

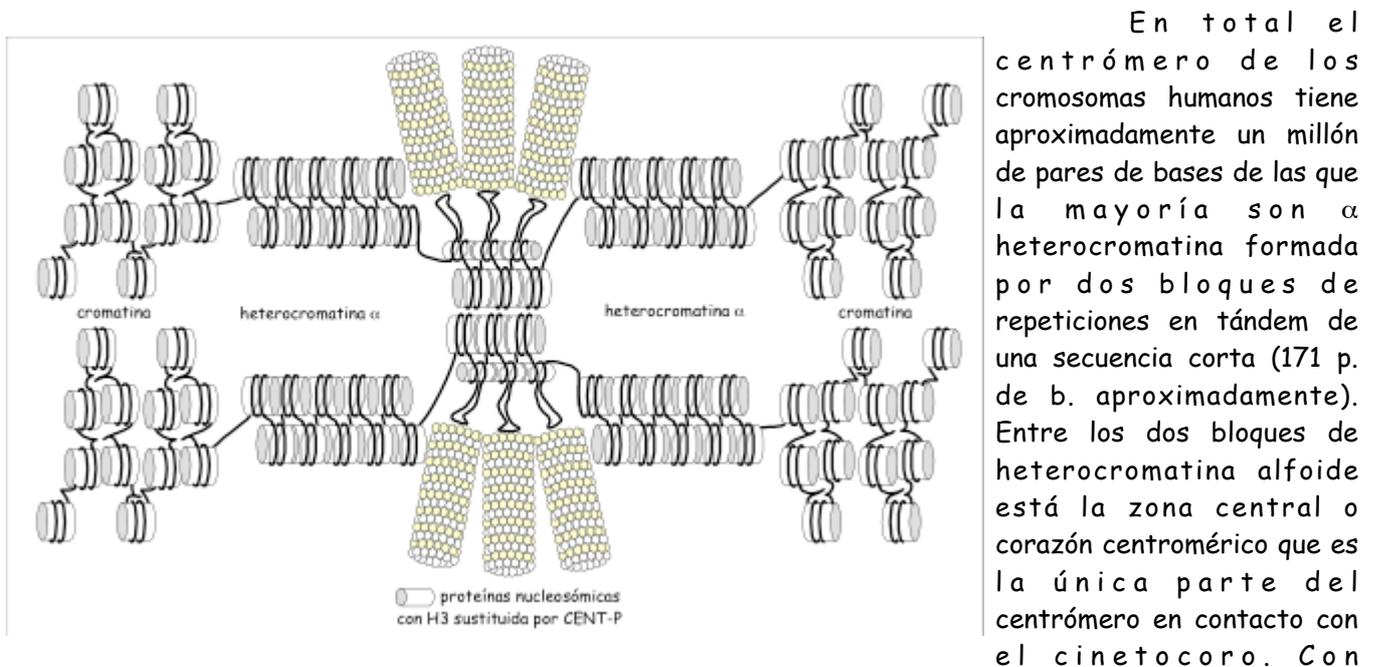
EL CENTRÓMERO

¿Por qué el centrómero se comporta de forma tan particular?

Los centrómeros son responsables de la unión de los cromosomas a las fibras del huso mitótico, consecuentemente de la migración de las cromátidas a los polos y por ello del reparto equitativo de la información genética en las células hijas. Sin duda esta función tiene que ver con la estructura que tienen los centrómeros y que a su vez estará determinada por las secuencias nucleotídicas y por la asociación con proteínas específicas.

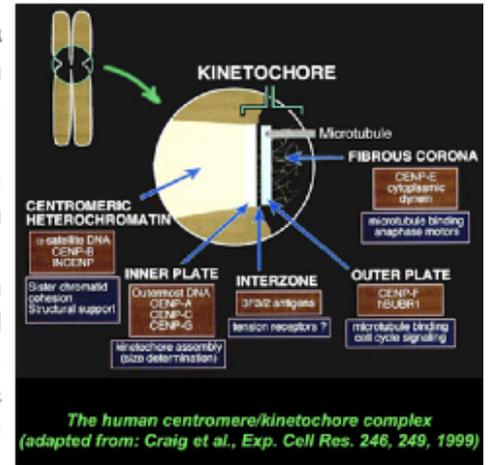
En las células de eucariotas superiores como las humanas los centrómeros de los cromosomas son estructuralmente complejos, anclándose en ellas durante las divisiones celulares varias fibras del huso por cada cromátida del cromosoma.

El estrechamiento que supone la constricción primaria permite intuir que en esa zona la espiralización del cromosoma es diferente, que no tiene plegamiento en dominios ni lazos supra-dominios como los que se forman por la asociación de proteínas no histonas en otras zonas del cromosoma. Está compuesto fundamentalmente por heterocromatina pero es una heterocromatina especial (α) que aparece al centrifugar el ADN genómico en gradiente de densidad de cloruro de cesio formando un pico separado del resto y se le llamó ADN satélite α . Tratando de ver secuencias se encontró que entre dos bloques de satélite α hay una zona central de ADN que se asocia al cinetocoro (*) formando su placa interna en la que la secuencia no es siempre la misma pero en todos los casos la histona H3 está sustituida por una proteína centromérica, la CENP-A (parece que la sustitución es alterna, un nucleosoma sí y otro no produciéndose un plegamiento que hace que los nucleosomas sustituidos queden en la parte exterior en contacto con el cinetocoro).



experimentos de desplazamiento de fragmentos se ha podido comprobar que las secuencias satélite α no son necesarias para la unión al cinetocoro.

(*) El cinetocoro es una estructura fundamentalmente proteínica a la que se asocian lazadas del ADN cromosómico. Se distinguen 4 zonas en su estructura, desde la placa interna formada por la asociación de la zona central del centrómero (ADN e histonas en las que H3 está sustituida por CENP-A) con otras proteínas como CENP-C y CENP-G, se continúa con una zona intermedia de menor densidad donde se detectan antígenos 3F3/2, una zona externa con acumulación de las proteínas CENP-F y hBUBR1 que es donde se anclan los microtúbulos y la corona fibrosa con CENP-E y dineína citoplasmática, también de menor densidad a los electrones. Teniendo en cuenta la práctica inclusión de la placa interna en el centrómero, el cinetocoro que tradicionalmente se describe en la citología tiene una estructura de sándwich con la capa central más densa.



Por otra parte en la zona central no se ha detectado una secuencia específica que justifique por sí sola la sustitución de la H3. Parece que el primer determinante de la funcionalidad del centrómero es epigenético, depende de cómo esté metilada las secuencias de la zona central.

Los bloques de heterocromatina alfoide tendrían una doble misión de protección del centrómero y separación del resto del cromosoma y sobre todo para dar estabilidad a la zona centromérica.

Dada la importancia de la sustitución de CENP-A por H3 y lo que ello puede modificar en los nucleosomas y la importancia de la secuencia de la central aunque no sea igual en todos los centrómeros de eucariotas superiores, parece recomendable ver ligeramente la estructura del centrómero de *Saccharomyces cerevisiae*, levadura sencilla para tener una idea cómo pudo ser el principio evolutivo del centrómero de los cromosomas humanos.

Cuando Clarke y Carbon secuenciaron y analizaron el centrómero del cromosoma 3 de *Saccharomyces cerevisiae* (1985) las técnicas moleculares no eran tan potentes como en la actualidad ni se tenían secuenciados genomioms enteros por lo que se arreglaron para suplir con inteligencia las dificultades.

Eligieron como material biológico una levadura sencilla de la que se sabía que el centrómero de cada cromátida se unía a una sola fibra del huso.

Se centraron en el centrómero del cromosoma 3 del que sabían que estrechamente unidos al centrómero se encontraban por un lado el gen LEU2 y por el otro el CDC10.

Para seleccionar el fragmento que contuviese al centrómero se hizo una genoteca en plásmidos que introducidos en células eucarióticas se expresan como cualquier cromosoma pero como no tienen centrómero propio, si tampoco lo tenían en el segmento de la levadura introducido en el plásmido éste en las meiosis segregaba 4:0 (iba todo a un polo). Así seleccionaron los fragmentos que tenían centrómero y luego entre éstos volvieron a seleccionar los que tenían LEU2 y CDC10 con lo que aseguraban que llevaban el centrómero del cromosoma 3.

Luego con deleciones determinaron cual era el segmento mínimo que tenía actividad centromérica y o partir de ellos y mediante la técnica de paseo cromosómico se pudo determinar la secuencia nucleotídica del centrómero 3 (aproximadamente 220 pares de bases de las que sólo 125 parecen esenciales).

La secuencia en sí ofrecía poca información, si es caso que la mitad central era extraordinariamente rica en pares A-T. Pero al tener el centrómero de un cromosoma fue fácil conseguir hibridando en blots los de otros cromosomas de la levadura y al comparar las secuencias se pudieron distinguir 3 elementos básicos que se repetían.

	I	II	III
CEN 1TCTT GT CA CA TG	85pb (95% AT)	TGTTTT TG TTTT CCG AAGCAGTCAAAGT...
CEN 3	...ATAAG TC AC AT G	84pb (93% AT)	TGTATTT G ATTT CCG AAAGTTAAAAAG..
CEN 4	...AAAG TC AC AT G	78pb (92% AT)	TGTTTT ATG ATT ACCG AAACATAAAACCT...
CEN 6TTTC AT CA CG TG	85pb (94% AT)	AGTTTT TG TTTT CCG AAGATGTAAAATA...
CEN 7	...ATAT AT CA CG TG	86pb (93% AT)	TGTTTT TG CC TTCCG AAAGAAAATAGT...
CEN 10	...CTTA AT CA CG TG	86pb (94% AT)	TGTTTT ATG ATTT CCG AACCTAAATATAC...
CEN 11	...ATAAG TC AC AT G	85pb (95% AT)	TG TT CA TG ATTT CCG AACGTATAAAAATA...
CEN 14	...GTTAG TC AC AT G	85pb (93% AT)	TGTATTT G TCT TCG AAAGTAAAATAA...
CEN 15	...TAAT AT CA CG TG	86pb (91% AT)	TGTAT ATG ACT TCG AAAAATATATATT...
CEN 16	...ATAG AT CA CA TG	83pb (95% AT)	TG GT TA AG ATTT CCG AAATAGAAAATAT..
CONSENSO uTCACuTG	78-86pb (91-95% AT)	TGTTT RTG _ TTT CCG AAA_____AAA.....

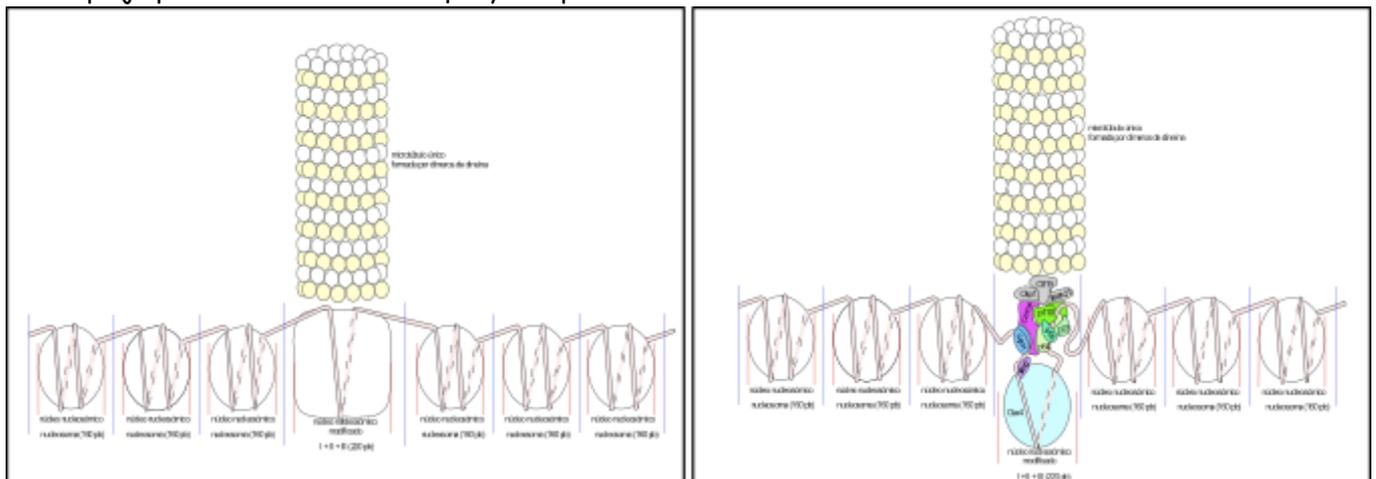
Llamaba especialmente la atención los elementos centrales (elemento II) de entre 78 y 86 pb que eran distintas en todos los cromosomas pero en todas ellas había entre un 91 y un 95% de pares A-T.

El elemento I tenía la secuencia **uTCACuTG** pegada al elemento II en todos los cromosomas y, también pegada a II en el elemento III se encontraba sistemáticamente la secuencia **TGTTT_TG_TTTCCGAAA_____AAA**. Clarke y Carbon proponen que estas secuencias permiten la asociación con una serie de proteínas específicas que pueden asociarse a la fibra microtubular del huso.

El análisis de estas proteínas en los años siguientes trajo como consecuencia la publicación en el año 2000 de un modelo que en la actualidad se considera acertado.

El núcleo o corazón nucleosómico es un octámero de histonas en las que H3 está sustituida por Cse4.

Esta sustitución parece ser epigenética, o al menos es epigenético su mantenimiento ya que cuando Cse4 se localiza en otros puntos cromosómicos es eliminada mientras que en el centrómero está protegida contra la proteólisis. Así se forma un núcleo especializado al que se asocia el ADN en una sola lazada gracias a la secuencia altamente rica en A-T de CDE II y al concurso de una proteína centrómero-cinetocórica (Mif2). De esta forma el segmento de 220 pb rodea el corazón cinetocórico especializado utilizando el elemento II y deja próximos entre sí los elementos I y III. Cada uno de ellos tiene asociadas una serie de proteínas cinetocóricas con distintas funciones, desde unión a fosforilantes, y los dos grupos se asocian entre sí por el concurso de Cbf1p. En esta situación el centrómero con las proteínas asociadas es receptivo para que se una el complejo puente cinetocórico al que ya se puede anclar el microtúbulo.



Pero del centrómero hay todavía algunas cosas más que decir. La primera es que, sabido que el cromosoma metafísico tiene dos moléculas de ADN completas e idénticas, ¿qué las mantiene juntas, al menos a nivel centromérico hasta la metafase y luego permite que se separen en anafase? Y por último, pero no menos intrigante, ¿por qué en meiosis I la unión del huso al cinetocoro es sintética y en mitosis es anfitética?

CONCEPTOS:

Binomio estructura – función en el centrómero.- La constricción primaria de los cromosomas tiene una estructura única en el cromosoma que le permite realizar su principal función que es el anclaje de los cromosomas en el huso para asegurar el reparto equitativo

del material genético. La estructura de los eucariotas más sencillos está determinada por la secuencia y por la modificación de un corazón nucleosómico por sustitución de la H3.

En los eucariotas superiores, sin que se haya podido encontrar secuencia alguna responsable de ello, hay varios nucleosomas modificados por sustitución de la H3, y son responsables de que el cinetocoro que se asocia sea más complejo y se una a su vez con varias fibras del huso. Además para proteger todo el segmento existe una acumulación a ambos lados del centrómero de heterocromatina, diferente a cualquiera otra heterocromatina del genomio.

Unión cinetocoro de cromosoma metafásico – fibras del huso.- Cada cromosoma metafásico tiene dos cromátidas hermanas y en cada cromátida hay una estructura centromérica a la que se asocian una serie de proteínas formando un cinetocoro. Un cromosoma metafásico tiene dos estructuras cinetocóricas. Se dice que un cromosoma se ancla *anfitéticamente* al huso cuando a un cinetocoro se unen fibras de un polo y al otro cinetocoro fibras del polo opuesto. Cuando a los dos cinetocoros se unen fibras de un solo polo se dice que hay un anclaje *sintético*. Hay otros casos excepcionales; cuando sólo un cinetocoro se une a microtúbulos, si estos son de ambos polos se dice que el anclaje es mesotético y si son sólo se un polo es monotético.

Como del anclaje depende la coorientación de los centrómeros y cromátidas se habla tradicionalmente de coorientación de centrómeros anfitética (cada centrómero se va a un polo diferente, como ocurre en mitosis) y coorientación sintética de centrómeros (los centrómeros de las dos cromátidas hermanas van al mismo polo, como ocurre en la metafase I meiótica).

Fragmentos acéntricos.- Un fragmento sin centrómero, p.e. un plásmido, en las divisiones no es arrastrado a la placa ecuatorial de la célula en prometafase ni separadas sus "cromátidas" a los polos en anafase. Es fácil que durante la citocinesis las dos copias se queden incluidas en el nuevo núcleo (el conjunto de las moléculas autónomas sin centrómero se repartirán más o menos entre los núcleos hijos y algunas se perderán por quedar fuera del núcleo y ser degradadas por nucleasas citoplasmáticas).

Otra cosa es lo que pasa con los fragmentos acéntricos que se generan durante las divisiones; los cromosomas se llevan completos hasta el centro de la célula en metafase si luego (como consecuencia de recombinaciones asociadas a anomalías u otros procesos) se separa un fragmento acéntrico no emigra a los polos, tiene una probabilidad muy baja de integrarse en alguno de los núcleos de telofase y se pierden sistemáticamente.

Tamaño mínimo.- Para que un trozo de cromatina se comporte como un cromosoma es necesario que tenga telómeros como se verá en la lección siguiente (o sea circular) para preservar su integridad y es necesario que tenga centrómero para asegurar el reparto equitativo en las células hijas de las divisiones celulares. Sin embargo cuando se hicieron cromosomas artificiales con estas estructuras no actuaban los centrómeros si no tenían en su conjunto un determinado tamaño. Sin que se sepa la causa, los centrómeros no actúan si no van acompañados de una cierta cantidad de material cromatínico.

Paso de metafase a anafase.- Las cromátidas entran siempre en división replicadas completamente y a nivel del centrómero son completamente independientes las dos dobles hélices. Se mantienen unidas entre sí por el concurso de ciertas proteínas (cohesina) que son modificadas por proteasas después de la metafase por lo que al acortar las fibras del huso en anafase no hay ya impedimento alguno para que cada centrómero arrastre a su cromátida al polo correspondiente.

En la primera división de meiosis los centrómeros de cromátidas hermanas tienen asociadas proteínas específicas que hacen que permanezcan uno al lado del otro (monopolin en *S. cerevisiae*, Rec8 entre otras proteínas en superiores). Estas proteínas están asociadas desde S premeiótico donde parece que se perpetúan por un procedimiento epigenético. La orientación a polos opuestos de centrómeros homólogos tiene que ver con la disposición de centrómeros y quiasmas aunque, lógicamente facilita el proceso el que exista cohesina, (que mantiene unidas las cromátidas hermanas) y unión estable de cinetocoros hermanos que desaparece en meiosis II.

BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL:

- Hemmerich et al. (2000) P.N.A.S. 97, 12583
- Hauf and Watanabe (2004) Cell 119, 317-327