

DINÀMICA DEL DNA EN EL CROMOSOMA

JOAQUIM ROCA

Institut de Biologia Molecular de Barcelona. CSIC.

Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona.
www.cid.csic.es/homes/roca

SUMMARY

Native DNA molecules are precisely organized and condensed into chromosomes. Faithful replication and partition of the genome require both the resolution of DNA tangling problems and the restoration of the structural features needed to modulate genetic activities. As an introduction to the dynamism of chromosomal DNA, this chapter deals with current topics regarding DNA topology and mechanisms governing the spatial localization of DNA.

INTRODUCCIÓ

Les molècules de DNA estan altament condensades dins l'espai cel·lular. El plegament i la localització espacial del DNA depenen de mecanismes estrictament determinats que, junt amb una finalitat estèrica de condensació, operen també com a moduladors de l'expressió genètica. La replicació del genoma, a part de duplicar les molècules de DNA, ha de regenerar també el seu patró d'organització en el cromosoma. En els darrers anys, noves metodologies han permès manipular experimentalment la localització

i la dinàmica del DNA intracel·lular. En aquest capítol es repassen alguns temes referents a la dinàmica del DNA, i es destaquen aspectes topològics de la doble hèlix. Primer s'expliquen conceptes bàsics sobre paràmetres topològics, i es tracten el mecanisme i la funció de les topoisomerases del DNA. A continuació es parla sobre aspectes estructurals de l'activitat genètica on participen regions llunyanes del cromosoma, i finalment es discuteix més àmpliament el procés de condensació mitòtica dels cromosomes.

TOPOLOGIA DEL DNA

El DNA intracel·lular està superenrotllat (*supercoiled*). Aquest terme significa literalment que la doble hèlix està enrotllada sobre si mateixa, però en la pràctica s'utilitza per indicar que hi ha alteracions en els paràmetres topològics de la doble hèlix. Els paràmetres utilitzats per definir la topologia del DNA són explicats a continuació.

Número d'enllaçament

Per definir estrictament el número d'enllaçament o Lk (*linking number*) hem d'imaginar un parell de corbes tancades en l'espai. El valor de Lk és un íntegre que correspon al número i el signe d'encreuaments entre les dues corbes, un cop projectades sobre qualsevol pla. Davant de qualsevol deformació, mentre les dues corbes segueixin tancades, el número d'enllaçament és inalterable.

En un DNA circular, cada bri de la doble hèlix representa una corba tancada i estarà encreuada un nombre determinat de cops amb l'altre bri. El número d'enllaçament del DNA es considera de signe positiu mentre la doble hèlix sigui dextrogira. En un DNA de longitud coneguda en parells de bases (N), el número d'enllaçament s'aproxima a N/h , on h (*helical repeat*) és el nombre de parells de bases per volta de la doble hèlix. En el DNA en dissolució (0,2 M NaCl, pH 7, 37°C), el valor mitjà d' h és aproximadament 10,5. Com que N/h no té perquè ser un íntegre, denominem L_{km} l'íntegre més pròxim a N/h . Per exemple, en el plasmidi pBR322, considerant N igual a 4316, i h igual a 10,5, L_{km} és 415. Per a mesuraments termodinàmics s'utilitza el valor real de N/h , tot i que no sigui un número íntegre. Aquest hipotètic número d'enllaçament es denomina L_{ko} . Així en el plasmidi pBR322, quan h és 10,5, L_{ko} resulta ser 415,3. L_{ko} representa el valor d'enllaçament en l'estat de

mínima energia del DNA, i, per tant, el seu valor varia segons l'entorn experimental.

Si abans de circularitzar un DNA fem voltar els extrems de la doble hèlix cap a la dreta o cap a l'esquerra, haurem augmentat o disminuït el número d'enllaçament entre els bris del DNA. El valor ($Lk - L_{ko}$) es denomina diferència d'enllaçament o ΔLk :

$$\Delta Lk = (Lk - L_{ko})$$

Si considerem la diferència d'enllaçament respecte a la mida del DNA, obtenim la diferència específica d'enllaçament, o densitat de superenrotllament (ds):

$$ds = (Lk - L_{ko})/L_{ko} = \Delta Lk/L_{ko}$$

En els bacteris i els eucariotes, la densitat de superenrotllament del DNA té un valor mitjà a l'entorn de -0,06. És a dir, el DNA té un dèficit del 6% en el número d'enllaçament L_{ko} . L'energia lliure associada amb el superenrotllament del DNA és proporcional al quadrat de la diferència del número d'enllaçament:

$$\Delta G_s = K \cdot \Delta Lk^2$$

L'energia associada al superenrotllament provoca canvis en la geometria del DNA, i transicions estructurals en determinades seqüències de la doble hèlix. Aquesta energia és utilitzada per diversos mecanismes cel·lulars. Per exemple, el superenrotllament negatiu facilitarà processos en els quals es requereixi la separació dels brins del DNA. També facilitarà l'encaixament de nucleosomes o altres complexos que establintzin deformacions del DNA.

Número de torsió i número d'enrotllament

Les deformacions del DNA es poden definir segons variacions de dues funcions geo-

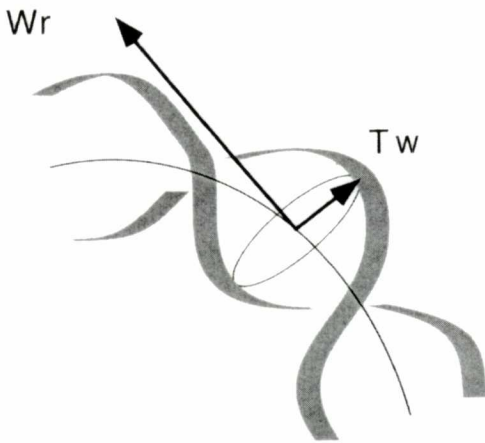


FIGURA 1. En un segment de DNA, el número de torsió (Tw) és una mesura de l'arc que descriu a l'espai un vector perpendicular a l'eix de la doble hèlix i que segueix la vorera d'un dels brins. El número d'enrotllament (Wr) és una mesura de l'arc que descriu a l'espai un vector tangencial a l'eix de la doble hèlix.

mètriques complexes: l'anomenat número de torsió o Tw (*twist number*), i l'anomenat número d'enrotllament o Wr (*writhe number*). El número de torsió descriu com giren els brins al voltant de l'eix central de la doble hèlix. El número d'enrotllament descriu com l'eix central de la doble hèlix canvia de direcció en l'espai (figura 1). De manera aproximada, el número de torsió varia una unitat positiva cada cop que un bri completa una

volta en sentit dextrogiar al voltant de l'eix del DNA. El número d'enrotllament varia prop d'una unitat cada cop que la trajectòria de l'eix del DNA es creua amb si mateixa en qualsevol projecció planar de l'espai. A cada entrecreuament, el signe de Wr es determina segons regles convencionals (figura 2).

El més important que ens ocupa respecte als valors de Tw i Wr no és el seu càlcul, sinó que la seva suma esdevé sempre el número d'enllaçament:

$$Lk = Tw + Wr$$

Aquesta llei implica que, mentre el número d'enllaçament no canviï, qualsevol canvi del número de torsió es correspon amb un canvi idèntic però de signe contrari en el número d'enrotllament, i viceversa. Així mateix, tot canvi en el número d'enllaçament es manifesta amb canvis en els números de torsió i d'enrotllament:

$$\Delta Lk = \Delta Tw + \Delta Wr$$

La figura 3 permet veure la interconversió entre els valors de Tw i Wr . Aquests paràmetres es poden modelar també amb un tub de goma circularitzat. Abans de connectar els extrems del tub, els podem fer girar unes voltes per simular variacions en el número d'enllaçament.

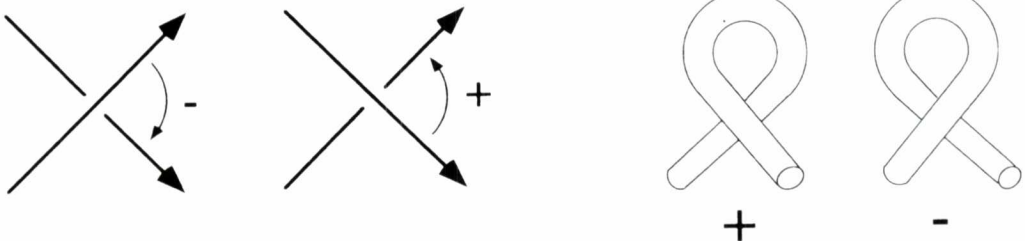


FIGURA 2. Per determinar el signe del número d'enrotllament (Wr), es projecten sobre un pla tots els encreuaments entre segments de la doble hèlix i s'indica la seva polaritat. Si per reduir l'angle que formen els segments d'un encreuament hem de fer girar el segment que va per sobre en sentit horari, l'encreuament és negatiu. Si l'hem de fer girar en sentit antihorari, l'encreuament és positiu.

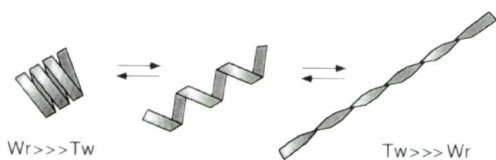


FIGURA 3. Interconversió entre el valor de torsió (T_w) i el d'enrotllament (W_r).

Experimentalment s'observa que en molècules circulars de DNA amb valors fisiològics de ΔLk i en absència de transicions estructurals, la doble hèlix es deforma aproximadament un 75% a càrrec de W_r i un 25% a càrrec de T_w . Les deformacions a càrrec del número d'enrotllament poden ser de tipus plectonèmic o de tipus solenoïdal (figura 4). En el plegament plectonèmic dos segments antiparalels de la doble hèlix s'envolten l'un amb l'altre i formen una doble hèlix d'ordre superior. La doble hèlix plectonèmica és dextrogira quan el DNA té superenrotllament negatiu ($\Delta Lk < 0$), i és levogira en el cas contrari ($\Delta Lk > 0$). En el plegament solenoïdal, el dúplex gira com al voltant d'un cilindre, i forma literalment una superhèlix. La conformació solenoïdal és dextrogira o levogira segons que el DNA tingui superenrotllament positiu o negatiu, respectivament. El DNA superenrotllat en dissolució adopta espontàniament la conformació plectonèmica. La conformació solenoïdal la trobem generalment estabilitzada per proteïnes, com és el cas dels nucleosomes.

Dominis topològics

En petites molècules de DNA circulars, com plasmidis, DNA mitocondrials o genomes vírics, podem mesurar canvis en el número d'enllaçament. En grans molècules de DNA, com són els cromosomes bacterians i eucariòtics, és més complex mesurar paràmetres topològics. En aquest cas, el DNA

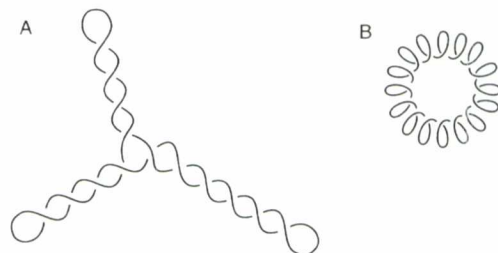


FIGURA 4. Conformacions plectonèmiques (A) i solenoïdals (B) del DNA superenrotllat.

està organitzat en segments on la topologia és modulada de manera independent. Cadascun d'aquests segments el denominem domini topològic.

El genoma d'*Escherichia coli* consisteix en una molècula de DNA d'1,5 mm de longitud, la qual sembla organitzada en uns cinquanta dominis topològics. En els cromosomes eucariòtics, es creu que el DNA està organitzat també en dominis d'una quantitat de quilobases de DNA compresa entre 10 i 200 cadascun.

Qualsevol element, transitori o permanent, que impedeixi la lliure rotació de la doble hèlix sobre el seu eix esdevé una frontera entre dos dominis topològics. Podem considerar així els elements estructurals vinculats amb l'organització i la compactació del DNA. La majoria dels processos catalítics que tenen lloc a la doble hèlix, com ara replicació, transcripció, recombinació i reparació, impliquen la interacció del DNA amb grans complexos multiproteics. Aquests complexos no poden moure's lliurement dins de l'espai cel·lular i, per tant, actuen també com a barreres entre dominis topològics quan s'uneixen al DNA.

TOPOISOMERASES DEL DNA

Molts processos cel·lulars afecten, o són afectats, per l'estat topològic del DNA. El

superenrotllament local del DNA oscil·la contínuament segons el desplaçament de polimerases, d'helicases, o de l'encaixament dels nucleosomes. Apareixen invariablement nusos i encadenaments entre els brins del DNA com a conseqüència dels processos de replicació, recombinació i condensació dels cromosomes. Si els brins de DNA fossin traspassables entre ells, la topologia del DNA mai no seria un entrebanc, ja que es podrien alterar els números d'enllaçament, o desfer el més complex dels nusos en un instant. El que sembla una utopia és una realitat des del punt de vista molecular a causa de l'activitat de les topoisomerases del DNA.

Tipus de topoisomerases i mecanisme d'acció

Les topoisomerases del DNA són enzims definits per dues característiques. La primera és la capacitat de produir escissions transitòries en el DNA. Sense cofactor energètic, les topoisomerases tallen i lliguen els enllaços fosfodièster del DNA mitjançant reac-

cions de transesterificació. En el lloc del tall, es genera sempre un intermediari covalent entre una tirosina de l'enzim i el fosfat de l'extrem del bri. La segona característica consisteix en el fet que la topoisomerasa permet el pas d'un altre bri, o d'altres brins, de DNA a través d'aquesta escissió transitòria.

Les topoisomerases són presents en tot tipus de cèl·lules i també en molts virus. Considerant homologies i propietats catalítiques, es descriuen tres tipus o famílies evolutives de topoisomerases: les tipus I-A, les tipus I-B, i les tipus II. La figura 5 mostra el tipus d'escissió i el complex covalent que caracteritza cada família de topoisomerases, i anomena alguns dels enzims més representatius.

Les topoisomerases del tipus I-A s'uneixen i tallen brins senzills de DNA. A través del tall faciliten el pas d'un altre bri o d'una doble hèlix de DNA. L'intermediari covalent es forma amb el fosfat 5' de l'extrem tallat. L'enzim més representatiu d'aquest grup és la topoisomerasa I d'*E. coli*. *In vitro*, aquesta proteïna de 97 kD pot fer i desfer nusos en cercles de DNA d'un sol bri, com

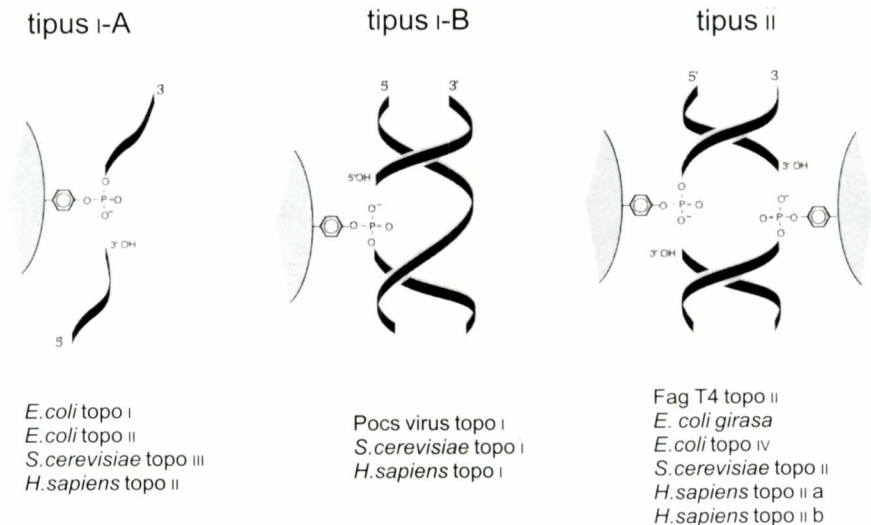


FIGURA 5. Tipus de topoisomerases i enzims més representatius.

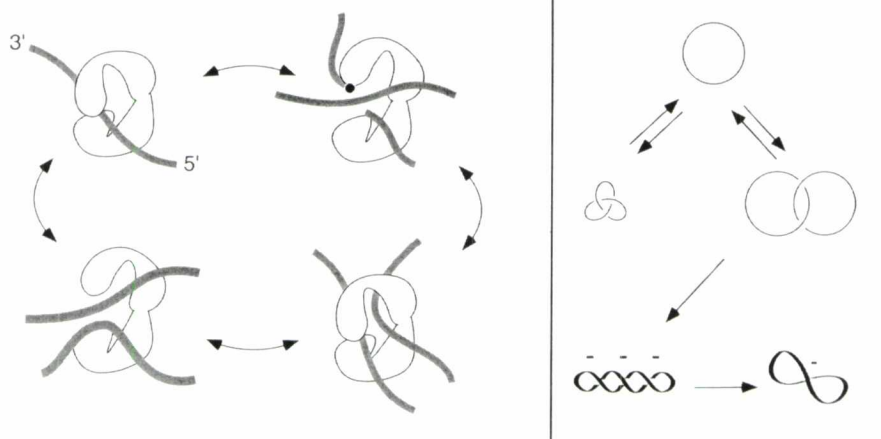


FIGURA 6. Estructura, mecanisme i reaccions catalitzades per les topoisomerases del tipus I-A.

també pot encadenar-los o desencadenar-los. L'enzim relaxa també parcialment molècules de DNA amb superenrotllament negatiu, ja que hi troba segments de bri senzill (figura 6). Altres topoisomerases del tipus I-A són la topoisomerasa III dels bacteris i la topoisomerasa III dels eucariotes. Un enzim peculiar d'aquest grup és l'anomenada «girasa reversa», que es troba en bacteris termòfils. Aquest enzim és una quimera entre una topoisomerasa del tipus I-A i una helicasa, i catalitza el superenrotllament positiu del DNA.

Les topoisomerases del tipus I-B s'uneixen a la doble hèlix de DNA i tallen un dels brins, i formen l'intermediari covalent amb el fosfat 3' del bri trencat. Com que l'enzim no subjecta l'extrem 5' del bri, és possible la lliure rotació del DNA al voltant de l'altre bri; això permet que relaxin tant un superenrotllament positiu com negatiu (figura 7). Les topoisomerases del tipus I-B sembla que són exclusives dels eucariotes. Les anomenades topoisomerases I dels llevats, dels amfibis, dels insectes, de les plantes i dels mamífers són proteïnes d'uns 100 kD i presenten una alta homologia en la regió C-terminal, on es troba el centre actiu.

A diferència de les topoisomerases del tipus I-A i del tipus I-B, les topoisomerases del tipus II funcionen com a enzims dímers i utilitzen ATP. Les topoisomerases del tipus II catalitzen el pas d'una doble hèlix (segment T) a través d'un tall en una altra doble hèlix (segment G). Aquests enzims tallen els dos brins del segment G, de manera que cada meitat del dímer forma l'intermediari covalent amb el fosfat 5' del corresponent bri del DNA. Estudis bioquímics i estructurals han permès dibuixar un model realista del mecanisme de les topoisomerases del tipus II (figura 8). Quan els segments G i T són a la mateixa molècula de DNA, la topoisomerasa catalitza un canvi de dues unitats en el número d'enllaçament, així varia el grau d'en-

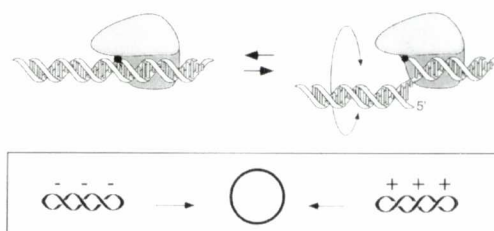


FIGURA 7. Mecanisme i reaccions catalitzades per les topoisomerases del tipus I-B.

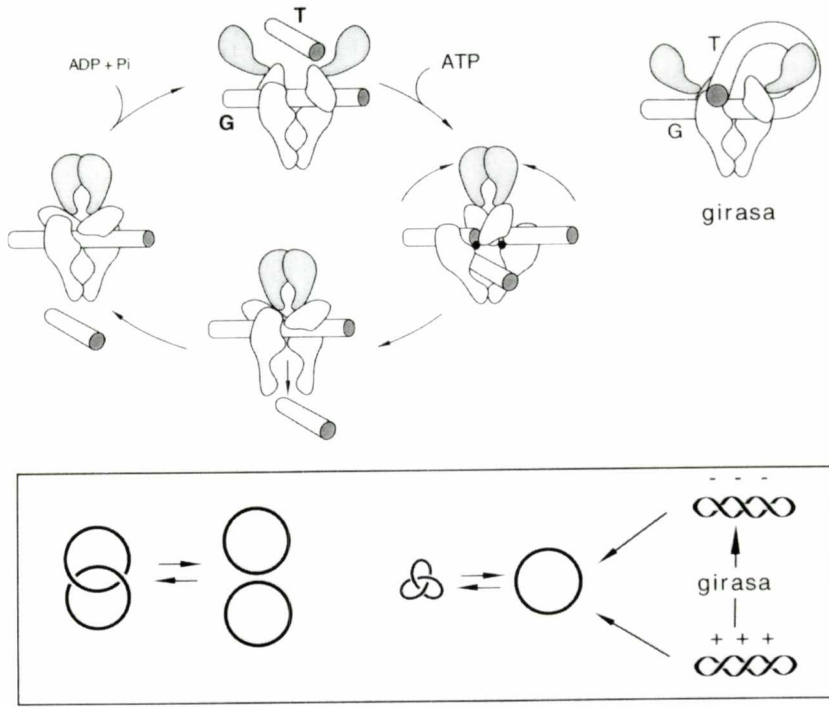


FIGURA 8. Estructura, mecanisme i reaccions catalitzades per les topoisomerases del tipus II.

rotllament o el nuament del DNA. Quan els segments G i T pertanyen a diferents molècules de DNA, l'enzim catalitza el seu encadenament o desencadenament. A excepció de la girasa del DNA, totes les topoisomerases del tipus II modifiquen la topologia del DNA cap a l'estat de mínima energia, i fins i tot arriben a simplificar-ne la topologia per sota dels valors d'oscil·lació tèrmica.

En els eucariotes, les topoisomerases del tipus II són homodímeres d'una proteïna de 160 a 180 kD. Mentre en els llevats hi ha un únic gen codificant per a l'anomenada topoisomerasa II, en els vertebrats s'han trobat dues variants de l'enzim, la topoisomerasa II α i la topoisomerasa II β . En els procariotes, les topoisomerases del tipus II són tetràmeres, ja que cada meitat de l'enzim és constituït per dues proteïnes. En bacteris trobem dues topoisomerases del tipus II: l'anome-

nada topoisomerasa IV, que té propietats catalítiques semblants a la topoisomerasa II eucariòtica; i la girasa, que està especialitzada a reduir el número d'enllaçament del DNA. Així, la girasa només pot relaxar el superenrotllament positiu i generar superenrotllament negatiu en el DNA. Mecanísticament i estructuralment, però, l'enzim és similar a les altres topoisomerases del tipus II. L'especialització de la girasa es deu a la geometria que l'enzim imposa en interaccionar amb el DNA, que sempre afavoreix la inversió d'un encreuament positiu entre els segments G i T (figura 8).

Implicacions funcionals de les topoisomerases del DNA

És ben conegut el paper de les topoisomerases en la resolució dels encadenaments

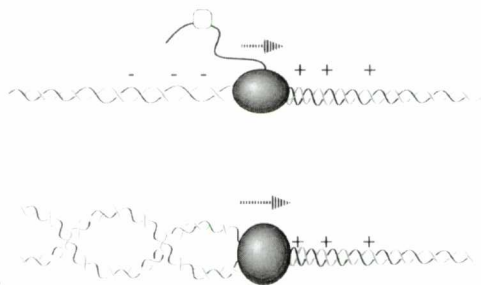


FIGURA 9. Canvis topològics en el DNA durant la transcripció i la replicació.

que es generen durant el procés de replicació (figura 9). El desencadenament del DNA un cop replicat és essencial per a la segregació cromosòmica. La topoisomerasa IV en els bacteris i la topoisomerasa II en els eucariotes són els enzims responsables d'aquesta funció.

S'ha estudiat també el paper de les topoisomerases en la modulació del número d'enllaçament del DNA. El superenrotllament del DNA fluctua com a conseqüència del desplaçament de polimerases, ja que obliguen el DNA a girar sobre el seu eix. Això genera superenrotllament positiu per davant de la polimerasa, i negatiu per darrere (figura 9). La relaxació d'aquest superenrotllament esdevé necessària per a l'avanç de les polimerases. En els bacteris, la girasa relaxa el superenrotllament positiu i la topoisomerasa I, el superenrotllament negatiu. De l'equilibri d'aquestes activitats en resulta la densitat de superenrotllament del $-0,06$ observat en DNA bacterians. En les eucariotes, la topoisomerasa I de manera preferent i, també, la topoisomerasa II relaxen simultàniament el superenrotllament positiu i negatiu.

ACCIONS A DISTÀNCIA DINS L'ESTRUCTURA DEL CROMOSOMA

L'expressió genètica depèn de paràmetres termodinàmics i cinètics d'un conjunt

de factors que interaccionen amb el DNA. En la transcripció, primer s'han d'establir les interaccions proteïna-proteïna i proteïna-DNA suficients per assentar la RNA polimerasa en el promotor. Seguidament, els processos d'iniciació i d'elongació determinaran el temps necessari per assentar una nova polimerasa. Sobretot en els eucariotes, molts factors reguladors de la transcripció s'uneixen al DNA a cents o milers de bases d'on es forma el complex d'iniciació. Hi ha proposats diversos mecanismes per explicar com es comuniquen llocs llunyans en el DNA. En uns casos es requereix un contacte físic entre l'element distant i el complex d'iniciació, llavors el DNA s'ha de plegar per aproximar ambdós punts; això es coneix com a *looping* del DNA. En altres casos, té lloc la propagació de canvis estructurals. Aquests canvis poden operar en l'àmbit del superenrotllament del DNA, la composició de la cromatina o el posicionament dels nucleosomes. Finalment, cal considerar factors que un cop units a un punt del DNA es difonen linealment fins a un altre punt.

«Looping» del DNA

Qualsevol proteïna que es trobi en quantitat de 100 a 1.000 molècules dins el nucli cel·lular, com és el cas de molts factors reguladors, està a una concentració de prop de 10^{-8} M. En un DNA en dissolució, la concentració efectiva entre punts separats cents o milers de bases té un valor de 10^{-8} a 10^{-9} M. Es dedueix, per tant, que merament la unió de factors a seqüències distants no augmenta la seva concentració efectiva. En canvi, si el DNA està condensat i hi ha restriccions a la seva geometria espacial, la concentració efectiva entre punts distants pot augmentar fins a 10^{-4} M. Aquest valor és més consistent amb les concentracions efectives calculades de reguladors de l'activitat genètica que operen a distància. Les restriccions a la geo-

metria del DNA són generades per curvatures del DNA, intrínseques o bé induïdes per la unió de proteïnes, i pels plegaments deguts al superenrotllament. La figura 10 il·lustra dos exemples d'aproximació d'elements llunyans, que esdevé determinada per restriccions específiques en l'organització del DNA.

Estructura i dominis funcionals

En els eucariotes, els cromosomes presenten regions amb diferent estructura i diferent grau de condensació. Citològicament es defineixen regions eucromàtiques i heterocromàtiques, com a menys o més condensades, respectivament. En comparació de l'eucromatina, el DNA heterocromàtic es replica tardanament, és ric en seqüències repetitives, i és de difícil accés per a moltes proteïnes. Els telòmers i els centròmers presenten característiques heterocromàtiques, amb composició i funció diferenciades.

L'expressió d'un gen depèn de la seva ubicació al cromosoma. Gens procedents de regions eucromàtiques canvien el seu patró d'expressió en ser col·locats en regions heterocromàtiques, i viceversa. L'efecte posicional que no permet a un gen respondre davant els seus reguladors, és anomenat silenciament (*silencing*). Els gens d'expressió constitutiva i els gens induïbles apareixen generalment ubicats en regions eucromàtiques, on el DNA és de fàcil accés per factors de transcripció. L'activació d'aquests gens pot ajudar-se amb mecanismes d'obertura local de nucleosomes, i pot estar potenciada per elements distants (*enhancers*). Gens ubicats a l'heterocromatina, en canvi, només poden activar-se si s'altera l'organització d'una gran regió del DNA. En aquesta situació trobem molts dels gens regulats durant el desenvolupament i la diferenciació cel·lular.

En la majoria dels casos, per establir o revertir l'estat de silenciament, es requereix que la cèl·lula completi la fase S del cicle cel·lular. Es creu, doncs, que els canvis estructurals tenen lloc durant l'encaixament de la cromatina en el DNA replicat. A part de la competència entre factors solubles per unir-se al DNA, la determinació estructural pot dependre també d'elements que sobreviuen al procés de replicació, com serien la metil·lació de bases o la presència de proteïnes fortament unides al DNA.

Els canvis estructurals que impliquen grans dominis del DNA es modulen des d'elements en *cis*, que aquí referim com LCR (*Locus Control Regions*). Hi ha proposats diferents models per explicar com operen els LCR (figura 11). En els casos de silenciament, el model més acceptat consisteix en la polimerització cooperativa i la difusió sobre la cromatina de nous elements estructurals. En altres casos, els LCR poden definir dominis topològics on modular el superenrotllament del DNA. Una altra possibilitat considera els LCR punts d'entrada o sortida de factors que es traslladen per sobre del DNA.

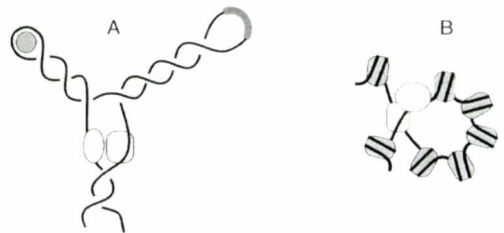


FIGURA 10. Interacció entre llocs llunyans. En el cas A, la geometria del plegament plectonèmic es determina per la presència de dues curvatures en el DNA: una curvatura és intrínseca de la seqüència i l'altra és induïda per la unió d'una proteïna. En el cas B, és l'encaixament dels nucleosomes el que apropa amb una orientació determinada dues seqüències del DNA.

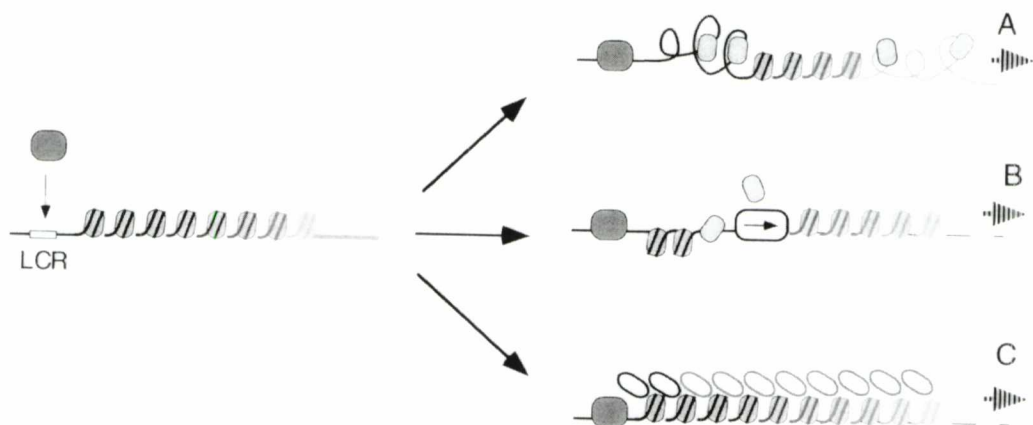


FIGURA 11. Possibles mecanismes per a la difusió de canvis estructurals en la cromatina. A: superenrotllament del DNA; B: difusió lineal d'un factor unitat al DNA; C: nucleació i polimerització de nous elements estructurals.

CONDENSACIÓ MITÒTICA DELS CROMOSOMES

La condensació mitòtica dels cromosomes garanteix la correcta segregació del genoma en resoldre dos problemes derivats de l'estructura i la llargària de les molècules de DNA. En primer lloc, es redueix en quatre ordres de magnitud la longitud del DNA. Els cromosomes mitòtics tenen la mida adient perquè les molècules de DNA no es trobin al mig del pla de tall durant la fase de citoquinesi. En segon lloc, la condensació afavoreix l'eliminació dels encadenaments produïts entre molècules germanes de DNA durant la fase de replicació, com també de qualsevol altre nuament del DNA.

La condensació mitòtica dels cromosomes es coneix des de l'inici del segle, però fins fa poc no s'ha disposat de metodologia per al seu estudi. S'han desenvolupat sistemes de condensació de cromosomes *in vitro*. Per exemple, el DNA d'esperma s'organitza en cromosomes metafàsics quan s'incuba amb extractes d'oòcits. Noves tècniques de microscòpia, com la localització

in situ amb sondes o anticossos fluorescents, permeten mesurar amb precisió paràmetres espacials en els cromosomes. Finalment, s'han identificat dos factors que intervenen en el mecanisme de condensació: la topoisomerasa II, i les anomenades proteïnes de la família SMC (*Stable Maintenance of Chromosomes*).

La falta de models mecànics per a la condensació mitòtica dels cromosomes es deu al desconeixement dels ordres superiors d'organització de la cromatina abans de la mitosi. Estudis citològics indiquen que l'estructura i la localització nuclear dels cromosomes durant l'interfase segueix patrons ben definits, però sabem poc dels mecanismes que hi intervenen, i de l'organització del DNA durant el procés de replicació. Experiments de sedimentació de cromosomes en presència d'agents modificadors de la topologia del DNA indiquen que la rotació lliure de la doble hèlix està limitada en intervals de 10 a 200 quilobases. Aquests dominis podrien correspondre a ananses de DNA, o podrien ser el resultat de punts de contacte entre el DNA amb diver-

sitat d'estructures, cosa que inclou també l'aparellament de seqüències homòlogues entre cromosomes.

Els cromosomes metafàsics són de cinc a deu cops més compactes o curts que els cromosomes interfàsics. No és clar, però, que els cromosomes metafàsics resultin simplement d'un grau més de condensació que els interfàsics. El model actual de cromosoma metafàsic parteix de l'enrotllament solenoïdal del DNA amb histones i forma fibres de 10 i 30 nm. Aquestes fibres serien plegades en nanses de fins a 200 quilobases, mitjançant l'ancoratge del DNA sobre punts de suport que posteriorment s'agrupen i formen un eix. El resultat és una estructura de 200 nm de diàmetre, que finalment es plegaria helicoidalment fins a generar un gruix de 700 nm de diàmetre, gruix corresponent als braços de cromosomes metafàsics. Aquest model és conceptualment correcte, però no hem d'oblidar que amb imaginació podríem proposar altres alternatives dins el marc de les proves experimentals.

El mecanisme de plegament és un procés estrictament determinat. El número, la posició i el grau de condensació en cada regió d'un cromosoma és invariable, així com la longitud i la geometria de l'eix central. L'organització del DNA en fibres de 10 i 30 nm representa un primer nivell de condensació que ja opera durant la interfase. El plegament de la cromatina en determinats dominis o nanses, en canvi, pot ser específic de la condensació mitòtica. D'acord amb el model actual, tres mecanismes diferenciats generarien la condensació mitòtica. El primer és la definició i la formació de nanses. No és clar si les nanses ja existien durant la interfase. El segon mecanisme faria apropar nanses contigües, i així es generaria una estructura més compacta o un eix en cada cromosoma. El tercer mecanisme fa que aquest eix es condensi i es plegui helicoidalment.

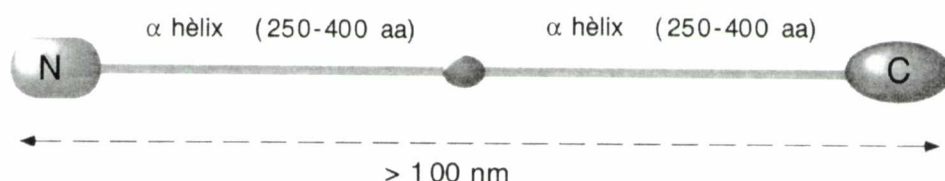
Elements en CIS per a la condensació cromosòmica

En els mecanismes de condensació intervenen factors amb propietats motores i adhesives que han de reconèixer elements en *cis* en el DNA. La condensació mitòtica s'inicia quan les cromàtides germanes encara són aparellades; per tant, els mecanismes de condensació han d'operar amb total processivitat sobre els elements reconeguts en cada molècula del DNA.

S'ha suggerit que els orígens o punts de terminació de replicació del DNA podrien servir per determinar el patró de nanses de cromatina, però manca l'evidència experimental d'aquesta hipòtesi. Les investigacions actuals apunten cap als segments del DNA que romanen insolubles un cop els cromosomes han estat buidats d'histones i tractats amb nucleases. Aquests segments de DNA, anomenats SAR (*Scaffold Attached Regions*), s'estenen al llarg de centenars de bases i són molt rics amb AT. Tres observacions avalen els SAR com a elements en *cis* involucrats amb la condensació mitòtica. En primer lloc, citològicament es veu que els SAR estan situats preferentment en l'eix dels cromosomes metafàsics. En segon lloc, la inducció de proteïnes amb gran afinitat per seqüències riques amb AT interfereix específicament amb el procés de condensació. En tercer lloc, *in vitro* s'observa una gran afinitat de la topoisomerasa II per a aquestes seqüències.

Funció de la topoisomerasa II durant la mitosi

La disponibilitat de cèl·lules amb mutacions en la topoisomerasa II, junt amb l'ús d'inhibidors i anticossos, ha permès estudiar el paper de l'enzim en la condensació cromosòmica. En els llevats, la inactivació de la topoisomerasa II atura la condensació cromosòmica en un estadi semblant al



<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Xenopus</i>
Smc 1	cut 3	XCAP-C
Smc 2	cut 14	XCAP-E

FIGURA 12. Família de proteïnes SMC: característiques estructurals i proteïnes més representatives.

de la profase mitòtica. Tot i així, la cèl·lula intenta completar la mitosi estirant els cromosomes amb el fus mitòtic, però les cromàtides estan molt encadenades i la segregació és impossible. En les cèl·lules de vertebrats, en canvi, la inactivació de la topoisomerasa II atura el cicle cel·lular en la fase G2. Si es provoca la continuació del cicle cel·lular, també s'observa falta de condensació i la impossibilitat de segregació cromosòmica. Si la topoisomerasa II s'inhibeix un cop iniciada la mitosi, la condensació pot completar-se, però sovint la segregació és asimètrica i es produeixen trencaments en el DNA. Totes aquestes observacions indiquen que el desencadenament del DNA per la topoisomerasa II és essencial i ha operat paral·lelament al procés de condensació. El procés de condensació, així mateix, afavoreix la irreversibilitat del procés de desencadenament. Els darrers encadenaments són eliminats per l'enzim quan les cromàtides germanes són estirades en sentits oposats pel fus mitòtic. En aquest escenari, la topoisomerasa II, més que un factor condensant, és un factor facilitador de la condensació.

A part de l'activitat desencadenant,

també es considera que la topoisomerasa II té una funció directa en la condensació mitòtica del DNA. S'ha observat repetidament, per immunolocalització, que l'enzim se situa a l'eix dels cromosomes metafàsics. Això ha fet pensar que la topoisomerasa II participa com a element estructural, i serveix de punt d'ancatge per a les nanses del DNA. Hi ha qui ha observat, però, que la morfologia d'un cromosoma condensat és estable si se n'extreu la topoisomerasa II. Cal considerar, doncs, que la localització axial de la topoisomerasa II sigui circumstancial. Tot i així, el possible paper estructural de la topoisomerasa II com a punt d'ancatge del DNA continua sent atractiu per raó de les propietats mecàniques de l'enzim. *In vitro*, la topoisomerasa II pot unir-se de manera reversible al DNA i forma un anell proteic molt estable.

Una altra indicació del paper condensant de la topoisomerasa II es dedueix d'experiments en sistemes de condensació de cromosomes *in vitro*. Aquí, sense replicació no hi ha encadenaments, però la topoisomerasa II segueix sent necessària per a la condensació. Es postula que l'enzim participi

Mecanismes de resolució	Mecanismes de condensació
a Desencadenament del DNA (topoisomerasa II)	b Encaixament del DNA i histones c Formació de nanses de DNA d Aproximació i plegament dels elements de suport de les nanses

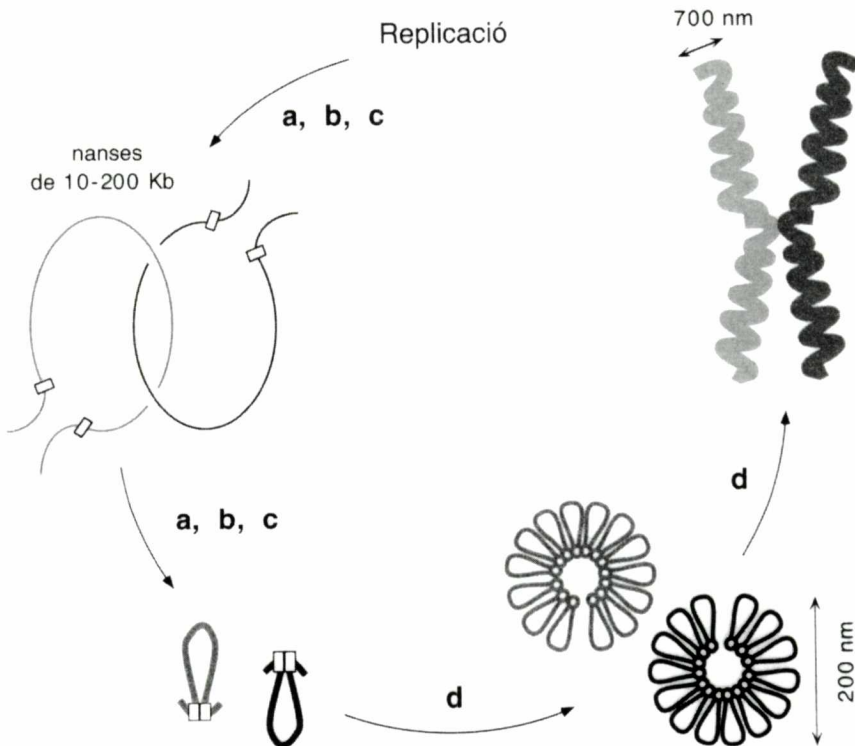


FIGURA 13. El procés de condensació mitòtica dels cromosomes resulta de l'activitat sinèrgica de dos tipus de mecanismes: un mecanisme de resolució, que mitjançant l'activitat de la topoisomerasa II desencadena progressivament les cromàtides germanes; i uns mecanismes de condensació pròpiament dits, que inclouen el plegament solenoïdal del DNA per formar fibres de cromatina, l'organització del DNA en nanses i la compactació dels elements que donen suport a les nanses.

en la condensació mitjançant el superenrotllament del DNA, però no hi ha evidència experimental en aquest sentit; a més, caldria entendre com participa en aquest escenari

l'abundant activitat relaxant de la topoisomerasa I. Una hipòtesi alternativa, que he proposat, diu que si la topoisomerasa II no és un element estructural permanent, po-

dria augmentar la compactació del cromosoma mitjançant un patró de nuament processual entre dominis del DNA. Aquesta possibilitat explicaria per què la morfologia del cromosoma es manté en solubilitzar la topoisomerasa, i també explicaria per què l'activitat de l'enzim torna a ser necessària en el procés de descondensació dels cromosomes.

Proteïnes SMC

Un fenotip característic de cèl·lules amb mutacions condicionals és la falta de segregació dels cromosomes, combinat amb defectes en el seu grau de condensació. Aquest fenotip va permetre trobar mutants de la topoisomerasa II, i ha permès descobrir recentment unes proteïnes vinculades també amb la condensació cromosòmica. Aquest grup de proteïnes, anomenat família SMC (*Stable Maintenance of Chromosomes*), està conservat a tots els eucariotes, i també hi ha proteïnes evolutivament relacionades als bacteris.

Les proteïnes SMC pesen de 115 a 160 kD i la seva seqüència d'aminoàcids suggereix cinc dominis estructurals: un domini N-terminal amb un lloc d'unió per nucleòtids, una hèlix llarga, una regió central flexible, una segona hèlix llarga i un domini C-terminal amb motius molt conservats. Les proteïnes SMC formen dímers i oligòmers, possiblement mitjançant interaccions del tipus hèlix-hèlix. Aquesta estructura quarternària és característica de proteïnes amb activitat motora. La figura 12 mostra aquest tipus d'estructura i anomena algunes de les proteïnes SMC més representatives. Actualment s'estan identificant nous membres, i previsiblement es descriuran subfamílies dins d'aquest grup.

La immunolocalització de les proteïnes SMC mostra una distribució homogènia dins el nucli cel·lular fins a l'inici de la con-

densació cromosòmica; aleshores es concentren a l'eix central dels cromosomes metafàsics. Tot i que la localització axial coincideix amb la de la topoisomerasa II, no hi ha evidència experimental que ambdues proteïnes interaccionin. Els sistemes de condensació *in vitro* han mostrat que les proteïnes SMC són necessàries tant per establir l'estat de condensació dels cromosomes com per mantenir-lo. El mecanisme de condensació és desconegut. Per la seva semblança amb proteïnes amb activitat motora, es creu que apropen punts llunyans de la cromatina, en un procés intensiu i dependent d'ATP.

Les proteïnes SMC més estudiades han estat les que intervenen en la condensació mitòtica dels cromosomes. Hi ha membres de la família, però, que semblen participar en altres funcions. Algunes proteïnes SMC són necessàries per a la compensació d'expressió genètica entre cromosomes homòlegs; d'altres formen part de complexos multiproteics relacionats amb la recombinació. És previsible, doncs, que el mecanisme de les proteïnes SMC sigui utilitzat en diferents processos on operen canvis en l'organització superior del DNA.

Com a síntesi, a la figura 13 es representen algunes fases d'un model de condensació mitòtica dels cromosomes. S'indiquen els mecanismes que hi intervenen i les possibles funcions de la topoisomerasa II i de les proteïnes SMC.

BIBLIOGRAFIA

- ADACHI, Y.; LUKE, M.; LAEMMLI, U. K. (1991). «Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation». *Cell*, núm. 64, pàg. 137-148.
- FELSENFELD, G. (1996). «Chromatin unfolds». *Cell*, núm. 86, pàg. 13-19.
- HECK, M. S. (1997). «Condensins, cohesins and chromosome architecture: How to make and break a mitotic chromosome». *Cell*, núm. 91, pàg. 5-8.

- HIRANO, T. (1995). «Biochemical and genetic dissection of mitotic chromosome condensation». *TiBS*, núm. 20, pàg. 357-361.
- KAMAKAKA, R. T. (1997). «Silencers and locus control regions: opposite sites of the same coin». *TiBS*, núm. 22, pàg. 124-128.
- KOSHLAND, D; STRUNNIKOV (1996). «Mitotic chromosome condensation». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, núm. 12, pàg. 305-333.
- PETERSON, C. L. (1994). «The SMC family: Novel motor proteins for chromosome condensation?». *Cell*, núm. 79, pàg. 389-392.
- RIPPE, K.; VON HIPPEL, P. H.; LANGOWSKI, J. (1995). «Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription». *TiBS*, núm. 20, pàg. 500-505.
- ROCA, J. (1995). «The mechanisms of DNA topoisomerases». *TiBS*, núm. 20, pàg. 156-160.
- UEMURA, *et al.* (1987). «DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*». *Cell*, núm. 50, pàg. 917-925.
- WANG, J. C. (1991). «DNA topoisomerases: why so many?». *J. Biol. Chem.*, núm. 266, pàg. 6659-6662.
- WANG, J. C. (1996). «DNA topoisomerases». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 65, pàg. 635-692.