

UNA APASIONANTE EXPLORACIÓN: LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Luis Franco Vera

Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de España

Hace ahora 20 años pronunciaba mi discurso de ingreso en esta Real Academia, que llevaba por título “El rostro humano de la Ciencia”. Usando a modo de cañamazo el amplio campo de los aspectos moleculares de la regulación biológica –genética, epigenética, enzimática, etc.–, se iban entretejiendo diversos aspectos de la actividad humana, esos rasgos que pueden definir lo que es auténticamente humano. Reflexionaba así sobre las condiciones en que la ciencia en general o la actividad científica concreta son realmente *humanizadoras*, capaces de desarrollar, de hacer patentes las más nobles cualidades humanas. La creatividad, el optimismo, la colaboración, el afán de superación, la búsqueda de la belleza, la actitud de servicio a la sociedad y hasta el buen humor, fueron otros tantos hilos, que sobre ese cañamazo de la regulación biológica formaron un tapiz en el que pretendí reflejar un rostro amable. Y, si me permite que continúe recordando en primera persona aquel discurso, el motivo principal para tratar de aunar un complejo entramado de mecanismos biológicos con los valores humanos era doble. Por una parte, la consideración de que la ciencia la hacen hombres y mujeres que se perfeccionan en cuanto tales en la medida en que su actividad no vulnera esos valores. En efecto, aunque la ciencia, en abstracto, podría considerarse como algo éticamente neutro, no lo es el ejercicio científico. Por otro lado, la necesidad de que el científico no se enroque en una especie de torre de marfil, insensible a los problemas de la humanidad. O si se quiere decir con otras palabras, el convencimiento de que la ciencia debe desarrollarse al servicio del hombre.

Estas consideraciones, que eran a mi modo de ver, válidas hace 20 años, siguen siéndolo ahora. Pero no cabe duda de que,

dado el exponencial avance de las ciencias, 20 años constituyen un periodo suficientemente largo como para que ese cañamazo de la regulación biológica haya crecido extraordinariamente. Y, por otro lado, al hilo del progreso de la ciencia son varias las voces que se alzan pidiendo una intervención en la propia naturaleza humana, de modo que el *Homo sapiens* evolucione hacia un *Homo technologicus* [1]. ¿Se puede seguir hablando de que la ciencia muestre un rostro humano, si se quiere trascender lo humano como apuntó Huxley al acuñar el término *transhumanismo* [2]?

Sería extremadamente ambicioso por mi parte que pretendiera abarcar en una forzosamente breve disertación los problemas que se plantean en esta línea. No obstante, me parece que debo atreverme a hacer una incursión en ese campo. Me mueven a ello dos razones, especialmente cuando Su Majestad preside el acto de apertura de curso de las Reales Academias del Instituto de España. En primer lugar, la Corona siempre ha mostrado un especial interés por el desarrollo de la ciencia al tiempo que no le son ajenas –antes, al contrario– las cuestiones que, de una manera u otra, se refieren a los valores humanos. De hecho, en el discurso que Su Majestad Felipe VI pronunció en Valencia el 25 de noviembre del año pasado, con ocasión de la entrega de los premios Rei Jaume I, ponía en íntima relación ambos intereses al referirse a «*la noble meta de comprender el mundo que nos rodea, que es la premisa para poder cambiarlo y encontrar las soluciones que mejoren la vida de las personas*».

Por otra parte, sé que los problemas humanos no quedan al margen de la dedicación de las Académicas y Académicos a las

materias de la competencia de sus Academias; es más, son estos problemas los que les impulsan a cultivar su actividad. Animado con estas consideraciones, me propongo abordar un tema que, como continuación de aquella ya lejana reflexión sobre el rostro humano de la ciencia, actualice alguno de los recientes avances en el amplio campo de la regulación biológica. Permítaseme –como vulgarmente se dice– llevar el agua a mi molino y centrarme en el estudio de la regulación de la expresión génica y en el papel en ella de la epigenética. Son estos unos aspectos de la biología molecular en los que los avances de los últimos 20 años han resultado especialmente asombrosos.

Y he aquí delineados –por seguir con la analogía varias veces repetida– el cañamazo y los hilos del tapiz que compondrán esta intervención. El primero estará constituido por los logros que en sus aspectos estructurales y mecánicos han hecho posible llegar a un conocimiento insospechado a principios del presente siglo. El asombro que tales logros ha producido servirá para ir entretejiendo los distintos hilos, que espero formen una imagen de cómo los verdaderos científicos no son ajenos al asombro, a la sorpresa ante la belleza de la naturaleza, sino que, al contrario, esa admiración les ha servido de fuerza impulsora para sus más decisivos descubrimientos.

Se habla con frecuencia del periodo que abarca los siglos XV y XVI como la Era de las Grandes Exploraciones. Titulo el presente discurso como una apasionante exploración porque, como los grandes exploradores de nuestro siglo de oro, el científico se mueve por el afán de conocer las maravillas del mundo y su trabajo es también una apasionante aventura. La innata pasión del hombre por conocer llevó a aquellos a arrostrar peligros, privaciones, sacrificios y esfuerzos de todo tipo. Ciertamente, hubo otros intereses entre los exploradores: el afán de riquezas, de poder, en definitiva, todas esas ambiciones menos nobles que pueden atenazarlos a todos. Pero, me atrevería a decir que una gran parte –si no la mayoritaria– de quie-

nes se lanzaron a esas aventuras estaban impulsados por ideales más elevados. Y en su exploración fueron descubriendo un sinfín de novedades, que contemplaron con asombro, con un asombro que fue motor para continuar avanzando en su aventura. Y al final, se vieron recompensados al ir progresivamente asomándose a nuevos escenarios, llenos de belleza y de sorpresas.

He titulado este discurso como una apasionante exploración, y es que el científico, como los grandes descubridores, se mueve fundamentalmente por el afán de conocer, de desentrañar las maravillas que el mundo ofrece y así su trabajo se puede convertir en una maravillosa aventura, en la que el asombro, la sorpresa, la curiosidad son motores de su esfuerzo. Esfuerzo que se ve recompensado también por la contemplación de la belleza de la naturaleza. En nuestro recorrido histórico iremos encontrando dificultades, sorpresas, resultados asombrosos, belleza. Espero poder hacer partícipes a todos del entusiasmo por la investigación, por esa búsqueda de las asombrosas y bellas realidades que toda labor científica –en este caso, la regulación de la expresión génica– encierra.

1. INTRODUCCIÓN

Forma parte del acervo cultural de nuestros días el hecho de que el DNA es el portador de la herencia biológica. El DNA es un polímero en cuya constitución forman parte 4 nucleótidos, que se encadenan hasta formar moléculas lineales de un número muy elevado de eslabones. Es también de dominio público que fueron Watson y Crick quienes en 1953, en el artículo que se ha calificado como el más trascendente de la Biología en el siglo XX, propusieron un modelo estructural para el DNA, en el cual dos cadenas complementarias se enrollan entre sí formando una doble hélice [3]. Dejando de lado, por ahora, las cuestiones estructurales, hay que tener en cuenta que, al hablar de que el DNA es el portador de la información genética, se quiere indicar que la naturaleza

química de los genes es la de este biopolímero. Pero no es fácil definir qué es un gen. Se trata de un concepto que ha evolucionado desde una idea relativamente simple hasta convertirse en algo enormemente difícil de delimitar. Un concepto que, si hace 50 o 60 años se explicaba en pocas líneas, hoy requiere un arduo esfuerzo para describirlo. Una descripción tan compleja, que hace prácticamente imposible dar una definición del concepto de gen en pocas líneas. Hasta tal punto es esto cierto, que el historiador Raphael Falk re refirió al gen como “un concepto en tensión” [4]. Pero eso, lejos de resultar algo descorazonador, no es más que una consecuencia del avance imparable de las ciencias: si bien cada nuevo descubrimiento implica un conocimiento más perfecto de la realidad y resuelve numerosas dudas, al mismo tiempo plantea un nuevo abanico de interrogantes. Esta circunstancia es, precisamente, una de las causas que confieren a las ciencias experimentales un atractivo especial, a la par que hace de la investigación una apasionante aventura.

Para el recorrido a través de la regulación génica que se hará en estas líneas, bien pueden dejarse de lado muchas de las actuales disquisiciones sobre el concepto de gen para centrar ese recorrido sobre lo que algunos autores han denominado “el gen molecular” [5]. Se puede recordar aquí lo que se dio en llamar “el dogma central de la Biología Molecular” [6], según el cual la información genética pasa del DNA a las proteínas, últimos ejecutores del mensaje genético, a través del RNA mensajero. Para expresar la información que un gen contiene para la síntesis de una proteína, el DNA se *transcribe* primero para producir un RNA mensajero (mRNA), que posteriormente se *traduce* para dar lugar a la proteína. Y es evidente que estos procesos han de estar sometidos a una fina regulación. Con la excepción de los linfocitos B y T, todas las células humanas poseen el mismo genoma, los mismos genes. Y sin embargo hay 250 tipos celulares distintos, que se distinguen por los genes que se transcriben y se traducen. Es decir, hay genes que permanecen siempre silenciados

en un determinado tipo celular y otros susceptibles de expresarse, que no lo hacen continuamente, sino cuando es necesario para la función de esas células concretas. La expresión de los genes constituye un proceso regulado de forma muy compleja, que está en la base de la diferenciación celular, el mantenimiento de la identidad celular y las respuestas adaptativas a los cambios en su entorno. Los mecanismos por los que se produce esta regulación, y muy especialmente, los epigenéticos, formarán el cañamazo sobre el que construirá este discurso.

2. ¿DÓNDE SE LOCALIZA EL DNA DE LAS CÉLULAS HUMANAS? UNA PRIMERA SORPRESA

En 1933, Brachet llegó a la conclusión de que el DNA de los organismos eucarióticos se encuentra localizado en el núcleo celular [7]. Posteriormente se supo que también las mitocondrias poseen DNA, si bien su cantidad es ínfima si se compara con la del nuclear. En efecto, las estimaciones más recientes indican que el contenido de DNA en una célula somática humana masculina es de 6,41 pg. Debido a la diferencia de tamaño de los cromosomas sexuales X e Y, el de una célula somática femenina es de 6,51 pg [8]. Por el contrario, la cantidad de DNA mitocondrial –variable, puesto que no es constante el número de mitocondrias por célula– se puede estimar en un valor medio de 0,06 pg por célula a partir de los datos obtenidos por el grupo de Graziano Pesole [9].

Los datos anteriores tienen la frialdad de los números. Además, como un picogramo es la billonésima parte de un gramo, la cifra puede quedar relegada al mundo de lo submicroscópico, muy lejano a las escalas en que habitualmente nos movemos. Pero, si se tienen en cuenta los parámetros estructurales de la molécula de DNA –que, a pesar del tiempo transcurrido, son esencialmente los previstos por sus descubridores [3]–, resulta que esos pocos picogramos de DNA, tienen una longitud de alrededor de 2 m. Y aquí está la primera sorpresa. El núcleo de una célula humana tiene entre 5 y 6 μm de

diámetro y si se tiene en cuenta que un micrómetro es la milésima parte de un milímetro, el problema de cómo puede empaquetarse esa longitud de DNA parece algo muy difícil de resolver. Y, por dar una cifra que puede asombrar más, si todo el DNA de los aproximadamente 50 billones de células de un hombre adulto se alineara, resultaría una longitud de unos 100.000 millones de kilómetros, es decir, una cantidad suficiente para ir y volver de la tierra al sol más de 300 veces o bien, para recorrer 2 millones y medio de veces el ecuador terrestre [10].

Tras el primer estupor que podrían producir estos datos, sería posible pensar que, al fin y al cabo, como en un carrete de hilo de coser pueden enrollarse unos 400 m de hilo, el problema de situar 2 m de DNA en el núcleo celular sería similar; bastaría con enrollar compactamente el DNA, cuyo volumen (aproximadamente $9,1 \mu\text{m}^3$) es, en efecto, inferior en un orden de magnitud al del núcleo (aproximadamente $110 \mu\text{m}^3$). Pero hay que tener en cuenta que el DNA es un polianión, de modo que su empaquetamiento exige algo capaz de eliminar la repulsión electrostática. Hace mucho tiempo que los investigadores se percataron de este problema. Partieron de la base de que el DNA eucariótico no está desnudo en el núcleo, sino que forma un complejo denominado cromatina, del que las histonas son componentes fundamentales. Las histonas, descubiertas en 1884 [11], son proteínas de naturaleza básica, con cargas positivas, que pueden, al menos en parte, neutralizar las negativas del DNA.

Por otro lado, desde 1941, se había atribuido un papel funcional a las histonas [12], que en 1950 cristalizó en la hipótesis de que las histonas eran represores específicos de los genes en un artículo publicado por Edgar y Ellen Stedman [13]. De esta manera, se estimuló la curiosidad de los científicos que se lanzaron a una carrera para estudiar unas proteínas que, hasta entonces, habían recibido poca atención. Los éxitos obtenidos en el fraccionamiento de histonas [14–16] y en su secuenciación [17] pusieron de manifiesto que el número de especies de histonas

era reducido y, además, presentaban una enorme constancia evolutiva, de modo que había una extraordinaria conservación en la estructura de histonas pertenecientes a organismos muy alejados filogenéticamente. Naturalmente, hubo que abandonar la hipótesis de los Stedman y se atribuyó a las histonas un papel estructural, papel que había de ser decisivo si exigía tal constancia evolutiva. El problema de empaquetar el DNA, quedaba reformulado como el empaquetamiento de la cromatina.

Este nuevo rumbo de la investigación dio lugar, especialmente entre los años 1965 y 1974 a una copiosa producción científica, que cuajó en numerosas propuestas para la organización de la cromatina. La difracción de rayos X fue una herramienta fundamental para esos estudios, y todos ellos, con diversos matices, admitían que, por medio de la interacción con las histonas, la doble hélice del DNA se disponía en forma de una superhélice continua [18].

3. UNA RUPTURA EN LAS IDEAS: LA ORGANIZACIÓN NUCLEOSOMAL DE LA CROMATINA

Sorprenderse ante un hallazgo inesperado es el primer paso para hacer avanzar el conocimiento, pero *«nuestro espíritu siente una tendencia natural a rechazar aquello que no entra en el marco de las creencias científicas o filosóficas de nuestro tiempo»* [19]. Estas palabras de Alexis Carrel se pueden aplicar a la aceptación por la comunidad científica del modelo de la superhélice como algo definitivo. Tan es así, que cuando algunos autores, al observar cromatina mediante microscopía electrónica, encontraron fibras de diámetro irregular, lo achacaron a artefactos en la preparación de las muestras. La duda ante lo inesperado es una actitud prudente. Cuando Röntgen obtuvo los primeros indicios de la existencia de un nuevo tipo de radiación, su inicial sorpresa derivó en incredulidad, hasta que la evidencia llegó a convencerle. Marie Curie repitió muchas veces las medidas de radiaci-

tividad que finalmente condujeron al descubrimiento de un nuevo elemento, el radio. A este propósito, Eva Curie comenta que su madre sospechaba que habría algún error en los experimentos, pues ante un fenómeno inesperado, la duda es la primera reacción del científico [20].

Pero, como ocurrió a Wilhelm Röntgen y a Marie Curie, llega un momento en que hay que rendirse ante la evidencia y eso ocurrió en el estudio de la estructura de la cromatina en 1973, cuando las sospechas en favor de una organización discontinua de las fibras de cromatina comenzaron a consolidarse de la mano de dos grupos: el de Woodcock y el de los esposos Olins. Ambos propusieron, en un congreso de Biología Celular celebrado ese año en Miami, que la cromatina estaba formada por una sucesión de partículas más o menos esféricas, de diámetro cercano a 100 Å. Ese mismo año apareció un artículo en el que se presentaban argumentos bioquímicos, basados en la digestión con endonucleasas, a favor de una organización discontinua y repetitiva de la cromatina [21]. Woodcock encontró serias dificultades para publicar sus resultados, como recoge la clásica obra de van Holde [22], y el trabajo final de Ada y Donald Olins vio la luz el año siguiente [23]. Acababa de producirse un cambio radical en la manera de contemplar la estructura de la cromatina, en la que el DNA se organiza en forma de nucleosomas. Un nucleosoma consta de una partícula núcleo y un DNA espaciador. Mientras que el DNA espaciador es de longitud variable, la partícula núcleo es idéntica en todas las células eucarióticas. Está constituida por un octámero formado por dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 alrededor del cual se enrollan 147 pares de bases de DNA describiendo una superhélice.

Teniendo en cuenta que el binomio estructura-función se había ya constituido en uno de los principios insoslayables que configuran la mentalidad de la Biología Molecular, tan pronto se descubrió la existencia del nucleosoma y se estableció su composición, se comenzó a tratar de determinar su

estructura. Gracias especialmente a los trabajos del grupo de Klug, pronto se determinó la estructura de la partícula núcleo con una resolución de 22 Å [24] y más tarde se llegó a describir con una resolución de 7 Å [25]. Si bien este nivel de resolución permitió determinar las dimensiones de la partícula núcleo y trazar algunos detalles de su organización, era insuficiente para decidir la estructura terciaria exacta de las histonas y localizar en el espacio todos sus aminoácidos. Con todo, el conjunto de la investigación fue decisivo para que Klug recibiera el premio Nobel de Química en 1982.

En 1991 Moudrianakis, que había conseguido aislar y cristalizar octámeros de histonas a partir de partículas núcleo, logró determinar su estructura con una resolución de 3,1 Å [26]. Evidentemente, los resultados se restringían a las histonas y, además, no a la totalidad de sus moléculas ya que las colas N-terminales, al no estar estructuradas, no eran observables en la estructura cristalina. En cualquier caso, los resultados de Moudrianakis supusieron también una ruptura con algo que se admitía hasta entonces sin dudas: las regiones estructuradas de las histonas –los dos tercios C-terminales de sus moléculas– no son, en propiedad, globulares. Se disponen con un motivo estructural, desconocido hasta entonces, que se denominó “*histone fold*” y mediante una interdigitación de las hélices de cada *histone fold*, se adquiría la peculiar organización estructural del octámero.

Así, Moudrianakis se encontró con unas imágenes que mostraban la estructura de las histonas en el octámero con una precisión nunca vista hasta entonces. La valía de un investigador radica en saber plantear la pregunta adecuada [27] y Moudrianakis la planteó: ¿por dónde pasa el DNA? Pero el DNA no estaba presente en la muestra objeto de la investigación. Un investigador mediocre habría encontrado en esa circunstancia la disculpa para no aventurar ninguna solución. Pero Moudrianakis captó un detalle fundamental: en la superficie del octámero existe una especie de rampa helicoidal, que la recorre con unas dimensiones acordes con las

predichas por las observaciones de la partícula núcleo a baja resolución. Más aún, la disposición de aminoácidos básicos en esa rampa parece una impronta de los fosfatos de las dos cadenas de una doble hélice, algo así como un negativo fotográfico en el que se aprecian las cargas de signo contrario a las que hay en el DNA [28]. Moudrianakis intuyó su recorrido, ya que la disposición de las cargas positivas de los aminoácidos básicos está *pidiendo a gritos* que el DNA se disponga de una manera concreta¹.

4. LA BELLEZA, MOTOR Y RESULTADO DE LA INVESTIGACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL NUCLEOSOMA

Einstein estaba convencido de que la belleza era un principio rector en la búsqueda de resultados importantes [29]. Los resultados y la intuición de Moudrianakis hacían entrever la belleza que podía poseer la organización estructural del nucleosoma. Pero si el octámero de histonas se había logrado cristalizar para poder estudiar su estructura con buena resolución, los intentos de superar la lograda por el grupo de Klug [25] fracasaron. La única técnica entonces disponible para investigar la organización tridimensional de estructuras complejas, como el nucleosoma, era la difracción de rayos X, que exige trabajar con muestras cristalizadas. Pero los cristales de nucleosomas eran inestables y si se prolongaba el tiempo de irradiación para bajar de los 7 Å de resolución, se destruían. Un hecho es la cosa más tozuda del mundo, como advirtió Mijail Bulgakov [30] y aquí el hecho era la inestabilidad de los cristales de nucleosomas. Pero frente a la tozudez de los hechos, está la de los investigadores, que pueden rebuscar entre el arsenal de métodos disponibles aquellos que les ayuden a superar los obstáculos y pueden contar, además, con la imaginación para idear nuevos caminos para alcanzar el fin.

¹ Pueden observarse estos detalles en las figuras 1 y 4 del artículo de Arents y Moudrianakis [28].

Así, el grupo de Richmond, pudo resolver las dificultades. La imaginación les llevó a diseñar una partícula núcleo más estable, reconstituida a partir de octámeros obtenidos con histonas recombinantes y un DNA de 146 pares de bases de secuencia palindrómica. De este modo, todas las partículas eran idénticas y perfectamente simétricas, lo que aumentaba la estabilidad de los cristales. Por otro lado, en lugar de emplear una fuente convencional de rayos X, emplearon los procedentes de la radiación del sincrotrón. La elevada energía de estos rayos X permitía obtener datos de difracción precisos con un tiempo de irradiación lo suficientemente breve como para que los cristales no se destruyeran. De esta manera, llegaron a describir la estructura de la partícula núcleo con una resolución de 2,8 Å [31]. Gracias a la imaginación y a los avances técnicos, se logró un importante hito en la investigación sobre la estructura de la cromatina. No es este el lugar para describir todas las implicaciones estructurales y funcionales de este trascendental artículo, que ha sido citado más de 7000 veces².

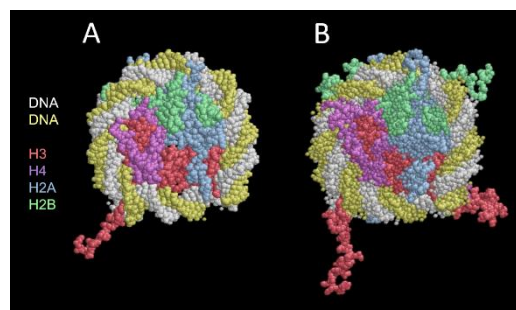


Figura 1. Estructura de la partícula núcleo del nucleosoma. **A.** Estructura determinada por Luger *et al.* [31] con una resolución de 2,8 Å. **B.** Estructura determinada por Davey *et al.* [32] con 1,9 Å de resolución. Las imágenes se han construido con el programa RasMol 2.7.5.2, a partir de las coordenadas facilitadas en los artículos correspondientes (archivos 1aoi.pdb y 1kx5.pdb, respectivamente). En la columna de la izquierda se aprecia el código de color utilizado para el DNA y las histonas.

Las imágenes publicadas en el artículo que se acaba de comentar, así como en

² <https://www.researchgate.net/scientific-contributions/Timothy-J-Richmond-57142037>. Acceso 15 de septiembre de 2023.

los subsiguientes del grupo de Richmond, en los que consiguieron mejorar la resolución hasta 1,9 Å [32,33], poseen una indudable belleza plástica (Figura 1), aun a sabiendas de que los colores se han añadido para facilitar la comprensión de las estructuras. El científico no pierde la admiración por la belleza con su trabajo. Al contrario, como escribió Konrad Lorenz, uno de los iniciadores de la etología moderna, galardonado con el premio Nobel de Medicina o Fisiología,

«Las verdades de la Naturaleza orgánica son de una belleza que inspira amor y veneración, y se nos ofrecen tanto más bellas cuanto más penetramos en sus detalles y particularidades. Es un desatino decir que la investigación positiva, la Ciencia, el conocimiento de las relaciones naturales, menguan el placer que procuran las maravillas de la Naturaleza. Al contrario, el hombre se siente conmovido por la realidad viva de la Naturaleza, y tanto más profundamente cuanto mayores son sus conocimientos sobre ella. No existe ningún buen biólogo, cuyos trabajos fueran coronados por el éxito, que no haya sido llevado hacia su profesión por aquel placer interior que deriva de contemplar las bellezas de las criaturas vivas, y que al mismo tiempo no sienta aumentar su placer en la Naturaleza y en el trabajo, a medida que se amplían sus conocimientos profesionales. Lo dicho vale para todas las ramas de la Biología» [34].

En efecto, si la contemplación de un colibrí nos admira por el colorido de su plumaje, por el rápido batido de sus alas para conseguir su vuelo estático, el estudio de los complejos mecanismos moleculares que per-

miten una frecuencia de 70 aleteos por segundo, llena de admiración al científico. Considerar, por ejemplo, que para lograr esa impresionante frecuencia se precisa una rapidísima transmisión de impulsos nerviosos hasta llegar a las sinapsis neuromusculares; que en las hendiduras sinápticas se ha de liberar acetilcolina que, como neurotransmisor, al alcanzar las placas motoras de los músculos responsables del movimiento de las alas provoca su contracción; que, para que esos músculos se relajen y queden en disposición de iniciar una nueva contracción, la acetilcolina debe eliminarse de la hendidura sináptica; que esa eliminación implica la acción de una enzima, la acetilcolinesterasa, que ha de unirse a su sustrato acetilcolina, deformarlo para hacer posible su hidrólisis y liberar los productos de la reacción; que todo eso, en fin, debe transcurrir en un tiempo lo suficientemente corto para que unos milisegundos después pueda registrarse un nuevo impulso nervioso e iniciar un nuevo ciclo de contracción-relajación. Considerar todo esto, decía, nos admira más que la observación del pájaro.

Espero que se disculpe esta breve digresión, que no es banal; volvamos a la estructura del nucleosoma. Si es admirable la belleza plástica de las estructuras, cuando se profundiza en los detalles moleculares que subyacen en esa estructura, emerge una nueva admiración ante una belleza más profunda. La precisa localización de los aminoácidos de las histonas hace posible la organización estructural del nucleosoma, gracias al establecimiento de múltiples interacciones de las histonas entre sí y con el DNA. Tan precisa es esa estructura que basta, por ejemplo, la mutación de la treonina 118 de la histona H3 a una isoleucina para que el nucleosoma se desestabilice [35]. El aminoácido 118 de H3 se encuentra localizado en el lazo HSH³, que separa las hélices 2 y 3 del

³ El *histone fold* está constituido por una hélice α larga flanqueada por dos cortas. Algunos de los aminoácidos que forman la unión de las hélices adoptan una estructura β , que permite la unión con el *histone fold* de la histona complementaria, mediante enlaces de hidrógeno que forman hojas

β antiparalelas. De este modo se emparejan H2A y H2B, formando dímeros. Dos dímeros H3-H4, emparejados del mismo modo, forman un tetrámero. Los lazos que unen las hélices de cada *histone fold* se designan como HSH (*Helix-Strand-*

histone fold, y que está en contacto con el lazo HSH1 situado entre las hélices 1 y 2 de la histona H4. En este último lazo se encuentra la arginina 48, que establece una interacción electrostática con el DNA en la posición SHL 0,5 [31]. Basta esa mínima diferencia – del orden de 0,6 Å – en el tamaño de las cadenas laterales de la treonina y de la isoleucina para que el leve alejamiento de la arginina 48 y el DNA, provocado por la mutación, desestabilice el nucleosoma. Si la contemplación de la estructura del nucleosoma puede causar admiración a cualquier persona, cuando el especialista profundiza en detalles estructurales como el que acabamos de considerar, su admiración es aún más profunda que la del profano en la materia.

5. OTRA VEZ LA CURIOSIDAD: ¿QUÉ HAY ENTRE EL NUCLEOSOMA Y EL CROMOSOMA METAFÁSICO?

Como se ha comentado anteriormente, el DNA debe compactarse mucho para encerrarse en un núcleo eucariótico. Y debe hacerlo más para formar el cromosoma metafásico. En efecto, mientras que la concentración de DNA en un núcleo en interfase puede calcularse en 0,10 g/ml, en un cromosoma es del orden de 0,17 g/ml [36]. La organización del nucleosoma supone ya una compactación del DNA, ya que la longitud ocupada por el ácido nucleico se reduce por un factor comprendido entre 6 y 7, pero es necesaria una compactación mucho mayor para llegar a la correspondiente al cromosoma, que se calcula en un factor del orden de 10^4 [37].

La organización de la cromatina en estructuras de orden superior al nucleosoma excitó pronto la curiosidad de los investigadores. Dos años después de que se describiera la existencia de nucleosomas [23] y se propusiera su composición [38], ya se planteó el modelo solenoidal para la organización de los nucleosomas formando una fibra de unos 30 nm de diámetro [39], que podía

observarse al microscopio electrónico, en determinadas condiciones, en preparaciones diluidas de cromatina. Posteriormente, se propusieron múltiples modelos para la estructura de esas fibras de 30 nm, algunos de los cuales se han revisado recientemente [40] y se admitía que esas fibras podrían plegarse ulteriormente hasta llegar a formar la compacta organización de los cromosomas metafásicos [41].

Pero también surgieron dudas sobre la existencia real de las fibras de 30 nm, que se postuló eran características de las preparaciones diluidas de cromatina, pero no de su estado real en el núcleo [42,43]. El grupo del Prof. Daban, en la Universidad Autónoma de Barcelona propuso que los cromosomas metafásicos están organizados en forma de placas de espesor compatible con las dimensiones de los nucleosomas, que estarían dispuestos irregularmente en ellas [44–46]. Recientemente, los mismos autores han encontrado datos a favor de la existencia de placas en núcleos en interfase [47] y sus propiedades dinámicas permitirían la reorganización de la cromatina durante la transición interfase-metafase y viceversa [48] (Figura 2).

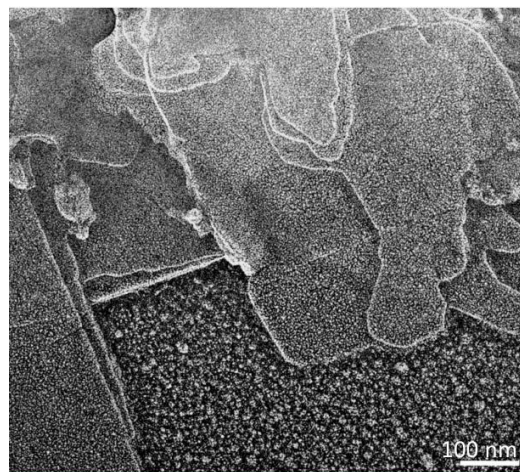


Figura 2. Placas de nucleosomas en cromosomas metafásicos. Adaptado de la ref. [48], con licencia CC BY 4.0. Figura cortesía del Prof. J. R. Daban.

En cualquier caso, en la última década se ha producido un importante giro en

Helix) y se numeran correlativamente según la secuencia de la histona.

el estudio de las estructuras de orden superior de la cromatina. El interés por estudiar esas estructuras *in vitro* ha ido decayendo y, como afirma Strickfaden, la fibra de 30 nm ha perdido su condición de estructura esencial *in vivo* [49]. La atención de los investigadores se centra ahora en la organización tridimensional de la cromatina *in situ*, es decir, en el interior del núcleo eucariótico intacto. El matemático Ennio de Giorgi (1928-1996) afirmaba que «*el avance normal de la ciencia sigue la lógica del aprovechamiento del éxito, mientras que los grandes cambios de rumbo de la ciencia obedecen a la lógica del “aprovechamiento del fracaso”*» [50]. Sería un tanto exagerado decir que el acceso experimental a la dilucidación de las estructuras de orden superior de la cromatina mediante estudios *in vitro* fue un fracaso, así como pensar que el paso a considerar la estructura *in situ* haya supuesto un gran cambio de rumbo en la ciencia; pero, en cualquier caso, este giro en la investigación pone de manifiesto cómo los científicos saben aprovechar los resultados adversos –o, al menos, insatisfactorios– para imprimir un nuevo rumbo a su estudio. A la consideración de la estructura tridimensional de la cromatina en el núcleo se dedica un posterior apartado de este discurso.

6. LO QUE QUEDABA POR DESCUBRIR

El físico teórico norteamericano John Archibald Wheeler (1908-2011) hizo importantes aportaciones a la ciencia, aunque quizá es más conocido por popularizar el término “agujero negro”. Y, como hombre de ciencia, era consciente de que cada hallazgo en la investigación abre las puertas a lo desconocido, a lo que queda por descubrir. Así pudo escribir:

«Las maravillas descubiertas están en un segundo plano con respecto a aquellas que aún esperan ser descubiertas. Lo no descubierto nos rodea en todas las direcciones, en lo que los antiguos romanos gustaban llamar ‘las murallas llameantes del

mundo’, flammanda moenia mundi» [51].

En este momento son totalmente pertinentes estas palabras de Wheeler. En efecto, el descubrimiento de la estructura del nucleosoma, la apenas atisbada estructura de orden superior de la cromatina, pueden parecerse maravillosos avances en nuestro conocimiento. Pero más allá de esas *llameantes murallas* queda aún mucho por descubrir. La cromatina y su compleja estructura no son más que el escenario donde ha de representarse el trascendental juego de la expresión génica. Como se comentaba al principio de este discurso, un gen se expresa cuando una hebra del DNA se transcribe para producir el RNA mensajero, que luego se traduce para dar lugar a las proteínas. La transcripción se realiza gracias a la acción de la RNA polimerasa, una enzima que va recorriendo la cadena molde del DNA y cataliza la consecutiva adición a la cadena de RNA naciente de ribonucleótidos complementarios a los de la cadena molde. Pronto se advirtió que no sólo la superestructura de la cromatina, sino también la propia organización nucleosomal, impiden el avance procesivo de la RNA polimerasa, de modo que, para que se realice la transcripción es preciso un cambio, una *remodelación*, como se comenzó a decir, de la estructura de la cromatina.

Las dos últimas décadas del siglo pasado fueron enormemente fructíferas para ahondar en esos cambios estructurales que había de sufrir la cromatina para permitir la transcripción. Se obtuvieron los primeros datos gracias a las investigaciones realizadas con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [52–56] extendidas después a organismos superiores. Se comprobó que la acetilación de las histonas –una modificación covalente reversible que, a expensas de acetil-CoA convierte el grupo ϵ -amino de algunos residuos de lisina en acetamida anulando así su carga positiva– relaja la superestructura de la cromatina [57,58]. Tras la publicación de la hipótesis de Peter Loidl, que postulaba que la acetilación de histonas, además de contribuir al relajamiento de la estructura de la cro-

matina, podía desempeñar funciones de señalización, que marcaran determinados lugares de la cromatina para la ejecución de funciones específicas [59], se consiguió demostrar la existencia de múltiples actividades enzimáticas responsables de modificar el estado de acetilación de las histonas [60–65]. Se descubrieron los complejos de remodelación que, gracias a la energía de hidrólisis del ATP consiguen vencer los obstáculos energéticos que la desorganización de una estructura estable como el nucleosoma implica [66]. El estudio de otras modificaciones covalentes reversibles de las histonas, como la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación y la poliADP ribosilación, así como la demostración de que la metilación del DNA en algunas de sus citosinas es un proceso reversible, abrió un campo de alcance insospechado: el de las modificaciones epigenéticas de la cromatina, es decir, los cambios potencialmente heredables que, sin alterar la secuencia del DNA, pueden modificar la expresión génica.

Se llegó así, al inicio del presente siglo, al convencimiento de que si la traducción del mensaje contenido en el DNA venía determinada por el código genético, en la regulación de la expresión de ese mensaje intervenía decisivamente un *código epigenético* [67] y se abrió una fructífera línea de investigación para descifrar el código contenido en las diferentes modificaciones de las histonas y en cómo se *lee* ese código [68,69]. Se comenzaba así a vislumbrar cómo podría resolverse el problema que plantea la estructura de la cromatina de cara a la expresión génica. Expresión génica que ha de ser específica por cuanto cada célula debe expresar sólo una selección de los genes que componen su genoma y lo ha de hacer en el momento oportuno. Sobre las causas responsables de esa especificidad se conocía también bastante a principios de nuestro siglo. Los genes tienen regiones reguladoras en las que se encuentran secuencias específicas –elementos *cis*– capaces de ser reconocidas por factores transcripcionales, activadores o represores de la transcripción. Esas regiones se sitúan ordinariamente fuera del cuerpo del

gen; se trata del promotor o de regiones que pueden estar muy alejadas del inicio de la transcripción –hasta un millón de pares de bases– denominadas potenciadores. La unión de factores *trans* a esos elementos es determinante de la activación o represión del gen. Pero los elementos *cis* ordinariamente contienen un número reducido de nucleótidos, lo que significa –dado el gran tamaño de los genomas eucarióticos– esas secuencias específicas pueden estar repetidas millones de veces. Surge así la cuestión importante de cómo los factores *trans* pueden encontrar la secuencia específica correspondiente al gen que en cada momento se deba expresar. Dicho de otro modo, cómo la mayor parte de esos elementos reguladores se hacen inaccesibles para permitir la unión de los factores sólo al sitio correcto en cada célula y en cada momento concreto. Parece claro que la cromatina desempeña un papel fundamental en esa selección a través de sus modificaciones epigenéticas y de la localización de los nucleosomas, que pueden impedir el acceso de los factores a sus secuencias de unión. Esta cuestión, que ha sido recientemente revisada [70], ya era ampliamente aceptada a finales del siglo XX.

Ya se ha comentado cómo se pudo comprobar que la localización de los nucleosomas podía variar con la activación de los genes y cómo aparecían cambios epigenéticos –tanto en la metilación del DNA como en las modificaciones de las histonas– a veces inequívocamente relacionados con la activación génica. También eran conscientes los investigadores de que, si los genes que han de expresarse en un momento dado adquieren una específica marca epigenética y los complejos remodeladores son capaces de leer esa marca, sería factible su transcripción. Pues bien, que algunos componentes de los complejos de remodelación poseen dominios capaces de reconocer marcas epigenéticas era ya un hecho sabido a principios del presente siglo [71] y también se sabía que, como resultado de la actuación de diversas cascadas de señalización, era posible modificar específicamente las histonas de un

determinado gen, como se comprobó, por ejemplo, en el caso del gen *MAT2A* [72].

Se conocía también que los complejos de remodelación pertenecían a cuatro familias, atendiendo a la naturaleza de su ATPasa: SWI/SNF, ISWI, INO80 y Mi2/CHD [73] y que esos complejos eran capaces, al menos *in vitro*, de llevar a cabo diferentes modos de alterar la organización nucleosomal para permitir el acceso a la cromatina de los diversos factores y de la maquinaria transcripcional. En efecto, todos los complejos de remodelación son capaces de provocar el deslizamiento de nucleosomas, de modo que dejen secuencias de DNA libres de obstáculos; es también posible la eliminación de un dímero H2A/H2B, con o sin sustitución por otro dímero en cuya constitución intervenga la variante H2A.Z⁴, con la consiguiente desestabilización del nucleosoma resultante; es posible, finalmente, la eliminación completa de un octámero de histonas, haciendo accesible al DNA antes ocupado [74]. Pero, en aquellos primeros años del milenio quedaban aún muchos interrogantes por resolver. Por ejemplo, sobre los posibles mecanismos de la remodelación sólo se podían hacer conjeturas [73,75–77]. También había que profundizar mucho sobre la coordinación de los diferentes mecanismos epigenéticos con las distintas funciones del genoma; había, por fin, que dilucidar cómo se organizaban espacialmente todas esas funciones en el interior del núcleo.

Hasta ahora, en nuestro recorrido histórico, nos hemos detenido en los aspectos estructurales del material genético eucariótico, aspectos que pueden asombrar y que permiten contemplar la belleza de algunas complejas estructuras. Se ha entrevisto cómo la admiración ante tales aspectos es motor para avanzar en la investigación. Luego, hemos pasado como de puntillas por los interrogantes que surgen cuando se considera que esa compleja estructura ha de ser

el escenario donde se desarrolla la transcripción, que da comienzo a la expresión génica, para dejar esbozado el estado de la cuestión tal como se planteaba hace 20 años. Tiempo es ya de considerar, siquiera sea brevemente, cómo se han ido despejando algunos de esos interrogantes en estas dos décadas, cómo se ha penetrado en esos territorios desconocidos y cómo cada hallazgo ha abierto las puertas a nuevos espacios, que se ofrecen a la contemplación y a la curiosidad del investigador. Ernst Peter Fischer, en uno de sus más conocidos libros, cita unas palabras de Marie Curie que vienen como anillo al dedo para nuestra siguiente andadura: «*tampoco creo que exista el peligro de que el espíritu de aventura científica desaparezca de nuestro mundo. Si hay algo de lo que me rodea que tenga fuerza vital, es precisamente este espíritu de aventura, que parece inquebrantable y que está ligado a la curiosidad*» [78].

7. ¿CÓMO ALTERAN LOS COMPLEJOS DE REMODELACIÓN LA ESTRUCTURA DEL NUCLEOSOMA? OTRA VEZ ADMIRACIÓN

Como se ha tenido ocasión de ver en las líneas precedentes, a principios del presente siglo se sabía que los complejos de remodelación se pueden reclutar en las regiones del genoma que han de transcribirse, leyendo las señales epigenéticas escritas sobre ellas. Se sabía también que empleaban la energía procedente de la hidrólisis del ATP para superar la barrera energética que impone la estabilidad de la estructura nucleosomal. Pero se ignoraban los mecanismos moleculares por los que se conseguía desensamblar la estructura del nucleosoma.

Hace años, tuve ocasión de definir la Bioquímica, la Biología Molecular, como «*una forma de estudiar la Biología, que persigue dar una interpretación de los procesos vitales orgánicos en términos de la estruc-*

⁴ En el caso de las histonas humanas, con la excepción de H4, además de la forma canónica existen distintas variantes de secuencia; H2A.Z

es una variante de H2A, cuya presencia, en lugar de la forma canónica, hace menos estable al nucleosoma.

*tura y dinámica de las moléculas que constituyen un organismo vivo» [79]. En esta definición hacía hincapié en la decisiva aportación que la consideración de la estructura y la función, como partes inseparables de un binomio, tuvo en la génesis de la Bioquímica y la Biología Molecular. De hecho, Astbury, un físico atraído por los problemas que planteaba la estructura de macromoléculas biológicas, que fue uno de los primeros usuarios del término *Biología Molecular*, escribió: «La biología molecular es predominantemente tridimensional y estructural, lo que no significa, sin embargo, que sea un simple refinamiento de la morfología. Es necesario, al mismo tiempo, discurrir sobre el origen y función» [80].*

Gracias a esta mentalidad, fueron numerosos los investigadores que llegaron al convencimiento de que para comprender el modo en que los complejos de remodelación alteraban la estructura del nucleosoma era preciso conocer, de una parte, la estructura de los complejos de remodelación; de otra, la estructura que resulta al unirse dichos complejos al nucleosoma, ya que esa unión ha de ser el primer paso para la actuación del remodelador.

Evidentemente, el estudio de la estructura de los complejos de remodelación no es una tarea fácil. Su tamaño, excesivamente grande debido a las numerosas subunidades que la mayoría de ellos poseen, hace prácticamente imposible su cristalización y estudio mediante difracción de rayos X, que, como se ha comentado anteriormente, era la técnica de elección para estudios estructurales de biomacromoléculas. La microscopía electrónica convencional –por ejemplo, con contraste negativo–, aunque aplicable a preparaciones de esos complejos, no proporcionaba, ni de lejos, la suficiente resolución. Pero como ocurre en toda exploración, la carencia de medios aviva el ingenio para obtenerlos. Y eso ocurrió en la investigación de la estructura de los complejos de remodelación. No era, por supuesto, el único caso en el que se echaba en falta una técnica capaz de estudiar sofisticadas estruc-

turas biológicas y eso aguzó más la imaginación de los investigadores. Ya en 1980 Jacques Dubochet había observado que al trabajar a 4°K el daño producido en los materiales biológicos por los haces de electrones que se emplean en la microscopía electrónica, se reducía considerablemente [81]. Animado con este primer resultado, Dubochet continuó investigando sobre la técnica denominada crio-microscopía electrónica que, esencialmente, consiste en preservar la estructura de las biomoléculas consiguiendo que el agua, al bajar la temperatura a valores próximos al 0 absoluto, quede en un estado vítreo, con lo que se evita que los cristales de hielo destruyan las estructuras nativas. En esas condiciones, los materiales pueden observarse por microscopía electrónica hasta alcanzar una resolución próxima al nivel atómico. Ya se ha comentado anteriormente una temprana aplicación de esta técnica al estudio de la estructura de la cromatina [42], pero fue en la década de 2010 cuando la crio-microscopía electrónica se popularizó, hasta el punto de que la revista *Nature Methods* la calificó como el “método del año” de 2015 [82]. Y dos años más tarde, Jacques Dubochet, junto con Joachim Frank y Richard Henderson obtuvieron el premio Nobel de Química por “el desarrollo de la criomicroscopía electrónica para la determinación con alta resolución de la estructura de biomoléculas en disolución”. Como añadía la nota de prensa de la Real Academia de Ciencias Sueca al anunciar la concesión del premio, «este método ha trasladado la bioquímica a una nueva era». De hecho, la accesibilidad creciente de esta revolucionaria tecnología ha hecho posible la determinación de la estructura de los complejos de remodelación de la cromatina, así como entrever el mecanismo íntimo de la desestabilización del nucleosoma.

La mayor parte de las investigaciones se han llevado a cabo con complejos de remodelación de la familia SWI/SNF, los primeros que se describieron y los más estudiados en todos sus aspectos. Por ejemplo, en 2017 se publicó un artículo en el que se recogía la estructura de ScSnf2 –la ATPasa

del complejo Swi/Snf de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*– unida a un nucleosoma. La unión tiene lugar fundamentalmente a través de interacciones con el DNA en la localización SHL2⁵ del nucleosoma, aunque también intervienen contactos con la cola N-terminal de H4. La resolución –del orden de 5 Å en la estructura de la ATPasa– permitió apreciar la estructura secundaria de ScSnf2. Los autores postularon un mecanismo para la distorsión de la estructura del DNA provocada por el cambio conformacional inducido por el ATP en la enzima. Ese cambio provocaría la aparición de un abultamiento en la trayectoria del DNA causado por su separación local del octámero de histonas [83]. La propagación de esta separación iría completando el proceso de re-estructuración del nucleosoma.

Dos años más tarde el mismo grupo añadió un importante detalle: la estructura del complejo Snf2-nucleosoma se determinó tanto en presencia de ADP, como de ADP-BeF_x [84]. Hay que tener en cuenta que el producto resultante de la unión de fluoruros de berilio al ADP mimetiza la estructura del estado de transición del ATP en el ciclo catalítico de la ATPasa [85], con lo que los autores de la investigación pudieron precisar más el mecanismo de la distorsión del DNA inducido por la hidrólisis del ATP y de su propagación [84]. Es evidente que las imágenes que se pueden obtener a través de estas investigaciones, no sólo permiten contemplar la belleza de las estructuras, sino que, como consecuencia de la estrecha relación entre estructura y función, permiten entrever algunos aspectos de la dinámica de la remodelación de la cromatina⁶.

Hasta ahora se han mencionado investigaciones realizadas sólo con la ATPasa de SWI/SNF, pero los complejos de esta familia, además de esa subunidad que actúa como motor del cambio estructural, tienen

⁵ SHL es la sigla con la que se designan las diferentes localizaciones del DNA en un nucleosoma. Los números enteros corresponden a las posiciones en las que el surco estrecho del DNA está orientado hacia fuera. La posición SHL0 corresponde al punto medio de la secuencia del

un número elevado de subunidades: SWI/SNF de levadura y BAF humano tienen 10 subunidades; el PBAF humano posee 12 y el RSC de levadura 15. Lógicamente, se trata de estructuras complicadas, cuyo tamaño supera al del propio nucleosoma. No obstante, en 2019 ya se dispuso de resultados sobre la estructura del complejo RSC de levadura unido a un nucleosoma, con una resolución de 7,1-7,6 Å dependiendo de la región [86] y un año después se publicó una investigación similar en la que, si bien la resolución de conjunto era peor, se logró alcanzar una resolución de 3,6-3,8 Å en el caso del complejo libre de nucleosomas [87] (Figura 3).

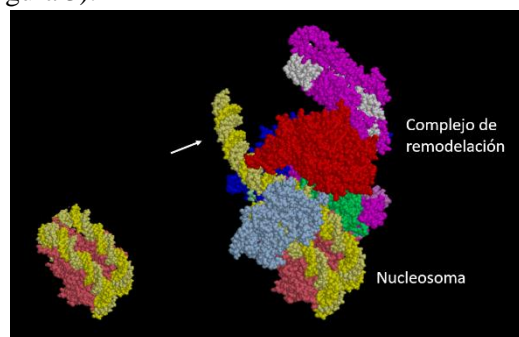


Figura 3. Estructura del complejo de remodelación de *S. cerevisiae* RSC unido a un nucleosoma. A la izquierda se observa la estructura del nucleosoma aislado y a la derecha unido a RSC. Obsérvese cómo el DNA comienza a separarse del octámero de histonas por la acción de RSC, en la región señalada por la flecha. Las imágenes se han construido con el programa RasMol 2.7.5.2, a partir de las coordenadas facilitadas en el artículo de Wagner *et al.* [87] (archivo 6tda.pdb).

RSC es capaz no sólo de provocar el deslizamiento de nucleosomas, sino también de hacer saltar el octámero para dejar totalmente libre el DNA que lo envolvía [88]. Este proceso tiene singular importancia en torno al sitio de inicio de la transcripción, para generar una región libre de nucleosomas y permitir el libre acceso de la maquinaria transcripcional. La secuencia del DNA en esas regiones facilita la eliminación de nucleosomas por RSC [89] y los mencionados estudios estructurales han permitido analizar la función

DNA, que se encuentra precisamente en el eje diádico del nucleosoma. La numeración se establece con valores positivos y negativos hacia un lado u otro del DNA.

⁶ Se puede observar un modelo para ese mecanismo en el vídeo 2 del artículo de Li *et al.* [84].

de uno de los componentes de RSC en el reconocimiento de esas secuencias [87] y de otro de los componentes para permitir la eliminación de un dímero H2A-H2B que inicia la liberación del octámero de histonas [86]⁷.

El vertiginoso ritmo de la investigación hace que cada vez haya más detalles sobre la estructura de los complejos SWI/SNF, tanto libres [90], como unidos a nucleosomas [91,92]. Estos refinamientos han permitido, por ejemplo, comprender cómo mutaciones en la hélice C-terminal de la subunidad SMARCB1 del complejo humano BAF o en los dominios de interacción entre las subunidades de los complejos, frecuentes en cáncer, conducen a una remodelación aberrante que sería la causa molecular de la oncogénesis.

El papel fundamental de los remodeladores de la familia SWI/SNF es, como se acaba de ver, provocar un deslizamiento de nucleosomas para liberar el sitio de iniciación de la transcripción, o bien, permitir el paso de la RNA polimerasa por una secuencia ocupada por un nucleosoma y en ambos casos, la eliminación de un dímero H2A-H2B representa una etapa previa. Pero hay también otros procesos en los que la actuación de los componentes de la familia SWI/SNF desempeñan una función importante, aunque más especializada. Es el caso de la proteína humana del tipo SNF2, codificada por el gen *ATRX*, acrónimo que hace referencia a que mutaciones en dicho gen causan el síndrome de retraso mental con α -talasemia, ligado al cromosoma X (*X-linked mental retardation with alpha-thalassemia*). La proteína *ATRX*, en cooperación con la carabina molecular⁸ *DAXX*, se encarga de depositar la variante H3.3 en los telómeros, heterocromatina pericéntrica, y otras secuencias repetitivas de DNA [93,94]. Otra función especializada de una proteína del tipo

SNF2, *PICH*, es la remodelación de nucleosomas necesaria para resolver los puentes de cromatina que se pueden formar en la anafase como consecuencia de enredos entre el DNA de cromátidas hermanas. Recientemente se ha demostrado que, para *PICH* desorganice los nucleosomas y así resulte posible la actuación de la topoisomerasa que rompe el puente, se requiere, por supuesto, la hidrólisis de ATP, pero además *PICH* depende de la tensión provocada por la tracción ejercida por el huso mitótico [95]. Esta actuación de un remodelador dependiendo de una fuerza física no sólo constituye un ejemplo único, sino que plantea nuevos problemas sobre el modo en que esa dependencia haya podido adquirirse en el transcurso de la evolución. Una vez más, tropezamos en nuestro recorrido con propiedades asombrosas de la materia viva que plantean nuevos problemas y estimulan el afán de seguir investigando.

Recientemente, Chen y sus colegas han revisado la estructura y mecanismo de acción de los complejos de remodelación de la familia SWI/SNF, incluidos los humanos, para concluir que, dada la homología entre ellos y la semejanza de su función, la arquitectura y mecanismo de acción es similar en todos ellos [96].

La estructura de los remodeladores de la familia *INO80/SWR1* también ha recibido atención, con vistas a acceder a su mecanismo de acción. Simultáneamente se describió el análisis mediante crio-microscopía electrónica de los complejos *INO80* humano y de levadura unidos a un nucleosoma [97–99]. Los estudios hechos con mayor resolución [97,98] permitieron vislumbrar la función de los componentes no enzimáticos del complejo en el deslizamiento de los nucleosomas. Es interesante que *INO80* actúa en forma de dímero, presentándose un efecto cooperativo entre ambos monómeros; la cola N-terminal de la histona H3 está implicada

⁷ El vídeo recogido en el artículo de Wagner *et al.* [87] permite contemplar algunos detalles de la estructura del complejo RSC-nucleosoma.

⁸ Véase el Vocabulario Científico y Tecnológico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de España (www.VCTRAC.es) para la definición del lema **carabina molecular**.

en la regulación de dicho efecto [97]. El año 2018 resultó prolífico en las investigaciones estructurales sobre la familia INO80/SWR1 porque, además de los trabajos que se acaban de citar, se llegó también a conocer la estructura de SWR1 de levadura unido a un nucleosoma [100]

La organización estructural de los complejos INO80/SWR1 es muy similar, no sólo al comparar INO80 de levadura con SWR1 del mismo organismo, sino cuando la comparación se hace con INO80 humano. Por ejemplo, todos los complejos contienen actina combinada con varias Arps (*actin-related proteins*); estas últimas proteínas son esenciales para acoplar la ATPasa motora con el deslizamiento del octámero. Y como este deslizamiento es algo común a todos los complejos, parecería que la similitud estructural estaba relacionada con una similar función. No obstante, al analizar en detalle las funciones de los complejos INO80/SWR1 surgió una sorpresa: los datos bioquímicos revelan que la actividad y el mecanismo de los distintos complejos son muy diferentes y en un artículo en el que se revisaban estas diferencias, los autores concluían «*la familia INO80 presenta una sorprendente diversidad de funciones, basada sobre un marco estructural similar*» [101]. Y es que la sorpresa no es una actitud exclusiva de las personas inexpertas; el científico ha de adoptar de continuo una actitud abierta ante la naturaleza, siempre pródiga en proporcionar sorpresas a los que sean capaces de observarlas. Y aquí se da una sorpresa que no hace tambalearse la mencionada relación entre estructura y función, sino que obliga a perfilarla.

No sería justo terminar este recorrido a lo largo de la estructura y función de los complejos de remodelación sin mencionar los estudios sobre el complejo NURD. Su nombre corresponde al acrónimo de *nucleosome remodeling and deacetylation*, ya que el complejo contiene, además de la ATPasa Mi-2, las proteínas RbAp46 y RbAp48, capaces de interaccionar con la histona H4, y otros componentes, un módulo en el que se encuentran las histona desacetilasas HDAC1 y HDAC2. El descubrimiento de la presencia

de estas enzimas supuso también una cierta sorpresa. En efecto, la sensación general que puede haber quedado de la descripción anterior de los remodeladores de las familias INO80 y SWI/SNF, es que su acción fundamental consiste en dejar libres algunos segmentos de DNA, bien para que puedan ensamblarse factores transcripcionales, complejos de iniciación de la transcripción, topoisomerasas, etc., como para que puedan ser recorridos por las RNA polimerasas durante la transcripción. Sin embargo, la desacetilación de histonas está clásicamente relacionada con la represión de la transcripción. ¿Qué sentido tiene, pues, que exista un complejo de remodelación con capacidad represora? La respuesta a este interrogante parece obvia: la remodelación de la cromatina puede servir tanto para permitir el acceso de la maquinaria transcripcional a ciertos genes como para impedirlo en el caso de otros. De hecho, los primeros estudios del transcritoma de la levadura *S. cerevisiae* pusieron de manifiesto que entre los genes dependientes de SWI/SNF para su transcripción hay más reprimidos que activados por el remodelador [102,103]. Así pues, el que los complejos NURD estuvieran especializados en generar cromatina inactiva, no sería una situación anómala y así se reconoció en las revisiones iniciales [73]. De hecho, el posicionamiento nucleosomal puede tener una función reguladora al dejar descubiertas o proteger secuencias concretas del DNA y, por tanto, la función de la remodelación puede ser bivalente en cuanto a la regulación de la transcripción.

Así estaban las cosas a principios de este siglo; todo parecía claro en torno a la función del complejo NURD. Sin embargo, cuando parecía que todo estaba pacíficamente aclarado, comenzaron a surgir complicaciones. Una primera es la variabilidad de sus siete subunidades. En mamíferos, se pueden ensamblar al menos dos parálogos por cada subunidad. La subunidad que posee la actividad ATPasa es CHD, de la cual existen tres parálogos, 3, 4 y 5. Las restantes subunidades son GATAD2, con dos parálogos, A y B, MBD, con otros dos, 2 y 3, MTA

con tres posibles parálogos, 1, 2 y 3, RBBP, y CDK2AP, con dos parálogos cada una, designados, respectivamente 4/7 y 1/2; finalmente, la histona desacetilasa, que puede ser HDAC1 o HDAC2. Además, algunas subunidades están repetidas en el complejo; de hecho el establecimiento de su estequiometría ha presentado dificultades. Esa diversidad ofrece múltiples combinaciones estructurales para los complejos NURD, que constituyen un excelente ejemplo de lo que se ha dado en denominar intercambio de parálogos, es decir la capacidad de modular la funcionalidad a través de la incorporación de parálogos específicos de sus subunidades [104]. Un ejemplo ilustrativo es que el parálogo más abundante de MBD, es decir, MBD3 participa en la regulación de la expresión de numerosos genes, más ajustándola al valor adecuado que efectuando un control todo o nada [105]. Por el contrario, el complejo NURD con MBD2 está implicado en la represión del gen de la γ -globina fetal en las células eritroides adultas [106].

Todas estas circunstancias han añadido un especial interés al estudio estructural del complejo NURD. Dada la complejidad estructural y las dudas planteadas por la estequiometría del complejo cuando ésta se estudió por métodos tradicionales, la investigación de la estructura hubo de hacerse por una combinación de varios métodos. El primer análisis utilizó espectrometría de masas cuantitativa, entrecruzamiento, métodos clásicos de bioquímica de proteínas y microscopía electrónica con contraste negativo y técnicas de reconstrucción tridimensional. Permitió la obtención de imágenes con baja resolución (20-30 Å) del complejo, aclarar cuestiones acerca de su estequiometría y demostrar que PWWP2A, una proteína que interacciona con la cromatina, se encarga de regular la composición de NURD [107].

Más recientemente, se ha aplicado otra combinación de métodos, en este caso cromatografía de exclusión molecular acoplada a dispersión de luz de ángulo múltiple con láser; espectrometría de masas con adquisición independiente de datos; entrecruzamiento químico acoplado a espectrometría

de masas; microscopía electrónica con contraste negativo; cristalografía de rayos X; resonancia magnética nuclear, predicciones de estructura secundaria y modelización por homología. A partir de los datos obtenidos por todas estas técnicas se ha utilizado una integración bayesiana para la determinación de la estructura de tres sub-complejos de NURD. Finalmente, utilizando la previamente determinada estructura del complejo CHD4-nucleosoma [108], los autores de la investigación han propuesto un modelo para la estructura del subcomplejo MTA1-HDAC1-RBBP4-MBD3-GATAD2A unido a un nucleosoma [109]. Aunque hayan de perfilarse muchos detalles, estas investigaciones han servido para comprender el papel de MBD3 en NURD, así como para caracterizar los dominios de unión de las diferentes subunidades.

Ya es hora de terminar esta descripción de las estructuras de los complejos de remodelación. La emprendimos basándonos en esa íntima relación entre estructura y función que varias veces se ha mencionado. Y, efectivamente, el conocimiento de la estructura ha aportado datos sobre la función, algunos de los cuales se ha resaltado en las líneas precedentes. Pero los estudios estructurales forzosamente dan una visión estática de la arquitectura molecular, por más que se pueda entrever cómo se desarrolla dinámicamente la función. Acceder a estos estudios dinámicos no es tarea fácil. No obstante, como numerosos estudios *in vitro* demuestran, la mayor parte de los complejos remodeladores de cromatina provocan el deslizamiento de nucleosomas a lo largo del DNA de un modo direccional; es decir, los nucleosomas se deslizan hacia el flanco más largo de DNA desnudo [110].

El problema se ha resuelto gracias a un trabajo realizado en el laboratorio de la Prof. Geeta Narlikar, referente en la investigación sobre remodelación de la cromatina. Han utilizado para ello la transferencia de energía de resonancia de Förster, técnica conocida con el acrónimo FRET (del inglés *Förster resonance energy transfer*). FRET se basa en que un cromóforo excitado puede

transferir energía a otro cromóforo aceptor a través de acoplamiento dipolo-dipolo. La eficiencia de esta transferencia de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre los dos cromóforos, lo que permite medir con precisión pequeños cambios en su posición relativa. En el experimento que nos ocupa, el cromóforo donador se incorporó a moléculas de H2A, con las que se reconstituyeron nucleosomas; el aceptor estaba unido a uno de los extremos del DNA sobre el que se habían reconstituido los nucleosomas, que inicialmente estaban situados muy próximos a este extremo. Un único nucleosoma se fijó a un soporte por el extremo del DNA que no estaba unido al cromóforo; el deslizamiento del octámero se consiguió añadiendo SNF2 y ATP y se pudo seguir por el descenso de FRET, medido con un espectrofluorímetro muy sensible [111]. Hay que tener en cuenta que SNF2, aunque en disolución existe como un monómero, dimeriza al unirse a nucleosomas. Y es posible obtener dímeros artificiales mediante entrecruzamiento, que se mantienen como tales en disolución. Pero la presencia de dímeros unidos al nucleosoma plantea un problema: ¿cómo se coordina la actuación de ambos motores para que induzcan el deslizamiento en la misma dirección y no se llegue a una especie de competencia de “tira y afloja”?

Los resultados del experimento de Johnson y Narlikar muestran que, efectivamente, el nucleosoma se desliza en la dirección del DNA libre, alejándose del extremo que contiene el cromóforo. Además, la hidrólisis del ATP por ambos motores es lo que les hace capaces de coordinar su detección del flanco hacia el que se ha de dirigir. En definitiva, la hidrólisis del ATP no es sólo una fuente de energía para hacer posible el deslizamiento, sino que es lo que indica la dirección en que ha de producirse. Para obtener esta conclusión, los autores emplearon una serie de dímeros artificiales en los que se habían introducido mutantes en uno de los motores [111]. Aunque estos resultados se hayan obtenido con solo uno de los motores, presumiblemente son extrapolables al resto de las familias de remodeladores.

Los datos aportados en este apartado ilustran el modo de acción de los complejos de remodelación. Pero no puede olvidarse que, como se ha apuntado más arriba, su actuación debe estar coordinada con las modificaciones epigenéticas y, por supuesto, con la unión de los factores *trans* a sus sitios específico. Y, además, todo ello ha de realizarse en el marco de la organización estructural del material genético dentro del núcleo. En la dilucidación de estas cuestiones se ha avanzado notablemente en los últimos 20 años y a ellas se dedican los próximos apartados.

8. ¿CÓMO INFLUYEN LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES EN LA REGULACIÓN ESPECÍFICA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA?

Los factores transcripcionales son esenciales para que se dé una transcripción regulada en todos los organismos. Pero en eucariotas no puede considerarse su actuación con independencia de la organización nucleosomal de la cromatina, de los cambios introducidos en ella por los complejos de remodelación y de las modificaciones epigenéticas. La interrelación de todos estos elementos ha de considerarse cuando se trata de arrojar alguna luz sobre el problema de la regulación de la expresión génica. Son muchos los avances que se han producido en los últimos 20 años. Por ejemplo, se han implementado métodos de alto rendimiento para determinar en paralelo a nivel genómico las modificaciones epigenéticas y la ocupación de la cromatina por factores transcripcionales [112,113], lo que ha permitido describir el escenario en el que se desarrolla el intrincado juego de la transcripción. Por otro lado, el desarrollo de los proyectos ENCODE [114] y BLUEPRINT [115] ha hecho posible conocer la ocupación de promotores y potenciadores por factores transcripcionales. Pero los avances registrados también han hecho más complejo el panorama; por ejemplo, se estima que el número de factores transcripcionales humanos está en torno a 1.600 [116] y, como habitualmente intervienen varios en

la regulación de cada gen puede resultar difícil delimitar el papel de cada uno de ellos. Por ejemplo, en el promotor del gen *Egr1* de ratón hay al menos 14 sitios para 5 factores transcripcionales. Uno de ellos es el propio producto del gen, que actúa como represor, haciendo que la activación sea transitoria, pero no se ha llegado a discernir el papel de los demás factores, aunque los resultados son compatibles con el papel de SP1 en la activación [117].

Las bases moleculares de ese reconocimiento son fundamentalmente las interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos y los átomos accesibles de los nucleótidos. Suele hablarse de una secuencia consenso como la más apta para interactuar con el factor; esa secuencia se determina tras comparar estadísticamente las múltiples secuencias que experimentalmente se han observado como enlazadas al factor en cuestión. Pueden darse así uniones fuertes, cuando la secuencia del sitio coincide bien con la secuencia consenso y uniones de baja afinidad, cuando el sitio es débil, es decir, cuando su secuencia no coincide totalmente con la de consenso. Además de uniones inespecíficas, que algunas veces se producen, cabe, finalmente, una unión indirecta, en la que el factor no se une directamente al DNA, sino que es reclutado por interacción con otro factor que lo hace. Aunque sean las interacciones con el DNA las que fundamentalmente determinan la unión de los factores transcripcionales, en algunos casos intervienen también las histonas del nucleosoma. Es lo que ocurre con el factor p53 que, cuando sus secuencias diana se encuentran en las zonas de entrada o salida del nucleosoma, la interacción de su extremo N-terminal desestructurado con el tetrámero H3-H4 refuerza la unión del factor [118].

Pero, como ya se ha apuntado, hay que tener en cuenta que la cromatina puede influir en la unión de factores al DNA. Muchas veces, algún rasgo reversible de la organización de la cromatina, como la metilación del DNA o la localización de los nucleosomas, impide la unión de un factor.

Para esos casos, se ha propuesto la designación de la unión del factor como “sensible a la cromatina” [70]. Desde hace tiempo se conoce que hay proteínas, como MCP2 que se unen a dinucleótidos CpG específicamente cuando la citosina está metilada y que esta unión puede impedir, por competencia, la de factores transcripcionales, pero recientemente se ha visto que la metilación del DNA puede inhibir la unión de factores debido a los sutiles cambios de estructura del DNA que implica la metilación de citosinas [119]. Por su parte, la presencia de nucleosomas tradicionalmente se ha considerado un obstáculo a la unión de factores transcripcionales, aunque desde hace tiempo se sabe que en algunos casos singulares pueden unirse proteínas a secuencias contenidas en un nucleosoma. La unión del receptor de glucocorticoides a su secuencia diana TGTTCT cuando ésta se encuentra incorporada a un nucleosoma es un ejemplo paradigmático en este sentido [120].

Quizá sea este el momento de abordar una cuestión que recuerda el diálogo que, en el acto 1º de la tragedia de Shakespeare, mantienen Horacio y Hamlet. Éste ha visto un fantasma, que resulta ser el espíritu de su asesinado padre, el rey. Horacio, amigo de Hamlet y compañero de estudios en Wittenberg, representa al hombre racionalista. Estudia filosofía natural –el nombre que recibían las ciencias naturales en su época– y cuando se le pide una explicación sobre el fenómeno del espectro se muestra incrédulo. Es en ese momento cuando Hamlet le dice:

*«There are more things in heaven and earth, Horatio,
Than are dreamt of in your philosophy»* [121].

Y el científico, aunque como Horacio haya de confiar en que su razón es capaz de abordar el conocimiento del universo, no debe caer en la arrogancia de pensar que ya está bien entendido. Comentando las palabras de Hamlet que se acaban de citar, el matemático Ennio de Giorgi (1928-1996) escribió:

«Estas palabras no son una invitación a “soñar menos”, sino más bien a

“soñar más” si queremos alcanzar una comprensión más amplia, aunque siempre muy parcial, de la realidad que nos rodea, y a la vez una invitación a desconfiar de los científicos que, habiendo obtenido algún éxito brillante, se hacen la ilusión de haber encontrado la teoría última, en la que debería encuadrarse toda investigación posterior» [50].

Encajan aquí estas consideraciones porque se admitía pacíficamente que una estructura cerrada de la cromatina impedía el acceso a los factores transcripcionales. Pero en 2002 se observó que algunos factores, como HNF3 y GATA-4 no sólo pueden unirse a sus secuencias diana cuando la cromatina se encuentra en un estado compacto, sino que, además, son capaces de iniciar la apertura de la estructura de la cromatina [122]. Los autores de la investigación denominaron “pioneros” a esos factores, por su capacidad de iniciar por sí mismos la apertura de la cromatina. Una reciente revisión de Luzete-Monteiro y Zaret ha recogido las características de estos factores pioneros [123] por las que, después de unirse a motivos parcialmente expuestos en la superficie de un nucleosoma, promueven la exposición local del nucleosoma que, a su vez, permite la unión de otros factores transcripcionales – para los que se ha propuesto el nombre de “colonizadores” [124]–, remodeladores o enzimas que provocan cambios epigenéticos en la cromatina. De esta manera se hace posible que una región de la cromatina inicialmente inactiva por su compactación, se haga competente para la transcripción o, por el contrario, llegue a un estado de represión total [123].

Un caso especialmente interesante de factores pioneros es el de OCT4 y SOX2. Se trata precisamente de dos de los factores de reprogramación que utilizó Shinya Yamanaka para obtener células pluripotentes inducidas (iPS) a partir de fibroblastos de ratón [125] o humanos [126]. El modo de unión del heterodímero formado por esos factores a los nucleosomas se ha investigado mediante crio-microscopía electrónica –otra

vez los estudios estructurales vienen en ayuda de los funcionales–, para concluir que cuando el motivo de unión CTTTGT-TATGC está situado en la posición SHL-6 la unión provoca una importante distorsión del DNA, que deja al descubierto H2A y H3, mientras que si el motivo se encuentra en la posición aparentemente simétrica SHL+6 sólo se producen mínimas distorsiones en el DNA [127]. Estos resultados son especialmente interesantes, porque proporcionan la base molecular por la que una célula diferenciada, por medio de la actuación de OCT4, puede comenzar a abrir regiones heterocromatizadas de su genoma, para que éste pase al estado de pluripotencia, en el que prácticamente todos los genes están potencialmente activos.

En una recentísima investigación se ha encontrado una interrelación del factor pionero OCT4 con modificaciones epigenéticas de la histona H3, concretamente la acetilación o trimetilación de su lisina 27. Esta región de la cola N-terminal de la histona entra en contacto con OCT4 tras el cambio conformacional inducido en el nucleosoma por la unión del factor. Y cuando la lisina 27 está modificada, esa interacción favorece cooperativamente la unión de más unidades de OCT4 o de SOX2 a los sitios de unión internos del nucleosoma [128]. Estos resultados sugieren que las modificaciones epigenéticas preexistentes pueden regular la acción de algunos factores pioneros.

Una vez más, con el descubrimiento de los factores pioneros se abrió una brecha en las ideas vigentes, en este caso sobre la represión ejercida por los nucleosomas. Aunque la coincidencia entre unión de factores y apertura de la estructura de la cromatina era sobradamente conocida, siempre se había pensado que la adquisición de una estructura accesible era paso previo a la unión de factores. El descubrimiento de los factores pioneros y de su modo de actuación, permitió comprender que, en ocasiones, ocurría lo contrario. Se abrió así una nueva frontera en la exploración de la regulación de la activación génica. Hasta los nombres empleados

de modo tan gráfico –pioneros, colonizadores– parecen sugerir un avance en la conquista de lo desconocido.

Se acaba de hablar de la relación entre adquisición de una estructura abierta por parte de la cromatina y la unión de factores transcripcionales, pero no se puede olvidar que en los cambios de organización de la cromatina los complejos de remodelación juegan un papel fundamental, como se ha comentado repetidas veces. Que existe una relación entre unión de factores y la actuación de remodeladores es algo sabido. Por ejemplo, la unión del factor CTCF está asociada con la aparición de una serie de nucleosomas estrictamente posicionados a ambos lados del sitio de unión [129], pero ese posicionamiento depende de la actuación de SNF2. En efecto, el silenciamiento de SNF2H/SMARCA5 –la ATPasa de ISWI humano– hace que se pierda apreciablemente la extensión de ese posicionamiento [130]. No obstante, como se advertía en la excelente revisión del grupo de Schübeler, hasta el momento de su publicación no había sido posible establecer, desde un punto de vista bioquímico, la existencia de interacciones entre remodeladores y factores transcripcionales [70]. Sin embargo, muy recientemente se ha demostrado que el factor pionero ASCL1 interacciona con BAF durante la neurogénesis humana, incluso –y especialmente– en los sitios donde no actúa como pionero [131].

Los experimentos que se acaban de reseñar abren la puerta a un nuevo territorio a explorar: el de los mecanismos de interrelación entre la actuación de complejos remodeladores y factores de transcripción. Pero, como se apuntaba al inicio de esta sección, en la regulación de la expresión génica intervienen también las modificaciones epigenéticas. Ya se ha comentado cómo a principios de este siglo ya se sabía que algunos complejos remodeladores eran capaces de reconocer marcas epigenéticas en las histonas [71]. En 1992, unos meses antes de que se conociera el papel remodelador de SWI/SNF, nuestro grupo comprobó que en las cepas de levadura en las que el gen *SNF2* estaba mutado,

el promotor del gen *SUC2* mantenía una estructura de cromatina típica del estado reprimido aún en las condiciones normales de activación, como es la ausencia de glucosa [56]. Años más tarde, por experimentos de inmunoprecipitación de cromatina se demostró que la proteína SNF2 está unida al promotor de *SUC2* en ausencia de glucosa y no en su presencia. Evidentemente, la presencia del remodelador es necesaria para la formación de una estructura de cromatina que permita la expresión. Pero lo que ahora interesa resaltar es que esa presencia requiere que el bromodominio de SNF2 esté intacto, lo que pone de manifiesto que el remodelador se recluta sobre el promotor de *SUC2* a través de interacciones con histonas acetiladas [132].

A lo largo del tiempo ha ido creciendo el convencimiento de que los complejos remodeladores pueden reconocer marcas epigenéticas en las histonas. Así, en 2009 ya se sabía que todos los complejos de la familia SWI/SNF poseen bromodominios, capaces de reconocer lisinas acetiladas y que en algunos casos se daba un reconocimiento específico de algunas marcas concretas de acetilación. También se había descrito la presencia de bromodominios en remodeladores de la familia ISWI. Por su parte, los miembros de la familia CHD poseen cromodominios, que interaccionan específicamente con lisinas metiladas. Además, como típico del complejo NURD, se encuentra el homeodominio PLANT, una alternativa a los cromodominios en el reconocimiento de lisinas metiladas. Finalmente, se había encontrado la combinación de dominios HAND-SANT-SLIDE en los complejos ISWI. SANT interacciona especialmente con colas N-terminales de histonas no modificadas y el dominio SLIDE interacciona con el DNA nucleosomal [133]. Pero la introducción y el reconocimiento de las marcas epigenéticas es algo tan importante, que merece dedicarle atención especial.

9. LA EPIGENÉTICA SE HACE PROTAGONISTA

Varias veces a lo largo de este discurso se ha hecho referencia a las modificaciones epigenéticas de la cromatina, esos cambios potencialmente heredables que, sin alterar la secuencia del DNA, pueden modificar la expresión génica. Se ha hecho referencia a la metilación del DNA y a las modificaciones covalentes de las histonas, especialmente, a la acetilación de residuos de lisina y a la metilación, que puede afectar tanto a cadenas laterales de lisina, como de arginina. Pero es el momento de centrarnos en esas modificaciones epigenéticas, que están alcanzando un interés insospechado hace tan sólo tres décadas. Es cierto que, ya en el año 2000, Allis había comenzado a hablar del “código de las histonas” por el que «*multiple histone modifications, acting in a combinatorial or sequential fashion on one or multiple histone tails, specify unique downstream functions*» [68],

Si las diferentes modificaciones de las histonas introducen un “código epigenético” es evidente que hacen falta moléculas capaces de distinguir una combinación de modificaciones de otra. Era, pues, lógico que Strahl y Allis, tras enunciar su hipótesis, se plantearan dos preguntas, que constituyen otros tantos epígrafes de su artículo: “*How is the histone code read?*” y “*Who reads the code?*” [68]. Aunque antes hay que plantear “¿cómo se escribe ese código?” Y, teniendo en cuenta que, para que las marcas epigenéticas desempeñen un papel regulador se requiere que las modificaciones sean reversibles, hay que preguntarse también, ¿cómo se borran las marcas?” Dicho de otro modo, como esas modificaciones implican una reacción química, tiene que haber enzimas capaces de introducir, de *escribir* el código epigenético (*writers*), enzimas para eliminar, para *borrar* esas marcas (*erasers*) y, como se apuntaba al principio de este párrafo, proteínas que puedan interpretar, *leer*, el código (*readers*).

En el casi cuarto de siglo transcurrido desde la enunciación del código de las histonas las modificaciones epigenéticas de la cromatina y sus consecuencias funcionales han suscitado un notable interés. Por

ejemplo, a las primeras modificaciones conocidas de las histonas –acetilación, metilación y fosforilación– se añaderían pronto la ubiquitinación, la sumoilación y la poliADP ribosilación, para continuar el elenco con crotonilación, propionilación, butirilación, malonilación y succinilación, aunque no se sabe si todas esas modificaciones son funcionalmente significativas [40]. Y es precisamente la funcionalidad de esas modificaciones lo que hace impensable, hoy en día, plantearse un estudio sobre la función de la cromatina sin tener en cuenta los factores epigenéticos. Buena muestra de ello es el aumento exponencial del número de publicaciones que relacionan ambos aspectos, que en 20 años han pasado de algo más de 60 artículos anuales a más de 2.500 (Figura 4). Ya se ha hecho mención de las conexiones entre remodelación y epigenética y de la influencia de la modificación de histonas en la

Artículos publicados sobre epigenética y cromatina

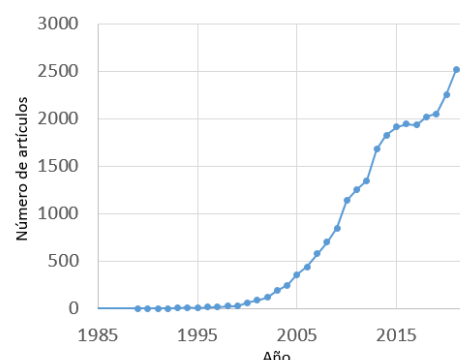


Figura 4. Evolución temporal del número de publicaciones sobre epigenética y cromatina.

unión cooperativa de algunos factores pioneros. Pero, quizá es en el estudio de la elongación de la transcripción donde se han obtenido resultados más asombrosos que, en la línea argumental de este discurso, merecen ser tratados con algún detalle. Gran parte de las investigaciones se han llevado a cabo con la levadura *S. cerevisiae*, ya que constituye un organismo modelo con apreciables ventajas. En general, los resultados obtenidos se pueden extrapolar a eucariotas superiores, incluido el hombre, aunque se den diferencias que, en su momento, se señalarán.

Como se ha comentado ya, se tenía el convencimiento de que la estructura nucleosomal debía alterarse para hacer posible el recorrido de la polimerasa. Y, al tratar de los complejos de remodelación, se ha apuntado que la eliminación de un dímero H2A-H2B es una etapa previa a la desorganización de la estructura nucleosomal. Pero los dímeros H2A-H2B son inestables y es necesario algún procedimiento para que conserven su estructura una vez separados del resto del octámero de histonas. Esa conservación se facilita por la existencia de algunas carabinas moleculares, como FACT (acrónimo de *facilitates chromatin transcription*) y Nap1 (acrónimo de *nucleosome assembly protein*).

En la 4ª edición del Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de España (VCTRAC) se ha incluido el lema “carabina molecular”, con la definición: *Cada uno de los componentes celulares que participan en el plegamiento, translocación y ensamblaje de las proteínas sintetizadas en las células, impidiendo interacciones inadecuadas*. Se evita así el anglicismo “chaperona”, que queda relegado como sinónimo, y se recupera uno de los significados españoles del término “carabina”, puesto que el papel de las carabinas moleculares, acompañar a proteínas para evitar interacciones inadecuadas, recuerda el de aquella obsoleta función desempeñada por quienes acompañaban a chicas jóvenes. Pues bien, tanto FACT, como Nap1 pueden jugar ese papel de “acompañar” a los dímeros H2A-H2B cuando se liberan del octámero y evitar que se degraden, pudiendo ser reutilizados.

En un artículo de revisión publicado el año 2007 [134] se resumía el conocimiento que en esa época se tenía sobre los acontecimientos que permiten el paso de la RNA polimerasa II a través de los nucleosomas que ocupan el cuerpo de un gen. En él se mencionaba cómo en un decisivo artículo del grupo de Danny Reinberg se puso de manifiesto que la sola unión de FACT es incapaz de separar el dímero H2A-H2B. No obs-

tante, ese proceso se facilita por una compleja serie de acontecimientos, que incluye el reclutamiento por FACT del factor general de elongación PAF1 (acrónimo de *polymerase-associated factor*) [135]. Como se demostró después, el complejo PAF1 contiene una enzima capaz de catalizar la ubiquitinación de H2B [136]. Esta modificación se había asociado con la cromatina activa, pero el trabajo mencionado especificaba su papel concreto, puesto que la ubiquitinación de H2B favorece la trimetilación de la lisina 4 de H3 y H3K4me3 es una marca reconocida por el remodelador CHD1. Parece, pues, que la acción conjunta de CHD1, FACT y la carabina Spt6, específica de H3-H4, consiguen el completo desensamblaje del nucleosoma para permitir el paso de la RNA polimerasa.

Pero la acetilación de histonas también juega un papel importante en la elongación, ya que, como se ha comentado, su asociación con la cromatina activa era conocida desde tiempo atrás. De hecho, se había encontrado, ya en 1998, que el complejo de elongación contenía las histona acetiltransferasas CBP y PCAF y que esta última interactuaba con la forma fosforilada de la RNA polimerasa II, que es la competente para la elongación [137]. Pero la estructura abierta de la cromatina, con el nucleosoma desestructurado, debe volver a cerrarse tras el paso de la RNA polimerasa. De lo contrario, si queda accesible el DNA, pueden iniciarse rondas espurias de transcripción a partir de sitios crípticos de iniciación, que, ordinariamente, están ocultos dentro del cuerpo del gen por estar incluidos en un nucleosoma. Por supuesto, las carabinas FACT y Spt6, se encargan de depositar de nuevo el tetrámero (H3-H4)₂ y los dos dímeros H2A-H2B para reconstituir el nucleosoma que se había destruido para permitir el paso del complejo de elongación. Pero además deben eliminarse las acetilaciones que contribuyeron a la adopción de una estructura abierta de la cromatina. Para ello, la metiltransferasa SET2, que va también unida a la RNA polimerasa fosforilada [138], cataliza la dimetilación de la lisina 36 de H3 en el nucleosoma

situado detrás de la polimerasa y, a su vez, H3K36me2 recluta el complejo de histona desacetilasa Rpd3S, que elimina los restos acetilo de las histonas tras el paso de la polimerasa.

Así estaba el conocimiento de los procesos epigenéticos implicados en la elongación de la transcripción hace 15 años, a partir de experimentos realizados con la levadura *S. cerevisiae*, con algunos sistemas *in vitro* y con datos obtenidos con organismos superiores [134]. En la actualidad, en líneas generales, se acepta este esquema de acontecimientos, aunque se han introducido numerosas precisiones. Por ejemplo, los complejos de remodelación ISWI y CHD favorecen el deslizamiento de los nucleosomas reconstituidos tras el paso de la polimerasa, para facilitar que Rpd3S pueda unirse simultáneamente a dos nucleosomas a la vez y acelerar así la desacetilación [139].

Por otro lado, se ha aclarado el mecanismo por el que la ubiquitinación de H2B favorece la trimetilación de la lisina 4 de H3. Es el complejo COMPASS (acrónimo de *complex of proteins associated with Set1*) el que, en levaduras, a través de su metiltransferasa Set1 cataliza la formación de H3K4me3. En eucariotas superiores, la situación es más compleja, puesto que otras metiltransferasas están también implicadas en la formación de H3K4me3 [140]. A su vez, COMPASS va unido a la RNA polimerasa a través de su dominio C-terminal; la unión se facilita por la fosforilación de sus serinas 2 y 5 [140]. Y, una vez más, los estudios estructurales han venido en ayuda de la comprensión de la función; la determinación mediante crio-microscopía electrónica de la estructura de un complejo formado por un nucleosoma con H2Bub y el módulo catalítico de COMPASS ha puesto de manifiesto que H2Bub bloquea un motivo de Set1 que actúa como autoinhibidor y, por tanto, hace posible la actuación de la enzima [141]. Estudios bioquímicos más recientes han permitido precisar aún más el mecanismo de ubiquitinación de H2B y la participación del complejo PAF1 [142].

También han aumentado considerablemente los datos disponibles sobre el papel de FACT, que es mucho más amplio que el de una simple carabina molecular [143]. Para estudiar el mecanismo de actuación de FACT, el grupo de Karolin Luger ha determinado –mediante crio-microscopía electrónica– la estructura de un complejo formado por un tetrámero (H3-H4)₂, un dímero H2A-H2B, DNA y la propia carabina molecular, así como la de otro complejo en el que se encuentra el octámero de histonas completo. La comparación de la estructura de ambos complejos ha permitido a los investigadores proponer un mecanismo para la eliminación del primer dímero H2A-H2B, que queda unido a FACT [144] (Figura 5). En la dinámica de la actuación de FACT participan sus

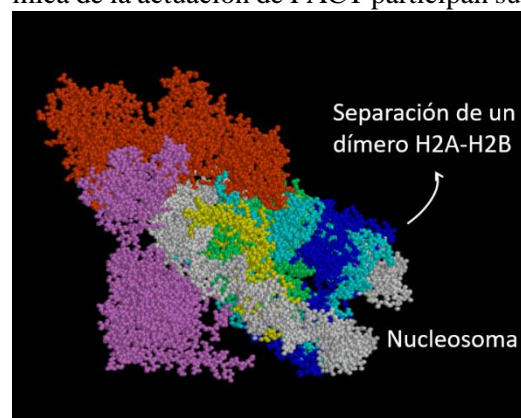


Figura 5. Complejo FACT-nucleosoma en el momento en que FACT comienza a separar un dímero H2A-H2B. Las dos subunidades de FACT se representan en rojo y magenta y las histonas H2A y H2B en azul claro y oscuro, respectivamente. Imagen generada por RasMol 2.7.5.2, a partir de las coordenadas determinadas por Liu *et al.* [144] (archivo 6upl.pdb).

dos subunidades, SPT16 y SSRP1 y el dímero H2A-H2B queda unido al dominio C-terminal de esta última. A través de una metodología radicalmente diferente, el grupo de Tsuyoshi Terakawa ha llegado recientemente a proponer un mecanismo similar para la actuación de la carabina Nap1 de *S. cerevisiae* [145].

Además, hay que señalar que, mientras que la actuación de la RNA polimerasa II es procesiva –es decir, la enzima, tras completar un ciclo de catálisis y haber añadido un nuevo nucleótido a la cadena de RNA naciente, no se separa del DNA, sino que avanza hasta llegar al siguiente eslabón

del DNA—, la metilación de H3K4 y H3K36 no lo es. Esto significa que tras añadir un grupo metilo a la lisina en cuestión, la enzima ha de separarse y volver a ser reclutada por la polimerasa para añadir el siguiente grupo metilo hasta llegar al estado final de trimetilación [140].

Finalmente, los resultados de los experimentos *in vitro* realizados por el grupo de Kurumizaka han permitido vislumbrar la secuencia del proceso de remodelación del nucleosoma a lo largo del avance de la RNA polimerasa [146]. Sobre una secuencia de DNA con un estricto condicionante de posicionamiento reconstituyeron un nucleosoma y ligaron a uno de los extremos otra secuencia de DNA capaz de unir RNA polimerasa II. Se sabía desde hace tiempo que la RNA polimerasa, al atravesar un nucleosoma, queda parcialmente pausada en ciertas posiciones en las que los contactos histona-DNA hacen más difícil su avance [147]. Pues bien, Kujirai *et al.* consiguieron, mediante electroforesis, separar los complejos RNA polimerasa-nucleosoma en las diferentes posiciones de pausa, que corresponden a las localizaciones SHL-1, SHL-2, SHL-5 y SHL-6. Tras la purificación de esos complejos, estudiaron su estructura mediante criomicroscopía electrónica. Esas estructuras son como instantáneas que ponen de manifiesto cómo la RNA polimerasa va despegando el DNA de la superficie del octámero de histonas durante la transcripción. Al tratarse de un experimento *in vitro*, con un sistema mínimo de transcripción, no muestra el proceso real *in vivo*, en el que, como hemos comentado, participa una numerosa serie de factores y de modificaciones epigenéticas, pero da una idea de cómo la RNA polimerasa puede abrirse camino para superar la barrera impuesta por los nucleosomas [146]⁹. Recientemente se ha demostrado mediante FRET que, *in vitro*, la ubicuitinación de H2B120 reduce la duración de las pausas y, por tanto, acelera la velocidad de elongación [148].

⁹ En uno de los vídeos (aau9904s1.mp4) recogidos como material suplementario de este artículo, se puede observar el modelo propuesto

Hay que advertir que todos los mecanismos de elongación que se han reseñado hasta aquí, no tienen por qué ser válidos en todas las células eucarióticas. Por ejemplo, FACT, muy abundante en levaduras y en células de mamíferos poco diferenciadas —incluidas muchas cancerosas—, tiene una presencia escasa en células diferenciadas. En células HeLa, por ejemplo, las proteínas LEDGF y HDGF2 (acrónimos, respectivamente, de *lens epithelium-derived growth factor* y de *hepatoma-derived growth factor* 2), desempeñan un papel similar a FACT [149].

La complejidad de un proceso como la elongación de la transcripción en eucariotas no deja de ser sorprendente, habida cuenta de la gran coordinación que existe entre tantas etapas que la componen y que vale la pena resumir ahora. En primer lugar, las regiones competentes para la transcripción contienen histonas acetiladas y las acetiltransferasas asociadas a la RNA polimerasa II completan esta acetilación. Pero el nucleosoma, aún con histonas acetiladas, sigue siendo un obstáculo para el avance de la polimerasa, de modo que, al llegar la polimerasa a un nucleosoma, se produce una pausa inicial en la elongación. Entonces, la actuación combinada de la carabina molecular FACT y del complejo PAF1 consiguen la ubicuitinación de H2B, lo que, a su vez, activa la histona metiltransferasa SET1D (Set1 en levadura), que cataliza la formación de H3K4me3. Esta histona modificada puede reclutar complejos de remodelación, que ayudan al desensamblaje del nucleosoma, con la ayuda de las carabinas FACT (o sus equivalentes) y Spt6 lo que favorece el paso de la RNA polimerasa. Detrás de ella deben desacetilarse las histonas de los nucleosomas re-ensamblados, para lo cual la enzima SET2D (Set2 en levadura) cataliza la dimetilación de H3K36, modificación que recluta la histona desacetilasa correspondiente (Rpd3S en levadura), que, con la ayuda de los remodeladores ISWI y CHD, consiguen

por los autores para el avance de la RNA polimerasa II a través del nucleosoma.

finalmente esa desacetilación y dejan al nucleosoma en las condiciones iniciales, preparado para una nueva ronda de transcripción por otra molécula de RNA polimerasa.

La RNA polimerasa II transcribe *in vivo* a una velocidad media de 35 nucleótidos por segundo y en determinadas regiones puede llegar a los 72 nucleótidos por segundo [150,151]; de estos datos se desprende que la transcripción del DNA contenido en un nucleosoma se completa en unos 5 s y puede llegar a hacerse en la mitad de tiempo. Es innegable que nos encontramos de nuevo ante un hecho sorprendente que puede causar admiración, no sólo por la complejidad y la extraordinaria coordinación de tantos fenómenos, sino, además, por la velocidad con que todo ello se lleva a cabo.

Hay varias formas de contemplar estos datos. La primera sería la de una sorpresa superficial, que no indaga en el auténtico significado de los datos: no conduciría a ningún avance en el conocimiento. Simplemente, conduce a una admiración pasajera, como la del que se pasma al contemplar un paisaje como el del cañón del Colorado sin preguntarse qué fenómenos geológicos han dado lugar a esa maravilla de la naturaleza.

La segunda, podría definirse como una reflexión vana, falta de curiosidad indagadora. Sería la actitud del que, tras calcular los tiempos y fases del proceso, se quedara satisfecho y no siguiera investigando. Es la postura de los que piensan que la ciencia, al reducir toda la realidad a leyes y números, ha matado la maravilla del mundo. Algo así opinaba el poeta romántico John Keats cuando decía que los descubrimientos de Newton habían «destruido la poesía del arco iris, reduciéndolo a un prisma» [152], idea en la que insistió en su poema *Lamia*:

[Natural] «Philosophy will clip an
Angel's wings,
Conquer all mysteries by rule and
line,
Empty the haunted air, and gnomed
mine—

*Unweave a rainbow, as it erewhile
made
The tender-person'd Lamia melt into
a shade»* [153].

La tercera forma es la que podríamos llamar de un asombro reflexivo o inquisitivo. Asombro, sí, ante los datos iniciales, pero un asombro reflexivo que, partiendo de ellos advierte lo que queda por resolver. Bersanelli y Gargantini han advertido que «*no hay investigación si la admiración no se convierte en pregunta*», lo que les da pie a colocar la curiosidad entre las cualidades que deben adornar al científico [27]. La admiración y el asombro ante los datos deben estimular la curiosidad, deben llevar a valorar todos los antecedentes del problema. Seguramente por eso, como apunta Fernández-Rañada, «*los griegos tomaron la lechuza cómo símbolo de la filosofía, porque sólo pueden ser sabios quienes se asombran ante el mundo, como parece hacerlo ella con sus ojos tan abiertos*» [154]. Y para tener los ojos abiertos, deberíamos volver a la ingenua curiosidad de los niños, que, como advertía Carl Sagan, es capaz de plantear cuestiones profundas:

«*Si uno habla con niños de una guardería o de primaria, se encuentra con una serie de entusiastas por la ciencia. Formulan preguntas profundas. Se cuestionan, ¿qué es un sueño?, ¿por qué tenemos dedos en los pies?, ¿por qué la luna es redonda?, ¿cuándo es el cumpleaños del mundo?, ¿por qué la hierba es verde? Se trata de cuestiones importantes, profundas, que fluyen espontáneamente de ellos. Pero si uno habla con chicos de 17 o 18 años no se encuentra con nada de esto. Han perdido la curiosidad. Ha ocurrido algo terrible entre los 3 y los 17 años*» [155].

Encajan aquí las ideas de Descartes, que distinguía entre el asombro útil, la admiración, y el inútil, un simple pasmo. Mientras que la admiración lleva a considerar con atención las cosas que nos parecen raras y extraordinarias y, por consiguiente, dignas

de ser consideradas más atentamente, el pasmó hace que todo el cuerpo se quede inmóvil como una estatua, de modo que sólo puede captar una primera impresión del objeto y le impide adquirir un conocimiento más profundo:

«L'admiration est une subite surprise de l'âme, qui fait qu'elle se porte à considérer avec attention les objets qui luy semblent rares et extraordinaires. Ainsi elle est cause premièrement par l'impression qu'on a dans le cerveau, qui represent l'object comme rare, et par consequent digne d'être fort considéré; puis en suite par le mouvement des esprits, qui sont disposez par cette impression à tendre avec grande force vers l'endroit du cerveau où elle est, pour l'y fortifier et conserver (...). [L'étonnement est] ce qui fait que tout le corps demeure immobile comme une statue, et qu'on ne peut apercevoir de l'objet que la première face qui s'est présentée, ni par conséquent en acquérir une plus particulière connaissance. C'est cela qu'on appelle communément être étonné; et l'étonnement est un excès d'admiration qui ne peut jamais être que mauvais» [156].

Sirvan las anteriores reflexiones para reiterar que esas emociones que tenían los grandes exploradores, el asombro, la curiosidad, la capacidad de admirarse ante la contemplación de algo inesperado y bello, no son ajenas a los científicos, sino, más bien, han de servirles de acicate para progresar en su trabajo e, incluso, para su autorrealización, porque *«el hombre trata de adquirir los conocimientos universales que le permiten comprenderse mejor y progresar en la realización de sí mismo. Los conocimientos fundamentales derivan del asombro suscitado en él por la contemplación de la creación: el ser humano se sorprende al descubrirse inmerso en el mundo, en relación con sus semejantes con los cuales comparte el destino. De aquí arranca el camino que lo llevará al descubrimiento de horizontes de*

conocimientos siempre nuevos. Sin el asombro el hombre caería en la repetitividad y, poco a poco, sería incapaz de vivir una existencia verdaderamente personal» [157].

10. UNA PAUSA EN NUESTRA EXPLORACIÓN

Cuando se emprende un recorrido por territorio desconocido, el asombro ante los descubrimientos inesperados y la admiración ante la belleza de muchos de ellos aconseja hacer una pausa, reposar un poco y reconsiderar, sopesar lo que se acaba de descubrir. Quizá sea este el momento de hacer esa pausa y preguntarnos, lo visto hasta aquí, ¿es sólo algo sorprendente, que va a satisfacer la curiosidad de quienes se dedican a las ciencias básicas? O, como ocurrió con las de Maxwell, ¿están llamadas estas investigaciones a cambiar, a mejorar la vida de las generaciones futuras? La respuesta es fácil, toda vez que no hay que presagiar qué ocurrirá en el futuro: el presente ya es testigo de la aplicación de muchas de las cuestiones básicas que aquí se han expuesto. Por centrarnos en ese aspecto particular de nuestro hilo conductor que es la epigenética, hay que reconocer que sus conceptos y hallazgos están revolucionando el campo de la biomedicina. Si las modificaciones epigenéticas pueden alterar la expresión de un gen, sus efectos pueden ser semejantes a los de una mutación genética. Una mutación es un cambio en la secuencia de un gen o de sus regiones reguladoras, que puede llegar a suprimir su función natural. Y si la de ese gen es fundamental para el mantenimiento de la salud, la mutación será la causa de una patología de mayor o menor gravedad. Pero si la función del gen se altera por cambios epigenéticos, los resultados patológicos serán similares. En este sentido, se ha acuñado el término de *epimutaciones* para referirse a esos cambios [158] y se puede hablar de enfermedades epigenéticas, tanto si están causadas exclusivamente por errores en las modificaciones de la cromatina, como si éstos participan junto con otros factores en la etiología de la enfermedad [159].

El listado de enfermedades epigenéticas es enormemente amplio. En un ya clásico libro sobre el particular [160] se incluyen capítulos sobre cáncer, enfermedades autoinmunes y alérgicas, enfermedades metabólicas, incluida la diabetes, enfermedades neurobiológicas, respiratorias, infecciosas, cardiovasculares, ginecológicas, así como de desórdenes asociados al envejecimiento o a la impronta genómica. Incluso, recientemente, se ha encontrado que una de las proteínas codificadas por el genoma del coronavirus causante de la COVID-19 distorsiona la regulación epigenética de las células huésped [161]. Este amplio panorama está obligando a cambiar el protocolo de diagnóstico en muchos casos, pero, a la vez, abre una nueva esperanza para el tratamiento, ya que los cambios epigenéticos, a diferencia de las mutaciones genéticas son reversibles. De hecho, ya se dispone de fármacos epigenéticos, capaces de revertir las modificaciones patológicas, aprobados para su empleo [162] y la investigación actual es muy activa en ese terreno. Por brevedad, sólo se incluyen a este respecto las citas más recientes y de más amplio espectro [163–169].

Queda pues, claro, que gran parte de las investigaciones que se han resumido hasta el momento están conduciendo a nuevos y prometedores avances en su aplicación, especialmente en el área de la medicina personalizada.

11. ¿UN GEN, UNA ENZIMA?

La propuesta “un gen, una enzima” constituyó una explicación plausible y fructífera de las bases moleculares de la herencia biológica en el momento de su formulación [170]. Sin embargo, la hipótesis ya no puede

aceptarse en su sentido original. Aun dejando de lado que, como se comentó al inicio de este discurso, el concepto de gen es hoy materia de discusión [4], y limitándonos a considerar simplemente el gen como una secuencia de DNA que se transcribe para producir un mRNA, esto es, aceptando el concepto de “gen molecular” de Griffiths y Stotz [5], hay que tener en cuenta que un único gen estructural puede dar lugar a varios mRNAs que, a su vez, pueden traducirse para formar distintas isoformas de proteína. Esto es posible debido a la existencia de ajuste¹⁰ alternativo.

La existencia de ajuste para producir el mRNA maduro a partir de un transcrito primario, pre-mRNA, fue descrita en 1977 independientemente por los grupos de Roberts [171] y Sharp [172] en sus investigaciones sobre el mRNA de adenovirus. Desde entonces, se ha visto que el ajuste existe en la mayor parte de los genes eucarióticos como un proceso que, ordinariamente, elimina los intrones y une entre sí los exones. Los mecanismos moleculares por los que tiene lugar el ajuste son muy complejos y se han revisado en múltiples artículos. Para la eliminación del intrón de un pre-mRNA localizado entre los exones designados a partir de ahora como el exón 5' y el exón 3', según su situación en la secuencia, tiene lugar las reacciones que se resumen a continuación [173,174]. El grupo hidroxilo 2' de una adenosina específica situada en el intrón, en una localización denominada sitio de ramificación por lo que luego se verá, realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace fosfodiéster situado en el extremo 5' del exón 5'. Como consecuencia de esta reacción, el extremo 5' de este exón queda libre, con su átomo de oxígeno 3' con carga negativa. El intrón que queda en la otra parte del pre-mRNA forma

¹⁰ La Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de España, en la 4ª edición de su Vocabulario Científico y Tecnológico, traduce el término inglés *splicing* como ajuste, incorporando la definición: *Mecanismo fundamental del procesamiento de los mRNAs eucarióticos por el que el producto primario de la transcripción experimenta escisiones y empalmes en puntos específicos de la cadena, con el fin de eliminar los*

intrones. Se utiliza así un término existente en castellano, lo que permite introducir, por ejemplo, el neologismo *ajustosoma* para evitar el anglicismo *spliceosoma*, que se usa con frecuencia en la literatura bioquímica en lengua española.

un lazo entre la adenosina del sitio de ramificación y el fosfato que pertenecía al exón 5'. En una segunda etapa, el oxianión 3' del exón 5' realiza un ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster del extremo del exón 3'. De este modo los exones 5' y 3' quedan unidos –ajustados–, y el lazo formado por el intrón se degrada. Todos estos procesos requieren la participación de más de un centenar de factores, que incluyen ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) y enzimas que se ensamblan dinámicamente para formar complicados complejos, denominados ayustosomas.

Pero los genes que poseen más de dos exones, como es el caso de la mayoría de los genes humanos, pueden presentar lo que se denomina ajuste alternativo. Por ejemplo, no todos los exones se incluyen en el mRNA maduro o se retiene algún intrón. Esto da lugar a que de un único gen puedan resultar varios mRNAs maduros [175]. El acontecimiento más frecuente en el ajuste alternativo es la eliminación de un exón, pero se dan otras posibilidades, como la existencia de sitios de ajuste alternativos 3' o 5' que ocurren en el interior de los exones, la presencia de exones mutuamente excluyentes, que da lugar a la inclusión de solo uno de ellos en el mRNA maduro, y la retención de intrones.

La existencia de ajuste alternativo plantea una cuestión importante: ¿cómo se seleccionan los exones que deben ser incluidos en el mRNA maduro? Aunque los mecanismos por los que los ayustosomas eligen los posibles exones no se conocen aún con total precisión, sí se han descrito muchos detalles sobre ellos. La secuencia consenso por la que se inicia un intrón en el sitio 5' siempre es el dinucleótido GU, y en humanos puede continuar por A/G, A, G, y U, pero estos últimos 4 nucleótidos, especialmente el último, se dan con menor probabilidad [176]. Por su parte, la secuencia consenso intrónica que precede al sitio 3' de ajuste es C/U, AG y frecuentemente está precedida por un segmento de polipirimidinas. Pero, como ocurre en el sitio 5', sólo el dinucleótido AG está siempre presente [177]. Es corriente designar a los sitios de ajuste como

fuertes o débiles según sus secuencias se aproximen a las secuencias consenso que se acaban de mencionar.

El ajuste alternativo añade nuevo reto a la exploración que venimos realizando, ya que, en mamíferos, la mayor parte de los ajustes se realizan de forma co-transcripcional [178]. Algunas snRNPs, como U1 y U2AF van unidas al dominio C-terminal de la RNA polimerasa II durante la elongación de la transcripción y se depositan sobre los sitios de ajuste 5' y 3', respectivamente. Cuanto más fuertes son estos sitios, más firme es la unión de esas snRNPs y, como consecuencia, más fácil el ensamblaje del resto de los componentes del ayustosoma, que dará lugar a la eliminación del intrón intermedio entre los dos exones que quedarán unidos. Pero está claro que, dado el inmenso número de secuencias GU y AG presentes en el genoma y la relativamente baja probabilidad de que haya una estrecha coincidencia con el resto de las secuencias consenso, es necesario algo adicional para asegurar la unión de las snRNPs a los sitios correctos de ajuste. En este sentido, se han descrito varios elementos, tanto *cis* como *trans*, que regulan el ensamblaje del ayustosoma [179]. Entre los primeros se encuentran los ISE, ESE (acrónimos de *intronic* o *exonic splicing enhancers*), ISS y ESS (*intronic* o *exonic splicing silencers*), cuyo nombre revela claramente su localización en el pre-mRNA y su función. La interrelación de estos elementos reguladores y los sitios de ajuste da lugar a un compleja red de interacciones [180].

Como el ajuste ocurre normalmente asociado a la transcripción, aunque afecte al RNA naciente, la estructura de la cromatina y sus modificaciones epigenéticas influyen decisivamente en su regulación [181,182]. Se han propuesto dos modelos por los que la estructura de la cromatina influye en el ajuste alternativo [183]. Uno es el modelo cinético, según el cual la velocidad a la que la RNA polimerasa II realiza su función procesiva determina la selección de unos exones u otros. El segundo es el modelo de recluta-

miento, que propone que, además de las enzimas y factores que ya se han mencionado antes, en determinados casos, se asocian al dominio C-terminal de la RNA polimerasa II otras proteínas implicadas en el ajuste, que condicionan la selección de exones. Ambos modelos no son excluyentes y se han encontrado casos que encajan en ellos.

En cuanto al modelo cinético, una velocidad alta de avance de la polimerasa puede dificultar que las snRNPs U1 y U2AF se unan a sitios débiles de ajuste, dando lugar a la exclusión del exón correspondiente, mientras que un avance lento permitiría su inclusión [178,184]. La velocidad de transcripción depende de múltiples factores, que incluyen la propia secuencia del DNA, la organización de la cromatina y sus modificaciones epigenéticas y la actuación de los remodeladores. Para centrarnos en aspectos relacionados con el hilo conductor de este discurso, cabe señalar que, además de la ubiquitinación de H2B, ya reseñada, la presencia de H3K79me2 y H4K20me1 favorecen un avance rápido [185], mientras que la metilación de H3K9, que puede reclutar HP1 y dar lugar a una estructura compacta, tipo heterocromatina, frena ese avance [186].

La metilación del DNA en el cuerpo del gen también influye en la velocidad de la transcripción, aunque de una forma indirecta. El factor CTCF (*CCCTC-binding factor*) se une a su secuencia diana cuando los dinucleótidos CpG adyacentes no están metilados. En este caso, la presencia del factor hace que el avance de la polimerasa sea más lento, lo que condiciona el ajuste en base al modelo cinético. Un ejemplo paradigmático de este mecanismo se describió en 2011, trabajando con el gen *CD45*. Los exones 4, 5 y 6 pueden o no incluirse en el mRNA maduro, mientras que los demás se encuentran en todas las isoformas. Pues bien, la unión de CTCF al exón 5 frena el avance de la polimerasa y permite el ajuste de este exón, pero

cuando el DNA en ese exón está metilado no se une CTCF y el exón 5 se excluye [187].

En otros casos, las modificaciones epigenéticas de las histonas influyen de otro modo. Es lo que ocurre en el gen *FGFR2*, que codifica el receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos. El ajuste alternativo de este gen da origen a dos isoformas, denominadas IIIb y IIIc, que se diferencian por la presencia de uno u otro de dos exones mutuamente excluyentes. Cuando en los nucleosomas que ocupan estos exones H3K36 está desmetilada, por omisión se produce la isoforma IIIb. Por el contrario, la trimetilación de ese residuo de lisina hace que la proteína MRG15¹¹, que posee un cromodominio, se una a esos nucleosomas y, a su vez, recluta el factor de ajuste PTB1, que induce la inclusión del exón alternativo, produciéndose la isoforma IIIc [174]. Sería éste un caso explicable por el modelo de reclutamiento.

Además de su papel en la regulación de la velocidad de avance de la RNA polimerasa, el factor CTCF modula el ajuste alternativo por otros mecanismos, que se han revisado recientemente [188]. Vale la pena señalar uno de ellos, relacionado con otra función de este factor de la que se tratará en el siguiente apartado del presente discurso. Esa función es la dimerización de dos factores CTCF unidos a diferentes partes del genoma, con lo que se forma un bucle en la secuencia del DNA y se sitúan ambas partes en proximidad física. Pero esos bucles mediados por CTCF se forman preferentemente entre el promotor de un gen y regiones intragénicas y cuando el bucle implica a un exón constitutivo próximo al promotor y otro alternativo que no esté lejos en la secuencia, el bucle favorece la inclusión de ese exón alternativo [189].

Además del ajuste alternativo existen otras posibilidades de que resulten múltiples mRNAs a partir de un único gen. Las

¹¹ El nombre del gen *MRG15* corresponde al acrónimo de *MORF4-related gene on chromosome 15*.

más comunes son la presencia de promotores [190] o sitios de terminación de la transcripción [191] alternativos.

La existencia de ajuste y la posibilidad de que se dé de modo alternativo añade una nueva dificultad en nuestro recorrido de exploración de la transcripción. La decisión que ha de tomarse en cada momento no es ya la de transcribir o no transcribir un gen sino, además, la de seleccionar el mecanismo de ajuste para que predomine la isoforma requerida en cada momento. Esto es así porque, como se verá inmediatamente, con mucha frecuencia las diferentes isoformas de mRNA maduro se traducen a proteínas con funciones distintas y, a veces, opuestas. Y, además, complica el proceso de transcripción en el sentido de que no basta con que la polimerasa supere las barreras impuestas por los nucleosomas, sino que debe interactuar con otros factores que se encarguen, al mismo tiempo en que se va produciendo la elongación, de ensamblar en los sitios precisos toda la maquinaria de ajuste que, como se ha comentado, consta de más de 100 factores. Una vez más nos hemos encontrado con un panorama extraordinario, que requiere un exquisito ajuste y coordinación, y que pone de manifiesto cómo esa tremenda complejidad tiene un sentido.

No todas las isoformas de mRNA que resultan de ajuste alternativo se traducen a proteína. Con frecuencia, las isoformas de mRNA contienen codones prematuros de parada y se degradan por medio de un mecanismo que elimina también otras formas anormales de mRNA. Otras isoformas están presentes en cantidades despreciables y no influyen en la homeostasis celular. Algunas más, aunque no se traduzcan, pueden desempeñar alguna función. Pero ahora conviene centrarse en las isoformas que dan lugar a proteínas alternativas.

Las diferentes isoformas de proteína procedentes de un mismo gen pueden tener funciones distintas y, a veces, opuestas. Un

ejemplo clásico, que se describió ya en 1994 es el del gen *FAS*, que codifica una proteína de la membrana mitocondrial, implicada en la inducción de la apoptosis, un proceso que conduce a la muerte celular cuando han fracasado otros intentos de reparar defectos cruciales para el desarrollo normal de la célula. La apoptosis es así un mecanismo de defensa ante el desarrollo tumoral: por ejemplo, cuando en una célula se alteran de modo insalvable los mecanismos de reparación de un DNA alterado, la puesta en marcha de la apoptosis evita que la célula se divida y propague los errores presentes en el DNA. Pues bien, un ajuste alternativo que afecta al exón 6 de *FAS* conduce a una proteína soluble antiapoptótica [192]. Tras este hallazgo inicial, son muchos los casos que se han descrito en los que un ajuste alternativo aberrante se encuentra en la base de numerosas patologías. Concretamente, la influencia del ajuste alternativo en el cáncer ha sido objeto de numerosos estudios [193–196].

En esta línea, cabe reseñar las investigaciones realizadas en el grupo de Epigenética y Cromatina del Instituto de Investigaciones Sanitarias INCLIVA, de Valencia, aunque constituye una mínima búsqueda dentro de esta grandiosa exploración que estamos reviviendo. Todo comenzó cuando se deseaba averiguar si las mutaciones en el gen *KRAS*, que suponen un factor de mal pronóstico en el cáncer colorrectal, daban lugar a modificaciones epigenéticas en la cromatina que condujeran a una regulación aberrante de la transcripción. Pero ocurrió algo relativamente frecuente en la investigación: cuando se busca algo que se estima interesante, puede encontrarse otra cosa, no menos importante. Algo así sucedió a Susan Jocelyn Bell, que tratando de detectar quásares, descubrió los púlsares en 1967¹². Y, por seguir con la analogía de las exploraciones, *«desde Cristóbal Colón en adelante son innumerables los episodios que muestran cómo buscando alcanzar un cierto territorio, se termina alcanzando otro distinto,*

no figuró entre quienes obtuvieron el premio, el supervisor de su trabajo Antony Hewish, y Martin Ryle.

¹² El descubrimiento fue galardonado con el Premio Nobel de Física en 1974, pero Jocelyn Bell

pero no necesariamente menos importante que el que se había prefijado» [27].

Estudiando el acetiloma de las células cancerosas HAF1 ($KRAS^{wt/-}$) y HAE6 ($KRAS^{G13D/-}$), líneas isogénicas que sólo difieren en que la segunda de ellas es portadora de una mutación en $KRAS$, no se observaron diferencias en la acetilación de histonas, pero sí en la de hnRNPA1 y hnRNPA2/B1, ribonucleoproteínas implicadas en el ajuste [197]. Al estudiar las diferencias que las mutaciones de $KRAS$ introducían en el ajuste, se encontró que el de los genes $RPL13$, $HSP90B1$, $ENO1$, $EPDR1$ y $ZNF518B$ estaba alterado en líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal humano portadoras de la mutación $KRAS^{G13D}$, cuando se comparaba con el ajuste en células con $KRAS$ normal [198]. El último de esos genes presentaba un especial interés, ya que tanto el conjunto de sus 5 isoformas, como las dos mayoritarias, se sobreexpresan en células cancerosas a causa de alteraciones epigenéticas, que afectan a las histonas de los nucleosomas del promotor y a cambios en el posicionamiento del nucleosoma +1 [199]. Además, la sobreexpresión del gen está relacionada positivamente con la migración, la capacidad invasiva de las células y la inducción de la transición epitelio-mesenquimal [199]. Por ese motivo, el gen $ZNF518B$ fue objeto de un estudio ulterior a nivel genómico, que puso de manifiesto la existencia de una compleja red de interacciones, que implican, por una parte, a $ZNF518B$ y los genes $EHMT2$ y $EZH2$ que codifican histona metiltransferasas, y por otra, a los genes implicados en oncogénesis $KAT2B$, $RGS4$, $EFNA5$, $RGS4$ y $PADI3$. Además, se encontró que las isoformas mayoritarias de $ZNF518B$ tienen un papel diferencial en la recaída en la enfermedad [200].

Se estableció así una nueva conexión entre epigenética, ajuste alternativo y patogénesis, que también se da en otro de los genes anteriormente comentados, concretamente $EPDR1$. La expresión del gen está relacionada con el estadio de desarrollo del cáncer colorrectal y también en este caso la regulación de la expresión de la isoforma

mayoritaria está controlada por factores epigenéticos, concretamente metilación de una isla CpG en su promotor [201]. Más aún, la selección de las isoformas de ajuste del gen $KRAS$, cuyas mutaciones están relacionadas con el ajuste de $ZNF518B$ y $EPDR1$, está también gobernada por mecanismos epigenéticos [202]. De este modo, se ha propuesto que existe un triángulo entre el desarrollo del cáncer, el ajuste alternativo y las modificaciones epigenéticas [203]. Que alteraciones en la regulación epigenética o un ajuste aberrante esté en la base de patologías como el cáncer es algo de lo que, implícita o explícitamente, ha quedado constancia en las líneas precedentes. Pero al ajuste afecta a genes que codifican proteínas que introducen, borran o leen las marcas epigenéticas y toda la maquinaria de ajuste puede estar afectada por una regulación a nivel epigenético. De este modo, se cierra el triángulo (Figura 6) que, lejos de suponer un factor alarmante en

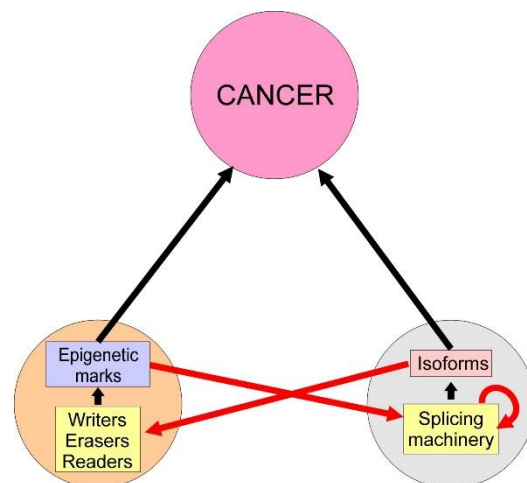


Figura 6. Triángulo formado por el cáncer, la epigenética y el ajuste alternativo. Las alteraciones epigenéticas y el ajuste aberrante causan cáncer en muchos casos (flechas negras). Ambas causas están interconectadas (flechas rojas), porque los cambios epigenéticos afectan a los factores de ajuste y el ajuste puede, a su vez, alterar de diversos modos a la adquisición de marcas epigenéticas. Además, un ajuste aberrante puede influir sobre los propios factores de ajuste Reproducido con autorización CC BY-ND 2.0 de Gime no-Valiente *et al.* [203].

el tratamiento del cáncer, presenta rasgos esperanzadores a la vista de la antes mencionada posibilidad de revertir las marcas epigenéticas.

12. UNA COMPLICACIÓN FINAL: LA ORGANIZACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA CROMATINA

En cierto modo, puede decirse que termina este discurso de un modo semejante a como empezó. Porque comenzábamos considerando que dentro del núcleo de una célula humana deben empaquetarse 2 m de DNA y ahora, después de repasar los complejos procesos que deben ocurrir para que la expresión de los genes que en ese DNA se contienen se realice de un modo controlado, hemos de volver a contemplar el teatro en que todos esos acontecimientos ocurren: el núcleo. Y si surgía el asombro al observar qué grado de empaquetamiento era necesario, ahora ese asombro ha de incrementarse si tenemos en cuenta algunas propiedades del interior del núcleo. De lo que se ha visto hasta ahora, queda claro que no sólo hay cromatina en el núcleo eucariótico. Hay una multitud de enzimas, una gran cantidad de factores transcripcionales, muchas proteínas y RNAs implicados en el ajuste... Todo eso hace que en el interior del núcleo la concentración de las diferentes moléculas sea muy elevada, lo que conduce a un entorno de gran viscosidad. En efecto, estudios reológicos han permitido estimar que la viscosidad del nucleoplasma es aproximadamente de 10.000 poises [204], esto es, unas 300 veces superior a la de la miel. ¿No llama la atención el que procesos tan complejos como los anteriormente descritos puedan desarrollarse en un entorno tan poco favorable para el movimiento de las moléculas?

Pero hay que añadir otra consideración. Cuando se piensa en la organización de los genes, habitualmente nos los imaginamos como una secuencia rectilínea de sus elementos. De hecho, cuando se representa el mapa de una región del genoma, se suele dibujar como una sucesión rectilínea de los genes y espacios intergénicos. Pero la situación es muy otra en el núcleo en interfase.

Los cromosomas –que en la metafase se condensan hasta formar las conocidas estructuras– durante la interfase está desplegados –enmarañados, se podría decir–, distribuidos a lo largo y ancho del núcleo¹³; y es dentro de esa inmensa maraña formada por la cromatina de los 46 cromosomas humanos desplegados donde deben producirse todos los acontecimientos que llevan a la expresión regulada de los genes.

La organización estructural del núcleo se comenzó a abordar tan pronto como los métodos de microscopía óptica lo permitieron. El nucléolo, por ejemplo, fue observado ya en 1835 [205]. Actualmente se sabe que en él tiene lugar la transcripción, por parte de la RNA polimerasa I, de los genes que codifican los RNAs ribosomales. Y en 1903, Ramón y Cajal describió la presencia en el núcleo de neuronas de unos orgánulos que denominó “cuerpos accesorios” [206] y que hoy se conocen como cuerpos de Cajal. Poco más tarde, Cajal también describió la presencia en núcleos de otros corpúsculos sin membrana [207], que más tarde recibieron el nombre de motas nucleares. Más recientemente se observó que tanto los cuerpos de Cajal como las motas nucleares están implicados en el ajuste, ya que se agrupan en ellos varias snRNPs [208,209].

A pesar de que los datos antedichos sobre orgánulos subnucleares desprovistos de membrana proporcionaban alguna información sobre la organización nuclear, el avance en el conocimiento sobre la organización de la cromatina en interfase, uno de los problemas que actualmente atraen más atención en el estudio de la regulación de la expresión génica en eucariotas, no ha sido posible hasta los últimos años. Y esto se debe en buena medida a las nuevas tecnologías, que ha hecho posible el progreso de los métodos de análisis de imagen, así como de procedimientos clásicos de la biología molecular. Todo este conjunto de mejoras, junto

¹³ En la figura 3B del artículo de Strickfaden ya comentado [49], se recoge una imagen de la disposición del cromosoma 1 humano en células HCT116 en interfase.

con las aportaciones de la informática y de otras disciplinas, como la física de la materia blanda, han hecho posible abrir nuevas perspectivas en el estudio de la organización y función de la cromatina, desde un ángulo inimaginable hace tan sólo una década. Tanta importancia tienen los aspectos metodológicos, que en el primer semestre del año en curso se han publicado tres excelentes revisiones sobre ellos [210–212]. El notorio afán de los biólogos moleculares y celulares por encontrar siglas o acrónimos fácilmente memorizables y, a veces, reproduciendo palabras usadas en la vida corriente [213], ha hecho que el catálogo de esos métodos resulte una auténtica sopa de letras.

Una técnica pionera en el análisis de la organización del genoma es la denominada Hi-C [214]. Los autores describen el fundamento del método de una forma sencilla: tras el entrecruzamiento con formaldehído, el DNA se digiere con una enzima de restricción que deje extremos 5' protuberantes. Estos extremos se rellenan, incluyendo un residuo biotinilado y los fragmentos romos resultantes se ligan en condiciones de dilución que favorezcan el ligamiento entre los fragmentos entrecruzados de DNA. Así, los productos del ligamiento contienen secuencias de DNA que estaban en proximidad en el núcleo. El cizallamiento de estas muestras, seguido de la recuperación de los fragmentos que contienen biotina y su secuenciación, permite obtener un catálogo de las secuencias de DNA que estaban en proximidad física en el núcleo. Así llegaron a la conclusión de que en el núcleo en interfase se pueden distinguir dos compartimentos que, arbitrariamente, denominaron como A y B. El compartimento A se correlaciona con la presencia de genes con alta tasa de expresión y con una estructura más accesible de la cromatina, como se demuestra por digestión con DNasa I, mientras que el compartimento B corresponde a la cromatina más compacta, que contiene genes reprimidos [214].

Por ejemplo, los avances en las tecnologías de imagen han permitido el seguimiento dinámico de las interacciones entre diferentes motivos moleculares de una célula

viva, previo su marcaje fluorescente, por microscopía o microcinematografía de alta resolución. También las mejoras tecnológicas han afectado a otro método microscópico de localización *in situ*. Concretamente, la técnica conocida desde hace tiempo para la localización microscópica de secuencias concretas de DNA, denominada FISH (*fluorescent in situ hybridisation*), hibridación *in situ* fluorescente, se ha perfeccionado para llegar a la llamada crio-FISH. La FISH clásica consiste en añadir una sonda formada por una secuencia específica de DNA, marcada con un fluorocromo a una preparación microscópica de un tejido. La sonda se une específicamente a la región de la preparación donde se encuentre un DNA con secuencia complementaria, lo cual permite la localización espacial de esa secuencia. Pero la sensibilidad de la detección está limitada por las deformaciones introducidas por la fijación del tejido y por la desnaturalización térmica que se requiere como paso previo a la hibridación. La utilización de inclusión en sacarosa del tejido o células, previa a la criopreservación y corte, así como procedimientos más suaves de desnaturalización, hacen de la técnica crio-FISH un método mucho más valioso para estudiar la localización *in situ* de las regiones cromosómicas deseadas [212].

Otro método digno de mención, que también utiliza la crioprotección, es el mapeo de la arquitectura del genoma, GAM (*genome architecture mapping*). En esencia, el método consiste en preparar múltiples secciones ultrafinas a través del núcleo y utilizar microdisección por láser de esas secciones. El DNA de las muestras se extrae, se amplifica y se secuencian. Los motivos que se localizan más próximos en el espacio, aunque no necesariamente en la secuencia, se encuentran con mayor frecuencia en una misma muestra. El análisis informático de todos los posibles pares de motivos entre una gran colección de muestras, permite determinar la proximidad en el espacio de los distintos motivos de la cromatina [215].

Otros métodos que se han diseñado recientemente son SPRITE (*split-pool recognition of interactions by tag extension*)

y ChIA-Drop (*chromatin-interaction analysis via droplet-based and barcode-linked sequencing*). SPRITE permite mapear interacciones en la cromatina y contactos DNA-RNA a nivel genómico. Para ello se entrecruza la cromatina y se fragmenta. Los fragmentos se distribuyen en múltiples alícuotas y en cada una de ellas se etiquetan las moléculas de DNA. Este proceso de mezcla, redistribución en alícuotas y etiquetado se repite varias veces y, finalmente, se secuencian las cadenas de etiquetas de cada fragmento. Esto permite agrupar los complejos que formaban parte de una estructura de orden superior de la cromatina y se pueden detectar los nodos que conectan regiones que pueden pertenecer a distintos cromosomas [216]. ChIA-Drop tiene cierta similitud con SPRITE, aunque se basa en la distribución de la muestra de cromatina tras su entrecruzamiento y fragmentación en una emulsión de microgotas, cada una de ellas con una etiqueta diferente, que se preparan en un dispositivo *ad hoc*. El paso final implica también la amplificación y secuenciación para identificar las secuencias con idénticas etiquetas que se asignan a la misma microgota de origen. Al comparar las secuencias leídas con la del genoma de referencia, se puede descubrir qué regiones del genoma se encontraban en proximidad espacial, con lo que se pueden inferir las interacciones que tienen lugar en la cromatina [217]. Y hay otras técnicas disponibles, que se han ido implementando en los últimos años. Por continuar con la “sopa de letras”, se pueden mencionar ChIA-PET, ChromEMT, DNA-PAINT, Hi-C, que se han detallado en la revisión de Cosma y Neguembor [210] y cuya descripción haría de este texto una prolija relación.

Bastan los detalles anteriores para comprender cómo las nuevas metodologías, basadas muchas veces en principios de otras ciencias, han sido decisivas para abordar el estudio de la organización tridimensional de la cromatina en el núcleo en interfase. Pero, como tendremos ocasión de ver seguidamente, la integración de la biología molecular y celular con la física no se ha limitado a los aspectos metodológicos, por importantes

que éstos sean, sino que ha aportado también un original enfoque a ese estudio. Se vuelven a hacer realidad las palabras de Astbury, que se ha mencionado antes como uno de los pioneros en la utilización de la expresión “biología molecular”:

«El término biología molecular (...) implica no tanto una técnica como un modo de aproximación; aproximación desde el punto de vista de las llamadas ciencias básicas, con la idea motriz de investigar lo que subyace a los fenómenos a gran escala de la Biología clásica, para encontrar su correspondiente planificación molecular» [80].

Ni que decir tiene que a la biología celular moderna pueden aplicarse también estas palabras de Astbury: el carácter integrador de la física proporciona a la biología una nueva y definitiva manera de aproximarse al mundo de los organismos vivos.

En el caso concreto del estudio de la organización tridimensional de la cromatina, como se ha apuntado anteriormente, la física de la materia blanda ha aportado importantes conceptos. Con las técnicas mencionadas anteriormente, se puede observar –superando los datos accesibles a través de la morfología microscópica– que en el núcleo existen múltiples condensados moleculares, orgánulos atípicos en el sentido de que no están delimitados por una membrana, de modo que pueden intercambiar sus componentes con mayor libertad que si lo estuvieran. En estos condensados se encuentran factores transcripcionales, cofactores y otros componentes implicados en el inicio de la transcripción regulada con una concentración local elevada [218]. El mantenimiento de estos condensados es posible gracias a un fenómeno basado en que una mezcla de moléculas puede separarse espontáneamente en dos fases, que difieren en su composición. Esta separación de fases se funda en la existencia de múltiples interacciones débiles y, en el caso que nos ocupa de los condensados nucleares, la viscoelasticidad del entorno controla también

su tamaño y dinámica [219]. Estos condensados formados por separación de fases poseen varios rasgos distintivos, entre los que cabe señalar su forma redondeada y su capacidad de fusionarse entre sí, así como la elevada movilidad de las moléculas que contienen dentro del orgánulo. Además, estas propiedades dependen de las características fisicoquímicas –temperatura, pH, etc.– del entorno [220]. Todo ello permite que estos condensados se sitúen selectivamente en torno al promotor de un gen y, gracias a la presencia de sus componentes, la transcripción pueda iniciarse. No obstante, siguen existiendo muchos interrogantes sobre el modo en que los condensados seleccionan el lugar concreto del genoma en que deben situarse, aunque se han propuesto algunas posibilidades [221].

Otra circunstancia a tener en cuenta es la formación de estructuras genómicas de orden superior que posibilitan los contactos entre potenciadores y promotores. Ya se ha mencionado cómo los elementos potenciadores se encuentran situados a veces a una distancia muy grande del promotor si se atiende a su posición en la secuencia. Pero con frecuencia se da una asociación física espacial gracias al establecimiento de interacciones entre diversos elementos de la secuencia del DNA. Lo más frecuente es la presencia de sitios de unión del factor CTCF en proximidad del potenciador y del promotor. Gracias a la ya aludida capacidad de dimerización de este factor, ambas regiones génicas se acercan en el espacio y la unión de una proteína, la cohesina, sella, por decirlo así, la unión. Pero la formación de bucles en la cromatina gracias a la acción de la cohesina no garantiza siempre la suficiente proximidad física del promotor y el potenciador, proximidad que puede lograrse por varios mecanismos de extrusión del bucle [222]. Se forma así un dominio topológicamente asociado (TAD, siglas de *topologically associating domain*), que, además, puede reclutar un condensado de factores

transcripcionales que faciliten la expresión del gen [218,221,222]. La microcinematografía en células vivas ha puesto de manifiesto la dinámica de estos bucles de cromatina. Por ejemplo, Gabriele *et al.* [223] han utilizado el TAD que contiene el gen *Fbn2* en células embrionarias de ratón y, por medio de técnicas de edición genómica, han marcado diferencialmente con fluorescencia cada uno de los dos sitios CTCF que hay a ambos lados del gen. Esto les ha permitido seguir el movimiento de esos sitios, o lo que es lo mismo, la dinámica del bucle¹⁴.

El desplazamiento de las diferentes regiones del genoma –a veces muy distantes en la secuencia– para la formación de TADs y para la separación de fases en un medio de elevadísima viscosidad, exige una gran plasticidad en la estructura de la cromatina que, a su vez, requiere la plasticidad de la estructura de los nucleosomas que, no olvidemos, siguen presentes a lo largo del DNA. Esta plasticidad se puede favorecer por fluctuaciones térmicas en la estructura nucleosomal, que ocurren en las condiciones fisicoquímicas del núcleo [224]. Pero también hay que tener en cuenta que la compatibilidad del modelo de placas cromosomales con la organización de la cromatina en interfase [47] (Figura) ha permitido a Daban concluir que la cromatina posee las propiedades intrínsecas de las estructuras de materia blanda [48].

Parece claro, y así se admite generalmente en nuestros días, que la asociación de TADs con condensados de factores transcripcionales permite una explicación de las interacciones entre todos los elementos que determinan la expresión génica, pero es necesario profundizar mucho más en la dinámica espacio-temporal de estos motivos de organización de la cromatina. El marcaje específico de diferentes motivos de la cromatina y el análisis por medio de microfotografía de lapso de tiempo (*time-lapse*) de alta resolución está resultando una aproximación

¹⁴ El artículo de Gabriele *et al.* [223] contiene, como material suplementario, 4 vídeos que permiten visualizar esos aspectos dinámicos.

prometedora para resolver este problema [225].

A lo largo de nuestro recorrido por la regulación de la expresión génica, hemos tenido a la epigenética como una inseparable compañera de viaje. Pero no se ha hecho ninguna mención a ella en estas consideraciones sobre la organización tridimensional de la cromatina en interfase. ¿Acaso nos habrá abandonado esta fiel compañera? En las líneas siguientes se comprobará que no ha sido así. De entrada, hay que considerar que, en algunos casos, la organización tridimensional de la cromatina en dominios concretos depende de la unión de proteínas, como la HP1, a la que ya se ha aludido. Y esta proteína que forma agrupaciones compactas, tipo heterocromatina, se recluta por H3K9me3 [226]. Pero en otras ocasiones, la relación entre modificaciones epigenéticas y estructura tridimensional de la cromatina ocurre en el sentido contrario: es la organización tridimensional la que permite la extensión de las marcas epigenéticas en regiones del genoma alejadas en la secuencia, pero próximas por formar parte de un mismo TAD. También se ha demostrado que la interacción entre diferentes nucleosomas, dirigida por las modificaciones epigenéticas en las colas N-terminales de sus histonas, puede condicionar su proximidad espacial [227].

Otra relación entre modificaciones epigenéticas y organización de la cromatina viene dada por el hecho que el compartimento A contiene marcas activadoras en sus histonas, mientras que en el B, abundan las marcas represivas [214]. El resultado era de esperar, dada la distribución de genes entre ambos compartimentos antes comentada. Pero, en la actualidad, se está prestando mucha atención a otras posibles interrelaciones entre el epigenoma y la organización tridimensional de la cromatina, incluyendo sus variaciones dinámicas. De momento, las investigaciones se están realizando por modelización biofísica y computacional

[227,228], una aproximación que se calificado como una herramienta poderosa para desarrollar un modelo coherente para proporcionar una visión importante en el campo de la estructura, compactación, plegamiento y cambios dinámicos de la cromatina [49], pero aún es pronto para poder describir resultados satisfactorios.

13. CONCLUSIÓN

Llegamos al final de nuestro recorrido por los mecanismos de regulación de la expresión génica. Un final, que viene marcado por el momento concreto en que se está narrando este viaje, que en modo alguno puede considerarse finalizado. «*No sé qué podrá parecerle yo al mundo, pero tengo para mí que no he sido sino un muchacho que juega a la orilla del mar, que se distrae de cuando en cuando al encontrar un guijarro más liso o una concha más bella que las habituales, mientras el gran océano de la verdad se extendía ante mí aún por descubrir*», decía Newton, poco antes de fallecer, a su amigo Andrew Ramsay [229]. Pienso que de estas palabras podría apropiarse cualquier investigador honrado, que sabe que lo que haya podido aportar al desarrollo de la ciencia es muy poco en comparación con lo que queda por descubrir. Pero eso no es un obstáculo para admirar esa *concha más bella*, ese aspecto de su investigación, que, por modesto que haya sido no deja de ser asombroso y admirable. Espero que quienes han tenido la paciencia de llegar hasta estas líneas hayan participado de ese asombro al contemplar la belleza de una compleja estructura o la admirable coordinación de los procesos de regulación. Esa sorpresa ante lo inesperado que, como comentan Shi y Evans [230], llevó al científico y filósofo Charles Sanders Peirce (1839-1914) a postularla como necesaria para facilitar –a través de la abducción¹⁵– la generación de nuevas hipótesis [231]. Esa sorpresa ante la capacidad que el ser humano tiene de comprender la

¹⁵ Se puede encontrar una explicación sobre el concepto de *abducción* y sobre su importancia

en la génesis de hipótesis en el artículo de Génova [233].

realidad natural y penetrar, siquiera sea parcialmente, en alguno de sus secretos. Ese asombro y sorpresa que, en la “Lección de Anatomía” de Rembrandt se adivina en los rostros de los estudiantes ante la disección que realiza el Dr. Nicolaes Tulp. Ese asombro, esa curiosidad, ese deseo de aprender, que han permitido conocer los complejos mecanismos explorados esta tarde. Movidos por una idéntica curiosidad y por su afán de descubrir la verdad, los investigadores han llegado a conocer múltiples aspectos de la organización del material genético; de la reestructuración de la cromatina que se precisa para que los genes se expresen. Han llegado a vislumbrar los complejos mecanismos que nuestras células emplean para coordinar la información genética que poseen.

Es cierto, que falta mucho por descubrir y que siempre seguirá faltando. Pero no deja por eso de ser admirable que la inteligencia humana pueda entrar en esos increíbles procesos que hemos estado explorando esta tarde y que, en muchos casos, esa exploración haya conseguido adquirir un elevado grado de certeza. Un deseo de certeza que habría que recuperar, pues, citando a Hannah Arendt, «*Lo que se perdió en la Época Moderna no fue la aptitud por la verdad, la realidad, la fe, ni la concomitante e inevitable aceptación del testimonio de los sentidos y de la razón, sino la certeza que anteriormente iba con ellas*» [232]. Aunque los métodos de las ciencias experimentales –esos sofisticados métodos que también hemos tenido ocasión de repasar– no pueden penetrar en todos los ámbitos de la vida humana, es tiempo de que confiemos en el poder de nuestra inteligencia para alcanzar la verdad, esa Verdad con mayúscula que Antonio Machado animaba a buscar.

Ojalá los datos expuestos en las páginas precedentes sirvan para que todos recuperemos esa confianza, y quizá, para preguntarnos si, junto con el azar que, a lo largo

de la evolución, ha jugado un papel importante en la adquisición de mecanismos tan complejos como los contemplados, hay un sentido, un designio. Es cierto que el método científico no puede dar respuesta afirmativa – como pretenden los partidarios del “diseño inteligente” –, ni tampoco negativa a esa pregunta, que, aunque trascienda el ámbito de lo experimental, es lícito plantear. Personalmente, me limito a compartir las palabras de John Henry Newman: «*Creo en un designio, porque creo en Dios; no creo en Dios porque vea un designio*»¹⁶.

BIBLIOGRAFÍA

1. Warwick, K. Homo Technologicus: Threat or Opportunity? *Philosophies* **2016**, *1*, 199–208.
2. Huxley, J. Transhumanism. In *New Bottles for New Wine*; Chatto and Windus: London, 1957; pp. 13–17.
3. Watson, J.D.; Crick, F.H. Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
4. Falk, R. The Gene: A Concept in Tension. In *The Concept of the Gene in Development and Evolution*; Beurton, P., Falk, R. and Rheinberger, H.-J., Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, U. K., 2000; pp. 317–348.
5. Griffiths, P.E.; Stotz, K. Gene. In *The Cambridge Companion to the Philosophy of Biology*; Hull, D., Ruse, M., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, U. K., 2007; pp. 85–102.
6. Crick, F.H. On Protein Synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138–163.
7. Brachet, J. Recherches Sur La Synthèse de l'acide Thymonucleique Pendant Le Developpement de l'oeuf d'Oursin. *Archives de Biologie* **1933**, *44*, 519–576.
8. Piovesan, A.; Pelleri, M.C.; Antonaros, F.; Strippoli, P.; Caracausi, M.; Vitale, L. On the Length, Weight and GC Content of the Human Genome. *BMC Research Notes* **2019**, *12*, 106.
9. D'Erchia, A.M.; Atlante, A.; Gadaleta, G.; Pavesi, G.; Chiara, M.; De Virgilio, C.; Manzari, C.; Mastropasqua, F.; Prazzoli, G.M.; Picardi, E.; et al. Tissue-Specific

¹⁶ La cita original, *I believe in design because I believe in God; not in God because I see design* pertenece a una carta enviada a William Robert

Brownlow el 13 de abril de 1870 y recogida en el volumen 27 de la recopilación de cartas y diarios de Newman [234].

- MtDNA Abundance from Exome Data and Its Correlation with Mitochondrial Transcription, Mass and Respiratory Activity. *Mitochondrion* **2015**, *20*, 13–21.
10. Annunziato, A. DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education* **2008**, *1*, 26.
 11. Kossel, A. Histones. *Z. Physiol. Chem.* **1884**, *8*, 511–515.
 12. Schultz, J. The Evidence of the Nucleoprotein Nature of the Gene. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1941**, *9*, 55–65.
 13. Stedman, E.; Stedman, E. Cell Specificity of Histones. *Nature* **1950**, *166*, 780–781.
 14. Johns, E.W.; Butler, J.A. Further Fractionations of Histones from Calf Thymus. *Biochem. J.* **1962**, *82*, 15–18.
 15. Johns, E.W. The Isolation and Purification of Histones. *Methods Cell Biol.* **1977**, *16*, 183–203.
 16. Fambrough, D.M.; Bonner, J. Limited Molecular Heterogeneity of Plant Histones. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *175*, 113–122.
 17. DeLange, R.J.; Fambrough, D.M.; Smith, E.L.; Bonner, J. Calf and Pea Histone IV. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 5669–5679.
 18. Pardon, J.F.; Wilkins, M.H.; Richards, B.M. Super-Helical Model for Nucleo-histone. *Nature* **1967**, *215*, 508–509.
 19. Carrel, A. *La Incógnita Del Hombre*; Editorial Iberia S. A.: Barcelona, 1953.
 20. Curie, E. *La Vida Heroica de María Curie*; Espasa Calpe: Madrid, 1966.
 21. Hewish, D.R.; Burgoyne, L.A. Chromatin Sub-Structure. The Digestion of Chromatin DNA at Regularly Spaced Sites by a Nuclear Deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *52*, 504–510.
 22. van Holde, K.E. *Chromatin*; Springer New York: New York, 1989; ISBN 978-1-4612-8123-8.
 23. Olins, A.L.; Olins, D.E. Spheroid Chromatin Units (ν Bodies). *Science* **1974**, *183*, 330–332.
 24. Finch, J.T.; Lutter, L.C.; Rhodes, D.; Brown, R.S.; Rushton, B.; Levitt, M.; Klug, A. Structure of Nucleosome Core Particles of Chromatin. *Nature* **1977**, *269*, 29–36.
 25. Richmond, T.J.; Finch, J.T.; Rushton, B.; Rhodes, D.; Klug, A. Structure of the Nucleosome Core Particle at 7 Å Resolution. *Nature* **1984**, *311*, 532–537.
 26. Arents, G.; Burlingame, R.W.; Wang, B.C.; Love, W.E.; Moudrianakis, E.N. The Nucleosomal Core Histone Octamer at 3.1 Å Resolution: A Tripartite Protein Assembly and a Left-Handed Superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 10148–10152.
 27. Bersanelli, M.; Gargantini, M. *Solo El Asombro Conoce*; Ediciones Encuentro: Madrid, 2006.
 28. Arents, G.; Moudrianakis, E.N. Topography of the Histone Octamer Surface: Repeating Structural Motifs Utilized in the Docking of Nucleosomal DNA. *PNAS* **1993**, *90*, 10489–10493.
 29. Whitrow, G.J. *Einstein: El Hombre y Su Obra*; Siglo XXI: México, 1969.
 30. Bulgakov, M.A. *Master and Margarita*; Penguin Books, 1997.
 31. Luger, K.; Mäder, A.W.; Richmond, R.K.; Sargent, D.F.; Richmond, T.J. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature* **1997**, *389*, 251–260.
 32. Davey, C.A.; Sargent, D.F.; Luger, K.; Maeder, A.W.; Richmond, T.J. Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 1097–1113.
 33. Richmond, T.J.; Davey, C.A. The Structure of DNA in the Nucleosome Core. *Nature* **2003**, *423*, 145–150.
 34. Lorenz, K. *Hablaba Con Las Bestias, Los Peces y Los Pájaros*; Ed. Labor: Barcelona, 1982;
 35. Kurumizaka, H.; Wolffe, A.P. Sin Mutations of Histone H3: Influence on Nucleosome Core Structure and Function. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 6953–6969.
 36. Daban, J.R. Physical Constraints in the Condensation of Eukaryotic Chromosomes. Local Concentration of DNA versus Linear Packing Ratio in Higher Order Chromatin Structures. *Biochemistry* **2000**, *39*, 3861–3866.
 37. Pienta, K.J.; Coffey, D.S. A Structural Analysis of the Role of the Nuclear Matrix and DNA Loops in the Organization of the Nucleus and Chromosome. *J. Cell Sci. Suppl.* **1984**, *1*, 123–135.
 38. Kornberg, R. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science* **1974**, *184*, 868–871.
 39. Finch, J.T.; Klug, A. Solenoidal Model for Superstructure in Chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 1897–1901.
 40. Castillo, J.; López-Rodas, G.; Franco, L. Histone Post-Translational Modifications and Nucleosome Organisation in Transcriptional Regulation: Some Open Questions. *Adv. Exper. Med. Biol.* **2017**, *966*, 65–92.
 41. Maeshima, K.; Imai, R.; Tamura, S.; Nozaki, T. Chromatin as Dynamic 10-Nm Fibers. *Chromosoma* **2014**, *123*, 225–237.

42. Eltsov, M.; Maclellan, K.M.; Maeshima, K.; Frangakis, A.S.; Dubochet, J. Analysis of Cryo-Electron Microscopy Images Does Not Support the Existence of 30-Nm Chromatin Fibers in Mitotic Chromosomes in Situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 19732–19737.
43. Maeshima, K.; Hihara, S.; Eltsov, M. Chromatin Structure: Does the 30-nm Fibre Exist in Vivo? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 291–297.
44. Gállego, I.; Castro-Hartmann, P.; Caravaca, J.M.; Caño, S.; Daban, J.R. Dense Chromatin Plates in Metaphase Chromosomes. *Eur. Biophys. J.* **2009**, *38*, 503–522.
45. Daban, J.R. Stacked Thin Layers of Metaphase Chromatin Explain the Geometry of Chromosome Rearrangements and Banding. *Scientific Reports* **2015**, *5*, 14891.
46. Chicano, A.; Crosas, E.; Otón, J.; Melero, R.; Engel, B.D.; Daban, J. Frozen-hydrated Chromatin from Metaphase Chromosomes Has an Interdigitated Multilayer Structure. *The EMBO Journal* **2019**.
47. Chicano, A.; Daban, J.R. Chromatin Plates in the Interphase Nucleus. *FEBS Letters* **2019**, *593*, 810–819.
48. Daban, J.R. Soft-Matter Properties of Multilayer Chromosomes. *Physical Biology* **2021**, *18*, 053001.
49. Strickfaden, H. Reflections on the Organization and the Physical State of Chromatin in Eukaryotic Cells. *Genome* **2021**, *64*, 311–325.
50. de Giorgi, E. Riflessioni Su Matematica e Sapienza. *Quaderni dell'Accademia Pontaniana* **1996**, *18*.
51. Wheeler, J.A. *A Journey into Gravity and Spacetime*; Scientific American Library, W. H. Freeman & Co: New York, 1990;
52. Almer, A.; Hörz, W. Nuclease Hypersensitive Regions with Adjacent Positioned Nucleosomes Mark the Gene Boundaries of the PHO5/PHO3 Locus in Yeast. *EMBO J* **1986**, *5*, 2681–2687.
53. Almer, A.; Rudolph, H.; Hinnen, A. Removal of Positioned Nucleosomes from the Yeast PHO5 Promoter upon PHO5 Induction Releases Additional Upstream Activating DNA Elements HS1. *EMBO J.* **1986**, *5*, 2689–2696, doi:10.1002/j.1460-2075.1986.tb04552.x.
54. Pérez-Ortín, J.E.; Estruch, F.; Matallana, E.; Franco, L. DNase I Sensitivity of the Chromatin Structure of the Yeast SUC2 Gene. *Mol. Gen. Genet.* **1986**, *205*, 422–427.
55. Pérez-Ortín, J.E.; Estruch, F.; Matallana, E.; Franco, L. Fine Analysis of the Chromatin Structure of the Yeast SUC2 Gene and of Its Changes upon Derepression. Comparison between the Chromosomal and Plasmid-Inserted Genes. *Nucleic Acids Research* **1987**, *15*, 6937–6956.
56. Matallana, E.; Franco, L.; Pérez-Ortín, J.E. Chromatin Structure of the Yeast SUC2 Promoter in Regulatory Mutants. *Mol. Gen. Genet.* **1992**, *231*, 395–400.
57. Krajewski, W.A.; Panin, V.M.; Razin, S. V. Acetylation of Core Histones Causes the Unfolding of 30 Nm Chromatin Fiber: Analysis by Agarose Gel Electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *196*, 455–460.
58. Garcia-Ramirez, M.; Rocchini, C.; Ausio, J. Modulation of Chromatin Folding by Histone Acetylation. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 17923–17928.
59. Loidl, P. Towards an Understanding of the Biological Function of Histone Acetylation. *FEBS letters* **1988**, *227*, 91–95.
60. Sendra, R.; Rodrigo, I.; Salvador, M.L.; Franco, L. Characterization of Pea Histone Deacetylases. *Plant Mol. Biol.* **1988**, *11*, 857–866.
61. López-Rodas, G.; Tordera, V.; Sánchez del Pino, M.M.; Franco, L. Yeast Contains Multiple Forms of Histone Acetyltransferase". *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19028–19033.
62. López-Rodas, G.; Tordera, V.; Sánchez del Pino, M.M.; Franco, L. Subcellular Localization and Nucleosome Specificity of Yeast Histone Acetyltransferases. *Biochemistry* **1991**, *30*, 3728–3732.
63. López-Rodas, G.; Georgieva, E.I.; Sendra, R.; Loidl, P. Histone Acetylation in Zea Mays. I. Activities of Histone Acetyltransferases and Histone Deacetylases. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18745–18750.
64. Georgieva, E.I.; López-Rodas, G.; Sendra, R.; Gröbner, P.; Loidl, P. Histone Acetylation in Zea Mays II. Biological Significance of Post-Translational Histone Acetylation during Embryo Germination. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18751–1876.
65. Mingarro, I.; Sendra, R.; Salvador, M.L.; Franco, L. Site Specificity of Pea Histone Acetyltransferase B in Vitro. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13248–13252.
66. Kwon, H.; Imbalzano, A.N.; Khavari, P.A.; Kingston, R.E.; Green, M.R. Nucleosome Disruption and Enhancement of Activator Binding by a Human SW1/SNF Complex. *Nature* **1994**, *370*, 477–481.
67. Turner, B.M. Histone Acetylation and an Epigenetic Code. *BioEssays* **2000**, *22*, 836–

- 845.
68. Strahl, B.D.; Allis, C.D. The Language of Covalent Histone Modifications. *Nature* **2000**, *403*, 41–45.
 69. Rice, J.C.; Allis, C.D. Lysine Methylation and Acetylation of Histones. *Current Opinion in Cell Biology* **2001**, *13*, 263–273.
 70. Isbel, L.; Grand, R.S.; Schübeler, D. Generating Specificity in Genome Regulation through Transcription Factor Sensitivity to Chromatin. *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 728–740.
 71. Narlikar, G.J.; Fan, H.; Kingston, R.E. Cooperation between Complexes That Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell* **2002**, *108*, 475–487.
 72. Latasa, M.U.; Boukaba, A.; García-Trevijano, E.R.; Torres, L.; Rodríguez, J.L.; Caballería, J.; Lu, S.C.; López-Rodas, G.; Franco, L.; Mato, J.M.; et al. Hepatocyte Growth Factor Induces MAT2A Expression and Histone Acetylation in Rat Hepatocytes: Role in Liver Regeneration. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1248–1250.
 73. Becker, P.B.; Hörz, W. ATP-Dependent Nucleosome Remodeling. *Annual Review of Biochemistry* **2002**, *71*, 247–273.
 74. Petesch, S.J.; Lis, J.T. Overcoming the Nucleosome Barrier during Transcript Elongation. *Trends Genet.* **2012**, *28*, 285–294.
 75. Bonaldi, T.; Längst, G.; Strohner, R.; Becker, P.B.; Bianchi, M.E. The DNA Chaperone HMGB1 Facilitates ACF/CHRAC-Dependent Nucleosome Sliding. *EMBO J.* **2002**, *21*, 6865–6873.
 76. Guyon, J.R.; Narlikar, G.J.; Sullivan, E.K.; Kingston, R.E. Stability of a Human SWI-SNF Remodeled Nucleosomal Array. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 1132–1144.
 77. Jaskelioff, M.; M. Gavin, I.; Peterson, C.L.; Logie, C. SWI-SNF-Mediated Nucleosome Remodeling: Role of Histone Octamer Mobility in the Persistence of the Remodeled State. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 3058–3068.
 78. Fischer, E.P. *Einstein y Cia. La Ciencia Moderna a Través de Sus Protagonistas*; Alianza Editorial: Madrid, 2000.
 79. Franco, L. *Estudiar Bioquímica*; Universidad de Valencia. Colección Cultura Universitaria Popular: Valencia, 1990;
 80. Astbury, W.T. X-Ray Studies of the Structure of Compounds of Biological Interest. *Annu. Rev. Biochem.* **1939**, *8*, 113–133.
 81. Knapek, E.; Dubochet, J. Beam Damage to Organic Material Is Considerably Reduced in Cryo-Electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* **1980**, *141*, 147–161.
 82. Editorial. Method of the Year 2015. *Nature Methods* **2016**, *13*, 1.
 83. Liu, X.; Li, M.; Xia, X.; Li, X.; Chen, Z. Mechanism of Chromatin Remodelling Revealed by the Snf2-Nucleosome Structure. *Nature* **2017**, *544*, 440–445.
 84. Li, M.; Xia, X.; Tian, Y.; Jia, Q.; Liu, X.; Lu, Y.; Li, M.; Li, X.; Chen, Z. Mechanism of DNA Translocation Underlying Chromatin Remodelling by Snf2. *Nature* **2019**, *567*, 409–413.
 85. Ponomarev, M.A.; Timofeev, V.P.; Levitsky, D.I. The Difference between ADP-Beryllium Fluoride and ADP-Aluminium Fluoride Complexes of the Spin-Labeled Myosin Subfragment 1. *FEBS Letters* **1995**, *371*, 261–263.
 86. Ye, Y.; Wu, H.; Chen, K.; Clapier, C.R.; Verma, N.; Zhang, W.; Deng, H.; Cairns, B.R.; Gao, N.; Chen, Z. Structure of the RSC Complex Bound to the Nucleosome. *Science* **2019**, *366*, 838–843.
 87. Wagner, F.R.; Dienemann, C.; Wang, H.; Stützer, A.; Tegunov, D.; Urlaub, H.; Cramer, P. Structure of SWI/SNF Chromatin Remodeller RSC Bound to a Nucleosome. *Nature* **2020**, *579*, 448–451.
 88. Clapier, C.R.; Kasten, M.M.; Parnell, T.J.; Sirinakis, G.; Zhang, Y.; Cairns, B.R.; Clapier, C.R.; Kasten, M.M.; Parnell, T.J.; Viswanathan, R.; et al. Regulation of DNA Translocation Efficiency within the Chromatin Remodeler RSC/Sth1 Potentiates Nucleosome Sliding and Ejection. *Mol. Cell* **2016**, *62*, 453–461.
 89. Lorch, Y.; Maier-Davis, B.; Kornberg, R.D. Role of DNA Sequence in Chromatin Remodeling and the Formation of Nucleosome-Free Regions. *Genes Develop.* **2014**, *28*, 2492–2497.
 90. Wang, C.; Guo, Z.; Zhan, X.; Yang, F.; Wu, M.; Zhang, X. Structure of the Yeast Swi/Snf Complex in a Nucleosome Free State. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3398.
 91. Han, Y.; Reyes, A.A.; Malik, S.; He, Y. Cryo-EM Structure of SWI/SNF Complex Bound to a Nucleosome. *Nature* **2020**, *579*, 452–455.
 92. He, S.; Wu, Z.; Tian, Y.; Yu, Z.; Yu, J.; Wang, X.; Li, J.; Liu, B.; Xu, Y. Structure of Nucleosome-Bound Human BAF Complex. *Science* **2020**, *367*, 875–881.
 93. Aguilera, P.; López-Contreras, A.J. ATRX, a Guardian of Chromatin. *Trend Gener.* **2023**, *39*, 505–519.
 94. Pang, Y.; Chen, X.; Ji, T.; Cheng, M.; Wang, R.; Zhang, C.; Liu, M.; Zhang, J.; Zhong, C. The Chromatin Remodeler ATRX: Role and Mechanism in Biology

- and Cancer. *Cancers* **2023**, *15*, 2228.
95. Spakman, D.; Clement, T.V.M.; Biebricher, A.S.; King, G.A.; Singh, M.I.; Hickson, I.D.; Peterman, E.J.G.; Wuite, G.J.L. PICHA Acts as a Force-Dependent Nucleosome Remodeler. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 7277.
 96. Chen, K.; Yuan, J.; Sia, Y.; Chen, Z. Mechanism of Action of the SWI/SNF Family Complexes. *Nucleus* **2023**, *14*, 2165604.
 97. Ayala, R.; Willhoft, O.; Aramayo, R.J.; Wilkinson, M.; Elizabeth, A.; Ocloo, L.; Wigley, D.B.; Zhang, X. Structure and Regulation of the Human INO80-Nucleosome Complex. *Nature* **2018**, *556*, 391–395.
 98. Eustermann, S.; Schall, K.; Kostrewa, D.; Lakomek, K.; Strauss, M.; Moldt, M.; Hopfner, K. Structural Basis for ATP-Dependent Chromatin Remodelling by the INO80 Complex. *Nature* **2018**, 386–390.
 99. Aramayo, R.J.; Willhoft, O.; Ayala, R.; Bythell-Douglas, R.; Wigley, D.B.; Zhang, X. Cryo-EM Structures of the Human INO80 Chromatin-Remodeling Complex. *Nat. Str. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 37–44.
 100. Willhoft, O.; Ghoneim, M.; Lin, C.L.; Chua, E.Y.D.; Wilkinson, M.; Chaban, Y.; Ayala, R.; McCormack, E.A.; Ocloo, L.; Rueda, D.S.; et al. Structure and Dynamics of the Yeast SWR1-Nucleosome Complex. *Science* **2018**, *362*, eaat7716.
 101. Willhoft, O.; Wigley, D.B. INO80 and SWR1 Complexes: The Non-Identical Twins of Chromatin Remodelling. *Curr. Opin. Str. Biol.* **2020**, *61*, 50–58.
 102. Holstege, F.C.P.; Jennings, E.G.; Wyrick, J.J.; Lee, T.I.; Hengartner, C.J.; Green, M.R.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; Young, R.A. Dissecting the Regulatory Circuitry of a Eukaryotic Genome. *Cell* **1998**, *95*, 717–728.
 103. Sudarsanam, P.; Iyer, V.R.; Brown, P.O.; Winston, F. Whole-Genome Expression Analysis of Snf/Swi Mutants of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 3364–3369.
 104. Reid, X.J.; Low, J.K.K.; Mackay, J.P. A NuRD for All Seasons. *Trends Biochem. Sci.* **2023**, *48*, 11–25.
 105. Bornelöv, S.; Reynolds, N.; Xenophontos, M.; Gharbi, S.; Johnstone, E.; Floyd, R.; Ralser, M.; Signolet, J.; Loos, R.; Dietmann, S.; et al. The Nucleosome Remodeling and Deacetylation Complex Modulates Chromatin Structure at Sites of Active Transcription to Fine-Tune Gene Expression. *Molecular Cell* **2018**, *71*, 56–72.
 106. Sher, F.; Hossain, M.; Seruggia, D.; Schoonenberg, V.A.C.; Yao, Q.; Cifani, P.; Dassama, L.M.K.; Cole, M.A.; Ren, C.; Vinjamur, D.S.; et al. Rational Targeting of a NuRD Subcomplex Guided by Comprehensive in Situ Mutagenesis. *Nature Genetics* **2019**, *51*, 1149–1159.
 107. Low, J.K.K.; Silva, A.P.G.; Sharifi Tabar, M.; Torrado, M.; Webb, S.R.; Parker, B.L.; Sana, M.; Smits, C.; Schmidberger, J.W.; Brillault, L.; et al. The Nucleosome Remodeling and Deacetylase Complex Has an Asymmetric, Dynamic, and Modular Architecture. *Cell Reports* **2020**, *33*, 108450.
 108. Farnung, L.; Ochmann, M.; Cramer, P. Nucleosome-CHD4 Chromatin Remodeler Structure Maps Human Disease Mutations. *eLife* **2020**, *9*, 56178.
 109. Arvindekar, S.; Jackman, M.J.; Low, J.K.K.; Landsberg, M.J.; Mackay, J.P.; Viswanath, S. Molecular Architecture of Nucleosome Remodeling and Deacetylase Sub-Complexes by Integrative Structure Determination. *Protein Science* **2022**, *31*, e4387.
 110. Zhou, C.Y.; Johnson, S.L.; Gamarra, N.I.; Narlikar, G.J. Mechanisms of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Motors. *Annu. Rev. Biophys.* **2016**, *45*, 153–181.
 111. Johnson, S.L.; Narlikar, G.J. ATP Hydrolysis Coordinates the Activities of Two Motors in a Dimeric Chromatin Remodeling Enzyme. *J. Mol. Biol.* **2022**, *434*, 167653.
 112. Salma, M.; Andrieu-Soler, C.; Deleuze, V.; Soler, E. High-Throughput Methods for the Analysis of Transcription Factors and Chromatin Modifications: Low Input, Single Cell and Spatial Genomic Technologies. *Blood Cells Mol. Dis.* **2023**, *101*, 102745.
 113. Wang, M.; Li, Q.; Liu, L. Factors and Methods for the Detection of Gene Expression Regulation. *Biomolecules* **2023**, *13*, 304.
 114. “ENCODE Project Consortium” An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome. *Nature* **2012**, *489*, 59–74.
 115. Adams, D.; Altucci, L.; Antonarakis, S.E.; Ballesteros, J.; Beck, S.; Bird, A.; Bock, C.; Boehm, B.; Campo, E.; Caricasole, A.; et al. BLUEPRINT to Decode the Epigenetic Signature Written in Blood. *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 224–226.
 116. Lambert, S.A.; Jolma, A.; Campitelli, L.F.; Das, P.K.; Yin, Y.; Albu, M.; Chen, X.; Taipale, J.; Hughes, T.R.; Weirauch, M.T. The Human Transcription Factors. *Cell* **2018**, *172*, 650–665.

117. Riffo-Campos, Á.L.; Castillo, J.; Tur, G.; González-Figueroa, P.; Georgieva, E.I.; Rodríguez, J.L.; López-Rodas, G.; Rodrigo, M.I.; Franco, L. Nucleosome-Specific, Time-Dependent Changes in Histone Modifications during Activation of the Early Growth Response 1 (Egr1) Gene. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290*, 197–208.
118. Nishimura, M.; Arimura, Y.; Nozawa, K.; Kurumizaka, H. Linker DNA and Histone Contributions in Nucleosome Binding by P53. *J. Biochem.* **2020**, *168*, 669–675.
119. Rao, S.; Chiu, T.P.; Kribelbauer, J.F.; Mann, R.S.; Bussemaker, H.J.; Rohs, R. Systematic Prediction of DNA Shape Changes Due to CpG Methylation Explains Epigenetic Effects on Protein-DNA Binding. *Epigenetics and Chromatin* **2018**, *11*, 6.
120. Perlmann, T.; Wrangé, O. Specific Glucocorticoid Receptor Binding to DNA Reconstituted in a Nucleosome. *EMBO J* **1988**, *7*, 3073–3079.
121. Shakespeare, W. *Hamlet*; Penguin Classics, 2015;
122. Cirillo L.A., L.F.R.C.I.F.D.J.M.Z.K.S.; Cirillo, L.A.; Lin, F.R.; Cuesta, I.; Friedman, D.; Jarnik, M.; Zaret, K.S. Opening of Compacted Chromatin by Early Developmental Transcription Factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 279–289.
123. Luzete-Monteiro, E.; Zaret, K.S. Structures and Consequences of Pioneer Factor Binding to Nucleosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2022**, 102425.
124. Slattery, M.; Zhou, T.; Yang, L.; Dantas Machado, A.C.; Gordân, R.; Rohs, R. Absence of a Simple Code: How Transcription Factors Read the Genome. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 381–399.
125. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
126. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872.
127. Michael, A.K.; Grand, R.S.; Isbel, L.; Cavadini, S.; Kozicka, Z.; Kempf, G.; Bunker, R.D.; Schenk, A.D.; Graff-Meyer, A.; Pathare, G.R.; et al. Mechanisms of OCT4-SOX2 Motif Readout on Nucleosomes. *Science* **2020**, *368*, 1460–1465.
128. Sinha, K.K.; Bilokapic, S.; Du, Y.; Malik, D.; Halic, M. Histone Modifications Regulate Pioneer Transcription Factor Cooperativity. *Nature* **2023**, *619*, 378–384.
129. Fu, Y.; Sinha, M.; Peterson, C.L.; Weng, Z. The Insulator Binding Protein CTCF Positions 20 Nucleosomes around Its Binding Sites across the Human Genome. *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000138.
130. Wiechens, N.; Singh, V.; Gkikopoulos, T.; Schofield, P.; Rocha, S.; Owen-Hughes, T. The Chromatin Remodelling Enzymes SNF2H and SNF2L Position Nucleosomes Adjacent to CTCF and Other Transcription Factors. *PLoS Genetics* **2016**, *12*, e1005940.
131. Păun, O.; Tan, Y.X.; Patel, H.; Strohbuecker, S.; Ghanate, A.; Cobolli-Gigli, C.; Sopena, M.L.; Gerontogianni, L.; Goldstone, R.; Ang, S.-L.; et al. Pioneer Factor ASCL1 Cooperates with the MSWI/SNF Complex at Distal Regulatory Elements to Regulate Human Neural Differentiation. *Genes & Develop.* **2023**, 218–242.
132. Hassan, A.H.; Prochasson, P.; Neely, K.E.; Galasinski, S.C.; Chandy, M.; Carozza, M.J.; Workman, J.L. Function and Selectivity of Bromodomains in Anchoring Chromatin-Modifying Complexes to Promoter Nucleosomes. *Cell* **2002**, *111*, 369–379.
133. Clapier, C.R.; Cairns, B.R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annual review of biochemistry* **2009**, *78*, 273–304, doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.
134. Williams, S.K.; Tyler, J.K. Transcriptional Regulation by Chromatin Disassembly and Reassembly. *Current Opinion in Genetics and Development* **2007**, *17*, 88–93.
135. Pavri, R.; Zhu, B.; Li, G.; Trojer, P.; Mandal, S.; Shilatifard, A.; Reinberg, D. Histone H2B Monoubiquitination Functions Cooperatively with FACT to Regulate Elongation by RNA Polymerase II. *Cell* **2006**, *125*, 703–717.
136. Piro, A.S.; Mayekar, M.K.; Warner, M.H.; Davis, C.P.; Arndt, K.M. Small Region of Rtf1 Protein Can Substitute for Complete Paf1 Complex in Facilitating Global Histone H2B Ubiquitylation in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 10837–10842.
137. Cho, H.; Orphanides, G.; Sun, X.; Yang, X.J.; Ogryzko, V.; Lees, E.; Nakatani, Y.; Reinberg, D. A Human RNA Polymerase II Complex Containing Factors That Modify Chromatin Structure. *Mol. Cell Biol.* **1998**,

- 28, 5355–5363.
138. Li, B.; Howe, L.A.; Anderson, S.; Yates, J.R.; Workman, J.L. The Set2 Histone Methyltransferase Functions through the Phosphorylated Carboxyl-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8897–8903.
 139. Swygert, S.G.; Peterson, C.L. Chromatin Dynamics: Interplay between Remodeling Enzymes and Histone Modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1839*, 728–736.
 140. Chan, J.; Kumar, A.; Kono, H. RNAPII Driven Post-Translational Modifications of Nucleosomal Histones. *Trends Genet.* **2022**, *38*, 1076–1095.
 141. Hsu, P.L.; Shi, H.; Leonen, C.; Kang, J.; Chatterjee, C.; Zheng, N. Structural Basis of H2B Ubiquitination-Dependent H3K4 Methylation by COMPASS. *Molecular Cell* **2019**, *76*, 712–723.
 142. Fetian, T.; McShane, B.M.; Horan, N.L.; Shodja, D.N.; True, J.D.; Mosley, A.L.; Arndt, K.M. Paf1 Complex Subunit Rtf1 Stimulates H2B Ubiquitylation by Interacting with the Highly Conserved N-Terminal Helix of Rad6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2023**, *120*, e2220041120.
 143. Kujirai, T.; Ehara, H.; Sekine, S.I.; Kurumizaka, H. Structural Transition of the Nucleosome during Transcription Elongation. *Cells* **2023**, *12*, 1388.
 144. Liu, Y.; Zhou, K.; Zhang, N.; Wei, H.; Tan, Y.Z.; Zhang, Z.; Carragher, B.; Potter, C.S.; D’Arcy, S.; Luger, K. FACT Caught in the Act of Manipulating the Nucleosome. *Nature* **2020**, *577*, 426–431.
 145. Nagae, F.; Takada, S.; Terakawa, T. Histone Chaperone Nap1 Dismantles an H2A/H2B Dimer from a Partially Unwrapped Nucleosome. *J. Mol. Biol.* **2023**.
 146. Kujirai, T.; Ehara, H.; Fujino, Y.; Shirouzu, M.; Sekine, S. ichi; Kurumizaka, H. Structural Basis of the Nucleosome Transition during RNA Polymerase II Passage. *Science* **2018**, *362*, 595–598.
 147. Kulaeva, O.I.; Hsieh, F.-K.; Chang, H.-W.; Luse, D.S.; Studitsky, V.M. Mechanism of Transcription through a Nucleosome by RNA Polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1829*, 76–83.
 148. Huynh, M.T.; Sengupta, B.; Krajewski, W.A.; Lee, T.H. Effects of Histone H2B Ubiquitylations and H3K79me3 on Transcription Elongation. *ACS Chem-Biol.* **2023**, *18*, 537–548.
 149. LeRoy, G.; Oksuz, O.; Descostes, N.; Aoi, Y.; Ganai, R.A.; Kara, H.O.; Yu, J.R.; Lee, C.H.; Stafford, J.; Shilatifard, A.; et al. LEDGF and HDGF2 Relieve the Nucleosome-Induced Barrier to Transcription in Differentiated Cells. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaay3068.
 150. Danko, C.G.; Hah, N.; Luo, X.; Martins, A.L.; Core, L.; Lis, J.T.; Siepel, A.; Kraus, W.L. Signaling Pathways Differentially Affect RNA Polymerase II Initiation, Pausing, and Elongation Rate in Cells. *Molecular Cell* **2013**, *50*, 212–222.
 151. Marcello, A. RNA Polymerase II Transcription on the Fast Lane. *Transcription* **2012**, *3*, 29–34.
 152. Shermer, M. Unweaving the Heart. *Sci. Amer.* **2005**, *293*, 36.
 153. Keats, J. *Lamia*; J. B. Lippincott Company: Philadelphia, 1888.
 154. Fernández-Rañada, A. *Los Muchos Rostros de La Ciencia*; 2^a ed.; Ed. Nobel, 2015.
 155. Head, T. *Conversations with Carl Sagan*; University Press of Mississippi, 2006; ISBN 978-1578067367.
 156. Descartes, R. *Les Passions de l’âme*; Henry Le Gras: Paris, 1649;
 157. Juan Pablo II, S. Carta Encíclica Fides et Ratio. *AAS* **1999**, *91*, 60.
 158. Rodríguez-Paredes, M.; Esteller, M. Cancer Epigenetics Reaches Mainstream Oncology. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 330–339, doi:10.1038/nm.2305.
 159. Franco, L. Enfermedades Epigenéticas: Desde El Cáncer Hasta La Sordera. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)* **2009**, *103*, 79–96.
 160. *Epigenetics in Human Disease*; Tollefsbol, T., Ed.; 2nd ed.; Academic Press Inc., 2018; ISBN 978-0128122150.
 161. Kee, J.; Thudium, S.; Renner, D.M.; Glastad, K.; Palozola, K.; Zhang, Z.; Li, Y.; Lan, Y.; Cesare, J.; Poleshko, A.; et al. SARS-CoV-2 Disrupts Host Epigenetic Regulation via Histone Mimicry. *Nature* **2022**, *610*, 381–388.
 162. Feehley, T.; O’Donnell, C.W.; Mendlein, J.; Karande, M.; McCauley, T. Drugging the Epigenome in the Age of Precision Medicine. *Clinical Epigenetics* **2023**, *15*, 1–13.
 163. Castro-Muñoz, L.J.; Ulloa, E.V.; Sahlgren, C.; Lizano, M.; de la Cruz-Hernández, E.; Contreras-Paredes, A. Modulating Epigenetic Modifications for Cancer Therapy (Review). *Oncol. Rep.* **2023**, *49*, 59.
 164. Gajjela, B.K.; Zhou, M.M. Bromodomain Inhibitors and Therapeutic Applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2023**, *75*, 102323.
 165. Jung, I.; An, J.; Ko, M. Epigenetic Regulators of DNA Cytosine Modification: Promising Targets for Cancer Therapy. *Biomedicines* **2023**, *11*, 654.

166. Liu, S.; Li, X.; Li, X.; Li, X.D. Recent Advances in the Development of Peptide-Based Inhibitors Targeting Epigenetic Readers of Histone Lysine Acetylation and Methylation Marks. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2023**, *75*, 102334.
167. Marzochi, L.L.; Cuzziol, C.I.; Nascimento Filho, C.H.V. Do; dos Santos, J.A.; Castanhole-Nunes, M.M.U.; Pavarino, É.C.; Guerra, E.N.S.; Goloni-Bertollo, E.M. Use of Histone Methyltransferase Inhibitors in Cancer Treatment: A Systematic Review. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *944*, 175590.
168. Padilla, A.; Manganaro, J.F.; Huesgen, L.; Roess, D.A.; Brown, M.A.; Crans, D.C. Targeting Epigenetic Changes Mediated by Members of the SMYD Family of Lysine Methyltransferases. *Molecules* **2023**, *28*, 2000.
169. Ren, L.; Yang, Y.; Li, W.; Yang, H.; Zhang, Y.; Ge, B.; Zhang, S.; Du, G.; Wang, J. Recent Advances in Epigenetic Anticancer Therapeutics and Future Perspectives. *Front. Genet.* **2023**, *13*.
170. Beadle, G.W.; Tatum, E.L. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1941**, *27*, 499–506.
171. Chow, L.T.; Gelinas, R.E.; Broker, T.R.; Roberts, R.J. An Amazing Sequence Arrangement at the 5' Ends of Adenovirus 2 Messenger RNA. *Cell* **1977**, *12*, 1–8.
172. Berget, S.M.; Moore, C.; Sharp, P.A. Spliced Segments at the 5' Terminus of Adenovirus 2 Late MRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 3171–3175.
173. Sperling, R. The Nuts and Bolts of the Endogenous Spliceosome. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2017**, *8*, e1377.
174. Ramanouskaya, T. V.; Grinev, V. V. The Determinants of Alternative RNA Splicing in Human Cells. *Mol. Genet. Genom.* **2017**, *292*, 1175–1195.
175. Lee, Y.; Rio, D.C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 291–323.
176. Roca, X.; Krainer, A.R.; Eperon, I.C. Pick One, but Be Quick: 5' Splice Sites and the Problems of Too Many Choices. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 129–144.
177. Sibley, C.R.; Blazquez, L.; Jernej, U. Lessons from Non-Canonical Splicing. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 407–421.
178. Giono, L.E.; Kornblihtt, A.R. Linking Transcription, RNA Polymerase II Elongation and Alternative Splicing. *Biochem. J.* **2020**, *477*, 3091–3104.
179. Kornblihtt, A.R.; Schor, I.E.; Alló, M.; Dujardin, G.; Petrillo, E.; Muñoz, M.J. Alternative Splicing: A Pivotal Step between Eukaryotic Transcription and Translation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2013**, *14*, 153–165.
180. Kováčová, T.; Souček, P.; Hujová, P.; Freiburger, T.; Grodecká, L. Splicing Enhancers at Intron–Exon Borders Participate in Acceptor Splice Sites Recognition. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6553.
181. Narayanan, S.P.; Singh, S.; Shukla, S. A Saga of Cancer Epigenetics: Linking Epigenetics to Alternative Splicing. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 885–896.
182. Neugebauer, K.M. Nascent RNA and the Coordination of Splicing with Transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, *11*, a032227.
183. Braunschweig, U.; Gueroussov, S.; Plocik, A.M.; Graveley, B.R.; Blencowe, B.J. Dynamic Integration of Splicing within Gene Regulatory Pathways. *Cell* **2013**, *152*, 1252–1269.
184. Muniz, L.; Nicolas, E.; Trouche, D. RNA Polymerase II Speed: A Key Player in Controlling and Adapting Transcriptome Composition. *EMBO J.* **2021**, *40*, e105740.
185. Veloso, A.; Kirkconnell, K.S.; Magnuson, B.; Biewen, B.; Paulsen, M.T.; Wilson, T.E.; Ljungman, M. Rate of Elongation by RNA Polymerase II Is Associated with Specific Gene Features and Epigenetic Modifications. *Genome Res.* **2014**, *24*, 896–905.
186. Gómez Acuña, L.I.; Fiszbein, A.; Alló, M.; Schor, I.E.; Kornblihtt, A.R. Connections between Chromatin Signatures and Splicing. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2013**, *4*, 77–91.
187. Shukla, S.; Kavak, E.; Gregory, M.; Imashimizu, M.; Shutinoski, B.; Kashlev, M.; Oberdoerffer, P.; Sandberg, R.; Oberdoerffer, S. CTCF-Promoted RNA Polymerase II Pausing Links DNA Methylation to Splicing. *Nature* **2011**, *479*, 74–79.
188. Alharbi, A.B.; Schmitz, U.; Bailey, C.G.; Rasko, J.E.J. CTCF as a Regulator of Alternative Splicing: New Tricks for an Old Player. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 7825–7838.
189. Ruiz-Velasco, M.; Kumar, M.; Lai, M.C.; Bhat, P.; Solis-Pinson, A.B.; Reyes, A.; Kleinsorg, S.; Noh, K.M.; Gibson, T.J.; Zaugg, J.B. CTCF-Mediated Chromatin Loops between Promoter and Gene Body Regulate Alternative Splicing across Individuals. *Cell Sys.* **2017**, *5*, 628–637.
190. Doshi, J.; Willis, K.; Madurga, A.; Stelzer,

- C.; Benenson, Y. Multiple Alternative Promoters and Alternative Splicing Enable Universal Transcription-Based Logic Computation in Mammalian Cells. *Cell Reports* **2020**, *33*, 108437.
191. Pereira-Castro, I.; Moreira, A. On the Function and Relevance of Alternative 3'-UTRs in Gene Expression Regulation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* **2021**, 1–30.
 192. Cheng, J.; Zhou, T.; Liu, C.; Shapiro, J.; Brauer, M.; Kiefer, M.; Barr, P.; Mountz, P. Protection from Fas-Mediated Apoptosis by a Soluble Form of the Fas Molecule. *Science* **1994**, *263*, 1759–1782.
 193. Di, C.; Syafrizayanti; Zhang, Q.; Chen, Y.; Wang, Y.; Zhang, X.; Liu, Y.; Sun, C.; Zhang, H.; Hoheisel, J.D. Function, Clinical Application, and Strategies of Pre-mRNA Splicing in Cancer. *Cell Death and Differentiation* **2019**, *26*, 1181–1194.
 194. Rahman, M.A.; Nasrin, F.; Bhattacharjee, S.; Nandi, S. Hallmarks of Splicing Defects in Cancer: Clinical Applications in the Era of Personalized Medicine. *Cancers* **2020**, *12*, 1381.
 195. Bonnal, S.C.; López-Oreja, I.; Valcárcel, J. Roles and Mechanisms of Alternative Splicing in Cancer — Implications for Care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2020**, *17*, 457–474.
 196. Yang, H.D.; Nam, S.W. Pathogenic Diversity of RNA Variants and RNA Variation-Associated Factors in Cancer Development. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 582–593.
 197. Roda, D.; Castillo, J.; Telechea-Fernández, M.; Gil, A.; López-Rodas, G.; Franco, L.; González-Rodríguez, P.; Roselló, S.; Pérez-Fidalgo, J.A.; García-Trevijano, E.R.; et al. EGF-Induced Acetylation of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins Is Dependent on KRAS Mutational Status in Colorectal Cancer Cells. *PLoS one* **2015**, *10*, e0130543.
 198. Riffo-Campos, Á.; Castillo, J.; Vallet-Sánchez, A.; Ayala, G.; Cervantes, A.; López-Rodas, G.; Franco, L. In Silico RNA-Seq and Experimental Analyses Reveal the Differential Expression and Splicing of EPDR1 and ZNF518B Genes in Relation to KRAS Mutations in Colorectal Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 3627–3634.
 199. Gimeno-Valiente, F.; Riffo-Campos, Á.L.; Vallet-Sánchez, A.; Siscar-Lewin, S.; Gambardella, V.; Tarazona, N.; Cervantes, A.; Franco, L.; Castillo, J.; López-Rodas, G. ZNF518B Gene Up-Regulation Promotes Dissemination of Tumour Cells and Is Governed by Epigenetic Mechanisms in Colorectal Cancer. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9339.
 200. Gimeno-Valiente, F.; Riffo-Campos, Á.L.; Torres, L.; Tarazona, N.; Gambardella, V.; Cervantes, A.; López-Rodas, G.; Franco, L.; Castillo, J. Epigenetic Mechanisms Are Involved in the Oncogenic Properties of ZNF518B in Colorectal Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 1433.
 201. Gimeno-Valiente, F.; Riffo-Campos, L.; Ayala, G.; Tarazona, N.; Gambardella, V.; Rodríguez, F.M.; Huerta, M.; Martínez-Ciarpaglini, C.; Montón-Bueno, J.; Roselló, S.; et al. EPDR1 Up-Regulation in Human Colorectal Cancer Is Related to Staging and Favours Cell Proliferation and Invasiveness. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3723.
 202. Riffo-Campos, Á.L.; Gimeno-Valiente, F.; Rodríguez, F.M.; Cervantes, A.; López-Rodas, G.; Franco, L.; Castillo, J. Role of Epigenetic Factors in the Selection of the Alternative Splicing Isoforms of Human KRAS in Colorectal Cancer Cell Lines. *Oncotarget* **2018**, *9*, 20578–20589.
 203. Gimeno-Valiente, F.; López-Rodas, G.; Castillo, J.; Franco, L. Alternative Splicing, Epigenetic Modifications and Cancer: A Dangerous Triangle, or a Hopeful One? *Cancers* **2022**, *14*, 560.
 204. Zidovska, A. The Rich Inner Life of the Cell Nucleus: Dynamic Organization, Active Flows, and Emergent Rheology. *Biophys. Rev.* **2020**, *12*, 1093–1106.
 205. Wagner, R. Einige Bemerkungen Und Fragen Über Das Keimbläschen (Vesicular Germinativa). *Müller's Archiv. Anat. Physiol. Wissenschaft Med.* **1835**, *268*, 373–377.
 206. Ramón y Cajal, S. Un Sencillo Método de Coloración Selectiva Del Retículo Protoplasmático y Sus Efectos En Los Diversos Organos Nerviosos de Vertebrados e Invertebrados. *Trab. Lab. Invest. Biol. (Madrid)* **1903**, *2*, 129–221.
 207. Ramón y Cajal, S. El Núcleo de Las Células Piramidales Del Cerebro Humano y de Algunos Mamíferos. *Trab. Lab. Invest. Biol. (Madrid)* **1910**, *8*, 27–62.
 208. Nizami, Z.; Deryusheva, S.; Gall, J.G. The Cajal Body and Histone Locus Body. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a000653.
 209. Spector, D.L.; Lamond, A.I. Nuclear Speckles. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a000646.
 210. Cosma, M.P.; Neaguembor, M.V. The Magic of Unraveling Genome Architecture and Function. *Cell Reports* **2023**, *42*, 112361.

211. Flores, V.; Farabella, I.; Nir, G. Genome-Wide Tracing to Decipher Nuclear Organization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2023**, *82*, 102175.
212. Kempfer, R.; Pombo, A. Methods for Mapping 3D Chromosome Architecture. *Nat. Rev. Genet.* **2020**, *21*, 207–226.
213. Franco, L. *El Rostro Humano de La Ciencia. Reflexiones En Torno a La Regulación Biológica*; Discurso de ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales: Madrid, 2003.
214. Lieberman-Aiden, E.; Berkum, N.L. Van; Williams, L.; Imakaev, M.; Ragozcy, T.; Telling, A.; Amit, I.; Lajoie, B.R.; Sabo, P.J.; Dorschner, M.O.; et al. Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science* **2009**, *326*, 289–294.
215. Beagrie, R.A.; Scialdone, A.; Schueler, M.; Kraemer, D.C.A.; Chotalia, M.; Xie, S.Q.; Barbieri, M.; De Santiago, I.; Lavitas, L.M.; Branco, M.R.; et al. Complex Multi-Enhancer Contacts Captured by Genome Architecture Mapping. *Nature* **2017**, *543*, 519–524.
216. Quinodoz, S.A.; Ollikainen, N.; Tabak, B.; Palla, A.; Schmidt, J.M.; Detmar, E.; Lai, M.M.; Shishkin, A.A.; Bhat, P.; Takei, Y.; et al. Higher-Order Inter-Chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus. *Cell* **2018**, *174*, 744–757.
217. Zheng, M.; Tian, S.Z.; Capurso, D.; Kim, M.; Maurya, R.; Lee, B.; Piecuch, E.; Gong, L.; Zhu, J.J.; Li, Z.; et al. Multiplex Chromatin Interactions with Single-Molecule Precision. *Nature* **2019**, *566*, 558–562.
218. Ochiai, H.; Ohishi, H.; Sato, Y.; Kimura, H. Organization of Transcription and 3D Genome as Revealed by Live-Cell Imaging. *Curr. Opin. Str. Biol.* **2023**, *81*, 102615.
219. Lee, D.S.W.; Wingreen, N.S.; Brangwynne, C.P. Chromatin Mechanics Dictates Subdiffusion and Coarsening Dynamics of Embedded Condensates. *Nat. Phys.* **2021**, *17*, 531–538.
220. Maccaroni, K.; Torre, M. La; Burla, R. Phase Separation in the Nucleus and at the Nuclear Periphery during Post-Mitotic Nuclear Envelope Reformation. *Cells* **2022**, *11*, 1749.
221. Boija, A.; Klein, I.A.; Sabari, B.R.; Lee, T.I.; Taatjes, D.J.; Young, R.A.; Boija, A.; Klein, I.A.; Sabari, B.R.; Agnese, A.D.; et al. Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* **2018**, *175*, 1842–1855.
222. Karpinska, M.A.; Oudelaar, A.M. The Role of Loop Extrusion in Enhancer-Mediated Gene Activation. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **2023**, *79*, 102022.
223. Gabriele, M.; Brandão, H.B.; Grosse-Holz, S.; Jha, A.; Dailey, G.M.; Cattoglio, C.; Hsieh, T.H.S.; Mirny, L.; Zechner, C.; Hansen, A.S. Dynamics of CTCF- and Cohesin-Mediated Chromatin Looping Revealed by Live-Cell Imaging. *Science* **2022**, *376*, 476–501.
224. Farr, S.E.; Woods, E.J.; Joseph, J.A.; Garaizar, A.; Collepardo-Guevara, R. Nucleosome Plasticity Is a Critical Element of Chromatin Liquid-Liquid Phase Separation and Multivalent Nucleosome Interactions. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2883.
225. van Staaldouin, J.; van Staveren, T.; Grosveld, F.; Wendt, K.S. Live-Cell Imaging of Chromatin Contacts Opens a New Window into Chromatin Dynamics. *Epigen. Chrom.* **2023**, *16*, 27.
226. Bannister, A.J.; Zegerman, P.; Partridge, J.F.; Miska, E.A.; Thomas, J.O.; Allshire, R.C.; Kouzarides, T. Selective Recognition of Methylated Lysine 9 on Histone H3 by the HP1 Chromo Domain. *Nature* **2001**, *410*, 120–124.
227. Abdulla, A.Z.; Salari, H.; Tortora, M.M.C.; Vaillant, C.; Jost, D. 4D Epigenomics: Deciphering the Coupling between Genome Folding and Epigenomic Regulation with Biophysical Modeling. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **2023**, *79*, 102033.
228. Itoh, Y.; Woods, E.J.; Minami, K.; Maeshima, K.; Collepardo-Guevara, R. Liquid-like Chromatin in the Cell: What Can We Learn from Imaging and Computational Modeling? *Curr. Opin. Str. Biol.* **2021**, *71*, 123–135.
229. Westfall, R. *Isaac Newton: Una Vida*; Ediciones Folio: Barcelona, 2004;
230. Shi, F.; Evans, J. Science and Technology Advance through Surprise. *arXiv* **2020**, *1910.09370*.
231. Peirce, C.S. *Prolegomena to a Science of Reasoning: Phaneroscopy, Semeiotic, Logic*; Bisanz, E., Ed.; Peter Lang GmbH, 2015.
232. Arendt, H. *La Condición Humana*; Gil Novales, R. (traductor), Ed.; 5ª reimpre.; Paidós: Buenos Aires; ISBN 978-950-

- 12-5414-3.
233. Génova, G. Los Tres Modos de Inferencia. *Anuario Filosófico* **1996**, 29, 1249–1263.
234. Newman, J.H. *The Letters and Diaries of John Henry Newman. Vol 27*; Dessain, C.S., Gornall, T., Eds.; Clarendon Press: Oxford, 1975.