



Complejo de reconocimiento de origen en la replicación de eucariotas

Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia

María Belén Rodríguez Campuzano



Trabajo Fin de Grado de carácter bibliográfico

Grado en Farmacia

Complejo de reconocimiento de origen en la replicación de eucariotas

Autora: María Belén Rodríguez Campuzano

Tutor: Martiniano Santiago Pavón

Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica

Sevilla, junio 2021

RESUMEN

La replicación del ADN durante el ciclo celular inicia con la licencia de replicación a través del reconocimiento por el Complejo de reconocimiento del origen de secuencias de inicio dentro del genoma denominadas orígenes, para proceder al ensamblaje de la maquinaria de replicación. Los organismos procariotas requieren de un único origen OriC, el cual es una secuencia reconocida y estructurada de ubicación única. Mientras que en el caso de los eucariotas son necesarios miles de orígenes dispersos a lo largo del cromosoma para asegurar la replicación en un marco de tiempo. La falta de conocimientos sobre estas secuencias de nucleótidos plantea interrogantes sobre los iniciadores implicados en su reconocimiento para la replicación, y en consecuencia responsables del inicio y control de la replicación en cada ciclo celular, lo que llevar a exponer enzimas útiles como diana en el desarrollo de fármacos con fines diagnósticos y terapéuticos.

La participación de ORC en otros procesos celulares no replicativos, explica su papel regulador fundamental no solo en el ciclo celular, sino también como coordinador de la síntesis del ADN y el ciclo celular. En consecuencia, alteraciones en el mismo pueden poner en riesgo la transmisión exacta e idónea del material genético durante la replicación, conduciendo a una inestabilidad genómica determinante de enfermedades como el cáncer, diabetes...

Enfermedades genéticas como el síndrome de Meier-Gorlin son resultado de mutaciones en ORC que provocan una alteración en su función, o bien síntomas que son provocados por patógenos que utilizan el ORC del huésped para su propia replicación.

PALABRAS CLAVE:

Ciclo celular, origen de reconocimiento, replicación, helicasa, funciones no replicativas, mutación.

ABSTRACT:

DNA replication during the cell cycle begins with the replication license through the recognition by the Origin Recognition Complex (ORC) of start sequences within the genome called origins, to proceed with the assembly of the replication machinery. Prokaryotic organisms require a single OriC origin, which is a recognized and structured sequence of unique location. While in the case of eukaryotes, thousands of origins scattered throughout the chromosome are necessary to ensure replication in a time frame. The lack of knowledge about these nucleotide sequences raises questions about the primers involved in their recognition for replication, and consequently responsible for the initiation and control of replication in each cell cycle, which leads to exposing useful enzymes as a target in development. of drugs for diagnostic and therapeutic purposes.

The participation of ORC in other non-replicative cellular processes explains its fundamental regulatory role not only in the cell cycle, but also as a coordinator of DNA synthesis and the cell cycle. Consequently, alterations in it can put at risk the exact and suitable transmission of genetic material during replication, leading to a determining genomic instability of diseases such as cancer, diabetes... Genetic diseases such as Meier-Gorlin syndrome are the result of mutations in ORC that cause an alteration in its function, or symptoms that are caused by pathogens that use the host's ORC for their own replication.

KEYWORDS:

Cell cycle, origin of recognition, replication, helicase, non-replicative functions, mutation.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Palabras clave.....	1
Abreviaturas.....	4
1. Introducción.....	6
2. Objetivos.....	10
3. Metodología.....	10
4. Resultados y discusión.....	11
4.1 Orígenes de replicación.....	11
4.1.1 ORC.....	12
4.2 Formación del complejo replicativo.....	13
4.3 Proceso de replicación celular.....	18
4.4 Funciones no replicativas de ORC.....	20
4.5 Enfermedades relacionadas con ORC.....	23
5. Conclusiones.....	27
6. Bibliografía.....	28

ABREVIATURAS

- ✚ Cdc10: Cell division control 10.
- ✚ Cdc45: Cell division cycle 45.
- ✚ Cdc6: Cell division cycle 6.
- ✚ CDK: Cyclin-dependent kinase.
- ✚ Cdt1: Chromatin licensing and DNA replication factor 1.
- ✚ CMG: Cdc45:MCM2-7:GINS
- ✚ CKI: Proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas.
- ✚ CTD: Dominio C-terminal.
- ✚ Ctf4: Chromosome Transmission Fidelity 4.
- ✚ EBNA1: Epsteins-Barr nuclear antigen 1.
- ✚ FEN1: Flap Structure-Specific Endonuclease 1.
- ✚ FPM: factor promotor de la maduración.
- ✚ G1: Fase GAP 1.
- ✚ G2: Fase GAP 2.
- ✚ GINS: Go-Ichi-Ni-San.
- ✚ GTPasa: Guanosina trifosfatasa.
- ✚ HP1: Heterochromatin protein 1.
- ✚ H2i: Helix 2 insert.
- ✚ S: Fase de síntesis.
- ✚ M: Fase de mitosis.
- ✚ MAPK: Cascada de proteínas quinasas activadas por agente mitógenos.
- ✚ MCM2-7: Minichromosome maintenance protein 2-7.
- ✚ NTD: Dominio N-terminal.
- ✚ OB: Pliegue de unión de oligonucleótidos.
- ✚ ORC: Complejo de reconocimiento del origen de replicación.
- ✚ PCNA: Proliferating cell nuclear antigen.
- ✚ PS1: Pre-sensor 1 β -hairpin.
- ✚ RF: Motivo dedo de arginina.
- ✚ RFC: Replication factor C.
- ✚ RPA: Replication protein A.
- ✚ SIR: Silent information regulation.

- ✚ Skp2: Proteína quinasa 2 asociada a la fase S.
- ✚ Sld (2/3): Synthetically Lethal with Dpb11-1.
- ✚ SIR: Silent information regulation.
- ✚ VEB: Virus Epstein-Barr.
- ✚ WA/WB: Motivo Walker A/B.
- ✚ ZF: Motivo de unión a Zinc N-terminal.

1. INTRODUCCIÓN

En la conservación de especies y el desarrollo celular de organismos de todos los reinos, es fundamental la duplicación del ADN (ácido desoxirribonucleico) durante el ciclo celular, para la transmisión fiel de la información genética a las dos células hijas resultantes de la división celular. El ciclo celular tiene como función la formación completa de una nueva célula, asegurando que el proceso se realice de forma adecuada y regulada (Lomanto et al., 2003). En el caso de organismos multicelulares son necesarios múltiples secuencias de divisiones celulares para crear un nuevo individuo, o bien para sustituir las células alteradas o muertas. Durante el ciclo celular, la célula aumenta su tamaño, sus componentes intracelulares, duplica su material genético y se divide. Este se organiza en una serie de etapas: una fase de síntesis (S), una fase de segregación mitótica (M) y dos fases intermedias (G1 y G2). Las fases G1, S y G2 corresponden a la interfase, donde la célula crece, duplica su ADN cromosómico y prepara los orgánulos para pasar una copia completa del genoma a cada una de las dos células hijas. Y una vez alcanza la fase M, que se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Fig. 1), se completa la segregación de los cromosomas y la división celular (citoquinesis), formando las células hijas, preparadas para comenzar su respectivo ciclo celular (Schafer, 1998).

Durante la fase G1 la célula se prepara para la replicación del ADN mediante acumulación del ATP requerido, aumento de material enzimático y, otras moléculas y estructuras citoplasmáticas. La progresión de la fase G1 está regulada por un “punto de restricción”, que la divide en una fase temprana y una fase tardía, los factores determinantes en este punto son una combinación de factores intrínsecos (tasa de síntesis de proteínas) y factores extrínsecos como las señales mitógenicas (factores de crecimiento, etc.) (Zetterberg et al., 1995). Los factores mitógenos actúan por unión a receptores de membrana que activan por fosforilación a la proteína G monomérica Ras, lo que a su vez provoca la cascada de fosforilaciones de las proteínas MAPK (quinasas activadas por mitógenos) que ocasiona la transcripción de genes tales como las ciclinas partícipes de G1 (Lomanto et al., 2003). Sin embargo, la ausencia de estos factores intrínsecos y extrínsecos provoca que la célula entre en un estado de reposo denominado fase G0, entrando en un estado de latencia dentro del ciclo celular que puede durar días, semanas o años, e incluso en ocasiones puede que para nunca volver a dividirse.

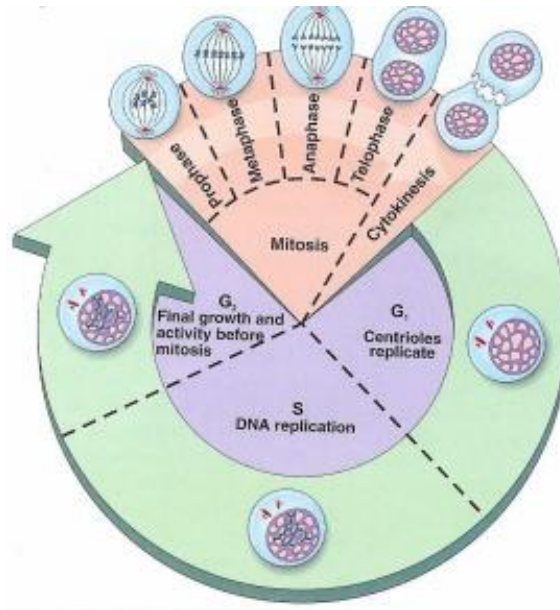


Figura 1. En la fase M, tiene lugar el reparto del material genético duplicado a las células hijas. Durante la profase se condensan las cromátidas hermanas en el núcleo y comienza a formarse el huso mitótico. En la metafase los cromosomas se disponen unidos al huso mitótico en el ecuador de la célula. Para una vez en la anafase provocar la separación de las cromátidas hermanas y migrar hacia los polos. Una vez en telofase, los cromosomas se encuentran en los polos de la célula y adquieren envoltura nuclear. Finalmente, durante la citocinesis el citoplasma y resto de contenido se ha dividido y por acción del anillo contráctil de actina y miosina se divide la célula en dos (Lomanto et al., 2003).

Dentro de la replicación del ADN durante la fase S se diferencian tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Durante la fase de iniciación tiene lugar el proceso de licencia de origen. En este punto, el complejo de reconocimiento del origen de replicación, actúa como punto de partida (proteína iniciadora) capaz de reconocer una secuencia de ADN (replicador) e impulsar la unión de un complejo de factores proteicos que preparan el molde y maquinaria para la síntesis de las cadenas hijas. Cada región cromosómica de un único origen o evento de iniciación, es llamada replicón (Ekundayo, Bleicher, 2019). Pese al papel clave de ORC en el inicio de la replicación, se ha demostrado la participación en otros procesos dentro del ciclo celular. La amplia gama de funciones de las proteínas ORC sugiere su papel como centro integrador de la replicación del ADN y el ciclo celular, además de otras funciones separables de la replicación, como es el desarrollo dendrítico o el silenciamiento de la transcripción.

Una vez completada la fase de iniciación, las helicasas catalizan el desenrollamiento del ADN a medida que avanzan las horquillas de replicación en las cadenas de ADN monocatenario de manera bidireccional a lo largo de todo el genoma. Dando paso a la enzima ADN polimerasa

que polimeriza la nueva cadena de ADN por adición de nucleótidos sobre los moldes. Una vez generadas las dos cadenas de ADN, se finaliza con la fase de terminación cuando las dos horquillas se encuentran y se induce la ubiquitinización para la extracción de la maquinaria de replicación, quedando las dobles cadenas de ADN unidas por el centrómero para la mitosis. Finalmente, en la fase G2, la célula se prepara para la mitosis a través de un reparto equitativo de los orgánulos para la división de la célula madre en las dos células hijas idénticas, y condensación de las cromátidas hermanas en forma de cromosoma.

El ciclo celular en eucariotas se encuentra altamente regulado, principalmente por acción de quinasas dependientes de ciclina (Ciclyn-Dependent-Kinases, CDKs) que son proteínas quinasas de serina/treonina que son fosforiladas en sus aminoácidos, donde la ciclina actúa como unidad reguladora y la quinasa es el elemento catalítico. Estos actúan activamente en diferentes puntos del ciclo celular, a través de la fosforilación de una serie de proteínas diana (Fig. 2) promoviendo la síntesis de ADN y la segregación de cromosomas. De esta forma controlan de manera temporal y espacial la coordinación de los procesos del ciclo celular. En el caso de que no se cumpla alguna de las condiciones particulares del proceso, se reprime el sistema de control a través de las proteínas inhibidoras de CDK (CKI), donde se diferencia la familia INK4 (inhibidoras de CDK4/CDK6) y la familia CIP/KIP (inhibidoras universal de todos los complejos CDK1/2/4/6). Los genes que codifican estas proteínas son denominados “genes supresores de tumores”. Alteraciones genéticas en estas proteínas reguladoras también pueden conducir a una proliferación descontrolada de células derivando en cáncer. La cooperación de las ciclinas, las CDK y las proteínas CKI resulta indispensable para lograr una progresión correcta y ordenada del ciclo celular (Ding et al., 2020). Se encuentran las ciclinas mitóticas (Cyclin B y Cyclin A) que unidas a las quinasas CDK1 forman el “Factor Promotor de la fase M (FPM)” para inducir la entrada de la célula en la fase M a través de la transferencia de grupos fosfatos del ATP a residuos de serina y treonina, una vez revisado que el material genético se haya duplicado correctamente, que no tenga errores y el medio extracelular sea adecuado (Lomanto et al., 2003).

Mientras que el punto de control más importante se encuentra en el último tercio de la fase G1, cuando la Ciclina E se une a la quinasa CDK2 e inducen el paso de la célula de la fase G1 a la fase S. Cuando estas CDK2 se encuentran en actividad baja, permiten que los complejos pre-RC puedan ensamblarse (Gasser, 2019). Mientras que cuando los niveles de actividad de CDK2 aumentan a medida que se produce la transición G1/S se desencadena la fosforilación de los sustratos Sld2 y Sld3 para su unión al complejo pre-replicativo y activación del mismo. Para superar este punto de control han de cumplirse los requisitos de tamaño adecuado de la

célula, disponibilidad de ATP y demandas reproductivas. De esta forma con el control en G1 se evita una sobreabundancia de orígenes cargados, restringiendo cada onda de activación de CDK2 en una replicación por ciclo.

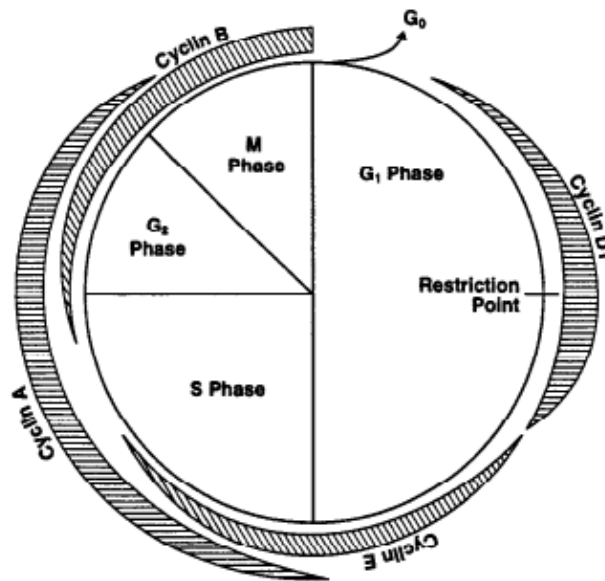


Figura 2. Esquema de las quinasas reguladoras de las distintas etapas del ciclo celular. El grosor de las barras indica la concentración relativa de ciclina intracelular (Schafer, 1998).

La replicación del ADN debe desarrollarse de forma eficiente y altamente coordinada para evitar la formación de errores que tengan consecuencias perjudiciales en la supervivencia celular y viabilidad del organismo. El daño en el ADN puede resultar de una replicación incompleta, errónea o extemporánea que da lugar a mutaciones que resultan causa principal de enfermedades humanas, o a la formación de clones de células que proliferan incontrolablemente como es el caso del cáncer (Gaillard y García-Muse, 2015). Para garantizar una transmisión precisa de la información genética durante la replicación, esta se reduce a una sola vez por ciclo celular, coordinada con otros eventos como la segregación cromosómica y reparación de errores del ADN. Por ello ha sido ampliamente estudiado en eucariotas, bacterias y, más recientemente, en arqueas (Costa et al., 2013). La comprensión de los mecanismos de replicación del ADN, y en concreto la concesión de licencias del origen de replicación puede suponer un punto de partida en la búsqueda de dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos, moléculas efectoras o mensajeros secundarios con fines diagnósticos y terapéuticos. A través del control sobre los eventos previos a la replicación, como supondría el ORC, se podría alcanzar el objetivo de dominar de manera temporal y espacial e incluso inhibir la replicación del ADN cromosómico en casos de trastornos de inestabilidad genómica u otras enfermedades genéticas.

2. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo es realizar una recopilación de los conocimientos actuales sobre el Complejo de reconocimiento del origen de la replicación. Esta revisión se centra en la estructura y papel de ORC como maquinaria que determina el inicio de la replicación, así como su mecanismo de acción durante la replicación y otros procesos celulares en los que se encuentre implicado. Evaluar la relación de ORC con diversas enfermedades humanas, y su análisis como posible diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades, cánceres y alteraciones genéticas.

3. METODOLOGÍA.

En la elaboración de este trabajo, se ha llevado a cabo una extensa revisión bibliográfica con la finalidad de resumir y plasmar los estudios existentes sobre ORC dentro de la literatura científica. Al tratarse de un artículo de revisión, se basa en la lectura de artículos de diferentes fuentes primarias, secundarias y terciarias tales como revistas científicas, bases de datos y libros de texto. En la búsqueda de artículos se usaron bases de datos como Medline, Science Direct y Pubmed, o revistas especializadas como Nature o Science. Dentro del material encontrado se hizo una selección más selectiva de los artículos en función de su relevancia y fecha de publicación, centrándome en los más recientes dentro de lo posible.

En primer lugar, se ha realizado una búsqueda de información básica sobre el ciclo celular y la replicación como contacto inicial para el abordaje de tema de estudio. Para continuar en la búsqueda exhaustiva sobre el tema, usando las palabras clave: complejo de reconocimiento del origen, ORC, helicasa replicativa, funciones no replicativas y cáncer. Asimismo, se han usado los mismos términos en el buscador "google académico".

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

4.1 ORÍGENES DE REPLICACIÓN.

Dentro de la división celular, la replicación del genoma requiere el ensamblaje de diferentes factores proteicos hasta llevar a la formación del complejo de pre-replicación (pre-RC). Durante la transición de la fase G1 a la fase de síntesis (S) del ciclo celular, ORC son secuencias cortas de ADN de varias repeticiones ricas en A-T que actúan como iniciador, uniéndose de forma dependiente de ATP a sitios específicos del cromosoma, denominados orígenes de replicación, definiendo el sitio de unión del resto de factores de replicación. Siempre van a existir más orígenes que los que se activan durante la replicación, de forma que estos quedan como orígenes inactivos, que actuarán como posibles sustitutos, en casos de estancamiento de la horquilla de replicación.

En la replicación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han descubierto unas regiones cromosómicas conservadas que dirigen el reclutamiento del ORC, estas son denominadas secuencias de replicación autónomas, de 100-150pb de longitud y ricas en Adenina y Timina. Estas secuencias se dividen en una serie de regiones esenciales, la más importante es el “elemento A”, que consta de 11 pares de bases, y que actúa como secuencia consenso, sitio principal de unión del iniciador ORC. La región B2 es la encargada de desenrollar la doble cadena de ADN y es el sitio de unión de la helicasa replicativa. De hecho, investigaciones sobre el ORC en múltiples organismos han mostrado la gran conservación de sus componentes, aunque sí existen ciertas diferencias en la organización y función específicas entre especies.

Organismos procariontes, como las bacterias, presentan un único origen de replicación, llamado *OriC*, mientras que, en el caso de los eucariotes debido al gran tamaño genómico requieren de decenas, incluso cientos, de miles de diferentes orígenes de replicación a lo largo de la cromatina. Con el objetivo de asegurar que estos genomas grandes puedan duplicarse dentro de un marco de tiempo razonable y a través de un único ciclo de división celular (Huilin y Stillman, 2012). Los genomas bacterianos, al tratarse generalmente de un cromosoma circular pequeño, utilizan un único origen de replicación, *OriC*. Se trata de una región de 240 pb con secuencias ricas en A-T donde tiene lugar la separación de la doble hebra de ADN por acción de la helicasa, denominada *DnaB*. Además, consta de varias copias de una secuencia consenso de 9 pb donde se une la proteína *dnaA* (formando las cajas de *dnaA*), que son responsables de mantener el ADN desenrollado y de la carga de *DnaB* en las hebras simples. Estos dominios funcionales tienen una gran similitud con el ORC de eucariotes.

4.1.1 ORC.

El ORC eucariota es un complejo heterohexámero de naturaleza proteica en forma de media luna con una hendidura central dispuesta para la inserción de la doble cadena de ADN y con múltiples contactos para los factores de iniciación, cuyo ensamblaje y estabilidad depende de la presencia de ATP. Sus subunidades Orc1-6 presentan un orden:

Orc1→Orc4→Orc5→Orc3→Orc2, dispuestas alrededor del anillo central. Todas las subunidades Orc 1-5 presentan una estructura común, con dominio AAA+ (Proteína ATPasa asociada a diversas funciones celulares) en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, en forma de hélice alada (WH) involucrado en la unión del ADN (Fig. 3). Esta actividad ATPasa se inhibe una vez se une a los orígenes de replicación y, posteriormente, es reactivada por el ADN monocatenario (Stillman, 2005). Por su parte, la subunidad Orc6 se dispone fuera del anillo, ocupando en el hueco entre Orc2 y Orc3. Cada unidad de Orc consta de dos dominios de unión a ATP, Walker A y Walker B, que contribuyen a que el complejo rodee el ADN de doble cadena en forma de anillo. Estos dominios están situados hacia el extremo carboxilo en el caso de Orc1 y Orc2, y hacia el extremo amino en Orc3, Orc4 y Orc5. Contribuyendo a la actividad ATPasa se encuentran el Sensor-1 y Sensor-2 que detectan si el ATP o ADP está unido. De todas las subunidades, Orc1 es la principal responsable de la actividad ATPasa del complejo, hasta que es fosforilada en la fase S al ser marcada con ubiquitina por la ligasa Skp2, lo que provoca su degradación.

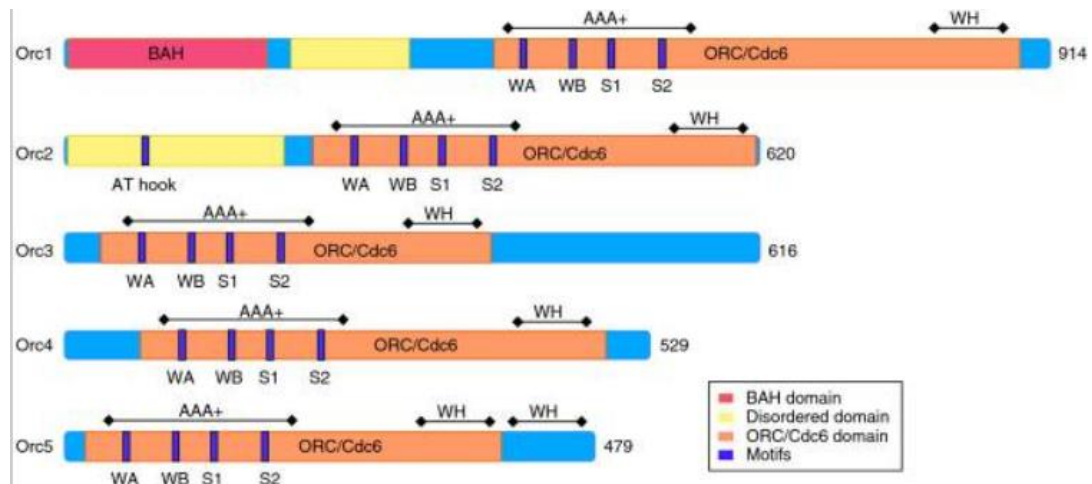


Figura 3. Comparación de las subunidades Orc1-5, cada una de ellas contiene un dominio AAA+ dentro del dominio ORC/ Cdc6 (naranja). Dentro del mismo se encuentra Walker A (WA), Walker B (WB), Sensor-1 (S1) y Sensor-2 (S2). Seguido del dominio de hélice alada (WH) perteneciente al extremo carboxilo terminal. En el caso de Orc1 contiene un dominio adicional BAH (rosa) que participa en el silenciamiento de la transcripción. El número de la derecha indica la cantidad de aminoácidos de cada subunidad. (Duncker y Chesnokov, 2009).

Hay que señalar que Orc6 no tiene ninguna similitud estructural con el resto de subunidades Orc, pero sí presenta una semejanza estructural con el factor de transcripción TFIIB (Liu et al., 2011). Orc6 se une a Orc1-5 en la fase G1/M y se disocia de ellos durante la fase S. Dentro de Orc6 se ha encontrado una mutación de su α hélice en el C-terminal causante del síndrome de Meier-Gorlin, enfermedad que causa enanismo primordial en humanos y que es descrita en este trabajo posteriormente (Bicknell et al., 2011).

Existe una relación clara entre ORC y el tiempo de replicación, en el caso del ORC de *Sacharomyces cerevisiae* se puede dividir, en función del tiempo de replicación, en sitios de replicación temprana y sitios de replicación tardía (Popova et al., 2018). Lo que puede relacionarse con la constante de disociación de ORC, los sitios de replicación tardía presentan una constante de disociación baja, mientras que una constante de disociación alta corresponde a los sitios de replicación temprana. La preferencia de ORC por cadenas de cromatina abierta y de mayor número en sitios de unión explica la relación entre la replicación temprana y las regiones de eucromatina, en comparación con las regiones de heterocromatina donde la replicación suele ser tardía.

4.2 FORMACIÓN DEL COMPLEJO REPLICATIVO.

Continuando con la formación del complejo pre-replicativo (pre-RC), durante la fase M del ciclo celular, se procede a la unión dependiente de ATP de un factor adicional, denominado Cdc6, este factor se une al ORC unido a cromatina lo que provoca una reorientación en el dominio N-terminal de Orc1. Además, esta unión aumenta la especificidad de la interacción entre ORC y el origen de replicación. Cdc6 está compuesto de 4 proteínas de unión a ATP (transportadores ABC), las cuales, presentan una estrecha homología con las subunidades AAA+ de Orc1. Esta unión tiene lugar a través de una interacción directa con Orc1, donde el C-terminal de Cdc6 se dispone entre las subunidades Orc1 y Orc2 (Fig. 4). La presencia de Cdc6 y ATP, provoca que la forma de media luna se transforme en un anillo cerrado con una gran cavidad central (Sun et al., 2012)

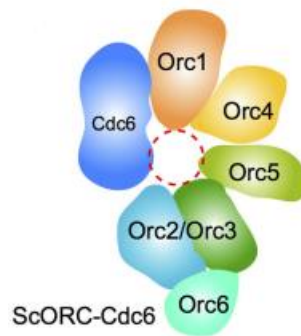


Figura 4. Esquema de la disposición de Cdc6 unido a ORC, donde se puede observar como llena el espacio entre las subunidades Orc1 y Orc2. (Sun et al., 2017)

La función de ORC/Cdc6 es cargar el complejo de mantenimiento de minicromosomas 2-7 (MCM2-7) que constituye el núcleo de la helicasa replicativa y, el cual, se encuentra unido, a su vez, a la proteína de transcripción 1 (Cdt1) dependiente de Cdc10, formando el complejo OCCM (Fig. 5). La hidrólisis del ATP por acción de Cdc6 promueve la unión de Cdt1 al origen por medio de una interacción con Orc6, lo que promueve la carga de la helicasa MCM2-7 en la cromatina. Este Cdt1, por unión al extremo N-terminal de las subunidades Mcm2, Mcm4 y Mcm6, contribuye a la remodelación del complejo MCM2-7, este contacto permite ensanchar la puerta Mcm2/5 para su unión a la cromatina y el cierre posterior del anillo. El heptámero Cdt1-MCM2-7 está unido de forma que el extremo C-terminal de las subunidades MCM2-7 se asocia al dominio WH de ORC, dejando accesible el extremo N-terminal. Este MCM2-7 forma sitios de unión de ATP en las interfaces de sus subunidades para utilizar la energía de la hidrólisis de ATP en la fusión del ADN bicatenario y conducir las hebras monocaterias a través del canal central del anillo Mcm2-7 (Kumar y Remus, 2016). ORC también es encargado de inducir la flexión del ADN para su entrada por la puerta Mcm2/5.

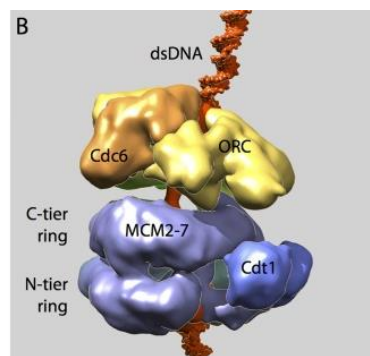


Figura 5. Mecanismo de carga de Cdt1-MCM2-7 en el ADN de doble cadena. Se muestra un nivel inferior compuesto de Cdt1-MCM2-7 y un nivel superior con ORC-Cdc6 (Sun et al., 2017).

Dentro de cada subunidad Mcm se disponen una ATPasa central flanqueada por un dominio N-terminal y un dominio C-terminal, conocidos como “NTD” y “CTD”, respectivamente (Fig.4). El conjunto presenta una disposición en espiral con un espacio en la interfaz Mcm2/Mcm5, en la cual se inserta el ADN de doble cadena, quedando el anillo parcialmente cerrado alrededor del mismo. Dentro del dominio NTD existen tres subdominios conservados, en el que se distinguen las regiones NTD-A, -B y -C (Figura 6) (Li et al., 2015). El dominio NTD-A forma un paquete en forma de hélice helicoidal similar a las proteínas de unión al ADN. En el caso del subdominio NTD-B, a través de sus dedos de Zinc, es responsable de la estabilidad del hexámero MCM2-7. El tercer dominio NTD-C presenta un pliegue de unión a oligonucleótidos (OB) que participa, a través de interacciones hidrofóbicas, en los contactos con el ADN, así como en la oligomerización de MCM2-7 en la estructura hexamérica, terminando en la horquilla N-terminal (NtHp). El dominio C-terminal (CTD) supone el motor de la helicasa, donde se diferencia la región WA, los bucles de la horquilla β (H2i), la región WB, el presensor 1 de unión al ADN (PS1) y un dedo de arginina (RF). Ambos dominios pueden incluir extensiones para múltiples uniones a diversas proteínas que participan en la replicación. La interacción de MCM2-7 con el ADN tiene lugar a través de la inserción de la horquilla β que facilita el contacto de la proteína ATPasa con el ADN para su actividad posterior.

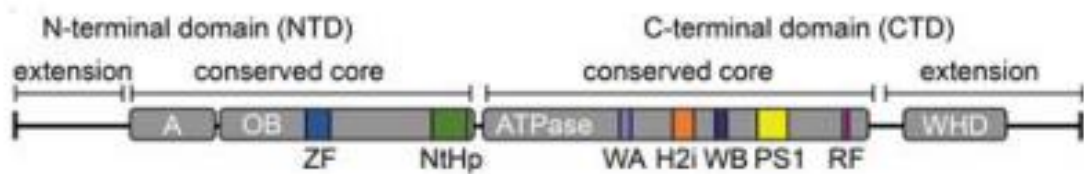


Figura 6. Estructura de los dominios de la proteína Mcm, en cuyo extremo N-terminal se encuentran los dominios NTD –A, -B y –C donde se encuentran el pliegue de unión de oligonucleótidos (OB), la horquilla de Zinc (ZF) y la horquilla N-terminal. Seguido del extremo C-terminal que constituye el motor de la helicasa con el dominio de unión Walker A (WA) a ATP, Walker B (WB) y el dedo de arginina (RF). Entre las interfaces de los dominios Walker se encuentran el presensor 1 de unión al ADN (PS1) y los bucles de inserción de la horquilla β en la hélice (H2i). (Riera et al.,2017)

Aunque MCM2-7 constituye el núcleo de la helicasa, por sí solo no es capaz de cumplir su función, y a través de su unión con diferentes factores forma los complejos OCCM \rightarrow OCM \rightarrow DH \rightarrow CMG que acaban formando el replisoma. La salida de Cdc6 y Cdt1 de OCCM, impulsada por la hidrólisis de ATP, se asocia con el cierre del primer anillo MCM2-7 (Ticau et al., 2017). La unión de un nuevo Cdc6 al complejo ORC-MCM2-7 supone un intermedio transitorio (complejo

OCM) para el reclutamiento del segundo heptámero Cdt1-MCM2-7, también impulsado por la hidrólisis de ATP. En el OCCM el ADN de doble cadena ya está dentro del canal central de MCM2-7, aunque esta entrada queda todavía parcialmente abierta entre Mcm2 y Mcm5. La liberación del segundo Cdc6 seguida de ORC provoca el cierre del segundo anillo MCM2-7 alrededor del ADN, dando como resultado un complejo estable (Complejo de pre-replicación o MCM2-7 DH). Cdc6 funciona como un factor de control de calidad, cuya actividad ATPasa asegura que los complejos MCM2-7 defectuosos o incompletos sean eliminados de los orígenes de replicación (Kang y Warner, 2014).

El complejo MCM2-7 DH carece de capacidad de hidrolizar el ATP y de desenrollar el ADN, pero sí tiene la capacidad de deslizarse por la cadena de ADN hasta sitios que no contienen el origen de replicación. Esto es debido a que la puerta Mcm2/5 se encuentra bloqueada hasta su activación durante la transición G1/S (Riera et al., 2017). Una vez situados, los hexámeros MCM sufren una inclinación visible o giro entre los dominios NTD y CTD mediados por sus dedos de Zinc (ZF), para que estos puedan interactuar cara a cara y formar el hexámero doble. La carga de múltiples DH en muchos orígenes de replicación es una forma de almacenar grandes cantidades de la helicasa replicativa inactiva antes de que tenga lugar la síntesis de ADN (Alver et al., 2014).

Estos hexámeros MCM2-7 DH constituyen el núcleo de la helicasa en estado inactivo, no es hasta la fase S del ciclo celular, cuando se desencadena un aumento de los niveles de la proteína quinasa DDK dependiente de Dbf4 y de la quinasa dependiente de ciclina (CDK). De esta forma el doble hexámero MCM2-7 actúa como plataforma objetivo de DDK para fosforilar las subunidades Mcm2, Mcm4 y Mcm6 permitiendo la unión lateral de cada hexámero MCM2-7 con una copia del ciclo de división celular (Cdc45) y el complejo tetramérico go-ichi-ni-sa (GINS) para formar dos organizaciones de once proteínas denominadas CMG (Fig.7) que constituyen la forma activa de la helicasa. La DDK se forma por unión de la quinasa Cdc7 con el cofactor Dbf4, bloqueando la actividad autoinhibidora de Cdc7. La acción reguladora de la quinasa dependiente de ciclina, no solo es importante en la licencia de origen de replicación y en la activación del complejo DH, también resulta fundamental para evitar el inicio de un nuevo ciclo de replicación tras la síntesis del ADN, a través de la fosforilación de las subunidades ORC, CDC6 y Cdt1. Conduciendo a la degradación o exclusión de estos, evitando la concesión de nuevas licencias de replicación. Cdt1 también es regulado por la proteína Geminin (GMNN) que actúa impidiendo la unión de Cdt1 con MCM2-7.

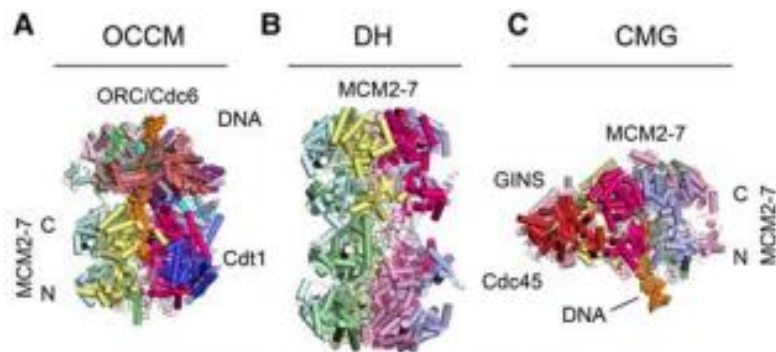


Figura 7. Cambios estructurales desde el complejo OCCM donde tiene lugar la unión del primer MCM2-7, seguido de la asociación del segundo MCM2-7 cara a cara para formar el complejo DH inactivo. Por último, la activación del mismo a través el tetrámero GINS y Cdc45. (Riera y Barbon, 2017)

A medida que las células avanzan en la fase S, para completar la formación del complejo CMG, se ensamblan el resto de factores de activación, tales como la Proteína A de replicación (RPA), la subunidad MCM10 para la separación de las dos hélicas de CMG, la Polimerasa α o primasa, la Polimerasa épsilon (Pol ϵ) que actúa sobre la hebra principal, la Polimerasa delta (Pol δ) responsable de la hebra rezagada y el factor CTF4. Pol- ϵ es un complejo de cuatro proteínas compuesto por una subunidad catalítica Pol2, que se asocia al extremo C-terminal de CMG través del trímero CTF4 y cuyas subunidades se encuentran entrecruzadas con Mcm2, Mcm5 y Mcm6 (Sun et al., 2017). En esta nueva agrupación, tiene lugar una reordenación del extremo NTD de la mitad de los anillos Mcm (3,5 y 2), los cuales, se giran hacia la izquierda y las restantes hacia la derecha, lo que reconfiguraría el canal central de la hélica (Riera et al., 2017).

El reclutamiento de estos factores también está regulado por acción de la quinasa CDK, mediante la fosforilación de la subunidad Mcm2, provoca la apertura del anillo CMG y debilita la unión Mcm2/5 para facilitar el paso de la doble cadena de ADN. La fosforilación dependiente de DDK de MCM2-7 es importante para facilitar el reclutamiento de los factores Sld3 y Sld2, que forman el complejo DPB11 necesario para estabilizar la unión de Cdc45 a MCM2-7 (Masai et al., 2006). El complejo CMG presenta dos conformeros distintos según la organización de sus subunidades, mediante la transición de un estado inactivo a un estado relajado/activo a partir de la interacción de los dominios NTD con los factores GINS y Cdc45, acoplado al reordenamiento traslacional y rotacional de las subunidades Mcm6 y Mcm4 del anillo resultado de la alteración de la puerta Mcm2/5.

En cada origen, se cargan uno o más MCM2-7, pero solo una minoría se transforma en CMG activos durante la fase S; quedando los restantes como “orígenes latentes”, que se activan solo si una bifurcación de replicación proximal se convierte en terminal.

4.3 PROCESO DE REPLICACIÓN CELULAR.

Tanto Cdc45 como el complejo GINS son coactivadores de la helicasa, cuya unión completa su activación. De forma que el movimiento de CMG a través de su extremo N-terminal a lo largo de la doble cadena de ADN en sentido 3'-5' provoca la separación de las cadenas utilizando la energía de hidrólisis de ATP procedente de las interfaces Mcm3/5 y Mcm5/2. De esta forma sufre un cambio conformacional en el que cada complejo CMG rodea una hebra de ADN monocatenario, excluyendo la plantilla de la hebra retrasada fuera de la estructura. Son los dominios WH de Mcm5 y Mcm6, mediante reordenamiento, los responsables de la constricción del poro donde se encuentra el ADN de doble cadena hasta quedar en un tamaño tan pequeño donde es imposible albergarlo. En la replicación de las cadenas monocatenarias, las ADN polimerasas catalizan en sentido 3'-5' el enlace fosfodiéster entre el grupo hidroxilo 3' de la hebra y el grupo fosfato 5' del nuevo nucleótido.

Una vez excluida estéricamente la cadena rezagada hacia la superficie externa de MCM, es rodeada de la proteína de replicación A (RPA) y lista para que la Pol α pueda colocar el cebado. El complejo polimerasa primasa α se une a través del factor Ctf4 que actúa como puente, unido al extremo N-terminal de GINS. Este complejo con actividad ARN primasa y ADN polimerasa completa la síntesis de 7-10 nucleótidos de ARN seguidos de 10-12 nucleótidos de ADN antes de que ocurra el cambio de polimerasas (Kumar, 2016) (Fig. 8). En el caso de la hebra principal, esta pasa a través de un canal cargado positivamente donde establece interacción con el bucle H2i de Mcm2/3/5/6 para proceder a la acción de Pol- ϵ a través de su dominio N-terminal en sentido 3'-5'. Tras esto la puerta de entrada de ADN en Mcm2/5 es bloqueada por GINS y Cdc45, quedando totalmente cerrada. La estructura antiparalela del ADN de doble cadena, provoca que una de las hebras se sintetice en la misma dirección que la horquilla, siendo el caso de la hebra principal. Mientras que la hebra rezagada crece en dirección contraria a la horquilla en fragmentos cortos que posteriormente se procesan y se ligan.

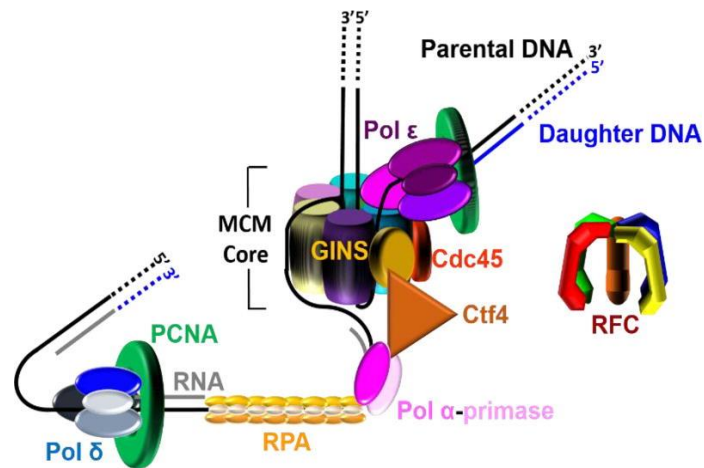


Figura 8. Arquitectura del replisoma con posibles rutas de las cadenas de ADN, donde la hebra principal recorre el interior del complejo con interacciones con las subunidades Mcm, mientras que los enlaces de la hebra retrasada tienen lugar en la superficie N-terminal (Hedglin y Benkovic, 2017).

La replicación de la hebra rezagada consta de varias fases: cebado inicial por acción de ADN primasa, alargamiento en sentido 5' → 3' del cebador ARN por la Pol α, cambio de Pol α a Pol δ, alargamiento del fragmento de Okazaki (100-200 nucleótidos) por Pol δ y maduración a través de Pol δ, FEN1 y ADN ligasa. La presencia de la Pol δ tras la actividad de la Pol α se debe a su limitada progresión en plantillas largas y su carente actividad exonucleasa 3' → 5' para corregir los errores, por lo que resulta fundamental la participación exonucleasa de Pol δ en la corrección. Una vez completada la actividad Polα es inhibida por medio de su disociación a partir del factor RPA en un proceso dependiente de ATP, para proceder al ensamblaje del antígeno nuclear celular en proliferación (PCNA) en el extremo del cebador. Su asociación en la unión cebador-fragmento de Okazaki es catalizada por las enzimas del factor de replicación C (RFC) a partir de la energía de hidrólisis del ATP. Se carga un anillo de PCNA en cada fragmento de Okazaki de la hebra rezagada, mientras que se utiliza un único anillo PCNA en la hebra principal (Hedglin y Benkovic, 2017). La interacción de PCNA y Pol δ forma una abrazadera deslizante con una cavidad central lo suficientemente grande como para albergar el ADN bicatenario de nueva síntesis, esto continúa 1-2 nucleótidos adicionales en el extremo 5' con el fin de eliminar los cebadores iniciales a través de la actividad 3' → 5' exonucleasa del complejo FEN1 y Pol δ (Burgers, 2009). Una vez degradado todo el ARN, la ADN ligasa es responsable de la unión ADN-ADN. Dentro del segmento de 20 nucleótidos sintetizados suponen zona crítica de posible mutación, resultando imprescindible la acción de la Pol δ en la corrección de los errores que tengan lugar en la misma.

En el caso de la hebra principal la síntesis en forma continua es mediada únicamente por acción de Pol-ε. La replicación de cada hebra continúa de forma independiente hasta que las horquillas se acercan demasiado entre sí hasta su encuentro donde no se produce un estancamiento de horquillas, sino que los complejos CMG se desvían entre sí liberándose del ADN a través de un mecanismo de poliubiquitinación de la subunidad Mcm7 (Kang et al., 2018), y tiene lugar la fusión de las hebras de ambas cadenas (Fig. 9).

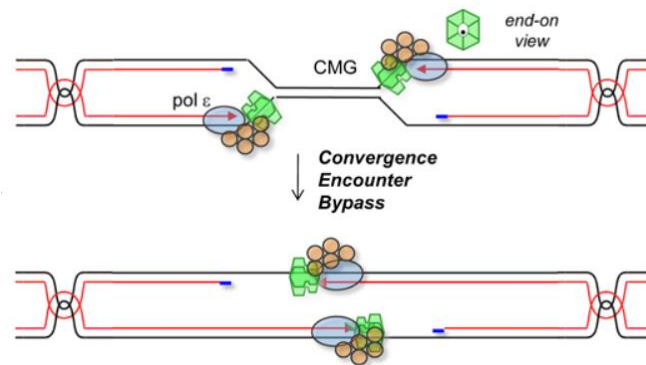


Figura 9. Modelo terminación de la replicación en eucariotas. El acercamiento entre las bifurcaciones produce la fusión de las cadenas complementarias y desviación de los complejos CMG, que continúan translocándose hasta alcanzar un fragmento de Okazaki y su procesamiento (Dewar, 2017).

4.4 FUNCIONES NO REPLICATIVAS DE ORC.

El papel de ORC, no solo implica funciones replicativas, a pesar de ser la función más estudiada, también se ha demostrado su participación en la inhibición de la transcripción y formación de heterocromatina, condensación cromosómica, desarrollo neuronal... De esta forma se explica el papel de estas proteínas, no solo en la síntesis del ADN, sino también como centro de coordinación del ciclo celular y de la síntesis del ADN.

Una vez completada la replicación del ADN en la fase S, las subunidades Orc1-4 se localizan en los centrosomas, donde se ha mostrado que la ausencia de Orc1 provoca defectos en la división del centrosoma, provocando una replicación excesiva de los centriolos. Los centriolos tienen la capacidad de dividirse de forma dependiente a la quinasa del complejo Ciclina A / CDK2 y Ciclina E / CDK2. En este caso, es la región N-terminal de la subunidad Orc1, denominada dominio CID (dominio inhibidor de CDK), la que actúa como reguladora de la división del centrosoma durante la fase G1 mediante unión e inhibición a los complejos ciclinas, de esta forma, se impide un segundo ciclo de duplicación del centrosoma limitándolo a una sola ronda por ciclo celular (Popova et al., 2018).

Durante la metafase, las cromátidas hermanas resultantes se unen entre sí mediante el complejo de cohesina hasta alcanzar la anafase, cuando se separan y migran hacia los polos de la célula. La cohesina forma un anillo de múltiples subunidades encargado de rodear a las cromátidas hermanas. La implicación de ORC se ha descubierto a través de dos mecanismos diferentes en levaduras y eucariotas superiores. Estudios en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* describen el papel de la subunidad Orc5 en el reclutamiento de los componentes de la cohesina en las regiones centroméricas de los cromosomas (Popova et al., 2018). Este reclutamiento coincide con la formación del complejo de replicación en la fase G1 del ciclo celular, pero solo tiene lugar en condiciones en las que la carga de la helicasa se encuentra inhibida, lo que explicaría la implicación independiente del correspondiente ORC en la captación de la cohesina con su actividad en la replicación del ADN. Mientras que, en el caso de *Saccharomyce cerevisiae*, ORC actúa de manera independiente a la cohesina, ya que aún en presencia de esta, la ausencia de Orc2 provoca una inhibición de la unión de las cromátidas, o incluso la existencia de mutaciones en la cohesina no alteran la cohesión de las cromátidas hermanas debido a la participación de las secuencias de ORC en el genoma. No obstante, todavía es necesario realizar más estudios para conocer si ORC media directamente o si se requiere de la actuación de factores adicionales.

Dentro de la regulación de la división celular, el papel de ORC tiene lugar a través de la interacción del extremo N-terminal de Orc6 y la proteína septina. Esta proteína contiene una región GTPasa y es capaz de formar complejos heteroméricos muy estructurados, su función es actuar como andamios en el reclutamiento y organización de proteínas de los dominios membranales hasta provocar un estrangulamiento en la célula en división, que actúa como barrera de difusión y en el reclutamiento de los factores implicados en la morfogénesis. La subunidad Orc6 es responsable de estimular la actividad GTPasa de la septina y provocar la desconexión de los filamentos formados para la separación definitiva de ambas células (Scholefield y Veening, 2011).

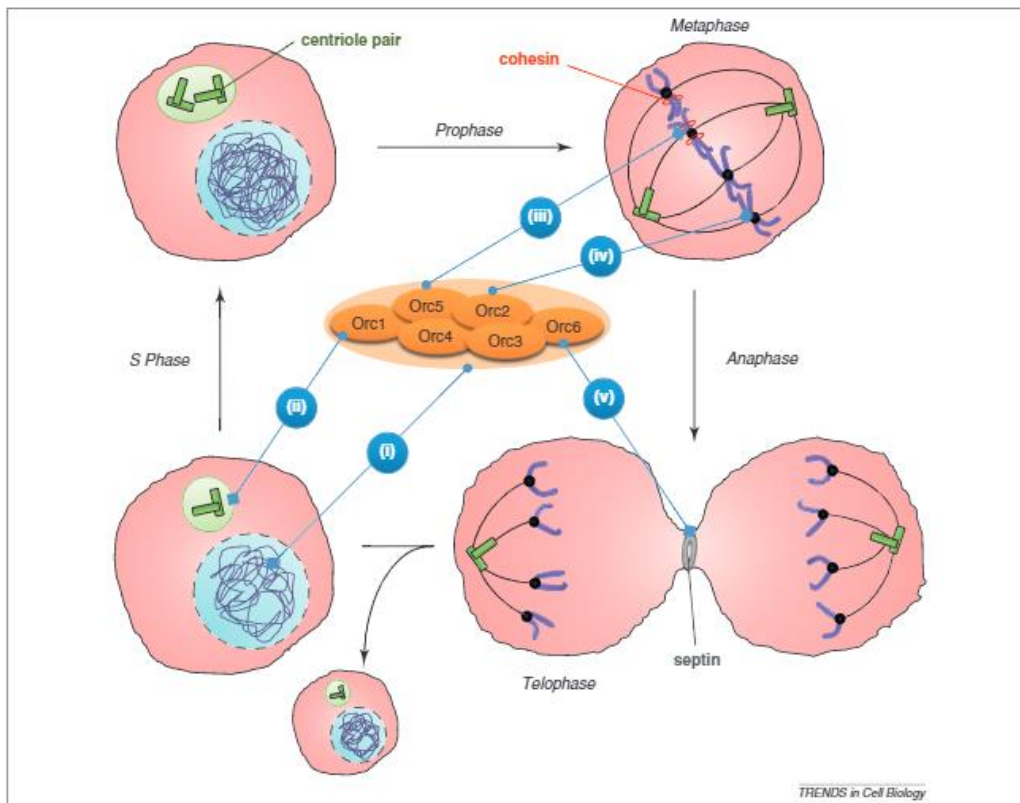


Figura 10. Esquema de las distintas funciones de ORC a lo largo del ciclo celular. Durante la fase S es el encargado de iniciar la replicación del ADN (i) y regular la duplicación del centrosoma (ii). Una vez en metafase, facilita la cohesión de las cromátidas hermanas de forma dependiente a la cohesina (iii) o independiente a esta (iv). Para finalizar con su implicación en la telofase, participa en la citocinesis de la célula por interacción con la proteína septina (v). Además del papel de ORC en la segregación cromosómica durante la mitosis. (Scholefield y Veening, 2011)

En cuanto a la segregación cromosómica, se ha sugerido la participación de ORC en el establecimiento de las proteínas de silenciamiento de transcripción. Debido al nivel de empaquetamiento de la cromatina, resulta fundamental la actuación de las proteínas modificadoras de histonas para permitir el acceso de los factores de transcripción génica. Existen múltiples tipos de modificadores de histonas, en este caso, se hace referencia a HMR y HML, las cuales son dianas del factor SIR (Silent Information Regulator) responsable del silenciamiento e inhibición de la transcripción en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, para esta unión resulta indispensable la presencia de la subunidad Orc1 unida a través del extremo N-terminal, encargada de reclutar al factor de heterocromatina SIR, el cual es el responsable del reconocimiento para la unión de las proteínas HMR y HML. Esta función se ha conservado a nivel eucariota, la localización de ORC en células eucariotas superiores, como *Drosophila melanogaster* y *Xenopus laevis*. En este caso la interacción tiene lugar a nivel cromosómico

entre la subunidad Orc1, por su dominio N-terminal, con las proteínas unidas a heterocromatina (HP1) localizada en los centrómeros. A través de esta interacción se facilita el reclutamiento de HP1, el ensamblaje del complejo ORC/HP1 a la cromatina y, por ende, el papel de HP1 en el establecimiento y compactación de la cromatina. La ausencia de ORC durante la mitosis da como resultado una alteración de la localización de HP1 y en consecuencia la formación de cromosomas irregularmente condensados (Rasanth et al., 2010). Esta coevolución de las funciones de ORC pueden deberse a la necesidad de replicar diferentes zonas del cromosoma eucariota en distintos momentos de la fase S.

A nivel neuronal, la disposición de varias de las subunidades ORC en el citoplasma de las neuronas supone un nuevo enfoque. Se encuentran niveles altos de las subunidades centrales Orc2-5, mientras que la subunidad Orc6 está en una concentración moderada y, lo más característico, es la ausencia de Orc1 en tejidos cerebrales adultos, como la corteza, hipocampo y cerebelo. La localización de la proteína Orc3 en las dendritas y la unión de las subunidades ORC con las membranas neuronales de los cerebros postnatales sugieren que puede estar involucrada en el desarrollo dendrítico (Huang y Zang, 2005). Mediante su actividad ATPasa actúa regulando la formación de las ramas dendríticas y de las neuronas, de forma similar a su papel en la replicación, donde su función principal es traducir cada de activación de la quinasa CDK en una nueva copia del genoma. A nivel neuronal se podría especular la presencia de ondas similares a CDK responsables de desencadenar la actividad de ORC y regular la formación de las ramas y columnas dendríticas.

4.5 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON ORC.

La complejidad del proceso de replicación del ADN, tanto en sus múltiples etapas, como en la gran variedad de factores proteicos que participan, provoca que posibles alteraciones en alguna de las proteínas de replicación puedan resultar en defectos en la licencia del origen, en la activación de la replicación o en alguna de las funciones no replicativas mencionadas anteriormente, originando enfermedades genéticas de distinta sintomatología.

El síndrome de Meier-Gorlin (MGS) es conocido como síndrome de microtia y estatura baja, fue descrito por primera vez en 1959 por Meier y su equipo, y el segundo caso descubierto fue en 1975 por Gorlin. Es un trastorno de enanismo primordial autosómico recesivo poco común caracterizado por microtia (orejas pequeñas), aplasia/hipoaplasia de rótula y estatura baja, siendo estas tres características clínicas consideradas la triada central en el MGS. Además de la triada clínica, los pacientes suelen presentar rasgos faciales característicos como labios

carneosos, microstomía, retrognatia y micrognatia (de Munnik et al., 2015). La primera hipótesis se relacionó con una alteración en los genes que dirigen el desarrollo óseo, pero no ha sido hasta 2011 cuando se han identificado como causa principal las mutaciones en diversos factores del complejo de pre-replicación, tales como Orc1, Orc4, Orc6, Cdt1 y Cdc6.

Centrándonos en las mutaciones de Orc1 y Orc4 como las causantes de los defectos de crecimiento más graves. En cuanto a la mutación en la subunidad Orc1 provoca una reducción de la afinidad con la cromatina, disminución en el ensamblaje de pre-RC y, en consecuencia, una activación deficiente de los orígenes de replicación y una progresión más lenta de la fase S del ciclo celular. Las mutaciones de cambio de sentido E127G y R105Q tienen lugar dentro del dominio BAH (Dominio de homología adyacente al bromo) del extremo N-terminal de Orc1, que provocan una interrupción en la interacción con la proteína H4L20me (Histona H4 di-metilada), la cual resulta indispensable para el ensamblaje de ORC y la progresión del ciclo celular (Fig. 10).

Un segundo mecanismo de alteración del crecimiento celular, tiene lugar a través de la mutación R105Q que también puede ocurrir en el dominio CID (dominio inhibidor de CDK) de Orc1, de esta forma, se anula el efecto inhibidor de Orc1 sobre la ciclina quinasa E-CDK2 implicada en la segregación de los cromosomas y, en consecuencia, provoca una reduplicación de los centrosomas y una proliferación celular más lenta (Shen, 2013).

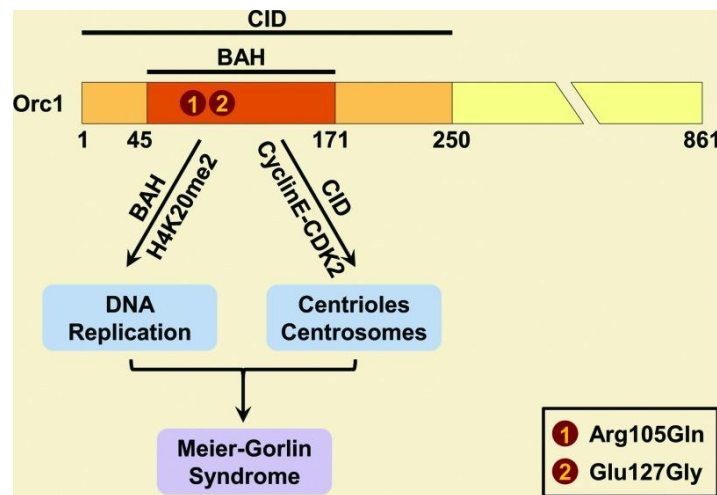


Figura 11. Esquema de las mutaciones de cambio de sentido E127G y R105Q que tienen lugar en el dominio BAH y dominio CID de Orc1. La desregulación de Orc1 por ambas vías resulta en un crecimiento reducido característico de MGS (Shen, 2013).

Mientras que en el caso de la subunidad Orc4, la mutación que ocurre es también de cambio de sentido tipo Y174C, dentro del dominio AAA+ fundamental en el proceso de replicación. De esta forma se deteriora la función del complejo pre-RC, disminuyendo la proliferación celular y, por tanto, el crecimiento en general (Shen, 2013). Actualmente, existen muchos aspectos de este trastorno que se desconocen, por lo que es necesario un mayor estudio del papel de los defectos genéticos asociados al complejo de pre-replicación para alcanzar un diagnóstico molecular en un mayor porcentaje de pacientes y a la hora de determinar el riesgo de recurrencia.

El virus Epstein-Barr (VEB) perteneciente a la familia de herpes virus, cuya transmisión tiene lugar a través de gotas salivales, infecta a un 90% de la población mundial y es capaz de permanecer en estado latente durante un periodo indefinido. Durante su replicación en células infectadas, la unión de la proteína EBNA1 (antígeno nuclear 1 de Epstein-Barr) con su origen de replicación oriP, requiere de la subunidad Orc2 de células humanas, captada por EBNA1, con el objetivo de secuestrar toda la maquinaria de replicación del huésped. El reclutamiento de Orc2 está mediado por las regiones LR1 y LR2 (secuencias ricas en arginina y glicina) del dominio N-terminal de EBNA1. Lo que puede suponer un nuevo enfoque en la búsqueda de un tratamiento para erradicar la latencia de VEB. Un mecanismo similar ha sido hallado en el caso del virus de herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV), que es capaz de infectar a células tumorales y permanecer en ellas en estado latente. En este caso, el herpesvirus KSHV utiliza una secuencia TR (secuencia de repetición terminal) como su propio origen y la proteína LANA (antígeno nuclear asociado a la latencia) en el reclutamiento de ORC y, con ello, de la maquinaria de replicación del huésped, como ocurre en VEB (Shen, 2013).

Dentro de las mutaciones internas o por patógenos que puede sufrir el cuerpo humano, entre las más graves se encuentran aquellas producidas en ORC. Como complejo fundamental en la replicación, hay que garantizar la copia exacta e ideal del material genético en las células hijas. Mutaciones o alteraciones en este punto pueden dar lugar a síndromes de inestabilidad genómica, como el cáncer, diabetes... A pesar de que existen puntos de control del ciclo de replicación para detectar los posibles errores que puedan tener lugar y detener el proceso, para repararlos o marcar a la célula para la muerte celular programada, puede ocurrir que algún error no sea detectado pudiendo provocar inestabilidad en el genoma. En el caso de los eucariotas, al carecer de secuencias de origen de replicación específicas en el ADN, como

ocurre en las bacterias, resulta muy difícil buscar un agente inhibidor enfocado hacia los orígenes de replicación. La identificación de moléculas vulnerables en la licencia de origen supone un objetivo claro de fármacos con fines de diagnóstico o terapéuticos para la detección y regulación de los errores de la replicación.

A la hora de buscar soluciones para células que portan uno o varios genes defectuosos, la opción de inhibir la replicación para evitar la multiplicación de estas células, considerando el primer punto objetivo en la selección del origen por ORC. De forma que, alterando la concesión de la licencia de origen, se consigue perturbar el inicio de la replicación y alcanzar la muerte de la célula.

5. CONCLUSIONES.

- La licencia de replicación implica el reconocimiento oportuno y fusión de ORC en los orígenes cromosómicos para proceder al ensamblaje y formación de las helicasas replicativas.
- El papel de ORC no se limita únicamente a la replicación del ADN, lo que implica su participación en diversos procesos celulares. Algunos relacionados con la división celular, lo que explica su función en la regulación y coordinación de todos los procesos necesarios para la división celular, y así mismo en el propio ciclo celular.
- La determinación de las mutaciones en enfermedades asociadas a ORC, conlleva a cuestionarse como enfoque terapéutico el reemplazo de los genes mutados por medio de la terapia génica. En el caso de enfermedades mediadas por patógenos que utilizan la maquinaria de replicación celular del hospedador, habría que cuestionarse utilizar estas características únicas de los patógenos en la eliminación de su latencia.
- Examinar el concepto de inhibición de ORC como ruta para prevenir o impedir la replicación del ADN cromosómico, a través del desarrollo de fármacos de base estructural a ORC, lo que quizás podría ser útil a la hora de impedir el inicio de la replicación. A partir de la tecnología de clonación de proteínas se podría dilucidar la estructura en la investigación de agentes terapéuticos de afinidad con el objetivo de reprogramar las licencias de replicación en casos de inestabilidad genómica, e incluso el cáncer.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Bicknell LS, Bongers E, Leitch A, Brown S, Schoots J, Harley ME, Aftimos S, Al-Aama JY, Bober M, Brown P, van Bokhoven H, Dean J, Edrees AY, Feingold M, Fryer A, Hoefsloot LH, Kau N, Knoers N, MacKenzie J, Opitz JM, Sarda P, Ross A, Temple IK, Toutain A, Wise CA, Wright M, Jacks AP. Mutations in the pre-replication complex cause Meier-Gorlin syndrome. 2011; 43(4): 356-359.
- Burgers PM. Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem.* 2009; 284(7): 4041–4045.
- Costa A, Hood IV, Berger JM. Mechanisms for Initiating Cellular DNA Replication. *Annu Rev Biochem.* 2013; 82: 25–54.
- Dewar JM, Walter JC. Mechanisms of DNA replication termination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017; 18(8): 507–16.
- Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, Yu M, Lin J, Cui Q. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(6): 1960.
- Duncker BP, Chesnokov IN, McConkey BJ. The origin recognition complex protein family. *Genome Biol.* 2009; 10(3): 214.
- Ekundayo B, Bleichert F. Origins of DNA replication. *PLoS Genet.* 2019; 15(9): 1–21.
- Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15(3): 276–80.
- Hedglin M, Benkovic SJ. Eukaryotic Translesion DNA Synthesis on the Leading and Lagging Strands: Unique Detours Around the Same Obstacle. *Chem Rev.* 2017; 117(12) :7857–7877.
- Huang Z, Zang K, Reichardt LF. The origin recognition core complex regulates dendrite and spine development in postmitotic neurons. *J Cell Biol.* 2005; 170(4): 527–535.
- Schafer K.A. The cell cycles: A review. *Wyeth-Ayerst Res.* 1998; 35(6): 461–478.
- Kang S, Kang MS, Ryu E, Myung K. Eukaryotic DNA replication: Orchestrated action of multi-subunit protein complexes. *Mutat Res.* 2018; 809: 58–69.
- Kang S, Warner MD, Bell SP. Multiple Functions for Mcm2-7 ATPase Motifs During Replication Initiation. *Mol Cell.* 2014; 55(5): 655–665.

Kumar C, Remus D. Eukaryotic replication origins: Strength in flexibility. *Nucleus*. 2016; 7(3): 292–300.

Li H, Stillman B. The origin recognition complex: A biochemical and structural view. *Subcell Biochem*. 2012; 62: 37–58.

Li N, Zhai Y, Zhang Y, Li W, Yang M, Lei J, Tye BK, Gao N. Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature*. 2015; 524(7564) :186–191.

Liu S, Balasov M, Wang H, Wu L, Chesnokov IN, Liu Y. Structural analysis of human Orc6 protein reveals a homology with transcription factor TFIIB. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(18): 7373–7378.

Lomanto LD, Ortiz OL, Bretón CO, Gómez AI, Mesa VM. El ciclo celular. *Medunab*. 2003; 6(16): 21–29.

Masai H, Taniyama C, Ogino K, Matsui E, Kakusho N, Matsumoto S, Kim JM, Ishii A, Tanaka T, Kobayashi T, Tamai K, Ohtani K, Arai K. La fosforilación de MCM4 por la cinasa Cdc7 facilita su interacción con Cdc45 sobre la cromatina. *J Biol Chem*. 2006; 281 : 39249–39261

de Munnik SA, Hoefsloot EH, Roukema J, Schoots J, Knoers NV, Brunner HG, Jackson AP, Bongers EM. Meier-Gorlin syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2015; 10(1): 114.

Popova VV, Brechalov AV, Georgieva SG, Kopytova DV. Nonreplicative functions of the origin recognition complex. *Nucleus*. 2018; 9(1): 460–473.

Rasanth SG, Shen Z, Prasanth KV, Stillman B. Human origin recognition complex is essential for HP1 binding to chromatin and heterochromatin organization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(34): 15093–15098.

Riera A, Barbon M, Noguchi Y, Reuter LM, Schneider S, Speck C. From structure to mechanism— understanding initiation of DNA replication. *Genes Dev*. 2017; 31(11): 1073–1088.

Gasser S. Once and Only Once. *Cell*. 2019; 177(3): 495–498.

Scholefield G, Veening JW, Murray H. DnaA and ORC: More than DNA replication initiators. *Trends Cell Biol*. 2011; 21(3): 188–194.

Stillman B. Origin recognition and the chromosome cycle. *FEBS Letters*. 2005; 579: 877–884.

Sun J, Kawakami H, Zech J, Speck C, Stillman B, Li H. Cdc6-induced Conformational Changes in ORC Bound To Origin DNA Revealed by Cryo-Electron Microscopy. *Structure*. 2012; 20(3): 534–544.

Sun J, Yuan Z, Bai L, Li H. Cryo-EM of dynamic protein complexes in eukaryotic DNA replication. *Protein Sci*. 2017; 26(1): 40–51.

Ticau S, Friedman LJ, Champasa K, Corrêa IR Jr, Gelles J, Bell SP. Mechanism and Timing of Mcm2–7 Ring Closure During DNA Replication Origin Licensing. *Nat Struct Mol Biol*. 2017; 24(3): 309–315.

Shen Z. The origin recognition complex in human diseases. *Biosci Rep*. 2013; 33(3): 475–483.

Zetterberg A, Larsson O, Wiman O, Klas G. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol*. 1995; 7(6): 835–842.