

FIGURA 27.17 Una ribozima en cabeza de martillo da lugar a una estructura terciaria con forma de V, en la cual, el tallo 2 se inserta sobre el 3; entre los tallos 2, 3 y 1 yace el centro catalítico que contiene un ion magnesio que inicia la reacción hidrolítica.

que se hayan sido usadas para demostrar que la introducción de las moléculas apropiadas de RNA en una célula permite que la reacción enzimática ocurra *in vivo*. Una ribozima diseñada en esa forma, proporciona esencialmente una actividad similar a la de restricción, altamente específica, dirigida contra un RNA diana. Al poner la ribozima bajo el control de un promotor regulado, se puede usar en la misma forma que las cadenas no codificantes (por ejemplo), específicamente para eliminar la expresión de un gen diana en circunstancias definidas.

27.10 La edición de RNA ocurre en bases individuales

Concepto principal

- Los receptores de apolipoproteína B y glutamato presentan desaminaciones específicas de sitio catalizadas por desaminasas de citidina y adenosina, que cambian la secuencia de codificación.

Un axioma primordial de la biología molecular es que la secuencia de un RNAm sólo puede representar lo que está codificado en el DNA. El dogma central contemplaba una relación lineal en la cual una secuencia continua de DNA se transcribía en una de RNAm, que a su vez, se traducían directamente en una proteína. La presencia de genes interrumpidos y la eliminación de intrones por corte y empalme del RNA introduce un paso adicional en el proceso de expresión génica, las secuencias de codificación

(exones) del DNA deben ser reconectadas en el RNA, proceso que sigue siendo de transferencia de información, en el cual la secuencia de codificación real del DNA se mantiene sin cambios.

Los cambios en la información codificada por el DNA ocurren en circunstancias excepcionales, sobre todo en la generación de nuevas secuencias que codifican inmunoglobulinas en mamíferos y aves. Dichos cambios tienen lugar específicamente en las células somáticas (linfocitos B), donde se sintetizan las inmunoglobulinas (véase Cap. 23, Diversidad inmunitaria). Durante el proceso de reconstrucción de un gen de inmunoglobulina, en el DNA de un individuo se genera nueva información, y la información codificada en el DNA es cambiada por una mutación somática. La información del DNA sigue siendo transcrita fielmente en el RNA.

La edición del RNA es un proceso en el que la información cambia en el ámbito del RNAm; es revelada por circunstancias en que la secuencia de codificación de un RNA difiere de la del DNA a partir del cual fue transcrito. La edición del RNA ocurre en dos circunstancias diferentes, cada una por diferentes causas. En células de mamífero se dan casos de sustitución de una base individual del RNAm que produce un cambio en la secuencia de la proteína codificada. En las mitocondrias de tripanosomas los cambios son más extensos en los productos de transcripción de varios genes, en cuyo caso se agregan o eliminan bases sistemáticamente.

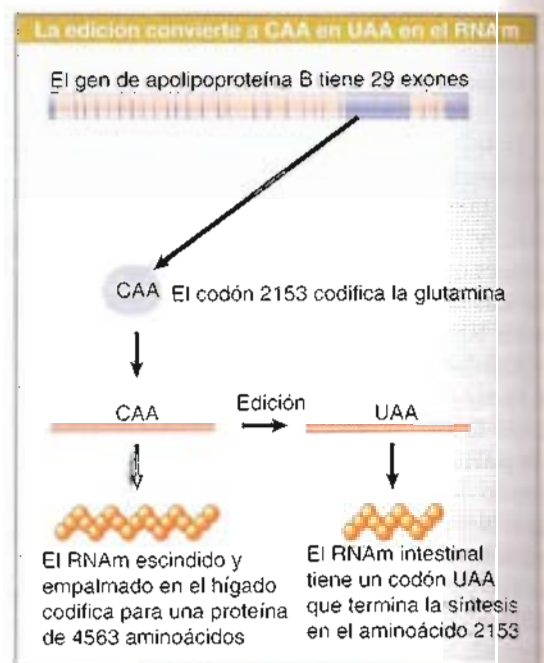


FIGURA 27.18 La secuencia del gen de la apo-B es la misma en el intestino y el hígado, pero la del RNAm se modifica por un cambio de base que crea un codón de terminación en el intestino.

En la FIGURA 27.18 se resumen las secuencias del gen de la apolipoproteína B y el rNAm en el intestino y el hígado de los mamíferos. El genoma tiene un solo gen (interrumpido), cuya secuencia es idéntica en todos los tejidos, con una región de codificación de 4 563 codones. Este gen se transcribe en un rNAm, el cual se traduce en una proteína de 518 kD, que representa la secuencia completa de codificación en el hígado.

Una forma más corta de la proteína de ~250 kD se sintetiza en el intestino, la cual consta de la mitad terminal N de la proteína completa y se traduce a partir de un rNAm cuya secuencia es idéntica a la hepática, excepción hecha de un cambio de C por U en el codón 2 153. Dicha sustitución pasa el codón CAA para glutamina hacia el codón ocre UAA para terminación.

¿A qué se debe esta sustitución? No hay un gen o exón alternativo en el genoma para codificar la nueva secuencia, y no se ha descubierto ningún cambio en el patrón de corte y empalme. La conclusión obligada es que ha habido un cambio directamente en la secuencia del transcrito.

Otro ejemplo son los receptores de glutamato del cerebro de rata. La edición en una posición cambia un codón de glutamina del DNA por un codón de arginina del RNA, cambio que afecta la conductividad del conducto y, por tanto, tiene un efecto importante en el control del flujo iónico a través del neurotransmisor. En otra posición del receptor, un codón de arginina se convierte en un codón de lisina.

El suceso de edición en la apo-B hace que C₂₁₅₃ se cambie por U; ambos cambios en el receptor de glutamato son de A a I (inosina). Estos sucesos son *desaminaciones* en las cuales se elimina el grupo amino del anillo nucleotídico, sucesos catalizados por enzimas llamadas desaminasas de citidina y adenosina, respectivamente. Este tipo de edición parece tener lugar principalmente en el sistema nervioso. Hay 16 dianas (potenciales) para la desaminasa de citosina en *Drosophila melanogaster*, y todas corresponden a genes implicados en la neurotransmisión. En muchos casos el suceso de edición cambia un aminoácido de una posición funcionalmente importante de la proteína.

¿Qué controla la especificidad de una reacción de edición? Las enzimas que llevan a cabo la desaminación como tal, a menudo son muy específicas; por ejemplo, la desaminasa de adenosina mejor caracterizada actúa en cualquier molécula A, en una región dicatenaria del RNA. Las enzimas de edición se relacionan con las desaminasas generales, pero presentan otras regiones o subunidades adicionales que controlan su especificidad. En el caso de la edición de apo-B, la subunidad catalítica de un complejo de edición se relaciona con la desaminasa

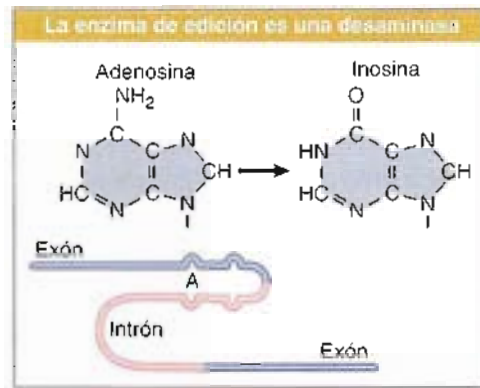


FIGURA 27.19 La edición del rNAm se produce cuando una desaminasa actúa sobre una adenina en una región dicatenaria de rNAm apareada de manera imperfecta.

de citidina bacteriana, pero presenta una región de unión al RNA adicional que ayuda a reconocer el sitio diana específico para la edición. Una enzima especial, la desaminasa de adenosina, reconoce los sitios diana del receptor de glutamato del RNA y se presentan sucesos similares en un receptor de serotonina del RNA.

El complejo puede reconocer una región particular de la estructura secundaria de manera análoga a las enzimas de modificación del RNA, o bien reconocer directamente una secuencia nucleotídica. El perfeccionamiento de un sistema *in vitro* para el suceso de edición de apo-B sugiere que una secuencia relativamente pequeña (~26 bases) que rodea al sitio de edición constituye una diana suficiente. En la FIGURA 27.19 se muestra que en el caso del RNA de GluR-B, se forma una región de pares de bases necesaria para el reconocimiento de la diana entre la región editada en el exón y una secuencia complementaria del intrón de flujo descendente. Se necesita un patrón de apareamiento erróneo dentro de la región doble para el reconocimiento específico. Así, diferentes sistemas de edición pueden tener diferentes requisitos de especificidad de secuencias en sus sustratos.

27.11 La edición del RNA puede dirigirse por RNA guías

Conceptos principales

- La intensa edición de RNA en mitocondrias de tripanosomas se debe a inserciones o deleciones de uridina.
- El sustrato de RNA aparea sus bases con un RNA guía en ambos lados de la región por editar.
- El RNA guía proporciona el molde para la adición (o, con menos frecuencia, la deleción) de uridinas.
- La edición es catalizada por un complejo de endonucleasa, actividad de transferasa de uridilo terminal y ligasa de RNA.

Otro tipo de edición se revela por cambios secuenciales notables en los productos de varios genes de mitocondrias de los tripanosomas. En el primer caso por descubrir, la secuencia de la subunidad II de la proteína oxidasa de citocromo experimenta un cambio de marco respecto de la secuencia del gen *coxII*. Las secuencias del gen y la proteína, incluidas en la FIGURA 27.20, se conservan en varias especies de tripanosomas. ¿Cómo actúa ese gen?

El RNAm de *coxII* tiene un inserto de cuatro nucleótidos adicionales (todos uridinas) en torno al sitio de cambio del marco de lectura; con la escisión se restablece el marco de lectura apropiado, se inserta un aminoácido adicional y cambian los aminoácidos a uno y otro lado. Con esa secuencia no es posible descubrir un segundo gen, y debe concluirse que las bases adicionales se insertan durante o después de la transcripción. En los genes de SV5 y los paramixovirus causantes del sarampión se encuentra una discrepancia similar entre el RNAm y las secuencias genómicas, en cuyo caso implica la adición de moléculas de G en el RNAm.

En otros genes, la edición de secuencias de RNA es similar, e incluye deleciones, así como adiciones de uridina. El caso extraordinario del gen *coxIII* del *Trypanosoma brucei* se resume en la FIGURA 27.21.

Más de la mitad de las moléculas del RNAm consta de uridinas no codificadas por el gen. La comparación

entre el DNA genómico y el RNAm muestra que no hay segmento mayor de siete nucleótidos representado en el RNAm que no haya sido modificado, y se insertan series de uridinas de hasta siete bases. ¿De dónde proviene la información para la inserción específica de uridina? Un RNA guía contiene una secuencia complementaria de la del RNAm correctamente editado. En la FIGURA 27.22 se observa un modelo de su acción en el gen del citocromo B de especies de *Leishmania*.

La secuencia de la parte alta de la figura muestra el transcripto original, o RNA preeditado. Los espacios indican el sitio de inserción de las bases en el proceso de edición, que para crear la secuencia válida de RNAm en esa región, deben ser ocho uridinas.

El RNA guía es complementario del RNAm a lo largo de una distancia significativa que incluye la región editada y la rodea. Por lo general, la complementariedad es más extensa en el lado 3' de la región editada y bastante corta en el lado 5'. El apareamiento entre el RNA guía y el preeditado de los espacios donde las moléculas de A del RNA guía no apareadas, no encuentran complemento en el RNA preeditado; el RNA guía proporciona un molde que permite a las moléculas faltantes de U insertarse en dichas posiciones. Cuando concluye la reacción, el RNA guía se separa del RNAm, que queda disponible para la traducción.

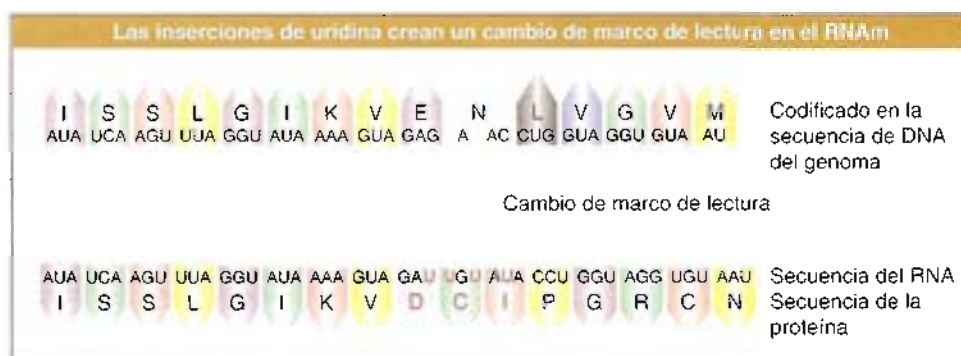


FIGURA 27.20 El RNAm para el gen *coxII* de los tripanosomas tiene un cambio de marco respecto del DNA; el marco de lectura correcto se crea por la inserción de cuatro uridinas.

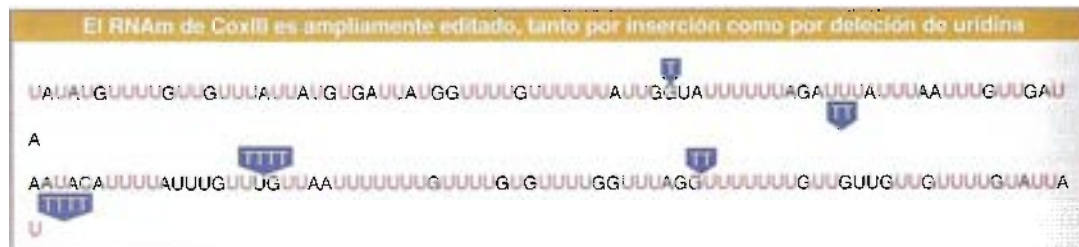


FIGURA 27.21 Parte de la secuencia *coxIII* del RNAm de *T. brucei* muestra muchas uridinas no codificadas en el DNA (rojas) o eliminadas del RNA (marcadas con T).

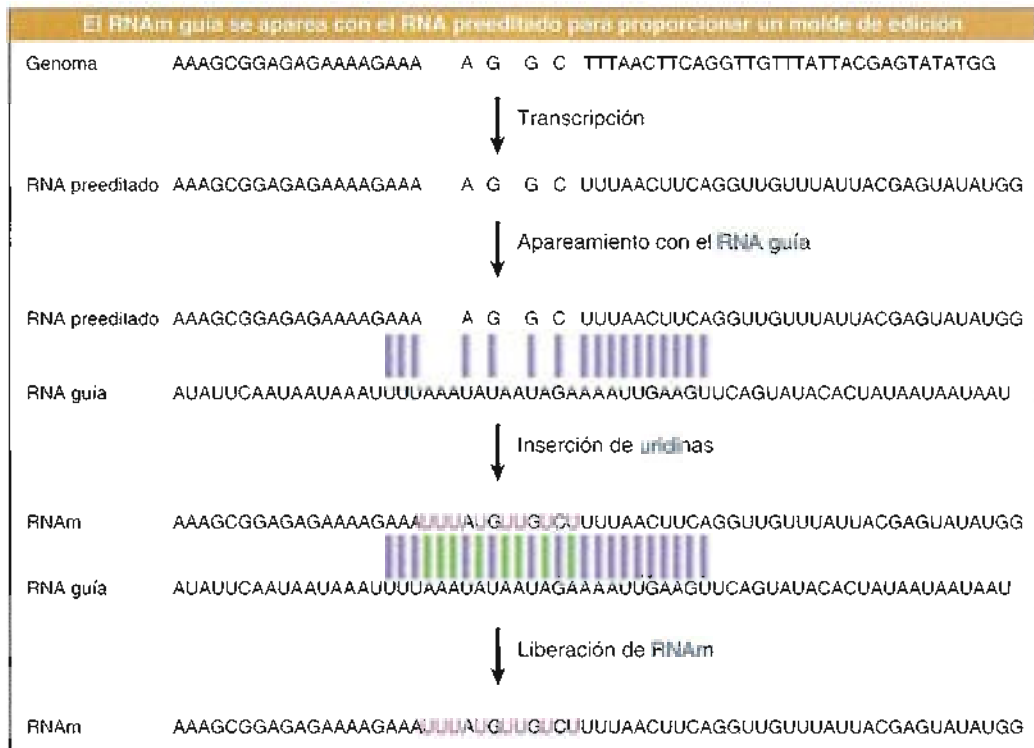


FIGURA 27.22 El RNA preeditado aparea sus bases con un RNA guía a ambos lados de la región por editar. El RNA guía proporciona un molde para la inserción de uridinas. El RNAm producido por las inserciones es complementario del RNA guía.

La especificación de la secuencia final editada puede ser bastante compleja. En este ejemplo se evita una porción larga del producto de transcripción por inserción de un total de 39 moléculas de U, que parece necesitar dos RNA guías que actúan en sitios adyacentes; el primero se aparea en el sitio 3' y la secuencia editada se convierte entonces en un sustrato para edición adicional por el siguiente RNA guía.

Los RNA guías se codifican como unidades de transcripción independientes. En la **FIGURA 27.23** se muestra un mapa de la región importante del DNA mitocondrial del género *Leishmania* que incluye el "gen" del citocromo *b* que codifica la secuencia preeditada y dos regiones que especifican RNA guías. Los genes para las principales regiones de codificación y otros RNA y sus RNA guías están intercalados.

En principio, una mutación en el "gen" o uno de sus RNA guías podría cambiar la secuencia primaria del RNAm y, por tanto, también la secuencia primaria de la proteína. Por criterios genéticos, cada una de esas unidades podría considerarse como constitutiva de parte del "gen". Las unidades se expresan de manera independiente, de modo que deberían complementarse en configuración *trans*. Si hubiera mutaciones, se necesitarían tres grupos de

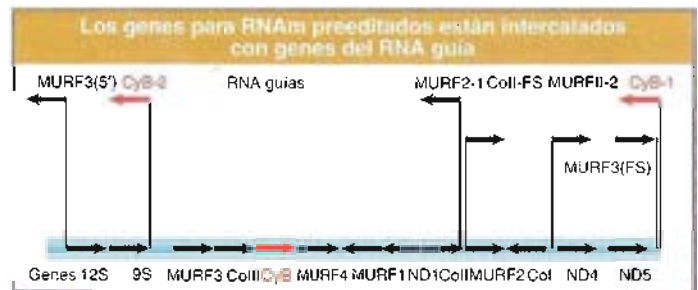


FIGURA 27.23 El genoma de especies de *Leishmania* contiene genes que codifican RNA preeditados intercalados con unidades que codifican los RNA guías necesarios para generar las secuencias RNAm correctas. Algunos genes tienen varios RNA guías. El *CyB* es el gen para el citocromo *b* preeditado, y *CyB-1* y *CyB-2* son genes para los RNA guías implicados en su edición.

complementación para codificar la secuencia primaria de una sola proteína.

La caracterización de intermediarios editados en parte sugiere que la reacción procede a lo largo del RNA preeditado en dirección 3'–5'. El RNA guía determina la especificidad de las inserciones de uridina por su apareamiento con RNA preeditado.

La edición de uridinas es catalizada por un complemento enzimático de 20S que contiene una endonucleasa, una transferasa de uridilo nuclear

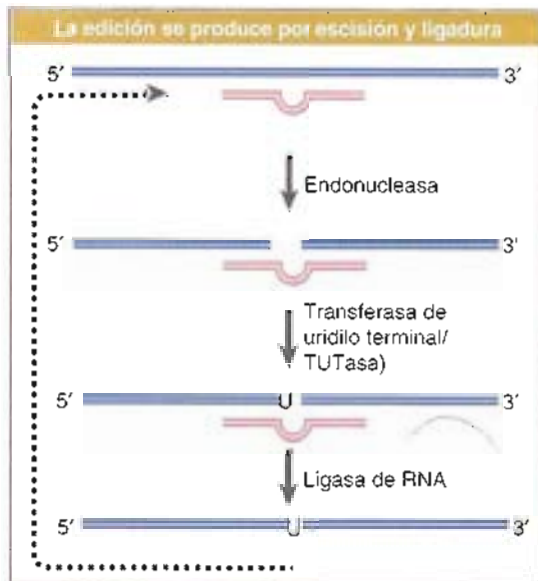


FIGURA 27.24 La adición o delección de moléculas de U se debe a escisión del RNA, eliminación o adición de U, y ligadura de los extremos. Las reacciones son catalizadas por un complejo de enzimas dirigido por un RNA guía.

(TUTasa) y una ligasa de RNA, como se ilustra en la **FIGURA 27.24**; se une al RNA guía y lo utiliza para aparearse con el RNAm preeditado. El sustrato RNA es escindido en un sitio que (supuestamente) se identifica por ausencia de apareamiento con el RNA guía, se inserta o elimina una uridina para el apareamiento de bases con el RNA guía, y después, se liga el sustrato RNA. El trifosfato de uracilo (UTP) constituye la fuente del fragmento uridilo que se agrega por actividad de la TUTasa; no se sabe si esa actividad o la de una exonucleasa independiente se encarga de la delección. (En algún momento se pensó que el segmento de moléculas de U en el extremo del RNA guía podría proporcionar la fuente de U añadido o un vertedero para los eliminados, pero la transferencia de moléculas de U al RNA guía parece ser una reacción aberrante que no se encarga de la edición.)

27.12 El corte y empalme de proteínas son autocatalíticos

Conceptos principales

- Una **inteína** tiene la capacidad de catalizar su propia eliminación de una proteína, de manera que las **exteínas** de los flancos se conecten.
- Corte y empalme de proteínas se catalizan por la **inteína**.
- Casi todas las **inteínas** tienen dos actividades independientes, corte y empalme de proteínas y una **endonucleasa** que vuelve a casa.

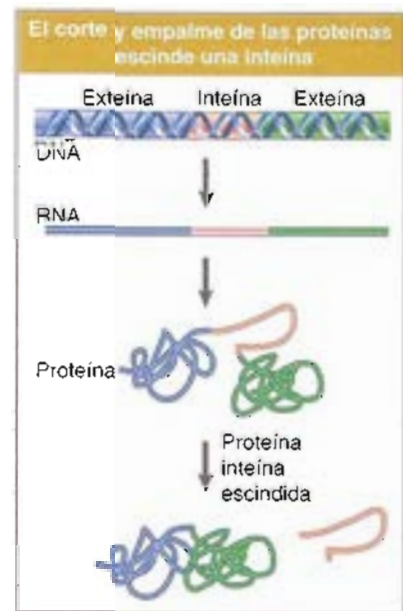


FIGURA 27.25 En el corte y empalme de proteínas, las exteínas se conectan por eliminación de la inteína de la proteína.

El **corte y empalme de proteínas** tienen el mismo efecto que el correspondiente del RNA, una secuencia representada en el gen no está representada en la proteína, cuyas partes se nombran por analogía con el corte y empalme del RNA: las **exteínas** son las secuencias representadas en la proteína madura, y las **inteínas**, las secuencias que se eliminan. El mecanismo de eliminación de la inteína es completamente diferente del de corte y empalme del RNA. En la **FIGURA 27.25** se muestra que el gen se traduce en un precursor proteínico que contiene la inteína, de modo que ésta será posteriormente escindida de la proteína. Se conocen casi 100 ejemplos de corte y empalme de proteínas, difundidos en todas las clases de organismos. El gen típico cuyo producto presenta corte y empalme de proteínas tiene una sola inteína.

La primera inteína se descubrió en un gen atacaico de polimerasa de DNA en forma de una secuencia intercalada en el gen que no cumple con las reglas de los intrones. Se demostró entonces que la proteína purificada puede cortar su secuencia hacia fuera, en una reacción autocatalítica que no requiere de ingreso de energía y que ocurre a través de una serie de reestructuraciones de enlaces, como se muestra en la **FIGURA 27.26**. La reacción es una función de la inteína, si bien su eficacia podría depender de las exteínas.

La primera reacción es un ataque por un $-OH$ o una cadena lateral $-SH$ del primer aminoácido de la inteína en el enlace peptídico que la conecta con la primera exteína, con lo cual la exteína se transfiere del grupo amino terminal de la inteína a una

conexión N-O o N-S acilo. Después, ese enlace es atacado por la cadena lateral -OH o -SH del primer aminoácido de la segunda exteína, el resultado será la transferencia de la exteína I a la cadena lateral del aminoácido terminal de la exteína II. Por último, la asparagina terminal C de la inteína forma un ciclo y el NH terminal de la exteína II ataca el enlace acilo para sustituirlo con un enlace peptídico convencional. Cada una de esas reacciones puede ocurrir de manera espontánea a velocidades muy bajas, pero su aparición en forma coordinada, suficientemente rápida como para lograr el corte y empalme de la proteína, requiere de catálisis por la inteína.

Las inteínas tienen rasgos característicos. Se encuentran como inserciones en el marco de lectura de las secuencias de codificación, y se reconocen como tales por la presencia de genes homólogos que carecen de la inserción. Tienen una serina o cisteína terminal N (para proporcionar la cadena lateral -XH) y una asparagina terminal C. La inteína típica porta una secuencia de ~150 aminoácidos en el extremo terminal N y casi 50 en el terminal C, los cuales participan en la catalización de la reacción de corte y empalme de proteínas. La secuencia del centro de la inteína puede tener otras funciones.

Una característica extraordinaria de muchas inteínas es su actividad de endonucleasa de alojamiento, la cual escinde un DNA diana para crear un sitio donde pueda insertarse la secuencia de codificación de la inteína del DNA (véase la Fig. 27.12 de la sección 27.5. Algunos intrones del grupo I codifican endonucleasas que fomentan la movilidad). Las actividades de corte y empalme de las proteínas y de la endonucleasa de alojamiento de una inteína son independientes.

En realidad se desconoce la conexión entre esas dos actividades en una inteína, pero se han sugerido dos tipos de modelo. Uno supone que originalmente había cierta conexión entre las actividades, pero desde entonces se tornaron independientes y algunas inteínas han perdido la capacidad de endonucleasa de alojamiento. En el otro, las inteínas pueden haberse originado como unidades de corte y empalme de proteínas, que en su mayor parte fueron invadidas después por endonucleasas de alojamiento (se desconoce la razón), lo cual es compatible con el hecho de que las endonucleasas de alojamiento parecen haber invadido también otros tipos de unidades, incluidos, sobre todo, los intrones del grupo I.

27.13 Resumen

El autocorte y empalme constituye una propiedad de dos grupos de intrones muy difundidos entre las

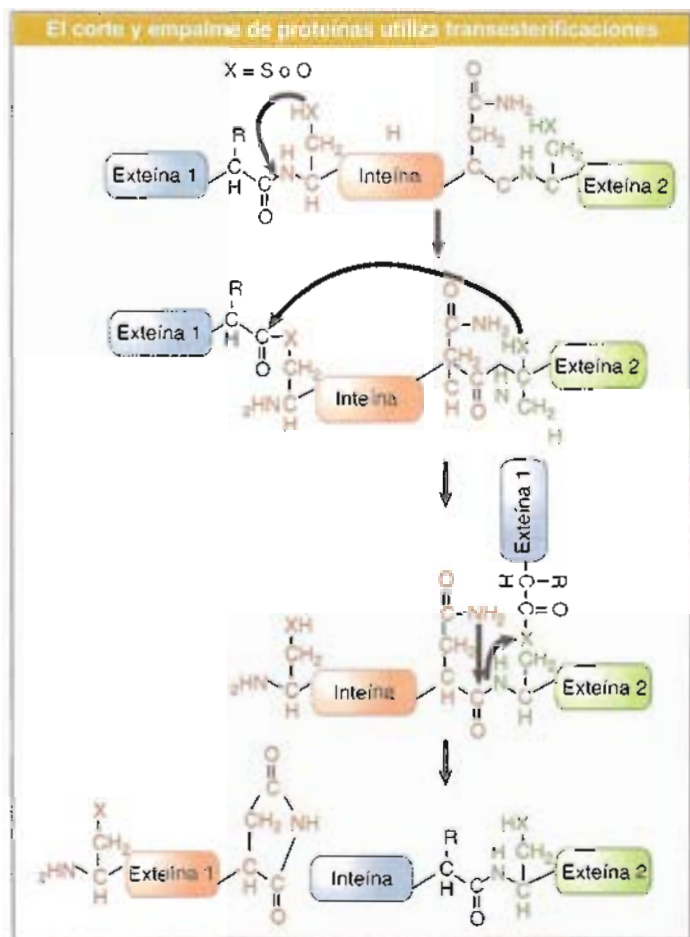


FIGURA 27.26 Los enlaces se reestructuran mediante una serie de transesterificaciones que involucran a los grupos -OH de serina o treonina, o al grupo -SH de la cisteína, hasta que las exteínas se conectan mediante un enlace peptídico y la inteína con un extremo C-circular es liberada.

eucariotas inferiores, los sistemas procarióticos y las mitocondrias. La información necesaria para la reacción reside en la secuencia del intrón (aunque en realidad, proteínas *in vivo* facilitan la reacción). Para los intrones de los grupos I y II, la reacción requiere de la formación de una estructura secundaria/terciaria específica que implica secuencias de consenso cortas. El RNA del intrón del grupo I crea una estructura en que la secuencia del sustrato es mantenida por la región IGS del intrón, en tanto que otras secuencias conservadas generan un sitio de unión del nucleótido guanina, todo ello, por transesterificación, que implica una molécula de guanosina como cofactor. No se requiere ingreso de energía. La guanosina rompe el enlace en la unión 5' exón-intrón y se enlaza con el intrón; el hidroxilo del extremo libre del exón ataca entonces la unión 3' exón-intrón. El intrón se torna cíclico y pierde la guanosina y las 15 bases terminales. Una serie

de reacciones relacionadas puede catalizarse a través de ataques por el fragmento terminal G-OH del intrón en enlaces fosfodiéster internos. Proporcionando sustratos apropiados ha sido posible obtener ribozimas por ingeniería, las cuales realizan diversas reacciones catalíticas, incluidas actividades de transferasa de nucleótidos.

Algunos intrones mitocondriales de los grupos I y II tienen marcos de lectura abiertos. Las proteínas codificadas por los intrones del grupo I son endonucleasas, que producen escisiones dicatenarias en sitios diana del DNA; la escisión inicia un proceso de conversión del gen, en el cual, la secuencia del intrón mismo se copia en el sitio diana. Las proteínas codificadas por intrones del grupo II incluyen una actividad de endonucleasa que inicia el proceso de transposición y una de transcriptasa inversa que permite obtener una copia del intrón mismo en el sitio diana. Dichos intrones posiblemente se originaron por procesos de inserción. Las proteínas codificadas por ambos grupos de intrones pueden incluir actividades de madurasa, que facilitan el corte y empalme del intrón por estabilización de la formación de la estructura secundaria/terciaria en sitio activo.

El componente RNA de la ribonucleoproteína ribonucleasa P lleva a cabo reacciones catalíticas. Los RNA virusoides son susceptibles de autocorte y empalme en una estructura "en cabeza de martillo", estructura que puede formarse entre un RNA sustrato y un RNA ribozima, lo cual permite dirigir la escisión en secuencias muy específicas. Dichas reacciones sustentan el punto de vista de que el RNA puede formar sitios activos específicos con actividad catalítica.

La edición del RNA cambia la secuencia de un RNA durante su transcripción o después de ésta, que son cambios necesarios para crear una secuencia de codificación significativa. En sistemas de mamíferos se presentan sustituciones de bases individuales que asumen la forma de desaminaciones, donde C se convierte en U, o A en I. Una subunidad catalítica relacionada con la desaminasa de citidina o adenosina actúa como parte de un complejo más grande con especificidad para una secuencia diana en particular.

Las adiciones y deleciones (casi siempre de uridina) se presentan en las mitocondrias de tripanosomas y en paramixovirus. Las reacciones extensas de edición ocurren en los tripanosomas, en los cuales, hasta la mitad de las bases de un RNAm provienen de la edición. En la reacción de edición se usa un molde constituido por un RNA guía complementario de la secuencia del RNAm. La reacción es catalizada por un complejo enzimático que incluye una

endonucleasa, una transferasa de uridina terminal y una ligasa de RNA, que utilizan nucleótidos como fuente de adición o liberan nucleótidos después de la deleción.

El corte y empalme de proteínas constituye una reacción catalítica derivada de reacciones de transferencia de enlaces que no requiere de ingreso de energía. La enzima cataliza su autocorte y empalme fuera de las extremidades de los flancos. Muchas proteínas tienen una actividad de endonucleasa de alojamiento independiente de la actividad de corte y empalme de las proteínas.

Referencias

27.2 Los intrones del grupo I realizan autocorte y empalme por transesterificación

Artículos de revisión

Cech, T. R. (1985). Self-splicing RNA: implications for evolution. *Int. Rev. Cytol.* 93, 3-22.

Cech, T. R. (1987). The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science* 236, 1532-1539.

Artículos de investigación

Been, M. D. and Cech, T. R. (1986). One binding site determines sequence specificity of *Tetrahymena* pre-rRNA self-splicing, *trans*-splicing, and RNA enzyme activity. *Cell* 47, 207-216.

Belfort, M., Pedersen-Lane, J., West, D., Ehrenman, K., Maley, G., Chu, F., and Maley, F. (1985). Processing of the intron-containing thymidylate synthase (*td*) gene of phage T4 is at the RNA level. *Cell* 41, 375-382.

Cech, T. R. et al. (1981). *In vitro* splicing of the rRNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27, 487-496.

Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E., and Cech, T. R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31, 147-157.

Myers, C. A., Kuhla, B., Cusack, S., and Lambowitz, A. M. (2002). tRNA-like recognition of group I introns by a tyrosyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2630-2635.

27.3 Los intrones del grupo I forman una estructura secundaria característica

Artículos de investigación

Burke, J. M. et al. (1986). Role of conserved sequence elements 9L and 2 in self-splicing of the *Tetrahymena* ribosomal RNA precursor. *Cell* 45, 167-176.

Michel, F. and Wetschhof, E. (1990). Modeling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* 216, 585-610.

27.4 Las ribozimas tienen varias actividades catalíticas

Artículo de revisión

Cech, T. R. (1990). Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 543-568.

Artículo de investigación

Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A., and Breaker, R. R. (2004). Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428, 281-286.

27.5 Algunos intrones del grupo I codifican endonucleasas que fomentan la movilidad

Artículo de revisión

Belfort, M. and Roberts, R. J. (1997). Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res.* 25, 3379-3388.

27.6 Los intrones del grupo II pueden codificar proteínas multifuncionales

Artículos de revisión

Lambowitz, A. M. and Belfort, M. (1993). Introns as mobile genetic elements. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 587-622.

Lambowitz, A. M. and Zimmerly, S. (2004). Mobile group II introns. *Annu. Rev. Genet.* 38, 1-35.

Artículos de investigación

Jackson, L., Huang, H. R., Liu, L., Matsuura, M., Lambowitz, A. M., and Perlman, P. S. (2001). Retrotransposition of a yeast group II intron occurs by reverse splicing directly into ectopic DNA sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 13207-13212.

Zimmerly, S. et al. (1995). Group II intron mobility occurs by target DNA-primed reverse transcription. *Cell* 82, 545-554.

Zimmerly, S. et al. (1995). A group II intron is a catalytic component of a DNA endonuclease involved in intron mobility. *Cell* 83, 529-538.

27.7 Algunos intrones de autocorte y empalme requieren de madurasas

Artículos de investigación

Bolduc et al. (2003). Structural and biochemical analyses of DNA and RNA binding by a bifunctional homing endonuclease and group I splicing factor. *Genes. Dev.* 17, 2875-2888.

Carignani, G. et al. (1983). An RNA maturase is encoded by the first intron of the mitochondrial gene for the subunit I of cytochrome oxidase in *S. cerevisiae*. *Cell* 35, 733-742.

Henke, R. M., Butow, R. A., and Perlman, P. S. (1995). Maturase and endonuclease functions depend on separate conserved domains of the bifunctional protein encoded by the group I intron *aI4* alpha of yeast mitochondrial DNA. *EMBO J.* 14, 5094-5099.

Matsuura, M., Noah, J. W., and Lambowitz, A. M. (2001). Mechanism of maturase-promoted group II intron splicing. *EMBO J.* 20, 7259-7270.

27.9 Los virioides tienen actividad catalítica

Artículos de revisión

Doherty, E. A. and Doudna, J. A. (2000). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 597-615.

Symons, R. H. (1992). Small catalytic RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 641-671.

Artículos de investigación

Forster, A. C. and Symons, R. H. (1987). Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* 50, 9-16.

Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849-857.

Scott, W. G., Finch, J. T., and Klug, A. (1995). The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* 81, 991-1002.

27.10 La edición de RNA ocurre en bases individuales

Artículos de investigación

Higuchi, M. et al. (1993). RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* 75, 1361-1370.

Navaratnam, N. et al. (1995). Evolutionary origins of apoB mRNA editing: catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site. *Cell* 81, 187-195.

Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J., and Scott, J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50, 831-840.

Sommer, B. et al. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11-19.

27.11 La edición del RNA puede dirigirse por RNA guías

Artículos de investigación

Aphasizhev, R., Shicego, S., Peris, M., Jang, S. H., Aphasizheva, I., Simpson, A. M., Rivlin, A., and Simpson, L. (2002). Trypanosome mitochondrial 3' terminal uridylyl transferase (TUTase): the key enzyme in U-insertion/deletion RNA editing. *Cell* 108, 637-648.

Benne, R., Van den Burg J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., and Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819-826.

Blum, B., Bakalara, N., and Simpson, L. (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60, 189-198.

Feagin, J. E., Abraham, J. M., and Stuart, K. (1988). Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 53, 413-422.

Seiwert, S. D., Heidmann, S. and Stuart, K. (1996). Direct visualization of uridylyate deletion in vitro suggests a mechanism for kinetoplast editing. *Cell* 84, 831-841.

27.12 El corte y empalme de proteínas son autocatalíticos

Artículo de revisión

Paulus, H. (2000). Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. *Annu. Rev. Biochem* 69, 447-496.

Artículos de investigación

Derbyshire, V., Wood, D. W., Wu, W., Dansereau, J. T., Dalgaard, J. Z., and Belfort, M. (1997). Genetic definition of a protein-splicing domain: functional

mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11466-11471.

Perler, F. B. et al. (1992). Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5577-5581.

Xu, M. Q., Southworth, M. W., Mersha, F. B., Hornstra, L. J., and Perler, F. B. (1993). *In vitro* protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate. *Cell* 75, 1371-1377.

Cromosomas

ESQUEMA DEL CAPÍTULO

- 28.1** Introducción
- 28.2** Los genomas víricos están empaquetados en sus cubiertas
- La longitud del DNA que se puede incorporar a un virus depende de la estructura de su casco.
 - El ácido nucleico del casco está muy condensado.
 - Los virus de RNA filamentosos condensan el genoma de RNA conforme ensamblan el casco a su alrededor.
 - Los virus de DNA esférico insertan el DNA en una cubierta proteínica preensamblada.
- 28.3** El genoma bacteriano es un nucleoide
- El nucleoide bacteriano es ~80% DNA en cuanto a masa, y puede ser desplegado por agentes que actúan en el RNA o las proteínas.
 - Las proteínas que condensan el DNA no han sido identificadas.
- 28.4** El genoma bacteriano está superenrollado
- El nucleoide tiene ~100 dominios independientes superenrollados negativamente.
 - La densidad promedio del superenrollamiento es ~1 superhélice/100 bp.
- 28.5** El DNA eucariótico tiene asas y dominios unidos a un bastidor
- El DNA de la cromatina de interfase está superenrollado en forma negativa en dominios independientes de ~85 kb.
 - Los cromosomas en metafase tienen un bastidor de proteínas al que se unen las asas del DNA.
- 28.6** Secuencias específicas unen el DNA a una matriz de interfase
- El DNA está unido a la matriz nuclear en secuencias específicas llamadas MAR o SAR.
 - Las MAR son ricas en A-T, pero no tienen una secuencia de consenso específica.
- 28.7** La cromatina se divide en eucromatina y heterocromatina
- Los cromosomas individuales se observan sólo durante la mitosis.
 - En la interfase, la masa general de la cromatina está en forma de eucromatina, con empaquetamiento menos compacto que los cromosomas en mitosis.
 - Las regiones de heterocromatina se mantienen densamente empaquetadas durante la interfase.
- 28.8** Los cromosomas tienen patrones de banda
- Ciertas técnicas de tinción hacen que los cromosomas parezcan una serie de estrias llamadas bandas G.
 - Las bandas tienen un menor contenido de G-C que los espacios intermedios (interbandas).
 - Los genes se concentran en las interbandas, ricas en G-C.
- 28.9** Los cromosomas en escobillón se extienden
- Los sitios de expresión génica de los cromosomas en escobillón muestran asas que se extienden a partir de su eje.
- 28.10** Los cromosomas politénicos forman bandas
- Los cromosomas politénicos de los dípteros tienen una serie de bandas que se pueden usar como mapa citológico.
- 28.11** Los cromosomas politénicos se expanden en sitios de expresión génica
- Las bandas son sitios de expresión génica en cromosomas politénicos que se expanden para dar lugar a "abultamientos".
- 28.12** El cromosoma eucariótico es un dispositivo de segregación
- Un cromosoma de eucariota se mantiene en el huso mitótico por unión de microtúbulos al cinetócoro, que se forma en su región centromérica.
 - Los centrómeros a menudo tienen heterocromatina rica en secuencias de DNA satélite.
- 28.13** Los centrómeros pueden contener DNA repetitivo
- Los centrómeros de los cromosomas de eucariotas superiores contienen grandes cantidades de DNA repetitivo.
 - Se desconoce la función del DNA repetitivo.
- 28.14** Las secuencias de DNA de los centrómeros de *S. cerevisiae* son cortas
- En *S. cerevisiae*, los elementos CEN se identifican por la capacidad de permitir que un plásmido se segregue de manera precisa en la mitosis.
 - Los elementos CEN consisten en las secuencias cortas conservadas CDE-I y CDE-III, las cuales flanquean una región CDE-III rica en A-T.
- 28.15** El centrómero se une a un complejo proteínico
- En CDE-II se forma un complejo proteínico especializado alterno a la estructura usual de la cromatina.
 - El complejo proteínico CBF3 que se une a CDE-III es indispensable para la función del centrómero.
 - Las proteínas que conectan esos dos complejos podrían proporcionar la conexión para los microtúbulos.
- 28.16** Los telómeros tienen secuencias de repetición simples
- Para la estabilidad del extremo cromosómico, se requiere el telómero.

Continúa en la siguiente página

- Un telómero es una repetición sencilla en la que una cadena rica en C + A tiene la secuencia $C_n(A/T)_n$.

28.17 Los telómeros sellan los extremos de los cromosomas

- La proteína TRF2 cataliza una reacción en que la unidad repetida 3' de la cadena rica en G + T forma un asa por desplazamiento de su homóloga en una región de flujo ascendente respecto del telómero.

28.18 Los telómeros son sintetizados por una enzima ribonucleoproteínica

- La telomerasa hace uso del 3'-OH de la cadena telomérica G + T para cebar la síntesis de repeticiones seriadas de tipo TTGGGG.

- El componente RNA de la telomerasa tiene una secuencia que se aparea con repeticiones ricas en C + A.
- Una de las subunidades proteínicas es una transcriptasa inversa que utiliza al RNA como molde para la síntesis de la secuencia rica en G + T.

28.19 Los telómeros son indispensables para la supervivencia

28.20 Resumen

28.1 Introducción

En la organización de todo material genético celular es evidente un principio general, se trata de una masa compacta confinada en un volumen limitado, y sus diversas actividades, como replicación y transcripción, deben tener lugar en ese espacio. Por otra parte, la organización del material debe ajustarse a transiciones entre un estado de inactividad y otro de actividad.

El estado condensado del ácido nucleico resulta de su unión con proteínas básicas, cuyas cargas positivas neutralizan las cargas negativas del ácido nucleico. La estructura del complejo nucleoprotéico depende de las interacciones de las proteínas con el DNA (o RNA).

El empaquetado del DNA, en fagos, virus, células bacterianas y núcleos de eucariotas, resulta en un problema común. La longitud del DNA (o en el caso de algunos virus, el RNA) como molécula extendida rebasaría con mucho las dimensiones del compartimiento que la contiene, de modo que tendría que comprimirse exageradamente para caber

en el espacio disponible. *Este fenómeno contrasta con la imagen típica del DNA de una doble hélice extendida, pero su deformación estructural al plegarse en una forma más compacta es la regla, más que la excepción.*

La magnitud de la discrepancia entre la longitud del ácido nucleico y el tamaño de su compartimiento resulta evidente a partir de los ejemplos resumidos en la **FIGURA 28.1**. Para bacteriófagos y virus de eucariotas, el genoma de ácido nucleico, ya sea DNA o RNA monocatenario o dicatenario, efectivamente llena el receptáculo (que puede ser cilíndrico o esférico).

En compartimientos de bacterias o células eucarióticas es difícil calcular con exactitud la discrepancia, pues el DNA está contenido en una zona compacta que ocupa sólo parcialmente el compartimiento; el material genético asume la forma de **nucleoide** en las bacterias y de masa de **cromatina** en núcleos eucarióticos de interfase (entre divisiones).

La densidad del DNA en esos compartimientos es alta, de ~10 mg/ml, en una bacteria, de ~100 mg/ml en un núcleo eucariótico, y en la cabeza del fago T4, de >500 mg/ml. Tal concentración en solución

El DNA está muy compactado en todos los tipos de genomas				
Compartimiento	Forma	Dimensiones	Tipo de ácido nucleico	Longitud
TMV	filamento	0.008 x 0.3 μm	Un RNA monocatenario	2 μm = 2.64 kb
Fago fd	filamento	0.006 x 0.85 μm	Un DNA monocatenario	2 μm = 6.0 kb
Adenovirus	icosaedro	0.07 μm de diámetro	Un DNA dicatenario	11 μm = 35.0 kb
Fago T4	icosaedro	0.065 x 0.10 μm	Un DNA dicatenario	55 μm = 170.0 kb
<i>E. coli</i>	cilindro	1.7 x 0.65 μm	Un DNA dicatenario	1.3 mm = 4.2 x 10 ³ kb
Mitocondria (humana)	esferoide en oblea	3.0 x 0.5 μm	~10 DNA dicatenarios idénticos	50 μm = 16.0 kb
Núcleo (humano)	esferoide	6 μm de diámetro	46 cromosomas de DNA dicatenario	1.8 m = 6 x 10 ⁶ kb

FIGURA 28.1 La longitud del ácido nucleico es mucho mayor que las dimensiones del compartimiento circundante.

sería equivalente a un gel de gran viscosidad. Se desconocen las implicaciones fisiológicas, como su efecto en la capacidad de las proteínas para hallar sus sitios de unión en el DNA.

El empaquetamiento de la cromatina es flexible y cambia durante el ciclo celular eucariótico. En el momento de la división (mitosis o meiosis), el material genético se empaqueta todavía más densamente, de modo que los **cromosomas** son identificables.

La compresión global del DNA suele describirse mediante la **razón de empaque** , que corresponde a la longitud del DNA dividida entre la longitud de la unidad que la contiene. Por ejemplo, el cromosoma humano más pequeño contiene $\sim 4.6 \times 10^7$ bp de DNA (~ 10 veces el tamaño del genoma de la bacteria *E. coli*), lo cual equivale a 14 000 micras (= 1.4 cm de DNA extendido). En el momento de la mayor condensación de la mitosis, el cromosoma tiene $\sim 2 \mu$ de longitud, así que la razón de empaque del DNA en el cromosoma puede llegar hasta 7 000.

Las razones de empaque de las estructuras globales más amorfas del nucleóide bacteriano o la cromatina eucariótica no pueden ser tan exactas, pero el resultado puntual usual suele ser que los cromosomas en mitosis tengan un empaquetado cinco o diez veces más denso que la cromatina de interfase, lo cual indica una razón de empaque típico de 1 000 a 2 000.

Una cuestión importante aún sin respuesta se refiere a la especificidad del empaquetado. ¿El DNA se pliega en un patrón *particular* o es diferente para cada copia del genoma? ¿Cómo cambia el patrón del empaque cuando se replica o transcribe un segmento del DNA?

28.2 Los genomas víricos están empaquetados en sus cubiertas

Conceptos principales

- La longitud del DNA que se puede incorporar a un virus depende de la estructura de su casco.
- El ácido nucleico del casco está muy condensado.
- Los virus de RNA filamentosos condensan el genoma de RNA conforme ensamblan el casco a su alrededor.
- Los virus de DNA esférico insertan el DNA en una cubierta proteínica preensamblada.

Desde la perspectiva del empaquetado de *cada* secuencia, hay una diferencia importante entre un genoma celular y un virus. El tamaño del genoma celular es esencialmente indefinido, pues el número y localización de las secuencias individuales puede cambiar por duplicación, delección y reestructura-

ción, o sea que se requiere de un método *generalizado* de empaquetamiento del DNA insensible al contenido o la distribución total de la secuencia. Por el contrario, dos instrucciones definen las necesidades de un virus. La cantidad de ácido nucleico por empaquetar *depende* del tamaño del genoma y debe adaptarse a una de cubierta ensamblada por una o varias proteínas codificadas por los genes víricos.

El aspecto superficial de una partícula vírica es falazmente simple; el genoma de ácido nucleico está contenido en una **cápside** , o estructura simétrica, o casi simétrica, ensamblada a partir de una o unas cuantas proteínas. A la cápside se unen (o se incorporan a ella) otras estructuras, las cuales se ensamblan a partir de proteínas diferentes y que son necesarias para la infección de la célula hospedadora.

La estructura de la partícula vírica es muy compacta, ya que rara vez el volumen interno de la cápside es mucho mayor que el del ácido nucleico que contendrá; la diferencia suele ser menor del doble y a menudo, el volumen interno es apenas mayor que el del ácido nucleico.

En su forma más extrema, la restricción de que la cápside se ensamble con proteínas codificadas por el virus, indica que toda la cubierta se construye a partir de un solo tipo de subunidad. Las reglas de ensamblaje de subunidades idénticas en estructuras cerradas restringe la cápside a uno o dos tipos. En el primer caso, las subunidades de proteína se apilan secuencialmente en forma helicoidal para constituir una estructura *filamentosa* o cilíndrica, mientras que en el segundo, forman una cubierta seudoesférica, una estructura similar a un poliedro con **simetría icosaédrica** . Algunas cápsides víricas se ensamblan a partir de más de un tipo de subunidad proteínica, y si bien esto amplía los tipos exactos de estructuras que se pueden formar, las cápsides víricas aún se apegan a las clases generales de filamentos cuasicristalinos o icosaedros.

Hay dos tipos de soluciones al problema de cómo construir una cápside que contenga un ácido nucleico:

- La cubierta proteínica se puede ensamblar en torno al ácido nucleico, de modo de condensar el DNA o el RNA por interacciones proteína-ácido nucleico durante el proceso de ensamblaje.
- La cápside se puede construir a partir de esos componentes en forma de cascarón vacío, en el cual se insertará el ácido nucleico, que se condensa conforme entra.

En los virus de RNA monocatenario, la cápside se ensambla en torno al genoma según el principio de que *la posición del RNA dentro de la cápside es de-*



FIGURA 28.2 Mediante apilado de subunidades proteínicas en el virión se crea una vía helicoidal para el RNA del TMV.

terminada directamente por su unión con las proteínas de la cubierta. El ejemplo mejor caracterizado es el de TMV (virus del mosaico del tabaco), en el cual, el ensamblaje se inicia con una horquilla doble que yace en la secuencia del RNA. A partir de ese **centro de nucleación**, procede de manera bidireccional en el RNA hasta llegar a los extremos. La unidad de la cápside es un disco de dos capas, cada una de las cuales contiene 17 subunidades proteínicas idénticas. El disco es una estructura circular que, al interactuar con el RNA, forma una hélice. En el centro de nucleación, la horquilla de RNA se inserta en el orificio central del disco y éste cambia de conformación, a una estructura helicoidal que rodea al RNA. Se agregan discos adicionales, cada uno de los cuales lleva una nueva cadena de RNA hacia su orificio central. El RNA se enrolla de forma helicoidal dentro de la cubierta de proteína como se ilustra en la **FIGURA 28.2**.

Las cápsides esféricas de los virus de DNA se ensamblan de forma diferente, siendo el ejemplo característico los fagos lambda y T4, en cuyo caso, una cubierta vacía se ensambla a partir de un pequeño conjunto de proteínas. *A continuación, el genoma doble se inserta en la cabeza*, proceso que se acompaña de un cambio estructural en la cápside.

En la **FIGURA 28.3** se resume el ensamblaje del virus lambda, el cual empieza con un pequeño casco que contiene una proteína "medular" y que se transforma en un casco vacío de forma característica. En ese punto se inicia el empaquetado del DNA, el casco aumenta de tamaño, aunque conserva la misma forma, hasta que toda la cabeza se sella por la adición de la cola.

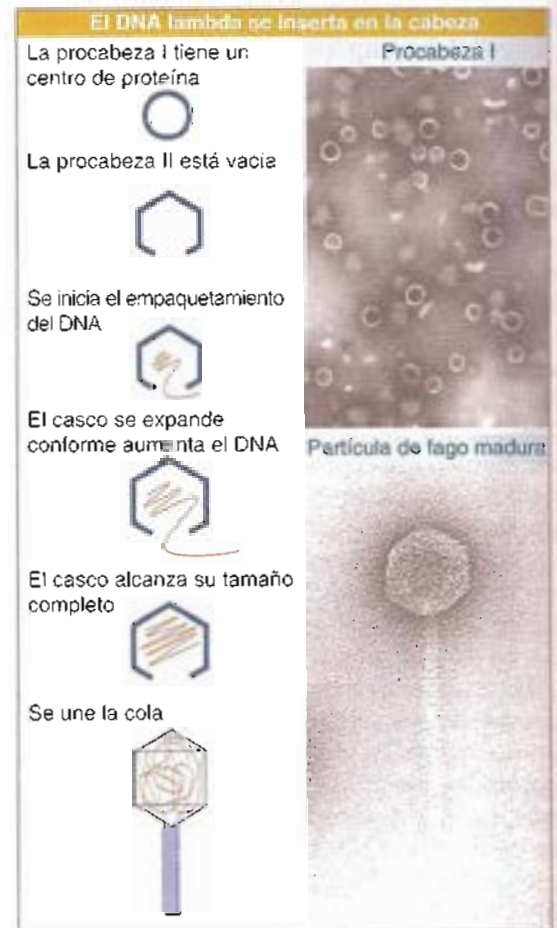


FIGURA 28.3 La maduración del fago lambda pasa por varias etapas. La cabeza vacía cambia de forma y se expande cuando se llena de DNA. Las micrografías electrónicas muestran las partículas al inicio y al término de la vía de maduración. Fotografía superior reproducida de Cue, D. y Feiss, M. 1993, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 90:9290-9294. Copyright 1993, National Academy of Sciences U.S.A. Imagen cortesía de Michael G. Feiss, University of Iowa. La imagen inferior es cortesía de Robert Judd, University of Pittsburgh.

Un DNA dicatenario que cubre distancias cortas es un cilindro bastante rígido que de todas formas debe comprimirse en una estructura compacta para ajustarse al interior de la cápside. Sería bueno saber si el empaquetado implica un enrollado ligero del DNA dentro de la cabeza o si necesita flexionarse abruptamente.

La inserción del DNA en una cabeza de fago implica dos tipos de reacción, translocación y condensación, ambas desfavorables desde el punto de vista energético.

La translocación es un proceso activo en el que el DNA es llevado al interior de la cabeza por un mecanismo dependiente de ATP; el mecanismo utilizado es común para muchos virus que se replican mediante enrollamiento circular para generar largas colas que contienen multímeros del genoma víri-

co. El ejemplo mejor caracterizado es el del fago lambda, cuyo genoma es empaquetado en la cápside vacía por la enzima **terminasa**, proceso que se resume en la **FIGURA 28.4**.

La terminasa fue detectada por primera vez merced a su participación en la generación de extremos del fago lineal de DNA por escisión en sitios *cos* (nombre que refleja el hecho de que genera extremos cohesivos con colas complementarias de una sola cadena). El genoma del fago codifica dos subunidades que constituyen la terminasa, una de las cuales se une a un sitio *cos*, punto en que se une a la otra subunidad, la cual corta el DNA. La terminasa se ensambla en un heterooligómero dentro de un complejo que también incluye IHF (factor de integración del hospedador, dímero codificado por el genoma bacteriano). Después se une a una cápside vacía y aprovecha la hidrólisis de ATP para impulsar la translocación a lo largo del DNA, hasta llevarlo al interior de la cápside vacía.

Otro método de empaquetado utiliza un componente estructural del fago. En el fago $\phi 29$ de *Bacillus subtilis*, el motor que inserta el DNA en la cabeza es la estructura que la conecta con la cola y que actúa como motor rotatorio, cuya acción efectúa la translocación lineal del DNA al interior de la cabeza del fago. El mismo motor se usa para expulsar el DNA y la cabeza del fago cuando infecta a una bacteria.

Se sabe poco del mecanismo de condensación en una cápside vacía, excepto que ésta contiene "proteínas internas", así como DNA. Una posibilidad es que proporcione algún tipo de "bastidor" donde se condensa el DNA (sería la contraparte del uso de proteínas en la cubierta de los virus vegetales de RNA).

¿Qué tan específico es el empaquetado? No puede depender de ciertas secuencias porque deleciones, inserciones y sustituciones no pueden interferir con el proceso de ensamblaje. La relación entre el DNA y el casco ha sido directamente investigada para determinar cuáles de sus regiones pueden enlazarse en forma cruzada con las proteínas de la cápside. La sorprendente respuesta es que todas las regiones del DNA son casi igualmente susceptibles, es decir, que cuando se inserta en la cabeza, sigue una regla general para la condensación, pero el patrón no es determinado por secuencias específicas.

Estos diferentes mecanismos de ensamblaje de virus llegan todos al mismo fin: el empaquetado de una molécula unicatenaria de DNA o RNA dentro de la cápside. No obstante, algunos virus tienen genomas que constan de muchas moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, los reovirus contienen diez segmentos de RNA dicatenario que deben empaquetarse en la cápside, para lo cual pueden ser necesarias secuencias de seguimiento específicas en los seg-

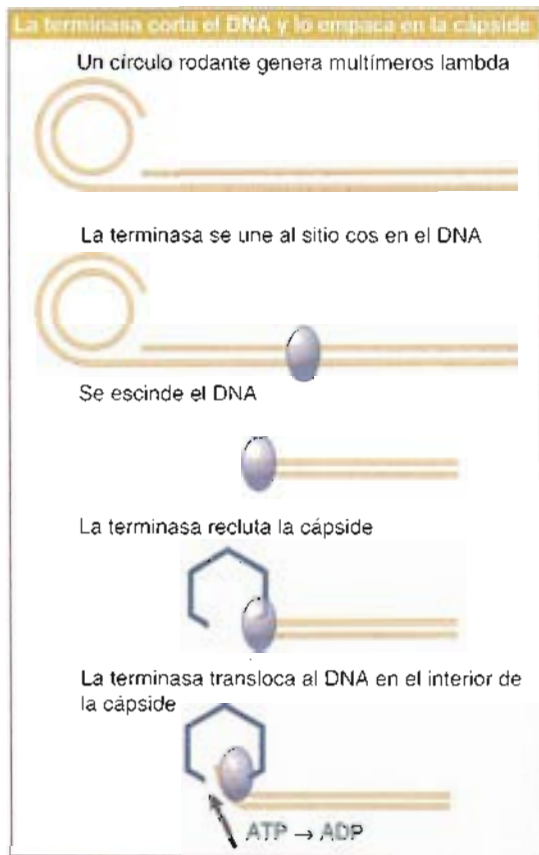


FIGURA 28.4 La proteína terminasa se une a sitios específicos en un multímero de genomas víricos generados por replicación de un círculo rodante. Corta el DNA y se une a una cápside vírica vacía, para después utilizar la energía de la hidrólisis de ATP con el fin de insertar el DNA en la cápside.

mentos de modo de garantizar que el proceso de ensamblaje elija una copia de cada molécula diferente para formar un conjunto completo de información genética. En el caso más sencillo del fago $\phi 6$, que empaqueta tres diferentes segmentos de RNA de doble cadena en una cápside, los segmentos deben unirse en un orden específico; como cada uno es incorporado a una cápside, desencadena un cambio en su conformación que crea sitios de unión para el siguiente segmento.

Algunos virus vegetales tienen múltiples divisiones, sus genomas están formados por segmentos, cada uno de los cuales se empaqueta en una cápside *diferente*. Un ejemplo es el virus del mosaico de la alfalfa (AMV), que tiene cuatro RNA unicatenarios diferentes, cada uno empaquetado de manera independiente en una cubierta constituida por la misma subunidad proteínica. Una infección exitosa depende del ingreso de un RNA de cada tipo a la célula.

Los cuatro componentes del AMV constan de partículas de diferentes tamaños, o sea que la misma proteína de la cápside puede empaquetar cada RNA en su propia partícula característica, fenómeno que

difiere del empaquetado de un segmento único de ácido nucleico en una cápside de forma fija.

La vía de ensamblaje de los virus cuyas cápsides tienen sólo una forma auténtica puede ser desviada por mutaciones que dan lugar a la formación de partículas **monstruosas** aberrantes, en las cuales, la cabeza es mayor de lo usual. Esas mutaciones muestran que una proteína de la cápside, tiene capacidades intrínsecas para ensamblarse en un tipo particular de estructura, pero el tamaño y la forma exactos pueden variar. Algunas de esas mutaciones ocurren en genes que codifican **factores de ensamblaje** necesarios para la formación de la cabeza, pero que no son parte del casco. Tales proteínas auxiliares limitan las opciones de la proteína de la cápside, de manera que se ensambla sólo a lo largo de la vía deseada. En el ensamblaje de la cromatina celular se emplean proteínas comparables (véase Cap. 29, Nucleosomas).

28.3 El genoma bacteriano es un nucleoide

Conceptos principales

- El nucleoide bacteriano es ~80% DNA en cuanto a masa, y puede ser desplegado por agentes que actúan en el RNA o las proteínas.
- Las proteínas que condensan el DNA no han sido identificadas.

Si bien las bacterias no muestran estructuras con las características morfológicas definidas de los cromosomas eucarióticos, de todas formas los genomas

están organizados en cuerpos definidos. El material genético se ve como un conjunto bastante compacto (o una serie de conjuntos), que ocupa casi el 33% del volumen de las células. En la **FIGURA 28.5** se muestra el corte delgado de una bacteria en el cual es evidente dicho nucleoide.

Cuando se lisa *E. coli*, se liberan fibras en forma de asas unidas a la envoltura rota de la célula. Como puede observarse en la **FIGURA 28.6**, el DNA de esas asas no muestra una forma extendida dicatenaria, sino compacta, por su vínculo con proteínas.

De *E. coli* se han aislado varias proteínas de unión con el DNA que superficialmente se asemejan a las proteínas de cromosomas eucarióticos. ¿Qué criterios deberían aplicarse para decidir si una proteína que se une al DNA tiene participación estructural en los nucleoides? Debería haber cantidades suficientes como para que se una a todo el genoma, y las mutaciones de su gen deberían modificar en alguna forma la estructura o las funciones vinculadas con la supervivencia del genoma (por ejemplo, segregación a células hijas). Ninguna de las posibles proteínas cumple aún las condiciones genéticas.

La proteína HU es un dímero que tal vez condensa el DNA al envolverlo en una estructura similar a una burbuja y que tiene relación con IHF, que presenta actividad estructural para la formación de un complejo proteínico en reacciones especializadas de recombinación. Las mutaciones en cualquiera de los genes que codifican las subunidades de HU (*hupA* y *-B*) tienen poco efecto, pero la pérdida de ambas funciones da lugar a un fenotipo sensible al frío y cierta pérdida de la estructura helicoidal del DNA. Esos resultados dan lugar a la posibilidad



FIGURA 28.5 Un corte delgado muestra el nucleoide bacteriano como masa compacta en el centro de la célula. Imagen cortesía de Molecular and Cell Biology Instructional Laboratory Program, University of California, Berkeley.

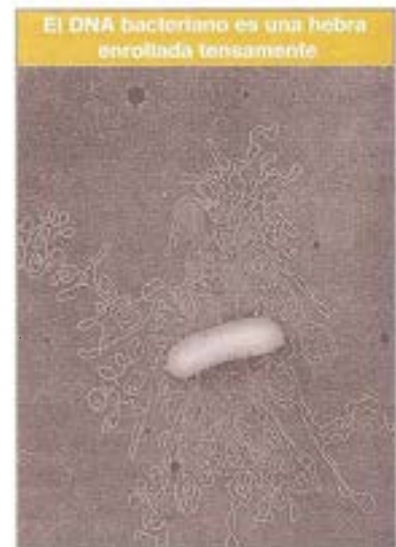


FIGURA 28.6 El nucleoide se vierte fuera de una *E. coli* lisada en forma de asas de una fibra. Fotografía © G. Murti/Photo Researchers, Inc.

de que intervenga de forma general en la condensación del nucleoide.

La proteína HI (también conocida como H-NS) se une al DNA interactuando preferentemente con secuencias plegadas. Las mutaciones en su gen han resultado en diversas formas (*osmZ*, *bglY*, *pilG*), cada una identificada como regulador aparente de un sistema diferente. Dichos resultados tal vez reflejen el efecto que HI produce en la topología local del DNA que incide en la expresión génica dependiente de un promotor en particular.

Sería de esperar que la ausencia de una proteína necesaria para la estructura del nucleoide tuviera graves efectos a la viabilidad, ¿por qué entonces los efectos en las deleciones de los genes para las proteínas HU y HI son relativamente restringidos? Una explicación es que dichas proteínas son *redundantes*, y una sola puede sustituir a las otras, de manera que se necesitarían deleciones en *todas ellas* para modificar notoriamente la estructura del nucleoide. Otra posibilidad es que aún no se han identificado las proteínas encargadas de las principales características de la integridad del nucleoide, el cual se puede aislar directamente en forma de complejo de sedimentación muy rápida constituido por ~80% DNA por masa. (Los complejos análogos en eucariotas tienen ~50% DNA por masa; véase la sección 28.4. El genoma bacteriano está superenrollado); puede ser desplegado por tratamiento con reactivos que actúan sobre el RNA o las proteínas, cuya posible participación en la estabilización de esta estructura es evidente; el papel del RNA ha sido bastante refractario al análisis.

28.4 El genoma bacteriano está superenrollado

Conceptos principales

- El nucleoide tiene ~100 dominios independientes superenrollados negativamente.
- La densidad promedio del superenrollamiento es ~1 superhélice/100 bp.

El DNA del nucleoide bacteriano aislado *in vitro* se comporta como una estructura doble cerrada, a juzgar por su respuesta al bromuro de etidio. Esa pequeña molécula se intercala entre pares de bases para generar giros superhelicoidales positivos en moléculas de DNA circular "cerradas", esto es, en moléculas donde ambas cadenas tienen integridad covalente. (En las moléculas circulares "abiertas" que incluyen una hendidura en una cadena o en moléculas lineales, el DNA puede rotar libremente en respuesta a la intercalación, aliviando así la tensión.)

En un DNA cerrado natural cuyo superenrollamiento es *negativo*, el intercalado de bromuro de etidio elimina primero las superhélices negativas y después introduce superhélices positivas. La cantidad de bromuro de etidio necesaria para llegar a un superenrollamiento de cero es un parámetro de la densidad original de las superhélices negativas.

El nucleoide compacto presenta algunas hendiduras durante su aislamiento, las cuales también pueden generarse por tratamientos limitados con desoxirribonucleasa, con lo cual, sin embargo, el bromuro de etidio no pierde su capacidad de introducir superhélices positivas. Esta capacidad del genoma de conservar su respuesta al bromuro de etidio ante las hendiduras significa que debe tener muchos **dominios** cromosómicos independientes, y que *en cada dominio, el superenrollamiento no resulta afectado por lo que sucede en los otros*.

Esta autonomía sugiere que la estructura del cromosoma bacteriano tiene la organización general que se muestra esquemáticamente en la **FIGURA 28.7**. Cada dominio consta de un asa de DNA cuyos extremos se aseguran de alguna forma (desconocida) que no permite que se propaguen los sucesos rotativos de un dominio a otro.

En los primeros informes se sugería que los dominios constan de ~40 kb de DNA, pero en análisis más recientes se sugiere que pueden ser más pequeños, de ~10 kb cada uno, o ~400 dominios en el genoma de *E. coli*. Los extremos de los dominios parecen distribuidos de manera aleatoria, y no localizados en sitios predeterminados del cromosoma.



FIGURA 28.7 El genoma bacteriano consta de un gran número de asas de DNA dicatenario (en forma de fibra); cada una de las cadenas se ancla en la base para formar un dominio estructural independiente.



FIGURA 28.8 Una superhélice sin restricción en la vía del DNA crea tensión, pero ésta no se transmite a lo largo del DNA cuando una superhélice se restringe por unión con proteínas.

La existencia de dominios independientes podría permitir que se mantuvieran diferentes grados de superenrollamiento en regiones diferentes del genoma, que tal vez sea importante al considerar las diferentes susceptibilidades de ciertos promotores bacterianos ante el superenrollamiento (véase sección 11.15, El superenrollamiento es una característica importante de la transcripción).

Como se muestra en la **FIGURA 28.8**, en el genoma, el superenrollamiento puede, en principio, asumir una de dos formas:

- Si un DNA superenrollado está libre, su vía no tiene restricciones y las superhélices negativas generan un estado de tensión por torsión que se trasmite libremente a lo largo del DNA en un dominio, tensión que se alivia por el desenrollamiento de la doble hélice, como se describe en la sección 19.12, El superenrollamiento afecta la estructura del DNA. El DNA se encuentra en equilibrio dinámico entre el estado de tensión y el de desenrollado.
- El superenrollamiento puede constreñirse si las proteínas se unen al DNA para mantenerlo en una configuración tridimensional particular, en cuyo caso, las superhélices estarán representadas por la vía que sigue el DNA en su vínculo fijo con las proteínas. La energía de la interacción entre las proteínas y el DNA superenrollado estabiliza el ácido nucleico, de manera que no se transmita tensión por la molécula.

¿*In vivo* las superhélices del DNA de *E. coli* están comprimidas o la doble hélice está sujeta a la tensión por torsión característica del DNA libre? Las mediciones del superenrollamiento *in vitro* se enfrentan al problema de que las proteínas que comprimen podrían haberse perdido durante el aislamiento. En

varios enfoques se sugiere que, *in vivo*, el DNA está sometido a estrés por torsión.

Uno de los enfoques es determinar el efecto de las hendiduras en el DNA. Las superhélices no comprimidas se liberan por medio de hendiduras, en tanto que las comprimidas no resultan afectadas. Las hendiduras liberan ~50% del superenrollamiento general, lo cual sugiere que casi la mitad del superenrollamiento se transmite como tensión a lo largo del DNA, y la otra mitad es absorbida por la unión con proteínas.

En otro enfoque se utiliza el psoraleno, reactivo de enlace cruzado, que se une más fácilmente al DNA cuando se encuentra bajo tensión por torsión. La reacción del psoraleno con el DNA de *E. coli in vivo* corresponde a una densidad promedio de un giro superhelicoidal negativo/200 bp ($\sigma = -0.05$).

También es posible analizar la capacidad de las células de formar estructuras alternas de DNA, por ejemplo, para generar estructuras cruciformes en secuencias palindrómicas. A partir del cambio del número de enlaces que se requiere para llevar a cabo tales reacciones, es posible calcular la densidad del superenrollamiento original, abordaje que sugiere una densidad promedio de $\sigma = -0.025$ o un giro superhelicoidal negativo/100 pares de bases.

Por tanto, las superhélices *crean* tensión por torsión, *in vivo*; podría haber variaciones acerca de un nivel promedio, y es difícil medir la variedad precisa de densidades. No obstante, es obvio que el nivel basta para ejercer efectos significativos en la estructura del DNA, por ejemplo, para ayudar a su disolución en regiones específicas, como orígenes o promotores.

Muchas de las características importantes de la estructura del nucleóide compacto aún no han sido establecidas. ¿Con qué especificidad se construyen los dominios? ¿Yacen las mismas secuencias siempre en las mismas localizaciones relativas o pueden variar los contenidos de dominios en particular? ¿Se mantiene la integridad del dominio? El análisis bioquímico por sí mismo no puede responder por completo a esas preguntas, pero es posible diseñar técnicas selectivas adecuadas, y las propiedades de los mutantes estructurales deberían llevar a un análisis molecular de la construcción del nucleóide.

28.5 El DNA eucariótico tiene asas y dominios unidos a un bastidor

Conceptos principales

- El DNA de la cromatina de interfase está superenrollado en forma negativa en dominios independientes de ~85 kb.
- Los cromosomas en metafase tienen un bastidor de proteínas al que se unen las asas del DNA.

La cromatina de interfase es una masa enmarañada de DNA que ocupa gran parte del volumen nuclear, a diferencia de la otra estructura tan organizada y reproducible de los cromosomas mitóticos. ¿Qué controla la distribución de la cromatina de interfase en el núcleo?

El aislamiento del genoma como cuerpo compacto único proporciona ciertas pruebas indirectas de su naturaleza. Aplicando la misma técnica perfeccionada para el aislamiento del nucleóide bacteriano (véase la sección 28.4, El genoma bacteriano está superenrollado), es posible lisar los núcleos sobre un gradiente de sacarosa, de modo de liberar el genoma de forma que pueda conectarse por centrifugación. Después de aislarlo de *Drosophila melanogaster*, es posible visualizarlo como una fibra de pliegues compactos (de 10 nm de diámetro) constituida de DNA unida a proteínas.

El superenrollamiento medido por su respuesta al bromuro de etidio corresponde casi a una superhélice negativa/200 bp. Esas superhélices pueden eliminarse mediante hendiduras de desoxirribonucleasa, si bien el DNA conserva la forma de la fibra de 10 nm, lo cual sugiere que el superenrollamiento se debe a la disposición de la fibra en el espacio, y que representa la torsión presente.

La relajación completa de las superhélices implica una hendidura/85 kb, de modo de identificar la longitud promedio del DNA "cerrado". Dicha región podría constituir un asa o dominio de características similares a los identificados en el genoma bacteriano. Las asas se observan directamente cuando la mayor parte de las proteínas es extraída de los cromosomas mitóticos. El complejo resultante consta de DNA vinculado con ~8% del contenido de proteína original. Como se observa en la FIGURA 28.9, los cromosomas sin proteínas adoptan la forma de un bastidor central rodeado de un halo de DNA.

El bastidor en metafase consta de una red densa de fibras, del cual emana DNA, aparentemente en forma de asas de 10 a 30 μm (30 a 90 kb) de longitud promedio. El DNA puede ser digerido sin afectar la integridad del bastidor, que consta de un conjunto de proteínas específicas, lo cual sugiere una forma de organización en la cual asas de DNA de ~60 kb se anclan en un bastidor proteináceo central.

El aspecto del bastidor simula un par de cromátides hermanas mitóticas, el cual suele tener una conexión muy estrecha (aunque en ocasiones las hermanas están separadas) y estar unido sólo por unas cuantas fibras. ¿Podría ser ésta la estructura encargada de mantener la forma de los cromosomas durante la mitosis? ¿Podría generarse por unión de los componentes proteínicos que suelen asegurar las bases de las asas en la cromatina de interfase?



FIGURA 28.9 Los cromosomas sin histonas constan de un bastidor proteínico al que se anclan las asas de DNA. Reproducida de Cell, vol. 12, Paulson, J. R., y Laemmli, U.K., *The structure of histone.....*, pp. 817-828. Copyright 1977, con autorización de Elsevier. Imagen cortesía de Ulrich K. Laemmli, University of Geneva, Switzerland.

28.6

Secuencias específicas unen el DNA a una matriz de interfase

Conceptos principales

- El DNA está unido a la matriz nuclear en secuencias específicas llamadas MAR o SAR.
- Las MAR son ricas en A-T, pero no tienen una secuencia de consenso específica.

¿Se une el DNA al bastidor mediante secuencias específicas? Los sitios de DNA unidos a estructuras proteináceas en núcleos de interfase se llaman **MARS (regiones de unión con la matriz)**, o bien **SAR (regiones de unión con el bastidor)**. Se desconoce la naturaleza de la estructura celular en interfase a la que se conectan. La cromatina a menudo parece unida a una matriz y se ha sugerido mucho que esa unión es necesaria para la transcripción o replicación. Cuando los núcleos carecen de proteínas, el DNA se expulsa como asas desde una estructura proteinácea residual, pero los intentos por relacionar las proteínas que se encuentran en esa preparación con elementos estructurales de células íntegras no han tenido éxito.

¿Regiones específicas del DNA están relacionadas con esa matriz?

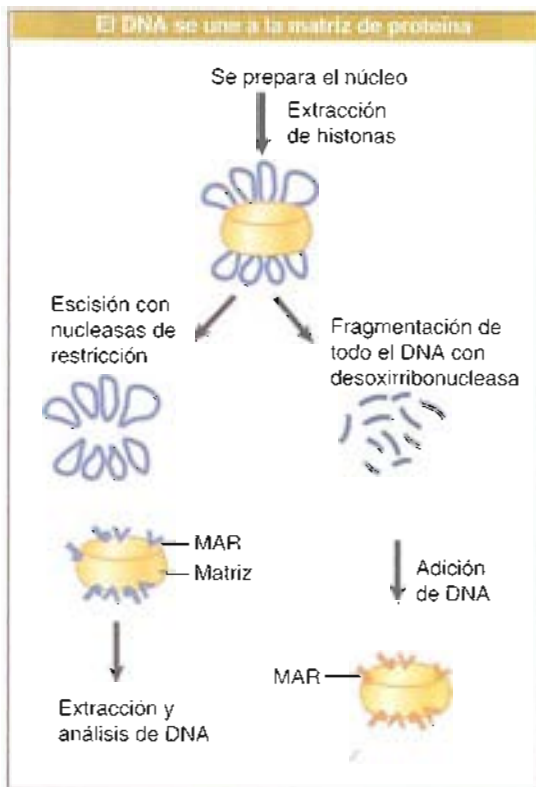


FIGURA 28.10 Las regiones vinculadas con la matriz se pueden identificar por caracterización del DNA retenido por la matriz aislada *in vivo* o por identificación de los fragmentos que pueden unirse a la matriz de la que se ha eliminado todo el DNA.

Los abordajes *in vivo* e *in vitro* se resumen en la **FIGURA 28.10**. Ambos se inician por aislamiento de la matriz como preparado nuclear crudo que contiene proteínas nucleares y cromatina, de modo que entonces se pueden usar diferentes tratamientos para caracterizar el DNA de la matriz o identificar el que puede unirse a ella.

Para analizar el MAR existente, es posible descondensar las asas cromosómicas por extracción de las proteínas, y al eliminar aquéllas mediante un tratamiento con nucleasas de restricción, quedan sólo secuencias MAR *in vivo* (supuestas) unidas a la matriz.

El abordaje complementario consiste en eliminar *todo* el DNA de la matriz por tratamiento con una desoxirribonucleasa, momento en que se puede estudiar la capacidad de los fragmentos aislados del DNA para unirse a la matriz *in vitro*.

Las mismas secuencias deberían vincularse con la matriz *in vivo* o *in vitro*. Una vez que se ha identificado un MAR potencial, se puede determinar el tamaño de la región mínima necesaria para el vínculo *in vitro* mediante deleciones, lo cual permitirá identificar proteínas que se unen a las secuencias MAR.

Una característica sorprendente es la falta de conservación de secuencia en fragmentos MAR: suelen ser ~70% ricas en A-T, pero carecen de secuencias de consenso desde otros puntos de vista. Sin embargo, otras secuencias interesantes se encuentran a menudo en la cadena de DNA que contiene la MAR. Los sitios de acción en configuración *cis* que regulan la transcripción son frecuentes, y suele haber un sitio de reconocimiento de la topoisomerasa II en MAR. Por ello es posible que esta última desempeñe más de una función, pues proporciona un sitio de unión con la matriz y contiene otro donde se efectúan cambios topológicos del DNA.

¿Cuál es la relación entre el bastidor de cromosomas de las células en división y la matriz de las células de interfase? ¿Las mismas secuencias de DNA están unidas a ambas estructuras? En varios casos, los mismos fragmentos de DNA que se encuentran en la matriz nuclear *in vivo* pueden recuperarse del bastidor en metafase, y los fragmentos que contienen secuencias MAR pueden unirse a un bastidor en metafase, de manera que parece probable que el DNA contenga un solo tipo de sitio de unión. En células de interfase, el sitio de unión se conecta con la matriz nuclear, en tanto que en células mitóticas hace lo propio con el bastidor del cromosoma.

La matriz nuclear y el bastidor cromosómico constan de diferentes proteínas, si bien hay algunos componentes comunes. La topoisomerasa II es un destacado componente del bastidor cromosómico y constituyente de la matriz nuclear, lo cual sugiere que el control de la topología es importante en ambos casos.

28.7

La cromatina se divide en eucromatina y heterocromatina

Conceptos principales

- Los cromosomas individuales se observan sólo durante la mitosis.
- En la interfase, la masa general de la cromatina está en forma de eucromatina, con empaquetamiento menos compacto que los cromosomas en mitosis.
- Las regiones de heterocromatinas se mantienen densamente empaquetadas durante la interfase.

Cada cromosoma tiene un solo DNA dicatenario muy largo, lo cual explica porqué la replicación cromosómica es semiconservadora, como la molécula de DNA individual. (Esto no necesariamente sería el caso si un cromosoma porta muchas moléculas independientes de DNA.) El DNA dicatenario único se pliega en una fibra que recorre continuamente el



FIGURA 28.11 Las cromátides hermanas de un par mitótico constan cada una de una fibra (~30 nm de diámetro plegada compactamente dentro del cromosoma). Imagen cortesía de Daniel L. Hartl, Harvard University.

cromosoma, de modo que en lo que se refiere a la cromatina de interfase y la estructura del cromosoma mitótico, se tiene que explicar el empaquetado de una sola molécula de DNA extremadamente larga en una forma en que pueda transcribirse y replicarse, así como adoptar cíclicamente la forma más y menos comprimida.

Los cromosomas eucarióticos individuales entran a escena brevemente durante el acto de la división celular, sólo entonces pueden verse como unidades compactas. La **FIGURA 28.11** es una micrografía electrónica de un par de cromátides hermanas captadas en metafase. (Las cromátides hermanas son cromosomas producidos por el suceso de replicación previo, aún unidos en esa etapa de la mitosis.) Cada una consta de una fibra de ~30 nm de diámetro y tiene aspecto nudoso. El DNA está de cinco a diez veces más condensado en los cromosomas que en la cromatina de interfase.

Sin embargo, durante la mayor parte del ciclo vital de la célula eucariótica, su material genético ocupa una zona del núcleo donde no se pueden distinguir cromosomas individuales. La estructura de la cromatina de interfase no cambia visiblemente entre divisiones, no hay una rotura evidente durante el periodo de replicación, cuando la cantidad se duplica. La cromatina es fibrilar, si bien es difícil discernir en detalle su configuración general en el espacio, pero es similar, o idéntica, a la de los cromosomas mitóticos.

Como puede observarse en el corte nuclear de la **FIGURA 28.12**, la cromatina se divide en dos tipos de material:



FIGURA 28.12 Un corte delgado a través de un núcleo teñido con el colorante de Feulgen muestra la heterocromatina como regiones compactas agrupadas cerca del nucléolo y la membrana nuclear. Imagen cortesía de Edmund Puvion, Centre National de la Recherche Scientifique.

- En casi todas las regiones, las fibras están menos densamente empaquetadas que en los cromosomas mitóticos, material denominado **euromatina**, que parece relativamente disperso en el núcleo y que ocupa la mayor parte de éste en la **Figura 28.12**.
- Algunas regiones de la cromatina están muy densamente empaquetadas con fibras, lo cual les confiere un estado comparable al de los cromosomas durante la mitosis, material denominado **heterocromatina**, que por lo general está en los centrómeros, pero también en otras localizaciones. Experimenta el ciclo celular con relativamente pocos cambios en cuando a condensación. En la **Figura 28.12** forma una serie de cúmulos bien definidos, pero a menudo las diversas regiones de heterocromatina se acumulan en un **chromocentro**, densamente teñido. (Esta descripción se aplica a regiones que siempre son heterocromáticas y constituyen la denominada heterocromatina constitutiva; además, hay otro tipo de heterocromatina, la heterocromatina facultativa, en la cual, algunas regiones de la euromatina se convierten a un estado heterocromático.)

Las mismas fibras transcurren de manera continua entre euromatina y heterocromatina, lo cual implica que esos estados representan diferentes grados de condensación del material genético; de la misma forma, las regiones euromáticas se encuentran en diferentes estados de condensación durante la interfase y la mitosis. Así, el material genético se organiza de modo que permita mantener estados alternativos en la cromatina y cambios cíclicos en el empaquetado de la euromatina entre la interfase y la división. En el **Capítulo 30**, Control de la estructura de la cromatina, se describe la base molecular de esos estados.

La condición estructural del material genético se correlaciona con su actividad. Las características comunes de la heterocromatina constitutiva son:

- Está permanentemente condensada.
- A menudo consta de múltiples repeticiones de unas cuantas secuencias de DNA que no se transcriben.
- La densidad de los genes en esa región ha disminuido mucho respecto de la eucromatina, y los genes se traslocan a ella o cerca de ella, a menudo desactivados.
- Se replica tardíamente en la fase S y su recombinación genética es menos frecuente, lo cual tal vez resulte de su estado condensado.

Hay algunos marcadores moleculares de los cambios de propiedades del DNA y sus componentes proteínicos (véase la sección 31.3, La heterocromatina depende de interacciones con histonas), entre otros, acetilación reducida de proteínas histonas, aumento de la metilación de una proteína histona e hipermetilación de bases citidina en el DNA, cambios moleculares que dan lugar a la condensación del material, de lo que depende su inactividad.

Aunque los genes activos están contenidos en la eucromatina, sólo una pequeña parte de sus secuencias se transcribe en cualquier momento, de modo que la localización en la eucromatina es *necesaria* para la expresión genética, pero *insuficiente*.

28.8 Los cromosomas tienen patrones de banda

Conceptos principales

- Ciertas técnicas de tinción hacen que los cromosomas parezcan una serie de estrías llamadas bandas G.
- Las bandas tienen un menor contenido de G-C que los espacios intermedios (interbandas).
- Los genes se concentran en las interbandas, ricas en G-C.

Como resultado del estado difuso de la cromatina, no se puede determinar directamente la especificidad de su organización, pero sí investigar si la estructura del cromosoma (mitótica) es ordenada. ¿Siempre yacen secuencias particulares en sitios particulares o el plegamiento de la fibra de la estructura global es algo más aleatorio?

En el ámbito del cromosoma, cada miembro del conjunto tiene una ultraestructura diferente y reproducible. Cuando son sometidos a ciertos tratamientos y después se tiñen con el colorante químico Giemsa, los cromosomas generan una serie de **bandas G**. En la **FIGURA 28.13** se presenta un ejemplo de los cromosomas humanos.

Hasta que no se perfeccionó esta técnica, los cromosomas sólo se distinguían por sus dimensiones generales y la localización relativa de su centrómero, pero las bandas G permiten identificar a cada cromosoma por su patrón de bandas característico, que permite identificar la translocación de un cromosoma a otro por comparación con el conjunto diploide original. En la **FIGURA 28.14** se muestra un esquema de las bandas del cromosoma X humano; estas bandas son estructuras grandes, cada una de $\sim 10^7$ bp de DNA, posiblemente con muchos cientos de genes.

La técnica de bandas es de una utilidad práctica enorme, pero el mecanismo sigue siendo un misterio. Todo lo que se sabe es que el colorante tiñe los cromosomas no tratados de manera más o menos uniforme. Por tanto, la generación de bandas depende de una diversidad de tratamientos que modifica la respuesta del cromosoma (supuestamente por extracción del componente que se une al colorante desde las regiones sin bandas). Se pueden generar bandas similares mediante tratamientos variados.

La única característica conocida que distingue a las bandas de las interbandas es que las primeras tienen un menor contenido de G-C, que es un resultado peculiar. Si hay ~ 10 bandas en un cromosoma grande, con un contenido total de ~ 100 Mb, el cromosoma se divide en regiones de ~ 5 Mb de longitud que alternan con las del contenido bajo (bandas) y elevado (interbandas) de G-C. Los genes (identificados por hibridación con RNAm) tienen la tendencia a localizarse en las regiones interbandas.

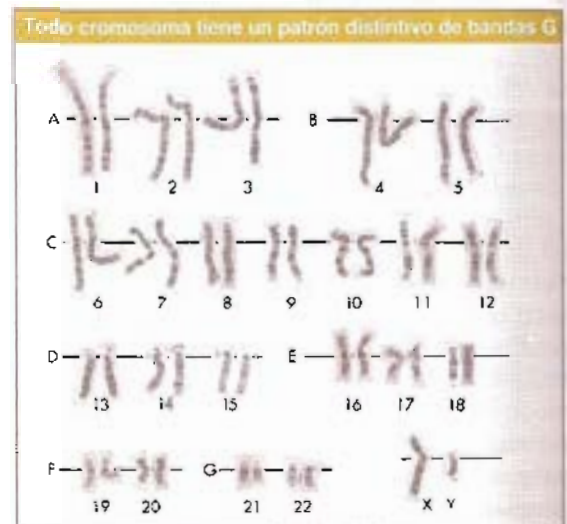


FIGURA 28.13 Las bandas G generan una serie lateral característica de bandas en cada miembro del conjunto cromosómico. Imagen cortesía de Lisa Shaffer, Washington State University-Spokane.

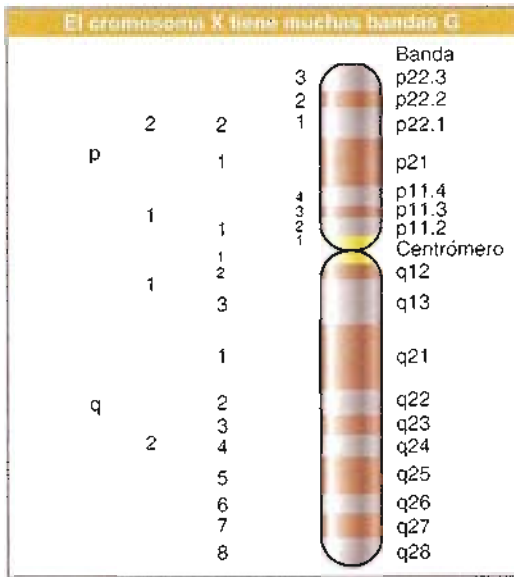


FIGURA 28.14 El cromosoma X humano puede dividirse en regiones distintas según su patrón de bandas. El brazo corto es *p*, y el largo, *q*; cada brazo se divide en regiones más pequeñas, subdivididas. En este mapa se observa una estructura de baja resolución; a mayor resolución, algunas bandas se subdividen adicionalmente en bandas más pequeñas e interbandas (p. ej., *p21* se divide en *p21.1*, *p21.2* y *p21.3*).

fenómeno que respalda a una organización dependiente de secuencias largas.

La secuencia del genoma humano confirma la observación básica. En la **FIGURA 28.15** se muestran claras fluctuaciones del contenido de G-C cuando el genoma se divide en ramas pequeñas (segmentos o tramos de DNA). El promedio de 41% de G-C es común en los genomas de mamíferos, pero hay regiones con apenas 30% o hasta con 65%. Cuando se revisan tramos más largos, hay menos variaciones. La longitud promedio de las regiones que contienen >43% de G-C es de 200 a 250 kb, lo cual aclara que la estructura de bandas o interbandas no representa segmentos homogéneos que alternen en cuanto a contenido de G-C, si bien las bandas contienen una mayor cantidad de segmentos con contenido bajo de G-C. Los genes se concentran en regiones con un contenido más alto de G-C. Todavía se desconoce cómo afecta el contenido de G-C a la estructura cromosómica.

28.9 Los cromosomas en escobillón se extienden

Concepto principal

- Los sitios de expresión génica de los cromosomas en escobillón muestran asas que se extienden a partir de su eje.

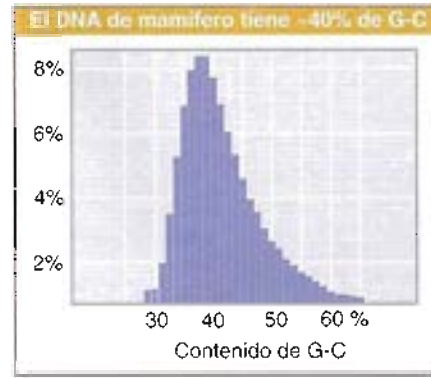


FIGURA 28.15 En distancias cortas hay grandes fluctuaciones en cuanto a contenido de G-C. Cada barra muestra el porcentaje de fragmentos de 20 kb con el contenido determinado de G-C.

Sería extremadamente útil localizar la expresión génica en su estado natural para observar qué cambios estructurales se relacionan con la transcripción. La compresión del DNA en la cromatina, aunada a la dificultad de identificar genes particulares en su interior, hace imposible visualizar la transcripción de los genes activos individuales.

La expresión génica se observa directamente en ciertas circunstancias desusadas, en las cuales, los cromosomas se encuentran muy extendidos, de modo que se facilita distinguir loci individuales (o grupos). La diferenciación lateral de la estructura es evidente en muchos cromosomas cuando apenas llegan para la meiosis, etapa en la que simulan una serie de cuentas ensartadas en un hilo; las cuentas son gránulos intensamente teñidos que apropiadamente se nombran **cromómeros**. Sin embargo, en general hay poca expresión génica durante la meiosis, y no es práctico utilizar ese material para identificar las actividades de cada uno de los genes. Una circunstancia excepcional que permite estudiar el material es la constituida por los **cromosomas en escobillón**, mejor caracterizados en ciertos anfibios.

Los cromosomas en escobillón se forman durante una meiosis inusualmente larga que puede durar ¡incluso varios meses! Durante ese periodo, los cromosomas se mantienen en una forma no distendida, visible con el microscopio de luz; en un momento posterior de la meiosis, recuperarán su tamaño compacto normal.

Así, el estado de extensión brinda esencialmente una versión no plegada del estado normal del cromosoma.

Los cromosomas en escobillón son bivalentes meióticos, cada uno constituido por dos pares de cromátides hermanas. En la **FIGURA 28.16** se muestra un ejemplo en que dichos pares casi se han separa-

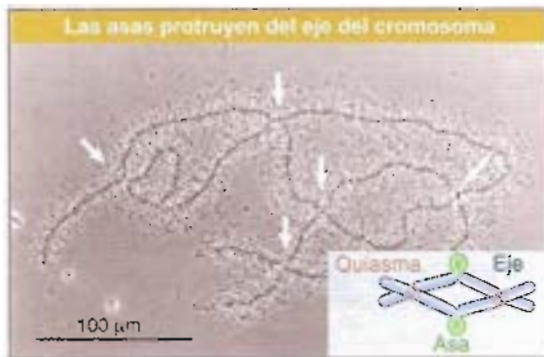


FIGURA 28.16 Un cromosoma en escobillón es un divalente meiótico en el que dos pares de cromátides hermanas se mantienen juntas en el quiasma (indicado con flechas). Imagen cortesía de Joseph G. Gall, Carnegie Institution.

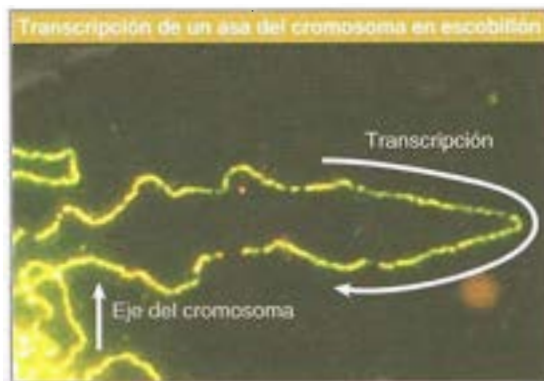


FIGURA 28.17 Un asa del cromosoma en escobillón es rodeada por una matriz de ribonucleoproteína. Reproducida de Gall, J. G. et al. *Mol. Biol. Cell.* Diciembre 1999, 10:4385-4402. Imagen cortesía de Joseph G. Gall, Carnegie Institution.

do, de manera que se mantienen juntos sólo por los quiasmas. Cada par de cromátides hermanas forma una serie de cromómeros elipsoidales, de ~ 1 a $2 \mu\text{m}$ de diámetro, conectados por una cadena muy fina que contiene dos cadenas hermanas dobles de DNA y transcurre en forma continua por el cromosoma, a través de los cromómeros.

La longitud de los cromosomas en escobillón en la lagartija acuática *Notophthalmus viridescens* va de 400 a 800 μm , frente a la variación de 15 a 20 μm que se observa más tarde en la meiosis, de modo que su empaquetamiento es ~ 30 veces menos estrecho. La longitud total del conjunto total de cromosoma en escobillón es de 5 a 6 mm y se organiza en ~ 5000 cromómeros.

Los cromosomas en escobillón toman su nombre de las asas laterales que abandonan los cromómeros en ciertas posiciones (simulan un escobillón, que es un objeto extinto). Las asas se extienden por pares, una a partir de cada cromátide hermana. Las asas forman un continuo con la cadena axial, lo

que sugiere que representan material cromosómico expulsado de esa organización más compacta del cromómero.

Las asas están rodeadas por una matriz de ribonucleoproteínas que contienen cadenas recién formadas de RNA, y a menudo es posible definir una unidad de transcripción por el aumento en la longitud de la RNP que se mueve en torno al asa; véase el ejemplo de la **FIGURA 28.17**.

Por tanto, el asa es un segmento expulsado del DNA en proceso de transcripción activa. En ciertos casos se han identificado las asas que corresponden a genes en particular; la estructura del gen transcrito y la naturaleza de su producto pueden analizarse *in situ*.

28.10 Los cromosomas politénicos forman bandas

Concepto principal

- Los cromosomas politénicos de los dípteros tienen una serie de bandas que se pueden usar como mapa citológico.

Los cromosomas de los núcleos de interfase de algunos tejidos de la larva de mosca díptera son mucho mayores respecto de su estado normal, tanto en diámetro como en longitud. En la **FIGURA 28.18** se muestra un ejemplo de un conjunto cromosómico de la glándula salival de *D. melanogaster*, cuyos miembros se denominan cromosomas **politénicos**.

Cada miembro del conjunto politénico consta de una serie visible de **bandas** (más apropiadamente llamadas cromómeros, aunque es un término poco usado) que van de $\sim 0.5 \mu\text{m}$ de ancho la más grande, a $\sim 0.05 \mu\text{m}$ la más pequeña (ésta es distinguible sólo por microscopía electrónica) y que contienen la mayor parte de la masa del DNA; se tiñen intensamente con los reactivos apropiados. Las regiones intermedias son menos susceptibles a la tinción y se denominan **interbandas**. El conjunto de *D. melanogaster* tiene ~ 5000 bandas.

Los centrómeros de los cuatro cromosomas de *D. melanogaster* se suman para formar un cromocentro constituido sobre todo por heterocromatina (en el macho incluye el cromosoma Y completo). A ese respecto, $\sim 75\%$ del conjunto de DNA haploide se organiza en bandas e interbandas alternadas, con una longitud de $\sim 2000 \mu\text{m}$. Extendido, el DNA llegaría a los $\sim 40000 \mu\text{m}$, de manera que la razón de empaquetamiento sería de ~ 20 , con lo que se demuestra vívidamente la extensión del material genético respecto de los estados normales de la cromatina de interfase o cromosomas mitóticos.



FIGURA 28.18 Los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* forman una serie alternante de bandas e interbandas. Imagen cortesía de José Bonner, Indiana University.

¿Qué estructura tienen esos cromosomas gigantes? Cada uno es producido por repeticiones sucesivas de un par diploide en sinapsis, pero las réplicas no se separan, se mantienen unidas en estado extendido. Al inicio del proceso, el contenido de DNA de cada par de sinapsis es de $2C$ (donde C representa el contenido de DNA del cromosoma individual), que entonces se duplica hasta nueve veces, para llegar a un máximo de $1024C$. El número de duplicaciones es diferente en los diversos tejidos de las larvas de *D. melanogaster*.

Cada cromosoma se ve como un gran número de fibras paralelas longitudinales, muy condensadas en las bandas y menos en las interbandas. Es posible que cada fibra represente un solo cromosoma haploide (C), lo cual da lugar al nombre de politénico, el grado de politenia corresponde al número de cromosomas haploides contenidos en el cromosoma gigante.

El patrón de bandas es característico de cada cepa de especies de *Drosophila*. El número constante y la disposición lineal de las bandas se observó por primera vez en el decenio de 1930, cuando se detectó que forman un *mapa citológico* de los cromosomas. Las reestructuraciones, como deleciones, inversiones y duplicaciones, resultan en modificaciones en el orden de las bandas.

El arreglo lineal de las bandas es equiparable al correspondiente de los genes, de modo que las reestructuraciones genéticas, según se observa en un mapa de enlace, pueden correlacionarse con las estructurales de los mapas citológicos. En última instancia, se puede localizar una mutación determinada en una banda en particular. El número total de genes de *D. melanogaster* supera al número de bandas, de manera que probablemente hay genes múltiples en casi todas las bandas.

La posición de genes específicos en el mapa citológico suele determinarse directamente por la



FIGURA 28.19 Mediante hibridación *in situ* es posible identificar bandas individuales que contienen genes particulares.

técnica de *hibridación in situ*, cuyo protocolo se resume en la **FIGURA 28.19**. Una sonda radioactiva que representa a un gen (con mucha frecuencia un clon de DNAc marcado, derivado del RNAm) da lugar a la hibridación con el DNA desnaturalizado de los cromosomas politénicos *in situ*. Mediante autorradiografía se identifican las posiciones de los genes correspondientes por la superposición de granos en una o varias bandas específicas; véanse los ejemplos de la **FIGURA 28.20**. Recientemente las sondas fluorescentes han sustituido a las radioactivas, que facilitan la determinación directa de la banda en la que yace una secuencia en particular.

28.11 Los cromosomas politénicos se expanden en sitios de expresión génica

Concepto principal

- Las bandas son sitios de expresión génica en cromosomas politénicos que se expanden para dar lugar a "abultamientos".

Una de las características intrigantes de los cromosomas politénicos es que los sitios reactivos son visibles. Algunas de las bandas pasan transitoriamente por un estado de expansión en el cual simulan un **abultamiento** en el cromosoma, cuando material



FIGURA 28.20 Vista ampliada de las bandas 87A y 87C en que se observa la hibridación *in situ* con DNA marcado, extraído de células con choque térmico. Imagen cortesía de José Bonner, Indiana University.

cromosómico es expulsado desde el eje. En la **FIGURA 28.21** se observan abultamientos muy grandes (llamados anillos de Balbiani).

¿Cuál es la naturaleza del abultamiento? Consta de una región en que las fibras cromosómicas se desenrollan respecto de su estado usual de empaquetamiento en las bandas, aunque mantienen su continuidad con el eje cromosómico. Los abultamientos suelen emanar de bandas únicas, si bien, cuando son muy grandes, como los anillos de Balbiani, el aumento de volumen puede ser de tal magnitud, que oculta la disposición de las bandas subyacentes.

El patrón de abultamientos se relaciona con la expresión génica. Durante el desarrollo de las larvas, los abultamientos aparecen y remiten con un patrón definido, específico de tejido, de manera que, en un momento dado, se observa un patrón característico en cada tejido. Los abultamientos son inducidos por la hormona *ecdisona*, que controla el desarrollo en el género *Drosophila* e induce algunos directamente, mientras que otros, son inducidos de manera indirecta por los productos de los primeros.

Los abultamientos son *sitios en que se está sintetizando RNA*. El concepto aceptado ha sido que la expansión de la banda es consecuencia de la necesidad de relajación de la estructura para sintetizar RNA.

Por tanto, es posible considerar a los abultamientos como consecuencia de la transcripción, un gen activo único puede generar un abultamiento.



FIGURA 28.21 El cromosoma IV del insecto *C. tentans* tiene tres anillos Balbiani en la glándula salival. Reproducido de Cell, vol. 4, Daneholt, B., et al., *Transcription in polytene chromosomes...*, pp. 1-9. Copyright 1975, con autorización de Elsevier. Imagen cortesía de Bertil Daneholt, Medical Nobel Institute.

Los sitios de abultamiento difieren de las bandas normales en la acumulación de proteínas adicionales, por ejemplo, la polimerasa II de RNA y otras vinculadas con la transcripción.

Las características de los cromosomas en escobión y politénicos sugieren una conclusión general. Para ser transcrito, el material genético se dispersa respecto de su estado usual de empaquetado denso. La duda es si esa dispersión en el ámbito macroscópico del cromosoma emula los sucesos que ocurren en el ámbito molecular de la masa de eucromatina de interfase ordinaria.

¿Las bandas de un cromosoma politénico tienen un significado funcional? Es decir, ¿corresponde a cada banda a un tipo de unidad genética? Se podría pensar que la respuesta es inmediatamente evidente a partir de la secuencia del genoma de la mosca, porque mediante el mapeo de interbandas con la secuencia sería posible determinar si en alguna el tipo de identidad es fijo, pero hasta ahora no se ha encontrado un patrón que apunte a un significado funcional de las bandas.

28.12 El cromosoma eucariótico es un dispositivo de segregación

Conceptos principales

- Un cromosoma de eucariota se mantiene en el huso mitótico por unión de microtúbulos al cinetócoro, que se forma en su región centromérica.
- Los centrómeros a menudo tienen heterocromatina rica en secuencias de DNA satélite.



FIGURA 28.22 Los cromosomas sufren tracción hacia los polos a través de microtúbulos que se unen a los centrómeros. Las cromátides hermanas se mantienen juntas hasta la anafase, mediante proteínas (cohesinas). El centrómero se muestra aquí a la mitad del cromosoma (metacéntrico), pero puede localizarse en cualquier sitio, a todo lo largo, incluso cerca del extremo (acrocéntrico) y en el extremo (telocéntrico).

Durante la mitosis, las cromátides hermanas se dirigen a polos opuestos de la célula, movimiento que depende de la unión de los cromosomas a los microtúbulos, conectados a los polos en el otro extremo. (Los microtúbulos constituyen un sistema filamentososo celular que se reorganiza durante la mitosis, de manera que conecte los cromosomas con los polos de la célula.) Los sitios de las dos regiones en que se organizan los extremos de los microtúbulos, cerca de los centriolos, en polos y cromosomas, se llaman **MTOC** (centros de organización de microtúbulos).

En la **FIGURA 28.22** se ilustra la separación de las cromátides hermanas conforme avanza la mitosis de metafase a telofase. La región del cromosoma encargada de su segregación en la mitosis y la meiosis se llama **centrómero**. La región centromérica de cada cromátide hermana está sujeta a tracción por los microtúbulos hacia el polo opuesto, y para oponerse a esa fuerza motriz, las proteínas "goma", llamadas cohesinas, mantienen juntas a las cromátides hermanas. Inicialmente, las cromátides hermanas se separan en sus centrómeros y después se sueltan completamente una de otra durante la anafase, cuando las cohesinas se fragmentan. El centrómero es sometido a tracción hacia el polo durante la mitosis y el cromosoma adherido a él es "arrastrado", de modo que éste constituye el dispositivo de unión de gran número de genes con el aparato para la división. Dicho aparato contiene el sitio en que las cromátides hermanas se mantienen juntas antes de la separación de cromosomas individuales, que en la fotografía de la Figura 28.11 se muestra como una región comprimida que conecta los cuatro brazos del cromosoma; las cromátides hermanas se encuentran en la etapa de metafase de la mitosis.

El centrómero es indispensable para la segregación, según se observa por el comportamiento de los cromosomas que se han roto. Una sola rotura

genera un sitio que retiene el centrómero y un **fragmento acéntrico**, que carece de él. Este último no se une con el huso mitótico y, como resultado, no puede incluirse en ninguno de los núcleos de células hijas.

(Cuando el movimiento cromosómico depende de centrómeros bien definidos, sólo puede haber un centrómero por cromosoma, pero si las translocaciones generan cromosomas con más de un centrómero, en la mitosis se forman estructuras aberrantes debido a que los dos centrómeros de la misma cromátide hermana han sido arrastrados hacia diferentes polos, rompiendo así el cromosoma. No obstante, en algunas especies los centrómeros son "difusos", y la situación, diferente. En el ámbito molecular sólo se han analizado centrómeros bien definidos.)

Las regiones que flanquean al centrómero suelen ser ricas en secuencias DNA satélite y presentan una cantidad considerable de heterocromatina, pero todo el cromosoma está condensado, de manera que la heterocromatina centromérica no es de inmediato evidente en los cromosomas mitóticos, pero puede observarse mediante una técnica que genera **bandas C**. En el ejemplo de la **FIGURA 28.23**, todos los centrómeros se muestran como regiones de tinción intensa. Aunque esto es común, la heterocromatina no es identificable en torno a *todos* los centrómeros conocidos, lo cual sugiere que probablemente es indispensable para el mecanismo de división.

La región del cromosoma en que se forma el centrómero se define por secuencias de DNA (si bien se han definido en muy pocos casos). El DNA centromérico se une a proteínas específicas encargadas de establecer la estructura que une el cromosoma con los microtúbulos, estructura llamada **cinetócoro**, que es un objeto fibroso de tinción intensa con diámetro o longitud de ~400 nm. El cinetócoro proporciona el MTOC de un cromosoma.



FIGURA 28.23 Las bandas C generan una tinción intensa en los centrómeros de todos los cromosomas. Imagen cortesía de Lisa Shaffer, Washington State University-Spokane.

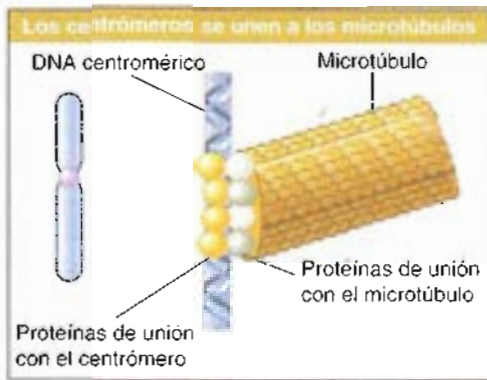


FIGURA 28.24 El centrómero se identifica por una secuencia de DNA que se une a proteínas específicas. Dichas proteínas no se unen a los microtúbulos, sino que establecen el sitio en que las proteínas de unión de microtúbulos, a su vez, se unen.

La **FIGURA 28.24** muestra la jerarquía de organización que conecta el DNA centromérico con los microtúbulos. Las proteínas unidas al DNA centromérico se adhieren a otras que, a su vez, se unen con los microtúbulos (véase la sección 28.15. El centrómero se une a un complejo proteínico).

28.13 Los centrómeros pueden contener DNA repetitivo

Conceptos principales

- Los centrómeros de los cromosomas de eucariotas superiores contienen grandes cantidades de DNA repetitivo.
- Se desconoce la función del DNA repetitivo.

Para que el centrómero funcione, el DNA debe ser bastante largo. (Los elementos cortos bien definidos de *Saccharomyces cerevisiae* pueden ser una excepción a la regla general.) Los casos en que es posible comparar secuencias específicas del DNA con la región centromérica, suelen incluir secuencias repetitivas.

Hasta ahora, *S. cerevisiae* es el único caso en que el DNA centromérico puede identificarse por su capacidad de conferir estabilidad en plásmidos. Sin embargo, con la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, de sólo tres cromosomas, se ha utilizado un enfoque relacionado, y la región en que se encuentra cada centrómero se identificó por delección de la mayor parte de la secuencia de cada cromosoma para crear un minicromosoma estable. Mediante ese abordaje se localiza a los centrómeros en regiones de 40 a 100 kb, que consisten en DNA parcial o completamente repetitivo. No se sabe bien a bien qué tanto de cada una de esas regiones más bien largas se necesita para la segregación de cromosomas en la mitosis y la meiosis.

Los intentos para localizar funciones centroméricas en cromosomas del género *Drosophila* sugieren que se dispersan en una gran región constituida por 200 a 600 kb. El gran tamaño de ese tipo de centrómero sugiere que es posible que contenga varias funciones especializadas, incluidas secuencias necesarias para el ensamblaje del cinetócoro y el apareamiento de cromátides hermanas.

En el género *Arabidopsis*, el tamaño del centrómero es comparable; cada uno de los cinco cromosomas tiene una región centromérica en la cual prácticamente se ha suprimido la recombinación, que ocupa >500 kb. Obviamente incluye al centrómero, pero no se cuenta con información directa respecto de cuánto se necesita de él. En esas regiones hay genes expresados, lo cual hace dudar respecto de si toda la región es parte del centrómero. En el centro de la misma se encuentra una serie de 180 bp repetidos, el tipo de estructura que suele relacionarse con los centrómeros. Es muy pronto para decir cómo se relacionan dichas estructuras con la función del centrómero.

En los primates, el segmento primario que incluye la heterocromatina de los centrómeros es el DNA α satélite, que consta de arreglos seriados de unidades de repetición de 170 bp. Hay variantes significativas entre las repeticiones, si bien las de cualquier centrómero tienden a relacionarse mejor entre sí que con miembros de la familia de otras localizaciones. No hay duda de que las secuencias necesarias para la función del centrómero residen en bloques de DNA satélite α , pero no se sabe si esas mismas secuencias satélite α llevan a cabo la función o llevan incrustadas otras secuencias.

El centrómero de *S. cerevisiae* tienen secuencias cortas conservadas y una cadena A-T larga

```
TCACA*GATGATA*TTTGATTTTATTATA*TTTTAAAAAAGTAAAAAATAAAAAGTAGTTTATTTTTAAAAAATAAAATTTAAATATTTTCACAAAATGAT*TTCCGAA  
AGTGTA*CTACTATAAACTAAAAATAAATAAAAAATTTTTTCATTTTTTATTTTTTCATCAAAATAAAAAATTTTTTATTTTAAATTTTATAAAGTG*TTTACTAAAGGCT*  
CDE-I CDE-II 80-90 bp, >90% A + T CDE-III
```

FIGURA 28.25 Por las homologías de secuencia entre elementos CEN de levaduras es posible identificar tres regiones conservadas.

28.14 Las secuencias de DNA de los centrómeros de *S. cerevisiae* son cortas

Conceptos principales

- En *S. cerevisiae*, los elementos CEN se identifican por la capacidad de permitir que un plásmido se segregue de manera precisa en la mitosis.
- Los elementos CEN consisten en las secuencias cortas conservadas CDE-I y CDE-III, las cuales flanquean una región CDE-II rica en A-T.

Si una secuencia centromérica del DNA se encarga de la segregación, cualquier molécula que porte esa secuencia debería trasladarse apropiadamente en la división celular, en tanto que cualquiera que careciera de ella, debería fracasar en la segregación. Este pronóstico se ha usado para aislar el DNA centromérico en la levadura *S. cerevisiae*. Los cromosomas de las levaduras no muestran cinetócoros visibles comparables con los de eucariotas superiores, pero de todas formas se dividen en la mitosis y se segregan en la meiosis por los mismos mecanismos.

La ingeniería genética ha permitido producir plásmidos de levaduras que se replican como las secuencias cromosómicas (véase la sección 15.8, Los orígenes de la replicación pueden aislarse en las levaduras), pero son inestables en la mitosis y la meiosis y desaparecen de gran parte de las células porque se segregan de manera errática. Los fragmentos de DNA cromosómico que contienen centrómeros se han aislado por su capacidad de conferir estabilidad mitótica a esos plásmidos.

Un fragmento de regiones de DNA centromérico (CEN) se identifica como la secuencia mínima susceptible de conferir estabilidad a tal plásmido. Otra forma de caracterizar la función de esas secuencias es modificarlas *in vitro* y después reintroducirlas en la célula de la levadura, donde, en el cromosoma, sustituyen al centrómero correspondiente, lo cual permite que las secuencias necesarias para la función del CEN se definan directamente en el contexto del cromosoma.

Un fragmento del CNE derivado de un cromosoma puede sustituir al centrómero de otro cromosoma sin consecuencias aparentes, lo cual sugiere que los centrómeros son intercambiables, *se utilizan sencillamente para unir el cromosoma al huso y no se relacionan con la distinción entre un cromosoma y otro.*

Las secuencias requeridas para la función centromérica entran en una banda de ~120 bp; la región centromérica está empaquetada en una estructura resistente a la nucleasa y se une a un solo microtúbulo, de modo que la región centromérica de *S. cerevisiae* se puede aprovechar para identificar a las proteínas que se unen al DNA del centrómero y a las que conectan al cromosoma con el huso.

Como se resume en la FIGURA 28.25, en la región CEN se pueden distinguir tres tipos de elementos de secuencia:

- El elemento dependiente del ciclo celular (CED)-I es una secuencia de 9 bp que se conserva con variaciones menores en el límite izquierdo de todos los centrómeros.
- El CDE-II corresponde a una secuencia >90% rica en A-T, de 80 a 90 bp, que se encuentra en todos los centrómeros, cuya función podría depender de su longitud, más que de la exactitud de la secuencia. Su constitución recuerda algunos DNA repetidos, cortos y seriados (satélites) (véase la sección 6.12, Los satélites de los artrópodos tienen repeticiones idénticas muy cortas) en los que la composición de las bases podría causar algunas distorsiones características de la estructura doble helicoidal del DNA.
- El CDE-III es una secuencia de 11 bp muy conservada en el límite derecho de todos los centrómeros. Las secuencias a uno y otro lado del elemento están menos conservadas, y probablemente también sean necesarias para la función del centrómero. (El CDE-III podría tener más de 11 bp si resulta que las secuencias de los flancos son esenciales.)

Las mutaciones en CDE-I o CDE-II reducen, pero no desactivan, la función del centrómero, a diferencia de las mutaciones puntuales del CCG central de CDE-III que desactivan por completo al centrómero.

28.15 El centrómero se une a un complejo proteínico

Conceptos principales

- En CDE-II se forma un complejo proteínico especializado alterno a la estructura usual de la cromatina.
- El complejo proteínico CBF3 que se une a CDE-III es indispensable para la función del centrómero.
- Las proteínas que conectan esos dos complejos podrían proporcionar la conexión para los microtúbulos.

¿Es posible identificar las proteínas necesarias para la función de secuencias CNE? Hay varios genes en que las mutaciones afectan la segregación cromosómica y cuyas proteínas se localizan en los centrómeros. La contribución de dichas proteínas a la estructura centromérica se resume en la FIGURA 28.26.

Una estructura especializada de cromatina se sintetiza en la región CDE-II por su unión con una proteína llamada Cse4 que simula una de las histonas que constituyen las subunidades básicas de la cromatina (véase la sección 31.3, La heterocromatina depende de las interacciones con las histonas). Una proteína llamada Mif2 puede también ser parte de ese complejo, o cuando menos, conectarse con él. Las Cse4 y Mif2 tienen contrapartes localizadas en centrómeros eucarióticos superiores, CENP-A y CENP-C, lo cual sugiere que esa interacción puede ser un aspecto universal de la estructura del centrómero. La interacción básica consiste en el plegamiento del DNA en la región CDE-II en torno a un agregado proteínico; la reacción probablemente se facilita con la aparición de un plegamiento intrínseco en la secuencia CDE-II.

El CDE-I se une por medio del homodímero CBF1, interacción no esencial para el funcionamiento del centrómero, pero si no ocurre, disminuye la



FIGURA 28.26 El DNA en CDE-II se enrolla en torno a un agregado proteínico que incluye Cse4p. El CDE-III está unido a CBF3, y el CDE-I, a CBF1. Esas proteínas se conectan a través del grupo de Ctf19, Mcm21 y Okp1.

fidelidad de la segregación cromosómica ~10x. Un complejo de 240 kD de cuatro proteínas llamado CBF3 se une a CDE-III, interacción, ésta sí, indispensable para la función del centrómero.

Las proteínas unidas en CDE-I y CDE-III están conectadas entre sí y también con la estructura proteínica enlazada en CDE-II por otro grupo de proteínas (Ctf19, Mcm21, Okp1). La conexión con el microtúbulo suele ser llevada a cabo por ese complejo.

El modelo general sugiere que una estructura proteínica que simula el bloque de estructura normal de la cromatina (nucleosoma) localiza al complejo que se encuentra en el centrómero. El plegamiento del DNA en dicha estructura permite a las proteínas unirse con los elementos de los flancos para formar parte de un solo complejo. Algunos de los componentes de éste (tal vez no los que se unen directamente con el DNA) vinculan el centrómero con el microtúbulo. La estructura de los cinetócoros probablemente siga un patrón similar y utilice compuestos relacionados en una amplia variedad de organismos.

28.16 Los telómeros tienen secuencias de repetición simples

Conceptos principales

- Para la estabilidad del extremo cromosómico, se requiere el telómero.
- Un telómero consiste en una repetición sencilla en la que una cadena rica en C + A tiene la secuencia $C_n(A/T)_n$.

Otra característica esencial de todos los cromosomas es el **telómero**, que "sella" su extremo. Se sabe que debe ser una estructura especial porque los extremos cromosómicos generados por rotura son "pegajosos" y tienden a reaccionar con otros cromosomas, en tanto los extremos naturales son estables.

Para identificar una secuencia telomérica se pueden aplicar dos criterios:

- Debe yacer en el extremo de un cromosoma (o cuando menos en el extremo de una molécula de DNA lineal auténtica).
- Debe conferir estabilidad a una molécula lineal.

El problema de encontrar un sistema que ofrezca un análisis de la función ha llevado nuevamente al ámbito molecular utilizando levaduras. Todos los plásmidos que sobreviven en las levaduras (porque poseen elementos *ARS* y *CEN*) son moléculas de DNA circulares, los lineales son inestables (porque se han degradado). ¿Una secuencia telomérica au-

téntica de DNA podría conferir estabilidad a un plásmido lineal? Es posible identificar los fragmentos de DNA de levaduras que demostradamente se localizan en los extremos cromosómicos mediante dicho análisis, además de que una región del extremo de una molécula conocida de DNA lineal natural, el DNAr extracromosómico del género *Tetrahymena*, puede tornar estable un plásmido lineal de levadura.

Las secuencias teloméricas se han caracterizado a partir de una amplia variedad de eucariotas inferiores y superiores. El mismo tipo de secuencia se encuentra en plantas y seres humanos, de modo que la construcción del telómero parece seguir un principio casi universal, consta de una larga serie de secuencias repetidas, seriadas y cortas; dependiendo del organismo, pueden ser de 100 a 1 000 repeticiones.

Todas las secuencias teloméricas se pueden expresar con la fórmula general $C_n(A/T)_m$, donde $n > 1$ y m , de 1 a 4. En la FIGURA 28.27 se muestra un ejemplo genérico. Una propiedad inusual de la secuencia telomérica es la extensión de la cadena rica en G-T, para la cual, de 14 a 16 bases suelen constituir una sola cadena. La cola G se genera, quizá, debido a una fragmentación limitada específica de la cadena rica en C-A.

Algunos indicios respecto de la forma de actuar de un telómero dependen de algunas ciertas propiedades inusuales de los extremos de las moléculas de DNA lineales. En una población de tripanosomas, varía la longitud de los extremos. Cuando se hace seguimiento a una célula clon, el telómero crece de siete a 10 bp (una a dos repeticiones) por generación. Todavía más revelador es el destino de los telómeros ciliados introducidos en las levaduras. Después de la replicación en éstas, *se agregan repeticiones teloméricas de levaduras en los extremos de las repeticiones de especies de Tetrahymena.*

La adición de repeticiones teloméricas en el extremo del cromosoma en cada ciclo de replicación podría resolver el problema de la replicación de las moléculas de DNA lineal descrito en la sección 16.2. Los extremos del DNA lineal son un problema para la replicación. La adición de repeticiones por síntesis nueva contravendría la pérdida de repeticiones resultante de la falta de replicación hasta el extremo del cromosoma. La extensión y el acortamiento estarían en equilibrio dinámico.

Si los telómeros se prolongan (y acortan) continuamente, su secuencia exacta puede no ser de importancia. Todo lo que se requiere es que el extremo sea reconocido como un sustrato adecuado para la adición, lo cual explica cómo funciona el telómero ciliado en las levaduras.



FIGURA 28.27 Un telómero común tiene una estructura de repetición simple en la que una cadena rica en G-T va más allá de la cadena rica en C-A. La cola G es generada por una fragmentación limitada de la cadena rica en C-A.

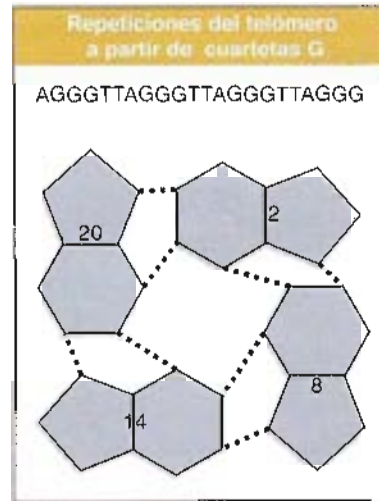


FIGURA 28.28 La estructura cristalina de una secuencia corta de repetición del telómero humano forma tres cuartetos G apilados; el superior contiene la primera G de cada unidad de repetición y se apila sobre cuartetos que contienen la segunda G (G3, G9, G15, G21) y la tercera G (G4, G10, G16, G22).

28.17 Los telómeros sellan los extremos de los cromosomas

Concepto principal

- La proteína TRF2 cataliza una reacción en que la unidad repetida 3' de la cadena rica en G + T forma un asa por desplazamiento de su homóloga en una región de flujo ascendente respecto del telómero.

Los fragmentos teloméricos aislados no se comportan como si tuvieran DNA monocatenario, más bien muestran movilidad electroforética aberrante y otras propiedades.

Las bases de guanina tienen una capacidad inusual para relacionarse entre sí. La cola monocatenaria rica en G del telómero puede formar "cuarternos" de moléculas de G, cada uno de los cuales contiene cuatro guaninas que forman enlaces de hidrógeno para formar una estructura plana. Cada



FIGURA 28.29 En el extremo del DNA cromosómico se forma un asa. Imagen cortesía de Jack Griffith, University of North Carolina at Chapel Hill.

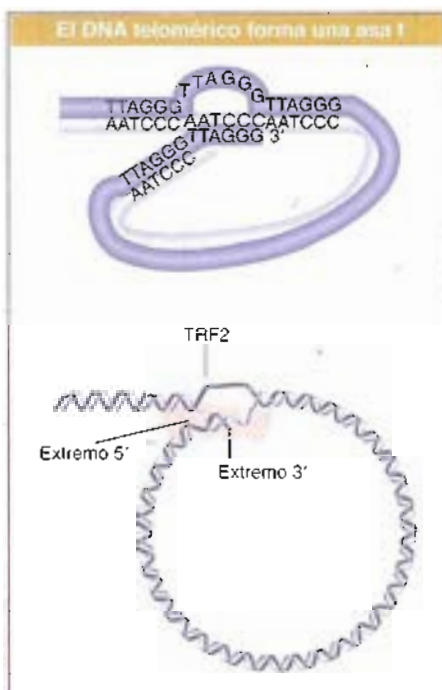


FIGURA 28.30 El extremo 3' del telómero de una sola cadena (TTAGGG)_n desplaza a las repeticiones homólogas del DNA dicatenario para formar el asa. La reacción es catalizada por TRF2.

guanina proviene de la posición correspondiente de una unión de repetición sucesiva TTAGGG. En la **FIGURA 28.28** se muestra una organización basada en una estructura cristalina reciente. El cuarteto ilustrado representa un vínculo entre las primeras guaninas de cada unidad de repetición y se apila sobre otro cuarteto que tiene la misma organización, pero se forma a partir de la segunda guanina de cada unidad de repetición. Una serie de cuartetos como éste podría apilarse en forma helicoidal, y si bien la formación de esa estructura da fe de las

propiedades desusadas de la secuencia rica en G *in vitro*, no demuestra, por supuesto, si el cuarteto se forma *in vivo*.

¿Qué características del telómero se encargan de la estabilidad del extremo cromosómico? En la **FIGURA 28.29** se observa que en el telómero se forma un asa de DNA. La ausencia de cualquier extremo libre podría ser la característica clave para la estabilización del extremo del cromosoma. La longitud promedio del asa es de 5 a 10 kb en células animales.

En la **FIGURA 28.30** se muestra que el asa se forma cuando el extremo 3' del telómero de una sola cadena (TTAGGG)_n desplaza a la misma secuencia en una región del telómero de flujo ascendente. Esto convierte a la región doble en una estructura del tipo del asa D, en la cual, una serie de repeticiones de TTAGGG se desplaza para formar una región de una sola cadena y la cola del telómero se aparea con la cadena homóloga.

La reacción es catalizada por la proteína de unión del telómero TRF2, que con otras proteínas, crea un complejo que estabiliza los extremos cromosómicos. Su importancia en la protección de los extremos depende de que la delección de TRF2 da lugar a reestructuraciones cromosómicas.

28.18 Los telómeros son sintetizados por una enzima ribonucleoproteínica

Conceptos principales

- La telomerasa hace uso del 3'-OH de la cadena telomérica G + T para cebar la síntesis de repeticiones seriadas de tipo TTGGGG.
- El componente RNA de la telomerasa tiene una secuencia que se aparea con repeticiones ricas en C + A.
- Una de las subunidades proteínicas es una transcriptasa inversa que utiliza al RNA como molde para la síntesis de la secuencia rica en G + T.

El telómero tiene dos funciones:

- La primera es proteger el extremo cromosómico; cualquier otro extremo del DNA, por ejemplo, el generado por una rotura dicatenaria, se convierte en blanco de los sistemas de reparación. Las células tienen que ser capaces de distinguir al telómero.
- La segunda es permitir que el telómero se extienda; de lo contrario, se hará más corto con cada ciclo de replicación (porque la replicación no puede iniciarse en el extremo mismo).

Las proteínas que se unen al telómero constituyen la solución para ambos problemas. En las levaduras, diferentes conjuntos de proteínas resuelven cada problema, pero ambos se unen con el telómero mediante la misma proteína, Cdc13:

- La proteína Stn1 protege contra la fragmentación (específicamente contra cualquier extensión de la fragmentación de la cadena C-A que genera la cola G).
- Una enzima **telomerasa** extiende la cadena rica en C-A. Esta actividad depende de dos proteínas con actividades auxiliares, como el control de la longitud de extensión.

La telomerasa utiliza el extremo 3'-OH de la cadena telomérica G + T como cebador de la síntesis de repeticiones seriadas TTGGGG, actividad que sólo necesita GTP y TTPd. La telomerasa es una gran ribonucleoproteína que consta de un molde de RNA (codificado por *TLC1*) y una proteína con actividad catalítica (*EST2*). El componente de RNA corto (159 bases de longitud en el género *Tetrahymena* y 192 en el *Euplotes*) incluye una secuencia de 15 a 22 bases, la cual es idéntica a dos repeticiones de la secuencia de repetición rica en C. Este RNA proporciona el molde para la síntesis de la secuencia de repetición rica en G. El componente proteínico de la telomerasa es una subunidad catalítica que sólo puede actuar en el molde de RNA provisto por el componente de ácido nucleico.

En la **FIGURA 28.31** se muestra la acción de la telomerasa, enzima que avanza de manera discontinua; el molde de RNA es ubicado en el cebador de DNA, se agregan varios nucleótidos al cebador y después, la enzima se transloca para volver a empezar. La telomerasa es un ejemplo especializado de una transcriptasa inversa, enzima que sintetiza la secuencia de DNA en un molde de RNA (véase la sección 22.4, El DNA vírico es generado por transcripción inversa). No se sabe cómo se ensambla la cadena complementaria del telómero (rica en C-A), pero se especula que podría sintetizarse mediante el extremo 3'-OH de una horquilla terminal G-T como cebador de la síntesis de DNA.

La telomerasa sintetiza las repeticiones individuales que se agregan a los extremos cromosómicos, pero, en sí, no controla el número de repeticiones. Otras proteínas participan en la determinación de la longitud del telómero y pueden ser identificadas por los mutantes *EST1* y *EST3* de levaduras, en los cuales, la longitud del telómero ha sido modificada. Estas proteínas pueden unir telomerasas, e influyen en la longitud del telómero controlando el acceso de la telomerasa a su sustrato. Se han encontrado proteínas que se unen a los telómeros en células de mamíferos, pero poco se sabe sobre su función.

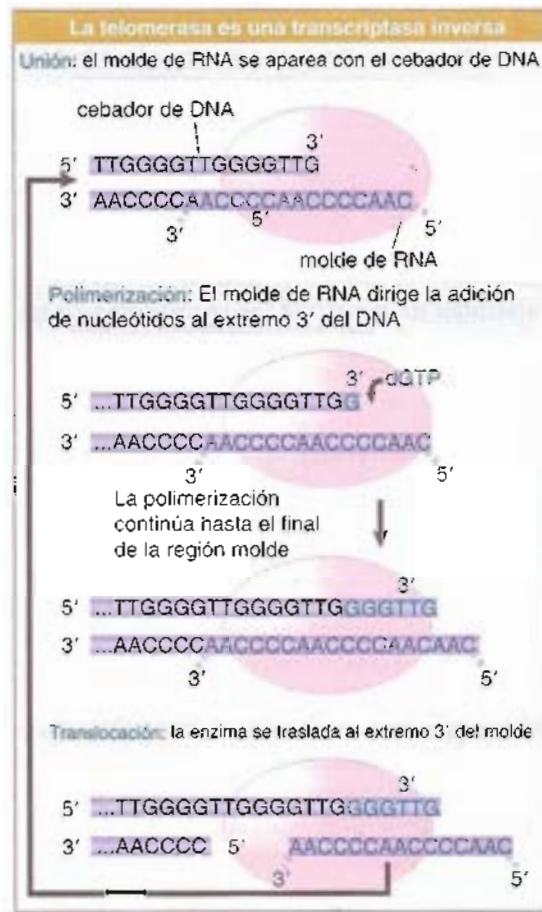


FIGURA 28.31 La telomerasa se ubica a sí misma por apareamiento de bases entre el molde de DNA y el cebador de DNA uncatenarío, que sobresale; agrega bases G y T al cebador, una a la vez, según el molde. El ciclo se inicia nuevamente cuando se ha agregado una unidad de repetición.

Cada organismo presenta un rango característico de longitudes teloméricas; son largos en los mamíferos (en general, de 5 a 15 kb en el ser humano) y cortos en las levaduras (unos ~300 bp en *S. cerevisiae*). El mecanismo de control básico es que la probabilidad de que un telómero sea un sustrato de la telomerasa aumenta conforme se abrevia su longitud; no se sabe si esto es un efecto continuo o si depende de que la longitud se reduzca respecto de alguna cifra crítica. Cuando la telomerasa actúa en un telómero, puede agregar varias unidades de repetición. La forma intrínseca de acción de la enzima es disociar, después de agregar una repetición; la adición de varias unidades de repetición depende de otras proteínas que hacen que la telomerasa lleve a cabo más de un ciclo de extensión. El número de repeticiones agregadas no influye en la longitud del telómero mismo, más bien es controlado con proteínas auxiliares que se vinculan con la telomerasa.

Las características mínimas requeridas para que exista como cromosoma son:

- Telómeros para asegurar la supervivencia.
- Un centrómero para mantener la segregación.
- Un origen para iniciar la replicación.

Todos esos elementos se han conjuntado para estructurar un cromosoma artificial de levaduras (YAC), método que permite perpetuar secuencias ajenas, de ahí que el cromosoma sintético sea estable sólo si tiene más de 20 a 50 kb de longitud. Se desconoce el fundamento de dicho efecto, pero la capacidad de construir un cromosoma sintético permite investigar la naturaleza del dispositivo de segregación en un ambiente controlado.

28.19 Los telómeros son indispensables para la supervivencia

En todas las células en proceso de división se observa actividad de telomerasa, la cual suele interrumpirse en aquéllas con diferenciación terminal que no se dividen. En la FIGURA 28.32 se muestra que si la telomerasa presenta mutación en una célula en esas condiciones, los telómeros se acortan gradualmente en cada mitosis. Un ejemplo de los efectos de tal mutación en las levaduras se ilustra en la FIGURA 28.33, en la cual, el telómero se acorta de 400 a 0 bp en ~120 generaciones.

La pérdida de telómeros produce efectos nocivos. Cuando la longitud del telómero llega a 0, a las células se les dificulta dividirse con éxito. Los intentos de división por lo general causan roturas y translocaciones de cromosomas, proceso que resulta en una mayor tasa de mutaciones, que en las

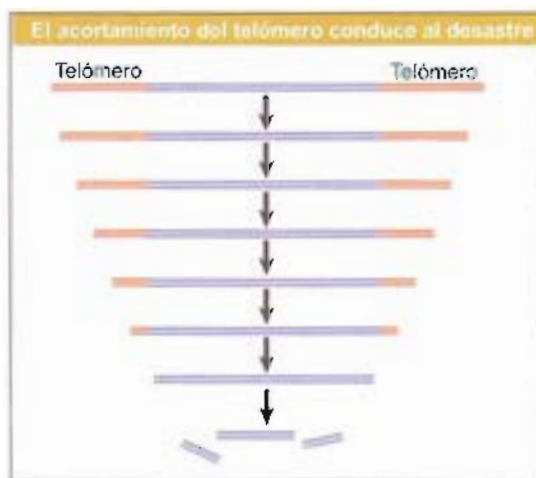


FIGURA 28.32 La mutación en la telomerasa hace que los telómeros se acorten en cada división celular. En un momento dado, la pérdida del telómero da lugar a rotura y reestructuración de los cromosomas.

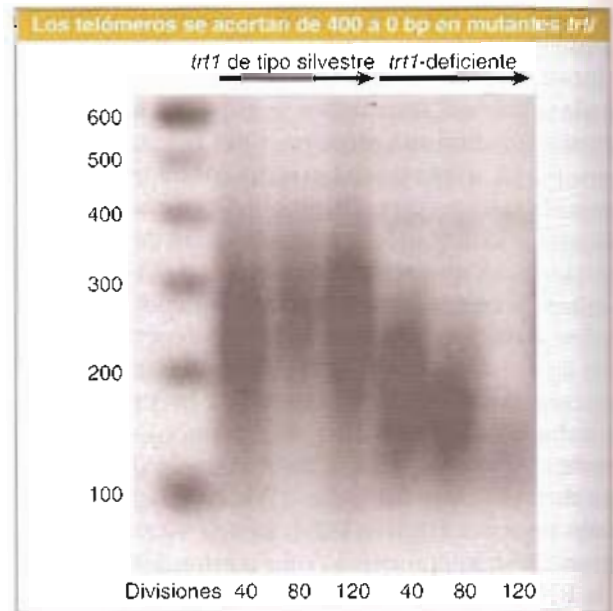


FIGURA 28.33 La longitud del telómero se mantiene en ~350 bp en la levadura de tipo silvestre, pero por una mutación en el gen *trt1*, que codifica el componente de RNA de la telomerasa, rápidamente acorta sus telómeros a una longitud de 0. Reproducida con autorización de Nakamura, T. M., et al. 1997. *Science*. 277:955-959. © 1997 AAAS. Imagen cortesía de Thomas R. Cech and Toru Nakamura, University of Colorado.

levaduras se vincula con pérdida de la viabilidad y ocupación del cultivo predominantemente por células senescentes (alargadas, que no se dividen y que, en última instancia, mueren).

Algunas células brotan del cultivo senescente porque han adquirido la capacidad de extender sus telómeros por una alternativa a la actividad de la telomerasa. Las supervivientes entran en dos grupos, en uno de los cuales, los cromosomas se han tornado circulares, carecen de telómeros y, como resultado, son independientes de la telomerasa. El otro grupo utiliza un entrecruzamiento inequitativo para extender sus telómeros (FIGURA 28.34). El telómero es una estructura de repetición, de manera que es posible que dos de ellos se alineen de manera errónea cuando los cromosomas se aparean. La recombinación entre regiones desiguales genera un entrecruzamiento inequitativo, como se muestra antes en la Figura 6.1, en cuyo caso, la longitud de un cromosoma recombinante aumenta, mientras que la del otro disminuye.

Las células suelen suprimir el entrecruzamiento inequitativo por sus consecuencias potencialmente nocivas mediante dos sistemas, uno de ellos, proporcionado por las proteínas de unión con telómeros. En las levaduras, la frecuencia de recombinación entre telómeros aumenta por delección del gen *taz1*, que codifica una proteína reguladora de la actividad

de telomerasa. El segundo es un sistema general que repara el apareamiento erróneo. Además de corregir pares de bases apareadas erróneamente que podrían surgir en el DNA, este sistema suprime la recombinación entre regiones erróneamente apareadas, como se muestra en la Figura 28.34, incluidos los telómeros. En caso de mutación, un mayor porcentaje de las levaduras con deficiencias de telomerasa sobrevive a la pérdida de los telómeros porque la recombinación entre ellos genera algunos cromosomas con telómeros más largos.

Cuando se cultivan células eucarióticas, suelen dividirse un número fijo de generaciones y después, entran en senescencia, tal vez por una declinación de la longitud del telómero por la falta de expresión de la telomerasa. La célula entra en una crisis que algunas superan, pero por lo general estas últimas presentan reestructuraciones cromosómicas resultado de la falta de protección de los extremos cromosómicos. Dichas reestructuraciones pueden dar lugar a mutaciones que contribuyen al estado tumorigénico. La ausencia de expresión de la telomerasa en esas circunstancias se debe a una falta de expresión del gen, y la reactivación de la enzima es uno de los mecanismos por lo que dichas células pueden sobrevivir de manera continua en cultivo (que obviamente no era una opción en los experimentos con levaduras en los cuales había antecedentes de delección del gen).

28.20 Resumen

El material genético de todos los organismos y virus adopta la forma de nucleoproteínas estrechamente empaquetadas. Algunos genomas víricos se insertan en viriones preformados, en tanto que otros ensamblan una cubierta proteínica en torno al ácido nucleico. El genoma bacteriano forma un denso nucleóide de ~20% de proteína por masa, pero se desconocen los detalles de la interacción de las proteínas con el DNA. El DNA está organizado en ~100 dominios que mantienen un superenrollamiento independiente, con una densidad de superhélices no restringidas correspondiente a ~1/100 a 200 bp. En eucariotas, la cromatina de interfase y los cromosomas de metafase parecen organizados en grandes asas, cada una de las cuales puede ser un dominio superenrollado de manera independiente. Las bases de las asas se conectan a un bastidor de metafase o a la matriz nuclear mediante sitios específicos del DNA.

Las secuencias con transcripción activa residen en la eucromatina, que constituye la mayor parte de la cromatina de interfase. Las regiones de he-

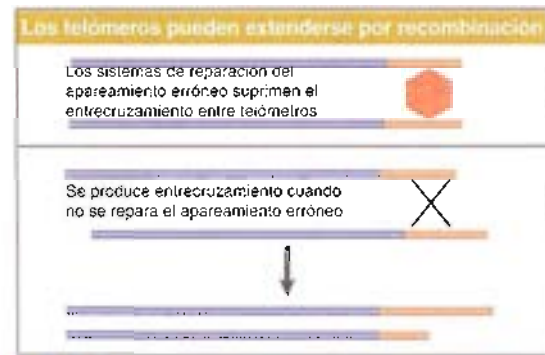


FIGURA 28.34 El entrecruzamiento en las regiones teloméricas suele ser suprimido por los sistemas de reparación de apareamiento erróneo, pero puede ocurrir cuando se presenta una mutación. El suceso de entrecruzamiento inequitativo extiende el telómero de uno de los productos, permitiendo que el cromosoma sobreviva en ausencia de la telomerasa.

terocromatina están empaquetadas ~5 a 10×, más compactadas, y son inertes en cuanto a la transcripción. Toda la cromatina se empaqueta densamente durante la división celular, cuando es posible distinguir cada uno de los cromosomas. La producción de bandas G mediante tratamiento con el colorante Giemsa es indicio de la existencia en los cromosomas de una infraestructura reproducible. Las bandas son regiones muy grandes (~107 bp) que pueden utilizarse para localizar translocaciones cromosómicas u otros cambios considerables en la estructura.

Los cromosomas en escobillón de los anfibios y los politénicos de los insectos tienen estructuras inusualmente amplias, con razones de empaquetamiento <100. Los cromosomas politénicos de *D. melanogaster* se dividen en casi 5000 bandas, cuyo tamaño varía en magnitud con un promedio de ~25 kb. También se observan regiones con actividad transcripcional en estructuras aún más desplegadas (con "abultamientos") donde se expulsa material del eje del cromosoma, proceso que podría simular los cambios que ocurren en menor escala cuando se transcribe una secuencia en la eucromatina.

La región centromérica contiene el cinetócoro, encargado de unir el cromosoma con el huso mitótico. El centrómero suele estar rodeado de heterocromatina. Las secuencias centroméricas se han identificado sólo en la levadura *S. cerevisiae*, donde constan de elementos conservados cortos, CDE-I y CDE-III, que se unen a CBF1 y al complejo CBF3, respectivamente, así como una región larga, rica en A-T, llamada CDE-II, que se une a Cse4 para formar una estructura especializada en la cromatina. Otro grupo de proteínas que se une a ese ensamblaje proporciona la conexión con los microtúbulos.

Los telómeros proporcionan estabilidad a los extremos de los cromosomas, y casi todos los conocidos constan de múltiples repeticiones, en las cuales una cadena tiene la secuencia general $C_n(A/T)_m$, donde $n > 1$ y $m = 1$ a 4. La otra cadena $G_n(T/A)_m$ tiene un extremo único que sobresale y aporta un molde para la adición de bases individuales en un orden definido. La enzima telomerasa es una ribonucleoproteína cuyo componente RNA proporciona el molde para la síntesis para la cadena rica en G, con lo cual se resuelve el problema de la imposibilidad de replicación en el extremo de una cadena doble. El telómero estabiliza el extremo del cromosoma porque la cadena única colgante $G_n(T/A)_m$ desplaza del telómero a su homóloga en unidades de repetición previas hasta formar un asa, de manera que no haya extremos libres.

Referencias

- 28.2** Los genomas víricos están empaquetados en sus cubiertas

Artículos de revisión

- Black, L. W. (1989). DNA packaging in dsDNA bacteriophages. *Annu. Rev. Immunol.* 43, 267–292.
- Butler, P. J. (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354, 537–550.
- Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354, 531–535.
- Mindich, L. (2000). Precise packaging of the three genomic segments of the double-stranded-RNA bacteriophage phi6. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 149–160.

Artículos de investigación

- Caspar, D. L. D. and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27, 1–24.
- de Beer, T., Fang, J., Ortega, M., Yang, Q., Maes, I., Duffy, C., Berton, N., Sippy, J., Overduin, M., Feiss, M., and Catalano, C. E. (2002). Insights into specific DNA recognition during the assembly of a viral genome packaging machine. *Mol. Cell* 9, 981–991.
- Dube, P., Tavares, P., Jusz, R., and van Heel, M. (1993). The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry. *EMBO J.* 12, 1303–1309.
- Fraenkel-Conrat, H. and Williams, R. C. (1955). Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41, 690–698.
- Jiang, Y. J., Aerne, B. L., Smithers, L., Haddon, C., Ish-Horowitz, D., and Lewis, J. (2000). Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature* 408, 475–479.

- Zimmern, D. (1977). The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell* 11, 463–482.
- Zimmern, D. and Butler, P. J. (1977). The isolation of tobacco mosaic virus RNA fragments containing the origin for viral assembly. *Cell* 11, 455–462.

- 28.3** El genoma bacteriano es un nucleóide

Artículos de revisión

- Brock, T. D. (1988). The bacterial nucleus: a history. *Microbiol. Rev.* 52, 397–411.
- Dilica, K. and Rouviere-Yaniv, J. (1987). Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* 51, 301–319.

- 28.4** El genoma bacteriano está superenrollado

Artículo de revisión

- Hatfield, G. W. and Benham, C. J. (2002). DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 36, 175–203.

Artículos de investigación

- Petitjohn, D. E. and Pfenninger, O. (1980). Supercoils in prokaryotic DNA restrained *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1331–1335.
- Postow, L., Hardy, C. D., Arsuaga, J., and Cozzarelli, N. R. (2004). Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* 18, 1766–1779.

- 28.8** Los cromosomas tienen patrones de banda

Artículos de investigación

- International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Saccone, S., De Sario, A., Wiegant, J., Raap, A. K., Della Valle, G., and Bernardi, G. (1993). Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11929–11933.
- Venter, J. C. et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1350.

- 28.12** El cromosoma eucariótico es un dispositivo de segregación

Artículo de revisión

- Hyman, A. A. and Sorger, P. K. (1995). Structure and function of kinetochores in budding yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 471–495.

- 28.13** Los centrómeros pueden contener DNA repetitivo

Artículo de revisión

- Wiens, G. R. and Sorger, P. K. (1998). Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* 93, 313–316.

Artículos de investigación

- Copenhaver, G. P. et al. (1999). Genetic definition and sequence analysis of Arabidopsis centromeres. *Science* 286, 2468-2474.
- Haaf, T., Warburton, P. E., and Willard, H. F. (1992). Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: centromere protein binding and disruption of normal chromosomal segregation. *Cell* 70, 681-696.
- Sun, X., Wahlstrom, J., and Karpen, G. (1997). Molecular structure of a functional Drosophila centromere. *Cell* 91, 1007-1019.

28.14 Las secuencias de DNA de los centrómeros de *S. cerevisiae* son cortas

Artículos de revisión

- Blackburn, E. H. and Szostak, J. W. (1984). The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 163-194.
- Clarke, L. and Carbon, J. (1985). The structure and function of yeast centromeres. *Annu. Rev. Genet.* 19, 29-56.

Artículo de Investigación

- Fitzgerald-Hayes, M., Clarke, L., and Carbon, J. (1982). Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell* 29, 235-244.

28.15 El centrómero se une a un complejo proteínico

Artículo de revisión

- Kitagawa, K. and Hicier, P. (2001). Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 678-687.

Artículos de investigación

- Lechner, J. and Carbon, J. (1991). A 240 kD multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* 64, 717-725.
- Meluh, P. B. and Koshland, D. (1997). Budding yeast centromere composition and assembly as revealed by *in vitro* cross-linking. *Genes Dev.* 11, 3401-3412.
- Meluh, P. B. et al. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *S. cerevisiae*. *Cell* 94, 607-613.
- Ortiz, J., Stemmann, O., Rank, S., and Lechner, J. (1999). A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore. *Genes Dev.* 13, 1140-1155.

28.16 Los telómeros tienen secuencias de repetición simples

Artículos de revisión

- Blackburn, E. H. and Szostak, J. W. (1984). The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 163-194.
- Zakian, V. A. (1989). Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 23, 579-604.

Artículo de investigación

- Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P., and Zakian, V. A. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* 85, 423-433.

28.17 Los telómeros sellan los extremos de los cromosomas

Artículos de investigación

- Griffith, J. D. et al. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Henderson, E., Haradin, C. II., Walk, S. K., Tinoco, I., and Blackburn, E. H. (1987). Telomeric oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* 51, 899-908.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325.
- Parkinson, G. N., Lee, M. P., and Neidle, S. (2002). Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 417, 876-880.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Williamson, J. R., Raghuraman, K. R., and Cech, T. R. (1989). Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* 59, 871-880.

28.18 Los telómeros son sintetizados por una enzima ribonucleoproteínica

Artículos de revisión

- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-573.
- Blackburn, E. H. (1992). Telomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 113-129.
- Collins, K. (1999). Ciliate telomerase biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 187-218.
- Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 177-208.
- Zakian, V. A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270, 1601-1607.
- Zakian, V. A. (1996). Structure, function, and replication of *S. cerevisiae* telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 30, 141-172.

Artículos de investigación

- Greider, C. and Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51, 887-898.
- Murray, A., and Szostak, J. W. (1983). Construction of artificial chromosomes in yeast. *Nature* 305, 189-193.
- Pennock, E., Buckley, K., and Lundblad, V. (2001). Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* 104, 387-396.
- Shippen-Lentz, D. and Blackburn, E. H. (1990). Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* 247, 546-552.
- Teixeira, M. T., Arneric, M., Sperisen, P., and Lingner, J. (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase-extendible and -nonextendible states. *Cell* 117, 323-335.

Artículos de revisión

- Hackett, J. A., Feldser, D. M., and Greider, C. W. (2001). Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 106, 275–286.
- Nakamura, T. M., Cooper, J. P., and Cech, T. R. (1998). Two modes of survival of fission yeast without

telomerase. *Science* 282, 493–496.

- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955–959.
- Rizki, A. and Lundblad, V. (2001). Defects in mismatch repair promote telomerase-independent proliferation. *Nature* 411, 713–716.

Nucleosomas

ESQUEMA DEL CAPÍTULO

29.1 Introducción

29.2 El nucleosoma es la subunidad de la cromatina

- La nucleasa de micrococcos libera los nucleosomas de la cromatina como partículas de 11S.
- Un nucleosoma contiene ~200 bp de DNA y dos copias de cada histona medular (H2A, H2B, H3 y H4).
- El DNA envuelve la superficie externa del octámero de proteínas.

29.3 El DNA está enrollado en la estructura de los nucleosomas

- >95% del DNA se recupera en nucleosomas o multímeros cuando la nucleasa de micrococcos escinde el DNA de la cromatina.
- La longitud del DNA por nucleosoma varía de tejido a tejido en un rango de 154 a 260 bp.

29.4 Los nucleosomas tienen una estructura común

- El DNA de los nucleosomas se divide en DNA medular y DNA de enlace, dependiendo de su susceptibilidad a la nucleasa de micrococcos.
- El DNA medular tiene una longitud de 146 bp y se encuentra en las partículas centrales producidas por digestión prolongada con la nucleasa de micrococcos.
- El DNA de enlace es la región de 8 a 114 bp susceptible de escisión temprana por la enzima.
- Los cambios en la longitud del DNA de enlace explican las variaciones de la longitud total del DNA nucleosómico.
- La H1 se vincula con el DNA de enlace y podría encontrarse en el punto en que el DNA entra y sale del nucleosoma.

29.5 La estructura del DNA varía en la superficie del nucleosoma

- El DNA le da 1.65 vueltas al octámero de histonas.
- La estructura del DNA se modifica de manera que tiene un número mayor de pares de bases por giro en la parte media, pero menor en los extremos.

29.6 La periodicidad del DNA cambia en el nucleosoma

- Con el cambio en bp por giro se absorben ~0.6 giros negativos del DNA, de 10.5 en solución a un promedio de 10.2 en la superficie del nucleosoma, lo cual explica la paradoja del número de enlaces.

29.7 Organización del octámero de histonas

- El meollo del octámero de histonas está constituido por un tetrámero, H3₂-H4₂ vinculado con dos dímeros H2A-H2B.
- Cada histona presenta interdigitación intensa con su contraparte.
- Todas las histonas medulares tienen el segmento estructural de pliegue. Las colas terminales N salen del nucleosoma.

29.8 La vía de los nucleosomas en la fibra de cromatina

- Las fibras de cromatina de 10 nm se despliegan a partir de fibras de 30 nm y constan de una cadena de nucleosomas.
- Las fibras de 30 nm tienen seis nucleosomas por giro organizados en un solenoide.
- La histona H1 es necesaria para la formación de la fibra de 30 nm.

29.9 La replicación de la cromatina requiere del ensamblaje de los nucleosomas

- Los octámeros de las histonas no se conservan durante la replicación, a diferencia de los dímeros H2A-H2B y los tetrámeros H3₂-H4₂.
- Hay diferentes vías para el ensamblaje de los nucleosomas durante la replicación e independientemente de ésta.
- Para eliminar al ensamblaje de los nucleosomas, se requieren proteínas accesorias.
- El CAF-1 es una proteína de ensamblaje que se vincula con la subunidad PCNA del replicosoma; es necesaria para el depósito de los tetrámeros H3₂-H4₂ después de la replicación.
- Para el ensamblaje independiente de la replicación se puede usar una proteína de ensamblaje diferente y una variable de la histona H3.

29.10 ¿Los nucleosomas yacen en posiciones específicas?

- Los nucleosomas pueden formarse en posiciones específicas como resultado de la estructura local del DNA o de las proteínas que interactúan con secuencias específicas.
- La causa más frecuente de la posición del nucleosoma es el límite impuesto por las proteínas que se unen al DNA.
- El posicionamiento influye en qué regiones del DNA quedan en el enlace y qué cara del DNA se expone a la superficie del nucleosoma.

29.11 ¿Los genes transcritos se organizan en nucleosomas?

- Los nucleosomas se encuentran a la misma frecuencia cuando los genes transcritos o no transcritos son digeridos con nucleasa de micrococcos.
- Algunos genes intensamente transcritos parecen casos excepcionales desprovistos de nucleosomas.

29.12 Los octámeros de histonas son desplazados por la transcripción

- En un sistema modelo, la polimerasa de RNA desplaza a los octámeros de histonas durante la transcripción, pero éstos

Continúa en la siguiente página

- se unen nuevamente con el DNA tan pronto como ha pasado la polimerasa.
- Los nucleosomas se reorganizan cuando la transcripción pasa a través de un gen.
- 29.13** El desplazamiento del nucleosoma y su reensamblado requieren factores especiales
- Se necesitan factores auxiliares para que la polimerasa de RNA desplace a los octámeros durante la transcripción y para que después, las histonas se reensamben en nucleosomas.
- 29.14** Los aislantes impiden la acción de los potenciadores y de la heterocromatina
- Los aislantes pueden impedir el paso de cualquier efecto activador o inactivador desde los potenciadores, silenciadores y LCR.
 - Los aislantes suelen constituir barreras para evitar que la heterocromatina se expanda.
- 29.15** Los aislantes pueden definir un dominio
- Los aislantes son estructuras especializadas de la cromatina con sitios hipersensibles. Dos aislantes pueden proteger de todo efecto externo la región que los separa.
- 29.16** Los aislantes pueden actuar en una dirección
- Algunos aislantes tienen direccionalidad, de modo que pueden detener el paso de los efectos en una dirección, pero no en la otra.
- 29.17** Los aislantes pueden variar en potencia
- Los aislantes difieren en cuanto a eficacia para impedir el paso de una señal de activación.
- 29.18** Los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa reflejan cambios en la estructura de la cromatina
- En los promotores de los genes expresados hay sitios hipersensibles.
 - Estos sitios son generados por la unión de factores de transcripción que desplazan a los octámeros de histonas.
- 29.19** Los dominios definen regiones que contienen genes activos
- Un dominio que contiene un gen transcrito se define por su mayor sensibilidad a la fragmentación por la desoxirribonucleasa I.
- 29.20** Una LCR puede controlar a un dominio
- Una LCR se localiza en el extremo 5' del dominio y consta de varios sitios hipersensibles.
- 29.21** ¿Qué constituye un dominio regulador?
- Un dominio puede tener aislante, LCR y sitio de unión a la matriz, así como unidades de transcripción.
- 29.22** Resumen

29.1 Introducción

La cromatina tiene una organización compacta en que casi todas las secuencias del DNA son estructuralmente inaccesibles y están inactivas desde el punto de vista funcional. En esta masa se encuentra la parte más pequeña de las secuencias activas. ¿Cuál es la estructura general de la cromatina y cuál la diferencia entre secuencias activas e inactivas? La elevada proporción general del empaquetado del material genético sugiere de inmediato que el DNA no puede empacarse directamente en la estructura general de la cromatina, debe haber *jerarquías* de organización.

El diseño de la subunidad fundamental de la cromatina es el mismo en todas las eucariotas; el nucleosoma consta de ~200 bp de DNA organizados en un octámero de proteínas básicas, pequeñas, cuya estructura simula cuentas. Los componentes proteínicos son las histonas, que forman una porción medular, y el DNA se encuentra en la superficie de la partícula. Los nucleosomas son un componente invariable de la eucromatina y la heterocromatina en el núcleo de interfase, así como de los cromosomas mitóticos. El nucleosoma constituye el primer nivel de organización, con una razón de ~6 de empaque. Sus componentes y estructuras están bien definidos.

El segundo nivel de organización es el enrollado de la serie de nucleosomas en una disposición helicoidal para constituir la fibra de ~30 nm de diáme-

tro de la cromatina de interfase y los cromosomas mitóticos (véase Fig. 28.11). En la cromatina, la razón de empaque del DNA es de ~40. La estructura de esa fibra requiere de proteínas adicionales, pero no ha sido bien definida.

La proporción final del empaquetado depende del tercer nivel de organización, el empaquetado de la propia fibra de 30 nm, lo cual resulta en una razón general de empaquetado de ~1 000 en la eucromatina, intercambiable cíclicamente con el de los cromosomas mitóticos, que alcanza una razón general de ~10 000. En general, la heterocromatina tiene una razón de empaque de ~10 000, tanto en la interfase como durante la mitosis.

Para caracterizar los sucesos involucrados en el empaque, la replicación y la transcripción cíclicas, se necesita dilucidar estos niveles de organización. Se supone que el vínculo con proteínas adicionales o la modificación de las proteínas cromosómicas existentes se relacionan con el cambio de la estructura de la cromatina, pero no se conocen las dianas específicas para el control del empaquetado cíclico. Tanto replicación como transcripción implican el desenrollado del DNA y, por tanto, deben incluir un despliegue de la estructura que permita a las enzimas importantes actuar sobre él, lo cual posiblemente implicaría cambios en todos los niveles de organización.

Cuando se replica la cromatina, los nucleosomas deben replicarse en ambas moléculas hijas, así

que además de preguntarse cómo se ensambla el nucleosoma mismo, se debe inquirir qué pasa con las otras proteínas de la cromatina. La replicación rompe su estructura, indicio de que representa un problema para las regiones de mantenimiento de estructura específica y ofrece la oportunidad de modificarla.

La masa de cromatina contiene hasta el doble de proteínas que el DNA, y casi la mitad de esa masa proteínica se encuentra en los nucleosomas: la masa del RNA representa <10% respecto de la masa de aquél, mientras que gran parte de éste consta de productos de transcripción recientes, aún vinculados con el molde del DNA.

Las **no histonas** incluyen todas las proteínas de la cromatina, excepción hecha de las histonas, varían más entre tejidos y especies, y constituyen un porcentaje menor de masa que las histonas. Por otra parte, también incluyen un número mucho mayor de proteínas, de manera que cualquiera de éstas está presente en cantidades más pequeñas que las de cualquier histona.

Las funciones de las proteínas no histonas incluyen el control de la expresión génica y de las estructuras de orden superior, de modo que la polimerasa de RNA puede considerarse como una histona prominente. Las proteínas del HMG (grupo de alta movilidad) constituyen una subclase bien definida de no histonas (cuando menos algunas son factores de transcripción). Un problema importante respecto de otras no histonas, es que tienden a contaminarse con otras proteínas nucleares, y hasta ahora ha sido difícil obtener las proteínas no histonas responsables de las estructuras de orden superior.

29.2 El nucleosoma es la subunidad de la cromatina

Conceptos principales

- La nucleasa de micrococcos libera los nucleosomas de la cromatina como partículas de 11S.
- Un nucleosoma contiene ~200 bp de DNA y dos copias de cada histona medular (H2A, H2B, H3 y H4).
- El DNA envuelve la superficie externa del octámero de proteínas.

Cuando se suspenden en una solución de poca potencia iónica, los núcleos de interfase se hinchan y rompen para liberar fibras de cromatina. En la **FIGURA 29.1** se muestra un núcleo lisado con fibras dirigidas al exterior. En algunas regiones, las fibras constan de material muy compacto, pero en las que se han extendido, se observa que están constituidas de partículas bien definidas, los nucleosomas. En regiones



FIGURA 29.1 La cromatina que se derrama de los núcleos lisados consta de una serie de partículas muy compactas. La barra mide 10 nm. Reproducida de Cell, vol. 4 Oudet, P., et al., *Electron microscopic...* pp. 281-300. Copyright 1975, con autorización de Elsevier. Imagen cortesía de Pierre Chambon.



FIGURA 29.2 La digestión de la cromatina con nucleasa de micrococcos libera nucleosomas individuales. La barra mide 100 nm. Reproducida de Cell, vol. 4 Oudet, P., et al., *Electron microscopic...* pp. 281-300. Copyright 1975, con autorización de Elsevier. Imagen cortesía de Pierre Chambon.

especialmente extendidas, los nucleosomas están conectados por una cadena fina que corresponde a una cadena doble de DNA libre. Una cadena doble continua de DNA transcurre por la serie de partículas.

Si se trata la cromatina con la endonucleasa conocida como **nucleasa de micrococcos**, que corta la cadena de DNA en la unión entre nucleosomas, se pueden obtener nucleosomas individuales; primero libera grupos de partículas y después nucleosomas independientes, que en la **FIGURA 29.2** se ven como partículas compactas que se sedimentan a ~11 S.

El nucleosoma contiene ~200 bp de DNA vinculadas con un octámero de histonas que consta de dos copias de cada una de las **histonas medulares** conocidas como

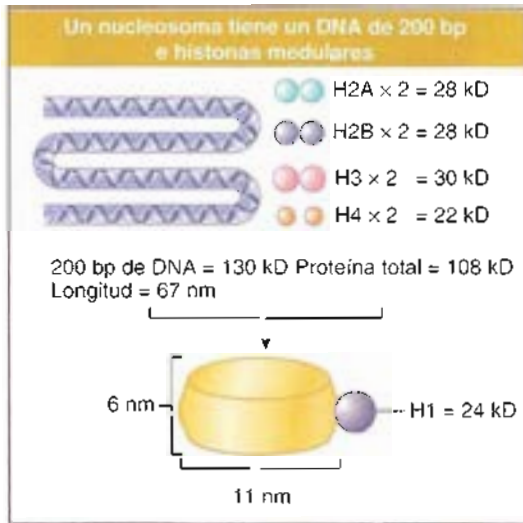


FIGURA 29.3 EL nucleosoma consta de masas casi equivalentes de DNA e histonas (incluida H1). La masa pronosticada del nucleosoma es de 242 kD.

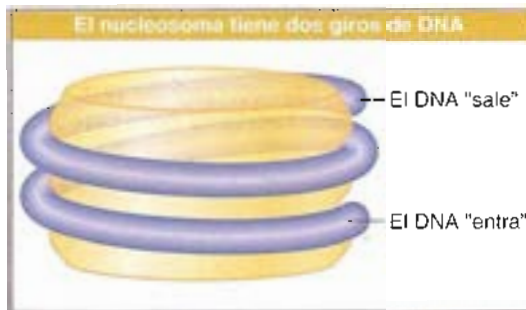


FIGURA 29.4 EL nucleosoma puede ser un cilindro con el DNA organizado en dos giros en torno a su superficie.

H2A, H2B, H3 y H4, cuyo vínculo se ilustra esquemáticamente en la **FIGURA 29.3**. Con este modelo se explica la estequiometría de las histonas medulares de la cromatina: H2A, H2B, H3 y H4 están presentes en cantidades equimolares, con dos moléculas de cada una por cada ~200 bp de DNA.

Las histonas H3 y H4 son de las proteínas más conservadas que se conocen, lo cual sugiere que sus funciones son idénticas en todas las eucariotas. Los tipos H2A y H2B pueden reconocerse en todas las eucariotas, pero muestran variaciones de secuencia apreciables, específicas de cada especie.

La histona H1 es un conjunto de proteínas estrechamente relacionadas con variantes apreciables entre tejidos y especies, y su participación es diferente de la de las histonas medulares; por otra parte, la cantidad equivale a la mitad de la cantidad de una histona medular, además de que se puede extraer más fácilmente de la cromatina (en general con una solución salina diluida [0.5 M]). La H1 se puede eliminar sin afectar la estructura del nucleosoma, lo cual sugiere que su localización en la partícula es externa.



FIGURA 29.5 Los dos giros del DNA del nucleosoma están muy juntos.

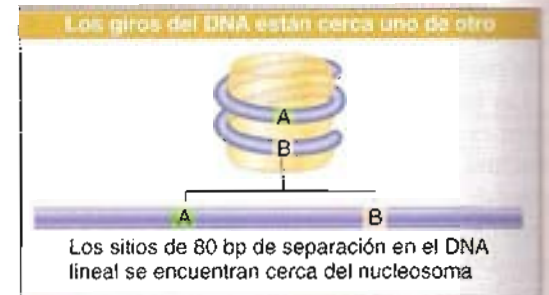


FIGURA 29.6 Las secuencias de DNA que yacen en diferentes giros, rodeando al nucleosoma, pueden quedar muy juntas.

La forma del nucleosoma corresponde a un disco o cilindro plano de 11 nm de diámetro y 6 de altura. La longitud del DNA es de ~34 nm, casi el doble de la circunferencia de la partícula y sigue una vía simétrica que rodea al octámero. En la **FIGURA 29.4** se muestra un esquema de la vía del DNA como una masa helicoidal que da dos giros en torno al octámero cilíndrico. Nótese que el DNA "entra" y "sale" del nucleosoma en puntos cercanos. La histona H1 a veces se localice en esa región (véase la sección 29.4). Los nucleosomas tienen una estructura común.

Si se analiza este modelo en función de un corte transversal del nucleosoma, se observará, como es la **FIGURA 29.5**, que las dos circunferencias del DNA yacen cerca una de la otra. La altura del cilindro es de 6 nm, de los cuales, 4 son ocupados por dos giros del DNA (cada uno de 2 nm de diámetro).

El patrón de dos giros posiblemente tenga consecuencias funcionales. Un giro en torno al nucleosoma requiere de ~80 bp de DNA, por lo cual los puntos separados por 80 bp en la doble hélice lineal, en realidad pueden estar cerca de la superficie del nucleosoma, como se ilustra en la **FIGURA 29.6**.

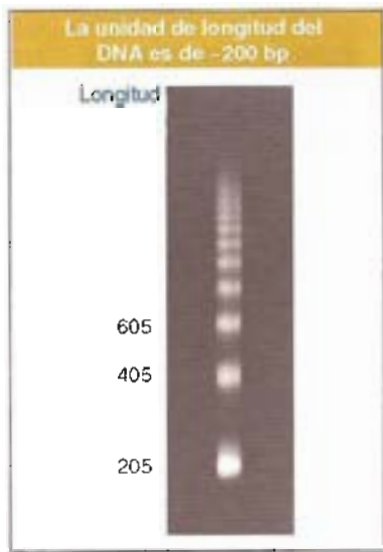


FIGURA 29.7 La nucleasa de micrococcos digiere la cromatina en los núcleos y produce una serie multimérica de bandas de DNA que pueden ser separadas mediante electroforesis en gel. Imagen cortesía de Markus Noll, Universität Zürich.

29.3

El DNA está enrollado en la estructura de los nucleosomas

Conceptos principales

- >95% del DNA se recupera en nucleosomas o multímeros cuando la nucleasa de micrococcos escinde el DNA de la cromatina.
- La longitud del DNA por nucleosoma varía de tejido a tejido en un rango de 154 a 260 bp.

Cuando se digiere la cromatina con la enzima nucleasa de micrococcos, el DNA es escindido en múltiplos integrales de una unidad de longitud. El fraccionamiento por electroforesis en gel revela la "escalera" que se representa en la **FIGURA 29.7**. Tales escaleras tienen ~10 escalones y la unidad de longitud determinada por los incrementos entre peldaños sucesivos, es de ~200 bp.

En la **FIGURA 29.8** se muestra que la escalera es generada por grupos de nucleosomas, que cuando se fraccionan sobre un gradiente de sacarosa, arrojan una serie de picos bien definidos que corresponden a monómeros, dímeros, trímeros y así sucesivamente. Cuando se extrae DNA de las fracciones y se somete a electroforesis, cada fracción resulta en una banda de DNA cuyo tamaño corresponde a un peldaño de la escalera de la nucleasa de micrococcos. El nucleosoma monomérico contiene DNA de una unidad de longitud, el dímero de nucleosomas

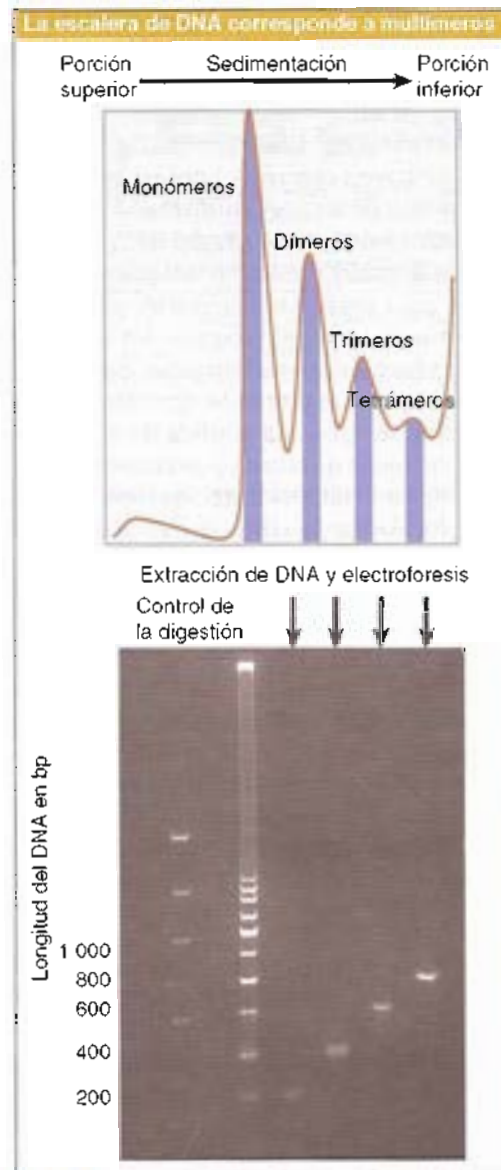


FIGURA 29.8 Cada multímero de nucleosomas contiene el número apropiado de unidades de longitud de DNA. En la fotografía, las bandas artificiales simulan una escalera de DNA. La imagen se estructuró utilizando fragmentos de PCR cuyo tamaño corresponde al de las bandas reales. Imagen cortesía de Jan Kieleczawa, Wyeth Reserch.

contiene el doble de la unidad de longitud de DNA, y así sucesivamente.

Cada peldaño en la escalera representa al DNA derivado de un número definido de nucleosomas, de modo que se considera que la escalera de 200 bp de cualquier cromatina indica que el DNA está organizado en nucleosomas. La escalera microcócica se genera cuando la enzima torna soluble en ácido (degradado hasta pequeños fragmentos) a sólo ~2% del DNA del núcleo. Así, un pequeño porcentaje del DNA atacado específicamente, quizá represente regiones especialmente susceptibles.

Cuando la cromatina se escurre del núcleo, a menudo se observa una serie de nucleosomas conectados por una cadena de DNA libre (cuentas ensartadas en un hilo), no obstante, la necesidad de compactación del DNA *in vivo* sugiere que probablemente haya poco DNA libre (si acaso).

Este punto de vista es confirmado por el hecho de que *puede recuperarse >95% del DNA de la cromatina en forma de escalera de 200 bp*. Así pues, casi todo el DNA debe estar organizado en nucleosomas. Es muy probable que en su estado natural, los nucleosomas estén empaquetados estrechamente, con paso directo del DNA de uno al siguiente. Quizá la generación de DNA libre se deba a la pérdida de algunos octámeros de histonas durante su aislamiento.

La longitud del DNA del nucleosoma varía, en cierta forma, de la cifra "usual" de 200 bp. La cromatina de cualquier tipo celular tiene un valor promedio característico (± 5 bp). Normalmente, el promedio es de entre 180 y 200, pero hay extremos, apenas 154 bp (en un hongo) o hasta 260 bp (en espermatozoides del erizo de mar). El valor promedio puede ser diferente en cada tejido del organismo adulto, y tal vez haya diferencias entre diferentes partes del genoma en un solo tipo de célula. Las variaciones del genoma promedio incluyen secuencias repetidas seriadas, como los grupos de genes de RNA de 5S.

29.4 Los nucleosomas tienen una estructura común

Conceptos principales

- El DNA de los nucleosomas se divide en DNA medular y DNA de enlace, dependiendo de su susceptibilidad a la nucleasa de micrococos.
- El DNA medular tiene una longitud de 146 bp y se encuentra en las partículas centrales producidas por digestión prolongada con la nucleasa de micrococos.
- El DNA de enlace es la región de 8 a 114 bp susceptible de escisión temprana por la enzima.
- Los cambios en la longitud del DNA de enlace explican las variaciones de la longitud total del DNA nucleosómico.
- La H1 se vincula con el DNA de enlace y podría encontrarse en el punto en que el DNA entra y sale del nucleosoma.

Una estructura común subraya la cantidad variable de DNA contenida en los nucleosomas de diferentes fuentes. El vínculo del DNA con el octámero de histonas forma una partícula medular que contiene 146 bp de DNA, independientemente de la longitud del DNA del nucleosoma. La diferencia de

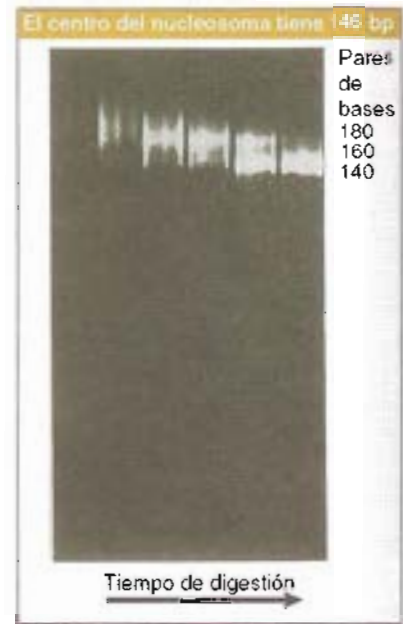


FIGURA 29.9 La nucleasa de micrococos disminuye la longitud de los monómeros de nucleosomas en pasos bien definidos. Imagen cortesía de Roger Kornberg, Stanford University School of Medicine.

longitud total del DNA por nucleosoma se superpone a esta estructura medular básica.

La partícula medular es definida por los efectos de la nucleasa de micrococos en el nucleosoma monomérico. La reacción inicial de la enzima es común entre nucleosomas, pero si se le permite continuar después de que se han generado monómeros, digiere algo del DNA del nucleosoma individual por una reacción en que el DNA es "recortado" de los extremos del nucleosoma.

La longitud del DNA disminuye en etapas bien definidas, como se muestra en la **FIGURA 29.9**. En los núcleos del hígado de rata, los nucleosomas monoméricos tienen inicialmente 205 bp de DNA pero después del primer paso, en algunos monómeros la longitud del DNA ha disminuido a ~165 bp, que acaban por disminuir a la longitud del DNA de la partícula medular, 146 bp. (El centro es razonablemente estable, pero la digestión continua genera un "producto límite de digestión", en el cual, los fragmentos más largos del DNA central son de 146 bp y los más pequeños, apenas 20 bp.)

Este análisis sugiere que el DNA de los nucleosomas puede dividirse en dos regiones:

- DNA medular, con una longitud invariable de 140 bp, y relativamente resistente a la digestión por nucleasas.
- DNA de enlace, que constituye el resto de la unidad de repetición. Su longitud varía de apenas 8 bp a tantos como 114 bp por nucleosoma.

El tamaño bien definido de la banda de DNA generada por la escisión inicial con la nucleasa de micrococcos sugiere que la región inmediatamente disponible para la enzima está restringida y representa sólo parte de cada DNA de enlace. (Si la totalidad de éste fuese susceptible, la banda fluctuaría entre 146 y >200 bp.) Sin embargo, una vez que se ha hecho un corte en el DNA de enlace, el resto de la región se torna susceptible y puede eliminarse relativamente rápido por acción enzimática adicional. En la **FIGURA 29.10** se representa la conexión entre los nucleosomas.

Las partículas medulares tienen propiedades parecidas a las de los nucleosomas mismos, si bien, son más pequeñas. Su forma y tamaño son similares a los de los nucleosomas, lo cual sugiere que la geometría esencial de la partícula depende de las interacciones entre el DNA y el octámero de proteínas. Las partículas medulares se obtienen más fácilmente como grupo homogéneo, de modo que para estudios estructurales, a menudo se prefieren a los preparados de nucleosomas (que tienden a variar, pues es difícil obtener una preparación en que no haya habido un recorte terminal del DNA).

¿Cuáles son las características físicas de la región medular y la de enlace? *Estos términos se introdujeron como definiciones operativas para describir las regiones en cuanto a su susceptibilidad relativa al tratamiento con nucleasas, pero dicha descripción no tiene implicaciones acerca de su estructura real, de ahí que la mayor parte del DNA medular se encorva sobre el nucleosoma, en tanto que las regiones terminales de la porción medular y la de enlace están más extendidas (véase la sección 29.5, La estructura del DNA varía en la superficie del nucleosoma).*

La existencia del DNA de enlace depende de factores diferentes a las cuatro histonas medulares. Los experimentos de reconstitución *in vitro* muestran que estas últimas tienen una capacidad intrínseca para organizar el DNA en partículas medulares, pero no forman nucleosomas con la unidad de longitud apropiada. El grado de superenrollamiento del DNA es un factor importante. La histona H1 y las proteínas no histonas, o ambas, influyen en la longitud del DNA de enlace vinculado con el octámero de histonas en una serie natural de nucleosomas. Las "proteínas de ensamblaje" que no forman parte de la estructura del nucleosoma, participan *in vivo* en la estructuración de los nucleosomas a partir de histonas y DNA (véase la sección 29.9, La replicación de la cromatina implica el ensamblaje de los nucleosomas).

¿Dónde está la histona H1? Se perdió durante la fragmentación de nucleosomas monoméricos, y si bien se puede retener en monómeros que aún tienen 165 bp de DNA, siempre se pierde con la



FIGURA 29.10 La nucleasa de micrococcos corta inicialmente entre los nucleosomas. Los mononucleosomas suelen tener ~200 bp de DNA. Los cortes terminales disminuyen la longitud del DNA primero a ~165 bp y posteriormente generan partículas medulares de 146 bp.

reducción final a la partícula medular de 146 bp, lo cual sugiere que la H1 podría localizarse en la región del DNA de enlace, adyacente al DNA medular.

Si la H1 está localizada en el DNA de enlace, podría "sellarlo" dentro del nucleosoma por unión con el punto en que el ácido nucleico entra y sale (véase la Fig. 29.4). La idea de que H1 yace en la región de unión de nucleosomas adyacentes es compatible con los antiguos resultados de que es la que más fácilmente se elimina de la cromatina, y que la cromatina, sin H1, es más fácilmente "solubilizada". Además, es más fácil obtener una fibra estirada a manera de cuentas ensartadas en un hilo cuando se ha eliminado la H1.

29.5

La estructura del DNA varía en la superficie del nucleosoma

Conceptos principales

- El DNA le da 1.65 vueltas al octámero de histonas.
- La estructura del DNA se modifica de manera que tiene un número mayor de pares de bases por giro en la parte media, pero menor en los extremos.

La exposición del DNA en la superficie del nucleosoma explica porqué es accesible a la escisión por ciertas nucleasas. La reacción con las nucleasas que atacan a cadenas únicas ha sido especialmente informativa. Las enzimas desoxirribonucleasas I y II hacen hendiduras de una sola cadena en el DNA; fragmentan un enlace en una cadena, pero la otra se mantiene intacta en ese punto, de modo que los efectos no son visible en el DNA de doble cadena. Sin embargo, con la desnaturalización se liberan fragmentos cortos y no cadenas únicas de longitud total. Si el DNA ha sido marcado en sus extremos, se pueden identificar los fragmentos terminales por autorradiografía, según se resume en la **FIGURA 29.11**. Cuando el DNA está libre en solución, pre-

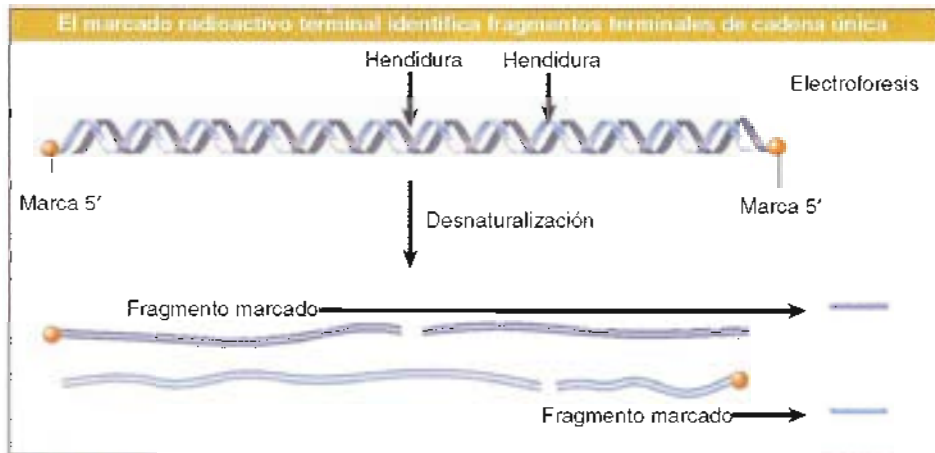


FIGURA 29.11 Cuando se desnaturaliza el DNA para dar cadenas únicas, se revelan hendiduras en el DNA de doble cadena por la presencia de fragmentos. Si el DNA se marca (digamos en los extremos 5', sólo los fragmentos 5' serán visibles mediante autorradiografía). El tamaño del fragmento identifica la distancia de la hendidura al extremo marcado.

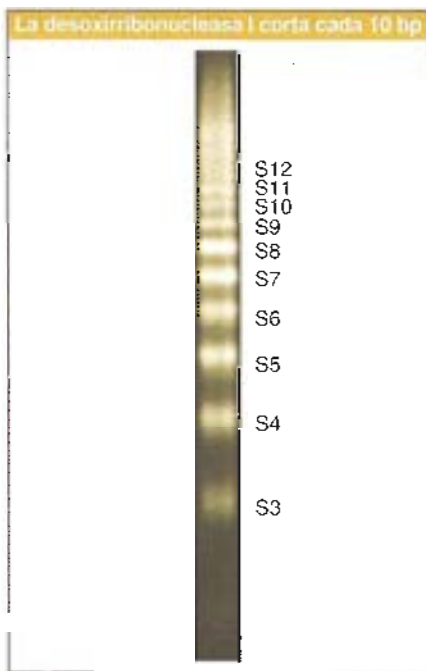


FIGURA 29.12 Los sitios para las hendiduras yacen a intervalos regulares a lo largo del DNA medular, como se observa en el producto de digestión de núcleos por la desoxirribonucleasa I. Imagen cortesía de Leonard C. Lutter, Henry Ford Hospital, Detroit, MI.

senta hendiduras (relativamente aleatorias). El DNA de los nucleosomas también puede ser modificado por las enzimas que le hacen hendiduras, pero sólo a intervalos regulares. Cuando los puntos de corte se determinan mediante DNA con marca radioactiva en los extremos, y después el DNA se desnaturaliza y somete a electroforesis, se obtiene una escalera del tipo que se muestra en la **FIGURA 29.12**.

El intervalo entre peldaños sucesivos de la escalera es de 0 a 11 bases, y la escalera abarca toda la distancia del DNA medular. Los sitios de escisión se numeran de S1 a S13 (S1 está a ~10 bases del extremo 5' marcado, S2, a ~20 bases, y así sucesivamente); las posiciones respecto de la hélice del DNA se ilustran en la **FIGURA 29.13**.

No todos los sitios se cortan con igual frecuencia; en algunos casos el corte es bastante eficaz, mientras que en otros, es apenas perceptible. Las enzimas desoxirribonucleasas I y II generan la misma escalera, si bien con algunas diferencias en cuanto a la intensidad de las bandas, lo cual demuestra que el patrón de corte representa una serie única de dianas en el DNA, determinada por su organización, con sólo una ligera preferencia por sitios particulares impuesta por cada enzima. El mismo patrón de corte se obtiene por escisión con un radical hidroxilo, lo cual apunta a que el patrón refleja la estructura del DNA mismo, más que preferencia de secuencias.

La sensibilidad del DNA nucleosómico a las nucleasas es análoga a un experimento de rastreo, así que la falta de reacción en sitios diana específicos es atribuible a la estructura del nucleosoma, en el cual ciertas posiciones del DNA se hacen inaccesibles.

Hay dos cadenas de DNA en la partícula medular, de modo que en un experimento de marcado de extremos se incluyen los dos 5' (o 3'), uno en cada cadena. Así, el patrón de corte incluye fragmentos derivados de varias cadenas, lo cual se ilustra en la **Figura 29.11**, en que cada fragmento etiquetado proviene de una cadena diferente. El corolario es que en un experimento, cada banda marcada puede representar de hecho dos fragmentos generados por corte a la misma distancia de cualquiera de los extremos marcados.

¿Cómo, entonces, deberían interpretarse las preferencias definidas en sitios específicos? Un punto de vista es que la vía del DNA en la partícula es simétrica (casi un eje horizontal a través del nucleosoma, como se ilustra en la Figura 29.4); por ejemplo, si la desoxirribonucleasa I no generara un fragmento de 80 bases, ello significaría que la posición a 80 bases de distancia respecto del extremo 5' de *cualquiera* de las cadenas no es susceptible a la enzima. El segundo esquema de liberación utilizado en la Figura 29.13 refleja ese punto de vista e identifica a S7 como sitio 0, o centro de simetría.

Cuando el DNA se inmoviliza sobre una superficie plana, los cortes resultan en sitios con separación regular. La FIGURA 29.14 sugiere que dicho fenómeno refleja la recurrencia del sitio expuesto con la periodicidad helicoidal de la forma B del DNA. La periodicidad del corte (espaciado entre puntos de escisión) coincide con la periodicidad estructural, de hecho es reflejo de ella (el número de pares de bases por giro de la doble hélice), es decir, la distancia entre sitios corresponde al número de pares de bases por giro. Las mediciones de ese tipo sugieren que un valor promedio para el DNA helicoidal de tipo B doble es de 10.5 bp/giro.

¿Cuál es la naturaleza de los sitios diana del nucleosoma? En la FIGURA 29.15 se muestra que cada sitio tiene de tres a cuatro posiciones en que ocurre el corte, esto es, el sitio de corte se define ± 2 bp, por lo cual representa una cadena corta de enlaces, en ambas cadenas, que está expuesta a la acción de la nucleasa en tres a cuatro pares de bases. Las intensidades relativas indican que se prefieren ciertos sitios a otros.

A partir de ese patrón, se puede calcular el punto "promedio" que se corta. En los extremos del DNA, los pares de sitios de S1 a S4 o de S10 a S13, distan entre sí 10.0 bases cada uno, mientras que en el centro de la partícula, la separación de los sitios entre S4 y S10 es de 10.7 bases (este análisis trata con posiciones *promedio*, de manera que los sitios no necesariamente están separados por un número entero de bases).

La variación en la periodicidad del corte en el DNA medular (10.0 en los extremos, 10.7 a la mitad) significa que su periodicidad estructural difiere. El DNA tiene más bp/giro que la cifra correspondiente en solución en la parte media, pero menos bp/giro en los extremos. La periodicidad promedio sobre el nucleosoma es de sólo 10.17 bp/giro, significativamente menor que la de 10.5 bp/giro del DNA en solución.

La estructura cristalina de la partícula medular sugiere que el DNA se organiza en una superhélice plana de 1.65 giros en torno al octámero de histonas. El grado de inclinación de la superhélice varía,

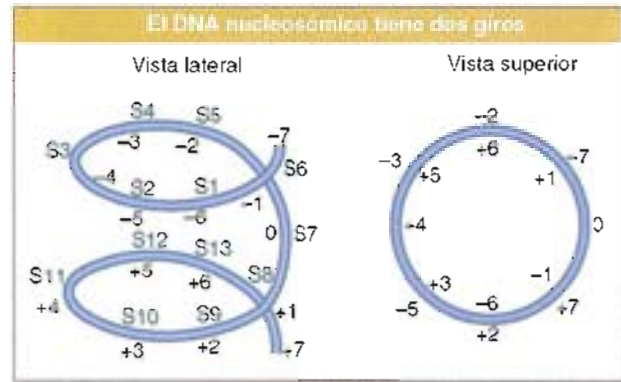


FIGURA 29.13 Dos esquemas de numeración dividen el DNA de la partícula medular en segmentos de 10 bp. Los sitios pueden numerarse de S1 a S13 a partir de un extremo, o tomando S7 para identificar la coordenada 0 de la simetría doble, que puede numerarse de -7 a +7.



FIGURA 29.14 Las posiciones más expuestas del DNA se presentan con una periodicidad que refleja la estructura de la doble hélice. (Para mayor claridad se muestran los sitios de sólo una cadena.)

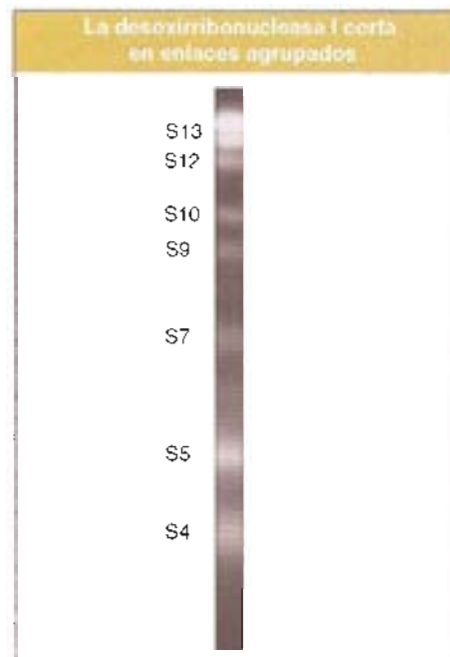


FIGURA 29.15 El análisis de alta resolución muestra que cada sitio de la desoxirribonucleasa I consta de varios enlaces fosfodiéster adyacentes, susceptibles, según se observa en este ejemplo de sitios S4 y S5 analizados en partículas medulares con marca en los extremos. Imagen cortesía de Leonard C. Lutter, Henry Ford Hospital, Detroit, MI.

y en la parte media es discontinuo. Las regiones de gran curvatura se disponen de manera simétrica en las posiciones ± 1 y ± 4 , que corresponden a S6 y S8, S3 y S11 respectivamente, y son los sitios menos sensibles a la desoxirribonucleasa I.

Una estructura de alta resolución del centro del nucleosoma muestra en detalle cómo se distorsiona la estructura del DNA. Gran parte del superenrollado ocurre en los 129 bp centrales, que hacen 1.59 giros superhelicoidales izquierdos con un diámetro de 80 Å (sólo cuatro veces el diámetro de la cadena dicatenaria del DNA). Las secuencias terminales de cualquier extremo hacen sólo una pequeña contribución a la curvatura general.

Estos 129 bp centrales se encuentran en forma de DNA-B, pero con una curvatura sustancial, necesaria para formar la superhélice. El surco mayor se dobla suavemente, pero el menor tiene ensortijados abruptos, cambios de conformación que explican porqué la parte central del DNA del nucleosoma no suele ser diana para la unión de proteínas reguladoras, que suelen unirse a las partes terminales del DNA central o a las secuencias de enlace.

29.6 La periodicidad del DNA cambia en el nucleosoma

Concepto principal

- Con el cambio en bp por giro se absorben ~ 0.6 giros negativos del DNA, de 10.5 en solución a un promedio de 10.2 en la superficie del nucleosoma, lo cual explica la paradoja del número de enlaces.

La comprensión de la estructura del DNA nucleosómico tiene lugar cuando se comparan los pronósticos para el superenrollado de la vía que sigue el DNA con las mediciones reales del superenrollado del DNA nucleosómico. Gran parte de los trabajos sobre la estructura de los conjuntos de nucleosomas se ha hecho en el virus SV40, cuyo DNA es una molécula circular de 5 200 bp con una longitud de contorno de $\sim 1\ 500$ nm. Tanto en el virión como en el núcleo infectado se empaqueta una serie de nucleosomas, que juntos se denominan minicromosoma.

Como se aísla normalmente, la longitud del contorno del minicromosoma es de ~ 210 nm, que corresponde a una razón de empaquetado de ~ 7 (esencialmente la misma que la de ~ 6 del nucleosoma mismo). Los cambios en la concentración de sales pueden convertirlo en un hilo de cuentas flexible, con una proporción mucho menor de empaquetado general, lo cual subraya el punto de que, *in vitro*, las tiras de nucleosomas pueden asumir más de una forma, dependiendo de las condiciones.

El grado de superenrollamiento de los nucleosomas individuales del minicromosoma se puede medir como se ilustra en la FIGURA 29.16. En primer término, las superhélices libres del minicromosoma mismo están relajadas, de manera que los nucleosomas forman una cuerda circular con una densidad superhelicoidal de 0. A continuación se extraen los octámeros de histonas, con lo cual se libera al DNA para que siga una vía libre. Las superhélices que estaban comprimidas en el minicromosoma aparecerán en el DNA desproteinado como -1 giro, y ya se puede medir el número total de superhélices en el DNA de SV40.

La cifra observada se aproxima al número de nucleosomas; el resultado será inverso cuando los nucleosomas se ensamblan *in vitro* en un DNA de SV40 superenrollado, pues la formación de cada nucleosoma elimina ~ 1 superhélice negativa.

Así pues, el DNA sigue una vía en la superficie del nucleosoma que genera ~ 1 giro de superhélice negativo cuando se elimina la proteína de restricción, si bien la vía que sigue el DNA corresponde a -1.67 giros de superhélice (véase la Fig. 29.4), discrepancia que a veces se denomina paradoja del número de enlace.

La discrepancia se explica por la diferencia entre las 10.17 bp/giro promedio del DNA nucleosómico

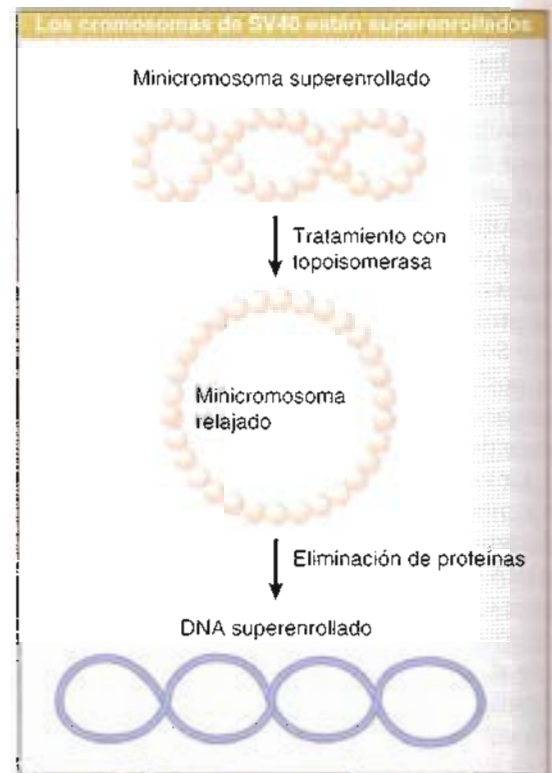


FIGURA 29.16 Las superhélices del minicromosoma de SV40 pueden relajarse para generar una estructura circular cuya periferia de histonas genera entonces superhélices en el DNA libre.

y las 10.5 bp/giro del DNA libre. En un nucleosoma de 200 bp se tienen $200/10.17 = 19.67$ giros. Cuando el DNA se libere del nucleosoma, tendrá $200/10.5 = 19.0$ giros. La vía del DNA en que el enrollado es menos compacto, sobre el nucleosoma, absorbe -0.67 giros, lo cual explica la discrepancia entre la vía física de -1.67 y la medición de -1.0 giros superhelicoidales. De hecho, algo de la tensión por torsión en el DNA de los nucleosomas depende del aumento del número de bp/giro; sólo queda el resto para medirse como superhélice.

29.7 Organización del octámero de histonas

Conceptos principales

- El meollo del octámero de histonas está constituido por un tetrámero, $H3_2-H4_2$, vinculado con dos dímeros $H2A-H2B$.
- Cada histona presenta interdigitación intensa con su contraparte.
- Todas las histonas medulares tienen el segmento estructural de pliegue. Las colas terminales N salen del nucleosoma.

Hasta ahora se ha analizado la estructura del nucleosoma desde la perspectiva de su organización en el DNA de la superficie, pero desde la perspectiva de las proteínas, se necesita saber cómo interactúan las histonas entre sí y con el DNA. ¿Reaccionan apropiadamente sólo en presencia de DNA o poseen una capacidad independiente para formar octámeros? La mayor parte de las pruebas acerca de las interacciones histona-histona provienen de su capacidad para formar complejos estables y de experimentos de enlace cruzado con el nucleosoma.

Las histonas medulares forman dos tipos de complejos; H3 y H4 forman un tetrámero ($H3_2-H4_2$), H2A y H2B forman varios complejos, en particular un dímero ($H2A-H2B$).

Se puede obtener octámeros de histonas íntegros por extracción de la cromatina o (más difícilmente), al permitir que las histonas se vinculen *in vitro*, en condiciones de concentración alta de sales y proteínas. El octámero suele disociarse para generar un hexámero de histonas que ha perdido un dímero $H2A-H2B$, en tanto que el otro se pierde separadamente en ese punto, con lo que queda un tetrámero $H3_2-H4_2$, fenómeno que apunta a una forma de organización en que el nucleosoma tiene un "meollo" central constituido por el tetrámero $H3_2-H4_2$; *in vitro*, este tetrámero puede organizar al DNA en partículas que muestran algunas de las propiedades de la partícula medular.

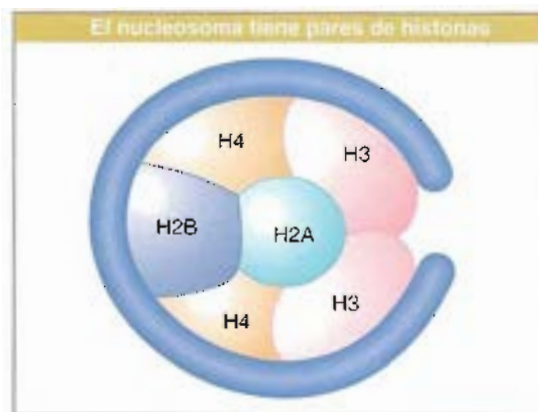


FIGURA 29.17 En un modelo simétrico del nucleosoma, el tetrámero $H3_2-H4_2$ constituye el centro de la estructura. En la parte superior se observa un dímero $H2A-H2B$; el otro está debajo.

Los estudios mediante enlaces cruzados amplían esas relaciones para mostrar qué pares de histonas están cerca uno del otro en el nucleosoma. (Un problema con dicha información suele ser que sólo un pequeño porcentaje de las proteínas tiene enlaces cruzados, de modo que es necesario ser cauto al decidir si los resultados tipifican a las principales interacciones.) A partir de esos datos, se ha construido un modelo de la organización del nucleosoma, esquematizado en la **FIGURA 29.17**.

Mediante estudios estructurales se ha mostrado que la forma global del octámero de histonas es similar a la de la partícula medular, lo cual sugiere que las interacciones histona-histona establecen la estructura general. Las posiciones de cada una de ellas han sido asignadas a regiones de estructura octamérica con base en su comportamiento al interactuar y en respuesta a enlaces cruzados.

La estructura cristalina (con una resolución de 3.1 Å) sugiere el modelo que se muestra en la **FIGURA 29.18** para el octámero de histonas. El rastreo de las vías de las columnas polipeptídicas individuales de la estructura cristalina sugiere que las histonas no sólo se organizan como proteínas globulares individuales, sino que cada una se interdigita con su contraparte, H3 con H4 y H2A con H2B. Así, en el modelo se distingue el tetrámero $H3_2-H4_2$ (blanco) de los dímeros $H2A-H2B$ (azules), pero no se muestran las histonas aisladamente.

En la parte superior se representa la misma perspectiva esquemática de la Figura 29.17. El tetrámero $H3_2-H4_2$ contribuye al diámetro del octámero y asume la forma de una herradura. Los pares $H2A-H2B$ se acoplan como dos dímeros, pero en esa imagen sólo se observar uno. La vista lateral representa la misma perspectiva de la Figura 29.4, en la cual se distingue la participación del tetráme-

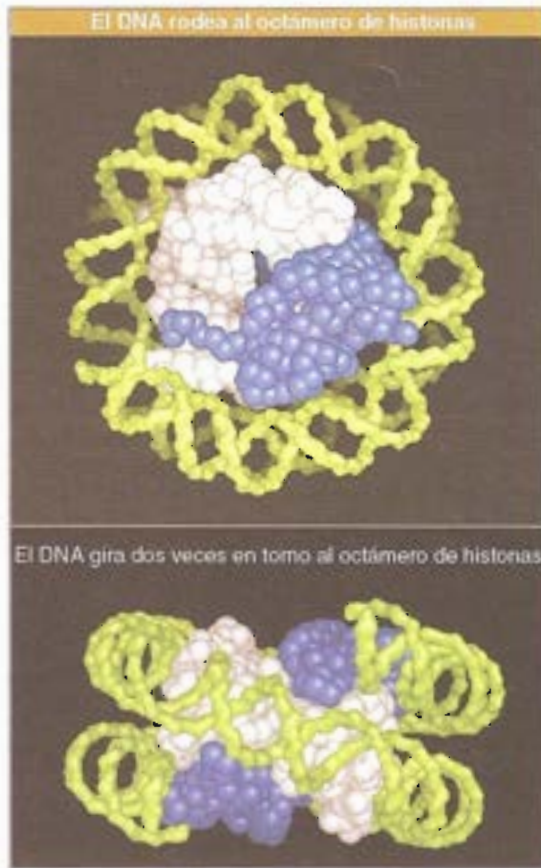


FIGURA 29.18 Modelo tridimensional de la estructura cristalina del octámero de histonas, con el tetrámero H3₂-H4, en blanco y los dímeros H2A-H2B en azul. Sólo uno de los dímeros H2A-H2B es visible en la imagen superior, el otro está escondido debajo. La vía potencial del DNA se muestra en la parte superior como un tubo estrecho (de una cuarta parte del diámetro del DNA); en la vista lateral son las líneas paralelas de un haz de 20 Å de ancho. Imagen cortesía de E. N. Moudrianakis, Johns Hopkins University.

ro H3₂-H4₂ y de los dímeros H2A-H2B separados. La proteína forma un tipo de carrete, con una vía superhelicoidal que podría corresponder al sitio de unión del DNA, enrollado casi 2 giros completos en un nucleosoma. El modelo muestra una doble simetría en torno a un eje que correría en forma perpendicular en la vista lateral.

En la **FIGURA 29.19** se resume una vista más detallada de las posiciones de las histonas (con base en una estructura cristalina a 2.8 Å). La imagen superior muestra la posición de una histona de cada tipo respecto de un giro en torno a un nucleosoma (numeradas de 0 a +7). Las cuatro histonas medulares muestran un tipo similar de estructura, en que 3 α hélices se conectan con dos asas, a lo que se le llama **pliegue de histonas**. Las regiones interactúan para formar heterodímeros con forma de lunula; cada uno se une a 2.5 giros de la hélice doble

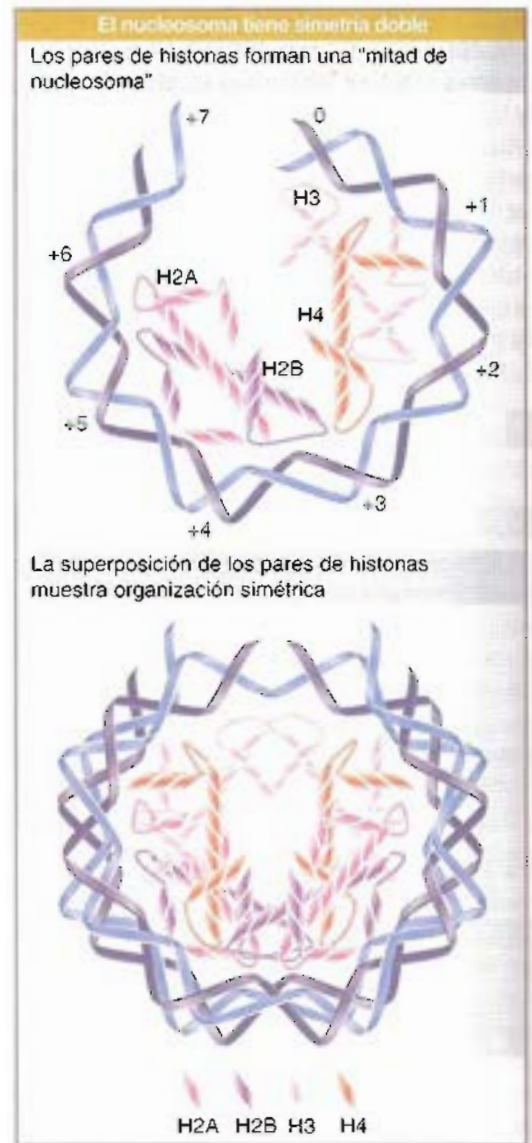


FIGURA 29.19 Las posiciones de las histonas en una vista desde arriba muestran los pares H3-H4 y H2A-H2B en una mitad de nucleosoma; en la imagen inferior se percibe la organización simétrica por la superposición de ambas mitades.

de DNA (H2A-H2B se une a +3.5 - +6; H3-H4 se une a +0.5 - +3 en la circunferencia que se ilustra). La unión ocurre en gran parte de la columna de enlaces fosfodiéster (compatible con la necesidad de compactar cualquier DNA, independientemente de su secuencia). El tetrámero H3₂-H4₂ se forma por interacciones entre las dos subunidades H3, como puede observarse en la parte inferior de la figura.

Cada una de las histonas medulares tiene un cuerpo globular que contribuye a la masa proteínica central del nucleosoma, además de una cola terminal N flexible con sitios para modificación, que pueden ser importantes para la función de la cromatina. La posición de las colas, que contribuyen con casi el

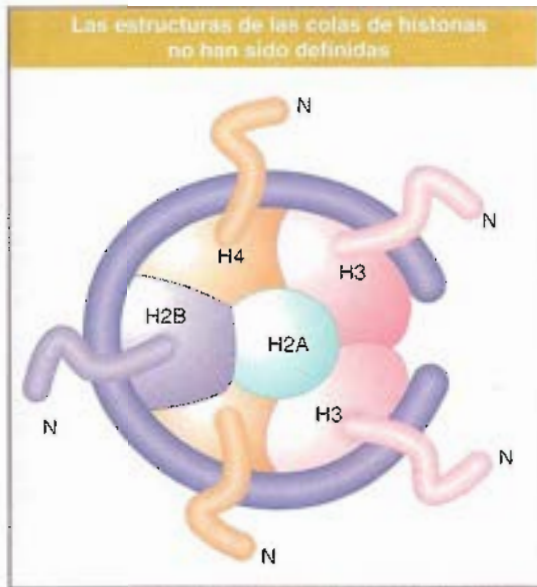


FIGURA 29.20 Los cuerpos globulares de las histonas se localizan en el octámero de la partícula medular. No obstante, se desconoce la localización de las colas terminales N, que portan los sitios para modificación, que podrían ser más flexibles.



FIGURA 29.21 Las colas terminales N de las histonas están desordenadas y salen del nucleosoma entre giros del DNA.

25% de la masa proteínica, no está tan bien definida, como se indica en la **FIGURA 29.20**. No obstante, las colas de H3 y H2B se pueden observar pasando entre giros de la superhélice de DNA y extendiéndose fuera del nucleosoma, como se muestra en la **FIGURA 29.21**. Cuando las colas de histonas se entrecruzan con el DNA por irradiación UV, se obtienen más productos con nucleosomas que con partículas medulares, lo cual podría significar que las colas entran en contacto con el DNA de enlace. La cola de H4 parece hacer contacto con un dímero H2A-H2B de un nucleosoma adyacente, que podría ser una característica importante en la estructura global.

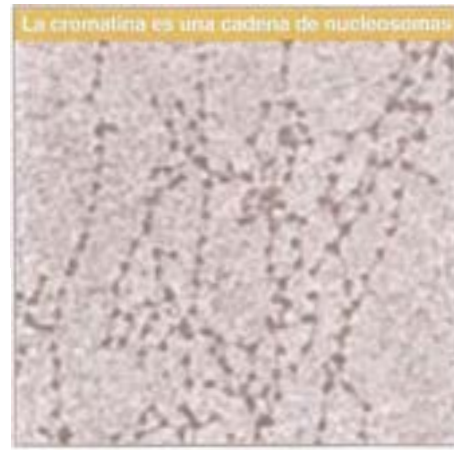


FIGURA 29.22 La fibra de 10 nm está parcialmente desenrollada; se observa que está constituida por una cadena de nucleosomas. Imagen cortesía de Barbara Hamkalo, University of California, Irvine.

29.8 La vía de los nucleosomas en la fibra de cromatina

Conceptos principales

- Las fibras de cromatina de 10 nm se despliegan a partir de fibras de 30 nm y constan de una cadena de nucleosomas.
- Las fibras de 30 nm tienen seis nucleosomas por giro organizados en un solenoide.
- La histona H1 es necesaria para la formación de la fibra de 30 nm.

Cuando se revisa la cromatina bajo el microscopio electrónico, se observan dos tipos de fibras, de 10 y 30 nm, descritas por su diámetro aproximado (que en la fibra de 30 nm en realidad fluctúa entre ~25 y 30 nm).

La **fibra de 10 nm** es esencialmente una cuerda continua de nucleosomas que, de hecho, en ocasiones transcurre de forma continua por una región más distendida en que se observan los nucleosomas como un hilo de cuentas, según se indica en el ejemplo de la **FIGURA 29.22**. La estructura fibrilar de 10 nm se obtiene en condiciones de escasa fortaleza iónica y no requiere de la presencia de la histona H1, lo cual significa que, estrictamente, es una función de los nucleosomas mismos, que en esencia puede ser observada como una serie continua de nucleosomas, como se muestra en la **FIGURA 29.23**. No se sabe si tal estructura existe *in vivo* o es simplemente una consecuencia de su despliegue durante la extracción *in vitro*.

Cuando se visualiza la cromatina en condiciones de mayor fortaleza iónica, se obtiene la **fibra de**



FIGURA 29.23 La fibra de 10 nm es una cadena continua de nucleosomas.



FIGURA 29.24 La estructura de la fibra de 30 nm está enrollada. Imagen cortesía de Barbara Hamkalo, University California, Irvine.

30 nm, como en la **FIGURA 29.24**, en la cual se muestra que la fibra tiene una estructura enrollada subyacente; presenta ~6 nucleosomas por giro, es decir, una razón de empaquetado de 40 (esto es, en cada μm del eje de la fibra están contenidos 40 μm de DNA); en este caso sí se requiere la presencia de H1. Esta fibra es el constituyente fundamental de la cromatina de interfase y los cromosomas en mitosis.

La disposición más probable para el empaquetado de los nucleosomas en la fibra es la de un solenoide, en el que los nucleosomas giran con una trayectoria helicoidal y se enrollan en torno a una cavidad

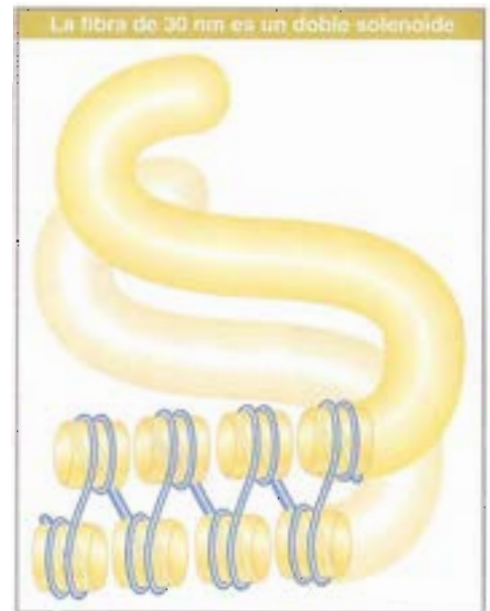


FIGURA 29.25 La fibra de 30 nm es un listón helicoidal constituido por dos hileras paralelas de nucleosomas enrollados en un solenoide.

central. Las dos formas principales de un solenoide son un solo inicio, que forma un arreglo lineal único, y dos inicios, en que efectivamente hay una doble hilera de nucleosomas. La **FIGURA 29.25** muestra un modelo de dos inicios, sugerido por datos recientes de enlaces cruzados mediante los cuales se identificó una doble pila de nucleosomas en la fibra de 30 nm; esto es sustentado por la estructura cristalina de un complejo tetranucleosómico.

Las fibras de 30 y 10 nm pueden convertirse de manera reversible merced a cambios en la fortaleza iónica, lo cual sugiere que la disposición lineal de los nucleosomas de la fibra de 10 nm desaparece al enrollarse dentro de la estructura de 30 nm en condiciones de mayor fortaleza iónica y en presencia de H1.

Si bien la presencia de esta última es necesaria para la formación de la fibra de 30 nm, la información acerca de su localización es controvertida. La relativa facilidad con que se extrae la cromatina parece apuntar en el sentido de que se encuentra en la parte externa del eje de la fibra superhelicoidal. No obstante, mediante datos de difracción y por el hecho de que es más difícil encontrarla en fibras de 30 nm que en las de 10 nm que la retienen, se argumenta respecto de una localización interna.

¿Cómo se pasa de la fibra de 30 nm a las estructuras específicas que se muestran en los cromosomas mitóticos? ¿Hay alguna especificidad adicional en la disposición de la cromatina de interfase? ¿Tienen las regiones particulares de fibras de 30 nm una relación fija entre sí o su disposición es aleatoria?

29.9 La replicación de la cromatina requiere del ensamblaje de los nucleosomas

Conceptos principales

- Los octámeros de las histonas no se conservan durante la replicación, a diferencia de los dímeros H2A-H2B y los tetrámeros H3₂-H4₂.
- Hay diferentes vías para el ensamblaje de los nucleosomas durante la replicación e independientemente de ésta.
- Para eliminar al ensamblaje de los nucleosomas, se requieren proteínas accesorias.
- El CAF-1 es una proteína de ensamblaje que se vincula con la subunidad PCNA del replicosoma; es necesaria para el depósito de los tetrámeros H3₂-H4₂ después de la replicación.
- Para el ensamblaje independiente de la replicación se puede usar una proteína de ensamblaje diferente y una variable de la histona H3.

En la replicación del DNA se separan sus cadenas y, por tanto, debe alterarse inevitablemente la estructura del nucleosoma. La transitoriedad del suceso de replicación constituye un problema importante para el análisis de una estructura en particular durante dicho proceso. La estructura del triplete de replicación es característica; es más resistente a la nucleasa de micrococos y es digerida en bandas que difieren de tamaño respecto del DNA del nucleosoma. La región que muestra esa estructura alterada se confina a la vecindad inmediata del triplete de replicación, lo cual sugiere la participación de un gran complejo proteínico, pero los nucleosomas se vuelven a formar más o menos inmediatamente detrás de él, conforme se traslada.

La replicación de la cromatina no implica ningún periodo prolongado durante el cual el DNA carezca de histonas, una vez que se ha replicado, los nucleosomas se regeneran rápidamente en ambos productos de la replicación. Este punto se ilustra mediante la micrografía electrónica de la **FIGURA 29.26**, que muestra una cadena de DNA con replicación reciente, ya empaquetada en los nucleosomas de ambos segmentos de las cadenas dobles hijas.

Así pues, tanto el análisis bioquímico como la visualización del triplete de replicación sugieren que la alteración de la estructura del nucleosoma se limita a una región corta, inmediata al triplete, el cual, al avanzar, desintegra los nucleosomas, pero éstos se forman otra vez rápidamente en las cadenas dobles hijas, conforme el triplete avanza. De hecho, el ensamblaje de los nucleosomas tiene enlace directo con el replisoma, que está replicando el DNA.

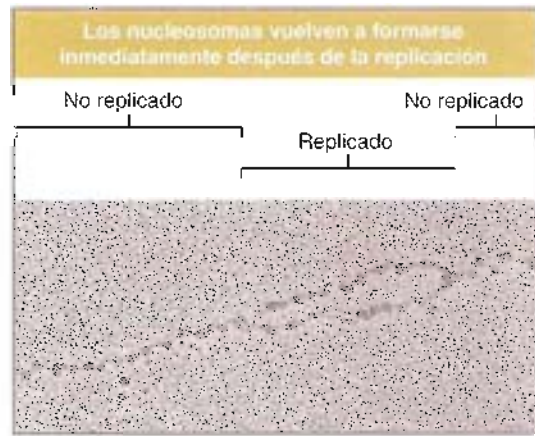


FIGURA 29.26 El DNA replicado se incorpora de inmediato a los nucleosomas. Imagen cortesía de Steven L. McKnight, UT Southwestern Medical Center at Dallas.

¿Cómo se relacionan las histonas con el DNA para generar nucleosomas? ¿Las histonas forman previamente un octámero de proteínas alrededor del cual el DNA forma después una cubierta, o se ensambla el octámero de histonas sobre el DNA a partir de histonas libres? La **FIGURA 29.27** muestra que para el ensamblaje de los nucleosomas se pueden usar dos vías *in vitro*, dependiendo de las condiciones. En una de ellas, un octámero preformado se une al DNA, y en la otra, primero se une un tetrámero de H3₂-H4₂ y después se unen dos dímeros H2A-H2B. Ambas vías tienen relación con reacciones *in vivo*. La primera refleja la capacidad de la cromatina de remodelarse por movimientos de los octámeros de histonas a lo largo del DNA (véase la sección 30.3. El remodelado de la cromatina es un proceso activo). La segunda representa la vía utilizada en la replicación.

Las proteínas accesorias ayudan a las histonas en su vinculación con el DNA. Los candidatos para esa función se pueden identificar mediante extractos que ensamblan histonas y DNA exógeno en los nucleosomas. Las proteínas accesorias pueden actuar como "chaperones moleculares", que se unen a las histonas para liberar controladamente histonas o complejos de histonas (H3₂-H4₂ o H2A-H2B) hacia el DNA; esto podría ser necesario porque las histonas, como proteínas básicas, tienen una elevada afinidad general por el DNA. Las interacciones mencionadas permiten a las histonas formar nucleosomas sin ser atrapadas en otros intermediarios cinéticos (esto es, otros complejos que resultan de la unión homogénea de las histonas al DNA).

Los intentos de producir nucleosomas *in vitro* empiezan con el análisis de un proceso de ensamblaje entre el DNA libre y las histonas, si bien *in vivo*, los nucleosomas se forman sólo cuando el DNA se

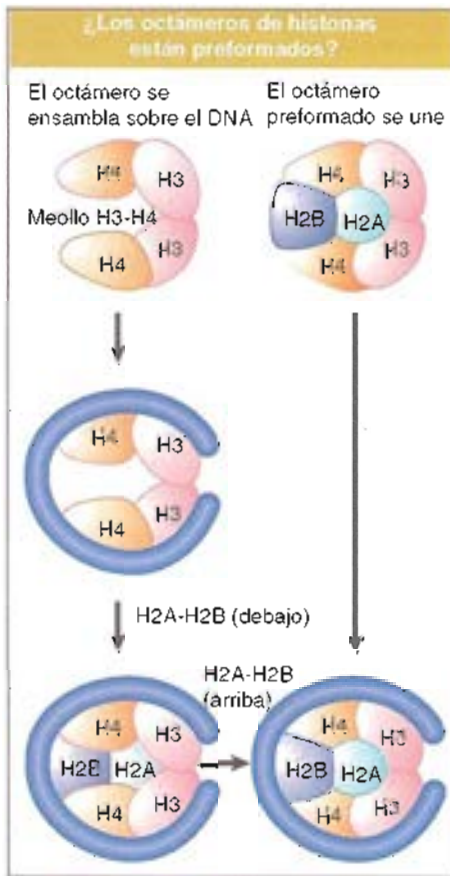


FIGURA 29.27 *In vitro*, el DNA puede interactuar directamente en un octámero de histona íntegro (en enlace cruzado), o bien ensamblarse con el tetrámero $H3_2-H4_2$, después de lo cual se agregan dos dímeros $H2A-H2B$.

replica. Se ha perfeccionado un sistema que simula ese requisito con extractos de células humanas que replican el DNA de SV40 y ensamblan los productos en la cromatina. La reacción de ensamblaje ocurre preferentemente en el DNA en proceso de replicación, para lo cual se requiere un factor auxiliar, el factor de ensamblaje de la cromatina (CAF)-1, que consta de >5 subunidades con una masa total de 238 kD. El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), factor de progreso de la polimerasa de DNA, recluta al CAF-1 para el triplete de replicación; con esto se logra el enlace entre la replicación y el ensamblaje de nucleosomas, de modo de asegurar que los nucleosomas se ensamblen tan pronto como el DNA se haya replicado.

El CAF-1 actúa de manera estequiométrica y por unión con H3 y H4 recién sintetizadas, lo cual sugiere que se forman nuevos nucleosomas, primero por ensamblaje del tetrámero $H3_2-H4_2$ y por la adición posterior de los dímeros $H2A-H2B$. Los nucleosomas que se forman *in vitro* tienen una longitud de repetición de 200 bp, pero carecen de his-

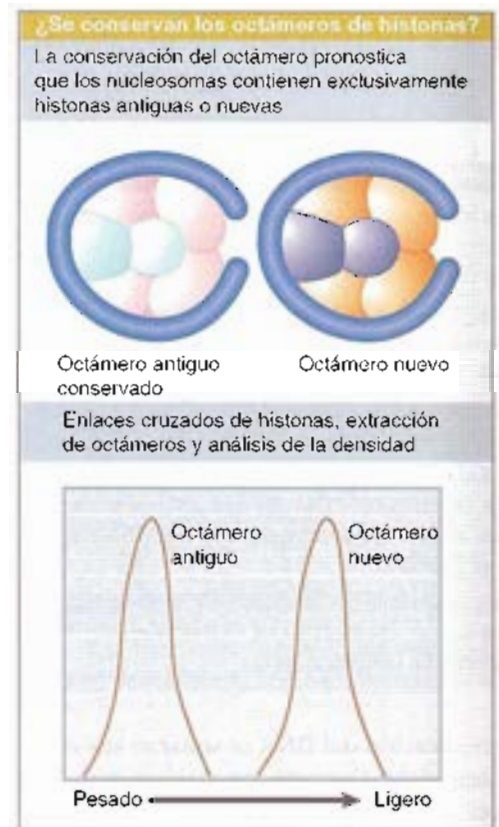


FIGURA 29.28 Si se conservan los octámeros de histonas, los octámeros antiguos y nuevos tendrían bandas de diferentes densidades al ocurrir la replicación de los octámeros pesados en los aminoácidos ligeros.

tonas H1, lo cual sugiere que sin H1 se puede lograr el espaciado apropiado.

Cuando se replica la cromatina, se replica una cadena de DNA *ya vinculada con nucleosomas*, lo cual da origen a dos cadenas hijas dobles. ¿Qué pasa con los nucleosomas preexistentes en ese punto? ¿Los octámeros se disocian de histonas en histonas libres para ser utilizadas de nuevo, o se mantienen ensamblados? La integridad del octámero se puede estudiar por los enlaces cruzados de las histonas. En las siguientes dos figuras se comparan los posibles resultados de un experimento en que se cultivan células en presencia de aminoácidos pesados para identificar las histonas antes de la replicación; después se permite que ocurra la replicación en presencia de aminoácidos ligeros. En ese punto, los octámeros de histona presentan enlaces cruzados y se centrifugan en un gradiente de densidad. La **FIGURA 29.28** muestra que si se han conservado los octámeros originales, se encontrarán en una posición de alta densidad, de modo que los nuevos ocuparán la posición de baja densidad. Pero esto no llega a ocurrir. En la posición de alta densidad se encuentra poco material, lo cual sugiere que los octámeros de



FIGURA 29.29 Cuando los octámeros pesados se replican con aminoácidos ligeros, los nuevos octámeros presentan bandas difusas entre densidades pesadas y ligeras, lo cual sugiere que ha habido desensamblado y reensamblado.

histonas no se conservan. Los octámeros tienen una densidad intermedia, y en la **FIGURA 29.29** se muestra lo que sería el resultado esperado si se hubieran liberado las histonas antiguas y después reensamblado con histonas recién sintetizadas.

El patrón de desensamblado y reensamblado ha sido difícil de caracterizar en detalle, pero en la **FIGURA 29.30** se muestra un modelo funcional. El triplete de replicación desplaza a los octámeros de histonas, que después se disocian en tetrámeros $H3_2-H4_2$ y dímeros $H2A-H2B$. Esos tetrámeros y dímeros "antiguos" entran a un fondo de reserva que también incluye "nuevos" tetrámeros y dímeros que se ensamblan a partir de histonas de recién-

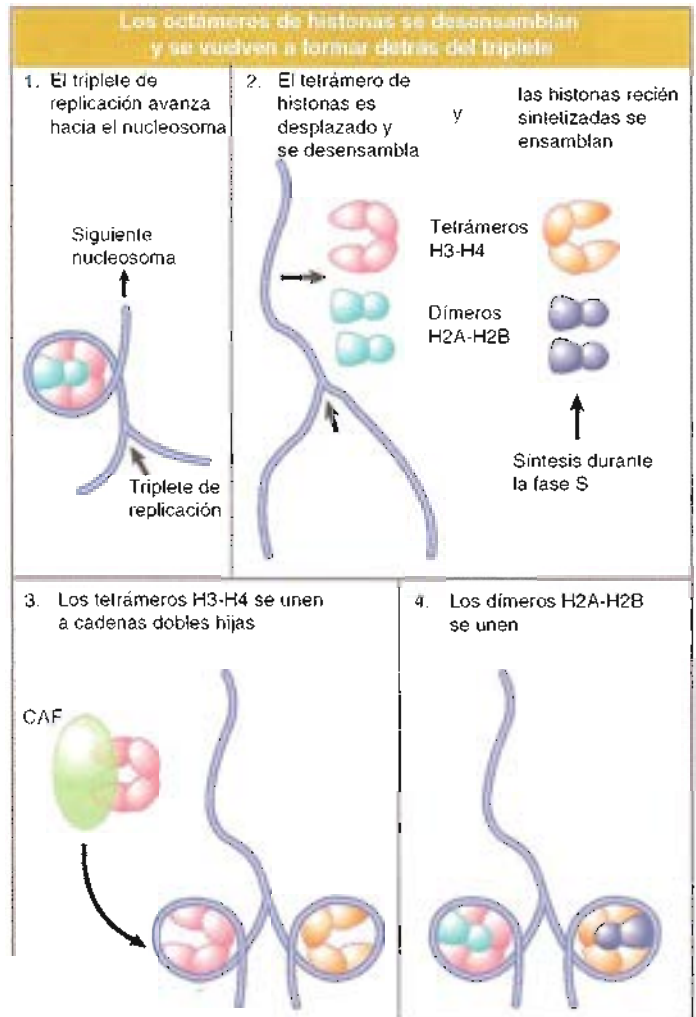


FIGURA 29.30 El paso del triplete de replicación desplaza los octámeros de histonas del DNA, que se desensamblan en tetrámeros $H3-H4$ y dímeros $H2A-H2B$. Las histonas recién sintetizadas se ensamblan en tetrámeros $H3-H4$ y dímeros $H2A-H2B$. Los tetrámeros y dímeros antiguos y nuevos se ensamblan de manera aleatoria con ayuda de CAF-1 en nuevos nucleosomas, inmediatamente detrás del triplete de replicación.

te síntesis. Los nucleosomas se ensamblan a ~600 bp detrás del triplete de replicación, proceso que se inicia cuando los tetrámeros $H3_2-H4_2$ se unen a cada una de las cadenas dobles hijas, ayudados por CAF-1. Dos dímeros $H2A-H2B$ se unen entonces a cada tetrámero $H3_2-H4_2$ para completar el octámero de histonas. El ensamblaje de tetrámeros y dímeros es aleatorio respecto de subunidades "antiguas" y "nuevas", lo cual explica los resultados de la **Figura 29.29**. El tetrámero $H3_2-H4_2$ "antiguo" podría ser un vínculo transitorio con una cadena simple de DNA durante la replicación; de hecho, tal vez tendría más probabilidades de mantenerse dentro de la cadena líder para su reutilización. Es posible que los nucleosomas se escindan y vuelvan a ensamblar de forma similar durante la transcripción (véase la

sección 29.11, ¿Los genes transcritos se organizan en nucleosomas?).

Durante la fase S (periodo de replicación del DNA) en un ciclo celular eucariótico, la replicación de la cromatina implica la síntesis de suficientes proteínas histonas como para empaquetar todo el genoma, básicamente debe sintetizarse la misma cantidad de histonas que las ya contenidas en los nucleosomas. La síntesis de RNAm de histonas es controlada como parte del ciclo celular y aumenta enormemente en la fase S. La vía para el ensamblaje de la cromatina a partir de esa mezcla equivalente de histonas antiguas y nuevas durante la fase S se le denomina vía de replicación acoplada (RC).

En otra vía, llamada vía independiente de las replicaciones (RI), se ensamblan nucleosomas durante otras fases del ciclo celular, cuando no se está sintetizando DNA. Esto resultaría necesario como resultado de daños en el DNA o porque los nucleosomas se desplazan durante la transcripción. El proceso de ensamblaje debe tener necesariamente algunas diferencias respecto de la vía acoplada a la replicación porque no puede vincularse con el aparato respectivo. Una de las características más interesantes de la vía independiente de la replicación es que utiliza variantes de algunas de las histonas diferentes de las utilizadas durante la replicación.

La variante de histona H3.3 difiere de la histona H3 altamente conservada en cuatro aminoácidos; la primera sustituye lentamente a la H3 en células en proceso de diferenciación que no tienen ciclos de replicación. Esto sucede como resultado del ensamblaje de nuevos octámeros de histonas para sustituir a los que han sido desplazados con el DNA por cualquier motivo. El mecanismo que se utiliza para asegurar el uso de H3.3 en la vía independiente de la replicación es diferente en dos casos investigados.

En los protozoarios del género *Tetrahymena* el uso de histonas depende exclusivamente de su disponibilidad. La histona H3 se sintetiza sólo durante el ciclo celular, en tanto que la variante de reposición se sintetiza sólo en células sin replicación. En el género *Drosophila*, sin embargo, hay una vía activa que asegura la utilización de H3.3 por la vía independiente de la replicación. Nuevos nucleosomas que contienen H3.3 se ensamblan en los sitios de transcripción, supuestamente sustituyendo a nucleosomas desplazados por la polimerasa de RNA. El proceso de ensamblaje discrimina entre H3 y H3.3 con base en sus secuencias, excluyendo específicamente la utilización de H3. Por el contrario, el ensamblaje acoplado a la replicación hace uso de ambos tipos de H (aunque H3.3 está disponible en concentraciones mucho menores que H3, y, por tanto, entra sólo a un pequeño porcentaje de los nucleosomas).

Probablemente el CAF1 no participa en el ensamblaje independiente de la replicación. (También hay organismos como las levaduras y los del género *Arabidopsis*, para los cuales el gen no es indispensable, lo cual implica el uso de procesos alternativos en el ensamblaje acoplado a la replicación.) Una proteína que puede participar en el ensamblaje independiente de la replicación se denomina HIRA, cuyo agotamiento en sistemas *in vitro* para el ensamblaje de nucleosomas inhibe la formación de nucleosomas en el DNA no replicado, pero no en el que está en proceso de replicación, lo cual indica que, de hecho, las vías utilizan diferentes mecanismos de ensamblaje. La HIRA actúa como chaperón para facilitar la incorporación de histonas en los nucleosomas, vía que supuestamente se encarga, en general, del ensamblaje independiente de la replicación; por ejemplo, es necesaria para la descondensación del núcleo del espermatozoide, cuando las protaminas son sustituidas por las histonas para generar cromatina competente en la replicación después de la fecundación.

El ensamblaje de los nucleosomas que contienen una alternativa de H3 también ocurre en los centrómeros (véase la sección 31.3, La heterocromatina depende de las interacciones con histonas). El DNA centromérico se replica tempranamente durante la fase de replicación del ciclo celular (la diferencia de las secuencias heterocromáticas circundantes, que se replican después; véase la sección 15.7, Cada cromosoma eucariótico contiene muchos replicones). Se inhibe la incorporación de H en los centrómeros y en su lugar, en las células eucariotas superiores, se incorpora una proteína llamada CENP-A (en el género *Drosophila* se llama Cid y en las levaduras Cse4). Esto ocurre en la vía de ensamblaje independiente de la replicación, al parecer porque la vía acoplada a la replicación se inhibe durante un lapso breve, mientras se replica el DNA centromérico.

29.10 ¿Los nucleosomas yacen en posiciones específicas?

Conceptos principales

- Los nucleosomas pueden formarse en posiciones específicas como resultado de la estructura local del DNA o de las proteínas que interactúan con secuencias específicas.
- La causa más frecuente de la posición del nucleosoma es el límite impuesto por las proteínas que se unen al DNA.
- El posicionamiento influye en qué regiones del DNA quedan en el entace y qué cara del DNA se expone a la superficie del nucleosoma.

Se sabe que los nucleosomas pueden reconstituirse *in vitro*, independientemente de la secuencia del DNA, pero esto no significa que su formación *in vivo* sea así. ¿Yace siempre una secuencia de DNA en particular en cierta posición *in vivo* respecto de la topografía del nucleosoma, o están los nucleosomas dispuestos en forma aleatoria en el DNA, de manera que una secuencia específica pueda presentarse en cualquier localización. por ejemplo, en la región medular en una copia del genoma y en la región de enlace en otra?

Para responder a esta interrogante es necesario usar una frecuencia definida de DNA, más precisamente, se tiene que determinar la posición de un punto definido del DNA respecto del nucleosoma. En la FIGURA 29.31 se ilustra el principio de un procedimiento para lograrlo.

Supóngase que la secuencia de DNA se organiza en nucleosomas sólo con cierta configuración, de manera que cada sitio del DNA siempre se localice en una posición particular del nucleosoma. Ese tipo de organización se llama **posicionamiento del nucleosoma** (o, a veces, *lases del nucleosoma*). En una serie de nucleosomas en posición, las regiones del DNA de enlace constituyen sitios únicos.

Considérese la secuencia nada más para un nucleosoma. La escisión con nucleasa de micrococcos genera un fragmento monomérico que constituye una *secuencia específica*. Si el DNA se aísla y escinde con una enzima de restricción que tiene sólo un sitio diana en ese fragmento, podría cortarse en un punto único, lo cual resultaría en dos fragmentos, cada uno de tamaño único.

Los productos de la doble digestión, por enzimas de restricción y microcócica, se separan por electroforesis en gel. Para identificar el fragmento correspondiente en el producto de la doble digestión, se usa una sonda que representa la secuencia de un lado del sitio de restricción, técnica llamada **de marcado terminal indirecto**.

Revirtiendo el argumento, la identificación de una sola banda demuestra que la posición del sitio de restricción tiene definición exclusiva respecto del extremo del DNA del nucleosoma (según se define por el corte de la nucleasa microcócica). Así, el nucleosoma tiene una secuencia de DNA única.

¿Qué pasa si los nucleosomas *no yacen en una sola posición*? Ahora, los DNA de enlace constan de *diferentes* secuencias en cada copia del genoma, de modo que el sitio de restricción yace en una posición diferente cada vez; de hecho, se encuentra en todas las localizaciones posibles respecto de los extremos del DNA nucleosómico monomérico. La FIGURA 29.32 muestra que la doble escisión genera entonces una amplia extensión, del fragmento más

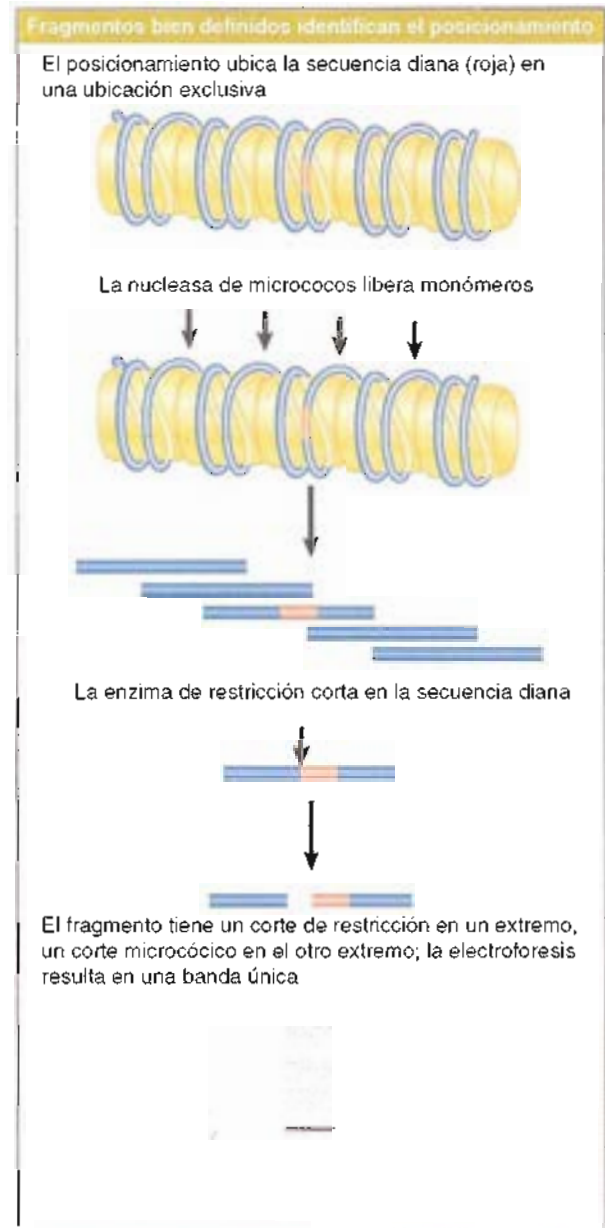


FIGURA 29.31 El posicionamiento del nucleosoma coloca sitios de restricción en ubicaciones únicas respecto de los sitios de enlace escindidos por la nucleasa de micrococcos.

pequeño detectable (casi 20 bases) a la longitud del DNA monomérico.

Al describir esos experimentos se ha tratado a la nucleasa de micrococcos como una enzima que escinde el DNA en las regiones de enlace expuestas sin ningún tipo de especificidad de secuencia. En realidad, la enzima tiene la misma especificidad de secuencia, no obstante que se desvía hacia la selección de secuencias ricas en A-T. Por tanto, no es posible suponer que la existencia de una banda específica en la técnica de marcado indirecto del extremo represente la distancia a partir de un corte

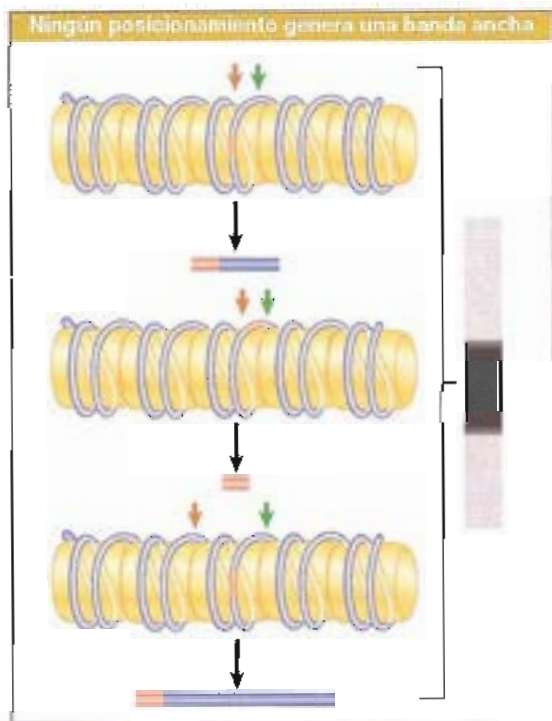


FIGURA 29.32 En ausencia del posicionamiento de un nucleosoma, en todas las localizaciones posibles de diferentes copias del genoma yace un sitio de restricción. Se producen fragmentos de todos los tamaños posibles cuando una enzima de restricción corta en un sitio diana (rojo) y la nucleasa de micrococcos corta en las uniones entre nucleosomas (verde).

por la enzima de restricción a la región de enlace. ¡Más bien podría representar la distancia del corte por la enzima de restricción a un sitio de escisión preferido por la nucleasa de micrococcos!

Esta posibilidad se controla mediante el tratamiento del DNA desnudo exactamente en la misma forma que la cromatina. Si hay sitios preferidos por la nucleasa de micrococcos en la región específica, habrá bandas específicas, patrón que entonces se compararía con el generado a partir de la cromatina.

Una *diferencia* entre el patrón de bandas del DNA de control y el de la cromatina proporciona pruebas del posicionamiento de los nucleosomas. Algunas bandas presentes en el producto de digestión del DNA de control pueden desaparecer del correspondiente del nucleosoma, lo cual indica que no se dispone de posiciones para escisión preferencial. Por otra parte, pueden aparecer nuevas bandas en el producto de digestión de los nucleosomas, cuando por la organización de éstos, se hacen accesibles de manera preferencial nuevos sitios.

El posicionamiento de los nucleosomas podría lograrse por cualquiera de dos formas:

- **Intrínseca:** cada nucleosoma se deposita específicamente en una secuencia particular del DNA. Esto modifica el punto de vista

del nucleosoma como unidad susceptible de formarse entre cualquier secuencia del DNA y un octámero de histona.

- **Extrínseca:** el primer nucleosoma de una región se ensambla preferentemente en un sitio particular. Un punto de inicio preferencial para el posicionamiento del nucleosoma es resultado de la presencia de una región de la que se excluyen los nucleosomas. La región excluida proporciona un límite que restringe las posiciones disponibles para el nucleosoma adyacente, de modo que entonces se ensamblaría secuencialmente una serie de nucleosomas con una longitud de repetición definida.

Ahora queda claro que el depósito de octámeros de histonas en el DNA no es aleatorio respecto de la secuencia. El patrón es intrínseco en algunos casos, en los cuales depende de características estructurales del DNA, y es extrínseco en casos en que procede de las interacciones de otras proteínas con el DNA, las histonas, o ambos.

Ciertas características estructurales del DNA afectan la ubicación de los octámeros de histonas. dadas las tendencias intrínsecas de aquél para girarse en una dirección más que en otra; así, las regiones ricas en A-T se localizan de manera que el surco menor vea hacia el octámero, en tanto que las regiones ricas en G-C se disponen de manera que el surco menor señale hacia fuera. Los segmentos largos de dA-dT (>8 bp) evitan el posicionamiento en el giro superhelicoidal central del meollo. Aún no es posible sumar todos los efectos estructurales importantes y así pronosticar completamente la localización de la secuencia específica del DNA respecto del nucleosoma. Las secuencias que hacen que el DNA adopte estructuras más extremas pueden tener efectos, como la exclusión de nucleosomas, de tal forma que podrían incidir en los límites.

Es frecuente que los nucleosomas se posicionen cerca de los límites. Si hay alguna variante en la construcción de los nucleosomas, por ejemplo, si la longitud del DNA de enlace varía unos 10 bp, la especificidad de la localización se reduciría, alejándose del primer nucleosoma definido en el límite. En ese caso podría esperarse que el posicionamiento se mantuviera rigurosamente sólo con una relativa cercanía al límite.

La localización del DNA en los nucleosomas puede describirse de dos formas. En la **FIGURA 29.30** se muestra que el **posicionamiento traducido** describe la posición del DNA respecto de los límites del nucleosoma. En particular, determina qué secuencias se encuentran en las regiones de enlace. Un cambio de 10 bp en el DNA lleva el siguiente a una región de enlace. Así, en el posicionamiento

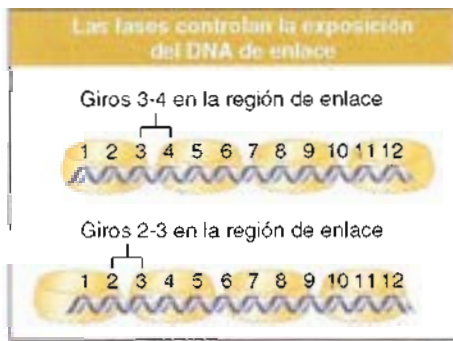


FIGURA 29.33 El posicionamiento traduccional describe la posición lineal del DNA respecto del octámero de histonas. El desplazamiento del DNA por cambios de 10 bp cambia las secuencias de las regiones de enlace más expuestas, pero no altera la cara del DNA protegida por la superficie de las histonas ni la que está expuesta al exterior. El DNA ya está enrollado sobre los nucleosomas; para mayor comodidad se muestra en forma lineal.

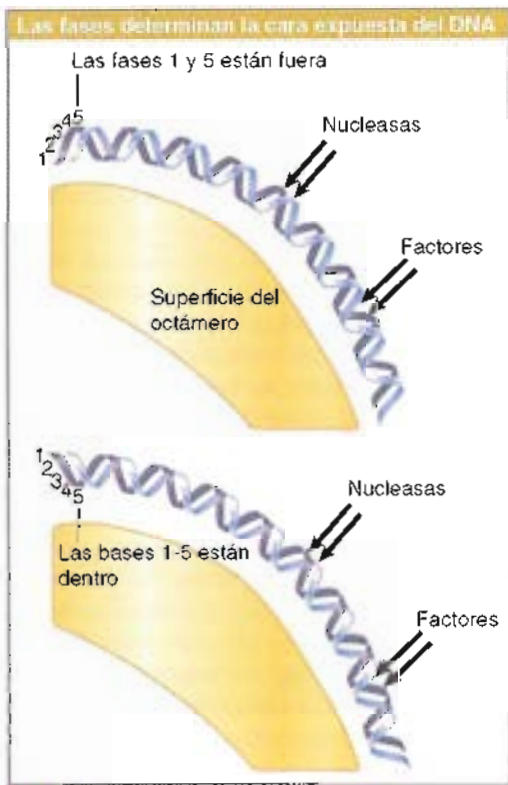


FIGURA 29.34 El posicionamiento rotativo describe la exposición del DNA en la superficie del nucleosoma. Cualquier movimiento que se aleje de la repetición helicoidal (~10.2 bp/giro) desplaza al DNA respecto de la superficie de la histona. Los nucleótidos del interior están más protegidos contra las nucleasas que los del exterior.

traduccional se determina qué regiones son más accesibles (cuando menos, a juzgar por la sensibilidad a la nucleasa de micrococos).

El DNA yace en el exterior del octámero de histonas, de modo que uno de los lados de cualquier

secuencia específica es ocultado por las histonas, en tanto que el otro es accesible. Dependiendo de su posicionamiento respecto del nucleosoma, un sitio en el DNA que debe reconocer a una proteína reguladora podría ser inaccesible, o estar disponible; por tanto, la posición exacta del octámero de histonas en relación con la secuencia del DNA puede ser importante. En la **FIGURA 29.34** se muestra el efecto del **posicionamiento rotativo** de la doble hélice en cuanto a la superficie del octámero. Si se mueve el DNA un número parcial de giros (imagínese el DNA rotando respecto de la superficie de la proteína), habrá un cambio en la exposición de secuencias al exterior.

El posicionamiento traduccional y rotativo puede ser importante para controlar el acceso al DNA. Los casos de posicionamiento mejor caracterizados involucran la limitación específica de los nucleosomas en los promotores. El posicionamiento traduccional, la exclusión de los nucleosomas de una secuencia en particular, o ambos procesos, pueden ser necesarios para permitir que se forme un complejo de transcripción. Algunos factores reguladores pueden unirse con el DNA sólo si se excluye un nucleosoma para dejar acceso libre al DNA, y ello crea un límite para el posicionamiento traduccional. En otros casos, los factores reguladores pueden volver a unirse con el DNA en la superficie del nucleosoma, pero el posicionamiento rotativo es importante para garantizar que se exponga la cara del DNA con los puntos de contacto apropiados.

En la sección 30.4, La organización de los nucleosomas puede cambiarse en el promotor, se analiza la conexión entre organización de nucleosomas y transcripción, pero por ahora nótese que los promotores (y algunas otras estructuras), a menudo tienen regiones cortas que excluyen a los nucleosomas. Dichas regiones por lo general forman un límite, cerca del cual se restringen las posiciones de los nucleosomas. Mediante un rastreo de una región extensa del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (con mapeo de 2 278 nucleosomas en más de 482 kb de DNA) se demostró que, de hecho, el 60% de los nucleosomas tiene una posición específica como resultado de efectos limítrofes, casi siempre por los promotores.

29.11 ¿Los genes transcritos se organizan en nucleosomas?

Conceptos principales

- Los nucleosomas se encuentran a la misma frecuencia cuando los genes transcritos o no transcritos son digeridos con nucleasa de micrococos.
- Algunos genes intensamente transcritos parecen casos excepcionales desprovistos de nucleosomas.



FIGURA 29.35 Las unidades de transcripción del DNA de genes nucleolares aislados alternan con segmentos de DNA no transcritos. Reproducida de Miller O. L. y Beatty, B. R. 1969. *Science*, 164: 955-957. Imagen cortesía de Oscar Miller.



FIGURA 29.36 Un minicromosoma de SV40 puede ser transcrito. Reproducida de J. Mol. Bio. Vol. 131, Gariglio, P. et al., *The temple of the isolated...* p. 131. Copyright 1979, con autorización de Elsevier. Imagen cortesía de Pierre Chambon.

Los intentos por observar a los genes durante la transcripción han dado resultados controvertidos. Las siguientes dos figuras ejemplifican cada extremo.

La cromatina con transcripción intensa se ve bastante extendida (demasiado como para ser cubierta por nucleosomas). En los genes con transcripción intensa que codifican RNAr, ilustrados en la **FIGURA 29.35**, el empaquetamiento extremo de las polimerasas de RNA dificulta la observación del DNA, y no es posible medir directamente las longitudes de los productos de transcripción del RNAr, dado que el RNA es compactado por proteínas, pero se sabe (por la secuencia del RNAr) qué tan largo debe ser el producto de transcripción. La longitud

del segmento de DNA transcrito que se mide por la longitud del eje del "árbol de navidad" es de ~85% de la longitud del RNAr, lo cual significa que el DNA está casi totalmente extendido.

Por otra parte, los complejos de transcripción de los minicromosomas de SV40 se pueden extraer de células infectadas: contienen el complemento usual de histonas y presentan una estructura tipo cuentas ensartadas. Se puede observar que las cadenas de RNA se extienden a partir del minicromosoma, como en el ejemplo de la **FIGURA 29.36**, lo cual apunta a la transcripción puede continuar mientras el DNA de SV40 se organiza en nucleosomas. Obviamente, el minicromosoma SV40 se transcribe con menor intensidad que los genes de RNAr.

La transcripción implica el desenrollamiento del DNA, y puede implicar el despliegue de la fibra en regiones restringidas de la cromatina. Un punto de vista simplista sugiere que se necesitará cierto "espacio" para el proceso. Las características de los cromosomas politénicos y en escobillón descritas en el Capítulo 28, Cromosomas, dan indicios de que la expresión génica se relaciona con una organización estructural más expansiva.

Al reflexionar acerca de la transcripción, se deben tener en mente el tamaño relativo de la polimerasa de RNA y del nucleosoma. Las enzimas eucarióticas son proteínas grandes con múltiples subunidades, por lo general >500 kD que se compararán con los ~40 kD del nucleosoma. En la **FIGURA 29.37** se ilustra el enfoque de la polimerasa de DNA respecto del DNA de los nucleosomas. Incluso sin un conocimiento profundo de la interacción, es evidente que implica abordar dos organismos comparables.

Considérense los dos giros del DNA en torno al nucleosoma. ¿Tendría suficiente acceso la polimerasa del RNA al DNA si el ácido nucleico se confinara a esa vía? Durante la transcripción, conforme la polimerasa de RNA se mueve sobre el molde, se une estrechamente con una región de ~50 bp que incluye un segmento local, no enrollado, de ~12 bp. La necesidad de desenrollar el DNA hace parecer poco probable que el segmento involucrado en la reacción de la polimerasa de RNA podría mantenerse en la superficie del octámero de histonas.

Por tanto, parece inevitable que la transcripción implique un cambio estructural, de modo que la primera pregunta acerca de la estructura de un gen activo será si el DNA en proceso de transcripción se mantiene organizado en nucleosomas. Si se desplazan los octámeros de histonas ¿se mantienen de alguna manera aunados al DNA transcrito?

Un abordaje experimental es el de digerir la cromatina con nucleasa de micrococos y, después, utilizar una sonda de alguno o algunos genes específicos

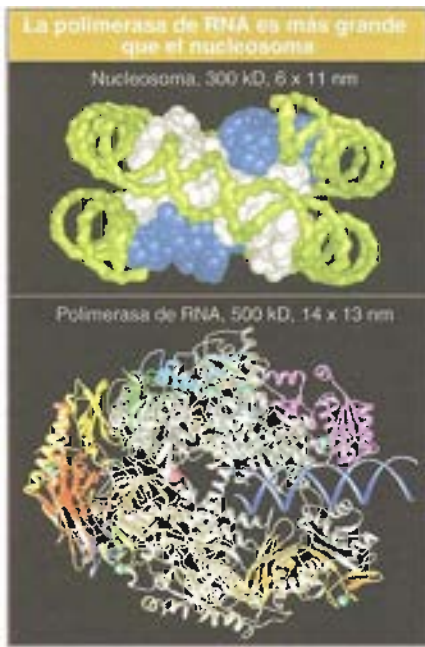


FIGURA 29.37 La polimerasa de RNA es comparable en tamaño al nucleosoma, y podría tener dificultades para seguir al DNA en torno al octámero de histonas. Imagen superior, cortesía de E. N. Moudrianakis, Johns Hopkins University. Imagen inferior, cortesía de Roger Kornberg, Stanford University School of Medicine.

para determinar si los fragmentos correspondientes están presentes en la escalera usual de 200 bp a la concentración esperada. Las conclusiones de esos experimentos son limitadas pero importantes. *Los genes que están en proceso de transcripción contienen nucleosomas con la misma frecuencia que las secuencias no transcritas.* Por tanto, los genes no necesariamente adoptan una forma alternativa de organización para ser transcritos. *No obstante, tal vez el gen transcrito promedio tenga sólo una polimerasa de RNA en un momento dado, por lo cual no revela qué está pasando en los sitios realmente afectados por la enzima.* Quizá conservan sus nucleosomas; es más probable que los nucleosomas se desplacen de manera temporal, conforme la polimerasa de RNA pasa a través de ellos, pero se forman de nuevo inmediatamente después.

29.12 Los octámeros de histonas son desplazados por la transcripción

Conceptos principales

- En un sistema modelo, la polimerasa de RNA desplaza a los octámeros de histonas durante la transcripción, pero éstos se unen nuevamente con el DNA tan pronto como ha pasado la polimerasa.
- Los nucleosomas se reorganizan cuando la transcripción pasa a través de un gen.

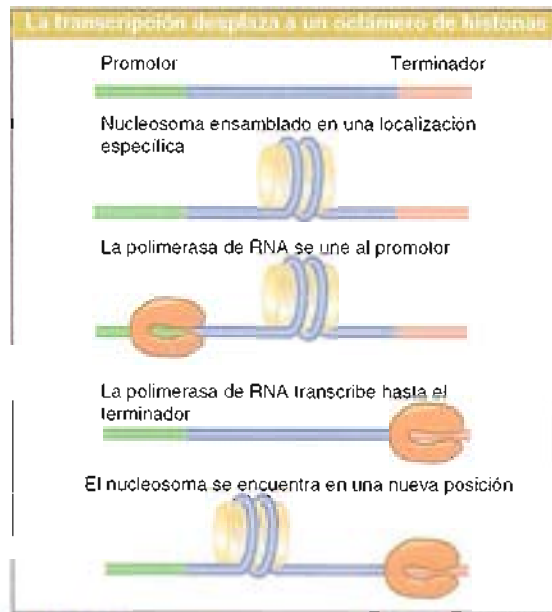


FIGURA 29.38 Un protocolo para estudiar el efecto de la transcripción en los nucleosomas muestra que el octámero de histonas es desplazado del DNA y se vuelve a unir en una nueva posición.

Los experimentos para comprobar si una polimerasa de RNA puede transcribir directamente a través de un nucleosoma sugieren que el octámero de histonas es desplazado por el hecho de la transcripción. En la **FIGURA 29.38** se muestra lo que sucede cuando la polimerasa de RNA del fago T7 transcribe un fragmento corto de DNA que contiene un solo núcleo octamérico *in vitro*, el cual se mantiene vinculado con el DNA pero en una localización diferente; es muy probable que se vuelva a unir con la misma molécula de DNA de la que fue desplazado.

En la **FIGURA 29.39** se muestra un modelo para el avance de la polimerasa. El DNA se desplaza conforme la polimerasa entra al nucleosoma, pero la enzima llega a un punto en que el DNA hace retroceder sus asas y se vuelve a unir, formando una región cerrada. Conforme la polimerasa avanza más, crea superhélices positivas desenrollando el DNA; el efecto puede ser muy notorio, pues el asa cerrada es de sólo ~80 bp, de manera que cada par de bases a través del cual avanza la polimerasa hace una adición significativa al superenrollamiento. De hecho, la polimerasa avanza fácilmente los primeros 30 bp hacia el nucleosoma, pero después lo hace en forma más lenta, como si su avance fuera cada vez más difícil. Cada 10 bp hay pausas, lo cual sugiere que la estructura del asa impone pausas relacionadas con la rotación en cada giro del DNA. Cuando la polimerasa llega el punto medio del nucleosoma (las bases por añadir a continuación se encuentran sobre todo en el eje de la simetría doble), se reanuda

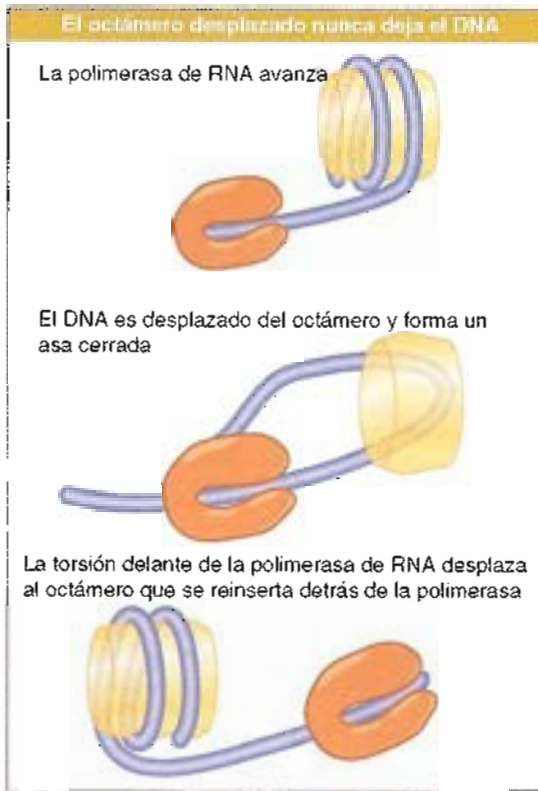


FIGURA 29.39 La polimerasa de RNA desplaza al DNA del octámero de histonas conforme avanza. El DNA se enrolla nuevamente y se une (a la polimerasa o al octámero), para formar un asa cerrada. Conforme la polimerasa avanza, genera un sobreenrollado positivo adelante, desplazando al octámero que mantiene contacto con el DNA, la polimerasa o ambos, y se inserta detrás de la polimerasa de RNA.

el movimiento y la polimerasa avanza rápidamente, lo cual sugiere que el punto medio del nucleosoma marca el sitio en que el octámero es desplazado (tal vez porque el sobreenrollado positivo ha llegado a un nivel crítico en el cual se expulsa al octámero del DNA). De esta forma se libera la tensión delante de la polimerasa y se permite que avance. El octámero se une después al DNA, detrás de la polimerasa, y ya no constituye un obstáculo para su avance. Es posible que el octámero cambie de posición, incluso sin haber perdido contacto con el DNA.

¿El octámero se libera como unidad íntegra? El entrecruzamiento de las proteínas del octámero no crea un obstáculo para la transcripción, la cual puede continuar incluso si los enlaces cruzados son lo suficientemente extensos como para asegurar que se hayan enlazado las regiones centrales de las histonas medulares, de ahí que la transcripción no implique disociación del octámero en las histonas que lo componen, y no es probable que necesite un mayor despliegue de la estructura central. La adición de la histona H1 a ese sistema, sin embargo, causa una rápida declinación en la transcripción, lo cual

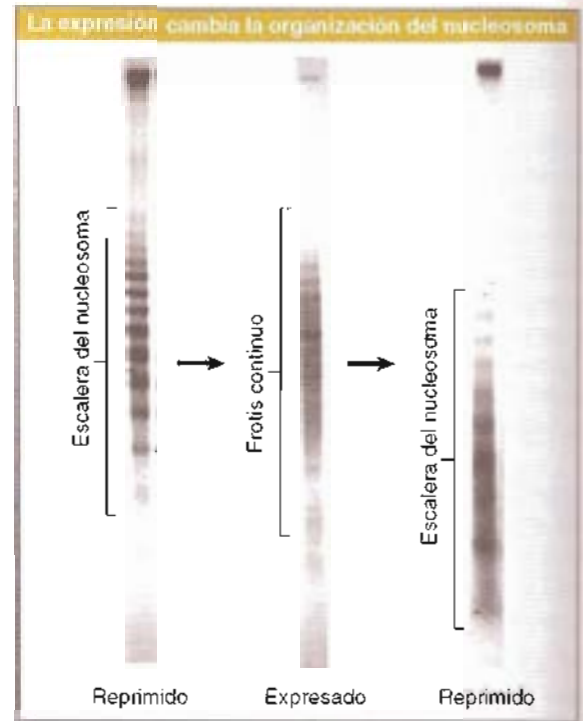


FIGURA 29.40 Las secuencias génicas *URA3* se fusionan con un promotor *GALI* regulado y una secuencia de DNA ribosómico. El *URA3* tiene nucleosomas posicionados en forma transicional antes de la transcripción. Cuando se induce la transcripción controlada por un promotor inducible, las posiciones de los nucleosomas son aleatorias. Cuando se reprime la transcripción, los nucleosomas recuperan su posición específica. Reproducido de Suter, B., et al. 1997, *EMBO J.* 16: 2150-2160. Copyright © Oxford University Press. Imagen cortesía de Fritz Thoma, ETH Zurich.

sugiere dos conclusiones. El octámero de histonas (ya sea que se conserve o se desplace) actúa como unidad íntegra, y puede ser necesario eliminar la H1 de la cromatina activa o modificar de alguna forma sus interacciones.

Por tanto, una polimerasa de RNA pequeña puede desplazar a un solo nucleosoma, que vuelve a formarse detrás de ella durante la transcripción. Por supuesto, la situación es más compleja en un núcleo eucariótico. La polimerasa de RNA es mucho mayor y el obstáculo al avance es una cadena de nucleosomas conectados, y para superarlo se necesita que factores adicionales actúen en la cromatina (ver Capítulo 30, Control de la estructura de la cromatina).

La organización de los nucleosomas puede ser modificada por la transcripción. En la **FIGURA 29.40** se observa lo que le sucede al gen *URA3* de las levaduras cuando se transcribe estando controlado por un promotor inducible. El posicionamiento se analiza con la nucleasa de micrococos para revisar los sitios de escisión respecto de un sitio de restricción en el extremo 5' del gen. Inicialmente, el gen muestra un patrón de nucleosomas organizadas desde el promo-

tor a una distancia significativa a través del gen; el posicionamiento se pierde en las regiones 3'. Cuando el gen se expresa, un extendido general sustituye al patrón de posicionamiento de los nucleosomas, lo cual indica la concentración de nucleosomas en la misma, pero ya no están organizados en fase, lo cual, a su vez, sugiere que la transcripción destruye el posicionamiento nucleosómico. Cuando se restablece la represión, el posicionamiento aparece en un lapso de 10 minutos (aunque no completo). El resultado lleva al interesante punto de que se pueden ajustar las posiciones de los nucleosomas sin replicación.

En el modelo de unificación se supone que la polimerasa de RNA desplaza a los octámeros de histonas conforme avanza. Si el DNA que viene detrás de la polimerasa está disponible, el octámero se vuelve a unir ahí. (Es posible, o tal vez probable, que el octámero nunca pierda totalmente el contacto con el DNA, pero sigue siendo un enigma cómo un octámero podría mantener el contacto con el DNA sin desplegarse o perder componentes, cuando un objeto incluso de mayor tamaño que él avanza a través del DNA. Tal vez el octámero sea "enviado atrás" haciendo contacto con la polimerasa de RNA.) Si el DNA no está disponible tal vez porque otra polimerasa continúa inmediatamente después de la primera, el octámero podría desplazarse permanentemente y el DNA mantenerse extendido.

29.13 El desplazamiento del nucleosoma y su reensamblado requieren factores especiales

Concepto principal

- Se necesitan factores auxiliares para que la polimerasa de RNA desplace a los octámeros durante la transcripción y para que después, las histonas se reensamblen en nucleosomas.

El desplazamiento de los nucleosomas respecto del DNA es clave para todas las etapas de la transcripción. El inicio del proceso es lo que se ha caracterizado mejor. Los promotores activos están marcados por sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa porque los octámeros de histonas se han desplazado del DNA (véase la sección 29.18. Los sitios hipersensibles de la desoxirribonucleasa reflejan cambios en la estructura de la cromatina). La eliminación de los octámeros requiere de complejos de remodelado reclutados por factores de transcripción que utilicen la energía generada por la hidrólisis de ATP para modificar la estructura de la cromatina (véase la sección 30.4. La organización de los nucleosomas

puede cambiar en el promotor). Esto significa que la polimerasa de RNA inicia la síntesis de ésta en una cadena corta de DNA no obstaculizada por los nucleosomas. Para que siga avanzando durante la elongación, deben desplazarse los octámeros de histonas delante de ella, pero para evitar que el DNA quede desnudo tras los octámeros, deben formarse nuevamente después de la transcripción.

La transcripción *in vitro* por la polimerasa II de RNA se necesita la llamada proteína facilitadora de la transcripción de la cromatina (FACT), que se comporta como factor de elongación durante la transcripción. (No es parte de la polimerasa de RNA, pero se vincula con ella específicamente durante la fase de elongación de la transcripción.) La FACT consta de dos subunidades bien conservadas en todas las eucariotas y se vincula con la cromatina de los genes activos.

Cuando se agrega FACT a nucleosomas aislados, conduce a la pérdida de los dímeros H2A-H2B, razón de que durante la transcripción *in vitro*, los nucleosomas se convierten en "hexasomas". Esto sugiere que la FACT es parte de un mecanismo para el desplazamiento de octámeros durante la transcripción, aparte de que podría participar en el reensamblado de los nucleosomas después de la transcripción, ya que ayuda a la formación de nucleosomas a partir de histonas medulares. Esto sugiere el modelo de la **FIGURA 29.41**, en la cual, la FACT saca de un nucleosoma el complejo H2A-H2B frente a la polimerasa de RNA y facilita su inserción en un nucleosoma que se está reensamblando detrás de la enzima. Seguramente se necesitan otros factores para llevar a cabo el proceso. Dicha proteína facilitadora también es necesaria para otras reacciones en que los nucleosomas pueden desplazarse, incluidas replicación y reparación del DNA.

Para mantener la integridad de la cromatina en regiones en proceso de transcripción, se requiere de otros factores, tal vez porque también participan en el desensamblado y reensamblado de los nucleosomas, pero no hay todavía información detallada acerca de sus funciones.

29.14 Los aislantes impiden la acción de los potenciadores y la heterocromatina

Conceptos principales

- Los aislantes pueden impedir el paso de cualquier efecto activador o desactivador desde los potenciadores, silenciadores y LCR.
- Los aislantes suelen constituir barreras para evitar la dispersión de la heterocromatina.

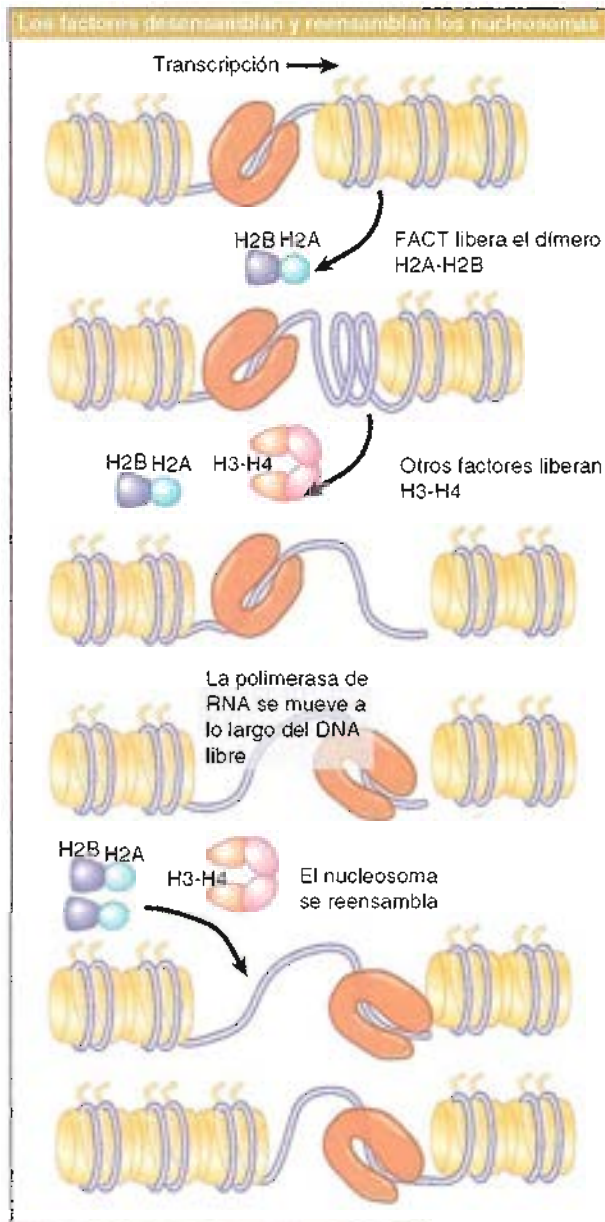


FIGURA 29.41 Los octámeros de histonas se desensamblan antes de la transcripción en proceso para eliminar nucleosomas y se forman nuevamente después de la transcripción. La liberación de dímeros H2A-H2B probablemente inicie el proceso de desensamblado.

Los elementos que evitan el paso de los efectos activadores o desactivadores se llaman **aislantes**, y tienen una de dos propiedades clave, o ambas:

- Cuando un aislante se coloca entre un promotor y un potenciador, *impide que el potenciador active al promotor*. El efecto del bloqueo se muestra en la **FIGURA 29.42**, lo cual podría explicar cómo la acción de un potenciador se limita a un promotor en particular.

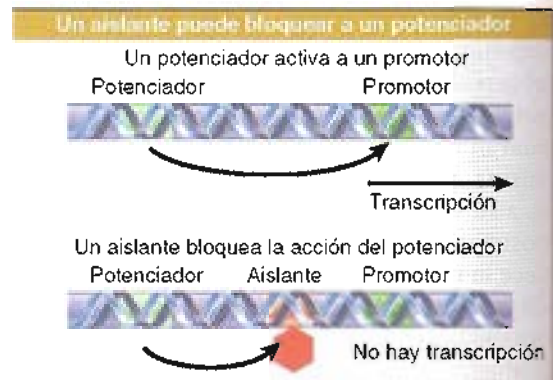


FIGURA 29.42 Un potenciador activa a un promotor en sus alrededores, pero un aislante localizado entre ambos puede impedirlo.

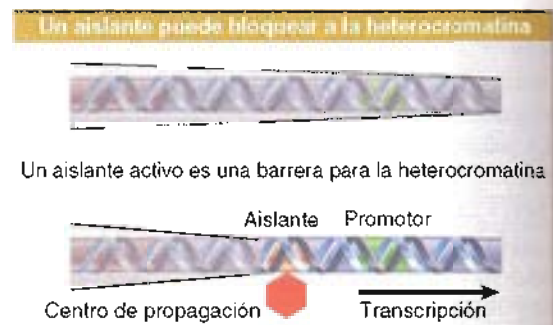


FIGURA 29.43 La heterocromatina puede dispersarse a partir de un centro y después bloquear a cualquier promotor que cubra. Un aislante puede ser una barrera para la propagación de la heterocromatina, que permite al promotor mantenerse activo.

- Cuando un aislante se coloca entre un gen activo y la heterocromatina *constituye una barrera que protege al gen contra el efecto de desactivación que se propaga desde la heterocromatina*. (La heterocromatina es una región de la cromatina inactiva, resultado de su estructura de orden superior; véase la sección 31.2. La heterocromatina se propaga a partir de un suceso de nucleación.) El efecto de barrera se muestra en la **FIGURA 29.43**.

Algunos aislantes poseen ambas propiedades y otros sólo una, o bien, funciones de bloqueo y barrera pueden estar separadas. Aunque ambas actividades posiblemente sean mediadas por cambios en la estructura de la cromatina, tal vez impliquen efectos diferentes; en cualquier caso, el aislante define el límite para los efectos a largo plazo.

¿Cuál es el objetivo de un aislante? Una función importante podría ser contrarrestar las acciones indiscriminadas de los potenciadores sobre los pro-

motores. Casi todos los potenciadores actúan cerca de algún promotor, y un aislante puede restringirlo impidiendo que los efectos rebasen cierto punto, de modo que sólo pueda actuar en un promotor específico. Asimismo, cuando un gen está cerca de la heterocromatina, un aislante puede impedir que sea desactivado inadvertidamente por la dispersión de la heterocromatina. Los aislantes, por tanto, actúan como elementos que hacen más precisa la regulación génica.

29.15 Los aislantes pueden definir un dominio

Concepto principal

- Los aislantes son estructuras especializadas de la cromatina con sitios hipersensibles. Dos aislantes pueden proteger de todo efecto externo la región que los separa.

Los aislantes se descubrieron durante el análisis de la región del genoma de *Drosophila melanogaster* que se resume en la FIGURA 29.44. Dos genes para la proteína Hsp70 (proteína de choque térmico) yacen en una región de 18 kb que constituye la banda 87A7, en cuyos extremos se encuentran las estructuras especiales *scs* y *scs'* (estructuras especializadas de cromatina). Ambas constan de una región muy resistente a la fragmentación por desoxirribonucleasa I y a uno y otro lado hay sitios hipersensibles espaciados casi cada 100 bp. El patrón de escisión de dichos sitios se altera cuando los genes son activados por un choque térmico.

Los elementos *scs* aíslan a los genes *hsp70* de los efectos de las regiones circundantes. Si se toman unidades *scs* y se colocan a cada lado de un gen blanco, éste funcionará en cualquier punto del genoma en que se coloque, incluso en sitios en que, por con-

texto, normalmente sería reprimido, por ejemplo, en regiones heterocromáticas.

Las unidades *scs* y *scs'* no parecen participar ni positiva ni negativamente en el control de la expresión génica, sino que apenas restringen los efectos del paso de una región a la siguiente.

No obstante, si regiones adyacentes ejercen efectos represivos, estos elementos *scs* podrían ser necesarios para bloquear la dispersión de tales efectos y, por tanto, tal vez serían esenciales para la expresión génica. En ese caso, la delección de tales elementos podría eliminar la expresión de los genes adyacentes.

Los elementos *scs* y *scs'* tienen diferentes estructuras y no parecen apoyarse en la misma base para su actividad aislante. La secuencia clave de estos elementos *scs* es una tira de 24 bp que se une al producto del gen *zw5*. La propiedad aislante de *scs'* reside en una serie de repeticiones CGATA, que se unen a un grupo de proteínas relacionadas llamado BEAF-32. La proteína muestra una localización

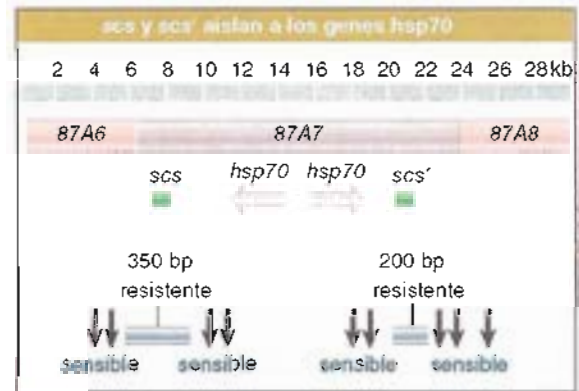


FIGURA 29.44 Estructuras especializadas de cromatina, que incluyen sitios de hipersensibilidad, marcan los extremos de un dominio del genoma de *D. melanogaster* y aíslan a los genes intermedios de los efectos de las secuencias circundantes.



FIGURA 29.45 Una proteína que se une al aislante *scs'* se localiza en interbandas de cromosomas politénicos del género *Drosophila*. La tinción roja identifica el DNA (las bandas) en ambas muestras, superior e inferior; la tinción verde identifica a BEAF32 (a menudo en interbandas) en la muestra superior. La coincidencia de las dos marcas se señala con amarillo (es decir, BEAF32 está en una banda). Reproducida de *Cell*, vol. 81, Zhao, K., Hart, C. M., y Laemmli, U. K., *Visualization of chromosomal...* pp. 879-889. Copyright 1995, con autorización de Elsevier. Imagen cortesía de Ulrich K. Laemmli, University of Geneva, Switzerland.

definida en el núcleo, pero los datos más notorios provienen de su localización en cromosomas politénicos. En la FIGURA 29.45 se muestra que el anticuerpo contra BEAF-32 tiñe ~50% de las interbandas de los cromosomas politénicos, lo cual sugiere que hay muchos aislantes en el genoma, y que BEAF-32 es una parte común del aparato aislante. Esto implicaría que la banda es una unidad funcional y que las interbandas a menudo tienen aislantes que impiden la propagación de puntos de activación o desactivación.

Otro ejemplo de un aislante que define a un dominio es la LCR de la β -globina de pollo (grupo de sitios hipersensibles que controlan la expresión de todos los genes de la β -globina; véase la sección 29.20). Una LCR puede controlar a un dominio. El sitio hipersensible más alejado hacia la izquierda de la LCR de la β -globina de pollo (HS4) es un aislante que marca el extremo 5' del dominio funcional y restringe la actividad de la LCR a los genes de globina del dominio.

Un gen rodeado de aislantes suele estar protegido contra la propagación de efectos de desactivación desde las regiones circundantes. La prueba consiste en insertar DNA por transfección en un genoma en localizaciones aleatorias. La expresión de un gen de la secuencia insertada a menudo es errática, y si bien en algunos casos se expresa apropiadamente, en otros se extingue. No obstante, cuando los aislantes con función de barrera se colocan a ambos lados del gen, en el DNA insertado, por lo general su expresión es uniforme en todos los casos.

29.16 Los aislantes pueden actuar en una dirección

Concepto principal

- Algunos aislantes tienen direccionalidad, de modo que pueden detener el paso de los efectos en una dirección, pero no en la otra.

Los aislantes pueden tener propiedades direccionales. Las inserciones del transposón *gypsy* en el locus *yellow* (*y*) de *D. melanogaster* provocan la pérdida de la función del gen en algunos tejidos, no así en otros. El motivo es que el locus *y* es regulado por cuatro potenciadores, como se muestra en la FIGURA 29.46. Donde quiera que se inserte *gypsy*, bloquea la expresión de todos los potenciadores que separa del promotor, pero no de aquéllos ubicados del otro lado. La secuencia encargada de ese efecto es un aislante que yace en un extremo del transposón, el cual actúa independientemente de la orientación de su inserción.

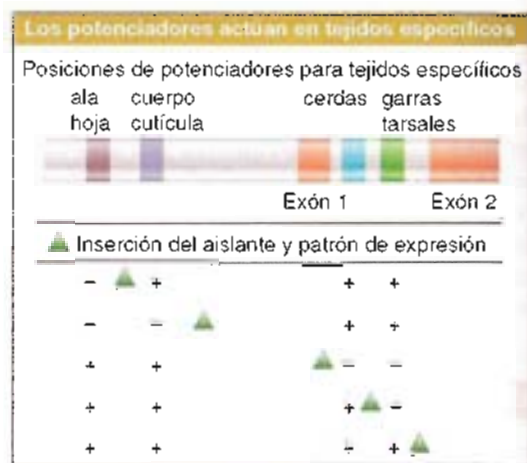


FIGURA 29.46 El aislante del transposón *gypsy* bloquea la acción de un potenciador cuando se coloca entre el potenciador y el promotor.

Algunos de los potenciadores se encuentran en flujo ascendente respecto del promotor y otros en flujo descendente, de manera que el efecto no puede depender de la posición respecto del promotor, tampoco es necesario que haya transcripción a través del aislante. Esto es difícil de explicar en función de modelos de asa para la interacción potenciador-promotor, la cual pronostica esencialmente la no pertinencia del DNA interpuesto. El modelo obvio que viene a la mente es un mecanismo de rastreo en que alguno de los componentes debe moverse en forma unidireccional, del potenciador al promotor, pero es difícil hacer coincidir ese punto de vista con las caracterizaciones previas de la independencia de los potenciadores respecto de tales efectos.

Las proteínas que actúan sobre el aislante han sido identificadas por la existencia de otros dos loci que afectan la función del aislante en forma *trans*. Las mutaciones en *su(Hw)* suprimen el aislamiento, de modo que *y* se expresa en todos los tejidos a pesar del aislante, lo cual sugiere que codifica una proteína que reconoce al aislante y que es necesaria para su acción. El *su(Hw)* tiene un segmento de DNA con dedo de zinc; el mapeo de los cromosomas politénicos muestra que está unido a gran número de sitios. El aislante contiene doce copias de una secuencia de 26 bp que se une a *Su(Hw)*. Las manipulaciones muestran que la potencia del aislante depende del número de copias de la secuencia de unión.

El segundo locus es *mod(mdg4)*, en el cual las mutaciones producen el efecto contrario, como en la pérdida de direccionalidad. Tales mutaciones aumentan la eficacia del aislante por extensión de sus efectos, de manera que impida la utilización de los potenciadores a ambos lados. El *su(Hw)* es epistático respecto de *mod(mdg4)*, es decir, que en un doble mutante se observa sólo el efecto de *su(Hw)*.

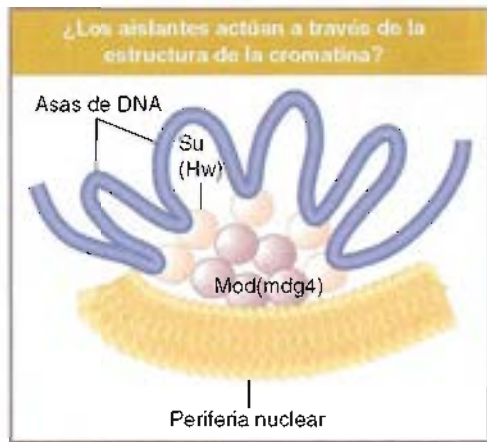


FIGURA 29.47 En la periferia del núcleo se encuentran complejos Su(Hw)/mod(mdg4) que pueden organizar el DNA en asas que limitan las interacciones potenciador-promotor.

lo cual implica que mod(mdg4) actúe a través de su(Hw). La participación básica de la proteína de tipo silvestre del locus *mod(mdg4)* es, por tanto, imponer direccionalidad a la capacidad de su(Hw) de aislar promotores dentro de esos límites.

Por tanto, la unión de su(Hw) con el DNA, seguida de la unión de mod(mdg4) con su(Hw), da lugar a un bloqueo unidireccional de la activación de un promotor, lo cual sugiere que el aislante unido por su(Hw) puede extender la inactividad en ambas direcciones, pero mod(mdg4) detiene el efecto de dispersión en una dirección. Tal vez haya una direccionalidad intrínseca en la cromatina que finalmente resulte en la incorporación de su(Hw), mod(mdg4) o algún otro componente, en una orientación, supuestamente en virtud de la interacción con algún componente de la cromatina que, en sí, tenga orientación preferencial. Sería necesario revertir cualquier direccionalidad de esas características en el promotor.

Es posible que los aislantes actúen haciendo cambios en la estructura de la cromatina. Un modelo proviene de la observación de que los sitios de unión de Su(Hw) y mod(mdg4) están presentes en >500 localizaciones de un genoma del género *Drosophila*. Sin embargo, la visualización de los sitios en que las proteínas se unen al núcleo muestra que se localizan a ~25 sitios definidos en torno a la periferia del núcleo, lo cual sugiere el modelo de la **FIGURA 29.47**, en el cual, las proteínas Su(Hw) unidas en diferentes sitios del DNA se conjuntan por enlace con mod(mdg4). El complejo Su(Hw)/mod(mdg4) se localiza en la periferia nuclear. El DNA unido a él se organiza en asas, de las cuales podría haber ~20 en un complejo promedio. Las interacciones potenciador-promotor deben ocurrir sólo dentro de un asa y no pueden propagarse entre ellas.

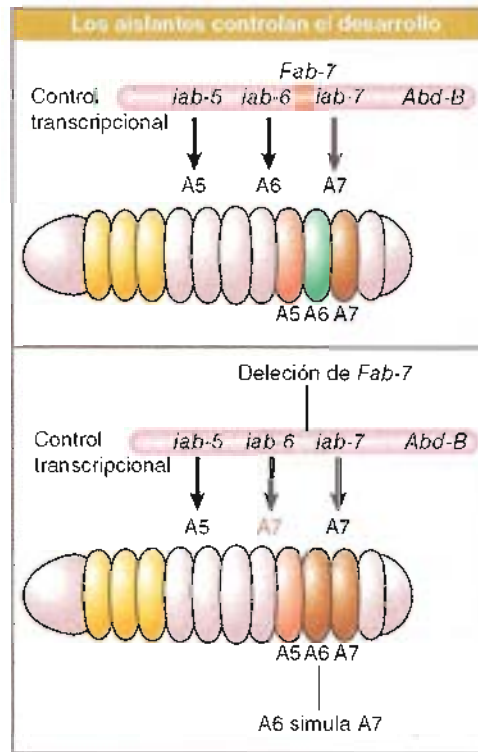


FIGURA 29.48 El *Fab-7* es un elemento limítrofe necesario para la independencia de los elementos reguladores *iab-6* e *iab-7*.

29.17 Los aislantes pueden variar en potencia

Concepto principal

- Los aislantes difieren en cuanto a eficacia para impedir el paso de una señal de activación.

En ocasiones, los elementos con diferentes propiedades de acción en configuración *cis* se combinan para generar regiones con efectos reguladores complejos. La región *Fab-7* es definida por deleciones en el locus *bithorax* del género *Drosophila*, que contiene una serie de elementos reguladores en configuración *cis* que controlan las actividades de tres unidades de transcripción. La parte importante del locus se ilustra en la **FIGURA 29.48**. Los elementos reguladores *iab-6* e *iab-7* controlan la expresión del gen adyacente *Abd-B* en regiones sucesivas del embrión (segmentos A6 y A7). Una delección de *Fab-7* hace que A6 se desarrolle como A7 y no en la forma acostumbrada; este efecto dominante sugiere que *iab-7* ha tomado el control sobre *iab-6*, lo cual se puede interpretar en función de las moléculas por el supuesto de que *Fab-7* proporciona un límite que impide que *iab-7* actúe cuando *iab-6* suele estar activo.

Como otros elementos limítrofes (aislantes), c) *Fab-7* contiene una estructura distintiva de cro-

matina marcada por una serie de sitios hipersensibles. En cuanto a su capacidad para proporcionar un límite, la región puede dividirse en dos tipos de elementos por deleciones más pequeñas y por análisis de fragmentos. Una secuencia de ~3.3 kb se conduce como aislante cuando se coloca dentro de otras estructuras, una secuencia de ~0.8 kb se conduce como represor que actúa sobre *iab-7*. La presencia de esos dos elementos explica la compleja conducta genética de *Fab-7* (que no ha sido descrito con detalle).

Los efectos de sustituir otros aislantes con *Fab-7* permiten profundizar en la acción del elemento límite. El efecto de *Fab-7* no es más que evitar interacciones entre *iab-6* e *iab-7*. No obstante, cuando se cambia *Fab-7* por un aislante diferente [de hecho, un sitio de unión para la proteína Su(Hw)], se observa un efecto más fuerte: *iab-5* toma el control de *iab-7*. Cuando se usa un elemento *scs*, el efecto se extiende hasta *iab-4*, lo cual sugiere un esquema en que los elementos más fuertes pueden bloquear la acción de secuencias reguladoras que yacen más lejos.

Esta conclusión introduce una dificultad para explicar la acción de los elementos límite, los cuales no pueden actuar en esa forma simplemente impidiendo la transmisión de los efectos más allá del límite, lo cual apunta en contra de modelos basados en el simple rastreo o en la inhibición de la propagación lineal de efectos estructurales, además de sugerir que puede haber algún tipo de efecto competitivo en que la fortaleza del elemento determine qué tan lejos puede llegar su efecto.

La situación se complica aún más por la existencia de elementos **antiaislante** que permiten a un potenciador superar los efectos del bloqueo de un aislante, lo cual nuevamente sugiere que aquellos efectos son mediados por algún tipo de control sobre la estructura local de la cromatina.

29.18 Los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa reflejan cambios en la estructura de la cromatina

Conceptos principales

- En los promotores de los genes expresados hay sitios hipersensibles.
- Estos sitios son generados por la unión de factores de transcripción que desplazan a los octámeros de histonas.

Además de los cambios generales que ocurren en regiones activas, o potencialmente activas, se presentan modificaciones estructurales en sitios espe-

cíficos vinculados con el inicio de la transcripción o con ciertas características estructurales del DNA. Esos cambios se detectaron por primera vez merced a los efectos de la digestión con concentraciones muy bajas de la enzima desoxirribonucleasa I.

Cuando digiere a la cromatina, como primer efecto introduce roturas en **sitios hipersensibles** específicos de la cadena doble. La susceptibilidad a la desoxirribonucleasa I refleja la disponibilidad del DNA en la cromatina, por lo cual se toman esos sitios como representativos de regiones cromáticas en que el DNA está particularmente expuesto porque no se encuentra organizado en la estructura usual de nucleosomas. Un sitio hipersensible típico es 100 veces más sensible al ataque de las enzimas que la mayor parte de la cromatina. Esos sitios también son hipersensibles a otras nucleasas y agentes químicos.

Los sitios hipersensibles se crean debido a la estructura de la cromatina (específica de tejido). Su localización puede determinarse por la técnica de marcado terminal indirecto, presentada antes en el contexto del posicionamiento de los nucleosomas. Esa aplicación de la técnica se recapitula en la **FIGURA 29.49**. En este caso se utiliza la escisión por desoxirribonucleasa I en el sitio hipersensible para generar un extremo del fragmento y su distancia se mide desde el otro extremo, generado por la escisión con una enzima de restricción.

Muchos de los sitios hipersensibles tienen relación con la expresión génica. Todo gen activo tiene un sitio, o más de uno, en la región del promotor. *Casi todos los sitios hipersensibles se encuentran sólo en la cromatina de las células en que está expresándose el gen vinculado*, no cuando el gen está inactivo. Los sitios hipersensibles 5' aparecen antes de que se inicie la transcripción, y para la expresión génica se requieren las secuencias de DNA contenidas en los sitios hipersensibles, como se observa por análisis de mutaciones.

Una región sensible a nucleasas, particularmente bien caracterizada, yace en el minicromosoma SV40. Un segmento corto cercano al origen de la replicación, apenas en flujo ascendente respecto del promotor de la unidad de transcripción tardía, es escindido preferencialmente por la desoxirribonucleasa I, la nucleasa de micrococos y otras nucleasas (incluidas las enzimas de restricción).

El estado del minicromosoma SV40 puede observarse al microscopio electrónico. Hasta en 20% de las muestras se observa un "espacio" en la organización del nucleosoma, el cual es evidente en la **FIGURA 29.50**. Ese espacio es una región de ~20 nm de longitud (casi 350 bp), con nucleosomas a uno y otro lado. El espacio visible corresponde a la región

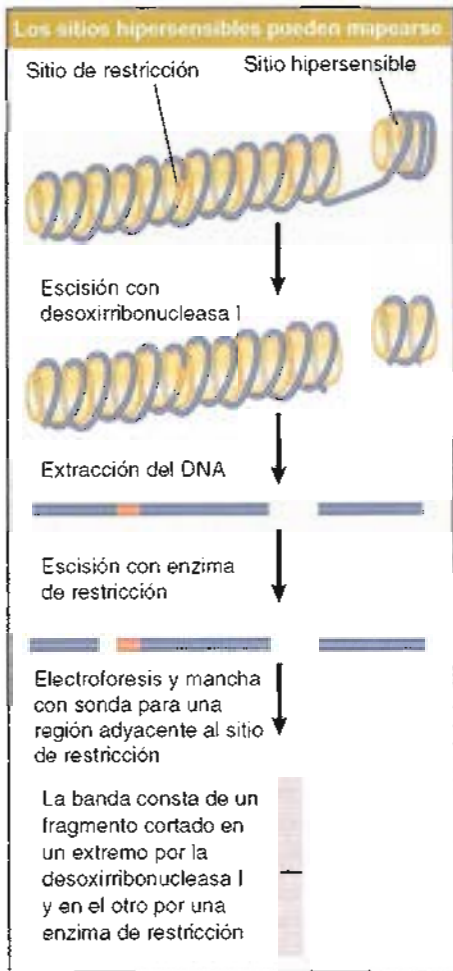


FIGURA 29.49 El marcado terminal indirecto permite medir la distancia entre un sitio hipersensible y la desoxirribonucleasa desde un sitio de corte por restricción. La existencia de un sitio de corte en particular para la desoxirribonucleasa I genera un fragmento bien definido, cuyo tamaño identifica la distancia del sitio hipersensible a la desoxirribonucleasa I, desde el sitio de restricción.

sensible a nucleasas, lo cual muestra directamente que la mayor sensibilidad a las nucleasas se relaciona con la exclusión de nucleosomas.

Un sitio hipersensible a las nucleasas no necesariamente lo es de manera uniforme. En la **FIGURA 29.51** se muestran dos mapas que ilustran este fenómeno. Dentro del espacio de ~300 bp del SV40 hay dos sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa I y una región "protegida"; esta última posiblemente refleje la relación de las proteínas (no histonas) con el DNA. El espacio se relaciona con elementos de la secuencia del DNA necesarios para la función del promotor.

El sitio de hipersensibilidad del promotor de la β -globina es digerido preferentemente por varias enzimas, entre otras, desoxirribonucleasas I y II y nucleasa de micrococos. Las enzimas tienen sitios

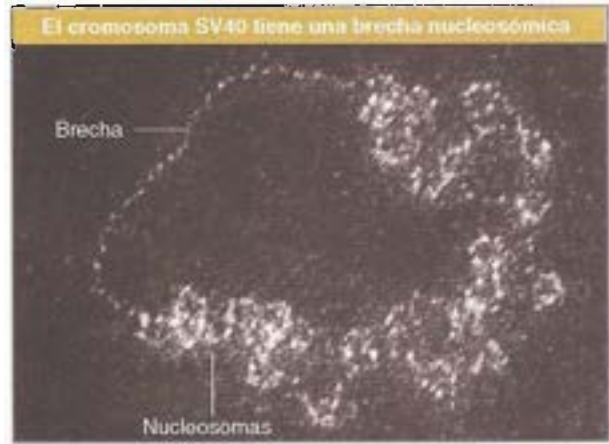


FIGURA 29.50 El minicromosoma de SV40 tiene una brecha de nucleosoma. Imagen cortesía de Moshe Yaniv, Pasteur Institute.

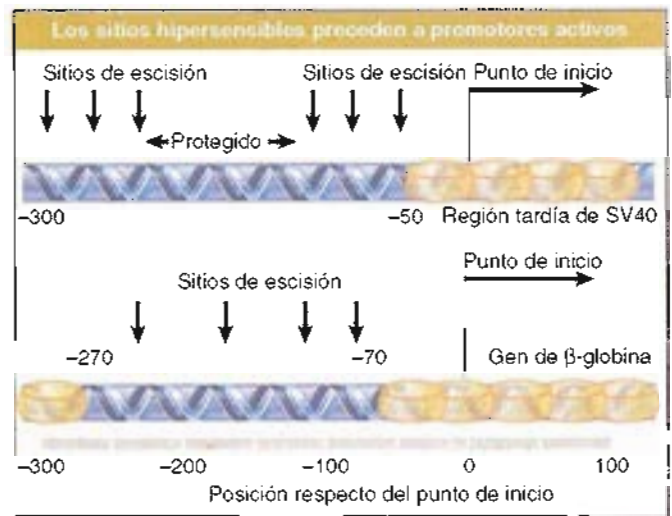


FIGURA 29.51 El segmento de SV40 incluye sitios hipersensibles, regiones sensibles y una región protegida del DNA. El sitio hipersensible de un gen de la β -globina de pollo incluye una región susceptible a varias nucleasas.

preferidos de escisión que yacen en puntos ligeramente diferentes de la misma región general. Así, a una región que va de -70 a -270 de preferencia acceden las nucleasas cuando el gen es susceptible de transcripción.

¿Cuál es la estructura del sitio hipersensible? Su accesibilidad preferencial a las nucleasas indica que no está protegido por octámeros de histona, pero eso no necesariamente implica que esté libre de proteínas. Una región de DNA libre puede ser vulnerable al daño y, en todo caso, ¿cómo podría excluir a los nucleosomas? Se supone que el sitio hipersensible es resultado de la unión de proteínas reguladoras específicas que excluyen a los nucleosomas. De hecho, la unión de tales proteínas tal vez constituya la base para la existencia de la región protegida dentro del sitio hipersensible.

Es posible que las proteínas que generan sitios hipersensibles sean factores reguladores de varios tipos, pues dichos sitios se relacionan con los promotores, otro tipo de elementos que regulan la transcripción, los orígenes de la replicación, los centromeros y los sitios con otro significado estructural. En algunos casos se vinculan con una organización más amplia de la estructura de la cromatina. Un sitio hipersensible puede constituir un límite para una serie de nucleosomas en posición. Los sitios hipersensibles vinculados con la transcripción pueden ser generados por factores de transcripción cuando se unen al promotor como parte del proceso que los hace accesible a la polimerasa de RNA (véase la sección 30.4, La organización del nucleosoma puede cambiarse en el promotor).

La estabilidad de los sitios hipersensibles se revela por las propiedades de los fibroblastos de pollo transformados con virus de tumor sensibles a la temperatura. En esos experimentos se aprovecha una propiedad inusual, pues aunque los fibroblastos no pertenecen a la línea eritroide, la transformación de las células a temperatura normal lleva a la activación de los genes de globina, que así activados, son sitios hipersensibles. Si la transformación se hace a una temperatura mayor (no permitida), los genes de globina no se activan, y los sitios hipersensibles no aparecen. Cuando los genes de globina se han activado por transformación a baja temperatura, pueden desactivarse por elevación de ésta, aunque se mantienen cuando menos durante las siguientes 20 replications celulares.

Este resultado demuestra que la adquisición de un sitio hipersensible es sólo una de las características necesarias para iniciar la transcripción, e implica que los sucesos involucrados en el establecimiento de un sitio hipersensible sean diferentes de los encargados de perpetuarlo. Una vez que se ha establecido el sitio, se perpetúa por replicación si no se presentan las condiciones necesarias para la inducción. ¿Podría ser necesaria alguna intervención específica para suprimir un sitio hipersensible?

29.19 Los dominios definen regiones que contienen genes activos

Concepto principal

- Un dominio que contiene un gen transcrito se define por su mayor sensibilidad a la fragmentación por la desoxirribonucleasa I.

La estructura de una región del genoma que contiene un gen activo, puede estar alterada. El cambio de estructura precede a la ruptura de la estructura

del nucleosoma y es diferente de ésta, que podría ser secundaria al verdadero paso de la polimerasa de RNA. Un índice del cambio de la cromatina transcrita depende de esa mayor susceptibilidad a la fragmentación por desoxirribonucleasa I, que define a un **dominio** cromosómico, región de estructura alterada que incluye cuando menos una unidad de transcripción activa y que llega a extenderse más. (Nótese que el uso del término "dominio" no implica necesariamente una conexión con los dominios estructurales identificados por las asas de cromatina o los cromosomas.)

Cuando la cromatina es digerida con desoxirribonucleasa I, podría degradarse a un material soluble en ácido (fragmentos muy pequeños de DNA) y la reacción general avanzaría en función del porcentaje de DNA modificado de esa forma. *Cuando sólo el 10% del DNA total se ha vuelto soluble en ácido, se pierde más del 50% del DNA de un gen activo, lo que sugiere que los genes activos se fragmentan de manera preferencial.*

El destino de los genes individuales se rastrea con una sonda específica por cuantificación de la cantidad de DNA que sobrevive para la reacción, protocolo incluido en la **FIGURA 29.52**. El principio es que la pérdida de una banda en particular indica que la región correspondiente del DNA ha sido fragmentada por la enzima.

En la **FIGURA 29.53** se muestra lo que sucede con los genes de la β -globina y con un gen de ovoalbúmina en la cromatina extraída de los eritrocitos de pollo (los genes de globina se expresan y el gen de ovoalbúmina está inactivo). Los fragmentos de restricción que representan genes de β -globina se pierden rápidamente, en tanto los que representan al gen de ovoalbúmina muestran poca fragmentación (de hecho, el gen de ovoalbúmina, es digerido a la misma velocidad que la mayor parte del DNA).

Por tanto, la mayor parte de la cromatina es relativamente resistente a la desoxirribonucleasa I y contiene genes no expresados (así como otras secuencias). *Un gen se torna relativamente susceptible a la enzima de manera específica en el tejido en que se expresa.*

¿Es la susceptibilidad preferencial una característica sólo de los genes de expresión más bien activa, como el de la globina, o de todos los genes activos? Los experimentos mediante sondas que representan a todo el grupo de RNAm celulares sugieren que todos los genes activos, ya sea que codifiquen RNAm abundantes o raros, son preferiblemente susceptibles a la desoxirribonucleasa I (aunque hay variaciones en el grado de susceptibilidad). Los genes que rara vez se expresan posiblemente tengan muy pocas moléculas de polimerasa de RNA que

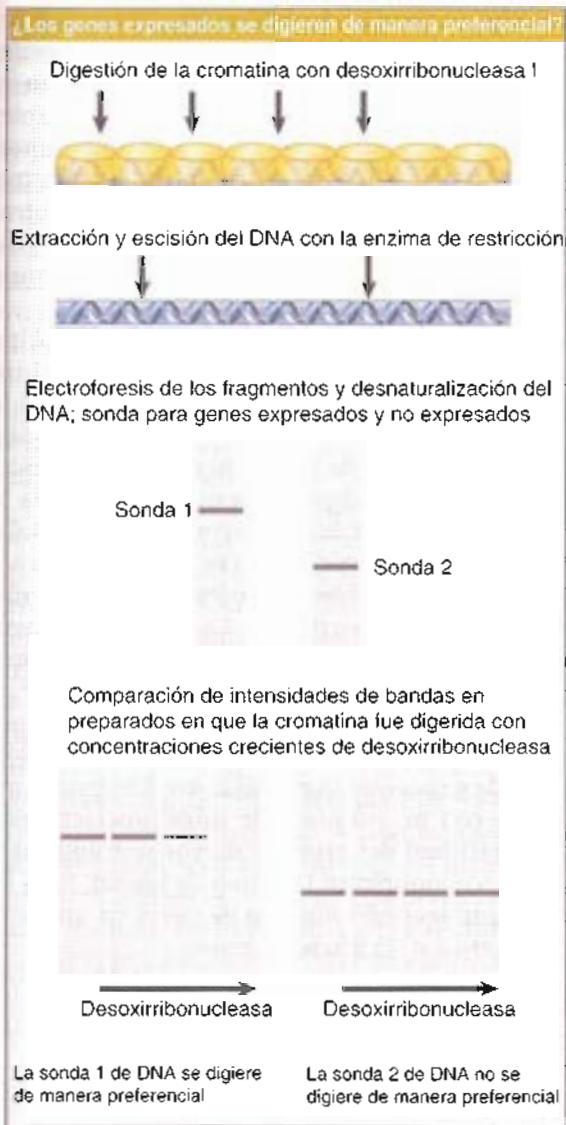


FIGURA 29.52 La desoxirribonucleasa I se puede medir mediante una sonda específica, por determinación de la tasa de desaparición del material con hibridación.

realmente se involucren en la transcripción en un momento dado; ello implica que la sensibilidad a la desoxirribonucleasa I no proviene del acto de la transcripción, más bien es una característica de los genes que pueden ser transcritos.

¿Cuál es la extensión de la región preferentemente sensible? Esto puede determinarse mediante una serie de sondas que representan las regiones de los flancos, así como la unidad de transcripción misma. La región sensible siempre abarca toda la región transcrita; una región adicional de varios kb a cada lado mostraría un nivel intermedio de sensibilidad (tal vez como resultado de efectos de dispersión).

El concepto crítico implícito en la descripción del dominio es que la región de alta sensibilidad a

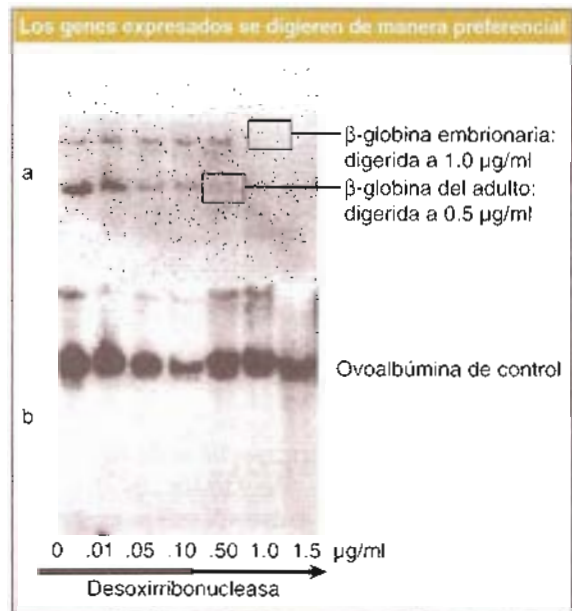


FIGURA 29.53 En células eritroides del adulto, el gen de la β-globina del adulto es muy sensible a la digestión por desoxirribonucleasa I, en tanto que el gen de la β-globina embrionaria es parcialmente sensible (quizá por efectos de dispersión), no así la ovoalbúmina. Imágenes cortesía de Harold Weintraub, Fred Hutchinson Cancer Research Center. Con autorización de Mark T. Groudine.

la desoxirribonucleasa I cubre una distancia considerable. A menudo se piensa en la regulación como dependiente de sucesos que ocurren en un sitio definido del DNA, por ejemplo, de la capacidad de iniciar la transcripción en el promotor, pero incluso si esto fuera válido, tal regulación debería determinar un cambio de mayor convergadura en la estructura, o bien ir acompañada de él. Esta es una diferencia entre eucariotas y procariontas.

29.20 Una LCR puede controlar a un dominio

Concepto principal

- Una LCR se localiza en el extremo 5' del dominio y consta de varios sitios hipersensibles.

Todo gen es controlado por su promotor, y algunos genes también responden a los potenciadores (que contienen elementos de control similares, pero más alejados), según se describió en el Capítulo 24, Promotores y potenciadores, pero esos controles locales no son suficientes para todos los genes. En algunos casos, un gen yace en un dominio de varios genes, todos bajo la influencia de elementos reguladores que actúan en el dominio completo. Esos elementos

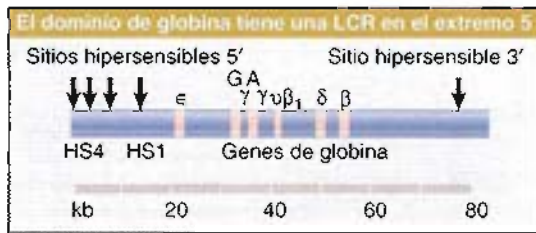


FIGURA 29.54 Un dominio de globina es marcado por sus sitios hipersensibles en ambos extremos. El conjunto de sitios del lado 5' constituye a la LCR y es indispensable para la función de todos los genes del grupo.

se identificaron por la incapacidad de una región de DNA, que incluye un gen y todos sus elementos reguladores conocidos, para expresarse apropiadamente cuando son introducidos a un animal a manera de transgén.

El ejemplo mejor caracterizado de un grupo de genes regulados es el de los genes de la β -globina de mamífero. Recuérdese de la Figura 6.3, que los genes de α y β -globina en mamíferos se encuentran como grupos de genes relacionados que se expresan en diferentes momentos durante el desarrollo embrionario y el adulto. Esos genes están provistos de un gran número de elementos reguladores analizados en detalle. En el caso del gen de la β -globina humana del adulto, las secuencias reguladoras se encuentran en los extremos 5' y 3' del gen, e incluyen elementos positivos y negativos en la región del promotor, así como elementos positivos adicionales en el gen y en flujo descendente respecto del mismo.

Sin embargo, un gen de la β -globina humana que contenga todas esas regiones de control, nunca se expresará en un ratón transgénico en un orden de magnitud del ámbito de tipo silvestre, pues se requiere de alguna secuencia reveladora adicional. Las reservas que proporcionan una función reguladora adicional son identificadas por los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa I que se encuentran en los extremos del conjunto. El mapa de la FIGURA 29.54 muestra que los 20 kb en flujo ascendente respecto del gen épsilon contienen un grupo de cinco sitios, y que hay un sitio a 30 kb en flujo descendente del gen β . Con la transfección de varias estructuras en células de la eritroleucemia del ratón, se muestra que las secuencias entre los sitios hipersensibles individuales de la región 5' se pueden eliminar sin mucho efecto, pero que la eliminación de cualquiera de los sitios reduce el nivel general de expresión.

Los sitios 5' son los principales reguladores, y el grupo de sitios hipersensibles se llama **región de control del locus (LCR)**; no se sabe si el sitio 3'

tiene alguna función. La LCR es absolutamente necesaria para la expresión de cada uno de los genes de globina del grupo, aparte de que cada gen es regulado adicionalmente por sus propios controles específicos, algunos de los cuales son autónomos. La expresión de los genes ϵ y γ en conjunción con LCR parece intrínseca a esos *loci*, en tanto que otros controles parecen depender de la posición en el grupo, lo cual sugiere que el *orden génico* en un grupo es importante para la regulación.

Toda la región que contiene los genes de globina y que se extiende aún más, constituye un **dominio cromosómico**, que muestra mayor sensibilidad a la digestión por la desoxirribonucleasa I (véase la Fig. 29.52). La delección de la LCR 5' restablece la resistencia normal a la desoxirribonucleasa en toda la región. Dos modelos de funcionamiento de una LCR proponen que su participación es necesaria para activar al promotor, o bien, se necesita para aumentar su velocidad de transcripción. La naturaleza exacta de las interacciones entre la LCR y los promotores individuales no es todavía muy clara.

¿Este modelo es aplicable a otros grupos de genes? El locus de globina α tiene una organización similar de genes que se expresan en diferentes momentos, con un conjunto de sitios hipersensibles en un extremo del grupo y mayor sensibilidad a la desoxirribonucleasa I en toda la región. Sólo se conoce un pequeño número de casos en que una LCR controla a un grupo de genes.

Uno de esos casos implica que una LCR controla genes en más de un cromosoma. La T_H2 LCR regula coordinadamente a un grupo de genes dispersos en 120 kb del cromosoma 11 por interacción con sus promotores; también interactúa con el promotor del gen de IFN γ en el cromosoma 10. Los dos tipos de interacción constituyen alternativas que comprenden dos destinos celulares diferentes, esto es, en un grupo de células la LCR causa expresión de los genes en el cromosoma 11, mientras que en el otro, hace que se exprese el gen del cromosoma 10.

29.21 ¿Qué constituye un dominio regulador?

Concepto principal

- Un dominio puede tener aislante, LCR y sitio de unión a la matriz, así como unidades de transcripción.

Si se conjuntan los diversos tipos de estructuras encontrados en diferentes sistemas, se puede pensar acerca de la posible naturaleza de un dominio cromosómico. La característica básica de un dominio regulador es que los elementos reguladores pueden

actuar sólo en unidades de transcripción del mismo dominio, el cual podría contener más de una unidad de transcripción, un potenciador, o ambos.

En la FIGURA 29.55 se resumen las estructuras que podrían participar en la definición de un dominio.

Un aislante detiene el paso de los efectos activadores o represores. En su forma más simple, un aislante bloquea cualquier tipo de efecto de paso, pero puede haber relaciones más complejas en que el aislante bloquee sólo un tipo de efecto, actúe de manera direccional, o ambos. Se supone que la acción de los aislantes afecta la estructura de la cromatina de orden superior, pero no se conocen los detalles ni la variedad de tales efectos.

Un **sitio de unión a la matriz (MAR)** puede encargarse de unir la cromatina con un sitio de la periferia del núcleo (véase la sección 28.6. Secuencias específicas unen el DNA a una matriz de interfase). Dichas secuencias posiblemente se encargan de crear dominios físicos del DNA que adoptan la forma de asas que salen de los sitios de unión, de manera muy parecida a un modelo de acción de aislante. De hecho, algunos elementos de MAR se comportan como aislantes en experimentos *in vitro*, pero parece que su capacidad de unir el DNA con la matriz se puede separar de su función de aislante, de manera que no es una simple acción de causa y efecto. No sería sorprendente que el aislante y los elementos de un MAR se vincularan para mantener una relación entre efectos reguladores y estructura física.

Una LCR actúa a distancia y cualquiera de los genes puede necesitarla en un dominio por expresar (véase la sección 29.20. Una LCR puede controlar un dominio). Cuando un dominio tiene una LCR, su función es esencial para todos los genes del mismo, pero las LCR no parecen ser comunes. Para su funcionamiento podrían necesitarse varios tipos de estructuras en configuración de acción *cis*. Como se definió originalmente, la propiedad de la LCR yace en el sitio hipersensible similar a un potenciador, necesaria para la actividad completa de los promotores del dominio.

La organización de dominios puede llegar a explicar el gran tamaño del genoma. Para que tal estructura funcionara, se requeriría cierta cantidad de espacio, por ejemplo, para permitir que la cromatina se descondensara y se hiciera accesible. Aunque las secuencias exactas de gran parte de la unidad podrían no tener importancia, tal vez entraría en acción la selección en cuanto a cantidad global de DNA en su interior, o cuando menos para evitar que diversas unidades de transcripción estuvieran demasiado cerca.



FIGURA 29.55 Los dominios pueden poseer tres tipos de sitios: aislantes para evitar los efectos de la dispersión entre dominios; MAR para unir el dominio con la matriz nuclear, y LCR, los cuales son necesarios para el inicio de la transcripción. Un potenciador puede actuar en más de un promotor dentro del dominio.

29.22 Resumen

Toda la cromatina eucariótica consta de nucleosomas. Un nucleosoma contiene una longitud característica de DNA, por lo general ~200 bp, que se ubican en torno a un octámero que contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Una proteína H1 aislada se vincula con cada nucleosoma. Virtualmente todo el DNA genómico se organiza en nucleosomas. El tratamiento con nucleasa de micrococos muestra que el DNA empaquetado en los nucleosomas puede dividirse en dos regiones desde el punto operativo. La nucleasa digiere rápidamente la región de enlace, si bien la región medular de 146 bp es resistente a esa digestión. Las histonas H3 y H4 son las más conservadas y un tetrámero H₃₂-H₄₂ contribuye al diámetro de la partícula. Las histonas H2A y H2B se organizan como dos dímeros H2A-H2B. Los octámeros se ensamblan por adición sucesiva de dos dímeros H2A-H2B al núcleo H₃₂-H₄₂.

La vía del DNA que rodea al octámero de histonas crea ~1.65 superhélices. El DNA "entra" y "sale" del nucleosoma en la misma zona, y podría ser sellado por una histona H1. La eliminación de las histonas medulares libera ~1.0 superhélices. La diferencia puede explicarse en gran parte por un cambio en la pendiente helicoidal del DNA, de un promedio de 10.2 bp/giro, en forma de nucleosoma, a 10.5 bp/giro, cuando está libre en solución. Hay variaciones en la estructura del DNA de una periodicidad de 10.0 bp/giro en los extremos del nucleosoma a 10.7 bp/giro en su parte central, así como enroscamientos en la vía del DNA sobre el nucleosoma.

Los nucleosomas están organizados en una fibra de 30 nm de diámetro, con seis por giro, y una razón de empaquetamiento de 40. La eliminación de H1 permite a esta fibra desplegarse en una de 10 nm que consta de una cadena lineal de nucleosomas. La fibra de 30 nm probablemente conste de la fibra de 10 nm enrollada en un solenoide con dos inicios.

La fibra de 30 nm es el constituyente básico de la eucromatina y la heterocromatina; las proteínas no histonas se encargan de la organización adicional de la fibra en la cromatina o la ultraestructura del cromosoma.

Hay dos vías para el ensamblaje de los nucleosomas. En la vía acoplada a la replicación, la subunidad de avance de PCNA del replisoma recluta a CAF-1, que es un factor de ensamblaje del nucleosoma, el cual facilita el depósito de tetrámeros H₃₂-H₄₂ en las cadenas hijas dobles resultantes de la replicación. Los tetrámeros pueden producirse por rotura de los nucleosomas existentes por el triplete de replicación o como resultado del ensamblado de histonas recién sintetizadas. Fuentes similares proporcionan los dímeros H2A-H2B, que después se ensamblan con el tetrámero H₃₂-H₄₂ para completar el nucleosoma. Dicho tetrámero y los dímeros H2A-H2B se ensamblan en forma aleatoria, de modo que los nuevos nucleosomas pueden incluir tanto las histonas previas como las de reciente síntesis.

La polimerasa de RNA desplaza a los octámeros de histonas durante la transcripción. Los nucleosomas vuelven a formarse sobre el DNA después de que ha pasado la polimerasa, a menos que la transcripción sea muy intensiva (como en el DNAr), en cuyo caso, pueden desplazarse por completo. La vía independiente de la replicación para el ensamblaje del nucleosoma se encarga de sustituir los octámeros de histonas desplazados por la transcripción. Utiliza la variante de histona H3.3 y no H3. Para el ensamblaje de nucleosomas en secuencias de DNA centroméricas después de la replicación, se usa una vía similar, con otra alternativa de H3. Un aislante bloquea la transmisión de efectos de activación y desactivación en la cromatina. Un aislante localizado entre un potenciador y un promotor impide que el primero active al segundo. Dos aislantes definen la región intermedia como un dominio regulador; las interacciones regulatorias dentro del dominio se limitan a él, de modo que queda aislado de los efectos externos. La mayor parte de los aislantes bloquea el paso de los efectos reguladores, en cualquier sentido, pero algunos son direccionales. Los aislantes suelen bloquear tanto los efectos activadores (interacciones potenciador-promotor) como los desactivadores (mediados por dispersión de la heterocromatina), pero algunos se limitan a uno u otro. Se cree que los aislantes actúan por modificación de la estructura de la cromatina de orden mayor, pero se desconocen los detalles.

La actividad génica se vincula con dos tipos de cambios de sensibilidad a las nucleasas. La cromatina susceptible de transcribirse tiene generalmente mayor sensibilidad a la desoxirribonucleasa I, lo cual refleja un cambio en la estructura en una región

amplia, que puede definirse como dominio, y que contiene genes activos o potencialmente activos. Los sitios hipersensibles del DNA ocurren en localizaciones bien definidas y se identifican por una sensibilidad mucho mayor a la desoxirribonucleasa I. Un sitio hipersensible consta de una secuencia de ~200 bp a partir de la cual se excluyen los nucleosomas, por la presencia de otras proteínas, además de que forma un límite que puede hacer que los nucleosomas adyacentes tengan restricciones en cuanto a posición. El posicionamiento de los nucleosomas puede ser importante para controlar el acceso de proteínas reguladoras al DNA.

Hay sitios hipersensibles en varios tipos de reguladores; los que regulan la transcripción incluyen promotores, potenciadores y LCR, a diferencia de otros, que incluyen orígenes para la replicación y centrómeros. Un promotor o potenciador actúa sobre un solo gen, pero una LCR contiene un grupo de sitios hipersensibles y puede regular un dominio que contenga varios genes.

Referencias

29.2 El nucleosoma es la subunidad de la cromatina

Artículos de revisión

- Kornberg, R. D. (1977). Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931-954.
- McGhee, J. D., and Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 1115-1156.

Artículos de investigación

- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532-537.

29.3 El DNA está enrollado en la estructura de los nucleosomas

Artículo de investigación

- Finch, J. T. et al. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* 269, 29-36.

29.4 Los nucleosomas tienen una estructura común

Artículo de investigación

- Shen, X. et al. (1995). Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vitro*. *Cell* 82, 47-55.

29.5 La estructura del DNA varía en la superficie del nucleosoma

Artículo de revisión

- Wang, J. (1982). The path of DNA in the nucleosome. *Cell* 29, 724-726.

Artículo de investigación

Richmond, T. J. and Davey, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145–150.

29.6 La periodicidad del DNA cambia en el nucleosoma

Artículo de revisión

Travers, A. A. and Klug, A. (1987). The bending of DNA in nucleosomes and its wider implications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 317, 537–561.

29.7 Organización del octámero de histonas

Artículos de investigación

Angelov, D., Vitolo, J. M., Mutskov, V., Dimitrov, S., and Hayes, J. J. (2001). Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6599–6604.

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 31 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10148–10152.

Luger, K. et al. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 28 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.

29.8 La vía de los nucleosomas en la fibra de cromatina

Artículo de revisión

Felsenfeld, G. and McGhee, J. D. (1986). Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell* 44, 375–377.

Artículos de investigación

Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R., and Richmond, T. J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306, 1571–1573.

Schalch, T., Duda, S., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 436, 138–141.

29.9 La replicación de la cromatina requiere del ensamblaje de los nucleosomas

Artículos de revisión

Osley, M. A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 827–861.

Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* 14, 1430–1438.

Artículos de investigación

Ahmad, K. and Henikoff, S. (2001). Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J. Cell Biol.* 153, 101–110.

Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* 9, 1191–1200.

Gruss, C., Wu, J., Koller, T., and Sogo, J. M. (1993). Disruption of the nucleosomes at the replication fork. *EMBO J.* 12, 4533–4545.

Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurencon, A., Karr, T. L., and Couble, P. (2005). The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature* 437, 1386–1390.

Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Scamps, C., Martini, E. M., Lipinski, M., and Almouzni, G. (2002). HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell* 9, 1091–1100.

Shibahara, K., and Stillman, B. (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 96, 575–585.

Smith, S. and Stillman, B. (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro*. *Cell* 58, 15–25.

Smith, S. and Stillman, B. (1991). Stepwise assembly of chromatin during DNA replication *in vitro*. *EMBO J.* 10, 971–980.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51–61.

Yu, L. and Gorovsky, M. A. (1997). Constitutive expression, not a particular primary sequence, is the important feature of the H3 replacement variant hv2 in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.* 17, 6303–6310.

29.11 ¿Los genes transcritos se organizan en nucleosomas?

Artículo de revisión

Kornberg, R. D. and Lorch, Y. (1992). Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 563–587.

29.12 Los octámeros de histonas son desplazados por la transcripción

Artículos de investigación

Cavalli, G. and Thoma, F. (1993). Chromatin transitions during activation and repression of galactose-regulated genes in yeast. *EMBO J.* 12, 4603–4613.

Studitsky, V. M., Clark, D. J., and Felsenfeld, G. (1994). A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template. *Cell* 76, 371–382.

29.13 El desplazamiento del nucleosoma y su reensamblado requieren factores especiales

Artículos de investigación

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 301, 1090–1093.

Saunders, A., Werner, J., Andriulis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D., and Lis, J. T. (2003). Tracking

FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin *in vivo*. *Science* 301, 1094–1096.

29.14 Los aislantes impiden la acción de los potenciadores y de la heterocromatina

Artículos de revisión

Gerasimova, T. I. and Corces, V. G. (2001). Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organization. *Annu. Rev. Genet.* 35, 193–208.

West, A. G., Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16, 271–288.

29.15 Los aislantes pueden definir un dominio

Artículos de investigación

Chung, J. H., Whitley, M., and Felsenfeld, G. (1993). A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74, 505–514.

Cuvier, O., Hart, C. M., and Laemmli, U. K. (1998). Identification of a class of chromatin boundary elements. *Mol. Cell Biol.* 18, 7478–7486.

Gaszner, M., Vazquez, J., and Schedl, P. (1999). The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction. *Genes Dev.* 13, 2098–2107.

Kellum, R. and Schedl, P. (1991). A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 64, 941–950.

Pikaart, M. J., Recillas-Targa, F., and Felsenfeld, G. (1998). Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* 12, 2852–2862.

Zhao, K., Hart, C. M., and Laemmli, U. K. (1995). Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32. *Cell* 81, 879–889.

29.16 Los aislantes pueden actuar en una dirección

Artículos de investigación

Gerasimova, T. I., Byrd, K., and Corces, V. G. (2000). A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Mol. Cell* 6, 1025–1035.

Harrison, D. A., Gdula, D. A., Cyne, R. S., and Corces, V. G. (1993). A leucine zipper domain of the suppressor of hairy-wing protein mediates its repressive effect on enhancer function. *Genes Dev.* 7, 1966–1978.

Rosenman, R. R., Pirrotta, V., and Geyer, P. K. (1993). The *su(Hw)* protein insulates expression of the *D. melanogaster white* gene from chromosomal position-effects. *EMBO J.* 12, 435–442.

29.17 Los aislantes pueden variar en potencia

Artículos de investigación

Hagstrom, K., Muller, M., and Schedl, P. (1996). Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to

ensure proper segment specification by the *Drosophila* bithorax complex. *Genes Dev.* 10, 3202–3215.

Mihaly, J. et al. (1997). In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a polycomb-response element. *Development* 124, 1809–1820.

Zhou, J. and Levine, M. (1999). A novel cis-regulatory element, the PTS, mediates an anti-insulator activity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 99, 567–575.

29.18 Los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa reflejan cambios en la estructura de la cromatina

Artículo de revisión

Gross, D. S. and Garrard, W. T. (1988). Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 159–197.

Artículos de investigación

Groudine, M., and Weintraub, H. (1982). Propagation of globin DNAase I-hypersensitive sites in absence of factors required for induction: a possible mechanism for determination. *Cell* 30, 131–139.

Moyne, G., Harper, F., Saragosti, S., and Yaniv, M. (1982). Absence of nucleosomes in a histone-containing nucleoprotein complex obtained by dissociation of purified SV40 virions. *Cell* 30, 123–130.

Scott, W. A. and Wigmore, D. J. (1978). Sites in SV40 chromatin which are preferentially cleaved by endonucleases. *Cell* 15, 1511–1518.

Varshavsky, A. J., Sundin, O., and Bohn, M. J. (1978). SV40 viral minichromosome: preferential exposure of the origin of replication as probed by restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 5, 3469–3479.

29.19 Los dominios definen regiones que contienen genes activos

Artículo de investigación

Stalder, J. et al. (1980). Tissue-specific DNA cleavage in the globin chromatin domain introduced by DNAase I. *Cell* 20, 451–460.

29.20 Una LCR puede controlar a un dominio

Artículos de revisión

Bulger, M. and Groudine, M. (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.* 13, 2465–2477.

Grosveld, F., Antoniou, M., Berry, M., De Boer, E., Dillon, N., Ellis, J., Fraser, P., Hanscombe, O., Hurst, J., and Imam, A. (1993). The regulation of human globin gene switching. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 339, 183–191.

Artículos de investigación

Gribnau, J., de Boer, E., Trimborn, T., Wijgerde, M., Müller, E., Grosveld, F., and Fraser, P. (1998). Chromatin interaction mechanism of transcriptional control *in vitro*. *EMBO J.* 17, 6020–6027.

Spilianakis, C. G., Lalioti, M. D., Town, T., Lee, G. R., and Flavell, R. A. (2005). Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435, 637–645.

van Assendelft, G. B., Hanscombe, O., Grosveld, F., and Greaves, D. R. (1989). The β -globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner. *Cell* 56, 969–977.

29.21 ¿Qué constituye un dominio regulador?

Artículo de revisión

West, A. G., Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16, 271–288.

Control de la estructura de la cromatina

ESQUEMA DEL CAPÍTULO

30.1 Introducción

30.2 La cromatina puede tener estados alternativos

- La estructura de la cromatina es estable y no puede modificarse con la alteración del equilibrio de los factores de transcripción y las histonas.

30.3 EL remodelado de la cromatina es un proceso activo

- Hay varios complejos de remodelado de la cromatina que utilizan la energía provista por la hidrólisis del ATP.
- Los complejos SWI/SNF, RSC y NURF son muy grandes todos y comparten algunas subunidades relacionadas.
- Un modelo de remodelado no tiene en sí especificidad para algún sitio diana particular, sino que debe ser reclutado por un componente del aparato de transcripción.

30.4 La organización de los nucleosomas puede cambiar en el promotor

- Los activadores específicos de secuencia reclutan complejos de remodelado a los promotores.
- El factor puede liberarse una vez que se ha unido el complejo de remodelado.
- El promotor MMTV requiere un cambio del posicionamiento rotativo de un nucleosoma que permita que un activador se una al DNA sobre el nucleosoma.

30.5 La modificación de las histonas es un episodio clave

- Las histonas se modifican por metilación, acetilación y fosforilación

30.6 Ocurre acetilación de histonas en dos circunstancias

- Ocurre acetilación de histonas de manera transitoria durante la replicación.
- La acetilación de histonas se vincula con la activación de la impresión génica.

30.7 Las acetilasas se relacionan con activadores

- La cromatina desacetilada puede tener una estructura más condensada.
- Los activadores de la transcripción se relacionan con actividades de acetilasa de histonas en grandes complejos.
- Las acetilasas de histonas varían en su especificidad diana.
- La acetilación podría afectar la transcripción en una forma cuantitativa o cualitativa.

30.8 Las desacetilasas se relacionan con los represores

- La desacetilación se vincula con la represión de la actividad génica.
- Hay desacetilasas presentes en complejos con actividad represora.

30.9 Las metilaciones de histonas y de DNA están relacionadas

- La metilación de DNA y de histonas es una característica de la cromatina inactiva.
- Los dos tipos de episodios de metilación pueden estar relacionados.

30.10 Los estados de la cromatina se interconvierten por modificación

- La acetilación de histonas se relaciona con la actividad génica.
- La metilación de DNA y de histonas se relaciona con la heterocromatina.

30.11 La activación del promotor comprende una serie ordenada de episodios

- El complejo de remodelado puede reclutar al complejo de acetilación.
- La acetilación de histonas puede ser el suceso que mantenga al complejo en estado activado.

30.12 La fosforilación de las histonas afecta la estructura de la cromatina

- Al menos dos histonas son dianas de la fosforilación, tal vez con efectos contrarios.

30.13 Se encuentran algunos segmentos comunes en las proteínas que modifican la cromatina

- El dominio cromo se encuentra en varias proteínas de la cromatina que tienen efectos de activación o represión sobre la expresión de los genes.
- El dominio SET es parte del sitio catalítico de las transferasas de metilos de proteínas.
- El dominio bromo se encuentra en una variedad de proteínas que interactúan con la cromatina y sirve para reconocer sitios acetilados en las histonas.

30.14 Resumen

30.1 Introducción

Cuando se aborda la transcripción en términos de interacciones del DNA, factores de transcripción individuales y polimerasas de RNA, se llega a la descripción precisa de los sucesos que tienen lugar *in vitro*, pero carece de una característica importante de la transcripción *in vivo*. El genoma celular está organizado en nucleosomas, pero en general se impide la iniciación de la transcripción si la región del promotor está empacada dentro de los nucleosomas. En este sentido, las histonas actúan como represores generalizados de transcripción (una idea bastante antigua), si bien se ve en este capítulo que también participan en interacciones más específicas. La activación de un gen requiere cambios en el estado de la cromatina: el tema esencial es cómo tienen acceso al DNA promotor los factores de transcripción.

La estructura local de la cromatina es parte integral del control de la expresión génica. Los genes pueden estar presentes en una de dos condiciones estructurales. Se han encontrado genes en estado "activo" sólo en las células donde se expresan. El cambio de estructura antecede al acto de la transcripción e indica que el gen es "transcribible". Esto hace pensar que la adquisición de una estructura "activa" debe de ser el primer paso en la expresión génica. Los genes activos se encuentran en dominios de la eucromatina con susceptibilidad preferencial a las nucleasas (véase la sección 29.19, Los dominios definen regiones que contienen genes activos). Se crean sitios hipersensibles en los promotores antes de que se active un gen (véase la sección 29.18, Los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa cambian la estructura de la cromatina).

En fecha más reciente se ha visto que hay una conexión cercana y continua entre la iniciación de la transcripción y la estructura de la cromatina. Algunos activadores de la transcripción génica modifican de manera directa las histonas; en particular, la acetilación de histonas se relaciona con la activación génica. Por el contrario, algunos represores de la transcripción actúan por desacetilación de histonas.

De este modo, un cambio reversible en la estructura de las histonas en la vecindad del promotor participa en el control de la expresión génica, lo que tal vez sea parte del mecanismo por el que un gen se mantiene en estado activo o inactivo.

Los mecanismos por los que se mantienen regiones locales de cromatina en estado inactivo (silente) tienen relación con el medio por el que se reprime cada promotor. Las proteínas involucradas en la formación de la heterocromatina actúan en la cromatina a través de las histonas, y las modificaciones de las histonas pueden ser una característica importante de la interacción. Una vez establecidos, dichos cambios en la cromatina pueden persistir a través de las divisiones celulares y crear un estado **epigenético** donde las propiedades de un gen son determinadas por la estructura autopropagante de la cromatina. El nombre epigenética refleja el hecho de que un gen pudiese tener una circunstancia heredada (puede ser activa o inactiva) que no depende de su secuencia. Sin embargo, se pueden conocer mejor las propiedades epigenéticas por las estructuras autopropagantes denominadas **priones** (agentes infecciosos proteináceos).

30.2 La cromatina puede tener estados alternativos

Concepto principal

- La estructura de la cromatina es estable y no puede modificarse con la alteración del equilibrio de los factores de transcripción e histonas.

Se han propuesto dos tipos de modelos para explicar cómo cambia el estado de expresión del DNA: en equilibrio o en cambio discontinuo.

En la **FIGURA 30.1** se muestra el modelo en equilibrio. Aquí el único factor pertinente es la concentración de la proteína represora o activadora, que produce un equilibrio entre las formas libre y unida al DNA. Cuando la concentración de la proteína es suficientemente alta, ocupa su sitio de unión al DNA



FIGURA 30.1 En un modelo en equilibrio el estado de un sitio de unión en el DNA depende de la concentración de la proteína que se le une.

y altera el estado de expresión del ácido. (Es posible que la unión reprima o active cualquier secuencia diana particular.) Este tipo de modelo explica la regulación de la transcripción en células bacterianas, donde la expresión génica depende de manera exclusiva de las acciones de cada una de las proteínas represoras y activadores (véase el Capítulo 12, El operón). Puede predecirse si se transcribe un gen bacteriano a partir de la suma de concentraciones de varios factores que activan o reprimen al gen individual. Los cambios de estas concentraciones *en cualquier momento* modificarán el estado de expresión de manera acorde. En la mayor parte de los casos, la unión a proteínas es colaboradora, de modo que una vez que la concentración alcanza un nivel lo suficientemente alto, hay un rápido vínculo con el DNA que origina un cambio en la expresión del gen.

Ocurre una situación diferente con la cromatina eucariótica. Los primeros experimentos *in vitro* mostraron que se puede establecer un estado activo o inactivo, pero esto no se afecta por la adición posterior de otros componentes. El factor de transcripción TF_{IIIA} , indispensable para que la polimerasa de RNA III transcriba los genes del RNA m 5S, no puede activar sus genes diana *in vitro* si están combinados con histonas. Sin embargo, si el factor está presente ante DNA libre, forma un complejo de transcripción, y después, la adición de histonas no impide que el gen se mantenga activo. Una vez que el factor

se ha unido, permanece en el sitio; esto permite que una sucesión de moléculas de la polimerasa de RNA inicie la transcripción. El que el factor o las histonas lleguen al sitio de control en primer término puede ser el punto determinante.

En la FIGURA 30.2 se muestran los dos tipos de circunstancia que pueden encontrarse en un promotor eucariótico. En el estado inactivo, hay nucleosomas que impiden que se unan los factores basales y la polimerasa de RNA. En el estado activo, el aparato basal ocupa el promotor, al que los octámeros de histonas no pueden unirse. Ambos tipos de estado son estables.

Se observa una situación similar con el complejo TF_{IID} en los promotores de la polimerasa II de RNA. Un plásmido que contiene un promotor de adenovirus se puede transcribir *in vitro* por la actividad de la polimerasa II de RNA en una reacción que requiere TF_{IID} y otros factores de transcripción. El molde puede ensamblarse en nucleosomas si se adicionan histonas. Si se agregan las histonas *antes* del TF_{IID} , no puede iniciarse la transcripción. No obstante, si el TF_{IID} se agrega primero, el molde puede aun ser transcrito en esa forma de cromatina. Por lo tanto, el TF_{IID} puede reconocer el DNA libre pero no puede hacer lo mismo con el DNA de los nucleosomas o actuar sobre él. Sólo el TF_{IID} debe agregarse antes de las histonas; los otros factores de transcripción y la polimerasa de RNA se pueden agregar después, lo que permite suponer que la unión del TF_{IID} al promotor crea una estructura a la que se pueden unir otros componentes del aparato de transcripción.

Es importante señalar que en estos sistemas *in vitro* se utilizan cantidades desproporcionadas de componentes, que pueden crear situaciones no naturales. Por lo tanto, la mayor importancia de estos resultados no es que demuestren el mecanismo utilizado *in vivo*, sino que establecen el principio de que los factores de transcripción o nucleosomas pueden formar estructuras estables que no pueden cambiarse tan sólo con la modificación del equilibrio con los componentes libres.

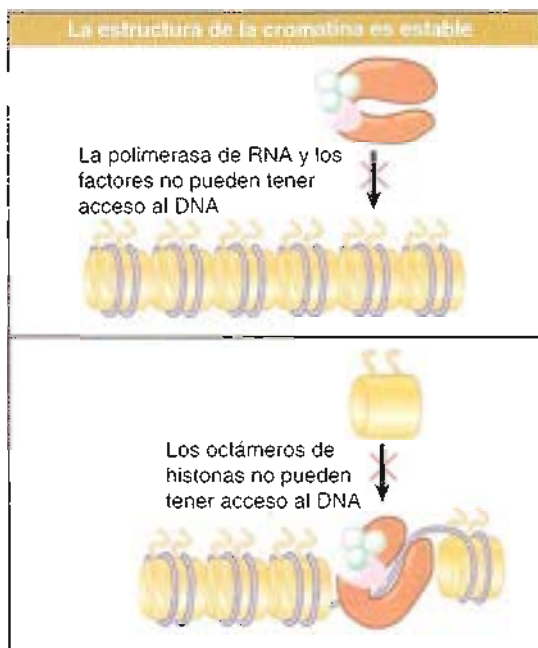


FIGURA 30.2 Si los nucleosomas se forman en un promotor, los factores de transcripción (y la polimerasa de RNA) no pueden unirse. Si los factores de transcripción (y la polimerasa de RNA) se unen al promotor para establecer un complejo estable de inicio, se excluyen las histonas.

30.3 El remodelado de la cromatina es un proceso activo

Conceptos principales

- Hay varios complejos de remodelado de cromatina que utilizan energía provista por la hidrólisis del ATP.
- Los complejos SWI/SNF, RSC y NURF son todos muy grandes y comparten subunidades relacionadas.
- Un complejo de remodelado no tiene en sí especificidad para algún sitio diana particular, sino que debe ser reclutado por un componente del aparato de transcripción.

El proceso general de inducción de cambios en la estructura de la cromatina se denomina **remodelado de cromatina**, que consta de mecanismos para reemplazar histonas y depende del aporte de energía. Muchos contactos proteína-proteína y proteína-DNA necesitan modificarse para que se liberen histonas de la cromatina. No hay traslados sin costo; debe proveerse energía para alterar estos contactos. En la **FIGURA 30.3** se ilustra el principio de un *modelo dinámico*, por un factor que hidroliza el ATP. Cuando el octámero de histonas se libera del DNA, se pueden unir otras proteínas (en este caso, factores de transcripción y polimerasa de RNA).

En la **FIGURA 30.4** se resumen los tipos de cambios de remodelado de la cromatina que pueden describirse *in vitro*:

- Los octámeros de histonas pueden desplazarse por el DNA y cambiar la relación entre el ácido nucleico y las proteínas, lo que modifica la posición de una secuencia particular sobre la superficie del nucleosoma.
- El espaciado entre octámeros de histonas puede cambiar, de nuevo con el resultado de que se alteran las posiciones de cada secuencia con relación a la proteína.
- El cambio más extenso es cuando un octámero puede desplazarse por completo del DNA para generar una brecha sin nucleosomas.

El uso más común del remodelado de la cromatina es cambiar la organización de los nucleosomas en el promotor de un gen que se va a transcribir. Esto se requiere para permitir que el aparato de transcripción tenga acceso al promotor. Sin embargo, también se necesita remodelado para permitir otras manipulaciones de la cromatina, incluidas las reacciones de reparación del DNA dañado.

El remodelado adopta más a menudo la forma de desplazamiento de uno o más octámeros de histonas. Esto puede detectarse por un cambio en la escalera de la nucleasa de micrococos, donde se ha perdido la protección contra la escisión. A menudo, esto da origen a la creación de un sitio que es hipersensible a la escisión por la desoxirribonucleasa I (véase la sección 29.18. Los sitios hipersensibles a la desoxirribonucleasa cambian la estructura de la cromatina). A veces hay cambios menos notorios, por ejemplo, que incluyen una modificación en la posición rotativa de un solo nucleosoma; esto puede detectarse por la pérdida de la escalera de 10 bases de la desoxirribonucleasa I. Así, los cambios en la estructura de la cromatina pueden ir desde alterar la posición de los nucleosomas hasta retirarlos.

El remodelado de cromatina lo realizan grandes complejos que aprovechan la hidrólisis de ATP para proveer la energía. El meollo del complejo de remodelado es su subunidad de fosfatasa del trifosfato

de adenosina. Los complejos de remodelado suelen clasificarse de acuerdo con el tipo de subunidad de fosfatasa del trifosfato de adenosina; aquellos con subunidades de fosfatasa del trifosfato de adenosina relacionadas se consideran pertenecientes a la misma familia (por lo general algunas otras subunidades son también comunes). En la **FIGURA 30.5** se conservan los nombres. Los dos tipos principales

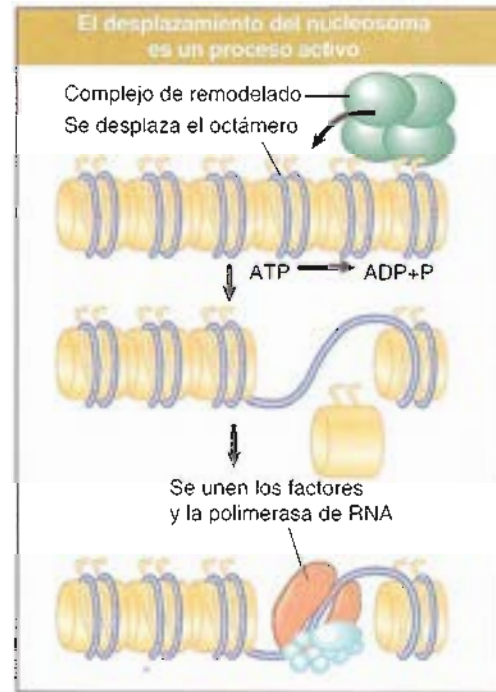


FIGURA 30.3 El modelo dinámico para la transcripción de la cromatina depende de factores que pueden aprovechar la energía provista por la hidrólisis del ATP para desplazar nucleosomas de secuencias específicas del DNA.

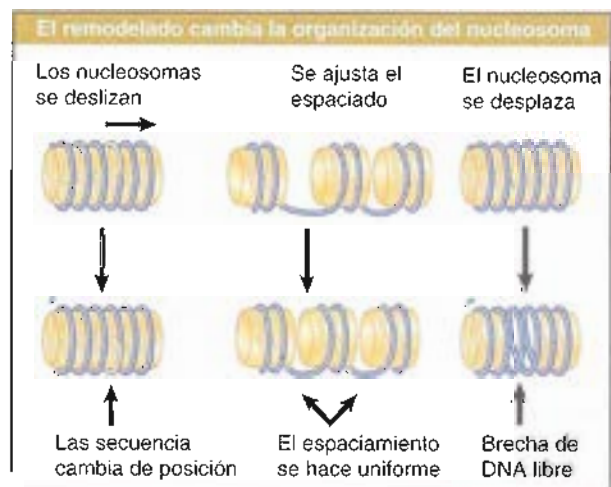


FIGURA 30.4 Los complejos de remodelado pueden hacer que los nucleosomas se deslicen por el DNA, pueden desplazar a los nucleosomas del DNA o reorganizar el espaciado entre los nucleosomas.

Hay varios tipos de complejos de remodelado			
Tipo de complejo	SWI/SNF	ISWI	Otras
Levaduras	SWI/SNF RSC	ISW1 ISW2	Complejo INO80 SWRI
Moscas	dSWI/SNF (brahma)	NURF CHRAC ACF	
Seres humanos	hSWI/SNF	RSF hACF/WCFR hCHRAC WICH	NuRD Complejo INO80 SRCAP
Rana		WICH CHRAC ACF	Mi-2

FIGURA 30.3 Los complejos de remodelado pueden clasificarse por sus subunidades de fosfatasa del trifosfato de adenosina.

de complejos son SWI/SNF e ISWI (las siglas ISWI se refieren a SWI de imitación).

Las levaduras tienen dos complejos SWI/SNF y tres complejos ISWI. Se encuentran también complejos de ambos tipos en la mosca y el ser humano. Cada tipo de complejo puede emprender una variedad diferente de actividades de remodelado.

El primer complejo de remodelado identificado fue **SWI/SNF**, nombre que refleja el hecho de que muchas de sus subunidades son codificadas por genes identificados en un principio mediante mutaciones *SWI* o *SNF* en *Saccharomyces cerevisiae*. Las mutaciones de estos loci son pleiotrópicas y la variación de defectos es similar a la que muestran los mutantes que perdieron la cola del dominio carboxilo terminal (CTD) de la polimerasa de RNA II. Estas mutaciones también muestran interacciones genéticas con las mutaciones de genes que codifican los componentes de la cromatina, en particular *SIN1*, que codifica una proteína no histona, y *SIN2*, que codifica la histona H3. Se requieren los genes *SWI* y *SNF* para la expresión de una variedad de loci individuales (se afectan ~120, o 2%, de los genes de *S. cerevisiae*). La expresión de estos loci puede requerir que el complejo SWI/SNF remodele la cromatina en sus promotores.

El complejo SWI/SNF actúa en forma catalítica *in vitro* y hay sólo ~150 complejos por célula de levadura. Los genes que codifican las subunidades SWI/SNF no son esenciales, lo que indica que la levadura debe de tener también otras formas de remodelado de la cromatina. El complejo RSC (que remodela la estructura de la cromatina) es más abundante y también indispensable. Actúa en ~700 loci diana.

Los complejos SWI/SNF pueden remodelar la cromatina *in vitro* sin pérdida global de histonas, o

pueden desplazar a los octámeros de histona. Ambos tipos de reacción tal vez pasen por el mismo proceso intermedio donde se altera la estructura de un nucleosoma diana, lo que lleva a la reconstitución de un nucleosoma (remodelado) sobre el DNA original, o al desplazamiento del octámero de histonas hacia una molécula diferente de DNA. El complejo SWI/SNF altera la sensibilidad de los nucleosomas a la desoxirribonucleasa I en el sitio diana e induce cambios en los contactos proteína-DNA que persisten después que se ha liberado de los nucleosomas. La subunidad Swi2 es la fosfatasa del trifosfato de adenosina, que aporta la energía para el remodelado por SWI/SNF.

Hay muchos contactos entre el DNA y un octámero de histonas; 14 identificados en la estructura cristalina. Todos estos contactos deben romperse para que pueda liberarse un octámero o moverse a una nueva posición. ¿Cómo se logra esto? Se pueden descartar algunos mecanismos obvios, porque se sabe que no se genera DNA de cadena única durante el remodelado (y no hay actividades de helicasa vinculadas con los complejos). La creencia actual es que los complejos de remodelado en las clases SWI e ISWI aprovechan la hidrólisis del ATP para hacer girar el DNA en la superficie del nucleosoma. Las pruebas indirectas permiten suponer que esto crea una fuerza mecánica que permite a una pequeña región del DNA liberarse de la superficie y después volver a ubicarse.

Una reacción importante catalizada por complejos de remodelado incluye el deslizamiento de los nucleosomas. Se observó por primera vez que la familia ISWI afecta el posicionamiento de los nucleosomas sin desplazar a los octámeros. Esto se logra por una reacción de deslizamiento donde el octámero se mueve a lo largo del DNA. El deslizamiento se impide si se retira la cola N terminal de la histona H4, pero no se sabe con exactitud cómo actúa dicha estructura a ese respecto. Los complejos SWI/SNF tienen la misma capacidad; se impide la reacción con la introducción de una barrera en el DNA, lo que hace pensar que hay una reacción de deslizamiento, donde el octámero de histonas se traslada más o menos en forma continua por el DNA sin perder contacto en ningún momento.

Un enigma acerca de la acción del complejo SWI/SNF es su tamaño completo. Tiene 11 subunidades con un peso molecular combinado de $\sim 2 \times 10^6$. Esto hace muy pequeña a la polimerasa de RNA y el nucleosoma, lo que dificulta comprender cómo todos estos componentes pudiesen interactuar con el DNA detenido en la superficie del cromosoma. Sin embargo, se puede encontrar un complejo de transcripción con actividad completa, llamado holoenzima polimerasa II de RNA, que contiene la

polimerasa de RNA misma, todos los factores TF_{II} , excepto TBP y TF_{IIA} , y el complejo SWI/SNF, que se vincula con la cola CTD de la polimerasa. De hecho, casi todo el complejo SWI/SNF puede estar presente en los preparados holoenzimáticos, lo que sugiere que el remodelado de la cromatina y el reconocimiento de los promotores tienen lugar en forma coordinada por un solo complejo.

30.4 La organización de los nucleosomas puede cambiar en el promotor

Conceptos principales

- Los activadores específicos de secuencia reclutan complejos de remodelado a los promotores.
- El factor puede liberarse una vez que se ha unido el complejo de remodelado.
- El promotor MMTV requiere un cambio del posicionamiento rotativo de un nucleosoma que permita que un activador se una al DNA sobre el nucleosoma.

¿Cómo se dirigen los complejos de remodelado a sitios específicos de la cromatina? No contienen en sí subunidades que se unan a secuencias específicas de DNA, lo que hace pensar en el modelo que se muestra en la **FIGURA 30.6**, donde son reclutados por activadores o (a veces) por represores.

La interacción entre los factores de transcripción y los complejos de remodelado da indicios clave de su forma de acción. El factor de transcripción Swi5 activa el locus *HO* en levaduras (nótese que Swi5 no es miembro del complejo SWI/SNF). El Swi5 entra a los núcleos cerca del final de la mitosis y se une al promotor *HO*. Después recluta SWI/SNF al promotor. A continuación, se libera Swi5, que deja a SWI/SNF en el promotor, lo que significa que un factor de transcripción puede activar un promotor por un mecanismo de "batear y correr", donde su función se cumple una vez que se ha unido el complejo de remodelado.

Se descubrió la participación de los complejos de remodelado en la activación génica porque dichos complejos son indispensables para que ciertos factores de transcripción puedan activar sus genes diana. Uno de los primeros ejemplos fue el factor GAGA, que activa al promotor de *hsp70* de *Drosophila in vitro*. La unión de GAGA a cuatro sitios ricos en (CT)_n en el promotor altera los nucleosomas, crea una región hipersensible y hace que los nucleosomas adyacentes se reacomoden de manera que ocupen posiciones preferentes más que aleatorias. La escisión es un proceso que depende de la energía y que requiere el complejo de remodelado NURF. La

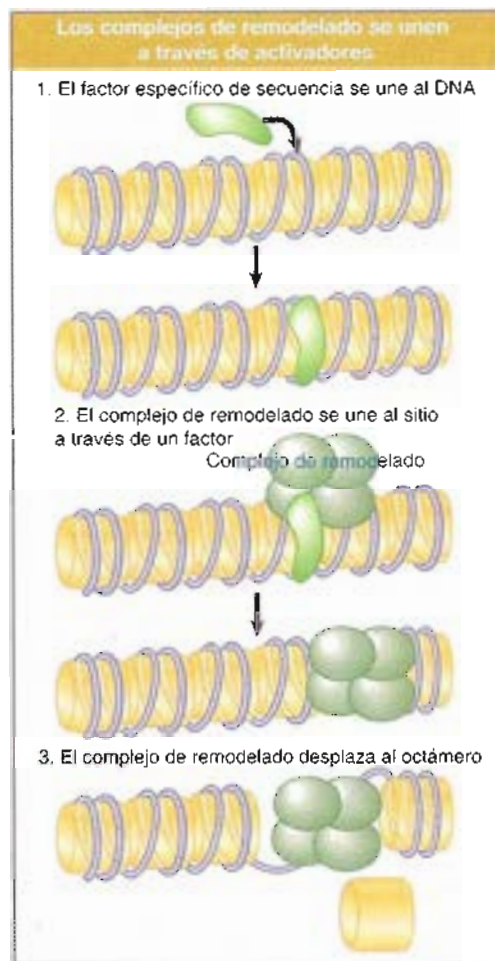


FIGURA 30.6 Un complejo de remodelado se une a la cromatina gracias a un activador (o un represor).

organización de los nucleosomas se modifica para crear un límite que determine las posiciones de los nucleosomas cercanos. Durante este proceso, GAGA se une a su sitio diana y al DNA; su presencia fija el estado remodelado.

El sistema *PHO* fue uno de los primeros en los que se demostró que hay un cambio en la organización de los nucleosomas durante la activación génica. En el promotor *PHO5* el regulador de bHLH, *PHO4*, responde a la privación de fosfatos con la inducción de la rotura de cuatro nucleosomas en una posición precisa. Este episodio es independiente de la transcripción (se presenta en un mutante TATA) y de la replicación. Hay dos sitios de unión para *PHO4* en el promotor. Uno se localiza entre los nucleosomas, que se puede unir por el dominio de unión a DNA aislado *PHO4*, y el otro yace dentro del nucleosoma y no puede reconocerse. La rotura del nucleosoma para permitir la unión del DNA en el segundo sitio es indispensable para la activación génica. Dicha acción requiere la presencia del dominio de activación de la transcripción.

La secuencia del activador de VP16 puede sustituir a la correspondiente *PHO4* en la escisión del nucleosoma. Esto hace pensar que la rotura tiene lugar gracias a interacciones proteína-proteína que involucran a la misma región que hace contactos proteína-proteína para activar la transcripción. En este caso, no se sabe qué complejo de remodelado participa en la ejecución de los efectos.

Una búsqueda de posiciones de nucleosomas del genoma de levadura mostró que la mayor parte de los sitios donde se unen factores de transcripción están libres en el nucleosoma. Los promotores de la polimerasa II de RNA por lo general tienen una región sin nucleosomas ~200 bp en sentido ascendente respecto del punto de inicio, que es flanqueado por los nucleosomas ubicados a cada lado.

Sin embargo, no siempre tienen que excluirse los nucleosomas para permitir la iniciación de la transcripción. Algunos activadores pueden unirse al DNA en la superficie de un nucleosoma. Los nucleosomas parecen ubicados de manera precisa en algunos elementos de respuesta de hormonas esteroides, de manera que se puedan unir a los receptores. La unión a receptores tal vez altere la interacción del DNA con las histonas y pudiese incluso llevar a la exposición de nuevos sitios de unión. Podría requerirse el posicionamiento exacto de los nucleosomas, ya sea porque el nucleosoma "presenta" el DNA en una fase de rotación particular, o porque hay interacciones proteína-proteína entre los activadores y las

histonas u otros componentes de la cromatina. De algún modo, se ha dejado de ver a la cromatina sólo como una estructura represiva y ahora se analizan cuáles interacciones entre activadores y cromatina pueden necesitarse para la activación.

El promotor MMTV representa un ejemplo de la necesidad de una organización nucleosómica específica. Contiene un conjunto de seis sitios palindrómicos en parte, cada uno unido a un dímero del receptor de la hormona (HR), que constituye el HRE. También tienen un sitio de unión aislado para el factor NF1, y dos sitios cercanos para el factor OTF. HR y NF1 no pueden unirse de manera simultánea a otros sitios en el DNA libre. La FIGURA 30.7 muestra cómo la estructura del nucleosoma controla la unión de los factores.

El HR protege sus sitios de unión en el promotor cuando se agrega hormona, pero no afecta a los sitios sensibles a la nucleasa de micrococos, que marcan ambos lados del nucleosoma. Esto permite suponer que HR se une al DNA sobre la superficie del nucleosoma; sin embargo, el posicionamiento rotativo del DNA en el nucleosoma antes de la adición de la hormona permite el acceso a sólo dos de cuatro sitios. La unión a los otros dos sitios requiere un cambio en la posición de rotación sobre el nucleosoma, que puede detectarse por la aparición de un sitio sensible en el eje de simetría par (que está en el centro de los sitios de unión que constituyen el HRE). Se puede buscar NFI en el nucleosoma después de la inducción hormonal, de modo que dichos cambios estructurales tal vez sean necesarios para permitir la unión de NF1, quizás porque exponen al DNA y eliminan el impedimento estérico por el que el HR bloquea la unión de NF1 al DNA libre.

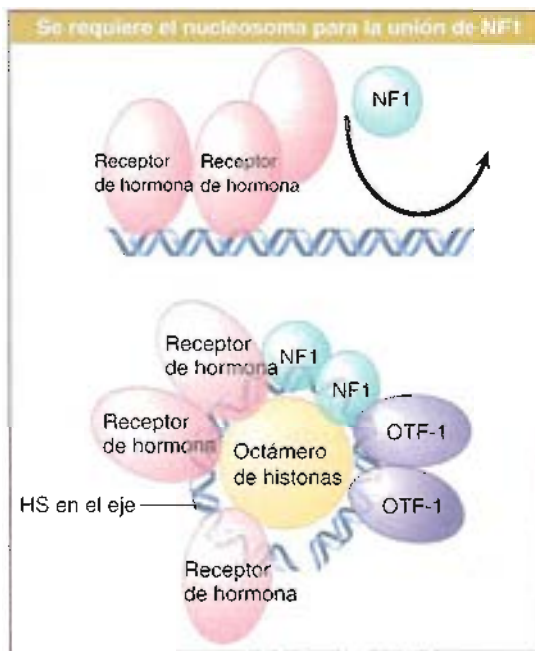


FIGURA 30.7 El receptor hormonal y NF1 no pueden unirse de manera simultánea al promotor MMTV en forma de DNA lineal, pero pueden hacerlo cuando el DNA se presenta sobre la superficie del nucleosoma.

30.5 La modificación de las histonas es un episodio clave

Concepto principal

- Las histonas se modifican por metilación, acetilación y fosforilación.

El que un gen se exprese depende de la estructura local de la cromatina (en el promotor) y en el dominio circundante. La estructura de la cromatina puede regularse de manera correspondiente gracias a episodios de activación individuales o cambios que afectan una región cromosómica amplia. Los sucesos más localizados implican a un gen diana individual donde se presentan cambios en la estructura de los nucleosomas y su organización en la vecindad inmediata del promotor. Cambios más generales pueden afectar regiones tan grandes como todo un cromosoma.

Los cambios que afectan a regiones grandes controlan la posibilidad de expresarse de un gen. El término **silenciamiento** se utiliza para referirse a la represión de la actividad de un gen en una región cromosómica local. La denominación **heterocromatina** se usa para describir regiones de los cromosomas que son lo bastante grandes como para observarse con una estructura físicamente más compacta al microscopio. La base de ambos tipos de cambio es la misma: proteínas adicionales se unen a la cromatina e impiden de manera directa o indirecta la activación de los promotores en la región por factores de transcripción o la polimerasa de RNA.

Los cambios en cada promotor controlan que la transcripción se inicie en un gen particular y pueden ser de activación o represión.

Todos estos episodios dependen de interacciones con histonas. Los cambios en la estructura de la cromatina se inician cuando se modifican las colas terminales N de las histonas, en especial H3 y H4. Las colas de las histonas constan de 15-30 aminoácidos en el extremo N de las cuatro histonas centrales y el extremo C de H2A. Las colas de H2B y H3 pasan entre los giros del DNA (véase la Figura 29.21 en la sección 29.7, Organización del octámero de histonas). La **FIGURA 30.8** muestra que se pueden modificar en varios sitios por metilación, acetilación o fosforilación. Otras modificaciones, como una monoubicuitinación o dimetilación también ocurren, pero no están bien descritos.

La acetilación y metilación tienen lugar en el grupo amino libre (ϵ) de la lisina. Como se observa en la **FIGURA 30.9** la acetilación retira la carga positiva que reside en la forma NH_3^+ del grupo. También ocurre metilación en la arginina. La fosforilación se presenta en el grupo hidroxilo de la serina y también en la treonina, lo que introduce una carga negativa en forma de un grupo fosfato. La lisina puede ser mono, di o trimetilada (todas las formas con carga positiva) y la arginina puede ser mono o dimetilada (en forma simétrica o asimétrica).

Estas modificaciones son transitorias. Pueden cambiar la carga de la molécula de la proteína y, en consecuencia, están en posibilidades de modificar las propiedades funcionales de los octámeros. Las modificaciones de las histonas se vinculan con los cambios estructurales que se presentan en la cromatina durante la replicación y transcripción. Pueden requerirse fosforilaciones en posiciones específicas y en diferentes histonas para procesos particulares, por ejemplo, la posición Ser¹⁰ de H3 se fosforila cuando los cromosomas se condensan durante la mitosis.

En células en cultivo sincronizadas, tanto las histonas medulares preexistentes como las recién sintetizadas parecen ser acetiladas y metiladas durante la fase S (cuando se replica el DNA y también

se sintetizan las histonas). Durante el ciclo celular, los grupos modificantes se retiran después.

La coincidencia de modificación y replicación hace suponer que la acetilación (y metilación) podrían vincularse con el ensamblaje del nucleosoma. Una especulación ha sido que la disminución de las cargas positivas en las histonas podría aminorar su afinidad por el DNA, lo que permite controlar mejor la reacción. La idea ha perdido sustento después de que se observó que los nucleosomas pueden reconstituirse, al menos *in vitro*, con histonas no modificadas. La acetilación de histonas es indispensable para el ensamblaje de nucleosomas en las levaduras y tal vez se requiera para algunas de



FIGURA 30.8 Las colas terminales N de las histonas H3 y H4 pueden acetilarse, metilarse o fosforilarse en varias posiciones.

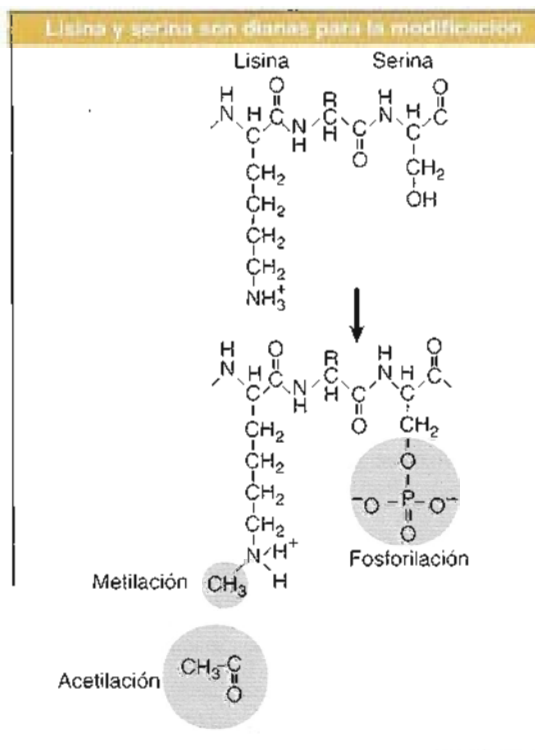


FIGURA 30.9 La acetilación de la lisina o la fosforilación de la serina reducen la carga positiva global de una proteína.

las interacciones proteína-proteína que tienen lugar durante etapas más avanzadas de la reacción (véase la sección 30.6, Ocurre acetilación de histonas en dos circunstancias).

Ocurre un ciclo de fosforilación y desfosforilación en H1, pero su sincronización es diferente del ciclo de modificación de las otras histonas. En células de mamífero en cultivo se introducen uno o dos grupos fosfato durante la fase S. No obstante, el principal episodio de la fosforilación es la adición posterior de más grupos en la mitosis, lo que lleva al número total de hasta seis. Todos los grupos fosfato se retiran al final del proceso de división. La fosforilación de H1 es catalizada por una cinasa de fase M, que provee el desencadenamiento indispensable para la mitosis. De hecho, esta enzima ahora se estudia a menudo en términos de su actividad de

cinasa de H1. No se sabe mucho acerca de la o las fosfatasas que retiran después los grupos.

La sincronización de la fosforilación principal de H1 ha llevado a especular que participa en la condensación mitótica. Sin embargo, en el género *Tetrahymena* (de protozoarios) es posible la delección de todos los genes de H1 sin afectar de manera significativa las propiedades globales de la cromatina. Hay un efecto más bien pequeño sobre la capacidad de la cromatina de condensarse durante la mitosis. Algunos genes se activan y otros se reprimen por ese cambio, lo que sugiere que hay alteraciones de la estructura local. Las mutaciones que eliminan sitios de fosforilación en H1 no tienen efecto, pero aquellas que simulan los efectos de la fosforilación producen un fenotipo que se parece al de la delección. Esto permite suponer que el efecto de la fosforilación de H1 es eliminar sus acciones sobre la estructura de la cromatina local.

¿Afectan las modificaciones de las histonas de manera directa la estructura del nucleosoma o su efecto sobre la cromatina es indirecto? No hay, de hecho, muchas pruebas de alguna diferencia en las propiedades de los nucleosomas conforme al estado de modificación de las histonas. Sin embargo, hasta ahora se han descrito varios casos donde la modificación de las histonas crea sitios de unión para proteínas no histonas, que cambian las propiedades de la cromatina.

Los nucleosomas sujetos a modificación pueden ser muy diversos. La modificación tal vez sea un episodio local, por ejemplo, restringido a los nucleosomas en el promotor. También puede ser un suceso general que se extiende, por ejemplo, hasta todo un cromosoma. La FIGURA 30.10 muestra que hay una correlación general donde la acetilación se vincula con la cromatina activa, en tanto la metilación se relaciona con la cromatina inactiva. No obstante, esto no es una regla simple y los sitios particulares que se modifican (así como las combinaciones de modificaciones específicas) pueden ser importantes, de manera que hay, sin duda, excepciones donde (por ejemplo) las histonas metiladas en cierta posición se encuentran en la cromatina activa. Las mutaciones en uno de los complejos de acetilasas de histonas de levaduras tienen el efecto contrario al habitual (impiden el silenciamiento de algunos genes); esto resalta la falta de un efecto uniforme de la acetilación.

La especificidad de las modificaciones la indica el hecho de que muchas de los enzimas modificantes tienen sitios diana individuales en histonas específicas. En la FIGURA 30.11 se resumen los efectos de algunas de las modificaciones. La mayor parte de los sitios modificados está sujeta a un solo tipo de cambio. En algunos casos, la modificación de un sitio

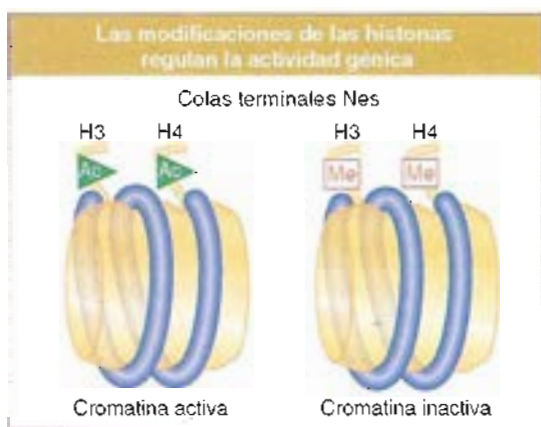


FIGURA 30.10 La acetilación de H3 y H4 se vincula con la cromatina activa, en tanto la metilación se relaciona con la cromatina inactiva.

La modificación de las histonas afecta la estructura y el funcionamiento de la cromatina

Histona	Sitio	Modificación	Función
H3	Lis-4	Metilación	Activación
H3	Lis-9	Metilación	Condensación de la cromatina
	Lis-9	Metilación	Se requiere para la metilación del DNA
	Lis-9	Acetilación	Activación
H3	Ser-10	Fosforilación	Activación
H3	Lis-14	Acetilación	Impide la metilación en Lis-9
H3	Lis-79	Metilación	Silenciamiento telomérico
H4	Arg-3	Metilación	
H4	Lis-5	Acetilación	Ensamblaje
H4	Lis-12	Acetilación	Ensamblaje
H4	Lis-16	Acetilación	Ensamblaje del nucleosoma
	Lis-16	Acetilación	Activación de X en la mosca

FIGURA 30.11 La mayor parte de los sitios modificados en las histonas tiene un tipo único específico de modificación, pero algunos sitios pueden tener más de un tipo de modificación. Cada una de las funciones se puede vincular con algunas de las modificaciones.

puede activar o inhibir la modificación en otro. La idea de que se pueden usar las combinaciones de señales para definir los tipos de cromatina a veces se ha llamado *código de histonas*.

30.6 Ocurre acetilación de histonas en dos circunstancias

Conceptos principales

- Ocurre acetilación transitoria de histonas durante la replicación.
- La acetilación de histonas se vincula con la activación de la expresión génica.

Todas las histonas centrales pueden acetilarse. Las principales dianas para la acetilación son las lisinas en las colas terminales N de las histonas H3 y H4. La acetilación tiene lugar en dos circunstancias diferentes:

- Durante la replicación del DNA y
- Cuando se activan los genes.

Cuando se replican los cromosomas, lo que ocurre durante la fase S del ciclo celular, las histonas se acetilan de manera transitoria. La **FIGURA 30.12** muestra que esa acetilación ocurre antes de que las histonas se incorporen a los nucleosomas. Se sabe que las histonas H3 y H4 se acetilan en la etapa en que se vinculan entre sí en el tetrámero H₃₂-H₄₂. El tetrámero se incorpora entonces a los nucleosomas. Bastante poco después, se retiran los grupos acetilo.

La importancia de la acetilación queda de manifiesto por el hecho de que impedir la acetilación en las histonas H3 y H4 durante la replicación causa pérdida de viabilidad en las levaduras. Las dos histonas son abundantes como sustratos, porque la levadura puede mantenerse perfectamente bien en tanto pueda acetilar cualquiera de esas histonas durante la fase S. Hay dos posibles funciones de la acetilación: podría necesitarse para que las histonas sean reconocidas por factores que las incorporan a los nucleosomas, o podría requerirse para el ensamblaje, la estructura, o ambos, del nuevo nucleosoma.

Los factores que se sabe intervienen en el ensamblaje de la cromatina no distinguen entre histonas acetiladas y no acetiladas, lo que hace pensar que es más probable que se requiera la modificación para interacciones posteriores. Se ha creído durante mucho tiempo que tal vez se requiera acetilación para ayudar a controlar las interacciones proteína-proteína que tienen lugar a medida que las histonas se incorporan a los nucleosomas. Una prueba de tal participación es que el complejo de acetilasa de histonas SAS en las levaduras se une al complejo de ensamblaje de la cromatina en la horquilla de replicación, donde acetila a la ¹⁶Lis de la histona 4. Esto

puede ser parte del sistema que establece los patrones de acetilación de histonas después de la replicación.

Fuera de la fase S, la acetilación de histonas en la cromatina en general tiene correlación con el estado de expresión génica. La correlación se observó por primera vez porque la acetilación de histonas aumenta en un dominio que contiene genes activos y la cromatina acetilada es más sensible a la desoxirribonucleasa I y (tal vez) a la nucleasa de micrococcos. La **FIGURA 30.13** muestra que esto implica la acetilación de colas de histonas en los nucleosomas. Ahora se sabe que esto ocurre en gran parte por la acetilación de nucleosomas en la vecindad del promotor cuando se activa un gen.

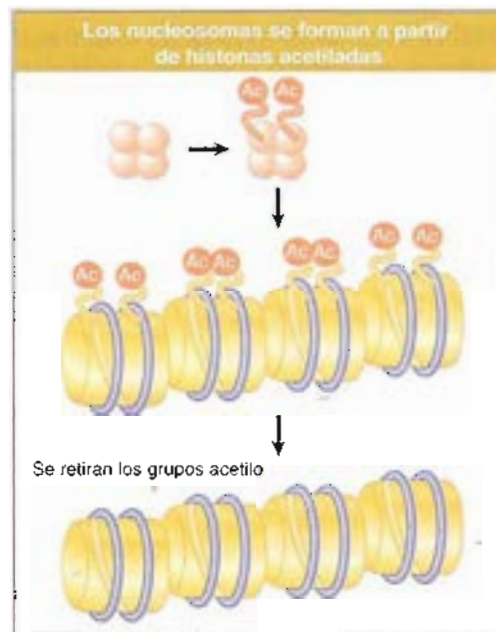


FIGURA 30.12 La acetilación durante la replicación ocurre en las histonas antes de que se incorporen a los nucleosomas.

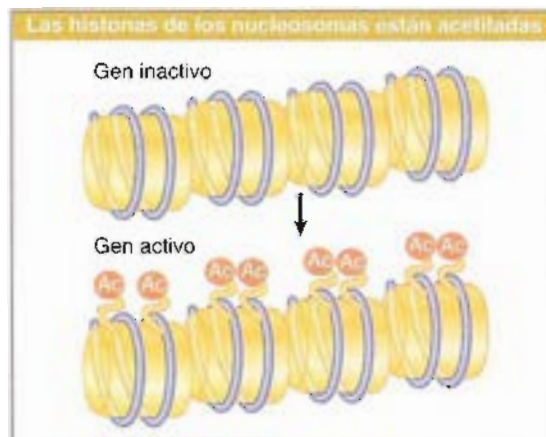


FIGURA 30.13 La acetilación relacionada con la activación génica ocurre por modificación directa de las histonas en los nucleosomas.

Además de los sucesos en cada promotor, ocurren cambios a gran escala en la acetilación de los cromosomas sexuales. Esto es parte del mecanismo por el que las actividades en el cromosoma X se alteran para compensar la presencia de dos cromosomas X en una especie, pero sólo uno (además del cromosoma Y) en otras (véase la sección 31.5, Los cromosomas X presentan cambios globales). El cromosoma X inactivo en mamíferos hembra tiene una H4 subacetilada. El cromosoma X superactivo en machos del género *Drosophila* presenta mayor acetilación de H4, lo que sugiere que la presencia del grupo acetilo puede ser un prerrequisito para una estructura activa menos condensada. En el macho del género *Drosophila*, el cromosoma X está acetilado de manera específica en la ¹⁶Lis de la histona H4. La acetiltransferasa de las histonas (HAT) encargada es una enzima que se recluta al cromosoma como parte de un gran complejo proteínico. Este complejo de "compensación de dosis" se encarga de introducir cambios generales en el cromosoma X que le permiten una mayor expresión. El aumento de la acetilación es sólo una de sus actividades.

30.7 Las acetilasas se relacionan con activadores

Conceptos principales

- La cromatina desacetilada puede tener una estructura más condensada.
- Los activadores de la transcripción se relacionan con actividades de acetilasa de histonas en grandes complejos.
- Las acetilasas de histonas varían en su especificidad diana.
- La acetilación podría afectar la transcripción en una forma cuantitativa o cualitativa.

La acetilación es reversible. Cada dirección de la reacción es catalizada por un tipo específico de enzima. Las enzimas que pueden acetilar histonas se llaman **acetiltransferasas de histonas** o **HAT**; los grupos acetilo son retirados por las **desacetilasas de histonas** o **HDAC**. Hay dos grupos de enzimas HAT: aquellas en el grupo A actúan sobre las histonas de la cromatina y participan en el control de la transcripción. Las del grupo B actúan sobre histonas de reciente síntesis en el citosol y participan en el ensamblado de los nucleosomas.

Dos inhibidores han permitido analizar la acetilación. La tricostatina y el ácido butírico inhiben las desacetilasas de histonas y hacen que se acumulen nucleosomas acetilados. El uso de estos inhibidores ha servido de sustento a la opinión generalizada

de que la acetilación se vincula con la expresión génica; de hecho, la capacidad del ácido butírico de causar cambios en la cromatina semejantes a los observados en la activación de genes constituye uno de los primeros indicios de la conexión entre acetilación y actividad génica.

El gran adelanto logrado al analizar la función de la acetilación de histonas fue la descripción de las enzimas acetilantes y desacetilantes y su vínculo con otras proteínas que intervienen en episodios específicos de activación y represión. Un cambio básico en la manera de ver la acetilación de histonas lo propició el descubrimiento de que las HAT no son necesariamente enzimas dedicadas vinculadas con la cromatina; más bien resulta que los activadores de la transcripción conocidos tienen actividad de HAT.

Se estableció la conexión cuando se identificó la subunidad catalítica de un grupo A de HAT como homóloga de la proteína reguladora Gcn5 en levaduras. Después se demostró que la Gcn5 misma tiene actividad de HAT (con las histonas H3 y H4 como sustratos). La Gcn5 es parte de un complejo adaptador necesario para la interacción entre 300 potenciadores y sus promotores diana. Su actividad de HAT se requiere para la activación del gen diana.

Esto permite cambiar la imagen de la acción de los coactivadores, como se muestra en la **FIGURA 30.14**, donde la polimerasa de RNA se une a un sitio hipersensible y los coactivadores son histonas acetilantes en los nucleosomas de la vecindad. Se sabe hoy de muchos ejemplos de interacciones de este tipo.

El Gcn5 conduce a uno de los complejos de acetilasas más importantes. En las levaduras, Gcn5 es parte del complejo de acetiltransferasa Spt-Ada-Gcn5 (SAGA) de 1.8 MDa que contiene varias pro-

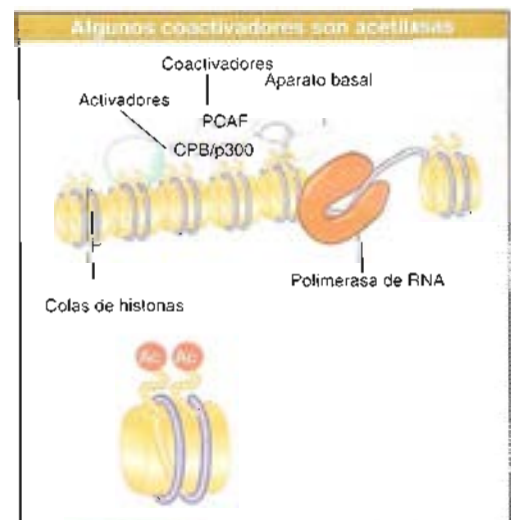


FIGURA 30.14 Los coactivadores pueden tener actividades de HAT que acetilan las colas de las histonas nucleosómicas.

teínas que participan en la transcripción. Entre estas proteínas se encuentran varios TAF_{II}. Además, la subunidad TAF_{II}145 de TF_{II}D es una acetilasa. (La TAF_{II}145 de levaduras es homóloga de la TAF_{II}250 de los mamíferos; ambas conocidas como TAF_{II}.) Hay algunas funciones que coinciden entre TAF_{II}D y SAGA, la más notoria es que las levaduras pueden mantenerse con TAF_{II}145 o Gcn5, pero se daña por la delección de ambos. Esto permite suponer que una actividad de acetilasa es indispensable para la expresión génica, pero puede proporcionarla TF_{II}D o SAGA. Como podría esperarse por el tamaño del complejo de SATA, la acetilación es sólo una de sus funciones, si bien sus demás acciones en la activación génica no están tan bien descritas.

Uno de los primeros activadores generales en caracterizarse como HAT fue la proteína de unión de p300/CREB (CBP). (En la actualidad, p300 y CBP son proteínas diferentes, pero tienen una relación tan cercana que a menudo se consideran como un solo tipo de actividad). La p300/CBP es un coactivador que enlaza a un activador con el aparato basal (véase la Figura 25.7). La p300/CBP interactúa con varios activadores, como los receptores hormonales, AP-1 (c-Jun y c-Fos) y MyoD. La interacción es inhibida por las proteínas reguladoras víricas E1A de adenovirus y el antígeno T de SV40, que se unen a p300/CBP para impedir la interacción con factores de transcripción; esto explica cómo estas proteínas víricas inhiben la transcripción celular. (Esta iniciación es importante para la capacidad de las proteínas víricas de contribuir al estado tumorigénico). La p300/CBP acetila las colas terminales Nes de H4 en los nucleosomas. Otro coactivador, PCAF, acetila de manera preferente la H3 en los nucleosomas. La p300/CBP y TCAF forman un complejo que participa en la activación de la transcripción. En algunos casos interviene otro HAT: el coactivador ACTR, que actúa con receptores de hormonas y es en sí un HAT que actúa sobre H3 y H4 y también recluta tanto p300/CBP como PCAF para formar un complejo coactivador. Una explicación de la presencia de múltiples actividades de HAT en un complejo de coactivación es que cada HAT tiene especificidad diferente y que se requieren múltiples episodios de acetilación diversos para la activación.

Una característica general de la acetilación es que un HAT del grupo A es parte de un gran complejo. En la FIGURA 30.15 se muestra un modelo simplificado de su comportamiento. Los complejos HAT pueden dirigirse al DNA gracias a interacciones con factores de unión al DNA. Esto determina la diana del HAT. El complejo también contiene subunidades detectoras que alteran la estructura de la cromatina o actúan de manera directa sobre la transcripción. Es posible que al menos algunos de los efectores

requieran el episodio de acetilación para actuar. La desacetilación, catalizada por una HDAC, puede actuar en forma similar.

Ocurre acetilación tanto en la replicación (cuando es transitoria) como en la transcripción (cuando se mantiene mientras el gen está activo). ¿Desempeña el mismo papel en cada caso? Una posibilidad es que el efecto importante tenga lugar sobre la estructura del nucleosoma. La acetilación puede ser indispensable para "hacer más laxo" el meollo del nucleosoma. En la replicación tal vez se requiera la acetilación de histonas para permitirles su incorporación a nuevos meollos con más facilidad. Es posible que en la transcripción se necesite un cambio similar para permitir una modificación relativa de la estructura, tal vez incluso permitir el desplazamiento del meollo de la histona del DNA. Otra posibilidad es que la acetilación genere sitios de unión para otras proteínas que se requieren en la transcripción. En cualquier caso, la desacetilación revertiría el efecto.

¿Es cuantitativo o cualitativo el efecto de la acetilación? Es posible que se requiera cierto número de grupos acetilo para ejercer un efecto y en gran medida carece de importancia la posición exacta donde ocurre. Una alternativa es que cada episodio de acetilación tenga efectos específicos. Podría interpretarse que hay complejos que contienen múltiples actividades de HAT en cualquier forma; si diferentes enzimas tienen diversas especificidades, tal vez se requieran múltiples actividades ya sea para acetilar un número suficiente de posiciones diversas o porque se necesitan sucesos individuales para diferentes efectos sobre la transcripción. En la replicación, parece (al menos con respecto a la histona H4) que la acetilación en cualquiera de las dos de tres posiciones disponibles es adecuada, lo que favorece un modelo cuantitativo en este caso. Donde la estructura de la cromatina cambia para modificar la transcripción, la

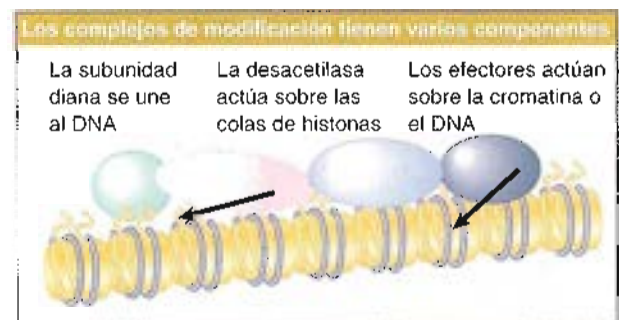


FIGURA 30.15 Los complejos que modifican la estructura o actividad de la cromatina tienen subunidades diana que determinan sus sitios de acción, las enzimas HAT o las HDAC que acetilan o desacetilan histonas y subunidades efectoras que tienen otras acciones sobre la cromatina o el DNA.

acetilación en posiciones específicas es importante (véase la sección 31.3. La heterocromatina depende de las interacciones con histonas).

30.8 Las desacetilasas se relacionan con los represores

Conceptos principales

- La desacetilación se vincula con la represión de la actividad génica.
- Hay desacetilasas presentes en complejos con actividad represora.

En las levaduras, las mutaciones en *SIN3* y *RPD3* actúan como si estos loci reprimieran una diversidad de genes. Las proteínas forman un complejo con la proteína de unión a DNA Ume6, que se une al elemento *URS1*. El complejo reprime la transcripción en los promotores que contienen *URS1*, como se ilustra en la FIGURA 30.16. La Rpd3 tiene actividad de desacetilasa de histonas; no se sabe si la función de Sin3 consiste sólo en llevar Rpd3 al promotor o si tiene alguna otra función en la represión.

Las células de mamíferos tienen un sistema similar para la represión. La familia bHLH de reguladores de la transcripción incluye activadores que actúan como heterodímeros, entre los que se encuentra MyoD (véase la sección 25.15. Las proteínas hélice-asa-hélice interactúan por vínculo combinatorio). También comprende represores, en particular el heterodímero Mad:Max, donde Mad puede pertenecer a un grupo de proteínas muy relacionadas. El heterodímero Mad:Max (que se une a sitios específicos del DNA) interactúa con un homólogo de Sin3 (llamado mSin3 en el ratón y hSin3 en los seres humanos). El mSin3 forma par-

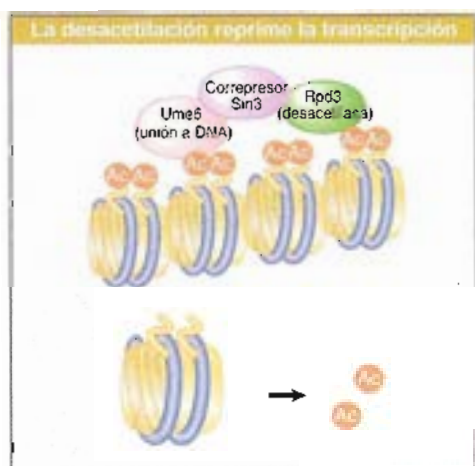


FIGURA 30.16 Un complejo represor tiene tres componentes: una subunidad de unión a DNA, un correpresor y una desacetilasa de histonas.

te de un complejo represivo que incluye proteínas de unión a histonas y las desacetilasas de histonas HDAC1 y HDAC2. Se requiere la actividad de desacetilasa para la represión. La naturaleza modular de este sistema la recalcan otros medios de empleo: un correpresor (SRMT), que permite a los receptores de hormonas retinoides reprimir ciertos genes diana, que actúa por unión a mSin3, que a su vez lleva las actividades de HDAC al sitio. Otro medio de llevar actividades de HDAC al sitio puede ser una conexión con MeCP2, una proteína que se une a citosinas metiladas (véase la sección 24.19. Los islotes CpG son dianas reguladoras).

La falta de acetilación de histonas también es una característica de la heterocromatina, lo que es cierto en el caso de la heterocromatina constitutiva (que, por lo general, incluye regiones de centromeros o telómeros) y la heterocromatina facultativa (regiones que son desactivadas en una célula aunque estén activas en otra). Por lo general, las colas terminales N de las histonas H3 y H4 no están acetiladas en las regiones heterocromáticas.

30.9 Las metilaciones de histonas y de DNA están relacionadas

Conceptos principales

- La metilación de DNA y de histonas es una característica de la cromatina inactiva.
- Los dos tipos de episodios de metilación pueden estar relacionados.

La metilación de histonas y de DNA se vincula con la inactividad. Los sitios metilados en las histonas comprenden dos lisinas en la cola de H3 y una arginina en la cola de H4.

La metilación de la ³Lis de H3 es una característica de las regiones condensadas de cromatina que incluyen la heterocromatina como se observa en su mayor parte y también regiones más pequeñas, que se sabe no tienen expresión. La enzima transferasa de metilos de histonas que actúa en esta lisina se llama SUV39H1. (Se ofrece el origen de este peculiar nombre en la sección 30.13. Algunos segmentos comunes se encuentran en proteínas que modifican la cromatina.) Su sitio catalítico tiene una región llamada dominio SET. Otras transferasas de metilos de histonas actúan sobre la arginina. Además, puede ocurrir metilación en la ⁷⁹Lis de la región central globular de H3, que podría necesitarse para la formación de heterocromatina en los telómeros.

Hasta fecha reciente se creía que la metilación de histonas era irreversible. No obstante, ya se identificaron desmetilasas de histonas, incluida una des-

metilasa específica de lisina (LSD1) que actúa sobre K4 de la histona H3 y una enzima que desmetila la arginina en las histonas H3 y H4. Aun no se sabe como se regula la desmetilación.

Gran parte de los sitios de metilación en el DNA son islotes CpG (véase la sección 24.19, Los islotes CpG son dianas reguladoras). Las secuencias CpG en la heterocromatina por lo general están metiladas. Por el contrario, para que un gen se exprese es indispensable que los islotes CpG localizados en regiones promotoras sean desmetilados (véase la sección 24.18, La expresión génica se vincula con la desmetilación).

La metilación de DNA y de histonas está conectada en un circuito de reforzamiento mutuo. La metilación de H3 es la señal que recluta la metilasa del DNA hacia la cromatina. El orden de los episodios es que la ⁹Lis de H3 se desacetila para crear un sustrato para la metilación. La H3 se convierte entonces al estado de Me⁹Lis o Me₃⁹Lis, que ofrece un sitio de unión para la metilasa de DNA. Algunas enzimas transferasas de metilos de histonas contienen sitios posibles de unión para el par CpG metilado, de manera que la metilación del DNA refuerza el circuito con el fin de brindar una diana para que la transferasa de metilos de histonas se una. El punto importante es que un tipo de modificación puede desencadenar el otro. Estos sistemas están muy generalizados, como se observa por las pruebas de estas conexiones en hongos, plantas y células animales, y de la regulación de la transcripción en los promotores usados por las polimerasas I y II de RNA, así como el mantenimiento de la heterocromatina en un estado inerte.

30.10 Los estados de la cromatina se interconvierten por modificación

Conceptos principales

- La acetilación de histonas se relaciona con la activación génica.
- La metilación de DNA y de histonas se relaciona con la heterocromatina.

En la FIGURA 30.17 se resumen los tres tipos de diferencias observadas entre las cromatinas activa e inactiva.

- La cromatina activa se acetila en las colas de las histonas H3 y H4.
- La cromatina inactiva se metila en la ⁹Lys de la histona H3.
- La cromatina inactiva se metila en las citosinas de los pares CpG.

El tipo contrario de episodios tiene lugar cuando se compara la activación de un promotor con la generación de heterocromatina. Las acciones de las enzimas que modifican la cromatina aseguran que los sucesos de activación sean mutuamente excluyentes con respecto a los de desactivación. La metilación de ⁹Lis de H3 y la acetilación de ¹¹Lis de H3 son mutuamente antagonistas.

Las acetilasas y desacetilasas pueden desencadenar los episodios iniciadores. La desacetilación permite que ocurra la metilación, lo que da lugar a la formación de un complejo heterocromático (véase la sección 31.3, La heterocromatina depende de interacciones con las histonas). La acetilación marca una región como activa (véase la sección 30.11, La activación del promotor comprende una serie ordenada de episodios).

30.11 La activación del promotor comprende una serie ordenada de episodios

Conceptos principales

- El complejo de remodelado puede reclutar al complejo de acetilación.
- La acetilación de histonas puede ser el suceso que mantenga al complejo en estado activado.

¿Cómo se reclutan las acetilasas (o desacetilasas) en sus dianas específicas? Como se ha observado con los complejos de remodelado, es posible que el proceso sea indirecto. Un activador (o represor)

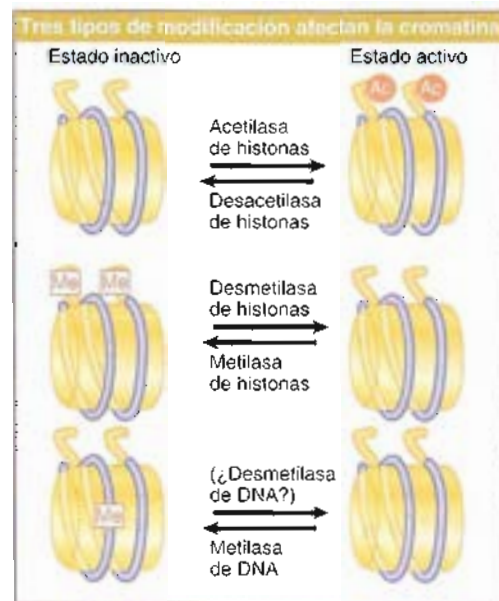


FIGURA 30.17 La acetilación de las histonas activa la cromatina, y la metilación de DNA y las histonas la desactiva.

específico de secuencia puede interactuar con un componente del complejo de la acetilasa (o desacetilasa) para reclutar un promotor.

Puede haber también interacciones directas entre complejos de remodelado y complejos de modificación de histonas. La unión por el complejo de remodelado SWI/SNF puede llevar a su vez a la unión por el complejo de acetilasa SAGA. Luego, la acetilación de histonas puede, de hecho, estabilizar el vínculo con el complejo SWI/SNF, lo que hace un reforzamiento mutuo de los cambios de los componentes en el promotor.

Se pueden conectar todos los sucesos que tienen lugar en el promotor a la serie resumida en la FIGURA 30.18. El episodio de iniciación es la unión de

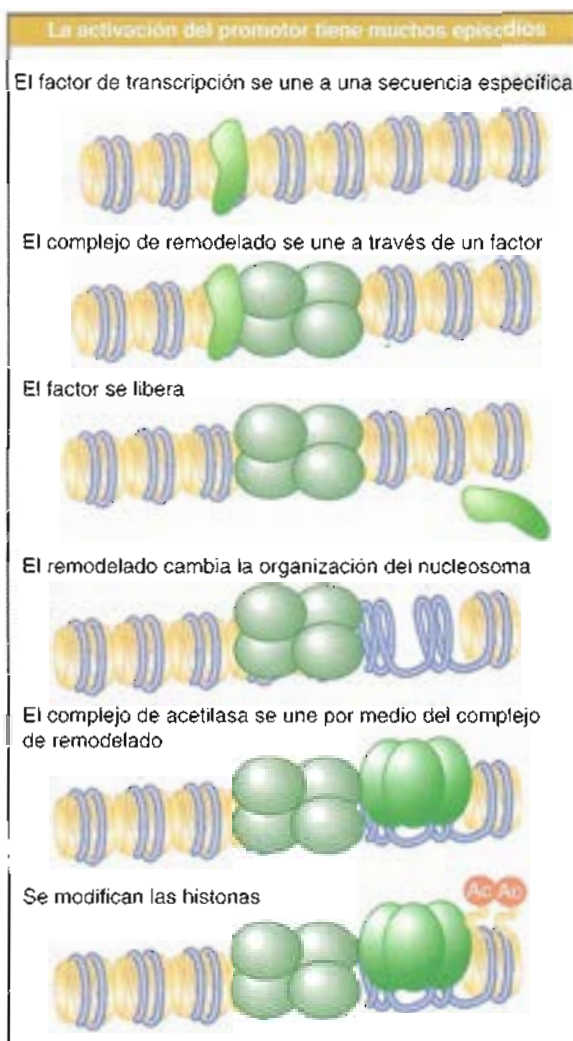


FIGURA 30.18 La activación del promotor comprende la unión de un activador específico de secuencia, el reclutamiento y la acción de un complejo de remodelado, y el reclutamiento y la acción de un complejo de acetilación. El orden de los episodios puede diferir, o tal vez se presenten de manera simultánea, de acuerdo con el gen.

un componente específico de secuencia (que puede hallar su secuencia diana en el DNA en el contexto de la cromatina), lo que recluta un complejo de remodelado. Los cambios ocurren en la estructura del nucleosoma. Un complejo de acetilación se une y la acetilación de las histonas diana provee una marca covalente de que el sitio se ha activado.

También ocurre modificación del DNA en el promotor. La metilación de la citosina en pares CpG se vincula con la inactividad génica (véase la sección 24.18. La expresión génica se relaciona con la desmetilación). La base para el reconocimiento del DNA como diana de la metilación no está muy bien esclarecida (véase sección 31.8. La metilación del DNA se encarga de la impresión).

Es claro que el remodelado de la cromatina en el promotor requiere una diversidad de cambios que afectan el nucleosoma, incluida la acetilación, pero, ¿qué cambios se requieren dentro del gen para que una polimerasa de RNA lo atraviese? Se sabe que la polimerasa de RNA puede transcribir el DNA *in vitro* a velocidades parecidas a la velocidad *in vivo* (~25 nucleótidos por segundo), sólo con un molde de DNA libre. Se han descrito varias proteínas por su capacidad para mejorar la velocidad con que la polimerasa de RNA transcribe la cromatina *in vivo*. La característica común es que actúan sobre la cromatina. Un modelo actual de su acción es que se asocian a la polimerasa de RNA y viajan con ella a lo largo del molde, lo que modifica la estructura del nucleosoma por su acción sobre las histonas. Entre estos factores están las acetilasas de histonas. Una posibilidad, es que la primera polimerasa de RNA en transcribir un gen sea la pionera de los factores de acarreo de la polimerasa que cambien la estructura de la unidad de transcripción, para hacer más fácil la actuación de las polimerasas posteriores.

30.12 La fosforilación de las histonas afecta la estructura de la cromatina

Concepto principal

- Al menos dos histonas son dianas para la fosforilación, tal vez con efectos contrarios.

Las histonas se fosforilan en dos circunstancias:

- de manera repetida en el ciclo celular, y
- en relación con el remodelado de la cromatina.

Se ha sabido durante mucho tiempo que la histona H1 es fosforilada durante la mitosis y en fecha más reciente se descubrió que constituye un sustra-

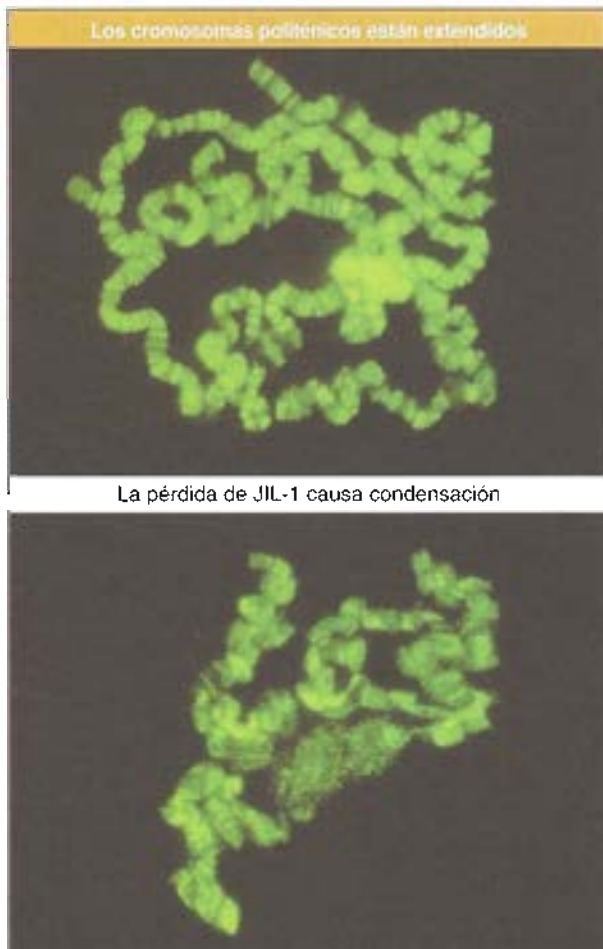
to muy bueno para la cinasa Cdc2, que controla la división celular. Ello llevó a la especulación de que la fosforilación tal vez se relacione con la condensación de la cromatina, pero hasta ahora no se ha demostrado un efecto directo de este episodio de fosforilación y no se sabe si tiene participación en la división celular.

La pérdida de una cinasa que fosforila la histona H3 en la ¹⁰Ser tiene efectos devastadores sobre la estructura de la cromatina. En la **FIGURA 30.19** se compara la estructura extendida usual del conjunto de cromosomas politénicos de la *Drosophila melanogaster* (fotografía superior) con la estructura que se observa en una mutante nuclear que no tiene cinasa JIL-1 (fotografía inferior). La ausencia de JIL-1 es letal, pero los cromosomas pueden visualizarse en las larvas antes de su muerte.

La causa de la pérdida de la estructura es con toda probabilidad la falta de fosforilación de la his-

tona H3 (por supuesto, JIL-1 puede tener también otras dianas). Esto permite suponer que se requiere la fosforilación de H3 para generar la estructura cromosómica más extendida de las regiones eucromáticas. La prueba que sustenta la idea de que JIL-1 actúa de manera directa sobre la cromatina es que se relaciona con el complejo de proteínas que se une al cromosoma X para aumentar su expresión génica en machos (véase la sección 31.5, Los cromosomas X sufren cambios globales).

Esto deja algunas impresiones contradictorias respecto de la función de la fosforilación de las histonas. Si tiene importancia en el ciclo celular, es posible que sea una señal para la condensación. Su efecto sobre el remodelado de la cromatina parece ser el contrario. Por supuesto, es posible que la fosforilación de diferentes histonas o incluso de diferentes aminoácidos en una de ellas, tenga efectos contrarios sobre la estructura de la cromatina.



La pérdida de JIL-1 causa condensación

FIGURA 30.19 Las moscas que no tienen JIL-1 cinasa presentan cromosomas politénicos anormales que se condensan en lugar de extenderse. Las fotografías son cortesía de Jorgen Johansen y Kristen M. Johansen, Iowa State University.

30.13 Se encuentran algunos segmentos comunes en las proteínas que modifican la cromatina

Conceptos principales

- El dominio cromo se encuentra en varias proteínas de la cromatina que tienen efectos de activación o represión sobre la expresión de los genes.
- El dominio SET es parte del sitio catalítico de las transferasas de metilos de proteínas.
- El dominio bromo se encuentra en una diversidad de proteínas que interactúan con la cromatina y sirve para reconocer sitios acetilados en las histonas.

Los conocimientos que se tienen sobre los mecanismos moleculares del control de la estructura de la cromatina se inician con mutantes que influyen en el efecto de la variegación de la posición. Se han identificado casi 30 genes en el género *Drosophila* y se denominan de manera sistemática *Su(var)* aquellos cuyos productos actúan suprimiendo la variación y *E(var)* aquellos cuyos productos la aumentan. Recuérdese que los genes se nombran por la conducta de los loci mutantes. Las mutaciones de *Su(var)* yacen en genes cuyos productos son necesarios para la formación de la heterocromatina e incluyen enzimas que actúan sobre la cromatina, como las desacetilasas de histonas, y las proteínas que se localizan en la heterocromatina. Las mutaciones *E(var)* yacen en genes cuyos productos son indispensables para activar la expresión génica e in-

cluyen miembros del complejo SWI/SNF. Por estas propiedades se infiere de inmediato que la modificación de la estructura de la cromatina es importante para controlar la formación de heterocromatina. La universalidad de estos mecanismos la indica el hecho de que muchos de estos loci tienen homólogos en levaduras que muestran propiedades análogas. Algunos de los homólogos en *Schizosaccharomyces pombe* son *clr* (genes reguladores de loci crípticos) donde las mutaciones afectan el silenciamiento.

Muchas de las proteínas Su(var) y E(var) tienen un segmento común de 60 aminoácidos llamado cromodominio o dominio cromo. El hecho de que este dominio se encuentre en proteínas de ambos grupos permite suponer que representa un segmento que participa en las interacciones proteína-proteína en la cromatina.

Los cromodomínios se encargan en gran parte de dirigir las proteínas hacia la heterocromatina. Actúan por reconocimiento de lisinas metiladas en colas de histonas (véase la sección 31.3, La heterocromatina depende de interacciones con las histonas y la sección 31.4, Polycomb y Trithorax son represores y activadores antagonistas).

La Su(var)3-9 tiene un cromodominio y también un Su(var)3-9, un dominio potenciador de gusto Trithorax (SET), segmento que se encuentra en varias proteínas Su(var). Sus homólogos en mamíferos se localizan en la heterocromatina del centrómero. Es la transferasa de metilos de histonas la que

actúa sobre ^3Lis de la histona H3 (véase la sección 30.9, La metilación de histonas y de DNA están relacionadas). El dominio SET es parte del sitio activo y, de hecho, es marcador de la actividad de metilasa.

El bromodominio o dominio bromo se encuentra en una diversidad de proteínas que interactúan con la cromatina, como las acetilasas de histonas. La estructura cristalina muestra que tiene un sitio de unión para la lisina acetilada. El bromodominio mismo reconoce sólo una secuencia muy corta de cuatro aminoácidos que incluye la lisina acetilada, por lo que la especificidad para el reconocimiento del sitio diana debe depender de interacciones que abarquen ambas regiones. Además de las acetilasas, el bromodominio se encuentra en una variedad de proteínas que interactúan con la cromatina, como los componentes del aparato de transcripción. Esto indica que se utiliza para reconocer histonas acetiladas, lo que significa que tal vez se encuentre en proteínas que participan en la activación génica.

Aunque hay una correlación general donde la cromatina activa se acetila, en tanto la inactiva es metilada en las histonas, hay algunas excepciones a la regla. La mejor definida es que la acetilación de ^{12}Lis de H4 se vincula con la heterocromatina.

Puede haber modificaciones múltiples en la misma cola de histona y una puede influir en otra. La fosforilación de una serina en una posición puede ser necesaria para la acetilación de una lisina en otra.

La FIGURA 30.20 muestra la situación en la cola de H3, que puede existir en uno de dos estados. El estado inactivo tiene una ^3Lis metilada. El estado activo tiene una ^3Lis acetilada y una ^{10}Ser fosfatada. Estos estados se pueden mantener sobre regiones amplias de la cromatina. La fosforilación de ^{10}Ser y la metilación de ^3Lis son mutuamente inhibitorias, lo que sugiere el orden de episodios que se muestra en la figura. Esta situación puede hacer que la cola se mueva entre los estados activo e inactivo.

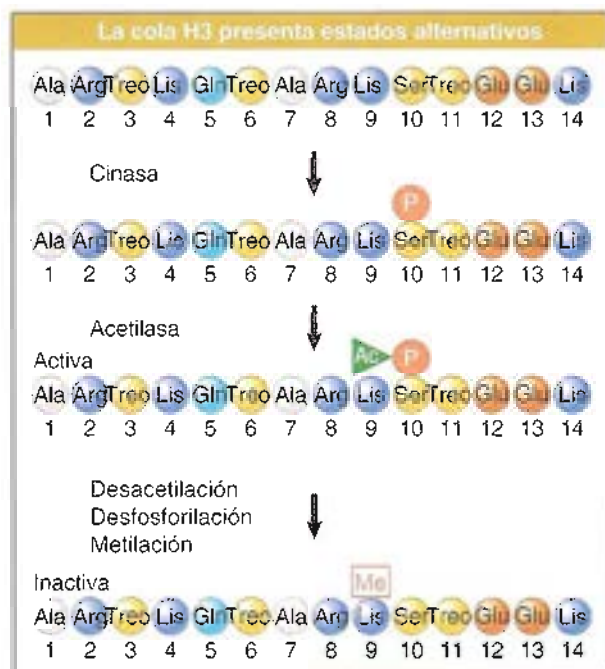


FIGURA 30.20 Las múltiples modificaciones en la cola H3 afectan la actividad de la cromatina.

30.14 Resumen

Los genes cuyas regiones de control se organizan en los nucleosomas por lo general no se expresan. En ausencia de proteínas reguladoras específicas, los promotores de otras regiones reguladoras se organizan por octámeros de histonas en un estado en el que no pueden activarse. Esto puede explicar la necesidad de los nucleosomas de ubicarse de manera precisa en la vecindad de un promotor, de manera que los sitios reguladores indispensables se expongan en forma apropiada. Algunos factores de transcripción tienen la capacidad de reconocer

el DNA en la superficie del nucleosoma y puede requerirse un posicionamiento particular del DNA para la iniciación de la transcripción.

Las cromatinas activa e inactiva no están en equilibrio. Se requieren episodios súbitos de escisión para convertir una en la otra. Los complejos de remodelado de la cromatina tienen la capacidad de desplazar octámeros de histonas por un mecanismo que comprende la hidrólisis de ATP. Los complejos de remodelado son grandes y se clasifican de acuerdo con el tipo de subunidad de fosfatasa del trifosfato de adenosina. Dos tipos frecuentes son SWI/SNF e ISWI. Una forma característica de este remodelado de la cromatina es desplazar uno o más de los octámeros de histonas de secuencias específicas del DNA, creando un límite que da como resultado el posicionamiento preciso o preferente de los nucleosomas cercanos. El remodelado de la cromatina puede también comprender cambios en las posiciones de los nucleosomas, que a veces implican el deslizamiento de los octámeros de histonas por el DNA.

La acetilación de histonas tiene lugar tanto en la replicación como en la transcripción y en ocasiones es necesaria para formar una estructura de cromatina menos compacta. Algunos coactivadores que conectan factores de transcripción con el aparato basal tienen actividad de acetilasas de histonas. Por el contrario, los represores pueden vincularse con desacetilasas.

Las enzimas modificantes pueden ser específicas de aminoácidos particulares en histonas específicas. Los sitios más frecuentes de modificación se localizan en las colas terminales N de las histonas H3 y H4 que protruyen desde los nucleosomas entre los giros del DNA. Los complejos de activación (o represión) suelen ser grandes y a menudo contienen varias actividades que emprenden diferentes modificaciones de la cromatina. Algunos segmentos comunes que se encuentran en las proteínas que modifican la cromatina son el cromodominio (que se encarga de las interacciones proteína-proteína), el bromodominio (que se dirige a la lisina acetilada) y el dominio SET (que es parte de los sitios activos de las transferasas de metilos de las histonas).

La modificación de las colas de histonas constituye un desencadenante de la reorganización de la cromatina. La acetilación en general se vincula con la activación génica. Las acetilasas de histonas se encuentran en complejos de activación, y las desacetilasas de histonas en complejos de inactivación. La metilación de las histonas se vincula con la inactivación génica. Algunas de las modificaciones de las histonas pueden ser exclusivas o sinérgicas con otras.

Referencias

30.2 La cromatina puede tener estados alternativos

Artículos de revisión

- Brown, D. D. (1984). The role of stable complexes that repress and activate eukaryotic genes. *Cell* 37, 359-365.
- Weintraub, H. (1985). Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states. *Cell* 42, 705-711.

Artículos de investigación

- Bogenhagen, D. F., Wormington, W. M., and Brown, D. D. (1982). Stable transcription complexes of *Xenopus* 5S RNA genes: a means to maintain the differentiated state. *Cell* 28, 413-421.
- Workman, J. L. and Roeder, R. G. (1987). Binding of transcription factor TFIIID to the major late promoter during *in vitro* nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. *Cell* 51, 613-622.

30.3 El remodelado de la cromatina es un proceso activo

Artículos de revisión

- Becker, P. B. and Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 247-273.
- Felsenfeld, G. (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355, 219-224.
- Grunstein, M. (1990). Histone function in transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 643-678.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.
- Peterson, C. L. and Côté, J. (2004). Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev.* 18, 602-616.
- Tsukiyama, T. (2002). The *in vivo* functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 422-429.
- Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell Biol.* 20, 1899-1910.

Artículos de investigación

- Cairns, B. R., Kim, Y.-J., Sayre, M. H., Laurent, B. C., and Kornberg, R. (1994). A multisubunit complex containing the SWI/ADR6, SWI2/1, SWI3, SNF5, and

- SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1950–1954.
- Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L., and Peterson, C. L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265, 53–60.
- Gavin, L., Horn, P. J., and Peterson, C. L. (2001). SWI/SNF chromatin remodeling requires changes in DNA topology. *Mol. Cell* 7, 97–104.
- Hamiche, A., Kang, J. G., Dennis, C., Xiao, H., and Wu, C. (2001). Histone tails modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14316–14321.
- Kingston, R. E. and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13, 2339–2352.
- Kwon, H., Imbazzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E., and Green, M. R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding of human SWI/SNF complex. *Nature* 370, 477–481.
- Logie, C. and Peterson, C. L. (1997). Catalytic activity of the yeast SWI/SNF complex on reconstituted nucleosome arrays. *EMBO J.* 16, 6772–6782.
- Lorch, Y., Cairns, B. R., Zhang, M., and Kornberg, R. D. (1998). Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell* 94, 29–34.
- Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R. D. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96, 389–392.
- Peterson, C. L. and Herskowitz, I. (1992). Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 68, 573–583.
- Robert, F., Young, R. A., and Struhl, K. (2002). Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome remodeling complex. *Genes Dev.* 16, 806–819.
- Schnitzler, G., Sif, S., and Kingston, R. E. (1998). Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell* 94, 17–27.
- Tamkun, J. W., Deuring, R., Scout, M. P., Kissinger, M., Pattanucci, A. M., Kaufman, T. C., and Kennison, J. A. (1992). *brhma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68, 561–572.
- Tsukiyama, T., Daniel, C., Tamkun, J., and Wu, C. (1995). ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell* 83, 1021–1026.
- Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C. C., Shiloach, J., and Wu, C. (1999). Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* 13, 686–697.
- Whitehouse, L., Flaus, A., Cairns, B. R., White, M. F., Workman, J. L., and Owen-Hughes, T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400, 784–787.

30.4 La organización de los nucleosomas puede cambiar en el promotor

Artículo de revisión

- Lohr, D. (1997). Nucleosome transactions on the promoters of the yeast *GAL* and *PHO* genes. *J. Biol. Chem.* 272, 26795–26798.

Artículos de investigación

- Cosma, M. P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299–311.
- Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A., and Emerson, B. M. (2000). Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* 14, 2441–2451.
- McPherson, C. E., Shim, E.-Y., Friedman, D. S., and Zaret, K. S. (1993). An active tissue-specific enhancer and bound transcription factors existing in a precisely positioned nucleosomal array. *Cell* 75, 387–398.
- Schmid, V. M., Fascher, K.-D., and Horz, W. (1992). Nucleosome disruption at the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction occurs in the absence of DNA replication. *Cell* 71, 853–864.
- Truss, M., Barstch, J., Schelbert, A., Ilache, R. J. G., and Beato, M. (1994). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vitro*. *EMBO J.* 14, 1737–1751.
- Tsukiyama, T., Becker, P. B., and Wu, C. (1994). ATP-dependent nucleosome disruption at a heat shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 367, 525–532.
- Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S., and Peterson, C. L. (1999). Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* 13, 2369–2374.

30.5 La modificación de las histonas es un episodio clave

Artículo de revisión

- Jenuwein, T. and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.

Artículo de investigación

Osada, S., Sulton, A., Muster, N., Brown, C. E., Yates, J. R., Sternglanz, R., and Workman, J. L. (2001). The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions with chromatin assembly factor ASF1. *Genes Dev.* 15, 3155–3168.

30.6 Ocorre acetilación de histonas en dos circunstancias

Artículos de revisión

Hirose, Y. and Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 14, 1415–1429.

Verreault, A. (2000). De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* 14, 1430–1438.

Artículos de investigación

Akhtar, A. and Becker, P. B. (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol. Cell* 5, 367–375.

Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyl-oxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5350–5354.

Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N., and Chalkley, R. (1976). Modifications to histones immediately after synthesis. *J. Mol. Biol.* 104, 471–483.

Ling, X., Harkness, T. A., Schultz, M. C., Fisher-Adams, G., and Grunstein, M. (1996). Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly *in vivo* and *in vitro*: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev.* 10, 686–699.

Shibahara, K., Verreault, A., and Stillman, B. (2000). The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor-1-mediated nucleosome assembly onto replicated DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7766–7771.

Turner, B. M., Birley, A. J., and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69, 375–384.

30.7 Las acetilasas se vinculan con activadores

Artículos de revisión

Brownell, J. E. et al. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homologue to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843–851.

Chen, H. et al. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CP/p300. *Cell* 90, 569–580.

Grant, P. A. et al. (1998). A subset of TAFIIs are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* 94, 45–53.

Kingston, R. E. and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13, 2339–2352.

Lee, T. I., Causton, H. C., Holsiege, F. C., Shen, W. C., Hannett, N., Jennings, E. G., Winston, F., Green, M. R., and Young, R. A. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* 405, 701–704.

30.8 Las desacetilasas se relacionan con represores

Artículos de revisión

Richards, E. J., Elgin, S. C., and Richards, S. C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489–500.

Artículos de investigación

Ayer, D. E., Lawrence, Q. A., and Eisenman, R. N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80, 767–776.

Kadosh, D. and Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 89, 365–371.

Schreiber-Agus, N., Chin, L., Chen, K., Torres, R., Rao, G., Guida, P., Skoultschi, A. I., and DePinho, R. A. (1995). An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell* 80, 777–786.

30.9 Las metilaciones de histonas y de DNA están relacionadas

Artículos de revisión

Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature* 436, 1103–1106.

Richards, E. J., Elgin, S. C., and Richards, S. C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108, 489–500.

Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343–2360.

Artículos de investigación

Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545–553.

Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P., and Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* 278, 4035–4040.

Gendrel, A. V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V., and Martienssen, R. A. (2002). Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene DDM1. *Science* 297, 1871–1873.

Johnson, L., Cao, X., and Jacobsen, S. (2002). Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr. Biol.* 12, 1360–1367.

Lawrence, R. J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z. J., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C. S. (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell* 13, 599–609.

Ng, H. H., Feng, Q., Wang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Zhang, Y., and Struhl, K. (2002). Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev.* 16, 1518–1527.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Sun, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Cole, P. A., and Casero, R. A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941–953.

Tamaru, H. and Selker, E. U. (2001). A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414, 277–283.

Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P. B., Nakayama, J., Grewal, S. I., Allis, C. D., Cheng, X., and Selker, E. U. (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* 34, 75–79.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, J. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y., et al. (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminium. *Science* 306, 279–283.

30.11 La activación del promotor comprende una serie ordenada de episodios

Artículo de revisión

Orphanides, G. and Reinberg, D. (2000). RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* 407, 471–475.

Artículos de investigación

Bortvin, A. and Winston, F. (1996). Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* 272, 1473–1476.

Cosma, M. P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299–311.

Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* 104, 817–827.

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S., and Reinberg, D. (1998). FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105–116.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., Buratovski, S., and Handa, H. (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev.* 12, 343–356.

30.12 La fosforilación de las histonas afecta la estructura de la cromatina

Artículo de investigación

Wang, Y., Zhang, W., Jin, Y., Johansen, J., and Johansen, K. M. (2001). The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell* 105, 433–443.

30.13 Se encuentran algunos segmentos comunes en las proteínas que modifican a la cromatina

Artículos de investigación

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromo domain. *Nature* 399, 491–496.

Koonin, E. V., Zhou, S., and Lucchesi, J. C. (1995). The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Res.* 23, 4229–4233.

Litt, M. D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C. D., and Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* 293, 2453–2455.

Owen, D. J., Ornaghi, P., Yang, J. C., Lowe, N., Evans, P. R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A. A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromo domain of histone acetyltransferase Gcn5p. *EMBO J.* 19, 6141-6149.

Turner, B. M., Birley, A. J., and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69, 375-384.

Los efectos epigenéticos son heredados

ESQUEMA DEL CAPÍTULO

31.1 Introducción

- Los efectos epigenéticos pueden ser consecuencia de la modificación de un ácido nucleico después de que se ha sintetizado o de la perpetuación de estructuras proteínicas.

31.2 La heterocromatina se propaga a partir de un episodio de nucleación

- La heterocromatina es nucleada en una secuencia específica y la estructura inactiva se propaga por la fibra de cromatina.
- Los genes dentro de las regiones de heterocromatina están inactivos.
- La longitud de la región inactiva varía de una célula a otra; como resultado, la desactivación de genes en esta vecindad causa un efecto de posición abigarrado.
- Ocurren efectos de dispersión similares en los tetómeros y los cartuchos silentes en el tipo de apareamiento de las levaduras.

31.3 La heterocromatina depende de interacciones con las histonas

- La HP1 es la proteína clave en la formación de la heterocromatina de mamífero y actúa por unión a la histona H3 metilada.
- La Rap1 inicia la formación de la heterocromatina en levaduras por unión a secuencias diana específicas en el DNA.
- Las dianas de Rap1 incluyen repeticiones teloméricas y silenciadores en *HML* y *HMR*.
- La Rap1 recluta Sir3/Sir4 que interactúan con las colas terminales N de H3 y H4.

31.4 Polycomb y Trithorax son represores y activadores antagonistas

- Las proteínas del grupo Polycomb (Pc-C) perpetúan un estado de represión por medio de las divisiones celulares.
- El PRE es una secuencia del DNA indispensable para la acción de Pc-G.
- El PRE constituye un centro de nucleación a partir del cual las proteínas Pc-G propagan una estructura inactiva.
- No se ha encontrado una proteína Pc-G individual que pueda unirse a PRE.
- El grupo de proteínas Trithorax antagoniza la acción de Pc-G.

31.5 Los cromosomas X experimentan cambios globales

- Uno de los dos cromosomas X se desactiva al azar en cada célula durante la embriogénesis de los mamíferos euterios.
- En casos excepcionales donde hay más de dos cromosomas X, todos, excepto uno, están desactivados.

- El *Xic* (centro de desactivación de X) es una región de actuación en configuración *cis* en el cromosoma X, necesaria y suficiente para asegurar que sólo un cromosoma X permanezca activo.
- El *Xic* incluye al gen *Xist* que codifica un RNA que se encuentra sólo en cromosomas X inactivos.
- Se desconoce el mecanismo encargado de prevenir que el RNA *Xist* se acumule en el cromosoma activo.

31.6 Las condensinas producen la condensación de los cromosomas

- Las proteínas SMC son fosfatasa del trifosfato de adenosina que incluyen condensinas y cohesinas.
- Un heterodímero de las proteínas SMC se vincula con otras subunidades.
- Las condensinas hacen que la cromatina de enrolle en forma más estrecha por la introducción de superhélices positivas al DNA.
- Las condensinas se encargan de condensar los cromosomas durante la mitosis.
- Las condensinas específicas de cromosomas se encargan de condensar cromosomas X inactivos en *C. elegans*.

31.7 Una metilasa de mantenimiento perpetúa la metilación del DNA

- Casi todos los grupos metilo del DNA se encuentran en las citosinas de ambas cadenas del par CpG.
- La replicación convierte un sitio por completo metilado en uno hemimetilado.
- Una metilasa de mantenimiento convierte los sitios hemimetilados en metilados por completo.

31.8 La metilación del DNA se encarga de la impresión

- Los alelos materno y paterno pueden tener diferentes patrones de metilación en la fecundación.
- La metilación suele vincularse con la desactivación del gen.
- Cuando los genes tienen impresión diferencial, la supervivencia de los embriones puede requerir que el alelo funcional sea provisto por el progenitor con el alelo no metilado.
- La supervivencia de heterocigotos para genes impresos es diferente, de acuerdo con la dirección del cruce.
- Los genes impresos se presentan en grupos y pueden depender de un sitio de control local, donde ocurre metilación nueva, a menos que se evite de manera específica.

31.9 Un solo centro puede controlar los genes con impresión opuesta

- Los genes impresos son controlados por la metilación de sitios de acción en configuración *cis*.

- La metilación pueden encargarse de desactivar o activar un gen.

31.10 Los efectos epigenéticos pueden heredarse

- Los efectos epigenéticos pueden derivarse de una modificación de un ácido nucleico después de que se ha sintetizado, o por la perpetuación de estructuras proteínicas.

31.11 Los priones de levaduras muestran herencia desusada

- La proteína Sup35 en su forma soluble de tipo silvestre es un factor de terminación de la traducción.
- También puede existir en una forma alternativa de agregados oligoméricos, donde no es activa para la síntesis de proteínas.
- La presencia de una forma oligomérica hace que la proteína recién sintetizada adquiera la estructura inactiva.
- La conversión entre las dos formas recibe la influencia de los chaperones.
- La forma de tipo silvestre tiene el estado genético recesivo *psi⁻* y la forma mutante tiene el estado genético dominante *PSI⁺*.

31.12 Los priones causan enfermedades en los mamíferos

- La proteína que causa encefalopatía espongiforme ovina tiene dos formas de presentación: la PrP^C no infecciosa de tipo silvestre, susceptible a las proteasas, y la PrP^{Sc} que causa enfermedad y es resistente a las proteasas.
- La enfermedad neuroiógica se puede transmitir a los ratones mediante la inyección de la proteína PrP^{Sc} purificada.
- El ratón receptor debe tener una copia del gen *PrP* que codifica la proteína de ratón.
- La proteína PrP^{Sc} puede autoperpetuarse y hacer que la proteína PrP, recién sintetizada, adopte la forma de PrP^{Sc} en lugar de la forma PrP^C.
- Múltiples cepas de PrP^{Sc} pueden tener diferentes conformaciones proteínicas.

31.13 Resumen

31.1 Introducción

Concepto principal

- Los efectos epigenéticos pueden ser consecuencia de la modificación de un ácido nucleico después de que se ha sintetizado o de la perpetuación de estructuras proteínicas.

La herencia **epigenética** describe la posibilidad de que diferentes estados, que pueden tener diferentes consecuencias fenotípicas, se hereden sin ningún cambio en la secuencia del DNA. Esto significa que dos individuos con la misma secuencia de DNA en el locus que controla el efecto pueden mostrar diferentes fenotipos. La causa básica de este fenómeno es la existencia de una estructura autoperpetuante en uno de los individuos, que no depende de la secuencia de DNA. Varios tipos diferentes de estructuras tienen la capacidad de presentar efectos epigenéticos:

- Una modificación covalente del DNA (metilación de una base).
- Una estructura proteínica que se ensambla con el DNA.
- Un agregado proteínico que controla la conformación de las nuevas subunidades según se sintetizan.

En cada caso, el estado epigenético es resultado de una diferencia en la función (por lo general inactivación) determinada por la estructura.

En el caso de la metilación del DNA, una secuencia metilada puede no transcribirse, en tanto una no metilada se expresará. La **FIGURA 31.1** muestra cómo se hereda esta circunstancia. Un alelo tiene

una secuencia metilada en ambas cadenas del DNA, en tanto el otro tiene una secuencia no metilada. La replicación del alelo metilado crea cadenas hijas hemimetiladas que recuperan el estado metilado gracias a la intervención de una enzima metilasa.

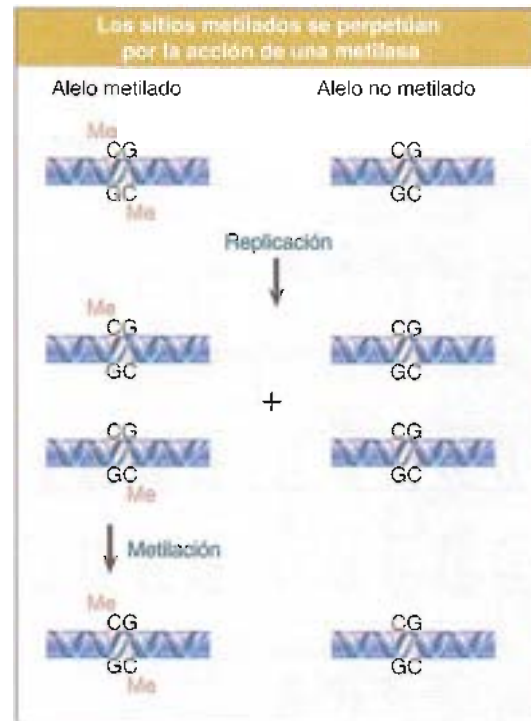


FIGURA 31.1 La replicación de un sitio metilado produce DNA hemimetilado, donde sólo una cadena progenitora está metilada. Una metilasa de perpetuación reconoce los sitios hemimetilados y añade un grupo metilo a la base en la cadena hija, lo que restablece la situación original donde el sitio está metilado en ambas cadenas. Un sitio no metilado se mantiene sin metilar después de la replicación.

constitutivamente activa. La replicación no afecta el estado del alelo no metilado. Si el estado de metilación afecta la transcripción, los dos alelos difieren en su estado de expresión génica aunque sus secuencias sean idénticas.

Las estructuras autopropagantes que se ensamblan en el DNA suelen tener un efecto represor al formar regiones heterocromáticas que impiden la expresión de genes en su interior. Su perpetuación depende de la capacidad de las proteínas en una región heterocromática de mantenerse unidas a esas regiones después de la replicación y luego de reclutar más subunidades proteínicas para sostener al complejo. Si cada una de las subunidades se distribuye al azar en cada par de cadenas hijas durante la replicación, las dos seguirán marcadas por la proteína, aunque su densidad disminuya a la mitad de la concentración previa a la replicación. La FIGURA 31.2 muestra que la existencia de efectos epigenéticos obliga a pensar que una proteína encargada de tal circunstancia debe tener algún tipo de capacidad de automoldeado o autoensamblado capaz de restablecer el complejo original.

Puede ser el estado de modificación de la proteína más que su presencia *en sí*, el encargado de un efecto epigenético. Por lo general, las colas de las histonas H3 y H4 no están acetiladas en la heterocromatina constitutiva. Sin embargo, si la heterocromatina del centrómero está acetilada, los genes silenciados

tal vez se tornen activos. El efecto tal vez se perpetúe durante la mitosis y meiosis, lo que permite suponer que se ha creado un efecto epigenético al cambiar del estado de acetilación de las histonas.

Los agregados de proteínas independientes que causan efectos epigenéticos (llamados **priones**), actúan por secuestro de la proteína en una forma en la que no puede mostrar su función normal. Una vez que se forma el agregado de proteínas, obliga a las nuevas subunidades de proteína a unirse en conformación inactiva.

31.2 La heterocromatina se propaga a partir de un episodio de nucleación

Conceptos principales

- La heterocromatina es nucleada en una secuencia específica y la estructura inactiva se propaga por la fibra de cromatina.
- Los genes dentro de las regiones de heterocromatina se encuentran inactivos
- La longitud de la región inactiva varía de una célula a otra; como resultado, la desactivación de genes en esta vecindad causa un efecto de posición abigarrado.
- Ocurren efectos de dispersión similares en los telómeros y los cartuchos silentes en el tipo de apareamiento de las levaduras.

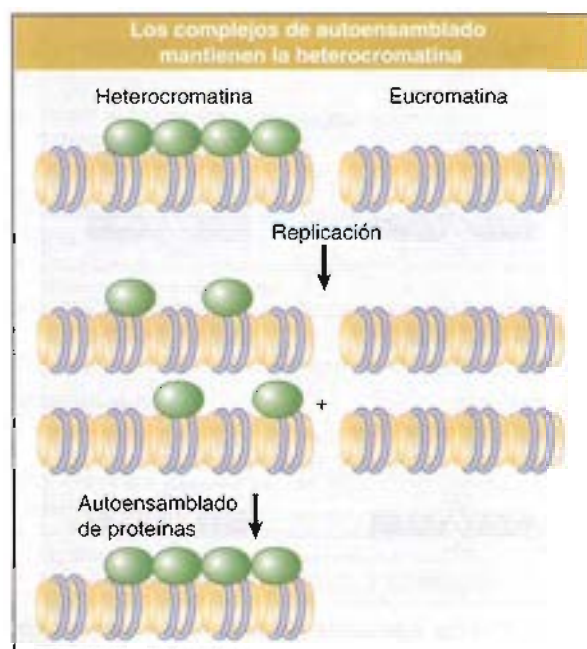


FIGURA 31.2 La heterocromatina está formada por proteínas que se vinculan con histonas. La perpetuación por medio de la división requiere que la proteína se relacione con cada par de cadenas hijas y luego reclute nuevas subunidades para volver a ensamblar los complejos represivos.

Un núcleo de interfase contiene eucromatina y heterocromatina. El estado de condensación para la heterocromatina es similar al de los cromosomas en la mitosis. La heterocromatina es inerte. Permanece condensada en la interfase, tiene represión transcripcional, se replica de manera tardía en la fase S y puede localizarse en la periferia del núcleo. La heterocromatina centromérica consta, por lo general, de DNA satélite; sin embargo, la formación de heterocromatina no se define en forma rigurosa por la secuencia. Cuando se transfiere un gen, ya sea por translocación cromosómica o por transfección e integración, hacia una posición cercana a la heterocromatina, puede tornarse inactivo como resultado de su nueva localización, lo que indica que se ha convertido en heterocromático.

Tal desactivación es resultado de un efecto **epigenético** (véase la sección 31.10. Los efectos epigenéticos pueden ser heredados). Puede diferir entre células individuales en un animal y da como resultado el fenómeno del **efecto de posición abigarrado (PEV)**, donde células idénticas en términos genéticos tienen diferentes fenotipos, lo que se ha descrito bien en el género *Drosophila*. La FIGURA 31.3 muestra un ejemplo del efecto de posición abigarrado.

do en el ojo de la mosca. Algunas regiones del ojo carecen de color, en tanto otras son rojas debido a que el gen *blanco* en alguna región fue desactivado por la heterocromatina cerana en unas células, pero se mantuvo activo en otras.

La explicación de este efecto se muestra en la FIGURA 31.4. La desactivación se expande desde la heterocromatina hacia la región adyacente una distancia variable. En algunas células llega bastante lejos para desactivar un gen cercano, pero en otras no lo hace. Esto ocurre en un cierto momento del desarrollo embrionario, después del cual todas las células de la progenie heredan ese estado del gen. Las células que provienen de un ancestro donde el gen estaba inactivo forman parches que corresponden al fenotipo con pérdida de función (en el caso de *blanco*, ausencia de color).

Cuanto más cerca esté un gen de la heterocromatina, mayor probabilidad habrá que sea inactivo. Esto permite suponer que la formación de la heterocromatina puede ser un proceso de dos etapas: ocurre un episodio de *nucleación* en una secuencia específica y después la estructura inactiva *se propaga* por la fibra de cromatina. La distancia hasta la que se extiende la estructura inactiva no está determinada de manera precisa y pudiese ser aleatoria, con la influencia de parámetros como las cantidades de componentes de proteínas limitantes. Un factor que puede afectar el proceso de dispersión es la activación de los promotores en la región; un promotor activo puede inhibir la dispersión.

Los genes que están más cerca de la heterocromatina tienen mayor probabilidad de ser desactivados y, por tanto, serán inactivos en un mayor porcentaje de células. En este modelo, es posible que los límites de una región heterocromática terminen por el agotamiento del aporte de una de las proteínas que se requiere.

El efecto de **silenciamiento telomérico** en levaduras es análogo del efecto de posición abigarrado en el género *Drosophila*; los genes translocados a una ubicación telomérica muestran la misma clase de pérdida variable de actividad. Esto se debe a un efecto de dispersión que se propaga desde los telómeros.

Una segunda forma de silenciamiento tiene lugar en las levaduras. El tipo de apareamiento de las levaduras lo determina la actividad de un solo locus activo (*MAT*), pero el genoma contiene otras dos copias de las secuencias de tipo de apareamiento (*HML* y *HMR*), que permanecen inactivas. Los loci *HML* y *HMR* comparten muchas propiedades con la heterocromatina y podrían considerarse regiones constituyentes de la heterocromatina en miniatura (véase la sección 19.22. Los cartuchos silentes en *HML* y *HMR* están reprimidos).



FIGURA 31.3 Ocurre el efecto de posición abigarrado en el color del ojo cuando el gen *blanco* se integra cerca de la heterocromatina. Las células donde ese gen es inactivo producen parches blancos en el ojo, en tanto las células donde es activo producen parches rojos. La gravedad del efecto depende de la cercanía del gen integrado a la heterocromatina. Fotografía por cortesía de Steven Henikoff, Fred Hutchinson Cancer Research Center.

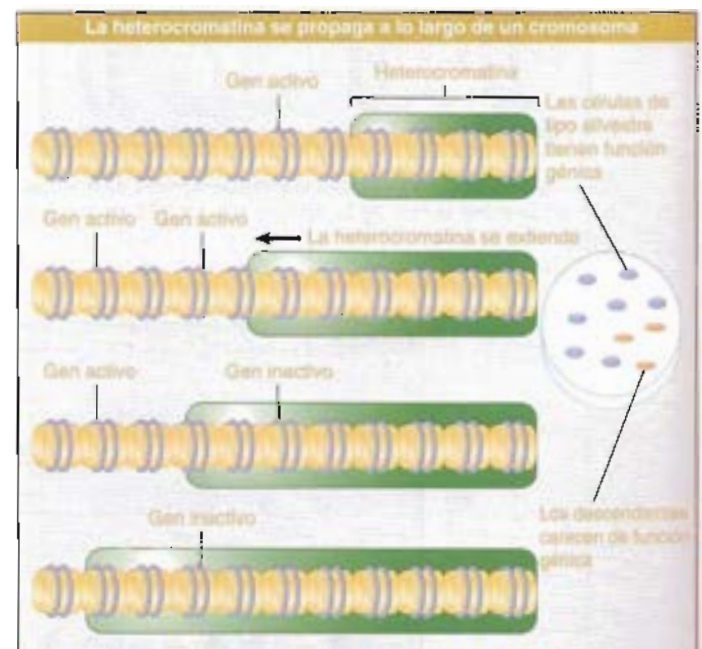


FIGURA 31.4 La extensión de la heterocromatina desactiva los genes. La probabilidad de que un gen se desactive depende de la distancia que lo separa de la región de heterocromatina.

31.3 La heterocromatina depende de interacciones con las histonas

Conceptos principales

- La HP1 es la proteína clave en la formación de la heterocromatina de mamífero y actúa por unión a la histona H3 metilada.
- La Rap1 inicia la formación de la heterocromatina en levaduras por unión a secuencias diana específicas en el DNA.
- Las dianas de Rap1 incluyen repeticiones teloméricas y silenciadores en *HML* y *HMR*.
- La Rap1 recluta a Sir3/Sir4, que interactúan con las colas terminales N de H3 y H4.

La desactivación de la cromatina tiene lugar cuando se agregan proteínas a la fibra nucleosómica. La desactivación puede deberse a una diversidad de efectos que incluyen la condensación de la cromatina para hacerla inaccesible al aparato necesario para la expresión génica, la adición de proteínas que bloquean de manera directa el acceso a los sitios re-

guladores o proteínas que inhiben en forma directa la transcripción.

Dos sistemas que se han descrito en términos moleculares son HP1 en los mamíferos y el complejo SIR en las levaduras. Aunque no hay similitudes detalladas entre las proteínas comprendidas en cada sistema, el mecanismo general de reacción es similar: los puntos de contacto en la cromatina son colas terminales N de histonas.

La HP1 (proteína 1 de la heterocromatina) es una de las proteínas *Su(var)* más importantes, identificada en un principio como una proteína que se localiza en la heterocromatina mediante la tinción de cromosomas politénicos con un anticuerpo dirigido contra la proteína. Después se demostró que puede ser producto del gen *Su(var)2-5*. Su homóloga en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* es codificada por *swi6*. La proteína original identificada como HP1 hoy se denomina HP1 α debido a que desde entonces se han encontrado dos proteínas relacionadas, HP1 β y HP1 γ .

La HP1 contiene un cromodominio cerca del extremo N y otro relacionado con él, llamado dominio de sombra crómica, en el extremo C (véase la Figura 31.6); la importancia del cromodominio queda de manifiesto por el hecho de que es la localización de muchas de las mutaciones de HP1.

La mutación de una desacetilasa que actúa sobre Ac-¹⁴Lis de H3 impide la metilación en ³Lis. La H3 que está metilada en ³Lis se une a la proteína HP1 gracias a un cromodominio. Esto sugiere el modelo para iniciar la formación de la heterocromatina que se muestra en la FIGURA 31.5. Primero, la desacetilasa actúa para retirar la modificación en ¹⁴Lis y luego la metilasa SUV39H1 actúa sobre la cola de la histona H3 para crear la señal metilada a la que se unirá HP1. La FIGURA 31.6 amplía la reacción para mostrar que la interacción tiene lugar entre el cromodominio y la lisina metilada, que constituye un desencadenante para la formación de cromatina

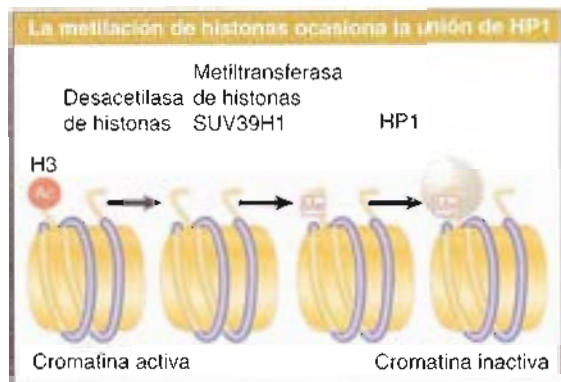


FIGURA 31.5 La SUV39H1 es una metiltransferasa de histonas que actúa sobre la ³Lis de la histona H3. La HP1 se une a la histona metilada.



FIGURA 31.6 La metilación de la histona H3 crea un sitio de unión para HP1.

inactiva. La **FIGURA 31.7** muestra que la región inactiva puede entonces extenderse por la capacidad de otras moléculas de HP1 de interactuar entre sí.

Se puede suponer la existencia de una base común para el silenciamiento en las levaduras porque depende de un conjunto común de *loci* genéticos. Las mutaciones de cualquiera de un número de genes causan activación de *HML* y *HMR* y también alivian la desactivación de genes que se han integrado cerca de la heterocromatina telomérica. Por lo tanto, los productos de estos *loci* actúan para mantener un estado inactivo de ambos tipos de heterocromatina.

En la **FIGURA 31.8** se propone un modelo para las acciones de estas proteínas. Sólo una de ellas es una proteína de unión a DNA específica de secuencia. Se trata de RAP1, que se une a las repeticiones $C_{1,3}A$ en los telómeros, y también a los elementos del silenciador de acción en configuración *cis* que se requieren para la represión de *HML/HMR*. Las proteínas Sir3 y Sir4 interactúan con Rap1 y también entre sí (pueden actuar como un heteromultímero). Las Sir3/Sir4 interactúan con las colas terminales N de las histonas H3 y H4. (De hecho, la primera prueba de la posibilidad de que las histonas tengan una función directa en la formación de la heterocromatina provino del descubrimiento de que las mutaciones suprimen el silenciamiento en el mapeco de los genes *HML/HMR* que codifican H3 y H4).

La Rap1 tiene la participación crucial de identificar las secuencias del DNA donde se forma la heterocromatina. Recluta Sir3/Sir4 e interactúa de manera directa con las histonas H3/H4. Una vez que Sir3/Sir4 se han unido a las histonas H3/H4, el complejo puede polimerizarse aun más y dispersarse a lo largo de la fibra de cromatina. Esto puede desactivar la región, ya sea porque la cobertura misma con Sir3/Sir4 tiene un efecto inhibitorio, o porque la unión a las histonas H3/H4 induce algún otro cambio en la estructura. No se sabe qué limita la dispersión del complejo. El extremo C de Sir3 tiene similitud con las proteínas de la lámina nuclear (constituyentes de la matriz nuclear) y tal vez se encargue de apuntalar la heterocromatina en la periferia nuclear.

Una serie similar de sucesos forma las regiones silenciadas en *HML* y *HMR* (véase también la sección 19.22, Los cartuchos silentes en *HML* y *HMR* están reprimidos). Tres factores específicos de secuencia participan en el desencadenamiento de la formación del complejo: Rap1, Abf1 (un factor de transcripción) ORC (el complejo de replicación en el origen). En este caso, Sir1 se une a un factor específico de secuencia y recluta a Sir2, -3 y -4, para formar la estructura represiva. La Sir2 es una desacetilasa de histonas. La reacción de desacetilación es indispensable para mantener la unión del complejo Sir a la cromatina.

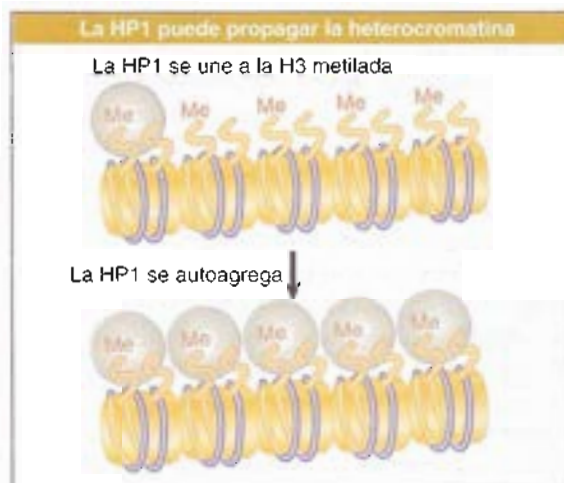


FIGURA 31.7 La unión de HP1 a la histona H3 metilada forma un desencadenante del silenciamiento porque se agregan más moléculas de HP1 a la cadena del nucleosoma.

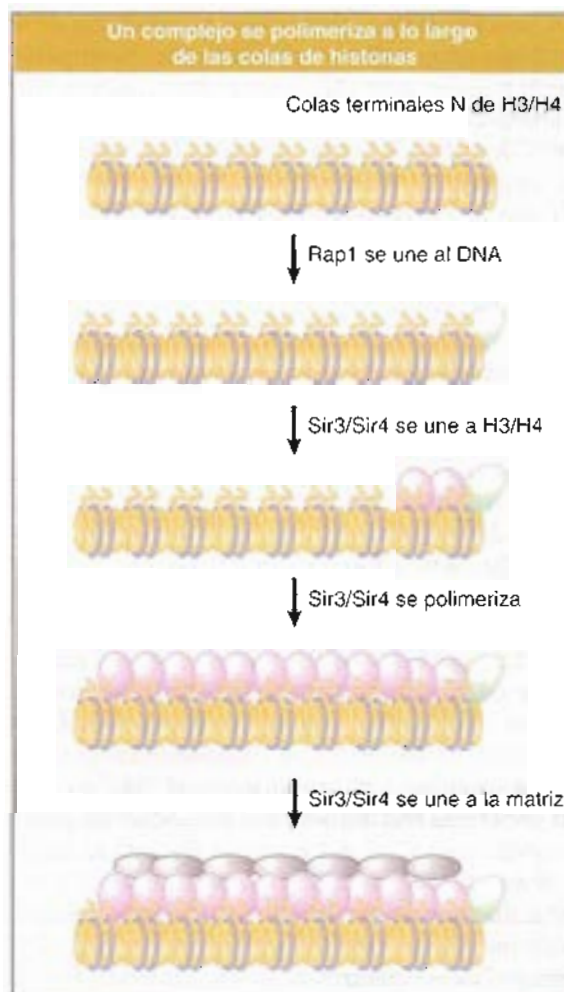


FIGURA 31.8 La formación de la heterocromatina se inicia cuando Rap1 se une al DNA. Sir3/4 se une a Rap1 y también a las histonas H3/H4. El complejo se polimeriza a lo largo de la cromatina y puede conectar telómeros a la matriz nuclear.

La formación de la heterocromatina en la levadura *S. pombe* depende de un complejo que contiene varias moléculas de RNAi (véase la sección 13.10, El RNA de interferencia tiene relación con el silenciamiento de los genes). Estas moléculas de RNAi se producen por la transcripción de repeticiones centroméricas para dar RNA que son fragmentados en unidades más pequeñas. El complejo también contiene proteínas que son homólogas de las que intervienen en la formación de la heterocromatina en otros organismos, como Argonaute, que contribuye a dirigir los complejos de remodelado del complejo de silenciamiento inducido de RNA (RISC) hacia la cromatina. Los componentes RNAi se encargan de localizar el complejo en el centrómero. A continuación, el complejo facilita la dimetilación de la histona H3 por una metiltransferasa de histonas.

¿Cómo reprime un complejo de silenciamiento la actividad de la cromatina? Es posible que condense la cromatina de manera que las proteínas reguladoras no puedan encontrar sus dianas. Lo más sencillo sería suponer que la presencia de un complejo silenciador es mutuamente incompatible con la presencia de factores de transcripción y polimerasa de RNA. La causa podría ser que los complejos de silenciamiento impidan el remodelado (y así, impidan de manera indirecta que los factores se unan) o que oculten de forma directa los sitios de unión a los factores de transcripción en el DNA. Sin embargo, la situación tal vez no sea tan simple puesto que se pueden encontrar factores de transcripción y polimerasa de RNA en promotores en la cromatina silenciada. Es posible que esto signifique que el complejo silenciador impide que los factores actúen, no que se unan. De hecho, puede haber competencia entre activadores génicos y los efectos represores de la cromatina, de modo que la activación de un promotor inhibe la dispersión de un complejo silenciador.

Otra estructura especializada de la cromatina se forma en el centrómero. Su naturaleza se deduce por las propiedades de una mutación en *Saccharomyces cerevisiae*, *cse4*, que altera la estructura del centrómero. La Cse4 es una proteína relacionada con la histona H3. Una proteína centromérica de mamífero, la proteína A del centrómero (CENP-A), tiene una secuencia relacionada. Las interacciones genéticas entre *cse4* y CDE-II y entre *cse4* de una mutación en el gen de la histona H4 permiten suponer que se puede formar un octámero de histonas alrededor de un meollo de Cse4-H4 y después, los complejos centroméricos (factores de unión medular) CBF1 y CBF3 pueden unirse para formar el centrómero.

Entonces, el centrómero puede vincularse con la formación de heterocromatina en la región. En las células humanas se requiere la proteína específica

del centrómero, CENP-B, para iniciar modificaciones de la histona H3 (desacetilación de ³Lis y ¹⁴Lis, seguida de la metilación de ⁹Lis) que desencadenan un vínculo con la proteína Swi6 que conduce a la formación de heterocromatina en la región.

31.4

Polycomb y Trithorax son represores y activadores antagonistas

Conceptos principales

- Las proteínas del grupo Polycomb (Pc-G) perpetúan un estado de represión gracias a las divisiones celulares.
- El PRE es una secuencia del DNA que se requiere para la acción de Pc-G.
- El PRE constituye un centro de nucleación a partir del cual las proteínas Pc-G propagan una estructura inactiva.
- No se ha encontrado una proteína Pc-G individual que pueda unirse a PRE.
- Las proteínas del grupo Trithorax antagonizan las acciones de Pc-G.

La heterocromatina ofrece un ejemplo de la represión específica de la cromatina. Otro lo brinda la genética de los genes homeóticos en el género *Drosophila*, que condujo a la identificación de un complejo proteínico que parece mantener ciertos genes en un estado reprimido. Las mutantes *Pc* muestran transformaciones de tipo celular que son equivalentes a las mutaciones de ganancia de función en los genes *Antennapedia (Antp)* o *Ultrabithorax*, debido a que estos genes se expresan en tejidos donde por lo general estén reprimidos. Esto implica a *Pc* en la regulación de la transcripción. Es más, *Pc* es el prototipo de una clase de ~15 loci llamado grupo *Pc (Pc-G)*; las mutaciones en estos genes por lo general tienen el mismo resultado de eliminar la represión de los genes homeóticos, lo que sugiere la posibilidad de que el grupo de proteínas tenga alguna función reguladora común.

Las proteínas Pc actúan en grandes complejos. El PRC1 (complejo represor Polycomb) contiene la Pc misma, varias otras proteínas Pc-G y cinco factores generales de transcripción. El complejo Esc-E(z) contiene Esc, E(z), otras proteínas Pc-G, una proteína de unión a histonas y una desacetilasa de histonas. La Pc misma tiene un cromodominio que se une a la H3 metilada, y E(z) es una metiltransferasa que actúa sobre H3. Estas propiedades sustentan de manera directa la conexión entre el remodelado de la cromatina y la represión, insinuada en un principio por las propiedades de *brahma*, una contraparte de *SWI2* en la mosca. El gen *brahma* codifica un componente del complejo de remodelado SWI/SNF,

y la pérdida de la función de *brahma* suprime las mutaciones en *Polycomb*.

En concordancia con la pleiotropía de las mutaciones de *Pc*, la *Pc* es una proteína nuclear que puede visualizarse en ~80 sitios de cromosomas politénicos, que incluyen el gen *Antp*. Otro miembro del *Pc-G*, *polihoméotico* se visualiza como un conjunto de bandas cromosómicas politénicas idénticas a las que se une *Pc*. Las dos proteínas se coinmunoprecipitan de manera simultánea en un complejo de $\sim 2.5 \times 10^6$ D que contiene de 10 a 15 polipéptidos. Aún no se establece la relación entre estas proteínas y los productos de los ~30 genes *Pc-G*. Una posibilidad es que algunos de estos productos génicos formen un complejo represor general y después algunas de las otras proteínas se vinculen para determinar su especificidad.

Las proteínas *Pc-G* no son represores convencionales. No se encargan de determinar el patrón inicial de expresión de los genes donde actúan. En ausencia de las proteínas *Pc-G* estos genes en un inicio están reprimidos, como es lo habitual, pero más tarde en el desarrollo se pierde la represión sin que el grupo *Pc-G* funcione. Esto permite suponer que las proteínas *Pc-G* de alguna forma reconocen el estado de represión cuando se establece y después actúan para perpetuarlo durante la división de las células hijas. La FIGURA 31.9 muestra un modelo donde las proteínas *Pc-G* se unen en conjunción con un represor, pero las proteínas *Pc-G* se mantienen unidas después de que ya no está disponible el represor, algo que es necesario para mantener la represión, de manera que si las proteínas *Pc-G* están ausentes, el gen se activa.

Una región de DNA que es suficiente para permitir la respuesta a los genes *Pc-G* se llama PRE (elemento de respuesta *Polycomb*). Se puede definir en términos de su funcionamiento por su propiedad de mantener la represión en su vecindad durante el desarrollo. El análisis de un PRE consiste en insertarlo cerca de un gen reportero controlado por un potenciador que está reprimido en las primeras etapas del desarrollo y después determinar si el reportero se expresa subsecuentemente en la descendencia. Un PRE eficaz evitará tal reexpresión.

El PRE es una estructura compleja que mide ~10 kb. Se han identificado dos proteínas, *Pho* y *Pho1*, con actividad de unión al DNA en sitios dentro del PRE, pero puede haber otras. No obstante, cuando un locus es reprimido por *Pc-G*, las proteínas *Pc-G* ocupan una longitud mucho mayor del DNA que el PRE mismo. La *Pc* se encuentra localmente sobre unas cuantas kilobases del DNA que rodea a una PRE.

Esto hace pensar que el PRE puede ofrecer un centro de nucleación a partir del cual se propague un estado estructural dependiente de las proteínas

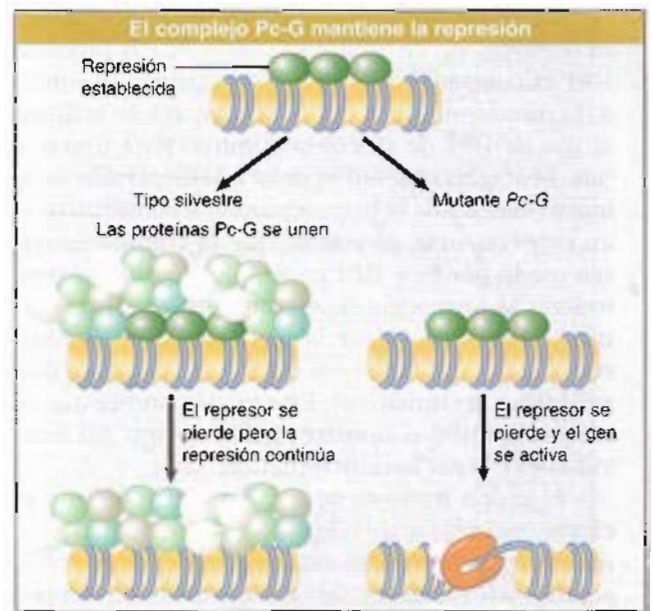


FIGURA 31.9 Las proteínas *Pc-G* no inician la represión, pero se encargan de mantenerla.

Pc-G. Este modelo se sustenta en la observación de efectos relacionados con el efecto de posición abigarrado (véase la Figura 31.4), esto es, un gen cerca de un locus cuya represión es mantenida por *Pc-G* puede desactivarse de manera hereditaria en algunas células, pero no en otras. En una circunstancia característica, los experimentos de enlace cruzado *in vivo* mostraron que la proteína *Pc-G* se encuentra sobre grandes regiones del complejo *bithorax* que están inactivas, pero se excluye la proteína de las regiones que contienen genes activos. La idea de que eso podría deberse a interacciones colaboradoras con un complejo multimérico es respaldada por la existencia de mutaciones en *Pc* que cambian su distribución nuclear y suprimen la posibilidad de que otros miembros de *Pc-G* se localicen en el núcleo. La función de las proteínas *Pc-G* en el mantenimiento de la represión, en contraposición con su establecimiento, debe significar que la formación del complejo en PRE también depende del estado local de la expresión génica.

Las propiedades de las proteínas individuales hacen pensar en un modelo de actuación para la unión de *Pc-G* a un PRE. En primer término, *Pho* y *Pho1* se unen a secuencias específicas dentro del PRE. Se recluta *Esc-E(z)* a *Pho/Pho1*; después, se utiliza su actividad de metiltransferasa para metilar la ^{27}Lis de la histona H3. Esto crea un sitio de unión para PRC porque el cromodominio de *Pc* se une a la lisina metilada. El complejo *Polycomb* induce una estructura más compacta en la cromatina; cada complejo PRC1 ocasiona que unos tres nucleosomas se hagan menos accesibles.

De hecho, el cromodominio se identificó primero como región de homología entre Pc y la proteína HP1 encontrada en la heterocromatina. La unión del cromodominio de Pc a ²⁷Lis en H3 es análoga al uso de HP1 de su cromodominio para unirse a ⁹Lis. El abigarramiento se debe a la dispersión de la inactividad desde la heterocromatina constitutiva y, en consecuencia, es posible que el cromodominio sea usado por Pc y HP1 en una forma similar para inducir la formación de estructuras heterocromáticas o inactivas (véase la sección 30.13, Algunos segmentos comunes se encuentran en proteínas que modifican la cromatina). Este modelo indica que se usan mecanismos similares para reprimir *loci* individuales o crear heterocromatina.

El grupo *trithorax* de proteínas (*trxG*) tiene el efecto contrario al de las proteínas Pc-G: actúa para mantener los genes en estado activo. Puede haber algunas semejanzas en las acciones de los dos grupos de proteínas: las mutaciones en algunos *loci* impiden el funcionamiento de Pc-G y *trxG*, lo que permite suponer que tal vez dependan de componentes comunes. El factor GAGA que es codificado por el gen *similar a trithorax* tiene sitios de unión en PRE. De hecho, los sitios donde se unen las Pc-G al DNA coinciden con los sitios donde se une el factor GAGA.

¿Qué significa esto? Tal vez se requiera GAGA para que los factores de activación, incluidos los miembros de *trxG*, se unan al DNA. ¿Se necesita también para que las proteínas Pc-G se unan y ejerzan represión? Todavía no se ha aclarado esto, pero tal modelo exigiría que, además de GAGA, algo más determinara cuál de los tipos alternativos de complejo se ensambla después al sitio.

31.5 Los cromosomas X experimentan cambios globales

Conceptos principales

- Uno de los dos cromosomas X se desactiva al azar en cada célula durante la embriogénesis en mamíferos euterios.
- En casos excepcionales donde hay más de dos cromosomas X, todos, excepto uno, están desactivados.
- El *Xic* (centro de desactivación de X) es una región de actuación en configuración *cis* en el cromosoma X, necesaria y suficiente para asegurar que sólo un cromosoma X permanezca activo.
- El *Xic* incluye al gen *Xist* que codifica un RNA que se encuentra sólo en cromosomas X inactivos.
- Se desconoce el mecanismo encargado de prevenir que el RNA *Xist* se acumule en el cromosoma activo.

La compensación de dosis cambia la expresión de X			
	Mamíferos	Moscas	Gusanos
	Desactiva un X femenino	Doble expresión de X masculino	La mitad de la expresión de dos X femeninos
X			
X			
X			
Y			

FIGURA 31.10 Se usan medios diferentes de compensación de dosis para hacer equivalente la expresión del cromosoma X en machos y hembras.

El sexo plantea un problema interesante para la regulación génica debido a la variación en el número de cromosomas X. Si se expresaran los genes ligados a X de manera equitativa en cada sexo, las hembras tendrían el doble de cada producto que los machos. La importancia de evitar esta situación la demuestra la presencia de una **compensación de dosis**, que equilibra el grado de expresión de los genes ligados a X en los dos sexos. Los mecanismos usados en diferentes especies se resumen en la **FIGURA 31.10**.

- En los mamíferos, uno de los dos cromosomas X femeninos se desactiva por completo. El resultado es que las mujeres tienen sólo un cromosoma X activo, circunstancia que es igual a la observada en los machos. El cromosoma X activo de las hembras y el cromosoma X único de los machos se expresan en el mismo grado.
- En el género *Drosophila*, la expresión del cromosoma X masculino único se duplica con relación a la expresión de cada cromosoma X femenino.
- En el *Caenorhabditis elegans*, la expresión de cada cromosoma X femenino es de la mitad con relación a la expresión del cromosoma X masculino único.

La característica común de todos estos mecanismos de compensación de dosis es que *el cromosoma entero es diana de la regulación*. Ocurre un cambio global que afecta de manera cuantitativa a todos los promotores en el cromosoma. Se sabe mucho acerca de la desactivación del cromosoma X en hembras de mamíferos, donde todo el cromosoma se torna heterocromático.

Las propiedades dobles de la heterocromatina son su estado condensado y la inactividad vinculada. Se pueden dividir en dos tipos.

- La **heterocromatina constitutiva** contiene secuencias específicas sin función de codificación, que en general incluyen DNA satélite y a menudo se encuentran en los

centrómeros. Estas regiones son invariablemente heterocromáticas por su naturaleza intrínseca.

- La **heterocromatina facultativa** adopta la forma de cromosomas íntegros que son inactivos en un linaje celular aunque se pueden expresar en otros. El ejemplo *por excelencia* es el del cromosoma X de mamíferos. El cromosoma X inactivo se perpetúa en un estado heterocromático, en tanto el cromosoma X activo es parte de la eucromatina. Por tanto, *participan secuencias de DNA idénticas en ambos estados*. Una vez que se ha establecido el estado de inactividad, lo heredan las células descendientes. Éste es un ejemplo de herencia epigenética, porque no depende de la secuencia del DNA.

La manera básica de ver los cromosomas X de la hembra del mamífero proviene de la **hipótesis del X único** planteada en 1961. Los ratones hembra heterocigotos para las mutaciones en el color de la piel ligadas al cromosoma X tienen un fenotipo abigarrado, donde algunas áreas son de tipo silvestre pero otras son producto de mutación. La **FIGURA 31.11** muestra que esto puede explicarse si se desactiva uno de los dos cromosomas X al azar en cada célula de una pequeña población de precursores. Las células donde se desactiva el cromosoma X portador del gen de tipo silvestre dan origen a una progenie que expresa sólo el alelo mutante en el cromosoma activo. Las células derivadas de un precursor donde se desactivó el otro cromosoma tienen un gen silvestre de tipo activo. En el caso del color de la piel, las células derivadas de un precursor particular se mantienen juntas en un parche del mismo color, que crea el patrón de abigarramiento visible. En otros casos, cada una de las células en una población expresará uno u otro de los alelos ligados al cromosoma X; por ejemplo, en heterocigotos para el locus G6PD ligado a X, cualquier eritrocito particular expresa sólo una de las dos formas alélicas. (Ocurre desactivación aleatoria de un cromosoma X en mamíferos euterios. En los marsupiales, la selección es dirigida: siempre el cromosoma X heredado del padre es el que se desactiva.)

La desactivación del cromosoma X en hembras se rige por la **regla n-1**: no obstante, hay muchos cromosomas X y todos, excepto uno, se desactivan. En hembras normales hay, por supuesto, dos cromosomas X, pero en casos excepcionales donde la no disyunción generó un genotipo 3X o mayor, sólo un cromosoma se mantiene activo, lo que hace pensar en un modelo general donde un episodio específico está limitado a un cromosoma X y lo protege de un mecanismo de desactivación que se aplica a todos los demás.

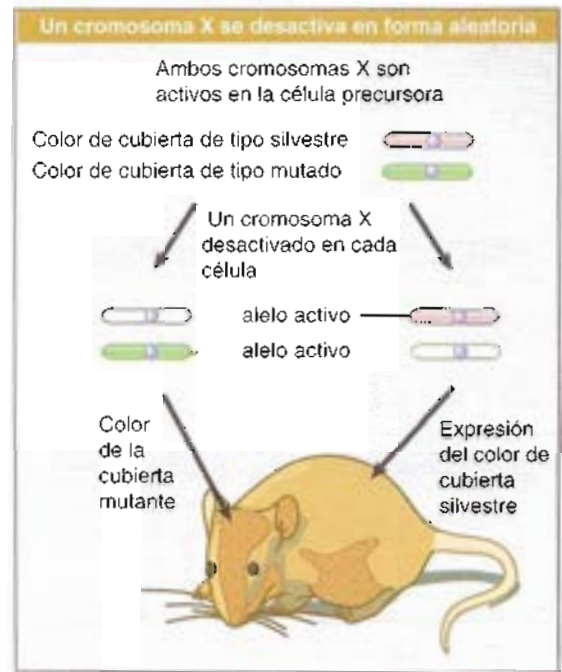


FIGURA 31.11 Se produce abigarramiento ligado a X por la desactivación aleatoria de un cromosoma X en cada célula precursora. Las células donde el alelo + se encuentra en el cromosoma activo tienen un fenotipo silvestre; las células donde el alelo - está en el cromosoma activo presentan el fenotipo mutante.

Un solo locus en el cromosoma X es suficiente para su desactivación. Cuando ocurre una translocación entre el cromosoma X y un autósoma, ese locus está presente en sólo uno de los productos recíprocos y es el único que puede desactivarse. Cuando se comparan diferentes translocaciones es posible ubicar este locus denominado *Xic* (centro de desactivación de X). Una región clonada de 450 kb contiene todas las propiedades del *Xic*. Cuando esta secuencia se inserta como transgén en un autósoma, éste se ve sujeto a desactivación (en un sistema de cultivo celular).

El *Xic* es un locus que actúa en configuración *cis* y contiene la información necesaria para contar los cromosomas X y desactivar todas sus copias excepto una. La desactivación procede desde *Xic* por todo el cromosoma X. Cuando *Xic* está presente en una translocación cromosoma X-autósoma, la desactivación se extiende a las regiones autosómicas (aunque el efecto no siempre es completo).

El locus *Xic* contiene un gen llamado *Xist* que se expresa sólo en el cromosoma X inactivo. La conducta de ese gen es en efecto la opuesta a la de todos los demás loci en el cromosoma, que están apagados. La delección de *Xist* impide que se desactive un cromosoma X. Sin embargo, no interfiere con el mecanismo de recuento (porque otros cromosomas X

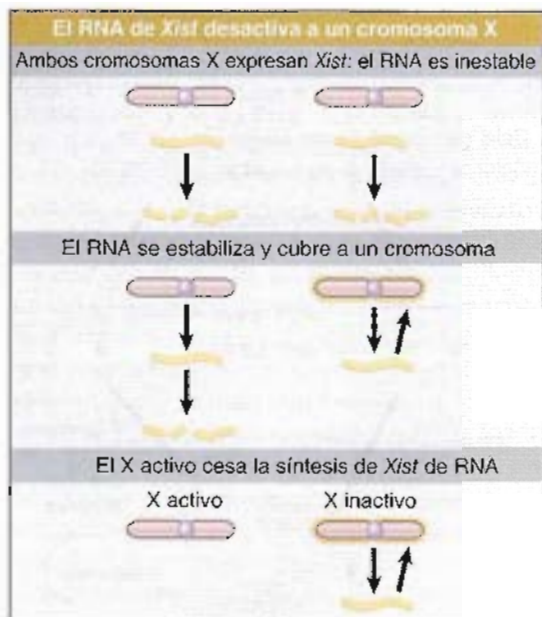


FIGURA 31.12 La desactivación de X comprende la estabilización del RNA de *Xist*, que cubre al cromosoma inactivo.

pueden desactivarse). De este modo, se pueden distinguir dos características de *Xic*: uno o varios elementos no identificados necesarios para el recuento y un gen *Xist* requerido para la desactivación.

En la **FIGURA 31.12** se ilustra la función del RNA y el gen *Xist* en la desactivación del cromosoma X. El gen *Xist* codifica un RNA que carece de un marco de lectura abierto. El RNA *Xist* "cubre" al cromosoma X a partir del cual fue sintetizado, lo que permite suponer que tiene una actividad estructural. Antes de la desactivación de X, es sintetizado por ambos cromosomas X femeninos. Después de la desactivación, el RNA se encuentra sólo en el cromosoma X inactivo. La tasa de transcripción se mantiene igual antes y después de la desactivación, por lo que la transición depende de los episodios que tienen lugar después de la transcripción.

Antes de la desactivación de X, el RNA *Xist* decae con una vida media de casi 2 h. La desactivación de X es mediada por la estabilización del RNA *Xist* sobre el cromosoma X inactivo. El RNA *Xist* muestra una distribución puntiforme a lo largo del cromosoma X, lo que permite suponer que el medio de estabilización puede ser el vínculo con proteínas que forman estructuras particulares. No se sabe aún si otros factores pueden participar en esta reacción y cómo el RNA *Xist* se limita a la dispersión en configuración *cis* por el cromosoma. Las características especiales del cromosoma X inactivo, que incluyen una falta de acetilación de una histona H4 y metilación de las secuencias CpG (véase la sección 24.19. Los islotes CpG son dianas reguladoras), al parecer

surgen más tarde como parte del mecanismo de desactivación.

La regla n-1 sugiere que la estabilización del RNA *Xist* está "predeterminada" y que algún mecanismo de bloqueo impide la estabilización en un cromosoma X (que será el X activo). Esto significa que, si bien *Xic* es necesario y suficiente para *desactivar* un cromosoma, los productos de otros *loci* pueden ser necesarios para el establecimiento de un cromosoma X activo.

El silenciamiento de la expresión de *Xist* es indispensable para el X activo. La delección del gen de la metiltransferasa del DNA impide el silenciamiento de *Xist*, tal vez porque es necesaria la metilación en el promotor *Xist* para que cese la transcripción.

31.6 Las condensinas producen la condensación de los cromosomas

Conceptos principales

- Las proteínas SMC son fosfatasa del trifosfato de adenosina, que incluyen condensinas y cohesinas.
- Un heterodímero de las proteínas SMC se vincula con otras subunidades.
- Las condensinas hacen que la cromatina se enrolle en forma más estrecha por la introducción de superhélices positivas al DNA.
- Las condensinas se encargan de condensar los cromosomas en la mitosis.
- Las condensinas específicas de cromosomas se encargan de condensar cromosomas X inactivos en *C. elegans*.

Las estructuras de cromosomas enteros reciben la influencia de las interacciones con proteínas de la familia de **SMC (de mantenimiento estructural de cromosomas)**. Hay fosfatasa del trifosfato de adenosina que entran en dos grupos funcionales. Las **condensinas** participan en el control de la estructura global y se encargan de condensar cromosomas compactos durante la mitosis. Las **cohesinas** participan en las conexiones entre cromátides hermanas que deben liberarse en la mitosis. Ambas constan de dímeros formados por proteínas SMC. Las condensinas forman complejos que tienen un meollo del heterodímero SMC2-SMC4 vinculado con otras proteínas (no SMC). Las cohesinas tienen una organización similar basada en el meollo heterodimérico de SMC1-SMC3.

En la **FIGURA 31.13** se muestra que una proteína SMC tiene una estructura enrollada en el centro, que es interrumpida por una región de bisagra flexible. Tanto los extremos amino como carboxilo tienen segmentos de unión a ATP y DNA. Se han

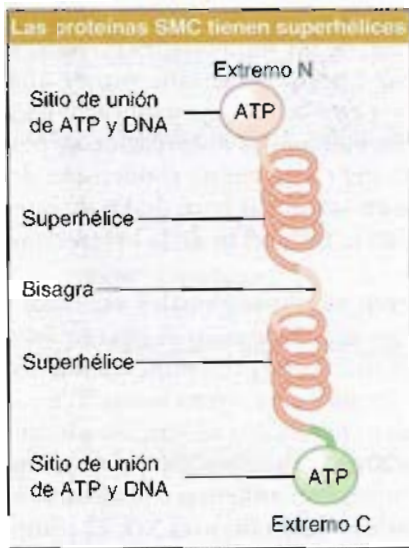


FIGURA 31.13 Una proteína SMP tiene un "módulo Walker" con un segmento de unión a ATP y uno de unión a DNA en sus extremos, que se conectan por medio de superhélices enlazadas por una región de bisagra.

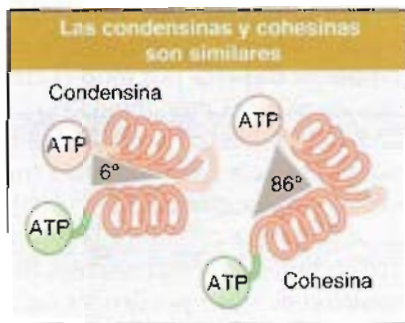


FIGURA 31.14 Las dos mitades de una condensina se pliegan hacia atrás en un ángulo de 6° . Las cohesinas tienen una conformación más abierta, con un ángulo de 86° entre las dos mitades.

propuesto diferentes modelos para las acciones de estas proteínas, dependiendo de que se dimericen por interacciones intra o intermoleculares.

Los experimentos con homólogos bacterianas de las proteínas SMC hacen pensar que se forma un dímero por una interacción antiparalela entre las superhélices, de manera que el extremo N de una subunidad se enlaza con el extremo C de la otra. Es posible que la existencia de una región de bisagra flexible permita a cohesinas y condensinas depender de un modo diferente de acción del dímero. En la **FIGURA 31.14** se muestra que las cohesinas tienen una estructura en V con los brazos separados en un ángulo de 86° , en tanto las condensinas tienen una flexión posterior más aguda, con sólo 6° entre los brazos. Esto permite a las cohesinas mantener las cromátides hermanas juntas, en tanto las

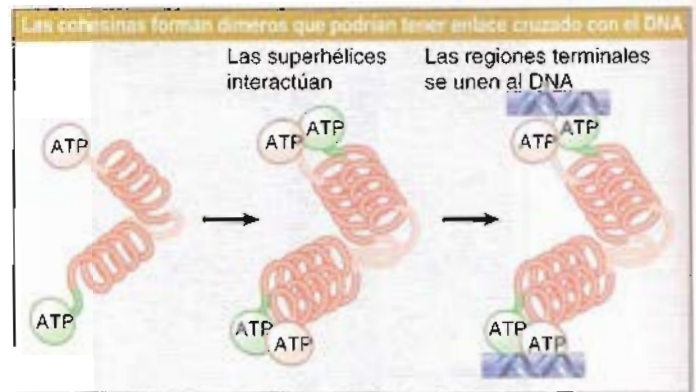


FIGURA 31.15 Las proteínas SMC forman dímeros gracias a interacciones antiparalelas entre las superhélices centrales. Ambas regiones terminales de cada subunidad tienen segmentos de unión de ATP y DNA. Las cohesinas pueden formar una estructura extendida que permite a dos moléculas diferentes de DNA enlazarse.

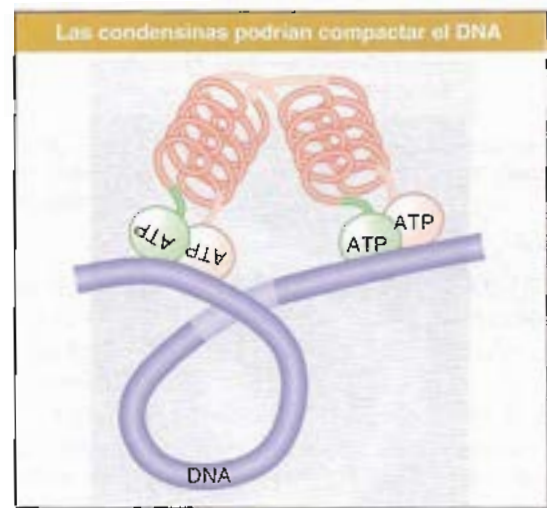


FIGURA 31.16 Las condensinas pueden formar una estructura compacta si se doblan en la bisagra, lo que hace que el DNA se torne compacto.

condensinas, por otro lado, condensan un cromosoma individual. La **FIGURA 31.15** muestra que una cohesina puede adquirir la forma de un dímero extendido con enlace cruzado de dos moléculas de DNA. La **FIGURA 31.16** muestra que una condensina podría adoptar la forma de un dímero en V (en esencia, flexionado en la bisagra), que hace tracción sobre sitios distantes en la misma molécula de DNA uniéndolos y condensándola.

Los experimentos hacen pensar en un modelo alternativo donde las proteínas de levaduras forman dímeros por las interacciones intramoleculares. Esto es, se forma un homodímero sólo por la interacción entre dos subunidades idénticas. Los centros de dos proteínas diferentes (en este caso, SMC1 y SMC3) pueden entonces interactuar en sus regiones cefálica y de bisagra para formar una estructura circular

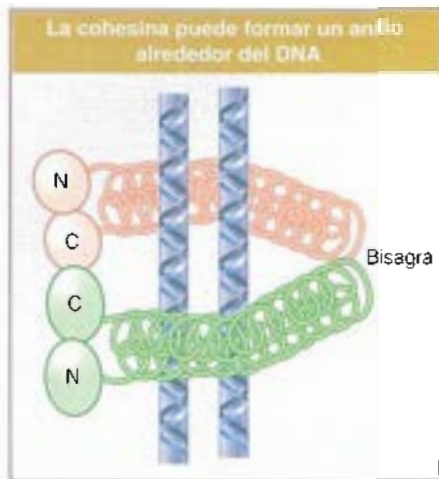


FIGURA 31.17 Las cohesinas pueden formar dímeros por medio de conexiones intramoleculares y después multímeros, que se conectan en las cabezas y la bisagra. Es posible que tal estructura mantenga dos moléculas de DNA juntas al rodearlas.

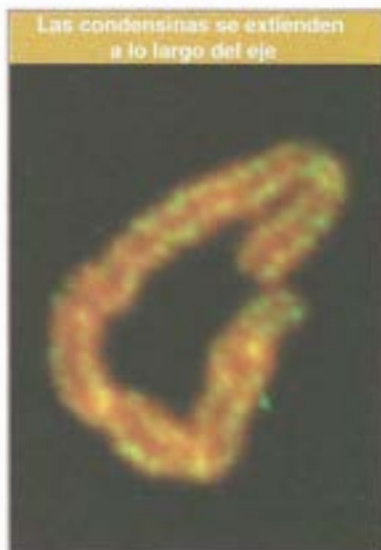


FIGURA 31.18 Las condensinas se localizan a todo lo largo de un cromosoma mitótico. El DNA es rojo; las condensinas, amarillas. Fotografía por cortesía de Ana Losada y Tatsuya Hirano.

como la que se muestra en la **FIGURA 31.17**. En lugar de unirse de manera directa al DNA, una estructura de ese tipo podría mantener juntas sus moléculas al rodearlas.

La visualización de los cromosomas mitóticos muestra que las condensinas se localizan a todo lo largo del cromosoma, como puede observarse en la **FIGURA 31.18**. (Por el contrario, las cohesinas se encuentran en localizaciones bien definidas.) El complejo condensina recibió ese nombre por su capacidad de hacer que la cromatina se condensase *in vitro*. Tiene la capacidad de introducir superhélices positivas en el DNA en una acción que aprovecha la hidrólisis de ATP y depende de la presencia de la

topoisomerasa I. Esta capacidad es controlada por la fosforilación de las subunidades no SMC que tiene lugar en la mitosis. No se sabe aún de qué manera se relaciona esto con otras modificaciones de la cromatina, por ejemplo, la fosforilación de histonas. La activación del complejo de condensina de manera específica en la mitosis hace dudar de que también participe en la formación de la heterocromatina de interfase.

Ocurren cambios globales en otros tipos de compensación de dosis. En el género *Drosophila* se encuentra un complejo de proteínas en los machos, donde se localiza en el cromosoma X. En *C. elegans*, un complejo proteínico se vincula con ambos cromosomas X en embriones XX, pero los componentes proteínicos se mantienen con distribución difusa en los núcleos de embriones XO. El complejo proteínico contiene un meollo de SMC y es similar a los complejos de condensina que se vinculan con cromosomas mitóticos en otras especies. Esto permite suponer que tiene una función estructural que hace que el cromosoma adquiera una forma más condensada, inactiva. Pueden necesitarse múltiples sitios en el cromosoma X para que el complejo se distribuya por completo. El complejo se une a esos sitios y después se dispersa por todo el cromosoma para cubrirlo de manera más amplia.

Los cambios que afectan a todos los genes en un cromosoma, ya sea de manera negativa (mamíferos y *C. elegans*), o positiva (género *Drosophila*) son, por tanto, una característica común de la compensación de dosis. No obstante, los componentes del aparato de compensación de dosis pueden variar, así como los medios por los que se localizan en el cromosoma y, por supuesto, ese mecanismo de acción es diferente en cada caso.

31.7

Una metilasa de mantenimiento perpetúa la metilación del DNA

Conceptos principales

- Casi todos los grupos metilo del DNA se encuentran en las citosinas de ambas cadenas del par CpG.
- La replicación convierte un sitio por completo metilado en uno hemimetilado.
- Una metilasa de mantenimiento convierte los sitios hemimetilados en metilados por completo.

Ocurre metilación del DNA en sitios específicos. En las bacterias se vincula con la identificación del sistema de metilación de restricción bacteriana utilizado para la defensa de los fagos y también para distinguir el DNA replicado del no replicado (véase

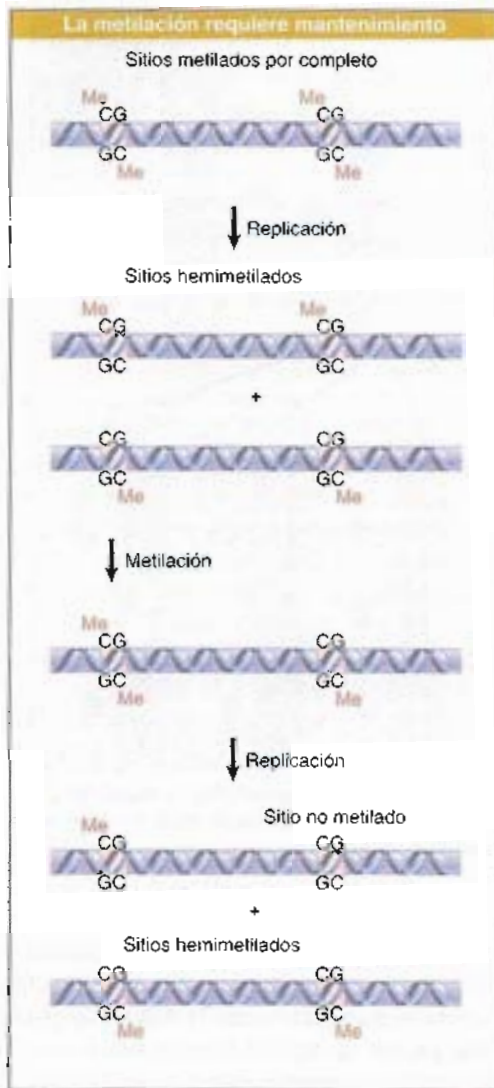


FIGURA 31.19 El estado de los sitios metilados podría perpetuarse gracias a la acción de una enzima que reconoce sólo sitios hemimetilados como sustratos.

la sección 20.7, Control de la dirección de la reparación de apareamientos erróneos). En las eucariotas, su principal función conocida tiene relación con el control de la transcripción; la metilación se vincula con la desactivación génica (véase la sección 24.18, La expresión génica se vincula con la desmetilación).

De 2 a 7% de las citosinas del DNA de las células animales están metiladas (la cifra varía de acuerdo con la especie). La mayor parte de los grupos metilo se encuentra en "pares" CG y, de hecho, la mayor parte de las secuencias CG está metilada. Por lo general, los segmentos C de ambas cadenas de esta secuencia palindrómica corta están metilados, lo que da lugar a la estructura.

Dicho sitio se describe como **metilado por completo**. Considérense, no obstante, las conse-

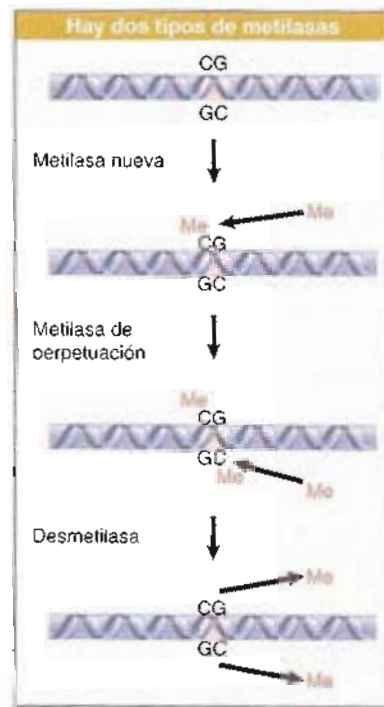


FIGURA 31.20 El estado de metilación es regulado por tres tipos de enzimas. Se conocen metilasas nuevas y de perpetuación, pero no se han identificado desmetilasas.

cuencias de la replicación de este sitio. En la **FIGURA 31.19** se muestra que cada par hijo tiene una cadena metilada y una no metilada. Dicho sitio se denomina **hemimetilado**.

La perpetuación del sitio metilado depende de lo que pase con el DNA hemimetilado. Si ocurre metilación de una cadena no metilada, se restablece la condición de metilación completa del sitio. Sin embargo, si la replicación ocurre antes, se perpetuará el estado hemimetilado en un par de cadenas hijas, pero el sitio no estará metilado en el otro par de cadenas hijas. En la **FIGURA 31.20** se muestra que el estado de metilación del DNA es controlado por **metilasas**, que agregan grupos metilo a la posición 5 de la citosina, y **desmetilasas**, que retiran los grupos metilo (para describir estas enzimas de manera más formal se les denomina **metiltransferasas**).

Hay dos tipos de metilasa del DNA cuyas acciones se distinguen por el estado de metilación del ácido. Para modificar el DNA en una nueva posición se requiere la acción de una **metilasa nueva**, que reconoce al DNA por virtud de una secuencia específica y actúa sólo en el no metilado para agregar un grupo metilo a una cadena. Hay dos metilasas nuevas (Dnmt3a y Dnmt3B) en el ratón; tienen diferentes sitios diana y ambas son indispensables para el desarrollo.

Una **metilasa de mantenimiento** actúa constitutivamente *sólo en sitios hemimetilados*, para conver-

tirlos en metilados completos. Su existencia indica que cualquier sitio metilado se perpetúa después de la replicación. Hay una metilasa de mantenimiento (Dnmt1) en el ratón y es indispensable: los embriones de ratón donde se ha alterado un gen no sobreviven después de la embriogénesis temprana.

La metilación de mantenimiento es casi 100% eficaz, lo que asegura que la situación demostrada a la izquierda de la Figura 31.19 prevalece *in vivo*. El resultado es que sí ocurre la metilación nueva en un alelo pero no en el otro, esa diferencia se perpetuará a través de las siguientes divisiones celulares, con lo que se mantiene una diferencia entre los alelos que no depende de sus secuencias.

La metilación tiene varios tipos de dianas. Los promotores génicos son la diana más frecuente. Los promotores son metilados cuando el gen está inactivo, pero no metilados cuando está activo. La ausencia de Dnmt1 en el ratón causa una desmetilación amplia en los promotores y se asume que es letal por la expresión génica sin control. El DNA satélite es otra diana. Las mutaciones en Dnmt3 impiden la metilación del DNA satélite, lo que causa inestabilidad en el centrómero dentro del ámbito celular. Las mutaciones en el gen humano correspondiente causan una enfermedad llamada ICF (inmunodeficiencia/inestabilidad del centrómero, anomalías faciales). La importancia de la metilación se recalca en otra enfermedad humana, el síndrome de Rett, causado por la mutación del gen para la proteína MeCP2 que se une a secuencias CpG metiladas.

Las metilasas son enzimas convencionales que actúan sobre un DNA diana. Sin embargo, puede haber también un sistema de metilación que utiliza una secuencia corta de RNA para hacer diana en una secuencia correspondiente de DNA para la metilación (véase la sección 13.6, Se puede usar RNA no codificante para desactivar la expresión génica). Nada se sabe del mecanismo de operación de este sistema.

¿Cómo se establecen y mantienen las regiones desmetiladas? Si un sitio del DNA no se ha metilado, es posible que una proteína que reconoce la secuencia no metilada la proteja contra la metilación. Una vez que se ha metilado un sitio, hay dos posibles formas de generar sitios desmetilados. Una es bloquear la actuación de la metilasa de mantenimiento sobre el sitio cuando éste se replica. Después de un segundo ciclo de replicación uno de los pares de cadenas hijas estará no metilado (como se muestra en el lado derecho de la Figura 31.19). El otro es desmetilar de manera activa el sitio, como se muestra en la FIGURA 31.21, ya sea por retiro directo del grupo metilo de la citosina o por escisión de la citosina o citidina metiladas del DNA para su sustitución por un sistema de reparación. Se sabe que puede ocurrir desmetilación activa en el geno-

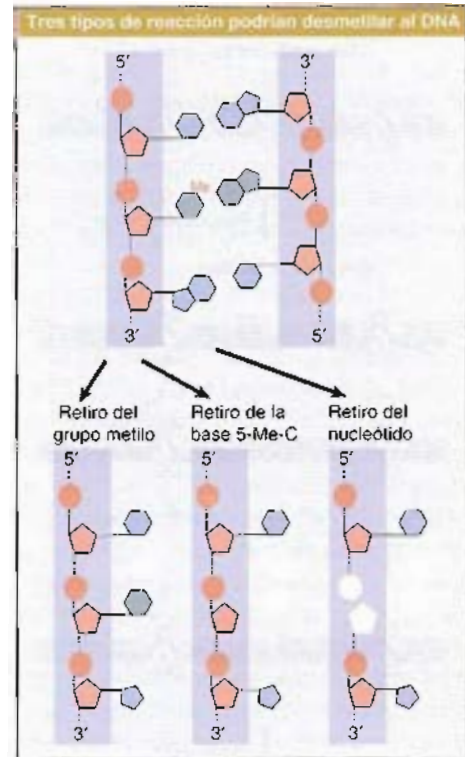


FIGURA 31.21 Es posible que el DNA se desmetile si se retira el grupo metilo, la base o el nucleótido. El retiro de la base o el nucleótido requeriría su reposición por un sistema de reparación.

ma paterno poco después de la fecundación, pero no se conoce el mecanismo usado. Una posibilidad interesante es que participase la AID desaminasa de histidina; puede desaminar fragmentos C-metilados y crear un apareamiento erróneo de bases que un sistema de reparación pudiese entonces corregir a un par C-G estándar (no metilado).

31.8

La metilación del DNA se encarga de la impresión

Concepto principal

- Los alelos paternos y maternos pueden tener diferentes patrones de metilación en la fecundación.
- La metilación suele vincularse con la desactivación del gen.
- Cuando los genes tienen impresión diferencial, la supervivencia de los embriones puede requerir que el alelo funcional sea provisto por el progenitor con el alelo no metilado.
- La supervivencia de heterocigotos para genes impresos es diferente, de acuerdo con la dirección del cruce.
- Los genes impresos se presentan en grupos y pueden depender de un sitio de control local, donde ocurre metilación nueva, a menos que se evite de manera específica.

El patrón de metilación de las células germinativas se establece para cada sexo durante la gametogénesis mediante un proceso de dos etapas: primero el patrón existente es borrado por una desmetilación de todo el genoma, y luego se impone el patrón específico de cada sexo.

Todas las diferencias de alelos se pierden cuando las células germinales primordiales avanzan durante el desarrollo del embrión; sin importar el sexo, los patrones anteriores de metilación se borran y un gen característico es entonces no metilado. En los machos el patrón se presenta en dos etapas. La vía de metilación característica de los espermatozoides maduros se establece en el espermatocito, pero se hacen otros cambios en ese patrón después de la fecundación. En las hembras, el patrón materno se impone durante la oogénesis cuando los oocitos maduran a través de la meiosis después del nacimiento.

Como es de esperarse por la inactividad de los genes en los gametos, su estado habitual es metilado. Sin embargo, hay casos de diferencias entre los dos sexos en los que un locus está no metilado en un sexo. Una pregunta importante es, ¿cómo se determina la especificidad de metilación en los gametos masculino y femenino?

Ocurren cambios sistemáticos en la embriogénesis temprana. Algunos sitios continuarán metilados, en tanto otros serán de manera específica no metilados en las células donde se expresa un gen. Por el patrón de cambios se puede inferir que cada uno de los episodios de metilación específica de secuencia tiene lugar durante el desarrollo somático del organismo, a medida que se activan genes particulares.

El patrón específico de los grupos metilo en células germinativas se encarga del fenómeno de la **impresión**, que describe una diferencia de conducta entre los alelos heredados de cada padre. La expresión de ciertos genes en embriones de ratón depende del sexo del progenitor del que se heredaron. Por ejemplo, el alelo que codifica IGF-II (factor II de crecimiento similar a insulina) que se hereda del padre se expresa, pero el heredado de la madre no se expresa. El gen del IGF-II de los oocitos está metilado pero el gen IGF-II de espermatozoides no lo está, de manera que los dos alelos tienen conducta diferente en el cigoto. Éste es el patrón más frecuente, pero la dependencia del sexo se revierte en algunos genes. De hecho, se muestra el patrón contrario (expresión de la copia materna) para IGF-IIR, el receptor de IGF-II.

Este modo de herencia específico del sexo requiere que se establezca el patrón de metilación de manera específica durante cada gametogénesis. El destino de un locus hipotético en un ratón se ilustra en la **FIGURA 31.22**. En el embrión temprano, el

alelo paterno no está metilado y sí expresado, y el alelo materno está metilado y es silente. ¿Qué sucede cuando ese ratón forma sus gametos? Si es un macho, el alelo aportado al espermatozoide deberá ser no metilado, sin importar si al principio lo estaba o no. Así, cuando un alelo materno se encuentra en un espermatozoide, debe ser desmetilado. Si el ratón es una hembra, el alelo con que contribuye al oocito debe ser metilado; si en un principio era el alelo paterno, deberán agregarse grupos metilo.

La consecuencia de la impresión es que un embrión requiere un alelo paterno para este gen. Así, en el caso de una cruce heterocigota donde el alelo de un progenitor tiene una mutación de desactivación, el embrión sobrevivirá si el alelo de tipo silvestre proviene del padre, pero morirá si proviene de la madre. Este tipo de dependencia en la direccionalidad de la cruce (al contrario de la genética mendeliana) es un ejemplo de herencia epigenética, donde algún factor diferente a las secuencias de sus genes mismos influye en sus efectos (véase la sección 31.10. Los efectos epigenéticos pueden heredarse). Si bien los alelos paterno y materno tienen secuencias idénticas, muestran diferentes propiedades, dependiendo de qué progenitor los aportó. Estas propiedades se heredan a través de la meiosis y en las mitosis somáticas posteriores.

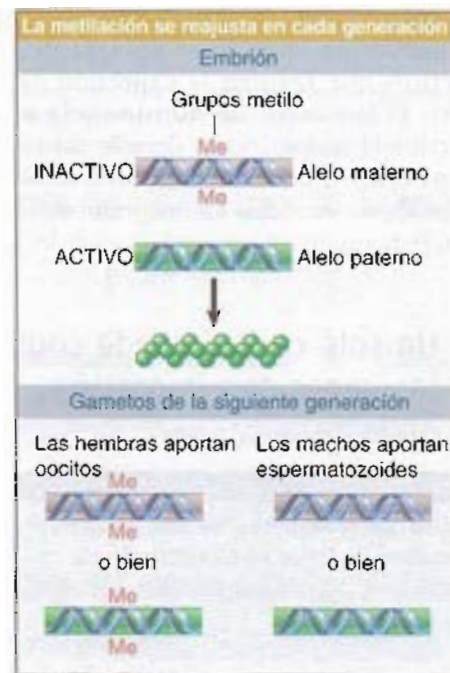


FIGURA 31.22 El patrón característico de la impresión es que un locus metilado sea inactivo. Si se trata del alelo materno, sólo el alelo paterno estará activo y será esencial para la viabilidad. El patrón de metilación se reajusta cuando se forman los gametos, de manera que todos los espermatozoides tienen un tipo paterno y todos los oocitos tienen un tipo materno.

Los genes impresos a veces se agrupan. Más de la mitad de los 17 genes impresos conocidos en el ratón están contenidos en dos regiones particulares, cada una con genes de expresión materna y paterna. Esto hace pensar en la posibilidad de que los mecanismos de impresión funcionen por largas distancias. Se puede entender en parte esa posibilidad por las deleciones en la población humana que causan las enfermedades de Prader-Willi y Angelman. Casi todos los casos se deben a la misma deleción de 4 Mb, pero los síndromes son diferentes dependiendo de qué progenitor contribuyó con la deleción. El motivo es que la región con deleción contiene al menos un gen impreso por el padre y al menos uno impreso por la madre. Sin embargo, hay algunos casos excepcionales con deleciones mucho más pequeñas. Se puede causar el síndrome de Prader-Willi por una deleción de 20 kb que silencia genes distantes a ambos lados. El efecto básico de la deleción es impedir que un padre restablezca el modo paterno a un cromosoma heredado por la madre. El resultado es que los genes se mantienen en modo materno, de manera que los alelos paternos, así como los maternos, son silentes en la descendencia. Se encuentra el efecto inverso en algunas pequeñas deleciones que causan el síndrome de Angelman. La deducción es que esa región comprende algún tipo de "centro de impresión" que actúa a cierta distancia para cambiar de un tipo de progenitor al otro.

La metilación también se encarga de efectos epigenéticos que regulan la expresión de genes de RNAr. El fenómeno de **dominancia nucleolar** describe la transcripción de sólo un conjunto de genes del RNAr de los progenitores, resultado de la metilación de citosinas en los promotores de los genes heredados de un progenitor y no del otro.

31.9 Un solo centro puede controlar los genes con impresión opuesta

Conceptos principales

- Los genes impresos son controlados por la metilación de los sitios de acción en configuración *cis*.
- La metilación puede encargarse de desactivar o activar un gen.

La impresión está determinada por el estado de metilación del sitio de acción en configuración *cis* cerca de un gen diana o varios. Estos sitios reguladores se conocen como dominios con metilación diferencial (DMD) o regiones de control de la impresión (ICR).

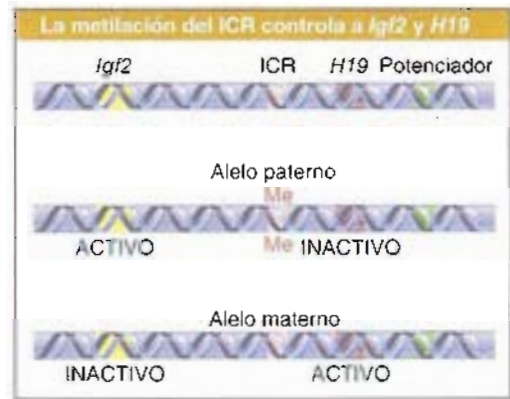


FIGURA 31.23 El ICR está metilado en el alelo paterno, donde *Igf2* es activo y *H19* es inactivo. El ICR no está metilado en el alelo materno, donde *Igf2* es inactivo y *H19* es activo.

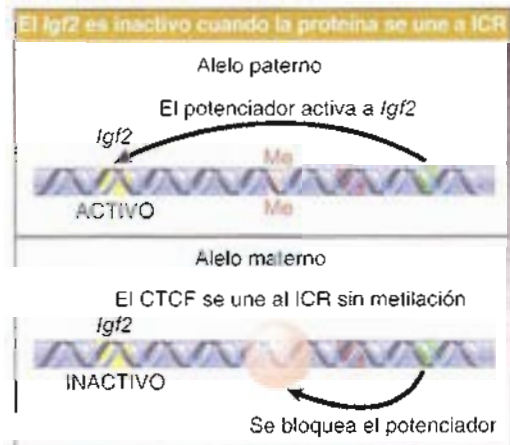


FIGURA 31.24 El ICR es un aislante que impide que un potenciador active a *Igf2*. El aislante actúa sólo cuando una CTCF al DNA no metilado.

La deleción de esos sitios elimina la impresión y los *loci* diana actúan entonces igual en los genomas materno y paterno.

La conducta de una región que contiene dos genes, *Igf2* y *H19*, ilustra las formas en que la metilación puede controlar la actividad génica. La **FIGURA 31.23** muestra que estos dos genes reaccionan en forma opuesta al estado de metilación en el ICR localizado entre ellos. La ICR está metilada en el alelo paterno. El *H19* muestra la respuesta característica de desactivación. Sin embargo, nótese que el *Igf2* se expresa. La situación inversa se encuentra en el alelo materno, donde la ICR no está metilada. El *H19* se expresa entonces, pero el *Igf2* está desactivado.

El control de *Igf2* lo ejerce una función aislante de la ICR. La **FIGURA 31.24** muestra que cuando la ICR no está metilada se une a la proteína CTCF, lo que crea una función de aislante que bloquea a un potenciador y le impide la activación del promotor de *Igf2*. Éste es un efecto muy poco común, donde

la metilación activa de manera indirecta a un gen al bloquear a un aislante. La regulación de *H19* muestra la dirección más habitual del control, donde la metilación crea un estado de impresión inactivo. Esto podría reflejar un efecto directo de la metilación sobre la actividad del promotor.

31.10 Los efectos epigenéticos pueden heredarse

Concepto principal

- Los efectos epigenéticos pueden derivarse de una modificación de un ácido nucleico después de que se ha sintetizado, o por la perpetuación de estructuras proteínicas.

La herencia **epigenética** describe la posibilidad de diferentes estados, que pueden tener diversas consecuencias fenotípicas, de heredarse sin ningún cambio en la secuencia del DNA. ¿Cómo puede ocurrir esto? Los mecanismos epigenéticos se dividen en dos clases generales:

- El DNA puede modificarse por la unión covalente de una molécula que después es perpetuada. Dos alelos con la misma secuencia pueden tener diferentes estados de metilación, que les confieren propiedades diversas.
- Puede establecerse un estado de proteína de autopropagación que tal vez comprenda el ensamblaje de un complejo proteínico, la modificación de una o varias proteínas específicas o el establecimiento de una conformación proteínica alternativa.

La metilación establece la herencia epigenética, en tanto la metilasa de mantenimiento actúe de manera constitutiva para restablecer el estado metilado después de cada ciclo de replicación, como se muestra en la Figura 31.19. Se puede perpetuar un estado de metilación por medio de una serie indefinida de mitosis somáticas, lo que tal vez sea una situación "predeterminada". La metilación también puede perpetuarse a través de la meiosis: por ejemplo, en el hongo del género *Ascobolus* hay efectos epigenéticos que pueden transmitirse tanto por medio de mitosis como de meiosis, por mantenimiento del estado de metilación. En las células de los mamíferos se crean efectos epigenéticos porque la reestructuración del estado de metilación es diferente en la meiosis de machos y hembras.

Las situaciones donde los efectos epigenéticos parecen mantenerse mediante estados proteínicos se conocen menos bien en términos moleculares. El efecto de posición abigarrado muestra que la hete-

rocromatina constitutiva puede extenderse a una distancia variable y después se perpetúa a través de las divisiones somáticas. No hay metilación del DNA en el género *Saccharomyces* y una cantidad cada vez menor en el género *Drosophila* y, como resultado, es probable que la herencia de estados epigenéticos del efecto de posición abigarrado o el silenciamiento telomérico en estos organismos se deban a la perpetuación de estructuras proteínicas.

En la **FIGURA 31.25** se consideran dos posibilidades extremas para el destino de un complejo proteínico en la replicación.

- Un complejo podría perpetuarse a sí mismo si se escinde en forma simétrica, de manera que el complejo mitad se vincule con cada cadena doble hija. Si los complejos mitad tienen la capacidad de nuclear la formación de complejos totales, se restablecerá el estado original. Esto es básicamente análogo al mantenimiento de la metilación. El problema con este modelo es que no hay motivo evidente por el que los complejos proteínicos actúen de esa manera.
- Un complejo podría mantenerse como unidad y segregarse a una de las dos cadenas hijas dobles. El problema con este modelo es que requiere el ensamblaje de un nuevo complejo en el otro par nuevo de cadenas hijas y no es evidente por qué debería suceder.

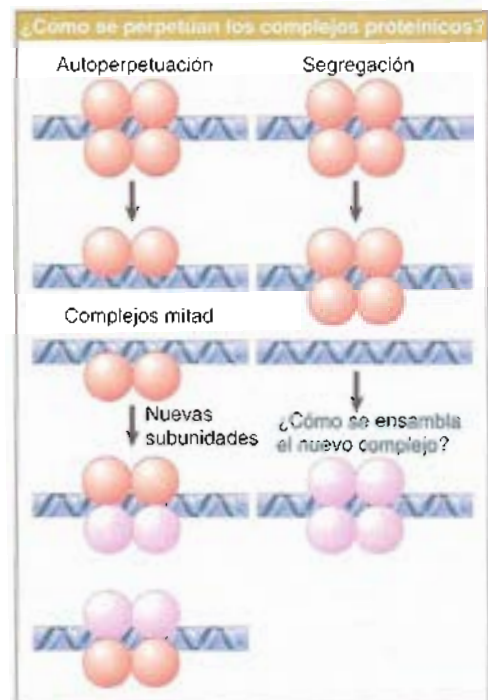


FIGURA 31.25 ¿Qué sucede con los complejos proteínicos en la cromatina durante la replicación?



FIGURA 31.26 Los meillos acetilados se conservan y distribuyen en forma aleatoria en las fibras de cromatina hijas durante la replicación. Cada fibra hija tiene una mezcla de meillos antiguos (acetilados) y nuevos (sin acetilar).

Considérese ahora la necesidad de perpetuar una estructura heterocromática constituida por complejos proteínicos. Supóngase que una proteína se distribuye más o menos de manera continua en una banda de heterocromatina, como se muestra en la Figura 31.4. Si se distribuyen subunidades individuales en forma aleatoria a cada cadena doble hija en la replicación, los dos constituyentes continuarán marcados por la proteína, aunque su densidad disminuirá a la mitad de su concentración antes de la replicación. Si la proteína tiene una propiedad de autoensamblaje que hace que las nuevas subunidades se asocien a ella, se restablecerá la situación original. *En términos básicos, la existencia de efectos epigenéticos obliga a considerar que una proteína encargada de tal circunstancia debe tener algún tipo de capacidad de automoldeado o autoensamblaje.*

En algunos casos puede ser el estado de modificación de la proteína, más que la presencia de la proteína *en sí* lo que se encarga de un efecto epigenético. Hay una correlación general entre la actividad de la cromatina y el estado de metilación de las histonas, en particular H3 y H4, que ocurre en sus colas terminales N. La activación de la transcripción se vincula con la acetilación en la vecindad del promotor; y la represión de la transcripción se vincula con la desacetilación (véase la sección 30.7. Las ace-

tilasas se vinculan con los activadores). La correlación más notoria es que el cromosoma X inactivo en células femeninas de mamífero está subacetilado en la histona H4.

La inactividad de la heterocromatina constitutiva puede requerir que las histonas no se acetilen. Si una acetiltransferasa de histonas se apuntala en una región de heterocromatina telomérica en las levaduras, los genes silenciados se tornan activos. Cuando la levadura se expone a la trichostatina (un inhibidor de la desacetilación), la heterocromatina centromérica se acetila y los genes silenciados en regiones centroméricas pueden tornarse activos. *El efecto puede persistir incluso después de que se ha retirado la trichostatina.* De hecho, puede perpetuarse a través de mitosis y meiosis, lo que permite suponer que se ha creado un efecto epigenético al cambiar el estado de acetilación de las histonas. ¿Cómo podría perpetuarse el estado de acetilación? Supóngase que el tetrámero H₃-H₄, se distribuye en forma aleatoria a dos cadenas hijas. Esto crea la situación que se muestra en la FIGURA 31.26, donde cada par de cadenas hijas contiene algunos octámeros de histonas acetilados por completo en las colas H3 y H4, en tanto otras están por completo desacetiladas. Para contribuir a un efecto epigenético, debería suponerse que la presencia de algunos octámeros de histonas por completo acetilados ofrece una señal que hace que los octámeros no acetilados se acetilen.

(La situación real es tal vez más complicada que la mostrada en la figura, porque ocurren acetilaciones transitorias durante la replicación. Si tan sólo se reversionen después del depósito de histonas en los nucleosomas, esto tal vez sea irrelevante. Otra posibilidad es que se impida la desacetilación usual en lugar de, o además de, inducir la acetilación.)

31.11 Los priones de las levaduras muestran herencia desusada

Conceptos principales

- La proteína Sup35 en su forma soluble de tipo silvestre es un factor de terminación de la traducción.
- También puede existir en una forma alternativa de agregados oligoméricos, donde no es activa en la síntesis de proteínas.
- La presencia de la forma oligomérica hace que la proteína recién sintetizada adquiera la estructura inactiva.
- La conversión entre las dos formas recibe la influencia de los chaperones.
- La forma de tipo silvestre tiene el estado genético recesivo *psi⁻* y la forma mutante tiene el estado genético dominante *PSI⁺*.

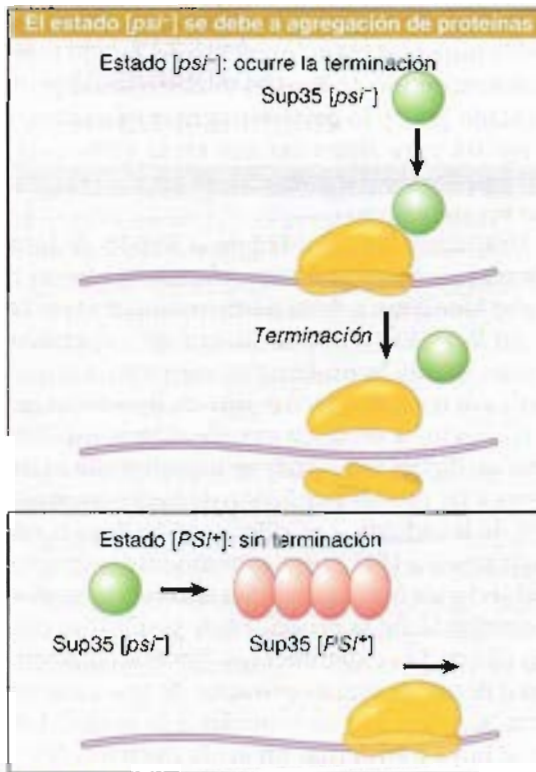


FIGURA 31.27 El estado de la proteína Sup35 determina si ocurre terminación de la traducción.

Uno de los casos más claros de la dependencia de la herencia epigenética del estado de la proteína lo constituye la conducta de los **priones**, que se han descrito en dos circunstancias: por efectos genéticos en levaduras y como agentes causales de enfermedades neurológicas en mamíferos, incluidos los seres humanos. Un efecto epigenético notorio se encuentra en las levaduras, donde se pueden heredar dos estados diferentes que se ubican en un solo locus genético, *si bien la secuencia del gen es la misma en ambos estados*. Los dos estados diferentes son $[psi^-]$ y $[PSI^+]$. Ocurre un cambio de condición con baja frecuencia como resultado de la transición espontánea entre los estados.

El genotipo $[psi^-]$ se ubica en el locus Sup35, que codifica un factor de terminación de la traducción. En la FIGURA 31.27 se resumen los efectos de la proteína Sup35 en las levaduras. En las células de tipo silvestre, que se describen como $[psi^-]$, el gen está activo y la proteína Sup35 termina la síntesis de proteínas. En las células de tipo mutante $[PSI^+]$ el factor no funciona, lo que hace que la síntesis de proteínas no termine de manera apropiada. (Esto se detectó en un principio por los efectos letales de la mayor eficacia de los supresores de codones ocre en las cepas $[PSI^+]$.)

Las cepas $[PSI^+]$ tienen propiedades genéticas inusitadas. Cuando una cepa $[psi^-]$ se cruza con

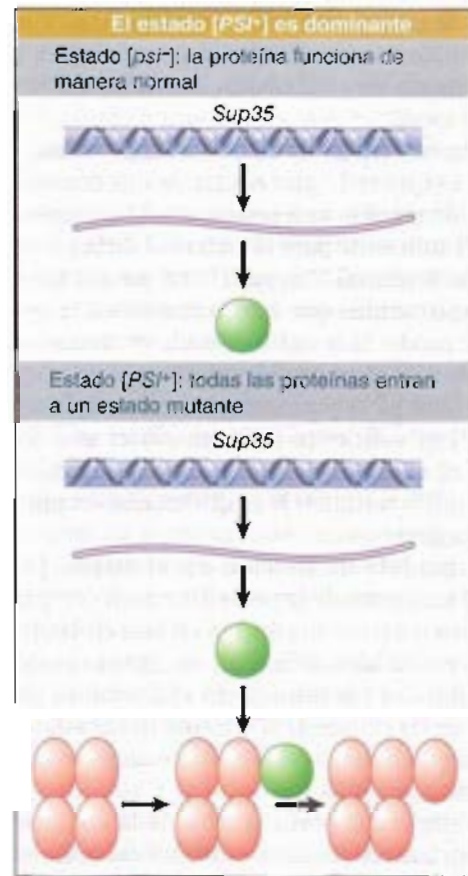


FIGURA 31.28 La proteína Sup35 recién sintetizada cambia al estado $[PSI^+]$ por la presencia de una proteína preexistente $[PSI^+]$.

una $[PSI^+]$, *toda la progenie resulta $[PSI^+]$* . Éste es un patrón de herencia que se esperaría de un agente extracromosómico, pero el rasgo $[PSI^+]$ no puede localizarse en ninguno de esos ácidos nucleicos. El rasgo $[PSI^+]$ es metaestable, lo que significa que aunque es heredado por casi toda la progenie, se pierde a un ritmo alto, compatible con la mutación. Se muestra una conducta similar también en el locus *URE2*, que codifica una proteína requerida para la represión de ciertas enzimas catabólicas mediadas por el nitrógeno. Cuando una cepa de levadura se convierte a un estado alternativo, llamado $[URE3]$, la proteína Ure2 ya no es funcional.

El estado $[PSI^+]$ está determinado por la conformación de la proteína Sup35. En una célula $[psi^-]$ de tipo silvestre, la proteína muestra su función normal. En una célula $[PSI^+]$, no obstante, la proteína está presente en una conformación alternativa, donde ha perdido su función normal. Para explicar el predominio unilateral de $[PSI^+]$ sobre $[psi^-]$ en cruza genéticas, se debe suponer que la *presencia de la proteína en estado $[PSI^+]$ hace que todas las proteínas en la célula entren a ese estado*. Esto requiere una interacción entre la proteína $[PSI^+]$ y la proteína recién

sintetizada, lo que tal vez refleja la generación de un estado oligomérico, donde la proteína [PSI⁺] tiene una función de nucleación, como se ilustra en la FIGURA 31.28.

Una característica común a las proteínas Sup35 y Ure2 es que cada una consta de dos dominios que actúan de manera independiente. El dominio terminal C es suficiente para la actividad de la proteína. El dominio terminal N es suficiente para la formación de las estructuras que hacen inactiva a la proteína. De este modo, la levadura donde el dominio terminal N de Sup35 tiene delección no puede adquirir el estado [PSI⁺] y la presencia de un dominio terminal N [PSI⁺] es suficiente para mantener una proteína Sup35 en el estado de [PSI⁺]. La característica crítica del dominio terminal N es que es rico en glutamina y asparagina.

La pérdida de función en el estado [PSI⁺] se debe al secuestro de la proteína en un complejo oligomérico. La proteína Sup35 en las células [PSI⁺] se agrupa en *loci* bien definidos, en tanto la proteína en las células [psi⁻] se difunde en el citosol. La proteína Sup35 de las células [PSI⁺] forma fibras amiloides *in vitro*, que tienen un característico contenido alto de estructuras en hoja β.

Se sugiere la participación de la conformación proteínica (más que su modificación covalente) por los efectos de los trastornos que afectan la estructura de las proteínas. Los tratamientos de desnaturalización causan pérdida del estado [PSI⁺]. En particular, el chaperón Hsp104 participa en la herencia de

[PSI⁺]. Sus efectos son paradójicos. La delección de Hsp104 impide el mantenimiento del estado [PSI⁺] y la sobreexpresión de Hsp104 también causa pérdida del estado [PSI⁺], lo que hace pensar que se requiere Hsp104 para algún cambio en la estructura de Sup35 necesario para adquirir el estado [PSI⁺], que debe ser transitorio.

Utilizando la capacidad de la Sup35 de formar la estructura inactiva *in vitro*, es posible ofrecer una prueba bioquímica de la participación de la proteína. En la FIGURA 31.29 se ilustra un experimento notorio, donde la proteína se convirtió a la forma inactiva *in vitro*, se colocó dentro de liposomas (donde, en efecto, la proteína es rodeada por una membrana artificial) y después se introdujo de manera directa a las células por fusión de los liposomas con [psi⁻] de levaduras. Las células de las levaduras se convirtieron a [PSI⁺]. Ese experimento refuta todas las objeciones que surgieron a la conclusión de que la proteína tiene la capacidad de conferir el estado epigenético. Los experimentos donde se aparcen células o donde se toman extractos de una para tratar a otra, siempre son susceptibles a la posibilidad de que se haya transferido un ácido nucleico. No obstante, cuando la proteína por sí misma no convierte células diana (aunque la proteína convertida al estado inactivo lo puede hacer), la única diferencia es el tratamiento de la proteína, que debe, por tanto, encargarse de la conversión.

La capacidad de la levadura de formar el estado de prion [PSI⁺] depende de los antecedentes genéticos. La levadura debe ser [PIN⁺] para que se forme el estado [PSI⁺]. El propio estado [PIN⁺] es un estado epigenético. Puede crearse por la formación de priones a partir de cualquiera de diferentes proteínas. Esas proteínas comparten la característica de Sup35 de tener dominios ricos en Gln/Asn. La sobreexpresión de esos dominios en las levaduras estimula la formación del estado [PSI⁺], lo que sugiere que hay un modelo común para la formación del estado de prion, que involucra la agregación de los dominios Gln/Asn a la estructura amiloide de autopropagación.

¿Cómo influye la presencia de una proteína Gln/Asn sobre la formación de priones por otra? Se sabe que la formación de los priones Sup35 es específica de la proteína Sup35, esto es, no ocurre por agregación cruzada de otras proteínas. Esto permite suponer que las células de levadura pueden contener proteínas solubles que antagonizan la formación de priones. Estas proteínas no son específicas de un prion. Como resultado, la introducción de cualquier dominio proteínico Gln/Asn que interactúe con esas proteínas disminuirá la concentración. Esto permite que otras proteínas Gln/Asn se agreguen más con más facilidad.

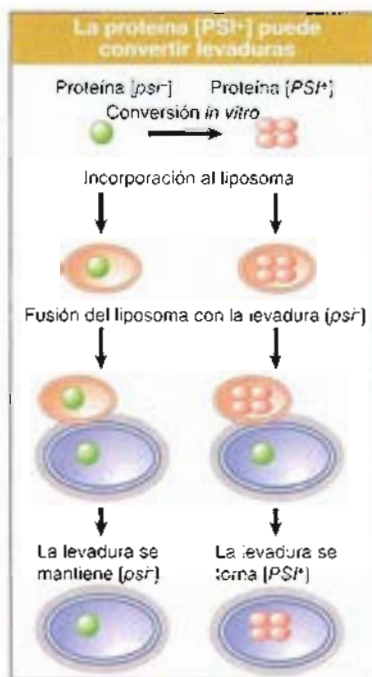


FIGURA 31.29 La proteína purificada puede convertir el estado [psi⁻] de las levaduras al [PSI⁺].

Los priones causan enfermedades en los mamíferos

Conceptos principales

- La proteína que causa encefalopatía espongiforme ovina tiene dos formas de presentación: la PrP^C no infecciosa de tipo silvestre susceptible a las proteasas, y la PrP^{Sc} que causa enfermedad y es resistente a las proteasas.
- La enfermedad neurológica puede transmitirse a los ratones mediante la inyección de la proteína PrP^{Sc} purificada.
- El ratón receptor debe tener una copia del gen *PrP* que codifica la proteína murina.
- La proteína PrP^{Sc} puede autoperpetuarse al hacer que la proteína PrP, recién sintetizada, adopte la forma de PrP^{Sc} en lugar de la forma PrP^C.
- Múltiples cepas de PrP^{Sc} pueden tener diferentes conformaciones proteinicas.

Se han encontrado enfermedades por priones en ovejas, seres humanos, y en fecha más reciente, en vacas. El fenotipo básico es una ataxia, trastorno neurodegenerativo que se manifiesta por una imposibilidad de mantenerse erecto. El nombre de esta enfermedad en ovejas, **encefalopatía espongiforme ovina**, refleja el fenotipo: el animal se talla contra las paredes para mantenerse erecto. La encefalomielitis ovina puede perpetuarse por la inoculación de ovejas con extractos hísticos de animales infectados. La enfermedad **kuru** se encontró en Nueva Guinea, donde pareció perpetuarse por el canibalismo, en particular por la ingestión de cerebros. Las enfermedades en poblaciones occidentales con un patrón de transmisión genética incluyen el síndrome de Gerstmann–Straussler y la enfermedad relacionada, de Creutzfeldt–Jakob (CJD), que ocurre en forma esporádica. En fecha más reciente, una enfermedad que simula CJD parece haber sido transmitida por el consumo de carne de vacas que sufre la enfermedad de “las vacas locas”. Cuando el tejido de ovejas infectadas por esta encefalitis se inocula a ratones, aparece la enfermedad en un periodo que va de 75 a 150 días. El componente activo es una proteína resistente a las proteasas codificada por un gen que normalmente se expresa en el cerebro. La forma de la proteína en el cerebro normal, llamada PrP^C es sensible a las proteasas. Su conversión a la forma resistente, llamada PrP^{Sc} se vincula con la aparición de la enfermedad. La preparación infecciosa no tiene ácidos nucleicos detectables, es

sensible a la irradiación UV a longitudes de onda que dañan a las proteínas y tiene una baja infectividad (una unidad infecciosa/10³ proteínas PrP^{Sc}), que corresponde a una herencia epigenética donde no hay cambio en la información genética (porque las células normales y enfermas tienen la misma secuencia génica *PrP*), pero la forma PrP^{Sc} de la proteína es el agente infeccioso (mientras que PrP^C es inocua). La forma PrP^{Sc} tiene un alto contenido de hojas β, que forman una estructura fibrilar amiloide ausente en la forma PrP^C.

La base para la diferencia entre las formas PrP^{Sc} y PrP^C parece radicar en un cambio de conformación, más que en alguna alteración covalente. Ambas proteínas están glucosiladas y unidas a la membrana por un enlace GPI.

El análisis de la infectividad en ratones permite estudiar la dependencia de la secuencia proteínica. La **FIGURA 31.30** muestra los resultados de algunos experimentos determinantes. En circunstancias normales, la proteína PrP^{Sc} extraída de un ratón infectado induce la enfermedad (y a la larga, la muerte) cuando se inyecta a un ratón receptor. Si el gen *PrP* es “puesto fuera de combate”, el ratón se hace resistente a la infección. Este experimento demuestra dos cosas. Primero, la proteína endógena es necesaria para una infección, al parecer porque provee la materia prima natural que se convierte en el agente infeccioso. Segundo, la causa de la enfermedad no es el retiro de la forma PrP^C de la proteína, porque un ratón sin PrP^C sobrevive de manera normal; la enfermedad es causada por una



FIGURA 31.30 Una proteína PrP^{Sc} puede infectar sólo a un animal que tiene el mismo tipo de proteína PrP^C endógena.

ganancia de función en PrP^{Sc}. Si el gen PrP se altera para impedir que ocurra el enlace GPI, los ratones infectados por PrP^{Sc} no padecen la enfermedad, lo que hace pensar que la ganancia de función implica una función de señal alterada para la que se requiere el enlace GPI.

La existencia de barreras de especie permite construir proteínas híbridas para definir las características requeridas para la infectividad. Las preparaciones originales de la encefalopatía espongiforme ovina fueron perpetuadas en varios tipos de animales, pero no siempre se pueden transferir con facilidad. Por ejemplo, los ratones son resistentes a la infección por priones de criceto, lo que significa que PrP^{Sc} de criceto no puede convertir la PrP^C de ratón en PrP^{Sc}. La situación cambia, no obstante, si el gen de ratón *PrP* es sustituido por un gen *PrP* de criceto (esto puede hacerse mediante la introducción de un gen *PrP* de criceto al ratón con *PrP* puesto fuera de combate). Un ratón con un gen *PrP* de criceto es sensible a la infección por un PrP^{Sc} de criceto. Esto permite suponer que la conversión de la proteína PrP^C celular al estado Sc requiere que las proteínas PrP^{Sc} y PrP^C tengan secuencias apareadas.

Hay diferentes "cepas de PrP^{Sc}" que se distinguen por periodos de incubación característicos después de su inoculación a ratones. Esto implica que la proteína no se restringe tan sólo a estados alternativos de PrP^C y PrP^{Sc}, sino más bien que puede haber múltiples estados de Sc. Estas diferencias deben de depender de alguna propiedad de autopropagación de la proteína más que de su secuencia. Si la conformación es la característica que distingue a PrP^{Sc} de PrP^C, debe haber múltiples conformaciones, cada una con una propiedad de automoldeado cuando convierte PrP^C.

La probabilidad de conversión de PrP^C a PrP^{Sc} se afecta por la secuencia de PrP. El síndrome de Gerstmann-Straussler en seres humanos es causado por un cambio de un solo aminoácido en PrP, que se hereda como rasgo dominante. Si se hace el mismo cambio en el gen PrP del ratón, el animal presenta la enfermedad. Esto sugiere que la proteína mutante tiene una mayor probabilidad de conversión espontánea al estado Sc. De manera similar, la secuencia del gen PrP determina la susceptibilidad de las ovejas a presentar la enfermedad en forma espontánea; la combinación de aminoácidos en tres posiciones (codones 136, 154 y 171) determina la susceptibilidad.

El prión ofrece un caso extremo de herencia epigenética, donde el agente infeccioso es una proteína que puede adoptar múltiples conformaciones, cada una con propiedad de automoldeado. Es posible que esa propiedad participe en el estado de segregación de la proteína.

31.13 Resumen

La formación de la heterocromatina ocurre por proteínas que se unen a regiones cromosómicas específicas (como los telómeros) y que interactúan con las histonas. La formación de una estructura inactiva puede propagarse a lo largo de la hebra de cromatina desde un centro de iniciación. Ocurren episodios similares en el silenciamiento de loci de tipo de apareamiento inactivos en levaduras. Las estructuras represivas que se requieren para mantener los estados inactivos de genes particulares son formadas por el complejo de proteína Pc-G en el género *Drosophila*. Comparten con la heterocromatina la propiedad de propagarse a partir de un centro de iniciación.

La formación de heterocromatina puede iniciarse en ciertos sitios y después propagarse por una distancia que no está determinada con precisión. Cuando se ha establecido un estado heterocromático, se hereda a través de divisiones celulares posteriores, lo que da origen a un patrón de herencia epigenética, donde dos secuencias idénticas de DNA pueden vincularse con diferentes estructuras proteínicas y, por tanto, tener capacidades diversas de expresión. Esto explica la aparición del efecto de posición abigarrado en el género *Drosophila*.

La modificación de las colas de histonas es un desencadenante de la reorganización de la cromatina. La acetilación se vincula en general con la activación génica. Se encuentran acetilasas de histonas en complejos de activación, en tanto las desacetilasas de histonas se encuentran en complejos de desactivación. La metilación de histonas se vincula con la desactivación génica. Algunas modificaciones de histonas pueden ser exclusivas o sinérgicas con otras.

La cromatina inactiva en telómeros de levaduras y loci de tipo de apareamiento silente parecen tener una causa común, que comprende la interacción de ciertas proteínas con las colas terminales N de las histonas H3 y H4. La formación del complejo inactivo puede iniciarse por la unión de una proteína a una secuencia específica del DNA; los otros componentes pueden entonces polimerizarse en forma colaboradora a lo largo del cromosoma.

La desactivación de un cromosoma X en las hembras de mamíferos (euterias) ocurre en forma aleatoria. El locus *Xic* es necesario y suficiente para contar el número de cromosomas X. La regla n-1 asegura que se desactiven todos los cromosomas X, excepto uno. *Xic* contiene el gen *Xist* que codifica un RNA que se expresa sólo en el cromosoma X inactivo. La estabilización de *Xist* del RNA es el mecanismo por el que se distingue el cromosoma X inactivo.

La metilación del DNA se hereda de manera epigenética. La replicación del DNA crea productos hemimetilados y una metilasa de mantenimiento restablece el estado de metilación completo. Algunos episodios de metilación dependen del origen parental. Espermatozoides y oocitos contienen patrones diferentes y específicos de metilación, con el resultado de que los alelos maternos y paternos se expresan de manera diferente en el embrión, lo que causa la impresión donde un alelo no metilado heredado de un progenitor es esencial porque es el único alelo activo, el alelo heredado del otro progenitor es silente. Los patrones de metilación se restablecen durante la formación de gametos en cada generación.

Los priones son agentes infecciosos proteínicos que ocasionan la enfermedad de encefalopatía espongiforme ovina y padecimientos relacionados en los seres humanos. El agente infeccioso es una variante de una proteína celular normal. La forma PrP^{Sc} tiene una conformación alterada de automoldeado: la forma normal, PrP^C, no adopta por lo general esa conformación, pero sí lo hace en presencia de PrP^{Sc}. Un efecto similar se encarga de la herencia del elemento [*PSI*] en las levaduras.

Referencias

31.2 La heterocromatina se propaga a partir de un episodio de nucleación

Artículo de investigación

Ahmad, K. and Henikoff, S. (2001). Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 104, 839–847.

31.3 La heterocromatina depende de interacciones con las histonas

Artículos de revisión

Loo, S. and Rine, J. (1995). Silencing and heritable domains of gene expression. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 519–548.

Moazed, D. (2001). Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol. Cell* 8, 489–498.

Rusche, L. N., Kürchmaier, A. L., and Rine, J. (2003). The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 481–516.

Thompson, J. S., Hecht, A., and Grunstein, M. (1993). Histones and the regulation of heterochromatin in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58, 247–256.

Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343–2360.

Artículos de investigación

Ahmad, K. and Henikoff, S. (2001). Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 104, 839–847.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120–124.

Bloom, K. S. and Carbon, J. (1982). Yeast centromere DNA is in a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes. *Cell* 29, 305–317.

Cheutin, T., McNairn, A. J., Jenuwein, T., Gilbert, D. M., Singh, P. B., and Misteli, T. (2003). Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299, 721–725.

Eissenberg, J. C., Morris, G. D., Reuter, G., and Hartnett, T. (1992). The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* 131, 345–352.

Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with the silent information regulators SIR3 and SIR4: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583–592.

Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.

James, T. C. and Elgin, S. C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *D. melanogaster* and its gene. *Mol. Cell Biol.* 6, 3862–3872.

Kayne, P. S., Kim, U. J., Han, M., Mullen, R. J., Yoshizaki, F., and Grunstein, M. (1988). Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* 55, 27–39.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116–120.

Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5807–5811.

Manis, J. P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K., and Alt, F. W. (1998). Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J. Exp. Med.* 187, 2081–2089.

Meluh, P. B. et al. (1998). Cse4p is a component of the core centromere of *S. cerevisiae*. *Cell* 94, 607–613.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D. (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* 8, 2257–2269.

Nakagawa, H., Lee, J. K., Hurwitz, J., Allshire, R. C., Nakayama, J., Grewal, S. I., Tanaka, K., and Murakami, Y. (2002). Fission yeast CENP-B homologs

- nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev.* 16, 1766–1778.
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., and Grewal, S. I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110–113.
- Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Axelrod, A., Pillus, J., and Gasser, S. M. (1993). SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75, 543–555.
- Platero, J. S., Hartnett, T., and Eisenberg, J. C. (1995). Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* 14, 3977–3986.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenwein, T., Dorn, R., and Reuter, G. (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* 21, 1121–1131.
- Seckinger, E. A. and Gross, D. S. (2001). Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment. *Cell* 105, 403–414.
- Shore, D. and Nasmyth, K. (1987). Purification and cloning of a DNA-binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* 51, 721–732.
- Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C., and Boeke, J. D. (2000). A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6658–6663.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I., and Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303, 672–676.
- Eisenberg, J. C., James, T. C., Fister-Hartnett, D. M., Hartnett, T., Ngan, V., and Elgin, S. C. R. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *D. melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9923–9927.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D., and Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromo domains. *Genes Dev.* 17, 1870–1881.
- Francis, N. J., Kingston, R. E., and Woodcock, C. L. (2004). Chromatin compaction by a Polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574–1577.
- Franke, A., DeCamillis, M., Zink, D., Cheng, N., Brock, H. W., and Paro, R. (1992). Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *D. melanogaster*. *EMBO J.* 11, 2941–2950.
- Geyer, P. K. and Corces, V. G. (1992). DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev.* 6, 1865–1873.
- Orlando, V. and Paro, R. (1993). Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using *in vivo* formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 75, 1187–1198.
- Strutt, H., Cavalli, G., and Paro, R. (1997). Colocalization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J.* 16, 3621–3632.
- Wang, L., Brown, J. L., Cao, R., Zhang, Y., Kassiss, J. A., and Jones, R. S. (2004). Hierarchical recruitment of Polycomb group silencing complexes. *Mol. Cell* 14, 637–646.
- Zink, B. and Paro, R. (1989). *In vivo* binding patterns of a trans-regulator of the homeotic genes in *D. melanogaster*. *Nature* 337, 468–471.

31.4 Polycomb y Trithorax son represores y activadores antagonistas

Artículo de revisión:

- Ringrose, L. and Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu. Rev. Genet.* 38, 413–443.

Artículos de investigación:

- Brown, J. L., Fritsch, C., Mueller, J., and Kassiss, J. A. (2003). The *Drosophila* pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development* 130, 285–294.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R. S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039–1043.
- Chan, C. S., Rastelli, L., and Pirrotta, V. (1994). A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J.* 13, 2553–2564.
- Czernin, B., Mellé, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase

31.5 Los cromosomas X experimentan cambios globales

Artículo de revisión

- Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D. A., and Panning, B. (2002). Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* 36, 233–278.

Artículos de investigación

- Jeppesen, P. and Turner, B. M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74, 281–289.
- Lee, J. T. et al. (1996). A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell* 86, 83–94.
- Lyon, M. F. (1961). Gene action in the X chromosome of the mouse. *Nature* 190, 372–373.
- Panning, B., Dausman, J., and Jaenisch, R. (1997). X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* 90, 907–916.
- Penny, G. D. et al. (1996). Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379, 131–137.

31.6 Las condensinas producen la condensación de los cromosomas

Artículos de revisión

- Hirano, T. (1999). SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev.* 13, 11–19.
- Hirano, T. (2000). Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 115–144.
- Hirano, T. (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* 16, 399–414.
- Jessberger, R. (2002). The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 767–778.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297, 559–565.

Artículos de investigación

- Csankovszki, G., McDonel, P., and Meyer, B. J. (2004). Recruitment and spreading of the *C. elegans* dosage compensation complex along X chromosomes. *Science* 303, 1182–1185.
- Haering, C. H., Lowe, J., Hochwage, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* 9, 773–788.
- Kimura, K., Rybenkov, V. V., Crisona, N. J., Hirano, T., and Cozzarelli, N. R. (1999). 135 condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation. *Cell* 98, 239–248.

31.7 Una metilasa de mantenimiento perpetúa la metilación del DNA

Artículos de revisión

- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Bird, A. P. (1986). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Nature* 321, 209–213.
- Matzke, M., Matzke, A. J., and Kooter, J. M. (2001). RNA: guiding gene silencing. *Science* 293, 1080–1083.
- Sharp, P. A. (2001). RNA interference—2001. *Genes Dev.* 15, 485–490.

Artículos de investigación

- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., and Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185–188.
- Li, E., Bestor, T. H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.
- Morgan, H. D., et al. (2004). Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J. Biol. Chem.* 279, 52353–52360.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are

essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.

- Xu, G. L., Bestor, T. H., Bourc'his, D., Hsieh, C. L., Tommerup, N., Bugge, M., Hulten, M., Qu, X., Russo, J. J., and Viegas-Paquignot, E. (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402, 187–191.

31.8 La metilación del DNA se encarga de la impresión

Artículo de revisión

- Bartolomei, M. S. and Tilghman, S. (1997). Genomic imprinting in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 31, 493–523.

Artículos de investigación

- Chaillet, J. R., Vogt, T. F., Beier, D. R., and Leder, P. (1991). Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. *Cell* 66, 77–83.
- Lawrence, R. J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z. J., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C. S. (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell* 13, 599–609.

31.9 Un solo centro puede controlar los genes con impresión opuesta

Artículos de investigación

- Bell, A. C. and Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405, 482–485.
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M., and Tilghman, S. M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405, 486–489.

31.11 Los priones de levaduras muestran herencia desusada

Artículos de revisión

- Horwich, A. L. and Weissman, J. S. (1997). Deadly conformations: protein misfolding in prion disease. *Cell* 89, 499–510.
- Lindquist, S. (1997). Mad cows meet psychotic yeast: the expansion of the prion hypothesis. *Cell* 89, 495–498.
- Serio, T. R. and Lindquist, S. L. (1999). [PSI⁺]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 661–703.
- Wickner, R. B. (1996). Prions and RNA viruses of *S. cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 30, 109–139.
- Wickner, R. B., Edskes, H. K., Roberts, B. T., Baxa, U., Pierce, M. M., Ross, E. D., and Brachmann, A. (2004). Prions: proteins as genes and infectious entities. *Genes Dev.* 18, 470–485.
- Wickner, R. B., Edskes, H. K., Ross, E. D., Pierce, M. M., Baxa, U., Brachmann, A., and Shewmaker, F. (2004). Prion genetics: new rules for a new kind of gene. *Annu. Rev. Genet.* 38, 681–707.

Artículos de investigación

- Chernoff, Y. O. et al. (1995). Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [PSI⁺]. *Science* 268, 880-884.
- Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Hong, J. Y., and Liebman, S. W. (2001). Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN(+)]. *Cell* 106, 171-182.
- Derkatch, I. L., Bradley, M. E., Masse, S. V., Zadorsky, S. P., Polozkov, G. V., Inge-Vechtomov, S. G., Liebman, S. W. (2000). Dependence and independence of [PSI(+)] and [PIN(+)] : a two-prion system in yeast? *EMBO J.* 19, 1942-1952.
- Glover, J. R. et al. (1997). Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell* 89, 811-819.
- Masison, D. C. and Wickner, R. B. (1995). Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science* 270, 93-95.
- Osherovich, L. Z. and Weissman, J. S. (2001). Multiple gln/asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast. *Cell* 106, 183-194.
- Sparrer, H. E., Santoso, A., Szoka, F. C., and Weissman, J. S. (2000). Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast [PSI⁺] factor by in vitro-converted Sup35 protein. *Science* 289, 595-599.
- Wickner, R. B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *S. cerevisiae*. *Science* 264, 566-569.

- Prusiner, S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Prusiner, S. B. and Scott, M. R. (1997). Genetics of prions. *Annu. Rev. Genet.* 31, 139-175.
- Wickner, R. B., Edskes, H. K., Roberts, B. T., Baxa, U., Pierce, M. M., Ross, E. D., and Brachmann, A. (2004). Prions: proteins as genes and infectious entities. *Genes Dev.* 18, 470-485.

Artículos de investigación

- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. E., McKinley, M. P., Prusiner, S. B., and Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-428.
- Bueler, H. et al. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347.
- Hsiao, K. et al. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 338, 342-345.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C., and Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62.
- Oesch, B. et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP²⁷⁻³⁰ protein. *Cell* 40, 735-746.
- Scott, M. et al. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73, 979-988.

31.12 Los priones causan enfermedades en los mamíferos

Artículos de revisión

- Chien, P., Weissman, J. S., and DePace, A. H. (2004). Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 617-656.