función de los dominios de DnaA (Modificada de Martínez et.al., 2017; Messer et.al., 2001).

10.2.5 Enzimas involucradas en el replisoma procariota

DnaB es una proteína que pertenece a la familia de las helicasas y actúa en dirección 5'→3' de la cadena parental para separar el dsDNA, posee dominios que utilizan una cadena plegada similar a RecA para llevar a cabo su función; comparándola con el

mecanismo eucarionte, esta proteína desempeña el papel de Mcm2-7, y actualmente no se han encontrado homólogos de las subunidades Cdc45 y GINS para organismos procariontes, indicándonos que DnaB es capaz de activarse sin tener que formar un complejo mayor. Su estructura es hexamérica formada por tres dímeros alineados en forma de anillo con un orificio central por el que se cree pasa el DNA y necesita de ATP para poder activarse. El ssDNA que pasa por el canal central de DnaB sirve como plantilla para la síntesis de los fragmentos de Okazaki en la cadena rezagada. Una vez activa, el mecanismo que genera para separar las cadenas es rotatorio al translocarse a través del DNA y desenrollarlo (Kaguni, 2011; Martínez et.al., 2017; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Ozaki y Katamaya, 2009; Ravoitytè y Wellinger, 2017).

Para poder integrarse a complejo abierto de DnaA, la helicasa debe formar un complejo con DnaC. DnaC es una proteína que estabiliza y coloca a DnaB en la horquilla, cumple la función de ser el cargador de la helicasa, integrando DnaB a los dominios I y III de DnaA, y requiere actividad AAA+ para llevar a cabo su función. Una vez que se ensambla el complejo de iniciación abierto formado por DnaA/DnaB/DnaC, sufre una remodelación estructural, provocando que DnaC se disocie del complejo abierto; ésta debe separarse de DnaB una vez que lo integró al complejo pues inhibe su actividad de helicasa, al separarse genera hidrólisis de ATP lo que activa a la DnaB y avanza agrandando la horquilla replicativa. El complejo resultante son dos hexámeros de DnaB, cada uno en el extremo 5' de cada cadena de DNA; cada hexámero interactúa con una primasa, pues se ha visto que el movimiento de DnaB es requerido para producir cadenas simples de DNA, el blanco de la primasa (Martínez et.al., 2017; Kaguni, 2011; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Yao y O'Donnell, 2015; Messer et.al., 2001).

La primasa procariota es una proteína con una subunidad única que presenta una homología con el sitio activo de las topoisomerasas, esta proteína genera primers de RNA de 12 nucleótidos para que pueda actuar la polimerasa (complejo Pol III HE). El iniciador, requerido por la Pol III para la síntesis de DNA, es suministrado por la proteína DnaG, la primasa en estos organismos. Este monómero interactúa con DnaB mientras se desplaza, la asociación genera los fragmentos de Okazaki, sugiriendo que la helicasa y la primasa procariotas coordinan sus funciones dando lugar al primosoma, conjunto de proteínas que van a dar lugar a la síntesis del iniciador (Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Yao y O'Donnell, 2015; Yao y O'Donnell, 2016).

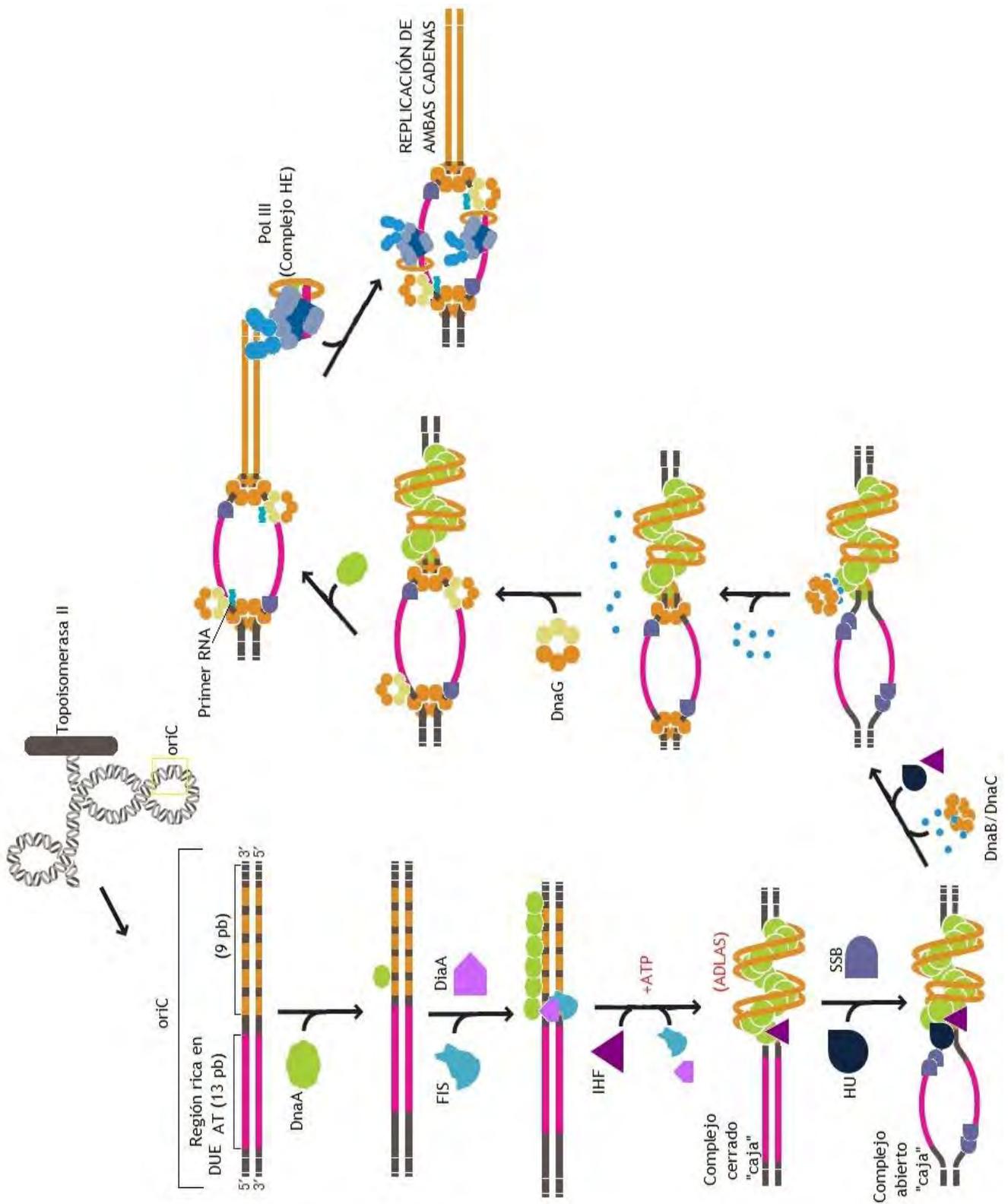


Figura 62. Mecanismo de activación del primosoma e iniciación de la replicación. Activación del *oriC*, iniciación de la replicación (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012; Messer et al., 2001; Kaguni, 2011; Bleichert, Botchan y Berger, 2017).

10.2.6 Replisoma procariota

Cabe mencionar que por cada DnaB, se integra un complejo Pol III HE por medio de su subunidad tau a la cadena principal y dos a la rezagada, y se asocia al primer formado por DnaG, teniéndose que DnaB cumple dos funciones: actividad helicasa y activación de DnaG; pues la interacción periódica DnaB/DnaG es suficientemente fuerte para que una Pol III sintetice la hebra principal y las otras dos Pol III generen los fragmentos de Okazaki en la hebra rezagada (Martínez et.al., 2017; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Yao y O'Donnell, 2016).

La abrazadera deslizante (subunidad β) organiza todas estas enzimas dentro del replisoma para que se lleve a cabo el proceso, su estructura está representada en la Figura 63; siendo la primasa y la helicasa las dos enzimas que difieren más entre organismos procariontes de eucariontes, aparte las DNA polimerasas (Martínez et.al., 2017; Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Yao y O'Donnell, 2016).

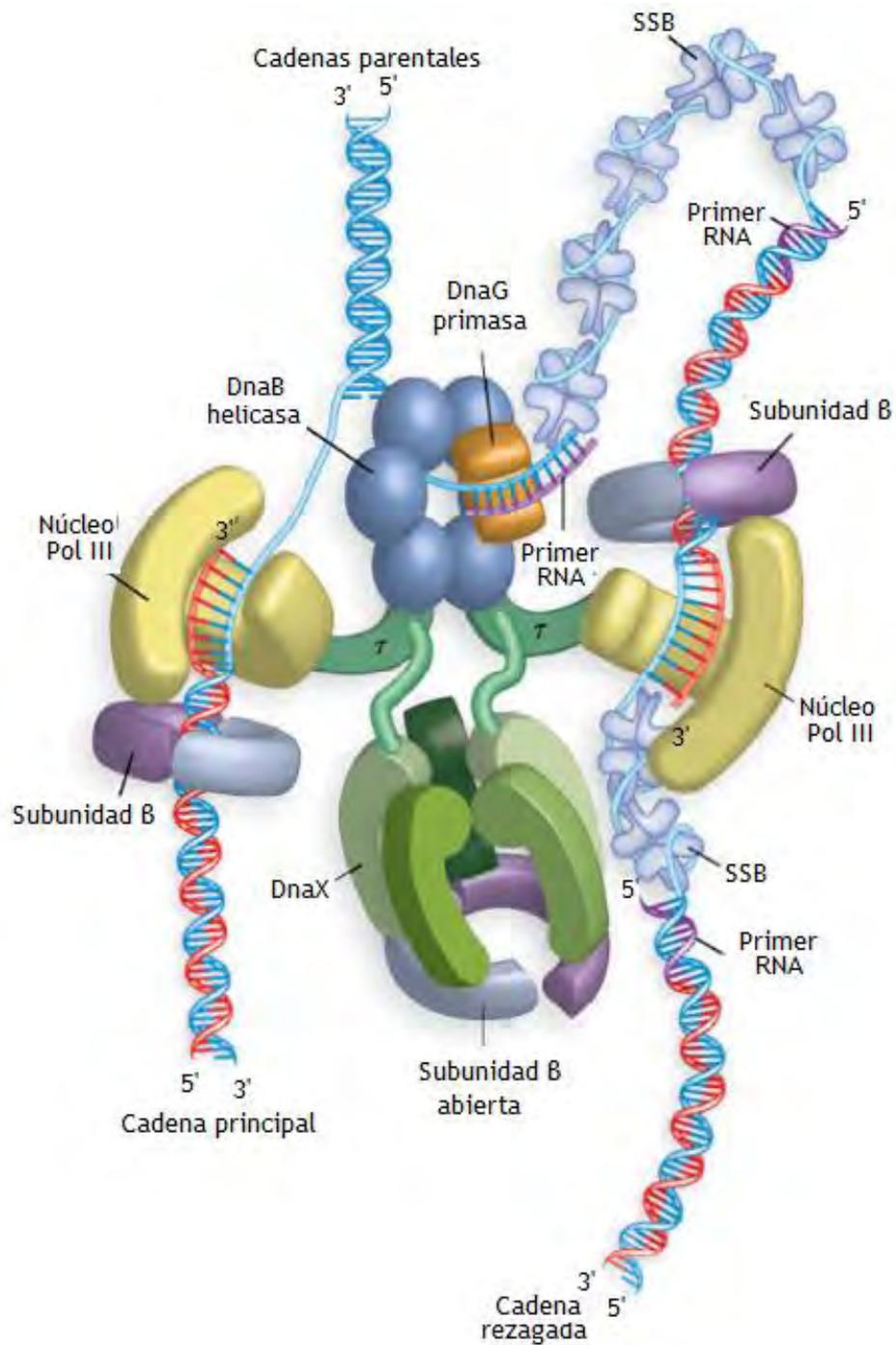


Figura 63. Estructura clásica del replisoma procarionta y sus componentes (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012; Yao y O'Donnell, 2015; Yao y O'Donnell, 2016).

10.2.7 Enzimas adicionales involucradas en la replicación procariota

Al igual que en eucariontes, el proceso de replicación necesita ser completado por otras proteínas implicadas en la maduración de los fragmentos de Okazaki. Los fragmentos de Okazaki procariontes son de 1 – 2 Kb de longitud, mucho más grandes que los eucariontes (100 – 200 nt), estos son formados por la Pol III y al terminarlos ésta enzima es rápidamente expulsada del complejo holoenzimático desanclándose de la subunidad β ; para completar la síntesis en *E. coli* los primers de RNA son removidos por una mecanismo combinado entre la RNasa HII y la Pol I (Yao y O'Donnell, 2015; Martínez et.al., 2017; Yao y O'Donnell, 2016; Kaguni, 2011; Cánovas, 2012).

Al separarse la Pol III la subunidad β se vuelve rápidamente el objetivo de la Pol I, RNasa HII y la ligasa; el proceso se da por la acción conjunta entre RNasa HII – Pol I pues como se sabe la RNasa es una enzima capaz de escindir fragmentos de RNA y la Pol I además de su acción polimerasa posee una actividad exonucleasa que le provee la capacidad de hidrolizar ácidos nucleicos ya sea en dirección $5' \rightarrow 3'$ o $3' \rightarrow 5'$; por lo que ambas remueven los fragmentos de Okazaki desde el extremo $5'$, permitiendo reemplazar RNA por DNA. A diferencia del mecanismo de eliminación del primer eucariota en los organismos procariontes no se requiere de una enzima extra con actividad $5'$ endonucleasa como FEN1, pues a pesar de que la RNasa procarionte tampoco remueve estos extremos la acción conjunta de la Pol I lo hace dejando solo un pequeño hueco que va a ser completado por la DNA ligasa I dándole continuidad a la cadena (Figura 64) (Yao y O'Donnell, 2015; Martínez et.al., 2017; Yao y O'Donnell, 2016; Kaguni, 2011; Cánovas, 2012).

Es importante mencionar que la formación de los fragmentos de Okazaki en procariontes crea bucles de DNA en la cadena rezagada (Figura 62), esto es debido a que cuando la Pol III se disocia del complejo holoenzimático crea una unión con la helicasa DnaB, estos bucles no poseen ninguna función y su formación probablemente se deba a que las polimerasas (Pol III) para la cadena principal y la rezagada son del mismo tipo, a diferencia de organismos eucariontes donde la Pol ϵ sintetiza la cadena principal y la Pol δ la rezagada. En la cadena principal también se existe un contacto Pol – helicasa y éste es importante para la actividad de ambas enzimas, por lo que en esta cadena también se forma un bucle de ssDNA que es protegido por SSB (Yao y O'Donnell, 2015; Martínez et.al., 2017; Yao y O'Donnell, 2016; Kaguni, 2011; Cánovas, 2012).

En la tabla 12 se resumen la función y características de todas las proteínas antes mencionadas que conforman la maquinaria replicativa procariota y están involucradas en la horquilla de replicación.

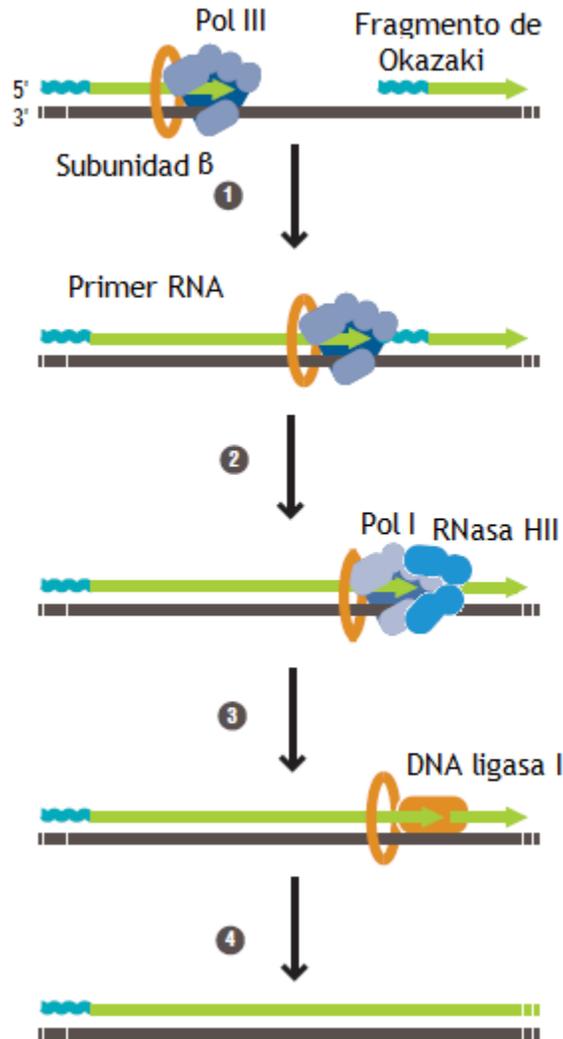


Figura 64. Mecanismo de escisión del cebador en procariontes. (1) La síntesis del fragmento de Okazaki es completada por Pol III. (2) Se libera la Pol III y se recluta Pol I – RNasa HII, la Pol I remueve RNA y sintetiza DNA. (3) Se libera Pol I – RNasa HII y se recluta DNA ligasa I. (4) Se completa la cadena dándole continuidad (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015; Yao y O'Donnell, 2015; Yao y O'Donnell, 2016).

Tabla 12. Proteínas involucradas en la replicación procariota (Modificada de Bleichert, Botchan y Berger, 2017; Yao y O'Donnell, 2015; Yao y O'Donnell, 2016; Cox, Doudna y O'Donnell, 2012).

Proteína	Número de subunidades	Función
Topoisomerasa II	4	Girasa: libera tensión torcional generada por el desenrollamiento del DNA
Dna A	1	Iniciador, se une al oriC
FIS		Estimula la oligomerización de DnaA
HU IHF	2	Proteína histona: estimula la iniciación
Dna B	6	Helicasa: desenrolla el DNA
Dna C	1	Cargador de la helicasa, requerida por DnaB para integrarse a la caja de DnaA
DnaG	1	Primasa: síntesis de cebador
SSB	4	Se une al DNA se facilita actividad de DnaA
Pol III HE	17	Sintetiza las cadenas de DNA
Pol I	1	Procesa los fragmentos de Okazaki: remueve RNA
RNasa HII	1	Procesa los fragmentos de Okazaki: remueve RNA
Ligasa I	1	Sella los fragmentos de Okazaki

10.2.8 Origen de replicación

A diferencia de organismos eucariontes, en células procariotas la replicación es monofocal, es decir, tiene un punto de origen único (oriC), ésta comienza siempre en un punto determinado del cromosoma circular. Entre bacterias varía el tamaño del origen, pero todos contienen sitios de unión para la proteína DnaA y que se inicie el complejo, el oriC se compone de una secuencia de 9 pb que sirve como sitio de unión de las proteínas requeridas para iniciar la replicación del DNA; adyacente a ésta se encuentra una región de 13 pb rica en repetidos de AT (DUE) que puede desnaturalizarse con facilidad formando un oriC de 245 pb (Figura 65) (Martínez et.al., 2017; Yao y O'Donnell, 2016; Messer et.al., 2001; Bleichert, Botchan y Berger, 2017).

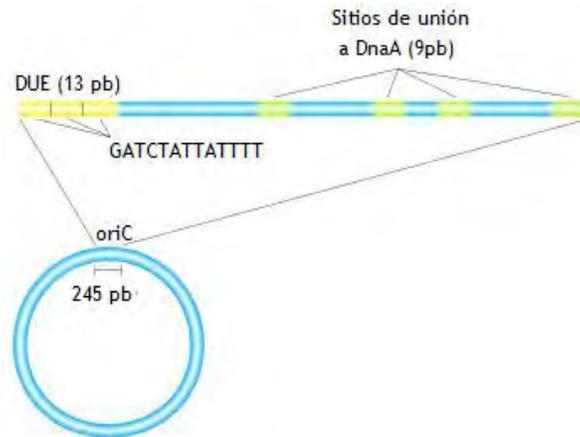


Figura 65. Origen de replicación en procariontes (Modificada de Yao y O'Donnell, 2016; Messer et.al., 2001).

Veinte a 30 monómeros de la proteína iniciadora de la replicación (DnaA) se unen a las repeticiones de 9 pb, y el DNA se enrolla alrededor del complejo que forma la proteína. Este enrollamiento estimula la región rica en AT a desenrollarse permitiendo la activación del primosoma, lo que conlleva a la formación de dos horquillas de replicación que se mueven en direcciones opuestas a lo largo del cromosoma circular duplicando el material genético (Figura 66) (Yao y O'Donnell, 2016; Martínez et.al., 2017).

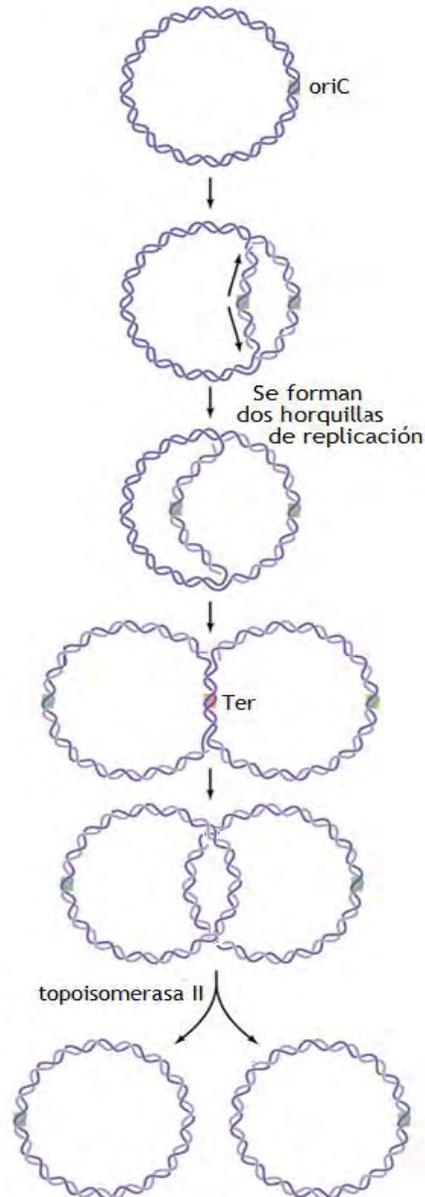


Figura 66. Replicación monocéntrica y bidireccional en procariontes (Modificada de Cox, Doudna y O'Donnell, 2012; Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

10.2.9 Etapas de la replicación procarionta

Sabiendo todas las etapas que involucra la replicación la podemos dividir en tres fases (Figura 67):

i. *Iniciación*

La replicación de comienza en un sitio específico y es bidireccional, esta fase abarca la formación de la caja de DnaA hasta la asociación y activación del primosoma.

ii. *Elongación*

Esta fase implica la asociación del complejo Pol III HE al primosoma formando el replisoma y extendiéndose por todo el DNA.

iii. *Terminación*

Las dos horquillas de replicación avanzan en sentidos opuestos y como la velocidad de replicación es la misma para ambas horquillas, se encuentran en un sitio de terminación diametralmente (180°) opuesto al origen. En *E. coli* hay 6 sitios de terminación llamados Ter, que son secuencias de 22 pb reconocidas por la proteína Tus (inhibidor de DnaB), la secuencia al no ser simétrica genera que la proteína se coloque en una determinada orientación; así, el complejo Tus-Ter genera una señal de terminación de la replicación. Al ser circular el DNA procarionta, una vez terminada la replicación las cadenas quedan entrelazadas pero la Topoisomerasa II las rompe y éstas se separan quedando dos copias idénticas del DNA parental (Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

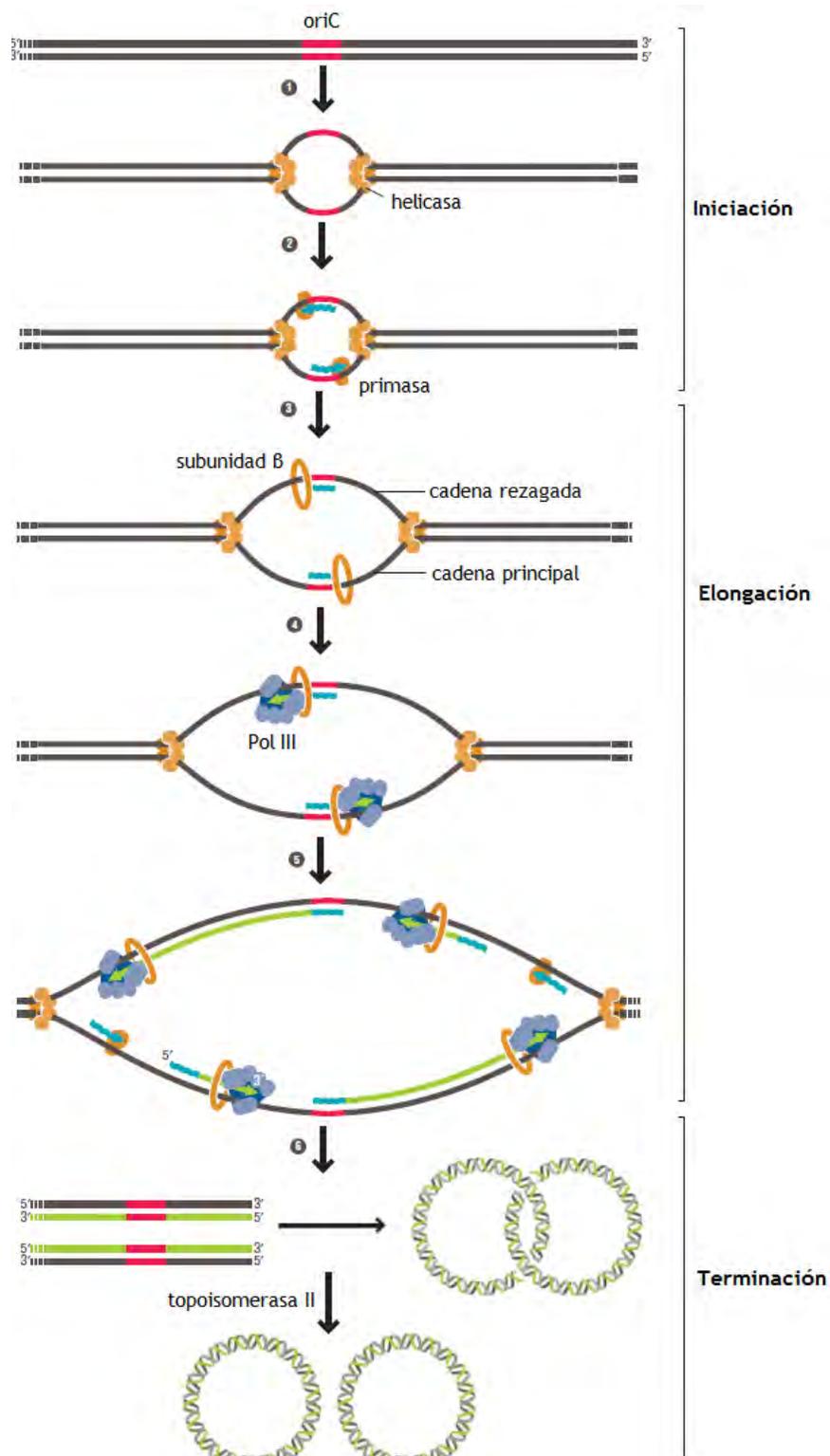


Figura 67. Fases de la replicación en procariontes. (1) Desenrollamiento del *oriC*, reclutamiento de DnaA y helicasa. (2) Asociación de primosoma. (3) Asociación de la subunidad β . (4) Asociación de Pol III (complejo) y elongación, formación del replisoma. (5) Movimiento del replisoma bidireccionalmente. (6) Finalización (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

Tabla 13. Comparación entre organismos de las proteínas involucradas en la replicación (Modificada de Yao y O'Donnell, 2015; Yao y O'Donnell, 2016).

Función	Proteína en eucariontes	Proteína en procariontes
Inicio de la replicación	ORC	DnaA que reconoce el oriC
Girasa	Topoisomerasa I y II	Topoisomerasa II
Helicasa	Complejo CMG (Cdc45/Mcm2-7/GINS)	DnaB (DnaB/DnaC: para integrarlo)
Proteína protectora del DNA	RPA	SSB
Primasa	Pol α	DnaG
Polimerasa (replicasa)	Pol δ/ϵ	Pol III
Abrazadera deslizante	PCNA	Subunidad β
Cargador de la abrazadera	RFC	DnaX
Escisión de RNA	RNasa H1	RNasa HII / Pol I
Endonucleasa 5'	FEN1	No necesita
Ligasa	DNA ligasa I	DNA ligasa I

Tabla 14. Diferencias de los fragmentos de Okazaki entre organismos eucariontes y procariontes (Autor, 2017).

Característica	Organismos eucariontes	Organismos procariontes
Tamaño (longitud del fragmento)	100 – 200 nt	1 – 2 Kb
Enzima encargada de la extensión de los fragmentos de Okazaki	Pol δ	Pol III
Remoción del cebador	RNasa H1	RNasa HII / Pol I
Espacio entre cada fragmento	1 – 3 nt	No hay

11. TRANSCRIPCIÓN

La transcripción es el primer paso de la expresión génica, el proceso por el cual la información de un gen se utiliza para generar un producto funcional, proteína. La transcripción del DNA es un mecanismo fundamental para el control celular y para la expresión de la información genética, pues permite que la información de un cromosoma llegue al resto de los organelos celulares. La transcripción no es un proceso continuo, sino temporal; es decir, no todo el DNA se transcribe simultáneamente, sino que existen determinadas regiones que se transcriben en distintos momentos, en dependencia de las condiciones fisiológicas de la célula y en respuesta a diferentes estímulos del medio externo e interno; el objetivo de la transcripción es producir una copia de RNA (mRNA) de la secuencia de DNA de un gen que contiene la información necesaria para generar una proteína (Figura 68). La transferencia de la información del DNA hacia el RNA se realiza siguiendo las reglas de complementariedad de las bases nitrogenadas, en donde la base complementaria a la adenina en vez de ser timina será uracilo (U); y el RNA producto de la transcripción recibe el nombre de transcrito. A diferencia de la replicación que forma una copia completa de un cromosoma, la transcripción solamente copia el gen que va a codificar para la proteína, el CDS (Kim y Jinks-Robertson, 2012; Cánovas, 2012; Aguilera y Gaillard, 2014).

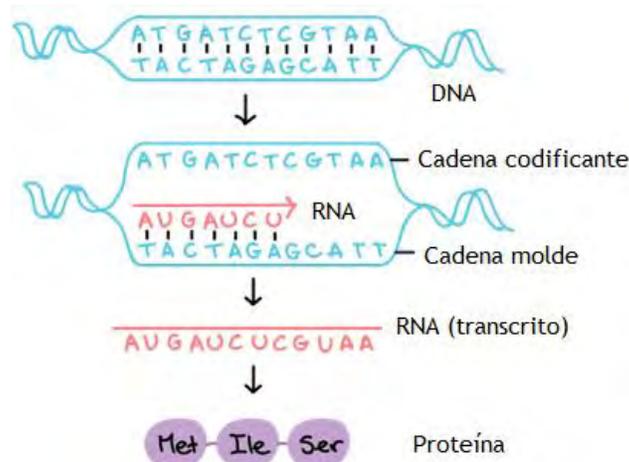


Figura 68. Esquema general de transcripción (Modificada de Khan Academy, 2017).

El proceso es similar a la replicación, con la diferencia de las enzimas y los precursores necesarios para realizar el proceso; a manera general la transcripción abarca 4 etapas, reconocimiento del promotor, iniciación, elongación y terminación (Figura 69). La transcripción comienza con la descondensación del DNA parental, que sirve de molde para ser copiado, así, las enzimas helicasa y girasa cortan los puentes de hidrógeno entre

bases nitrogenadas de una hebra y otra y evitan que las hebras recién separadas se enreden, para que así los factores de transcripción se unan a un sitio de DNA rico en adenina y timina (caja TATA) que sirve como promotor de la transcripción, pues es una secuencia de reconocimiento de inicio; ésta se encuentra “río arriba” de la región del DNA a transcribir, en eucariontes aproximadamente 25 pb antes del inicio de transcripción. Posterior a la unión de los factores de transcripción a la caja TATA, la enzima RNA polimerasa reconoce un sitio de inicio (TAC) y comienza la transcripción a partir de una cadena de DNA molde (sentido 3'→5') ya que la transcripción ocurre en dirección 5'→3' por el sentido en que opera la RNA Pol, por lo que la otra cadena de DNA (sentido 5'→3', codificante) no se transcribe; ésta va añadiendo rNTPs creando una reacción de condensación entre el grupo trifosfato 5' del rNTP entrante y el grupo 3'-OH del último nucleótido de la cadena formando un enlace fosfodiéster que lo une a la cadena (Aguilera y Gaillard, 2014; Kim y Jinks-Robertson, 2012; Cánovas, 2012).

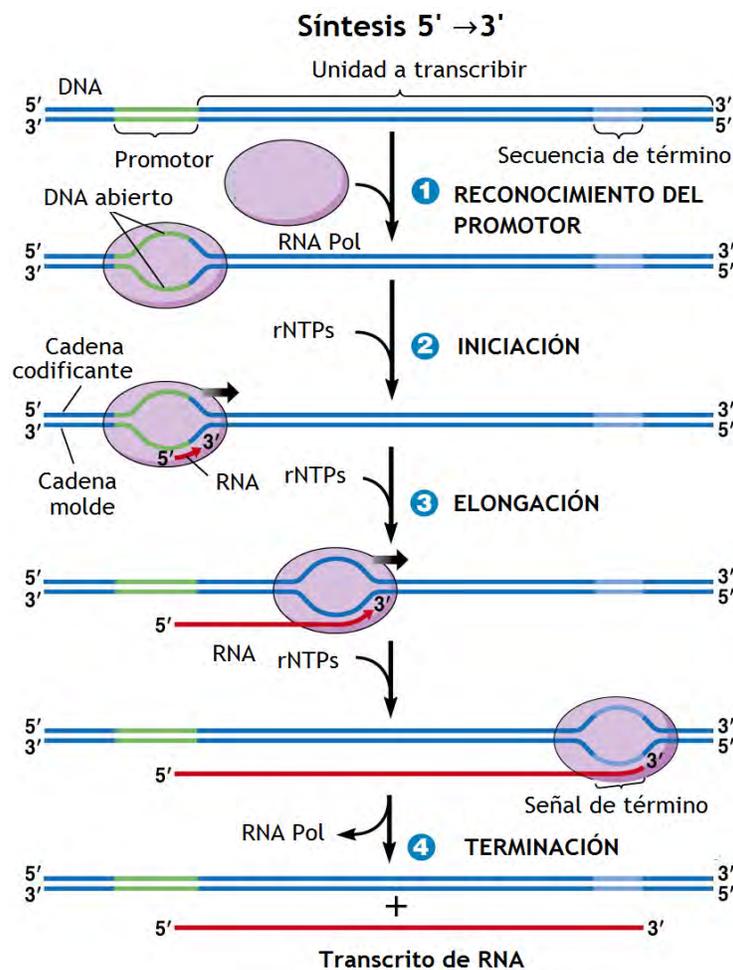


Figura 69. Etapas de la transcripción (Modificada de Aguilera y Gaillard, 2014).

La transcripción puede terminar por dos mecanismos en organismos procariontes, la terminación dependiente de Rho o la terminación directa (independiente de Rho). En la terminación dependiente de Rho la transcripción continúa hasta que se encuentre una secuencia de término (ATT, ACT, ATC) que es reconocida por la proteína Rho, la cual separa a la RNA Pol del DNA. Y en la terminación directa continúa hasta encontrar un bucle que desestabiliza la unión DNA/RNA. El proceso molecular de transcribir la información genética contenida en el DNA al lenguaje molecular simple del DNA está mediado por varias enzimas; en células eucariotas el DNA se mantiene en el núcleo pero las proteínas son producidas en el citoplasma entonces para que una molécula de DNA genere una proteína ésta debe ser transcrita en una molécula de RNA que sirve como intermediario pues se mueve al citoplasma además de servir como plantilla para producir la proteína. En organismos eucariontes la transcripción ocurre dentro del núcleo, mientras que en las células procariontes, al no existir núcleo el proceso ocurre en el citoplasma, y en la medida que se va formando el mRNA éste es leído simultáneamente por los ribosomas (Aguilera y Gaillard, 2014; Kim y Jinks-Robertson, 2012; Cánovas, 2012).

A diferencia de los procariontes, los transcritos eucariontes necesitan someterse a algunos pasos de procesamiento antes de traducirse en proteínas. En eucariontes se genera un pre-mRNA pues terminada la transcripción se agrega al transcrito una caperuza en el extremo 5' (capping) y se lleva a cabo una poliadenilación por la enzima poli-A-polimerasa (PAP) que añade una cola poli-A en el extremo 3' con el fin de proteger al transcrito de RNA. Para organismos eucariontes la transcripción involucra varias etapas, en donde el primer transcrito (DNA→RNA) abarca tanto exones como intrones, éstos son removidos por medio de mecanismos de empalme antes que el pre-mRNA pase del núcleo al citoplasma creando un mRNA maduro que es el que será empleado para la traducción y formará la proteína (Kim y Jinks-Robertson, 2012; Aguilera y Gaillard, 2014; Cánovas, 2012).

La transcripción es selectiva ya que solo se sintetiza RNA a partir de ciertas regiones que son las codificantes para la proteína; es monocatenaria pues la cadena de RNA recién sintetizada tiene la misma información que una de las cadenas del DNA (la cadena molde de la cual parte la transcripción), sólo se requiere de transcribir una cadena de DNA debido a que el RNA es monocatenario y por el sentido en que actúa la RNA Pol. Es reiterativa, ya que puede estar ocurriendo la transcripción de una misma región de DNA

(un gen) simultáneamente (Figura 70) (Aguilera y Gaillard, 2014; Kim y Jinks-Robertson, 2012).

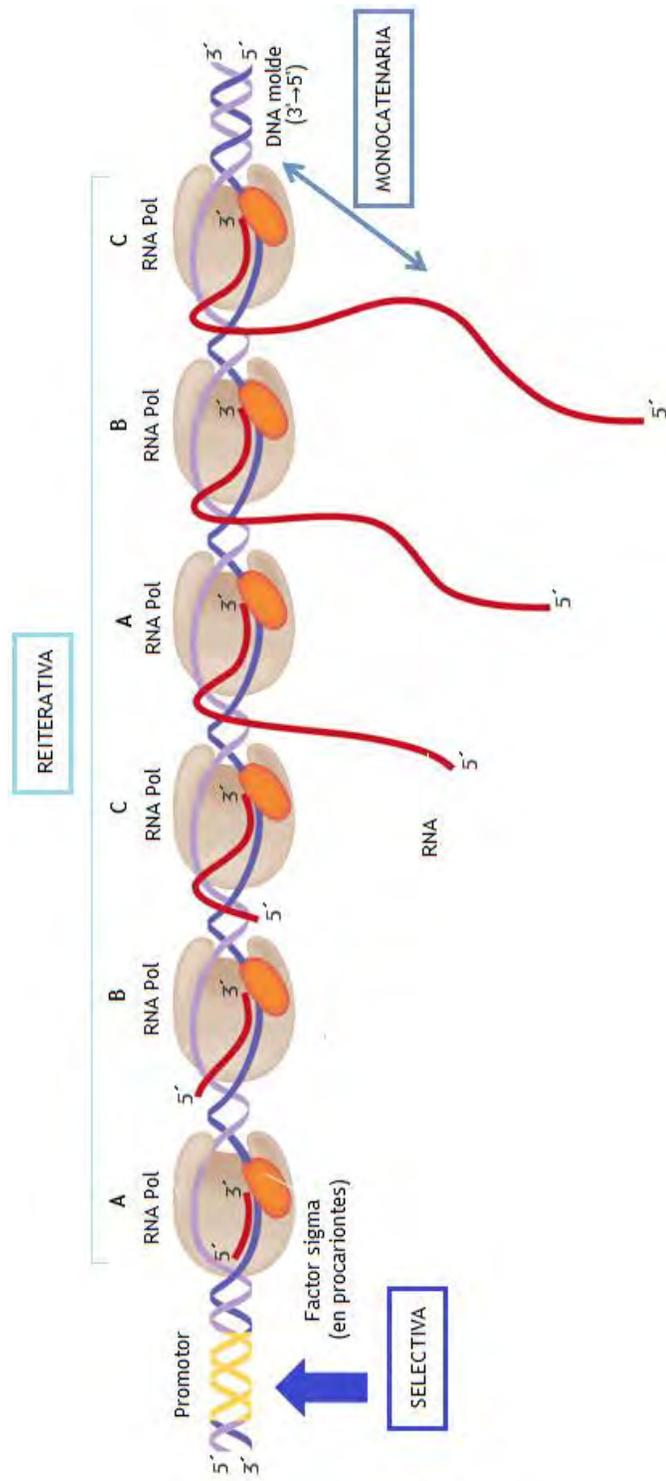


Figura 70. Propiedades de la transcripción (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

11.1 Transcripción Eucariota

Para comprender la transcripción del DNA como el primer paso en la decodificación y expresión de la información genética es necesario explicar algunos aspectos sobre la molécula intermediaria del proceso, el RNA. Su estructura básica al igual que el DNA incluye una molécula de azúcar, pero en este caso será la ribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada; tres de ellas son las mismas bases que se encuentran en el DNA, mientras que la timina es sustituida por el uracilo. A diferencia del DNA el RNA es monocatenario pues posee solo una hebra la cual puede sobre-enrollarse sobre sí misma según segmentos de complementariedad parcial constituyendo estructuras secundarias del RNA que se verán involucradas en los procesos enzimáticos necesarios para creación de proteínas (Aguilera y Gaillard, 2014).

Mediante un experimento que se denominó pulso y caza, se descubrió que el RNA era el intermediario simple entre el DNA y los ribosomas de una célula, responsables de sintetizar proteínas; éste experimento permitió establecer que el RNA lleva la misma información contenida en el gen pero en un lenguaje molecular mucho más simple y de fácil lectura para la célula (Kim y Jinks-Robertson, 2012; Aguilera y Gaillard, 2014).

A grandes rasgos, el experimento consistió en hacer crecer una célula en un medio de cultivo enriquecido con precursores radiactivos de RNA (uridina tritiada), para realizar un seguimiento durante un breve período de tiempo (pulso). Una vez que las células han incorporado la uridina tritiada se transfieren a un medio con precursores sin marcar (caza); de esta forma es posible seguir el RNA marcado durante el pulso pues la síntesis del nuevo RNA se producirá con precursores sin marca. En un primer tiempo observado estos se encontraban en el interior del núcleo celular, de modo que se dedujo que el RNA se forma y encuentra dentro del núcleo de las células eucariontes; en un segundo tiempo observado se evidenció que el RNA se encontraba fuera del núcleo asociado a ribosomas, de modo que se concluyó que esta biomolécula es capaz de movilizar la información genética hasta los ribosomas donde la información genética es leída y codificada en productos proteicos (Kim y Jinks-Robertson, 2012; Aguilera y Gaillard, 2014).

11.1.1 RNA polimerasa

La síntesis de RNA a partir de DNA se lleva a cabo por la acción de la enzima RNA polimerasa dependiente de DNA que consta de un complejo con múltiples subunidades que abarcan de 12 – 17 subunidades dependiendo del tipo de enzima. Es una enzima que al igual que la DNA polimerasa cataliza la adición de nt al extremo 3' de la cadena a sintetizar. A diferencia de la DNA Pol, la RNA Pol no necesita de un cebador para iniciar la síntesis pues simplemente se une a la cadena molde de DNA y comienza la síntesis complementaria. En 1969 Roeder y Rutter descubrieron que en las células eucariotas, existen tres tipos de RNA polimerasas basándose en 3 suposiciones: (Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012).

- El RNA ribosómico tiene una composición de base diferente de otras clases de moléculas de RNA.
- Los genes ribosómicos se encuentran en el nucléolo, mientras que otras clases de moléculas de RNA se dispersan en el nucleoplasma.
- La regulación de la síntesis de RNA ribosómico y de RNA dependiente de DNA, es independiente.

Así, se tiene que la RNA Pol I se encarga de sintetizar rRNA que conforma la gran subunidad de los ribosomas; la RNA Pol II transcribe los genes codificadores de proteínas (mRNA) y la mayoría de los RNAs reguladores no codificantes, y la RNA Pol III interviene en la transcripción de pequeños RNA, la subunidad 5S del rRNA y tRNA (tabla 15) (Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Lewis, Doherty y Clarke, 2008).

Tabla 15. Tipos de RNA polimerasas (Modificada de Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

Tipo de RNA Pol	Localización	Producto	Subunidades	Tamaño (kDa)
RNA Pol I	Nucléolo	28, 18 y 5.8 rRNAs	12	~500
RNA Pol II	Nucleoplasma	mRNA, snRNA	14	597
RNA Pol III	Nucleoplasma	5S rRNA, tRNA, nsRNA (U6)	17	~700

A diferencia de la Pol III, Pol I y Pol II transcriben genes largos, por lo que se encuentran con barreras de cromatina, y ambas requieren de emplear una estructura promotora que se encuentra “río arriba” de la región del inicio de la transcripción. La RNA Pol I presenta 14 subunidades mientras que RNA Pol II presenta 12 compartiendo 5 subunidades entre sí, sin embargo, la subunidad donde se encuentre el sitio catalítico activo de cada enzima no la comparten, siendo así que la segunda polimerasa es la que participa en la transcripción del DNA. En general, la RNA Pol II tiene una estructura en forma de “pinza de cangrejo” que posee cuatro nódulos rígidos, el “núcleo”, “estante”, “abrazadera” y “lóbulo mandibular”, con dominios modulares menores anclados a cada uno. El núcleo y el estante constituyen la parte central de proteína de donde se forman los canales primario y secundario y de donde salen en forma de protuberancia la abrazadera y lóbulo mandibular como las pinzas de un cangrejo. El canal primario sirve como sitio de unión de los ácidos nucleicos y es el más grande, mientras que el canal secundario, el pequeño, sirve como poro de entrada de los rNTPs (Figura 71) (Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011).

Para la elongación del transcrito la RNA Pol forma un complejo de elongación (EC) que es capaz de desenrollar el dsDNA e incorpora un nt elongando la cadena de manera nucleótido-dependiente, reacción que requiere de Mg^{2+} como cofactor (Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011). La doble hélice del DNA es desenrollada cerca del sitio catalítico de la enzima formando un híbrido DNA-RNA de 9 – 10 pb que se forma entre la cadena molde de DNA y el RNA sintetizado. Como ya mencionó, la RNA Pol II agrega rNTPs al extremo 3' del híbrido y estos son proporcionados por el canal secundario; adicionalmente la enzima posee dos elementos estructurales flexibles que son esenciales para su actividad, el bucle del gatillo y puente entre hélices (entre los canales) y son conservados cerca del sitio catalítico. La RNA Pol II cuenta de 12 subunidades (RPB1 – RPB12) donde las más grandes (RPB1, RPB2 y RPB3) constituyen el núcleo funcional y estructural de la enzima, RPB1 está involucrada en la transcripción no selectiva y dependiente de promotores, se une al DNA molde y participa en la elongación de la cadena de RNA; los dominios RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 y RPB12 son los que comparte con la RNA Pol I; mientras que RPB4, RPB9 y RPB11 no son esenciales para la transcripción (Figura 72) (Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011).



Figura 71. Esquema de la estructura de la RNA Pol II (Modificada de Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012).

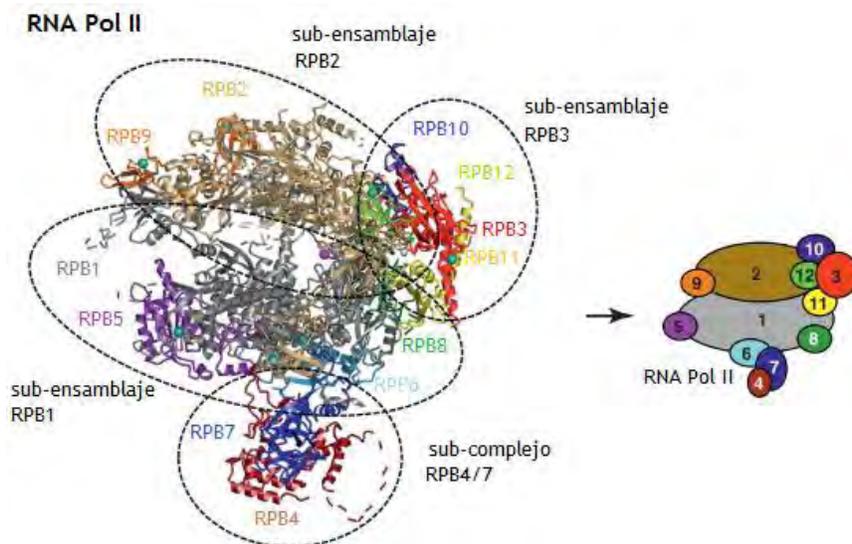


Figura 72. Estructura de los dominios de la RNA Pol II. (Modificada de Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011)

11.1.2 Núcleo del promotor

Estudios recientes muestran que la transcripción inicia en una región dentro de un segmento de DNA de aproximadamente 50 – 100 pb que es capaz de ensamblar a la RNA Pol II y asociar factores generales de transcripción (GTFs) necesarios para la iniciación de la transcripción, ésta región es denominada núcleo del promotor.

El núcleo del promotor está compuesto de secuencias en dirección 5' de un gen que es suficiente para iniciar la transcripción del DNA, éste funciona como plataforma en donde se ensambla la maquinaria de transcripción. El ensamblaje de esta maquinaria al núcleo del promotor es iniciado por la interacción de factores de transcripción específicos con sus secuencias reguladoras (río arriba); muchos núcleos del promotor tienen un gran número de genes codificantes y se han conservado a lo largo de la evolución, denominados

elementos canónicos (Figura 73a). Los elementos canónicos son reconocidos por varios GTFs de forma específica de modo que permite el ensamblaje de una superestructura (casi cuaternaria) de varias proteínas que forman un complejo transcripcional que rodea al sitio de inicio de la transcripción (TSS) pues constan de ser una región NFR; incluyendo a los GTFs, la RNA Pol II y los elementos a reconocer (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

Dentro de éstos elementos se encuentra la caja TATA, Inr, BRE, DPE y DCE; también existe la caja CCAAT que no es normalmente considerada dentro de los elementos canónicos y se encuentra 50 – 80/100 pb río arriba del TSS. Los elementos canónicos que principalmente se asocian al núcleo del promotor son la caja TATA e Inr. La primera se encuentra 30 – 31 pb río arriba del TSS y sirve como sitio de unión de los GTFs (TFIID que forma un PIC), ésta se encuentra solo en los promotores eucariotas del 5 – 7% por lo que las células deben contener Inr para sustituir su función o co-realizarla; éste se extiende a través del TSS y puede independientemente iniciar la transcripción con o sin presencia de la caja TATA; ambos se ven involucrados en la formación de PICs. La caja TATA sirve como sitio de unión del componente de TFIID (TBP) que forma el PIC y posteriormente recluta a la RNA Pol II. De igual manera Inr posee un sitio de unión a este complejo (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

El elemento TCT es un elemento que engloba el TSS y está localizado en la misma posición que el Inr pero posee una función diferente; éste no es reconocido por TFIID y no puede iniciar la transcripción por sí solo. Otro elemento DPE modula la actividad de la caja TATA y de Inr, no actúa independientemente a Inr pero requiere de su presencia para su función y también presenta un sitio de unión del componente de TFIID. El elemento BRE es una secuencia de 7 pb que puede encontrarse río arriba (BREu) de la caja TATA o río abajo (BREd) y puede activar o suprimir la transcripción. Por último DCE se encuentra en tres posiciones diferentes río abajo del TSS y puede ser reconocido por el complejo TFIID. En la tabla 16 se muestra la posición de los elementos canónicos y su secuencia (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

A su vez, existen genes eucariontes que carecen de éstos elementos clásicos en el núcleo del promotor en lugar presentan regiones de 100 – 150 pb asociadas la iniciación de la transcripción (elementos no canónicos, Figura 73b). Dentro de éstos se encuentran las islas CpG que son regiones del DNA en donde existe un alto contenido de dinucleótidos C-G; los desiertos ATG que son regiones que carecen de estos nucleótidos

y por lo tanto hay ausencia de la caja TATA, y los TIPs regiones de RNAs no codificantes; los tres se caracterizan por presentar mTSS y codificar para mRNA y piRNA (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014). Todos estos elementos y proteínas abarcan la etapa de reconocimiento del promotor, la formación del PIC (TFIID – DNA); algunos autores difieren en que ésta etapa está involucrada dentro de la iniciación y otros indican que la iniciación se da cuando la maquinaria de transcripción está completa y activa.

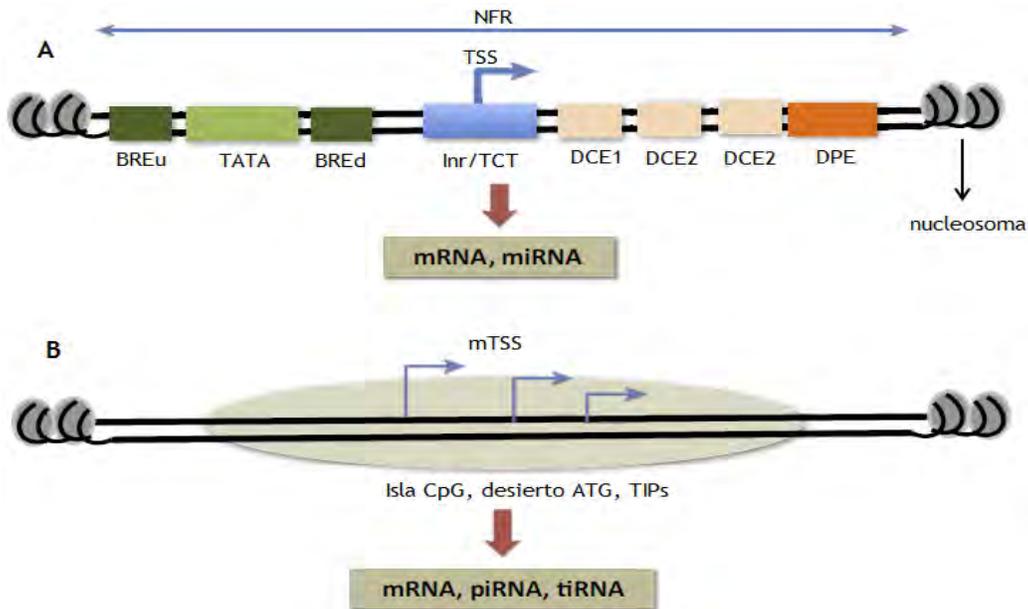


Figura 73. Elementos canónicos y no canónicos del núcleo del promotor eucarionte (Modificada de Roy y Singer, 2015).

Tabla 16. Elementos canónicos del núcleo del promotor eucarionte (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

Elemento	Posición	Secuencia (5'→3')	GTF de unión
BREu	-38 a -32	(G/C)(G/C)(G/A)CGCC	TFIIB
Caja TATA	-31 a -30	TATA(A/T)A(A/T)(A/G)	TBP (TFIID)
BREd	-23 a -17	G/ATT/AT/GT/GT/GT/G	TFIIB
Inr	-2 a +5	YYA ⁺ NT/AYY	TAF1/TAF2
TCT	-2 a +6	Sin definir	TBP
DPE	+28 a +32	A/GGA/TCGTG	TAF6/TAF9
DCE1	+6 a +11	CTTC,CTGT,AGC(CTTC)	
DCE DCE2	+16 a +21	CTTC,CTGT,AGC(CTGT)	TAF1
DCE2	+30 a +34	CTTC,CTGT,AGC(AGC)	

11.1.3 Reconocimiento del promotor

Los promotores se definen de manera general como secuencias en el DNA que tienen la capacidad de iniciar la transcripción; de esta manera en el núcleo del promotor se unen las proteínas activadoras y conforman un promotor más eficiente (Roy y Singer, 2015).

Estudios bioquímicos, genéticos y estructurales han demostrado que las RNA Pol emplean factores para la iniciación de la transcripción que se unen al núcleo del promotor; estos factores (factores de transcripción, activadores, mediadores, represores, acetilasas de histonas, complejo remodelador de la cromatina, etc.) son cruciales para llevar a cabo este complejo proceso clave en la fisiología celular y generalmente son factores que sirven como señal de qué gen es el que va a ser transcrito (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

Una característica particular de las RNA polimerasas eucariotas es que no se fijan directamente al DNA para transcribirlo sino que lo hacen mediante factores proteicos adicionales que conforman la maquinaria de transcripción; muchos actúan reconociendo sitios activos en *cis* que se clasifican como parte de los promotores. Estos factores de transcripción se asocian a diferentes estados de la RNA Pol II y modulan o facilitan su función (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

Sin embargo, la unión al DNA no es el único medio de acción de un factor de transcripción, un factor puede reconocer otro factor, puede reconocer la RNA Pol II o los elementos del núcleo del promotor; también puede estar incorporado en un complejo de iniciación. Principalmente la función de los GTFs es reconocer los elementos canónicos y permitir el ensamblaje de la RNA Pol II para dar inicio a la transcripción (Figura 74) (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

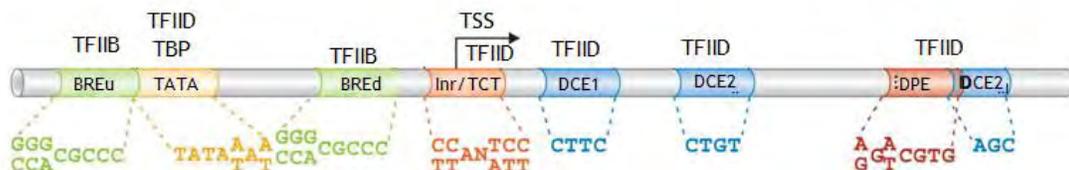


Figura 74. Elementos canónicos del núcleo del promotor eucarionte con su GTF de unión y secuencia (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

11.1.4 Iniciación (factores de transcripción)

Estos factores son necesarios ya que se ha visto que no es posible iniciar la transcripción de un gen *in vitro* cuando se utiliza sólo la RNA Pol II purificada; por lo que fue necesario adicionar componentes proteicos aislados de extractos celulares crudos. Este hecho demostró que se requieren factores de transcripción los cuales son definidos como cualquier proteína que es necesaria para la iniciación de la transcripción pero que no es parte propiamente de la RNA Pol II. Así el complejo del núcleo del promotor es complementado cuando estos GTFs son reclutados; encontrándose 7: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH y TFIIJ, y juntos forman la maquinaria de transcripción que se localiza cerca del TSS (Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Wade y Struhl 2008; Roy y Singer, 2015; Goodrich y Kugel, 2016).

Los GTFs y el proceso de iniciación de la transcripción se esquematizan en la Figura 75 y están divididos en 8 etapas:

- i. Reconocimiento de los elementos del núcleo del promotor por TFIID
- ii. Reconocimiento del núcleo del promotor por el complejo TFIID/TFIIB
- iii. Reclutamiento de la RNA Pol II por TFIIIF
- iv. Unión de TFIIE que recluta a TFIIH para completar el PIC, TFIIH abre la cadena DNA
- v. Formación de un complejo de iniciación abierto, por la separación de las cadenas del DNA
- vi. Síntesis del primer enlace fosfodiéster en el transcrito naciente de mRNA
- vii. Liberación de los contactos de la RNA Pol II y aclaramiento del promotor
- viii. Alargamiento del transcrito de RNA

TFIIA puede unirse al complejo en cualquier etapa después de la unión de TFIID, estabilizando el PIC, pero se ha visto que principalmente se une simultáneamente con TFIIB; aún se desconoce la función de TFIIJ.

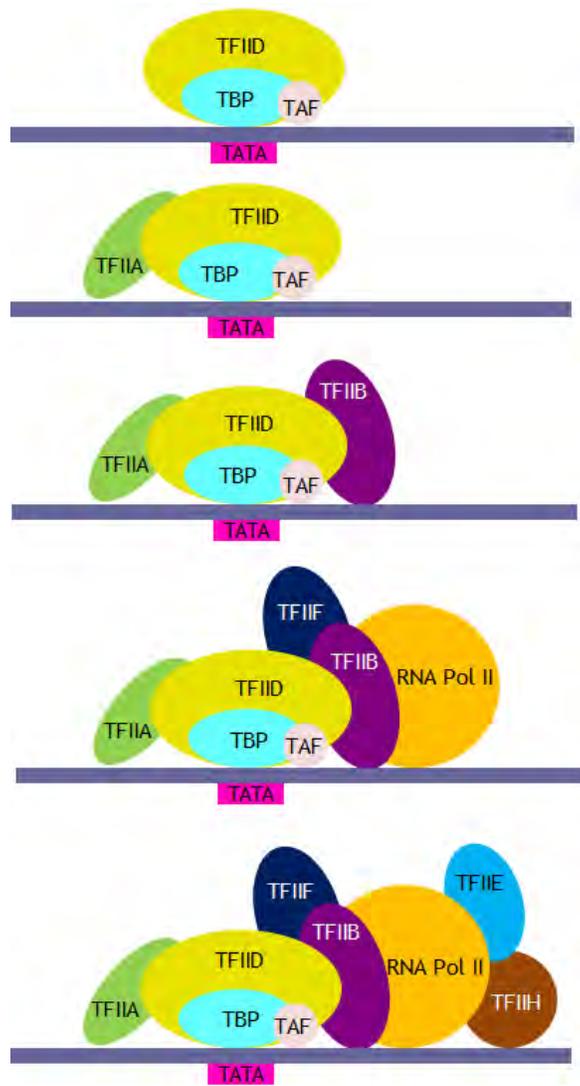


Figura 75. Orden de ensamblaje de los factores generales de transcripción y la RNA Pol II en el promotor (Modificada de Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014).

Dentro de éstos, TFIID es el único factor capaz de reconocer al elemento canónico principal la caja TATA, ya que se compone de múltiples subcomplejos que pueden contener la iniciación de la transcripción mediante la interacción con la caja TATA; dentro de estas subunidades se encuentra TBP, una proteína capaz de reconocer esta secuencia y unirse específicamente a ella. También presenta subcomplejos que no tienen esta capacidad pues reconocen otros elementos del núcleo del promotor. TAF presenta 15 tipos capaces de unirse a otros elementos como DCE, DPE y BREd por medio de TAF1, TAF2, TAF9, TAF6, pero también es un factor que ayuda la unión de TBP a la caja TATA (Roy y Singer, 2015; Goodrich y Kugel, 2016; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Wade y Struhl 2008).

TBP es una proteína que interactúa específicamente con TAF y su reclutamiento al núcleo del promotor se da por medio de SAGA que lo posiciona dentro del PIC para que se una al surco menor del DNA generando un doblez en la cadena que genera una curvatura y permite ensamblar todos los factores de mejor manera. La unión de TBP al DNA produce un giro negativo en el DNA que provee de un remodelamiento de la cromatina por SW1/SNF y el desplazamiento del nucleosoma (Roy y Singer, 2015; Goodrich y Kugel, 2016; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Wade y Struhl 2008).

Aparte de TFIID, TFIIB también hace contacto específico con el núcleo del promotor a través de BRE; ésta interacción ayuda a estabilizar la unión TBP–DNA y es posible que juegue un papel en la fuerza del promotor o en el orden de ensamblaje del PIC. Otras funciones de TFIIB involucran el reclutamiento de un promotor, transcripción abortiva, determinación del TSS, desensamblaje del promotor y formación del EC. La transcripción abortiva es cuando se producen transcritos de menos de 5 nt, éstos son inestables resultando en su degradación; también ocurre para transcritos de 10 nt ya que la longitud ideal es alrededor de 25 nt pues se genera una iniciación productiva para que la elongación comience (Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Roy y Singer, 2015; Goodrich y Kugel, 2016).

TFIIB es un polipéptido de 35 kDa el cual presenta sitios de interacción para el complejo TFIID, TFIIF y para la RNA Pol II proporcionando una plataforma para el reclutamiento de la polimerasa y el factor TFIIF que es el que la recluta; es el único responsable en la determinación del sitio de iniciación de transcripción; lo cual fue confirmado por estudios de cristalografía (Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Roy y Singer, 2015; Goodrich y Kugel, 2016).

El factor TFIIF, formado por los polipéptidos RAP30 y RAP74, de 30 y 74 kDa respectivamente, se encuentra fuertemente asociado a la RNA Pol II, incluso en ausencia de DNA y suprime interacciones inapropiadas entre la enzima y sitios que no son promotores; por lo que este factor es el reclutador de la enzima. Se cree que RAP30 ha evolucionado del factor bacteriano sigma, pues no sólo tiene homología con él sino que puede unirse directamente a la RNA Pol de *Escherichia coli* (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Shandilya y Roberts, 2012; Wade y Struhl 2008; Goodrich y Kugel, 2016).

TFIIE es un tetrámero que está compuesto de dos subunidades de 56 kDa y 34 kDa y entra al complejo de iniciación después de que TFIIF reclute a la polimerasa, aunque es posible que entre simultáneamente. Una vez que TFIIE es incorporado establemente recluta a TFIIH al promotor completando así el proceso de ensamblaje y haciendo competente a la polimerasa para iniciar la transcripción creando el EC. TFIIH es un factor complejo de 9 subunidades y múltiples actividades enzimáticas, es el factor que separa las cadenas de DNA ya que dos de sus subunidades son helicasas dependientes de ATP y pueden desenrollar el dsDNA (una en cada dirección); cinco subunidades tienen un papel en la reparación de DNA lo que permite acoplar la transcripción a la reparación simultánea (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Shandilya y Roberts, 2012; Wade y Struhl 2008; Goodrich y Kugel, 2016).

Es importante comprender que el acceso al gen, segmento de DNA, involucra importantes modificaciones en la cromatina y modificaciones en el nucleosoma para poder ingresar a este; ya que aunque éste se encuentre presente en un organismo sin acceso a él no se da la transcripción y como consecuencia no se produce la proteína en la traducción creando importantes modificaciones celulares; así el acceso al gen está dado por medio de histonas modificadoras y enzimas remodeladoras de la cromatina. Cada gen puede contener en el núcleo del promotor las secuencias (CPEs), previamente mencionadas, que están localizadas río arriba o río abajo del gen blanco para la transcripción, mientras que algunos de estos elementos se pueden encontrar en la región codificante; la caja TATA reconocida por TBP y TAFs distorsionan la secuencia de TATA para facilitar el ensamblaje de los GTFs por lo que el reclutamiento de TBP es una etapa crítica para formar el PIC, los activadores incrementan la unión de TBP al núcleo del promotor, mientras que los factores negativos como Mot1 y TAND la suprimen. En la Figura 76a se muestra cómo la unión del activador a su secuencia afín, que se encuentra en proximal o distal al núcleo del promotor, es crucial para reclutar a los GTFs que reconocen y se unen a los CPEs TATA, BREu/d y otros proximales +1 al sitio de inicio de la transcripción; otros CPEs como Inr o DPE también participan en el reconocimiento de GTFs hacia ciertos promotores (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Shandilya y Roberts, 2012; Wade y Struhl 2008; Goodrich y Kugel, 2016).

TATA se une a TBP que se encuentra en complejo con TFIID, mientras que TFIIB reconoce a los elementos BRE y facilita el reclutamiento de la RNA Pol II – TFIIF para formar el PIC. Los activadores también median la unión covalente de enzimas histonas modificadoras como acetil-transferasas (KAT) y metil-transferasas (KMT/PRMT) y de remodeladores de la cromatina dependientes de ATP para así tener acceso al gen y descondensar el nucleosoma hasta llegar al ssDNA. Añadir grupos acetilo a varios residuos de las H3 y H4 de los nucleosomas proximales al promotor además de metilarlas crean un ambiente de cromatina abierta y permisiva competente para la transcripción. Por el contrario, las metiltransferasas SUV39 en H1/H2 y tri-metilato de G9A en H3K27 conducen a la formación de un estado de cromatina represivo que no es permisivo para la transcripción. La Figura 76b muestra cómo se estabiliza el PIC cuando se accedió al gen, esto involucra que los nucleosomas que se encuentran rodeando al promotor tienen un código de histonas diferente que permiten al promotor la transcripción activa. Esto es debido a modificaciones epigenéticas como acetilación de H3 en su lisina 9 y 14 (H3K9/14) o metilación de la H3 en lisina 4 (H3K4). A su vez la CTD de la RNA Pol II es fosforilada en su serina 5 para favorecer el ensamblaje. El nucleosoma H3K4 trimetilado proximal atrae a los remodeladores de cromatina ATP dependientes hBAF y hCHD1 que con la ayuda de chaperones histonas (ASF1, nucleolina, NPM1) hacen que la plantilla de DNA sea accesible para que comience la transcripción (Roy y Singer, 2015; Trujillo, Guzmán y Carreón, 2014; Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Shandilya y Roberts, 2012; Wade y Struhl 2008; Goodrich y Kugel, 2016).

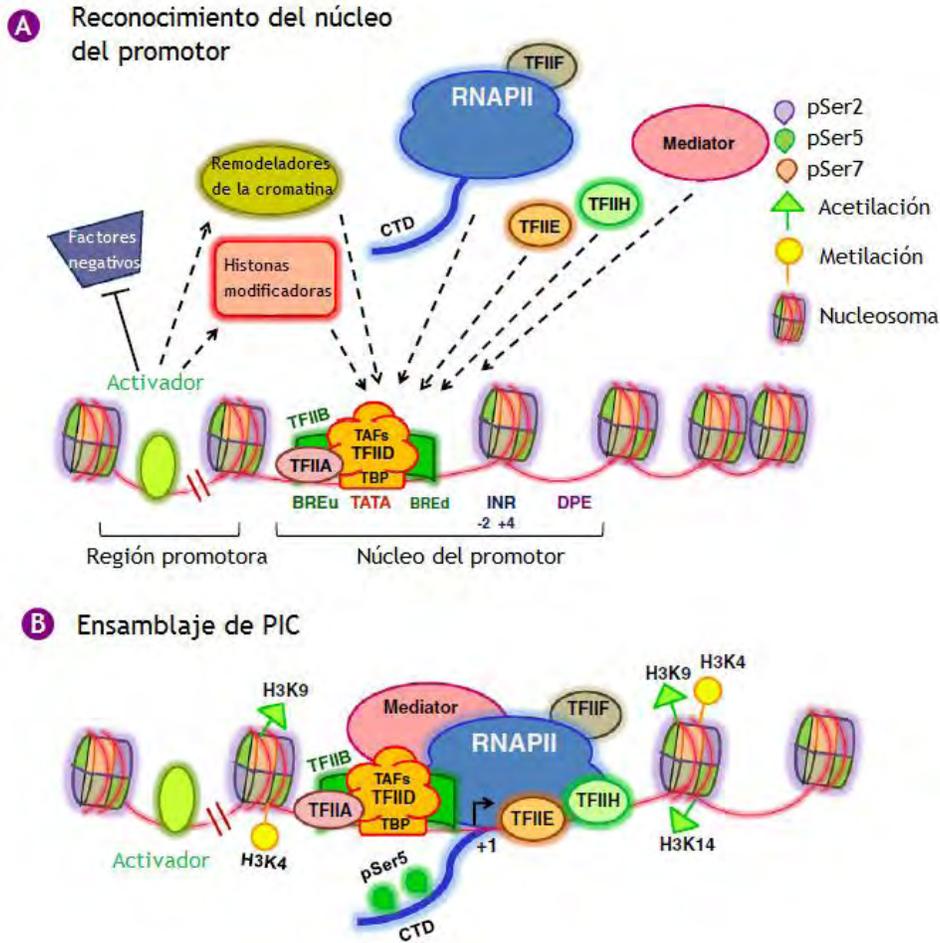


Figura 76. Ensamblaje del PIC y modificaciones del nucleosoma (Modificada de Shandilya y Roberts, 2012).

El ensamblaje de la maquinaria de transcripción está involucrado en la etapa de iniciación de la transcripción desde el TFIIB hasta TFIIH y el EC corresponde a la elongación cuando este está activo y funcional (presenta CTD fosforilada).

11.1.5 Elongación

Aunque la elongación de la transcripción es altamente procesiva, no es continua ni ininterrumpida; durante la elongación la RNA Pol II constantemente se pausa debido a que se presentan obstáculos como la mala incorporación de un nt al RNA, una lesión en la cadena molde de DNA o señales específicas de secuencias reguladoras. En estos casos, RNA Pol II retrocede a través del DNA al disociar el extremo 3' del RNA de la cadena molde, la eliminación de esa parte del transcrito es una actividad intrínseca y se da en el sitio activo de la enzima que es ayudada por el TFIIS pero el retroceso solo puede ser reversible si es menor a 5 nt; en más 7 – 9 nt es irreversible generando una

arresto del complejo y TFIIS induce la escisión del transcrito. TFIIS también estimula el alargamiento del RNA limitando el tiempo de pausa de la enzima. Por medio de cristalografía se reveló que la RNA Pol II en su estructura presenta un sitio de unión a este factor en donde se revisa la cadena denominado sitio "P" que se encuentra dentro del canal secundario (Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Wade y Struhl 2008; Zhang, Najmi y Schneider, 2017).

Múltiples factores (FACT, Spt4, Paf1, complejo TREX, Spt6, Swi/Snf) viajan junto con la RNA Pol II en la región codificadora en la elongación. Spt4 es un factor que influye en la pausa de la RNA Pol II en presencia del DRB, pero cuando forma un complejo con Spt5 promueve la procesividad de la elongación y es capaz de cerrar el sitio activo de la RNA Pol II manteniendo la estabilidad de la maquinaria. Stp6 es un histona chaperona que media el re-ensamblaje del nucleosoma y modificaciones de las histonas para alterar la estructura de la cromatina estimulando la elongación pues favorece la separación de las cadenas de DNA (Wade y Struhl 2008; Goodrich y Kugel, 2016; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Cole y Cowling, 2008).

El complejo Swi/Snf puede regular negativa o positivamente la transcripción por el remodelamiento de la cromatina y Paf1 se ve involucrado en las cuatro etapas de la transcripción ya que procesa al DNA y modifica a las histonas. Este factor forma un complejo con TFIIB y TFIIF que puede producir mal apareamiento de TBP; pero en la elongación actúa directamente aumentando la eficiencia de la reacción y puede o no estar asociado con TFIIS para estimular la acción de la RNA Pol II (Wade y Struhl 2008; Goodrich y Kugel, 2016; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Cole y Cowling, 2008).

El extremo CTD de la subunidad más grande de la RNA Pol II contiene múltiples copias de secuencias de repeticiones Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 que son fosforilados para determinar su actividad; esta fosforilación proporciona un medio para reclutar modificadores de histonas y complejos de remodelación en la cromatina, como los mencionados previamente, que influyen en la iniciación, elongación y terminación de la transcripción. Ser5 es fosforilada por TFIIH y Ser2 por P-TEFb/CTK1 (Figura 77) (Wade y Struhl 2008; Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Goodrich y Kugel, 2016).

En la elongación la fosforilación del extremo CTD es crítico para la maduración del mRNA en eventos como formación del capuchón (capping), splicing, poliadenilación, exportación del núcleo y metilación de histonas. La transición entre la iniciación y elongación de la

transcripción se determinó mediante ChIP en donde se observó que es rápida si la cantidad de RNA Pol II en el promotor es equivalente al nivel en las secuencias codificadas; por otro lado, es lenta si está más en el promotor y la asociación entre estos genera un TR. En células eucariotas se ha encontrado que el TR promedio es de 0.9 indicándonos que hay una transición rápida entre el inicio y elongación de la transcripción lo que corrobora que la RNA Pol II tenga un tiempo de pausa. Otro factor que regula este tiempo es el HSF ya que recluta factores que liberan a la polimerasa de su pausa; el reclutamiento de P-TEFb activa este tiempo mientras que su inhibición libera a la enzima de la pausa (Wade y Struhl 2008; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Cole y Cowling, 2008; Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Goodrich y Kugel, 2016).

El mediador es un complejo modular que comunica los activadores específicos de genes entre el núcleo de la maquinaria de transcripción; éste logra su función al regular positiva y negativamente la información entre esos dos componentes y regula la transición inicio → elongación cuando es fosforilado por ELK1. Así, todos los factores previamente mencionados son liberados a la maquinaria para promover o suprimir la elongación del RNA (Wade y Struhl 2008; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Cole y Cowling, 2008; Zhang, Najmi y Schneider, 2017; Goodrich y Kugel, 2016).

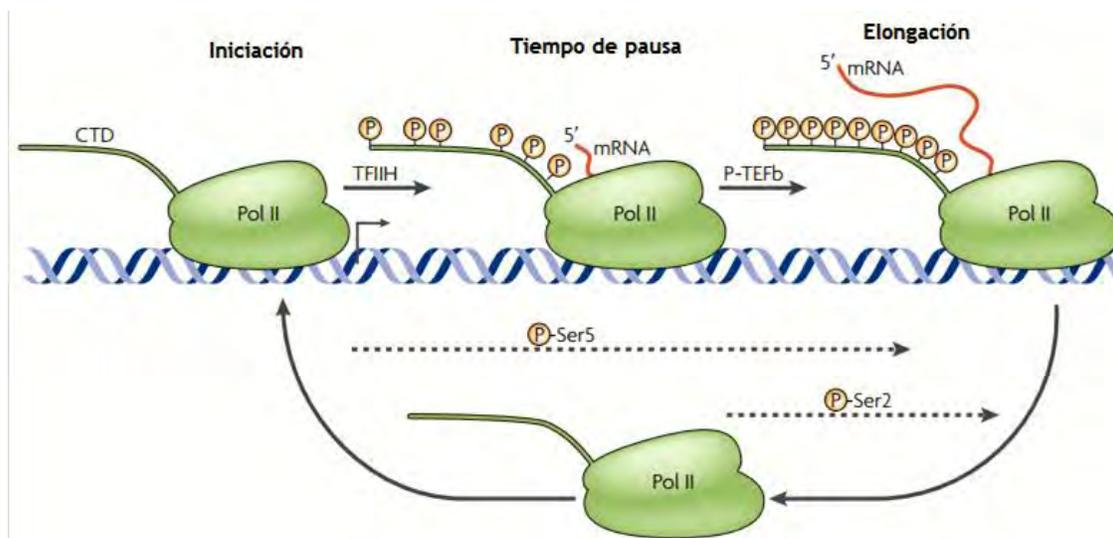


Figura 77. Fosforilación del EC en el extremo CTD para la transición inicio→elongación que involucra el tiempo de pausa de la RNA Pol II. La RNA Pol II fluye en un ciclo de fosforilación y desfosforilación en el extremo CTD durante la transcripción. El reconocimiento del promotor y formación del PIC ocurre cuando CTD se encuentra desfosforilada. CTD es fosforilada en Ser5 por TFIIF lo que genera el tiempo de pausa; y la elongación es estimulada por P-TEFb que fosforila la CTD en Ser2 (Modificada de Cole y Cowling, 2008).

El EC es un ensamblaje de macromoléculas estable que es capaz de operar en contra de fuerzas opuestas; su estabilidad es requerida para la síntesis de transcritos largos y en eucariotas pueden llegar a ser hasta de 10^8 nt. Sin embargo la terminación de la transcripción y disociación de este complejo es requerido por la célula para su regulación independiente, maduración del mRNA y evitar el solapamiento de eventos transcritivos que pueden interferir unos con otros (Hall, 2017; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

Debido a su estabilidad el desensamblaje del EC requiere alta cantidad de energía y depende de un tiempo preciso; el complejo se mantiene unido por una complicada red de interacciones intermoleculares que incluyen una llave doble de 8 – 10 pb dentro del canal principal de la RNA Pol II entre la cadena molde de DNA y el RNA sintetizado, remodelar estas interacciones mientras la enzima se mueve a través del DNA afectaría la tasa y procesividad de elongación pudiendo pausar la reacción generando un retroceso en la cadena; por lo que EC bajo circunstancias específicas se desestabiliza permitiendo disociarse irreversiblemente. Dependiendo de la competencia de la RNA Pol II en la transcripción ésta puede entrar en un estado de pausa, este mecanismo está mediado por la presencia de proteínas negativas como NELF y DSIF que generan una transcripción abortiva al causar el estado de pausa de la enzima Pol pues se unen a esta y la inactivan (Hall, 2017; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

Los nucleosomas proximales al promotor pausado se caracterizan por la presencia de histonas bivalentes modificadas y también se asocian al estado en pausa de la polimerasa, la metilación en H3K4 es un estado activo de la cromatina inhibiendo la pausa, mientras que la metilación en H3K27 es un estado inactivo de la cromatina que puede generar pausa en la RNA Pol II (Hall, 2017; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

La polimerasa en pausa está enriquecida por fosforilación en Ser7 en su CTD, CDK9 una subunidad del complejo pTEFB disminuye esta represión de la polimerasa al fosforilar a NELF en su Spt5 y a DSIF disociando a NELF mientras que DSIF ya inactiva se mueve junto con la RNA Pol II durante la elongación (Figura 78a) (Hall, 2017; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

Estudios recientes sugieren que Spt5 promueve el reclutamiento de las enzimas formadoras del capuchón en los transcritos nacientes. La RNA Pol II puede cambiar a un

estado productivo de iniciación cuando todas las señales o factores de inhibición son superados; los nucleosomas que rodean al sitio activo del promotor contienen histonas marcadas para una transcripción activa; la iniciación activa es dependiente de TFIIH y fosforilación de la polimerasa en su CTD en Ser5, además de esto se requiere que el TFIIIB se encuentre fosforilado en Ser65 para que este proceso se lleve a cabo. La fosforilación de CTD recluta enzimas formadoras del capuchón a la región 5' del mRNA naciente esto activa el escape de la RNA Pol II del promotor hacia el ORF del gen (Figura 78b). Seguido del desmonte del promotor la RNA Pol II entra a la fase de elongación atravesando toda la región codificante. TFIIIS, FACT y elongina favorecen la procesividad de la enzima durante esta etapa en donde algunos componentes del PIC todavía se encuentran asociados al promotor formando una estructura base mientras que TFIIIB, TFIIIF y TFIIIE se disocian (Hall, 2017; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

CDK9 con ayuda de la fosfatasa Rtr1 (RPAP2 en humanos) fosforilan a CTD de la polimerasa en Ser2 mientras que la fosfatasa SSU72 remueve la fosforilación en Ser5 para permitir la fosforilación en Ser2. El estado fosfo-Ser2-CTD recluta el complejo de splicing para el mRNA para que se realice de manera co-transcripcional mientras que los nucleosomas que se encuentran en el ORF poseen una marca de metilación en H3K36 que activa la elongación favoreciendo que la polimerasa progrese (Figura 78c) (Hall, 2017; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

Una vez que la polimerasa se encuentra con una señal de pausa en el extremo 3' (cola Poli-A) se reclutan los factores CPSF y CstF para facilitar la terminación, CPSF se une a la cola Poli-A induciendo la pausa de la RNA Pol II y, eventualmente estimulando la escisión y liberación de la enzima; la cola CTD es hipo-fosforilada en serina 2 como señal de término para que la región transcrita por la RNA Pol II sea re-ensamblada en cromatina con la ayuda de HDACs para volver a formar parte del nucleosoma (Figura 78d) (Hall, 2017; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

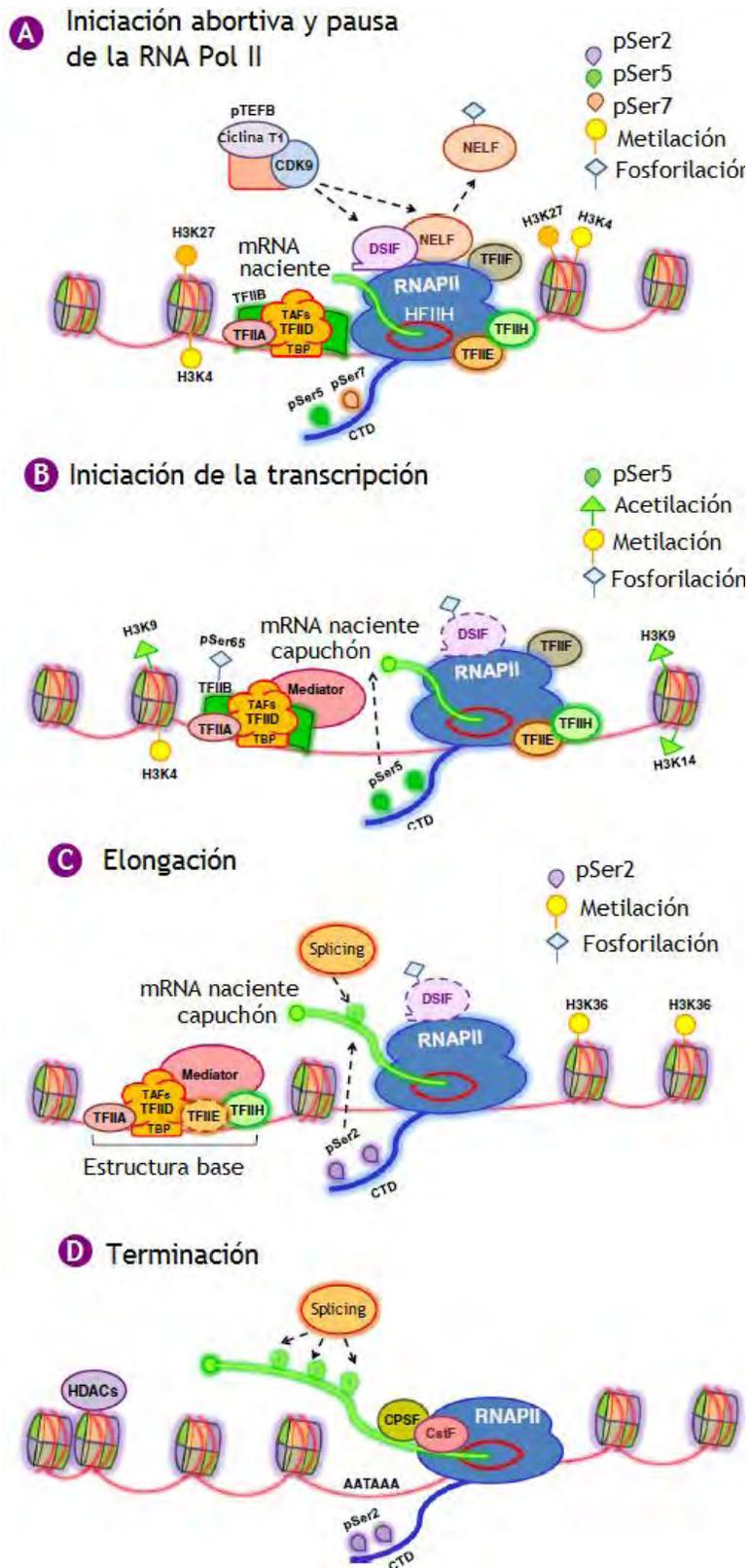


Figura 78. Ciclo de elongación (Modificada de Shandilya y Roberts, 2012).

11.1.6 Terminación

En esta etapa de la transcripción se puede reciclar la polimerasa formando un bucle en el gen, esto involucra que las regiones de terminación y promotoras se aproximen durante la transcripción para facilitar el reciclaje de la RNA Pol II y se den múltiples ciclos de transcripción (Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016).

Los GTFs y el mediador pre-unidos a la estructura base se estabilizan formando la estructura base de reiniciación al interactuar con el activador y TFIIB fosforilado lo que provoca una interacción con la RNA Pol II y los complejos de terminación para mediar el contacto promotor – terminador (bucle del gen) incrementando la eficiencia en la reiniciación por la RNA Pol II (Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

El reciclaje de la polimerasa está mediado por su desfosforilación en donde Ssu72 (SCP1 en mamíferos) desfosforila Ser5 mientras que Fcp1 lo hace en a Ser2 haciéndola competente para iniciar otro ciclo de transcripción (Figura 79). La terminación de la transcripción por la RNA Pol II se ha estudiado especialmente en levaduras encontrándose dos vías principales de terminación, la vía CPF y la vía NSS (Figuras 80 y 81, respectivamente) (Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

La vía CPF termina la transcripción de mRNAs a través de un complejo de múltiples subunidades y varios factores adicionales que son requeridos para el eficiente desmantelamiento del EC al final de los genes blanco. La liberación de la RNA Pol II está asociada y precedida por el procesamiento del extremo 3' del transcrito naciente que simultáneamente incluye escisión y poliadenilación de la molécula del mRNA. Este procesamiento y terminación del extremo 3' está activado por señales multipartida de terminación en el mRNA naciente que son reconocidas por los componentes de CPF (Figura 80a) para que éste interactúe directamente con la RNA Pol II cuando es reclutado al EC; la escisión del mRNA se da antes de que el DNA se libere de la polimerasa. Se cree que este mecanismo ocurre por dos posibles modelos, el primero es denominado “modelo alostérico” (Figura 80b) y sucede cuando estas señales de terminación generan que la polimerasa tenga un cambio conformacional que la inactiva; el segundo es el “modelo de torpedo” (Figura 80c) e incluye la asociación de una 5'→3' exonucleasa (Rat1 en levaduras, XRN2 en humanos) al EC que degrada el mRNA recién sintetizado aún anclado a la RNA Pol II y provoca la terminación. Estudios recientes muestran un modelo nuevo, en donde un componente de CPF, Pcf11 (Figura 80d) puede desmantelar el EC al

unirse simultáneamente al mRNA y la polimerasa; pero este modelo solo ha sido abalado en ensayos *in vitro* (Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016; Shandilya y Roberts, 2012).

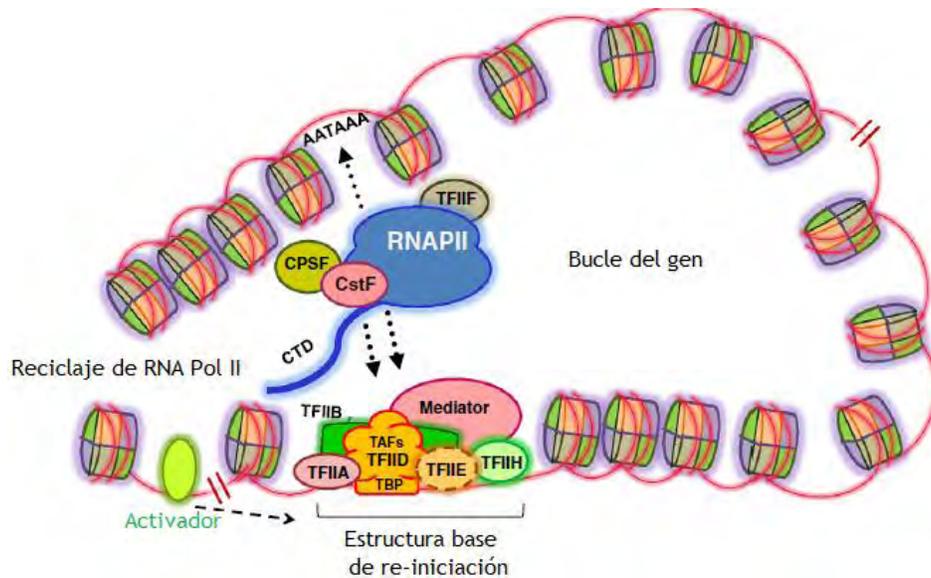


Figura 79. Terminación de la transcripción en eucariotes (Modificada de Shandilya y Roberts, 2012).

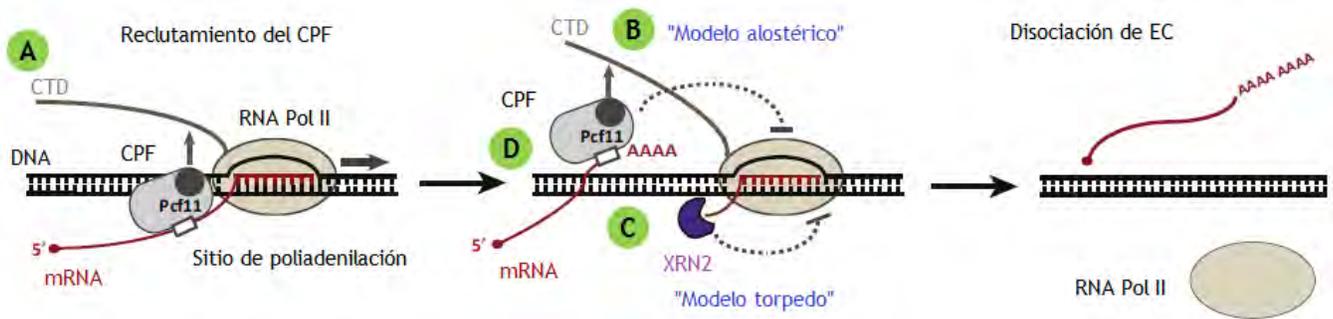


Figura 80. Terminación de la transcripción vía CPF. Se muestran los dos modelos principales, en el modelo de torpedo XRN2 depende de una previa escisión del mRNA por el complejo CPF. El modelo alostérico se da cuando las señales de terminación generan un cambio en la estructura de la RNA Pol II por lo que pierde los GTFs y el EC se disocia (Modificada de Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016).

En la segunda vía, NNS (Figura 81), la terminación se da por la producción de ncRNAs que son funcionales y estables y por la producción de CUTs; en esta vía dos proteínas de unión al RNA, Nrd1 y Nab3, reconocen una secuencia corta de elementos del mRNA naciente y sirven como adaptadores para ensamblar el complejo NNS. Nrd1 también interactúa con la polimerasa para desestabilizarla y posteriormente la RNA helicasa Sen1

interactúa con el mRNA para desaparecer los híbridos DNA-RNA y así desaloja a la polimerasa ya inestable. Esta vía es análoga a la terminación dependiente de Rho en bacterias, pues Rho y Sen1 interactúan con el transcrito para dismantlar el EC de una manera ATP dependiente. Existen otros dos mecanismos de apoyo que favorecen estas vías, el primero está dado por el factor Reb1, éste induce un tiempo de pausa en la polimerasa para que sea ubiquitinada y degradada por el proteosoma. El segundo es un mecanismo dependiente de la enzima tipo RNasa II Rnt1 que escinde al mRNA para dar punto de entrada a XRN2 y promover la separación del transcrito dando lugar a la terminación (Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016).

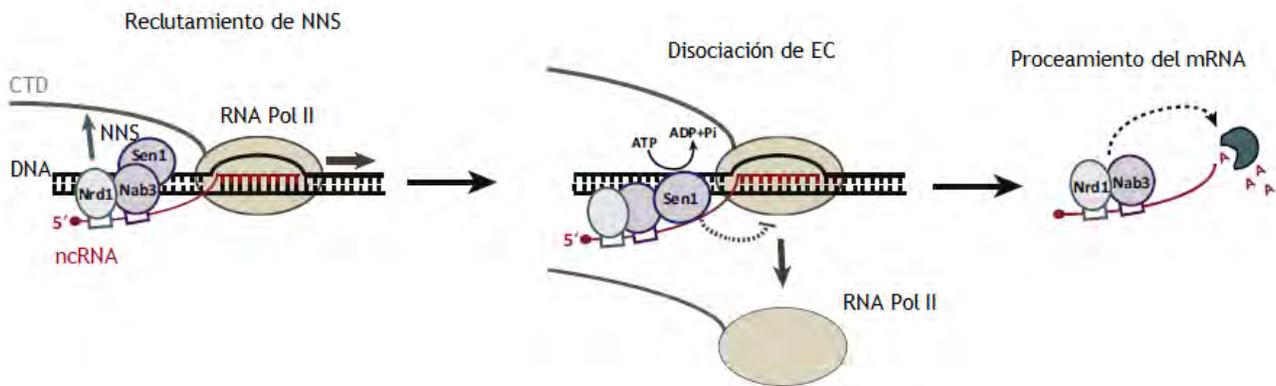


Figura 81. Terminación de la transcripción vía NNS. Nrd1 y Nab3 interactúan con el transcrito para reclutar a Sen1 que dismantla el EC por medio de hidrólisis de ATP (Modificada de Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016).

También se ha visto que el RNA puede unirse a otros RNAs que favorecen la terminación de la transcripción; un ejemplo es Xist, un lncRNA que es responsable del silenciamiento transcripcional de uno de los dos cromosomas X en células femeninas ya que Xist se asocia al cromosoma X para extenderse a lo largo de éste y finalmente inhibir la transcripción de la RNA Pol II; este mecanismo requiere de la asociación con la proteína SHARP que favorece la inhibición de la polimerasa, simultáneo al reclutamiento de HDAC3 que es responsable de la represión transcripcional por el remodelamiento en la estructura de la cromatina (Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016; Hall, 2017).

11.1.7 Formación del capuchón

En la transcripción el transcrito generado es un pre-mRNA puesto que en eucariotas presenta intrones y exones. Al no codificar para nada los intrones necesitan ser removidos para dar un mRNA maduro. Este mecanismo de maduración se hace por medio de

splicing y simultáneamente se da la poliadenilación del extremo 3' del transcrito y la formación del capuchón en el extremo 5' con la finalidad de proteger el pre-mRNA y que éste no se degrade durante su maduración (Hall, 2017).

La estabilidad y la eficiencia en traducir el mRNA está influenciada por el capuchón que es colocado en el extremo 5'; éste es co-transcripcionalmente añadido (Figura 83) y consiste en una guanina metilada en posición N7 pirofosfatasa (m7GDP/m7G) que se une al nucleósido terminal del transcrito creando un enlace inusual 5' – 5' pirofosfato (m7G5'–ppp–5'). A este mecanismo se le conoce como capping o formación del capuchón (Ramanathan, Robb y Chan, 2016; Jiao et.al. 2010; Cowling, 2010).

El proceso es llevado a cabo por la combinación de la actividad de tres enzimas, la trifosfatasa (TPasa), guanililtransferasa (GTasa) y guanina-N7-metiltransferasa (G-N7-MTasa); la presencia del grupo metilo en el capuchón es esencial para el reconocimiento de las proteínas CBP y eIF4E así como la enzima Dcp2 que des-capucha a la molécula. La estructura m7GDP se encuentra en todas la células eucariotas y está ligada a que el enlace 5' – 5' sea irreversible (Ramanathan, Robb y Chan, 2016; Jiao et.al. 2010; Cowling, 2010).

La adición del capuchón protege al pre-mRNA de escisión por una exonucleasa 5'→3' además de ser la señal para el reclutamiento de proteínas involucradas en el splicing, poliadenilación y exportación del núcleo del transcrito. También actúa reclutando los factores de iniciación para la síntesis de proteínas formando un bucle de RNA durante la traducción. La formación del capuchón m7GDP es simultánea a la transcripción del sustrato (mRNA) y se cataliza por las enzimas previamente mencionadas que son reclutadas por la RNA Pol II cuando está fosforilada en Ser5 y se da cuando el transcrito ha alcanzado 25 – 30 nt de longitud (Ramanathan, Robb y Chan, 2016; Jiao et.al. 2010; Cowling, 2010).

El mecanismo comienza cuando la TPasa remueve un grupo fosfato del mRNA creando un extremo 5' difosfatado en el mRNA (Figura 82a) para que así la GTasa transfiera un grupo GTP a ese extremo 5' difosfatado del mRNA creando un enlace covalente GMP – lisina pues se liberan dos fosfatos (Figura 82b). Finalmente la G-N7-MTasa añade un grupo metilo a la amina 7 del GMP para finalizar la estructura del capuchón (Figura 82c); adicionalmente la proteína Hcm1 actúa como cofactor de la G-N7-MTasa y la proteína

SAM actúa como donador del grupo metilo; toda la reacción se da en el núcleo de la célula (Ramanathan, Robb y Chan, 2016; Jiao et.al. 2010; Cowling, 2010).

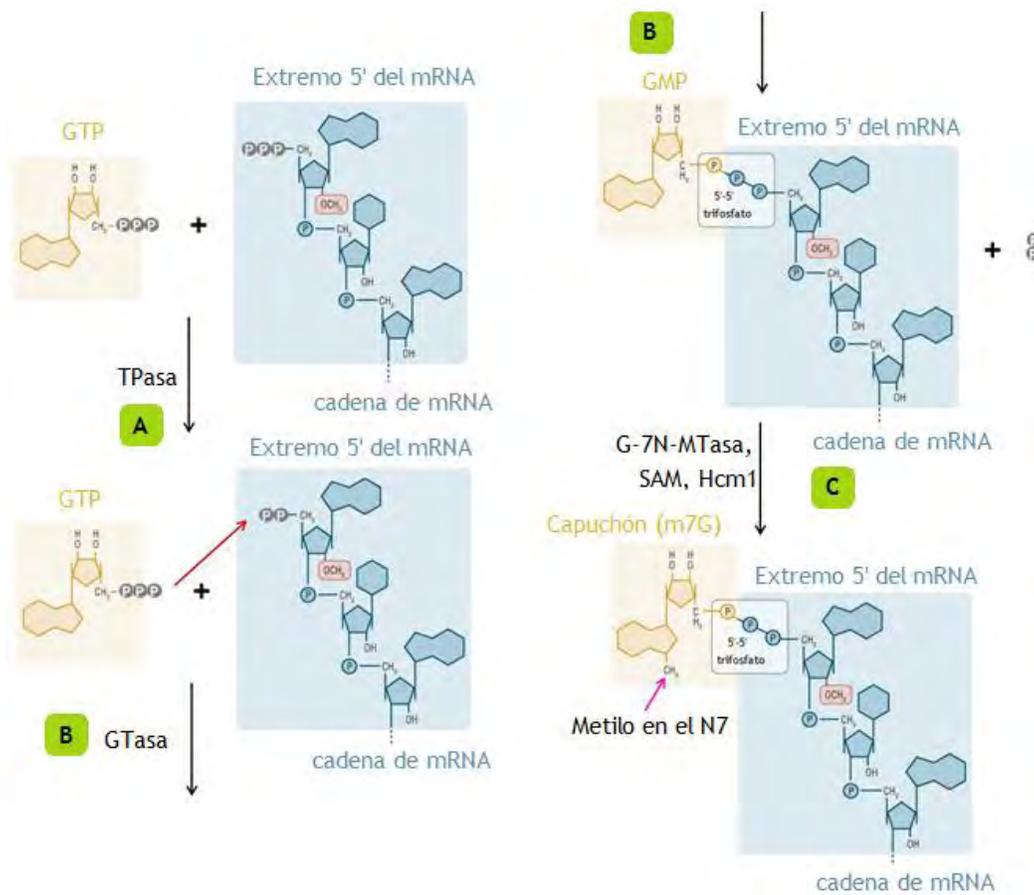


Figura 82. Estructura y formación del capuchón (Modificada de Cowling, 2010; Ramanathan, Robb y Chan, 2016).

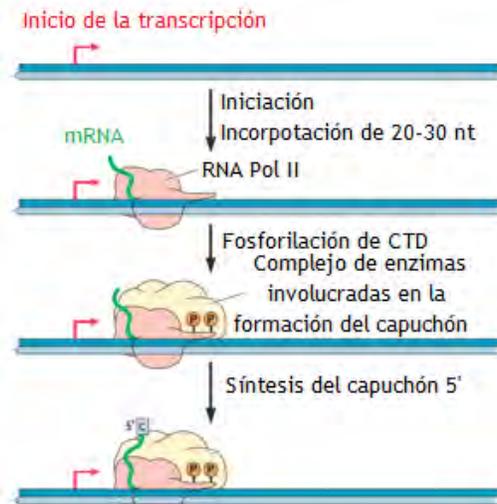


Figura 83. Esquematación de la adición del capuchón co-transcripcionalmente (Modificada de Ramanathan, Robb y Chan, 2016).

Estudios recientes han confirmado que el capuchón está involucrado en splicing, poliadenilación y exportación del núcleo. Primero se demostró que las enzimas GTasa y G-N7-MTasa no se localizan sólo en el extremo 5' sino que se encuentran a lo largo de todo el gen transcrito incluyendo el extremo 3', lo que potencializa la poliadenilación en este extremo. En la poliadenilación el extremo 3' del pre-mRNA es modificado por dos etapas, una escisión endonucleolítica y la adición de una cola Poli-A, la escisión es dependiente de CBC un complejo (CBP80-CBP20) que se une al capuchón. El empalme es dependiente de que el capuchón se encuentre metilado pues si no la reacción es inhibida ya que el grupo metilo sirve como señal del reconocimiento del intrón que se encuentra próximo al extremo 5'. Así mismo el splicing está mediado por la acción de CBC y sus componentes interactúan con el capuchón produciendo un sitio de reconocimiento de empalme 5'. Por último, la exportación del mRNA hacia el citoplasma es dependiente del capuchón, ya que si éste se encuentra presente inhibe la reacción manteniendo el transcrito en el núcleo (Cowling, 2010; Jiao et.al. 2010; Ramanathan, Robb y Chan, 2016).

Existen otras proteínas involucradas en el mecanismo de formación del capuchón y que lo regulan, por ejemplo Rail es una pirofosfohidrolasa que hidroliza el extremo 5' del RNA trifosfatado cuando no está unido al capuchón para posteriormente ser degradado por la exorribonucleasa 5'→3' Rat14, indicándonos que Rail actúa como proteína controladora del mecanismo. También se ha observado que cuando ya se formó el capuchón la actividad de Rail se potencializa por la enzima Rat1 generando una hidrólisis en el enlace 5'-5' trifosfato llevando a la degradación del mRNA, esto sucede siempre y cuando no se haya añadido el grupo metilo pues en la presencia del capuchón metilado Rail se desestabiliza perdiendo su función. Así mismo se ha visto que la metilación del capuchón puede ser disminuida por la eliminación de glucosa o aminoácidos en el medio indicándonos así la necesidad de la célula hacia estos componentes para metilar el capuchón, al disminuir esta actividad el capuchón es susceptible a la actividad de Dcp2 (Jiao et.al. 2010; Zhai y Xiang, 2014).

11.1.8 Poliadenilación

Como ya se mencionó la poliadenilación del extremo 3' del pre-mRNA está dada en dos etapas, la escisión endonucleolítica y la adición de una cola Poli-A en ese sitio con la finalidad de proteger el transcrito durante la exportación nuclear, estabilizar los transcritos maduros y hacer más eficaz la traducción del mRNA. En este proceso es añadida una

secuencia larga de ~50–100 adenosinas en mamíferos y 30 adenosinas en levaduras en el extremo 3' del pre-mRNA, a lo que se le denomina cola Poli-A y para que se lleven a cabo las dos etapas se requiere de acciones coordinadas por factores proteicos y de elementos de secuencia específica que sirven como guía para que los factores trans formen el complejo de procesamiento en el sitio de escisión (Yeh y Yong, 2016; Curinha et.al., 2014; Matoulkova et.al., 2012; Kaida, 2016).

Los principales componentes de estos factores son CPSF, CSTF, CFI y CFII, así como la enzima PAP; los elementos auxiliares río arriba USE y río abajo DSE juegan un papel favorecedor en la actividad de PAP al emplear a PAS pues su centro está codificado por una secuencia canónica AAUAAA que sirve como blanco para la escisión. La escisión nucleotídica comienza cuando el complejo USE-PAS-DSE genera un patrón que señala el sitio de escisión y procesa el extremo 3' del mRNA, CPSF es un complejo de 6 proteínas (CPSF 1–4, FIP1L1, WDR33) que reconoce y se une a PAS donde la unión es asistida por el complejo CSTF que se une a DSE. Posteriormente la endonucleasa CPSF3 asistida por CFI y CFII cortan el pre-mRNA en el sitio de escisión que está 15 – 30 nt río abajo de PAS y 0 – 20 nt río arriba de DSE (Yeh y Yong, 2016; Curinha et.al., 2014; Matoulkova et.al., 2012; Kaida, 2016).

Finalmente PAP es reclutada por hFip1 a la maquinaria de poliadenilación en el sitio de escisión para catalizar la adición de la cola Poli-A dándole estabilidad al mRNA protegiéndolo de exonucleasas, y el complejo PABP es atraído mientras crece la cola Poli-A, éste necesita de por lo menos 11 – 14 adenosinas para unirse a ésta, estabilizarla y protegerla (Figura 84). Este mecanismo de poliadenilación se da en el núcleo de la célula y también es necesaria para la exportación al citoplasma. Aparte existe la poliadenilación citoplasmática que se ve involucrada en la regulación de la expresión génica (Yeh y Yong, 2016; Curinha et.al., 2014; Matoulkova et.al., 2012; Kaida, 2016).

Simplekin es una proteína que solamente funciona como andamio para anclar todas las proteínas y formar el complejo de poliadenilación, ésta también juega un papel en la poliadenilación citoplasmática al unir CPSF con CPEB. Generalmente cuando el mRNA es exportado al citoplasma y se une a los ribosomas para ser traducido y des-adenilado, sin embargo hay veces en que el mRNA se guarda en el citoplasma con una cola Poli-A corta permaneciendo inactivo transcripcionalmente pero que presenta un potencial de activación futura (Yeh y Yong, 2016; Curinha et.al., 2014; Matoulkova et.al., 2012; Kaida, 2016).

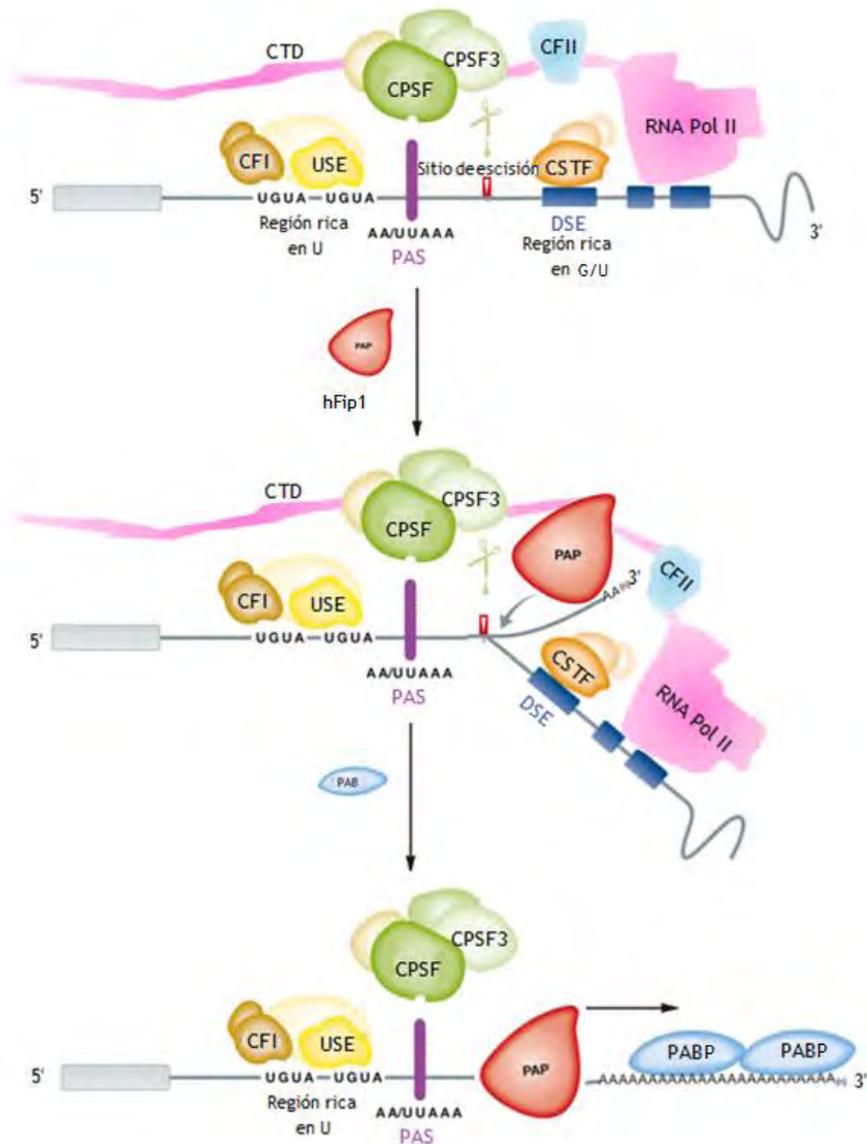


Figura 84. Escisión endonucleolítica y la adición de cola Poli-A con el extremo 3' del mRNA (Modificada de Yeh y Yong, 2016).

11.1.9 Poliadenilación alternativa

Últimamente se ha visto que los genes humanos poseen más de un sitio de poliadenilación sugiriendo que un mecanismo de regulación en la expresión génica sea la APA. Ésta le contribuye complejidad al transcriptoma y es posible que más del 70% de los genes sean capaces de producir isoformas del mRNA por este mecanismo (Kaida, 2016; Yeh y Yong, 2016).

Los eventos APA pueden ser clasificados en 4 grupos: UTRAPA, CRAPA, eventos APA clásicos y eventos APA intrónicos (Figura 85). En el caso de UTRAPA los sitios alternos para la poliadenilación se localizan en el extremo 3' UTR del mRNA proximales al codón de paro, por lo tanto se generan isoformas alternativas de mRNA que difieren en la longitud de su 3' UTR sin afectar la capacidad codificante del mRNA debido a que el sitio 3' UTR contiene sitios de unión para proteínas reguladoras del RNA y microRNAs. El mecanismo UTRAPA altera la estabilidad, localización o eficiencia en la traducción de esa isoforma de mRNA (Curinha et.al., 2014; Kaida, 2016; Yeh y Yong, 2016; Creemers et.al., 2015; Matoulkova et.al., 2012).

Por otro lado en CRAPA los sitios alternos de poliadenilación se encuentran en intrones río arriba del gen lo que produce múltiples isoformas que carecen de algunos polipéptidos en el extremo C-terminal lo que conlleva a la formación de proteínas truncas que se comportan de manera diferente. Los eventos APA clásicos generan isoformas en donde el último exón difiere del mRNA original; y los eventos APA intrónicos implican escindir el intrón de PAS generando la extensión de un exón interno y haciéndolo terminal modificando la función de la proteína, algunos autores consideran estos eventos dentro de los CRAPA. Los sitios alternos de poliadenilación poseen señales no canónicas con secuencia AUUAAA, AGUAAA o UAUAAA que son consideradas más débiles que la señal de la poliadenilación normal que genera PAS (Curinha et.al., 2014; Kaida, 2016; Yeh y Yong, 2016; Creemers et.al., 2015; Matoulkova et.al., 2012).

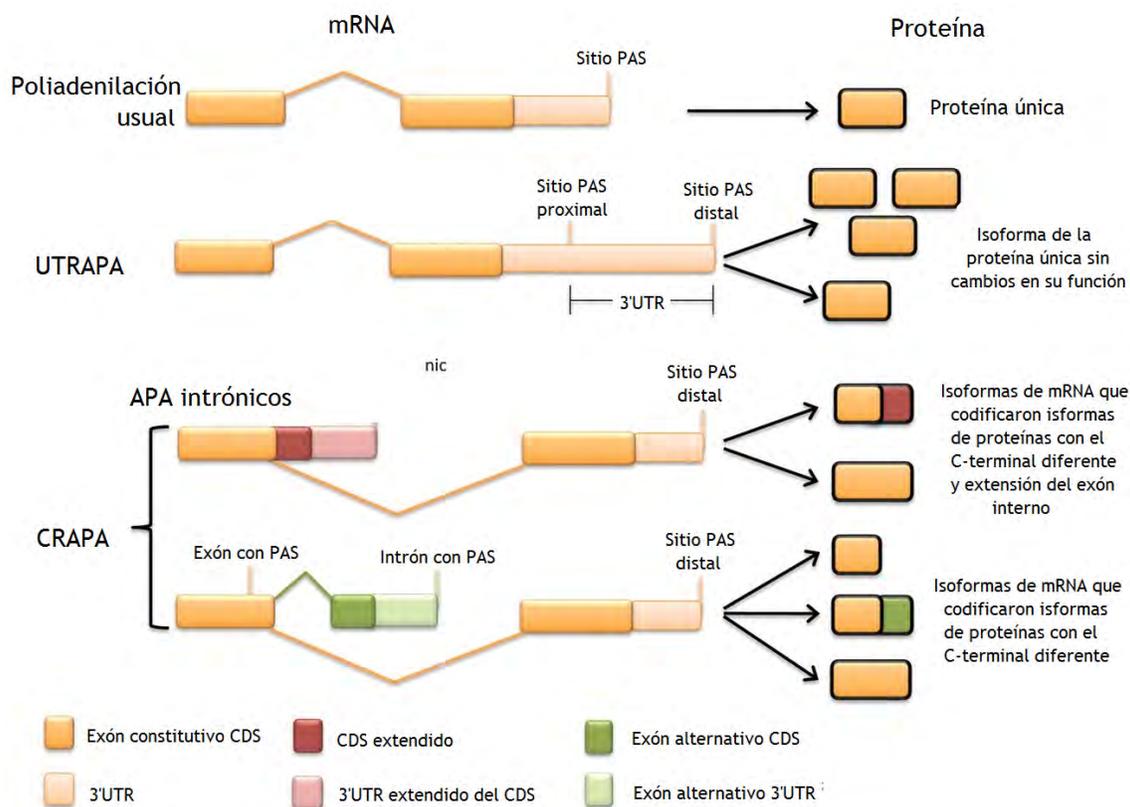


Figura 85. Mecanismos de APA (Modificada de Curinha et.al., 2014).

Como el acortamiento en la región 3' UTR modifica la expresión génica, el mecanismo UTRAPA ha sido de interés recientemente pues estos nuevos perfiles de poliadenilación permiten identificar enfermedades específicas dependientes de APA; también se ha visto que la sobre activación de PAP en la poliadenilación usual genera un mal pronóstico en algunos tipos de cáncer. Así la poliadenilación alternativa y la longitud de la cola Poli-A son factores determinantes en el desarrollo de enfermedades ya que las anomalías en el procesamiento del extremo 3' del mRNA son comunes en padecimientos oncológicos, neurológicos, hematológicos, cardiológicos, inmunológicos, y en la proliferación, diferenciación y desarrollo celular; como se muestra en la tabla 17 (Curinha et.al., 2014; Creemers et.al., 2015).

Tabla 17. Enfermedades relacionadas con mecanismos APA y poliadenilación del extremo 3' del mRNA (Modificada de Curinha et.al., 2014; Creemers et.al., 2015).

Tipo de enfermedad	Afección	Gen	APA/PA	Mecanismo
Hematológicas	β talasemia	β globina	APA	Mutaciones en la cola Poli-A a causa de la elongación 3' UTR y defectos en la terminación de la transcripción
	α talasemia	α globina	APA	
	Trombofilia	Protrombina	PA	
Proliferación y oncológicas	Condiciones proliferativas en cáncer	IMP-1	APA	Acortamiento del 3' UTR
	Cáncer de mama	-	APA	Alargamiento del 3' UTR
	Cáncer colorectal	DKMN, PDXK y PPIE	APA	Acortamiento del 3' UTR durante la progresión del cáncer
	Glioblastoma	CCND1 y MECP2	APA	Acortamiento del 3' UTR
Inmunológicas	Síndrome IPEX	FOXP3	PA	Mutaciones en la señal de Poli-A
	Síndrome Wiskott-Aldrich	WASP	APA	Mutaciones en el 3' UTR que genera nuevas señales de Poli-A
	Osteoartritis y escleroderma	Genes para colágeno	PA	Poliadenilación dependiente de USE
	Lupus eritematoso	GIMAP5	APA	Mutación en la señal de Poli-A

	Alzheimer	COX-2 y	APA	Aumento de PAS
Neurológicas	Parkinson	Sinucleína α	APA	Aumento de PAS por el aumento en los niveles de dopamina
	Distrofia muscular oculofaríngea	PABPN1	APA	Acortamiento del 3' UTR por mutaciones
Genéticas	Síndrome de Fabry	α -Galactosidasa A	APA	Inestabilidad del mRNA por mutaciones en Poli-A
	Síndrome del X frágil	FMR1	APA	Repetidos 5' UTR afectan Poli-A
Endocrinas	Diabetes tipo II	TCF7L2	APA	Aumento de PAS
Cardiológicas	Cardiomiopatía (dilatación)	FBRSL1	APA	Alargamiento del 3' UTR

11.1.10 Splicing del pre-mRNA

Como ya se ha mencionado la organización interrumpida del gen y la organización ininterrumpida de su mRNA requiere de un cambio en el RNA entre la transcripción y la traducción, donde el transcrito primario tiene la misma organización del gen pues se transcribió toda la secuencia pero posee secuencias no codificantes que necesitan ser removidas. Es por eso que éste transcrito primario es denominado pre-mRNA ya que está "inmaduro" por así decirlo al contener intrones que son regiones que intervienen en la codificación de las proteínas (Hall, 2017; Patel y Bellini, 2008).

El pre-mRNA es sujeto a splicing un mecanismo encargado de la remoción de los intrones al empalmarlos generando exones conjuntos dándole continuidad a la secuencia. Ésta es una reacción esencial para la síntesis proteica y requiere que el transcrito ya posea el extremo 3' poliadenilado y que en su extremo 5' se encuentre el capuchón (m7G), con

estas tres reacciones se completa la maduración del pre-mRNA (Figura 86) (Hall, 2017; Kaida, 2016; Patel y Bellini, 2008; Will y Lührman, 2010).

El splicing ocurre en tres etapas: primero la escisión en el sitio de empalme 5' (la secuencia del intrón que comienza con GU) que crea un ataque nucleofílico del OH 2' de una adenosina del intrón (la secuencia del intrón que termina en AG) sobre el extremo 5' fosforilado (Figura 87a), seguido de la formación de un bucle creando un enlace fosfodiéster 2'-5' estructura llamada lariat (Figura 87b), dejando libre el extremo OH 3' del exón previo al intrón a ser removido que ataca a un grupo fosfato del exón adyacente a lariat, reacción que libera el intrón enlazando los dos exones (Figura 87c). Éste mecanismo está dado por las UsnRNPs y una vez escindido el intrón es degradado en el núcleo y las snRNP son recicladas (Hall, 2017; Kaida, 2016; Patel y Bellini, 2008; Will y Lührman, 2010).

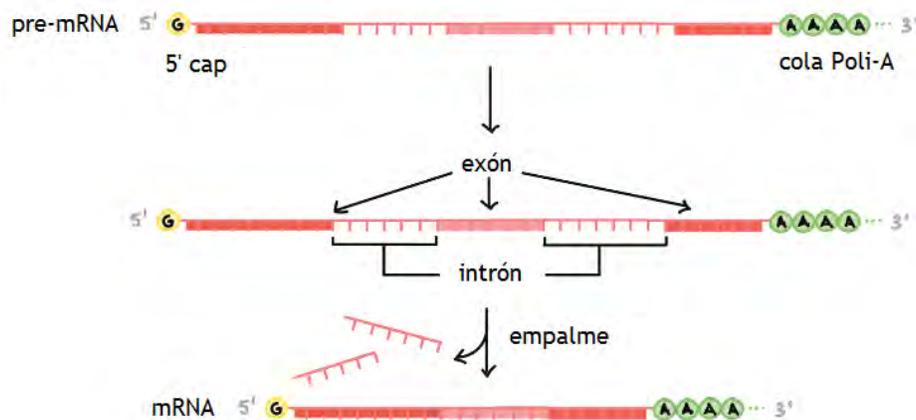


Figura 86. Maduración del pre-mRNA (Modificada de Khan Academy, 2017).

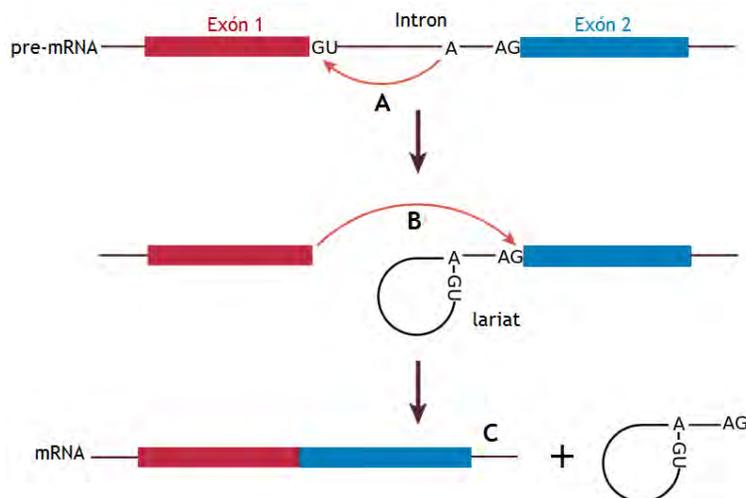


Figura 87. Etapas de la reacción de empalme (Modificada de Will y Lührman, 2010).

Para que ocurran estas etapas se debe dar lugar a la formación del spliceosoma, un complejo macromolecular que funciona como maquinaria para catalizar la reacción de empalme y está conformado por seis subunidades de RNPs denominadas UsnRNPs o snRNP (U1, U2, U4, U5 y U6, siendo U1 la más abundante). Las subunidades están acopladas a proteínas Sm y más de 100 factores de splicing no-snRNP (principalmente U11, U12, U4atac, U6atac). U1, U2, U4, U5, y U6 son componentes que reconocen secuencias consenso localizadas cerca de los extremos 5' y 3' de los intrones (sitios de empalme 5' y 3'), BPS y secuencias de polipirimida. Para que se forme el spliceosoma U1 reconoce el sitio de empalme 5' seguido de U2AF como factor auxiliar que reconoce el sitio de empalme 3' y ayuda a SF1 que se une a BPS para formar el complejo E (Kaida, 2016; Hall, 2017; Will y Lührman, 2010; Patel y Bellini, 2008).

Posteriormente SF1 es reemplazado por U2 que reconoce el sitio de ramificación y se forma el complejo A pre-spliceosoma, así el tri-snRNP formado por U4/U6-U5 puede unirse formando el complejo B pre-catalítico al spliceosoma. Finalmente ocurren cambios conformacionales en el complejo B en donde se requiere liberar de U1 y U4 para activarlo y por medio de reacciones catalíticas en el sitio activo del complejo formar el complejo C que es el spliceosoma en sí, el que cataliza la reacción de remoción del intrón (Figura 88) (Kaida, 2016; Hall, 2017; Will y Lührman, 2010; Patel y Bellini, 2008).

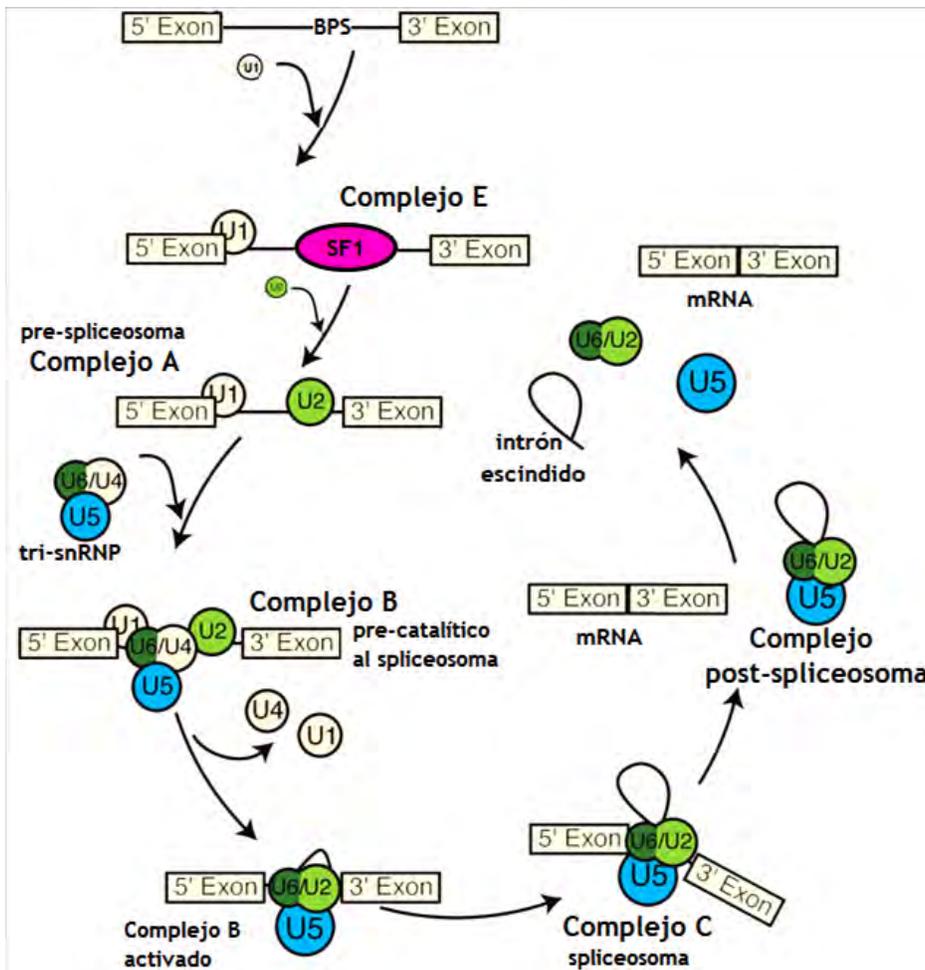


Figura 88. Ensamblaje del spliceosoma (Modificada de Hall, 2017).

Debido a que U1 es más abundante que los demás componentes, estudios recientes muestran que posee actividades extras además de formar parte del spliceosoma. Un ejemplo la subunidad U1A de U1 que tiene su CDS y 3' UTR conservadas a través de organismos, en el extremo 3'UTR U1A contiene una secuencia de 47 nt. Ésta es un sitio de unión para PAS y al formar el complejo U1A-PAS-U1A se inhibe la poliadenilación del mRNA pues se inhibe el extremo CTD de PAP sin afectar la reacción de escisión, por lo que U1A está implicado en la regulación de la expresión génica. Para la formación del spliceosoma se requiere de RNA helicasas que favorecen el ensamblaje del complejo, una de ellas Brr2 entra al núcleo y se asocia a U5 para que éste forme parte del tri-snRNP y sea reclutado al complejo A formando el complejo B. Como ya se mencionó la activación del complejo B requiere de la eliminación de U1 y U4, esto se hace por el remodelamiento del tri-snRNP el cual por actividad de Brr2 separa 22 pb perfectamente complementarias

entre U6 y U4 para que U6 se acople con U2 y se cree el complejo C (Will y Lührman, 2010; Kaida, 2016; Hall, 2017).

Por otra parte los componentes del spliceosoma se encuentran acoplados a las proteínas Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F y G), éstas forman un anillo heteroheptamérico alrededor del núcleo de cada UsnRNP promoviendo la actividad del complejo. Las proteínas Sm son transcritas por la RNA Pol II y adquieren el m7G co-transcripcionalmente, al igual que U6 y U6atac que son transcritas por la RNA Pol II como precursores de snRNP ya que contienen 32 nt adicionales. Estos precursores necesitan ser exportados al citoplasma para iniciar su maduración en UsnRNP y snRNP (Fischer, Englbrecht y Chari, 2011; Patel y Bellini, 2008; Will y Lührman, 2010; Kaida, 2016; Hall, 2017).

Los transcritos recién sintetizados de estos pre-snRNP son fosforilados por PHAX para que puedan ser exportados al citoplasma al formar un complejo con CBC (CBP80–CBP20). PHAX alberga a NES que tiene un sitio de unión al receptor CRM1, ésta interacción sólo se da cuando CRM1 está unida a RAN. Así el complejo CBC–pre-snRNP–PHAX–RAN–CRM1 es reconocido por el receptor Xpo1 y llevado a citoplasma; la exportación de U1, U4, U5 y U2 no ha sido muy estudiada pero se ha visto que también es dependiente del capuchón pues se encuentran unidas a CBC. Ya en citoplasma PHAX es desfosforilada por la fosfatasa 2A y así es reclutada otra vez al núcleo junto con CBC desmantelando a RAN y CRM1 (Figura 89a) (Fischer, Englbrecht y Chari, 2011; Patel y Bellini, 2008; Will y Lührman, 2010; Kaida, 2016; Hall, 2017).

CK2 forma un complejo con el pre-snRNP libre en citoplasma para que sea reconocido por el complejo SMN que es el principal efector en la maduración de los snRNP pues participa en las tres etapas: primero ensambla al núcleo de snRNP el anillo de proteínas Sim y así ocurre una hipermetilación m1G de los snRNPs, ambas reacciones son necesarias para el corte nucleolítico en el extremo 3' del pre-snRNP por una exonucleasa generando un snRNP maduro (Figura 89b) que necesita regresar al núcleo para terminar su maduración y realizar el splicing. Para regresar al núcleo el anillo Sim se encuentra con el capuchón m3G que genera una NLS necesaria para la exportación de snRNP al núcleo, utilizando a Imp β y SPN1 como adaptadores entre el núcleo y citoplasma para que así el snRNP pase impulsado por SMN (Figura 89c). La parte final y maduración de snRNP en núcleo es poco estudiada y comprendida, se cree que un sitio interno de U es modificado por pseudouridilación o metilación separando el anillo Sim, Imp β y SPN1 haciendo el snRNP funcional, así se obtienen U1, U2, U4, U5 y U6 para el ensamblaje del

spliceosoma (Figura 89d) (Fischer, Englbrecht y Chari, 2011; Patel y Bellini, 2008; Will y Lührman, 2010; Kaida, 2016; Hall, 2017).

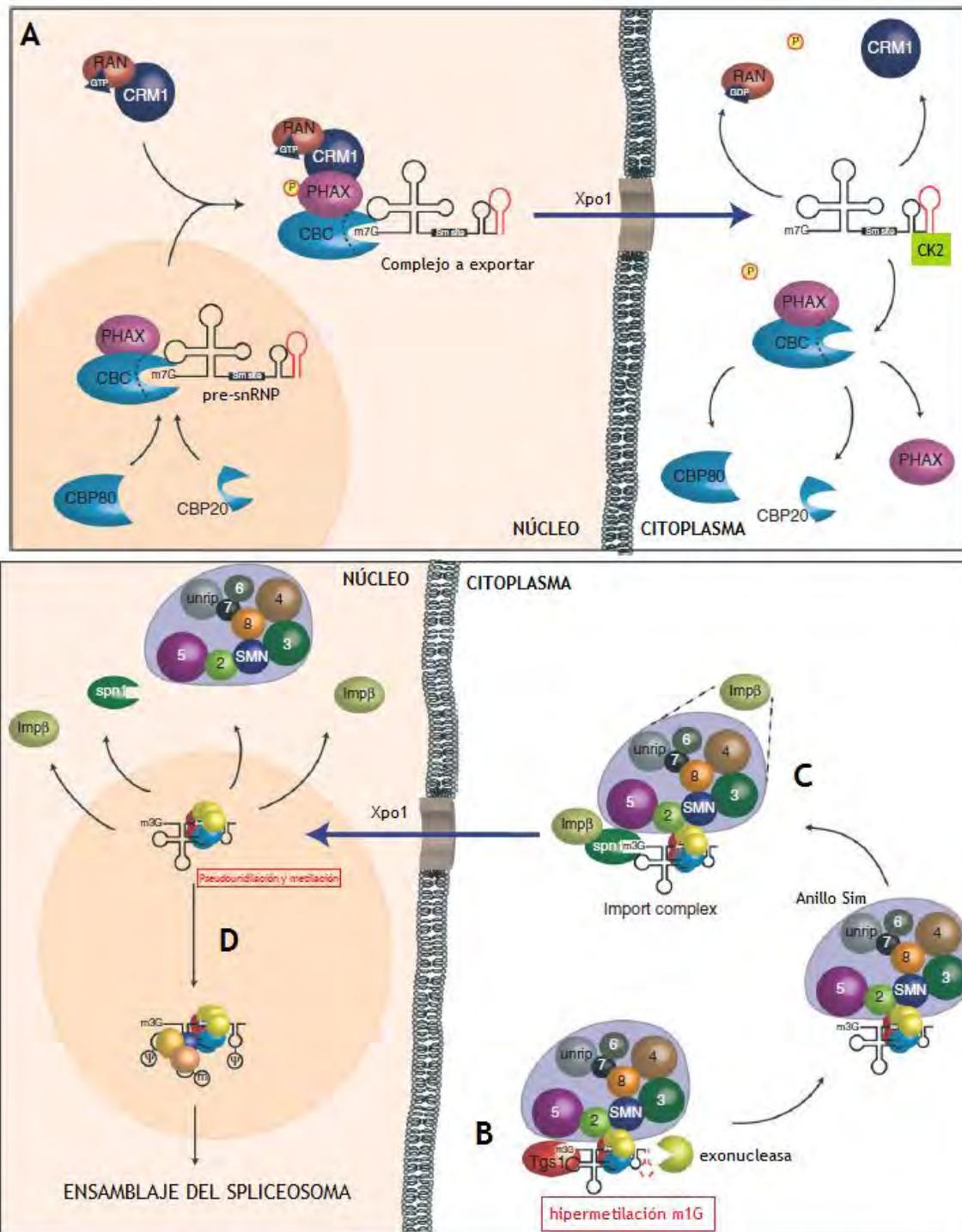


Figura 89. Maduración de los UsnRNPs/snRNPs (Modificada de Fischer, Englbrecht y Chari, 2011; Patel y Bellini, 2008).

11.1.11 Splicing alternativo

Los exones de los transcritos primarios (pre-mRNA) pueden ser procesados de manera consecutiva dando lugar a una sola molécula de mRNA o alternativa dando lugar a diferentes mRNAs que provienen de un solo pre-mRNA; estos mRNAs procesados alternadamente se dan por el mecanismo de splicing alternativo (Roy et.al., 2013).

El splicing alternativo es un proceso de edición post-transcripcional que se produce tras la obtención del pre-mRNA y este puede dar lugar a distintas combinaciones de exones; el splicing alternativo permite que en un mismo gen se pueda estar codificando la información necesaria para sintetizar distintas proteínas ya que mediante este proceso a partir de un mismo mensajero primario pueden obtenerse varias secuencias de mRNA maduro dependiendo de cuáles sean los exones que se combinen. El mecanismo de splicing alternativo es una de las maneras de originar distintas isoformas funcionales de una misma proteína en diferentes tejidos o compartimentos celulares, y añade complejidad a los mecanismos de regulación de la expresión génica ya que permite codificar mayor número de proteínas con el mismo número de genes. Estudios bioinformáticos muestra que 40 – 60% de los genes humanos están sujetos a splicing alternativo (Roy et.al., 2013; Hall, 2017).

El splicing alternativo está regulado con patrones específicos espacio-temporales y juega un papel esencial en la regulación génica y dependiendo de las condiciones fisiológicas de pueden dar 5 tipos de splicing alternativo que están representados en la Figura 90 (Roy et.al., 2013).

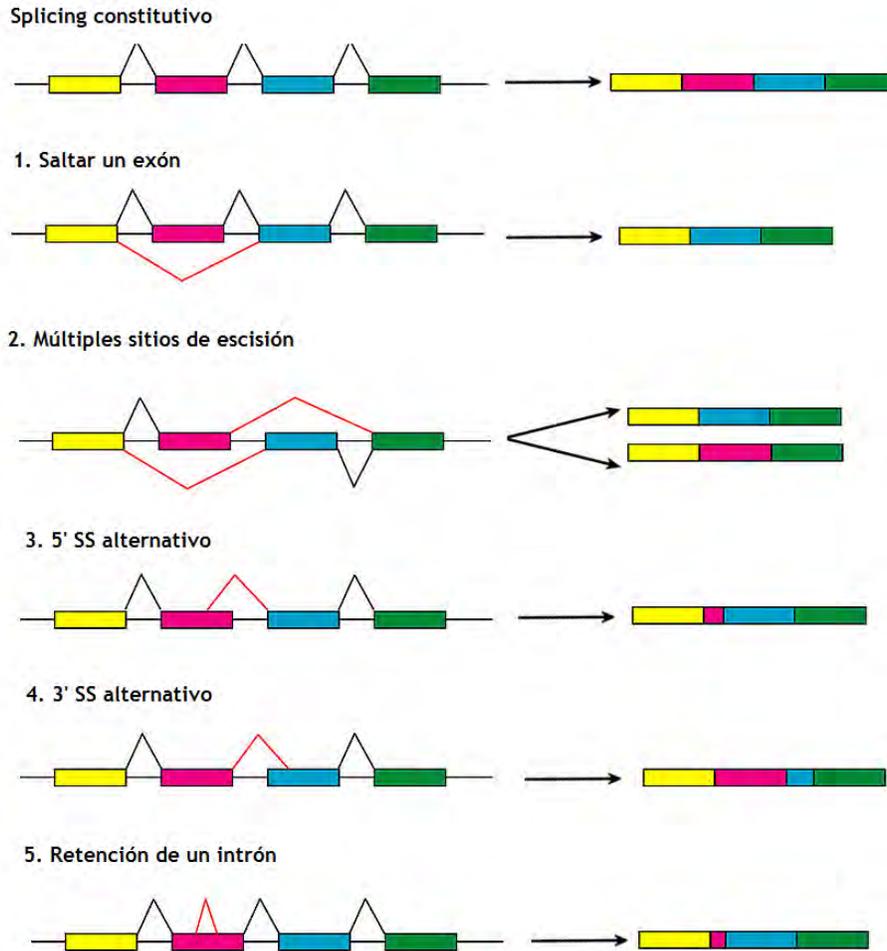


Figura 90. Tipos de splicing alternativo (Modificada de Khan Academy, 2017; Roy et.al., 2013).

11.1.12 Exportación núcleo→citoplasma del mRNA

La expresión génica en eucariontes requiere de procesos coordinados en el núcleo, estos procesos incluyen la maduración del pre-mRNA, ensamblaje de pre-mRNPs seguido del transporte a través del espacio intercromático, acoplamiento y exportación del mRNA a través de NPC liberándolo así dentro del citoplasma en forma de mRNP. Ya previamente se mencionó cómo es estabilizado, protegido y madurado el mRNA por medio de splicing, adición del capuchón y cola Poli-A, procesos que ocurren simultáneamente durante la elongación del transcrito; por lo que ahora se mencionará como debe ser transportado al citoplasma, pues en eucariontes la transcripción tiene lugar en el núcleo y la traducción en el citoplasma (Cole y Scarcelli 2006; Björk y Wieslander 2014; Gehring, Wahle y Fischer, 2017).

El mRNA posee la capacidad de unirse a múltiples proteínas para formar parte del pre-mRNP, procesos río abajo de la expresión del gen poseen componentes de los RNPs lo que facilita la formación del complejo. El pre-mRNP es necesario para que por un proceso co-transcripcional se madure a mRNP y pueda ser movido al espacio intercromático acoplándose a los NPC al pasar a través de él hacia el citoplasma. La formación del pre-mRNP se da simultáneamente a la formación del transcrito mientras la RNA Pol II va elongando la cadena de RNA ésta pasa por uno de sus canales haciéndola accesible a la unión de las RNPs. Las proteínas CBP20, CBP80, PABP forman parte del complejo pre-mRNP así como TREX1 que es un adaptador para CBC. El pre-mRNP tiene la actividad intrínseca de plegarse y durante el splicing éste influencia el empalme entre exón–intrón dirigiendo y optimizando las reacciones de transesterificación ya que dentro de este plegamiento pueden existir señales que influyan en la eficiencia y ubicación del splicing; por lo que un plegado incorrecto o lento del pre-mRNP puede estar involucrado en la cinética del splicing. El pre-mRNP completa su plegamiento al formar una estructura de 7 nm en forma de listón y está dado por la interacción con EJC y proteínas SR (Figura 91a) (Björk y Wieslander, 2014; Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013; Cole y Scarcelli 2006; Zhai y Xiang, 2014).

Los eventos co-transcripcionales en el procesamiento del ensamblaje del pre-mRNP están involucrados en la formación del capuchón y splicing, éstos son tan importantes como la correcta formación del extremo 3' ya que le confiere a la estructura la capacidad de ser exportada. El procesamiento del extremo 3' depende de la fosforilación de la Ser2 del CTD de la RNA Pol II ya que promueve la unión de factores de poliadenilación. En la poliadenilación se unen a este extremo las proteínas Nab2 y CPFS6 que reclutan al receptor de exportación Mex67, adicionalmente CPFS6 puede ser reclutada a la cola Poli-A al interactuar con Pcf11; por medio de todas estas proteínas se forma el mRNP maduro una estructura de ~25 nm, simultáneamente el complejo EJC se une terminando el splicing (Figura 91b). Así el mRNP es liberado al espacio intercromático donde interactúa con el NPC que tiene forma de anillo y sirve como canal de conexión, si éste no está ocupado y el mRNP es competente es exportado al citoplasma (Björk y Wieslander, 2014; Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013; Cole y Scarcelli 2006; Zhai y Xiang, 2014).

Al igual que los UsnRNP, la exportación de mRNP depende del receptor CRM1 – RAN que se unen a NES y por NXF1 se unen a mRNP a través de proteínas adaptadoras

(Figura 91c). El NPC está conformado por ~30 nucleoporinas y por 8 nucleoporinas FG éstas últimas atraen al mRNP y se unen por medio de Nab2 para pasar a través del NPC. Durante la exportación el mRNP comienza a pasar por el NPC plegado y conforme avanza por el poro se va desensamblando la estructura empezando con el extremo 5' del mRNA que es el primero en entrar en contacto con el citoplasma mientras que el extremo 3' sigue en contacto con poro en el núcleo. NXF1/NXT1 promueven la capacidad del mRNP de pasar a través del NPC por interacciones secuenciales que tienen con las nucleoporinas FG; ya en citoplasma el mRNP se encuentra en forma de fibra y presenta la capacidad de interactuar con la caja DEAD de la helicasa Dpb5 y por hidrólisis de ATP remodela al mRNP para liberar a algunos factores como Nab2, Mex67 y CRM1-RAN. Dpb5 no solo interactúa con mRNP cuando ya está en citoplasma sino que tiene la capacidad de introducirse en el extremo del NPC e ir atrayendo a mRNP para que pase a través de este (Figura 91d). El mecanismo de cómo es que se desensambla el mRNP liberando al mRNA no está muy bien aclarado pero se cree que Dpb5 es capaz de disociar las proteínas del mRNP cuando es activado por la proteína Gle1 dejando así separado al mRNA (Björk y Wieslander, 2014; Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013; Cole y Scarcelli 2006; Zhai y Xiang, 2014).

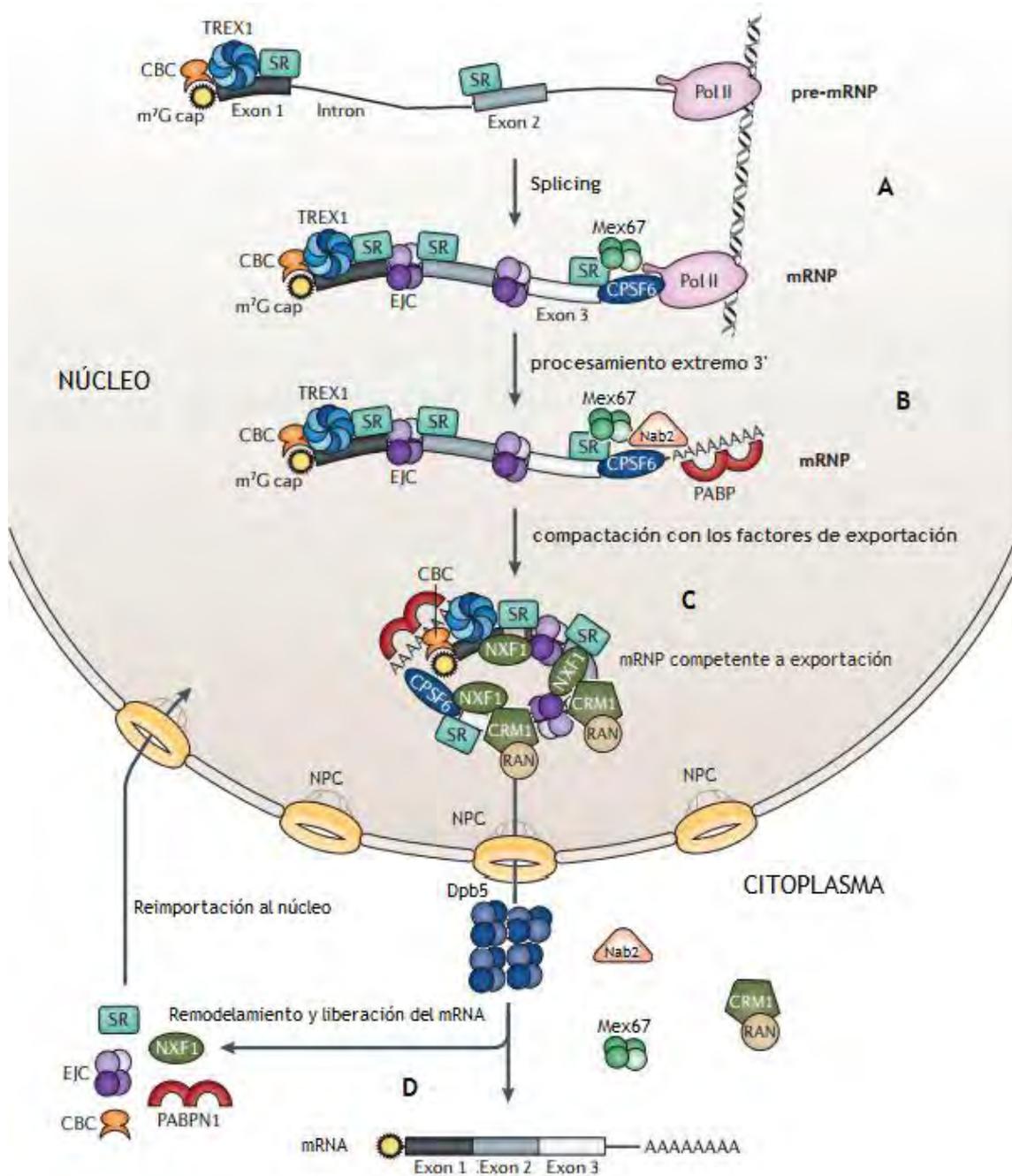


Figura 91. Exportación nuclear del mRNA (Modificada de Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013; Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Cole y Scarcelli 2006).

La principal función de estos mRNPs es traducir el mRNA en proteína, por lo tanto también contienen factores y secuencias que permiten reconocer la maquinaria de traducción y regularla. Los reguladores de la traducción como miRNAs o RBPs afectan la tasa de iniciación e interfieren en la formación del complejo inicial que es dependiente del capuchón. La regulación mediada por RBPs puede darse por dos mecanismos

principalmente, el primero es cuando señales del exterior celular controlan los transcritos pues les confieren actividades 5'TOP inhibiendo su traducción selectivamente; el factor Larp1 es un componente de TOP que está relacionado a este mecanismos de regulación, Larp1 es fosforilado por mTOR inhibiendo su capacidad de unirse al motivo TOP permitiendo la traducción del mRNA normalmente, su desfosforilación aumenta su afinidad por el motivo TOP lo que conlleva al desplazamiento de eIF4E inactivando la traducción (Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013).

El otro mecanismo involucra las secuencias reguladoras ARE que promueven la unión de proteínas que desestabilizan el mRNA como TTP que recluta al complejo CCR4-NOT (C-NOT/CCR4/CAF1), la enzima principal que des-adenila la cola Poli-A; los miRNAs desestabilizan al mRNA por el mismo mecanismo. Existen también otros factores que regulan la vida media del mRNA positivamente, como a la proteína HuR que también se une a las secuencias ARE estabilizando al mRNA, sin embargo cuando esta proteína es ubiquitinizada por el complejo p97/UBX8 se desplaza de la secuencia permitiendo la degradación del mRNA ya que deja libre el espacio para la unión de TTP (Figura 92) (Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Müller-McNicoll y Neugebauer, 2013).

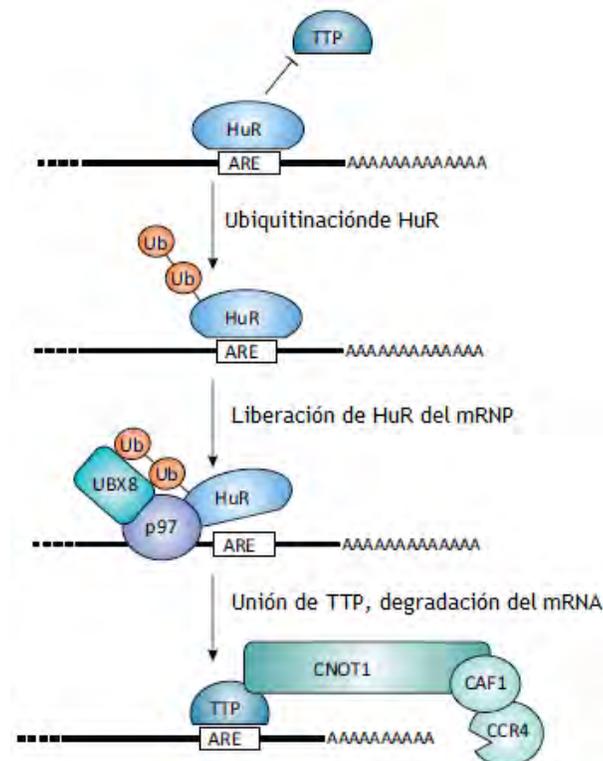


Figura 92. Mecanismo de regulación del mRNA mediado por RBPs (Modificada de Gehring et.al. 2017).

11.1.13 Degradación del mRNA

Como ya se mencionó, el capuchón cumple varias funciones en el metabolismo del mRNA, pues aumenta la eficiencia y precisión del splicing además de verse involucrado en el transporte núcleo→citoplasma. En el citoplasma es específicamente reconocido por el factor de iniciación de la traducción eIF4E controlando la cantidad de mRNA disponible para la traducción y es necesario para proteger y estabilizar ese transcrito, por lo que su remoción es un mecanismo regulatorio que influencia y afecta la expresión del transcrito en la síntesis proteica (Ling, Qamra y Song, 2011; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017).

La regulación en la estabilidad del mRNA ha surgido como un paso en el control de la expresión génica, la estabilidad del mRNA está determinada por la tasa de transcripción y degradación. La degradación del mRNA ocurre por diferentes vías y en células eucariotas comienza con el acortamiento de la cola Poli-A seguida de su degradación, ésta puede darse por dos diferentes maneras: en dirección 5'→3' o en dirección 3'→5'. En dirección 5'→3' la des-adenilación conlleva a una escisión del m7G en el extremo 5', está regulada por un proceso catalizado por la enzima Dcp2 dejándolo así monofosfatado y exponiéndolo a su degradación por la exoribonucleasa citoplasmática Xrn1 (Figura 96a). Mientras que en dirección 3'→5' la des-adenilación y degradación del extremo 3' están dadas por un complejo de exosomas de RNA citoplasmático que es un complejo de múltiples subunidades de 3' exoribonucleasas pero que también poseen actividad de endoribonucleasas que van degradando la cadena de mRNA desde ese extremo hasta llegar al capuchón que es hidrolizado por la enzima DcpS (Figura 96b); teniéndose así que existen dos clases de enzimas removedoras del capuchón. En los últimos años se ha identificado una tercera enzima removedora del m7G, X29 que hidroliza el metilo en N7 haciéndolo más susceptible a su degradación (Li y Kiledjian, 2010; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017; Arribas-Layton et.al., 2013; Ling, Qamra y Song, 2011).

Pero la degradación del mRNA y remoción del capuchón no está dada sólo por estas enzimas, por ejemplo Dcp2 es una hidrolasa de la familia Nudix que en su secuencia contiene un motivo Nudix conservado lo que le confiere el sitio catalítico dependiente de metales divalentes pues contiene tres residuos de glutamato que coordinan la hidrólisis del capuchón; adicionalmente posee los dominios cajas A y B. La caja A le confiere a la enzima fidelidad catalítica en el momento de la remoción del capuchón al interactuar con la proteína activadora Dcp1 y la caja B es requerida para la unión correcta al mRNA pues reconoce una secuencia de más de 25 nt que es el sustrato ideal para el Dcp2 ya que así

se previene la degradación de mRNAs que se estén traduciendo, teniéndose que la longitud mínima del mRNA para que sea reconocido es de ~12 nt (Figura 93) (Arribas-Layton et.al., 2013; Ling, Qamra y Song, 2011; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017; Li y Kiledjian, 2010).

Cabe mencionar que el capuchón debe estar metilado ya que sin metilar es un pobre sustrato para la enzima Dcp2. El mecanismo removedor del capuchón se compone de la subunidad catalítica Dcp2 y la subunidad reguladora o activadora Dcp1, formando el complejo Dcp2/Dcp1 (el ejecutor de la reacción); se necesita formar el complejo pues Dcp2 requiere de cambios conformacionales provistos por Dcp1 para realizar su función; en estudios enzimáticos se ha visto que en el complejo Dcp2/Dcp1 el promotor Edc1 actúa como cofactor de Dcp1 para generar movimientos rotacionales en sitio catalítico de Dcp2 y así el complejo se pueda unir al mRNA (Arribas-Layton et.al., 2013; Ling, Qamra y Song, 2011; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017; Li y Kiledjian, 2010).

Dcp1 es una proteína que contiene un dominio EVH1 (Figura 93) que es el que le confiere la interacción proteína – proteína para interactuar con el NTD de Dcp2 transformando su estructura abierta no productiva a cerrada productiva. Sin embargo, éste complejo Dcp2/Dcp1 no está conservado en eucariontes superiores por lo que se sospecha que el complejo debe contener más factores en estos organismos. Es así como el promotor Edc1 y el promotor Edc2 estimulan la actividad de este complejo favoreciendo su heterodimerización, estas son proteínas están conservadas en levaduras mientras que en eucariotas superiores Edc3 y Edc4 son los principales estimuladores en la formación del complejo Dcp2/Dcp1 ya que sirven como puente para unir al complejo, esto fue revelado por medio de SAXS (Arribas-Layton et.al., 2013; Ling, Qamra y Song, 2011; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017; Li y Kiledjian, 2010).

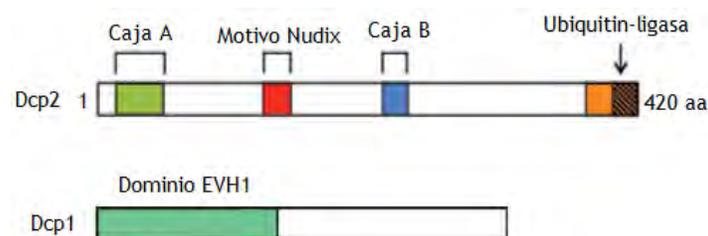


Figura 93. Estructura de los dominios de Dcp2 y Dcp1 (Modificada de Li y Kiledjian, 2010; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017).

Se ha postulado que la remoción del capuchón tiene lugar en los cuerpos P, que no son organelos pre-formados pero que tienen una dinámica en la agregación de las proteínas involucradas en este mecanismo, en estos cuerpos P se forma el complejo Dcp2/Dcp1 y se encuentran las enzimas Dhh1, Pat1, Edc3/4, el complejo Lsm1 y Xrn1 (Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017; Li y Kiledjian, 2010).

Pat1, Dhh1, Edc3 y Lsm1-7 son proteínas conservadas de levaduras a humanos y están involucradas en la activación del complejo Dcp2/Dcp1. Pat1 interactúa con Dcp1 y estimula la liberación del CBC del capuchón, ésta se asocia con el complejo Lsm1-7 que se une selectivamente a mRNAs des-adenilados que es la señal que activa la remoción del capuchón; mientras que Dhh1 es un activador de este mecanismo pues es un inhibidor de la traducción además de que interactúa directamente con Dcp2, Edc3 y Pat1 (Ling, Qamra y Song, 2011; Arribas-Layton et.al., 2013; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017; Li y Kiledjian, 2010).

Todas estas proteínas activadoras son reguladas por Upf1, Upf2 y Upf3 que comparten sitios de unión con Dcp2. Estudios recientes han demostrado que la remoción del m7G puede ocurrir co-traduccionalmente mientras el mRNA sigue asociado a los ribosomas sin entrar a los cuerpos P (Figura 94) (Ling, Qamra y Song, 2011; Arribas-Layton et.al., 2013; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017; Li y Kiledjian, 2010).

acceso de las enzimas activadoras. Al unirse VCX-A al capuchón impide que el sitio catalítico de Dcp2 pueda llevar a cabo la reacción (Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017; Ling, Qamra y Song, 2011; Li y Kiledjian, 2010).

Tabla 18. Proteínas involucradas en la remoción del capuchón (Modificada de Ling, Qamra y Song, 2011; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017).

Proteína	Función	Proteínas con las que interactúa
Dhh1	Represor de la traducción, activador de remoción del m7G	Dcp2, Pat1, Edc3, Dcp1, Lsm1-7
Pat1	Represor de la traducción, activador de remoción del m7G, plataforma para la formación del complejo Dcp2/Dcp1	Dcp1, Dcp2, Dhh1, Lsm1-7, Edc3
Lsm1-7	Complejo activador de remoción del m7G	Dcp1, Dcp2, Pat1, cola Poli-A
Edc1/2	Activador de remoción del m7G	Dcp1, Dcp2, mRNA
Edc3	Activador de remoción del m7G en la degradación general del mRNA	Dcp1, Dcp2, Dhh1, Pat1, mRNA
Edc4	Activador de remoción del m7G en mamíferos	Dcp1, Dcp2
eIF4E	Inhibidor de remoción del m7G, factor de iniciación de la traducción	Pab1, eIF4G, m7G
PABP	Inhibidor de remoción del m7G, se une a cola Poli-A	Cola Poli-A, eIF4G
VCX-A	Inhibidor de remoción del m7G, se une al capuchón	Dcp2, m7G
Upf1-3	Recluta complejo activador de remoción del m7G	Dcp1, Pat1, Lsm1-7

La degradación 3'→5' está dada por DcpS un miembro de la familia HIT que son nucleótido hidrolasas y se caracterizan por contener un motivo conservado HIT que le permite reconocer y actuar sobre mRNAs de menos de 10 nt. Ésta enzima hidroliza el

grupo fosfato del capuchón liberándolo como m⁷GMP; adicionalmente en ambos lados del motivo HIT contiene dominios que le confieren la capacidad de unirse al capuchón y de hidrólisis (Figura 95). Los factores reguladores de DcpS en mamíferos no han sido bien estudiados. Sin embargo, se sabe que DcpS tiene la capacidad de acoplarse con los exosomas potencializando su acción y que si el splicing del pre-mRNA comienza en el extremo 5' se favorecerá su degradación por esta vía (Figura 96b) (Li y Kiledjian, 2010).



Figura 95. Estructura de los dominios de DcpS (Modificada de Li y Kiledjian, 2010).

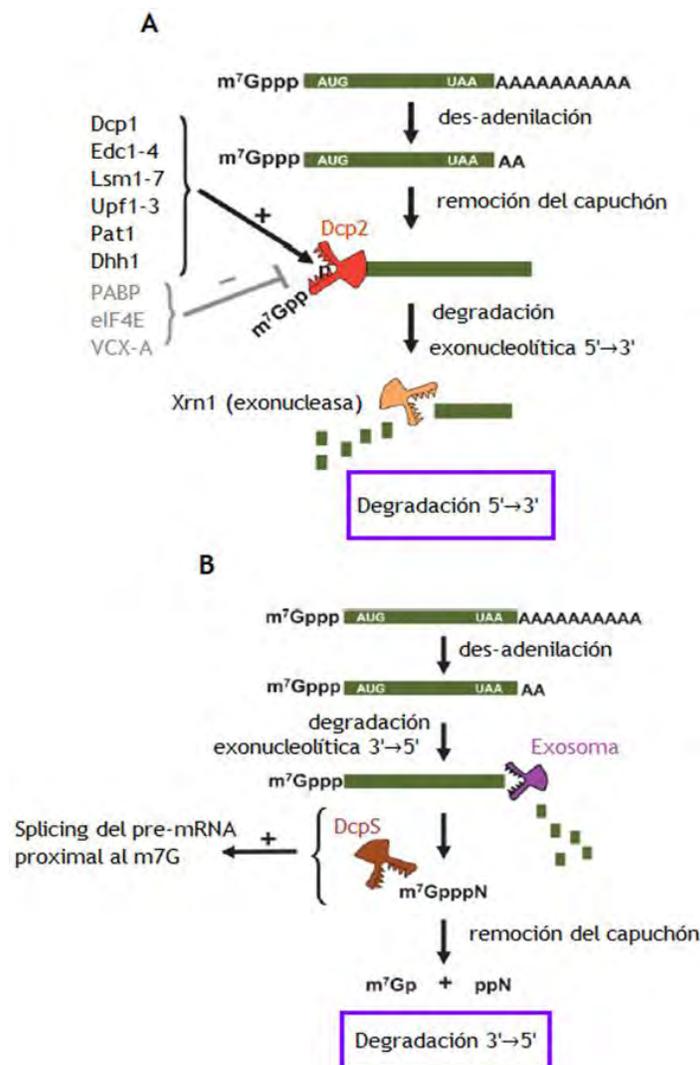


Figura 96. Comparación entre mecanismos de degradación del mRNA (Modificada de Li y Kiledjian, 2010).

Otro mecanismo que involucra la regulación en el extremo 5' es el cual en que la enzima Rail se ve involucrada en convertir el grupo trifosfato del capuchón en monofosfato o des-metilarlo permitiendo su degradación. Ésta proteína también posee la capacidad de unirse a la 5' exoribonucleasa Xrn2 formando un complejo que reconoce el extremo 5' monofosfatado para degradarlo. Dos enzimas homólogas a Rail han sido encontradas la enzima Ydr370C que además de poseer las mismas actividades que Rail tiene la actividad de 5' exoribonucleasa y así potencializa la degradación del mRNA al formar un complejo con Dxo1 que también posee actividad 5' exoribonucleasa; pero este complejo no tiene actividad de pirofosfatasa a diferencia del complejo Rail/Xrn2. Cabe mencionar que la acción de estas enzimas solo es posible si el extremo 5' está monofosfatado. La otra enzima homóloga es Dom3Z, sólo se encuentra presente en mamíferos y posee la actividad de pirofosfatasa como la de 5' exoribonucleasa que junto con la enzima DXO (homóloga a Dox1 en mamíferos) forman un complejo capaz de degradar el mRNA desde su extremo 5' sin necesidad de que este se encuentre monofosfatado, también pueden escindir el capuchón aunque éste se encuentre tri-metilado (Zhai y Xiang, 2014).

11.1.14 Regulación en el extremo 3'UTR

Como ya se mencionó el CDS es la porción de DNA que se transcribe a mRNA para ser traducida pero ésta también incluye regiones sin transcribir en sus extremo 5' y 3'. El 3' UTR está definido por la poliadenilación o la PAP ya que éste se encuentra entre el codón de paro y el inicio de la cola Poli-A por lo que se ve afectado por estos mecanismos. Recientemente se ha observado que estas regiones no codificantes de mRNA son elementos reguladores importantes impactando en la expresión génica, así como en la estabilidad, exportación nuclear, localización sub-celular y eficiencia de la traducción del mRNA influenciando la cantidad de proteína sintetizada, principalmente los 3' UTRs; por lo que cualquier mutación o defecto en estas regiones afectarán la expresión del gen (Matoulkova et.al., 2012; Kaida, 2016; Arribas-Layton et.al., 2013).

También se ha visto que los genes que más se expresan contienen sitios para la poliadenilación proximales a 3' UTR y éstos son más cortos comparados con los 3' UTR largos en donde la expresión del gen disminuye. Numerosos componentes del procesamiento del extremo 3' están involucrados en el reconocimiento, sitio de escisión y poliadenilación del mRNA al unirse a elementos cis adyacentes al 3' UTR; además de estar influenciados por modificaciones post-transcripcionales como fosforilación, acetilación, sumolación o metilación. Las isoformas de 3' UTR resultantes de PAP o

splicing alternativo se reflejan en la síntesis proteica y su longitud está inversamente correlacionada con la estabilidad del mRNA, expresión y proliferación celular; las isoformas cortas son más estables por lo que tienen una capacidad transcripcional más elevada y mayor potencial de producción de proteínas al escapar de los mecanismos de degradación de las isoformas largas. También la correlación de la longitud de los 3' UTR se ha visto relacionada con la cantidad de GC pues genes con regiones carentes de estas bases presentan 3' UTR cortos y las isoformas se expresan dependiendo del tipo celular (Matoulkova et.al., 2012; Kaida, 2016; Arribas-Layton et.al., 2013).

Los UTRs son conservados entre especies y poseen elementos regulatorios *cis* (Figura 97) que son reconocidos por elementos regulatorios *trans*, principalmente RBPs u otros RNAs. Uno de los elementos 3' UTR *cis* son las regiones ARE que influyen la estabilidad del mRNA, progresión de la traducción y procesamiento alternativo del pre-mRNA y es el mayor elemento de represión traduccional y desestabilización del mRNA; este elemento contiene un motivo con secuencia AUUUA y por análisis de quimeras se ha demostrado que incrementar el número de este motivo desestabiliza el mRNA. ARE se divide en tres clases: la clase I contiene tres motivos AUUUA, la clase II tiene múltiples copias y en la clase III el motivo no es AUUUA pues su secuencia cambia a GUUUG; una de las funciones de este elemento es participar en la des-adenilación de la cola Poli-A al acortarla 30 – 60 nt por una digestión ribonucleotídica suprimiendo la traducción al desestabilizar al mRNA. Estas secuencias son reconocidas por ARE-BPs siendo las proteínas AUF1, TTP, etc. las que contribuyen en una regulación negativa, mientras que las proteínas de la familia ELAV (NF90, HuR) promueven la traducción al estabilizar el mRNA. Adicionalmente, la remoción del capuchón está implicada en el mecanismo ARE ya que las ARE-BPs son reclutadas por el complejo de remoción del m7G (Matoulkova et.al., 2012; Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017).

Otro elemento *cis* en 3' UTR es GRE que presenta la secuencia GUUUUG para que sus proteínas de unión regulen eventos postranscripcionales, degradación, des-adenilación y splicing del mRNA. En humanos estas proteínas de unión son CUGBP1 y CUGBP2, la primera tiene efectos de desestabilización del mRNA seguido de un aumento en la eficiencia de la traducción, mientras que la segunda lo estabiliza inhibiendo la traducción. CURE y DICE son otros elementos de regulación *cis* y están considerados dentro de la misma región de 3' UTR donde sus secuencias sirven como sitio de unión para las proteínas hnRNPE1 y hnRNPK, ambas inhiben la iniciación de la traducción al inhibir el

ensamblaje 80S del ribosoma, su secuencia ha sido identificada como (C/U)CCANxCCC(U/A)PyxUC(C/U)CC en donde Pyx pueden ser 1 – 4 nt de C o U y Nx pueden ser 0 – 5 nt diferentes. Ésta diversidad en la secuencia también permite el ensamblaje de PTB una proteína que se une a los sitios distantes del 3' UTR permitiendo introducir otro RNA lo que crea un bucle para el reclutamiento de los ribosomas en la traducción; esta proteína también afecta la poliadenilación, formación del capuchón y estabilidad del mRNA (Matoulkova et.al., 2012; Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017).

Los elementos CARE son los repetidos de dinucleótidos más comunes en el genoma humano y se localizan dentro de CDS como de las regiones no codificantes con un sitio de unión a la proteína hnRNPL que asegura la estabilidad del mRNA. Por último los elementos IRE son secuencias de 26 – 30 nt que se pueden encontrar dentro de 5' UTR o 3' UTR, siendo más común en el segundo, su secuencia es CAGA/UGX donde X puede ser A, C o U y estos elementos crean un bucle que es reconocido por IRP2 una proteína que regula positivamente la traducción pues estabiliza al mRNA y disminuye la velocidad de reacción. Dentro de los elementos trans en 3'UTR se encuentran RPBs, ncRNAs y miRNAs; estos últimos regulan la expresión del 60% de genes codificantes para proteínas en humanos al promover la desestabilización/degradación del mRNA o inhibiendo la traducción y su sitio de unión está dado por una secuencia de 6 nt consecutivos iguales (Matoulkova et.al., 2012; Gehring, Wahle y Fischer, 2017; Grudzien-Nogalska y Kiledjian, 2017).

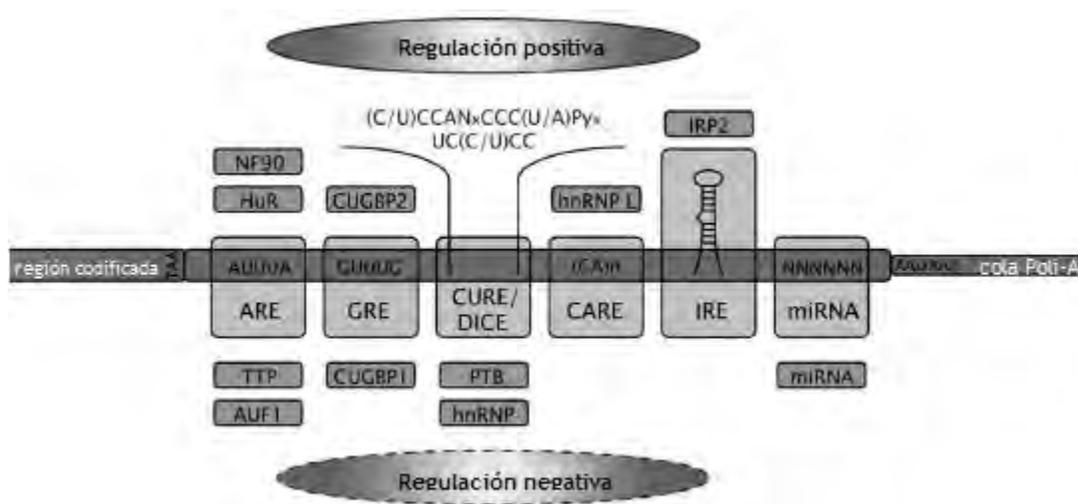


Figura 97. Elementos reguladores cis de 3' UTR (Modificada de Matoulkova et.al., 2012).

11.2 Transcripción Procariota

En las bacterias la transcripción y la traducción tienen lugar en el citoplasma bacteriano y son simultáneas por lo que no se requiere de mecanismos de exportación siendo así, que la traducción en organismos procariontes es más sencilla. Al ser un genoma circular y no poseer intrones tampoco se requiere de mecanismos de maduración por lo que el primer transcrito del mRNA es el que va a ser codificado.

11.2.1 RNA polimerasa

Comenzando con que las tres moléculas principales de RNA (tRNA, rRNA, mRNA) son sintetizadas por un solo tipo de RNA polimerasa, la RNA polimerasa DNA dependiente (RNAP), que a diferencia de organismos eucariontes que emplean tres tipos de RNA polimerasas; la velocidad de síntesis de la RNAP es de ~40 nucleótidos/segundo a 37 °C; ésta velocidad es aproximadamente la misma que la de traducción (15 aminoácidos/seg) pero mucho más lenta que la de replicación del DNA (800 pb/seg) (Mooney et.al., 2005; Clancy, 2008; Zhang, Najmi y Schneider, 2017).

Muchas estructuras cristalográficas de la RNAP han demostrado que tiene cierta similitud con la RNA Pol II pues de igual manera se asemeja a la pinza de un cangrejo en donde los sitios catalíticos se encuentran en los extremos de pinza; compuesta también de los cuatro núcleos rígidos, el “núcleo”, “estante”, “abrazadera” y “lóbulo mandibular” con dominios modulares menores anclados a cada uno. De igual manera, el núcleo y el estante constituyen la parte central de proteína de donde se forman los canales primario y secundario y donde salen en forma de protuberancia la abrazadera y lóbulo mandibular como las pinzas de un cangrejo. La función del canal primario y secundario es la misma que la de la RNA Pol II pues es el sitio de unión de los ácidos nucleicos y el poro de entrada de los rNTPs. El núcleo y el estante constituyen la parte central de la estructura y el sitio catalítico donde se encuentra el híbrido DNA/RNA, que están conectados por una hélice (Figura 98). La principal diferencia a la RNA Pol II es que ésta cuenta con 12 subunidades (RBP1 – RBP12) mientras que esta enzima consiste de 5 subunidades (α_2 , β , β' y ω) con un masa molecular de 400 kDa, donde las subunidad RBP1 y RBP2 son funcionalmente comparables a las subunidades β y β' de RNAP, RBP3 ha sido propuesto como un análogo de una de las subunidades α (Figura 99a) (Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Villain-Guillot et.al., 2007; Mooney et.al., 2005; Clancy, 2008).

Adicionalmente la RNAP forma un complejo holoenzima (RNAP HE) con el factor σ que reconoce específicamente al promotor e inicia la transcripción; este factor es el más conservado de todos y posee cuatro dominios (1 – 4): la región 1 antagoniza la actividad de unión al DNA, la región 2 se une al núcleo de la RNAP y al promotor (-10), la región 3 interactúa con secuencias río arriba de los promotores (-10) en el DNA y con el canal secundario de RNAP y la región 4 está involucrada en la unión con elementos -35 del promotor (Figura 99b). Para asociarse con la enzima crea una estructura en forma de V en donde cambios conformacionales son requeridos en el núcleo de RNAP y en el factor σ facilitando el reconocimiento del promotor, la apertura del promotor e iniciación de la transcripción; el factor σ es liberado del complejo poco después de que la transcripción es iniciada y la elongación proceda en ausencia de este factor (Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011; Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Villain-Guillot et.al., 2007; Mooney et.al., 2005; Clancy, 2008).

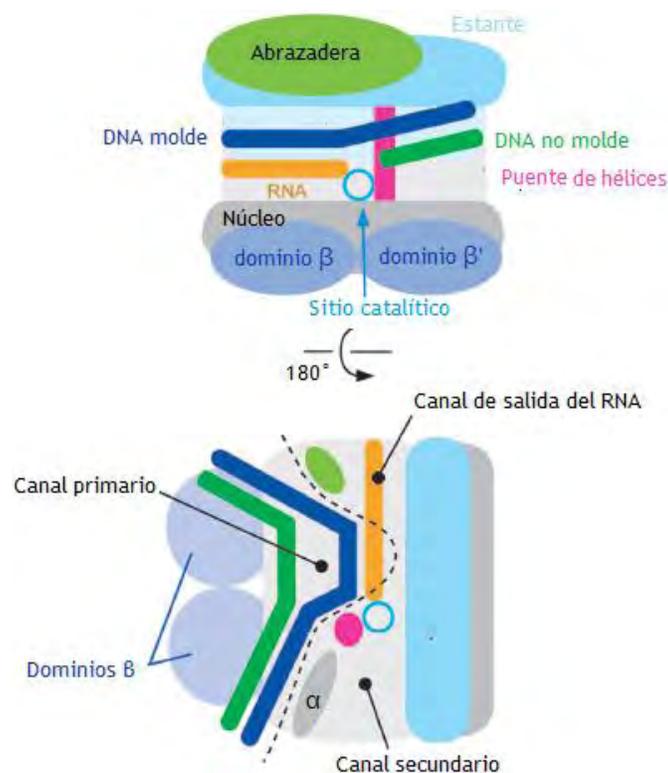


Figura 98. Esquema de la estructura de la RNAP. (Modificada de Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012)

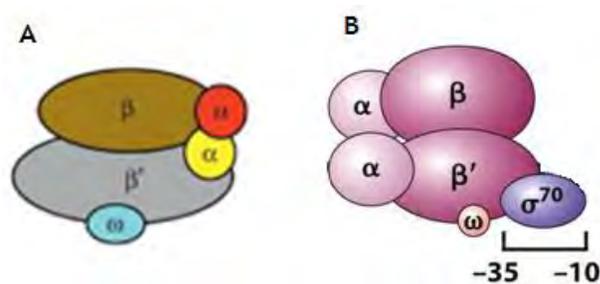


Figura 99. Estructura de los dominios de la RNAP (Modificada de Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011; Villain-Guillot et.al., 2007).

11.2.2 Factor σ

El factor σ es disociable del complejo pues su única función es reconocer la secuencia del promotor exponiendo el sitio de inicio de la transcripción, a este proceso se le denominó ciclo σ (Figura 100); donde σ se disocia de RNAP cuando el EC es estable y completo. La enzima NusA actúa como cofactor en la disociación de σ pues compite con la región 4 como sitio de unión; una vez que RNAP termina la transcripción y se separa del RNA y DNA siendo libre de volver a formar la unión con σ para iniciar otro ciclo de transcripción la clave de que este ciclo sea tan funcional y eficaz es la habilidad de RNAP de ser reprogramada rápidamente permitiendo así que las células se adapten a patrones de transcripción optimizando el metabolismo celular en respuesta a condiciones externas y señales celulares (Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Mooney et.al., 2005; Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011).

La obtención de la estructura de RNAP ha sido posible a ensayos con el factor Gfh1 un inhibidor de la transcripción; donde se reveló que el sitio de unión de RNAP para Gfh1 es muy pequeño requiriendo que el inhibidor tenga un cambio conformacional para acomodarse en ese sitio, así como la enzima; el CTD de Gfh1 se superenrolla en las subunidades β donde su extremo final alcanza el canal secundario y el principal lo coloca cerca del sitio catalítico bloqueando así el acceso de los rNTPs al sitio catalítico. Por este medio es que fue posible observar que existen dos cambios conformacionales en RNAP el “trinquete” entre los dos canales y el “balanceo” de la abrazadera, y se cree que ambos cambios se dan durante el tiempo de pausa antes de la translocación de la RNAP y terminación de la transcripción. Se dice que la abrazadera se balancea pues a comparación de la estructura normal del EC ésta se encuentra inclinada 7° en relación al núcleo además de que este cambio conlleva a ampliar el canal primario pues existe un mayor contacto entre los dominios α y β' ; sugiriéndonos que Gfh1 se une a la forma en

“trinquete” de la RNAP para inhibir su función (Figura 101) (Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012; Mooney et.al., 2005; Tagami, Sekine y Yokoyama, 2011).

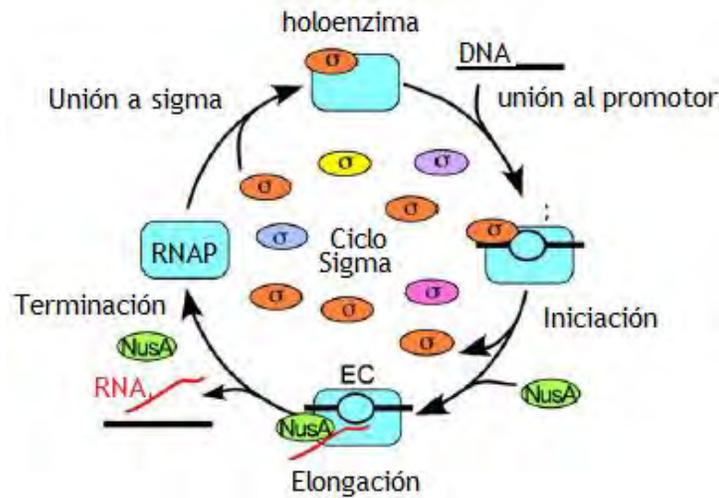


Figura 100. Ciclo sigma (Modificada de Mooney et.al., 2005).



Figura 101. Cambios conformacionales de RNAP (Modificada de Sekine, Tagami y Yokoyama, 2012).

Como se puede ver los mecanismos de transcripción difieren entre eucariontes y procariontes debido a que en la transcripción eucarionte se depende de un gran número de factores de iniciación, elongación y terminación de la transcripción acoplados a la RNA Pol II, así como la maduración del mRNA. La transcripción procarionte es más sencilla con menor cantidad de factores, comenzando con las funciones de la RNAP y sin la necesidad que ésta pase por muchos cambios (Lewis, Doherty y Clarke, 2008; Wade y Struhl 2008; Clancy, 2008; Browning y Busby, 2016).

11.2.3 Reconocimiento del promotor

Otra diferencia significativa es la secuencia promotora, mientras que eucariontes se tienen muchos elementos para que se inicie la transcripción las células procariontas solo requieren de dos. El promotor es la secuencia de DNA necesaria para que la RNAP se una a la cadena molde y lleve a cabo la reacción de iniciación, en bacterias esta secuencias debe contener por lo menos 12 pb para que sea reconocida por el factor σ . La secuencia no es contigua pues como ya se mencionó se encuentra 35 pb y 10 pb río arriba del sitio donde inicia la transcripción, así el factor σ media la unión del DNA con la RNAP determinando la secuencia, esta función es comparable a lo que hace TFIIB en eucariontes. Hay cuatro secuencias consenso que se pueden localizar dentro de estos dos elementos del promotor, la secuencia consenso en -10 es denominada caja TATA pues su principal secuencia es TATAAT, mientras que en -35 pueden encontrarse las secuencias TTGACG, TTGACA, AACTGT para ser reconocidas por el factor σ (Figura 102); una vez que se llevo a cabo la interacción la región -10 facilita el desacoplamiento de la cadena de DNA molde al romperse los enlaces fosfodiéster formando una burbuja de transcripción (Lewis, Doherty y Clarke, 2008; Wade y Struhl 2008; Clancy, 2008; Browning y Busby, 2016).

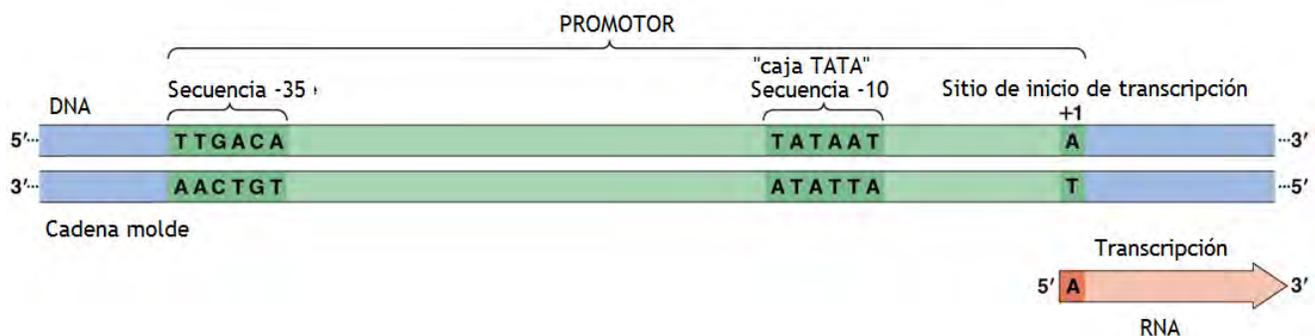


Figura 102. Secuencia de los elementos del promotor en eucariontes (Modificada de Lewis, Doherty y Clarke, 2008).

Las eubacterias poseen múltiples factores σ que son capaces de formar holoenzimas con diferentes RNAPs por lo que son capaces de reconocer diferentes secuencias del promotor y regular diferentes clases de genes simultáneamente (Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen, 2013).

11.2.4 Iniciación

La iniciación de la transcripción ocurre esencialmente en cuatro pasos y cuando se da la formación del EC (RNAP, DNA molde y transcrito de mRNA), la RNAP HE se une al promotor el DNA para formar un complejo pre-iniciación cerrado; este complejo se llama así pues las cadenas de DNA permanecen unidas y que posteriormente el complejo separa las cadenas de DNA en el sitio de inicio de la transcripción para formar un complejo abierto en donde finalmente se da el escape del promotor (por el factor σ) del RNAP HE para dar inicio a la transición iniciación \rightarrow elongación. El escape del promotor típicamente incluye múltiples ciclos abortivos donde la producción de éstos da fin a la fase de iniciación; estos ciclos se caracterizan por la síntesis de RNAs cortos (2 – 15 nt). La cara río arriba de la RNAP permanece estacionaria con respecto al DNA mientras se están dando estos ciclos abortivos (Figura 103) (Wade y Struhl 2008; Lewis, Doherty y Clarke, 2008; Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen, 2013).

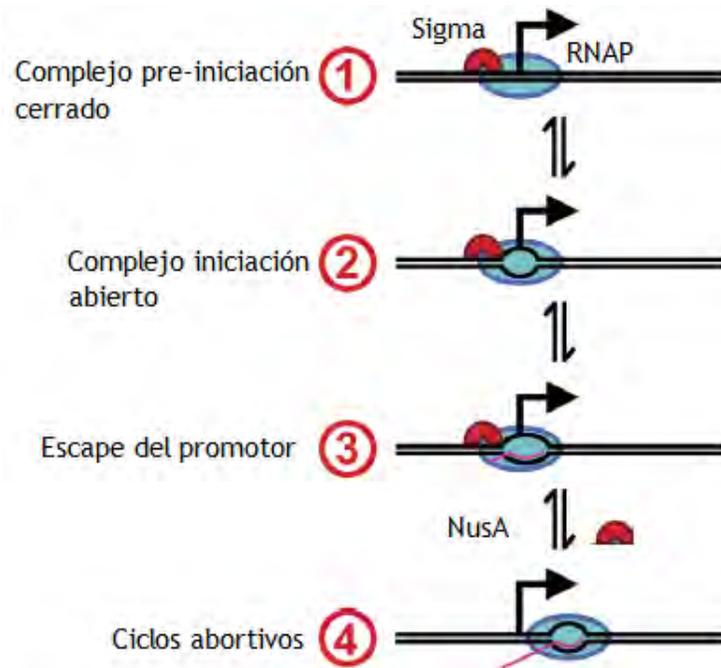


Figura 103. Iniciación de la transcripción en procariontes (Modificada de Wade y Struhl 2008).

Estudios recientes con fluorescencia muestran que la disociación del factor σ de RNAP HE requiere de la unión con la proteína activada NtrC para que se pueda formar el complejo abierto, esta reacción es dependiente de la hidrólisis de ATP que es la señal de activación para que las cadenas de DNA se separen. Estos estudios también revelaron que el complejo cerrado se forma durante dos tiempos diferentes el tiempo corto (~ 2 seg)

y el tiempo largo (~80 seg), en donde la formación del complejo abierto se da subsecuente al tiempo largo del complejo cerrado (Wade y Struhl 2008; Lewis, Doherty y Clarke, 2008; Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen, 2013).

11.2.5 Elongación

La transición entre iniciación a elongación en *E. coli* determinada por ChIP mostró que su TR (radio de asociación entre el promotor y la secuencia codificada) es <1 indicando que esta transición está limitada en la mayoría de las regiones transcritas y que RNAP depende de un contacto de 1 – 3 seg con el promotor después de la disociación del factor σ antes de empezar a sintetizar el mRNA (Wade y Struhl 2008; Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen, 2013).

La regulación del EC está dada por los factores Nus y Gre, NusA y NusG que son factores globales de transcripción y regulan dos clases de EC; los EC anti-terminación están involucrados en la síntesis de rRNA y los EC del mRNA, los segundos son complejos altamente sensibles a señales internas y externas de pausa y terminación para asegurar la eficiente regulación de la expresión génica; mientras que los EC anti-terminación son altamente procesivos capaces de sintetizar transcritos de varias Kb. Ya se había mencionado que en la transcripción del mRNA NusA disocia al factor σ para que se comience a elongar la cadena pero también se ve involucrado en la regulación de los EC anti-terminación, en vez de disminuir la vida media y pausar la transcripción para terminarla como lo hace con el mRNA aumenta la tasa de elongación del complejo (Wade y Struhl 2008; Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen, 2013; Lewis, Doherty y Clarke, 2008; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016).

NusG actúa incrementando la tasa de elongación tanto el EC para mRNA como el EC anti-terminación; se ha encontrado que este factor es esencial para bacterias Gram negativas por la interacción que presenta con la proteína Rho en la terminación de la transcripción ya que Rho se encuentra en mayores cantidades en Gram negativas que en Gram positivas. Por último los factores Gre se unen al canal secundario de la RNAP y están involucrados en reiniciar los complejos en pausa para que no se lleve a cabo la terminación de la transcripción; la elongación se ve afectada por lesiones en el DNA o proteínas de unión a este que bloquean la acción de la RNAP (Wade y Struhl 2008; Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen, 2013; Lewis, Doherty y Clarke, 2008; Porrua, Boudvillain y Libri, 2016).

11.2.6 Terminación

La terminación de la transcripción se requiere como mecanismo regulatorio independiente y para prevenir que haya un solapamiento entre eventos transcripcionales pudiendo interferir unos con otros. Debido a su estabilidad la disociación del EC requiere de mucha energía y en bacterias las señales de terminación se dividen en dos clases dependiendo de si estas solo necesitan información codificada en el DNA o si requieren de la acción de una proteína reguladora para desestabilizar el EC, por lo que se presentan dos mecanismos conforme se llevan a cabo. El primero es la terminación intrínseca que es activada por una señal de ácidos nucleicos haciéndola suficientemente fuerte para desestabilizar el EC, estas señales intrínsecas están presentes en los transcritos bacterianos como una secuencia rica en GC que tiene la capacidad de crear una estructura en forma de bucle, estas secuencias se encuentran dentro de los genes y operones de bacterias en la región 5'UTR regulando así la expresión génica al inducir la terminación temprana de la transcripción. El tiempo de pausa de la RNAP ocurre antes de comenzar la terminación y es un componente importante de este mecanismo ya que favorece la formación del híbrido RNA-DNA que es poco estable en el canal primario, este híbrido provee el tiempo necesario para que se forme el bucle y pueda invadir el canal de salida del mRNA en la RNAP; así se desestabiliza el EC y se disocia (Figura 104a) (Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen 2013).

Se han propuesto varios modelos de cómo la formación del bucle termina con la transcripción, el primero propone que la disociación del híbrido es iniciada en posición proximal del lugar de formación del bucle facilitando la liberación de la RNAP por una secuencia de residuos de U que se encuentra río debajo de bucle (Figura 104a); el segundo modelo de hipertranslocación, sugiere que la formación del bucle empuja a la RNAP a través del DNA sin la adición de nt al extremo 3' del mRNA resultando en el acortamiento progresivo del híbrido. Por último, el tercer modelo propone que la invasión del canal de salida del mRNA por el bucle activa cambios conformacionales en la RNAP para desestabilizar el EC y disociarla de este, este modelo postula la acción directa del bucle para desestabilizar a la enzima (Figura 104b) (Porrua, Boudvillain y Libri, 2016; Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen 2013).

El segundo mecanismo de terminación es dependiente de Rho y se caracteriza por el estricto reclutamiento de esta proteína por secuencias determinantes relajadas (Figura

104d), la versatilidad en estas secuencias permite que la presencia de Rho en el mRNA desaloje a la RNAP. Rho es un homohexámero en forma de anillo que es ATP dependiente y se une a secuencias de 85 – 100 nt de largo denominadas sitios Rut, estos sitios son característicos por contener secuencias ricas en C y pobres en G y la unión de Rho a estos sitios es determinante para su actividad. Una vez establecido el vínculo Rho se posiciona sobre el mRNA por medio de sus anillos centrales provocando su translocación dependiente de la hidrólisis de ATP. La proteína comienza este movimiento desde el extremo 3' del mRNA con el fin de alcanzar a la RNAP disociada río abajo en el TTS, la procesividad de Rho es moderada y solo comienza la disociación del EC después de translocarse 60 – 80 nt. La fuerza de Rho es la suficiente para que cuando entre en contacto con la RNAP pueda empujarla mecánicamente y separarla del EC (Figura 104c). Estudios genómicos demuestran que Rho necesita de un cofactor, la proteína NusG que aunque solo estimula su actividad un 20% es requerida para la acción de Rho; aparte se ha mostrado que filamentos de la proteína H-NS co-localizan con Rho facilitando su actividad al estimular la pausa de la RNAP (Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016; Browning y Busby, 2016; Robinson y van Oijen 2013).

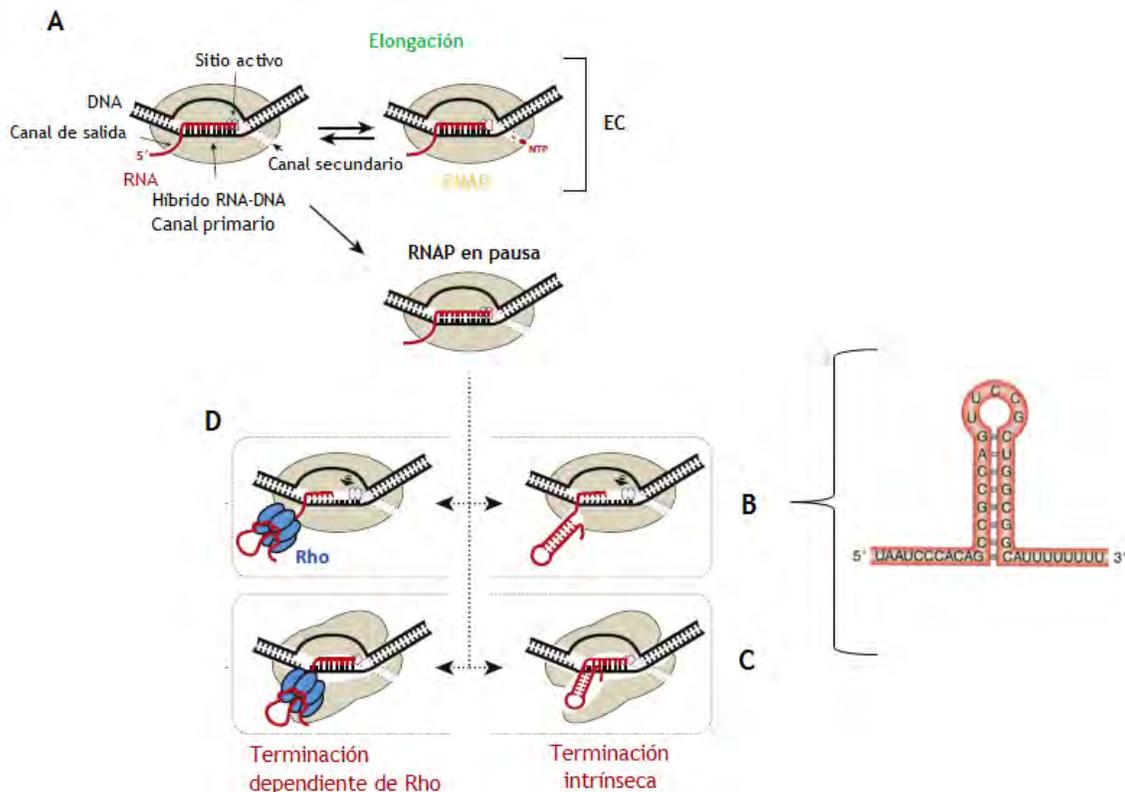


Figura 104. Mecanismos de terminación de la transcripción en procariontes (Modificada de Porrúa, Boudvillain y Libri, 2016).

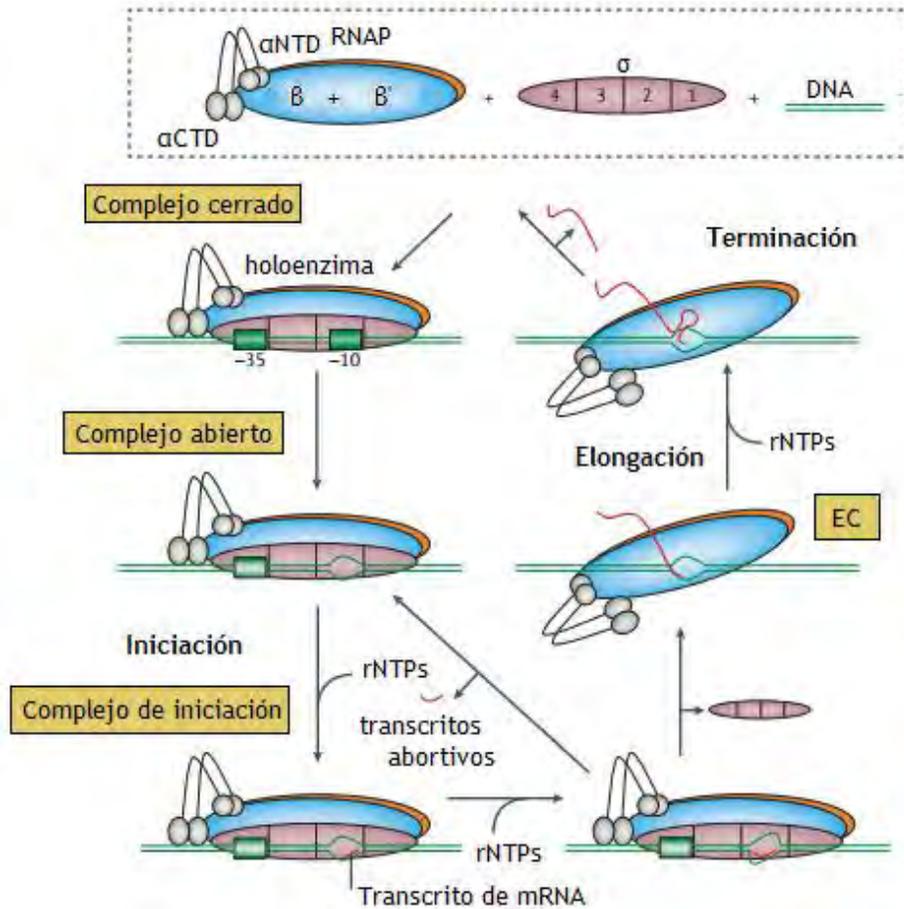


Figura 105. Esquema general de la transcripción en procariontes (Modificada de Browning y Busby, 2016).

12. TRADUCCIÓN

Las instrucciones para construir proteínas están codificadas en el DNA de una célula en forma de genes; como se describió en el dogma central de la biología molecular la información de un gen se puede utilizar para construir una proteína en un proceso de dos pasos: el primero es la transcripción que ya se describió previamente cómo la secuencia de nucleótidos del DNA pasa a ser un mRNA que se va a “decodificar/leer” para construir un polipéptido con una secuencia específica de aminoácidos, la traducción es esa etapa que implica pasar de una secuencia de pb del mRNA a una secuencia de aa del polipéptido (Koonin y Novozhilov, 2009).

Todas las proteínas se sintetizan a partir del mRNA éste se lee en dirección 5'→3' en donde la cadena de polipéptidos se sintetiza a partir el extremo NTD al CTD, de acuerdo con el código genético cada aminoácido es específico de un codón del mRNA. El código genético es una regla que dicta cómo la información codificada en la secuencia del mRNA es traducida a secuencia de aminoácidos para formar un polipéptido; el desciframiento de éste fue descrito por Francis Crick y Sydney Brenner en 1961 al asignar un aminoácido a cada triplete de nucleótidos o codón (Samiksha, 2016; Knight, Freeland y Landweber, 2011; Koonin y Novozhilov, 2009).

Esta conexión entre genes y la síntesis de polipéptidos es denominada cistrón, éste consiste en un largo número de nucleótidos dispuestos en codones; Crick y Sydney explicaron el código genético diciendo que las “letras” son el lenguaje que se encuentra en las pares de bases del mRNA, que los codones (grupos de esos pares de bases) son las “palabras” y así las “oraciones” o “párrafos” equivalen a un grupo de codones. Así la información escrita en un lenguaje de cuatro letras (nucleótidos) puede traducirse a un lenguaje de veinte letras (aminoácidos) (Samiksha, 2016; Knight, Freeland y Landweber, 2011; Koonin y Novozhilov, 2009).

Inicialmente el desciframiento del código genético implicaba tres teorías: la primera decía que el código más simple posible es un código unitario (1 nt) en el que un nucleótido codifica un aminoácido, tal código es inadecuado ya que sólo se podrían especificar cuatro aminoácidos por lo que fue rechazada. La segunda indicaba que un código doble (2 nt) era el que codificaba para un aminoácido, esta teoría también era inadecuada porque solamente podría especificar para 16 aminoácidos. Mientras que un código triple (tripleto, 3 nt) era la teoría aceptada ya que la combinación de los nucleótidos podría

especificar para 64 aminoácidos, a manera que Gamow en ese mismo año determinó que el triplete es el requerido para codificar la secuencia de aminoácidos (Samiksha, 2016; Knight, Freeland y Landweber, 2011; Koonin y Novozhilov, 2009).

La única problemática que se presentó en esa época es que no sabían cómo determinar el codón para cada uno de los 20 aminoácidos, hasta que Gruberg y Severo Ochoa descubrieron la polirribonucleótido fosforilasa una enzima capaz de sintetizar RNA sin la necesidad de emplear un molde; así en 1962 Khorana empleando esta enzima desarrolló una técnica de síntesis de RNA con una combinación de pares de bases específica, un homopolímero que consiste en un RNA sintético que solamente contiene un tipo de nt y un copolímero que contiene dos tipos de nucleótidos y en colaboración con Nirenberg prepararon homopolímeros de U, C, A y G lo que les permitió observar qué aminoácido era formado a partir de qué nucleótido encontrando que CCC codificaba para prolina, UUU para fenilalanina y AAA para lisina. Como observaron que el triplete GGG no se tradujo en nada en 1964 Khorana empleando copolímeros observó la formación de aminoácidos alternos como cisteína y valina; más tarde se descubrió que GGG codifica para glicina. Entonces en un mRNA las instrucciones para construir un polipéptido están organizadas en forma de codones (Figura 107) en el cual existen 64 codones diferentes que especifican 20 aminoácidos (Figura 106) organizándose así en que cada codón determina un aminoácido teniéndose múltiples posibles combinaciones que especificaran diferentes aminoácidos, es decir, que algunos pueden ser especificados por varios codones (Samiksha, 2016; Knight, Freeland y Landweber, 2011; Koonin y Novozhilov, 2009).

		SEGUNDA LETRA					
		U	C	A	G		
PRIMERA LETRA	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	

Figura 106. Código genético (Modificada de Knight, Freeland y Landweber, 2011; Samiksha, 2016).

Los 64 codones son decodificados en la dirección en que son leídos (5'→3') encontrándose hasta un codón de paro, éste determina el sitio hasta donde va a ser decodificado el mRNA y es el punto que indica que un polipéptido está completo (Figura 107); teniéndose tres codones de paro codificados por UAA, UAG y UGA. También se requiere de un codón de inicio que está dado por AUG, éste especifica el aminoácido metionina y sirve como señal de inicio de la traducción pues el mRNA posee regiones sin traducir en sus extremos 5' UTR y 3' UTR. Así el código genético posee 9 características que definen su funcionamiento: (Koonin y Novozhilov, 2009; Samiksha, 2016; Ralston, 2008; Knight, Freeland y Landweber, 2011)

- i. *Está organizado en codones:* Cada 3 nt adyacentes constituyen un codón que determina el posicionamiento de un aminoácido en un polipéptido (Figura 107).
- ii. *Posee una señal de inicio:* Como ya se mencionó está el codón AUG que es el principal, aunque también puede darse esta señal por el codón GUG que codifica para valina.
- iii. *Posee una señal de paro:* Determinando la secuencia necesaria de aminoácidos del polipéptido, los codones UAA, UAG y UGA que no codifican para ningún aminoácido son denominados sin sentido, por lo que los codones con sentido (que codifican) serían 61.
- iv. *Es degenerado y flexible en la 3ª base del codón:* Esta característica significa que un aminoácido puede estar codificado por más de un codón (Figura 106), no implica la falta de especificidad en la síntesis proteica sino la variedad de combinaciones posibles para formar un codón. Existen dos tipos de degeneración: la parcial indica que los dos primeros nucleótidos del codón son idénticos difiriendo del tercero, y la completa indica que las dos primeras bases difieren entre sí y la tercera puede ser cualquiera de las 4 (A, C, G o U) es flexible al poder emparejarse con otra base para formar el codón.



Figura 107. Un codón codifica para un aminoácido (Modificada de Knight, Freeland y Landweber, 2011).

- v. *No es solapado*: Indica que un aminoácido es especificado por un codón y este no se puede combinar con el adyacente, es decir, la misma base no se puede utilizar para dos codones diferentes (Figura 108).
- vi. *No es ambiguo*: Esto indica que un codón siempre va a determinar solamente un aminoácido, no puede codificar para dos o más. La ambigüedad del código genético se modifica en presencia de factores externos, por ejemplo, en procariontes el codón UUU codifica para fenilalanina pero en presencia de estreptomicina puede codificar para leucina, isoleucina o serina.

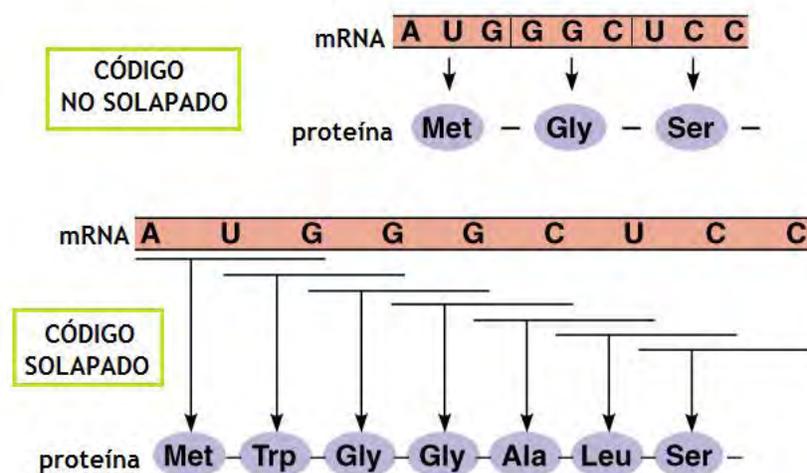


Figura 108. Solapamiento del código genético (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015; Samiksha, 2016).

- vii. *La lectura es corrida, "sin comas"*: Esta característica indica que a partir del punto de inicio la lectura de los codones se va a llevar a cabo sin interrupciones o espacios vacíos, es decir, es continua; ya que si se añade un nucleótido en medio de la secuencia o se pausa la lectura la secuencia de los aminoácidos codificados cambia. No hay ninguna señal que indique el fin de un codón contra el inicio de otro (Figura 109).
- viii. *Es universal*: Quiere decir que aplica a todos los organismos, donde la misma secuencia del nucleótido codifica para el mismo aminoácido en todas las formas de vida, virus, plantas, microorganismos complejos, eucariontes y eucariontes superiores.
- ix. *Presenta polaridad*: Aquí se abarca en la dirección en que es leído el código genético, ya que si fuera en dirección 3'→5' el codón podría especificar dos diferentes aminoácidos haciéndolo ambiguo.

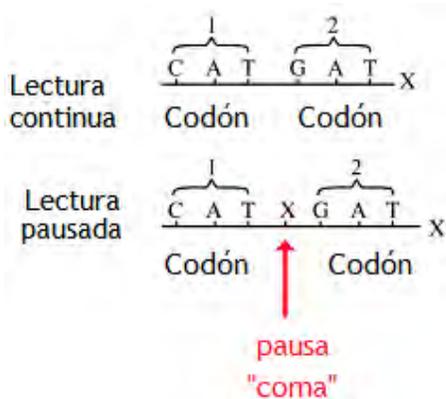


Figura 109. Lectura del código genético. (Modificada de Ralston, 2008; Koonin y Novozhilov, 2009)

Pero como siempre hay una excepción a la regla, y en el caso del código genético existen 3: en *Paramecium* y otros ciliados la glutamina puede estar codificada por UAA o UGA; en algunos fagos existe solapamiento de genes ya que poseen muy pocos y requieren de este mecanismo para poder codificar múltiples proteínas y por último los genes mitocondriales no aplican en la característica de universalidad pues aquí los aminoácidos codificados no emplean los mismo codones que los genes nucleares (Samiksha, 2016; Koonin y Novozhilov, 2009; Ralston, 2008; Knight, Freeland y Landweber, 2001).

La especificidad funcional de los polipéptidos reside en su secuencia lineal de aminoácidos que determina su estructura primaria, secundaria y terciaria, por lo que los aminoácidos libres que hay en el citoplasma tienen que unirse para formar los polipéptidos, ésta secuencia lineal de aminoácidos de un polipéptido depende de la secuencia lineal del mRNA que fue determinada por la secuencia del DNA para que así en la traducción participen 4 componentes principales encargados de llevar a cabo el proceso: los ribosomas donde tiene lugar la traducción, el tRNA que sirve de molécula adaptadora entre el mRNA y los aminoácidos que son incorporados a la proteína, reacción catalizada por la enzima aminoacil tRNA sintetasa (Knight, Freeland y Landweber, 2001).

El primer paso que tiene que producirse es la activación de los aminoácidos y formación de los complejos de transferencia. Los aminoácidos por sí solos no son capaces de reconocer los codones del mRNA por lo que necesitan unirse a un intermediario que sirve como adaptador entre éstos. En 1958 Crick postuló la necesidad de este intermediario que acoplará cada aminoácido a su correspondiente codón siendo el efector el tRNA. Durante la traducción los codones del mRNA se leen secuencialmente con el tRNA, el

adaptador que contiene 70 – 80 nt; éste reconoce unos cuantos codones y suministra el aminoácido correspondiente el cual se añade al extremo carboxilo del polipéptido que está siendo sintetizado, a manera que la cadena de aminoácidos se construye uno a la vez y la secuencia de aminoácidos en la cadena refleja la secuencia de codones que se encuentra en el mRNA que hasta alcanzar el codón de paro se completa el polipéptido (Clancy y Brown, 2008; Koonin y Novozhilov, 2009; Cooper, 2010).

Estas moléculas encargadas de transportar los aminoácidos hasta el ribosoma y de reconocer los codones del mRNA mensajero durante el proceso de traducción tienen una estructura en forma de hoja de trébol con varios sitios funcionales, el extremo 3' es el sitio de unión al aminoácido (el brazo aceptor), el lazo DHU con 7 – 12 nt presenta un sitio de unión para la enzima aminoacil tRNA sintetasa encargada de unir los aminoácidos con el rRNA, el anticodón que se presenta en uno de los lazos con 7 nt y es quien da el reconocimiento del codón a través de una secuencia complementaria y por último el lazo TΨC de 7 nt que es lugar de enlace al ribosoma (Figura 2) (Clancy y Brown, 2008; Koonin y Novozhilov, 2009; Cooper, 2010).

La incorporación de los aminoácidos correctamente codificados a las proteínas depende de la unión correcta de cada uno con el tRNA, así como la especificidad en el apareamiento codón – anticodón. Ésta unión catalizada por la enzima aminoacil tRNA sintetasa encargada de la esterificación de un aminoácido específico con su tRNA afín que resulte compatible para formar un aminoacil tRNA; enzima descubierta por Paul Zamecnik y Mahlon Hoagland en 1957 que depende del reconocimiento de la enzima a un solo aminoácido en donde la reacción está dada por dos pasos. Primero el aminoácido es activado por hidrólisis de ATP una reacción de adenilación que libera un pirofosfato para formar un intermediario AMP (Figura 110a); este aminoácido activado es unido al extremo 3' del tRNA que contiene un residuo de otro aminoácido creando un enlace peptídico entre ellos (Figura 110b). Para entender el mecanismo de cómo se da la traducción se debe comprender de que existen tres eventos esenciales que se repiten en cada codón, el primero es la decodificación o reconocimiento del codón de inicio por el tRNA, seguido de la transferencia del péptido en donde se la incorporación de aminoácidos y el enlace peptídico; y por último la translocación mRNA-tRNA que es la manera en que el ribosoma codifica el siguiente codón en la cadena de mRNA (Cooper, 2010; Clancy y Brown, 2008; Frank, 2017).

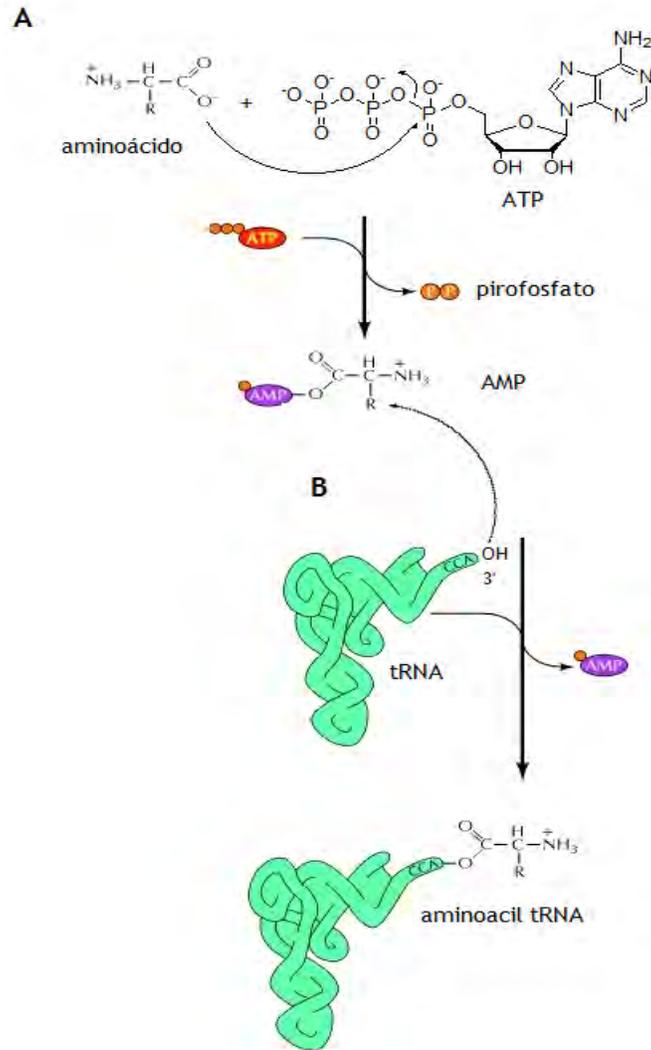


Figura 110. Mecanismo de acción de la aminoacil tRNA sintetasa (Modificada de Cooper, 2010).

En todos los organismos la traducción del código genético tiene lugar en los ribosomas un organelo celular complejo compuesto por rRNA y proteínas ribosomales; en 1960 fue descubierta su estructura y desde ese tiempo se ha investigado de cómo el ribosoma copia los codones para producir una cadena de aminoácidos (Frank, 2017).

Los ribosomas son el sitio de síntesis proteica tanto en procariontes como en eucariontes y están caracterizados por ser grandes estructuras compuestas por $\frac{2}{3}$ de rRNA y $\frac{1}{3}$ proteínas dispuestas en dos subunidades: la grande o centro peptidil-transferasa encargada de formar los enlaces peptídicos y la pequeña o centro decodificador que contiene sitio de unión con el tRNA y es la encargada de leer los codones del mRNA. Estas subunidades y el rRNA se miden en unidades S de acuerdo a su coeficiente de

sedimentación que se realiza por ultracentrifugación (Browninga y Bailey-Serres, 2015; Fox, 2010; Frank, 2017; Cooper, 2010).

El ribosoma no solo provee de un espacio en el cual los tRNA se pueden unir al molde de mRNA sino también cataliza la adición de cada uno de los aminoácidos unidos al tRNA a la cadena creciente de polipéptido. La estructura del ribosoma es conservada entre organismos aunque las subunidades difieren en tamaño, en las células procariontas el ribosoma es 70S donde la subunidad mayor es de 50S y la menor 30S; cada una de estas subunidades se compone de diferentes tamaños de rRNA y una variedad de proteínas, 30S se compone de rRNA 16S y 21 RPSs y 50S se compone de rRNA 23S y 5S con 34 RPLs (Figura 111a). Mientras que en células eucariotas las subunidades son más grandes, la mayor es 60S que contiene rRNA 28S, 5.8S y 5S con ~49 RPLs y la menor 40S compuesta de rRNA 18S con conformando ~33 RPSs, juntas constituyen un ribosoma de 80S (Figura 111b) (Browninga y Bailey-Serres, 2015; Fox, 2010; Frank, 2017; Cooper, 2010).

Existe evidencia de que el ribosoma presenta segmentos expandidos y regiones variables que contienen RPs específicas, tanto para eucariontes como para procariontes; teniéndose que en bacterias existen 54 RPs, en levaduras 79RPs y en eucariotas superiores 79 – 80 de estas proteínas presentes como copia única. Estas RPs son esenciales para interactuar con el eIF3 en la iniciación en eucariontes. A su vez, cada ribosoma contiene tres ranuras que son sitios de unión para el tRNA, conocidos como los sitios A, P y E y al ser conservados no difieren en estructura ni función entre organismos. El tRNA se mueve a través de estos sitios conforme se leen los codones y se suministran aminoácidos durante la traducción y cada uno tiene un papel diferente en los pasos que involucra la traducción. El sitio A es el lugar donde el tRNA primero se une con su codón correspondiente y el sitio de unión para la enzima aminoacil tRNA sintetasa; el sitio P contiene el tRNA que lleva la cadena de aminoácidos que se está sintetizando, esta cadena se transfiere al tRNA del sitio A durante la adición del aminoácido para que se forme el enlace peptídico; y el sitio E es donde se mueve el tRNA una vez que ya no lleva un aminoácido o cadena de proteína, éste es el sitio de salida del ribosoma (Figura 111c) (Browninga y Bailey-Serres, 2015; Fox, 2010; Frank, 2017; Cooper, 2010).

La estructura “completa” del ribosoma para que éste sea funcional se compone de la unión varios tRNAs, el mRNA, la enzima sintetasa y factores de elongación que llevan a cabo el proceso; esta estructura fue analizada por cristalografía con rayos X y crio-EM lo

que permitió establecer las interacciones que se dan entre el ribosoma y el tRNA en el momento de la traducción además de que se determinó el papel que juega un ion de Mg^{2+} estabilizando el mRNA en el centro de decodificación del ribosoma, el sitio P (Browninga y Bailey-Serres, 2015; Fox, 2010; Frank, 2017; Cooper, 2010).

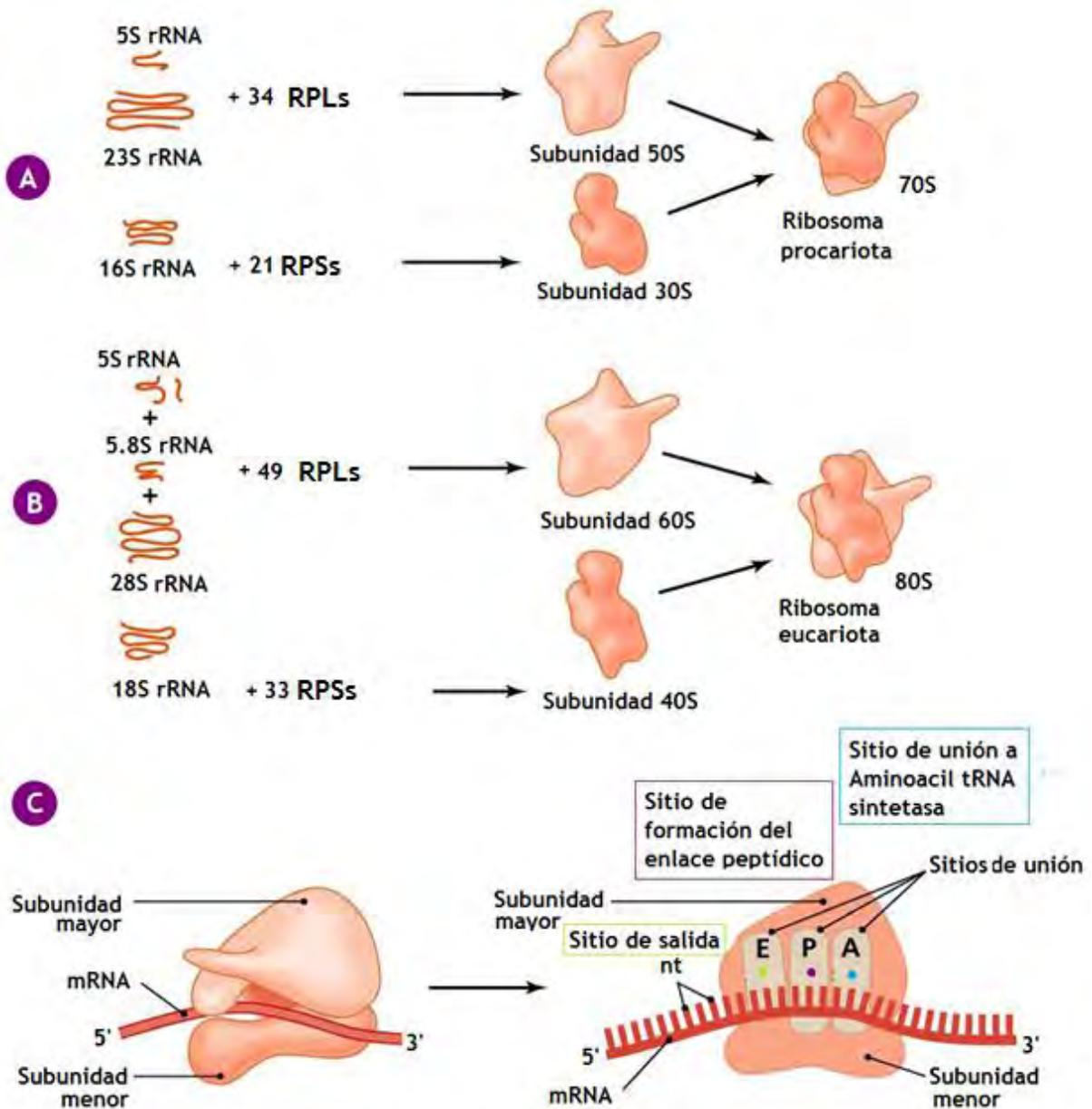


Figura 111. Subunidades y sitios del ribosoma procariontes y eucarionte (Modificada de Hardin, Kleinsmith y Bertoni, 2015).

El mecanismo de traducción entre procariontes y eucariontes es similar con pequeñas particularidades que determinan la posición en cómo se da la síntesis del polipéptido

iniciada por el mRNA. Como ya se sabe existe un codón de inicio que activa este mecanismo pero no es suficiente; la traducción no simplemente empieza en el extremo 5' del mRNA se necesita de un sitio específico denominado ORF que es el sitio específico que contiene la secuencia para codificar una proteína y de donde inicia la traducción (Barbosa, Peixero y Romão, 2013; Clancy y Brown, 2008; Cooper, 2010).

Tanto en procariontes como en eucariontes el extremo 5' no es codificante, en eucariontes es denominado 5' UTR una secuencia de ~35 pb que precede al ORF y se caracteriza por ser monocistrónico al codificar una sola cadena polipeptídica, la presencia del capuchón que se encuentra lejos de codón de inicio es la señal necesaria para iniciar la traducción (Figura 112a). Mientras que en procariontes el ORF es policistrónico ya que una misma secuencia es capaz de codificar diferentes proteínas al poseer varios sitios de inicio de la traducción. A este ORF le precede una secuencia Shine-Dalgarno 3 – 9 pb río arriba del codón de inicio que sirve como RBS posicionando al mRNA en el ribosoma al interactuar con el extremo 3' del rRNA 16S, así esta secuencia es la señal para iniciar la traducción no solo en el extremo 5' si no también en regiones internas del mRNA para formar así un ORF policistrónico (Figura 112b); finalmente ambos organismos poseen extremo 3' UTR no codificante (Barbosa, Peixero y Romão, 2013; Clancy y Brown, 2008; Cooper, 2010).

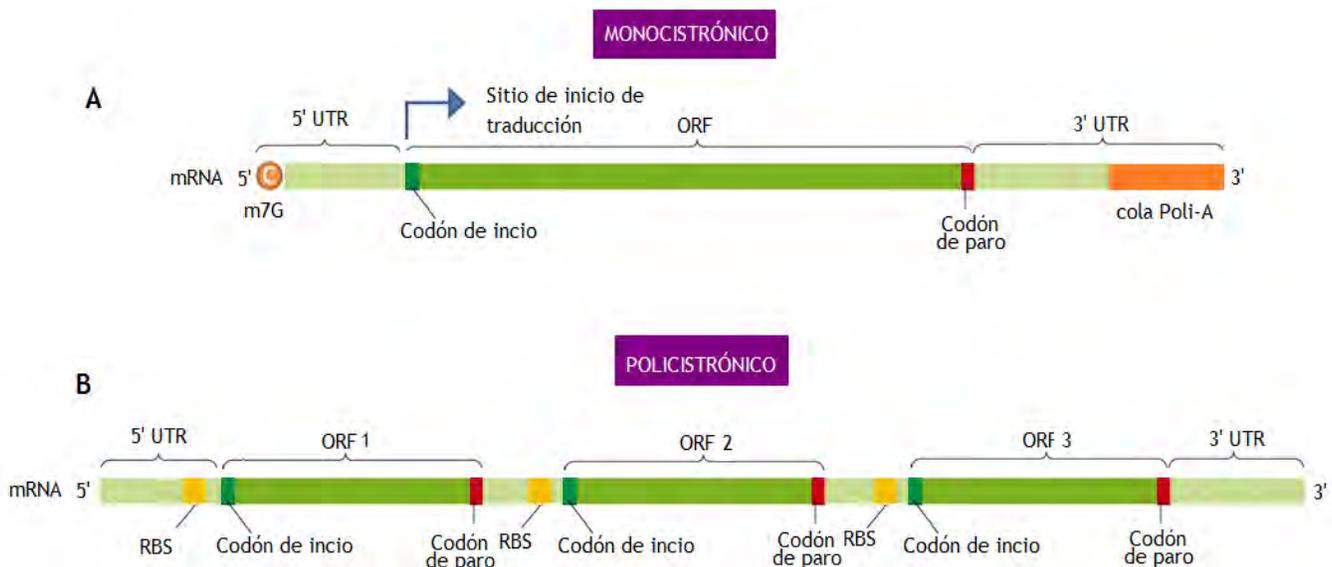


Figura 112. Orígenes de replicación del mRNA en eucariontes y procariontes (Modificada de Clancy y Brown, 2008).

Al igual que la replicación y transcripción, la traducción abarca las etapas de iniciación, elongación y terminación (Figura 113).

La iniciación se da cuando el mRNA se asocia con las subunidades ribosomales y un tRNA que transporta el primer aminoácido del polipéptido (Figura 113a); siendo ésta la única etapa que difiere más entre organismos procariontes de eucariontes (Barbosa, Peixero y Romão, 2013; Browning y Bailey-Serres, 2015).

En la elongación se da la unión codón – anticodón entre el mRNA y el tRNA donde se lee un codón a la vez y el aminoácido correspondiente a cada codón se une a la cadena del polipéptido en crecimiento. Esta etapa es un ciclo que se repite conforme cada aminoácido se añade a la cadena y ocurre en 3 pasos: el reconocimiento del codón se da en el sitio A del ribosoma, la formación del enlace peptídico en donde el ribosoma forma un enlace entre el aminoácido entrante (del tRNA del sitio A) y el último aminoácido de la cadena existente (del tRNA del sitio P) para así transferir el polipéptido hacia el tRNA del sitio A; y la translocación que implica que el ribosoma avance un codón en el mRNA para desplazar al tRNA que carga el aminoácido del sitio A al sitio P, quedando el sitio A vacío y el del sitio P hasta que se mueva hacia el sitio E donde sale del ribosoma (Figura 113b) (Browning y Bailey-Serres, 2015; Clancy y Brown, 2008; Barbosa, Peixero y Romão, 2013; Cooper, 2010).

Y la terminación que ocurre cuando el codón de paro se encuentra con el anticodón y el polipéptido recién sintetizado es liberado de éste (Figura 113c) (Clancy y Brown, 2008; Barbosa, Peixero y Romão, 2013; Browning y Bailey-Serres, 2015; Cooper, 2010).

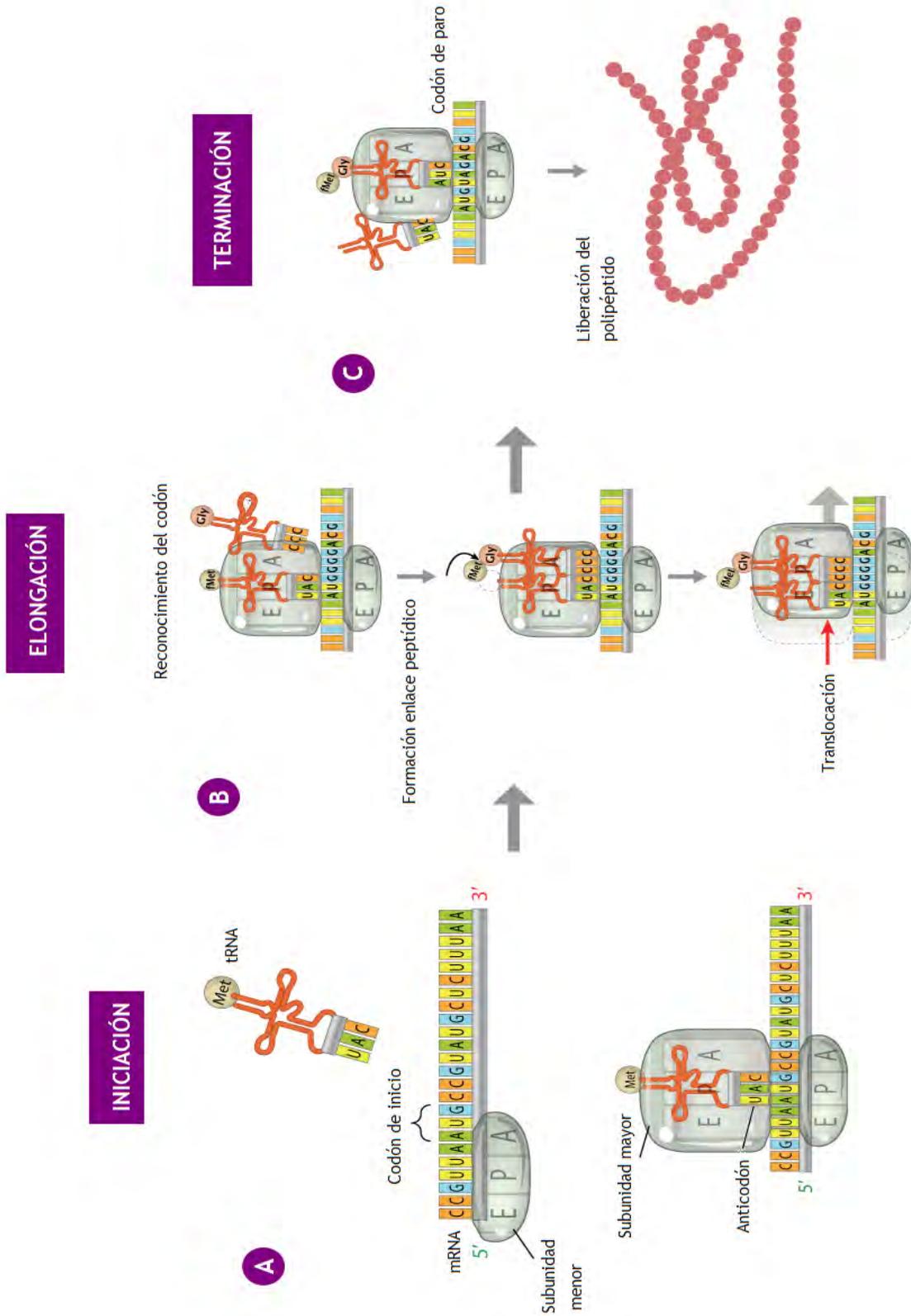


Figura 113. Esquema general de las etapas de la traducción (Modificada de Barbosa, Peixero y Romão, 2013).

12.1 Traducción Eucariota

La traducción es empleada por los organismos eucariontes para regular la expresión génica a través del control de ésta, la tasa de traducción puede ser controlada en cualquiera de sus tres etapas; sin embargo, ocurre principalmente en la iniciación cuando el ribosoma es reclutado al mRNA y posicionado en el codón de inicio. Esta etapa es crucial pues el ribosoma selecciona el mRNA a traducir y debe encontrar el codón de inicio en el ORF (Browning y Bailey-Serres, 2015; Johnson et.al., 2017).

12.1.1 Iniciación

La iniciación de la traducción en eucariontes es probablemente la fase más compleja ya que ésta difiere significativamente con el proceso que se da en procariontes y que es relativamente sencillo; empezando por que la unión mRNA-rRNA se da por medio de la secuencia Shine-Dalgarno y ésta interacción permite el reclutamiento del mRNA a la subunidad 30S en procariontes. En eucariontes al carecer de esa secuencia el mecanismo de reclutación del mRNA al ribosoma es más complejo iniciando con que éste se dan en tres eventos: primero la subunidad 40S y el tRNA iniciador (Met-tRNA) necesitan ser reclutados al mRNA, segundo, se necesita dar el reconocimiento del codón de inicio para establecer el correcto ORF y por último, la subunidad 60S debe de unirse al complejo para formar un complejo de elongación competente (Browning y Bailey-Serres, 2015; Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Johnson et.al., 2017; Sonenberg y Hinnebusch, 2009).

La iniciación de la traducción en organismos eucariontes consiste en el ensamblaje competente del complejo de iniciación que implica la unión entre el mRNA y el ribosoma 80S para continuar a la elongación, también involucra la correcta apareación entre el codón de inicio y el lazo anticodón del tRNA en el sitio P del ribosoma con el aminoácido inicial Met. Para esto se requiere de por lo menos 12 eIFs que catalizan el proceso que está dado en dos etapas: la formación del complejo de iniciación 48S con el apareamiento estable codón – anticodón en el sitio P de la subunidad 40S del ribosoma y su unión de éste a la subunidad 60S. Donde la iniciación de la traducción está dada por dos mecanismos y ambos involucran la acción de los eIFs: el primero es denominado de exploración ya que consiste en que el complejo 48S encuentre el codón de inicio en el mRNA comenzando por el extremo 5', y el segundo es un mecanismo interno que implica el reconocimiento de IRES. Un rasgo característico del mRNA eucarionte es que éste

posee el m7G en su extremo 5' y la cola Poli-A en el 3' y ambos se ven involucrados en la maquinaria de traducción para facilitar el proceso de iniciación en el citoplasma celular (Browning y Bailey-Serres, 2015; Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Johnson et.al., 2017; Sonenberg y Hinnebusch, 2009).

– *Mecanismo de exploración (factores de traducción)*

En la mayoría de los mRNAs el complejo 48S se forma por un mecanismo de exploración que requiere del complejo de pre-iniciación 43S (subunidad 40S, eIF2 TC, eIF3, eIF1, eIF1A y eIF5). La iniciación comienza con la disociación de las subunidades del ribosoma 80S preexistente, esto es porque la traducción es un proceso cíclico en donde las subunidades del ribosoma que participan en la iniciación provienen del post-TC ribosomal que es reciclado. La disociación de las subunidades es realizada por los factores eIF3 y eIF1A que se unen a la subunidad 40S; eIF1 promueve la disociación del tRNA para que pueda unirse a la subunidad menor en el sitio A mientras que eIF3 se une en el sitio E a través de su CTD y por eIF6 que se une a la subunidad 60S (Figura 115a). Esta disociación también requiere de proteínas ABCE1 que ayudan a catalizar la separación de las subunidades y su unión con los factores (Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Browning y Bailey-Serres, 2015; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Walsh y Mohr, 2011; Gingras, Raught y Sonenberg, 2009).

Una vez disociado el ribosoma el complejo eIF2 – TC necesita ser formado para unirse a la subunidad 40S y formar el PIC 43S; la principal función de eIF2 es unir el Met-tRNA al ribosoma. Este factor está compuesto por tres subunidades α , β , γ , necesarias para formar el eIF2 – TC, este se compone de la asociación entre eIF2-GTP-Met-tRNA (Figura 115b) en donde la subunidad γ posee el sitio de unión a GTP, mientras que la subunidad β lo posee hacia el tRNA. Una vez formado el eIF2 – TC se requiere que se una a la subunidad 40S del ribosoma, esta acción está catalizada por eIF5 que ayuda a posicionar al eIF2 – TC en el sitio P orientando el Met-tRNA hacia el sitio E, la asociación de éste termina de completar el complejo pre-iniciación 43S (Figura 115c). PIC es competente por sí solo de unirse al extremo 5' UTR mRNA pero requiere de los factores eIF4 e hidrólisis de ATP para unirse de una manera más estable (Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Browning y Bailey-Serres, 2015; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Walsh y Mohr, 2011; Gingras, Raught y Sonenberg, 2009).

Este grupo de factores incluyen eIF4B (69kDa) eIF4H y eIF4F y se caracterizan por actuar como CBPs, eIF4F es un complejo que abarca a las CBPs, eIF4E (24kDa), eIF4G (176kDa) y eIF4A (46kDa) con actividad RNA helicasa pues presenta una caja DEAD y juntos generan una región de mRNA lineal al romper todas la estructuras en forma de tallo/asa en el extremo 5' (Figura 115d). eIF4B y eIF4H potencializan la actividad helicasa de eIF4A al contener dominios RRM que son homólogos al sitio de unión a ATP en eIF4A. A su vez eIF4E contiene dos residuos Trp que crean una conexión proximal con el nucleótido inicial del capuchón estabilizando la unión, eIF4G envuelve el capuchón y se encuentra unido a eIF4E a través de su extremo NTD lo que crea cambios estructurales en la proteína estabilizando aun más la unión al m7G; mientras que eIF4A posee dos dominios con sitio de unión a ATP que le confieren la capacidad de tener una conformación abierta inactiva y una cerrada activa cuando se une al mRNA. Por último eIF4G en su extremo NTD posee tres dominios HEAT, HEAT1 y HEAT2 que estimulan la actividad de helicasa de eIF4A al alinearse con los motivos de la caja DEAD (Figura 114) (Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Browning y Bailey-Serres, 2015; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Walsh y Mohr, 2011; Gingras, Raught y Sonenberg, 2009).

También los factores eIF4 sirven como andamio y se unen a través de eIF3 al complejo pre-iniciación 43S en el ribosoma, PABP no es oficialmente un factor de iniciación pero está considerada dentro de este grupo ya que también favorece la unión al mRNA creando un puente con eIF4G (Figura 115e). Es así como está mediada la unión del PIC 43S al mRNA en donde eIF4E y eIF4G juegan el principal papel en la unión manteniendo el extremo 5' constantemente preparado para la unión al ribosoma través de eIF3 (Browning y Bailey-Serres, 2015; Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Walsh y Mohr, 2011; Gingras, Raught y Sonenberg, 2009).

Así, una vez unido el PIC 43S al ribosoma este explora la región 5'UTR en dirección 5'→3' hasta encontrar el codón de inicio (Figura 115f). Ésta exploración consiste en desenrollar estructuras secundarias que se puedan presentar en el extremo 5' UTR para que el PIC se pueda mover a través del mRNA además de que eIF3 se une a un sitio E que se encuentra río arriba del codón de inicio en el mRNA para formar un canal que contribuye en la exploración de cadena del mensajero. En mamíferos se requiere de la proteína DHX29 que se une a la subunidad 40S para aumentar la eficiencia de exploración al formar un canal de unión al mRNA, y también se necesita de la proteína DDX3 que al ser una helicasa facilita la formación de una cadena lineal de mRNA; con

esta acción también se genera una pérdida parcial de eIF2-GTP para formar el complejo 48S (Figura 115g) (Browning y Bailey-Serres, 2015; Walsh y Mohr, 2011; Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Gingras, Raught y Sonenberg, 2009).

Para asegurar la fidelidad de la iniciación de la traducción el complejo 48S debe poseer un mecanismo discriminatorio que prevenga el apareamiento parcial de los codones con el Met-tRNA mientras se hace la exploración, esta función está desarrollada por eIF1 que le confiere la capacidad al complejo 48S de discriminar los codones que no sean AUG. Después de reconocer el codón de inicio se completa la formación del complejo 48S en donde el ribosoma entra en un estado de arresto para que se de la unión codón-anticodón, ésta acción está mediada por eIF5, eIF5B y GAP; donde eIF5 se une a eIF2 β para inducir la actividad GTPasa de eIF2 γ y debilitar el enlace con GTP creando un GDP, acción requerida para la unión de la subunidad 60S. La unión de 60S está mediada por eIF5B que disocia los factores eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF2-GDP (Figura 115h) pues ocupa el mismo lugar que eIF2, la unión de la subunidad 60S facilita el desplazamiento de los factores y el posicionamiento de eIF5B en el complejo es temporal pues su actividad promueve la hidrólisis de GTP liberándolo junto con eIF1A para dar lugar a la unión de la subunidad 60S y formar el complejo de iniciación 80S (Figura 115i). En la tabla 19 se muestra un resumen de los factores de iniciación y su función (Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Browning y Bailey-Serres, 2015; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Walsh y Mohr, 2011).



Figura 114. Dominios de eIF4G (Modificada de Browning y Bailey-Serres, 2015).

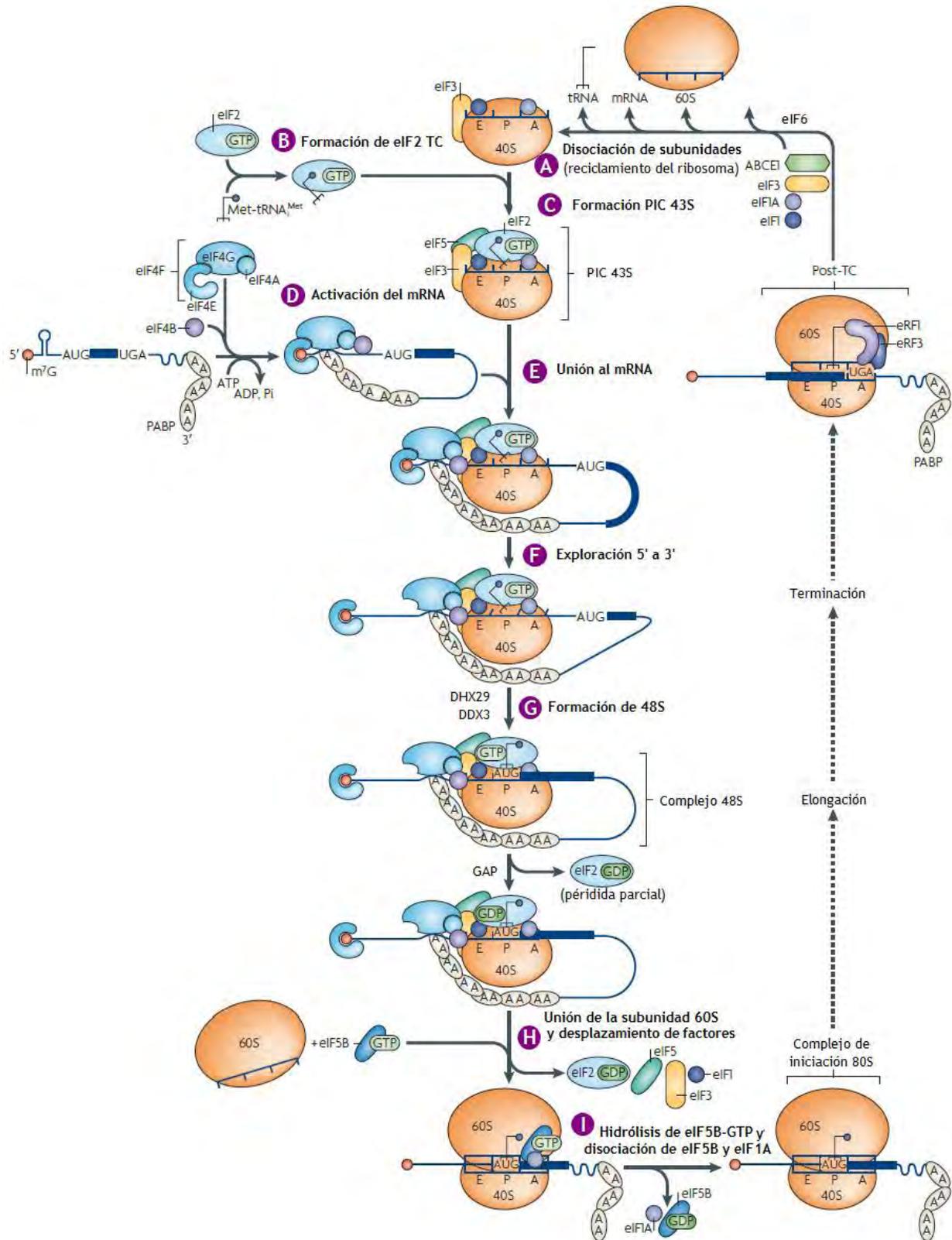


Figura 115. Mecanismo de iniciación de la traducción en eucariotes (Modificada de Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Browning y Bailey-Serres, 2015).

Tabla 19. Factores de iniciación de la traducción en eucariontes (Modificada de Walsh y Mohr, 2011; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

Factor	Subunidades, masa molecular (kDa)	Función
Factores principales		
eIF2	3 (36.1, 38.4 y 51.1)	Formar complejo eIF2 TC
eIF3	13 (800)	Se une a la subunidad 40S, eIF1, eIF4G y eIF5 estimulando la unión del eIF2 TC a 40S para formar PIC 43S, promueve la unión de PIC 43S al mRNA y su subsecuente exploración, disocia las subunidades uniéndose a 40S
eIF1	1(12.7)	Asegura fidelidad en la unión al codón de inicio, promueve exploración, y previene hidrólisis prematura inducida por eIF5
eIF1A	1(16.5)	Estimula la unión del eIF2 TC a la subunidad 40S y la acción de eIF1
eIF4E	1 (24.5)	Unión al capuchón
eIF4A	1 (46.1)	Actividad RNA helicasa
eIF4G	1 (175.5)	Se une a eIF4E, eIF4A y eIF3 y promueve la actividad helicasa de eIF4A
eIF4F	3 (246.1)	Complejo que se une al capuchón y media la unión de PIC 43S al mRNA y su exploración
eIF4B	1 (69.3)	Potencializa la actividad helicasa de eIF4A
eIF4H	1 (27.4)	Potencializa la actividad helicasa de eIF4A y posee un fragmento homólogo a eIF4B
eIF5	1 (49.2)	GTPasa que induce la hidrólisis de eIF2-GTP en el reconocimiento del codón
eIF5B	1 (138.9)	GTPasa que media la unión de la subunidad 60S
eIF2B	5 (33.7, 39, 50.2, 59.7 y 80.3)	Promueve intercambio GDP – GTP en eIF2

Factores auxiliares		
eIF6	1 (26.6)	Factor anti-asociación de las subunidades, se une a 60S
DHX29	1 (55.3)	Se une a la subunidad 40S y promueve la exploración de 48S
PABP	1 (70.7)	Se une a eIF4G y eIF3 y promueve la unión de eIF4F al capuchón

– *Mecanismo IRES*

El otro mecanismo por cómo puede estar mediada la iniciación de la traducción es por un mecanismo interno de unión del ribosoma que implica el reconocimiento de la secuencia IRES, éste es un elemento del RNA que media su reclutamiento al ribosoma. Este tipo de iniciación es principalmente utilizado por los virus que se unen a la subunidad 40S por medio de IRES aunque se ha visto que algunas levaduras lo poseen y lo emplean para evitar la complejidad de la iniciación de la traducción (Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Walsh y Mohr, 2011; Johnson et.al., 2017; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

Los virus emplean elementos especializados de RNA (IRES) para reclutar su mRNA al ribosoma en una manera dependiente del capuchón. De este mecanismo se tienen 4 tipos de mecanismos basados en la interacción no canónica con los eIFs y la subunidad 40S y la complejidad de iniciación del mecanismo (Figura 116). Los IRES del tipo 3 y 4 están compuestos por RNAs con dominios múltiples que forman complejos de alta afinidad con las subunidades del ribosoma y manipulan su conformación para promover la síntesis proteica (Walsh y Mohr, 2011; Johnson et.al., 2017; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

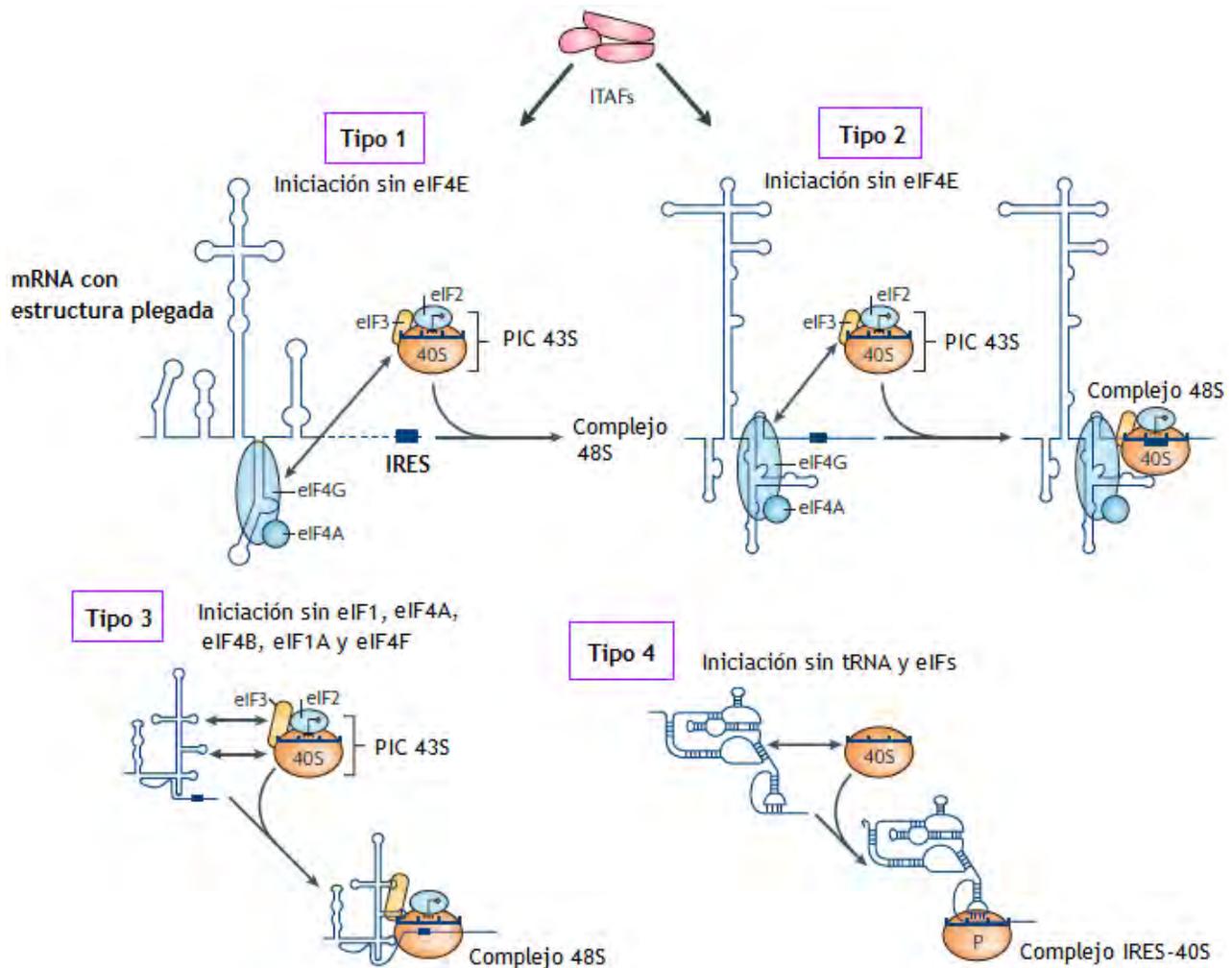


Figura 116. Mecanismo de activación IRES (Modificada de Walsh y Mohr, 2011; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

El tipo 1 y 2 involucran la unión específica del dominio p50 en el CTD de eIF4G (que se encuentra adyacente al dominio con sitio de unión a eIF4A) a la secuencia, por lo que este factor potencializa la unión; la unión eIF4G – eIF4A – eIF3 recluta a los componentes del PIC 43S en ausencia de eIF4E, eIF5B y eIF2 que se requieren para estimular la unión (Figura 116) (Walsh y Mohr, 2011; Johnson et al., 2017; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

El tipo 3 involucra la interacción entre eIF3, la subunidad 40S y los componentes de PIC 43S, donde la unión IRES – 40S se da en el codón de inicio independiente de la actividad de eIF4F, eIF4B, eIF2, eIF1 y eIF1A, pues la unión con 40S es directamente llevada a cabo por eIF3 que produce un complejo 48S competente para la posterior unión de 60S (Figura 116). Este tipo de IRES es empleado por virus HCV y el elemento se encuentra en

el extremo 5' UTR con aproximadamente 340 nt (Figura 117a). Está compuesto por los dominios II, III y IV, y dos subdominios que específicamente se unen al eIF3 y a la subunidad 40S. El dominio II es un bucle largo e irregular que adopta una forma distorsionada de L y contiene los subdominios IIa y IIb que interactúan con 40S, el dominio III posee los subdominios a – f necesarios para la interacción con eIF3 y el rRNA 18S; el sitio de apareamiento al codón de inicio se encuentra en el dominio IV que debe ser desplegado para unirse al mRNA (Figura 117b) (Walsh y Mohr, 2011; Johnson et.al., 2017; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

El IRES tipo 3 emplea ciertos eIFs para su iniciación y se puede dividir en tres pasos: iniciando con la formación de un complejo IRES – 40S binario de alta afinidad seguido de la reclutación al complejo con eIF3 y el Met-tRNA a través de eIF2 – TC para formar el complejo de iniciación 48S. Finalmente eIF5 con hidrólisis de GTP por eIF5B atraen a la subunidad 60S para formar el ribosoma 80S competente para la elongación, en éste el codón de inicio se encuentra en el sitio P unido al tRNA (Figura 117c) (Johnson et.al., 2017; Walsh y Mohr, 2011; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

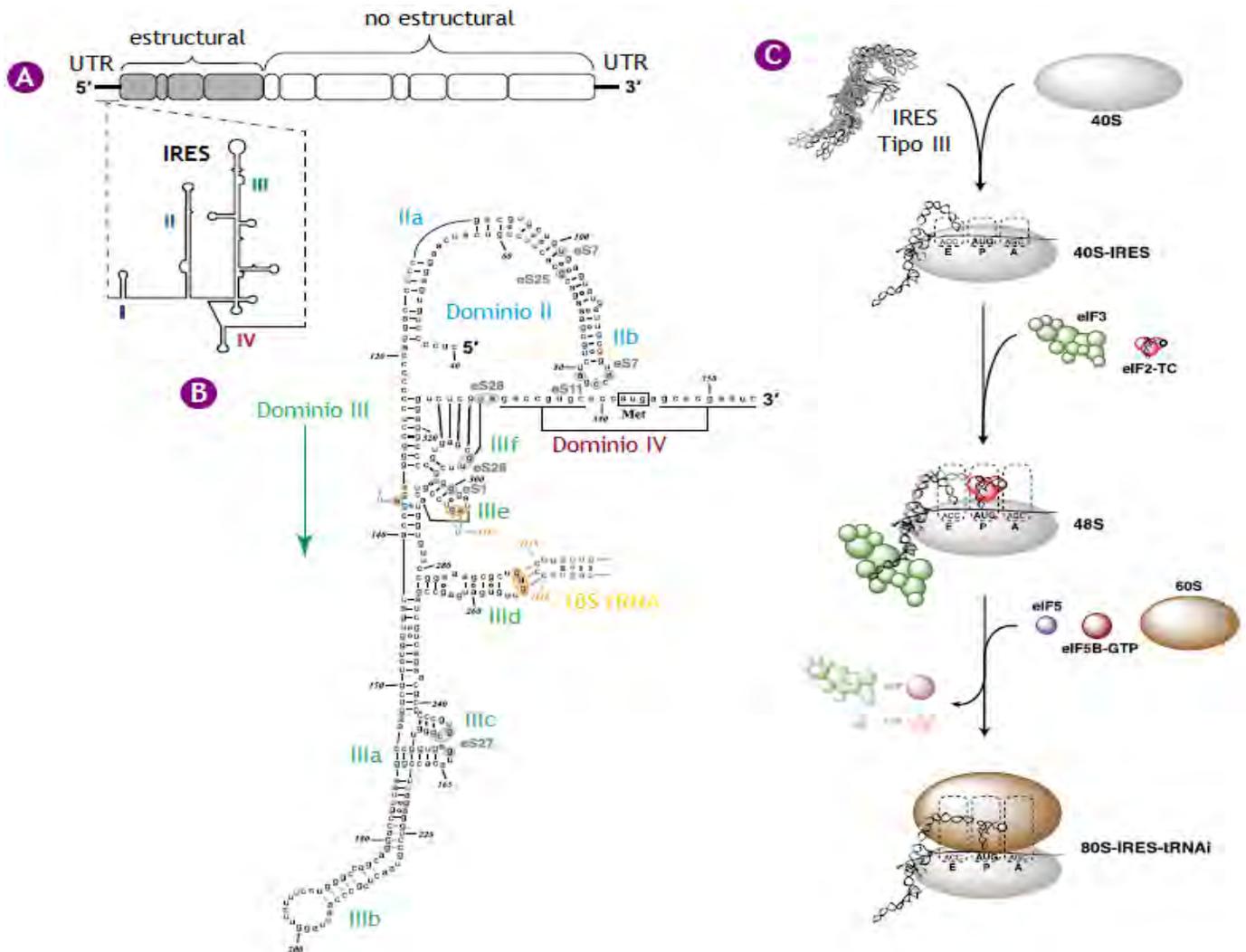


Figura 117. IRES tipo III (Modificada de Johnson et.al., 2017).

El IRES tipo 4 involucra la unión directa de IRES con la subunidad 40S a través del sitio P en ausencia de tRNA y eIFs induciendo cambios conformacionales que le facilitan la unión con la subunidad 60S. Los virus que son capaces de iniciar la traducción por este tipo de mecanismo se caracterizan por presentar una región IGR que es donde poseen la secuencia IRES para la síntesis de proteínas; además de iniciar la traducción en ausencia de eIFs también lo hacen sin emplear el codón de inicio (Figura 118a). El IGR – IRES es un segmento de 190 nt de RNA río arriba del codón que codifica para alanina y posee 3 regiones con dominios PK esenciales para su actividad IRES: la región 1 empieza en el extremo 5' y posee a PKII, la región 2 se posiciona en la superficie y es donde se da la interacción con las subunidades 40S y 60S con el PKIII y la región 3 de IRES es un segmento corto que contiene un bucle rico en A indispensable para la unión al ribosoma y esencial para los eventos de iniciación y el ensamblaje de 80S con la presencia de PKI

(Figura 118b). Este tipo de IRES se une a la subunidad 40S con alta afinidad y de manera irreversible, ésta unión recluta a la subunidad 60S para ensamblar el ribosoma 80S y que éste sea competente para la elongación en ausencia de eIFs. El siguiente tRNA que va a entrar por el sitio A en la elongación es reclutado al ribosoma como parte del eEF1A – TC catalizado por eEF2-GTP, además estos factores median la pseudo-translocación del tRNA en la elongación por medio de este mecanismo (Figura 118c) que es empleado por virus CrPV (Johnson et.al., 2017; Walsh y Mohr, 2011; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

IRES es resistente a la regulación por medio de mecanismos eIFs como la fosforilación de eIF2 y de eIF4E porque la acción de estos factores no es tan crucial como en el mecanismo de exploración, la iniciación por IRES tipo 1 y 2 también requiere ITAFs (PTB, ITAF45, autoantígeno La) para estabilizar la unión con el ribosoma y la conformación tridimensional (Johnson et.al., 2017; Walsh y Mohr, 2011; Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Jackson, Hellen y Pestova, 2010).

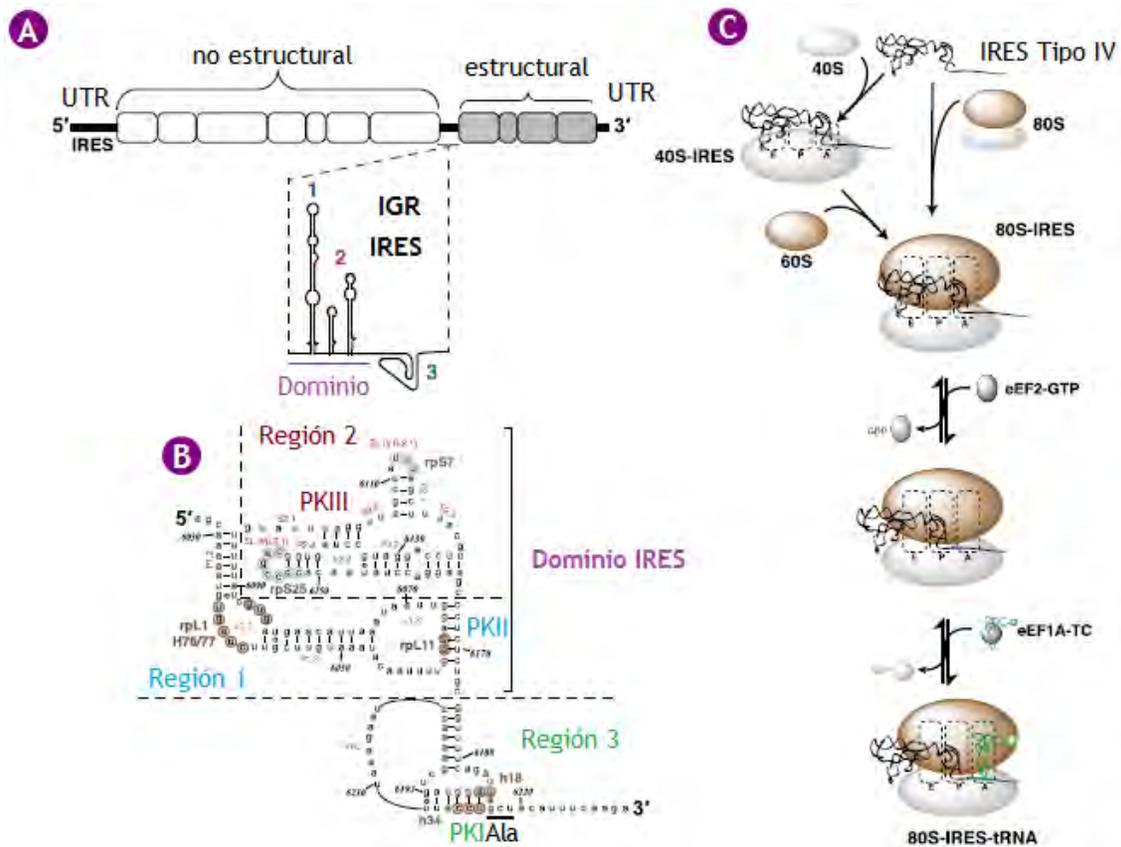


Figura 118. IRES tipo IV (Modificada de Johnson et.al., 2017).

Los mecanismos por cómo se puede regular la iniciación de la traducción son muchos pero los principales involucran al factor eIF2 y eIF4E. La fosforilación de eIF2 α en su Ser51 es un mecanismo esencial en el control de la traducción, ésta acción inhibe competitivamente a eIF2-GDP y eIF2B disminuye el ensamblaje del eIF2 – TC. Adicionalmente la fosforilación de eIF2 α la realiza GCN2 e induce la activación de GCN4, un activador transcripcional que tiene efectos inhibitorios sobre el ORF pues no se completa la traducción de todo el ORF ya que se reinicia por acción de la inhibición de eIF2 – TC (Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Browning y Bailey-Serres, 2015; Gingold y Pilpel, 2011; Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Gingras, Raught y Sonenberg, 2009).

Otro proceso de regulación y control de la tasa de traducción involucra el reconocimiento del capuchón en el extremo 5' del mRNA por eIF4F, la unión m7G – eIF4F se puede ver obstaculizada por un homólogo de eIF4E, 4E-HP; simultáneamente la interacción entre eIF4G y eIF4E en el complejo eIF4F es inhibida por miembros de la familia 4E-BPs proteínas que compiten con eIF4G por el sitio de unión con eIF4E y como consecuencia la unión al capuchón es inhibida pero la traducción dependiente de IRES no se ve afectada.

La unión de 4E-BP a eIF4E se da cuando la proteína es hipofosforilada creando un enlace fuerte con eIF4E, si se encuentra fosforilada debilita su unión con el factor; la fosforilación de 4E-BP está dada por mTOR una cinasa Set/Thr que está involucrada en vía de señalización PI3K/Akt. mTOR es responsable de directa o indirectamente fosforilar a 4E-BP (Sonenberg y Hinnebusch, 2009; Browning y Bailey-Serres, 2015; Gingold y Pilpel, 2011; Jackson, Hellen y Pestova, 2010; Gingras, Raught y Sonenberg, 2009).

12.1.2 Elongación

La elongación de la traducción es una etapa evolutivamente conservada en donde la progresión del ribosoma cataliza la formación de un polipéptido a través de la decodificación del mRNA. Una vez que se unió la subunidad 60S y se formó el ribosoma 80S éste posiciona al Met-tRNA en el sitio P que está apareado con el codón de inicio; un segundo codón del ORF que se encuentra en el sitio A subsecuente al codón de inicio espera la interacción con su anticodón y con la enzima aminoacil tRNA transferasa, la enzima se encuentra acoplada al factor eEF1A-GTP (Figura 119a) y por hidrólisis del GTP que realiza el factor eEF1B se libera al factor eEF1A para que la enzima se posicione en sitio A (Dever y Green, 2012; Browning y Bailey-Serres, 2015; Frank, 2016; Walsh y Mohr, 2011).

Una interacción apropiada codón – anticodón en el sitio A estimula a la enzima para que forme un enlace peptídico entre el Met-tRNA y el siguiente aa-tRNA. La formación del enlace peptídico se da cuando un grupo amino de la aminoacil tRNA transferasa ataca al carbono del éster de Met-tRNA para formar una pareja de aminoácidos (Figura 119b) que activa un movimiento de los tRNAs creando estados P/E y A/P. El enlace entre Met-tRNA – aa – tRNA (peptidil-tRNA, en el sitio A) deja desacetilado al tRNA del sitio P para que así la translocación subsecuente de un codón en el mRNA cambie el peptidil-tRNA al sitio P y el tRNA desacetilado al sitio E dejando siempre libre el sitio A para que el aa-tRNA entrante continúe el ciclo de formación de la cadena polipeptídica (Figura 119c) (Dever y Green, 2012; Browning y Bailey-Serres, 2015; Frank, 2016; Walsh y Mohr, 2011).

La translocación es facilitada por la unión del factor eEF2-GTP y la hidrólisis de GTP, ésta hidrólisis estabiliza los estados híbridos cuando se está dando la translocación de los tRNAs y liberando a eEF1A. eEF2 actúa principalmente previniendo la regresión de los tRNAs para que el sitio A pueda estar disponible para el siguiente aminoacil-tRNA unido a eEF1A (Figura 119d). La hidrólisis de GTP libera a eEF1A del ribosoma para que pueda

ser reciclado y se une a la siguiente aminoacil-tRNA; el reciclaje de eEF1A requiere del factor eEF1B (Figura 119e) éste está compuesto de 2 – 4 subunidades que catalizan el intercambio de guanina en eEF1A; la subunidad eEF1B α inserta un residuo de lisina al fosfato y de eEF1A para directamente desestabilizarlo (Frank, 2016; Walsh y Mohr, 2011; Dever y Green, 2012; Browning y Bailey-Serres, 2015).

La utilización de eEF1A y la translocación de los tRNAs son ciclos repetitivos hasta que se encuentre con el codón de paro es por eso que la elongación de la traducción a veces es nombrada por ciertos autores como ciclo elongativo. A parte de los factores eEF1 y eEF2 los mamíferos requieren de eEF3, una ATPasa que contiene dos ABCs. Éste factor se une por medio de sus ABCs al sitio E del ribosoma para facilitar la liberación del tRNA desacetilado después de que se dio la translocación. Por último, estudios recientes han revelado un factor adicional que se requiere en la elongación de la traducción, el factor eEF5 tiene un papel emergente ya que está involucrado en la elongación de secuencias de aminoácidos enriquecidas en prolina o glicina (Dever y Green, 2012; Browning y Bailey-Serres, 2015; Frank, 2016; Walsh y Mohr, 2011).

12.1.3 Terminación

La elongación termina cuando la translocación posiciona a uno de los tres codones de paro en el sitio A del ribosoma, lo que también da señal a la terminación de la traducción. Esta etapa termina en la liberación del péptido del ribosoma y está dada por los factores proteicos RFs; éstos se dividen en dos clases: la clase I incluye al eRF1 que se encarga de reconocer con una alta fidelidad estos codones de paro e hidrolizan al péptido para retirarlo del ribosoma y la clase II incluye a eRF3 una GTPasa que acelera la disociación del polipéptido (Dever y Green, 2012; Browning y Bailey-Serres, 2015; Kisselev, Ehrenberg y Frolova 2013).

eRF1 se une al sitio A a través de su NTD cuando el codón de paro se posiciona en ese mismo sitio ya que es capaz de reconocer cualquier codón de paro (UAA, UAG, UGA) y previene la entrada de complejos EF1A – aa-tRNA (Figura 119f). eRF3-GTP es reclutado a eRF1 a través de su CTD para potencializar su acción (Figura 119g) y por hidrólisis de GTP eRF3 aumenta la hidrólisis del polipéptido y la eficiencia en la terminación. eRF1 es retenido después de la terminación ya que es importante para el reciclaje del ribosoma pues recluta a ABCE1 que actúa junto con eIF6 para disociar las subunidades (Figura 119h). Cabe mencionar que la disociación del polipéptido se puede dar por la hidrólisis de

Como se puede observar en la Figura 119 la terminación es seguida por un reciclaje de las subunidades para un reuso eficiente de éstas; en la disociación de eRF3 hasta este punto de la traducción el ribosoma 80S, mRNA, eRF1 y polipéptido-tRNA siguen unidos y su disociación para el reciclaje requiere que las subunidades se separen así como de que el tRNA desacetilado sea liberado (Browning y Bailey-Serres, 2015; Dever y Green, 2012).

Como ya se mencionó ésta disociación está dada por la acción de ABCE1 en complejo con RLI1, este complejo requiere de la hidrólisis de ATP para catalizar la disociación de las subunidades donde la previa disociación de eRF3 es requerida pues al liberarse este factor crea un cambio conformacional en el sitio P que favorece y facilita la liberación del polipéptido. Ya se había mencionado que la disociación del complejo ribosomal puede ocurrir después de la terminación o en algunos casos particulares el complejo ribosomal se mantiene para permitir eventos de “re-iniciación” que es cuando se da el reciclaje de ribosomas. A diferencia de las bacterias en eucariontes no existe una proteína encargada de la disociación de los RFs y no existe evidencia de que eRF3 promueva la disociación de eRF1 por lo que se requiere de las proteínas citosólicas ABCE1 para el reciclaje. Estudios recientes proponen una vía NGD para las proteínas en donde se ve involucrado el reciclaje ribosomal, ésta vía es activada por los factores Dom34 y Hbs1 que se unen al sitio A del ribosoma para proveer su disociación en una manera codón independiente (Browning y Bailey-Serres, 2015; Dever y Green, 2012).

12.1.4 Modificaciones postraduccionales

Las proteínas son estructuras formadas por cadenas de aminoácidos ordenados en una secuencia precisa que adoptan una conformación tridimensional determinada pero flexible, éstas pueden compararse con dispositivos mecánicos para ejecutar diversas funciones en la célula desde proporcionar soporte estructural hasta favorecer reacciones químicas, controlar el tráfico intracelular y el flujo de sustancias entre la célula y el exterior así como regular la expresión de los genes. La codificación de los genes está dada por la transcripción y traducción como ya previamente se explicó pero los polipéptidos liberados en la terminación de la traducción pueden sufrir numerosas modificaciones químicas que tienen importantes efectos moduladores y pueden conllevar a la activación o inactivación de su función biológica, alterar su localización celular, o hasta su capacidad para interactuar con otras (Pérez-Sala, 2012; Prabakaran, et.al. 2012; Heal y Tate, 2010).

Estas modificaciones ocurren después de que el polipéptido fue sintetizado y liberado del post-TC por lo que se denominan modificaciones postraduccionales (PTM) y son requeridas para volver funcionales a las proteínas que lo requieren después de su traducción. La naturaleza de estas modificaciones es muy variada y pueden ser modificaciones permanentes o altamente reversibles. Las PTM son un mecanismo bioquímico en el cual los aminoácidos de la proteína son modificados covalentemente y son necesarias para activarlas o variar la función de éstas. Entre las modificaciones que puede sufrir la proteína se encuentran reacciones de oxidación, glicosilación, acetilación, proteólisis, unión de moléculas lipídicas, fosforilaciones, unión covalente de otras proteínas pequeñas como la ubiquitina, etc. Tomando en cuenta la variedad de modificaciones postraduccionales existentes este mecanismo podría dar lugar a más de un millón de especies diferentes de proteínas que desempeñarían distintas funciones en la célula; debido a la gran variedad de modificaciones sólo se hablarán de las más importantes y comunes (Pérez-Sala, 2012; Prabakaran, et.al. 2012; Heal y Tate, 2010).

Una de ellas es la modificación covalente que consiste en la adición (mediante una unión covalente) de una especie química a la cadena lateral de alguno de los aminoácidos de la proteína salida del ribosoma, este mecanismo involucra la formación y ruptura de enlaces covalentes por lo que es necesaria la participación de una enzima para catalizar la unión y de la hidrolasa para la separación originando dos formas de la proteína. La adición del grupo modificador provoca una perturbación de la estructura tridimensional confiriéndole a la proteína la capacidad de intensificar su actividad, sus interacciones con otras moléculas, sus mecanismos de control y regulación y modificar su localización celular, etc (Prabakaran, et.al. 2012; Pérez-Sala, 2012; Chuh, Batt y Pratt, 2016; Siman y Brik, 2012; Heal y Tate, 2010).

La fosforilación es la modificación regulatoria más común en eucariotas, ésta se basa en fosforilar un residuo de aminoácido lo que ocasiona un cambio conformacional en la proteína afectando su función, por lo que es un mecanismo que puede controlar la actividad, estructura y localización celular de una proteína. Por ejemplo, las fosforilaciones en la Thr-14 y Tyr-15 en las Cdks tienen un efecto sinérgico pues ambas son inhibitoras de la actividad, mientras que la fosforilación en Thr-160 tiene un efecto antagónico con las anteriores pues es activadora (Chuh, Batt y Pratt, 2016; Siman y Brik, 2012; Prabakaran, et.al. 2012; Pérez-Sala, 2012; Heal y Tate, 2010).

La unión de cadenas laterales de glúcidos a los aminoácidos es otra de muchas PTM pero una de las principales, ésta se trata de la unión covalente de uno o varios radicales de glúcidos encadenados con la cadena del polipéptido y este mecanismo se da principalmente en proteínas de membrana o que van a ser secretadas; la función de estos oligosacáridos añadidos es favorecer o estabilizar la conformación final de la proteína extracelular aumentando su vida media al incrementar su estabilidad y resistencia a la digestión por proteasas, también pueden aumentar su solubilidad y son capaces de actuar como señales de reconocimiento hacia algunos receptores. Este mecanismo está catalizado por la enzima Glucosil transferasa (Chuh, Batt y Pratt, 2016; Prabakaran, et.al. 2012; Pérez-Sala, 2012; Siman y Brik, 2012; Heal y Tate, 2010).

Las PTMs representan los mecanismos básicos para incrementar la diversidad biológica y química del genoma. En la tabla 20 se resumen las PTMs más estudiadas y se muestran los residuos más significativos en donde se llevan a cabo, las 5 primeras son las modificaciones más simples mientras que las dos últimas se caracterizan por ser complejas, mientras que en la Figura 120 se muestra el mecanismo de algunas de estas (Prabakaran, et.al. 2012; Pérez-Sala, 2012; Chuh, Batt y Pratt, 2016; Siman y Brik, 2012; Heal y Tate, 2010).

Tabla 20. Modificaciones postraduccionales reversibles en eucariontes (Modificada de Prabakaran, et.al. 2012).

PTM	Grupo modificador	Donador	Residuo
Fosforilación	PO ³	ATP	S, T, Y
Acetilación	CH ₃ CO	AcCoA	K
GlcNAcilación	C ₆ H ₁₂ O ₅ (NH)CH ₃ CO	UDP-GlcNAc	S, T
Palmitoilación	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO	Palmitoil-CoA	C
Metilación	CH ₃	SAM	K
ADP ribosilación	ADO-ribosa	NAD ⁺	R, K, E
Ubiquitinización	Ub, SUMO	-	K

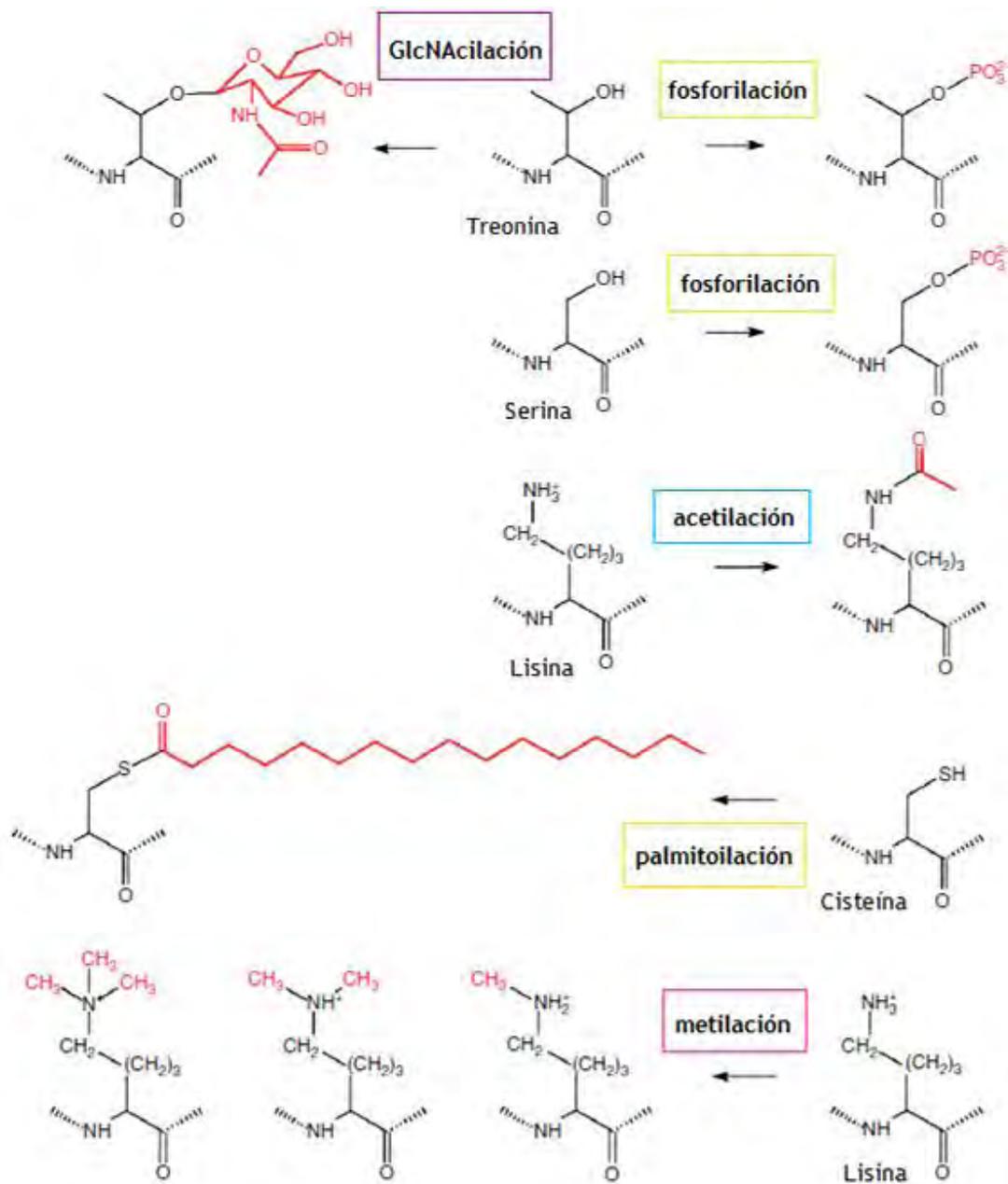


Figura 120. Mecanismo de acción de algunas PTM (Modificada de Prabakaran, et.al. 2012; Chuh, Batt y Pratt, 2016).

Existen dos tipos principales de glicosilación proteica que pueden modificar gran número de proteínas localizadas en la superficie celular, espacio extracelular o en la vía secretora a través de la adición de oligosacáridos. Adicionalmente proteínas intracelulares pueden servir como sustratos para este tipo de PTM al adicionarles monosacáridos N-acetilglucosamina, este mecanismo es conocido como O-GlcNAc (Figura 121) en donde el 50% de las proteínas de mamíferos pasan por este tipo de modificación. La glicosilación puede

alterar la vida media de las proteínas en circulación y mediar el contacto celular entre proteínas, células vecinas y patógenos, mientras que la glicosilación intracelular afecta la localización y señal de transducción proteica (Chuh y Pratt, 2015; Walsh, Garneau-Tsodikova y Gatto, 2015; Chuh, Batt y Pratt, 2016; Heal y Tate, 2010).

La adición de un grupo metilo es una manera reversible de PTM en donde la lisina y arginina sufren principalmente esta modificación; ésta reacción se da por acción de la metil transferasa SAM (S-adenosil-L-metionina) el donador del grupo metilo. Por otra parte la acetilación de residuos de lisina es una PTM asociada a cambios epigenéticos en la transcripción génica; la acetilación también puede ocurrir en el NTD de serina o treonina a través de enlaces éster incrementando la posibilidad de variación proteica (Figura 122) (Chuh y Pratt, 2015; Walsh, Garneau-Tsodikova y Gatto, 2015; Chuh, Batt y Pratt, 2016; Heal y Tate, 2010).

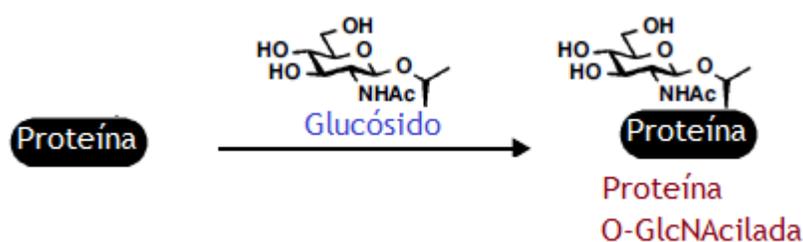


Figura 121. Mecanismo glicosilación (Modificada de Chuh y Pratt, 2015; Chuh, Batt y Pratt, 2016).

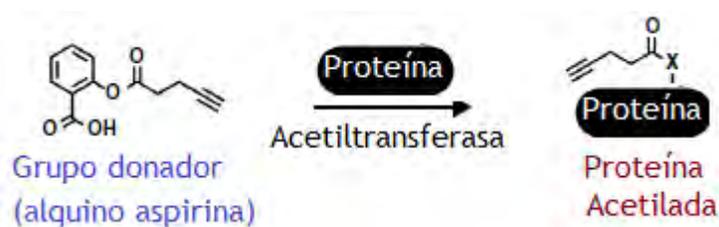


Figura 122. Mecanismo acetilación (Modificada de Chuh y Pratt, 2015; Chuh, Batt y Pratt, 2016).

La acilación proteica se da por la adición de largas cadenas de ácidos grasos y es crucial para la funcionalidad de la membrana y otras interacciones hidrofóbicas, la adición de 14 – 16 carbonos sin ramificar son los métodos más estudiados de PTMs. Este es un tipo de modificación que también es denominado lipidación y regula la afinidad, localización y capacidad de tráfico de la membrana, en donde la N-miristoilación y la S-palmitoilación son las más frecuentes (Figura 123a). La N-miristoilación implica la unión covalente irreversible un miristato (ácido graso de 14 carbonos) al NTD de la glicina catalizado por la enzima miristol – CoA en complejo con la N-miristol transferasa (NMT), a pesar de que

este tipo de PTM es esencial el ácido mirístico es relativamente raro *in vivo* pues solo <3% del proteoma está miristoilado. Principalmente ocurre co-traduccionalmente pero se ha observado que también puede ser PTM. Por el contrario la S-palmitoilación es la adición de un grupo no saturado de palmitol de 16 carbonos a los tioles de cisteína que sirven como blanco en la proteína a modificar; esta adición promueve interacciones hidrofóbicas reversibles a comparación de la N-miristoilación que es irreversible. Las proteínas blanco de la palmitoilación incluyen enzimas regulatorias, proteínas de andamio y receptores de membrana (Chuh y Pratt, 2015; Chuh, Batt y Pratt, 2016; Heal y Tate, 2010; Siman y Brik, 2012).

La S-prenilación es otra clase de lipidación que afecta al 2% del proteoma en mamíferos, se caracteriza por la adición irreversible de isoprenoides ya sea farnesil de 15 carbonos o geranylgeranil de 20 al CTD de la cisteína a través de un enlace tioéter; los sustratos de la prenilación requieren modificaciones para poder asociarse con la membrana y regular su función. En la célula secuencias cortas de aminoácidos codifican para los elementos de reconocimiento para la lipidación y son lo suficientemente fuertes para promover la modificación, se requiere de mínimo una secuencia de 10 aminoácidos para que se dé la reacción. La fosforilación en mamíferos ocurre principalmente en residuos de serina, treonina y tirosina catalizada por enzimas fosfatasa, proteínas cinasas que transfieren un grupo fosfato al residuo de aminoácido (Figura 124) (Chuh y Pratt, 2015; Chuh, Batt y Pratt, 2016; Heal y Tate, 2010; Siman y Brik, 2012).

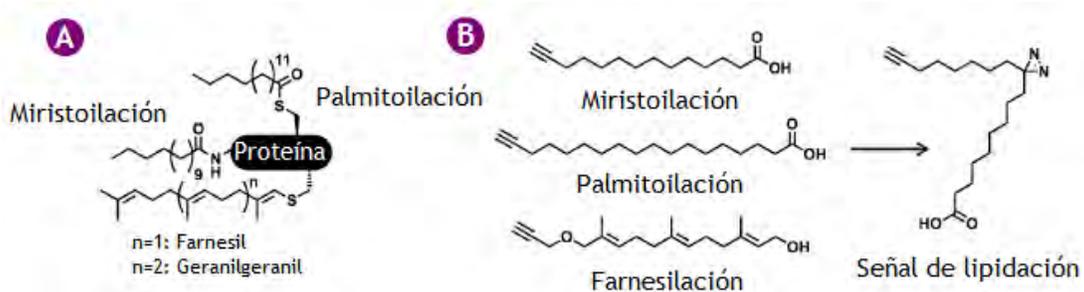


Figura 123. Mecanismo lipidación/acilación, palmitoilación y miristoilación. (A) Las proteínas pueden ser modificadas por varios tipos de lípidos. (B) Ejemplos de lípidos que sirven como señales metabólicas para la visualización e identificación de proteínas lipidadas e interacciones proteína-proteínas lípido-dependientes (Modificada de Chuh, Batt y Pratt, 2016; Chuh y Pratt, 2015; Heal y Tate, 2010).

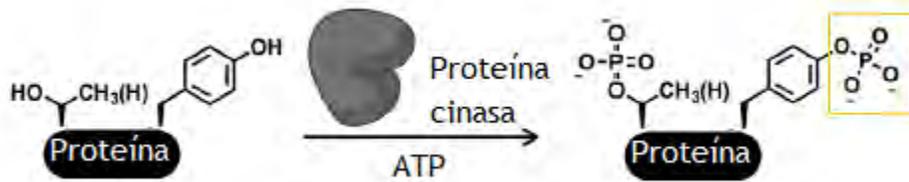


Figura 124. Mecanismo fosforilación (Modificada de Chuh, Batt y Pratt, 2016; Siman y Brik, 2012).

La ADP-ribosilación es un tipo de modificación causado por exotoxinas bacterianas como la toxina de colérica, la toxina de difteria y la toxina botulínica pues estas actúan como ADP ribosil-transferasas en donde el donador del ADP ribosil es la coenzima NAD; la reacción se da cuando NAD se desprende la nicotinamida cargada positivamente dejando el grupo ADP ribosil disponible para la transferencia a los aminoácidos (Figura 125) (Stanley y Virdee, 2016; Walsh, Garneau-Tsodikova y Gatto, 2015; Chuh, Batt y Pratt, 2016; Siman y Brik, 2012).

Por último, la ubiquitinación es un proceso que implica la degradación proteica y ocurre por la acción de tres enzimas que catalizan la transferencia de un grupo Ub al NTD de residuos de lisina principalmente. La maquinaria de activación enzimática implica una enzima 1 que actúa como ubiquitinil-AMP seguido de un conjunto de enzimas (enzima 2) que contienen un grupo tiol que proporcionan el producto activo nucleófilico para capturar la ubiquitina ligada a E1 y activarla; la tercera enzima es necesaria para catalizar la transferencia de la ubiquitina activa a las cadenas laterales del residuo de lisina de la proteína blanco que va a ser modificada (Figura 126); la ubiquitina puede formar cadenas con proteínas tipo ubiquitina como SUMO o NEDD8 (Stanley y Virdee, 2016; Walsh, Garneau-Tsodikova y Gatto, 2015; Chuh, Batt y Pratt, 2016; Siman y Brik, 2012).

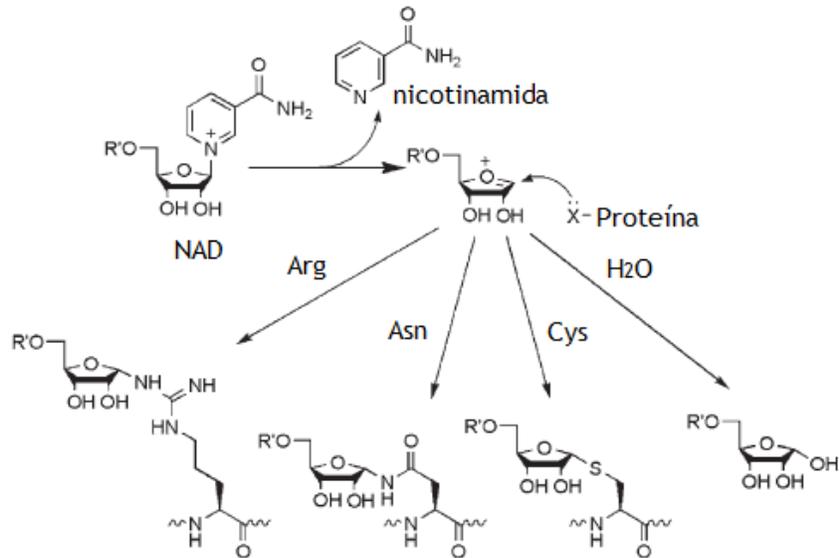


Figura 125. Mecanismo ADP-ribosilación (Modificada de Walsh, Garneau-Tsodikova y Gatto, 2005; Siman y Brik, 2012).

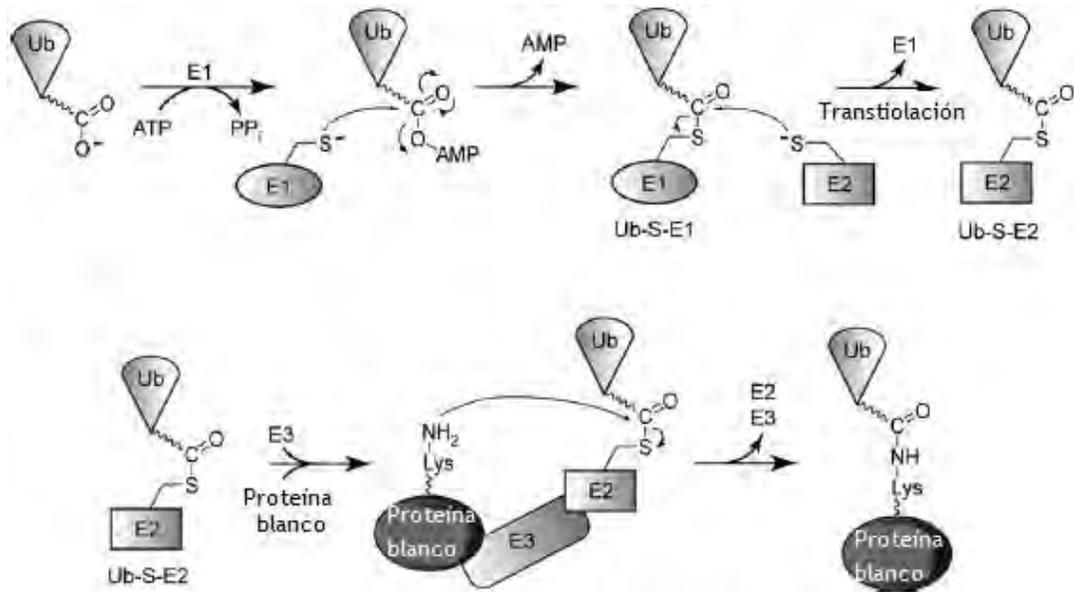


Figura 126. Mecanismo ubiquitinación (Modificada de Stanley y Virdee, 2016; Walsh, Garneau-Tsodikova y Gatto, 2015).

Tabla 21. PTMs más comunes en los residuos de las cadenas laterales de las proteínas. Hasta ahora no se conocen modificaciones en Leu, Ile, Val, Ala y Phe (Modificada de Walsh, Garneau-Tsodikova y Gatto, 2015).

Residuo	Reacción	
Asp	Fosforilación	
Glu	Metilación	Poliglicinación
	Carboxilación	Poliglutamilación
Ser	Fosforilación	O-glicosilación
Thr	Fosforilación	O-glicosilación
Tyr	Fosforilación	Orto-nitración
	Sulfonación	TOPA quinona
His	Fosforilación	Aminocarboxipropilación
	N-metilación	
Lys	N-metilación	C-hidroxilación
	N-acilación	
Cys	S- hidroxilación	Fosforilación
	S-acilación	S-prenilación
		Splicing
Met	Oxidación de sulfóxido	
Arg	N-metilación	N-ADP-ribosilación
Asn	N-glicosilación	N-ADP-ribosilación
	Splicing	
Gln	Transgluminación	
Trp	C-manosilación	
Pro	C-hidroxilación	
Gly	C-hidroxilación	

12.1.5 Relación entre la traducción y la degradación del mRNA

Como ya se ha mencionado el mRNA es madurado, poliadenilado y protegido con la adición del capuchón en el núcleo. Éste transcrito que llega al citoplasma para ser traducido es regulado por eventos nucleares; sin embargo, la cantidad de proteína producida por cada mRNA es determinada por la eficiencia en la traducción y la vida media de ese mRNA a través de su degradación (Bicknell y Ricci, 2017).

Estos eventos son altamente regulados y están relacionados para mantener así la expresión génica. Algunos de estos transcritos son degradados cuando se inhibe la iniciación de la traducción mientras que otros son degradados co-traduccionalmente, es decir, conforme avanza el ciclo elongativo la mayoría se degradan como consecuencia de su traducción (Bicknell y Ricci, 2017).

Una vez que el mRNA maduro llega al citoplasma el capuchón y la cola Poli-A sirven como señales de inicio para que los eIFs comiencen a formar el complejo de iniciación, este tipo de iniciación de la traducción es dependiente del capuchón ya que eIF4F requiere de su estructura para poder unirse a éste y ser reclutados a la subunidad 40S; la degradación del mRNA comienza con la desadenilación o remoción del capuchón seguida de la degradación por Xrn1 o por la degradación por el extremo 3' por exomas. Como ya se había descrito previamente con menor frecuencia las endonucleasas pueden iniciar la degradación del mRNA por escisión interna que conlleva a la degradación exonucleolítica (Bicknell y Ricci, 2017).

En algunas levaduras la iniciación de la traducción promueve la estabilidad del mRNA; sin embargo, la inhibición por mutaciones o factores externos alteran la secuencia alrededor de algún codón promoviendo la degradación del mRNA (Figura 127a), el mecanismo de cómo sucede este tipo de degradación hasta la fecha no está claro. Existen otras tres vías que inspeccionan el mRNA y en donde la traducción es necesaria para su degradación (Bicknell y Ricci, 2017).

La primera NGD ya había sido explicada en donde se requiere de la interacción con Dom34/Hbs1 en el sitio A de ribosoma que conlleva a la escisión endonucleolítica del mRNA (Figura 127b); la vía NSD ocurre cuando el ribosoma nunca se encuentra con un codón de paro y se prolonga hasta el extremo 3' del transcrito lo que provoca la interacción con factores Ski, primero el factor Ski7 se une a la subunidad 60S atrayendo a

los demás factores Ski (2, 3 y 8) lo que provoca la degradación exonucleolítica y endonucleolítica del mRNA (Figura 127c). Por último, la vía NMD degrada al mRNA que termina la traducción en el sitio donde se da la translocación del polipéptido y requiere del factor Upf1 para interactuar con eRF3, ésta vía involucra que Upf1 forme un complejo con Upf2 y Upf3 para potencializar su acción de endonucleasa además de ser capaz de remover el capuchón, en mamíferos la escisión está dada por Smg6 (Figura 127d) (Bicknell y Ricci, 2017).

Fos es un proto-oncogen en donde la degradación es dependiente de la traducción, éste posee una región mCRD en su ORF que le confiere esta característica, mCRD interactúa con Unr una proteína capaz de interactuar con PABP para formar un puente hacia la cola Poli-A protegiéndola de desadenilación. Mientras se da la traducción en el ribosoma se cree que es cuando ésta región pasa a través de él y se interrumpen y reorganizan las interacciones Unr-PABP haciendo susceptible al mRNA a desadenilación por Ccr4 (Figura 127e). Otra forma de degradar el mRNA es cuando los codones son reconocidos por un tRNA escaso lo que genera una decodificación más lenta a causa de que los codones no son óptimos a ese tRNA a comparación de los que se decodifican por tRNAs abundantes, codones óptimos. La disminución de la decodificación estimula la desadenilación del mRNA por Dhh1 (Figura 127f) (Bicknell y Ricci, 2017).

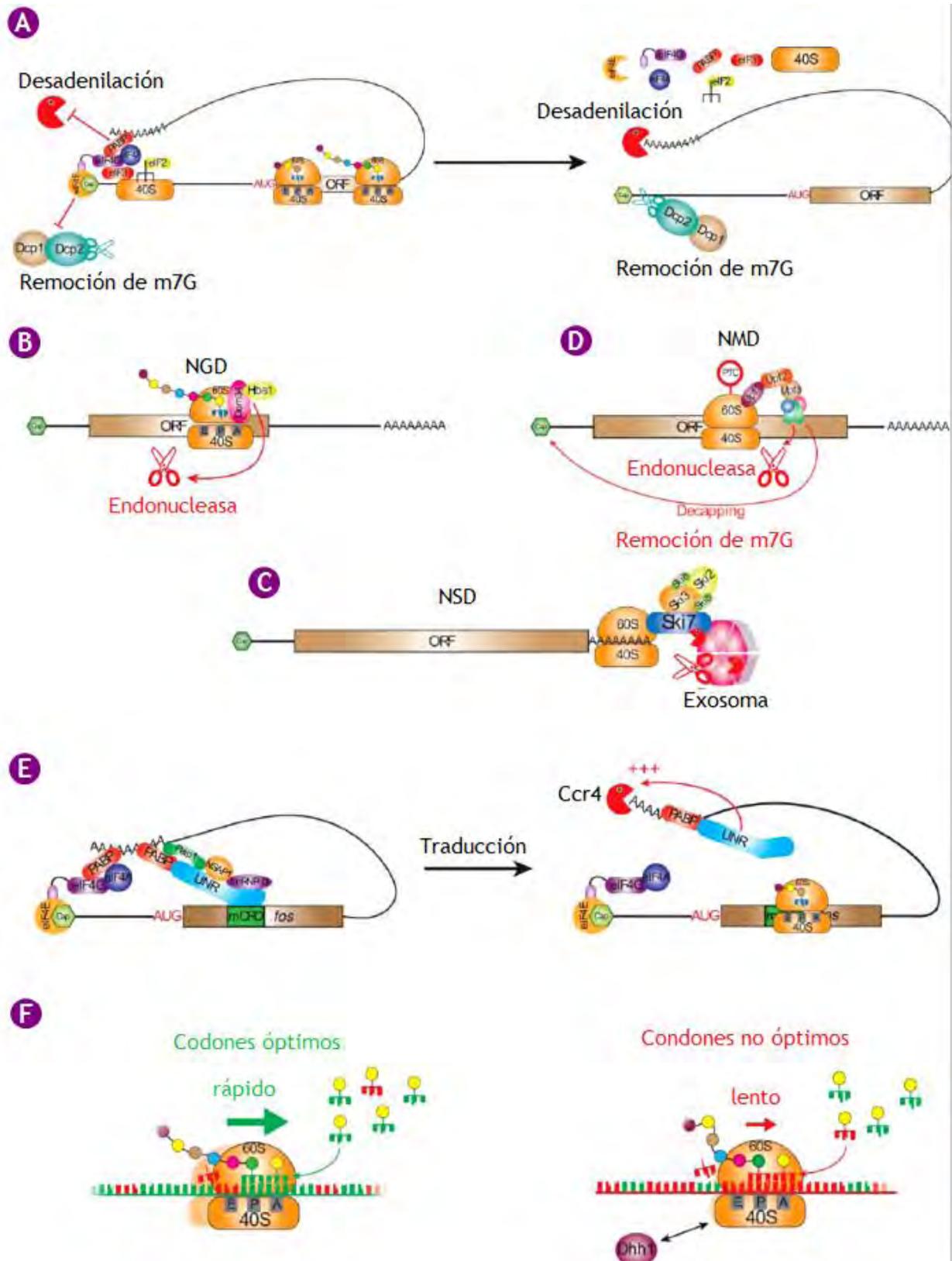


Figura 127. Relación entre la traducción y degradación del mRNA (Modificada de Bicknell y Ricci, 2017).

12.2 Traducción Procarionta

Las proteínas son sintetizadas en el ribosoma, una maquinaria macromolecular conservada que traduce el material genético del mRNA; como ya se mencionó este consiste de múltiples proteínas y rRNAs que coordinan y regulan la traducción en donde el tRNA se ve involucrado para reconocer a los codones del mRNA y que se dé la incorporación del aminoácido correspondiente, así el proceso está mediado por factores que regulan las cuatro etapas de la traducción en procariontes: iniciación, elongación, terminación y reciclaje (Figura 128) (Rodnina, 2016; Prabhakar et.al., 2017).

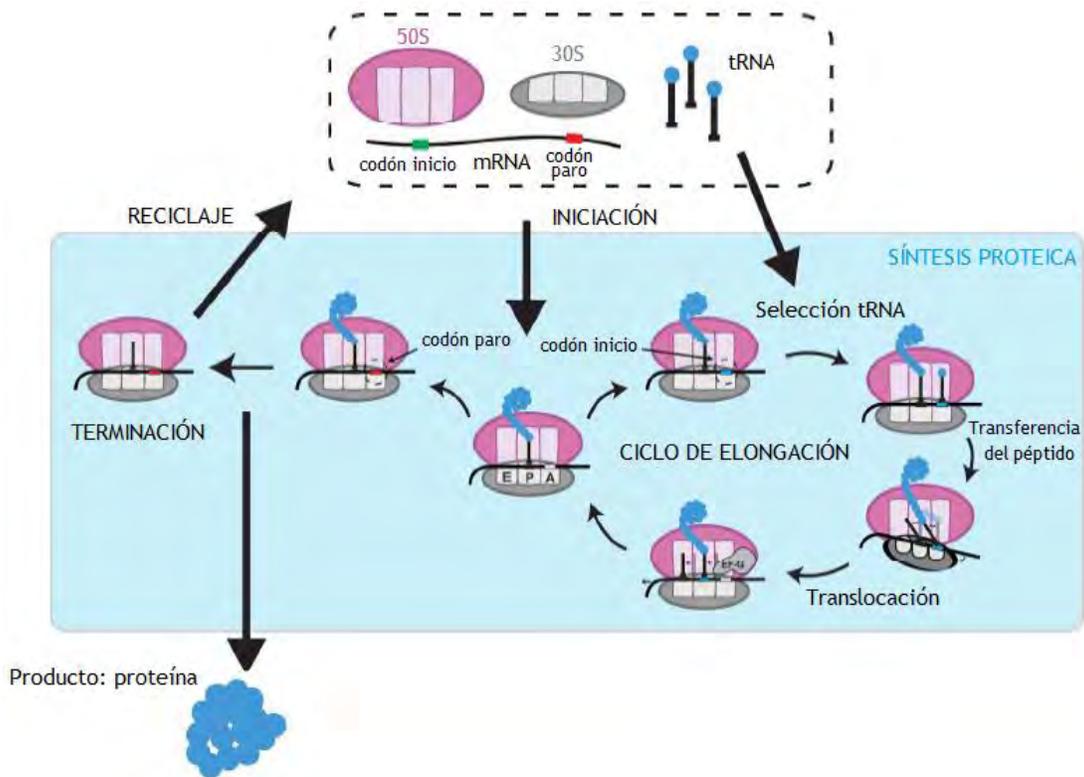


Figura 128. Esquema general de la traducción en procariontes (Modificada de Prabhakar et.al., 2017).

La traducción es el proceso más conservado del Dogma Central por lo que en procariontes es muy similar a eucariontes con menor complejidad y el mecanismo está mejor entendido. Dentro de las etapas previamente mencionadas la elongación y terminación son las que producen cambios conformacionales que generan una alta fidelidad y alta tasa de traducción durante la síntesis proteica en donde la selección del tRNA y acomodación del aa-tRNA en el sitio A del ribosoma minimiza la frecuencia de

error a la hora incorporar los aminoácidos durante la elongación (Rodnina, 2016; Prabhakar et.al., 2017).

12.2.1 Iniciación

En bacterias la iniciación de la traducción es un poco más sencilla en donde el RBS juega un papel crítico en el proceso pues se puede extender de -20 a +15 alrededor del codón de inicio y tiene características que pueden afectar la eficiencia de la iniciación como: la naturaleza del codón de inicio, la localización de la secuencia Shine-Dalgarno, la estructura del mRNA cerca del sitio de inicio y los elementos ricos en A/U del mRNA que pueden ser reconocidos por la proteína bS1 de la subunidad 30S. Las secuencias Shine-Dalgarno en el mRNA río arriba del codón de inicio se unen complementariamente al rRNA 16S que recluta a la subunidad 30S directamente en la región de iniciación aunque ésta unión debe ser catalizada por IFs (Rodnina, 2016; Prabhakar et.al., 2017; Robinson y van Oijen, 2013; Wilson, 2014; Myasnikov et.al., 2009).

A diferencia de organismos eucariontes en bacterias solo se requiere de 3 IFs para el ensamblaje de la subunidad 30S con el Met-tRNA. El IF3 es el primer factor en ser reclutado y se une al sitio E de la subunidad 30S esto promueve la unión de IF1 al sitio A para formar el pre-30SIC y ambas regulan el reclutamiento y unión de IF2-GTP. IF2 se une al sitio P de manera GTPasa dependiente para atraer al Met-tRNA y unirse también a ese sitio, así IF2 por su dominio IV se une a este tRNA para estabilizar la unión Met-tRNA a la subunidad 30S formando el 30SIC que verifica el correcto apareamiento codón – anticodón cuando se une el mRNA hasta que la subunidad 50S se una (Figura 129a) (Rodnina, 2016; Prabhakar et.al., 2017; Robinson y van Oijen, 2013; Wilson, 2014; Myasnikov et.al., 2009).

Esta vía de iniciación era la que inicialmente se creía que sucedía, que IF2 atraía la unión de Met-tRNA al sitio P de la subunidad 30S del ribosoma con el mRNA. Sin embargo, se observó que ésta vía solo la realizan el 30% de las células en crecimiento encontrándose otras dos vías de iniciación: una implica que primero se une la subunidad 30S con el mRNA a través de la secuencia Shine-Dalgarno y alternamente se une IF2 con el Met-tRNA para posteriormente incorporarse a la subunidad 30S (Figura 129b); este mecanismo lo realizan 65% de las células. Por último también se ha visto que la unión puede ser secuencial donde primero se une el mRNA con la subunidad 30S seguida de la unión del Met-tRNA y por último el IF2 (Figura 129c) que estabiliza la unión, esta vía la

realizan el 5% de células de acuerdo a ensayos de monitoreo con fluorescencia en donde ambas vías requieren de la previa unión de IF3 e IF1. Finalmente el ensamblaje del complejo 70S se completa cuando se disocian IF1 e IF3 por hidrólisis de GTP, ésta reacción atrae a la subunidad 50S y se forma el complejo de iniciación (Figura 129d). Se requiere de la disociación de IF3 principalmente ya que se ha observado que éste factor disminuye la atracción de la subunidad 50S al complejo mientras que IF2 lo atrae y promueve su unión (Rodnina, 2016; Prabhakar et.al., 2017; Robinson y van Oijen, 2013; Wilson, 2014; Myasnikov et.al., 2009).

Por medio de crióEM se ha podido revelar la estructura de IF2 encontrándose que es homóloga a eIF5B ya que posee los mismos dominios con funciones casi idénticas; IF2 posee en el dominio I las secuencias G1/G2 altamente conservadas que poseen un sitio de unión a GTP favoreciendo la unión de la subunidad 50S, en el dominio II la secuencia G3 es conservada que sirve como unión entre los dominios III y IV; el dominio III posee a C1 mientras que el IV posee a C2 y ambos generan un cambio conformacional en la subunidad 30S para que se una la subunidad 50S y se forme el 70SIC (Figura 130) (Rodnina, 2016; Prabhakar et.al., 2017; Robinson y van Oijen, 2013; Wilson, 2014; Myasnikov et.al., 2009).

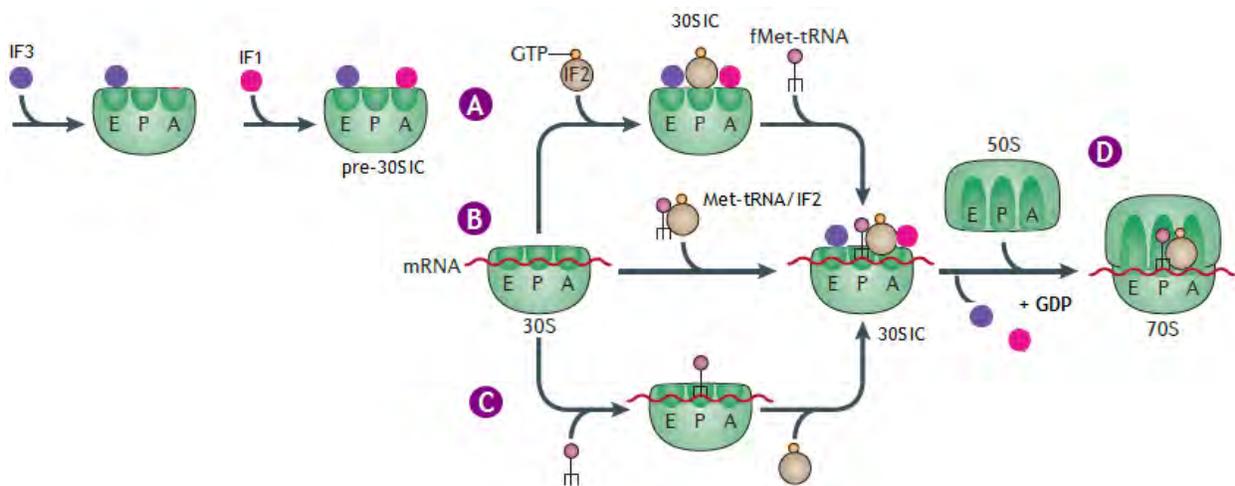


Figura 129. Iniciación de la traducción en procariontes (Modificada de Robinson y van Oijen, 2013).



Figura 130. Estructura de los dominios de IF2 (Modificada de Myasnikov et.al., 2009).

El ensamblaje de 70SIC contiene varios puntos de control que revisan la eficiencia de su formación (Figura 131); el reclutamiento del mRNA a pre-30SIC depende de 3 elementos: la concentración del mRNA en la célula (eficiencia de la transcripción y estabilidad del mRNA), la tasa de unión al ribosoma (reconocimiento de SD) y la estabilidad del complejo cuando se forma, por lo que este paso se ve involucrado en el punto de control 1 (Figura 131a). La unión del mRNA al ribosoma es seguida del desenrollamiento de estructuras secundarias que se puedan presentar en éste para acomodar el mRNA en el canal de la subunidad 30S; este mecanismo es facilitado por la proteína bS1 y es el segundo punto de control (Figura 131b). Después, el codón de inicio es seleccionado y éste conduce la unión correcta del Met-tRNA al momento de formar el 70SIC (Figura 131c); finalmente la transición 30SIC→70SIC es el último punto de control que verifica el correcto apareamiento de SD con el 16S rRNA y el posicionamiento del codón de inicio con el Met-tRNA en el sitio P del 70SIC (Figura 131d) (Rodnina, 2016; Prabhakar et.al., 2017).

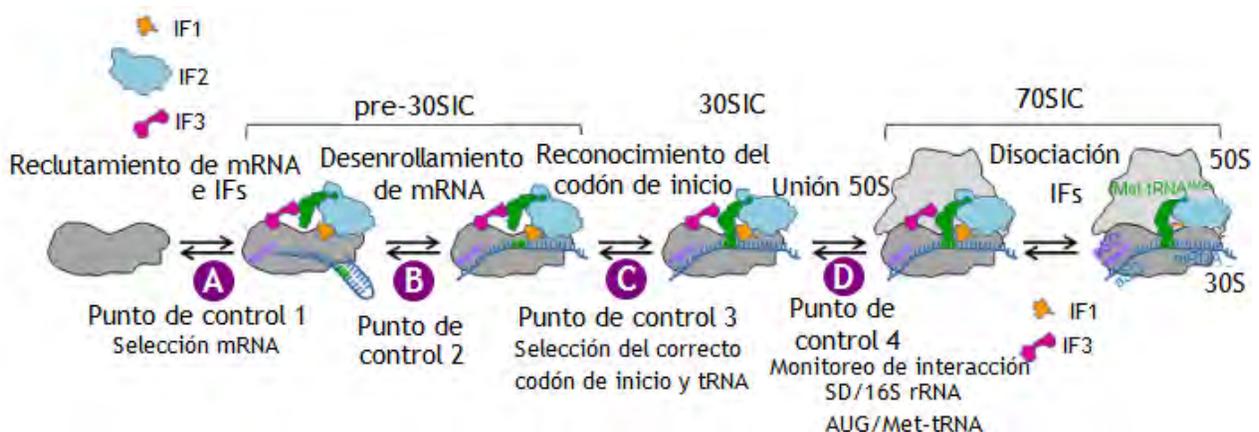


Figura 131. Puntos de control en la iniciación de la traducción en procariontes (Modificada de Rodnina, 2016).

12.2.2 Elongación

Después de la formación del complejo 70S se da la elongación. Esta etapa es muy parecida a cómo se da en eucariontes pues el EF-Tu es homólogo a eEF1A, EF-Ts es homólogo a eEF1B, EF-G homólogo a eEF2 y EF-P a eEF5. El factor EF-G es el principal en acción pues sincroniza la unión mRNA-tRNA y que ésta sea precisa manteniendo el marco de lectura tras cada ciclo elongativo. La elongación comienza con la decodificación del primer codón (el siguiente al codón de inicio) donde el aa-tRNA es seleccionado y colocado en ribosoma para la transferencia del péptido, es decir, el siguiente aa-tRNA es escoltado al sitio A por EF-Tu cuando IF2 se disocia del complejo 70S; la disociación de IF2 fortalece la unión del aa-tRNA al complejo. EF-Tu se encuentra en forma de TC para poder iniciar la elongación (Figuras 132a y 134) (Prabhakar et.al., 2017; Frank, 2016; Robinson y van Oijen, 2013; Rodnina, 2016; Wilson, 2014; Dever y Green, 2012; Browning y Bailey-Serres, 2015).

La hidrólisis del GTP por EF-Ts promueve el intercambio de guanina por medio de la hidrólisis de GTP para reciclar a EF-Tu cada vez que se requiera de un nuevo tRNA para crear el enlace peptídico (Figuras 132b y 134). De igual manera el peptidil-tRNA en sitio A deja desacetilado al tRNA del sitio P para que se dé la translocación subsecuente cambiando el peptidil-tRNA al sitio P y el tRNA desacetilado al sitio E dejando siempre libre el sitio A para que el aa-tRNA entrante continúe el ciclo de formación de la cadena polipeptídica. La translocación es facilitada por cambios conformacionales que se generan en el ribosoma y por la unión del factor EF-G este factor previene la regresión de los tRNAs para que el sitio A pueda estar disponible para el siguiente aminoacil-tRNA unido a EF-Tu (Figuras 132c y 134) (Prabhakar et.al., 2017; Frank, 2016; Robinson y van Oijen, 2013; Rodnina, 2016; Wilson, 2014; Dever y Green, 2012; Browning y Bailey-Serres, 2015).

La formación del enlace peptídico abre el ribosoma permitiendo los movimientos inter-subunidades entre los estados alternos y no alternos al generar un movimiento rotatorio en la subunidad 30S (Figura 133a). La translocación del tRNA genera estados híbridos A/P, P/E (Figura 133b) lo que genera que haya un giro de 90° en dominio superior “cabeza” de la subunidad pequeña (Figura 133c) para que cuando se dé la unión de EF-G se establezca ese estado híbrido y se dé la translocación al momento de la hidrólisis de GTP regresando el ribosoma al estado no alterno (Figura 133d). Al igual que eEF5, EF-P solo se requiere cuando se presentan las secuencias de aminoácidos enriquecidas en prolina o glicina para estabilizarlas. La acción de estos factores ha sido perfeccionada al

emplear crio-EM (Prabhakar et al., 2017; Frank, 2016; Robinson y van Oijen, 2013; Rodnina, 2016; Wilson, 2014; Dever y Green, 2012; Browning y Bailey-Serres, 2015).

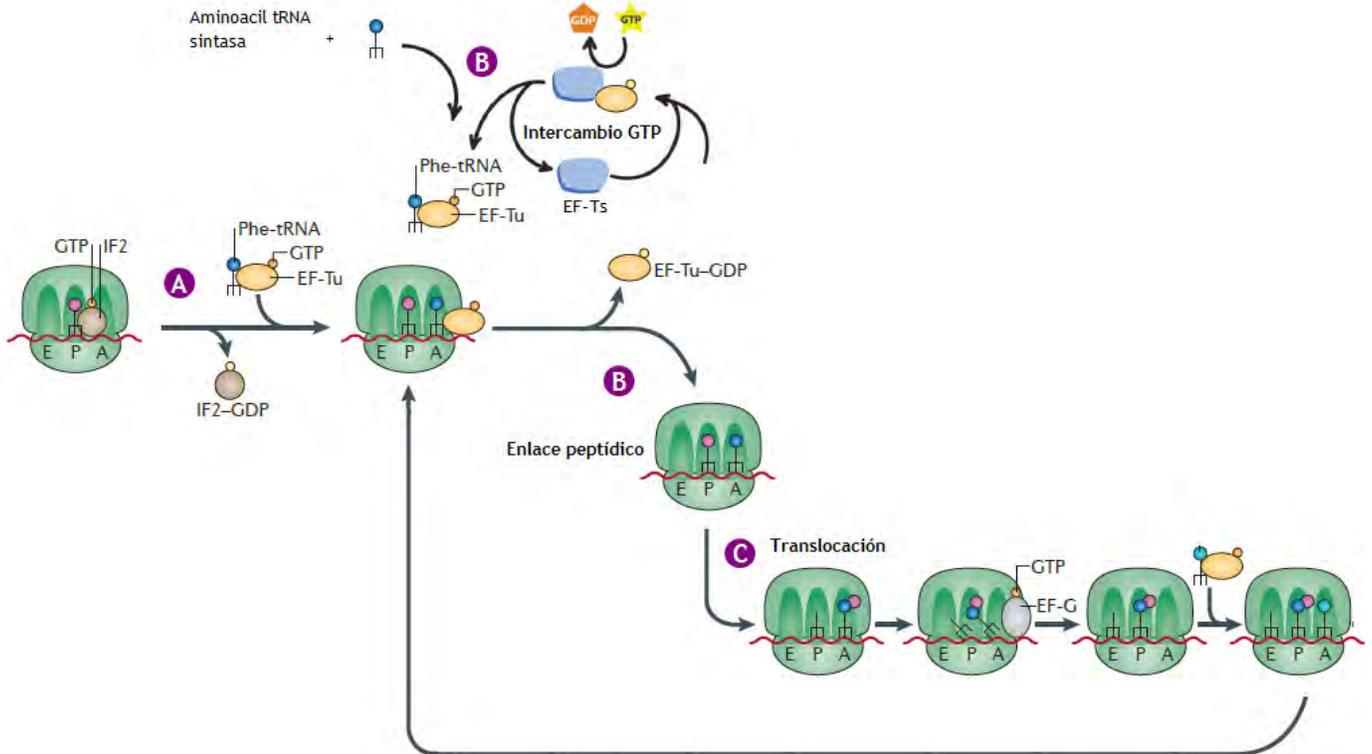


Figura 132. Mecanismo de elongación de la traducción en procariontes (Modificada de Robinson y van Oijen, 2013).

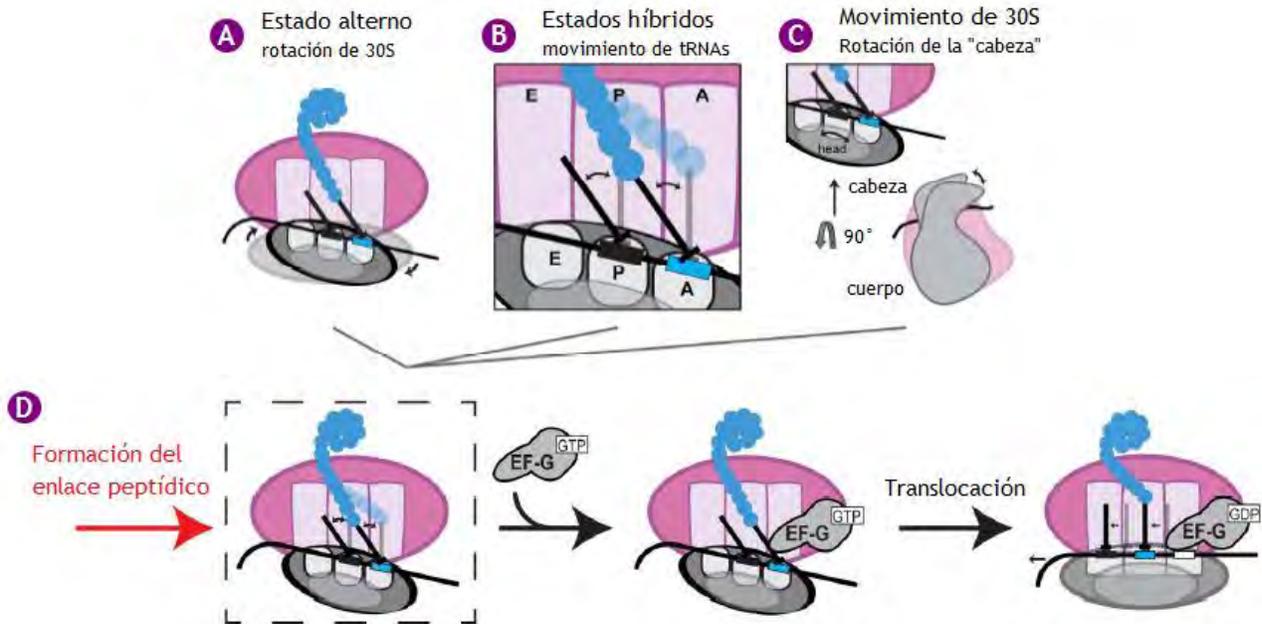


Figura 133. Cambios conformacionales que se generan en el ribosoma al momento de la translocación (Modificada de Prabhakar et al., 2017).

Tabla 22. Comparación de los factores de elongación de la traducción entre eucariontes y procariontes (Modificada de Prabhakar et.al., 2017).

Factor eucarionte	Factor procarionte	Función
eEF1A	EF-Tu	Escortar el aa-tRNA entrante al sitio A
eEF1B	EF-Ts	Hidrolizar GTP para reciclar a EF-Tu/eEF1A
eEF2	EF-G	Estabilizar los estados híbridos y favorecer la translocación
eEF5	EF-P	Estabilizar cadenas ricas en prolina y/o glicina

12.2.3 Terminación

La terminación está codificada por tres codones sin sentido los codones de paro que se posicionan en el sitio A del ribosoma y su reconocimiento depende de los RFs clase I encontrándose los factores RF1 y RF2; el RF1 reconoce al codón UAG mientras que RF2 reconoce a UGA, y el codón UAA es reconocido por ambos; Estos dos factores presentan secuencias homólogas y su estructura tridimensional es similar entre ellas, aparte de reconocer el codón de paro catalizan la hidrólisis del enlace éster entre el péptido y el tRNA del sitio P. Por otra parte se encuentra el RF3 que pertenece a la clase II y no presenta la capacidad de reconocer ningún codón ni es esencial para la viabilidad celular; sin embargo, acelera la terminación pues su función es disociar a los RFs clase I del complejo ribosomal. El papel de RF3 es poco entendido solamente se sabe que por medio de hidrólisis de GTP disocia a los factores RF1 y RF2 (Korostelev, 2011; Wilson, 2014; Prabhakar et.al., 2017; Robinson y van Oijen, 2013; Rodnina, 2016; Frank, 2016).

La función de los factores de la clase I depende del reconocimiento específico de los codones colocados en sitio A, este reconocimiento genera una reacción nucleofílica en la subunidad 50S favoreciendo la hidrólisis del peptidil-tRNA catalizada por EF-G. Estudios recientes demuestran que estos factores sirven como anticodones RF pues se ha visto que ambos presentan motivos PxT y SPF que confieren la capacidad de actuar como tri-péptidos anticodón y se unen al sitio A a través de estos. Una característica en que difiere la terminación de la elongación es que el enlace éster del peptidil-tRNA debe ser escindido por hidrólisis mientras que la hidrólisis de éste en la elongación debe ser evitada para prevenir la formación de proteínas traducidas incompletamente (Korostelev,

2011; Wilson, 2014; Prabhakar et.al., 2017; Robinson y van Oijen, 2013; Rodnina, 2016; Frank, 2016).

El sitio P donde se encuentra el peptidil-tRNA temporalmente se convierte en estereasa para permitir la escisión de éste cuando RF1 y RF2 reconocen al codón de paro. La disociación de las subunidades se da cuando RF3 ya eliminó a RF1 y RF2 lo que atrae la proteína RRF que provoca pequeñas desestabilizaciones simultáneas entre subunidades hasta que finalmente se separan para ser recicladas. El reconocimiento del codón de paro en el sitio A es esencial para la unión del RF “cerrado” (Figura 135a) lo que produce que el ribosoma le genere un cambio conformacional hacia un estado “abierto” (Figura 135b); el estado es activo para catalizar la hidrólisis del péptido naciente liberándolo del ribosoma (Figura 135c) (Korostelev, 2011; Wilson, 2014; Prabhakar et.al., 2017; Robinson y van Oijen, 2013; Rodnina, 2016; Frank, 2016).

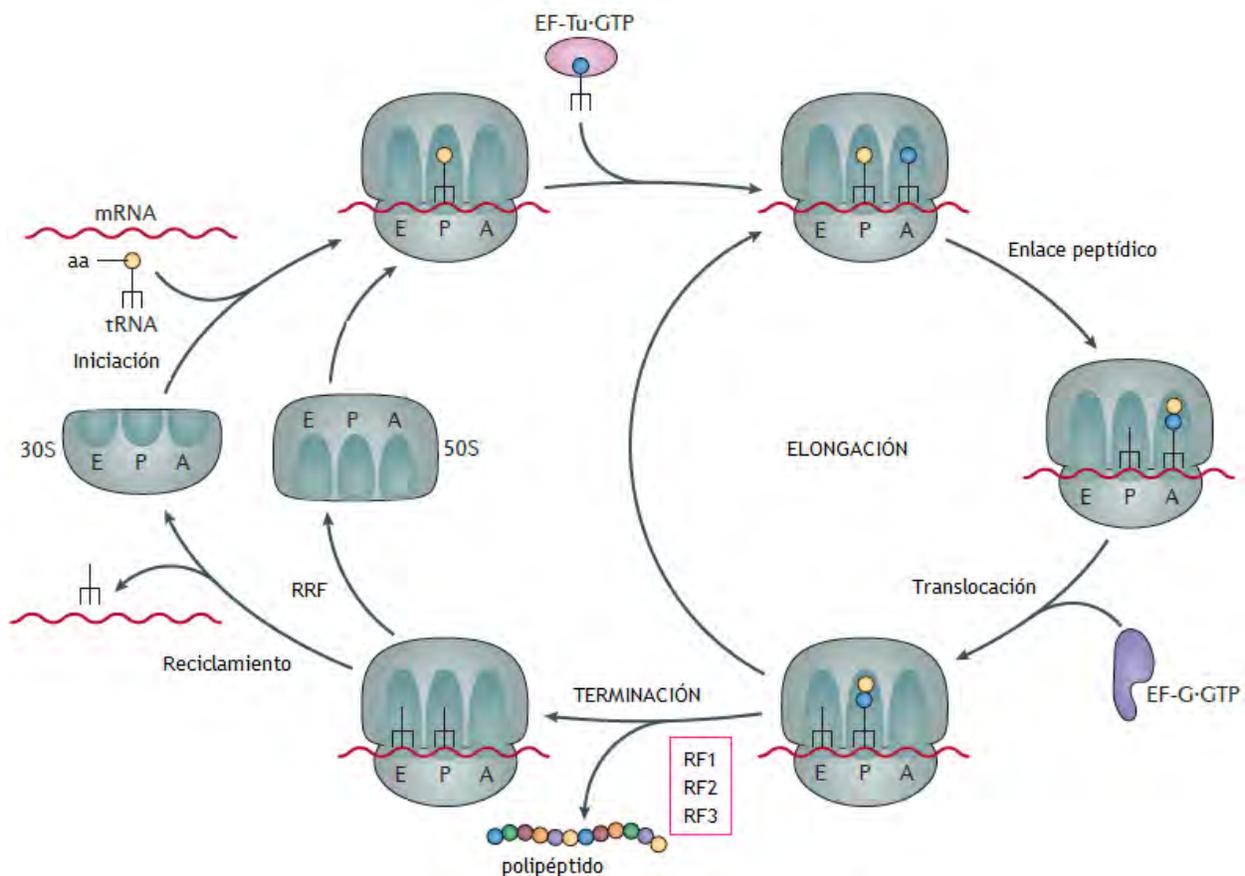


Figura 134. Elongación y terminación de la traducción en procariontes (Modificada de Wilson, 2014).

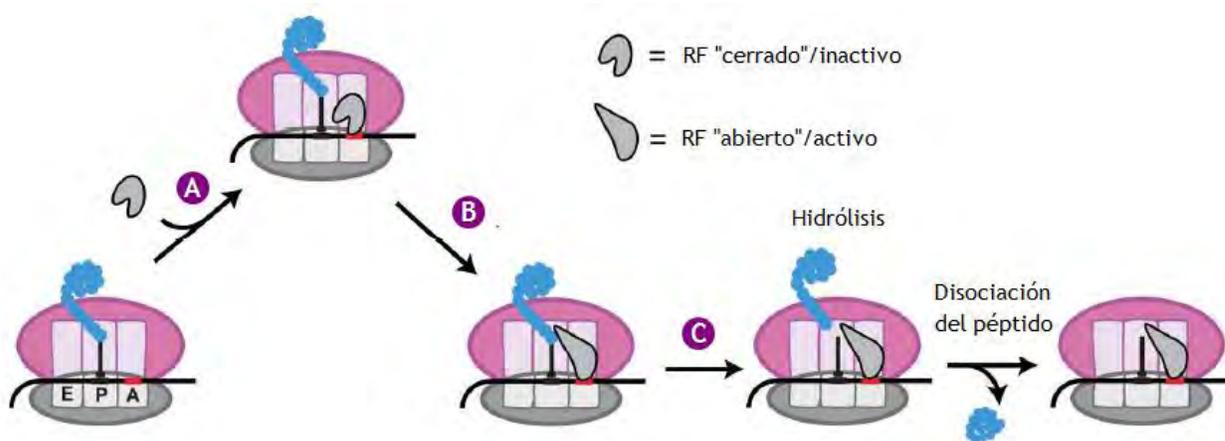


Figura 135. Mecanismo de terminación de la traducción por los RFs clase I (Modificada de Prabhakar et.al., 2017).

12.2.4 Reciclaje del ribosoma

Las bacterias emplean una gran cantidad de recursos para la síntesis proteica, las células en crecimiento utilizan el 50% de su energía para realizarla y el 20 – 40% está canalizada a la producción de ribosomas y factores de traducción. Una cuarta etapa que a veces no es considerada por muchos autores es el reciclaje de ribosomas. Esta etapa se da posterior a la terminación cuando el polipéptido fue hidrolizado y liberado del ribosoma 70S ésta acción forma el post-TC pues el mRNA y tRNA se mantienen unidos al ribosoma (Keiler, 2015; Dever y Green, 2012; Prabhakar et.al., 2017).

Ensayos *in vitro* demostraron en *E. coli* que se requiere de dos factores para liberar el mRNA y tRNA del post-TC; comenzando con el EF-G que promueve la disociación del complejo al hidrolizar GTP, esta etapa es crucial para separar la subunidades pues sino no ocurre el reciclaje del ribosoma. RRF interactúa con este complejo estimulado por la interacción con RF3 después de que se disociaron RF1/RF2, esencialmente interactúa con el tRNA desacetilado que está en un estado de transición entre el sitio P a E desestabilizando las interacciones entre subunidades potencializado por la acción de hidrólisis de EF-G, además EF-G favorece la unión de IF3 a la subunidad 30S impidiendo que se vuelvan a juntar (Keiler, 2015; Dever y Green, 2012; Prabhakar et.al., 2017).

Al momento de la disociación de subunidades es liberado el mRNA y las subunidades ya están listas para el siguiente ciclo de traducción; el tRNA se cree que desplazado al momento de que RRF se une al post-TC pues en ensayos de cristalografía se vio que la estructura de RRF es casi idéntica al tRNA en tamaño y forma y que RRF posee la

capacidad de translocarse entre los sitios del ribosoma como lo hace el tRNA, a su vez EF-G libera a RRF y RF3 del ribosoma (Figura 136) (Keiler, 2015; Dever y Green, 2012; Prabhakar et.al., 2017).

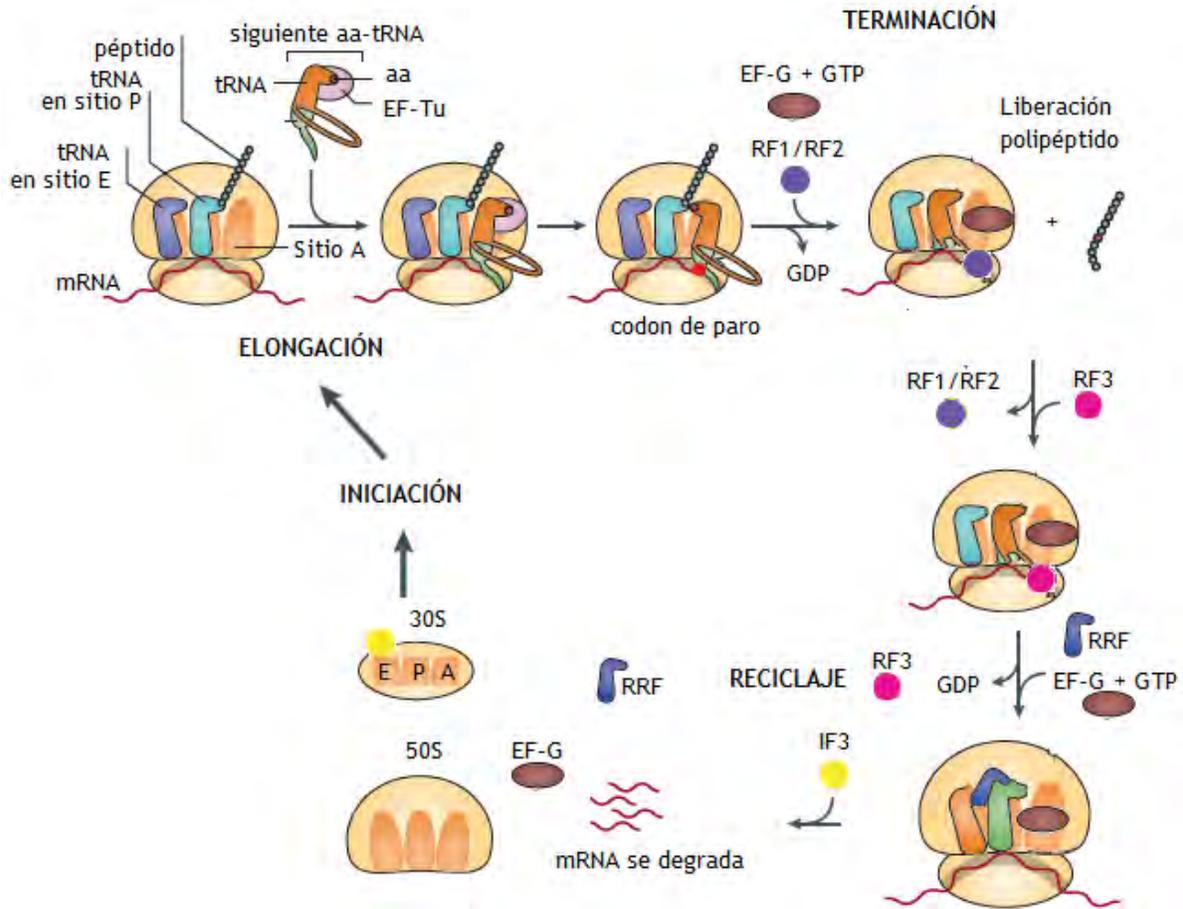


Figura 136. Terminación de la traducción y reciclaje del ribosoma (Modificada de Kieler, 2015).

Las PTM en organismos procariontes son más dinámicas y reversibles permitiendo que la célula explote la capacidad total de sus mecanismos reguladores, éstas ha sido de reciente interés pues en los últimos años se siguen investigando y descubriendo más mecanismos por cómo ocurren. La fosforilación es la más estudiada y en *E. coli* se han encontrado conexiones entre cinasa, fosfatasas y sus sustratos permitiendo construir redes de fosforilación en donde las cinasas de diferentes familias interactúan y pueden fosforilarse entre sí. Con estos hallazgos varios autores han llegado a concluir que las PTM en bacterias pueden tener un potencial regulador en la traducción (Grangeasse, Stülke y Mijakovic, 2015).

13. CONCLUSIONES

El trabajo realizado muestra como el Dogma Central de la Biología Molecular es la base de las interacciones moleculares entre los diferentes sistemas de la célula ya que relaciona todas las biomoléculas necesarias para la vida con las funciones específicas que desempeñan.

La replicación, transcripción y traducción son cruciales para el desarrollo de un organismo y son muy diferentes dependiendo de si el organismo es eucarionte o procarionte. También se toma en cuenta que son procesos complejos pues involucran una gran variedad de factores, proteínas y etapas que ayudan a llevar a cabo sus mecanismos y con el avance de nuevas técnicas constantemente se está incrementando la información que se tiene sobre este tema. Un ejemplo sería que antes no se tenía claro la relación que había entre la degradación del mRNA con la traducción del transcrito, y ahora se sabe que ésta degradación es necesaria para que se dé inicio a la traducción, así como que ya se conocen varias vías y los factores implicados en donde la degradación del mRNA inicia la traducción.

Realizar una comparación entre organismos permite encontrar diferencias significativas que explican cómo se llevan a cabo los procesos y por qué en organismos superiores se requiere que sean más complejos, además de que es de suma importancia conocer los mecanismos regulatorios en cada tipo de organismo ya que pueden tener aplicación futura en investigaciones que se basen en la modificación/regulación de alguna de estas etapas para así poder aplicarlo a la clínica.

Con la elaboración de este trabajo se obtuvo una recopilación de la información en una sola fuente que ayudará a mejorar la comprensión del tema, además de servir como un material documental de apoyo con un enfoque actualizado.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilera, A. & Gaillard, H. 2014. *Transcription and Recombination: When RNA Meets DNA*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Volumen 6. Pp 1 – 16.
2. Akopian, D. & Rape, M. 2017. *Conducting the finale of DNA replication*. Genes & Development. Volumen 31. Pp 226 – 227.
3. Alberts, B., et.al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4ª edición. USA: Garland Science.
4. Alberts, B., et.al. 2013. *Essential Cell Biology*. 4ª edición. USA: Garland Science.
5. Ali, F. & Costa, A. 2016. *The MCM Helicase Motor of the Eukaryotic Replisome*. Journal of Molecular Biology. Volumen 428. Pp 1822 – 1832.
6. Anónimo. s.f. *The discovery of reverse transcriptase*. Volumen 19. Número 4.2. Review de Baltimore, 1970 y Temin & Mizutani, 1970. [En línea]. Consultado el 23 de marzo de 2017. Disponible en: <http://basic.shsmu.edu.cn/jpkc/cellbiota/resource/exper/19.pdf>
7. Arribas-Layton, M. et.al. 2013. *Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery*. Biochemistry and Biophysics Acta. Volumen 1829. Número 0. Pp 580 – 589.
8. Balakrishnan, L. & Bambara, R. 2013. *Okazaki Fragment Metabolism*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Volumen 5. Pp 1 – 12.
9. Barros, T. et.al. 2013. *A structural role for the PHP domain in E. coli DNA polymerase III*. BMC. Structural Biology. Volumen 13. Número 8. Pp 1 – 12.
10. Barbosa, C.; Peixero, I. & Romão, L. 2013. *Gene Expression Regulation by Open Reading Frames and Human Disease*. PLOS Genetics. Volumen 9. Número 8. Pp 1 – 12.
11. Baxley, R. & Bielinsky, A. 2016. *Mcm10: A Dynamic Scaffold at Eukaryotic Replication Forks*. Genes. Volumen 8. Número 73. Pp 1 – 22.
12. Bicknell, A. & Ricci, E. 2017. *When mRNA translation meets decay*. Biochemical Society Transactions. Volumen 45. Pp 339 – 351.
13. Björk, P. & Wieslander, L. 2014. *Mechanisms of mRNA export*. Seminars in Cell & Developmental Biology. Volumen 32. Pp 47 – 54.
14. Bleichert, F., Botchan, M. & Berger, J. 2017. *Mechanisms for initiating cellular DNA replication*. Science. Volumen 355. Número 811. Pp 1 – 10.

15. Briggs, A., et.al. 2016. *Tracking the Resolution of Student Misconceptions about the Central Dogma of Molecular Biology*. Journal of microbiology & biology education. Volumen 17. Número 3. Pp 339 – 350.
16. Brown, TA. 2002. *Genomes*. 2ª edición. Oxford: Wiley-Liss.
17. Browning, K. & Bailey-Serres, J. 2015. *Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation*. American Society of Plant Biologists. Volumen 176. Pp 1 – 39.
18. Browning, D. & Busby, S. 2016. *Local and global regulation of transcription initiation in bacteria*. Nature Reviews Microbiology. Pp 1 – 13.
19. Bruck, I. et.al. 2015. *Insights into the Initiation of Eukaryotic DNA Replication*. Nucleus. Volumen 6. Número 6. Pp 449 – 454.
20. Bubeck, D. et.al. 2011. *PCNA directs type 2 RNase H activity on DNA replication and repair substrates*. Nucleic Acids Research. Volumen 39. Número 9. Pp 3652 – 3666.
21. Campbell, J. & Reece, D. 2011. *Biology*. 7ª edición. UK: Pearson Education.
22. Cánovas, B. 2012. *El ADN como portador de la información genética*. Centro Nacional de Información y Comunicación Educativa de España. Volumen 5. Pp 41 – 53.
23. Cerritelli, S. & Crouch, R. 2009. *Ribonuclease H: the enzymes in Eukaryotes*. FEBS Journal. Volumen 276. Número 6. Pp 1494 – 1505.
24. Choe, K. & Moldovan, G. 2017. *Forging Ahead through Darkness: PCNA, Still the Principal Conductor at the Replication Fork*. Cell Press. Molecular Cell Review. Número 65. Pp 380 – 392.
25. Chuh, K.; Batt, A. & Pratt, M. 2016. *Chemical Methods for Encoding and Decoding of Posttranslational Modifications*. Cell Chemical Biology. Volumen 23. Pp 86 – 107.
26. Chuh, K. & Pratt, M. 2015. *Chemical methods for the proteome-wide identification of posttranslationally modified proteins*. Current Opinion in Chemical Biology. Volumen 24. Pp 27 – 37.
27. Clancy, S. 2008. *DNA Transcription*. Nature Education. Volumen 1. Número 1. Pp 41 – 44.
28. Clancy, S. & Brown, W. 2008. *Translation: DNA to mRNA to Protein*. Nature Education. Volumen 1. Pp 101 – 106.
29. Cole, M. & Cowling, V. 2008. *Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication*. Perspectives. Volumen 9. Pp 810 – 815.
30. Cole, C. & Scarcelli, J. 2006. *Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm*. Current Opinion in Cell Biology. Volumen 18. Pp 299 – 306.

31. Cooper, G. 2010. *The Cell: A Molecular Approach*. 2^a edición. USA: Sinauer Associates.
32. Coffin, J. & Fan, H. 2016. *The Discovery of Reverse Transcriptase*. Annual Review of Virology. Volumen 3. Número 1.1 Pp 1 – 23.
33. Cowling, V. 2010. *Regulation of mRNA cap methylation*. Biochemistry Journal. Volumen 425. Pp 295 – 302.
34. Cox, M.; Doudna, J. & O'Donnell, M. 2012. *Molecular biology: principles and practice*. Nueva York: W.H. Freeman and Co.
35. Creemers, E. et.al. 2015. *Genome-Wide Polyadenylation Maps Reveal Dynamic mRNA 3'-End Formation in the Failing Human Heart*. Circulation Research. Pp 433 – 438.
36. Crick, F. 1970. *Central Dogma of Molecular Biology*. Nature. Volumen 227. Pp 561 – 563.
37. Culter, A. & Hayes, J. 2015. *A brief review of nucleosome structure*. FEBS Letters. Volumen 589. Pp 2914 – 2922.
38. Curinha, A. et.al. 2014. *Implications of polyadenylation in health and disease*. Nucleus. Volumen 5. Número 6. 508 — 519.
39. Daban, J. 2011. *Electron microscopy and atomic force microscopy studies of chromatin and metaphase chromosome structure*. Micron. Volumen 42. Pp 733 – 750.
40. Dever, T. & Green, R. 2012. *The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Volumen 4. Pp 1 – 16.
41. Devlin, T. 2006. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4^a edición. España: Reverté.
42. Dillon, S. & Dorman, C. 2010. *Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression*. Nature Reviews. Microbiology. Volumen 8. Pp 185 – 195.
43. Dohrmann, P. et.al. 2016. *The DNA polymerase III holoenzyme contains and is not a trimeric polymerase*. Nucleic Acids Research. Volumen 44. Número 3. Pp 1285 – 1297.
44. Evans, T. 2008. *Anatomy of a Polymerase – How Structure Effects Function*. New England Biolabs Expressions. Volumen 3.2. Pp 156 – 164.
45. Fischer, U.; Englbrecht, C. & Chari, A. 2011. *Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins*. John Wiley & Sons. Volumen 2. Pp 718 – 731.

46. Fox, G. 2010. *Origin and Evolution of the Ribosome*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Volumen 2. Número 83. Pp 1 – 18.
47. Frank, J. 2016. *The translation elongation cycle— capturing multiple states by cryo-electron microscopy*. The Royal Society. Volumen 372. Pp 2 – 10.
48. Frank, J. 2017. *The mechanism of translation*. F1000Research. F1000 Faculty Rev. Volumen 198. Pp 1 – 8.
49. Franklin, S. & Vondriska, T. 2011. *Genomes, Proteomes and the Central Dogma*. Circular Cardiovascular Genetics. Volumen 4. Número 5. Pp 576 – 594.
50. Genome Research Limited. 2016. *What is a chromosome?* [En línea]. Consultado el 27 de marzo de 2017. Disponible en: <http://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-chromosome>
51. Gehring, N.; Wahle, E. & Fischer, U. 2017. *Deciphering the mRNP Code: RNA-Bound Determinants of Post-Transcriptional Gene Regulation*. Cell Press. Trends in Biochemical Sciences. Volumen xx. Número yy. Pp 1 – 14.
52. Gibiansky, A. 2015. *Common Techniques in Molecular Biology*. RSS. Volumen 1. Número 25. Pp 11 – 28.
53. Gingold, H. & Pilpel, Y. 2011. *Determinants of translation efficiency and accuracy*. Molecular Systems Biology. Volumen 7. Número 481. Pp 1 – 13.
54. Gingras, A.; Raught, B. & Sonenberg, N. 2009. *eIF4 Initiation Factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation*. Annual Review in Biochemistry. Volumen 68. Pp 913 – 963.
55. Glover, B. & McHenry, C. 2010. *The DNA Polymerase III Holoenzyme: An Asymmetric Dimeric Replicative Complex with Leading and Lagging Strand Polymerases*. Cell Press. Volumen 105. Pp 925 – 934.
56. Goodrich, J. & Kugel, J. 2016. *Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription*. Perspectives. Volumen 7. Pp 612 – 616.
57. Grangeasse, C.; Stülke, J. & Mijakovic, I. 2015. *Regulatory potential of post-translational modifications in bacteria*. Frontiers in Microbiology. Volumen 6. Número 500. Pp 1 – 2.
58. Griswold, A. 2008. *Genome packaging in prokaryotes: the circular chromosome of E. coli*. Nature Education. Volumen 1. Número 1. Pp 57.
59. Grudzien-Nogalska, E. & Kiledjian, M. 2017. *New insights into decapping enzymes and selective mRNA decay*. John Wiley & Sons. Volumen 8. Pp 1 – 1.

60. Hall, K. 2017. *RNA and Proteins: Mutual Respect*. Research. Volumen 6. Número 345. Pp 2 – 11.
61. Hanawalt, P. 2004. *Density matters: The semiconservative replication of DNA*. PNAS. Volumen 101. Número 52. Pp 17889 – 17894.
62. Hardin, W., Kleinsmith, L. & Bertoni, G. 2015. *Becker's World of the Cell*. 9ª edición UK: Pearson Education.
63. Heal, W. & Tate, E. 2010. *Getting a chemical handle on protein post-translational modification*. Organic Biomolecular Chemistry. Volumen 8. Pp 731 – 738.
64. Indiani, C. & O'Donnell, M. 2010. *The replication clamp-loading machine at work in the three domains of life*. Nature Reviews. Molecular Cell Biology. Volumen 7. Pp 751 – 761.
65. Jackson, R.; Hellen, C. & Pestova, T. 2010. *The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation*. Nature Reviews. Molecular Cell Biology. Volumen 10. Pp 113 – 127.
66. Jafari, M. & Mirzaie, M. 2017. *The evolution of central dogma of molecular biology: a logic-based dynamic approach*. BioRxiv beta. The preprint server for biology. [En línea]. Consultado el 22 de marzo de 2017. Disponible en: <http://www.biorxiv.org/content/early/2017/01/26/103127.article-metrics>
67. Jansen, A. & Verstrepen, K. 2011. *Nucleosome Positioning in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and molecular biology reviews. Volumen 75. Número 2. Pp. 301 – 320.
68. Jiao, X. et.al. 2010. *Identification of a quality control mechanism for mRNA 5'-end capping*. Nature. Volumen 467. Número 7315. Pp 608 – 611.
69. Johnson, A. et.al., 2017. *Dynamics of IRES-mediated translation*. The Royal Society. Volumen 372. Pp 1 – 16.
70. Jorge, A., et.al. 2016. *Cooperative action in DNA condensation*. Current Opinion in Colloid & Interface Science. Volumen 26. Pp 66 – 74.
71. Kaguni, J. 2011. *Replication initiation at the Escherichia coli chromosomal origin*. Current Opinion on Chemistry and Biology. Volumen 15. Número 5. Pp 1 – 14.
72. Kaida, D. 2016. *The reciprocal regulation between splicing and 30-end processing*. WIREs RNA. Volumen 7. Pp 499 – 511.
73. Kevles, J. 2010. *Destroying Dogma: the Discovery of Reverse Transcriptase*. The Rockefeller University.

74. Khan Academy. 2015. *Stages of transcription*. [En línea]. Consultado el 23 de abril de 2017. Disponible en: <https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/transcription-of-dna-into-rna/a/stages-of-transcription>
75. Kieler, K. 2015. *Mechanisms of ribosome rescue in bacteria*. Nature Reviews. Microbiology. Volumen 13. Pp 285 – 297.
76. Kim, N. & Jinks-Robertson, S. 2012. *Transcription as a source of genome instability*. Nature Reviews in Genetics. Volumen 13. Número 3. Pp 204 – 214.
77. Kisselev, L.; Ehrenberg, M. & Frolova, L. 2013. *Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors?* The EMBO Journal. Volumen 22. Número 2. Pp 175 – 182.
78. Knight, R.; Freeland, S. & Landweber, L. 2011. *Rewiring the keyboard: evolvability of the Genetic code*. Nature Reviews Genetics. Macmillan Magazines Ltd. Volumen 2. Pp 49 – 58.
79. Komaba, D. 2010. *Gene Expression Regulation in Prokaryotes*. The University of Tokyo.
80. Koonin, E. 2012. *Does the central dogma still stand?* Biology Direct. Volumen 7. Número 27. Pp 1 – 7.
81. Koonin, E. 2015. *Why the Central Dogma: on the nature of the great biological exclusion principle*. Biology Direct. Volumen 10. Número 52. Pp 1 – 5.
82. Koonin, E. & Novozhilov, K. 2009. *Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma*. IUBMB Life. Volumen 61. Número 2. Pp 99 – 111.
83. Korostelev, A. 2011. *Structural aspects of translation termination on the ribosome*. RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volumen 17. PP 1409 – 1412.
84. Lee, J. 2015. *General features of DNA replication*. Undergraduate Medical Education. University of Texas. Volumen 22. Número 3. Pp 53 – 57.
85. Lerman, A. & Noguchi, E. 2013. *The Replication Fork: Understanding the Eukaryotic Replication Machinery and the Challenges to Genome Duplication*. Genes. Volumen 4. Pp 1 – 32.
86. Lewis, P.; Doherty, G. & Clarke, J. 2008. *Transcription factor dynamics*. Microbiology. Volumen 154. Pp 1837 – 1844.
87. Li, Y. & Kiledjian, M. 2010. *Regulation of mRNA decapping*. John Wiley & Sons. Volumen 1. Pp 253 – 265.
88. Li, G. & Sunney, X. 2011. *Central dogma at the single-molecule level in living cells*. Nature. Volumen 475. Pp 308 – 315.

89. Ling, S.; Qamra, R. & Song, H. 2011. *Structural and functional insights into eukaryotic mRNA decapping*. John Wiley & Sons. Volumen 2. Pp 193 – 208.
90. Lodish, H. 2009. *Molecular Cell Biology*. 4^a edición. New York: W. H. Freeman.
91. Marians, K. et.al. 2008. *Role of the Core DNA Polymerase III Subunits at the Replication Fork*. The Journal of Biological Chemistry. Volumen 273. Número 4. Pp. 2452 – 2457.
92. Martínez, M. et.al. 2017. *Origin DNA Melting—An Essential Process with Divergent Mechanisms*. Genes. Volumen 8. Número 26. Pp 1 – 13.
93. Mathews, C., et.al. 2013. *Bioquímica*. 4^a edición. España: Pearson.
94. Matoulkova, E. et.al. 2012. *The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells*. RNA Biology. Volumen 9. Número 5. Pp 563 – 576.
95. Mattick, J. 2003. *Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms*. BioEssays. Volumen 25. Número 10. Pp 930 – 939.
96. Méndez, J. & González-Tizón, A. s.f. *Los genomas eucariotas: aspectos generales*. Universidad de La Coruña, España.
97. Messer, W. et.al. 2001. *Bacterial replication initiator DnaA. Rules for DnaA binding and roles of DnaA in origin unwinding and helicase loading*. Biochemie. Volumen 83. Pp 5 – 12.
98. Mooney, R. et.al. 2005. *Sigma and RNA Polymerase: Review An On-Again, Off-Again Relationship?*. Molecular Cell. Volumen 20. Pp 335 – 345.
99. Müller-McNicoll, M. & Neugebauer, K. 2013. *How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA–protein complexes*. Nature Reviews Genetics. Pp 1 – 13.
100. Musialek, M. & Rybaczek, D. 2015. *Behavior of replication origins in Eukaryota – spatio-temporal dynamics of licensing and firing*. Cell Cycle. Volumen 14. Número 14. Pp 2251 – 2264.
101. Myasnikov, A.; et.al. 2009. *Structure–function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation*. Current Opinion in Structural Biology. Volumen 19. Pp 300 – 309.
102. Navarro, J., Sandoval, A. & Armendáriz, J. 2008. *Biología molecular en medicina*. Mensaje Bioquímico. Volumen 32. Pp 163 – 174.
103. NCBI. 2007. *Molecular Biology Review*. [En línea]. Consultado el 27 de marzo de 2017. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/MolBioReview.html>

104. O'Donnell, M. & Li, H. 2016. *The Eukaryotic Replisome Goes Under the Microscope*. Cell Press. Current Biology Review. Volumen 26. Pp R247 – R256.
105. Ohyama, T. 2005. *DNA conformation and transcription*. Molecular Biology Intelligence Unit. 3ª edición. Japón: Springer.
106. Ozaki, S. & Katayama, T. 2009. *DnaA structure, function, and dynamics in the initiation at the chromosomal origin*. Plasmid. Volumen 62. Pp 71 – 82.
107. Pachov, G., Gabdoulline, R. & Wade, R. 2011. *On the structure and dynamics of the complex*. Nucleic Acids Research. Volumen 39. Número 12. Pp 5255 – 5263.
108. Parker, M.; Botchan, M. & Berger, J. 2017. *Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. Volumen 52. Número 2. Pp 107 – 144.
109. Patel, S. & Bellini, M. 2008. *The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle*. Nucleic Acids Research. Volumen 36. Número 20. Pp 6482 – 6493.
110. Pellegrini, L. & Costa, A. 2016. *New Insights into the Mechanism of DNA Duplication by the Eukaryotic Replisome*. Cell Press. Trends in Biochemical Sciences Review. Volumen 41. Número 10. Pp 859 – 871.
111. Pérez-Sala, M. 2012. *Modificaciones postraduccionales de proteínas: mecanismos clave en el control de su actividad*. SEBBM Divulgación. Volumen 1. Número 29. Pp 12, 13.
112. Perišić, O., et.al. 2010. *Modeling studies of chromatin fiber structure as a function of DNA linker length*. Journal of Molecular Biology. Volumen 403. Número 5. Pp 777 – 802.
113. Pfeiffer, V. & Lingner, J. 2013. *Replication of Telomeres and the Regulation of Telomerase*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Volumen 5. Pp 1 – 22.
114. Pomerantz, R. & O'Donnell, M. 2007. *Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine*. TRENDS in Microbiology Volumen 15. Número 4. Pp 156 – 164.
115. Porrua, O.; Boudvillain, M. & Libri, D. 2016. *Transcription Termination: Variations on Common Themes*. Cell Press. Volumen 32. Número 8. Pp 508 – 522.
116. Prabhakar, A.; et.al. 2017. *Dynamic basis of fidelity and speed in translation: coordinated multi-step mechanisms of elongation and termination*. Protein Science. Pp 2 – 34.

117. Prabakaran, S. et.al. 2012. *Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding*. WIREs Systems in Biological Medicine. Pp 1 – 19.
118. Pray, L. 2014. *Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick*. Nature Education. Volumen 62. Número 9. Pp 100 – 104.
119. Pray, L. 2008. *Eukaryotic Genome Complexity*. Nature Education. Volumen 16. Número 1. Pp 96 – 98.
120. Pray, L. 2012. *Semi-conservative DNA replication: Meselson and Stahl*. Nature Education. Volumen 27. Número 14. Pp 98.
121. Ralston, A. 2008. *Distinct possibilities: Overlapping or non-overlapping genetic code?* Nature Education. Pp 31 – 43.
122. Ramanathan, A.; Robb, G. & Chan, S. 2016. *mRNA capping: biological functions and applications*. Nucleic Acids Research. Volumen 44. Número 16. Pp 7511 – 7526.
123. Ravoitytè, B. & Wellinger, R. 2017. *Non-Canonical Replication Initiation: You're Fired!* Genes. Volumen 8. Número 54. Pp 1 – 17.
124. Robinson, A. & van Oijen, A. 2013. *Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies*. Nature Reviews Microbiology. Pp 1 – 13.
125. Rodnina, M. 2016. *The ribosome in action: Tuning of translational efficiency and protein folding*. Protein Science. Volumen 25. Pp 1390 — 1406.
126. Roy, B. 2013. *Review: Alternative Splicing (AS) of Genes As An Approach for Generating Protein Complexity*. Current Genomics. Volumen 14. Pp 182 – 194.
127. Roy, A. & Singer, D. 2015. *Core promoters in transcription: old problem, new insights*. Trends in Biochemical Sciences. Volumen XX. Pp 1 – 7.
128. Rubtsova, M. et.al. 2016. *Peculiarities of Yeasts and Human Telomerase RNAs Processing*. Acta Natura. Volumen 8. Número 4 (31). Pp 14 -22
129. Samiksha, S. 2016. *Review. Genetic Code: Characteristics and Exceptions of Genetic Code*. Nature Education. Volumen 1. Número 4. Pp 20 – 23.
130. Schreiber, S. 2005. *Small molecules: the missing link in the central dogma*. Nature Chemical Biology. Volumen 1. Número 2. Pp 64 – 66.
131. Sekine, S.; Tagami, S. & Yokoyama, S. 2012. *Structural basis of transcription by bacterial and eukaryotic RNA polymerases*. Current Opinion in Structural Biology. Volumen 22. Pp 110 – 118.

132. Shandilya, J. & Roberts, S. 2012. *The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling*. Biochimica et Biophysica Acta. Volumen 1819. Pp 391 – 400.
133. Shapiro, J. 2009. *Revisiting the Central Dogma in the 21st Century*. Natural Genetic Engineering and Natural Genome Editing. Volumen 1178. Pp 6 – 28.
134. Shimotohno, K. 2011. *Reverse transcriptase and cDNA synthesis*. Genetics and molecular biology. EOLSS.
135. Shiomi, Y. & Nishitani, H. 2017. *Control of Genome Integrity by RFC Complexes; Conductors of PCNA Loading onto and Unloading from Chromatin during DNA Replication*. Genes. Volumen 8. Número 52. Pp 1 – 18.
136. Siman, P. & Brik, A. 2012. *Chemical and semisynthesis of posttranslationally modified proteins*. Organic Biomolecular Chemistry. Volumen 10. Pp 5684 – 5698.
137. Solomon, E. et.al. 2013. *Biología*. 9ª edición. México: Cenage Learning.
138. Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. 2009. *Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets*. Cell. Volumen 136. Número 4. Pp 731 – 745.
139. Stanley, M. & Virdee, S. 2016. *Review article. Chemical ubiquitination for decrypting a cellular code*. Biochemistry Journal. Volumen 473. Pp 1297 – 1314.
140. Sun, J. et.al. 2015. *The Architecture of a Eukaryotic Replisome*. Nature Structural Molecular Biology. Volumen 22. Número 12. Pp 976 – 982.
141. S.a. 2017. *Genome, chromosome, DNA, gene*. [En línea]. Consultado el 27 de marzo de 2017. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/basics/>
142. Tagami, S.; Sekine, S. & Yokoyama, S. 2011. *A novel conformation of RNA polymerase sheds light on the mechanism of transcription*. Transcription Lands Bioscience. Volumen 2. Número 4. Pp 162 – 167.
143. Trujillo, M.; Guzmán, G. & Carreón, Y. 2014. *La unidad y la diversidad de los complejos de iniciación de la transcripción en promotores basales de tipo II*. REB. Volumen 23. Número 4. Pp 157 – 163.
144. Ussery, D. 2012. *DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families*. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group. Pp 1 – 7.
145. Villain-Guillot, P. et.al. 2007. *Progress in targeting bacterial transcription*. Drug Discovery Today. Volumen 12. Números 5/6. Pp 200 – 208.
146. Vries, R. 2012. *DNA condensation in bacteria: Interplay between macromolecular crowding and nucleoid proteins*. Biochimie. Volumen 92. Pp 1715 – 1721.

147. Wade, J. & Struhl, K. 2008. *The transition from transcriptional initiation to elongation*. Current Opinion in Genetics & Development. Volumen 18. Pp 130 – 136.
148. Walsh, C.; Garneau-Tsodikova, S. & Gatto, G. 2015. *Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications*. Angewandte Chemie International. Volumen 44. Pp 7342 – 7372.
149. Walsh, D. & Mohr, I. 2011. *Viral subversion of the host protein synthesis machinery*. Nature Reviews. Microbiology. Volumen 9. Pp 860 – 875.
150. Watson, J., et.al. 2008. *Biología molecular del gen*. 5ª edición. España: Medica Panamericana.
151. Wiley, J. 2002. *Interactive concepts in biochemistry*. Science technologies. [En línea]. Consultado el 03 de mayo de 2017. Disponible en: <http://www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/>.
152. Wilkins, A. 2012. *Evolution: A View from the 21st Century. Book Review*. Genome Biol Evol. Volumen 4. Número 4. Pp 423 – 426.
153. Will, C. & Lührman, R. 2010. *Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function*. Current Opinion in Cell Biology. Volumen 13. Pp 290 – 301.
154. Wilson, D. 2014. *Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance*. Nature Reviews. Microbiology. Volumen 12. Pp 35 – 48.
155. Wu, A. et.al. 2017. *Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis*. ARI. Volumen 8. Número 41. Pp 4.1 – 4.22.
156. Yang, C. et.al. 2007. *Prevalence of the initiator CAAT/TATA box in the human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human CAAT/TATA-less core promoters*. Gene. Volumen 389. Pp 52 – 65.
157. Yao, N. & O'Donnell, M. 2015. *Evolution of replication machines*. Critical Reviews of Biochemistry and Molecular Biology. Volumen 51. Número 3. Pp 135 – 149.
158. Yao, N. & O'Donnell, M. 2016. *Bacterial and Eukaryotic Replisome Machines*. JMS Biochemistry and Molecular Biology. Volumen 3. Número 1. Pp 1 – 15.
159. Yeh, H. & Yong, J. 2016. *Alternative Polyadenylation of mRNAs: 3'-Untranslated Region Matters in Gene Expression*. Molecules and Cells. Volumen 39. Número 4. Pp 281 – 285.
160. Yurieva, O. & O'Donnell, M. 2016. *Reconstitution of a eukaryotic replisome reveals the mechanism of asymmetric distribution of DNA Polymerases*. Nucleus. Volumen 7. Número 4. Pp 360 – 368.

161. Zhai, L. & Xiang, S. 2014. *mRNA quality control at the end 5'*. Biomedical & Biotechnology. Volumen 15. Número 5. Pp 438 – 443.
162. Zhang, Y.; Najmi, S. & Schneider, D. 2017. *Transcription factors that influence RNA polymerases I and II: To what extent is mechanism of action conserved?* Biochimica et Biophysica Acta 1860. Pp 246 – 255.
163. Zheng, L. & Shen, B. 2011. *Okazaki fragment maturation: nucleases take centre stage*. Journal of Molecular Cell Biology. Volumen 3. Pp 23 – 30.
164. Zhou, C.; Pourmal, S. & Pavletich, N. 2015. *Dna2 nuclease-helicase structure, mechanism and regulation by Rpa*. E Life. Volumen 4. Pp 1 – 19.