

Mecanismos celulares que mantienen la integridad del genoma

IGNACIO HERRERO TAPIA¹

Universidad de Salamanca
ignacioherrero@usal.es

SUMARIO

La integridad de los genomas eucariotas puede verse amenazada durante la replicación del ADN. En este proceso se debe duplicar el genoma con la mayor fidelidad posible. Sin embargo, situaciones que perturban la replicación o cantidades limitantes de nucleótidos causan estrés replicativo alterando la estructura de la cromatina, esencial para garantizar una correcta replicación, ya que establece dónde se inicia el proceso y regula la expresión génica. Las alteraciones en la estructura de la cromatina ponen en peligro la integridad genética y epigenética de la célula, lo que genera graves consecuencias para el organismo.

Palabras clave: Daño celular, estructura de la cromatina, estrés replicativo, epigenética, enfermedad, senescencia, envejecimiento y cáncer.

SUMMARY

Genomic integrity in eukaryotic cells can be threatened during DNA replication. In this process, the entire genome must be duplicated with the major possible accuracy. Nevertheless, limited supply of nucleotides or situations in which replication is perturbed are both a source of replication stress, disturbing chromatin structure, which is essential to ensure a proper replication as it establishes where the process starts and regulate gene expression. Alterations in chromatin structure risks genetic and epigenetic cell integrity, which leads the organism to severe consequences.

1 Ignacio HERRERO TAPIA es Graduado en Biología por la Universidad de Salamanca.

Key words: Cellular damage, chromatin structure, replication stress, epigenetics, disease, senescence, ageing and cancer.

1. INTRODUCCIÓN

El código genético es universal. Pese a la gran diversidad de la vida, todos los organismos vivos de la Tierra almacenan su información genética en moléculas de ADN de doble cadena y todas las células replican su información hereditaria para copiarla y transmitirla a la siguiente generación. Los daños en este proceso, común a todos los organismos vivos, son daños importantes para la célula, que tiene que reparar para mantener la integridad de su genoma y así evitar que se transmitan a la siguiente generación, pues si los daños en el ADN no fuesen reparados podrían llevarla al envejecimiento, muerte celular o a una proliferación excesiva que conduciría al desarrollo de tumores².

El genoma es el conjunto de genes dispuestos en los cromosomas dentro de la célula, es decir, la secuencia total de nucleótidos que constituye el ADN de un individuo o especie. La complejidad y el tamaño de los genomas es característica de cada organismo. Así, los genomas eucariotas, que según explica la teoría de la endosimbiosis evolucionaron gracias a un proceso simbiótico³ y tienen, por tanto, genomas híbridos de gran tamaño, son más grandes y complejos que los de los procariotas⁴.

Las células poseen un ciclo de vida y la replicación sucede en la fase de síntesis, es decir, en la fase S del ciclo celular. Empieza siempre en puntos concretos del genoma, llamados orígenes de replicación, que en algunos organismos tienen secuencias características. La diferencia del tamaño y complejidad de los genomas eucariotas y procariotas, previamente mencionada, puede apreciarse en el número de orígenes que presenta cada uno. En eucariotas hay múltiples orígenes de replicación, mientras que en el genoma procariota solo existe un único origen.

La replicación es un proceso esencial y por eso está altamente regulado, ya que la vulnerabilidad que presenta el ADN expuesto, debido a su desenrollamiento y

2 ROBLES, R. G., RAMÍREZ, P. A. A., & VELÁSQUEZ, S. P. P. (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de la Salud*, 10 (1), 59-71.

3 ZIMORSKI, V., KU, C., MARTIN, W. F., & GOULD, S. B. (2014). Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current opinion in microbiology*, 22, 38-48.

4 LYNCH, M., & CONERY, J. S. (2003). The origins of genome complexity. *Science*, 302 (5649), 1401-1404.

aparición de cadenas simples de ADN enormemente sensibles, necesita un punto de control o *checkpoint* que se active en presencia de daños y que retrase la mitosis para poder asegurar la reparación del mismo⁵. Este mecanismo de control está regulado principalmente por un grupo de proteínas quinasas⁶. Por eso es muy importante su correcto funcionamiento, ya que defectos en el *checkpoint* de la fase S conllevarían la producción de daños y roturas en el ADN, que en mamíferos podría acarrear letalidad embrionaria, determinados síndromes como ataxia telangiectasia⁷ o cáncer⁸.

2. DAÑOS EN LA REPLICACIÓN: ALTERACIONES EN LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

El tamaño del genoma eucariota presenta un reto particular para la célula: empaquetar y organizar el ADN para que quepa dentro de los límites del núcleo y al mismo tiempo pueda presentar el dinamismo suficiente para permitir el acceso a determinadas secuencias específicas, como genes o elementos reguladores⁹. En las células que no se encuentran en periodo de división celular, el ADN se encuentra enrollado en torno a una serie de proteínas llamadas histonas –pequeñas fosfoproteínas básicas con una gran composición de aminoácidos de carga positiva en su cadena lateral, como arginina y lisina, que facilitan la unión a la molécula de ADN, cargada negativamente–, proteínas no histónicas y ARN, y diseminado por el núcleo interfásico. Estos complejos entre el ADN eucariótico, ARN y proteínas conforman la cromatina, con una composición aproximada del doble de proteína que de ADN¹⁰. La microscopía electrónica ha demostrado que la unidad básica de la cromatina es el nucleosoma y que las fibras de cromatina tienen la apariencia de un collar de cuentas que se extiende con las cuentas separadas, en intervalos de 200 pares de bases.

5 HUSTEDT, N., GASSER, S. M., & SHIMADA, K. (2013). Replication checkpoint: tuning and coordination of replication forks in s phase. *Genes*, 4 (3), 388-434.

6 TAKEDA, D. Y., & DUTTA, A. (2005). DNA replication and progression through S phase. *Oncogene*, 24 (17), 2827-2843.

7 LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., & DARNELL, J. (2000). Mutations Affecting Genome Stability.

8 KASTAN, M. B., & BARTEK, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432 (7015), 316-323.

9 MACALPINE, D. M., & ALMOUZZI, G. (2013). Chromatin and DNA replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(8), a010207.

10 COOPER, G. M., & HAUSMAN, R. E. (2014). *The Cell: a Molecular Approach, 6th edition*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates.

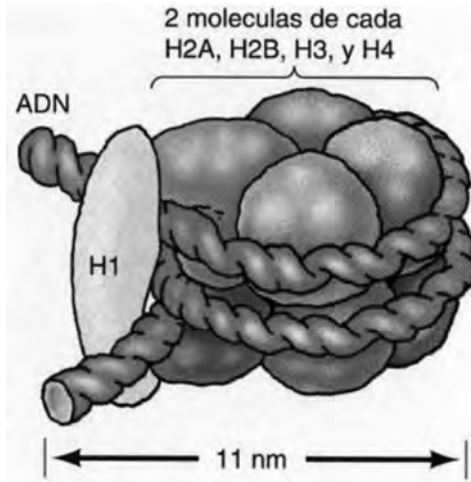


Imagen 1. Core del nucleosoma.

Fuente: Cooper, G. M.,
& Hausman, R. E. (2014).

The Cell: a Molecular Approach,
6th edition. Sunderland, Massachusetts,
USA: Sinauer Associates.

Existen cinco tipos importantes de histonas: H1, H2A, H2B, H3 Y H4. Estas cuatro últimas moléculas, dos veces repetidas: 2H2A, 2H2B, 2H3 y 2H4, conforman el núcleo octamérico llamado core del nucleosoma, unidad básica de la cromatina. El ADN se envuelve alrededor del octámero de histonas, da aproximadamente 1,8 vueltas que corresponden a unos 147 pares de bases y es sujetado por la histona H1, formando el nucleosoma, es decir, el conjunto del core con la histona H1 y los 147 pares de bases de ADN. Esta estructura es igual para todos los eucariotas excepto por la longitud del lazo internucleosómico que puede variar entre 40 y 80 pares de bases. De esta manera, existe una mayor o menor separación

entre los nucleosomas, pero todos tienen aproximadamente unos 10nm de espesor. En condiciones fisiológicas esta fibra de 10 nm sufre un segundo grado de enrollamiento sobre sí misma para dar lugar a una estructura en forma de solenoide, con 6 nucleosomas por vuelta. Esta configuración constituye la fibra de 30 nm, en la que el grado de empaquetamiento del ADN es de unas 40 veces¹¹. El grado de condensación varía durante el transcurso del ciclo celular.

Cuando las células no se dividen porque se encuentran en la interfase del ciclo celular, una pequeña proporción de cromatina se encuentra en estado de heterocromatina, muy condensada, que recuerda a la condensación que esta sufre en la mitosis, compactando el ADN cerca de 10.000 veces más para formar cromosomas estables, sin embargo la inmensa mayoría se encuentra distribuida por el núcleo en estado de descondensación, denominada eucromatina y es tremendamente accesible para la maquinaria de transcripción y replicación, facilitando así la transcripción de genes y la duplicación del material genético.

El hecho de que la célula replique su material genético y mantenga la organización adecuada de la cromatina es un factor importante para la prevención de

11 COOPER, G. M., & HAUSMAN, R. E. (2014). *The Cell: a Molecular Approach*, 6th edition. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates.

enfermedades. De hecho, el silenciamiento epigenético por hipermetilación de la cromatina está muy estudiado y se manifiesta especialmente en las etapas tempranas de la progresión tumoral¹². Durante la replicación la cromatina se desenrolla para dejar paso a la horquilla de replicación y debe restaurarse, inmediatamente una vez que esta ha pasado, en las dos nuevas hebras hijas. El ensamblaje de los nucleosomas es el primer paso en este proceso, que incluye también el remodelamiento de los mismos, la incorporación de variantes en las histonas y la restauración de las marcas en el ADN¹³.

2.1. REGULACIÓN DE LA CROMATINA E INICIO DE LA REPLICACIÓN

Para que se inicie la replicación es necesario que ocurran una serie de procesos secuenciales:

Al final de la mitosis a los orígenes de replicación se unen los complejos de reconocimiento de orígenes de replicación (ORC), que consisten en complejos con seis subunidades ORC1-6¹⁴ que tiene actividad ATP-asa.

En la fase G1 el complejo de mantenimiento del minicromosoma MCM (que contiene seis subunidades MCM2-7) es reclutado hacia los sitios de unión a los complejos de reconocimiento de los orígenes, por la acción de la proteína de control de la división celular 6 (CDC6) y CDT1 formando el complejo de pre-replicación (pre-RC)¹⁵. Una vez que los anillos de MCM2 se unen al ADN, el origen se ha “licenciado” y está listo para ser activado.

A continuación se produce la activación del origen, formándose el complejo de pre-iniciación (Pre-IC) y la activación de MCM. El montaje del complejo de pre-iniciación ocurre en la transición de la fase G1/S y su activación como replisoma funcional ocurre en la fase de síntesis del ciclo. Cuando el complejo MCM se une por primera vez para formar el Pre-RC, es un doble hexámero inactivo que rodea el ADN. La activación de los orígenes de replicación conlleva la separación de dicho par de hexámeros MCM, en aras de conformar dos hexámeros activos que formen dos replisomas distintos que puedan desenrollar el ADN y generar dos hor-

12 BAYLIN, S. B., & JONES, P. A. (2016). Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a019505.

13 GROTH, A., ROCHA, W., VERREAU, A., & ALMOUZI, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell*, 128 (4), 721-733.

14 MÉCHALI, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11 (10), 728-738.

15 MÉCHALI, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11 (10), 728-738.

quillas de replicación en cada origen¹⁶. Este paso es generado por la actividad DDK (Kinasa dependiente de Dbf4), que fosforila el complejo MCM. Sin embargo, la fosforilación por DDK no es suficiente y para promover la activación del origen es necesaria, también la actividad presentada por Kinasas dependientes de Ciclina (CDKs) para fosforilar una serie de factores y permitir la unión de otras proteínas de replicación a la cromatina y así establecer el Pre-IC¹⁷.

La cromatina desempeña un papel fundamental en el inicio de la replicación y la reorganización del genoma. En relación a este papel de la cromatina en la replicación, una cuestión a resolver es cómo los complejos ORC identifican orígenes de replicación, ya que, en metazoos, es decir, en el reino Animalia, los orígenes de replicación no presentan ninguna secuencia específica de ADN¹⁸. Si bien es cierto que estos complejos ORC se encuentran abundantemente en zonas libres de nucleosomas o de baja ocupación de los mismos en comparación con las regiones inmediatamente circundantes¹⁹, realmente no está claro si la falta de nucleosomas facilita el reclutamiento de ORC o si la unión del complejo desplaza los nucleosomas. Actualmente, sin embargo, sí existen evidencias cada vez más sólidas de que factores de la cromatina no histónicos, como la proteína heterocromatínica 1 (HP1) (proteína que favorece la represión de genes mediante la heterocromatinización de la eucromatina y el mantenimiento de su integridad), o la proteína HMGA1 (proteínas cromatínica AT-hook del grupo de alta movilidad) que regula procesos como la replicación del ADN o la reorganización de la heterocromatina, pueden dirigir los complejos ORC a regiones particulares para especificar los orígenes de replicación²⁰.

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas, como la monometilación en la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me1), pueden también regular el reclutamiento de ORC. Después del comienzo de la fase S, se produce la degradación de la metiltransferasa SET8 (proteína que contiene un dominio SET) que cataliza la

16 NGUYEN, V. Q., CO, C., IRIE, K., & LI, J. J. (2000). Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Current Biology*, 10 (4), 195-205.

17 ON, K. F., BEURON, F., FRITH, D., SNIJDERS, A. P., MORRIS, E. P., & DIFFLEY, J. F. (2014). Prereplicative complexes assembled in vitro support origin-dependent and independent DNA replication. *The EMBO journal*, e201387369.

18 MÉCHALI, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11 (10), 728-738.

19 CAYROU, C., COULOMBE, P., VIGNERON, A., STANOJCIK, S., GANIER, O., RIVALS, E., ... & MECHALI, M. (2011). Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome research*, gr-121830.

20 SCHWAIGER, M., KOHLER, H., OAKELEY, E. J., STADLER, M. B., & SCHÜBELER, D. (2010). Heterochromatin protein 1 (HP1) modulates replication timing of the Drosophila genome. *Genome research*, 20 (6), 771-780.

monometilación de H4K20, interacciona con el antígeno nuclear de proliferación celular y es necesaria para el avance de la horquilla de replicación. De hecho, alteraciones en su expresión conllevan una menor proliferación y estancamiento de las células en fase S²¹. Su degradación da lugar a pérdida de H4K20mel en los orígenes de replicación e inhibición del licenciamiento de orígenes, lo que podría suponer un mecanismo eficaz para prevenir una replicación de nuevo en el mismo ciclo²². Sin embargo, en la fase G2/M, esta marca de monometilación es reestablecida por SET8, posiblemente con la finalidad de marcar los orígenes de replicación a los que se unirá ORC en el siguiente ciclo celular²³.

Después de la unión de ORC, CDC6 y CDT1 facilitan la unión de la helicasa MCM2-7²⁴ y la formación del complejo pre-RC. Al ser un campo de estudio muy reciente todavía, se ha propuesto que la acetilación de las histonas podría estimular el ensamblaje del complejo de pre-replicación y/o la actividad de los orígenes, sin embargo el mecanismo exacto es hasta ahora desconocido, mas una posibilidad que se sopesa es que la acetilación de histonas facilite el reclutamiento de la helicasa MCM2-7²⁵.

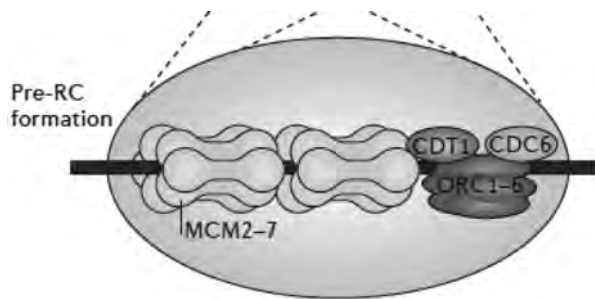


Imagen 2. Complejo de pre-replicación.

Fuente: Alabert, C., & Groth, A. (2012).

Chromatin replication and epigenomemaintenance.

Nature reviews Molecular cell biology, 13 (3), 153-167.

21 JØRGENSEN, S., ELVERS, I., TRELLE, M. B., MENZEL, T., ESKILDSEN, M., JENSEN, O. N., ... & SØRENSEN, C. S. (2007). The histone methyltransferase SET8 is required for S-phase progression. *The Journal of cell biology*, 179(7), 1337-1345.

22 JØRGENSEN, S., ESKILDSEN, M., FUGGER, K., HANSEN, L., LARSEN, M. S. Y., KOUSHOLT, A. N., ... & SØRENSEN, C. S. (2011). SET8 is degraded via PCNA-coupled CRL4 (CDT2) ubiquitylation in S phase and after UV irradiation. *The Journal of cell biology*, 192(1), 43-54.

23 RICE, J. C., NISHIOKA, K., SARMA, K., STEWARD, R., REINBERG, D., & ALLIS, C. D. (2002). Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes & development*, 16(17), 2225-2230.

24 MÉCHALI, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(10), 728-738.

25 MIOTTO, B., & STRUHL, K. (2010). HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Molecular cell*, 37(1), 57-66.

El complejo MCM2-7 aparece como dos hexámeros²⁶ que, tras la iniciación de la replicación se divide, avanzando en direcciones opuestas²⁷. Sin embargo, un correcto complejo de pre-replicación no asegura la activación del origen. De hecho, sólo el 10% de los orígenes son activados, quedando el 90% en estado durmiente²⁸. Este exceso de posibles orígenes puede servir como apoyo para asegurar la correcta duplicación del genoma bajo condiciones de estrés replicativo²⁹. Los orígenes que se activarán son seleccionados en la fase G1, y aunque el mecanismo que determina esta selección es desconocido, parece que la organización espacial del genoma es enormemente relevante.

Si todos los orígenes se activaran a la vez, el genoma humano en su totalidad podría ser duplicado en menos de una hora. Sin embargo, la replicación del genoma sigue un patrón determinado conocido como programa temporal de replicación, esto es, el orden en que se replican los elementos a lo largo de la longitud del cromosoma³⁰. El genoma sigue un programa para replicar al mismo tiempo regiones de megabases de ADN contiguo, conocidas como “dominios temporales” y esto, a su vez, depende del tipo de cromatina que se replica y del anclaje de los segmentos cromosómicos en ubicaciones específicas dentro del núcleo. La replicación temprana al principio de la fase S se correlaciona con la accesibilidad del ADN y con la acetilación H4K16 (H4K16ac). Comparada con la histona H3, la acetilación de los residuos de H4 ha sido poco estudiada, al menos, en células de mamíferos. El estudio de la acetilación de H4K16 presenta un interés particular por su capacidad de descompactar nucleosomas *in vitro* y de alterar la estructura altamente organizada de la cromatina. Parece ser, que la estabilidad de la cromatina y la proximidad espacial de las regiones que se replican simultáneamente puede ayudar a explicar patrones específicos de alteraciones genómicas en el cáncer³¹.

26 REMUS, D., BEURON, F., TOLUN, G., GRIFFITH, J. D., MORRIS, E. P., & DIFFLEY, J. F. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell*, 139 (4), 719-730.

27 GAMBUS, A., JONES, R. C., SANCHEZ-DIAZ, A., KANEMAKI, M., VAN DEURSEN, F., EDMONDSON, R. D., & LABIB, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nature cell biology*, 8 (4), 358-366.

28 BLOW, J. J., GE, X. Q., & JACKSON, D. A. (2011). How dormant origins promote complete genome replication. *Trends in biochemical sciences*, 36 (8), 405-414.

29 IBARRA, A., SCHWOB, E., & MÉNDEZ, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (26), 8956-8961.

30 GILBERT, D. M., TAKEBAYASHI, S. I., RYBA, T., LU, J., POPE, B. D., WILSON, K. A., & HIRATANI, I. (2010, January). Space and time in the nucleus developmental control of replication timing and chromosome architecture. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 75, pp. 143-153). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

31 DE, S., & MICHOR, F. (2011). DNA replication timing and long-range DNA interactions predict mutational landscapes of cancer genomes. *Nature biotechnology*, 29 (12), 1103-1108.

2.2. PROGRESO DE LA HORQUILLA Y SÍNTESIS DE LA CROMATINA

La replicación del ADN sucede gracias a numerosos eventos coordinados por la helicasa replicativa que desenrolla la doble hélice y las polimerasas que sintetizan ADN en sentido 5'-3'³². El complejo CMG, formado por CDC45 (proteína 45 de control del ciclo celular), MCM2-7 (complejo 2-7 de mantenimiento del minicromosoma) y GINS (acrónimo japonés de go-ichi-ni-san: 5,1,2,3 por las cuatro subunidades de proteínas que conforman el complejo: Sld5, Psf1, Psf2 y Psf3; esencial para la iniciación y elongación de determinadas fases de la replicación), conforma el core de la helicasa replicativa en eucariotas³³. CDC45 y GINS se asocian al hexámero MCM2-7 para permitir a la helicasa desplazarse a lo largo del ADN³⁴.

La helicasa CMG es parte de un complejo proteínico superior llamado Complejo de Progresión del Replisoma (RPC)³⁵, que incluye numerosos factores como el Factor de Replicación C (RFC), el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la proteína A de replicación (RPA) y otras ADN polimerasas que convierten el pre-IC en dos horquillas de replicación funcionales, que avanzan en direcciones opuestas desde el origen activado, con el replisoma en cada horquilla. La polimerasa ϵ , es la responsable de la síntesis continua de la hebra líder, mientras que la hebra retardada es sintetizada de manera discontinua por la unión de los fragmentos de Okazaki. Cada fragmento se inicia por el complejo primasa-Polimerasa α , mediante la síntesis de un cebador de ARN con una corta extensión de ADN, lo que comúnmente se entiende como Polimerasa δ . El cebador y parte del ADN se eliminan, mientras que dos de los fragmentos de Okazaki se ligan por acción de la Endonucleasa flap1 (FEN1) y la ADN ligasa 1³⁶.

32 JOHNSON, A., & O'DONNELL, M. (2005). Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 283-315.

33 BOCHMAN, M. L., & SCHWACHA, A. (2009). The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(4), 652-683.

34 COSTA, A., ILVES, I., TAMBERG, N., PETOJEVIC, T., NOGALES, E., BOTCHAN, M. R., & BERGER, J. M. (2011). The structural basis for MCM2-7 helicase activation by GINS and Cdc45. *Nature structural & molecular biology*, 18(4), 471-477.

35 GAMBUS, A., JONES, R. C., SANCHEZ-DIAZ, A., KANEMAKI, M., VAN DEURSEN, F., EDMONDSON, R. D., & LABIB, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nature cell biology*, 8(4), 358-366.

36 FRAGKOS, M., GANIER, O., COULOMBE, P., & MÉCHALI, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(6), 360-374.

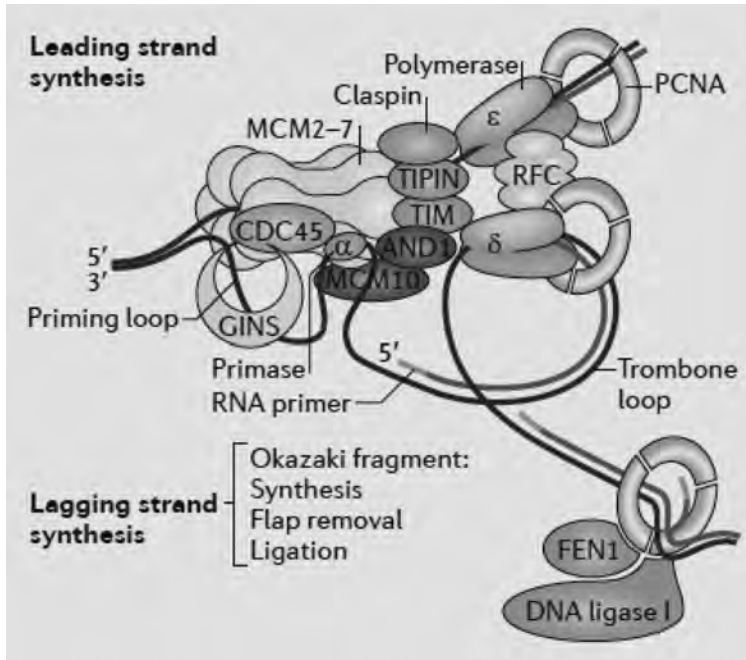


Imagen 3. Estructura del replisoma.

Fuente: Alabert, C., & Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13 (3), 153-167.

2.3. ENSAMBLAJE DE LA CROMATINA

El replisoma eucariota dirige la replicación a una velocidad aproximada de 2 a 3 kb/min³⁷. Esto supone que la cromatina tiene que desenrollarse en unas tasas de, aproximadamente, 10 a 15 nucleosomas por minuto por delante de la horquilla de replicación. Para reproducir un ambiente de cromatina similar al existente en las nuevas hebras de ADN, tienen que transferirse las histonas y otra serie de componentes³⁸ unidos a la cromatina de las hebras parentales a las hebras hijas³⁹. Además, para mantener la densidad nucleosómica hay que incorporar nuevas histonas, y sus

37 MÉCHALI, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11 (10), 728-738.

38 FRANCIS, N. J., FOLLMER, N. E., SIMON, M. D., AGHIA, G., & BUTLER, J. D. (2009). Polycomb proteins remain bound to chromatin and DNA during DNA replication in vitro. *Cell*, 137 (1), 110-122.

39 GROTH, A., ROCHA, W., VERREULT, A., & ALMOUZZI, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell*, 128 (4), 721-733.

modificaciones postraduccionales deberían asemejarse a las de las histonas antiguas en el ambiente cromatínico local.

Una consecuencia inmediata de la replicación del ADN es la disrupción de la estructura existente de la cromatina por el paso de la horquilla de replicación. Existen varias vías que contribuyen al reensamblaje de la cromatina en el nuevo ADN. La primera es la disrupción de la cromatina: la liberación del octámero de histonas por delante de la horquilla de replicación genera histonas parentales que pueden ser recicladas detrás de la horquilla⁴⁰; y la segunda: facilitar la deposición de nuevas histonas sintetizadas por el nuevo ADN⁴¹. La segregación de histonas parentales combinadas con las sintetizadas *de novo* es un proceso esencial para la estabilidad y heredabilidad de los estados de la cromatina.

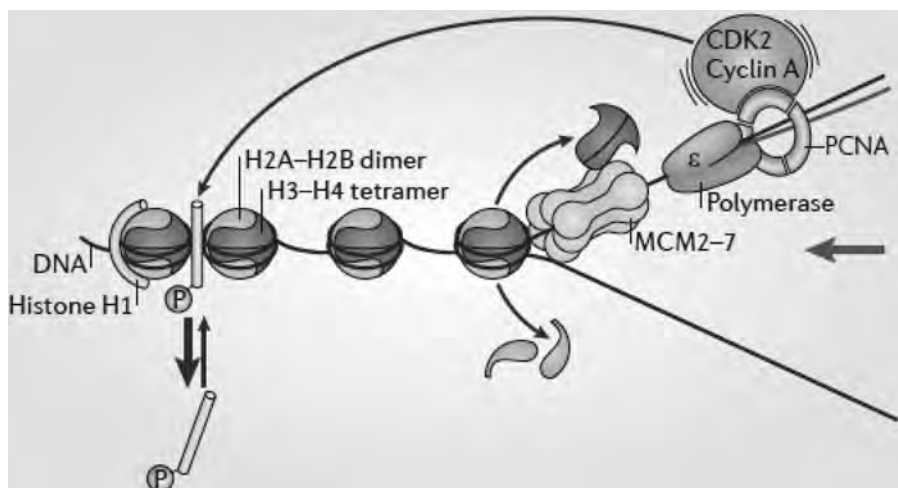


Imagen 4. Disrupción de la cromatina. La ciclina A-CDK2 es reclutada en la horquilla, probablemente gracias a la asociación con PCNA y MCM2-7, y esto puede facilitar la fosforilación de la histona H1, que causa su liberación de la fibra de cromatina. Los nucleosomas sufren disrupción inmediatamente delante de la horquilla y las histonas permanecen en cercana proximidad para asegurar un reciclado eficiente.

Fuente: Alabert, C., & Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13 (3), 153-167.

40 XU, M., LONG, C., CHEN, X., HUANG, C., CHEN, S., & ZHU, B. (2010). Partitioning of histone H3-H4 tetramers during DNA replication-dependent chromatin assembly. *Science*, 328 (5974), 94-98.

41 ANNUNZIATO, A. T. (2012). Assembling chromatin: the long and winding road. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819 (3), 196-210.

2.3.1. *Disrupción de la cromatina*

Análisis en la dinámica del complejo MCM en células vivas sugieren que la cromatina que se replica está descondensada⁴². Un mecanismo podría ser la fosforilación de la histona H1 en la fase S por la Kinasa dependiente de ciclina A-CDK2⁴³, pues incrementa la movilidad de la histona H1 y, en consecuencia, favorece la descompactación de la cromatina⁴⁴. En el mohó mucilaginoso *Physoarum polycephalum* la depleción de la histona H1 aceleraba la progresión de la fase S y el tiempo de replicación⁴⁵. En células humanas la ciclina A-CDK2 es reclutada a los sitios de replicación e interacciona directamente con PCNA y MCM7⁴⁶. Además, la ciclina A-CDK1 de G2/M, que también fosforila a la histona H1, puede activar orígenes de replicación tardíos si se sobreexpresa en células en fases tempranas de la fase S⁴⁷.

La disrupción de los nucleosomas sucede fundamentalmente en las zonas más próximas a la horquilla de replicación⁴⁸, quizá como resultado de la colisión con las helicasas replicativas⁴⁹. No se sabe si influyen otros factores, pero posiblemente el superenrollamiento generado delante de la horquilla pueda aumentar potencialmente el riesgo de disrupción⁵⁰, por tanto, el grado de enrollamiento de las moléculas de ADN también juega un papel fundamental.

42 KUIPERS, M. A., STASEVICH, T. J., SASAKI, T., WILSON, K. A., HAZELWOOD, K. L., MCNALLY, J. G., ... & GILBERT, D. M. (2011). Highly stable loading of Mcm proteins onto chromatin in living cells requires replication to unload. *The Journal of cell biology*, 192 (1), 29-41.

43 THOMSON, A. M., GILLESPIE, P. J., & BLOW, J. J. (2010). Replication factory activation can be decoupled from the replication timing program by modulating Cdk levels. *The Journal of cell biology*, 188 (2), 209-221.

44 CONTRERAS, A., HALE, T. K., STENOIEN, D. L., ROSEN, J. M., MANCINI, M. A., & HERRERA, R. E. (2003). The dynamic mobility of histone H1 is regulated by cyclin/CDK phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 23 (23), 8626-8636.

45 THIRIET, C., & HAYES, J. J. (2009). Linker histone phosphorylation regulates global timing of replication origin firing. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (5), 2823-2829.

46 CHIBAZAKURA, T., KAMACHI, K., OHARA, M., TANE, S., YOSHIKAWA, H., & ROBERTS, J. M. (2011). Cyclin A promotes S-phase entry via interaction with the replication licensing factor Mcm7. *Molecular and cellular biology*, 31 (2), 248-255.

47 KATSUNO, Y., SUZUKI, A., SUGIMURA, K., OKUMURA, K., ZINELDEEN, D. H., SHIMADA, M., ... & NAKANISHI, M. (2009). Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (9), 3184-3189.

48 GASSER, R., KOLLER, T., & SOGO, J. M. (1996). The stability of nucleosomes at the replication fork. *Journal of molecular biology*, 258 (2), 224-239.

49 GROTH, A. (2009). Replicating chromatin: a tale of histones. *Biochemistry and cell biology*, 87 (1), 51-63.

50 BRANZEI, D., & FOIANI, M. (2010). Maintaining genome stability at the replication fork. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11 (3), 208-219.

2.3.2. Reciclaje de las histonas

Fuertes evidencias sostienen un modelo en el que los tetrámeros parentales de H3-H4 se segregan aleatoriamente a las dos hebras hijas formando nucleosomas con nuevos o viejos dímeros de histonas H2A-H2B. Está poco claro si los dímeros de histonas H2A y H2B se reciclan eficientemente, debido a su naturaleza más dinámica. Sin embargo, la mayoría de los tetrámeros H3-H4 con histonas parentales tienden a permanecer en zonas próximas a su locus original⁵¹.

El cómo se transfieren las histonas antiguas a las nuevas hebras de ADN sigue siendo un misterio, pero parece ser que la helicasa MCM2-7 podría ser importante, ya que la histona H3 se une fuertemente y con gran afinidad al dominio amino terminal de MCM2⁵². Además, en humanos la chaperona de histonas ASF1 forma un complejo con MCM2-7 y una parte de ASF1 colocaliza con MCM2 en la cromatina⁵³. Esta interacción aparece favorecida por el dímero de H3-H4⁵⁴. La clave de la cuestión aquí es si MCM2-7 une dímeros o tetrámeros de H3-H4 liberados de los nucleosomas parentales y qué mecanismos aseguran la transferencia de estas histonas al nuevo ADN. Los complejos de histonas con ASF1 portan modificaciones típicas de nuevas histonas, aunque las marcas específicas de la cromatina que estarían presentes en las histonas parentales pueden detectarse en asociación con ASF1 cuando la replicación se perturba⁵⁵. Una posibilidad es que ASF1 se encargue de las histonas parentales en las horquillas activas, en cuyo caso H3-H4 serían transferidas como dímeros⁵⁶. La chaperona ASF1 está claramente ligada a la replicación del ADN, como resulta evidente de las observaciones realizadas en organismos con

51 RADMAN-LIVAJA, M., VERZIJLBERGEN, K. F., WEINER, A., VAN WELSEM, T., FRIEDMAN, N., RANDO, O. J., & VAN LEEUWEN, F. (2011). Patterns and mechanisms of ancestral histone protein inheritance in budding yeast. *PLoS Biol*, 9 (6), e1001075.

52 ISHIMI, Y., ICHINOSE, S., OMORI, A., SATO, K., & KIMURA, H. (1996). Binding of human minichromosome maintenance proteins with histone H3. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (39), 24115-24122.

53 JASENCAKOVA, Z., SCHARF, A. N., ASK, K., CORPET, A., IMHOF, A., ALMOUZNI, G., & GROTH, A. (2010). Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones. *Molecular cell*, 37 (5), 736-743.

54 GROTH, A., CORPET, A., COOK, A. J., ROCHE, D., BARTEK, J., LUKAS, J., & ALMOUZNI, G. (2007). Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science*, 318 (5858), 1928-1931.

55 JASENCAKOVA, Z., SCHARF, A. N., ASK, K., CORPET, A., IMHOF, A., ALMOUZNI, G., & GROTH, A. (2010). Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones. *Molecular cell*, 37 (5), 736-743.

56 ENGLISH, C. M., ADKINS, M. W., CARSON, J. J., CHURCHILL, M. E., & TYLER, J. K. (2006). Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell*, 127 (3), 495-508.

defectos en la fase S del ciclo celular que tenían una depleción de ASF1⁵⁷. La función de ASF1 durante la replicación del ADN, para evitar el silenciamiento de secuencias y facilitar el ensamblaje de la cromatina, parece ser independiente de CAF-1 (factor 1 de ensamblaje de la cromatina en humanos), una chaperona con una propiedad única, favorecer la deposición de las histonas H3-H4 sobre el ADN que se replica, una función evolutivamente muy conservada⁵⁸. El complejo CAF-1 comprende tres subunidades (p150, p60 y RbAp48, en mamíferos)⁵⁹. CAF-1 es dirigido hacia las horquillas de replicación a través de la interacción con PCNA,⁶⁰. Estas interacciones entre CAF-1 y PCNA, dependen de la fosforilación de la subunidad grande de CAF-1 (p150) por la kinasa replicativa Cdc7-Dbf4, en células humanas. Sin embargo, parece ser que la interacción de CAF-1 y ASF1 no es suficiente para promover una deposición de histonas⁶¹. La formación de un complejo ternario (CAF-1- ASF1- H3- H4) puede así actuar como un intermediario que transmita histonas de una chaperona a la siguiente. La transferencia de histonas desde ASF1 a CAF-1, es parte del proceso de ensamblaje que aseguraría una deposición eficiente de histonas en la replicación del ADN⁶².

Experimentos recientes han demostrado que durante el estrés replicativo ASF1 puede asociarse con histonas parentales, pudiendo tener un rol de aceptor de histonas. Para apoyar estos experimentos, los estudios estructurales sugieren que ASF1 se une al extremo carboxilo terminal de H4 y que esta captura de la hebra puede facilitar la división de tetrámeros en dímeros⁶³. Además, ASF1 suele tomar el control cuando se perturba la dinámica de las histonas durante el estancamiento de la horquilla.

57 FORMOSA, T. (2012). The role of FACT in making and breaking nucleosomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819 (3), 247-255.

58 LOYOLA, A., BONALDI, T., ROCHE, D., IMHOF, A., & ALMOUZZI, G. (2006). PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Molecular cell*, 24 (2), 309-316.

59 ENGLISH, C. M., ADKINS, M. W., CARSON, J. J., CHURCHILL, M. E., & TYLER, J. K. (2006). Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell*, 127 (3), 495-508.

60 MAGA, G., & HÜBSCHER, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of cell science*, 116 (15), 3051-3060.

61 MELLO, J. A., SILLJÉ, H. H., ROCHE, D. M., KIRSCHNER, D. B., NIGG, E. A., & ALMOUZZI, G. (2002). Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO reports*, 3 (4), 329-334.

62 KIM, J. A., & HABER, J. E. (2009). Chromatin assembly factors Asf1 and CAF-1 have overlapping roles in deactivating the DNA damage checkpoint when DNA repair is complete. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (4), 1151-1156.

63 GROTH, A., RAY-GALLET, D., QUIVY, J. P., LUKAS, J., BARTEK, J., & ALMOUZZI, G. (2005). Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress. *Molecular cell*, 17 (2), 301-311.

También la chaperona FACT (facilitador de la transcripción de la cromatina) une varios componentes del replisoma y viaja con la horquilla de replicación. FACT es indispensable para la replicación en algunos organismos. Esta chaperona interactúa con las histonas H2A-H2B y H3-H4 de muchas maneras, promoviendo tanto el ensamblaje como la disrupción del nucleosoma, pero sus funciones exactas no están claras todavía.

2.3.3. Provisión de nuevas histonas

Durante la duplicación de la cromatina se necesita un suministro eficiente de nuevas histonas a las regiones de síntesis del ADN. Para satisfacer tan alta demanda de histonas y, al mismo tiempo, evitar la acumulación potencial de histonas tóxicas libres, la producción de las histonas más importantes (H3.1, H3.2, H4, H2A, H2B y H1) en la fase S está minuciosamente regulada a nivel de estabilidad en la transcripción, traducción y estabilidad de ARNm⁶⁴. Poco después de su síntesis, las histonas H3.1 y H4 forman un dímero que se dirige rápidamente al núcleo y donde interactúa con el factor 1 de ensamblaje de cromatina (CAF1)⁶⁵. Esta vía de transporte conlleva una secuencia de chaperonas, entre las que se incluyen HSC70 Y HSP90 (proteínas de choque térmico que promueven un plegamiento y estructura de las proteínas, necesarias para el correcto desarrollo fisiológico de la célula)⁶⁶; NASP (proteína nuclear autoantigénica de esperma, requerida para la replicación del ADN, avance del ciclo y proliferación celular); o RBAP46 (proteína de unión al retinoblastoma, componente de diversos complejos que regulan el metabolismo de la cromatina)⁶⁷. NASP forma un complejo citoplasmático con HSP90 y estimula su actividad ATPasa, juntos transportan las histonas al núcleo de las células en división⁶⁸ y mantienen un grupo de histonas H3-H4 solubles, disponibles para su deposición.

Las modificaciones que las histonas adquieren antes de la deposición podrían facilitar determinados pasos específicos para el ensamblaje y/ o influenciar la

64 MARZLUFF, W. F., WAGNER, E. J., & DURONIO, R. J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly (A) tail. *Nature Reviews Genetics*, 9 (11), 843-854.

65 ANNUNZIATO, A. T. (2012). Assembling chromatin: the long and winding road. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819 (3), 196-210.

66 MORANO, K. A. (2007). New Tricks for an Old Dog. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113 (1), 1-14.

67 QIAN, Y. W., & EVA, Y. H. L. (1995). Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (43), 25507-25513.

68 KATO, D., OSAKABE, A., TACHIWANA, H., TANAKA, H., & KURUMIZAKA, H. (2015). Human tNASP promotes in vitro nucleosome assembly with histone H3. 3. *Biochemistry*, 54 (5), 1171-1179.

estructura de la cromatina tras su incorporación⁶⁹. La marca de pre-deposición más prominente y conservada evolutivamente es la diacetilación de la histona H4 en K5 y K12. Esta diacetilación se encuentra en el 95% de las histonas unidas a ASF1⁷⁰ y puede estimular la importación nuclear del complejo H3-H4-ASF1 por la importina 4⁷¹. Casi todos los organismos eucariotas la presentan. La histona acetiltransferasa (HAT) responsable de H4K5K12ac es HAT1, formando un complejo con el dímero H3-H4, CAF-1 y ASF1 antes de la deposición. Su función sigue siendo un enigma, aunque es probable que sea importante en el mantenimiento y propagación de la heterocromatina.

Otra marca de pre-deposición es la acetilación de la histona H3, aunque el residuo acetilado varía entre especies. En la levadura de gemación, *Saccharomyces cerevisiae*, se ha propuesto que la acetilación H3K56ac proporciona una accesibilidad superior al ADN nucleosomal y promueve un acceso al ADN dañado para facilitar la reparación del estancamiento de las horquillas de replicación y roturas en la doble hélice. Más aún, la acetilación de H3K56 aumenta la afinidad de CAF-1 por la histona H3 y promueve el ensamblaje de nucleosomas durante la fase S.

La nueva cromatina se encuentra, por tanto, altamente acetilada debido a la incorporación de nuevas histonas. Este estado altamente acetilado permite una mayor accesibilidad al ADN, a su reparación, activación de la transcripción y unión de factores de transcripción⁷². Sin embargo, las marcas de cromatina asociadas con las nuevas histonas H3 y H4 son transitorias y rápidamente eliminadas durante la maduración de la cromatina. La eliminación de H4k5 y la diacetilación de K12 es un proceso crítico para la asociación de HP1 y el mantenimiento de la heterocromatina silenciada⁷³ y fallos en la eliminación de estas marcas de acetilación, ponen en peligro el silenciamiento de la organización de la heterocromatina, conllevando

69 ALVAREZ, F., MUÑOZ, F., SCHILCHER, P., IMHOF, A., ALMOUZZI, G., & LOYOLA, A. (2011). Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (20), 17714-17721.

70 LOYOLA, A., BONALDI, T., ROCHE, D., IMHOF, A., & ALMOUZZI, G. (2006). PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Molecular cell*, 24 (2), 309-316.

71 CAMPOS, E. I., FILLINGHAM, J., LI, G., ZHENG, H., VOIGT, P., KUO, W. H. W., ... & REINBERG, D. (2010). The program for processing newly synthesized histones H3. 1 and H4. *Nature structural & molecular biology*, 17 (11), 1343-1351.

72 CHEN, E. S., ZHANG, K., NICOLAS, E., CAM, H. P., ZOFALL, M., & GREWAL, S. I. (2008). Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature*, 451 (7179), 734-737.

73 TADDEI, A., MAISON, C., ROCHE, D., & ALMOUZZI, G. (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nature cell biology*, 3 (2), 114-120.

la maduración de la cromatina es también importante para la estabilidad del genoma. La pérdida de los dos HDACs, Hst3 e Hst4, cuyo objetivo es eliminar la marca H3k56ac, produce daño en el ADN y sensibilidad al estrés replicativo⁷⁷. Por tanto, la maduración adecuada de la cromatina es esencial para la estabilidad del genoma.

Para completar la formación del nucleosoma, PCNA recluta a CAF1, promoviendo el primer paso de su ensamblaje⁷⁸, la deposición del dímero de histonas H3.1-H4 sobre el ADN⁷⁹. Las histonas H2A-H2B se asocian rápidamente para completar el nucleosoma favorecidas, probablemente, por las chaperonas FACT. En los minicromosomas del virus SV40 en replicación, los nucleosomas se encuentran a unos 225 y 285 nucleótidos de distancia tras la horquilla en la hebra líder y retardada, respectivamente⁸⁰. En la hebra líder, CAF1 puede enlazarse con PCNA y actuar simultáneamente con la Pol ϵ . Sin embargo, en la hebra retardada, la formación del nucleosoma debe estar coordinada con la maduración de los fragmentos de Okazaki por acción de FEN1 (Endonucleasa flap 1) y la ADN ligasa I⁸¹.

La maduración de la cromatina de nueva síntesis a una estructura que muestra una resistencia a nucleasas similar a la de la cromatina en interfase dura unos 20 minutos, aproximadamente⁸². La maduración no implica que los estados epigenéticos sean restaurados por completo en este periodo tan corto de tiempo. Sin embargo, la eliminación y adquisición de determinadas modificaciones post traduccionales en las histonas, como la metilación del ADN y la remodelación de nucleosomas ocurren en la cromatina naciente, y estos procesos son guiados a menudo a través de las interacciones con la maquinaria de replicación. La abrazadera PCNA recluta algunas actividades moduladoras de la cromatina y está en un lugar ideal para integrar el ensamblaje y la maduración de la cromatina con la replicación y reparación de la horquilla. Análisis de células vivas sugieren que las abrazaderas, una vez car-

77 CELIC, I., VERREAULT, A., & BOEKE, J. D. (2008). Histone H3 K56 hyperacetylation perturbs replisomes and causes DNA damage. *Genetics*, 179 (4), 1769-1784.

78 MOGGS, J. G., GRANDI, P., QUIVY, J. P., JÓNSSON, Z. O., HÜBSCHER, U., BECKER, P. B., & ALMOUZZI, G. (2000). A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 20 (4), 1206-1218.

79 TAGAMI, H., RAY-GALLET, D., ALMOUZZI, G., & NAKATANI, Y. (2004). Histone H3. 1 and H3. 3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, 116 (1), 51-61.

80 GASSER, R., KOLLER, T., & SOGO, J. M. (1996). The stability of nucleosomes at the replication fork. *Journal of molecular biology*, 258 (2), 224-239.

81 CHAFIN, D. R., VITOLO, J. M., HENRICKSEN, L. A., BAMBARA, R. A., & HAYES, J. J. (2000). Human DNA ligase I efficiently seals nicks in nucleosomes. *The EMBO journal*, 19 (20), 5492-5501.

82 ANNUNZIATO, A. T. (2012). Assembling chromatin: the long and winding road. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819 (3), 196-210.

gadas, son sorprendentemente estables y permanecen en el ADN replicado hasta unos 20 minutos⁸³.

Además de unir factores reguladores de la cromatina, PCNA contribuye a restaurar estados epigenéticos de la cromatina por otros mecanismos. Por ejemplo, se ha propuesto que la unión de PCNA potencia las concentraciones locales de DNMT1 (ADN metiltransferasa 1, una enzima que metila el carbono cinco de las citosinas) y facilita el reconocimiento rápido de las regiones hemimetiladas en la estructura abierta de la cromatina naciente⁸⁴.

La maduración de la cromatina también incluye la remodelación del nucleosoma. El factor de transcripción del Síndrome de Williams (WTSF-SNF2) es reclutado junto con SMARCAD1 por PCNA a la cromatina de nueva síntesis, pero parece ser que desempeñan funciones opuestas. El complejo WTSF-SNF2, que pertenece a la familia ISWI de enzimas remodeladoras, se localiza en sitios de replicación a lo largo de la fase S y parece que contrarresta la heterocromatinización⁸⁵. SMARCAD1, es un factor de remodelación que se requiere para restaurar el silenciamiento de la heterocromatina, probablemente facilitando la desacetilación de histonas y la metilación H3K9me3. Además, es parte de un gran complejo represor junto con HDAC1, HDAC2, la H3K9 metiltransferasa G9A y el factor de heterocromatina KAP1 y, por lo tanto, es muy adecuado para coordinar el espaciamiento del nucleosoma con la desacetilación y monometilación de H3K9⁸⁶.

3. DAÑOS EN LA REPLICACIÓN: ESTRÉS REPLICATIVO

Pese a que el estrés replicativo sea una amenaza sumamente reconocida para la estabilidad del genoma y la supervivencia de la célula, no existe una definición exacta o un conjunto de marcadores que caractericen inconfundiblemente este estado. De hecho, el que sea consecuencia de causas tan diversas y tenga tan amplia

83 SPORBERT, A., GAHL, A., ANKERHOLD, R., LEONHARDT, H., & CARDOSO, M. C. (2002). DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Molecular cell*, 10 (6), 1355-1365.

84 JONES, P. A., & LIANG, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics*, 10 (11), 805-811.

85 POOT, R. A., BOZHENOK, L., VAN DEN BERG, D. L., STEFFENSEN, S., FERREIRA, F., GRIMALDI, M., ... & VARGA-WEISZ, P. D. (2004). The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nature cell biology*, 6 (12), 1236-1244.

86 ROWBOTHAM, S. P., BARKI, L., NEVES-COSTA, A., SANTOS, F., DEAN, W., HAWKES, N., ... & GREEN, C. M. (2011). Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCAD1. *Molecular cell*, 42 (3), 285-296.

multitud de repercusiones en la célula contribuye a tal confusión. Es por esto que la definición de estrés replicativo evoluciona constantemente y es difícil de precisar: se entiende por estrés replicativo el enlentecimiento o estancamiento en el avance de la horquilla de replicación y/o en la síntesis de ADN.⁸⁷ Esto no se produce necesariamente por defectos en la replicación, como la pre-replicación o un número reducido de orígenes, ni por daños en la estructura física del material genético, como roturas en la doble hélice (DSBs). Puede generarse también por un amplio rango de obstáculos físicos y usualmente culmina con la formación de regiones de ADN de cadena sencilla (ssDNA), que se forman frecuentemente cuando la helicasa replicativa continúa separando el ADN parental después de que la horquilla se haya estancado.⁸⁸

3.1. FUENTES DE ESTRÉS REPLICATIVO

La replicación se basa en la síntesis y disponibilidad de ADN, junto con numerosos componentes de la cromatina, entre los que se incluyen: nucleótidos, histonas o chaperonas. Así como una maquinaria de replicación intacta. El suministro limitado de cualquiera de estos componentes puede ser fuente de estrés replicativo, aunque muchas veces la disponibilidad inadecuada de estos factores no tiene por qué ser la causa.⁸⁹ Por ejemplo, la rotura del enlace entre dos nucleótidos vecinos, la aparición de huecos en la secuencia y la existencia de regiones monocatenarias de ADN pueden ser tanto fuentes como síntomas de estrés replicativo. Las roturas de enlaces y presencia de huecos en las secuencias son, muchas veces, estados transitorios en algunas respuestas de reparación del daño causado en el ADN y también productos de manipulaciones comunes del mismo. Cuando se producen estos daños en el genoma de la célula, esta reacciona ralentizando la progresión por la fase S con el fin de disponer de más tiempo para reparar el daño antes de que llegue la horquilla⁹⁰, pues si estos huecos de cadena sencilla fuesen encontrados por la maquinaria de replicación podrían convertirse en roturas de la doble hélice, ya que las lesiones no reparadas del ADN son algunas de las causas más frecuentes de estrés replicativo. Dichas lesiones pueden actuar como barreras físicas que impiden

87 ZEMAN, M. K., & CIMPRICH, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology*, 16 (1), 2-9.

88 PACEK, M., & WALTER, J. C. (2004). A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication. *The EMBO journal*, 23 (18), 3667-3676.

89 AGUILERA, A., & GARCÍA-MUSE, T. (2013). Causes of genome instability. *Annual review of genetics*, 47, 1-32.

90 OSBORN, A. J., ELLEDGE, S. J., & ZOU, L. (2002). Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends in cell biology*, 12 (11), 509-516.

el avance de la horquilla de replicación o pueden ser solucionadas por vías de reparación especializadas, conocidas como vías de tolerancia al daño de ADN (DDT). Estas vías permiten a la célula sortear o tolerar la lesión en el ADN utilizando tanto polimerasas especializadas y cromátidas hermanas como moldes de la secuencia de nucleótidos y así poder rellenar el hueco⁹¹. DDT puede ocurrir también en la horquilla replicativa estancada, simplemente intercambiándola por otra o a través de la remodelación de la misma. Juntos, estos procesos favorecen que la replicación se lleve a cabo, evitando y previniendo que se prolongue el estancamiento de la horquilla.

Además, existe una amplia variedad de fuentes endógenas y exógenas de daño al ADN, entre las que se incluyen subproductos del metabolismo celular, luz ultravioleta y químicos mutágenos⁹². Evidencias recientes sugieren que en esta lista deberían incluirse las lesiones causadas por aldehídos reactivos, como los que se generan durante el metabolismo del alcohol⁹³ o la desmetilación de las histonas⁹⁴, pues agentes como el alcohol se asocian con cáncer y pueden dañar el ADN. Estudios recientes muestran que las lesiones inducidas por aldehídos metabólicos pueden ser la fuente endógena primaria de entrecruzamientos entre las hebras y, muy posiblemente, también de uniones entre las proteínas con el ADN.

La falta de ribonucleótidos también puede ser una causa de estrés replicativo, aunque las polimerasas replicativas son muy específicas en cuanto a lo que a aparear bases se refiere, tanto la Pol δ como la Pol ϵ son menos rigurosas discriminando desoxirribonucleótidos (dNTPs) de ribonucleótidos (rNTPs), por lo que los incorporan en tasas sorprendentemente altas⁹⁵. Los rNTPs que no se incorporan son reconocidos y eliminados a través de la vía de reparación de escisión de nucleótidos (RER), catalizada por una enzima especializada en el proceso, la RNasa H2, una enzima de vigilancia del genoma requerida para la eliminación de ribonucleótidos, junto con otras endonucleasas como Fen1 o Exo1. Existen dos tipos de ribonucleasas tipo H en eucariotas, la RNasa H2 es un complejo multimérico compues-

91 MAILAND, N., GIBBS-SEYMOUR, I., & BEKKER-JENSEN, S. (2013). Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14 (5), 269-282.

92 CICCIA, A., & ELLEDGE, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40 (2), 179-204.

93 BROOKS, P. J., & THERUVATHU, J. A. (2005). DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol*, 35 (3), 187-193.

94 SHI, Y., LAN, F., MATSON, C., MULLIGAN, P., WHETSTINE, J. R., COLE, P. A., ... & SHI, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119 (7), 941-953.

95 DALGAARD, J. Z. (2012). Causes and consequences of ribonucleotide incorporation into nuclear DNA. *Trends in Genetics*, 28 (12), 592-597.

to por 3 subunidades: RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, que digiere el ARN de cadena simple reconociendo al ribonucleótido en un dúplex de ADN y rompiendo el enlace 5'-fosfodiéster de dicho ribonucleótido. Pérdidas en la RNasa H2 resulta letal en mamíferos⁹⁶ y sensibiliza a los hongos a los factores dañinos del ADN, especialmente durante el incremento de tasas de incorporación de rNTPs, sugiriendo que la eliminación de los rNTPs es importante para la supervivencia de la célula⁹⁷. De hecho, un estudio realizado en 2012 concluyó que las lesiones de ribonucleótidos simples o dobles, covalentemente incorporados en el ADN genómico, a una frecuencia de aproximadamente 1.000.000 sitios por célula, la hacían ser la lesión endógena base más común en el genoma de mamíferos⁹⁸. La señalización de respuesta al daño en el ADN se activa quizás por la incorporación de ribonucleótidos en regiones difíciles de replicar o roturas en la doble hélice por la hidrólisis de rNTPs en cadenas de ADN opuestas. En resumen, puso de manifiesto el hecho de que los ribonucleótidos pueden ser altamente perjudiciales para las células de mamíferos, causando inestabilidad en el genoma.

Recientemente, se ha demostrado que las estructuras secundarias, más concretamente la de hélice cuádruple, conocida como G-cuadruplex, haciendo la G referencia a la guanina (por su tendencia a formarse en presencia de altas cantidades de esta base nitrogenada), son fuentes significativas de daño en el ADN⁹⁹. La estabilización química de estas estructuras o la pérdida de las helicasas que las relajan, puede conllevar una velocidad inferior en la replicación, aumento en la formación de DSBs y deleciones en los sitios en que se forman las estructuras de G-cuadruplex¹⁰⁰. El síndrome de Werner, por ejemplo, es causado por la mutación del gen WRN, que codifica para la helicasa RecQ, que es capaz de unirse a estructuras G-cuadruplex¹⁰¹. Las evidencias obtenidas sugieren que la proteína alterada no es transportada al interior

96 REIJNS, M. A., RABE, B., RIGBY, R. E., MILL, P., ASTELL, K. R., LETTICE, L. A., ... & DEVENEY, P. S. (2012). Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development. *Cell*, 149 (5), 1008-1022.

97 LAZZARO, F., NOVARINA, D., AMARA, F., WATT, D. L., STONE, J. E., COSTANZO, V., ... & MUZI-FALCONI, M. (2012). RNase H and postreplication repair protect cells from ribonucleotides incorporated in DNA. *Molecular cell*, 45 (1), 99-110.

98 NAKANISHI, N., FUKUOH, A., KANG, D., IWAI, S., & KURAOKA, I. (2012). Effects of DNA lesions on the transcription reaction of mitochondrial RNA polymerase: implications for bypass RNA synthesis on oxidative DNA lesions. *Mutagenesis*, ges060.

99 BOCHMAN, M. L., PAESCHKE, K., & ZAKIAN, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics*, 13 (11), 770-780.

100 PAESCHKE, K., BOCHMAN, M. L., GARCIA, P. D., CEJKA, P., FRIEDMAN, K. L., KOWALCZYKOWSKI, S. C., & ZAKIAN, V. A. (2013). Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. *Nature*, 497 (7450), 458-462.

101 BOCHMAN, M. L., PAESCHKE, K., & ZAKIAN, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics*, 13 (11), 770-780.

del núcleo celular, donde normalmente interacciona con el ADN. Sin la presencia de esta proteína en el núcleo, las células no pueden llevar a cabo correctamente los procesos de replicación, reparación y transcripción del material genético contribuyendo así al incremento estrés replicativo en el organismo¹⁰².

Como la replicación y la transcripción son procesos que operan ambos sobre el ADN, es inevitable que los dos procesos interfieran entre sí, y las colisiones entre los complejos de replicación y transcripción también son fuente de estrés replicativo. Hay regiones genómicas propensas a formar DSBs y se denominan sitios frágiles de replicación temprana y se encuentran en regiones altamente transcritas y prontamente replicadas de la fase S de las células de mamíferos¹⁰³.

El procesamiento de los componentes de ARN también es importante para prevenir el daño en el ADN o sus mutaciones, aunque en muchos casos su función sigue siendo una incógnita¹⁰⁴. Se ha demostrado que pérdidas o disminuciones en los componentes de ARN puede retrasar la tasa de transcripción o impedir la disociación de los complejos de transcripción del ADN, promoviendo indirectamente las colisiones con la maquinaria de replicación e incrementando el estrés topológico, es decir, el que se produce cuando existen fallos en el superenrollamiento, anudamiento y encadenamiento del ADN, pues durante la replicación y transcripción el material genético debe estar totalmente desenrollado. Sin embargo, existen diversos mecanismos para prevenir el estrés topológico generado y la colisión de las maquinarias de replicación y transcripción. Por ejemplo, las helicasas y topoisomerasas contribuyen a solucionar estos problemas ocasionados por convergencia de estos complejos, evitando la formación de híbridos ARN-ADN conocidos como *R loops*¹⁰⁵. Perturbaciones en cualquiera de estos procesos incrementarán la colisión entre los mecanismos de replicación y transcripción o incrementarán la formación de *R loops*, favoreciendo el daño en el material genético¹⁰⁶.

102 JACKSON, D. A., NEHLIN, J. O., IBORRA, F., WARREN, A. V., & COX, L. S. (2003). Characterisation of the interaction between WRN, the helicase/exonuclease defective in progeroid Werner's syndrome, and an essential replication factor, PCNA. *Mechanisms of ageing and development*, 124 (2), 167-174.

103 HELMRICH, A., BALLARINO, M., NUDLER, E., & TORA, L. (2013). Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nature structural & molecular biology*, 20 (4), 412-418.

104 STIRLING, P. C., CHAN, Y. A., MINAKER, S. W., ARISTIZABAL, M. J., BARRETT, I., SIPAHIMALANI, P., ... & HIETER, P. (2012). R-loop-mediated genome instability in mRNA cleavage and polyadenylation mutants. *Genes & development*, 26 (2), 163-175.

105 TUDURI, S., CRABBÉ, L., CONTI, C., TOURRIÈRE, H., HOLTGREVE-GREZ, H., JAUCH, A., ... & POMMIER, Y. (2009). Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nature cell biology*, 11 (11), 1315-1324.

106 AGUILERA, A., & GARCÍA-MUSE, T. (2012). R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Molecular cell*, 46 (2), 115-124.

Además de las zonas frágiles de replicación temprana mencionadas anteriormente existen otras regiones en el genoma propensas también al estrés replicativo causando DSBs¹⁰⁷. Estas regiones, llamadas sitios frágiles comunes son secuencias sensibles al estrés replicativo incluso a niveles leves. Se encuentran frecuentemente en algunos orígenes de replicación activos, haciendo estas regiones particularmente susceptibles al estancamiento de la horquilla.

La sobreexpresión o activación constitutiva de oncogenes como HRAS, MYC y la ciclina E es también una fuente emergente de estrés replicativo, aunque esto todavía no está muy estudiado¹⁰⁸. Estos tres oncogenes promueven el incremento de la iniciación de la replicación o la activación de orígenes, condición que puede llevar a depleciones de nucleótidos o a incrementar la colisión con los complejos de transcripción. Esto puede explicar por qué el tratamiento de células cancerígenas con nucleótidos exógenos ayuda a reducir la inestabilidad genómica¹⁰⁹. Curio-

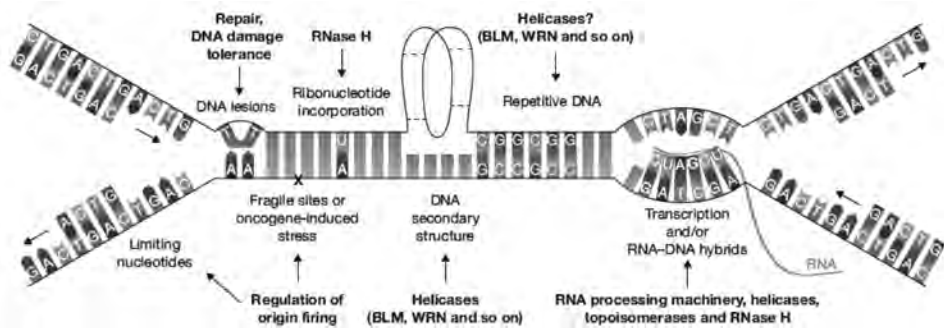


Imagen 6. Fuentes de estrés replicativo. Número de condiciones u obstáculos que pueden ralentizar o estancar la replicación, entre los que se incluyen: ausencia de nucleótidos, lesiones en el ADN, incorporación de ribonucleótidos, elementos repetitivos en el ADN, complejos de transcripción y/o híbridos de ARN-ADN, estructuras secundarias del ADN, sitios frágiles y oncogenes que inducen la aparición del estrés.

Fuente: Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology*, 16(1), 2-9.

107 FRANCHITTO, A. (2013). Genome instability at common fragile sites: searching for the cause of their instability. *BioMed research international*, 2013. FRANCHITTO, A. (2013). Genome instability at common fragile sites: searching for the cause of their instability. *BioMed research international*, 2013.

108 SRINIVASAN, S. V., DOMINGUEZ-SOLA, D., WANG, L. C., HYRIEN, O., & GAUTIER, J. (2013). Cdc45 is a critical effector of myc-dependent DNA replication stress. *Cell reports*, 3 (5), 1629-1639.

109 BURRELL, R. A., MCCLELLAND, S. E., ENDEFELDER, D., GROTH, P., WELLER, M. C., SHAIKH, N., ... & CHEW, S. K. (2013). Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature*, 494 (7438), 492-496.

samente, una sobreexpresión de ciclina E produce una reversión de la horquilla, lo que puede ser resultado de un estrés topológico aumentado, inducido por un exceso de orígenes de replicación activados.

Finalmente, otra causa de estrés replicativo son secuencias desafiantes de ADN para la maquinaria de replicación. Por ejemplo, las repeticiones de trinucleótidos pueden formar estructuras secundarias de ADN que bloquean la progresión o deslizamiento de la horquilla de replicación. Esto conduce a una expansión o contracción de la secuencia repetida y la consecuente disfunción del gen. Sin embargo, la respuesta al estrés replicativo contribuye a la estabilidad y correcto mantenimiento de estas repeticiones.

3.2. MECANISMOS DE RESPUESTA FRENTE AL ESTRÉS REPLICATIVO

La respuesta al estrés replicativo es un término amplio que abarca toda la señalización iniciada por lesiones en el ADN y horquillas de replicación dañadas, pues se extiende para organizar la reparación del material genético, los puntos de control del ciclo celular, la muerte celular y la senescencia¹¹⁰.

Para asegurar la fidelidad de la replicación y mantener la integridad del genoma, las células activan las vías de respuesta al estrés replicativo cuando la replicación se perturba¹¹¹, estas vías de respuesta son cascadas de señalización que se han mantenido a lo largo de la evolución. En situaciones de estrés, activan mecanismos de vigilancia o *checkpoints* que se encargan de resolver el problema y solucionar el estancamiento de las horquillas de replicación. La presencia de fragmentos de ssDNA, que surgen cuando las helicasas replicativas siguen disociando la doble hélice una vez que la polimerasa se ha estancado, asociado a la proteína de replicación A (RPA), la cual tiene gran afinidad por estos fragmentos, desencadena el reclutamiento de la proteína quinasa ATR (de *ATM and Rad3 related*)¹¹², conservada en todos los organismos eucariotas. ATR, es activada en presencia de ADNss por RPA. Por un lado, RPA recluta al complejo ATRIP¹¹³, que es el complejo sobre el cual se une la quinasa a la lesión del ADN y, por otro lado, a Rad17 que carga a

110 BAKKENIST, C. J., & KASTAN, M. B. (2015). Chromatin perturbations during the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA repair*, 36, 8-12.

111 MYUNG, K. *et al.* (2001) Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 397-408

112 LAMBERT, S., & CARR, A. M. (2013). Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. *Chromosoma*, 122(1-2), 33-45.

113 CORTEZ, D., GUNTUKU, S., QIN, J., & ELLEDGE, S. J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, 294 (5547), 1713-1716.

Rad9–Hus1–Rad1, más conocido como complejo (9-1-1), esencial para reclutar y posicionar el activador alostérico TopBP1, que activa a ATR¹¹⁴.

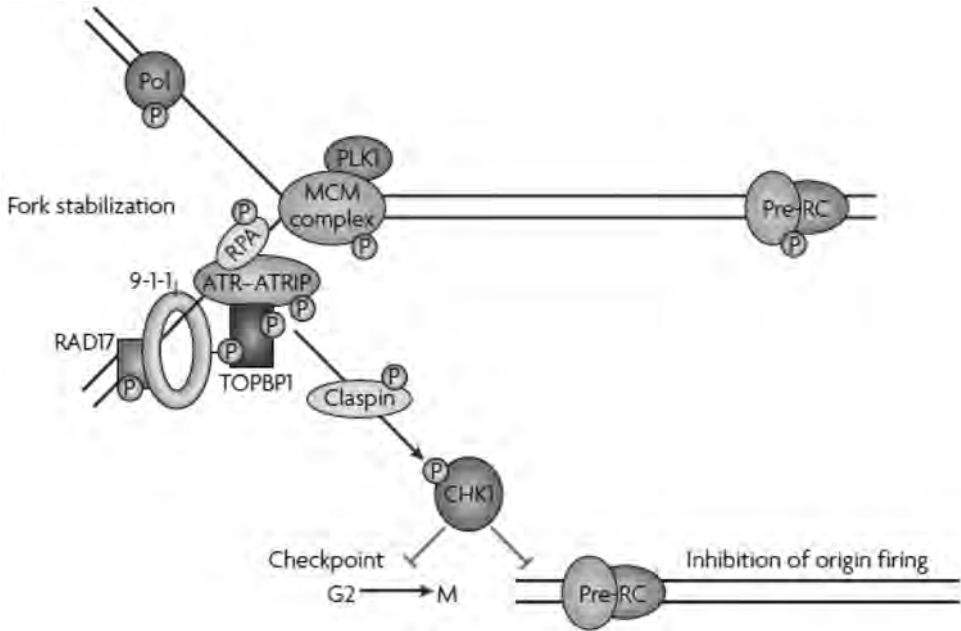


Imagen 7. La fosforilación de ATR a numerosos sustratos regula la replicación y transición del ciclo celular. El mayor sustrato de ATM y ATR es la kinasa de regulación CHK1. Su fosforilación la libera de la cromatina y deja libre, incrementando su actividad kinasa. CHK1 tiene numerosos sustratos, algunos de los cuales regulan las transiciones del ciclo celular y la activación de los orígenes de replicación. Muchos sustratos de ATR, incluyendo MCM2 (proteína 2 del mantenimiento del minicromosoma), MCM3, RPA, RAD9 (subunidad del complejo 9-1-1), TOPBP1 (proteína de unión a la topoisomerasa) y Rad17 se encuentran en la horquilla de replicación. En la mayoría de los casos las consecuencias de la fosforilación son todavía desconocidas, pero se sabe que probablemente contribuyan a la estabilización de la horquilla. Además, la fosforilación de MCM2, regula la unión de PLK1 que promueve la finalización de la replicación del ADN en los alrededores de la horquilla estancada.

Fuente: Cimprich, K. A., & Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(8), 616-627.

114 MAJKA, J., NIEDZIELA-MAJKA, A., & BURGERS, P. M. (2006). The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Molecular cell*, 24 (6), 891-901.

ATR responde frente a agentes que interfieran en el correcto funcionamiento de las horquillas de replicación, como hidroxiaurea, radiación UV y agentes alquilantes del ADN. En estas condiciones, la activación de ATR da lugar a la inhibición del avance del ciclo celular y a la supresión de la activación de orígenes de replicación tardíos. Estos eventos proporcionan más tiempo para la reparación y permiten a la célula disponer de un tiempo adicional para completar la síntesis de ADN tras solucionar el bloqueo de la replicación. Además, ATR ayuda a estabilizar y reiniciar la replicación a partir de la horquilla parada y suprimir la recombinación, previniendo el colapso descontrolado de la horquilla. Sin embargo, el mecanismo que gobierna la estabilidad de la horquilla no está del todo claro, aunque tras la activación de ATR, un factor clave es la fosforilación y activación de la proteína quinasa CHK1 (Checkpoint kinase 1).

Se ha demostrado, recientemente, que ATR protege localmente las horquillas de replicación y suprime, de manera global, la activación de los orígenes. Cuando ATR es activado por ADNss generado ante la horquilla de replicación estancada, CHK1 se difunde globalmente por el núcleo, donde inhibe la activación de nuevos orígenes. Con esto se asegura la célula que haya RPA en exceso sobre el ADNss al limitar el número de horquillas estancadas al que hubo al comienzo del estrés replicativo. Si la señalización de ATR falla, los orígenes durmientes se activan y los nuevos ADNss generados progresivamente agotan RPA en el núcleo. Cuando esto sucede, cada replicón activo genera ADNss, que se convierte rápidamente en DSBs¹¹⁵. Además, se ha descubierto que en las células humanas la activación de la vía ATR/CHK1 estabiliza el complejo Cdc7-ASK quinasa de unión a la cromatina, homólogo humano de Cdc7- Dbf4, necesario para el comienzo adecuado de la replicación y activación del origen.

3.3. PAPEL DE LA CROMATINA EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS REPLICATIVO

Evidentemente, al ocurrir el progreso de la horquilla y la resolución de su enlentecimiento, colapso o estancamiento en un ambiente altamente organizado de cromatina, el papel que jugará esta última será esencial en la respuesta al estrés replicativo. Por eso, es interesante tener en consideración cómo el progreso y estancamiento de la horquilla se ve influido por el ambiente cromatínico pre-existente, y cómo el estrés inducido por alteraciones en la integridad epigenética de la cromatina puede afectar a la reparación de horquillas estancadas o colapsadas.

115 McINTOSH, D., & BLOW, J. J. (2012). Dormant origins, the licensing checkpoint, and the response to replicative stresses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4 (10), a012955.

En primer lugar, la accesibilidad de la cromatina es un regulador importante de los tiempos de replicación. Las regiones heterocromáticas, menos accesibles, enriquecidas por marcas silenciadoras como H3K9 (H3K9me3), tardan más en replicar su información genética que las que se encuentran más accesibles, en las regiones eucromáticas transcripcionalmente activas¹¹⁶. Por eso, un aumento de la desmetilación de H3K9me3 por sobreexpresión de la KDM4A/JMJD2A desmetilasa promueve la accesibilidad de la cromatina y acelera el ciclo celular. Variaciones en la velocidad del ciclo por acción de KDM4A tienen multitud de consecuencias funcionales, entre las que destaca la ralentización de la replicación debida a una depleción de dicha desmetilasa, pues conlleva la aparición de estrés replicativo por un aumento en el daño del ADN y apoptosis por ATR/P53¹¹⁷. Por otro lado, una sobreexpresión de KDM4A origina una serie de ganancias debido a la re-replicación¹¹⁸. Los defectos que se puedan causar en la fase S por causa de KDM4A pueden solucionarse con la sobreexpresión de la H3K9 metiltransferasa Suv39H1. Juntos, la regulación de KDM4A y la metilación en H3K9 juegan un papel importante a la hora de prevenir el estrés replicativo.

La monoubiquitinación de H2B es otra modificación que causa estrés replicativo cuando se perturba. En hongos la monoubiquitinación de la lisina 123 de la histona H2B (H2Bub) facilita el ensamblaje y estabilización de los nuevos nucleosomas sintetizados. Por tanto, pérdidas de H2Bub ralentizan el progreso de la horquilla de replicación, sin afectar al ensamblaje del complejo pre-replicativo¹¹⁹. Como resultado de esto, células con mutaciones en H2B-K123 son hipersensibles al estrés replicativo provocado por la hidroxiurea (HU), un inhibidor de la síntesis de dNTP¹²⁰, y enlentece la recuperación de la replicación del ADN tras la eliminación del bloqueo producido por la HU. En concordancia, la depleción del ortólogo en mamíferos RNF20/40, causa a su vez estrés replicativo e inestabilidad genómica.

116 MÉCHALI, M., YOSHIDA, K., COULOMBE, P., & PASERO, P. (2013). Genetic and epigenetic determinants of DNA replication origins, position and activation. *Current opinion in genetics & development*, 23 (2), 124-131.

117 BLACK, J. C., ALLEN, A., VAN RECHEM, C., FORBES, E., LONGWORTH, M., TSCHÖP, K., ... & DYSON, N. J. (2010). Conserved antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1 γ during cell cycle progression. *Molecular cell*, 40 (5), 736-748.

118 BLACK, J. C., MANNING, A. L., VAN RECHEM, C., KIM, J., LADD, B., CHO, J., ... & LEWIS, P. W. (2013). KDM4A lysine demethylase induces site-specific copy gain and rereplication of regions amplified in tumors. *Cell*, 154 (3), 541-555.

119 TRUJILLO, K. M., & OSLEY, M. A. (2012). A role for H2B ubiquitylation in DNA replication. *Molecular cell*, 48 (5), 734-746.

120 ALVINO, G. M., COLLINGWOOD, D., MURPHY, J. M., DELROW, J., BREWER, B. J., & RAGHURAMAN, M. K. (2007). Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Molecular and cellular biology*, 27 (18), 6396-6406.

Además del impacto de la naturaleza de la cromatina pre-existente en el estrés replicativo, también la aparición de este está asociado a las modificaciones o la reorganización de la misma. Uno de los primeros cambios en la respuesta a estrés replicativo en la cromatina es la fosforilación de la serina 139 de la histona H2AX por parte de ATR. Esta modificación se encuentra abundantemente en sitios en los que la horquilla de replicación se ha estancado (en fase S), predominando en el ADN ribosomal, genes de ARNt y telómeros¹²¹. La ausencia de ATR conlleva la no fosforilación de H2AX y la consecuente inestabilidad genómica bajo estrés replicativo. No obstante, la fosforilación de H2AX no es específica del estrés replicativo, sino que también ocurre en respuesta al daño en el ADN, pudiendo ser generada por varias kinasas, no sólo ATR.

En adición a las modificaciones de histonas, la remodelación de la cromatina y el cambio en las variantes de las histonas se ha asociado con la respuesta al estrés replicativo tanto en células de hongos como mamíferos. Depleciones del remodelador cromatínico, la helicasa INO80 conlleva desestabilización y colapso de las horquillas y reduce la viabilidad de la célula en hongos¹²². De manera interesante, defectos en INO80 en células de mamíferos incrementan la sensibilidad a HU, sugiriendo una función conservada para esta enzima durante el estrés replicativo¹²³. Entre otras funciones de INO80 destaca la eliminación de la histona deslocalizada H2A.Z. Por tanto, si hubiese defectos en este complejo remodelador aumentarían los niveles de H2A.Z con sus consecuentes inconvenientes, ya que, entre otras cosas, altas concentraciones de H2A.Z se asocian con un colapso de las horquillas de replicación.

4. INESTABILIDAD EPIGENÓMICA, CÁNCER Y SENESCENCIA CELULAR

El colapso de las horquillas por alteraciones en la replicación causa daños en el ADN, mutaciones y, finalmente, enfermedades. Son daños genéticos porque alteran la secuencia de nucleótidos y, en consecuencia, el estado de la célula. La

121 SZILARD, R. K., JACQUES, P. É., LARAMÉE, L., CHENG, B., GALICIA, S., BATAILLE, A. R., ... & DUROCHER, D. (2010). Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of [gamma]-H2AX. *Nature structural & molecular biology*, 17(3), 299-305.

122 SHIMADA, K., OMA, Y., SCHLEKER, T., KUGOU, K., OHTA, K., HARATA, M., & GASSER, S. M. (2008). Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Current Biology*, 18 (8), 566-575.

123 VASSILEVA, I., YANAKIEVA, I., PEYCHEVA, M., GOSPODINOV, A., & ANACHKOVA, B. (2014). The mammalian INO80 chromatin remodeling complex is required for replication stress recovery. *Nucleic acids research*, 42 (14), 9074-9086.

acumulación de mutaciones en los genes regulatorios claves, puede inactivar a los genes supresores de tumores o activar protooncogenes generando una proliferación irregular en los tejidos que conduce a enfermedades como el cáncer¹²⁴.

El inicio y progresión del cáncer normalmente ha sido visto como una enfermedad genética, sin embargo ahora sabemos que es un proceso multifactorial complejo que encierra en su seno también alteraciones epigenéticas¹²⁵. La epigenética se refiere a los cambios heredables en el ADN y las histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos pero que modifican la estructura y función de la cromatina, por lo que afectan a la expresión génica y al fenotipo¹²⁶. La gran mayoría de estos cambios heredables, conocidos como epigenoma, se generan durante la diferenciación y se mantienen, de manera estable, a lo largo de múltiples ciclos celulares, permitiendo a las células tener identidades diferentes aun teniendo la misma información genética¹²⁷. El epigenoma, por tanto, proporciona un mecanismo de diversidad celular regulando qué información génica puede ser accesible o no a la maquinaria de transcripción. Fallos en el mantenimiento adecuado de estas marcas epigenéticas que pueden heredar las células hijas conlleva la activación o inhibición de varias vías de señalización que terminan condenando al organismo a un estado de enfermedad¹²⁸. De hecho, se ha demostrado recientemente que las células cancerígenas humanas contienen numerosas anomalías epigenéticas que interactúan de manera conjunta con alteraciones genéticas, contribuyendo, por igual, al progreso y expansión del cáncer en el organismo¹²⁹. Tanto los fallos en el mantenimiento de la cromatina como el estrés replicativo pueden dar lugar a inestabilidad epigenética, y son, por tanto, dos factores fundamentales en el envejecimiento y el cáncer.

4.1. FALLOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA CROMATINA PRODUCEN ENFERMEDADES

Existen defectos en la heterocromatina que pueden desencadenar fallos en la célula, como inestabilidad genómica y carcinogénesis. Esto se aprecia en pacientes

124 BARTEK, J., MISTRİK, M., & BARTKOVA, J. (2012). Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment. *Nature structural & molecular biology*, 19 (1), 5-7.

125 KOTURBASH, I., BELAND, F. A., & POGRIBNY, I. P. (2011). Role of epigenetic events in chemical carcinogenesis—a justification for incorporating epigenetic evaluations in cancer risk assessment. *Toxicology mechanisms and methods*, 21 (4), 289-297.

126 HASSLER, M. R., & EGGER, G. (2012). Epigenomics of cancer—emerging new concepts. *Biochimie*, 94 (11), 2219-2230.

127 EGGER, G., LIANG, G., APARICIO, A., & JONES, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429 (6990), 457-463.

128 JONES, P. A., & BAYLIN, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128 (4), 683-692.

con síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales) por alteraciones en DNMT1¹³⁰, ya que la metilación del carbono 5 de las citosinas en las islas CpG es el único factor epigenético que modifica directamente el ADN en mamíferos y conlleva silenciamiento génico¹³¹. La hipometilación, es decir, tasas bajas de la misma, es una característica muy frecuente en el cáncer, minuciosos análisis genómicos han demostrado la existencia de grandes bloques de hipometilación en el genoma de personas con cáncer de colon¹³². Los cambios que se observaron en la cromatina fueron pérdida de H4K16ac y H4K20me3 en regiones repetidas y reducción de los dominios H3K9me2¹³³. Todo esto conducía a la inestabilidad del genoma, alteraba los mecanismos de control de la replicación, la estructura de la cromatina y potenciaba la inestabilidad cromosómica. Además, mutaciones en el gen que regula a ASF1 se asocian con un tipo de anemia que conlleva anomalías peligrosas en la cromatina y defectos en la replicación. Por si fuera poco, estos defectos en el ensamblaje de la cromatina acarrearán senescencia celular y daño acumulativo en el ADN¹³⁴.



Imagen 8. Causas de daños por día en una célula de mamífero en división.

Datos tomados por el autor de: Preston, B. D., Albertson, T. M., & Herr, A. J. (2010, October). DNA replication fidelity and cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 20, No. 5, pp. 281-293). Academic Press.

129 YOU, J. S., & JONES, P. A. (2012). Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer cell*, 22(1), 9-20.

130 GAUDET, F., HODGSON, J. G., EDEN, A., JACKSON-GRUSBY, L., DAUSMAN, J., GRAY, J. W., ... & JAENISCH, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 300 (5618), 489-492.

131 WALDMANN, T., & SCHNEIDER, R. (2013). Targeting histone modifications—Epigenetics in cancer. *Current opinion in cell biology*, 25 (2), 184-189.

132 BOLAND, C. R., & GOEL, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138 (6), 2073-2087.

133 WEN, B., WU, H., SHINKAI, Y., IRIZARRY, R. A., & FEINBERG, A. P. (2009). Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nature genetics*, 41 (2), 246-250.

134 O'SULLIVAN, R. J., KUBICEK, S., SCHREIBER, S. L., & KARLSEDER, J. (2010). Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nature structural & molecular biology*, 17 (10), 1218-1225.

4.2. ESTRÉS REPLICATIVO, INESTABILIDAD EPIGENÉTICA Y SENESCENCIA

Cuando las células experimentan continuamente estrés replicativo sufren una serie de alteraciones que, pese a que evolutivamente han desarrollado un mecanismo sofisticado de respuesta para asegurar el progreso de la horquilla y la replicación adecuada del ADN en el genoma, pueden terminar haciendo mella en la célula. Y es que, una vez que la polimerasa se estanca, el ambiente cromatínico se ve expuesto a numerosos cambios epigenéticos como el deterioro progresivo del reciclaje de histonas parentales tras la horquilla estancada¹³⁵, que conduce potencialmente a una pérdida o ganancia indeseada de información epigenética¹³⁶. Además, el estrés replicativo puede alterar las modificaciones en las histonas y el ADN¹³⁷ y, finalmente, el colapso de la horquilla puede conducir a una reorganización alterada de la cromatina¹³⁸.

Estas alteraciones epigenéticas terminan afectando a la célula conduciéndola a la senescencia. La senescencia es un estado de la célula iniciado como respuesta frente al estrés replicativo, que constituye una ruta de respuesta alternativa a la apoptosis¹³⁹. Este mecanismo supresor de tumores necesita ser efectivo durante un corto periodo de tiempo, las primeras décadas en humanos y meses en ratones, pues si se mantiene en el tiempo los mecanismos fisiopatológicos de respuesta al daño se vuelven armas de doble filo con efectos nocivos para el organismo¹⁴⁰. Por tanto, estos mecanismos son tanto favorables como desfavorables al organismo dependiendo de su edad. Se ha demostrado recientemente que la senescencia es un potente agente supresor de tumores que a la larga conduce al envejecimiento¹⁴¹. Las características de las células senescentes son:

- **Parada del crecimiento:** Metabólicamente activas, pero incapaces de avanzar en el ciclo celular.

135 JASENCAKOVA, Z., SCHARF, A. N., ASK, K., CORPET, A., IMHOF, A., ALMOUZZI, G., & GROTH, A. (2010). Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones. *Molecular cell*, 37 (5), 736-743.

136 SARKIES, P., REAMS, C., SIMPSON, L. J., & SALE, J. E. (2010). Epigenetic instability due to defective replication of structured DNA. *Molecular cell*, 40 (5), 703-713.

137 NYCE, J., LIU, L., & JONES, P. A. (1986). Variable effects of DNA-synthesis inhibitors upon DNA methylation in mammalian cells. *Nucleic acids research*, 14 (10), 4353-4367.

138 ZARATIEGUI, M., CASTEL, S. E., IRVINE, D. V., KLOC, A., REN, J., LI, F., ... & CANDE, W. Z. (2011). RNAi promotes heterochromatic silencing through replication-coupled release of RNA Pol II. *Nature*, 479 (7371), 135-138.

139 CAMPISI, J., & DI FAGAGNA, F. D. A. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8 (9), 729-740.

140 CAMPISI, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nature Reviews Cancer*, 3 (5), 339-349.

141 KIRKWOOD, T. B., & AUSTAD, S. N. (2000). Why do we age? *Nature*, 408 (6809), 233-238.

- **Resistencia a la apoptosis:** La senescencia previene la proliferación y el crecimiento de células dañadas, que si las hubiere serían eliminadas por este mecanismo.
- **Alteración de la expresión génica:** Fundamentalmente de inhibidores de CDKs y de genes supresores de tumores, como P53.

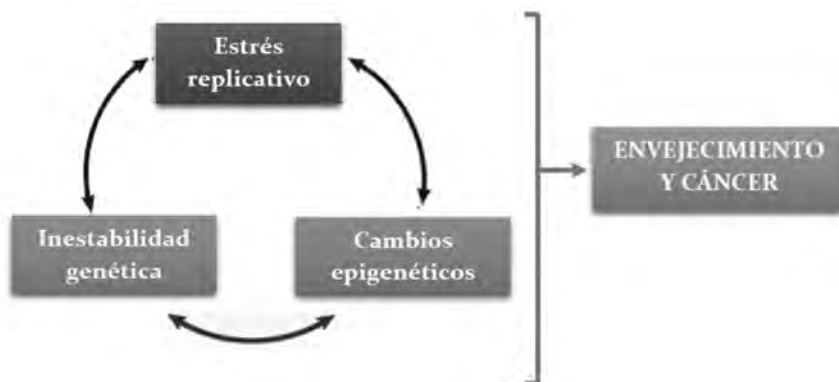


Imagen 9. Ciclo de relación del estrés replicativo, la inestabilidad del (epi)genoma, el envejecimiento y el cáncer. Las nuevas evidencias sugieren que el estrés replicativo es la mayor fuente de inestabilidad genética en cáncer y, además, altera el epigenoma generando aberraciones en la cromatina que pueden ser transmitidas a las células hijas y afectar a la expresión génica. Estas alteraciones genéticas y epigenéticas se potencian entre ellas alterando el ambiente de la cromatina.

5. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La replicación es una etapa crucial en la vida de la célula, pues en ella el ADN se ve expuesto más que nunca a multitud de agentes dañinos y así también su organización en cromatina. En función de los datos aportados en los apartados anteriores se concluye que el papel que juega la estructura de la cromatina a la hora de mantener la integridad del genoma es esencial para el correcto desarrollo y funcionamiento de la célula, pues alteraciones en su organización o en marcas epigenéticas tienen un gran impacto en la replicación y la expresión génica se desequilibra, es decir, terminan produciéndose enfermedades en el organismo. Es por esto que entender los mecanismos que aseguran la estabilidad y el mantenimiento de la estructura de la cromatina es necesario para entender cómo la célula, a través de ellos, mantiene la integridad del genoma.

La secuenciación completa del exoma de varios tipos de cáncer ha dado como resultado el inesperado descubrimiento de muchas mutaciones, que inactivan a los genes que controlan el epigenoma. Estas mutaciones tienen la capacidad de alterar los patrones de metilación del ADN, modificar las histonas, reubicar a los nucleosomas. La alteración del epigenoma contribuye al cáncer al igual que el proceso epigenético puede causar mutaciones puntuales y desactivar los mecanismos de reparación del ADN. Esta interferencia entre el genoma y el epigenoma abre nuevas posibilidades para la terapia contra el cáncer y para la medicina epigenética, que en un futuro será, muy probablemente, de una enorme relevancia.