

Mutaciones espontáneas

Errores de replicación:

Debidos a las formas tautoméricas:

Watson y Crick, al mismo tiempo que establecieron la estructura del ADN predijeron la posibilidad del cambio de pares de bases A·T C·G durante la replicación como un fenómeno natural, proceso que según se ha llegado a conocer después puede deberse a que en realidad cada una de las bases de ADN puede existir en la naturaleza en dos formas tautoméricas alternativas.

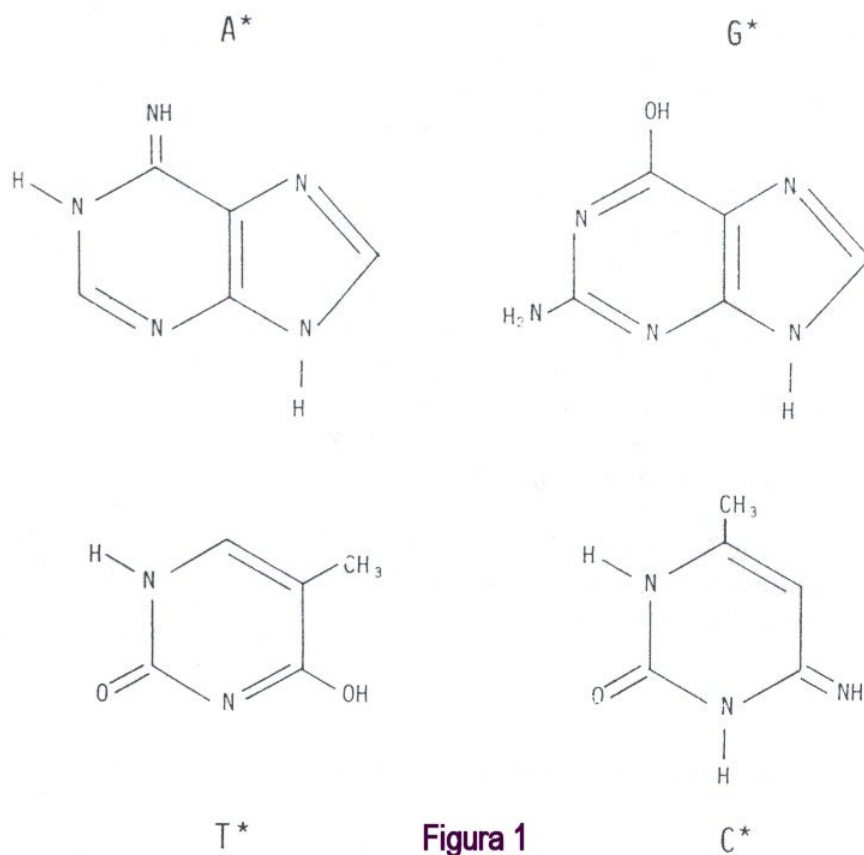


Figura 1

Si representamos con un signo * cada una de las bases tautoméricas de las formas normales, las posibilidades alternativas son las representadas en la **figura 1**.

Las formas tautoméricas se encuentran en equilibrio en la naturaleza, desplazando más frecuentemente hacia la forma normal. Las diferencias químicas entre dos formas tautoméricas consisten en el desplazamiento de átomos de hidrógeno que emigran hacia posiciones más inestables, tal como se refleja en la **figura 1**. La forma **ceto** de cada base es la que se encuentra normalmente en el DNA, mientras que las formas **imino** o **enol** son menos frecuentes.

Las formas tautoméricas inestables tienen específicamente alteradas las propiedades de complementariedad de bases de la siguiente forma:

Forma Tautomérica	Adquiere propiedades de	Aparea con
-------------------	-------------------------	------------

A*	G	C
G*	A	T
C*	T	A
T*	C	G

La **figura 2** presenta estos emparejamientos erróneos causados por el cambio a la forma tautomérica.

Si en el momento de la replicación de una cadena de ADN, la cadena molde tiene en un lugar dado una base en su forma tautomérica, en lugar de la normal, se pueden alterar las condiciones de complementariedad y colocarse una base errónea en la cadena bajo síntesis.

En la **figura 3** vemos que se pasa a un par de bases A·T donde debería existir un par G·C, lo que debería acarrear el cambio de aminoácido correspondiente al codón en el que esté incluida una de las bases cambiadas, y consecuentemente la aparición de un mutante. No obstante, para contrarrestar este tipo de errores, y también para otros que veremos a continuación, las células pueden disponer de mecanismo de reparación del ADN y al cabo de algunas replications volver al par de bases original.

También pueden ocurrir emparejamientos erróneos cuando una base se **ioniza**, esto ocurre con más frecuencia en las mutaciones producidas por las formas imino y enol de las bases.

Para distinguir los distintos cambios de bases se usa la siguiente nomenclatura:

- **Transición**, es el cambio de una purina por otra distinta (A G), o de una pirimidina por otra distinta (T C). Todos los emparejamientos erróneos descritos anteriormente dan lugar a mutaciones por transición. La DNA polimerasa III bacteriana tiene una actividad de corrección que le permite reconocer tales emparejamientos erróneos y escindirlos, reduciendo así las mutaciones que se producen. Hay además otro sistema de reparación que corrige muchas bases mal emparejadas que escapan a la corrección de la polimerasa.
- **Transversión**, es el cambio de una purina por una pirimidina o viceversa. No pueden originarse por los emparejamientos erróneos representados en la figura 2. Requeriría el emparejamiento erróneo de una purina con una purina o una pirimidina con una pirimidina. Las dimensiones de la doble hélice desfavorecen tales emparejamientos, aunque estudios de difracción de rayos X revelan que pueden formarse pares G·A, así como otros pares purina·purina.

Deleciones y duplicaciones:

Las **deleciones** grandes (de más de unos pocos pares de bases) representan una fracción considerable de las mutaciones espontáneas. La mayoría de las deleciones, no todas, ocurren en secuencias repetidas. Los puntos calientes para las deleciones corresponden a las secuencias repetidas más largas.

Las **mutaciones de cambio de fase** son un tipo de deleciones y duplicaciones cortas que producen el desfase en la traducción. Están producidas por errores de replicación y dan lugar a proteínas muy modificadas. Streisinger dedujo que estas mutaciones ocurren a menudo en secuencias repetidas y formuló un modelo que explicaría los cambios de fase durante la síntesis de DNA, los cuales cambian la pauta de lectura de la proteína.

En el modelo de Streisinger las mutaciones de cambio de fase surgen cuando los lazos en regiones de cadena única se estabilizan mediante un emparejamiento erróneo deslizado. En la **figura 4** se representa el modelo. En la **adición** de nucleótidos, durante la síntesis de DNA, la nueva cadena sintetizada resbala, formándose un lazo de varios pares de bases. Este lazo se estabiliza por el emparejamiento permitido por la unidad de secuencias repetidas, de este modo se producirá una adición tras el deslizamiento. Si en lugar de la cadena recién sintetizada el deslizamiento se produce en la cadena molde, entonces se produce una **delección** de

nucleótidos, tras el deslizamiento se producirá la delección de pares de bases.

Lesiones espontáneas

Además de los errores de replicación, las lesiones espontáneas, que producen daños en el DNA de forma natural, también pueden causar mutaciones. Dos de las lesiones espontáneas más frecuentes son el resultado de la desaminación y de la despurinización.

La **despurinización**, la más común de las dos, implica la interrupción del enlace glucosídico entre la base y la desoxiribosa y la pérdida posterior de un residuo de guanina o adenina del DNA. Una célula de mamífero pierde de forma espontánea alrededor de 10.000 purinas de su DNA durante un tiempo de generación de 20 horas a 37°C. Si estas lesiones persistieran, conducirían a un daño genético importante porque los sitios sin purina que se originan no pueden especificar una base complementaria a la purina original durante la replicación. Sin embargo, sistemas de reparación eficaces eliminan los sitios sin purinas. Bajo ciertas circunstancias se puede insertar una base en un sitio sin purina; con frecuencia esto da como resultado una mutación.

La **desaminación** de citosina produce uracilo. Los residuos de uracilo no reparados emparejarán con adenina durante la replicación, produciendo la conversión de un par G·C en un par A·T (una **transición G·CA·T**). Una de las enzimas celulares de reparación, la *glucosilasa de uracilo de DNA*, reconoce residuos de uracilo en el DNA y los escinde, dejando un hueco que es rellenado posteriormente. El análisis de puntos calientes de transición G·CA·T en el gen *lacI* ha demostrado que aparecen residuos de 5-metilcitosina en cada punto caliente. La posición de la 5-metilcitosina correlaciona bien con los sitios más mutables. Esto se debe a que la desaminación de la 5-metilcitosina origina 5-metiluracilo, que no es reconocida por la enzima *glucosilasa de uracilo de DNA* y por tanto no se repara. Así pues, las transiciones CT debidas a desaminación se detectan más frecuentemente en sitios con 5-metilcitosina, que se encuentran en bacterias y en células superiores.

Las **bases dañadas oxidativamente** representan un tercer tipo de lesión espontánea implicada en la mutagénesis. El metabolismo aerobio normal genera, como subproducto, ciertas especies activas de oxígeno, como radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH). Todas ellas causan lesiones oxidativas en el DNA que dan lugar a mutaciones y que han sido relacionadas con varias enfermedades humanas. La **figura 5** muestra un producto del daño oxidativo. El producto *8-oxo-7,8-dihidro-desoxi-guanina* (8-oxodG) empareja con frecuencia erróneamente con A, produciendo un alto número de **transversiones** GT.

Mecanismos Biológicos de Reparación

Hay muchas amenazas potenciales para la fidelidad de la replicación del DNA. No solo hay una frecuencia de error inherente a la replicación del DNA, sino que también ocurren lesiones espontáneas que añaden nuevos errores. Además, los mutágenos ambientales pueden dañar el DNA, aumentando la tasa de mutación. Las células vivas han desarrollado una serie de mecanismos enzimáticos que reparan los daños producidos en el DNA. Las Vías de reparación se clasifican en varias categorías.

Sistemas que evitan los errores antes de que ocurran

Sistemas enzimáticos que neutralizan compuestos que potencialmente pueden causar daños antes de que reaccionen con el DNA.

Uno de dichos sistemas implica la detoxificación de los radicales superóxido. La **dismutasa del superóxido** cataliza la conversión de radicales superóxido en peróxido de hidrógeno. A su vez, la **catalasa** convierte el peróxido de hidrógeno en agua.

Otro sistema que evita el error antes de que ocurra depende del producto proteico del gen *mutT*. Esta enzima impide la incorporación de 8-oxodG (antes mencionado) al DNA, hidrolizando para ello el trifosfato de la 8-oxodG a la forma monofosfato.

Reversión directa de la lesión

Eliminación directa de la lesión regenerando la base normal. Este tipo de reparación no siempre es posible, porque algunos tipos de lesiones son irreversibles. Sin embargo, en algunos casos, las lesiones pueden ser reparadas de esta forma. Un ejemplo es el fotodímero de pirimidina-ciclo-butano producido por la luz UV, este puede ser reparado por una **enzima fotorreactivante** (PRE). La enzima opera uniéndose al fotodímero y rompiéndolo, en presencia de luz visible de ciertas longitudes de onda, para regenerar las bases originales. La enzima no opera en la oscuridad, así que en estas condiciones se necesitan otras vías de reparación para eliminar los daños producidos por la luz UV.

Las **transferasas de grupos alquilo** son otras enzimas implicadas en la reversión directa de lesiones. Eliminan ciertos grupos alquilo añadidos a las posiciones 0 a 6 de la guanina por agentes como NG y EMS.

Vías de reparación por escisión

Reparación general por escisión

Hay varias vías generales para escindir bases alteradas, y un trecho de bases vecinas, y reparar luego el hueco que queda mediante síntesis de DNA. Una vía general está determinada por tres genes, denominados *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*. Este sistema reconoce cualquier lesión que cree una distorsión importante en la doble hélice de DNA. Una **endonucleasa** realiza una incisión alejada varios pares de bases a cualquier lado de la base dañada, eliminándose a continuación un fragmento de DNA de cadena sencilla de una longitud de 12 pares de bases. El pequeño hueco se rellena entonces mediante **síntesis de reparación** (mediada por la polimerasa de DNA I) y queda sellado por la ligasa de DNA.

Muchos tipos de lesiones son eliminados por este mecanismo general de reparación por escisión, incluyendo los principales fotoproductos de la luz UV, así como adiciones químicas voluminosas. En el hombre es también una vía de reparación crucial. Una enfermedad hereditaria poco frecuente, *xeroderma pigmentosum*, se debe a la carencia de una de las enzimas de reparación por escisión. La mayoría de las personas afectadas por esta enfermedad mueren de cáncer de piel antes de alcanzar los 30 años.

Vías de reparación específica

Ciertas lesiones son tan sutiles que no provocan una distorsión de importancia suficiente como para ser reconocida por el sistema de reparación por escisión general codificado por los genes *avrABC*. Por tanto son necesarias otras vías de escisión adicionales.

REPARACIÓN MEDIANTE NUCLEASA AP. Todas las células contienen endonucleasas que atacan los sitios que quedan tras la pérdida espontánea de residuos de purina o pirimidina. Por comodidad, los sitios sin purina o sin pirimidina se denominan **sitios AP**, ya que son equivalentes desde un punto de vista bioquímico. Las **endonucleasas AP** son vitales para la célula porque la despurinización espontánea es un hecho relativamente frecuente. Estas enzimas introducen hendiduras en la cadena mediante la rotura de enlaces fosfodiésteres en los sitios AP. Esto promueve un proceso de reparación por escisión mediado por otras tres enzimas: una exonucleasa, la polimerasa de DNA I y la ligasa de DNA.

Dada la eficacia de la ruta de reparación por la endonucleasa AP, ésta puede ser la etapa final de otras rutas de reparación. De esta manera, si los pares de bases dañados son escindidos, dejando un sitio AP, las endonucleasas AP pueden completar el restablecimiento de la situación normal. Esto es lo que ocurre en la vía

de reparación por glucosilasas de DNA.

REPARACIÓN MEDIANTE GLUCOSILASAS DE DNA. Las **glucosilasas de DNA** no rompen los enlaces fosfodiésteres, sino los enlaces N-glucosídicos (base-azúcar), liberando la base alterada y originando un **sitio AP**. Que es reparado posteriormente por endonucleasas AP.

Existen numerosas glucosilasas de DNA, Una de ellas, la glucosilasa de uracilo de DNA elimina uracilo del DNA. Los residuos de uracilo se producen por la desaminación espontánea de la citosina y, si no se reparan, dan lugar a transiciones CT. Si el uracilo fuera un constituyente normal del DNA, tal reparación no sería posible.

Existe también una glucosilasa que reconoce y escinde **hipoxantina**, el producto de la desaminación de la adenina. Otras glucosilasas eliminan bases alquiladas, purinas con anillos abiertos, bases dañadas oxidativamente y, en algunos organismos, fotodímeros producidos por la luz UV, Todavía se siguen descubriendo nuevas glucosilasas.

EL SISTEMA GO. Dos glucosilasas (productos de los genes *mutM* y *mutY*) actúan conjuntamente para eliminar las mutaciones causadas por las lesiones que produce en el DNA el 8-oxodG, o <<GO>>. Estas glucosilasas, junto al producto del gen *mutT*, forman el sistema GO. Cuando se originan lesiones GO en el DNA, por el daño oxidativo espontáneo, una glucosilasa cifrada en el gen *mutM* elimina la lesión. Aun así, persisten algunas lesiones GO que emparejan erróneamente con adenina. Una segunda glucosilasa, el producto del gen *mutY*, elimina la adenina de este emparejamiento erróneo específico, llevando el restablecimiento de la citosina correcta por síntesis de reparación (polimerasa de DNA I) y permitiendo la subsiguiente eliminación de la lesión GO por el producto del gen *mutM*.

Reparación posterior a la replicación

Algunas vías de reparación reconocen errores incluso después de que hay tenido lugar la replicación. Uno de estos sistemas, denominado **sistema de reparación de emparejamientos erróneos**, detecta los emparejamientos erróneos producidos durante la replicación del DNA. Este sistema:

- Reconoce pares de bases mal emparejados.
- Determina cuál de las dos bases mal emparejadas es la incorrecta.
- Escinde la base incorrecta y lleva a cabo la síntesis de reparación.

El segundo punto es la propiedad más importante de un sistema de este tipo. Los errores durante la replicación se producen en la cadena recién sintetizada, de modo que es la base de esta cadena la que debe ser identificada y escindida.

Para reconocer la cadena molde el sistema aprovecha el retraso normal en la metilación posterior a la replicación de la secuencia 5'-G·A·T·C·3'. La enzima metiladora es la **metilasa de adenina**, que produce 6-metiladenina en cada una de las cadenas. Sin embargo, la enzima tarda varios minutos en reconocer y modificar las secuencias GATC recién sintetizadas. Durante este período de tiempo actúa el sistema de reparación de emparejamientos erróneos, ya que puede distinguir las cadenas viejas de las nuevas. La metilación en la posición 6 no afecta al emparejamiento de bases, pero proporciona un marca apropiada que puede ser detectada por otros sistemas enzimáticos.

Una vez que el sitio mal emparejado ha sido identificado, el sistema de reparación de emparejamiento erróneos corrige el error.

En bacterias se ha descubierto un segundo sistema de reparación ya mencionado. Un enzima **glucosilasa de adenina**, cifrada en el gen *mutY*, reconoce y elimina los emparejamientos 8-oxodG-A (sistema GO). Esto

origina un sitio apurínico, que es reparado por la endonucleasa AP.

Bibliografía

Genética. R.Tamarin Ed. Reverté 1996

Genética. E. Sanchez Monge Ed. Omega, 2ª edición

Genética. A. Griffiths Ed. Interamericana McGraw-Hill 5ª edición

Conceptos de Genética. William S. Klug Ed. Prentice Hall 5ª edición

1

1

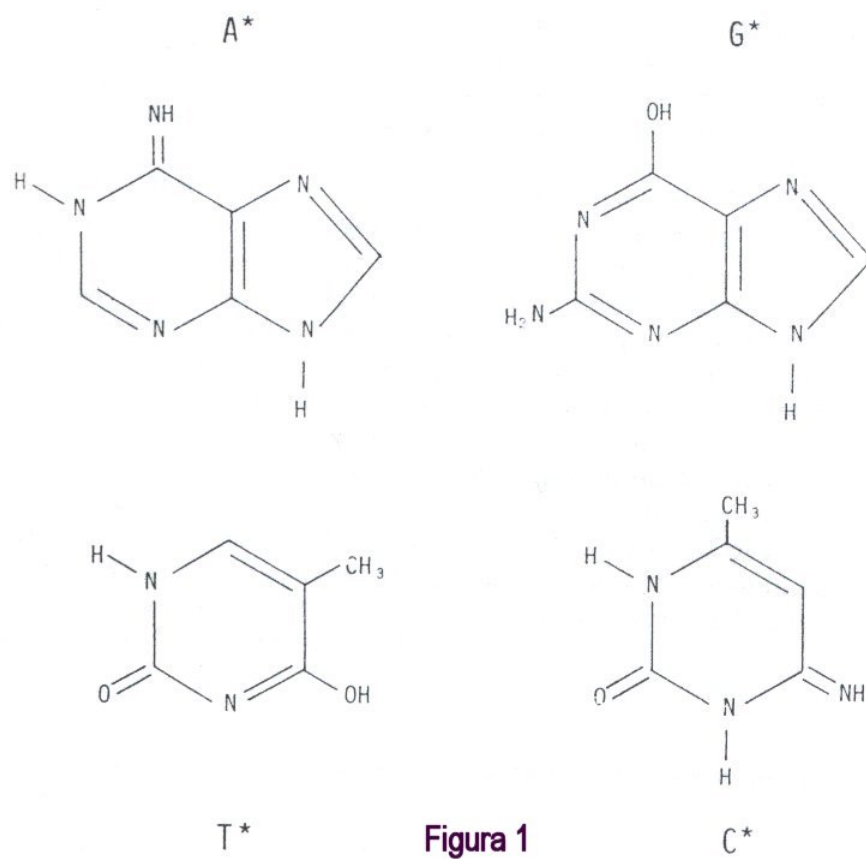


Figura 1