

llege of Medicine, New York), hemos descrito una nueva familia de compuestos que inducen selectivamente la CMA y que administrados mediante inyección intravítrea permiten reducir la pérdida de visión causada por la retinosis pigmentaria<sup>4</sup>. Esta enfermedad rara (incidencia 1:3500) tiene un origen hereditario y causa una pérdida de función visual progresiva que acaba en ceguera, y actualmente no hay ningún fármaco disponible para su tratamiento.

Aún queda mucho por explorar y dilucidar respecto a la autofagia, pero la importancia de este proceso intracelular, y el efecto mariposa que se refleja en el estado de salud del individuo cuando es modulada, ponen de manifiesto una vez más la importancia de la biología básica. Una vez entendido más a fondo este proceso beneficioso para el cuerpo, el desarrollo dirigido de fármacos ayudará a acelerar el proceso de traslado de conocimiento del laboratorio a la clínica.

1. Esteban-Martínez, L. et al. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J.* 36, 1688–1706 (2017).
2. Rodríguez-Muela, N. et al. Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Aging Cell* 12, 478–488 (2013).
3. Ramírez-Pardo, I., Villarejo-Zori, B. et al. Ambra1 haploinsufficiency in CD1 mice results in metabolic alterations and exacerbates age-associated retinal degeneration. *Autophagy*, in press.
4. Gómez-Sintes, R. et al. Targeting retinoic acid receptor alpha-corepressor interaction activates chaperone-mediated autophagy and protects against retinal degeneration. *Nature Communications*, in press.

## La replicación del ADN: un proceso fundamental para la vida y “arriesgado” para la salud.

**Rodrigo Bermejo**

Científico Titular del CSIC en el CIB Margarita Salas



La replicación del ADN es un proceso esencial para el mantenimiento y desarrollo de la vida. Permite, tanto a organismos procarióticos como eucarióticos, generar copias virtualmente idénticas de la información genética para su transmisión a las células hijas. Además de ser esencial para pre-

servar el material genético durante la propagación de los organismos, un correcto funcionamiento y control temporal de la replicación es necesario para los programas de desarrollo y diferenciación de organismos superiores. Por este motivo, mutaciones en genes que participan en la replicación se asocian a enfermedades humanas, como síndromes del desarrollo y el cáncer.

En células eucariotas, la mayor parte de la información genética está contenida en los cromosomas. La replicación de los mismos se realiza en estructuras macromoleculares conocidas como replisomas. En estos, se verifica la replicación del ADN, pero también procesos asociados como la transmisión de la información epigenética y la detección y reparación de daños. Las dos funciones fundamentales de la replicación son la apertura de las

hélices de ADN parental, realizada por el complejo helicasa CMG (Cdc45-MCM-Gins), y la síntesis de nuevas hebras de ADN, complementarias a las hebras parentales, realizada por las polimerasas del ADN Pol $\alpha$ , Pol $\delta$  y Pol $\epsilon$ . Pol $\alpha$ , en complejo con la enzima primasa, sintetiza cortos cebadores de ARN y ADN que sirven para la extensión de las cadenas nacientes por parte de Pol $\delta$  y Pol $\epsilon$ . Pol $\epsilon$  sintetiza una hebra líder de manera continua, a través de su asociación con el núcleo funcional del replisoma (la helicasa CMG). En cambio, Pol $\delta$  sintetiza una hebra rezagada de manera discontinua generando cortos fragmentos de ADN (fragmentos de Okazaki) que son posteriormente editados y ligados por una maquinaria especializada. La replicación del ADN cromosómico se inicia en sitios conocidos como orígenes de replicación y tiene lugar una única vez por división celular. Esto se debe a un estricto control, que se consigue separando una fase de “licenciamiento”, que tiene lugar en G1 con baja actividad de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y en que el origen es capacitado para actuar como tal mediante la carga del complejo MCM, de una fase de “disparo” en que la actividad CDK promueve el reclutamiento de factores adicionales que conllevan el ensamblaje del replisoma y la apertura de la hélice parental en estructuras conocidas como horquillas de replicación.

Además de los factores básicos para la síntesis del ADN, el replisoma cuenta con factores accesorios que actúan para garantizar la integridad del proceso de replicación, evitando la formación de mutaciones en el ADN y roturas o alteraciones estructurales de los cromosomas. Estos factores adicionales tienen gran importancia, ya que permiten a las células responder a problemas de

la replicación en situaciones que interfieren con la apertura de la hélice parental o con la síntesis de nuevo ADN, conocidas globalmente con el nombre de estrés replicativo. Por ejemplo, la presencia de proteínas fuertemente unidas al ADN (como topoisomerasas o proteínas químicamente entrelazadas con el ADN) o daños en el ADN (como entrelazamientos estables entre las hebras) impide la acción de la helicasa CMG y requiere la acción de proteasas y nucleasas especializadas que eliminen estas barreras (degradando las proteínas o escindiéndolas del ADN) o de helicinas accesorias que asistan a CMG para progresar más allá del obstáculo. A su vez, distintas situaciones pueden interferir con la síntesis del ADN. Existen secuencias de ADN que, por tender a organizarse en estructuras secundarias o presentar un alto número de repeticiones de sus bases, pueden determinar errores por deslizamiento de las polimerasas. Daños químicos en el ADN también pueden bloquear las polimerasas replicativas y alteraciones metabólicas (como la reducción de nucleótidos trifosfato) pueden determinar un cese global de la replicación. Las células eucarióticas están dotadas con helicinas especializadas que entran en acción en respuesta a estrés replicativo, eliminando estas estructuras secundarias del ADN molde, y con factores que facilitan una síntesis continuada sorteando el daño del ADN (por ejemplo, sustituyendo las polimerasas replicativas por polimerasas de translesión, de síntesis más robusta, capaces de replicar bases dañadas).

En general, una detención prolongada de la apertura de la hélice parental o de la síntesis de cadenas nacientes determina que el replisoma se vuelva inestable, pudiendo sufrir un colapso que conduce a la rotura y degradación de las cadenas nacientes, que al ser reparadas erróneamente pueden generar mutaciones y alteraciones estructurales de los cromosomas. Existe una ruta de señalización (el *checkpoint* de daño en el ADN) mediada por proteínas quinasas altamente conservadas (como ATR, ATM y CHK1). Estas son capaces de detectar situaciones de estrés replicativo y ejercer una serie de controles sobre procesos esenciales de la célula (detención del ciclo celular, estabilización de replisomas, inhibición del disparo de orígenes adicionales); para promover que no se vea alterada la integridad de la información y estructura del genoma.

La replicación del ADN está relacionada con el desarrollo de enfermedades humanas, especialmente cuando tiene lugar en condiciones anómalas. Las polimerasas replicativas pueden introducir bases erróneas opuestas al molde de ADN parental, generando mutaciones que suponen un importante motor del desarrollo del cáncer. La frecuencia de estas alteraciones está fuertemente limitada, tanto por la actividad de corrección de errores intrínseca de las polimerasas que elimina “al vuelo” los nucleótidos incorporados erróneamente, como por

el sistema de reparación de emparejamiento incorrecto (*mismatch repair*) que reconoce la alteración introducida por el nucleótido erróneo en la hélice del ADN recién sintetizada y es capaz de repararlo. Mutaciones que afectan a la actividad correctora de las polimerasas replicativas humanas (especialmente de POLE1) o la de factores necesarios para la reparación de nucleótidos de emparejamiento incorrecto se relacionan con una mayor propensión al desarrollo del cáncer. A su vez, se ha descubierto cómo la activación de algunos oncogenes y desregulación de supresores tumorales causa estrés replicativo crónico a través de mecanismos aún poco entendidos. Se cree que este estrés replicativo continuado termina por generar mutaciones de genes implicados en la protección del replisoma o reparación del ADN, lo que conduce a un estado de “inestabilidad genómica” (una aceleración en la generación de mutaciones y alteraciones cromosómicas) en las células pre-malignas. La inestabilidad genómica actúa como un motor de la transformación maligna, acelerando la adquisición de características genéticas que promueven la capacidad de proliferación e invasividad de la neoplasia. Paradójicamente, el estrés replicativo crónico también puede representar una debilidad específica de las células cancerosas, y en la actualidad se ensayan fármacos que inhiben las quinasas del *checkpoint* (ATR, CHK), encargadas de estabilizar el replisoma en respuesta a estrés, para inducir una citotoxicidad selectiva en estas células.

Existen una variada serie de enfermedades raras de transmisión mendeliana asociadas a mutaciones en factores relacionados con la replicación o su coordinación con otros procesos del ciclo celular. Mutaciones bialélicas en genes implicados en el licenciamiento y disparo de orígenes de replicación (ORC1-6, CDT1, CDC6, GMMN, CDC45, MCM10) causan el Síndrome de Meier-Gorlin, caracterizado por enanismo primordial y alteraciones específicas del desarrollo esquelético. Mutaciones en genes que la codifican la quinasa ATR (ATR) o su cofactor ATRIP (ATRIP, ATR-interacting protein) son causantes del síndrome de Seckel, caracterizado un retraso del desarrollo con microcefalia severa y retraso intelectual. Recientemente, el desarrollo de técnicas de secuenciación de exoma completo (WES) ha desvelado mutaciones en otros genes de la replicación implicados en el síndrome de Seckel como los de las nucleasas DNA2 y CTIP, que procesan estructuras anómalas que se generan durante el estrés replicativo. Mutaciones en helicinas y factores de reparación del ADN han sido asociadas con síndromes genéticos raros, caracterizados por anomalías del desarrollo y predisposición al desarrollo de cáncer. Mutaciones en RECQL4 se asocian a los síndromes de Rothmund-Thomson, RAPADILINO y Baller-Gerold. Genes que codifican para helicinas de la familia RECQ, BLM, WRN y FANCM, se asocian a



los síndromes de Bloom, Werner y la Anemia de Fanconi, respectivamente, caracterizados por predisposición al desarrollo de cáncer, así como envejecimiento prematuro (Bloom, Anemia de Fanconi) y anomalías del desarrollo (Werner y Anemia de Fanconi). Mutaciones en DDX11, que codifica para una helicasa implicada en la protección del replisoma y de su coordinación con la cohesión de las cromátidas hermanas, se asocia a los síndromes de Rotura de Cromosomas de Varsovia y al síndrome de Roberts, también caracterizados por inestabilidad genética y anomalías del desarrollo.

El descubrimiento en la última década de diversas condiciones genéticas causadas por mutaciones de la maquinaria de replicación ha supuesto un salto en la

compresión que juegan la replicación del ADN en la estabilidad del genoma, así como en el desarrollo y salud humana. En los próximos años, es de esperar que se produzcan nuevos avances sobre el impacto en la salud de otros aspectos cruciales asociados a la replicación (como el mantenimiento de la información epigenética). El grupo de [Replicación del ADN e Integridad del Genoma](#) del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, estudia la función molecular de muchos de estos factores en condiciones de estrés replicativo utilizando aproximaciones genómicas. Quizá en no demasiado tiempo, los conocimientos generados se podrán traducir en estrategias efectivas para intervenir la fisiopatología de estas enfermedades y en el tratamiento del cáncer.

## El CIB Margarita Salas, cuna de la Escuela Española en Biología del Desarrollo

### Carmen Fernández Alonso

Doctora en Ciencias Químicas en el CIB Margarita Salas

Pieza clave en la evolución de la biología en España, el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) jugó un papel fundamental en el establecimiento de la Biología del Desarrollo. Entre los años 1969 y 1975 en el CIB se desarrollaron nuevas metodologías de trabajo en *Drosophila* que permitieron definir conceptos clave para la biología del desarrollo y derivaron en el reconocimiento de la comunidad científica internacional, suponiendo el germen de la denominada Escuela Española en Biología del Desarrollo.

Los inicios históricos en esta área en el CIB podríamos remontarlos al grupo de Eugenio Ortiz de Vega, en cuyo laboratorio se investigaba en Genética de *Drosophila melanogaster*. Aquí trabajó en su tesis doctoral entre 1958 y 1962 Antonio García Bellido, considerado el padre de la moderna biología del desarrollo. En este periodo analizó los efectos de las mutaciones del gen *furrowed* sobre el desarrollo en *Drosophila*, un modelo animal de gran utilidad para estudiar fisiología por su sencillez, con una similitud genética con los humanos del 65%.

Una estancia postdoctoral en el laboratorio de Ernst Hadorn en Zurich permitió a García Bellido adquirir los conocimientos y técnicas fundamentales para el análisis experimental del proceso de desarrollo. En concreto, profundizó en la metodología para cultivar células de los discos imaginales de larvas de *Drosophila* (precursores de las estructuras de alas, patas, antenas, ojos, etc.) en el abdomen de un adulto estéril, sistema que perfeccionó en años posteriores para el estudio de las propiedades



Antonio García Bellido (Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica, 1984)

de estas células en mutantes del complejo bithorax, responsable de la diferenciación del tórax posterior y de los segmentos abdominales de la mosca.

En 1967, se desplazó al laboratorio de Edward Lewis en Caltech. Lewis era uno de los fundadores de la Genética de *Drosophila* y estaba enfocado en estudios de problemas de mutagénesis, de citogenética y de evolución. Lewis estaba trabajando con el sistema bithorax, cuyas mutaciones producían moscas de cuatro alas, de ocho patas, etc., demostrando que el proceso de desarrollo se veía afectado de forma grave, pero se desconocía la función de este sistema en el proceso. Aquí García Bellido se inició en el uso de células somáticas para la creación de mosaicos genéticos en células mutantes y normales, combinando fisiología, biología celular y genética.