

15 DE JUNIO DE 2000

Una máquina de reparación de ADN mantiene la estabilidad genómica

La exactitud del genoma está bajo una amenaza constante-los productos químicos tóxicos, la radiación ionizante e incluso los subproductos del metabolismo celular normal pueden desencadenar la destrucción del ADN. En algunos casos, el daño en el ADN es lo suficientemente severo como para cortar la hélice doble en dos partes. Cuando esto sucede, un grupo de proteínas que arreglan las roturas del ADN de doble cadena se movilizan para hacer las reparaciones. Si una rotura no es reparada, las consecuencias para la célula pueden ser desastrosas, yendo desde reordenamientos genéticos globales hasta fallas cromosómicas masivas.

Los seres humanos y otros organismos son afortunados al tener varios sistemas de reparación que inspeccionan al ADN en busca de indicios de daños e inician las reparaciones cuando éstas son necesarias. El investigador del HHMI, Frederick W. Alt, y sus colegas en el Hospital de Niños, en Boston, en la Facultad de Medicina de Harvard y en el Instituto del Cáncer Dana-Farber están ahondando en estos mecanismos de reparación, y están aprendiendo cómo trabajan los sistemas y por qué a veces se producen fallas.

"Esto demuestra claramente que la vía de unión de los extremos es extremadamente importante para volver a unir los extremos de los cromosomas dañados por la radiación ionizante. Si uno no lo tiene, las células tienen un serio problema."

— Frederick W. Alt

En un artículo de investigación publicado en el número de junio de 2000 de *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Alt y sus colegas informan que las células de ratón que carecen de una vía funcional de unión de extremos de ADN no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés)-que vuelve a conectar los extremos rotos del ADN de doble cadena-presentan niveles altos de roturas cromosómicas y reordenamientos del material genético, llamados translocaciones. Tales translocaciones son una causa frecuente de leucemias y linfomas. La lección que nos queda de estos

estudios, dijo Alt, es que la vía de reparación NHEJ es crucial para mantener la estabilidad genómica.

En estudios anteriores, Alt y sus colegas encontraron que la NHEJ es responsable de volver a juntar las roturas del ADN de doble cadena en células expuestas a radiaciones ionizantes y en los linfocitos que experimentan intercambio de genes durante el proceso de crear a las células que combaten a las infecciones. Esos experimentos revelaron que los ratones que carecían de un componente clave de la vía de NHEJ sufrían índices más altos de linfoma de células B, un cáncer que es causado por la translocación de genes específicos. De esta forma, Alt y sus colegas decidieron ver si la NHEJ tenía una función más amplia en el mantenimiento de la estabilidad genómica.

"Ese hallazgo de un índice aumentado de este tipo de cáncer particular, relacionado con la translocación, nos llevó a preguntarnos si la ausencia de la unión de los extremos podría predisponer, de alguna manera, a las células a la inestabilidad genómica general", dijo Alt. "Si esto fuera verdad, los malfuncionamientos en la vía de NHEJ podrían tener implicaciones más generales para la carcinogénesis".

Los científicos examinaron células embrionarias de fibroblastos de ratón que eran deficientes en una de las tres enzimas claves (DNA-PKcs, Ku70 y Lig4) de la vía de reparación de NHEJ.

"Elegimos fibroblastos embrionarios en lugar de células tumorales porque deseamos utilizar células que fueran lo más normales posible", dijo Alt.

Utilizando una nueva técnica de análisis de imágenes cromosómicas, llamada cariotipo espectral, los investigadores fueron capaces de determinar la localización de las roturas en la estructura cromosómica, que de otra manera no hubiera presentado ningún rasgo distintivo. En este procedimiento, los investigadores tratan a las células con sondas fluorescentes de ADN que se unen a secuencias específicas de ADN en los cromosomas. Estas sondas coloreadas pintan a cada cromosoma con una tonalidad levemente diferente. Se utiliza entonces un sistema automatizado de análisis de imágenes acoplado a un microscopio para examinar las células. Al mirar a través del microscopio, un investigador puede buscar diferencias en el color para distinguir entre los distintos cromosomas. La técnica marca a los cromosomas enteros y a los fragmentos de los mismos, haciendo considerablemente más fácil el trabajo de marcar los pedazos rotos de ADN o los reordenamientos cromosómicos.

"Cuando David Ferguson utilizó esta técnica de detección, no encontró ninguna anomalía cromosómica en las células de tipo salvaje", dijo Alt. "Si embargo, cuando observó las células deficientes en NHEJ, notó un aumento dramático en las anomalías cromosómicas en las células que carecían de Lig4 o de Ku70. También notó un menor aumento de anomalías en las células deficientes en ADN-PKcs".

Alt y sus colegas también examinaron el tejido tomado directamente de los ratones y observaron los mismos tipos de anomalías que habían notado

en las células de cultivo.

En un experimento diseñado para determinar la función de la vía de NHEJ en la reparación del daño cromosómico general inducido por radiación, los científicos irradiaron a los fibroblastos que eran deficientes en Lig4 y en p53, un sensor clave del daño en el ADN. Normalmente, p53 evita que las células dañadas continúen el ciclo de división celular.

"Encontramos un gran número de cromosomas dañados en las células que eran deficientes en Lig4 y p53, comparado con los daños encontrados en células deficientes sólo en p53", dijo Alt. "Casi todos los cromosomas habían sido rotos en pequeños pedazos. Esto demuestra claramente que la vía de unión de los extremos es extremadamente importante para volver a unir los extremos de los cromosomas dañados por la radiación ionizante. Si uno no lo tiene, las células tienen un serio problema".

Estudios anteriores de reparación cromosómica sugerían que una segunda vía de reparación, la vía de recombinación homóloga, podría ser la vía principal responsable de la reparación exacta del ADN dañado, ya que intenta emparejar las secuencias de ADN al volver a unir los segmentos rotos. Alt señaló que éste puede no ser el caso ya que los experimentos de su grupo demuestran que las translocaciones eran infrecuentes en las células de tipo salvaje irradiadas lo suficiente para causar un alto nivel de tal daño en las células deficientes en la NHEJ, en las cuales la vía de recombinación homóloga no debiera estar afectada.

"Estos hallazgos muestran que NHEJ realmente facilita de inmediato la unión de los extremos rotos, sin salir a buscar roturas en alguna parte" dijo Alt. "Esta capacidad incrementa las evidencias de que la NHEJ es un vigilante crucial del genoma de mamíferos".