

La cromatina: la esencia está en el cambio

José C. Reyes

Al contrario de lo que se ha venido pensando durante años, la cromatina es una estructura enormemente dinámica. Una extensa familia de complejos multiproteicos que es capaz de alterar las interacciones entre el DNA y las histonas utilizando para ello la energía del ATP; son los llamados «remodeladores de cromatina». Dichos enzimas son esenciales para todos los procesos del metabolismo del DNA.

Las histonas fueron descubiertas por el famoso bioquímico y pionero genetista alemán A. Kossel en 1884, hace por lo tanto 130 años. Pocos años antes, F. Miescher había descubierto los ácidos nucleicos y W. Flemming había usado por primera vez la palabra cromatina para designar una sustancia que se separaba en las células en mitosis.¹ Una vez sentadas las bases, la historia de la investigación en cromatina entró en lo que se ha dado en llamar la *edad oscura*, que duró aproximadamente un siglo, y en la que las histonas se consideraron meros componentes estructurales necesarios para la compactación del DNA.

► El paso de la edad oscura a la edad de oro

En este período se caracterizaron las distintas histonas canónicas (H2A, H2B, H3, H4, H1), así como algunas variantes histónicas, y se describió la estructura de los nucleosomas, la unidad fundamental repetida en la cromatina. El *nucleosoma* está constituido por un octámero de histonas (dos dímeros H2A-H2B y un tetrámero H3-H4) rodeado por 147 pares de bases de DNA. Las ideas sobre el papel de la cromatina en el metabolismo nu-

clear comenzaron a cambiar a finales de los ochenta del siglo XX, cuando los grupos de A. Kornberg y M. Grustein describen una función represora de los nucleosomas en transcripción.^{2,3} Comienza entonces a instalarse la idea de que los nucleosomas son entidades dinámicas y que su estructura o su posición en la molécula de DNA puede, o debe, alterarse durante la regulación transcripcional. Aparece así la noción de remodelación de cromatina. El empuje definitivo a este concepto proviene del descubrimiento, primero en levaduras y después en otros eucariotas, de un complejo multiproteico, el complejo SWI/SNF, capaz de alterar la estructura de los nucleosomas utilizando la energía liberada en la hidrólisis del ATP.⁴⁻⁹ Así, el complejo SWI/SNF se convierte en la primera maquinaria remodeladora de cromatina descrita. Hoy sabemos que cualquier cambio en los patrones de expresión durante el desarrollo, o en respuesta a factores externos e internos, va acompañado de una extensa remodelación de cromatina cuyos detalles, en la mayoría de los casos, son aún desconocidos. Pero no solo la transcripción, todos los procesos del metabolismo del DNA, tales como replicación, recombinación y reparación, requieren rápidas, y a menudo drásticas reestructuraciones de la cromatina. Otras modificaciones

dinámicas de la cromatina como la metilación del DNA o las modificaciones postraduccionales de los extremos amino y carboxilo terminales de las histonas, también pueden englobarse dentro de los procesos de remodelación de la cromatina; sin embargo, en este artículo me centraré en los mecanismos y el papel biológico de los complejos remodeladores de cromatina (CRC) con gasto de ATP.

► Enzimas con actividad remodeladora de nucleosomas

Una de las subunidades del complejo SWI/SNF de levaduras, denominada *Snf2/Swi2*, es una ATPasa y constituye el núcleo catalítico del complejo. Este enzima dio nombre a una familia de ATPasas conservadas en todos los eucariotas y que se caracterizan por poseer siete motivos de homología con la superfamilia de helicasas SF2. En humanos hay 33 genes que codifican proteínas de la familia SNF2, mientras que en *Saccharomyces cerevisiae* hay 17. Para muchos de los productos proteicos de estos genes se ha demostrado actividad de remodelación de cromatina, al menos *in vitro*.

Los enzimas de la familia SNF2 son capaces de utilizar la energía liberada en la

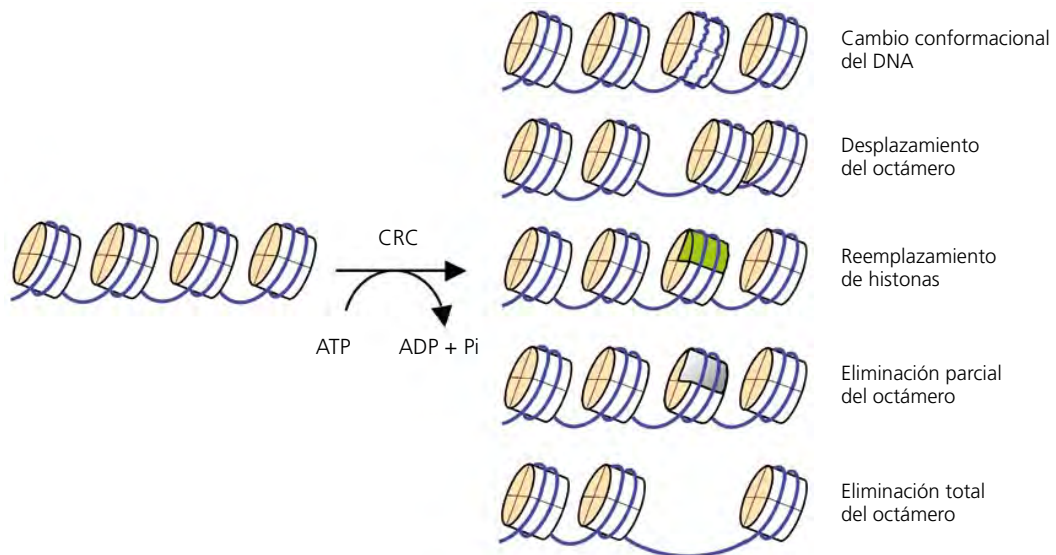


Figura 1. Actividades llevadas a cabo por complejos remodeladores de cromatina

hidrólisis del ATP para desestabilizar las interacciones entre el DNA y el octámero de histonas.^{10,11} El producto de la reacción puede ser el cambio de posición del octámero de histonas con respecto a la secuencia del DNA (deslizamiento), un cambio conformacional del DNA en la superficie del octámero, un cambio en la composición de histonas del octámero, o incluso la pérdida parcial (H2A-H2B) o total del octámero (fig. 1). El mecanismo por el cual estos enzimas acoplan la hidrólisis del ATP a la remodelación nucleosómica es aún desconocido. En experimentos con moléculas individuales se ha demostrado que las proteínas de la familia SNF2 son translocasas de DNA de baja procesividad; es decir, que son capaces de desplazarse cortas distancias por el DNA o de desplazar el DNA respecto al enzima fijo. Dicho desplazamiento crea una torsión que se traduce en superenrollamiento del

DNA. Podemos visualizar el efecto de la actividad remodeladora si imaginamos que empujamos, a la vez que giramos, hacia el nucleosoma, el extremo de una molécula de DNA que se encuentra enrollado en un nucleosoma fijo (fig. 2). Es fácil imaginar que la consecuencia sería hacer saltar las interacciones entre el DNA y la superficie del octámero creando a la vez un bucle de DNA. La migración de este bucle a lo largo de la superficie del octámero permitiría desplazar el DNA o facilitar la salida y entrada de histonas.

Además del dominio central ATPasa, las proteínas de la familia SNF2 presentan otros dominios en las regiones amino y carboxilo terminales tales como dominios CHROMO, BROMO, SANT, motivos AT-hook, etc. Se trata de dominios de interacción con las histonas o con modificaciones postraduccionales de las mis-

mas, así como de interacción con el DNA. La función de estos dominios es la de auxiliar o regular la actividad remodeladora del dominio catalítico principal. Por ejemplo, en ausencia de histonas, los dominios CHROMO de la proteína Chd1 de la levadura *S. cerevisiae* interactúan con el dominio ATPasa, impidiendo su asociación con el DNA y la hidrólisis del ATP (fig. 3). En presencia de histonas, la interacción de los dominios CHROMO con el extremo amino terminal de la H4 libera el dominio catalítico, activando el enzima.¹² Este elegante mecanismo evitaría la hidrólisis del ATP en ausencia del sustrato nucleosómico.

Muchas de las proteínas de la familia SNF2 se han encontrado asociadas a otras proteínas formando complejos multiproteicos, tales como los complejos SWI/SNF, NURF, TIP60, etc. Estas otras subunidades a menudo tienen funciones de apoyo a la actividad remodeladora o de reclutamiento a los *loci* específicos. Por ello, muchas de ellas interactúan con factores transcripcionales, con pequeños o largos RNA regulatorios o con modificaciones postraduccionales de las histonas. Además, en mamíferos es habitual que varias de las subunidades de los CRC estén codificadas por pequeñas familias génicas cuya expresión es específica de tejido o de estado de desarrollo, por lo que se trata de complejos bioquímicamente heterogéneos o polimórficos. Por ejemplo, no podemos hablar de un complejo SWI/SNF sino de una multitud de

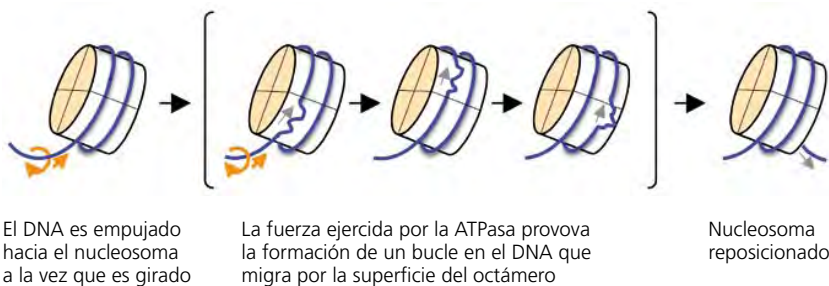


Figura 2. Modelo de mecanismo de desplazamiento del octámero respecto al DNA

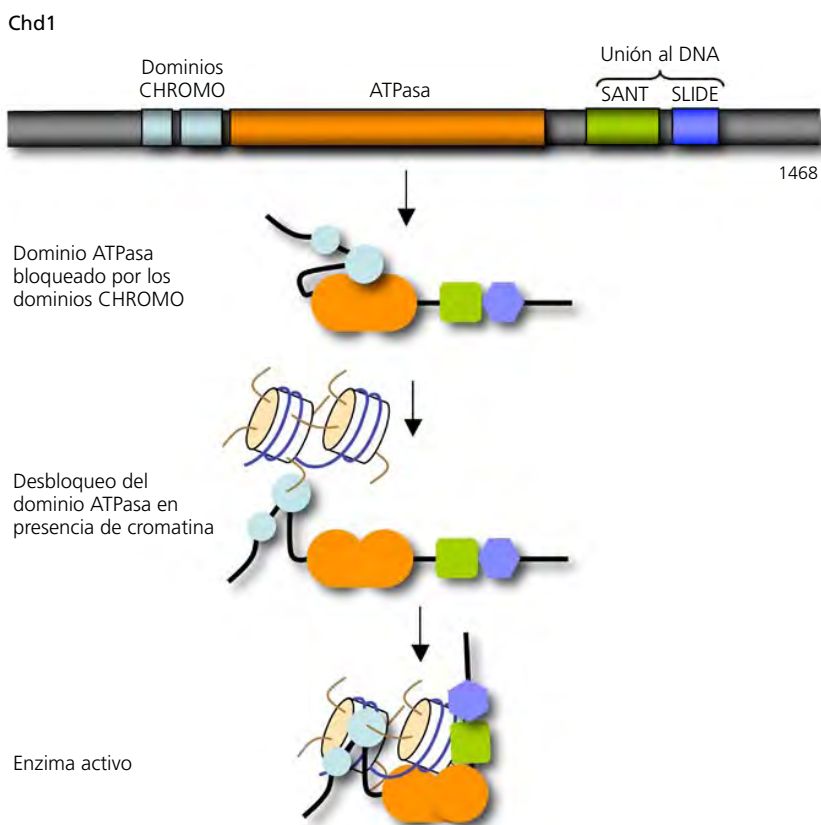


Figura 3. Regulación negativa de la actividad ATPasa de Chd1 por los dominios CHROMO

complejos SWI/SNF diferentes en un mismo organismo e incluso en un mismo tipo celular.

► **Funciones de los remodeladores de cromatina**

Como se comentó anteriormente, la remodelación de cromatina es esencial para multitud de procesos del metabolismo del DNA. Podemos resumir las funciones de los CRC en dos grandes tareas: 1) el establecimiento de la organización nucleosómica del genoma, y 2) el cambio de dicha organización durante procesos determinados (activación o represión transcripcional, reparación del DNA, etc.).

Los nucleosomas no se distribuyen al azar en los genomas eucariotas. Cuando un nucleosoma ocupa una secuencia fija del DNA en una gran proporción de las células de una población decimos que el nucleosoma está fuertemente posicionado. Cuando, por el contrario, los nucleosomas se distribuyen más o menos aleatoriamente hablamos de poco posicionamiento. El grado de posicionamiento

está determinado por la secuencia del DNA, por la actividad de remodeladores de cromatina y por la actividad de otras proteínas de la cromatina, tanto componentes estructurales no histónicos como

factores transcripcionales y RNA polimerasas. Así, en términos generales, las regiones promotoras y las islas CpG en mamíferos (regiones ricas en pares C-G asociadas a muchos promotores) presentan una baja densidad de nucleosomas, mientras que justo aguas abajo del inicio de transcripción de los genes suele ser muy frecuente la presencia de un tren de nucleosomas bien posicionados con una periodicidad fija (fig. 4). Dicho posicionamiento se va perdiendo a medida que avanzamos en la región codificante del gen. Las regiones de terminación de la transcripción también presentan una zona libre de nucleosomas flanqueada por nucleosomas bien posicionados. Esta distribución nucleosómica a escala genómica está determinada, al menos en parte, por remodeladores de la cromatina.

Por ejemplo, en *S. cerevisiae* la carencia de la actividad remodeladora del complejo RSC (un complejo similar a SWI/SNF) provoca un estrechamiento de la región libre de nucleosomas de los promotores¹³ (fig. 4). Por otra parte, la deficiencia de las ATPasas Isw1 o Chd1 provoca una pérdida de posicionamiento nucleosómico en las regiones codificantes (fig. 4).¹⁴ Estos datos sugieren que la organización nucleosómica del genoma que observamos requiere la constante actividad de los remodeladores y del constante gasto de ATP. Numerosos grupos estudian cómo esta distribución nucleosómica afecta a la iniciación de la transcripción, la tasa de elongación, la terminación, o incluso la maduración de intrones.¹⁵⁻¹⁸ Otros grupos

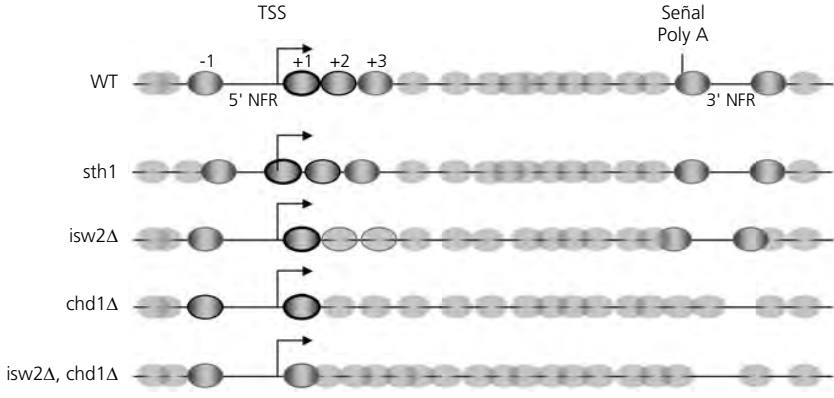


Figura 4. Efecto sobre la organización nucleosómica del genoma de mutaciones en genes que codifican remodeladores de la cromatina en *S. cerevisiae*

NFR: región desprovista de nucleosomas posicionados (del inglés *nucleosome free region*). El nivel de transparencia y el grosor de la línea de los nucleosomas indican el grado de posicionamiento.

proponen que el ordenamiento nucleosómico es en sí una consecuencia de la actividad transcripcional. Hasta qué punto el posicionamiento nucleosómico se puede considerar información epigenética y es, por lo tanto, heredado a través de la mitosis, es también un tema de activa investigación.

Además de esta función general en el mantenimiento de la organización nucleosómica del genoma, numerosos resultados demuestran papeles concretos de varios remodeladores en la reorganización de la cromatina de elementos reguladores tales como promotores o *enhancers*. Por ejemplo, la inducción en condiciones de bajo fosfato del promotor del gen *PHO5*

«Se estima que más del 20% de los cánceres de diferentes orígenes presentan mutaciones al menos en una de las subunidades de los complejos SWI/SNF humanos.»

en levaduras requiere la reorganización de cuatro nucleosomas. Al menos dos maquinarias diferentes de remodelación, SWI/SNF e INO80, son necesarias para la activación de este gen.¹⁹ En mamíferos la acción transcripcional de las hormonas esteroideas también depende ampliamente de remodeladores de la cromatina. Por ejemplo, los sitios de unión del receptor de progesterona humano sufren una fuerte remodelación nucleosómica en presencia de hormona que requiere al menos dos complejos remodeladores NURF y SWI/SNF.^{20,21}

Los remodeladores de cromatina con gasto de ATP son también importantes en el establecimiento, el mantenimiento o la erradicación de marcas epigenéticas. Por ejemplo, una deficiencia en las ATPasas de la familia SNF2 ATRX o SMARCA6 provoca fuertes defectos de metilación del DNA sobre todo en regiones de heterocromatina.²²⁻²⁴ Sería lógico especular que la actividad remodeladora de estas ATPasas es necesaria para *abrir* la compacta estructura de la heterocromatina y para permitir el acceso al DNA de las metiltransferasas del DNA.

Finalmente, aunque en esta pequeña revisión nos hemos centrado en las funcio-

Tabla 1. Lista de remodeladores y enfermedades asociadas

Gen	Complejo al que pertenece la proteína	Enfermedad
<i>BAF250A/ARID1A</i>	SWI/SNF	Síndrome de Coffin-Siris, cáncer de varios tipos
<i>BAF250B/ARID1B</i>	SWI/SNF	Síndrome de Coffin-Siris, autismo, esquizofrenia, cáncer de varios tipos
<i>SMARCA2/BRM</i>	SWI/SNF	Síndromes de Coffin-Siris y de Nicolaides-Baraitser, esquizofrenia
<i>SMARCA4/BRG1</i>	SWI/SNF	Síndrome de Coffin-Siris, melanomas, cáncer de pulmón
<i>SMARCB1/BAF47</i>	SWI/SNF	Síndromes de Coffin-Siris y de Kleeftstra, tumores rabdoideos
<i>SMARCC1/BAF155</i>	SWI/SNF	Autismo
<i>SMARCC2/BAF170</i>	SWI/SNF	Autismo
<i>BAF180/PBRM</i>	SWI/SNF	Autismo
<i>CHD7</i>	¿?	Síndrome de CHARGE, autismo
<i>CHD8</i>	¿?	Autismo
<i>ATRX</i>	ATRX-DAXX	Retardo mental y talasemia alfa ligado al cromosoma X
<i>CSB</i>	TC-NER	Síndrome de Cockayne
<i>SRCAP</i>	SRCAP	Síndrome de Floating-Harbor

nes transcripcionales, los remodeladores también son esenciales en procesos como replicación, reparación y recombinación, y su pérdida compromete fuertemente la estabilidad genómica (recientemente revisado en Price y D'Andrea²⁵ y Papamichos-Chronakis y Peterson²⁶).

► Enfermedades provocadas por defectos en CRC

Dado el extenso papel de los CRC dependientes de ATP en regulación transcripcional, así como en estabilidad genómica, no es raro que multitud de deficiencias congénitas estén asociadas a mutaciones en genes que codifican subunidades de los CRC. Por ejemplo, síndromes como los denominados ATR-X, de Cockayne, de Nicolaides-Baraitser, de Coffin-Siris y de CHARGE, entre otros,²⁷ son provocados por mutaciones

en ATPasas de la familia SNF2 o en otras subunidades de CRC (tabla 1). Si bien cada uno de estos síndromes presenta anomalías específicas, todos están caracterizados por mostrar defectos neurológicos, lo que pone de manifiesto el importante papel que tienen los CRC en el desarrollo del sistema nervioso y la diferenciación neuronal.²⁸

La reciente secuenciación de genomas completos o de exomas tumorales también ha sido determinante para demostrar la función de los CRC en evitar la formación de tumores en el hombre. De hecho, se estima que más del 20% de los cánceres de diferentes orígenes presentan mutaciones al menos en una de las subunidades de los complejos SWI/SNF humanos,²⁹ lo cual es comparable a las frecuencias de mutación encontradas en supresores de tumores clásicos como *TP53* o *PTEN*.

► Conclusiones y futuro

Tras aproximadamente 25 años de investigación sobre remodelación de cromatina, el concepto que más claramente hemos aprendido es que la esencia de la cromatina es ser dinámica y que la distribución nucleosómica que observamos es consecuencia de la afinidad del DNA por las histonas, pero también, y muy especialmente del continuo cambio producido por los procesos del metabolismo del DNA y la constante actividad de las maquinarias de remodelación, que gastan energía para evitar que el octámero ocupe las posiciones de mínima energía.

Mucho nos queda aún por comprender, empezando por el mismo mecanismo de remodelación. Cómo la actividad translocasa de las ATPasas SNF2 se acopla a la reorganización de las interacciones entre DNA e histonas y cómo tiene lugar el movimiento del octámero son cuestiones en activa investigación. Los estudios a escala genómica nos han enseñado mucho, pero la cantidad de información es tal que se tiende a analizar el comportamiento medio sin todavía focalizar los casos concretos. Los detalles a escala molecular de la reorganización, es decir, cuántas bases aguas arriba o aguas abajo se desplaza un nucleosoma en un promotor o un elemento regulador concreto ante un determinado estímulo, son desconocidos excepto en dos o tres ejemplos paradigmáticos.

Resultados recientes sugieren que hacen falta varios CRC para la activación transcripcional de un solo gen. ¿Qué hace cada uno? ¿Cuál es la coreografía del proceso? ¿Cómo unas maquinarias preparan el sustrato nucleosómico para otras y cómo todo esto se coordina con otras maquinarias enzimáticas encargadas de introducir o quitar marcas epigenéticas?

Por otra parte, el nucleosoma solo es el primer nivel de compactación de la cromatina. ¿Cómo se reorganiza la fibra de 30 nm o la de 300 nm? ¿Están también involucradas las ATPasas de la familia SNF2 en estos procesos? Creo que no me equivoco si afirmo que solo estamos al comienzo y que los próximos 25 años de investigación sobre los CRC serán aún más apasionantes que los anteriores. #

.....
José C. Reyes

CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA
MOLECULAR Y MEDICINA REGENERATIVA

(CABIMER), CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) SEVILLA

► Lecturas recomendadas

- Narlikar GJ, Sundaramoorthy R, Owen-Hughes T: Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell* 2013; 154: 490-503.
- Olins DE, Olins AL: Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 4: 809-14.
- Petesch SJ, Lis JT: Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation. *Trends Genet* 2012; 28: 285-94.
- Ronan JL, Wu W, Crabtree GR: From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 347-59.

► Bibliografía

- Olins DE, Olins AL: Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 4: 809-14.
- Han M, Grunstein M: Nucleosome loss activates yeast downstream promoters *in vivo*. *Cell* 1988; 55: 1137-45.
- Lorch Y, LaPointe JW, Kornberg RD: On the displacement of histones from DNA by transcription. *Cell* 1988; 55: 743-4.
- Laurent BC, Treich I, Carlson M: The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev* 1993; 7: 583-91.
- Khavari PA, Peterson CL, Tamkun JW, Mendel DB, Crabtree GR: BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature* 1993; 366: 170-4.
- Winston F, Carlson M: Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet* 1992; 8: 387-91.
- Tamkun JW *et al*: Brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 1992; 68: 561-72.
- Peterson CL, Herskowitz I: Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 1992; 68: 573-83.
- Laurent BC, Treitel MA, Carlson M: Functional interdependence of the yeast SNF2, SNF5, and SNF6 proteins in transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2687-91.
- Hargreaves DC, Crabtree GR: ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* 2011; 21: 396-420.
- Narlikar GJ, Sundaramoorthy R, Owen-Hughes T: Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell* 2013; 154: 490-503.
- Hauk G, McKnight JN, Nodelman IM, Bowman GD: The chromodomains of the Chd1 chromatin remodeler regulate DNA access to the ATPase motor. *Mol Cell* 2010; 39: 711-23.
- Hartley PD, Madhani HD: Mechanisms that specify promoter nucleosome location and identity. *Cell* 2009; 137: 445-58.
- Gkikopoulos T *et al*: A role for Snf2-related nucleosome-spacing enzymes in genome-wide nucleosome organization. *Science* 2011; 333: 1758-60.
- Subtil-Rodriguez A, Reyes JC: BRG1 helps RNA polymerase II to overcome a nucleosomal barrier during elongation, *in vivo*. *EMBO Rep* 2010; 11: 751-7.
- Tilgner H *et al*: Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16: 996-1001.
- Struhl K, Segal E: Determinants of nucleosome positioning. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20: 267-73.
- Petesch SJ, Lis JT: Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation. *Trends Genet* 2012; 28: 285-94.
- Steger DJ, Haswell ES, Miller AL, Wente SR, O'Shea EK: Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* 2003; 299: 114-6.
- Vicent GP *et al*: Four enzymes cooperate to displace histone H1 during the first minute of hormonal gene activation. *Genes Dev* 2011; 25: 845-62.
- Ballare C *et al*: Nucleosome-driven transcription factor binding and gene regulation. *Mol Cell* 2013; 49: 67-79.
- Zemach A *et al*: The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 2013; 153: 193-205.
- Dennis K, Fan T, Geiman T, Yan Q, Muegge K: Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* 2001; 15: 2940-4.
- Gibbons RJ *et al*: Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 2000; 24: 368-71.
- Price BD, D'Andrea AD: Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 2013; 152: 1344-54.
- Papamichos-Chronakis M, Peterson CL: Chromatin and the genome integrity network. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 62-75.
- Berdasco M, Esteller M: Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet* 2013; 132: 359-83.
- Ronan JL, Wu W, Crabtree GR: From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 347-59.
- Kadoch C *et al*: Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet* 2013; 45: 592-601.