

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Cromatina de *Saccharomyces cerevisiae* : estudios
estructurales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Luis de Castro Rincón

DIRECTOR:

Julián Perera González

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CROMATINA DE Saccharomyces cerevisiae
ESTUDIOS ESTRUCTURALES



R 28815.

Director de la Tesis:
Dr. Julián Perera Gonzalez

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Julián Perera Gonzalez", written over a horizontal line.

Tesis presentada para
optar al grado de DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
por José Luis de Castro

Madrid, Junio de 1986

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "José Luis de Castro", written over a diagonal line.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CROMATINA DE Saccharomyces cerevisiae
ESTUDIOS ESTRUCTURALES

Director de la Tesis:
Dr. Julián Perera Gonzalez

Tesis presentada para
optar al grado de DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
por José Luis de Castro

Madrid, Junio de 1986

ABREVIATURAS

DABA	Acido diaminobenzoico
DNA	Acido desoxiribonucleico
DNH	Desoxiribonucleohistona
HMG	Proteína de alta movilidad electroforética
PCA	Acido perclórico
PCNH	Proteína cromosomal no histona
PDA	Potato Dextrose Agar
PMSF	Fluoruro de p-metil-fenil-sulfonilo
pb	pares de bases
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato sódico
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
UV	ultravioleta

Esta Investigación se ha desarrollado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense, bajo la dirección del Prof. D. Julián Perera González a quien le estoy agradecido por su constante ayuda, así como al Prof. D. Luis Franco Vera y al Prof. D. Francisco Montero Carnerero por su apoyo y valiosos consejos.

Agradezco igualmente al Prof. D. Angel Martín Municio por el gran interés demostrado por la realización de este trabajo.

Deseo también expresar mi agradecimiento al Prof. D. José Gavilanes Franco por sus enseñanzas y por su total apoyo que han contribuido en gran medida a la realización de este trabajo. Deseo también manifestarle mi agradecimiento por haberme honrado con su amistad durante todo este tiempo.

También expreso mi agradecimiento a mis compañeros de equipo y a todos aquellos que de alguna manera han contribuido a la realización del presente trabajo, especialmente al Dr. D. Juan Manuel García Segura y al Dr. D. Alvaro Martínez del Pozo.

INDICE

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	1
1.1. Composición de la cromatina	1
1.1.1. Histonas	3
1.1.1.1. Interacciones de las histonas	12
1.1.2. Proteínas cromosomales no histonas	14
1.1.3. Proteínas HMG	15
1.2. Estructura de la cromatina	23
1.2.1. Organización del nucleosoma	26
1.2.1.1. Core nucleosomal	27
1.2.1.1.1. Conformación del DNA	28
1.2.1.1.2. Estudio de las histonas como com- ponentes del nucleosoma	35
1.2.1.1.3. Transiciones conformacionales en el nucleosoma límite	42
1.2.1.2. Mononucleosoma	46
1.2.1.2.1. H1	46
1.2.2. Estructuras de orden superior	51
1.3. Cromatina activa	59
1.4. Cromatina de levadura	66
1.5. Técnicas fisicoquímicas usadas en el presente estudio	74
1.5.1. Dicroísmo circular	74
1.5.2. Desnaturalización térmica del DNA	76
1.6. Objetivos de la presente Investigación ...	77

2. PARTE EXPERIMENTAL	79
2.1. Material biológico	79
2.2. Cultivo de levadura	79
2.3. Preparación de DNH	80
2.3.1. Preparación de DNH cruda	80
2.3.2. Purificación de DNH	81
2.4. Preparación de DNH soluble	82
2.4.1. Solubilización de DNH por diálisis	82
2.4.2. Solubilización por digestión con nucleasa micrococcal	82
2.5. Preparación de núcleos de <i>S. cerevisiae</i> ...	83
2.5.1. Transformación de las células en esferoplastos	83
2.5.2. Lisis de los esferoplastos	85
2.6. Preparación y fraccionamiento de cromatina	87
2.6.1. Obtención de fracciones solubles	87
2.6.1.1. Digestión de núcleos con nucleasa micrococcal	87
2.6.1.2. Fraccionamiento de la cromatina	89
2.6.2. Aislamiento de mononucleosomas de levadura	90
2.6.2.1. Cromatografía en BioGel A-5m	91
2.7. Técnicas espectroscópicas	91
2.7.1. Dicroísmo circular	91
2.7.2. Espectros de absorción	93
2.7.3. Desnaturalización térmica de DNA y nucleoproteínas	93
2.8. Métodos analíticos	95

2.8.1. Valoración espectrofotométrica de DNA ...	95
2.8.2. Valoración de DNA. Método fluorimétrico .	96
2.8.3. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida-agarosa	98
2.8.4. Aislamiento de DNA	99
2.8.5. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida	100
2.9. Otros métodos	101
2.9.1. Tratamiento de las bolsas de diálisis ...	101
3. RESULTADOS Y DISCUSION	102
3.1. Cultivo de levadura	102
3.2. Aislamiento y análisis de núcleos de levadura	102
3.2.1. Composición de los núcleos de levadura ..	106
3.3. Estudio de la fracción S _a de DNH solubilizada por diálisis	108
3.3.1. Características estructurales de la fracción DNH-S _a	110
3.3.1.1. Espectro de absorción	110
3.3.1.2. Composición de la fracción DNH-S _a	112
3.3.1.3. Espectro de dicroísmo circular	112
3.3.1.4. Curva de desnaturalización térmica	115
3.3.1.5. Análisis de las proteínas de la DNH soluble	118
3.4. Estudio de la fracción DNH-S _b solubili- zada por digestión con nucleasa micrococal	123
3.4.1. Espectro de absorción	123

3.4.2. Composición de la cromatina	125
3.4.3. Espectro de dicroísmo circular	125
3.4.4. Curva de desnaturalización térmica	126
3.4.5. Análisis de las proteínas de la cromatina	130
3.5. Estudio de la fracción S _a a partir de cultivos de levadura	132
3.5.1. Espectro de absorción	133
3.5.2. Composición de la DNH soluble	133
3.5.3. Estudios de dicroísmo circular y desnaturalización térmica	134
3.6. Estudio de fracciones solubles de cromatina a partir de núcleos	136
3.6.1. Digestión de los núcleos hasta un 5% de DNA soluble en ácido	137
3.6.1.1. Cinética de la digestión	138
3.6.1.2. Preparación de las fracciones de la cromatina	140
-Estudio de la fracción S ₂	140
3.6.2. Digestión de núcleos en condiciones suaves	145
3.6.2.1. Preparación de fracciones de la cromatina	145
-Estudio de la fracción S ₂	146
-Estudio de la fracción S ₂ '	150
3.7. Estudios estructurales con mononucleosomas de levadura	157
3.7.1. Aislamiento de mononucleosomas de levadura	157

3.7.1.1. Cromatografía en BioGel A-5m	160
3.7.2. Dicroísmo circular de mononucleosomas	166
3.7.3. Desnaturalización térmica de mononucleosomas	172
3.7.4. Efecto de la fuerza iónica	175
3.8. Efecto de la longitud de la cadena nucleosomal	177
3.8.1. Desnaturalización térmica	177
3.8.2. Dicroísmo circular	182
CONCLUSIONES	189
BIBLIOGRAFIA	191

1. INTRODUCCION

La información genética de la mayor parte de los organismos se encuentra contenida en su DNA. Para el caso de los eucariontes esta afirmación es absoluta. En las células de estos organismos la mayor parte del DNA se encuentra en el núcleo y no en forma libre, sino que presenta otras especies moleculares asociadas, formando un complejo que se denomina cromatina. Se trata de una de las arquitecturas moleculares más apasionantes, debido a su extraordinaria complejidad. En efecto, el DNA eucariótico tiene una longitud superior en varios órdenes de magnitud a las dimensiones del núcleo, por lo que su empaquetamiento dentro de él ha de ser considerable y complejo. Además, este empaquetamiento ha de permitir que ocurran todos los procesos asociados a la transmisión de información genética. Es evidente, por tanto, que para conocer la función de la cromatina, lo que conllevaría la explicación de todos los procesos y mecanismos de control de la expresión genética, es necesario conocer su estructura y composición, y aquella no desde un punto de vista estático, sino desde las perspectivas de sus relaciones estructura-función.

1.1. COMPOSICION DE LA CROMATINA

La cromatina está compuesta fundamentalmente por DNA, RNA y proteínas (Tabla I). No obstante, aunque una fracción del RNA puede ser considerado como componente in-

TABLA I.- Composición química de la cromatina de diversos materiales biológicos

	<u>RNA</u>	<u>Histonas</u>	<u>PCNH</u>
Eritrocito de pollo	0.01	0.89	0.51
Embrión de pollo	0.102	1.0	2.3
Timo de ternera	0.01	1.1	0.33
Células HeLa	0.02	1.3	0.5
Cerebelo de cerdo	0.122	1.0	2.1
Mieloma	0.120	1.0	1.3
Levadura	0.10	1.0	0.55

PCNH: Proteínas cromosomales no histonas.

trínseco la mayor parte se atribuye a la transcripción del DNA, ya que su contenido varía según la actividad transcripcional de la célula.

Con respecto a las proteínas de la cromatina, éstas se dividen en dos grupos. Uno formado por unos polipéptidos básicos, que suponen algo más de la mitad de las proteínas cromosomales, y que se denominan histonas. El otro, compuesto por el resto de las proteínas cromosomales, ácidas o neutras, y que se denominan, por exclusión, proteínas cromosomales no histonas (PCNH).

Se ha comprobado que la composición de la cromatina, en cuanto a la proporción de las diferentes especies moleculares presentes, varía según la fase del ciclo celular, de un modo posiblemente relacionado con su actividad. Sin embargo, la relación DNA/histonas permanece prácticamente constante (Johns, 1971) y próxima a la unidad, de modo que este hecho suele emplearse como un criterio auxiliar de pureza e integridad química de la cromatina.

1.1.1. HISTONAS

Las histonas son el principal grupo de proteínas cromosomales, por lo que ha sido ampliamente estudiado (Isenberg, 1979). Las histonas son proteínas básicas, de pequeño tamaño molecular, que se encuentran asociadas al DNA. Inicialmente se descubrieron en timo de ternera, donde existen cinco fracciones principales que se han clasificado atendiendo a su contenido en aminoácidos básicos (Johns, 1971): la H1, muy rica en lisina; las H2A y H2B, moderada-

mente ricas en lisina; y las H3 y H4, ricas en arginina (Tabla II).

Las histonas se han encontrado en todos los organismos eucarióticos investigados (Isenberg, 1979) con excepción de algunos eucariontes inferiores, en los que está ausente la histona H1 como es el caso de Saccharomyces cerevisiae (Franco y col., 1974; Franco y López-Braña, 1978). Además de las cinco fracciones principales de histonas, se han encontrado otras específicas de algún organismo o tejido. Así, se ha descrito en eritrocitos de ave otra histona que se ha denominado H5, la cual parece sustituir parcialmente a la H1 (Neelin y col., 1964; Edwards y Hnilica, 1968); igualmente, en el espermá de ciertos invertebrados marinos se ha encontrado la histona θ 1 que también sustituye a la histona H1 en estos organismos (Puigdoménech y col., 1975).

El estudio de la estructura primaria de las histonas ha conducido a la determinación de la secuencia de alguna de ellas. Las primeras en secuenciarse totalmente fueron las histonas H4 de timo de ternera (DeLange y col., 1969a; Ogawa y col., 1969) y de guisante (DeLange y col., 1969b), observandose que solo mostraban dos diferencias y además conservativas. Por su parte, la secuencia de la histona H3 de timo de ternera (DeLange y col., 1972; Olson y col., 1972) y la de guisante (Patthy y col., 1973) difieren en solo cuatro posiciones (Patthy y col., 1973). Estos resultados indican una gran conservatividad en estas proteínas, lo que viene apoyado por otros estudios de secuencia (Von Holt y col., 1979; Isenberg, 1979; Urban y

TABLA II.- Composición de aminoácidos de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 de timo de ternera y de la histona H1 de testículo de trucha. La composición se da en moles por ciento. Los datos se han calculado a partir de las secuencias de aminoácidos de H1 (McLeod y col., 1977), H2A (Yeoman y col., 1972), H2B (Iwai y col., 1970), H3 (DeLange y col., 1972) y H4 (Ogawa y col., 1969).

<u>Aminoácido</u>	<u>H1</u>	<u>H2A</u>	<u>H2B</u>	<u>H3</u>	<u>H4</u>
Asp	0.5	1.5	2.4	2.9	2.9
Asn	1.5	4.7	2.4	0.8	2.0
Thr	3.1	3.9	6.4	7.4	6.9
Ser	6.8	3.1	11.2	3.7	2.0
Glu	3.1	5.4	5.6	5.2	3.9
Gln	-	3.9	2.4	5.9	2.0
Pro	9.4	3.9	4.8	4.4	1.0
Gly	5.1	10.9	5.6	5.2	16.7
Ala	26.8	13.2	10.4	13.3	6.9
Cys	-	-	-	1.5	-
Val	7.2	6.2	7.2	4.4	8.8
Met	-	-	1.6	1.5	1.0
Ile	1.0	4.7	4.8	5.2	5.9
Leu	3.6	12.4	4.8	8.9	7.8
Tyr	0.5	2.3	4.0	2.2	3.9
Phe	0.5	0.8	1.6	3.0	2.0
Trp	-	-	-	-	-
His	-	3.1	2.4	1.5	2.0
Lys	29.9	10.9	16.0	9.6	10.8
Arg	1.0	9.3	6.4	13.3	13.7
%básicos	30.9	23.3	24.8	24.4	26.5
Lys/Arg	29.9	1.1	2.5	0.7	0.8

col., 1979). Sin embargo, posibles excepciones a esta situación se han observado en H3 de levadura (Brandt y Von Holt, 1976; Mardian e Isenberg, 1978^b) y Tetrahymena (Johman y Gorovsky, 1976), cuyas moviidades electroforéticas difieren de la proteína de timo de ternera. Por otro lado, la H4 de Tetrahymena difiere de la de timo de ternera en un mayor número de restos como muestran datos acerca de su secuencia (Glover y Gorovsky, 1978). Las histonas moderadamente ricas en lisina, H2A y H2B, son más variables que H3 y H4, pero de todas, es la H1 la más variable (Isenberg, 1979)(Figura 1).

El análisis de la secuencia de las histonas revela una distribución peculiar de los aminoácidos en la cadena polipeptídica (Figura 2). En las histonas H2A, H2B, H3 y H4 la mayoría de los residuos básicos y otros desestabilizantes de la α -hélice se encuentran en el tercio amino-terminal (Johnson y col., 1974; DeLange y Smith, 1971), mientras que la región carboxilo-terminal contiene la mayoría de los residuos hidrofóbicos. En consecuencia, las histonas presentan una estructura globular con un extremo, el amino-terminal, en conformación aperiódica (Edwards y Shooter, 1970; Chapman y col., 1976; Sautiere y col., 1975). La histona H1, por otra parte, presenta una estructura algo diferente, ya que existen dos regiones básicas, cada una de ellas en un extremo de la molécula, con restos desestabilizantes de la α -hélice (Cole, 1977), y presentando una estructura globular central (Hartman y col., 1977). De esta forma, los dos extremos flexibles están en conformación aperiódica (Johnson y col., 1974). Como caso particular, la histona H5 muestra estos residuos desestabilizantes de α -hélice sólo en el ex-

P. Ang 1 10
 P. Ang 2 20
 Ternera
 Trucha
 Drosoph.

Pro-Ser-Gln-Lys-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-
 Lys-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-
 Glu-Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-Pro-Lys-Arg-Ser-Pro-Ala-Pro-Lys-
 Glu-Pro-Lys-Ser-Ala-Pro-Lys-Arg-Ser-Gly-Lys-Ala-Ala-Lys-
 Pro-Lys-Thr-Ser-Gly-Lys-Ala-Ala-Lys-
 30

Pro-Gln-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Arg-Gly-Gly-Lys-Ala-
 Pro-Ser-Arg-Lys-Ala-Ser-Pro-Lys-Arg-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Arg-Ala-Gly-Lys-Gly-
 Lys-Gly-Ser-Lys-Lys-
 Lys-Gly-Ser-Lys-Lys-
 Lys-Ala-Gly-Lys-Ala-
 40

Gly-Lys-Arg-Arg-Gly-Val-Gln-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
 Gly-Arg-Arg-Arg-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
 Ala-Val-Thr-Lys-Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-
 Ala-Val-Thr-Lys-Thr-Ala-Gly-Lys-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-
 Gln-Lys-Asn-Ile-Thr-Lys-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-
 50

Gly-Lys-Arg-Arg-Gly-Val-Gln-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
 Gly-Arg-Arg-Arg-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
 Ala-Val-Thr-Lys-Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-
 Ala-Val-Thr-Lys-Thr-Ala-Gly-Lys-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-
 Gln-Lys-Asn-Ile-Thr-Lys-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-
 60

Gly-Lys-Arg-Arg-Gly-Val-Gln-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
 Gly-Arg-Arg-Arg-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
 Ala-Val-Thr-Lys-Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-
 Ala-Val-Thr-Lys-Thr-Ala-Gly-Lys-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-
 Gln-Lys-Asn-Ile-Thr-Lys-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-
 70

Glu-Ser-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-
 Glu-Ser-Tyr-Gly-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-
 Lys-Glu-Ser-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-
 Lys-Glu-Ser-Tyr-Ala-Ile-Tyr-Val-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-
 Lys-Glu-Ser-Tyr-Ala-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-
 80

Ile-Ser-Ser-Arg-Ala-Met-Ser-Val-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Val-Phe-Glu-Arg-Ile-
 Ile-Ser-Ser-Arg-Ala-Met-Ser-Val-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Val-Phe-Glu-Arg-Ile-
 Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile-
 Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile-
 Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Ser-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile-
 90

Ala-Ala-Glu-Ala-Gly-Arg-Leu-Thr-Tyr-Asn-Arg-Arg-Ser-Thr-Val-Ser-Ser-Arg-Glu-
 Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Thr-Ser-Ala-Asn-Arg-Arg-Ser-Thr-Val-Ser-Ser-Arg-Glu-
 Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu-
 Ala-Gly-Glu-Ser-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu-
 Ala-Ala-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu-
 100

Val-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 110

Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Arg
 Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Arg
 Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Arg
 Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Arg
 120

Val-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 130

Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Arg
 Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Arg
 Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Arg
 Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Arg
 140

Val-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-
 150

Figura 1.- Secuencia de la histona H2B de ternera, trucha, esperma de erizo de mar y Drosophila.

		20
Ternera	Ac- Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-Gln-Gly-Gly-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser-Arg-	
Trucha	Ac- Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-Thr-Gly-Gly-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser-Arg-	
P.Mil.	Ac- Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-----Gly-Ala-Lys-Gly-Lys-Ala-Lys-Ala-Lys-Ser-Arg-Ser-Ser-Arg-	40
	Ala-Gly-Leu-Gln-Phe-Pro-Val-Gly-Arg-Val-His-Arg-Leu-Leu-Arg-Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-	
	Ala-Gly-Leu-Gln-Phe-Pro-Val-Gly-Arg-Val-His-Arg-Leu-Leu-Arg-Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-	
	Ala-Gly-Leu-Gln-Phe-Pro-Val-Gly-Arg-Val-His-Arg-Leu-Leu-Arg-Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-	60
	Glu-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Glu-Tyr-Leu-Thr-Ala-	
	Glu-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Glu-----Leu-Thr-Ala-	
	Asn-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Glu-Tyr-Leu-Ala-Ala-	80
	Glu-Ile-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly-Asn-Ala-Ala-----Arg-Asp-Asn-Lys-Lys-Thr-Arg-	
	Glu-Ile-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly-Asx-Ala-Ala-Arg-Ile-Pro-Arg-Asx-Asx-Lys-Lys-Thr-Arg-	
	Glu-Ile-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly-Asn-Ala-Ala-----Arg-Asp-Asn-Lys-Lys-Thr-Arg-	100
	Ile-Ile-Pro-Arg-His-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-Leu-Asn-Lys-Leu-Leu-	
	-----Ile-Pro-Arg-His-Leu-Gln-Leu-Ala-Val-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-Leu-Asx-Lys-Leu-Leu-	
	Ile-Ile-Pro-Arg-His-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-Leu-Asn-Lys-Leu-Leu-	120
	Gly-Lys-Val-Thr-Ile-Ala-Gln-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Asn-Ile-Gln-Ala-Val-Leu-Leu-Pro-	
	Gly-Gly-Val-Thr-Ile-Ala-Glx-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Asx-Ile-Glx-Ala-Val-Leu-Leu-Pro-	
	Gly-Gly-Val-Thr-Ile-Ala-Gln-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Asx-Ile-Glx-Ala-Val-Leu-Leu-Pro-	130
	Lys-Lys-Thr-Glu-Ser-His-Lys-Ala-Lys-Gly-Lys	
	Lys-Lys-Thr-Glu-----Lys-Ala-Lys-Val-Ala-Lys	
	Lys-Lys-Thr-Gly-Ser-----Lys-Ser-Ser-----Lys	

Figura 1B.- Secuencia de aminoácidos de las histonas H2A de ternera, trucha y erizo de mar.

Timo conejo	10	Ac-Ser-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Thr-Ala-Ala-Pro-Ala-Pro-Ala-Glu-Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-----	20
Trucha		Ac-Ala-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Val-Ala-----Pro-Ala-Pro-Ala-Ala-Pro-Ala-Ala-Lys-Ala-	
	30	-----Lys-Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Gly-----Ala-Gly-Ala-Ala-Lys-Arg-Lys-Ala-Ala-	40
		Pro-Lys-Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Lys-Ala-Gly-----	
	50	Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Glu-Leu-Ile-Thr-Lys-Ala-Val-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Ser-Lys-Glu-Arg-Asn-Gly-	60
		Gly-Pro-Ala-Val-Gly-Glu-Leu-Ile-Gly-Lys-Ala-Val-Ala-Ala-Ala-Ser-Lys-Glu-Arg-Ser-Gly-	
	70	Leu-Ser-Leu-Ala-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Gly-Gly-Tyr-Asp-Val-Glu-Lys-Asn-	80
		Val-Ser-Leu-Ala-Ala-Leu-Lys-Lys-Ser-Leu-Ala-Ala-Gly-Gly-Tyr-Asp-Val-Glu-Lys-Asn-	
	90	Asn-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Gly-Leu-Lys-Ser-Leu-Val-Ser-Lys-Gly-Thr-Leu-Val-Glu-Thr-	100
		Asn-Ser-Arg-Val-Lys-Ile-Ala-Val-Lys-Ser-Leu-Val-Thr-Lys-Gly-Thr-Leu-Val-Glu-Thr-	
	110	Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe-Lys-Leu-Asn-Lys-Lys-Ala-Ala-Ser-Gly-Glu-Ala-	120
		Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe-Lys-Leu-Asn-Lys-Lys-Ala-----Val-Glu-Ala-	
	130	Lys-Pro-Lys-Pro-----Lys-Lys-Ala-Gly-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Lys-Pro-Ala-Gly-----	140
		Lys-----Lys-Pro-Ala-Lys-Lys-Ala-Ala-Ala-Pro-Lys-Ala-Lys-Lys-Val-Ala-Ala-Lys-Lys-	
	150	-----Ala-Thr-Pro-Lys-Lys-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Gly-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-----Lys-	160
		Pro-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Lys-Val-Ala-----Ala-Lys-Lys-Ala-Val-Ala-Ala-Lys-	
	170	Lys-Thr-Pro-Lys-Lys-Ala-Pro-Lys-Pro-Lys-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Val-Ala-Lys-Pro-	180
		Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-----Lys-----Lys-Pro-----Ala-----	
	190	Lys-Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Val-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-----Lys-Ala-Val-Lys-Pro-Lys-	200
		-----Thr-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Thr-Lys-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-	
	210	Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-----Ala-Pro-Lys-----Pro-Lys-Ala-Ala-Lys-Lys-Thr-Ala-	220
		Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Val-Lys-----Lys-Pro-Ala-Ala-	
	225	Ala-Lys-Lys-Lys-Lys	
		Ala-Lys-Lys	

Figura 1C.- Secuencia de aminoácidos de las histonas H1 de timo de conejo y de trucha.

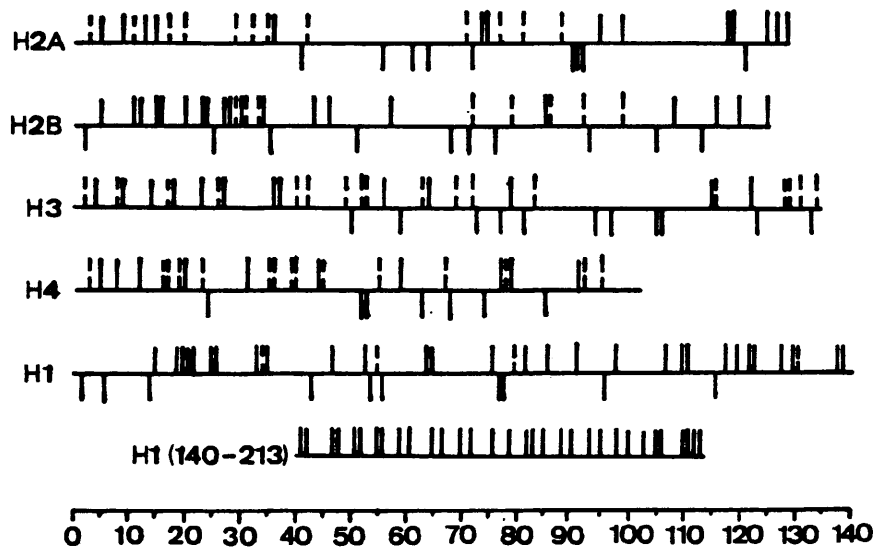


Figura 2.- Distribución de los residuos ácidos y básicos en la secuencia de las histonas de timo de ternera. Las barras hacia arriba indican lisina (---) y arginina (- -). Las barras hacia abajo indican residuos de aspártico y glutámico.

tremo carboxílico (Johnson y col., 1974).

Como ya se ha dicho, las histonas H3 y H4 presentan una gran conservatividad, la cual se manifiesta a lo largo de toda su estructura, si bien los sitios que muestran variaciones tienden a aparecer en la región amino-terminal (Isenberg 1979). Algo parecido ocurre con las histonas H2A y H2B, si bien, como ya se ha mencionado, el grado de variación es mayor (Von Holt y col., 1979; Isenberg, 1979; Urban y col., 1979). Así, en la histona H2B la mayor parte de las variaciones ocurren en el tercio amino-terminal de la molécula, mientras que los dos tercios carboxilo-terminales, con estructura globular, muestran gran conservatividad. Parece pues que a lo largo de la evolución se han conservado las regiones globulares. Las variaciones observadas en la región amino-terminal no afectan, por tanto, a la estructura de las histonas al encontrarse esta región en conformación aperiódica. A pesar de esto, en las histonas H3 y H4 parece conservarse también la región amino-terminal.

Por su parte, la histona H1, que es la más variable de las histonas (Kinkade y Cole, 1966; Bustin y Cole, 1969; Rall y Cole, 1971; Cole, 1977), presenta tres dominios diferentes. Los primeros cuarenta aminoácidos desde el extremo amino-terminal y los últimos cien en el extremo carboxilo-terminal son ricos en aminoácidos básicos y desestabilizantes de la α -hélice. La región intermedia entre los restos 41 y 115 es más hidrofóbica y típica de una proteína globular (Von Holt y col., 1979; Isenberg, 1979). Estudios físicos, tanto de H1 como de H5 y de péptidos aislados a partir de estas histonas, han demostrado que, en presencia

de sal, la región central adquiere estructura permaneciendo los extremos básicos desestructurados (Smerdon e Isenberg, 1976; Yaguchi y col., 1980; Chapman y col., 1978a; Tancredi y Temussi, 1979; Chapman y col., 1978b; Crane-Robinson y col., 1976; Avilés y col., 1978). Toda la conservatividad de secuencia que muestran las histonas sugiere que su estructura es fundamental para su función biológica.

Por otra parte, en las histonas existe una microheterogeneidad, que puede deberse a modificación de las cadenas laterales de los aminoácidos o a variaciones en la secuencia. En efecto, la estructura primaria de las histonas puede sufrir modificaciones covalentes como acetilación, fosforilación, metilación y poli(ADP)ribosilación (Isenberg, 1979). Especial es el caso de la H2A, la cual aparece en ocasiones unida covalentemente a la ubiquitina, formando la proteína A24 (Isenberg, 1979). Todas estas modificaciones covalentes postsintéticas se discutirán más adelante en otro apartado de esta misma Introducción.

Por otro lado, a pesar de la conservatividad ya comentada de estas proteínas, se ha comprobado que hay microheterogeneidad en la secuencia de una histona en una determinada especie. A este respecto, se han encontrado variables alélicas de histonas que son específicas de tejidos y que difieren de las mayoritarias en algunos restos de aminoácidos (Urban y col., 1979; Benezra y col., 1981). Como era de esperar, dada la menor conservatividad evolutiva de la H1, dentro de un mismo tejido puede haber al menos cuatro subtipos o variantes de secuencia de esta histona (Welch y Cole, 1979; Smerdon e Isenberg, 1976); la concentración

relativa de estos subtipos puede variar considerablemente entre diferentes tejidos de un mismo organismo (Urban y col., 1979; Isenberg, 1979; Seyedin y Kistler, 1979). Un caso extremo puede considerarse la histona H5 presente en eritrocitos de ave, puesto que estudios de homología de secuencia indican que probablemente se trate más de una variante de H1 que de un tipo diferente de histona (Yaguchi y col., 1977; Yaguchi y col., 1980).

Un aspecto muy interesante relacionado con esta microheterogeneidad de las histonas es que sus concentraciones varían a lo largo de la diferenciación celular. Así, se ha comprobado que existen subtipos de H1, H2A, H2B y H3 que se incrementan durante la embriogénesis o durante la maduración de ciertas células especializadas. En efecto, se ha comprobado que la síntesis de estas variantes de histonas comienza o acaba en determinados momentos de la embriogénesis (Newrock y col., 1978; Poccia e Hinegardner, 1975; Cohen y col., 1975) y se ha sugerido una íntima relación con la reestructuración de la cromatina (Newrock y col., 1978; Weintraub y col., 1978). También durante la espermatogénesis hay síntesis de histonas específicas o incluso de otras proteínas básicas. Así, en teleósteos las histonas son reemplazadas por protaminas (Sung y Dixon, 1970). Por su parte, en el esperma de equinodermos si hay histonas pero éstas son diferentes a las somáticas (Easton y Chalkley, 1972). Este fenómeno también ocurre durante la espermatogénesis de mamíferos, existiendo nuevas histonas tanto durante la formación (Shires y col., 1975; Kistler y Geroch, 1975) como en la maduración de las espermátidas (Kistler y col., 1973;

Marushige y Marushige, 1975; Balhorn y col., 1977). Con respecto a las variantes de H3 y H2A, las diferencias que se han logrado identificar se localizan en las zonas globulares, en secuencias ricas en aminoácidos ácidos e hidrofóbicos. Estas variaciones que, por tanto, difieren en su localización de las encontradas en la misma histona a lo largo de la evolución, pueden provocar cambios conformacionales en dichas histonas, lo que puede conducir a una alteración de la estructura de la cromatina.

1.1.1.1. Interacciones de las histonas

En primer lugar, las histonas H2A, H2B, H3 y H4 interaccionan entre sí formando complejos. Se ha comprobado que existen fuertes interacciones entre H2A y H2B y entre H2B y H4 para formar dímeros; y entre H3 y H4 para formar un tetrámero. La interacción entre H2B y H3 es más débil y las interacciones entre H2A y H4 y entre H2B y H3 lo son aún más (Isenberg, 1979). Esta jerarquía de interacciones se ha observado también en histonas aisladas de plantas (Spiker e Isenberg, 1977), hongos (Mardian e Isenberg, 1978^b) y protozoos (Glover y Gorovsky, 1978). Un hecho interesante es que pares de histonas mezclados, de guisante y ternera (Spiker e Isenberg, 1977), levadura y ternera (Mardian e Isenberg, 1978^b) y Tetrahymena y ternera (Glover y Gorovsky, 1978) interaccionan de forma casi idéntica a las histonas de una misma especie. Por este motivo, se ha sugerido (Isenberg, 1979; Spiker e Isenberg, 1977) que las zonas por las que interaccionan las diferentes histonas han sufrido a lo sumo

uno o dos cambios a lo largo de la evolución.

Por otra parte, el grupo de Bradbury ha llevado a cabo estudios sobre la localización de los sitios por los que las histonas interaccionan entre sí (Moss y col., 1976; Bohm y col., 1977; Bradbury y col., 1977). Estos estudios han sido efectuados principalmente mediante la técnica de resonancia magnética de protón, y han concluído que las histonas interaccionan a través de las regiones carboxilo-terminales, hidrofóbicas. Como ya se ha dicho, éstas son las regiones más conservadas a lo largo de la evolución en las histonas mayoritarias, confirmando la hipótesis anteriormente descrita. La presión selectiva que conserva la región globular puede provenir, en parte, de la necesidad de conservar las interacciones histona-histona. Por el contrario, es en estas regiones donde aparecen las variaciones identificadas entre diferentes subtipos de una misma histona a lo largo de la diferenciación celular, por lo que estas variaciones deben implicar cambios en las interacciones entre las moléculas de histonas y por tanto en la estructura de la cromatina. Por otra parte, la formación del complejo provoca en las histonas un aumento sustancial en el contenido de α -hélice y ya muy inferior en el de estructura β (Spiker e Isenberg, 1977; Moss y col., 1976; Baker e Isenberg, 1976).

Con respecto a la histona H1, ésta no muestra la tendencia a autoagregar que muestran las otras histonas (Smerdon e Isenberg, 1976; Sperling y Bustin, 1976). Un hecho interesante que se ha descrito es que diferentes subtipos de H1 pueden interaccionar fuerte y selectivamente con las PCNH HMG-1 y HMG-2 (Smerdon e Isenberg, 1976; Yu y

Spring, 1977).

En lo que se refiere a las interacciones de las histonas con el DNA, deben jugar un papel importante las interacciones iónicas, en las que intervendrán los restos básicos del extremo amino-terminal (o de ambos en el caso de la H1). A este respecto, las variaciones encontradas entre las secuencias de esta región de una histona en diferentes organismos no afectarán grandemente estas interacciones. Un caso especial es el de la histona H1, quizá debido al hecho de mostrar un mayor número de variantes. Así, se ha comprobado que diferentes subfracciones de H1 se unen diferencialmente al DNA (Welch y Cole, 1979; Welch y Cole, 1980). Por el contrario, las modificaciones covalentes de las histonas, más específicas, si modifican la carga neta de estas regiones, por lo que deben modificar estas interacciones. Debido a ello se han relacionado con la regulación de la expresión génica. Este tema será tratado posteriormente en esta Introducción al abordar la descripción de la estructura de la cromatina.

1.1.2. PROTEINAS CROMOSOMALES NO HISTONAS

Se trata del resto de proteínas que se aíslan en la cromatina junto con el DNA (Elgin y Weintraub, 1975). Difieren de las histonas en que no son básicas, conteniendo elevadas proporciones de aminoácidos ácidos. Puesto que este grupo de proteínas se define por exclusión, es lógico que exhiba una gran heterogeneidad, con funciones muy dispares, pudiendo presentar actividad enzimática (nucleasas, DNA

polimerasa, etc) o ser simplemente proteínas estructurales. Los estudios realizados han sugerido su implicación en mecanismos de respuesta hormonal (Teng y Hamilton, 1970; Spelsberg y col., 1971). Otros trabajos han demostrado que algunas de estas proteínas estimulan la transcripción (Stein y col., 1974; Spelsberg y col., 1973; Kostraba y Wang, 1973; Stein y col., 1976; James y col., 1977; Bekhor y Samal, 1977; Jansin y col., 1977). Pero, tampoco faltan las citas en las que se les sugiere un papel estructural (Goodwin y col., 1977a; Chan y Liew, 1977; Staron y col., 1977; Caifa y col., 1981).

Las proteínas no histonas presentan una gran variabilidad en el peso molecular y composición de aminoácidos (Lestourgeon y Rush, 1973) y su número es variable según las especies. Sin embargo, se ha comprobado que no hay muchas diferencias entre las PCNH de diferentes tejidos de un mismo organismo, si bien se han encontrado algunas específicas de tejidos (Elgin y Bonner, 1970; Shaw y Huang, 1970; McGillivray y col., 1971; Teng y col., 1971).

1.1.3. PROTEINAS HMG

Entre las proteínas no histonas hay un determinado grupo que ha sido y es objeto de un intenso estudio, siendo quizás las más conocidas. Se trata de las proteínas HMG (High Mobility Group). Se caracterizan por su alta movilidad electroforética (Goodwin y col., 1973) y por su elevado contenido en aminoácidos básicos y ácidos, que llegan a ser más del 50% (Goodwin y col., 1978a). Por tanto, son

5301696460

proteínas relativamente pequeñas y muy cargadas.

Estas proteínas se descubrieron en timo de ternera (Johns, 1964), y si bien, en principio, parecía haber un mayor número, finalmente se ha concluido que hay cuatro proteínas HMG mayoritarias: HMG-1, HMG-2, HMG-14 y HMG-17 (Goodwin y col., 1973; Goodwin y col., 1975a). Estas proteínas se han descrito en distintos tejidos de mamíferos, siendo muy similares a las de timo de ternera (Goodwin y col., 1975a; Goodwin y col., 1977b). Más tarde se han aislado nuevas proteínas HMG en timo de ternera, pero ya minoritarias (Goodwin y col., 1980; Walker y col., 1978a; Walker y col., 1978b).

Estas proteínas no solo se han descrito en mamíferos. En realidad se ha descrito su existencia en todos los tejidos y organismos eucarióticos estudiados hasta hoy. Así, están presentes en eritrocito y timo de aves (Sterner y col., 1978; Rabbani y col., 1978; Mathew y col., 1979; Vidali y col., 1977), testículo e hígado de trucha (Marushige y Dixon, 1971; Watson y col., 1977; Rabbani y col., 1980); dípteros (Rodríguez-Alfageme y col., 1976; Franco y col., 1977; Márquez y col., 1982; Bassuk y Mayfield, 1982), vegetales (Spiker y col., 1978), protozoos (Hamana e Iwai, 1979) y levaduras (Spiker y col., 1978; Weber e Isenberg, 1980).

Las HMG, aunque son menos abundantes que las histonas aparecen en gran cantidad en el núcleo, alrededor de 10^6 moléculas en cada uno de ellos. Debido a esta elevada concentración se ha propuesto que estas proteínas son componentes estructurales de la cromatina (Goodwin y col., 1978a;

Nicolini, 1978).

Estas proteínas han sido muy estudiadas en mamíferos, sobre todo en timo de ternera. Los datos de que se dispone parecen indicar la existencia de dos familias diferentes, las cuales difieren en el peso molecular y en otras características como por ejemplo su interacción con el DNA. En la primera familia, proteínas HMG de alto peso molecular, se incluyen la HMG-1 y la HMG-2. En la segunda familia, proteínas HMG de bajo peso molecular, se incluyen la HMG-14 y la HMG-17. Otras proteínas HMG que también están bien caracterizadas son las de testículo de trucha, HMG-T y H6; la HMG-T se incluye en la primera familia y la H6 en la segunda.

Las proteínas HMG-1 y HMG-2 tienen un peso molecular de alrededor de 26000 (Shooter y col., 1974; Goodwin y col., 1975b; Walker y col., 1980a) y contienen un 25% de residuos básicos y un 30% de residuos ácidos (Tabla III). Al igual que ocurre con las histonas estos restos cargados muestran una distribución asimétrica: los residuos básicos se concentran en la región amino-terminal y los residuos ácidos en la carboxilo-terminal (Walker y col., 1977; Walker y col., 1978). Ambas proteínas son muy semejantes como indican datos de secuencia (Walker y col., 1977) y el hecho de presentar reacción inmunológica cruzada (Smith y col., 1978; Bustin y col., 1978). Se da la circunstancia de que ambas proteínas poseen una región en la zona carboxilo-terminal, constituida exclusivamente por restos ácidos: 41 en la HMG-1 y 35 en la HMG-2 (Walker y col., 1979b).

Tanto la HMG-1 como la HMG-2 adquieren estructura

TABLA III.- Composición de aminoácidos de las proteínas HMG1 y HMG2 de timo de ternera (Goodwin y col., 1978) y de la HMG-T de testículo de trucha (Watson y col., 1977). Los valores se expresan en moles por ciento.

	<u>HMG1</u>	<u>HMG2</u>	<u>HMG-T</u>
Asp	10.7	9.3	11.45
Thr	2.5	2.7	2.99
Ser	5.0	7.4	4.57
Glu	18.1	17.5	9.07
Pro	7.0	8.9	7.74
Gly	5.3	6.5	17.31
Ala	9.0	8.1	8.29
Val	1.9	2.3	3.90
Cys	trazas	trazas	0.53
Met	1.5	0.4	2.04
Ile	1.8	1.3	1.63
Leu	2.2	2.0	2.69
Tyr	2.9	2.0	2.28
Phe	3.6	3.0	3.35
Lys	21.3	19.4	15.39
His	1.7	2.0	1.50
Arg	3.9	4.7	5.26
Trp	-	-	0.38

al aumentar la fuerza iónica. A este respecto, se ha comprobado que en disolución salina poseen un 40-50% de α -hélice, exhibiendo además estructuración en dominios (Cary y col., 1976; Baker y col., 1976; Reeck y col., 1982; Cary y col., 1983; Carballo y col., 1983). Con respecto a su interacción con el DNA, las regiones básicas de las proteínas se unen iónicamente a los grupos fosfato del DNA, quedando los residuos ácidos libres. En un principio se pensó que estabilizaban al DNA frente a la desnaturalización térmica (Yu y col., 1977) pero, posteriormente, se ha comprobado que lo desestabilizan (Javaherian, 1977). Parece ser que estos resultados contradictorios se deben a la dependencia de la estabilización por la fuerza iónica (Javaherian y col., 1979), pareciendo que a concentraciones de sal en las que las HMG están estructuradas, se produce la desestabilización (Butler y col., 1985). En cualquier caso este tema no está claro y puede ser que esta variación del efecto de las HMG sobre el DNA con la fuerza iónica juegue un importante papel en los cambios conformacionales del DNA en la cromatina. Además, parecen desenrollar la doble hélice del DNA por desnaturalización local de los pares de bases (Javaherian y col., 1978, 1979; Yoshida y Shigura, 1984) y tienen afinidad por DNA monocatenario, si bien esta afinidad es dependiente de la fuerza iónica. Esto también se ha observado en las HMG de alto peso molecular de eritrocito de pollo (Bidney y Reeck, 1978; Isackson y col., 1981; Isackson y col., 1979). Esto confirma los resultados de desnaturalización térmica. A este respecto, Hamada y Bustin (1985) han comprobado que las HMG-1 y HMG-2 se unen preferentemente a DNA superenrollado

en comparación con DNA lineal debido a la presencia de regiones de DNA monocatenario en ese DNA. Además, existe una jerarquía de sitios de unión al DNA lo que sugiere que pueden afectar selectivamente la estructura de distintas regiones en el genoma (Cockerill y Goodwin, 1983). Así, Sashi y col. (1982) han observado que la unión de estas proteínas al DNA afecta la digestión enzimática del mismo por varias nucleasas.

En lo que respecta a la HMG-T de testículo de trucha, presenta bastantes similitudes con las HMG-1 y HMG-2, aunque su peso molecular es ligeramente superior (Watson y col., 1977). Así, los datos de secuencia de que se dispone de la región amino-terminal revelan la existencia de una gran homología con las HMG de mamíferos (Watson y Dixon, 1981). Al igual que éstas adquiere estructura secundaria y terciaria ordenadas, al aumentar la fuerza iónica, aunque solo llega a formar un 9% de α -hélice (Cary y col., 1981). Con respecto a su interacción con el DNA, se ha comprobado por resonancia magnética nuclear que toda la cadena de HMG-T se une al DNA (Cary y col., 1981) y no se da unión a través de un dominio particular como en el caso de las HMG-1 y HMG-2.

Por otra parte, las proteínas HMG-14 y HMG-17 difieren de las anteriores en algunas características, pero al igual que ellas poseen unos niveles elevados de aminoácidos ácidos y básicos (Tabla IV). Estas proteínas tienen un tamaño similar, con un peso molecular de alrededor de 10000 (Walker y col., 1979a; Walker y col., 1979b); se han secuenciado totalmente (Walker y col., 1977b; Walker y col.,

TABLA IV.- Composición de aminoácidos de las proteínas HMG14 y HMG17 de timo de ternera (Goodwin y col., 1978) y de la H6 de testículo de trucha (Watson y col., 1979). Los valores se expresan en moles por ciento.

	<u>HMG14</u>	<u>HMG17</u>	<u>H6</u>
Asp	8.1	10.8	6.52
Thr	4.2	1.1	1.76
Ser	7.8	2.1	6.07
Glu	17.1	9.5	6.85
Pro	8.5	11.7	11.06
Gly	6.5	9.9	7.65
Ala	14.5	16.6	27.32
Val	4.2	1.8	3.66
Cys	0.7	-	-
Met	-	-	-
Ile	0.5	-	-
Leu	2.0	0.9	1.74
Tyr	-	-	-
Phe	-	-	-
Lys	19.0	21.9	23.61
His	0.3	-	-
Arg	5.6	3.7	4.75
Trp	-	-	-

1979a), lo que ha permitido observar una distribución irregular de las cargas, al igual que sucede con las HMG de alto peso molecular. Así, los dos tercios amino-terminales son muy básicos y la zona carboxilo-terminal es ácida (Walker y col., 1977b; Walker y col., 1977a). Al contrario que HMG-1 y HMG-2, las HMG-14 y HMG-17 carecen de estructura secundaria ordenada en disolución (Abercrombie y col., 1978; Javaherian y Amini, 1978), lo cual es lógico dado el elevado contenido en aminoácidos desestabilizadores de α -hélice (Goodwin y col., 1978). Con respecto a su unión al DNA, es mediante interacciones de tipo iónico. Mediante RMN se ha comprobado que el segmento de unión de la HMG-17 al DNA se encuentra entre los residuos 15 y 40 (Abercrombie y col., 1978). La HMG-14 tiene un segmento homólogo entre los residuos 11 y 36 por lo que posiblemente éste lleve a cabo una función similar. Por otro lado, se ha comprobado que estabilizan al DNA frente a la desnaturalización térmica, sin afectar, al menos en gran medida, la estructura de doble hélice (Javaherian y Amini, 1978), sugiriendo los resultados su unión a DNA bicatenario.

La H6 de testículo de trucha, que se incluye en esta familia de HMG de bajo peso molecular, ha sido totalmente secuenciada (Watson y col., 1979). Presenta una gran homología con las HMG-14 y HMG-17 de timo de ternera, si bien su tamaño es menor. Además, tampoco es capaz de adquirir estructura secundaria ordenada con la fuerza iónica y la interacción con el DNA es similar a la de HMG-14 y HMG-17. Así, parece ser la región amino-terminal la que interacciona con el DNA, en concreto la región entre los residuos 10 y 35

que es homóloga a la zona de unión de HMG-14 y HMG-17 (Cary y col., 1981).

Con respecto a su función, ya se ha comentado la hipótesis de que las HMG sean proteínas estructurales (Nicolini, 1978; Goodwin y col., 1978). Por otra parte, hay evidencia de su asociación con la cromatina activa. Así, se ha comprobado que las proteínas HMG se liberan de la cromatina en condiciones de digestión suave con DNasa I (Levy-Wilson y col., 1979; Vidali y col., 1977). Si se tiene en cuenta que esta enzima digiere preferentemente las regiones activas de la cromatina (Weintraub y Groudine, 1976; Garel y Axel, 1976; Levy-Wilson y col., 1980; Levy-Wilson y Dixon, 1978), la rápida liberación de las HMG sugiere su localización en tales regiones y, por tanto, que jueguen un papel importante en la expresión genética. Además, con procedimientos que separan las regiones transcripcionalmente activas de las inactivas (Levy-Wilson y Dixon, 1979) se ha encontrado que las regiones activas están enriquecidas en proteínas HMG (Weisbrod, 1982). Este tema se abordará nuevamente en un apartado posterior.

1.2. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

El conocimiento de la estructura de la cromatina ha experimentado un gran avance en los últimos años gracias a la utilización conjunta de técnicas físicas y bioquímicas (Kornberg, 1977; Felsenfeld, 1978; Igo-Kemenes y col., 1982; McGhee y Felsenfeld, 1980). Los primeros estudios de difracción de rayos X de cromatina (Richards y Pardon, 1970;

Pardon y col., 1967; Garret, 1971) dieron lugar a un modelo en el que el DNA se encontraba formando una superhélice continua que era mantenida por su interacción con las histonas. Este modelo fue aceptado hasta 1973 en que estudios de microscopía electrónica (Olins y Olins, 1973) mostraron una estructura discontinua y repetitiva para la cromatina. Esta aparecía con la apariencia de cuentas de collar a las que se denominó cuerpos). La existencia de una periodicidad estructural en cromatina se confirmó al digerir la cromatina con nucleasas (Hewish y Burgoyne, 1973; Van Holde y col., 1974; Honda y col., 1974; Noll, 1974a). La digestión a diferentes tiempos dió origen a fragmentos cuyos tamaños de DNA eran múltiplos de 200 pares de bases (pb), que sería la longitud del DNA de la unidad estructural. Por otra parte, la cromatina digerida mostraba, en microscopía electrónica, cadenas de partículas semejantes a las visualizadas en cromatina intacta (Van Holde y col., 1974) si bien el número de partículas por cadena disminuía con el tiempo de digestión.

Estas partículas globulares que posteriormente recibieron el nombre de nucleosomas (Kornberg, 1974; Oudet y col., 1975) se consideran las unidades básicas de la cromatina. La estructura nucleosomal de la cromatina se ha encontrado en todos los organismos eucarióticos investigados así como en todo tipo de células somáticas de organismos pluricelulares (Vease Tabla V). Además, la estructura nucleosomal existe independientemente del estado de la cromatina. Así, se encuentra dicha estructura en cromatina condensada y difusa (Bostock y col., 1976); en cromatina en interfase y cromosomas en metafase (Howze y col., 1976; Wrigler y Axel,

TABLA V.- Diferentes organismos en los que se ha detectado una estructura nucleosomal en su cromatina.

<u>Tipo de célula</u>	<u>Contenido en DNA del nucleosoma (pb)</u>	
<u>Aspergillus</u>	154	(Morris, 1976)
Neurona cortical de conejo	162	(Thomas y Thompson, 1977)
<u>Saccharomyces</u>	165,163	(Thomas y Furber, 1976; Lohr y col., 1977b)
<u>Neurospora</u>	170	(Noll, 1976)
Células HeLa	183	(Lohr y col., 1977b; Noll y Kornberg, 1977; Thomas y Furber, 1976)
Hígado de rata	198,196	(Morris, 1976b)
Eritrocito de pollo	212	
Esperma de erizo de mar	241	(Spadafora y col., 1976)

1976); en cromatina activa y no activa (Brown y col., 1977; Reeves y Jones, 1976; Mathis y Gorovsky, 1976; Levy-Wilson y Dixon, 1979; Gaubatz y col., 1979).

1.2.1. ORGANIZACION DEL NUCLEOSOMA

El nucleosoma se compone de unos 200 pb de DNA enrollados alrededor de un octámero de histonas (H2A,H2B,H3,H4)₂. Además, cuando hay, una molécula de la histona H1 forma también parte del nucleosoma. Estas estructuras son sensibles al ataque de las nucleasas, habiéndose comprobado que el tamaño del DNA disminuye con el tiempo de digestión (Sollner-Webb y Felsenfeld, 1975; Shaw y col., 1976; Axel, 1975). De esta forma se obtiene una estructura intermedia en el proceso de digestión que contiene 160 pb y que se aísla con la H1 (Varshavsky y col., 1976; Simpson, 1978a) y una partícula más estable que contiene 146 pb de DNA y el octámero de histonas, pero no H1 (Prunell y col., 1979; Lutter, 1979; Bryan y col., 1979; Simpson y Kunzler, 1979). Esta partícula ha recibido el nombre de nucleosoma límite o core nucleosomal y ha sido ampliamente estudiada. El DNA que une estas partículas se ha denominado DNA internucleosomal o DNA linker. En los diferentes organismos estudiados se ha comprobado que el tamaño del nucleosoma límite es el mismo en todas las especies. Esto lleva a la conclusión de que la variabilidad radica en el DNA internucleosomal.

1.2.1.1. Core nucleosomal

Los primeros datos acerca de las dimensiones del core nucleosomal surgieron de estudios de microscopía electrónica (Olins y Olins, 1974; Oudet y col., 1975) que lo mostraron como una partícula cilíndrica. Posteriormente, estudios de dispersión de neutrones demostraron que el DNA se encuentra enrollado alrededor del octámero de histonas (Baldwin y col., 1975) y sugirieron para el nucleosoma límite una forma de elipsoide oblató con un eje mayor de 100 Å y un eje menor de 50 Å (Pardon y col., 1977; Richards y col., 1977). El DNA se encontraría enrollado alrededor del octámero de histonas dando 1.7 vueltas de superhélice con un paso de rosca de 30 Å y un diámetro de 100 Å. Este modelo concuerda con los resultados obtenidos mediante estudios de difracción de rayos X (Finch y col., 1977). En conclusión, estos estudios mostraron el nucleosoma como un disco de 110 Å de diámetro y 57 Å de altura con el DNA localizado en el exterior. La superhélice de DNA tendría 90 Å de diámetro y 28 Å de paso de rosca, con 75-82 pb por vuelta de superhélice (Figura 3). Posteriores trabajos de difracción de rayos X con una resolución de 5 Å (Finch y col., 1981) complementados por difracción de neutrones con variación de contraste (Bentley y col., 1981; Bentley y col., 1984) han confirmado dichos resultados. Según este modelo el octámero de histonas en el core nucleosomal tendría unos 70 Å de diámetro y 57 Å de altura (Finch y col., 1977; Richmond y col., 1984). Sin embargo, recientemente, Burlingame y col. (1985) han realizado difracción de rayos X con una resolución de 3.3 Å de

cristales de octámeros de histonas (Burlingame y col., 1984) y han propuesto una estructura diferente con 70 Å de diámetro y 110 Å de longitud para el octámero de histonas. Actualmente hay una gran controversia acerca de ello (Klug y col., 1985; Moudrianakis y col., 1985a; Uberbacher y Bunick, 1985; Moudrianakis y col., 1985b)

1.2.1.1.1. Conformación del DNA

Los estudios espectroscópicos apoyan el que el DNA nucleosomal se encuentra en estructura B (Thomas y col., 1977; Goodwin y Brahm, 1978; Cotter y Lilley, 1977; Feigon y Kearns, 1979). Sin embargo, no se conoce con certeza la disposición del DNA en el nucleosoma. Por una parte se ha sugerido la existencia de unas discontinuidades en la doble hélice que conecten regiones en estructura B (Crick y Klug, 1975; Sobell y col., 1976). Sin embargo, no se ha detectado ninguna conformación de este tipo ni por resonancia magnética de protón ni de fósforo (Cotter y Lilley, 1977; Feigon y Kearns, 1979; Kallenbach y col., 1978; Klevan y col., 1979; Shindo y col., 1980). Por otra parte, la doble hélice del DNA podría enrollarse alrededor del octámero de histonas mediante una deformación continua a todo lo largo de su longitud (Levitt, 1978; Sussman y Trifonov, 1978) sin necesidad de violar ninguna restricción en los ángulos de enlace. En conclusión, aunque el enrollamiento del DNA puede no ser completamente uniforme (Bryan y col., 1979; Simpson y Shindo, 1979) no hay evidencia acerca de la existencia de discontinuidades en el DNA nucleosomal.

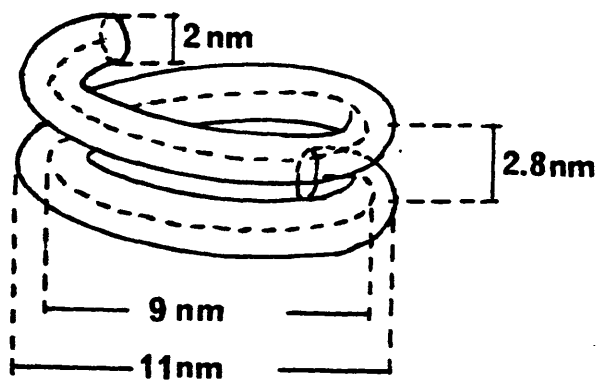
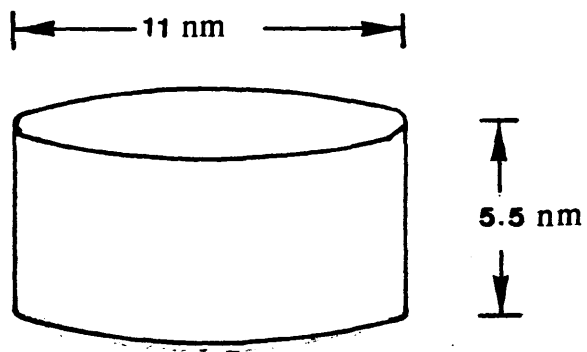


Figura 3.- Modelo de nucleosoma y de la superhélice de DNA según el modelo de Finch y col. (1977)

Con el fin de investigar la estructura del DNA en el nucleosoma límite, se han digerido estas partículas con diferentes endonucleasas, fundamentalmente con DNasa I (Sollner-Webb y col., 1978; Noll, 1974b; Sollner-Webb y col., 1976; Simpson y Whitlock, 1976; Sollner-Webb y Felsenfeld, 1977; Lutter, 1977; Noll, 1977; Whitlock y col., 1977; Lutter, 1978), nucleasa micrococal (Sollner-Webb y Felsenfeld, 1975; Axel, 1975; Shaw y col., 1976; Axel y col., 1974; Camerini-Otero y col., 1976; Whitlock, 1977; Sollner-Webb y col., 1978) y DNasa II (Sollner-Webb y col., 1978; Sollner-Webb y col., 1976; Whitlock y col., 1977; Oosterhof y col., 1975; Altenburger y col., 1976; Horz y col., 1980). Estas enzimas solo producen cortes en una pequeña fracción de los enlaces fosfodiéster de cada hebra del DNA, generando fragmentos que en electroforesis en geles en condiciones desnaturalizantes, en los que se separan las dos hebras, dan un patrón escalonado con fragmentos espaciados por intervalos de 10 nucleótidos. Este espaciamiento está relacionado con la repetitividad de la doble hélice de DNA (Noll, 1974b). Esto se ha confirmado al observar que DNA libre, adsorbido sobre fosfato cálcico, al ser digerido con DNasa I produce un patrón de fragmentos similar (Liu y Wang, 1978). Esto parece indicar que la enzima solo corta cuando el enlace fosfodiéster presenta una determinada orientación. Los resultados anteriores indican la existencia de unos determinados sitios de digestión para DNasa I dentro del nucleosoma límite, separados en cada hebra por 10 nucleótidos, lo que parece indicar que la estructura del DNA no varía. Sin embargo, el patrón de fragmentos originados en la

digestión a partir del nucleosoma límite es más complicado que el que resultaría de esa forma.

Así, mediante la digestión con DNasa I de nucleosomas límite cuyo extremo 5' estaba marcado con ^{32}P , se ha comprobado que de los 13 sitios potenciales de rotura hay algunos que son atacados preferentemente por la enzima, lo que indica que no todos los sitios son igual de accesibles (Figura 4). De esta forma se ha encontrado que los sitios localizados a aproximadamente 30, 60, 80 y 110 nucleótidos desde el extremo 5' están relativamente protegidos del ataque enzimático (Simpson y Whitlock, 1976; Lutter, 1978). La explicación más sencilla para estos resultados es que las histonas bloqueen tales sitios específicos. Finch y col. (1977) han construido un modelo basado en la frecuencia de cortes en cada sitio de rotura. El análisis de la cinética de digestión mostró la existencia de una correlación entre la frecuencia de corte de los sitios separados por 80 pb, de forma que, por ejemplo, los sitios localizados en los nucleótidos 30 y 110 a partir del extremo 5' estaban muy protegidos. Ello les hizo sugerir que el DNA formaba una superhélice de 80 pb por vuelta. De esta forma, dos sitios del DNA separados por esta distancia se encontrarán juntos (30 Å) y tendrán ambientes similares, pudiendo ser protegidos simultáneamente por las histonas del octámero (Figura 5). Los datos apoyan también la existencia de un eje binario de simetría que se encontraría alrededor del par de bases 70. También a partir de estos datos se ha deducido que el DNA forma una superhélice toroidal a izquierdas (Figura 6).

Más recientemente se ha mostrado que la periodici-

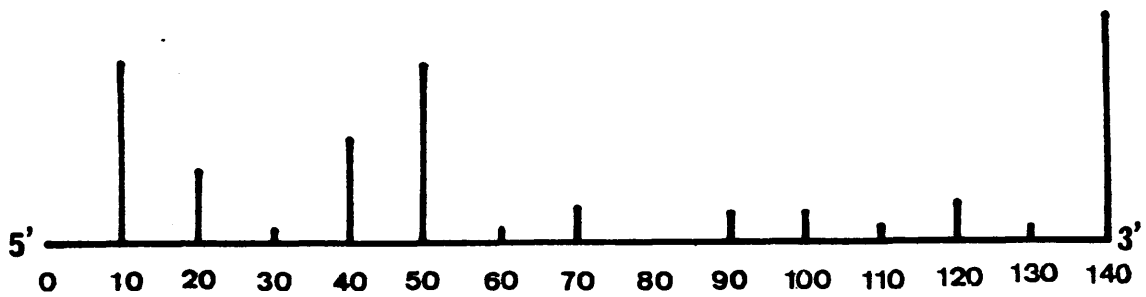


Figura 4.- Distribución de los sitios de ataque por la DNasa I a lo largo de una de las cadenas del DNA nucleosomal. La altura de la barra es proporcional a la susceptibilidad del sitio al ataque enzimático.

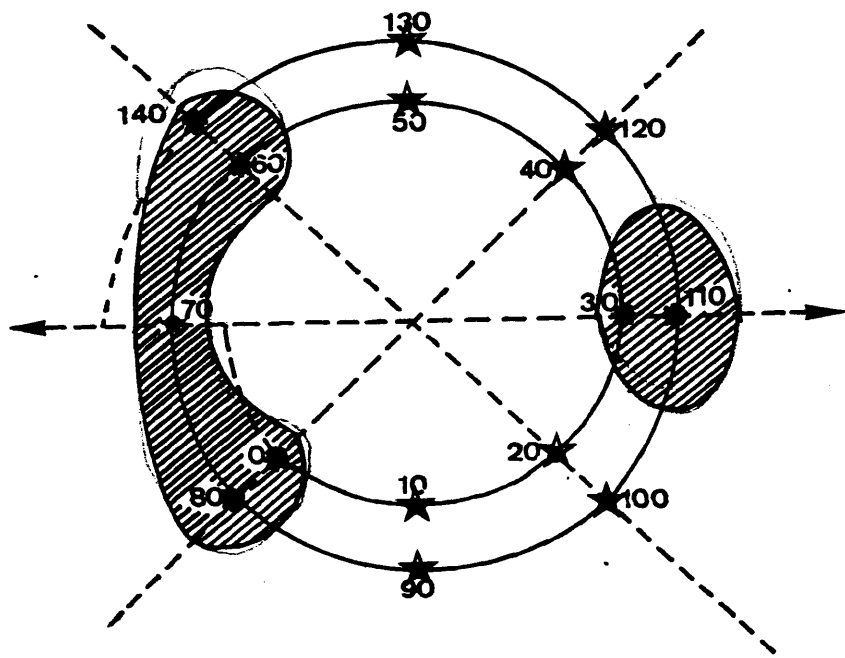


Figura 5.- Situación en el espacio de los sitios de ataque por DNasa I: (★) sitios de alta frecuencia de corte; (✱) sitios de baja frecuencia; (●) sitios de frecuencia intermedia. Las zonas sombreadas (A y B) muestran la agrupación de los sitios de corte de frecuencia de corte baja e intermedia. La flecha indica el eje de simetría propuesto.

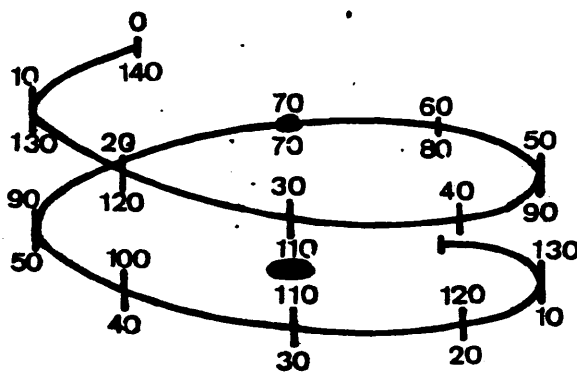


Figura 6.- Modelo propuesto para la superhélice del DNA nucleosomal, mostrando los sitios de corte por las nucleasas y el eje de simetría.

dad de corte de la DNasa I es de 10.4 nucleótidos y no de 10.0 (Prunell y col., 1979; Lutter, 1979; Bryan y col., 1979; Simpson y Kunzler, 1979). Ello puede reflejar la verdadera periodicidad del DNA en el nucleosoma o solo los requerimientos geométricos de la nucleasa (Prunell y col., 1979). Basado en esto, Trifonov y Betteken (1979) han sugerido una explicación alternativa al patrón de cortes de la DNasa I. Según estos autores, si el número de pares de bases por vuelta en la doble hélice de DNA no es entero, la orientación de los enlaces susceptibles al ataque enzimático en relación a la superficie nucleosomal no será la misma en cada uno de los sitios potenciales de rotura. Si la enzima solo puede acercarse al nucleosoma con una determinada geometría posicional, cada sitio mostraría una diferente susceptibilidad dependiendo de su orientación. De esta forma, la diferente frecuencia de rotura de cada sitio no requeriría protección por parte de las histonas como en el anterior modelo. En cualquier caso, la situación no es tan sencilla como se puede desprender de estos modelos, pues algunos trabajos han sugerido que la distancia entre los sitios de corte es menor en los extremos del nucleosoma que en su parte central (Lutter, 1979).

1.2.1.1.2. Estudio de las histonas como componentes del nucleosoma

Como ya se ha mencionado, el nucleosoma límite contiene dos moléculas de cada una de las histonas H4, H3, H2B y H2A que coinciden en mostrar una distribución asimé-

trica de los aminoácidos, lo que le confiere una estructura globular con el extremo amino-terminal desestructurado. El estudio de las interacciones entre las histonas y el DNA se abordó mediante estudios de entrecruzamiento químico de histonas con el DNA (Mirzabekov, 1980; Shick y col., 1980; Belyavsky y col., 1980; Karpov y col., 1982) y fotoentrecruzamiento de histonas al DNA (Mandel y col., 1979). Los resultados obtenidos han llegado a sugerir un modelo en el que la disposición secuencial de las histonas a lo largo de los 140 nucleótidos desde el extremo 5' es H2B-H4-H3-(H2B+H3)-H2B-H2A-(H2A+H3). En este modelo cada histona interacciona con regiones de 6 pb de largo y separadas por 10 pb. La distribución es similar sobre cada hebra del DNA, lo que supone una distribución simétrica que concuerda con la disposición simétrica de sitios de rotura con DNasa I, existiendo un eje de simetría binario, perpendicular al de la superhélice, que pasa por el par de bases 70 del nucleosoma límite (Figuras 7 y 8).

Dada la estructura que presentan las histonas, se supuso que su interacción con el DNA era a través de los residuos básicos, los cuales se unirían a los grupos fosfato del DNA (DeLange y Smith, 1971). Esto vino apoyado por los primeros estudios físicos realizados sobre histonas aisladas unidas a DNA (Boublik y col., 1971). Sin embargo, la titulación de los grupos fosfato (Doenecke, 1977; Giradet y Lawrence, 1979) ha indicado que solo un 50% de los grupos fosfato interacciona con las histonas, lo que está de acuerdo con el balance de cargas en el nucleosoma (Mirzabekov y Rich, 1979). Por su parte, la digestión con tripsina de los

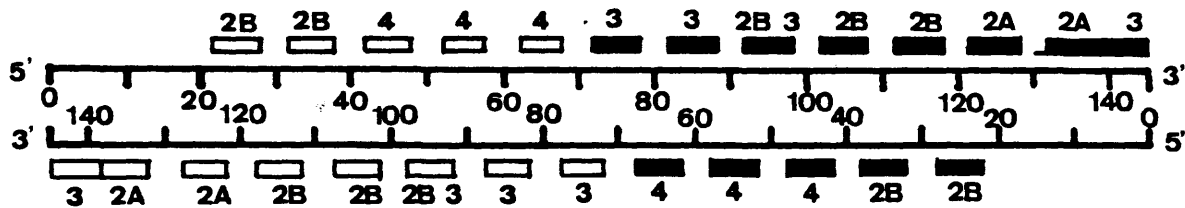


Figura 7.- Disposición secuencial de las histonas del core nucleosomal sobre ambas cadenas de DNA.

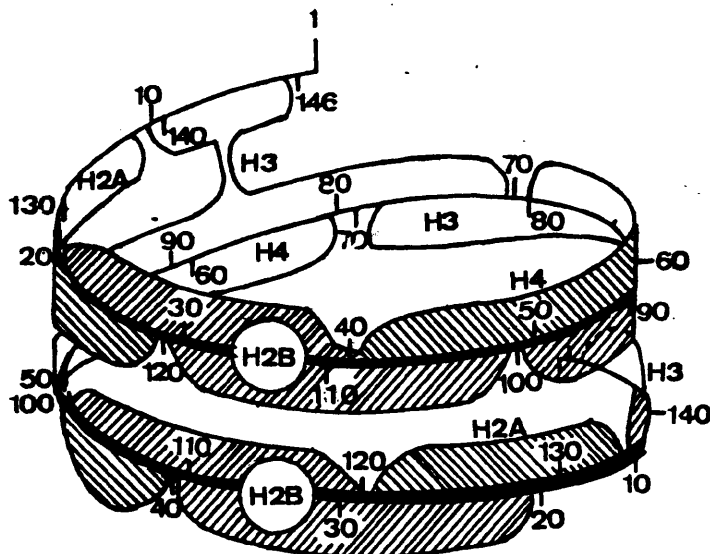


Figura 8.- Modelo tridimensional para la distribución de las histonas en el core nucleosomal.

nucleosomas (Weintraub y van Lente, 1974; Weintraub, 1975; Lilley y Tatchell, 1977; Doenecke y Galwitz, 1982; Grigoriev y Krashennikov, 1982; Simpson y col., 1978) provocan solo ligeros cambios estructurales de los mismos. La tripsina elimina los fragmentos amino-terminales de las histonas, por lo que la parcial persistencia de la estructura nucleosomal indica la participación de otras regiones de las histonas en su interacción con el DNA. Esto se ve confirmado por el hecho de que la interacción de las histonas individuales con el DNA no se ve prácticamente afectada tras la digestión con tripsina de sus regiones amino-terminales (Palter y Alberts, 1979). Dado que la digestión triptica elimina más lisinas que argininas se ha sugerido que el papel de estas últimas sea más importante, lo que viene confirmado por la inaccesibilidad que muestran según estudios de RMN (Cary y col., 1978; Nicola y col., 1978) y de modificación química (Ichimura y col., 1982) Además, se ha comprobado que la unión de los restos de lisina al DNA es débil (Manning, 1978). Finalmente, otros estudios han sugerido que además de la intervención de los residuos básicos, habría una unión secundaria mediante puentes de hidrógeno entre el enlace peptídico y las bases (Cary y col., 1982) La interacción entre las histonas y el DNA parecen pues ocurrir a través de todos sus dominios estructurales, aunque quizás especialmente por las regiones amino-terminales.

Por su parte, el estudio de la relación entre las histonas dentro del nucleosoma límite se ha abordado mediante métodos de entrecruzamiento. Se ha comprobado que la histona H2B puede entrecruzarse con la H2A (DeLange y col.,

1979) y con la H4 (Martinson y col., 1979). Estos experimentos han permitido obtener trímeros H2A-H2B-H4. El análisis de los puntos por donde se entrecruzan estas histonas parece indicar que la H2B posee tres dominios diferentes: una región carboxilo-terminal que interacciona con la H4, una región central que interacciona con la H2A y la región amino-terminal básica (Martinson y col., 1979).

Por otra parte, se ha observado que dos moléculas de H3 pueden entrecruzarse por un puente disulfuro formado entre dos restos de cisteína (Camerini-Otero y Felsenfeld, 1977), lo que no parece afectar a la formación del nucleosoma límite.

Por último, también se pueden entrecruzar las histonas H3 y H4 (Bonner y Pollard, 1975) lo cual concuerda con la proximidad de estas histonas en el octámero.

Como ya se ha indicado en otro apartado de esta Introducción, las cuatro histonas del nucleosoma límite pueden sufrir cinco tipos de modificaciones "in vivo": acetilación, fosforilación, metilación, ADP-ribosilación y en el caso de la histona H2A, la unión covalente a la ubiquitina (Isenberg, 1979).

Con respecto a la acetilación, las cuatro histonas del nucleosoma límite sufren la acetilación postsintética de uno o más residuos de lisina en el tercio amino-terminal de la molécula. Con respecto al significado biológico de esta modificación, ésta se ha relacionado con la actividad génica (Ruiz-Carrillo y col., 1975; Allfrey, 1977). Por otra parte, el estudio del efecto de la acetilación se ha podido llevar a cabo gracias al descubrimiento de

que el butirato inhibe la desacetilación de las histonas (Riggs y col., 1977), lo que ha permitido obtener histonas hiperacetiladas "in vivo". De esta forma se ha comprobado que la hiperacetilación de las histonas altera las propiedades de digestión del DNA con nucleasas (Simpson, 1978b; Sealy y Chalkley, 1978; Vidali y col., 1978; Mathis y col., 1978; Nelson y col., 1979), de forma que recuerda las propiedades de los genes activos (Weintraub y Groudine, 1976; Bloom y Anderson, 1978). Como posible explicación se ha sugerido que la acetilación de las lisinas, puesto que elimina su carga positiva, debilita la unión entre las histonas y el DNA.

En cuanto a la fosforilación, también pueden ser fosforiladas las cuatro histonas del nucleosoma límite. La fosforilación afecta a los restos de serina de la región amino-terminal de las moléculas. La fosforilación de las histonas se ha relacionado con diferentes actividades biológicas. Por ejemplo, la fosforilación de la H2A se ha relacionado con el contenido celular en heterocromatina (Gurley y col., 1978a). Por su parte, la fosforilación y defosforilación de H3, así como de H1, se han relacionado con la entrada y salida de los estados condensados de la mitosis (Gurley y col., 1978b).

Con respecto a la metilación, solo se ha observado en H3 y H4, afectando a restos de lisina (Isenberg, 1979). No se sabe que efectos tendrá esta modificación, pero se ha sugerido que afecte a las interacciones con el DNA (Byvoet y Baxter, 1975).

La ADP-ribosilación también se ha relacionado con

diferentes procesos biológicos (Hayashi y Ueda, 1977), habiéndose observado en todas las histonas (Hayashi y Ueda, 1977; Ord y Stocken, 1977; Riquelme y col., 1979). De las histonas del nucleosoma límite, la H2B parece ser la más afectada (Burzio y col., 1979; Okayama y col., 1978). Si bien no hay evidencia de su significado, es de esperar que afecte drásticamente a las interacciones en que se vean implicadas estas proteínas.

Por último, la histona H2A en algunos casos aparece unida a la ubiquitina, formando la proteína A24 (Goldknopf y Busch, 1977a; Goldknopf y Busch, 1978). Se ha observado que el 10% de las moléculas de H2A estaba conjugado al residuo 74 de la ubiquitina a través de un enlace isopeptídico en el que interviene la lisina 119 de la histona (Goldknopf y Busch, 1977a; Goldknopf y Busch, 1978). La proteína A24 resultante parece reemplazar a la H2A en el nucleosoma límite (Goldknopf y Busch, 1977b; Martinson y col., 1979). Mientras los niveles de A24 disminuyen durante la regeneración de hígado (Ballal y col., 1974; Ballal y col., 1975), también aparecen muy reducidos en células leucémicas linfocíticas en comparación con linfocitos normales (Yeoman y col., 1976). Por este motivo, es posible que los niveles de A24 estén en relación inversa a la actividad.

Otro tipo de experimentos encaminados a la obtención de datos acerca del papel de las histonas en el octámero, han sido los de reconstitución. En estos experimentos se han llegado a formar partículas similares a los nucleosomas, tanto en su aspecto al microscopio electrónico (Germond y col., 1975) como en su patrón de digestión con nucleasas

(Camerini-Otero y col., 1976; Axel y col., 1974) y en su coeficiente de sedimentación (Tatchell y Van Holde, 1977). Si estas reconstituciones se hacen con la ausencia de alguna histona se ve en que medida interviene cada una en la estructura nucleosomal. Las histonas H3 y H4 son necesarias y suficientes para formar partículas con un patrón de digestión por nucleasas similar al de nucleosomas nativos (Camerini-Otero y col., 1976; Sollner-Webb y col., 1976), así como una semejante resistencia a la digestión con tripsina o quimotripsina, y parecido espectro de difracción de rayos X (Boseley y col., 1976; Moss y col., 1977). Todos estos resultados indican un papel fundamental en la estructura nucleosomal de H3 y H4, lo que está de acuerdo con que sean las histonas más conservativas en secuencia, y las más fuertemente unidas al DNA mediante interacción iónica entre sus restos básicos y los fosfatos del DNA (Cary y col., 1978).

1.2.1.1.3. Transiciones conformacionales en el nucleosoma límite

El DNA se encuentra muy compactado en los nucleosomas por interacción con las histonas. Sin embargo, puesto que el DNA es transcrito y replicado a lo largo de la vida celular, los nucleosomas no pueden ser estructuras estáticas. En efecto, se han observado dos tipos de transiciones estructurales, deformaciones en el nucleosoma límite, que se abordarán en este apartado, y movimientos del octámero de histonas con respecto al DNA. Su aproximación metodológica

ha sido muy diversa.

Así, una primera posibilidad para este tipo de estudio la ofrecen las medidas de las transiciones térmicas del nucleosoma límite realizadas mediante técnicas de absorción UV, dicroísmo circular y calorimetría (Weischet y col., 1978). Las tres técnicas pusieron de manifiesto la existencia de transiciones bifásicas a mayores temperaturas que el DNA libre. La primera transición, observada por absorción UV y calorimetría, parecía implicar a 40 pb; estudios de RMN indicaban que tras esta transición aparecían dos diferentes conformaciones en el DNA (Shindo y col., 1980; Simpson y Shindo, 1979). Mediante digestiones con la nucleasa S1 se ha demostrado que el DNA que se desnaturaliza en la primera transición corresponde a la región de 20 pb a cada extremo del nucleosoma límite (Simpson, 1979), lo que ha sugerido que el DNA en estas regiones terminales del nucleosoma límite está en una conformación diferente con respecto al DNA interno.

Por otra parte, el estudio de las transiciones térmicas mediante dicroísmo circular ha mostrado que la primera transición no corresponde a ningún cambio en la conformación de las proteínas. Por el contrario, la segunda transición parece corresponderse con una desestructuración generalizada de las histonas y del DNA (Weischet y col., 1978). También mediante dicroísmo circular se ha podido observar como previamente a la primera transición se produce un cambio en el espectro del DNA, indicando una variación estructural previa a su desnaturalización.

Otro tipo de estudios acerca de las transiciones

estructurales del nucleosoma límite han sido aquellos en los que se media el efecto de las condiciones de la disolución. A este respecto, las transiciones dependientes de la fuerza iónica han sido ampliamente estudiadas. Inicialmente se comprobó que al disminuir la concentración de NaCl desde 5 hasta 0.5 mM, el coeficiente de sedimentación de los nucleosomas límite disminuía de 10.2 a 9.20 S (Gordon y col., 1978). También se han observado variaciones en este intervalo de concentraciones en el coeficiente de difusión (Gordon y col., 1978), dicroísmo circular (Gordon y col., 1979; Fulmer y Fasman, 1979), dicroísmo eléctrico (Wu y col., 1979) y en la mayor accesibilidad a sondas fluorescentes (Dieterich y col., 1979; Lewis, 1979). Además, también se ha comprobado que a baja fuerza iónica varían las interacciones entre las histonas (Martinson y col., 1979). Hay que hacer mención de que Gordon y col. (1978) han descrito una segunda transición en el intervalo de NaCl 5-10 mM, detectada por variación en el coeficiente de sedimentación. Sin embargo, esta transición no ha sido observada por otros métodos y ha sido posteriormente identificada como procedente de nucleosomas con un contenido en DNA mayor que el del nucleosoma límite (Gordon y col., 1979).

Los resultados obtenidos por medidas de dicroísmo eléctrico (Wu y col., 1979) sugieren que en el cambio estructural a baja fuerza iónica, el nucleosoma límite mantiene la forma de disco pero con un diámetro incrementado de 178 Å y con 0.9 vueltas de superhélice de DNA. Se ha observado mediante microscopía electrónica que los nucleosomas, en cromatina a baja fuerza iónica, se despliegan en dos

seminucleosomas (Tsanev y Petrov, 1976; Oudet y col., 1977) lo que estaría de acuerdo con el modelo propuesto por Weintraub y col. (1976), según el cual el nucleosoma se abriría por su eje de simetría en dos seminucleosomas, conteniendo cada uno de ellos un tetrámero de histonas. Sin embargo, trabajos más recientes (Harrington, 1982; Libertini y Small, 1982) coinciden en pensar que estas transiciones consisten en un relajamiento de la unión del DNA al nucleosoma en los extremos de la partícula.

Por otra parte, la presencia de urea, en concentración de 6-8 M provoca un cambio estructural, caracterizado por la disminución del coeficiente de sedimentación hasta 5-6 S. Durante esta transición las histonas permanecen unidas al DNA, lo que indica que son las interacciones histona-histona lo que mantiene al nucleosoma límite en forma compacta.

Estos experimentos muestran que tanto las interacciones hidrofóbicas como las electrostáticas son importantes en el plegamiento del nucleosoma. No obstante, no es fácil correlacionar las transiciones observadas en el nucleosoma con la funcionalidad de esta estructura. Como ya se ha mencionado, es de esperar que los nucleosomas se desplieguen cuando el DNA tenga que transcribirse o replicarse. A este respecto, Weintraub y col. (1976) han propuesto una hipótesis, la cual implica la apertura de cada nucleosoma en dos seminucleosomas a lo largo del supuesto eje de simetría. Pero, ningún estudio realizado ha mostrado que el nucleosoma pueda sufrir tal tipo de desplegamiento. No obstante, esta hipótesis ha recibido cierto apoyo por la observación al

microscopio electrónico de minicromosomas de SV40, en condiciones de baja fuerza iónica (Oudet y col., 1977), donde aparecen aproximadamente el doble de partículas globulares que las usualmente observadas, y con un menor diámetro.

1.2.1.2. Mononucleosoma

El mononucleosoma es el siguiente nivel estructural de la cromatina, tras el nucleosoma límite. Consta del nucleosoma límite, del DNA internucleosomal y de la histona H1. Esta histona se encuentra en relación 1:2 con las histonas del nucleosoma límite (Rall y col., 1977; Albright y col., 1979; Hayashi y col., 1978).

1.2.1.2.1.H1

Desde los primeros trabajos sobre este tema ya se sugirió que la H1 estaba asociada con el DNA internucleosomal (Varshavsky y col., 1976; Whitlock y Simpson, 1976). Al igual que con el nucleosoma límite, se ha llegado a determinar la disposición de las histonas en nucleosomas que contienen H1, con diferentes longitudes de DNA internucleosomal (Belyavsky y col., 1980; Karpov y col., 1982). Así, se ha comprobado que la histona H1 se une fundamentalmente a los extremos del DNA nucleosomal, si bien lo puede también hacer a lo largo de todo el DNA nucleosomal, aprovechando las regiones que dejan las otras histonas (Figura 9). Además, la unión de las histonas que conforman el octámero al DNA varía ligeramente en el nucleosoma. Así, la histona H3 se une más

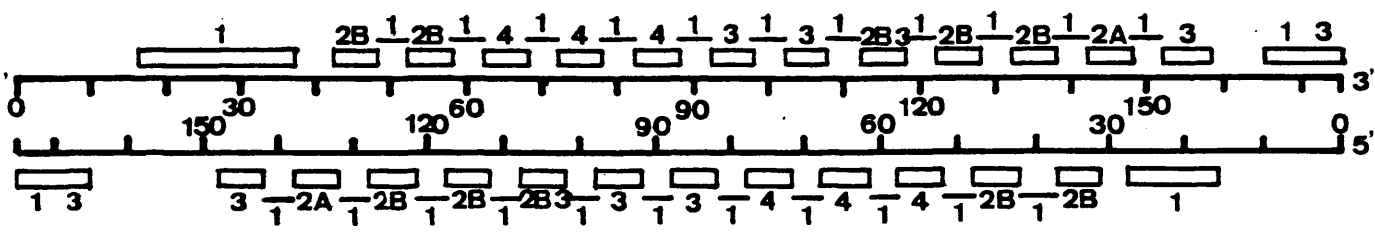


Figura 9.- Disposición de las histonas sobre ambas cadenas del DNA en el nucleosoma de 175 pb. Los sitios de unión fuerte se representan por rectángulos, mientras que los de unión secundaria se representan por barras.

hacia los extremos del DNA, lo que permite ampliar la extensión de la superhélice del DNA hasta dos vueltas por nucleosoma (Karpov y col., 1982). Ello aporta variabilidad a la unión de H1. La unión de la histona H1 al DNA internucleosomal se acepta que sea por el punto donde el DNA entra y sale del nucleosoma límite. Así, mientras que la cromatina con H1 aparece extendida a baja fuerza iónica, con el DNA entrando y saliendo del nucleosoma límite -aproximadamente con la misma tangente-, en la cromatina sin H1, la entrada y salida del DNA parecen desplazarse una con respecto a la otra (Thoma y col., 1979).

Asimismo, y como ya se ha dicho, la digestión de nucleosomas con nucleasa micrococcal conduce a la aparición del nucleosoma límite. Sin embargo, también se ha descrito la existencia de un intermediario de 160 pb de DNA a lo largo de la digestión (Sollner-Webb y Felsenfeld, 1975; Shaw y col., 1976; Tatchell y Van Holde, 1977; Weischet y col., 1979; Todd y Garrard, 1977). A este respecto, Varshavsky y col. (1976) han descrito partículas conteniendo 160 pb de DNA, todas las histonas del nucleosoma límite y H1. Además, Simpson (1978a) ha conseguido aislar una partícula con estas características y la ha denominado cromatosoma. Esta partícula está compuesta por 168 pb de DNA, el octámero de histonas y una molécula de H1 (o H5 en eritrocitos de aves). La longitud del DNA contenido correspondería, así, a dos vueltas completas de DNA alrededor del octámero de histonas, como ya habían sugerido Finch y col. (1977). Ello también apoya el hecho de que la H1 se una al punto de entrada y salida del nucleosoma límite.

El comportamiento del cromatosoma se asemeja mucho al del nucleosoma límite. Sin embargo, resulta ser más resistente a la desnaturalización térmica (Tatchell y Van Holde, 1977) y a la digestión con DNasa I, especialmente en los extremos del DNA. El patrón de digestión del cromatosoma se ha justificado por la adición de 10 pb de DNA a cada extremo del nucleosoma límite.

Parece, por tanto, que la H1 se une al lado del nucleosoma límite protegiendo y bloqueando la entrada y salida del DNA. No se conoce bien como organiza la H1 el DNA internucleosomal, entre nucleosomas límite adyacentes, si bien parece que no se una al surco ancho de la doble hélice del DNA (Goodwin y col., 1979).

Por otra parte, se ha descrito que al tratar núcleos con agentes de entrecruzamiento inespecíficos se forman homopolímeros de H1 (Bonner y Pollard, 1975; Olins y Wright, 1973; Chalkley, 1975). Ello sugeriría que las moléculas de H1 se encuentren adyacentes en la estructura de orden superior al nucleosoma. También se han descrito entrecruzamientos de la H1 con las histonas del nucleosoma límite (Ring y Cole, 1979), principalmente H3. También se pueden producir entrecruzamientos entre las proteínas HMG-14 y HMG-17 con la H1 y con las histonas del octámero (Goodwin y Johns, 1977; Weisbrod y Weintraub, 1979).

Con respecto a la misión de la H1 en la cromatina, estudios hidrodinámicos y de microscopía electrónica, realizados sobre cromatina sin H1, han demostrado que la readición de la histona provoca la contracción de la cromatina (Noll y Kornberg, 1977; Gaubatz y col., 1977; Thoma y

Koller, 1977). Además, tanto la cromatina con H1 como oligonucleosomas aislados sufren una contracción en el intervalo de concentración de sal de 10-20 mM (Thoma y col., 1979; Thoma y Koller, 1977; Renz y col., 1977; Stratling, 1979). Stratling (1979) ha apuntado, además, otra propiedad de la H1 cual es la capacidad de condensar pequeños oligómeros en oligómeros mayores, propiedad que parece ser más específica que una simple agregación, aunque sea una observación dependiente de la fuerza iónica.

El intervalo de fuerza iónica en el que la cromatina se contrae es similar a aquel en el que hay una transición (de no cooperativa a cooperativa) en la unión de la H1 al DNA (Renz y Day, 1976). Además, la H1 adquiere estructura ordenada, aproximadamente, en el mismo intervalo de concentraciones de sal (Smerdon e Isenberg, 1976; Barbero y col., 1980).

Hay también una serie de observaciones que pudieran estar relacionadas con la presencia de la H1. En este sentido, los primeros estudios realizados sobre nucleosomas mostraron que la longitud nucleosomal era diferente en diferentes tejidos (Kornberg, 1977; Felsenfeld, 1978). Si se acepta que los nucleosomas de todos los tejidos tienen en común dos vueltas completas de DNA (168 pb) alrededor del octámero de histonas, entonces la longitud del DNA espaciador varía de 0 pb en levadura y eucariontes inferiores (Lohr y col., 1977; Thomas y Furber, 1976; Noll, 1976a; Morris, 1976a) hasta 80 pb en esperma de erizo de mar (Spadafora y col., 1976). Esta variabilidad en la longitud del DNA espaciador puede darse incluso dentro de la misma célula, como

han sugerido experimentos de digestión con nucleasas (Lohr y col., 1977; Todd y Garrard, 1977). Esto ha recibido apoyo experimental al haberse comprobado en diferentes tipos celulares de *Xenopus* (Humphries y col., 1979).

Este hecho se ha relacionado con la actividad génica, de forma que las menores longitudes nucleosomales se han relacionado con los mayores niveles de actividad génica. Sin embargo, aunque hay datos que indican que esto puede ser cierto en algunos casos (Spadafora y col., 1976; Morris, 1976b; Thomas y Thompson, 1977) también se han observado excepciones, al menos en eucariontes inferiores (Lipps y Morris, 1977; Lohr e Ide, 1979).

También se ha propuesto que las mayores longitudes internucleosomales se encuentran asociadas con la H1. Así, en eritrocito de pollo, que posee la H5, la longitud nucleosomal es mayor que en otros tejidos de pollo (Yaguchi y col., 1980). Por otro lado, *Saccharomyces cerevisiae*, que carece de histona H1, posee una menor longitud nucleosomal (Lohr y Van Holde, 1975), lo que parece confirmar dicha hipótesis.

1.2.2. ESTRUCTURAS DE ORDEN SUPERIOR

El DNA de una célula eucariótica tiene una enorme longitud en relación con el tamaño del núcleo celular. Por tanto, su localización en el núcleo supone un elevado grado de compactación, que debe permitir los procesos de replicación y transcripción. Se sabe que el DNA en los cromosomas está compactado unas 10000 veces. La compactación del DNA en

los nucleosomas llega a ser de ocho veces, por lo que este nivel estructural no basta para dar cuenta del empaquetamiento del DNA en los cromosomas e incluso en la cromatina. Por tanto, la cadena nucleosomal ha de plegarse mucho más, adoptando estructuras de orden superior.

Los dos siguientes niveles de estructuración de la cromatina, tras el nucleosomal, son el filamento de 10 nm y la fibra de cromatina de 25-30 nm, los cuales han sido observados al microscopio electrónico (Ris y Kubai, 1974). Los nucleosomas deben empaquetarse en estas estructuras de una forma más o menos regular.

Es difícil obtener información reproducible sobre estructuras de orden superior, debido, entre otras causas, a la variabilidad en los métodos de aislamiento de cromatina y a las condiciones del disolvente utilizado en las medidas. La preparación de las fibras de 30 nm intactas requiere el uso de disolventes de moderada fuerza iónica (al menos NaCl 20 mM), la presencia de H1 en el complejo y la ausencia de grandes fuerzas de cizalla durante la preparación.

En relación con el efecto de la fuerza iónica sobre la estructura de la cromatina, se ha comprobado que los cationes mono y divalentes a concentraciones entre 10^{-3} y 10^{-1} M para Na^+ y 10^{-5} y 10^{-3} M para Mg^{2+} cambian la compactación de la cromatina modificando sus propiedades físicas (Fulmer y Fasman, 1979; Perez-Grau y col., 1984; Ausió y col., 1984). Estudios realizados sobre los efectos de los iones Na^+ y Mg^{2+} sobre la estructura de la cromatina han llevado a concluir que solo los cationes divalentes estabilizan la cromatina condensada dentro del núcleo (Dixon

y Burkholder, 1985). Esto ha venido apoyado por estudios de morfología cromosómica (Weitz, 1983) y de difracción de rayos X (Langmore y Paulson, 1983). También se ha comprobado que los efectos de los iones Na^+ y Mg^{2+} son diferentes en los primeros estados de la condensación, mientras que a mayores concentraciones son aditivos (Staron, 1985).

Las fibras de 30 nm se pueden convertir reversiblemente en filamentos de 10 nm por disminución de la fuerza iónica (Renz y col., 1977; Ris y Kubai, 1974; Finch y Klug, 1976). Esta transición se ha estudiado mediante difracción de neutrones (Suau y col., 1979) y microscopía electrónica (Thoma y col., 1979; Thoma y Koller, 1977). Los primeros estudios realizados utilizando estas técnicas (Finch y Klug, 1976; Carpenter y col., 1976) habían sugerido que el filamento de 10 nm era una disposición lineal de los nucleosomas, los cuales se superenrollaban para formar la fibra de 30 nm o solenoide. Este modelo ha sido apoyado por resultados posteriores.

Experimentos de dispersión de neutrones (Suau y col., 1979) revelaron que la disposición lineal de nucleosomas en el filamento de 10 nm obtenido a baja fuerza iónica, no puede consistir en un apilamiento cara a cara. Los datos están de acuerdo con modelos en los que los bordes cilíndricos de los nucleosomas límite están en contacto, con las caras orientadas paralelamente al eje del filamento. Según se aumenta la fuerza iónica se origina una nueva serie de estructuras de 30 nm de diámetro pero con una masa variable por unidad de longitud. Estas estructuras se hacen más compactas según aumenta la fuerza iónica; la más compacta

consiste en una superhélice con 6-7 nucleosomas por vuelta. Se piensa que los nucleosomas límite se disponen de modo que los diámetros de la estructura en su aspecto cilíndrico estén perpendiculares al eje de la superhélice. Se ha sugerido que tales ejes de los nucleosomas límite pueden ser paralelos al de la superhélice, con lo que cada vuelta de la superhélice es relativamente plana con las caras de los nucleosomas, en vueltas sucesivas, paralelas unas con otras (Figura 10).

Por microscopía electrónica se ha examinado también la transición del filamento de 10 nm a la fibra de 30 nm (Thoma y col., 1979). A baja fuerza iónica el filamento aparece en una configuración zig-zag, con una periodicidad de dos nucleosomas. Según se aumenta la concentración de sal algunas estructuras solenoidales irregulares, de mayor diámetro, comienzan a formarse, y a mayores concentraciones de sal (0.06-0.1 M NaCl) la mayor parte del material está en una fibra de 25 nm de diámetro. En estas fibras se pueden ver estrías separadas por 11 nm (Rattner y Hamkalo, 1979; Rattner y Hamkalo, 1978), lo que sugiere que los nucleosomas en vueltas sucesivas pueden empaquetarse lateralmente, mejor que con sus caras paralelas como proponen Suau y col. (1979). En este modelo el contacto entre dos nucleosomas adyacentes de una misma vuelta ocurre por las caras (Figura 11). Esto ha venido confirmado por experimentos de difracción eléctrica (McGhee y col. 1980) y reconstrucciones tridimensionales a partir de micrografías electrónicas (Subirana y col., 1985) Pese a las discrepancias, ambos grupos de investigadores están de acuerdo con que en el filamento de 10 nm

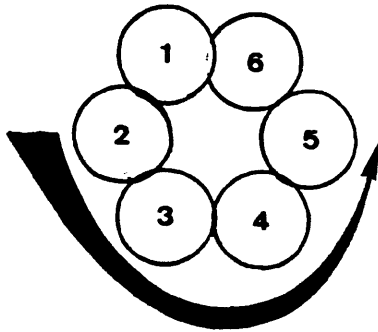


Figura 10.- Modelo de disposición de los nucleosomas en el solenoide. En este modelo las caras de los nucleosomas se disponen perpendicularmente al eje del solenoide.

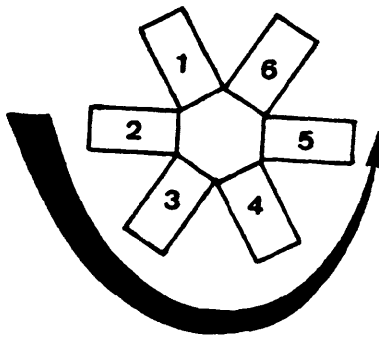


Figura 11.- Modelo de disposición de los nucleosomas en el solenoide. En este modelo las caras de los nucleosomas se disponen radialmente al eje del solenoide.

los nucleosomas están dispuestos con sus ejes perpendiculares al del filamento, y que la fibra de 30 nm consiste en una superhélice continua de nucleosomas con unos 6-7 nucleosomas por vuelta (Figura 12).

Además del modelo de superhélice continua hay otro que difiere del anterior en que sugiere que agrupaciones de 6-8 nucleosomas, juntas, forman la fibra de 30 nm. Tales estructuras se han visto mediante microscopía electrónica (Renz y col., 1977; Hozier y col., 1977; Stratling y col., 1978). Experimentos de crosslinking (Itkes y col., 1980) y de digestión con nucleasas (Puigdomenech y Ruiz-Carrillo, 1982; Zentgraf y Franke, 1984; Muyldermans y col., 1985) han cuestionado de nuevo el tema. Sin embargo, hay autores que opinan que se trata de vueltas de solenoide aisladas (Worcel, 1978). Por su parte, Azorín y col. (1982) han sugerido que estas agrupaciones pueden ser un estado alternativo de la estructura de la cromatina, habiéndose llegado a sugerir transiciones entre estas agrupaciones y el solenoide (Subirana y col., 1985).

La histona H1, que puede fijar los nucleosomas individuales en una conformación, puede también estabilizar la fibra de 30 nm (Thoma y col., 1979). Así, al poder eliminar exclusivamente de la cromatina a la H1 (Marekov y Beltchev, 1981) se ha observado que las PNH previenen parcialmente el desplegamiento de los nucleosomas a baja fuerza iónica, pero que se requiere la H1 para que haya un bloqueo completo (Dimitrov y col., 1985). Se ha comprobado que la cromatina en presencia de H1 muestra una estructura más compacta que en su ausencia (Varshavsky y col., 1976; Chris-

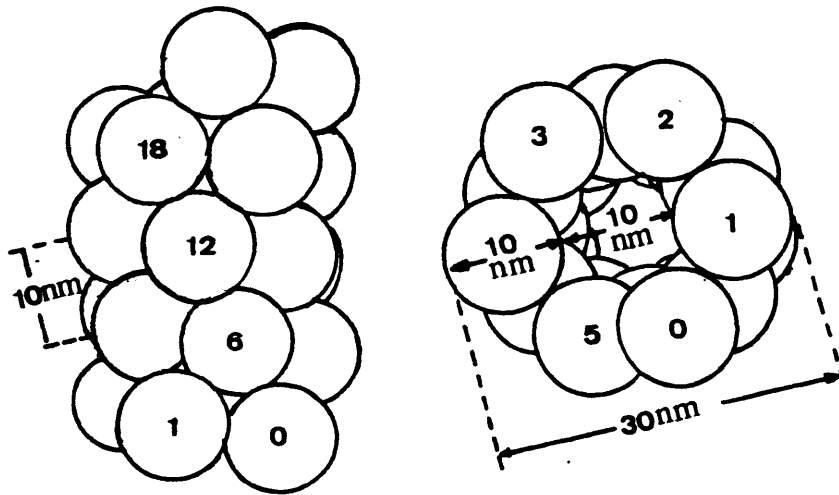


Figura 12.- Modelo solenoidal propuesto para el enrollamiento de la cadena polinucleosomal

tiansen y Griffith, 1977; Renz y col., 1977; Vogel y Singer, 1976; Bradbury y col., 1973). A este respecto, se ha comprobado que la histona H5 también parece promover la formación de orden superior en cromatina de eritrocito de pollo, e incluso con una mayor efectividad que la H1 (Thomas y Rees, 1983; Thomas y col., 1985). La capacidad de la H1 para formar contactos H1-H1 (Butler y Thomas, 1980; Losa y col., 1984) permite a la cromatina formar estructuras de orden superior cuando se debilitan las fuerzas repulsivas electrostáticas. La localización de la H1 en la estructura de orden superior no se conoce con exactitud, de forma que no está claro si la H1 está en el interior o en el exterior del solenoide. Así, por una parte, la H1 es la histona más susceptible a la proteólisis; por otra parte, se ha observado que un anticuerpo contra la H1 se une menos a cromatina a alta fuerza iónica que a baja fuerza iónica (Takahashi y Tashiro, 1979), lo que sugiere una disposición interna.

La tendencia de los nucleosomas límite a deslizarse a lo largo del DNA cuando la H1 es eliminada (Steinmetz y col., 1978; Klevan y Crothers, 1977; Tatchell y Van Holde, 1978) sugiere que en determinadas ocasiones los nucleosomas límite adyacentes interaccionan, lo que quizá juega un papel en la estabilización de la estructura de orden superior. Aunque la H1 influye en la capacidad de la cromatina para formar estructuras compactas regulares, muchas de las características de la fibra de 30 nm se pueden ver, aunque en forma desordenada, en cromatina sin H1 (Thoma y col., 1979; Thoma y Koller, 1977). Además, se ha observado como nucleosomas individuales forman estructuras similares (Finch y

Klug, 1976). Es probable que las interacciones entre nucleosomas límite ayuden a estabilizar la estructura de orden superior.

Sin embargo, la estructura solenoidal que se ha descrito no basta para explicar el grado de compactación de la cromatina, por lo que este solenoide debe adoptar estructuras aún más compactas. A este respecto, estudios de digestión con DNasa I han mostrado que a concentraciones de Mg^{2+} menores de 1 mM se produce una transición en la cromatina de eritrocito de pollo in situ. Esta transición puede estar relacionada con el empaquetamiento de la fibra de 30 nm en estructuras de orden superior (Kachatrian y col., 1985).

1.3. CROMATINA ACTIVA

El DNA se encuentra en el núcleo celular en una estructura tan compacta que no puede ser accesible al aparato transcripcional. Se ha observado al microscopio electrónico que tanto las regiones que se transcriben como las que no, poseen nucleosomas (Osheim y col., 1978). Además, los productos de digestión con nucleasa micrococcal son los mismos (Lacy y Axel, 1975). Por tanto, la estructura del nucleosoma debe ser diferente en ambas regiones. A este respecto, una diferencia entre los nucleosomas de ambas regiones ha quedado patente mediante estudios con endonucleasas relativamente inespecíficas, las cuales reconocen la estructura especial de los genes activos digiriéndolos más rápidamente (Weisbrod, 1982). Esto sugiere que estos nucleosomas situados en regiones activas poseen una estructura

diferente y más abierta que la de los nucleosomas presentes en las regiones que no se transcriben.

Los estudios sobre cromatina activa han mostrado algunas características diferenciales con respecto a la inactiva. A este respecto, se ha comprobado que el gen de la globina en núcleos de eritrocito de pollo es preferentemente degradado por la DNasa I (Weintraub y Groudine, 1976), lo que indica una estructura conformacionalmente distinta del resto de la cromatina. Esta sensibilidad del gen de la globina es específica de tejido, pues dicho gen no es preferentemente digerido en oviducto de gallina, en donde si lo es, por el contrario, el gen de la ovoalbúmina (Garel y Axel, 1976). Esta sensibilidad diferencial a la DNasa I de los genes activos se ha observado en diferentes organismos (Stadler y col., 1978; Flint y Weintraub, 1977; Groudine y col., 1978; Garel y col., 1977; Czupryin y Toczko, 1985), pero más bien indica la posibilidad de que sea transcrito en algún momento de la historia celular que el que lo sea en realidad (Stadler y col., 1980a).

La sensibilidad a la DNasa I no solo afecta a las regiones codificadoras, sino que se extiende a ambos extremos de las mismas (Stadler y col., 1980a; Stadler y col., 1980b; Wood y Felsenfeld, 1982); ello podría sugerir que los genes en estado activo se localizan en dominios mayores que el propio gen con la estructura alterada (Smith y col., 1984; Alevy y col., 1984). A este respecto se ha mostrado la existencia de zonas hipersensibles a la DNasa I en la región 5' de las regiones codificadoras (Wu, 1980). Estos sitios hipersensibles no existen en el DNA libre, por lo que han de

ser consecuencia de la estructura de la cromatina. Resultados obtenidos con el gen de la globina (Groudine y Weintraub, 1981) han relacionado estos sitios hipersensibles con la activación del gen. Es posible que estas zonas indiquen cuales son los genes que deben ser transcritos.

La cromatina activa también es digerida preferentemente por la DNasa II (Marushige y Bonner, 1971), lo que ha permitido su fraccionamiento. La digestión suave con DNasa II solubiliza un material que se puede fraccionar por precipitación con cationes divalentes como el Mg^{2+} . La fracción soluble en presencia de Mg^{2+} corresponde a las regiones activas de la cromatina (Funderud y Haugli, 1977; Mohber y Rush, 1971). Las regiones transcribibles aisladas de esta forma están organizadas en unidades repetitivas enriquecidas en PCNH. Además, presentan un coeficiente de sedimentación mayor que el de nucleosomas de cromatina inactiva (Gottesfeld y Butler, 1977), lo que se ha atribuido a la presencia de RNA naciente.

La nucleasa micrococcal ha sido ampliamente utilizada en el fraccionamiento de la cromatina activa. Se ha comprobado que la fracción soluble obtenida, tras digerir núcleos de oviducto de gallina, está enriquecida en el gen de la albúmina (Bloom y Anderson, 1978) y que además está compuesta fundamentalmente por mononucleosomas. Puesto que la nucleasa micrococcal ataca preferentemente al DNA internucleosomal (Noll, 1974a; Axel, 1975) la liberación de mononucleosomas enriquecidos en genes activos puede ser el resultado de la ruptura preferente del DNA internucleosomal de las regiones activas. La presencia de cromatina inactiva en

la fracción soluble tras la digestión indica que el DNA de esas regiones no es totalmente resistente a la acción de la nucleasa. Un método de fraccionamiento usualmente utilizado es el de Levy-Wilson y col. (1979). Este método consiste en digerir los núcleos hasta obtener un 5% de DNA soluble en ácido. Tras sedimentar los núcleos digeridos, éstos se lisan obteniéndose un material soluble tras centrifugación. Este material soluble se podía fraccionar posteriormente según su solubilidad en NaCl 0.1 M. Tanto la fracción soluble como la insoluble en NaCl 0.1 M estaban enriquecidas en secuencias transcribibles, si bien este enriquecimiento era mayor en la soluble.

Una posible causa de la diferente estructura de los nucleosomas activos es la presencia de histonas acetiladas (Mathews y Bradbury, 1982). En cromatina enriquecida en histonas hiperacetiladas, las zonas que se digieren más rápidamente por la DNasa I son precisamente aquellas que contienen las histonas hiperacetiladas (Vidali y col., 1978). Por otra parte, los nucleosomas con histonas hiperacetiladas, además de presentar los sitios de rotura típicos para la DNasa I, poseen tres sitios nuevos. Además, según se desprende de estudios de desnaturalización térmica, su estructura es menos estable que la de los nucleosomas normales (Bode y col., 1980; Yau y col., 1982; Simpson, 1978b). Más recientemente se ha propuesto que la hiperacetilación de H3 y H4 en Physarum ocurriría en la fase G2 del ciclo celular y estaría relacionada con la transcripción del DNA, mientras que las histonas H2A y H2B se hiperacetilarían en la fase S del ciclo, facilitando la replicación del DNA

(Waterborg y Mathews, 1983).

Por otra parte, se ha comprobado que la extracción de las proteínas HMG de la cromatina de eritrocito de pollo elimina la especial sensibilidad del gen de la globina a la DNasa I (Weisbrod y Weintraub, 1979). Al reconstituir la cromatina con el conjunto de las HMG extraídas, o con HMG-14 y HMG-17 purificadas, esa sensibilidad reaparece (Weisbrod y col., 1980). La mayor sensibilidad a la DNasa I de las regiones de cromatina con proteínas HMG parece ser un fenómeno general, pues se ha descrito incluso en cromatina de plantas (Spiker y col., 1983).

Como ya se ha indicado, las HMG poseen un elevado contenido tanto en aminoácidos ácidos como en básicos. Por este motivo se piensa que son capaces de interaccionar tanto con el DNA como con las histonas (Johns, 1982). Las HMG-14 y HMG-17 se unen tanto al core nucleosomal como a nucleosomas con H1/H5, haciendolo dos moléculas por nucleosoma (Shick y col., 1985; Mardian y col., 1980). Parece ser que estas HMG interaccionan por los extremos del DNA del core (Sandeem y col., 1980; Mardian y col., 1980) pero también en dos sitios internos (Shick y col., 1985). Esta unión no afecta al resto de las histonas (Sandeem y col., 1980). Esto ha llevado a sugerir que estas proteínas pueden afectar a las regiones activas no por cambios en la estructura nucleosomal sino participando en un desplazamiento temporal de las histonas durante la transcripción (Labhart y Koller, 1982; Karpov y col., 1984; Preobrazhenskaya y col., 1984).

De la misma forma que las regiones activas están enriquecidas en HMG, se ha observado una escasez de H1, por

lo que la presencia de dicha histona se ha relacionado con la cromatina inactiva. Por otra parte, Komaiko y Felsenfeld (1985) han mostrado que la ausencia de H1 de nucleosomas activos puede deberse a una redistribución debida al menor tamaño del DNA de los nucleosomas activos al ser éstos más sensibles a la digestión. Sin embargo, los resultados de Kimura y col. (1983) y Smith y col. (1984) indican que la cromatina activa está probablemente desprovista de H1 in vivo. A este respecto, se ha comprobado que una variante de la histona H1 que aparece en los estados embrionarios, la H1⁰, está asociada a un gen reprimido durante el desarrollo del hígado de rata (Roche y col., 1985).

Por otra parte, se ha comprobado que la digestión de núcleos de testículo de trucha con nucleasa micrococal libera la proteína HMG-T, similar a las HMG-1 y HMG-2 de timo de ternera, por lo que se ha propuesto su asociación con el DNA internucleosomal (preferentemente atacado por la nucleasa) de la cromatina activa de testículo de trucha en sustitución de la H1, inhibiendo la formación del solenoide (Levy-Wilson y col., 1977). Estudios de velocidad de sedimentación y de electroforesis en gel han indicado que mientras que tanto la HMG-1 como la HMG-2 se unen a nucleosomas de 180 pb, la HMG-1 interacciona mucho más débilmente (Schroter y Bode, 1982), siendo el tamaño de su sitio de unión de 14 pb (14 bases en el caso de unión a DNA monocatenario (Butler y col., 1985). Con respecto a su papel en la cromatina, Stoude y Mazluff (1982) han sugerido que la HMG-1 y HMG-2 pueden estimular la transcripción por una RNA polimerasa endógena de núcleos de mieloma de ratón. Por otra

parte, Bonna-Andrea y col. (1984) han encontrado que HMG-1 y HMG-2 pueden mediar en el ensamblaje del nucleosoma.

Debido a esta relación de acetilación de histonas y presencia de HMG-14 y HMG-17 con la actividad génica, se ha estudiado el efecto que provocan en la estructura nucleosomal (Bode y col., 1983). De esta forma, se ha comprobado que tanto los nucleosomas que contienen HMG-14 y HMG-17 como aquellos que poseen histonas acetiladas poseen una estructura más abierta que la del nucleosoma normal. Sin embargo, la estructura del nucleosoma con el octámero acetilado parece ser menos rígida que la de aquellos que contienen proteínas HMG. Ambos hechos, conjuntamente, podrían dar cuenta de una estructura abierta y flexible, y junto con la ausencia de H1, mantener la cromatina en una conformación extendida, que facilite el proceso de la transcripción.

En conclusión, parece haber una estrecha relación entre la presencia de HMG y la actividad transcripcional de la cromatina. Se ha propuesto que las proteínas HMG de alto peso molecular estarían asociadas con el DNA internucleosomal (Mathew y col., 1979; Levy-Wilson y col., 1977) pudiendo así influir sobre la adopción de estructuras de orden superior, impidiéndola, mientras que las de bajo peso molecular estarían asociadas al nucleosoma límite alterando su estructura, de forma que presenten una gran sensibilidad a la DNasa I (Hutcheon y col., 1980).

Estas modificaciones in vivo pueden venir provocadas por la acción de otras moléculas como las vitaminas. Así, se ha observado que en células tratadas con retinol, la cromatina se hace más accesible a DNasa I, al mismo tiempo

que se modifica el patrón de acetilación de histonas y el contenido en proteínas cromosomales (Ferrari y Vidali, 1985).

1.4. CROMATINA DE LEVADURA

La cromatina de Saccharomyces cerevisiae es similar a la de otros organismos superiores, pero de una mayor simplicidad. Esta simplicidad queda patente por la ausencia de cromosomas condensados durante la división celular (Rozijn y Tonino, 1964; Gordon, 1977), pese a la existencia de núcleos. Esto hace de la levadura un material de trabajo muy interesante. Además, este interés se acrecienta porque la mayor parte de la cromatina de levadura se encuentra en una conformación transcripcionalmente competente (Lohr y Hereford, 1979), lo que la hace un excelente sistema para el estudio de la estructura de la cromatina transcripcionalmente activa. Pero, precisamente, la elevada actividad transcripcional en la levadura provoca la existencia de unos niveles de RNA en núcleos muy elevados (Tabla VI); ello dificulta el estudio de la estructura de la cromatina, sobre todo si se tienen en cuenta los bajos niveles de DNA que existen en núcleos de levadura en comparación con los de organismos superiores (Tabla VI).

Ya en los primeros estudios realizados con cromatina de levadura se observó la presencia de histonas (Tonino y Rozijn, 1966). En 1973, Wintersberger y col. (1973) lograron obtener preparaciones de histonas a partir de núcleos de levadura, cuya imagen electroforética mostraba bandas de

TABLA VI. - Composición proporcional de núcleos y cromatina de levadura en comparación con el de células.

	<u>Células</u>			<u>Núcleos</u>			<u>Cromatina</u>		
	DNA	RNA	Prot.	DNA	RNA	Prot.	DNA	RNA	Prot.
<u>Saccharomyces carlsbergensis</u>									
NCYC 74 (1)	1	109	391	1	3.7	35.3	-	-	-
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>									
(comercial)(2)	1	26	173	-	-	-	1	0.3	4.2
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>									
Y55(3)	1	82	189	1	2.6	15.6	-	-	-
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>									
(Salvaje diploide)(4)	1	89	252	1	4.2	17.3	1	3.8	9.7
<u>Schizosaccharomyces pombe</u>									
NCYC 132 (5)	1	121	227	1	9.4	115	1	3.5	16

(1) Rozijn y Tonino, (1964); (2) Tonino y Rozijn, (1966);(3) Bhargava y Halvorson, (1971); (4) Wintersberger y col. (1973);(5) Dufus, (1969).

movilidad semejante a H4, H2A y H2B-H3 de organismos superiores, pero ninguna de movilidad similar a la H1. El fraccionamiento de las histonas condujo al aislamiento de H4, H2A y H2B, pero no se encontraron ni H3 ni H1. Posteriormente, se consiguió aislar la histona H3 (Brandt y Von Holt, 1976), pero en la actualidad no se ha detectado ninguna histona semejante a la H1 (Franco y col., 1974; Thomas y Furber, 1976; Brandt y col., 1980). Precisamente con la ausencia de histona H1 se ha relacionado la ausencia de cromosomas condensados. La composición de aminoácidos (Tabla VII), la movilidad electroforética y el análisis de datos parciales de estructura primaria han permitido identificar una variante de cada una de las histonas H3 y H4 y dos variantes de cada una de las histonas H2A y H2B (Brandt y col., 1980). Mediante la comparación de dichas secuencias parciales con las de histonas de organismos superiores, se ha observado que en H3 y H4 el 7% de los residuos varía, mientras que en H2A y H2B es el 20% (Brandt y col., 1980)

Por otra parte, la elevada actividad transcripcional que existe en levaduras las convierte en interesante material biológico para examinar el nivel de acetilación de sus histonas (Davie y col., 1981; Nelson, 1982). Los resultados han mostrado que la cromatina de levadura se encuentra entre las cromatinas más acetiladas (Davie y col., 1981). Estos resultados son consistentes con la idea de que la hiperacetilación de histonas permite a la cromatina ser transcrita a mayor velocidad.

Con respecto a las proteínas cromosomales no histonas, también se han descrito proteínas HMG en levadura

TABLA VII Composición de aminoácidos de las histonas de levadura (Brandt y col., 1980). Los valores se expresan como moles por ciento.

	H2B ₁	H2B ₂	H2A ₁	H2A ₂	H3	H4
Lys	13.7	14.0	11.9	9.8	11.3	10.6
His	1.7	1.5	1.9	2.3	1.4	2.1
Arg	5.2	5.0	6.7	7.4	10.9	11.3
Asx	5.9	5.8	7.4	7.9	4.7	6.2
Thr	6.7	7.4	5.2	4.1	6.3	5.9
Ser	11.2	11.3	7.9	6.7	7.8	5.9
Glx	10.3	9.7	9.3	9.0	12.7	8.8
Pro	5.2	4.2	4.4	0.3	3.5	1.9
Gly	4.7	4.4	7.3	9.5	5.8	14.4
Ala	12.7	14.2	14.0	14.2	12.0	6.9
Cys	-	-	-	-	-	-
Val	5.3	4.5	4.6	4.8	4.4	5.8
Met	0.9	0.7	0.6	0.2	0.2	0.3
Ile	5.5	5.8	5.2	4.7	4.5	5.3
Leu	5.8	6.1	9.7	11.7	9.9	8.5
Tyr	3.5	3.5	2.8	2.3	1.7	3.9
Phe	1.9	1.7	1.4	1.2	3.7	2.3
Lys/Arg	2.6	2.8	1.8	1.3	1.04	0.94

(Spiker y col., 1978). Weber e Isenberg (1980) han descrito la existencia de cuatro proteínas HMG en levadura (Tabla VIII). Mientras tres de ellas presentan las mismas características de extracción que las HMG típicas, como lo es su disociación de la cromatina con NaCl 0.35 M, la cuarta HMG no se extrae; pero, se solubiliza junto con las histonas cuando se emplea HCl 0.25 N. Debido a mostrar esta característica de ser extraída con ácido se la ha denominado HMGa (Weber e Isenberg, 1980). La movilidad electroforética de esta proteína en geles de poliacrilamida en presencia de urea es similar a la de la histona H1 de organismos superiores (Weber e Isenberg, 1980). Esto llevó a ser considerada en un primer momento como H1 (Sommer, 1978). Sin embargo, la composición de aminoácidos es muy diferente y al mismo tiempo es típica de HMG (Spiker y col., 1978; Weber e Isenberg, 1980), por lo que se incluye en este tipo de proteínas. Recientemente se ha descrito que es soluble en PCA al 5%, igual que la H1 de organismos superiores, y que comparte algunas propiedades inmunológicas con dicha histona. Estas HMG (S1, S3, S4 y HMGa) se han obtenido a partir de levadura prensada. Recientemente, Estruch y col., (1986a) han observado que al digerir núcleos de células en crecimiento con nucleasa micrococcal se liberan cuatro polipéptidos C0, C1, C2 y C3, mostrando C0 y C3 inmunoreactividad hacia anticuerpos de HMG1 de timo de ternera.

Por otra parte, se ha demostrado la existencia en cromatina de levadura de una estructura repetitiva y de nucleosomas (Lohr y Van Holde, 1975; Nelson y col., 1977), si bien el tamaño de los mismos es menor que el de nucleoso-

TABLA VIII.- Composición de aminoácidos de las proteínas HMG de Saccharomyces cerevisiae (Weber e Isenberg, 1980). Los valores se expresan como moles por ciento.

	HMG-S1	HMG-S3	HMG-S4	HMGa
Asn	7.8	6.6	9.5	8.5
Thr	5.9	7.3	5.6	8.4
Ser	10.4	9.9	8.0	7.5
Glx	9.7	10.2	11.7	15.6
Pro	-	-	-	5.9
Gly	7.7	5.6	11.4	3.6
Ala	9.9	10.8	9.5	8.8
Cys	0.7	0.0	0.0	0.0
Val	5.5	5.5	4.8	2.3
Met	0.0	0.0	0.0	0.0
Ile	3.8	5.7	3.0	6.5
Leu	6.5	5.0	6.7	7.5
Tyr	2.0	4.9	0.7	4.4
Phe	2.8	4.7	5.7	2.8
His	4.9	7.2	4.6	1.3
Lys	19.2	12.2	14.1	15.9
Arg	3.5	4.7	5.1	5.5
Lys/Arg	5.4	2.6	2.8	2.9

mas de eucariontes superiores, con un tamaño medio de 160 pb. Parece ser que el tamaño nucleosomal es variable en levadura, habiendose obtenido tamaños comprendidos entre 150 y 165 pb. También se ha comprobado la existencia del nucleosoma límite, cuyo tamaño y estructura son similares a los de eucariontes superiores (Lohr y col., 1977a). Por tanto, la diferencia observada radica en el DNA internucleosomal. Estos estudios se han llevado a cabo mediante electroforesis del DNA extraído de las partículas, sin haberse llegado a realizar ningún tipo de estudio con nucleosomas aislados a partir de núcleos. Esto es debido fundamentalmente al bajo rendimiento en nucleosomas, que a su vez se debe al hecho de no poder trabajar con un gran número de núcleos y al bajo contenido en DNA de los mismos. Se han descrito otros procedimientos que conducen al aislamiento de un complejo nucleoproteico sin necesidad de pasar a través de una etapa de núcleos (Tonino y Rozijn, 1966; Franco y López-Braña, 1978), pero dichos métodos pueden alterar la estructura de la cromatina y, por tanto, no ser útiles.

Por otro lado, en contraste con los eucariontes superiores, Lohr y Hereford (1979) han mostrado que la cromatina de levadura presenta una aparente conducta "todonada" en lo que respecta a su sensibilidad a la DNasa I, lo que puede estar relacionado con la elevada tasa de transcripción de levadura (Hereford y Rosbash, 1977). Cuando las células de levadura están en fase de crecimiento exponencial toda la cromatina es digerida más rápidamente que la de células en fase estacionaria. Sin embargo, Sledziewski y Young (1982) han encontrado una ligera preferencia de la

DNasa I hacia genes transcribiéndose actualmente bajo condiciones muy suaves de digestión.

Estruch y col. (1986b) han observado que la cromatina de levadura no es digerida uniformemente por la nucleasa micrococcal. Sus resultados sugieren, además, que esta enzima tiene preferencia por regiones no hiperacetiladas, lo que podría implicar que no digiere preferentemente las regiones activas.

Una característica interesante de la cromatina de levadura ha surgido de estudios de microscopía electrónica, los cuales han mostrado la existencia de dos regiones estructuralmente distintas (Rattner y col., 1982). Así, mientras que el 90-95% de la cromatina presenta la típica organización nucleosomal, el resto parece que no, apareciendo como una fibra de 30-40 Å de diámetro.

Por tanto, el nivel de estructura primaria de la cromatina, el nucleosoma, no está aún bien caracterizado en levadura. Si esto es así, la posible adopción de superestructura, similar a la de organismos superiores está aún mucho menos conocida. Al microscopio electrónico se han observado estructuras con un diámetro de 200-300 Å, las cuales se encuentran separadas a veces por zonas carentes de nucleosomas (Rattner y col., 1982). Además, la cromatina de levadura posee un mínimo de solubilidad en el intervalo de concentración salina de 100-200 mM (López-Braña, 1979), transición en la que parecen estar implicadas las proteínas HMG (De Castro, 1980). Por tanto, a pesar de carecer de H1, la cromatina de levadura parece capaz de adoptar estructuras de orden superior similares a las de eucariontes superiores,

si bien no han sido prácticamente estudiadas.

1.5. TECNICAS FISICOQUIMICAS USADAS EN EL PRESENTE ESTUDIO

1.5.1. DICROISMO CIRCULAR

El dicroísmo circular es una técnica que permite obtener información de las conformaciones de ácidos nucleicos y de nucleoproteínas. La actividad óptica de los ácidos nucleicos se debe a la asimetría de sus componentes básicos y a la asimetría de la doble hélice. La difracción de rayos X ha permitido distinguir tres diferentes conformaciones para la doble hélice de DNA (A, B y C) (Fuller y col., 1965), las cuales se diferencian en el número de pares de bases y en otros detalles estructurales. El espectro de dicroísmo circular de las tres formas es diferente por lo que permite distinguir en cual de estas tres conformaciones se encuentra la hélice y detectar cambios de simetría (Tunis-Schneider y Mestre, 1970).

En el espectro de dicroísmo circular de la cromatina es posible estudiar por separado las conformaciones del DNA y de las histonas, ya que éstas contribuyen sólo a longitudes de onda inferiores a 240 nm. El espectro de dicroísmo circular del DNA en la cromatina o nucleosomas está significativamente alterado con respecto al obtenido para la forma B del DNA en disolución (Tunis-Schneider y Mestre, 1970; Whitlock y Simpson, 1976): sobre los 280 nm el espectro de la cromatina está considerablemente reducido. Se ha postulado que esta alteración es un reflejo de la estruc-

tura terciaria del DNA en el nucleosoma al superenrollarse éste en torno al octámero de histonas (Cowman y Fasman, 1980; Cowman y Fasman, 1978) que contribuiría con una banda negativa centrada a los 275 nm. Esta banda negativa es similar en forma y posición al espectro de dicroísmo circular de DNA- (Jordan y col., 1972), al de los complejos DNA-polilisina (Haynes y col., 1970) o al del DNA en disolución a elevadas concentraciones de LiCl (Wolf y col., 1977). En estos casos el DNA se condensa en una estructura secundaria similar a la del DNA-B (Maniatis y col., 1974).

El tamaño del DNA nucleosomal está relacionado con la magnitud de la banda de elipticidad negativa a 275 nm. Los nucleosomas con longitudes de DNA más cortas presentan una menor elipticidad que los nucleosomas mayores (Cowman y Fasman, 1980). La presencia de las histonas H1/H5 asociadas al DNA linker completan la condensación del DNA nucleosomal, como se comprueba al observar como varía el espectro de dicroísmo circular cuando estas histonas se disocian de los nucleosomas (Cowman y Fasman, 1980), oligonucleosomas (Tatchell y Van Holde, 1979) y cromatina (Watanabe e Iso, 1981).

La hipótesis de que el espectro de dicroísmo circular del DNA nucleosomal refleja su estructura terciaria se ha utilizado para interpretar los cambios estructurales provocados en el nucleosoma por diversos agentes (Harrington, 1982; Libertini y Small, 1982; Olins y col., 1977; Zama y col., 1976) y los observados "in vivo" por hiperacetilación de histonas (Bode y col., 1980; Yau y col., 1982).

1.5.2. DESNATURALIZACION TERMICA DEL DNA

Al aumentar la temperatura de una disolución de DNA de doble hélice se produce la desnaturalización de éste a una temperatura que depende de su composición de bases y de la concentración de cationes del medio. Esta desnaturalización se detecta fácilmente midiendo el incremento en la absorción de la luz UV (Hiper Cromicidad) que acompaña a la separación de las dos cadenas de la doble hélice.

La representación de la variación de la absorción en función de la temperatura se denomina perfil de desnaturalización o de fusión y refleja las transiciones estructurales del DNA a lo largo de su desnaturalización. El perfil de fusión de un complejo DNA-proteínas depende de una serie de parámetros como el tipo de DNA y proteínas, la fuerza iónica de la disolución, las interacciones entre ambas moléculas, el pH, etc.

La asociación de las histonas con el DNA se refleja en un aumento de la temperatura a la que se desnaturaliza éste (Temperatura de fusión: T_m). Esta estabilización se debe a la neutralización parcial de las cargas negativas del DNA por las cargas positivas de las histonas. Así, se reduce la repulsión electrostática entre las dos cadenas de la doble hélice y se requiere una temperatura más elevada para separarlas. Por otra parte, las uniones hidrofóbicas de las histonas con el DNA también juegan un papel en la estabilización (Bartley y Chalkley, 1972). En nucleosomas, estas interacciones bastan para explicar la estabilización observada en la curva de fusión. En la cromatina, la fusión

del DNA es un proceso mucho más complejo y hay que tener en cuenta otras interacciones provocadas por la superestructura (Wilhelm y col., 1974; Li y Bonner, 1971; Fulmer y Fasman, 1979).

El DNA nucleosomal libre se desnaturaliza sobre los 50 °C. Los cores nucleosomales manifiestan dos transiciones, una a 74 °C y otra a 60 °C (Cowman y Fasman, 1980; Van Holde y col., 1980; Weischet y col., 1978). Esta última se ha asignado a la desnaturalización de 40 pb situados en los dos extremos de la partícula (Weischet y col., 1978; Simpson, 1979).

Los nucleosomas de más de 140 pb de DNA presentan también perfiles de desnaturalización bifásicos. La temperatura de las transiciones depende de la longitud del DNA y la presencia o ausencia de H1/H5. Una mayor longitud de DNA linker tiende a desestabilizar térmicamente la partícula en ausencia de H1/H5. Estas histonas aumentan la estabilización tanto del DNA linker como del dispuesto en el core (Cowman y Fasman, 1980).

1.6. OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

El hecho de que la cromatina de levadura no presente cromosomas en metafase la convierte en un sistema de interés para el estudio de la estructura de la misma. En esta Investigación se ha abordado el estudio estructural de la cromatina de levadura con objeto de caracterizarla parcialmente.

El estudio de la estructura de la cromatina no se

puede llevar a cabo fácilmente sobre la totalidad del material, dada su enorme complejidad. Por este motivo se procedió a la obtención de fracciones solubles que, además de mostrar una menor complejidad, permiten la aplicación sobre ellas de técnicas espectroscópicas como el dicroísmo circular, con objeto de analizar la estructura terciaria que adopta el DNA en ellas. El estudio de las fracciones solubles también se ha abordado mediante desnaturalización térmica del DNA con el fin de determinar la estabilidad del mismo en dichas fracciones.

Por otra parte, se procedió al aislamiento de mononucleosomas de levadura a partir de núcleos, en cantidad suficiente para poder realizar sobre ellos estudios estructurales con las mismas técnicas que para las fracciones solubles de levadura.

de crecimiento del cultivo como se explica en el apartado 3.1. de Resultados.

Las células se recogieron en el estado de crecimiento deseado por centrifugación a 3000 g durante 5 minutos. Se lavaron dos veces con agua destilada centrifugandose de la misma forma.

2.3. PREPARACION DE DNH

2.3.1. Preparación de DNH cruda

La DNH cruda se obtuvo siguiendo el método descrito por Franco y López-Braña (1978). La levadura, prensada o proveniente de los cultivos, se homogeneizó en una disolución de tampón fosfato 5 mM, $MgSO_4$ 1 mM, pH 6.5, y en presencia de fluoruro de p-metilsulfonilo (PMSF) con objeto de inhibir la proteólisis; se usaron 900 ml de medio y 10 ml de PMSF 0.2 mM en alcohol isopropílico para 500 gramos de levadura. La homogeneización se llevó a cabo por agitación (7.5 cm de amplitud; 150 oscilaciones por minuto) a 0-4 °C durante 22 horas, en recipientes de plástico con 270 ml de perlas de vidrio de 2.5 mm de diámetro, 375 gr de perlas de vidrio de 6 mm de diámetro y 15 bolas de porcelana de 25 mm de diámetro.

El homogeneizado, previa adición de octanol para eliminar la espuma se centrifugó a 8000 g durante 50 minutos; el sedimento presentó dos capas de las cuales la inferior, blanquecina, estaba formada, fundamentalmente, por paredes y células sin romper, y la superior, más oscura,

01

contenía la mayor parte de la nucleoproteína. Recuperada la capa superior del sedimento se lavó dos veces con el mismo medio (centrifugación a 8000 g durante 40 minutos). El sedimento resultante se resuspendió en NaCl 0.14 M, Tris-HCl 5 mM, pH 7.5 y se centrifugó a 8000 g durante 20 minutos. Este lavado se repitió hasta que el sobrenadante quedó claro (de 4 a 6 veces). Posteriormente el sedimento se sometió a tres lavados con sacarosa 0.25 M, MgSO₄ 1 mM, Triton X-100 0.5% (v/v), Tris-HCl 5 mM, pH 8.0 (15000 g durante 10 minutos). El material obtenido se denominó DNH cruda. Todas las operaciones descritas se realizaron a una temperatura de 0-4 °C para disminuir en lo posible el riesgo de degradación. Con el mismo fin, distintas etapas de lavado a lo largo de todo el proceso se efectuaron en presencia de PMSF.

2.3.2. Purificación de DNH

La DNH cruda se purificó siguiendo el método descrito por Franco y López-Braña (1978), mediante centrifugación a través de un gradiente discontinuo de sacarosa. El gradiente se preparó con 15 ml de sacarosa 2.0 M, MgSO₄ 1 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 8.0 y 15 ml de sacarosa 1.5 M, MgSO₄ 1 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 8.0, centrifugándose a 35000 g durante dos horas. El sedimento se lavó una o dos veces con MgSO₄ 1 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 8.0. Todas las etapas del proceso se llevaron a cabo a una temperatura de 0-4 °C. El material así obtenido se denominó desoxirribonucleohistona (DNH) pura.

2.4. PREPARACION DE DNH SOLUBLE

2.4.1. Solubilización de DNH por diálisis

La DNH pura se lavó dos veces con 10 volúmenes de agua destilada (18000 g durante 10 minutos). El sedimento se resuspendió en 10 volúmenes de Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5 y se sometió a diálisis exhaustiva a 0-4 °C frente a 25 volúmenes del mismo medio en presencia de PMSF (5-6 cambios durante cinco días). La fracción de DNH-S_a se obtuvo tras centrifugación a 35000 g durante 30 minutos.

2.4.2. Solubilización por digestión con nucleasa micrococcal

La DNH pura se lavó con tampón de digestión (sacrosa 0.3 M, CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl 5 mM, pH 7.3) y se centrifugó a 20000 g durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en el medio de digestión a una concentración de 3 mg de DNA por ml del tampón y se procedió a la digestión con nucleasa micrococcal (EC 3.1.4.7. Boehringer Mannheim) de la forma descrita por Woodhead y Johns (1976). Se añadieron a esta suspensión 200 unidades de nucleasa micrococcal por ml y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

Para detener la reacción se añadió EDTA 0.1 M, en frío, hasta llevar la disolución a una concentración final de 1.7 mM, centrifugándose a continuación a 1800 g durante 10 minutos. El sobrenadante constituyó la fracción inicial de DNH pura solubilizada por la digestión enzimática.

Con el fin de eliminar los oligonucleótidos generados en la digestión, se añadió $MgCl_2$ hasta una concentración de 10 mM. Se dejó precipitar durante una hora y se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en Tris 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5 y se dializó frente al mismo medio, con lo que se consiguió su resolubilización. Esta disolución constituyó la fracción DNH-S_b.

2.5. PREPARACION DE NUCLEOS DE S. cerevisiae

El método de obtención de núcleos que se ha seguido pasa a través de una etapa de esferoplastos. Esto es necesario debido a que la obtención de los núcleos se realiza mediante lisis osmótica de las células. Dado que las células de levadura poseen pared celular, es necesario eliminarla para poder lisar osmóticamente las células.

2.5.1. Transformación de las células en esferoplastos

Se siguió el procedimiento de Lohr e Ide (1979) con algunas modificaciones. La eliminación de la pared celular de levadura se lleva a cabo por digestión de la misma con β -Glucuronidasa. Esta reacción se ha visto que se ve favorecida preincubando las células con algún agente reductor como el β -Mercaptoetanol. Así, las células se suspendieron en el medio de pretratamiento (Tris 0.1 M, EDTA 5 mM, β -Mercaptoetanol 75 mM, pH 8.0) hasta una concentración de 0.25 g de células por ml. En el caso de células en fase estacionaria la suspensión de células se incubó durante 30

minutos a 32 °C con agitación; en el caso de células en fase exponencial la incubación tuvo lugar a 0 °C. Tras ello, se centrifugó durante 5 minutos a 1000 g. Las células se lavaron con el medio de digestión (Sorbitol 1.1 M, fosfato potásico 24 mM, pH 6.5) y se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en el mismo medio a una concentración de 0.25 g de células por ml y se añadió CaCl_2 hasta una concentración de 4 mM. La mezcla se atemperó a 37 °C, se añadió la enzima (β -Glucuronidasa-Arilsulfatasa; Boehringer-Mannheim) en una relación de 0.4 ml por gramo de levadura (La casa comercial suministra esta enzima como una disolución cruda) y se incubó a 37 °C. La formación de los esferoplastos se siguió mediante observación al microscopio óptico y el tiempo de incubación no fue nunca superior a una hora. El seguimiento de la formación de esferoplastos se hizo en base al diferente aspecto que muestran al microscopio óptico las células intactas y los esferoplastos. Las primeras presentan una sección irregular mientras que los esferoplastos muestran una sección circular. Otro procedimiento para seguir la formación de esferoplastos fue observar el efecto de añadir SDS al 1% sobre la muestra. La disolución de SDS entra por capilaridad entre el porta y el cubreobjetos y los esferoplastos lisan. Por el contrario, las células que aún mantienen la pared celular permanecen intactas. Tras comprobar que la casi totalidad de las células se habían transformado en esferoplastos (siempre se alcanzó el 90% de rendimiento), éstos se recogieron por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos. Los esferoplastos se lavaron con el mismo medio de digestión, ya sin

CaCl₂, con el fin de eliminar los restos de la enzima.

2.5.2. Lisis de los esferoplastos

Los esferoplastos obtenidos según se ha descrito en el apartado anterior se lisaron con objeto de aislar los núcleos. Para ello, inicialmente se siguió el procedimiento descrito por Lohr y col. (1977a), basado a su vez en el de Wintersberger y col. (1973). Los esferoplastos se suspendieron en Ficoll 18%, fosfato potásico 20 mM, MgCl₂ 0.5 mM, pH 6.8. Este medio no estabiliza osmóticamente a los esferoplastos por lo que lisan. Los núcleos se aislaron por centrifugación diferencial. Los esferoplastos que no habían lisado y las células intactas sedimentaron al centrifugar a 4000 g durante 5 minutos. Los núcleos se obtuvieron por centrifugación a 30000 g durante 20 minutos. Los fragmentos de membrana, mitocondrias y demás partículas citoplásmicas permanecen en la superficie debido a la alta densidad de este medio. Los núcleos se resuspendieron en 4 volúmenes de Ficoll 7%, Glicerol 20%, Sorbitol 1 M. Tras ello se dieron tres centrifugaciones a 7000, 6500 y 6000 rpm en un rotor Sorvall SS34 para eliminar los últimos restos de esferoplastos y células (Lohr y col., 1977a). Por último, los núcleos se obtuvieron centrifugando a 20000 g durante 25 minutos.

Con el método descrito en el párrafo anterior se obtuvo un rendimiento bajo en núcleos (Ver Resultados). Por ello se intentó favorecer la lisis de los esferoplastos mediante el uso de un homogeneizador Potter-Elvehjem (Wintersberger y col., 1973), pero esto solo consiguió

aumentar un poco el rendimiento en núcleos.

Un segundo método utilizado para lisar los esferoplastos de levadura fue el seguido por Nelson y col. (1977) con algunas modificaciones. Los esferoplastos se suspendieron una vez en el medio TKMC (Tris-HCl 50 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 1 mM, Sacarosa 250 mM, pH 7.5, Triton X-100 0.5%) en el que lisan. Los núcleos se sedimentaron centrifugando a 4000 g durante 10 minutos. En el sedimento, junto con los núcleos se encuentran las células intactas y los esferoplastos que no hayan lisado. Por ello el sedimento se resuspendió en el medio de homogeneización descrito en el método anterior y se procedió como en él se describe hasta la obtención de los núcleos. Este método condujo al aislamiento de núcleos con un rendimiento superior al anterior (Ver Resultados).

Por último, se siguió el método descrito por Schultz (1978) el cual está basado en el de Wintersberger y col. (1973) con algunas modificaciones. Los esferoplastos se lisaron por suspensión en 5 volúmenes del medio de lisis (Ficoll 18%, fosfato potásico 20 mM, CaCl₂ 0.5 mM, PMSF 1 mM pH 6.8). Esta suspensión se agitó vigorosamente durante 1 minuto en un Vortex y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 g con el fin de eliminar células intactas que no se hubieran transformado en esferoplastos. El sobrenadante se centrifugó a 27000 g durante 25 minutos sedimentando los núcleos. En el sobrenadante final queda material citoplasmático así como restos de membranas que forman una capa en la superficie. El sedimento de núcleos se resuspendió en dos volúmenes del medio HM (Sorbitol 1 M, Glicerol 20%, Ficoll 7%, CaCl₂ 0.5

mM, fosfato potásico 20 mM, PMSF 0.5 mM pH 6.8) y luego se añadieron otros 8 volúmenes del mismo medio. Se centrifugó durante 5 minutos a 4000 g, un número variable de veces hasta que no se obtuvo sedimento. Estos sedimentos, compuestos de células intactas, se eliminaron. El sobrenadante final se centrifugó durante 25 minutos a 27000 g con lo que sedimentaron los núcleos. La pureza de estos núcleos se comprobó mediante observación al microscopio, no detectándose ninguna célula.

Como se comentará más adelante en el apartado de Resultados, este último método fue el que dió unos mejores resultados en cuanto al rendimiento en núcleos, por lo que fue el utilizado en esta investigación. Otro factor que también se tuvo en cuenta fue el de la estabilidad de los núcleos en cuanto a su facilidad para lisar en el medio de digestión con nucleasa micrococcal. Se comprobó que los núcleos obtenidos por este último método eran los más estables.

2.6. PREPARACION Y FRACCIONAMIENTO DE CROMATINA

2.6.1. Obtención de fracciones solubles

2.6.1.1. Digestión de núcleos con nucleasa micrococcal

Se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Estruch y col. (1986a). Los núcleos se lavaron con el medio de digestión (Sacarosa 0.25 M, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, CaCl₂ 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4), centrifugándose 10

minutos a 2000 g. Los núcleos se resuspendieron en el mismo medio y se procedió a valorar el DNA que contenían, lo que se llevó a cabo por el procedimiento descrito en el apartado 2.8.1. Los núcleos se ajustaron a una concentración de 0.1 mg de DNA/ml con el medio de digestión. Se atemperó la mezcla a 37 °C y se añadió nucleasa micrococcal en una relación de 1.5U/ g DNA. La incubación se llevó a cabo a 37 °C durante el tiempo requerido. La reacción se detuvo por adición de 1/10 volumen de EDTA 0.15 M pH 7.5 y las muestras se mantuvieron a 0-4 °C. Las muestras también se hicieron 0.1 mM en PMSF, a no ser que fueran a ser tratadas con proteasas.

La evolución de la digestión se siguió por valoración del DNA soluble en ácido. Para ello se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación.

Para la valoración del DNA soluble en ácido se siguió el método descrito por Lohr y col. (1977). A las alícuotas tomadas de la mezcla de digestión se les añadió PCA 1 N, NaCl 1 M frío hasta una concentración de PCA 0.3 N, NaCl 0.3 M. Las muestras se agitaron durante 10 minutos y se centrifugaron a 15000 g durante 15 minutos. El sedimento se lavó una vez con PCA 0.3 N, NaCl 0.3 M y se recentrifugó. Los sobrenadantes constituyeron la fracción soluble en ácido y el sedimento la fracción no soluble en ácido.

Las muestras solubles en ácido se ajustaron a una concentración 0.5 N de PCA y se hidrolizaron a 70 °C durante 15 minutos. Este hidrolizado se denominó fracción S. Las muestras insolubles en ácido fueron hidrolizadas en PCA 0.5 N a 70 °C durante 20 minutos. Entonces, se centrifugaron a

15000 g durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante, y el sedimento se reextrajo con PCA 0.5 N durante 15 minutos a 70 °C y se centrifugó de nuevo a 15000 g durante 15 minutos. Los dos sobrenadantes se combinaron y constituyeron las fracciones P, insolubles en ácido.

2.6.1.2. Fraccionamiento de la cromatina

Los núcleos de levadura se digirieron inicialmente hasta un 5% de DNA soluble en ácido. Tras ello, se centrifugaron los núcleos a 2000 g durante 10 minutos. El sobrenadante constituyó la fracción S1. El sedimento P1 se lisó por adición de Tris 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5, en frío, agitándose durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 30000 g durante 15 minutos y el sobrenadante constituyó la fracción S2.

Otro tipo de fraccionamiento se llevó a cabo efectuando una digestión más suave (30 segundos)(Ver Resultados). Las fracciones S2 se obtuvieron de la misma forma que se ha descrito en el párrafo anterior. En este fraccionamiento el sedimento P2 se dializó frente a Tris 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5 toda la noche, tras lo que se centrifugó de la misma manera obteniéndose la fracción S2'.

Las fracciones solubles se purificaron parcialmente por precipitación con $MgCl_2$, eliminándose los oligonucleotidos presentes. El precipitado se resolubilizó por diálisis frente a Tris 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5.

2.6.2. Aislamiento de mononucleosomas de levadura

Los núcleos de levadura se digirieron con nucleasa micrococcal en las condiciones descritas por Nelson y col. (1977). Los núcleos se lavaron con el medio de digestión (Sacarosa 0.25 M, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 1 mM, Tris-cacodilato 15 mM, pH 6.5), centrifugandose a 2000 g durante 10 minutos. Los núcleos se resuspendieron en el mismo medio a una concentración de 0.1 mg DNA/ml. La mezcla se atemperó a 37 °C y se añadió nucleasa micrococcal en una relación de 1U/ g DNA. La reacción se detuvo por adición de 1/10 volumen de EDTA 0.15 M pH 7.5.

La evolución de la digestión se siguió por análisis de los tamaños de los fragmentos de DNA. Para ello se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación. El DNA se aisló de la forma que se describe en el apartado 2.8.4. y se sometió a electroforesis. El análisis del tamaño de los fragmentos de DNA originados en la digestión indicaron que a los 30 minutos de incubación había un mayor enriquecimiento en mononucleosomas (Vease apartado 3.7.1. de Resultados). Por este motivo se incubaron los núcleos con nucleasa micrococcal a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo de la forma ya indicada en el apartado 2.5. mediante adición de 1/10 volumen de EDTA 0.15 M pH 7.5, PMSF 1 mM.

Los núcleos digeridos se lisaron por diálisis frente a Tris 10 mM, EDTA 0.7 mM, PMSF 0.1 mM pH 7.5 durante una noche. Tras ello, se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos para sedimentar los restos nucleares y se recogió el sobrenadante, S2, el cual contenía el material solubilizado

por la digestión.

2.6.2.1. Cromatografía en Biogel A-5m

La fracción soluble S2 obtenida como se describe en el apartado 2.6.2. se concentró mediante ultrafiltración en un Diaflo Amicon con una membrana PM-30 hasta un volumen aproximado de 1 ml.

La totalidad de este volumen se aplicó en una columna de Biogel A-5m (Biorad) de 90 x 1.5 cm, con un flujo de unos 11-12 ml/h. Se recogieron fracciones de 1.25 ml en las que se midió la A_{260} . En algunas de estas fracciones también se analizó el tamaño de los fragmentos de DNA.

A la vista del perfil de elución y de los resultados de la electroforesis del DNA presente en las diferentes fracciones (Vease Resultados), se juntaron las fracciones que interesaron tal como se describe en el apartado 3.7. Estos picos se concentraron como anteriormente se ha explicado para la fracción S2 en un Diaflo Amicon con una membrana PM-30.

2.7. TECNICAS ESPECTROSCOPICAS

2.7.1. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se realizaron en un dicrógrafo Jobin-Yvon Mark III equipado con una lámpara de arco de xenon de 250 W, refrigerada por agua. El aire contenido en la cámara de muestra, sistema óptico y

cámara de fotomultiplicador se desalojó con una corriente de nitrógeno mantenida durante la realización del espectro. Para este estudio se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Los espectros de las muestras nucleoproteicas se hicieron normalmente en el ultravioleta próximo (320-250 nm). Los espectros se registraron por triplicado a una velocidad de barrido de 0.5 nm/s y una velocidad de carta de 2 mm/nm. La línea base se registró en las mismas condiciones con el tampón de disolución de la muestra. Debido a la baja concentración de algunas de las muestras, en ocasiones se trabajó a la máxima sensibilidad; en estos casos los espectros se registraron por cuadruplicado.

La elipticidad a cada longitud de onda se expresa como elipticidad molar por residuo de nucleótido en unidades de grado \times $\text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$. El peso molecular medio por residuo de nucleótido que se consideró fue de 330. La elipticidad molar por residuo se calcula según la siguiente expresión:

$$[\Theta] = \frac{330 \times 3300 \times S \times H}{d \times C}$$

siendo

[Θ]: elipticidad molar por residuo;

S : sensibilidad a la que se registra el espectro;

H : mm a cada longitud de onda entre la curva del espectro y la línea base;

d : paso óptico en cm;

C : concentración en mg/ml;

3300 es el factor numérico de conversión entre dicroísmo circular y elipticidad.

La concentración de DNA en las muestras se calculó a partir del espectro de absorción en la región ultravioleta. El valor de $E_{260}^{0.1\%}$ para el DNA en cromatina que se consideró fue de 20. Los espectros se corrigieron para eliminar la dispersión de la misma forma que se indica en el siguiente apartado.

2.7.2. Espectros de absorción

Se realizaron en un espectrofotómetro Cary 118, mediante un programa de amplificación constante de la señal por variación continua de la anchura de rendija. Para la realización de los espectros se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En los casos en que había dispersión, la absorción aparente debida a la misma se descontó de la medida experimental en base a la relación lineal que existe entre el valor de absorción aparente y el inverso de la cuarta potencia de la longitud de onda.

2.7.3. Desnaturalización térmica de DNA y nucleoproteínas

Los estudios de desnaturalización térmica se hicieron en un espectrofotómetro Beckman DU-8 equipado con el módulo TM. Se utilizó un bloque de seis cubetas de cuarzo de

un volumen de 0.34 ml cada una de ellas, lo que permite el registro simultáneo de la desnaturalización de hasta cinco muestras.

Los perfiles de desnaturalización térmica se obtuvieron a baja fuerza iónica. Para ello las muestras se dializaron previamente frente a EDTA 0.25 mM pH ,8.0 (ajustado con Tris) durante 24 horas a 0-4 °C.

Las curvas de transición se obtuvieron registrando la absorbancia a 260 nm de las muestras a diferentes temperaturas. La temperatura se incrementó de grado en grado entre 25 y 102 °C y se dejó atemperar durante un minuto antes de realizar la medida. El valor de absorbancia tomado a cada temperatura fue la media de cinco determinaciones. La rendija empleada en estas determinaciones fue de 0.5 nm.

Con el fin de poder comparar curvas de desnaturalización térmica obtenidas a diferentes concentraciones de DNA, los valores de A_{260} para cada temperatura se transformaron en hipercromicidad (tanto por ciento) mediante la expresión:

$$H(T) = \frac{A_{260}(T) - A_{260}(25)}{A_{260}(25)} \times 100$$

Donde $H(T)$ es la hipercromicidad a la temperatura T ; $A_{260}(T)$ es la absorbancia a 260 nm a la temperatura T ; y $A_{260}(25)$ es la absorbancia a 260 nm a 25 °C.

A partir de los valores de hipercromicidad calcu-

lados se calcularon a su vez los valores de la primera derivada. Para hallar la derivada en un punto se tomó un intervalo impar de puntos ($2n + 1$) compuesto por el punto que se está calculando y los n anteriores y los n posteriores. En dicho intervalo se ajustó una recta por regresión lineal mediante mínimos cuadrados y se tomó como pendiente en el punto considerado la de la recta ajustada. En todas las curvas de desnaturalización térmica realizadas en esta investigación se ha utilizado un intervalo de 5 puntos.

Las curvas derivadas obtenidas de algunas de las curvas de desnaturalización térmica se descompusieron en tres gaussianas con objeto de cuantificar cada una de las transiciones. No se llevó a cabo ningún ajuste fino por lo que los datos han de ser tomados con precaución.

2.8. METODOS ANALITICOS

2.8.1. Valoración espectrofotométrica de DNA

Se siguió un método basado en el descrito por Schmidt y Thanhauser (1945). Las alícuotas de cada muestra se llevaron hasta 2 ml con agua destilada. El material soluble en ácido se eliminó por adición de 1 ml de PCA 0.6 N frío. Se dejó precipitar en baño de hielo durante 10 minutos y se centrifugó. El precipitado se lavó con 1 ml de PCA 0.2 N.

El precipitado se disolvió en 2 ml de KOH 0.3 N y se incubó a 37 °C durante una hora. Tras ello se enfrió en baño de hielo 10 minutos, se añadieron 2 ml de PCA 0.6 N y

se dejó precipitar en frío durante 30 minutos. Tras centrifugar se recogió el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de PCA 0.2 N. Este segundo sobrenadante se juntó con el anterior y constituyó la fracción RNA.

El precipitado se suspendió en 2 ml de PCA 0.6 N y se incubó durante 30 minutos en un baño de agua a 100 °C. Se dejó enfriar durante 15 minutos en baño de hielo y se centrifugó. Tras recoger el sobrenadante el precipitado se lavó con 1 ml de PCA 0.6 N. El sobrenadante se juntó con el anterior y constituyó la fracción DNA.

El contenido en RNA y DNA en cada una de estas fracciones se obtuvo mediante la medida de la A_{260} , considerando 22.4 y 28.5 como valores de los coeficientes de extinción $E^{0.1\%}$ a 260 nm de los desoxiribonucleótidos y de los ribonucleótidos, respectivamente.

2.8.2. Valoración de DNA. Método fluorimétrico

El DNA se valoró siguiendo el procedimiento empleado por Lohr y col. (1977) con algunas modificaciones. Se trata de un método fluorimétrico basado en el de Kissane y Robins (1958) y Fiszer-Szafarz y col. (1981).

El reactivo se preparó de la siguiente manera: 300 mg de ácido diaminobenzoico (DABA) se disolvieron por agitación en 1 ml de HCl 4 N. A continuación se añadieron 150 mg de carbón activo, se agitó y se centrifugó. El sobrenadante se filtró a través de un filtro Sartorius de 0.45 μ m. Este reactivo debe mantenerse en la oscuridad y ser usado en las dos horas siguientes a su preparación.

El ensayo consistió en la mezcla de 0.1 ml del reactivo DABA con 0.2 ml de la muestra, incubándose a temperatura ambiente durante 60 minutos. Finalmente, la mezcla de reacción se diluyó con 0.9 ml de PCA 0.6 N. Los blancos se prepararon de idéntica forma que las muestras.

Seguidamente se midió la intensidad de fluorescencia de las muestras en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPF-44E, con una longitud de onda de excitación de 405 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm (Las rendijas fueron 5 y 7 nm respectivamente). Todas las medidas se llevaron a cabo a 28 °C.

Para la determinación del DNA soluble en ácido no fue necesario la preparación de unos patrones de concentración de DNA conocida. Una vez restada la intensidad de fluorescencia de cada blanco, se consideró que la suma de las intensidades de fluorescencia de las fracciones S y P para un mismo tiempo de incubación era el 100% del DNA presente en la alícuota tomada a ese tiempo de digestión. La solubilidad en ácido se determinó mediante la expresión:

$$\% \text{ DNA soluble en ácido} = \frac{I_s}{I_s + I_p}$$

para cada tiempo de incubación, siendo:

I_s : Intensidad de fluorescencia de la fracción S;

I_p : Intensidad de fluorescencia de la fracción P.

2.8.3. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida-agarosa

La composición de los geles fue de acrilamida 4%, agarosa 0.5%. Los geles se realizaron de la siguiente manera. Por una parte, se mezclaron 4.8 ml de acrilamida 40%, 3.3 ml de bisacrilamida 2% y 10 ml de tampón TBE concentrado cinco veces. Esta mezcla se ajustó con agua destilada a 25 ml y se desgasificó a vacío. Tras esto, se atemperó a 37 °C.

Por otra parte, 0.25 g de agarosa se disolvieron en agua destilada mediante ebullición. Una vez disuelta, el volumen se ajustó a 25 ml y se atemperó a 50 °C.

Una vez que la disolución de agarosa estuvo a 50 °C se vertió sobre la de acrilamida con agitación suave. Entonces se añadieron 20 μ l de TEMED y 158 μ l de persulfato amónico 20%. La mezcla se agitó suavemente y se vertió entre dos placas de vidrio previamente calentadas y se dejó a temperatura ambiente hasta la polimerización.

Una vez polimerizado el gel, éste se sometió a preelectroforesis durante dos horas a 200 V, en tampón TBE. Tras la preelectroforesis se procedió a la aplicación de las muestras disueltas en TBE, glicerol 10%, azul de bromofenol 1%, realizándose la electroforesis a un voltaje constante de 200 V. La electroforesis se detuvo cuando el azul de bromofenol salió del gel.

La tinción del gel se llevó a cabo con bromuro de etidio a una concentración de 2 μ g/ml durante 20 minutos. A continuación se lavó repetidamente con agua destilada. Las bandas de DNA se visualizaron mediante iluminación con luz

ultravioleta, para lo que se utilizó un transiluminador UV.

2.8.4. Aislamiento de DNA

Se siguió el procedimiento descrito por Marmur (1961) con algunas modificaciones.

Las diferentes muestras, cada una de ellas disuelta en su respectivo medio, se tratan durante 1 hora a 37 °C con RNasa pancreática a una concentración de enzima de 100 µg/ml. La RNasa pancreática había sido previamente tratada para eliminar cualquier actividad DNasa que pudiera haber en el producto comercial. Este tratamiento consistió en calentar a 90 °C durante 30 minutos.

Tras la digestión con RNasa se añade SDS hasta una concentración final de 0.5% (p/v) y proteinasa K a una concentración de 100 µg/ml. La mezcla de reacción se incuba a 37 °C durante 4 horas.

Después del tratamiento con proteinasa K las muestras se desproteinizan por adición de 2 volúmenes de cloroformo/octanol (24:1 v/v). Tras una vigorosa agitación se centrifuga en una microfuga Eppendorf durante 10 minutos, con lo que se separan las dos fases. Se recoge la fase acuosa, en la que se encuentra el DNA y se repite este tratamiento hasta que en la interfase no aparece ningún precipitado. El DNA presente en la fase acuosa final se precipita por adición de dos volúmenes de etanol 100% frío, dejándose toda la noche a -20 °C.

El DNA precipitado se sedimenta por centrifugación en una microfuga Eppendorf durante 10 minutos (0-4 °C). El

sedimento se lavó dos veces con etanol 100% frío y se secó en un Speed-Vac. Estas muestras se almacenaron hasta su utilización para determinar su tamaño mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-agarosa (Vease apartado 2.8.3.).

2.8.6. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Los geles se prepararon en placas de acuerdo con Panyim y Chalkley (1969). El espesor de los geles fue de 1 mm y la longitud de 17 cm.

La mezcla de polimerización se preparó juntando las siguientes disoluciones en la relación que se indica:

- A. Acrilamida 60%(p/v), bisacrilamida 0.4%(p/v)
- B. Acido acético glacial 43.2%(v/v), TEMED 4%.
- C. Urea 2.5 M, persulfato amónico 0.07%.

2A:1B:5C

Los geles se sometieron a preelectroforesis para eliminar el exceso de TEMED y persulfato (2 horas a 160 V). El tampón fue ácido acético 0.9 N.

Las muestras se disolvieron en ácido acético 0.18 N, urea 8 M. La electroforesis se desarrolló con el mismo tampón que la preelectroforesis durante 3 horas y media a 160 V.

Tras la electroforesis, la presencia de materiales proteicos se detectó mediante teñido con sales de plata.

2.9. OTROS METODOS

2.9.1. Tratamiento de bolsas de diálisis

Todas las diálisis llevadas a cabo en esta investigación se hicieron en bolsas tratadas de la forma que se describe a continuación. Se siguió el procedimiento descrito por McPhie (1971). La bolsa de diálisis se cortó en trozos de longitud apropiada. Estos trozos se empaparon, se abrieron bien y se sometieron a:

- 1 hora en etanol 50%
- 1 hora en etanol 50%
- 2 x 2 horas en NaHCO_3 10 mM
- 2 x 2 horas en EDTA 1 mM
- 2 x 1 hora en H_2O destilada

Los piezas se almacenaron en agua destilada a 4 °C. En caso de preveer un largo almacenamiento se añadió azida sódica.

Antes de su utilización se lavaron abundantemente con agua destilada, tanto por dentro como por fuera. En todo momento las bolsas de diálisis se manejaron con guantes.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. CULTIVO DE LEVADURA

Los cultivos de levadura se llevaron a cabo según se describe en el apartado 2.2. En la Figura 13 se muestra la curva de crecimiento de la cepa CECT-1383 de Saccharomyces cerevisiae, expresados como número de células y peso de las mismas en función del tiempo. Con vistas a una mayor rapidez en la determinación del estado en que se encontraba el cultivo, se estableció una relación entre ambos parámetros mencionados y la turbidez del medio de cultivo (A_{600}). Mediante esta rápida determinación se logró detener los cultivos prácticamente en el estado de crecimiento deseado.

Los cultivos se detuvieron en dos diferentes puntos de la curva de crecimiento, uno correspondiente a la fase de crecimiento exponencial y otro a la fase estacionaria. Para la obtención de células en fase exponencial se recogieron a una densidad de $4-5 \times 10^7$ células/ml. Para células en fase estacionaria se recogieron a $1-2 \times 10^8$ células/ml.

3.2. AISLAMIENTO Y ANALISIS DE NUCLEOS DE LEVADURA

Los métodos publicados para el aislamiento de núcleos de levadura son fundamentalmente de dos tipos. Uno es a partir de células normales usando varios métodos de presión (Tekamp y col., 1979; Bhargava y Halvorson, 1971;

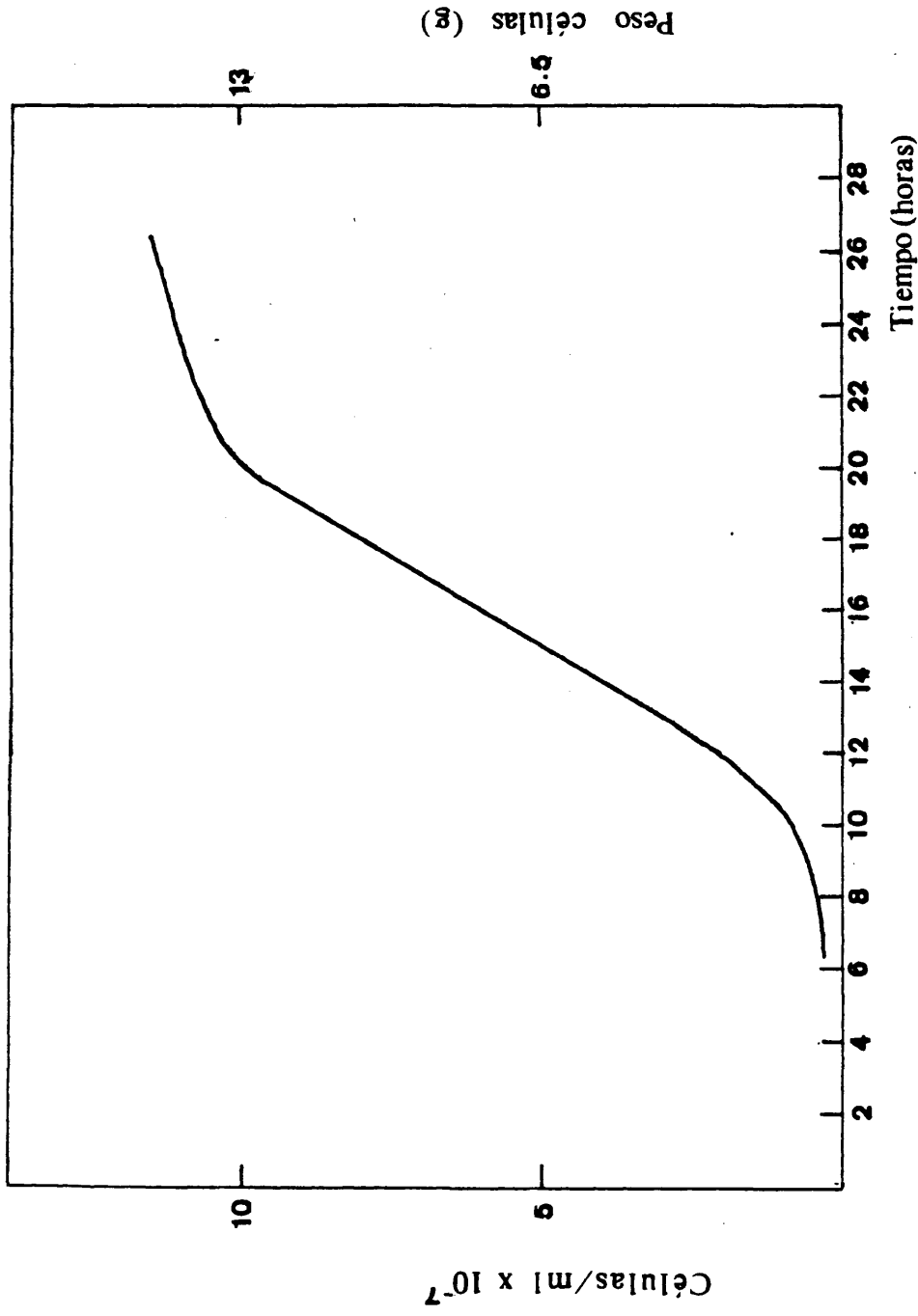


Figura 13.- Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* (CECT-1383). Se muestra el número de células por ml y el peso húmedo de las células en función del tiempo.

Sajdel-Sulkowska y col., 1974); el otro es a través de la formación de esferoplastos por digestión enzimática de la pared celular y subsiguiente lisis del esferoplasto por choque osmótico (May, 1971; Wintersberger y col., 1973; Schultz, 1978; Sledziewsky y col., 1982). Aunque los núcleos obtenidos por el primer método provienen de células normales el rendimiento es muy bajo y además sufren daños durante el aislamiento. El segundo método da mayores rendimientos y en base a ello es el que se ha utilizado. Además, los núcleos parece que no sufren ningún daño, aunque su estado fisiológico puede verse afectado (Ide y Saunders, 1981).

En esta investigación se siguieron los procedimientos descritos en el apartado 2.5. Un paso previo es la transformación de las células en esferoplastos (Vease apartado 2.5.1.). Esta transformación se controló mediante la observación al microscopio, en base al diferente aspecto que muestran las células y los esferoplastos respectivamente. Las células intactas presentan un contorno irregular mientras que los esferoplastos, como indica su propio nombre, presentan una sección circular. Una comprobación adicional se realizó por observación del efecto de SDS al 1% sobre la muestra. La disolución de SDS penetra por capilaridad entre el porta y el cubreobjetos y los esferoplastos lisan. Por el contrario, las células que aún mantienen la pared celular permanecen intactas. Mediante este procedimiento pudo comprobarse que la formación de esferoplastos superó siempre el 90% de rendimiento.

En cuanto a la lisis osmótica de los esferoplastos con objeto de obtener los núcleos se observó una gran dife-

rencia entre los métodos utilizados, tanto en el rendimiento como en la estabilidad de los núcleos obtenidos.

Inicialmente se siguió el método descrito por Lohr y col. (1977b), basado en el de Wintersberger y col. (1973). Se observó que el rendimiento en núcleos era muy pequeño. En un principio se pensó que era debido a una incompleta lisis de los esferoplastos por lo que se intentó solucionar mediante el uso de un homogeneizador Potter-Elvehjem (Wintersberger y col., 1973). Sin embargo, esto aumentó muy poco el rendimiento en núcleos. Por otro lado, también se comprobó que los núcleos obtenidos por este procedimiento eran poco estables, pues cuando se resuspendían en el medio de digestión con nucleasa micrococcal lisaban con gran facilidad.

Debido a estos inconvenientes se procedió al aislamiento de núcleos, a partir de esferoplastos, según otros procedimientos. De esta manera, se determinó que el método de Nelson y col. (1977), modificado según se describe en el apartado 2.5.2., conducía al aislamiento de núcleos con un rendimiento superior al anterior. Además, estos núcleos resultaron ser mucho más estables que los anteriores en cuanto a que no lisaban al suspenderlos en el medio de digestión de nucleasa micrococcal.

Finalmente, se utilizó el método de Schultz (1978) que resultó ser el mejor. Este método es prácticamente el mismo que el de Lohr y col. (1977b), pero difiere en que tanto en el medio de lisis como en el medio de homogeneización se utiliza Ca^{++} en lugar de Mg^{++} . Parece ser que el Ca^{++} preserva al núcleo de lisar, aunque incluso se utilice

una fuerte agitación, lo que concuerda con los resultados obtenidos con el método de Nelson y col. (1977), método que incorpora Ca^{++} en todos sus medios (Vease apartado 2.5.2.).

En el método de obtención de esferoplastos también está presente el Ca^{++} en el medio de incubación con β -Glucuronidasa. Los resultados parecen indicar que el Ca^{++} activa de alguna forma a la enzima con lo que los esferoplastos se obtienen más rápidamente, lo que impide también una pronta lisis nuclear y de una degradación del material genético. Todas estas características llevaron a considerar este último método de lisis de esferoplastos como el más idóneo para la obtención de núcleos de levadura.

Una vez que los núcleos se han suspendido en el medio de digestión con nucleasas son estables solo durante unos pocos días, por lo que es conveniente, y así se ha realizado en esta investigación, su rápida utilización.

3.2.1. Composición de los núcleos de levadura

Los núcleos de levadura obtenidos a partir de células en fase exponencial o en fase estacionaria se analizaron según se describe en el apartado 2.8.1. En la Tabla IX se muestran los resultados obtenidos expresados como relación en peso con respecto al DNA.

Puede observarse como la relación RNA/DNA es prácticamente igual para los núcleos de fase exponencial y estacionaria (2.15 y 2.4 respectivamente). Tampoco hay grandes diferencias en la relación proteína/DNA entre los núcleos de diferente estado de crecimiento. Estos valores

TABLA IX

	<u>DNA</u>	<u>RNA</u>	<u>PROTEINA</u>
Núcleos fase exponencial	1	2.15	14.2
Núcleos fase estacionaria	1	2.40	14.6

Composición de los núcleos de Sacharomyces cerevisiae obtenidos a partir de células en fase estacionaria y en fase exponencial.

están en consonancia con los valores obtenidos por otros autores (Bhargava y Halvorson, 1971; Wintersberger y col., 1973; Duffus, 1975).

Los resultados mostrados en la Tabla IX son de difícil interpretación, si bien podrían esperarse unas diferentes relaciones entre los núcleos de fase exponencial y los de fase estacionaria. Ide y Saunders (1981) han sugerido que los núcleos obtenidos por procedimientos como el que se ha seguido en esta investigación pueden verse afectados en su estado fisiológico. Efectivamente, en el tiempo transcurrido desde la recogida de las células hasta la obtención de los núcleos es posible que estos sufran cambios fisiológicos, especialmente en el proceso de formación de esferoplastos, durante el cual se incuban las células a 37 °C.

3.3. ESTUDIO DE LA FRACCIÓN S₂ DE DNH SOLUBILIZADA POR DIALISIS

El estudio estructural sobre la cromatina de levadura se inició con este material por un motivo doble. Por un lado se trata de una fracción de fácil preparación. Por otro, su caracterización se había ya iniciado en este laboratorio (Franco y López-Braña, 1978; Castro y col., 1982).

La fracción DNH-S₂ de levadura prensada se obtuvo según se detalla en el apartado 2.4.1. Un primer paso en su análisis fue la realización de su espectro de absorción en la región ultravioleta. Este mostró un aspecto típico de cromatina soluble, con un máximo a 258 nm y un mínimo alrededor de los 235 nm. Sin embargo, el material obtenido en

cada experimento era diferente a los demás en varios aspectos del espectro. En primer lugar, hay que reflejar la diferencia existente en la A_{260} en cada caso, lo que indica un diferente contenido en polinucleótidos. Puesto que las condiciones de la diálisis que conduce a la solubilización son constantes, un mayor o menor contenido en polinucleótidos implica una mayor o menor solubilidad de esta fracción de DNH, respectivamente, quizá debida incluso a algún factor ajeno al procedimiento. Otro aspecto variable fue la relación A_{230}/A_{260} , índice de la relación proteína/ácido nucleico.

La valoración de DNA, RNA y proteínas apoyó lo anteriormente expuesto (ver adelante), comprobándose que sus concentraciones eran variables de unos experimentos a otros. Como se indica en Materiales y Métodos (Vease apartado 2.8.1.) el paso inicial de la valoración de DNA y RNA supone la eliminación del material soluble en ácido. Este material se valoró en cierta forma mediante la medida de la A_{260} , mostrando ser muy variable. En este material se deben encontrar principalmente los fragmentos de ácidos nucleicos lo suficientemente pequeños para no precipitar a esa concentración de ácido perclórico (PCA). En una primera aproximación se podría tratar de establecer una relación entre la A_{260} de la fracción S_a y el contenido en oligonucleótidos solubles en ácido presentes en la misma, lo que llevaría a sugerir que la mayor o menor solubilización de la DNH sería el resultado de una mayor o menor degradación de la misma. Sin embargo, el contenido en material soluble en ácido no justifica totalmente la variación en A_{260} . Como confirmación,

los valores obtenidos en el análisis de DNA y RNA fueron también variables sin mostrar relación en absoluto con la cantidad de material soluble en ácido.

A continuación se presentan algunos de los resultados obtenidos con algunas de las muestras S_a aisladas. Se presentan únicamente aquellos que permitían suponer que esa DNH- S_a era un material nucleoproteico con unas características próximas a la de la cromatina. Así, se caracterizaban por presentar unos bajos niveles de material soluble en ácido, índice de una baja tasa de degradación. Otro factor común es que mostraban un valor elevado de la relación A_{230}/A_{260} . La cromatina debe mantener una relación proteína/DNA bastante constante; la relación A_{230}/A_{260} solo se verá afectada por la presencia de oligonucleótidos solubles en ácido y/o RNA, lo que provocaría, en ambos casos, una disminución de esta relación. También se caracterizaban porque la valoración de DNA y RNA dió una relación RNA/DNA muy pequeña y porque los espectros de dicroísmo circular y las curvas de desnaturalización térmica eran similares a los obtenidos con cromatinas de eucariontes superiores.

3.3.1. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LA FRACCION DNH- S_a

3.3.1.1. Espectro de absorción

En la Figura 14 se muestra el espectro de absorción típico de la fracción DNH S_a y en él se puede ver un máximo a los 258 nm con un mínimo a 237 nm, presentando una relación A_{230}/A_{260} de 0.85.

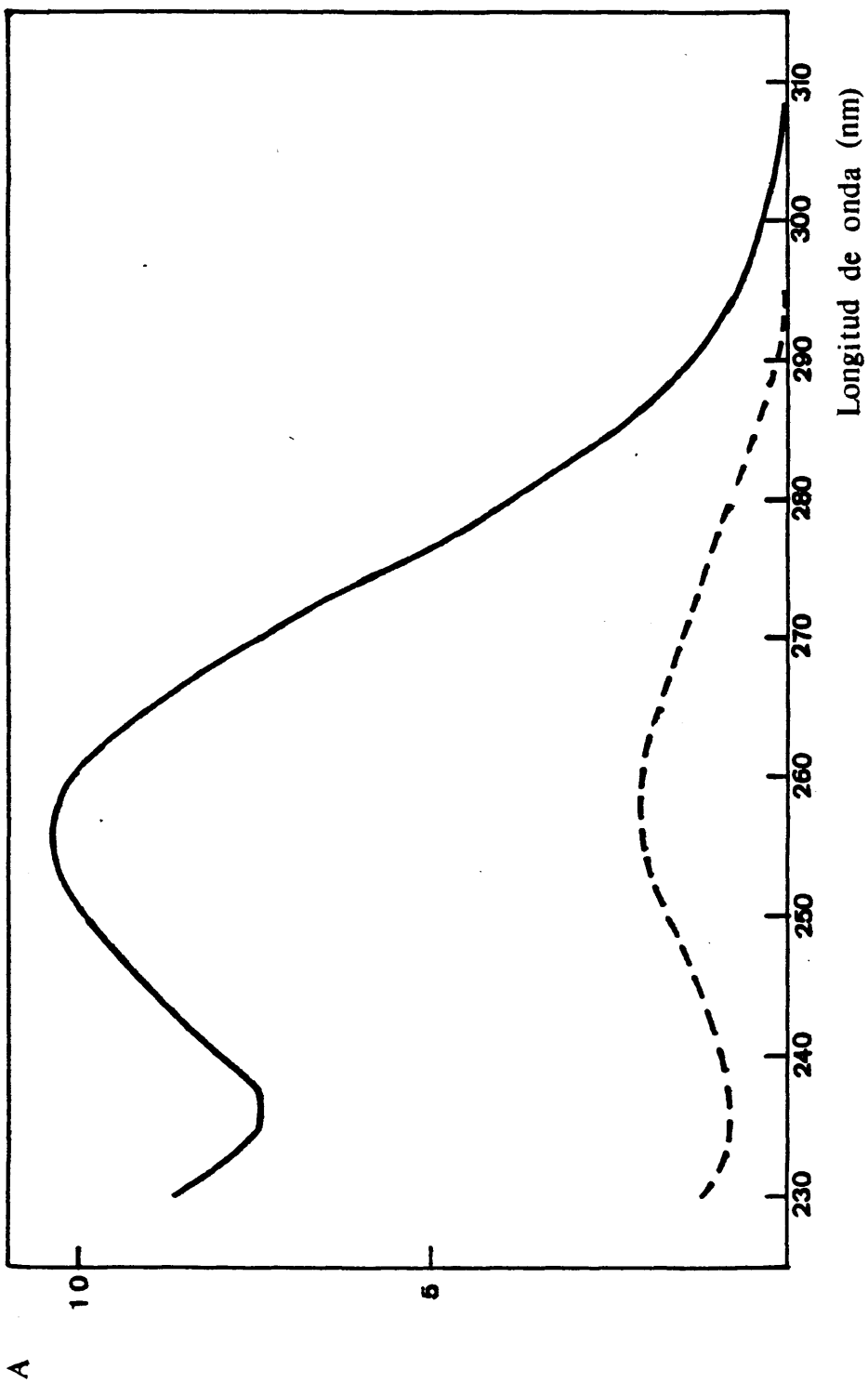


Figura 14.- Espectro de absorción UV de las fracciones DNH-S_a obtenidas a partir de levadura prensada (—) y de cultivos de levadura (---).

3.3.1.2. Composición de la fracción DNH-S_a

En la Tabla X se muestra la composición en peso de la fracción DNH-S_a soluble relativa al contenido en DNA. Como se observa, la relación RNA/DNA es muy baja (0.18) si la comparamos con la de cromatina coincidiendo con los resultados de Franco y López-Braña (1978). A lo largo del procedimiento de obtención de la DNH-S_a va disminuyendo el contenido en RNA. Esto se debe por un lado a los lavados dados con NaCl en el aislamiento de la DNH cruda, los cuales eliminan la gran cantidad de RNA presente en la cromatina de levadura, y por otro a la sedimentación a través del gradiente de sacarosa (paso de DNH cruda a DNH pura), lo que también disminuye la relación RNA/DNA. En la fracción S_a esta relación es aún menor que en la DNH pura, indicando que solo parte del RNA presente en esta última se solubiliza. Por otro lado, la relación proteína/DNA resultó ser de 1.6, lo que dada la relación proteína/DNA de la DNH pura indica que la fracción de DNH que se solubiliza por este método tiene menos contenido en proteína que el resto. Es también de destacar el bajo valor de la relación proteína/DNA con respecto a los núcleos de levadura (Vease Tabla IX).

3.3.1.3. Espectro de dicroísmo circular

En la Figura 15 se muestra el espectro de dicroísmo circular en la región del ultravioleta próximo de la fracción DNH-S_a en Tris 5 mM, EDTA 1 mM pH 7.5. Se puede observar como su aspecto es típico de cromatina. Presenta

TABLA X

	<u>DNA</u>	<u>RNA</u>	<u>PROTEINA</u>
DNH cruda	1	0.56	6.5
DNH pura	1	0.35	4.6
DNH soluble a partir de levadura prensada	1	0.18	1.6
Cromatina solubilizada por digestión con nu- cleasa micrococal	1	0.05	1.8
DNH soluble a partir de cultivos de levadura	1	2.03	0.5

Composición en peso relativo al de DNA de diferentes muestras.

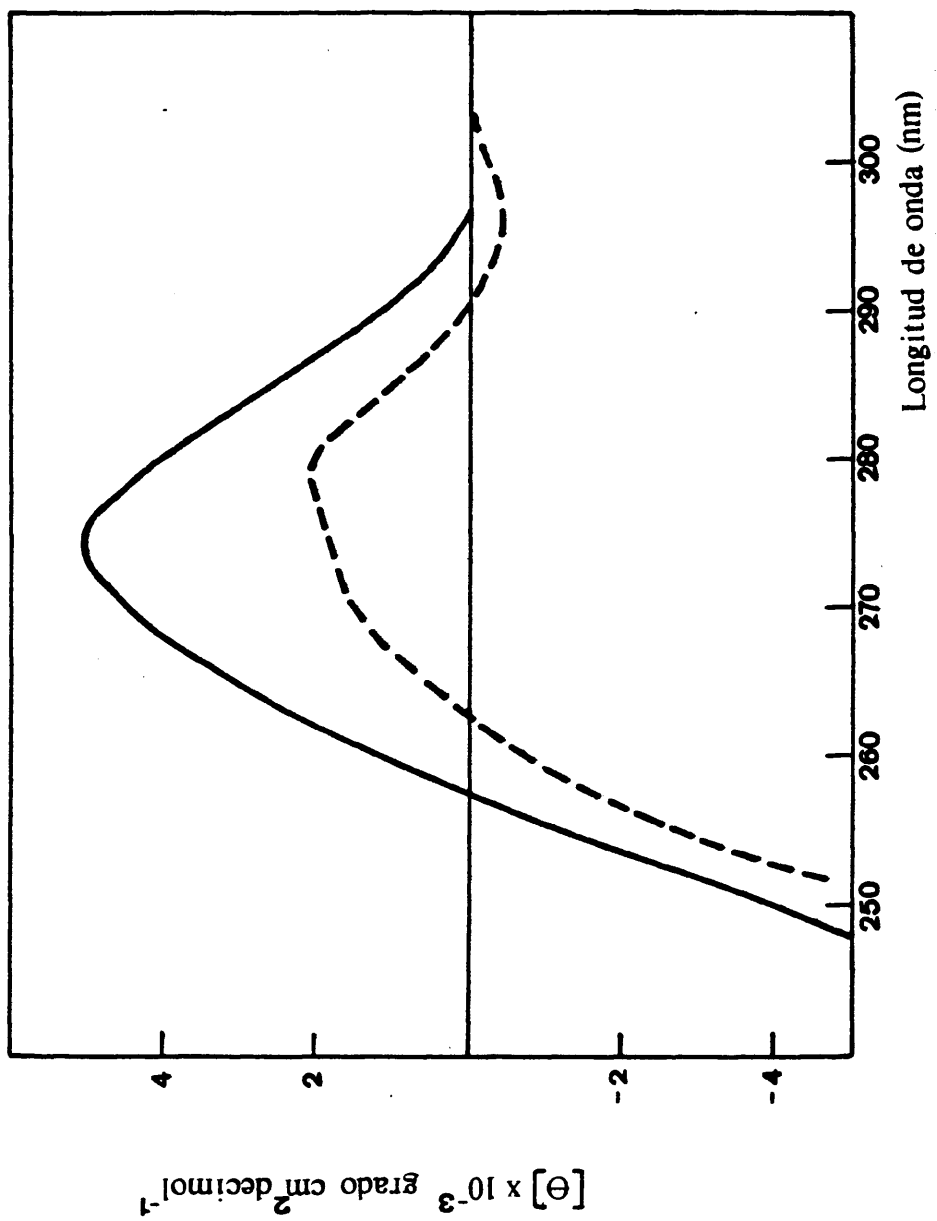


Figura 15.- Espectro de dicroísmo circular de las fracciones DNH-Sa (—) y DNH-S_b (---) obtenidas a partir de levadura prensada.

una banda de elipticidad positiva con el máximo a 275 nm y una elipticidad molar de unos 5000 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$. El valor es quizá un poco elevado en comparación con los resultados obtenidos con otras cromatinas por otros autores (Fulmer y Fasman, 1979; Watanabe e Iso, 1981; Shih y Fasman, 1970; De Murcia y col., 1978; Whitlock y Simpson, 1979)). Al mismo tiempo, el máximo de elipticidad de la banda positiva está desplazado hacia longitudes de onda menores con respecto a esos mismos estudios. Puesto que la disminución de la elipticidad del DNA en la cromatina con respecto a DNA libre se ha relacionado con la estructura terciaria del DNA en la cromatina (Cowman y Fasman, 1978), estos datos podrían indicar que la cromatina presente en la DNH-S_a tiene un menor nivel de estructura terciaria. Es posible también que esta diferencia se deba al RNA presente en dicho material.

3.3.1.4. Curva de desnaturalización térmica

La fracción DNH-S_a obtenida a partir de levadura prensada se dializó frente a EDTA 0.25 mM pH 8.0 con objeto de realizar estudios de desnaturalización térmica. La fuerza iónica tiene una gran influencia sobre el perfil de desnaturalización térmica, por lo que de esta manera se intentó disminuir en lo posible y mantener al mismo tiempo la capacidad tamponadora del medio.

En la Figura 16a se muestra la curva de desnaturalización térmica de esta fracción en EDTA 0.25 mM pH 8.0. Se puede observar como el valor de hipercromicidad llega a 20. La hipercromicidad del DNA libre y del DNA en cromatina en

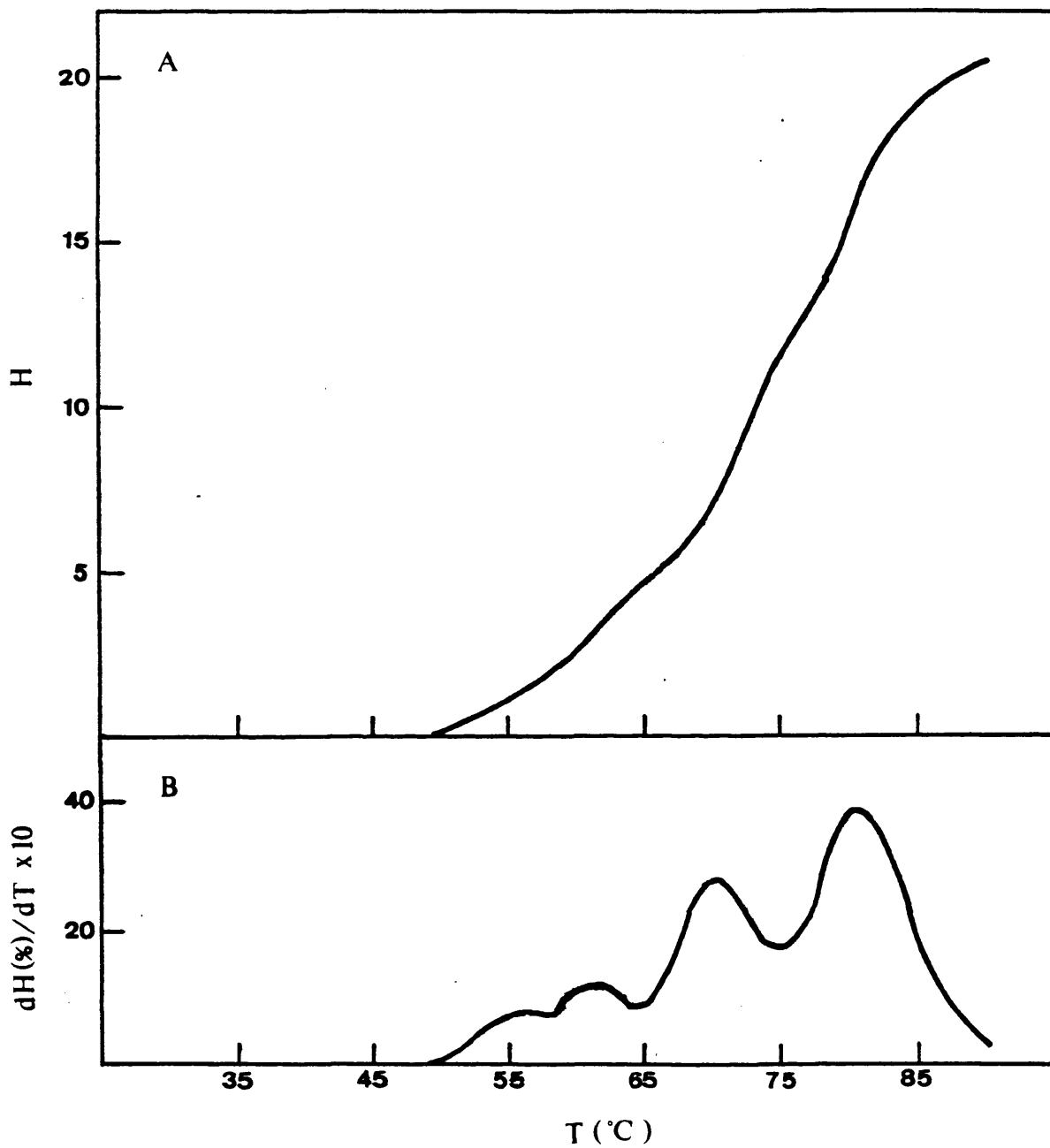


Figura 16.- A) Perfil de desnaturalización térmica de la fracción DNH-S_a procedente de levadura prensada.

B) Curva derivada del perfil de desnaturalización.

estas mismas condiciones llega a 30-35. El motivo por el que la hipercromicidad de una muestra de cromatina sea menor a este valor puede ser la presencia de RNA en la misma. El RNA presenta un efecto hipercrómico mucho menor que el DNA por lo que su presencia en la muestra disminuirá la hipercromicidad de ésta. Otra posible causa que explicaría el bajo valor de hipercromicidad de la fracción DNH-S_a podría ser la presencia de oligonucleótidos. Sin embargo, para que esto ocurriera los oligonucleótidos tendrían que ser de muy pequeño tamaño y en este caso se habrían eliminado casi totalmente en las diálisis efectuadas al poder escaparse de la bolsa. Por tanto, puede aceptarse que en la DNH soluble se obtiene un valor de hipercromicidad de 20 debido a la presencia de RNA. Esto viene confirmado por el hecho de que en otras muestras de DNH-S_a con un mayor contenido en RNA la hipercromicidad observada era menor.

En la Figura 16b se muestra la primera derivada de la curva de desnaturalización térmica donde se pueden ver claramente las transiciones térmicas que ocurren. Se detectan hasta cuatro diferentes transiciones de temperaturas de fusión 56, 62, 71 y 81 °C respectivamente. Por otra parte, el área de cada uno de los picos de la curva, directamente relacionado con la proporción de DNA que funde a cada temperatura, va aumentando con ella.

El DNA libre funde a una temperatura de 55 °C (Ver Figura 16b), por lo que es lógico atribuir la primera transición de la DNH-S_a de levadura al DNA libre. Si las relaciones aceptadas en eucariontes superiores entre las transiciones térmicas y las interacciones del DNA en la cromatina

pueden aceptarse como válidas para la DNH-S_a de levadura, lo que es lógico dada la gran semejanza entre su perfil de desnaturalización y el de eucariontes superiores, las transiciones de mayor T_m (71 y 81 °C) serán debidas a DNA estabilizado por histonas. La segunda transición (62 °C) puede deberse a DNA estabilizado por interacción con otras proteínas menos básicas o por regiones particulares de las histonas.

A este respecto, hay que hacer una consideración y es que, como ya se ha mencionado en la Introducción, en levadura no existe histona H1. En mononucleosomas de eritrocito de pollo con una longitud de 200 pb de DNA se ha comprobado que la eliminación de H1/H5 lleva a la desestabilización y alteración estructural de parte del DNA del core (Cowman y Fasman, 1978), además de desestabilizar lógicamente el DNA linker. De esta manera, es de esperar que el DNA en la cromatina de levadura se encuentre menos estabilizado frente a la temperatura que en organismos superiores.

3.3.1.5. Análisis de las proteínas de la DNH soluble

Se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida tal como se describe en el apartado 2.8.3. Las proteínas se obtuvieron mediante liofilización de la DNH soluble. En la Figura 17 se muestra el resultado de la electroforesis. En ella se pueden ver las bandas correspondientes a las histonas de levadura (H2A, H2B, H3 y H4) y otras bandas que principalmente deberán corresponder a PCNH. Por otra parte, hay que tener en cuenta el procedimiento de

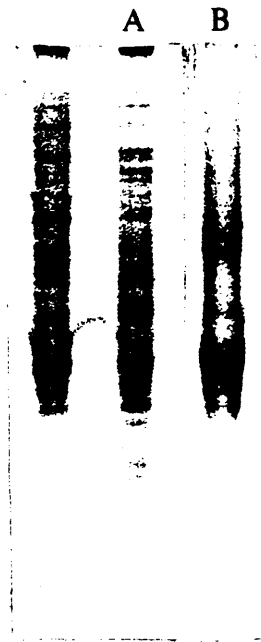


Figura 17.- Imagen electroforética de las proteínas presentes en las fracciones DNH-S_a (A) y DNH-S_b (B).

obtención de la DNH soluble antes de afirmar la identidad de estas bandas. La cromatina se libera por fuerzas de cizalla que rompen la membrana citoplasmática y la nuclear con lo que se pone en contacto el contenido citoplásmico con la cromatina. Es posible que proteínas del citoplasma, especialmente las básicas (ribosomales por ejemplo) se unan inespecíficamente a la cromatina y se aíslen con ella. Por tanto, con la excepción de las histonas, cuyo patrón de movi- lidades está bien determinado, del resto de las proteínas no puede asegurarse su origen. Esto viene confirmado por el hecho de que el patrón de bandas de la DNH S_a fue muy variable, no solo en la intensidad de las bandas, sino también en la presencia y ausencia de algunas de ellas.

Los resultados obtenidos con la fracción DNH- S_a obtenida a partir de levadura prensada son coherentes con el hecho de que este material nucleoproteico contiene RNA. Esto explica los resultados de los estudios de desnaturalización térmica que muestran una hipercromicidad disminuída para la DNH soluble con respecto a otras cromatinas. Por otra parte, la presencia de RNA tiene otras implicaciones sobre el espectro de dicroísmo circular de la DNH soluble. El espectro de DC del RNA presenta, al igual que el del DNA una banda de elipticidad positiva en la región del UV próximo. Se diferencian en que mientras el espectro del DNA alcanza el máximo de elipticidad sobre los 275 nm, el del RNA lo presenta a menores longitudes de onda, sobre los 265 nm (depende del tipo de RNA). Otra diferencia entre ambos

espectros radica en el valor de elipticidad molar en el máximo: mientras el DNA llega a 9000 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$ (Cowman y Fasman, 1978; Watanabe e Iso, 1981) el del RNA lo dobla (18000 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$). Estas dos diferencias implican que la presencia de RNA en cromatina provocará un desplazamiento del máximo del espectro de DC hacia longitudes de onda más bajas y además un aumento de la elipticidad molar de dicho máximo. Se ha mencionado anteriormente que el espectro de dicroísmo circular que se ha obtenido con cromatinas de eucariontes superiores presenta el máximo a 280 nm y con unos valores de elipticidad que oscilan entre 2000 y 4000 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$ (De Murcia y col., 1978; Fulmer y Fasman, 1979). Por tanto, el espectro de dicroísmo circular de la DNH s_a (Figura 15) muestra las características esperadas de contener RNA.

Como también se ha mencionado anteriormente, el valor de elipticidad de la cromatina depende del grado de estructuración que posea. Puesto que el máximo de elipticidad del DNA se encuentra a los 275 nm y el de cromatina a los 280 nm, está claro que la longitud de onda del máximo también depende de la estructura terciaria. Teniendo esto en cuenta es posible que el espectro que muestra la DNH soluble se deba a que está menos estructurada que la cromatina de eucariontes superiores. Sin embargo, el valor de elipticidad más elevado para cromatina es de 4000 grados $\times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$ (Cowman y Fasman, 1978; Fulmer y Fasman, 1979) que debe corresponder al estado de menor estructuración y por tanto, a la cadena polinucleosomal extendida. Un valor más elevado podría implicar diferencias en la estructura super-

helicoidal del core nucleosomal.

Por otra parte, se ha comprobado que cuando la cromatina se solubiliza mediante métodos que implican cizalla, la elipticidad de esa cromatina soluble es mayor que si la solubilización se lleva a cabo por métodos más suaves (Nicolini y col., 1976; De Murcia y col., 1978). Esto puede deberse a que las fuerzas de cizalla afectan en mayor o menor grado la estructura nucleosomal. La solubilización de la DNH no se lleva a cabo por métodos bruscos puesto que es por una simple diálisis. Sin embargo, el proceso global de aislamiento de la DNH comienza con una etapa en la que las células de levadura son machacadas. Por tanto, hay una etapa en la que se ha podido modificar la estructura nucleosomal originando un material que presenta una elipticidad incrementada.

En conclusión, los resultados obtenidos con la DNH S_a obtenida a partir de levadura prensada podrían indicar que la cromatina solubilizada tiene una estructura nucleosomal diferente a la de eucariontes superiores. Es posible que se trate de cromatina en la que el grado de superhelicidad del DNA alrededor del octámero de histonas sea menor. Sin embargo, esto podría deberse a las fuerzas de cizalla empleadas en la obtención de la DNH soluble, las cuales pueden destruir, al menos parcialmente, la estructura nucleosomal.

Los resultados mostrados indican que el material solubilizado en la diálisis frente a Tris 5 mM, EDTA 1 mM pH 7.5 tiene una composición excesivamente variable como para que puedan ser generalizados. Esto vino confirmado por la

variabilidad que mostraron también los estudios de dicroísmo circular y de desnaturalización térmica.

A la vista de las anteriores consideraciones se creyó conveniente estudiar el efecto de la metodología empleada así como del estado del material de partida. Así, se procedió a obtener una fracción de DNH solubilizada por digestión de la DNH pura con nucleasa micrococcal (DNH-S_b). Por otra parte, se procedió a aplicar el procedimiento para la obtención de la fracción de DNH S_a sobre células de levadura en cultivo.

3.4. ESTUDIO DE LA FRACCION DNH-S_b SOLUBILIZADA POR DIGESTION CON NUCLEASA MICROCOCCAL

La DNH pura obtenida de la forma que se describe en el apartado 2.3.2. se digirió con nucleasa micrococcal (Vease apartado 2.4.2). La fracción solubilizada por la acción enzimática se estudió para determinar sus características.

3.4.1. Espectro de absorción

En la Figura 18 se muestra el espectro de absorción de la fracción de DNH solubilizada por acción de la nucleasa micrococcal y precipitada con MgCl₂ para eliminar los oligonucleótidos solubles en ácido (Vease apartado 2.4.2.). Se puede observar como la relación $A_{230}/A_{260} = 1.1$, lo que indica que la relación proteína/ácido nucleico es mayor que en el caso de la fracción de DNH-S_a. Esto puede

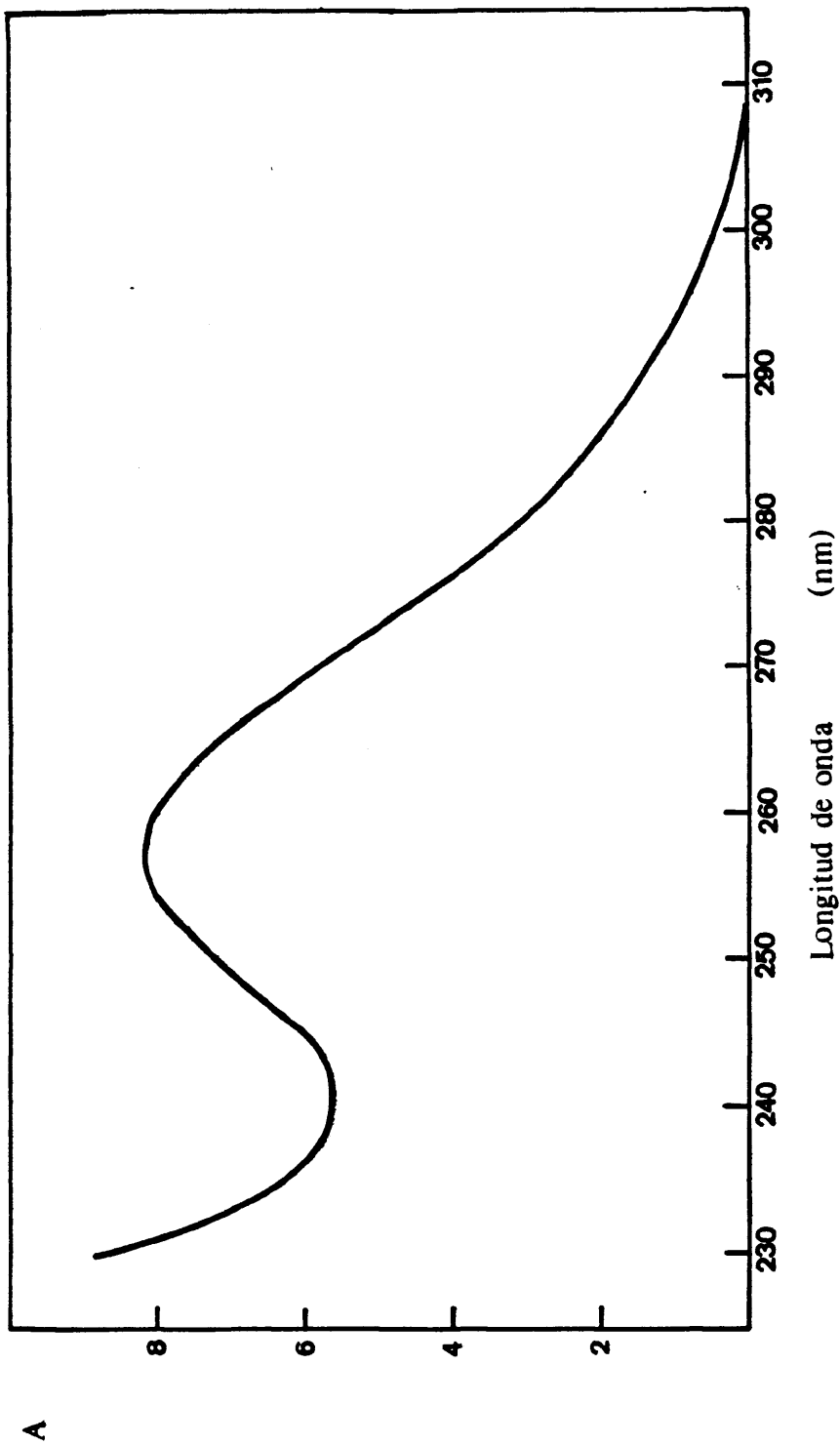


Figura 18.- Espectro de absorción UV de la fracción DNH-S_b obtenida al digerir DNH pura con nucleasa micrococcal.

deberse a que los oligonucleótidos liberados en la digestión se eliminan posteriormente con la precipitación con $MgCl_2$ y por tanto, la A_{260} de la DNH solubilizada no representa todo el material liberado por la nucleasa.

3.4.2. Composición de la cromatina

En la Tabla X se indica la relación en peso de RNA, DNA y proteínas en la fracción S_b . Se puede observar como el contenido en RNA es despreciable en relación con el de DNA. Por otra parte, la relación proteína/DNA es algo más elevada que la que presenta la DNH S_a .

A pesar de que la relación A_{230}/A_{260} es mucho más elevada en la fracción S_b , la relación proteína/DNA no es muy superior a la de DNH S_a . Esto puede ser debido a que en esta última hay un mayor contenido en RNA y en oligonucleótidos, los cuales contribuyen a la A_{260} y disminuyen la relación A_{230}/A_{260} .

El material que es objeto de la digestión con la nucleasa micrococal es el mismo que se somete a diálisis para obtener la fracción DNH- S_b , es decir, DNH pura. Ambos materiales solubles muestran, sin embargo, una diferente composición que debe venir motivada forzosamente por el diferente método seguido en la solubilización.

3.4.3. Espectro de dicroísmo circular

En la Figura 15 se muestra el espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta próximo de la fracción

de DNH solubilizada a partir de DNH pura por digestión con nucleasa micrococcal, en Tris 5 mM, EDTA 1 mM pH 7.5. Desde un punto de vista cualitativo el espectro es similar al de la DNH S_a si bien el máximo de la banda positiva se encuentra desplazado hacia longitudes de onda más altas (280 nm). Sin embargo, desde un punto de vista cuantitativo hay una gran diferencia puesto que la elipticidad molar máxima es de 2000 grados x cm² x decimol⁻¹, en comparación con los 5000 grados x cm² x decimol⁻¹ de la DNH S_a. Esta diferencia en la elipticidad podría explicarse sobre la base de un mayor grado de estructura terciaria en la fracción S_b. Además, es posible que esta estructuración sea semejante a la de cromatinas de eucariontes superiores, puesto que el valor de elipticidad coincide (De Murcia y col., 1978). Otra diferencia que muestra el espectro de la fracción S_b con respecto al de la DNH S_a es la aparición de una banda de elipticidad negativa sobre los 300 nm. Si suponemos que la contribución de la superhélice nucleosomal es una banda negativa que provoca la disminución del espectro conservativo del DNA en mayor o menor grado (Ver Introducción), hay que concluir que la banda negativa que muestra la fracción S_b es simplemente consecuencia de una mayor contribución por parte de la superhélice. Del espectro de dicroísmo circular parece así desprenderse que la fracción solubilizada S_b tiene un mayor grado de estructuración que la DNH S_a.

3.4.4. Curva de desnaturalización térmica

En la Figura 19a se muestra la curva de desnatura-

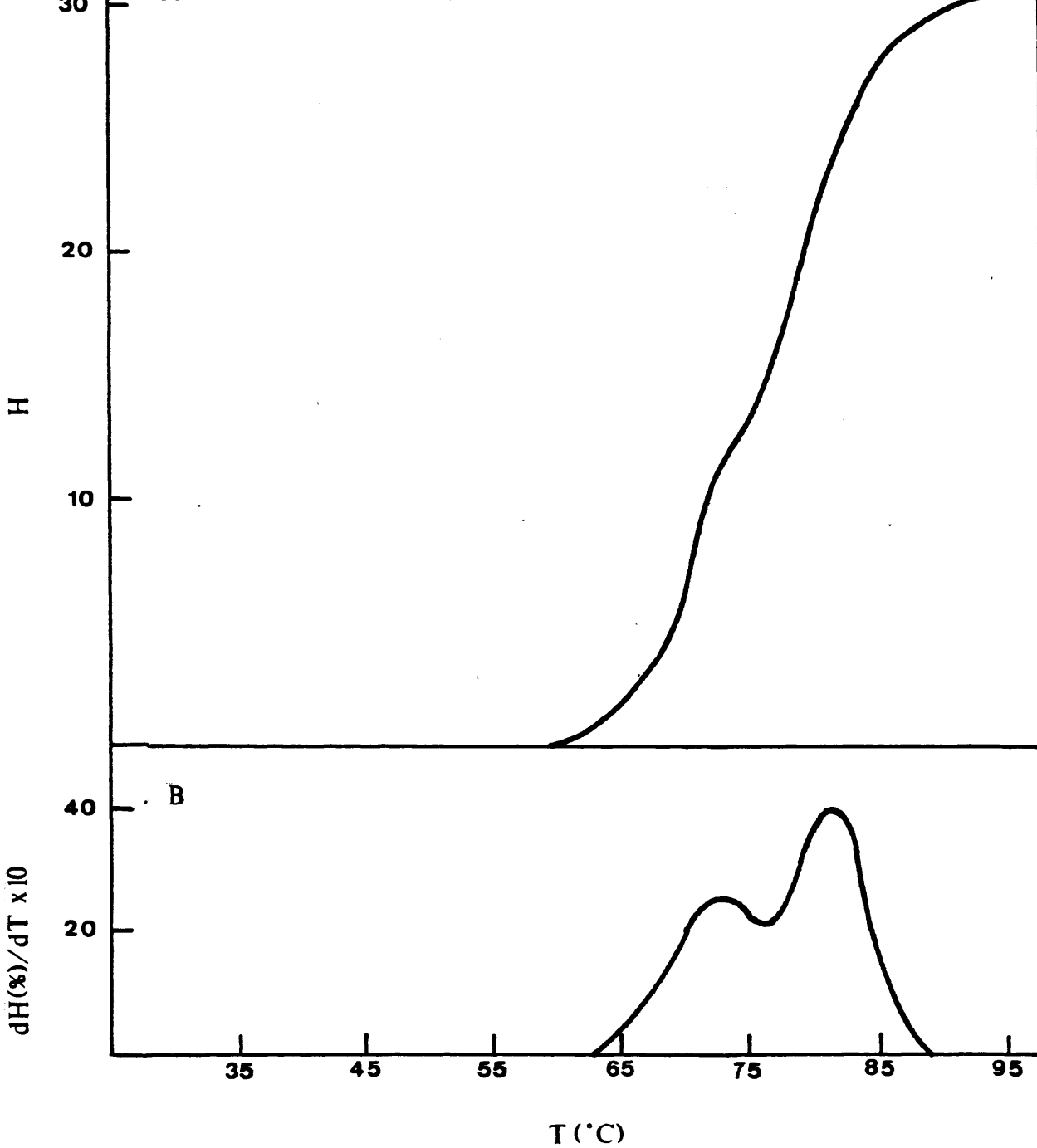


Figura 19.- A) Perfil de desnaturalización térmica obtenido con la fracción DNH-S_p.

B) Curva derivada del perfil de desnaturalización.

lización térmica de la fracción de DNH solubilizada por digestión de la DNH pura con nucleasa micrococcal, en EDTA 0.25 mM pH 8.0. En ella se puede apreciar como la hipercromicidad de esta muestra es del 30%. La baja presencia de RNA, que revela el análisis de esta fracción, es totalmente coherente con el hecho de que la hipercromicidad alcance el valor característico de DNA. En este aspecto, la fracción S_b muestra ser diferente de la DNH soluble a pesar de proceder del mismo material.

En la Figura 19b se muestra la primera derivada de la curva de desnaturalización térmica. En ella se puede observar como la fracción S_b presenta dos claras transiciones térmicas cuyas T_m (71 y 82 °C) coinciden con las dos últimas transiciones de la DNH S_a . En primer lugar hay que destacar la ausencia de la transición correspondiente al DNA libre, lo que indica que todo el DNA presente en la fracción solubilizada por digestión con nucleasa micrococcal está interaccionando con proteínas. Esto es coherente con los datos anteriores; es de esperar que la mayor estructuración de esta fracción de cromatina se deba a la interacción con determinadas proteínas que apantallen las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA permitiendo su aproximación y por tanto una mayor compactación. Este apantallamiento de las cargas negativas provocará al mismo tiempo un aumento de las T_m . Este efecto explica también la ausencia de la segunda transición de la DNH S_a que ocurría a los 62 °C. Se mencionó entonces que esta transición se había relacionado en cromatina de eucariontes superiores con la interacción del DNA con PCNH (Ver Introducción). Esto es

debido a que en la mayor parte de los casos las PCNH no son proteínas muy básicas, con lo que el apantallamiento de las cargas negativas del DNA y por tanto su efecto estabilizador frente a la desnaturalización térmica será menor que el de las histonas. De nuevo hay que hacer mención de la ausencia de la histona H1 en la cromatina de levadura (Brandt y Von Holt, 1976; Franco y col., 1974). En un apartado anterior mencionamos que esto podría implicar una menor estabilización del DNA en la cromatina. Sin embargo, el DNA en la fracción DNH S_b está muy estabilizado. Esto podría indicar que en la cromatina de levadura hay algún componente que sustituye, al menos parcialmente, a la histona H1. Esta hipótesis viene apoyada por el hecho de que las fracciones solubles de DNH de levadura, a pesar de carecer de H1, presentan algunas características que coinciden con las de eucariontes superiores y en las que está implicada la histona H1. Así, tanto la fracción de DNH S_a como la fracción solubilizada por digestión con la nucleasa micrococcal (S_b) precipitan parcialmente cuando se añade KCl hasta una concentración de 0.1 M (López-Braña, 1978; Castro y col., 1982). Por tanto, es posible que en la cromatina de levadura esté presente alguna proteína no histona que se asemeje a la histona H1 en su interacción con el DNA y que lo estabilice hasta una temperatura de 71 °C.

Los resultados de los estudios de desnaturalización térmica sobre la fracción S_b indican que sólo hay dos transiciones térmicas, que coinciden con las imputadas a regiones de DNA que interaccionan con las histonas, al ser éstas más básicas y provocar un mayor efecto estabilizador.

Esto, en principio, dado que la cromatina presente en la fracción S_a muestra las transiciones térmicas a 55 °C (DNA libre) y a 62 °C, que no aparecen en la cromatina solubilizada por digestión con nucleasa micrococcal, indica que en ésta esas regiones no existen. Esto puede deberse a una mayor estabilización provocada por la interacción con alguna proteína específica o por la mayor compactación de la cromatina en esta fracción.

3.4.5. Análisis de las proteínas de la cromatina

Las proteínas presentes en la fracción de DNH S_b se analizaron tras liofilización de la misma y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. En la Figura 18 se muestra el resultado de dicha electroforesis. Se puede observar la presencia de las histonas y de otras bandas que serán PCNH.

Por otra parte, se puede observar como el patrón de proteínas de la fracción solubilizada tras digestión es diferente del de la fracción S_a . Esta diferente composición de proteínas puede estar relacionada con las diferencias estructurales manifestadas por los estudios de dicroísmo circular. Sin embargo, teniendo en cuenta la procedencia de este material (DNH pura) no se puede determinar si las proteínas presentes son cromosomales o no, como ya se comentó al igual que en el caso de la fracción S_a , con la excepción de las histonas.

Los estudios realizados sobre la fracción de DNH S_b indican que es diferente de la fracción S_a solubilizada por diálisis. En primer lugar, contiene menos RNA con los efectos que conlleva esto sobre los espectros de dicroísmo circular y las curvas de desnaturalización térmica. Independientemente de este efecto, la fracción S_b presenta unos valores de elipticidad molar mucho menores que la fracción S_a , lo que sugiere para aquella un mayor grado de estructuración. Al mismo tiempo los estudios de desnaturalización térmica indican que el DNA se encuentra más protegido en la fracción S_b que en la S_a , lo que sugiere que también son diferentes las interacciones DNA-proteínas.

En conclusión, la comparación de los resultados obtenidos con ambas muestras solubles sugieren que se trata de dos diferentes fracciones de cromatina que difieren en dicroísmo circular, estabilidad frente a la temperatura y composición de proteínas. Como ya se ha mencionado, se ha descrito que el DNA de levadura es de longitud variable y es posible que haya regiones con menor longitud. Estas regiones no solo se caracterizarían por una mayor estabilidad de su DNA, sino que también iría acompañada de unos bajos valores de elipticidad. Por otro lado, estas regiones serían poco accesibles a la nucleasa y quizá por ello la fracción S_b solo se solubiliza tras una fuerte digestión con dicha enzima.

No hay que olvidar la posibilidad de que la fracción de DNH S_a tenga una estructura que haya sido alterada durante su obtención y que las diferencias existentes entre ambas fracciones se deban a ello.

3.5. ESTUDIO DE LA FRACCIÓN S_a A PARTIR DE CULTIVOS DE LEVADURA

La fracción de DNH S_a se obtuvo de la misma forma que a partir de levadura prensada (Vease apartado 2.4.1). Al igual que con ésta se realizó un espectro de absorción en la región ultravioleta (Figura 14). Al contrario que con la fracción solubilizada de levadura prensada, la A₂₆₀ de diferentes muestras era muy constante, así como la relación A₂₃₀/A₂₆₀. Esta, sin embargo, era muy pequeña, lo que indica una baja relación proteína/ácido nucleico. Por tanto, una diferencia con respecto a la DNH S_a de levadura prensada es la constancia en los datos deducidos del espectro de absorción. Esto parece sugerir que la variabilidad en las propiedades de la DNH S_a de levadura prensada son debidas al estado en que se encuentra la cromatina en el material de partida. Hay que tener en cuenta que el método utilizado con ambos materiales es el mismo, con lo que se puede descartar como causante de las diferencias. Por otro lado, la levadura obtenida a partir de cultivos ha de encontrarse, para las mismas condiciones en el mismo estado, y lo mismo se puede decir de su cromatina. La única razón para el comportamiento de la DNH S_a de la levadura prensada es que no se trabaje con un material de partida constante. La levadura prensada es comercial y no es posible controlar su estado, puesto que no es posible conocer el tiempo que ha transcurrido entre su recogida y su utilización como material biológico en la presente investigación. Al variar este tiempo el material, aun guardado en cámaras frigoríficas, debe estar en diferen-

te estado, más degradado cuanto mayor sea el tiempo. Un diferente grado de degradación conduce a una diferente solubilidad.

Con la DNH S_a obtenida a partir de cultivos de levadura se realizaron diversos estudios con el fin de investigar sus características.

3.5.1. Espectro de absorción

Como ya se ha mencionado, la fracción DNH S_a de cultivos de levadura presenta un espectro de absorción independiente del experimento (Figura 14). Si consideramos el valor de A_{260} como un índice de la solubilización de la DNH podemos concluir que la solubilización es en este caso mucho menor que cuando la DNH procede de levadura prensada. Por otra parte, la relación A_{230}/A_{260} es mucho menor que la de DNH S_a de levadura prensada (0.57), lo que indica una menor relación proteína/ácido nucleico.

3.5.2. Composición de la DNH soluble

En la Tabla X se muestra la composición de la DNH S_a de levadura cultivada como la relación en peso con respecto al DNA. Se puede observar como la relación RNA/DNA es altísima, lo que dada la baja relación que muestra la DNH pura, indica un grado de solubilización de la cromatina muy pequeño. La DNH pura obtenida a partir de cultivos de levadura presenta una composición muy similar a la obtenida a partir de levadura prensada. Por otra parte, el contenido en

proteína en la fracción S_a es también muy pequeño, lo que confirma que principalmente se solubiliza RNA y no cromatina.

3.5.3. Estudios de dicroísmo circular y desnaturalización térmica

Otros estudios, tales como dicroísmo circular y desnaturalización térmica, efectuados sobre la DNH soluble obtenida a partir de cultivos de levadura, indicaron lo mismo. Así, el espectro de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano fue el esperado para una muestra con gran contenido en RNA: banda de elipticidad positiva con el máximo a los 265 nm y con un valor de 15000 grados \times cm^2 \times decimol^{-1} . Por su parte, los estudios de desnaturalización térmica demostraron que en este material no había ninguna transición térmica. En el caso de que esta fracción contuviera cromatina el elevado contenido en RNA debe enmascarar las transiciones térmicas.

Estos experimentos realizados con cultivos de levadura parecen indicar que la cromatina solubilizada por diálisis a partir de levadura prensada no lo es merced a una estructura especial, sino posiblemente a una degradación mayor o menor durante su almacenamiento.

A lo largo de la exposición de los resultados se ha venido planteando la posibilidad de que el material presente en la fracción S_a de DNH se solubilizara merced a

una degradación provocada por el método de obtención. Sin embargo, la aplicación de dicho método a levadura recogida de cultivos no solubiliza este material. Esto indica que, efectivamente, el material presente en la DNH S_a no se solubiliza directamente porque posea una estructura especial que lo haga más soluble, sino que lo es debido a algún efecto degradativo ajeno al método de obtención. La diferencia entre los dos materiales de partida es el tiempo transcurrido desde la recolección de las células y su uso. Mientras las células de cultivo se utilizan inmediatamente después de su recogida, el tiempo de almacenamiento de la levadura prensada es desconocido. Este tiempo debe ser variable y durante él van a estar actuando las nucleasas endógenas de la cromatina de levadura. Esto explicaría el hecho de la gran variabilidad en la solubilización por diálisis de este material.

En general, se puede decir que en la DNH pura de levadura existen al menos dos diferentes fracciones de cromatina, una de ellas solubilizada fácilmente por diálisis, si bien requiriendo una cierta degradación, y otra solubilizada mediante digestión con nucleasa micrococal en condiciones fuertes. La primera de ellas, que posiblemente está enriquecida en secuencias transcripcionalmente activas se caracteriza por presentar un menor grado de estructura terciaria y una menor estabilidad frente a la temperatura. Por otra parte, como queda bien patente en la Figura 17, la composición en proteínas de ambas muestras es diferente. Es

posible que esta diferente composición proteica sea la responsable de las diferencias estructurales.

Sin embargo, ambas muestras se obtienen a partir de un material que no está intacto (ha sido machacado). Por este motivo se pensó que era necesario trabajar con núcleos de levadura. En los núcleos la cromatina está intacta y, por tanto, las fracciones de la misma que se obtengan a partir de ellos se diferenciarán en características estructurales intrínsecas de cada fracción. Además, la utilización de núcleos permite el estudio de la estructura de la cromatina en diferentes estados de crecimiento de la levadura. Dadas las diferencias funcionales existentes entre cromatina de células en fase exponencial y de fase estacionaria, pueden relacionarse con diferencias en la estructura de la cromatina en ambos casos.

Así, se procedió a la obtención de cromatina soluble a partir de núcleos de levadura.

3.6. ESTUDIO DE FRACCIONES SOLUBLES DE CROMATINA A PARTIR DE NUCLEOS

A fin de preparar fracciones solubles de cromatina, se realizaron digestiones de núcleos de levadura con nucleasa micrococal.

Todos los experimentos se han llevado a cabo con células recién recogidas, tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Los núcleos obtenidos a partir de estas células de la forma que se describe en el apartado 2.5. se digirieron con nucleasa micrococal. En primer lugar se pro-

cedió a un estudio de la cinética de la digestión con el fin de determinar las condiciones de la incubación (Vease apartado 2.6.1). Una vez ajustadas dichas condiciones, los núcleos se sometieron a la digestión con nucleasa en diferentes grados. En todos los casos la mezcla de digestión se fraccionó de la misma forma, la cual se detalla en el apartado 2.6.1.

Con el fin de solubilizar diferentes fracciones de cromatina, se realizaron dos tipos de digestión, diferentes en intensidad. Por un lado, la incubación se mantuvo hasta lograr un 5% de DNA soluble en ácido. Por otro, la digestión se realizó en condiciones mucho más suaves y reducidas.

3.6.1. Digestión de núcleos hasta un 5% de DNA soluble en ácido

Los núcleos obtenidos a partir de células de levadura, tanto en fase estacionaria como exponencial se digirieron con nucleasa micrococal hasta un 5% de DNA soluble en ácido. Se ha descrito en organismos superiores que la digestión de núcleos hasta ese punto solubiliza preferentemente las regiones activas de la cromatina. Así, la cromatina solubilizada de esta manera está enriquecida en secuencias de DNA transcribibles (Levy-Wilson y col., 1979). Además, esta fracción está empobrecida en la histona H1. Debido a la carencia de H1 de la cromatina de levadura fue de interés estudiar la fracción solubilizada por este procedimiento.

3.6.1.1. Cinética de la digestión

Se realizó de la forma que se detalla en el apartado 2.6.1. Los núcleos se resuspendieron en el medio de digestión y se digirieron con nucleasa micrococcal a las concentraciones de DNA y de nucleasa que se indican en el apartado 2.6.1. La evolución de la reacción se siguió mediante la valoración del porcentaje de DNA soluble en ácido presente en alícuotas de la mezcla de incubación tomadas a diferentes tiempos (Apartado 2.8.2). En la Figura 20 se muestra el resultado de este estudio realizado con núcleos en fase exponencial y en fase estacionaria. Con vistas a un fraccionamiento de la cromatina según el procedimiento descrito por Levy-Wilson y Dixon (1979), se determinó digerir los núcleos hasta que se alcanzara un 5% de DNA soluble en ácido. En la Figura 20 se muestra como se consigue este valor tras 10 minutos de digestión cuando se trata de núcleos de células en fase estacionaria y de 5 minutos cuando se trata de núcleos de células en fase exponencial.

Los resultados obtenidos indican que la liberación de DNA soluble en ácido se produce con mayor rapidez cuando se digieren núcleos de células en fase exponencial, lo que sugiere una mayor accesibilidad de la nucleasa micrococcal a la cromatina de células en esta fase. Esto a su vez podría indicar una menor estructuración de la cromatina en estas células, lo cual viene confirmado por los resultados de DC.

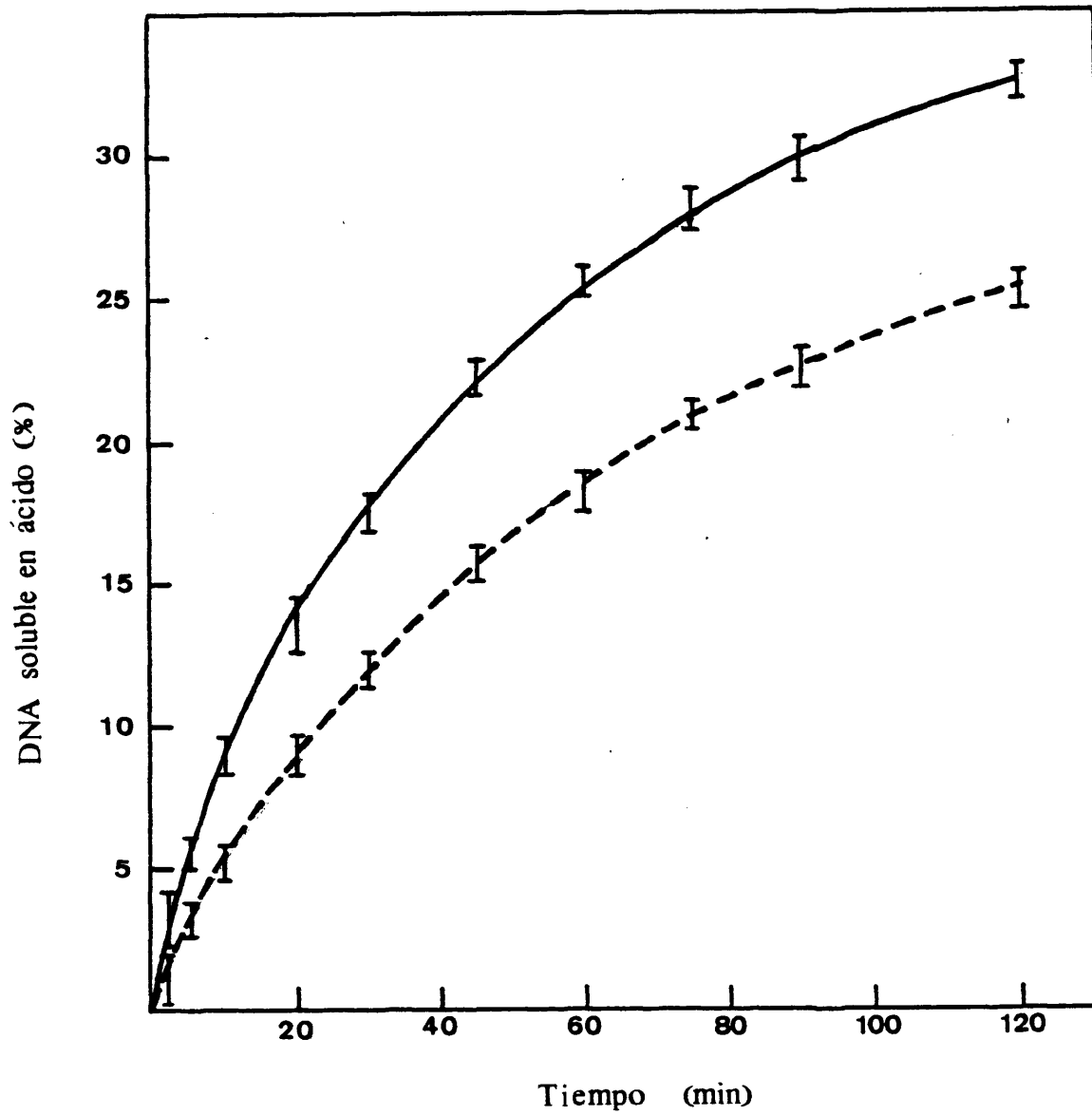


Figura 20.- Cinética de la digestión de núcleos de levadura con nucleasa micrococcal. Se muestra el DNA soluble en ácido en función del tiempo. Los núcleos procedían de células en fase exponencial (—) y en fase estacionaria (- - -).

3.6.1.2. Preparación de fracciones de la cromatina

Los núcleos de levadura tanto de fase exponencial como de fase estacionaria se digirieron hasta obtener un 5% de DNA soluble en ácido y la mezcla se fraccionó según se describe en el apartado 2.6.1.

El espectro de absorción de la fracción S1, el sobrenadante obtenido tras sedimentar los núcleos mostró un máximo sobre los 258 nm con una A_{230} también alta, indicando la presencia de material nucleoproteico. Esto podría indicar que había ocurrido una lisis nuclear. Sin embargo, cuando esta fracción se hizo 10 mM en Mg^{++} no precipitó ningún material lo que sugiere que la fracción S1 es una mezcla de oligonucleótidos y proteínas liberadas del núcleo. Este material se produce como consecuencia de la digestión y debido a su pequeño tamaño, pueden salir del núcleo. Por tanto, no salen del núcleo fragmentos de cromatina. Este resultado sirve para confirmar que durante la digestión no han lisado los núcleos.

Estudio de la fracción S2

Los núcleos (fracción P1) se lisaron obteniendose la fracción soluble S2, la cual tras precipitarse con Mg^{++} se dializó frente a Tris 5 mM, EDTA 1 mM pH 7.5. El espectro de absorción en la región UV de la fracción S2 de células tanto en fase estacionaria como en fase exponencial muestra una baja relación A_{230}/A_{260} (Figura 21) lo que indica una pequeña relación proteína /ácido nucleico.

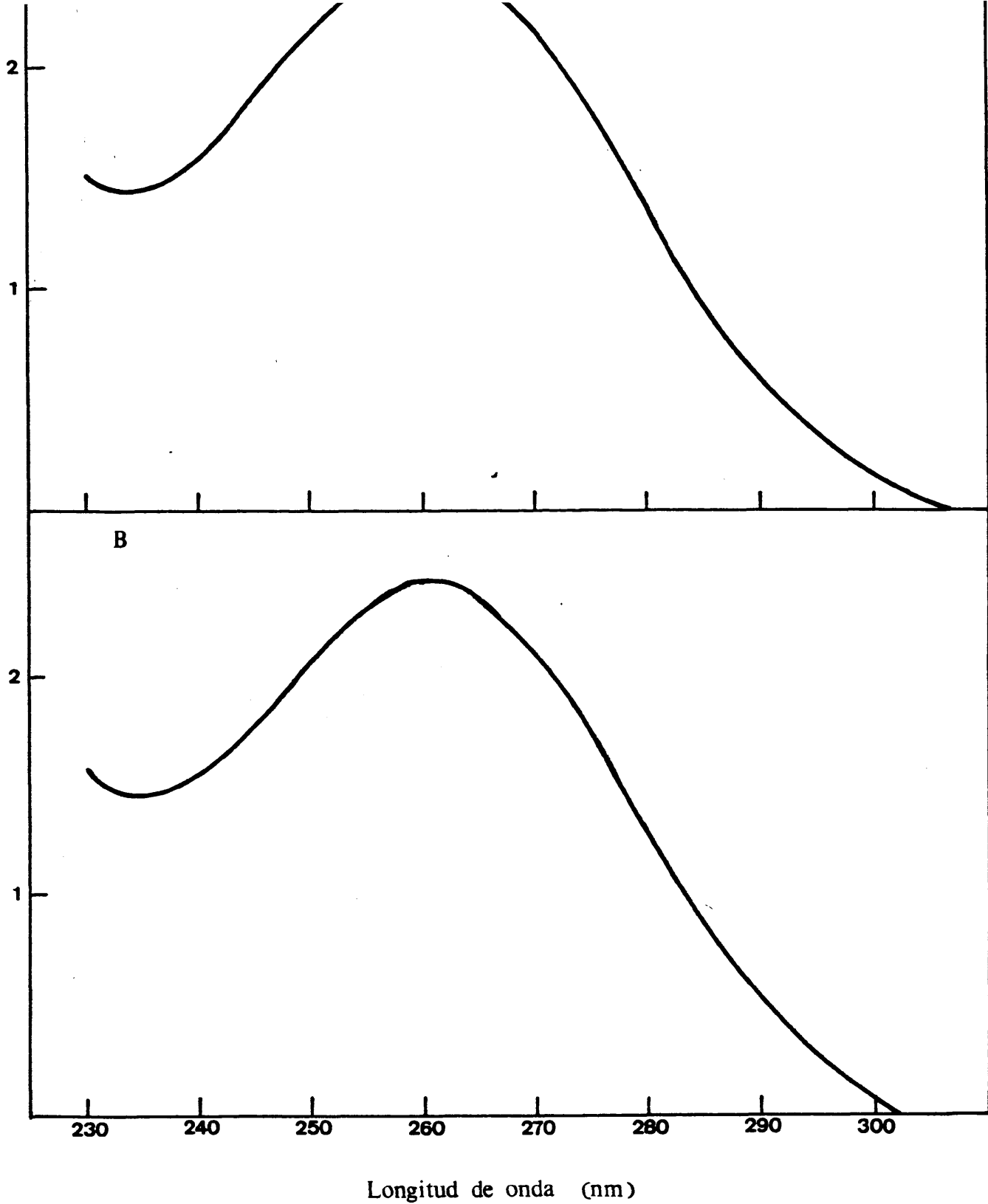


Figura 21.- Espectro de absorción UV de la fracción S2 obtenida al digerir núcleos de levadura con nucleasa micrococcal hasta un 5% de DNA soluble en ácido. A) Núcleos en fase exponencial; B) Núcleos en fase estacionaria.

Según se muestra en la Tabla XI, la relación proteína/DNA en peso de células en fase estacionaria es mayor que la de células en fase exponencial. Al mismo tiempo, la relación RNA/DNA es alta, lo que sugiere que el RNA es el responsable de la baja relación A_{230}/A_{260} .

En la Figura 22 se puede observar el espectro de DC de las fracciones S2 en Tris 5 mM, EDTA 1 mM pH 7.5, obtenidas al digerir los núcleos hasta un 5% de DNA soluble en ácido, correspondiente a células en fase exponencial y células en fase estacionaria. Este espectro es típico de muestras que presentan un elevado contenido en RNA. Es, por tanto, coherente con los datos de composición, que reflejan relaciones RNA/DNA elevadas.

Por otra parte, cabe también destacar la aparición en la fracción S2 obtenida a partir de células en fase estacionaria de una banda negativa a los 300 nm, banda que no aparece en la misma muestra cuando procede de células en fase exponencial. Esto sugiere que la cromatina presente en esa fracción presenta un mayor grado de estructura terciaria cuando proviene de células en fase estacionaria. Las curvas de desnaturalización térmicas realizadas con las fracciones S2 en EDTA 0.25 mM pH 8.0 no aportan ningún dato de interés debido a la baja hipercromicidad, resultado, probablemente del elevado contenido en RNA que presentan.

La digestión de núcleos de levadura hasta un 5% de DNA soluble en ácido solubiliza un material con un elevado contenido en RNA. La cromatina presente en esta fracción presenta características estructurales diferentes dependiendo del estado de crecimiento del cultivo de partida, concre-

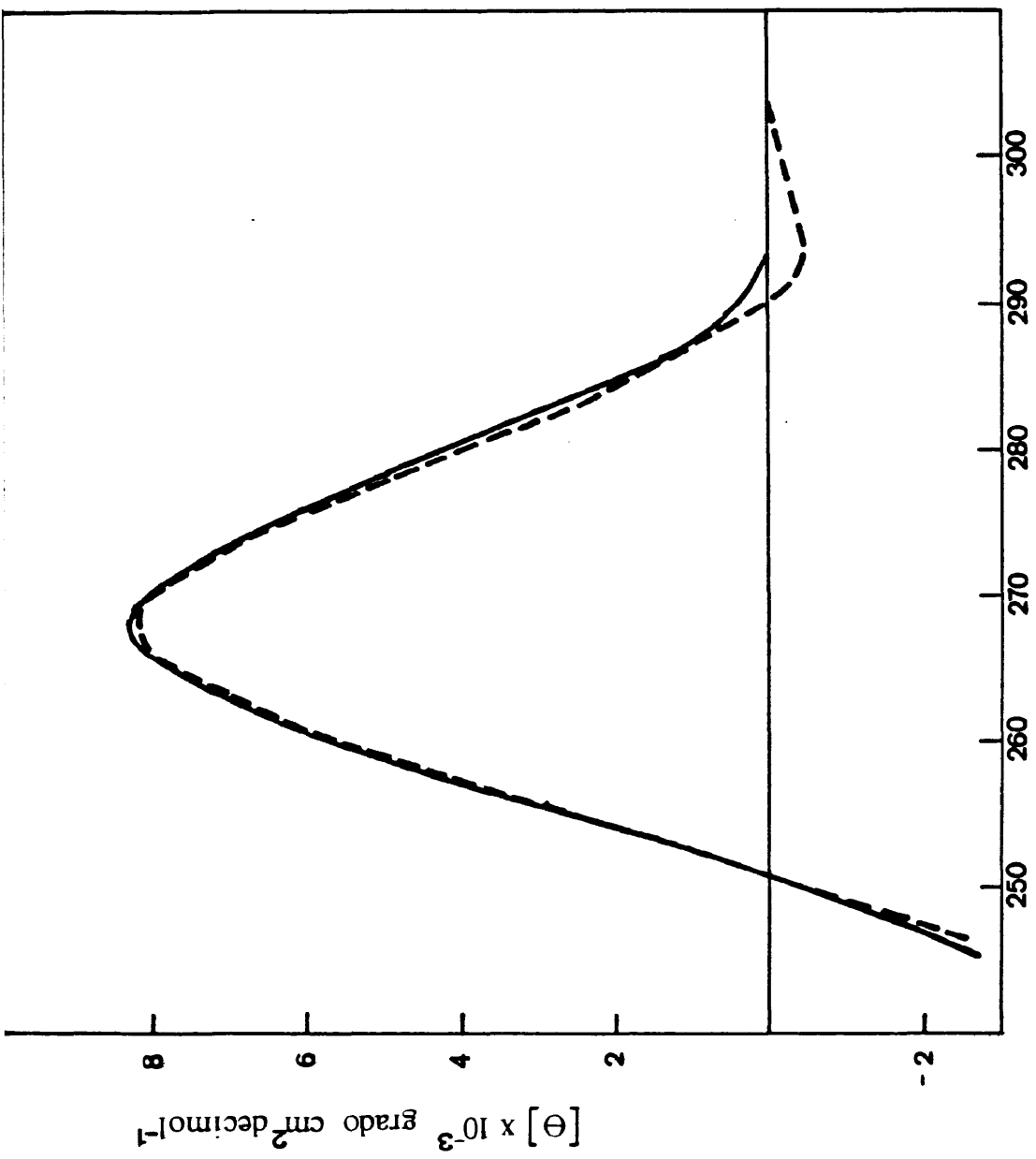


Figura 22.-Espectros de dicroísmo circular de las fracciones S2 obtenidas en la digestión de núcleos hasta un 5% de DNA soluble en ácido. Los núcleos procedían de células en fase exponencial (—) y en fase estacionaria (---).

TABLA XI

Digestión 5% de DNA
soluble en ácido

S2 estacionaria	1	1.5	1.6
S2 exponencial	1	1.5	1.4

Digestión suave

S2 estacionaria	1	-	1.6
S2 exponencial	1	-	1.5
S2' estacionaria	1	1.8	0.9
S2' exponencial	1	1.9	1.0

Composición de las diferentes fracciones aisladas a partir de núcleos de levadura por digestión con nucleasa micrococcal.

tadas, fundamentalmente, en la banda de elipticidad negativa sobre los 300 nm.

3.6.2. Digestión de núcleos en condiciones suaves

El segundo procedimiento de preparación de fracciones de cromatina se basó en una digestión mucho más reducida. El método seguido fue el descrito en el apartado 2.6.1.. El tiempo de digestión escogido fue de 30 segundos.

3.6.2.1. Preparación de fracciones de la cromatina

A partir de los núcleos digeridos de la forma que se indica en el apartado 2.6. durante 30 segundos se procedió a la preparación de fracciones según se describe en el apartado 2.6.1.

La fracción S1 aislada tanto de células en fase exponencial como de células en fase estacionaria mostró un espectro de absorción típico de cromatina, al igual que la fracción homóloga obtenida tras digestión hasta el 5% de solubilidad en ácido. Sin embargo, lo mismo que aquella, cuando se hizo 10 mM en Mg^{++} no precipitó ningún material indicando que no contenía cromatina. Este hecho indica que la fracción S1 podría ser una mezcla de oligonucleótidos y proteínas que diera lugar a un espectro de absorción semejante.

El sedimento de núcleos, P1, se lisó como se indica en el apartado 2.6.1. y se obtuvieron las fracciones S2 y S2'. Ambas fracciones se precipitaron con $MgCl_2$ 10 mM

para eliminar los nucleótidos presentes.

Estudio de la fracción S2

Con respecto a la fracción S2, el sobrenadante obtenido tras la precipitación con Mg^{++} no mostró prácticamente ninguna absorción en la región UV. Este resultado confirma que la digestión realizada es en condiciones suaves, pues los niveles de oligonucleótidos solubles en Mg^{++} en S2 son mínimos. El sedimento se resolubilizó mediante diálisis frente a EDTA 0.25 mM pH 8.0. Se puede observar en la Tabla XI como estas muestras no contienen RNA, al menos en cantidades apreciables. Este resultado es interesante puesto que sería de esperar que las regiones que se estuvieran transcribiendo fueran más accesibles a la nucleasa. Sin embargo, se han obtenido resultados que parecen indicar que esto no es así. Kohno y col. (1983) han observado que en exceso de RNA polimerasa el DNA de la cromatina se hace más resistente a la digestión con nucleasa micrococal. A su vez, Estruch y col. (1986a) han observado que esta enzima ataca preferentemente regiones que no tienen las histonas hiperacetiladas.

En la Figura 23 se muestra el espectro de DC en la región del ultravioleta próximo de la fracción S2 obtenida a partir de células en fase estacionaria y exponencial. Ambos espectros coinciden en presentar una banda de elipticidad positiva con el máximo situado sobre los 280 nm. Este resultado es compatible con la ausencia de RNA en esta fracción que, en caso contrario, desplazaría el máximo hacia el azul (el máximo del RNA se encuentra sobre los 265 nm y con una

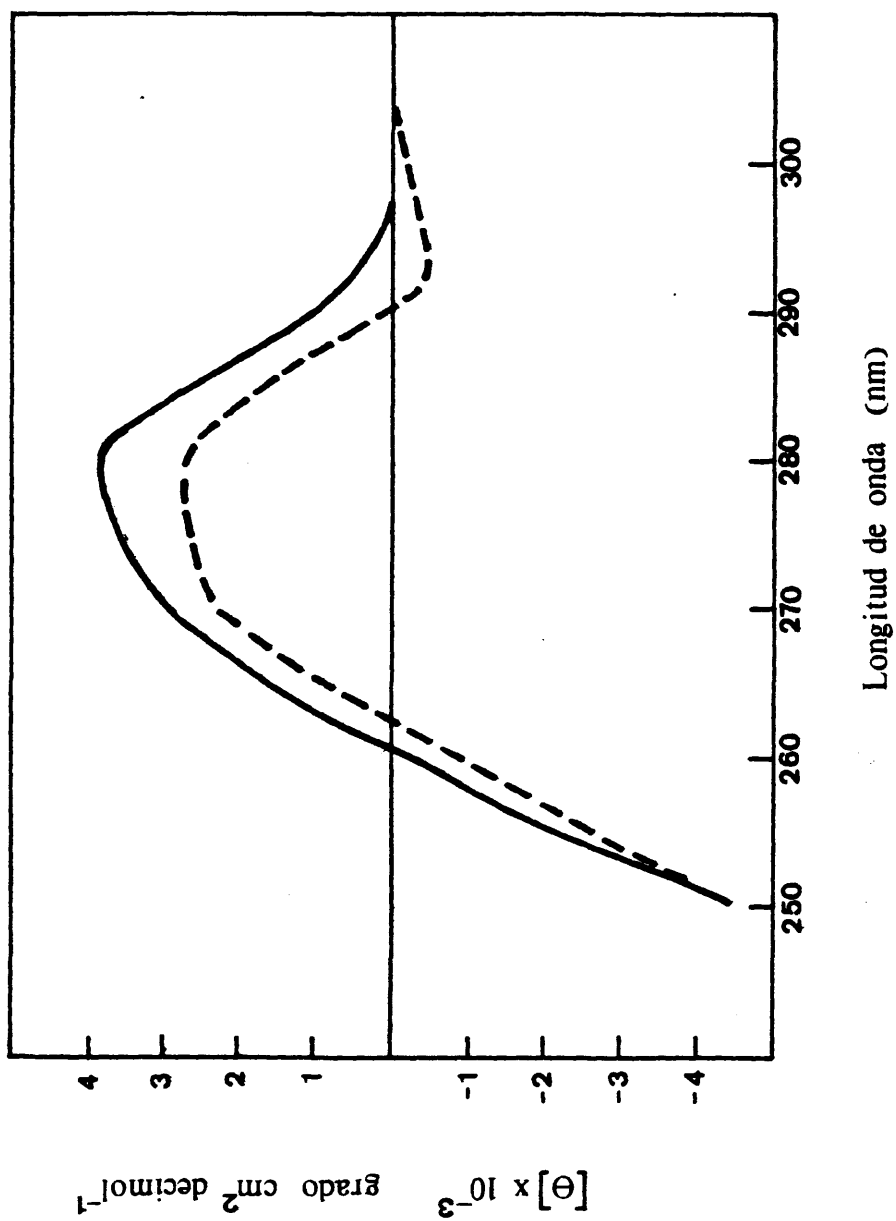


Figura 23.— Espectros de dicroísmo circular de las fracciones S2 obtenidas al digerir los núcleos de levadura con nucleasa micrococcal en condiciones suaves. (—) Fase exponencial; (---) Fase estacionaria.

elipticidad molar muy elevada).

La fracción S2 procedente de células en fase estacionaria presenta una elipticidad molar a los 280 nm de 2700 grados \times cm^2 \times decimol^{-1} mientras que la misma fracción procedente de células en fase exponencial la presenta de 3700 grados \times cm^2 \times decimol^{-1} .

Estos datos sugieren que la cromatina solubilizada por acción de la nucleasa micrococcal, procedente de células en fase estacionaria, presenta un mayor grado de estructuración que la fracción homóloga procedente de células en fase exponencial, en coincidencia con comentarios anteriores.

El valor de $[\theta]_{280}$ de la fracción S2 de fase exponencial es ligeramente inferior al encontrado en muestras poco estructuradas de cromatina de eucariontes superiores (Ver Introducción). Como ya se ha mencionado anteriormente la longitud del DNA de la región internucleosomal afecta al espectro de DC. La longitud del DNA nucleosomal en levadura es de 160 pb en contraste con los 200 pb de DNA en eucariontes superiores, es decir, es unos 40 pb menor. Este puede ser el motivo por el que la fracción S2 de fase exponencial alcanza solo un valor de $[\theta]_{280}$ de 3700 grados \times cm^2 \times decimol^{-1} frente a los 4000 alcanzados por la cromatina eucariótica.

Con respecto a la fracción S2 de fase estacionaria, presenta una $[\theta]_{280}$ algo superior al valor de 2000 grados \times cm^2 \times decimol^{-1} encontrado para fracciones de cromatina muy estructurada en otros organismos. Esto indica un menor grado de estructura terciaria para la fracción de cromatina de levadura, a pesar de que como se ha indicado en

el párrafo anterior, la longitud del DNA internucleosomal en la cromatina de levadura es menor que en la de eucariontes superiores y su contribución al espectro de dicroísmo circular ha de ser, por tanto, también menor.

Hay otra región del espectro en la que difieren las fracciones S2 de fase exponencial y estacionaria, respectivamente. En la Figura 23 se puede observar como la fracción S2 de fase estacionaria muestra una banda de elipticidad negativa sobre los 300 nm, mientras que la fracción S2 de fase exponencial carece de ella. Por tanto, esto ha de ser el reflejo de alguna diferencia entre las estructuras de ambas fracciones. Las fracciones S2 presentan la misma disminución aunque en menor grado de la elipticidad positiva con respecto al espectro conservativo del DNA y solo una de ellas presenta esta banda negativa. Esto podría ser reflejo de un mayor grado de estructura terciaria, con lo que su contribución negativa al espectro de dicroísmo circular sería mayor. Hay que resaltar el hecho de que los espectros de DC de la estructura del DNA provocados por la unión de la histona H1 al DNA muestran una banda negativa que comienza exactamente en esta zona del espectro (310-290 nm). Por tanto, es posible que esta banda negativa se deba a la adquisición por parte del DNA de una estructura tipo- por la interacción con alguna proteína que, en el caso de levadura no puede ser la histona H1. El espectro de DC de la estructura del DNA presenta su máximo de elipticidad en la banda negativa sobre los 265 nm, lo que por otra parte justificaría la disminución de elipticidad molar del DNA en la cromatina.

En la Figura 24a se muestra la curva de desnaturalización térmica de la fracción S2 de células en fase exponencial, y en la Figura 25a la correspondiente a la misma fracción de células en fase estacionaria. Se puede observar como en ambos casos se alcanzó un valor de hipercromicidad del orden de 30, de acuerdo con el hecho de no presentar RNA. Por otra parte, en las Figuras 24B y 25B se muestra la primera derivada de la curva de desnaturalización correspondiente. Se puede observar como ambas muestras presentan dos transiciones principales cuyas T_m son 72 y 81 °C respectivamente. En la fracción S2 de células en fase exponencial la primera transición es de menor longitud que la segunda, llegando a observarse un mínimo entre ambas transiciones. En la fracción S2 de células en fase estacionaria sigue siendo de mayor magnitud la segunda transición, pero la primera pasa a ser un hombro de la misma. En conclusión, la fracción solubilizada por digestión suave de la cromatina presenta una mayor estabilidad frente a la desnaturalización térmica cuando procede de células en fase estacionaria. Esto ha de deberse a una diferente interacción entre el DNA y proteínas en ambas fases.

Estudio de la fracción S2'

El sedimento P2 obtenido tras la lisis nuclear se dializó frente a Tris 5 mM, EDTA 1 mM pH 7.5 y se obtuvo la fracción S2' de la forma que se describe en el apartado 2.6.1. El espectro de absorción de ambas muestras indica una muy baja relación A_{230}/A_{260} lo que es lógico si se tiene en

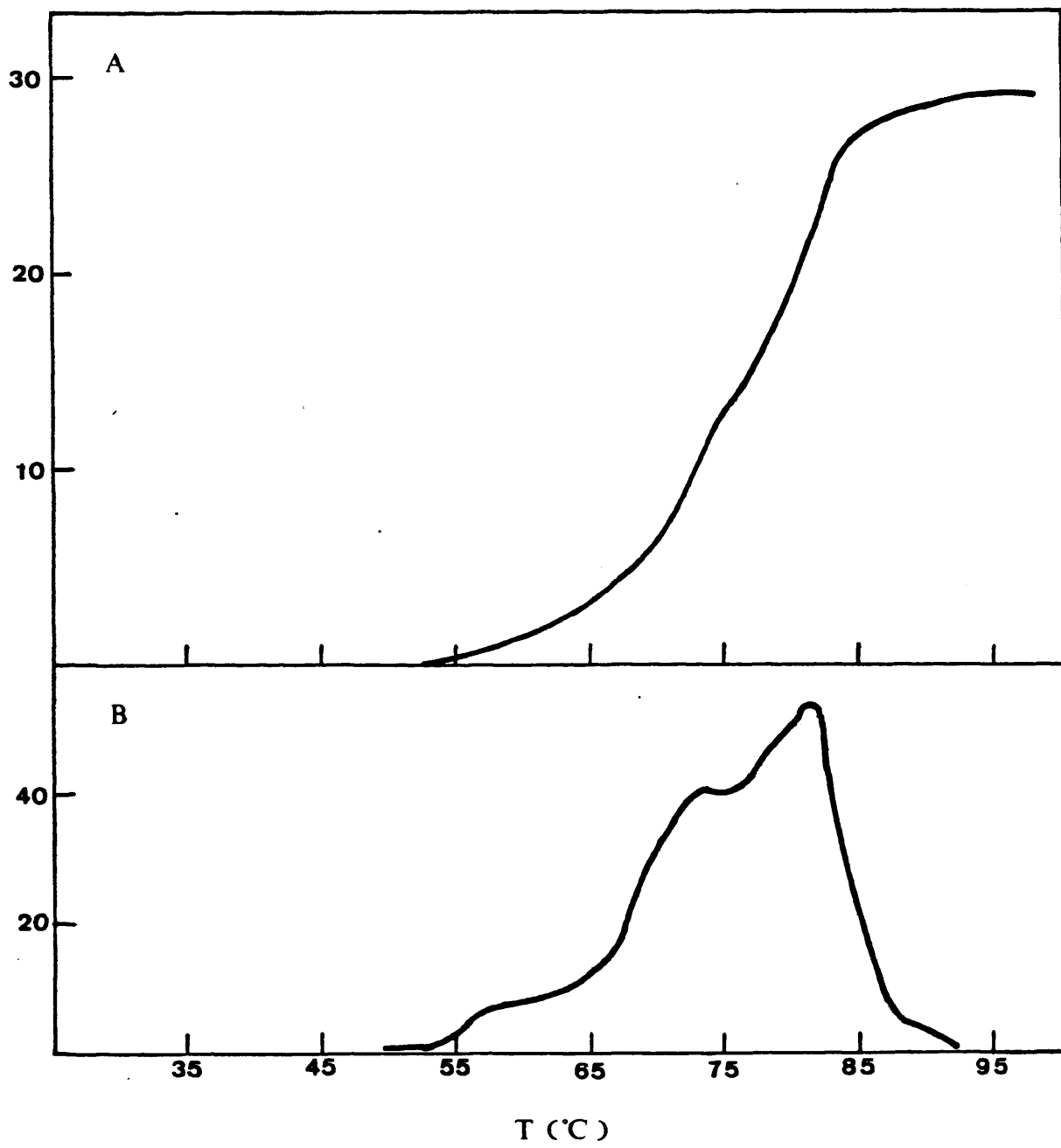


Figura 24.- A) Perfil de desnaturalización térmica obtenido con la fracción S2 obtenida al digerir núcleos en condiciones suaves. Los núcleos procedían de células en fase exponencial.

B) Curva derivada del perfil de desnaturalización.

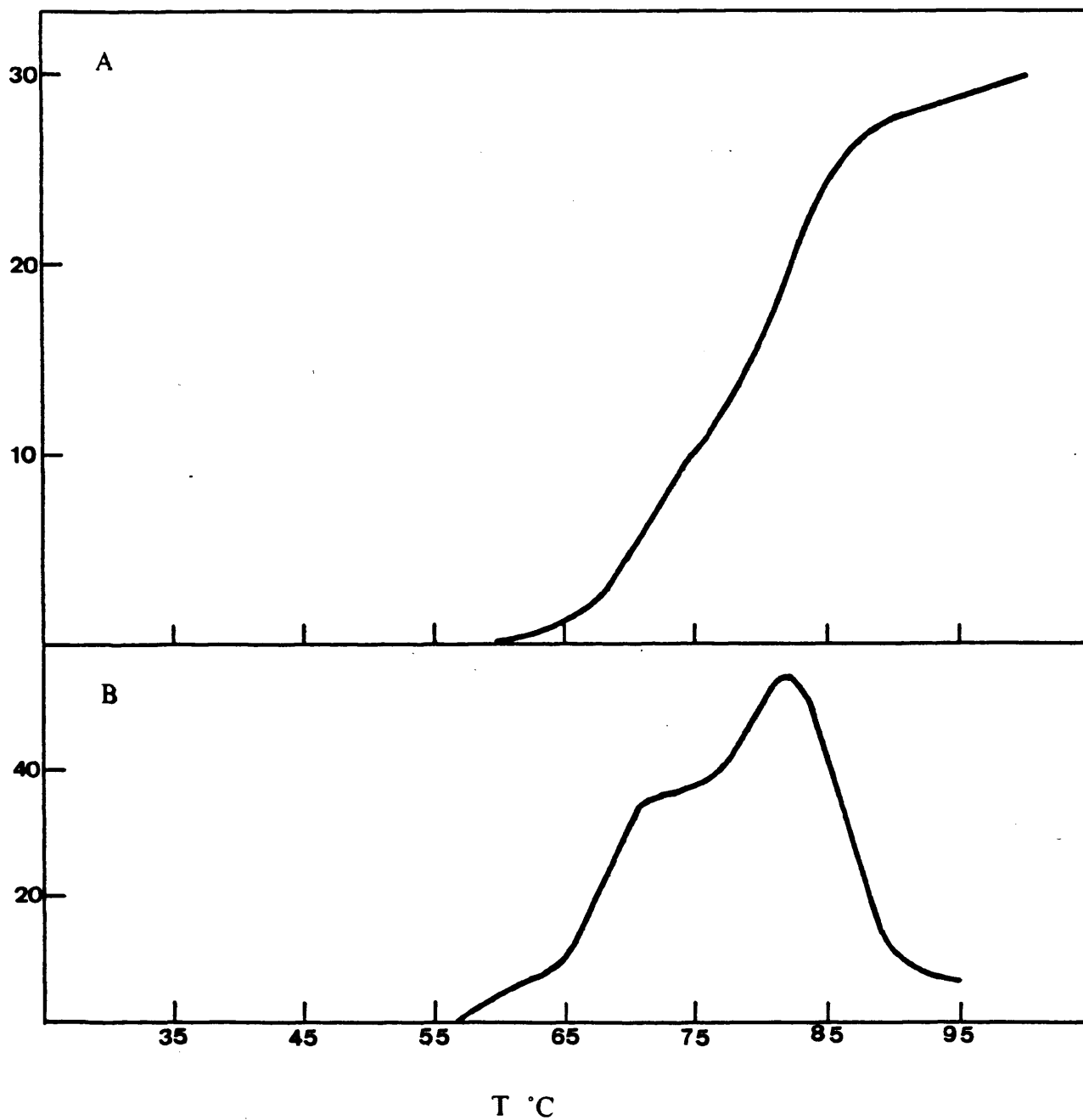


Figura 25.- A) Perfil de desnaturalización térmica de la fracción S2 obtenida al digerir los núcleos en condiciones suaves, procedente de células en fase estacionaria

B) Curva derivada del perfil de desnaturalización.

cuenta el elevado contenido en RNA (Tabla XI). Esta relación es menor que la de la fracción S2 de la digestión hasta el 5% de solubilidad en ácido, lo que puede relacionarse con el hecho de que la relación proteína/ácido nucleico es menor en este caso. En la Figura 26 se muestra el espectro de DC de estas fracciones S2' obtenidas a partir de células en fase exponencial y en fase estacionaria. El elevado contenido en RNA que muestra esta fracción es consecuente con el espectro obtenido. Se puede observar como aparece una banda de elipticidad positiva cuyo máximo se encuentra a los 267-268 nm y con un valor de elipticidad de 10000 grados \times cm^2 \times decimol^{-1} . El hecho de que el valor de elipticidad no sea más elevado así como que el dicroísmo a menores longitudes de onda indique la presencia de proteínas, sugiere que en la fracción S2' hay también una pequeña proporción de cromatina. Ambos espectros muestran una gran semejanza con los obtenidos con las fracciones S2 en las digestiones hasta un 5% de solubilidad en ácido. No es extraño dado que coinciden en presentar elevados niveles de RNA.

El material presente en la fracción S2' no procede, al menos principalmente, de la digestión con nucleasa, puesto que no se libera cuando se lisan los núcleos. Así, la solubilización debe tener otra causa. El método seguido para la obtención de S2' es el mismo al usado para la obtención de la DNH S_a lo que indica que el motivo de la solubilización podría ser el mismo. Las diferencias existentes entre el material solubilizado a partir de cromatina de células machacadas y de núcleos digeridos lisados puede deberse al método de preparación.

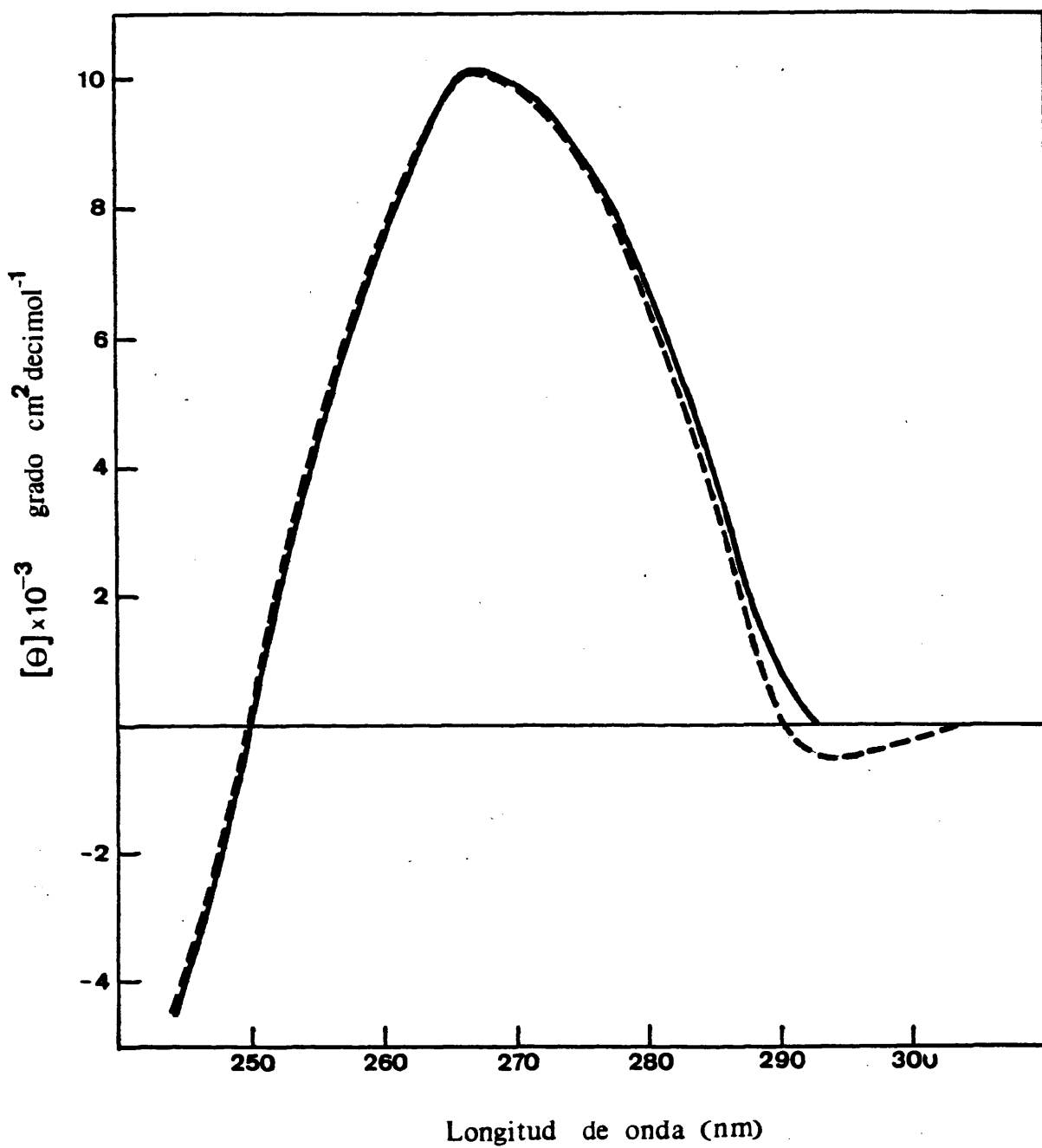


Figura 26.- Espectros de dicroísmo circular de las fracciones S2' obtenidas al digerir los núcleos de levadura con nucleasa micrococcal en condiciones suaves. (—) Fase exponencial; (---) Fase estacionaria.

En la banda positiva del espectro las muestras procedentes de células en fase estacionaria y en fase exponencial no presentan claras diferencias. Esto puede ser debido a que el contenido en RNA es tan elevado que enmascara la contribución de la cromatina. Sin embargo, se puede apreciar una diferencia en la zona alrededor de los 300 nm, región del espectro en la que solo contribuye la superestructura de la cromatina. Es posible que la explicación sea la misma que en el caso de las fracciones S2.

Con respecto a las curvas de desnaturalización térmica de las fracciones S2' se obtuvieron unos resultados acordes con el elevado contenido en RNA. Así, mostró muy baja hipercromicidad y no se pudieron determinar las transiciones térmicas.

Los resultados obtenidos con núcleos de levadura indican que al menos hay dos diferentes fracciones en su cromatina que difieren en su accesibilidad a la nucleasa micrococcal. La fracción más accesible es atacada preferentemente por la enzima, de manera que se solubiliza, al menos parcialmente, incluso con una digestión suave. Una digestión más intensa parece liberar principalmente RNA asociado a la cromatina, el cual se solubiliza también por diálisis frente a un tampón de baja fuerza iónica. Lógicamente, esta mayor digestión debe afectar a una mayor proporción de cromatina que en la digestión suave, pero ha de mostrar también una accesibilidad mayor que el resto de la cromatina. En todo caso, esta cromatina no ha sido estudiada debido al elevado

contenido en RNA. En conclusión, la digestión con nucleasa micrococcal de núcleos de levadura manifiesta la existencia de al menos dos diferentes fracciones en la cromatina que difieren en la susceptibilidad a la enzima, lo cual puede estar relacionado con la actividad transcripcional.

El material solubilizado mediante la digestión suave de núcleos procedentes de células en fase estacionaria muestra un diferente espectro de DC que el mismo material procedente de células en fase exponencial, indicando que éste posee una menor estructuración. De esta forma, la cromatina soluble de células estacionarias tendría un mayor grado de estructura terciaria. Esto está de acuerdo con los resultados de la cinética de digestión de los núcleos con nucleasa micrococcal. Estos estudios han mostrado como la digestión transcurre a mayor velocidad en los núcleos de fase exponencial, indicando una mayor accesibilidad a la enzima y una menor estructuración.

Por otra parte, los estudios de desnaturalización térmica indican que el DNA está más estabilizado en la cromatina soluble de células en fase estacionaria. Esto puede implicar una variación en las interacciones del DNA, quizá por aparición de nuevas proteínas o por modificación de las ya existentes. Estas nuevas proteínas, o en su caso las modificaciones podrían ser las responsables de los cambios estructurales entre ambas cromatinas solubles.

3.7. ESTUDIOS ESTRUCTURALES CON MONONUCLEOSOMAS DE LEVADURA

Finalmente, con vistas a conseguir mayor información de la cromatina de levadura se planteó el estudio de la subunidad de la misma, el mononucleosoma. Los mononucleosomas de levadura ya han sido aislados a partir de núcleos por Lohr y col. (1977) y Nelson y col. (1977) aunque no en suficiente cantidad como para poder realizar estudios espectroscópicos con los mismos. Posteriormente, Lee y col. (1982) también prepararon nucleosomas de levadura pero a partir de un material semejante a la DNH pura, lo que sugiere que sus resultados podrían haberse visto modificados por el método de obtención que tal y como ya se ha comentado anteriormente conlleva cizalla.

Para evitar estos problemas, en esta investigación se han aislado mononucleosomas de levadura a partir de núcleos, siendo esta la primera vez que se realizan estudios estructurales sobre mononucleosomas preparados de esta manera. Para evitar también problemas de rendimiento se ha partido siempre de células en fase estacionaria.

3.7.1. AISLAMIENTO DE MONONUCLEOSOMAS DE LEVADURA

El aislamiento de mononucleosomas se planteó de la forma que se ha descrito en el apartado 2.6.3., basada en el método descrito por Nelson y col. (1977). Para optimizar el procedimiento se llevó a cabo un análisis de los tamaños de los fragmentos de DNA a diferentes tiempos de digestión de los núcleos de levadura con nucleasa micrococcal. Para ello

se aisló el DNA de las diferentes alícuotas y se sometió a electroforesis según se describe en el apartado 2.8.3. En la Figura 27 se muestra el resultado de este estudio. Se puede observar en la misma cómo antes del comienzo de la digestión el DNA es de alto peso molecular. A medida que avanza la digestión el tamaño de los fragmentos de DNA va disminuyendo, apareciendo ya mononucleosomas a los dos minutos de digestión. Conforme va aumentando el tiempo de digestión van disminuyendo de intensidad las bandas correspondientes a los fragmentos de mayor tamaño y se va incrementando la intensidad de la banda correspondiente al mononucleosoma, hasta el momento en el que ésta también empieza a disminuir. A los 45 minutos ya hay casi exclusivamente mononucleosomas y a los 120 minutos prácticamente ya no existen.

Con objeto de obtener el máximo rendimiento posible en mononucleosomas los núcleos de levadura se digirieron en las condiciones descritas en el apartado 2.6.3. durante 30 minutos. Tras parar la reacción los núcleos se lisaron por diálisis. La fracción soluble S2 se obtuvo mediante centrifugación de la mezcla a 2000 g durante 10 minutos, con lo que sedimentaron los residuos insolubles de los núcleos.

El tamaño del DNA presente en la fracción S2 se analizó mediante electroforesis. En la Figura 28 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida-agarosa del DNA aislado de dicha fracción, observandose como presenta un contenido mayoritario en mononucleosomas, conteniendo también dinucleosomas. Sin embargo, no se observan fragmentos de mayor tamaño, lo que concuerda con los resultados de la cinética mencionados al comienzo de este aparta-

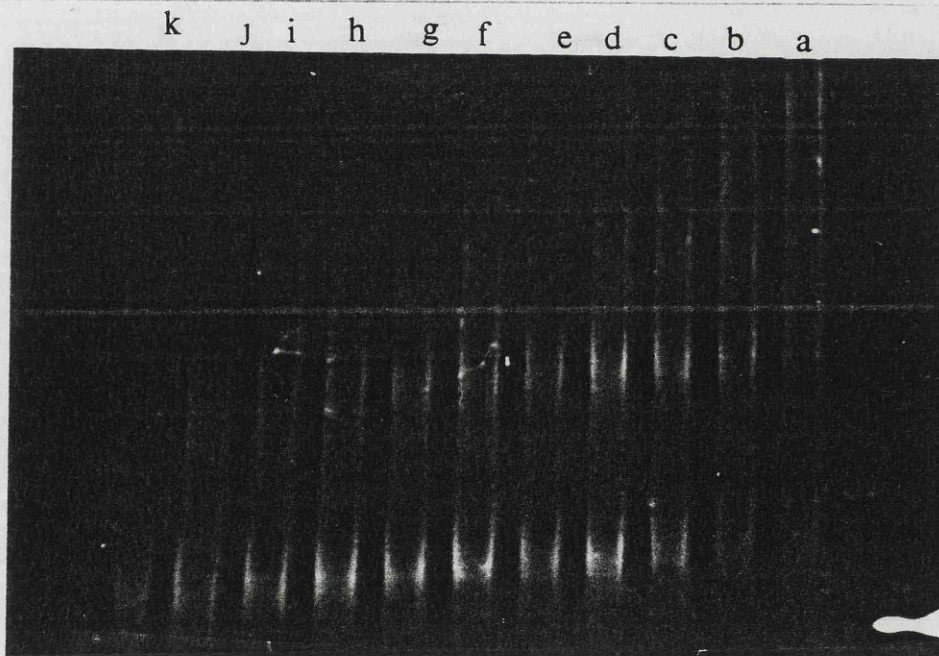


Figura 27.- Imagen electroforética de los fragmentos de DNA generados en la digestión de los núcleos con nucleasa micrococcal a diferentes tiempos de incubación: a) 2 min; b) 5 min; c) 10 min; d) 15 min; e) 20 min; f) 30 min; g) 45 min; h) 60 min; i) 90 min; j) 120 min; k) 180 min.

do.

Por otra parte, en la Figura 28 se muestra el espectro de absorción en la región UV de la fracción S2, mostrando un aspecto típico de material nucleoproteico. La A_{260} fue de 1.81 ± 0.1 y la relación A_{230}/A_{260} fue de 1.05.

3.7.1.1. CROMATOGRAFIA EN BIOGEL A-5 m

Debido a que la centrifugación en gradiente de sacarosa no fue útil para el aislamiento de los mononucleosomas, se llevó a cabo el fraccionamiento de S2 por cromatografía en Bio-Gel A-5m.

La fracción S2 obtenida tras digestión de los núcleos de levadura con nucleasa micrococcal se concentró por ultrafiltración a través de una membrana PM-30 (Amicon) que permite el paso de moléculas con un peso molecular de hasta 30000. En la Figura 29 se muestra el espectro de absorción de la fracción S2 concentrada y el del eluido de la ultrafiltración. Como se observa, el espectro del eluido muestra una A_{260} que es importante si se compara con la de la fracción S2 antes de la concentración. Esto es debido a que a través de la membrana PM-30 pasan los oligonucleótidos de peso molecular inferior a 30000, generados durante la digestión enzimática. Por tanto, un gran tanto por ciento de la A_{260} de la fracción S2 se debe a oligonucleótidos. Por otra parte, el espectro de absorción del eluido de la ultrafiltración, con su baja A_{230} , indica una ausencia casi total de proteínas y por tanto de cromatina. Esto se comprobó mediante el aislamiento y electroforesis del DNA de este eluido, no apareciendo ninguna banda en el gel.

La fracción S2 se sometió a cromatografía de penetrabilidad como se describe en el apartado 2.6.3. En la

2.0

1.0

240 250 260 270 280 290 300 310
Longitud de onda (nm)

Figura 28.- Espectro de absorción UV de la fracción S2
obtenida al digerir los núcleos de levadura según Nelson y col.
(1977).

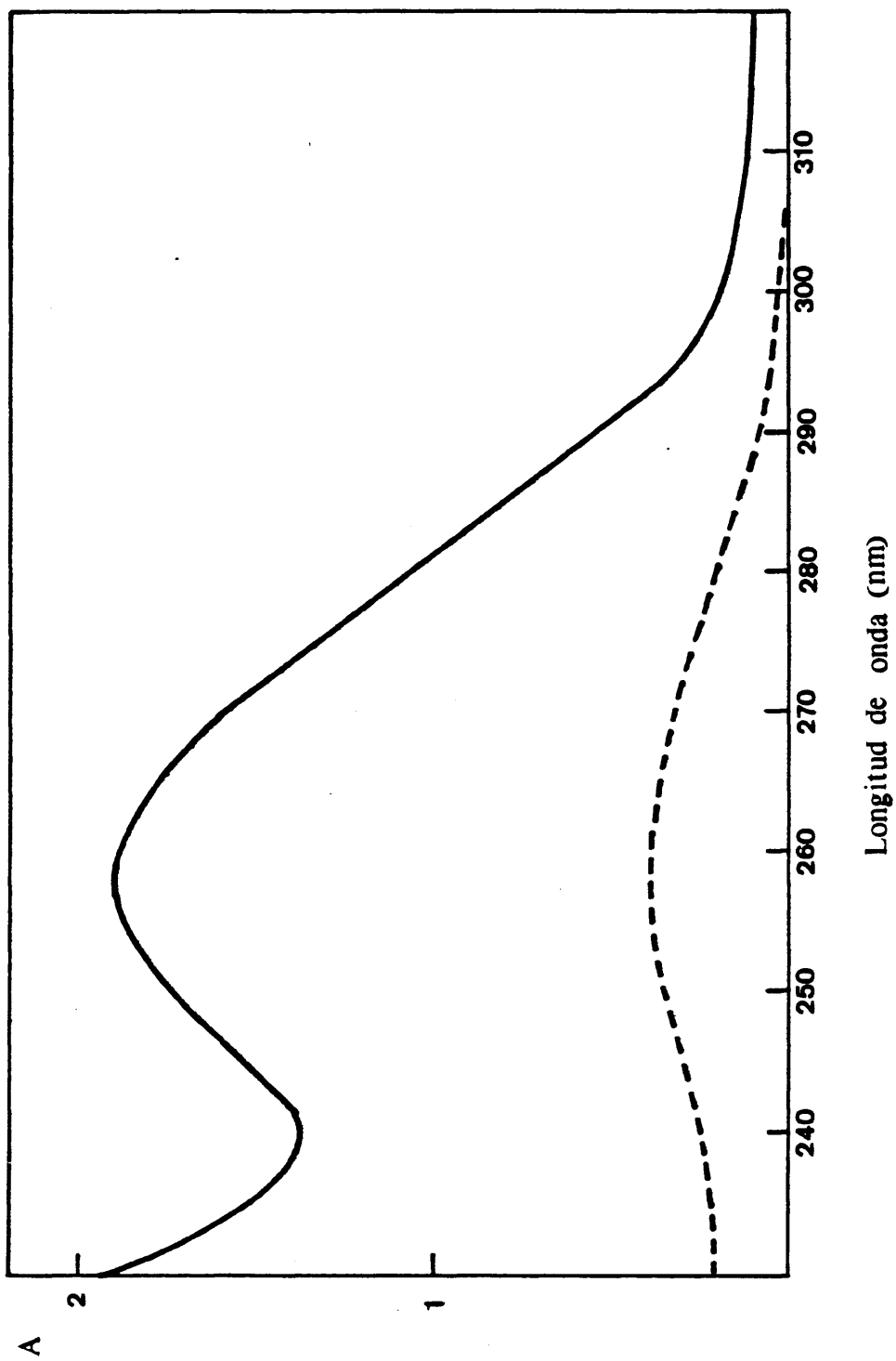


Figura 29.- Espectro de absorción UV de la fracción S2 concentrada por ultrafiltración (—) y del eluido de la misma (- - -).

Figura 30 se muestra el perfil de elución de dicha cromatografía, representandose la A_{260} del eluido en función del número de fracción.

Se puede observar que en el volumen de exclusión aparece un pico de A_{260} seguido de otros dos picos solapados. En esta región del perfil se estudió el tamaño del DNA que contenía cada fracción. En la Figura 31 se muestra el resultado de la electroforesis llevada a cabo en las condiciones descritas en el apartado 2.8.3. con el DNA aislado de diferentes fracciones de la cromatografía. De esta forma se comprobó que en el volumen de exclusión no había DNA, y que los otros dos picos contenían dinucleosomas y mononucleosomas respectivamente. Por delante del primero de estos picos se encontraba DNA de mayor tamaño que debe corresponder a cromatina de alto peso molecular. Debido al solapamiento de los picos, éstos aparecen contaminados con fragmentos de diferente tamaño. Con vistas a obtener mononucleosomas puros, se recogió exclusivamente la caída del pico de los mismos, constituyendo el pico IV de la cromatografía. Después se agruparon las fracciones en los picos II y III como se detalla en la Figura 30.

Posteriormente se procedió al aislamiento del DNA de cada uno de estos picos y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida-agarosa en la forma en que se describe en el apartado 2.8.3. En la Figura 31 se muestra el resultado de la electroforesis tras teñir el gel con bromuro de etidio. Puede comprobarse como en el pico I no hay DNA; en el pico II hay cromatina de alto peso molecular junto con dinucleosomas; en el pico III hay una mezcla de mono y

0.2

0.1

I I II IV

30 40 50 60 70 80 90 100

Nº de fracción

Figura 30.- Perfil de elución de la cromatografía en BioGel A-5m. Se detallan las fracciones recogidas y agrupadas en los picos I, II, III y IV.

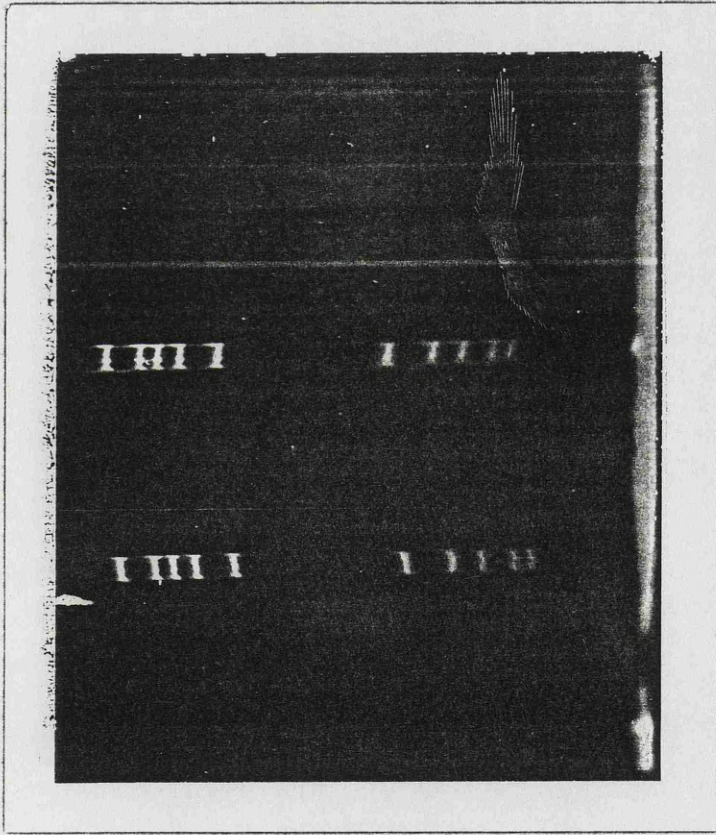
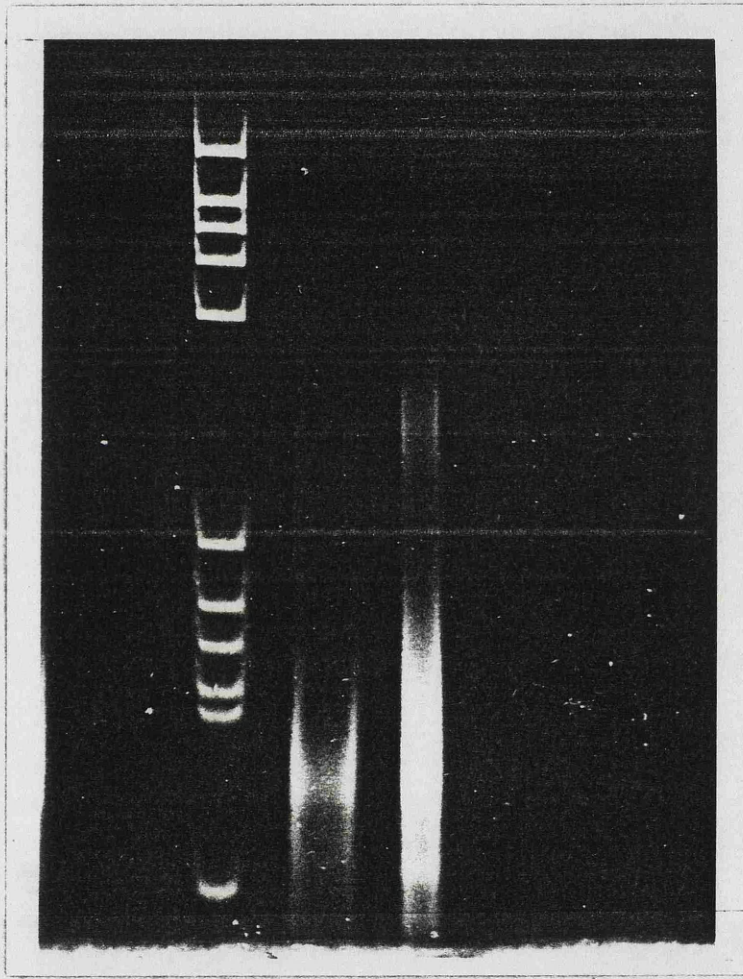


Figura 31.- Imagen electroforética de los fragmentos de DNA presentes en las distintas fracciones. La identidad se detalla en la figura.



dinucleosomas; y en el pico IV hay exclusivamente mononucleosomas (Cores nucleosomales). Los picos II, III y IV se concentraron con objeto de realizar con ellos posteriores estudios.

3.7.2. DICROISMO CIRCULAR DE MONONUCLEOSOMAS

Los espectros de dicroísmo circular son unos sensibles indicadores de las estructuras secundarias tanto de proteínas como de ácidos nucleicos. Específicamente, los espectros de nucleohistonas entre los 250 y los 320 nm reflejan sólo la conformación del DNA puesto que las histonas poseen pocos residuos aromáticos.

El espectro de dicroísmo circular en el UV próximo de los mononucleosomas de levadura realizado según se describe en el apartado 2.7.1. se muestra en la Figura 32. Se observa la presencia de un máximo de elipticidad positiva sobre los 282 nm y un hombro a los 277 nm, con unos valores de elipticidad de $[\theta]_{282} = 2750$ grados \times cm^2 \times decimol^{-1} y $[\theta]_{277} = 2125$ grados \times cm^2 \times decimol^{-1} . Estos valores de elipticidad son del mismo orden que los obtenidos con mononucleosomas de eucariontes superiores, si bien es algo elevado para tratarse de cores (Cowman y Fasman, 1978; Watanabe e Iso, 1981). Además, la longitud de onda a la que la elipticidad cambia de signo está sobre los 263 nm, lo que también coincide con los resultados obtenidos con otros organismos.

Cowman y Fasman (1978) han comprobado que la elipticidad molar del mononucleosoma sobre los 280 nm depende de

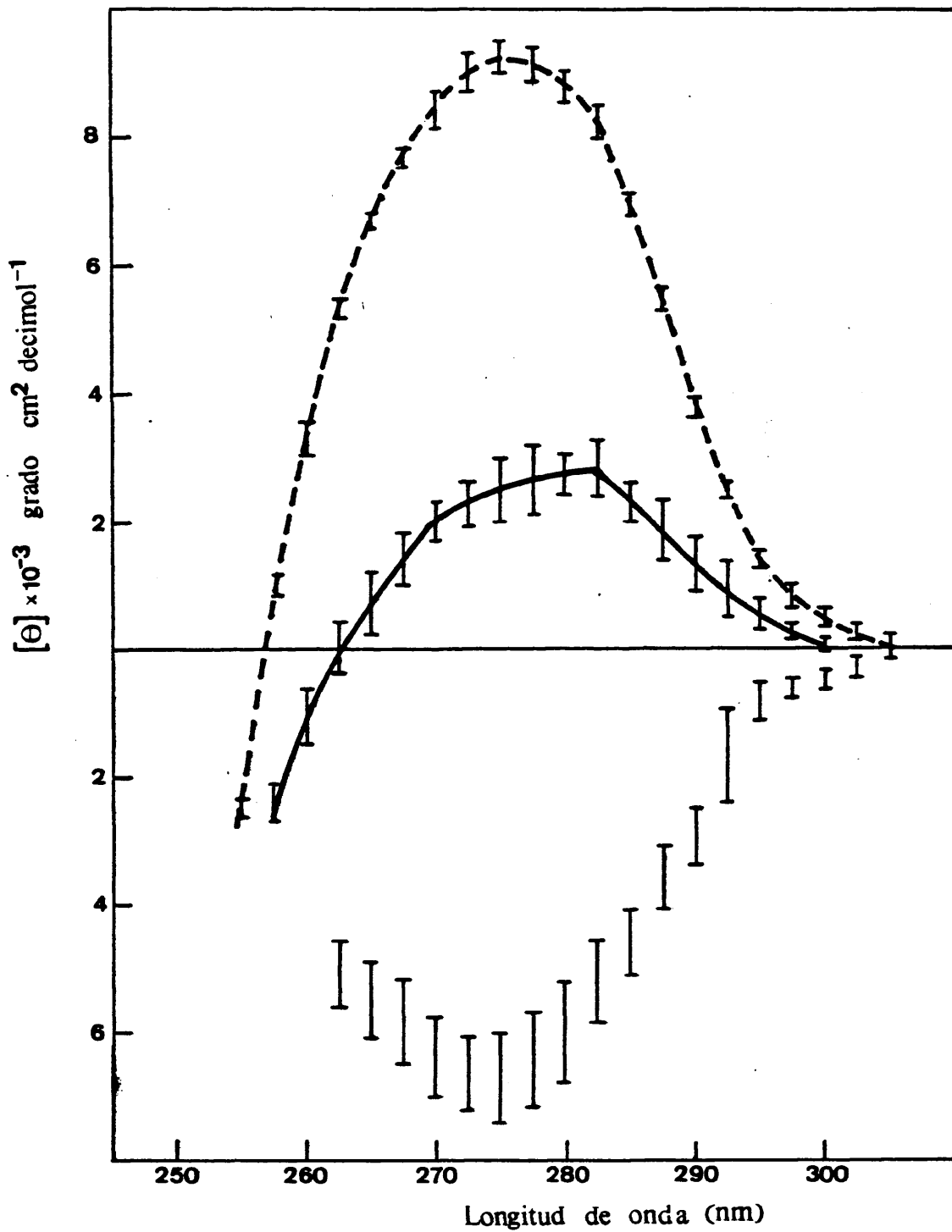


Figura 32.- Espectro de dicroísmo circular de mononucleosomas de levadura (—) y de DNA de levadura (---). Se muestra también el espectro de diferencia.

la longitud de su DNA, de forma que el menor valor de elipticidad se obtiene con la partícula core nucleosomal de 140 pb ($[\theta]_{284} = 1900 \pm 200$ grados \times $\text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$). Además, conforme se reduce la longitud de DNA se produce la aparición de una banda de elipticidad negativa a 295 nm, y el punto de corte donde la elipticidad se hace negativa sufre un desplazamiento a mayores longitudes de onda (Cowman y Fasman, 1978). El espectro de dicroísmo circular de los mononucleosomas de levadura no muestra esa banda negativa a los 295 nm, en lo que coincide con los mononucleosomas de eucariotes superiores con una longitud de 200 pb. Por tanto, los mononucleosomas de levadura muestran una gran semejanza en cuanto a su espectro de dicroísmo circular, tanto cualitativa como cuantitativamente, con los mononucleosomas de eucariotes superiores de 200 pb de longitud, pero sin embargo, su longitud de DNA es mucho menor.

Cowman y Fasman (1978) han comprobado también que la elipticidad de los mononucleosomas se ve afectada por la presencia de la histona H1 (ó H5). La completa eliminación de H1 y H5 provoca un incremento en la elipticidad a 283 nm, tanto en cromatina como en los diferentes tipos de mononucleosomas, con la excepción de las partículas core. Sin embargo, la eliminación de estas histonas no destruye la dependencia del espectro de dicroísmo circular de mononucleosomas con la longitud de DNA que contienen. Estos autores han propuesto que la fracción de DNA linker condensada por interacción con H1 (ó H5) contribuye al espectro de DC de una forma similar al de la partícula core y que el DNA no condensado tiene las mismas propiedades espectrales que el

DNA libre.

El DNA libre en estructura B presenta un ~~máximo~~ de elipticidad a los 275 nm ($[\theta]_{275} = 9300 \pm 200$ grados \times cm^2 \times decimol^{-1}) con un hombro a 280 nm ($[\theta]_{280} = 9000$ grados \times cm^2 \times decimol^{-1}). La gran reducción de la elipticidad de las partículas core con respecto a la del DNA libre se ha atribuido a la adquisición de estructura terciaria por parte del DNA cuando se enrolla alrededor del octámero de histonas (Cowman y Fasman, 1978). El resto del DNA hasta completar la longitud total del mononucleosoma solo contribuiría al espectro con la estructura B del DNA. El espectro de DC calculado para el DNA linker a partir de los obtenidos con cromatina y partículas core coincide casi exactamente con el de DNA libre (Watanabe e Iso, 1981). De esta forma, cuanto mayor es la longitud del DNA nucleosomal mayor es la elipticidad en la zona de los 280 nm. La contribución al espectro de DC de esta estructura terciaria la han determinado Cowman y Fasman (1978) sustrayendo al espectro de la partícula nucleosomal el del DNA libre, apareciendo una banda de elipticidad negativa centrada a los 275 nm. La intensidad de la banda negativa depende de la proporción de DNA condensado en una manera específica. Según estos autores, esta banda se puede deber a la estructura terciaria compacta del DNA, esto es, la manera en la que el DNA se enrolla alrededor del octámero de histonas permitiendo interacciones entre vueltas adyacentes de la superhélice.

En la Figura 32 se muestra el espectro de dicroísmo circular en el UV próximo del DNA de levadura, aislado de la forma que se describe en el apartado 2.8.5. En este

espectro se observa un máximo de elipticidad a los 275 nm ($[\theta]_{275} = 9300 \text{ grados} \times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$) con un hombro a los 280 nm ($[\theta]_{280} = 8600 \text{ grados} \times \text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$), resultados que concuerdan totalmente con los obtenidos por otros autores con DNA de organismos superiores. En la misma Figura se muestra también el espectro de diferencia obtenido al restar el espectro del DNA libre del espectro obtenido con los mononucleosomas de levadura. Se puede observar como dicho espectro muestra una banda de elipticidad negativa centrada a 275 nm, lo que concuerda con los resultados obtenidos con eucariontes superiores. Esto parece sugerir que en el nucleosoma de levadura el DNA adquiere una estructura terciaria similar a la de eucariontes superiores. Sin embargo, el valor de elipticidad alcanzado es mucho menor en valor absoluto, lo que podría indicar un menor grado de estructura terciaria. Por tanto, los resultados sugieren que el DNA en el mononucleosoma de levadura adquiere el mismo tipo de superestructura que en los mononucleosomas de eucariontes superiores, pero en menor grado.

La alteración en las propiedades de dicroísmo circular que acompaña la condensación de DNA por histonas podría deberse a un cambio en la estructura secundaria o a algún aspecto de la estructura terciaria. Estudios de espectroscopía Raman (Goodwin y Brahms, 1978) y dispersión de rayos X (Bram, 1971) han mostrado que el DNA en cromatina y en nucleosomas aislados adopta una estructura secundaria del tipo B. El DNA libre de proteína en soluciones acuosas de baja fuerza iónica también existe en forma B (Bram, 1971; Maniatis y col., 1974), no habiéndose detectado ninguna

diferencia entre ambos tipos de conformaciones.

Una explicación alternativa para las propiedades de dicroísmo circular del DNA nucleosomal puede ser la estructura terciaria. Una banda negativa a 275 nm tal, como la descrita en los espectros de diferencia comentados en este mismo Apartado, se ha observado previamente en DNA bajo diferentes condiciones: DNA-@ (Jordan y col., 1972), complejos DNA-H1 (Fasman y col., 1970) y complejos DNA-poli(L-Lisina) (Haynes y col., 1970). En todos estos casos la estructura secundaria del DNA es de tipo B (Maniatis y col., 1974; Haynes y col., 1970), pero el DNA se encuentra condensado en una estructura compacta. La banda a 275 nm es aparentemente el resultado de la interacción de luz polarizada circularmente con la disposición terciaria ordenada.

Aunque se ha propuesto (Jordan y col., 1972) que se requieren interacciones entre muchas cadenas de DNA adyacentes en partículas grandes para dar lugar al espectro @, es posible que la interacción entre dos cadenas de DNA en el nucleosoma sea suficiente para producir un efecto de baja intensidad. De acuerdo con el modelo de nucleosoma de Finch y col. (1977), la distancia entre vueltas adyacentes de la superhélice de DNA es aproximadamente 6 Å. Cowman y Fasman (1978) han propuesto que el espectro de dicroísmo circular de nucleosomas contiene una contribución de tipo @ como consecuencia de la interacción de luz polarizada circularmente con la estructura terciaria ordenada del DNA y que depende de la proximidad de las vueltas adyacentes de superhélice. De acuerdo con esta hipótesis, en el nucleosoma de levadura se daría el mismo fenómeno. Ahora bien, la banda

negativa a 275 nm se encuentra aún más reducida en el nucleosoma de levadura con respecto al espectro @, lo que podría indicar una mayor separación de las cadenas de DNA.

3.7.3. DESNATURALIZACION TERMICA DE MONONUCLEOSOMAS

Los mononucleosomas de levadura aislados se sometieron a desnaturalización térmica en EDTA 0.25 mM pH 8.0, según se describe en el apartado 2.7.3. En la Figura 33a se muestra el perfil de desnaturalización térmica obtenido, alcanzandose un valor de hipercromicidad de 29 a 100 °C, lo que concuerda con los valores obtenidos por otros autores para DNA (Watanabe e Iso, 1981)). En la Figura 33b se muestra la primera derivada de dicho perfil de desnaturalización térmica. En ella se observa un máximo a los 78 °C con un hombro sobre los 72 °C. También parece haber otro pequeño hombro sobre los 62 °C. Esto indica la existencia en el mononucleosoma de levadura de al menos tres transiciones térmicas, una mayoritaria centrada a los 78 °C, otra más pequeña sobre los 72 °C y otra ya muy pequeña sobre los 62 °C. Estos resultados concuerdan en gran medida con los de Lee y col. (1982) si bien las temperaturas de transición que ellos obtienen son algo inferiores. Así, estos autores obtienen la transición mayoritaria a los 75 °C, la segunda a los 68 °C y la tercera sobre los 60 °C. Es posible que esta primera transición se deba al DNA espaciador entre nucleosomas límite, puesto que algunos de los mononucleosomas aislados no lo habrán perdido durante la digestión enzimática.

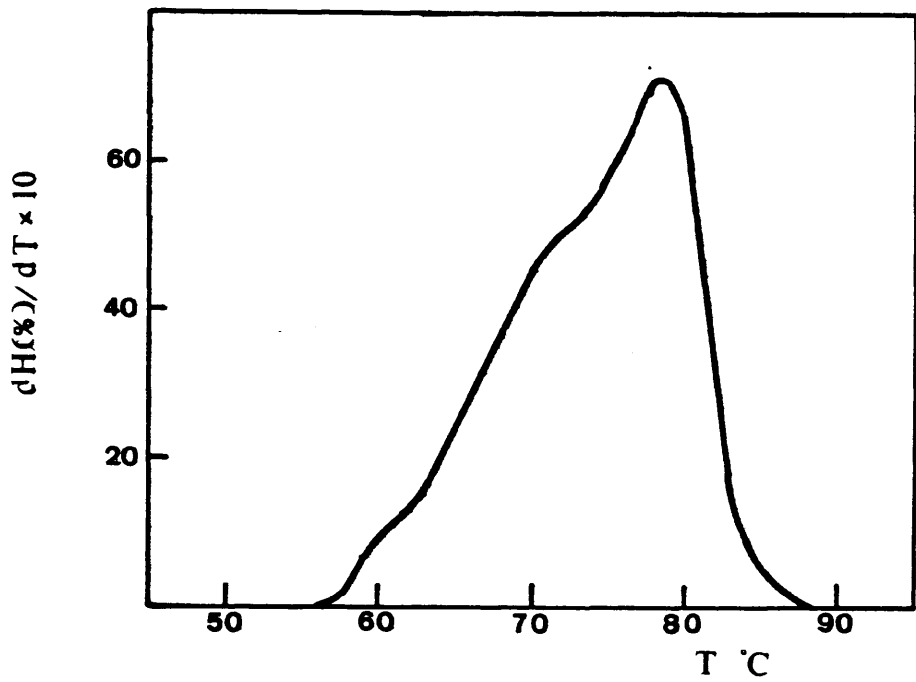
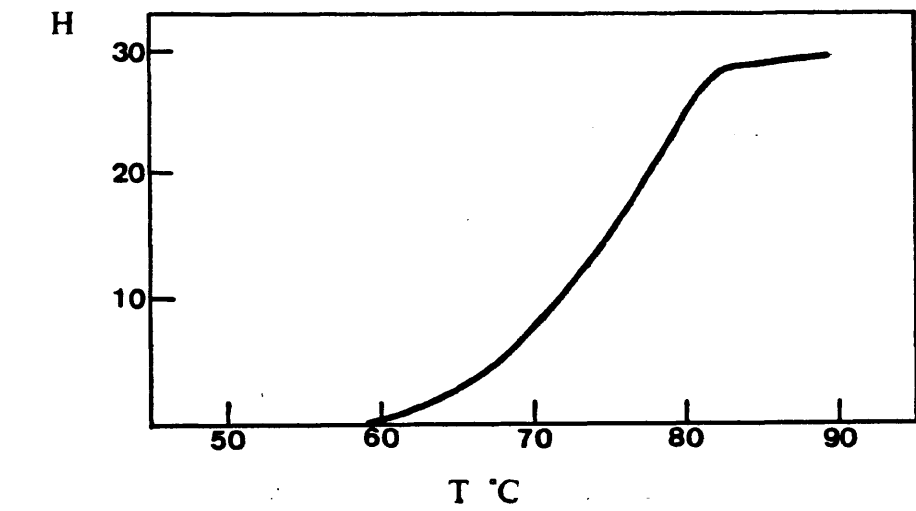


Figura 33.- A) Perfil de desnaturalización térmica de los mononucleosomas de levadura.

B) Curva derivada del perfil de desnaturalización.

Las otras dos transiciones estarían en este caso asociadas al DNA del nucleosoma límite.

Las diferencias ya señaladas entre las temperaturas de transición obtenidas por Lee y col. (1982) y las aquí descritas pueden atribuirse a diferencias estructurales entre ambos tipos de nucleosomas provocadas por el diferente método de obtención. Los mononucleosomas obtenidos por Lee y col. (1982) provienen de cromatina aislada por el procedimiento de Franco y López-Braña (1978) el cual incluye una etapa de cizalla. Este tipo de tratamientos afecta a la estructura de la cromatina, como se desprende de los trabajos realizados por otros autores a este respecto (Nicolini y col. 1976). Por otra parte, en esta investigación se ha comprobado que es así (Vease la primera parte de los resultados de esta Memoria). Por el contrario, los mononucleosomas obtenidos en esta investigación provienen directamente de núcleos de levadura, no habiendo sufrido en ningún momento fuerzas de cizalla. Por este motivo, los mononucleosomas de levadura que se han obtenido son los primeros que se obtienen con la estructura nativa en este organismo, por lo que los resultados obtenidos con ellos creemos son de mayor fiabilidad.

Una vez calculada la curva derivada se ajustó la curva experimental al mejor conjunto de gaussianas. La Figura 34 muestra el resultado de la descomposición de la curva derivada de mononucleosomas en tres gaussianas. En la Tabla XII se enumeran los resultados representados en la Figura 34, indicando la temperatura de fusión de cada una de las transiciones en que se ha descompuesto la curva, así como el

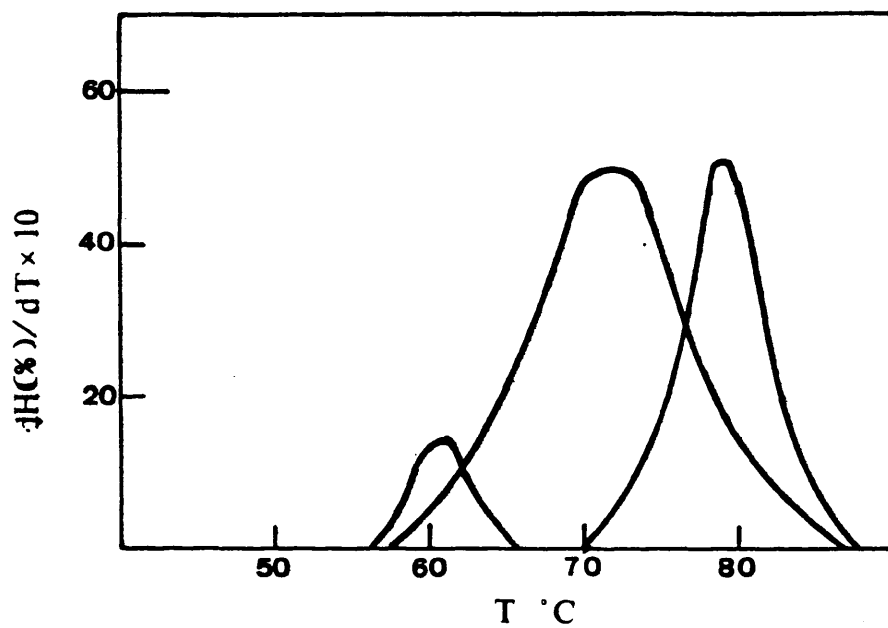


Figura 34.- Descomposición en gaussianas de la curva derivada del perfil de desnaturalización térmica.

porcentaje que representan obtenido a partir del área de la curva gaussiana calculada para cada transición.

Los mononucleosomas muestran dos transiciones mayoritarias que ocurren a 72 y 79 °C respectivamente, junto con una pequeña transición centrada a 62 °C. Estas tres transiciones coinciden con las descritas por otros autores para cromatina de alto peso molecular. Fulmer y Fasman (1979), en cromatina de alto peso molecular de eritrocito de pollo, han asignado la primera de las transiciones al DNA próximo al nucleosoma límite, mientras que las otras dos corresponderían a DNA estabilizado por histonas.

La baja contribución de la primera transición a la curva de desnaturalización de mononucleosomas de levadura puede deberse al hecho de que ese DNA esté también menos protegido del ataque por la nucleasa micrococcal y haya sido degradado.

3.7.4. EFEECTO DE LA FUERZA IONICA

En diferentes puntos de esta Memoria se ha mencionado que las fracciones solubles de DNH o de cromatina de levadura precipitan parcialmente a concentraciones de sal 0.1 M. Sin embargo, los mononucleosomas aislados no precipitaron en absoluto. Esto puede ser debido a que son partículas core, no precipitando tampoco en organismos superiores.

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio en el que se intentó ver el efecto de la fuerza iónica sobre la estructura terciaria del DNA en el core nucleosomal. Este estudio se llevó a cabo realizando el espectro de dicroísmo

177

circular de los cores a diferentes fuerzas iónicas. La concentración de sal (KCl) más elevada que se utilizó fue de 0.1 M. En todo el rango de concentraciones de sal utilizadas no se detectó ningún cambio en la elipticidad a 280 nm. Esto quiere decir que el DNA del core nucleosomal de levadura no sufre ninguna variación en su estructura terciaria.

3.8. EFECTO DE LA LONGITUD DE LA CADENA NUCLEOSOMAL

3.8.1. Desnaturalización térmica

Con objeto de ver la influencia de la longitud de la cadena nucleosomal sobre el perfil de desnaturalización térmica, los distintos picos obtenidos en la cromatografía en Biogel A5 m se dializaron frente a EDTA 0.25 mM pH 8.0 para someterles a desnaturalización térmica (Vease apartado 2.7.3.). Los perfiles de desnaturalización térmica de dichos picos mostraron unos valores de hipercromicidad de 29 para mononucleosomas, 34 para el pico II y 33 para el pico III.

En la Figura 35 se muestra la primera derivada de los perfiles de desnaturalización de los picos II y III. En ella se puede observar que cada fracción muestra unas características propias. Así, mientras los mononucleosomas

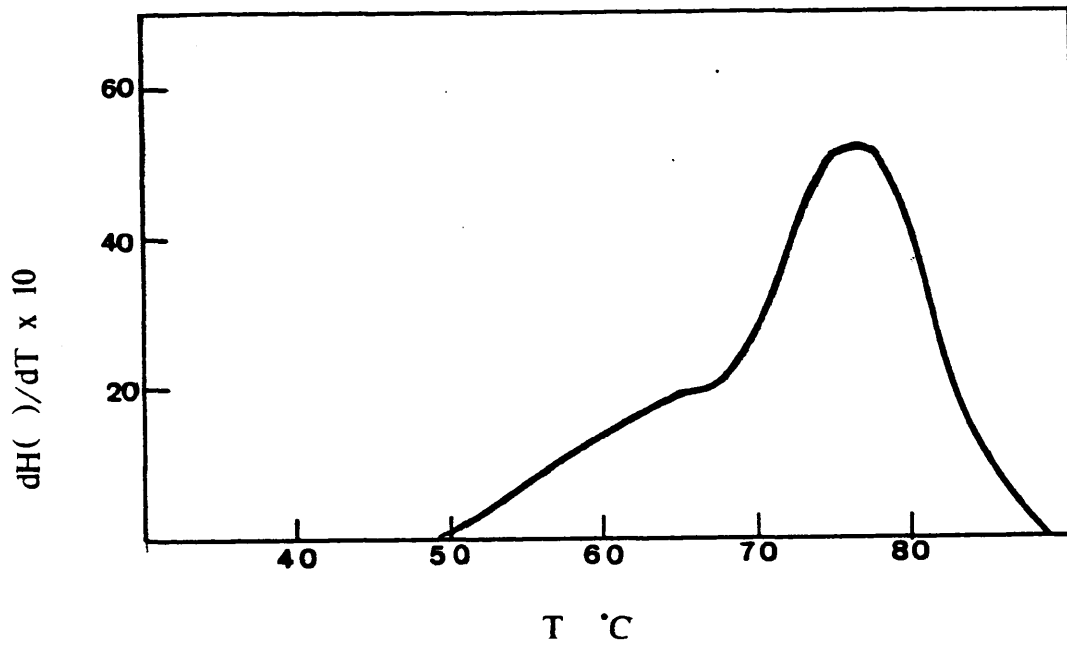
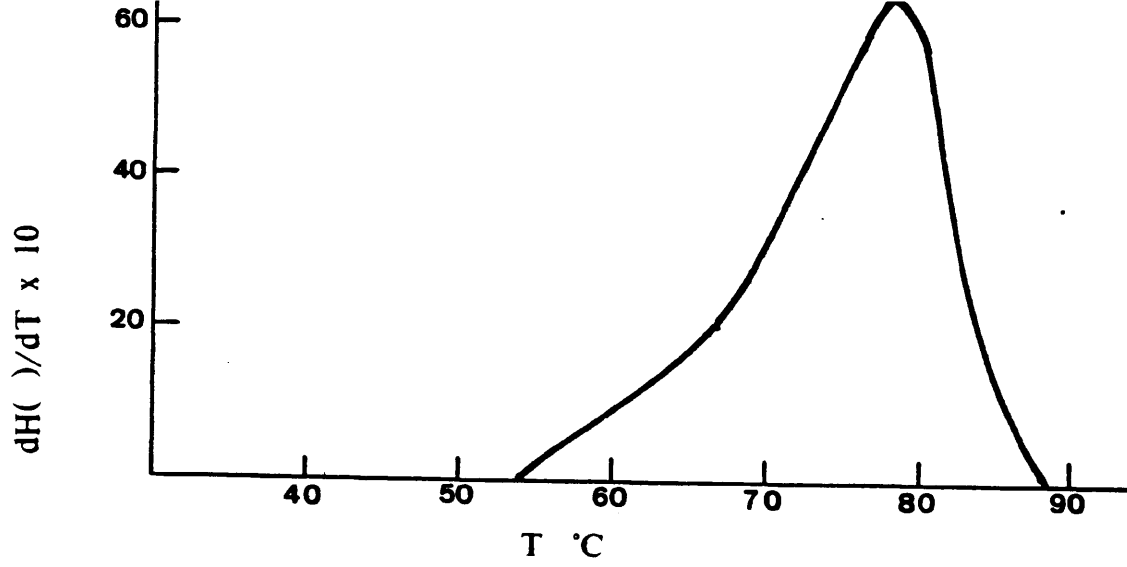


Figura 35.- Curva derivada de los perfiles de desnaturalización térmica de los picos II (A) y III (B).

muestran las transiciones ya comentadas en el apartado 3.7.3., es decir, 62, 72 y 78 °C, los picos II y III parecen mostrar transiciones térmicas a esas mismas temperaturas pero con una diferente contribución de cada una de ellas.

En la Figura 36 se muestra la descomposición en gaussianas de las curvas derivadas de las tres fracciones, y en la Tabla XII se muestra el porcentaje de cada una de las transiciones. Se puede observar como la primera transición va aumentando en importancia desde el mononucleosoma hasta el pico II. Por otra parte, el porcentaje de la segunda transición va disminuyendo y el de la tercera va aumentando. El tanto por ciento del área total que corresponde a cada transición es equivalente al tanto por ciento de pares de bases de DNA que están implicados en esa transición. De esta manera, puesto que el tamaño de los mononucleosomas aislados es de 140 pb, es decir, se trata del core nucleosomal, el aumento del tanto por ciento de pares de bases de DNA que funden a la temperatura de la primera transición debe ser consecuencia de la presencia en pico II y pico III (más en el primero) del DNA linker, del cual carece el mononucleosoma. El hecho de que este DNA no funda exactamente a la temperatura de fusión del DNA libre puede deberse a su pequeña longitud y a estar entre dos regiones muy protegidas. Es posible que las histonas del core protejan también, aunque en menor medida, al DNA linker.

Más difícil de explicar es el aumento del tanto por ciento del DNA que contribuye a la última transición. Este hecho puede deberse a un efecto que ejerza cada partícula core sobre las adyacentes, de manera que el DNA del

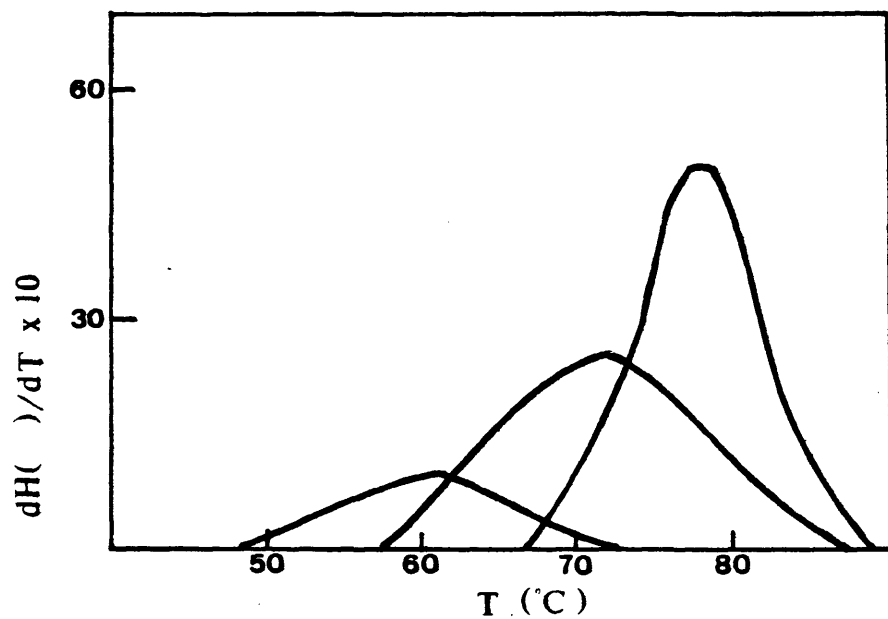
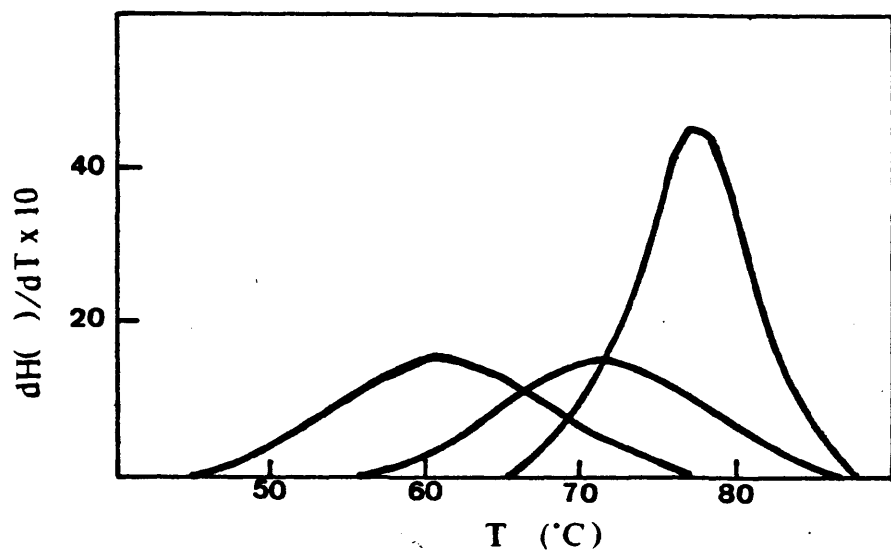


Figura 36.- Descomposición en gaussianas de las curvas derivadas del perfil de desnaturalización térmica de los picos II (A) y III (B).

TABLA XII

<u>Fracción</u>	<u>Transición</u>		
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
pico II	25%(61°C)	23%(71°C)	52%(77°C)
pico III	13%(61°C)	36%(72°C)	51%(78°C)
pico IV	3%(61°C)	66%(72°C)	31%(79°C)

Porcentaje y temperatura de cada transición en las fracciones de la cromatografía.

core se encuentre más protegido. En el mononucleosoma los extremos del DNA del core se encuentran libres con lo que es posible que se encuentren desestabilizados y fundan a una temperatura menor. La presencia de otra partícula core vecina o quizá simplemente del DNA linker pueden proteger esta región.

3.8.2. Dicroísmo circular

En la Figura 37 se muestra los espectros de dicroísmo circular correspondientes a los tres picos de la cromatografía en Biogel A-5m. Los espectros se realizaron con las muestras en Tris 10 mM, EDTA 0.7 mM pH 7.6. Se puede observar como hay un desplazamiento del máximo de elipticidad positiva a longitudes de onda menores con el aumento de la longitud de la cadena nucleosomal. Así, los mononucleosomas, como ya se ha descrito en el apartado 3.7.2. presentan un máximo de elipticidad sobre los 280 nm con un hombro sobre los 275 nm. Por otro lado, el espectro del pico III muestra un máximo de elipticidad sobre los 278 nm, y el del pico II sobre los 275 nm.

El valor de elipticidad molar también se ve afectado por la longitud de la cadena nucleosomal. Así, los mononucleosomas presentan en el máximo una elipticidad molar de 2700 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$. Por su parte, el máximo de elipticidad del pico III es de 2875 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$ y el del pico II de 3800 grados \times $\text{cm}^2 \times \text{decimol}^{-1}$.

Se puede observar como la longitud de la cadena nucleosomal también influye sobre la longitud de onda a la

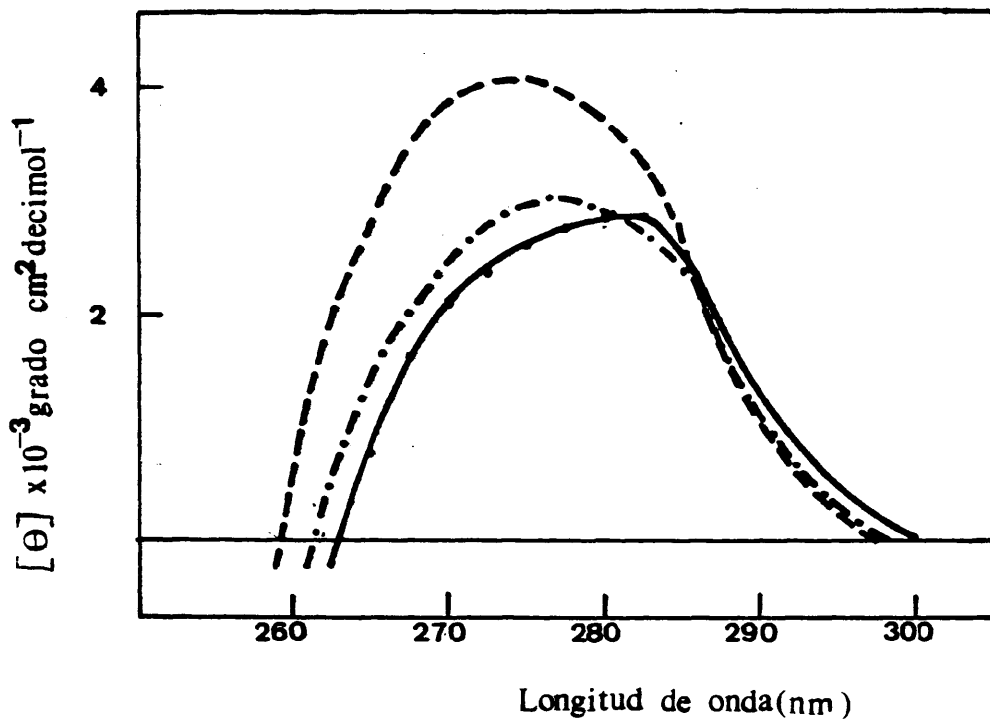


Figura 37.- Espectro de dicroísmo circular de pico II (---), pico III (-·-·-) y pico IV (—).

que la elipticidad se hace negativa. Mientras la elipticidad molar de los mononucleosomas cambia de signo a los 265 nm, la del pico III lo hace a los 261 nm y la del pico II a los 259 nm.

Como se puede ver en la Figura 35, en el pico III hay una mezcla de mononucleosomas y dinucleosomas, mientras que en el pico II se encuentran principalmente fragmentos de elevado peso molecular. A la vista de los resultados parece que el paso de mononucleosoma a dinucleosoma provoca ya el desplazamiento del máximo a menor longitud de onda, mientras que es necesaria una mayor longitud para que se produzca el incremento en el valor de elipticidad molar.

Si tenemos en cuenta la posible relación existente entre la estructura terciaria del DNA y el dicroísmo circular, el aumento de elipticidad indicaría una menor estructura en el DNA. Esto podría deberse a la presencia de DNA linker. De esta manera, el DNA contribuiría exclusivamente con el espectro conservativo del DNA (estructura B) y disminuiría el tanto por ciento del DNA que contribuye con la señal de dicroísmo de la estructura terciaria (banda de elipticidad negativa a los 275 nm).

De esta forma, el aumento en longitud de la cadena nucleosomal implica desestabilización del DNA frente a la temperatura y un aumento de la elipticidad. Ambos efectos pueden tener su explicación en la presencia del DNA linker. Sin embargo, también se produce una estabilización de parte del DNA que solo puede explicarse en función de una interacción entre los cores nucleosomales.

Por otra parte, se puede observar como el incremento en la longitud de la cadena nucleosomal produce un desplazamiento del máximo de elipticidad hacia menores longitudes de onda, lo que es típico de muestras con RNA. Sin embargo, los valores de hipercromicidad indican todo lo contrario. Es posible que estos resultados se deban a alguna contaminación del pico I. Este pico no contiene DNA y sin embargo, presenta una elevada A_{260} . El hecho de que eluya en el volumen de exclusión indica, además, que es de elevado peso molecular. Estos resultados parecen sugerir que en este pico se encuentra RNA de alto peso molecular, posiblemente asociado con proteínas.

Según Cantor y Schimmel (1975) los RNA de gran tamaño contienen seguramente estructura terciaria. Mediante estudios de crosslinking se ha observado que los rRNA 16S y 23S contienen regiones en doble hélice. A la vista de ello, se puede sugerir que el material presente en el pico I es un RNA de este tipo (o su precursor en el núcleo). El hecho de poseer regiones en doble hélice explicaría el elevado valor de hipercromicidad al mismo tiempo que el máximo de elipticidad se encuentra desplazado hacia menores longitudes de onda.

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que en la cromatina de levadura el DNA se encuentra con un menor grado de estructura terciaria. Así, los espectros de dicroísmo circular de las fracciones S2 muestran unos valores de elipticidad superiores a los que muestran fracciones semejantes de eucariontes superiores (Cowman y Fasman, 1978; Watanabe e Iso, 1981). Además, el hecho de que los cores nucleosomales de levadura muestren también valores de elipticidad superiores a los de las mismas partículas de eucariontes superiores indica que la diferencia existente entre estos organismos y la levadura radica en la disposición del DNA alrededor del octámero de histonas. Así, el DNA se debe disponer de una forma menos estructurada de forma que la contribución de la superestructura al espectro de dicroísmo circular (banda negativa sobre los 275 nm) (Cowman y Fasman, 1978) sea menor y, por tanto, mostrar unos mayores valores de elipticidad.

Un factor a tener en cuenta es que estudios realizados para examinar el nivel de acetilación de las histonas de levadura (Davie y col., 1981; Nelson, 1982) han mostrado que la cromatina de levadura se encuentra entre las cromatinas más acetiladas. Por otra parte, Bode y col. (1983) han comprobado que los nucleosomas que poseen histonas acetiladas poseen una estructura más abierta que la del nucleosoma normal. También se ha sugerido que una posible causa de la diferente estructura de los nucleosomas activos es la presencia de histonas acetiladas (Mathews y Bradbury, 1982). También se ha comprobado que en cromatina enriquecida en histonas hiperacetiladas las regiones que son

107

digeridas más rápidamente por la DNasa I son precisamente aquellas que contienen las histonas acetiladas (Vidali y col., 1978). Por último, estudios de desnaturalización térmica han indicado que la estructura de los nucleosomas enriquecidos en histonas hiperacetiladas tienen una estructura menos estable que la de los nucleosomas normales (Bode y col., 1980; Yau y col., 1982; Simpson, 1978b).

Teniendo todos los anteriores factores en cuenta es posible que la mayor elipticidad de los cores de levadura en comparación con los de organismos superiores sea debida a la acetilación de histonas. La hiperacetilación de las histonas se ha asociado también con la elevada actividad transcripcional que existe en levadura. Si la acetilación de las histonas provoca una pérdida de estructura terciaria por parte del DNA, es posible que, al mismo tiempo, lo haga más accesible a la RNA polimerasa.

Se ha comprobado también en esta investigación que la fracción solubilizada a partir de células en fase estacionaria muestra unos menores valores de elipticidad que la que proviene de células en fase exponencial. Si aceptamos lo anteriormente expuesto, este resultado indica que el DNA tiene un mayor grado de estructura terciaria en los núcleos que provienen de células en fase estacionaria. Esto podría indicar que la actividad transcripcional de las células en fase estacionaria es menor que la de células en fase exponencial y podría deberse a un menor nivel de acetilación en las histonas de la primera.

Otra posible causa de la menor estructuración del DNA en los cores de levadura, no excluyente con la anterior,

es la presencia de una histona H3 que difiere bastante de las de organismos superiores. Como ya se ha explicado en la Introducción, la histona H3 es la que interacciona con los extremos del DNA en el core, por lo que unas diferencias en esta histona pueden provocar cambios en la estructura del DNA en estas zonas.

Por otra parte, se ha comprobado que el aumento de la cadena nucleosomal implica un aumento en la elipticidad y una estabilización frente a la desnaturalización térmica. El aumento de la elipticidad tiene una explicación lógica en la contribución del DNA linker, así como el incremento en la transición que ocurre a menor temperatura. En cuanto a la estabilización frente a la temperatura puede deberse al efecto estabilizante de unas partículas sobre otras. Sin embargo, la posibilidad de que esté presente (en pico II) RNA con una cierta estructura terciaria puede hacer que se malinterpreten los resultados.

CONCLUSIONES

1.- La cromatina de levadura prensada tiene una estructura alterada debido a haber sufrido algún tipo de degradación, por lo que no es un material idóneo para el estudio de la estructura de la cromatina al no poder generalizarse sus resultados.

2.- El método de solubilización de fracciones de cromatina por diálisis no es válido pues requiere una cierta degradación previa de la cromatina.

3.- El DNA en la fracción DNH-S_a solubilizada por diálisis presenta un menor nivel de estructura terciaria que el de la fracción DNH-S_b solubilizada por digestión con nucleasa micrococcal..

4.- La digestión de núcleos hasta un 5 % de DNA soluble en ácido libera demasiado RNA que enmascara las características del DNA. Por el contrario, la digestión suave conduce a fracciones solubles de cromatina que no contienen RNA, al menos en cantidades detectables.

5.- Los núcleos procedentes de células en diferente fase de crecimiento muestran una diferente cinética de digestión con nucleasa micrococcal. Los núcleos de células en fase exponencial muestran una cinética más rápida, lo que indica una estructura más accesible.

6.- El DNA en la cromatina de levadura tiene un menor grado de estructura terciaria que el de cromatina de organismos superiores, como se deduce de los espectros de dicroísmo circular.

7.- El DNA tiene un mayor grado de estructura terciaria en la cromatina de células en fase estacionaria. Al mismo tiempo, también presenta una mayor estabilización frente a la desnaturalización térmica.

8.- El DNA de las partículas core aisladas presenta también una menor estructuración que los cores de organismos superiores pudiendo esto estar relacionado con la elevada actividad transcripcional de este organismo.

9.- Al aumentar la longitud de la cadena nucleosomal se produce una estabilización frente a la desnaturalización térmica. Las partículas core estabilizan de alguna forma a las partículas vecinas. Sin embargo, los resultados pueden venir afectados por la presencia de RNA que muestre estructura secundaria y terciaria.

BIBLIOGRAFIA

- Abercrombie, B.D., Kneale, G.G., Crane-Robinson, C., Bradbury, E.M., Goodwin, G.H., Walker, J.M. y Johns, E.W. (1978) Eur. J. Biochem. 84, 173.
- Albright, S.C., Nelson, P.P. y Garrad, W.T. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1065.
- Alevy, M., Tsai, M.J. y O'Malley, B. (1984) Biochemistry, 23, 2309.
- Allfrey, V.G. (1977) en "Chromatin and Chromatin Structure" (Ed. H.J. Li; R.A. Eckhardt) p. 167. Academic Press. New York.
- Altenburger, W., Horz, W., Zachau, H.G. (1976) Nature 264, 517.
- Ausi6, J., Borochoy, N., Seger, D. y Eisenberg, H. (1984) J. Mol. Biol. 177, 373.
- Avil6s, F.J., Chapman, G.E., Kneale, G.G., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 363.
- (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4101.
- Axel, R. (1975) Biochemistry 14, 2921.
- Azor6n, F., Perez-Grau, L. y Subirana, J.A. (1982) Chromosoma 85, 251.
- Baker, C.C. e Isenberg, I. (1976) Biochemistry 15, 629.
- Baker, C., Isenberg, I., Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1976) Biochemistry 15, 1645.

- Baldwin, J.P., Boseley, P.G., Bradbury, E.M. e Ibel, K. (1975) Nature 253, 245.
- Balhorn, R., Gledhill, B.L. y Wirobeck, A.J. (1977) Biochemistry 16, 4074.
- Ballal, N.R., Goldknopf, I.L., Godberg, D.A. y Busch, H. (1974) Life Sci. 14, 1835.
- Ballal, N.R., Kang, Y.G., Olson, M.O.J. y Busch, H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5921.
- Barbero, J.L., Franco, L., Montero, F. y Morán, F. (1980) Biochemistry 19, 4080.
- Bartley, J.A. y Chalkley, R. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3647.
- Bassuk, J.A. y Mayfield, J.E. (1982) Biochemistry 21, 1024.
- Bekhor, I. y Samal, B. (1977) Arc. Biochem. Biophys. 179, 537.
- Belyavsky, A.V., Bavikyn, S.G., Gogvadze, E.G. y Mirzabekov, A.D. (1980) J. Mol. Biol. 139, 519.
- Benezra, R., Blanckstein, L.A., Stollar, B.D. y Levy, S.B. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6837.
- Bentley, G.A., Finch, J.T. y Lewit-Bentley, A. (1981) J. Mol. Biol. 145, 771.
- Bentley, G.A., Lewit-Bentley, A., Finch, J.T., Podjarny, A.D. y Roth, M. (1984) J. Mol. Biol. 176, 55.
- Bhargava, M.M. y Halvorson, H.O. (1971) J. Cell Biol. 49, 423.
- Bidney, D.L. y Reeck, G.R. (1978) Biochem. Biophys. Res. Com. 85, 1211.
- Bloom, K.S. y Anderson, J.N. (1978) Cell 15, 141.

- Bode, J., Gomez-Lira, M.M. y Schroter, H. (1983) Eur. J. Biochem. 130, 433.
- Bode, J., Henco, K. y Wingender, E. (1980) Eur. J. Biochem. 110, 143.
- Bohm, M., Hayashi, H., Cary, P.D., Moss, T. y Bradbury, E.M. (1977) Eur. J. Biochem. 77, 487.
- Bonne-Andrea, C., Harper, G., Subczak, J. y DeRecondo, A.M. (1984) EMBO J. 3, 1193.
- Bonner, J., Chalkley, G.R., Dahmus, M., Fambrough, D., Fujimura, F., Huang, R.C., Huberman, J., Jensen, R., Marushige, K., Ohlenbush, H., Olivera, B. y Widholm, J. (1968) en "Methods in Enzymology" (Ed. S.P. Colowick; N.O. Kaplan) Vol. XII B; p. 3. Academic Press. New York.
- Bonner, W.M. y Pollard, H.B. (1975) Biochem. Biophys. Res. Com. 64, 282.
- Boseley, P.G., Bradbury, E.M., Butler-Browne, G.S., Carpenter, B.G. y Stephen, R.M. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 21.
- Bostock, C.J., Christie, S. y Huch, F.T. (1976) Nature 262, 516.
- Boublik, M., Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C. y Rattle, H.W.E. (1971) Nature New Biol. 229, 149.
- Bradbury, E.M., Carpenter, B.G. y Rattle, H.W.E. (1973) Nature 241, 123.
- Bradbury, E.M., Moss, T., Hayashi, H., Hjelm, R.P., Suau, P., Stephens, R.M., Baldwin, J.P. y Crane-Robinson, C. (1977) Cold Spring Harb. Symp. Quart. Biol. 42, 277.
- Brandt, W.F., Patterson, K. y Von Holt, C. (1980) Eur. J. Biochem. 110, 67.

- Brandt, W.F. y Von Holrt, C. (1976) FEBS Lett. 65, 386.
- Brown, I., Heikkila, J., Silver, J. y Stans, N. (1977) Biochim. Biophys. Acta 477, 288.
- Bryan, P.N., Wright, E.B. y Olins, D.E. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 1449.
- Burlingame, R.W., Love, W.E. y Moudrianakis, E.N. (1984) Science 223, 413.
- Burlingame, R.W., Love, W.E., Wang, B.C., Hamlin, R., Xuong, N.H. y Moudrianakis, E.N. (1985) Science 228, 546.
- Burzio, L.O., Riquelme, P.T. y Koide, S.S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3029.86.
- Bustin, M. y Cole, R.D. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5286.
- Bustin, M., Hopkins, R.B. e Isenberg, I. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1694.
- Butler, A.P., Mardian, J.K.W. y Olins, D.E. (1985) J. Biol. Chem. 260, 10613.
- Butler, P.J.G. y Thomas, J.O. (1980) J. Mol. Biol. 140, 505.
- Byvoet, P y Baxter, C.S. (1975) en "Chromosomal Proteins and their Role in the Regulation of Gene Expression" (Ed. G.S. Stein; L.J. Kleinsmith) p. 127. Academic Press. New York.
- Caifa, P., Scarpati-Cioffari, M.R., Altieri, F., Allegra, P., Lonigro, R. y Turamo, C. (1981) Eur. J. Biochem. 121, 15.
- Camerini-Otero, R.D. y Felsenfeld, G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5519.
- Camerini-Otero, R.D., Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1976) Cell 8, 333.

- Carballo, M., Puigdomènech, P. y Palau, J. (1983) EMBO J. 2, 1759.
- Carpenter, B.G., Baldwin, J.P., Bradbury, E.M. e Ibel, K. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 1739.
- Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Bradbury, E.M. y Dixon, G.H. (1981) Eur. J. Biochem. 119, 545.
- Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Bradbury, E.M. y Dixon, G.H. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 137.
- Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Bradbury, E.M., Javaherian, K., Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 583.
- Cary, P.D., Moss, T. y Bradbury, E.M. (1978) Eur. J. Biochem. 89, 475.
- Cary, P.D., Turner, C.H., Mayes, E. y Crane-Robinson, C. (1983) Eur. J. Biochem. 131, 367.
- Castro, J.L. (1980) Tesina de Licenciatura.
- Castro, J.L., Lopez-Braña, I., Franco, L. y Perera, J. (1982) en "Estudios sobre Biología" (Ed. U.C.M.) p.203.
- Cockerill, P.N., Goodwin, G.H., Cary, P.D., Turner, C. y Johns, E.W. (1983) Biochim. Biophys. Acta 745, 70.
- Cohen, L.H., Newrock, K.M. y Zweidler, A. (1975) Science 190, 494.
- Cole, R.D. (1977) en "The Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus" (Ed. P.O.P. Ts'0) Vol. I. p. 93. North Holland, Amsterdam.
- Cotter, R. y Lilley, D.M.J. (1977) FEBS Lett. 82, 63.
- Cowman, M.K. y Fasman, G.D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4759.
- Cowman, M.K. y Fasman, G.D. (1980) Biochemistry 19, 532.

- Crane-Robinson, C., Danby, S.E., Bradbury, E.M., Garel, A., Kovacs, A.M., Champagne, M. y Daune, M. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 379.
- Crick, F.H.C. y Klug, A. (1975) Nature 255, 530.
- Czupryn, M. y Toczko, K. (1985) Eur. J. Biochem. 147, 575.
- Chalkley, R. (1975) Biochem. Biophys. Res. Com. 64, 587.
- Chan, P.K. y Liew, C.C. (1977) Can. J. Biochem. 55, 847.
- Chapman, G.E., Hartman, P.G., Cary, P.D., Bradbury, E.M. y Lee, D.R. (1978a) Eur. J. Biochem. 86, 35.
- Chapman, G.E., Avilés, F.J., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1978b) Eur. J. Biochem. 90, 287.
- Chapman, G.E., Hartman, P.G. y Bradbury, E.M. (1976) Eur. J. Biochem. 61, 69.
- Christiansen, G. y Griffith, J. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 1837.
- Davie, J.R., Saunders, C.A., Walsh, J.M. y Weber, S.C. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 3205.
- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. y Bonner, J. (1969a) J. Biol. Chem. 244, 319.
- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. y Bonner, J. (1969b) J. Biol. Chem. 244, 5669.
- DeLange, R.J., Hooper, J. y Smith, E.L. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 882.
- DeLange, R.J. y Smith, E.L. (1971) Ann. Rev. Biochem. 40, 279.
- DeLange, R.J., Williams, L.C. y Martinson, H.G. (1979) Biochemistry 18, 1942.
- De Murcia, G., Das, G.C., Erard, M. y Daune, M. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 523.

- Dieterich, A.E., Axel, R. y Cantor, Ch.R. (1979) J. Mol. Biol. 129, 587.
- Dimitrov, S.I., Makarov, V.L., Marekov, L.N. y Beltchev, B.G. (1985) Int. J. Biol. Macromol. 7, 122.
- Dingman, C.W. y Sporn, M.B. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3483.
- Dixon, D.K. y Burkholder, G.D. (1985) Eur. J. Cell Biol. 36, 315.
- Doenecke, D. (1977) Eur. J. Biochem. 76, 355.
- Doenecke, D. y Galwitz, D. (1982) Mol. Cell Biochem. 44, 113.
- Duffus, J.H. (1969) Biochim. Biophys. Acta 195, 230.
- Duffus, J.H. (1975) en "Methods in Cell Biology" (Ed. D.M. Prescott) Vol. XII; Cap. 6; p. 77.
- Easton, D. y Chalkley, R. (1972) Exp. Cell. Res. 72, 502.
- Edwards, L.J. y Hnilica, L.S. (1968) Experientia 24, 228.
- Edwards, P.A. y Shooter, K.U. (1970) Biochem. J. 120, 61.
- Elgin, S.C.R. y Bonner, J. (1970) Biochemistry 9, 4440.
- Elgin, S.C.R. y Weintraub, H. (1975) Ann. Rev. Biochem. 44, 725.
- Estruch, F., Perez-Ortín, J.E., José, M., Puigdomènech, P. y Franco, L. (1986) FEBS Lett. 197, 179.
- Estruch, F., Perez-Ortín, J.E. y Franco, L. (1986b) Cel. Mol. Biol. 32, 195.
- Feigon, J. y Kearns, D.R. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 2327.
- Felsenfeld, G. (1978) Nature 271, 115.
- Ferrari, N. y Vidali, G. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 305.
- Finch, J.T., Brown, R.S., Rhodes, D., Richmond, T.,

- 190
- Rushton, B., Lutter, L.C. y Klug, A. (1981) J. Mol. Biol. 145, 757.
- Finch, J.T. y Klug, A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1897.
 - Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M. y Klug, A. (1977) Nature 269, 29.
 - Fiszler-Szafarz, B., Szafarz, D. y Guevara de Murillo, A. (1981) Anal. Biochem. 110, 165.
 - Flint, S.J. y Weintraub, H.M. (1977) Cell 12, 783.
 - Franco, L., Johns, E.W. y Navlet, J. (1974) Eur. J. Biochem. 45, 83.
 - Franco, L. y López-Braña, I. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 3745.
 - Franco, L., Montero, F. y Rodriguez-Molina, J.J. (1977) FEBS Lett. 78, 317.
 - Fuller, W., Wilkins, M.H.F., Wilson, H.R. y Hamilton, L.D. (1965) J. Mol. Biol. 12, 60.
 - Fulmer, A.W. y Fasman, G.D. (1979) Biopolymers 18, 2875.
 - Funderud, S. y Haugli, F. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 405.
 - Garel, A. y Axel, R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3966.
 - Garel, A., Zolan, M. y Axel, R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4867.
 - Garret, R.A. (1971) Biochemistry 10, 2277.
 - Gaubatz, J., Hardison, R., Murphy, J., Eichner, y M.E., Chalkley (1977) Cold Spring Harb. Symp. Quart. Biol. 42, 265.
 - Gaubatz, J., Ellis, M. y Chalkley, R. (1979) Federation

Proc. 38, 1973.

- Germond, J.E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellard, M. y Chambon, P. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1843.

- Giradet, J.L. y Lawrence, J.J. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 2419.

- Glover, C.V.C. y Gorovsky, M.A. (1978) Biochemistry 17, 5705.

- Goldknopf, I.L. y Busch, H. (1977a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 864.

- Goldknopf, I.L. y Busch, H. (1977a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5492.

- Goldknopf, I.L. y Busch, H. (1978) The Cell Nucleus 5, 149.

- Goodwin, D.C. y Brahms, J. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 835.

- Goodwin, D.C., Vergne, J., Brahms, J., Defer, N. y Kruh, J. (1979) Biochemistry 18, 2057.

- Goodwin, G.H., Brown, E., Walker, J.M. y Johns, E.W. (1980) Biochim. Biophys. Acta 623, 329.

- Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1977) Methods Cell Biol. 16, 257.

- Goodwin, G.H., Nicolas, R.H., y Johns, E.W. (1975a) Biochim. Biophys. Acta 405, 280.

- Goodwin, G.H., Rabbani, A., Nicolas, R.H. y Johns, (1977b) FEBS Lett. 80, 413.

- Goodwin, G.H., Sanders, C. y Johns, E.W. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 14.

- Goodwin, G.H., Shooter, K.V. y Johns, E.W. (1975b) Eur. J. Biochem. 54, 427.

- Goodwin, G.H., Walker, J.M. y Johns, E.W. (1978a) *Biochim. Biophys. Acta.* 519, 233.
- Goodwin, G.H., Walker, J.M. y Johns, E.W. (1978) en "The Cell Nucleus" (Ed. H. Bush) Vol. 6; p.131. Academic Press. New York.
- Goodwin, G.H., Woodhead, L. y Johns, E.W. (1977a) *FEBS Lett.* 73, 85.
- Gordon, C.N. (1977) *J. Cell Sci.* 24, 81.
- Gordon, V.C., Knobler, C.M., Olins, D.E. y Schumaker, V.N. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 660.
- Gordon, V.C., Schumaker, V.N., Olins, D.E., Knobler, C.H. y Horwitz, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* 6, 3845.
- Gottesfeld, J.M. y Butler, P.J.G. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 3155.
- Grygoriev, S.A. y Krasheninikov, I.A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 129, 119.
- Groudine, M., Das, S., Nieman, P. y Weintraub, H. (1978) *Cell* 14, 865.
- Groudine, M. y Weintraub, H. (1981) *Cell* 24, 393.
- Gurley, L.R., D'Anna, J.A., Barham, S.S., Deaven, L.L. y Tobey, R.A. (1978b) *Eur. J. Biochem.* 84, 1.
- Gurley, L.R., Walters, R.A., Barham, S.S. y Deaven, L.L. (1978a) *Exp. Cell Res.* 111, 373.
- Hamada, H. y Bustin, M. (1985) *Biochemistry* 24, 1428.
- Hamana, K. e Iwai, K. (1979) *J. Biochem.* 86, 789.
- Hancock, R. (1969) *J. Mol. Biol.* 40, 457.
- Harrington, R.E. (1982) *Biochemistry* 21, 1177.
- Hartman, P.G., Chapman, G.E., Moss, T. y Bradbury, E.M. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 45.

- Hayashi, K., Hofstaetter, T. y Yakuwa, N. (1978) *Biochemistry* 17, 1880.
- Hayashi, O. y Ueda, K. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 95.
- Haynes, M., Garret, R.A. y Gratzner, W.B. (1970) *Biochemistry* 9, 4410.
- Hereford, L.M. y Rosbash, M. (1977) *Cell* 10, 453.
- Hewish, D.R. y Burgoyne, L.A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 52, 504.
- Hjelm, R.P.Jr. y Huang, R.C.C. (1975a) *Biochemistry* 14, 2766.
- Hjelm, R.P.Jr. y Huang, R.C.C. (1975b) *Biochemistry* 14, 1682.
- Honda, B.M., Baillie, D.L. y Candido, E.P.M. (1974) *FEBS Lett.* 48, 156.
- Horz, W., Miller, F., Klobeck, G. y Zachau, H.G. (1980) *J. Mol. Biol.* 144, 329.
- Howze, G.B., Hsic, A.W. y Olins, A.L. (1976) *Exp. Cell Res.* 100, 424.
- Hozier, J., Renz, M. y Nehls, P. (1977) *Chromosoma* 62, 301.
- Humphries, S.E., Young, D. y Carroll, D. (1979) *Biochemistry* 18, 3223.
- Hutcheon, T., Dixon, G.H. y Levy-Wilson, B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 681.
- Ichimura, S., Mita, K. y Zama, M. (1982) *Biochemistry* 21, 5329.
- Ide, G.J. y Saunders, C.A. (1981) *Current Gen.* 4, 85.
- Igo-Kemenes, T., Horz, W. y Zachau, H.G. (1982) *Ann. Rev.*

Biochem. 51, 89.

- Isackson, P.J., Clow, L.G. y Reeck, G.R. (1981) FEBS Lett. 125, 30.
- Isackson, P.J., Fishback, P.J., Bidney, D.L. y Reeck, G.R. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5569.
- Isenberg, I. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 159.
- Itkes, A.V., Glotov, B.O., Nikolaev, L., Preem, S. y Severin, E. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 507.
- Iwai, K., Hamana, K. y Yabuki, H. (1970) J. Biochem (Tokio) 68, 597.
- James, G.T., Yeoman, L.C., Matsui, S., Goldberg, A.G. y Busch, H. (1977) Biochemistry 16, 2384.
- Jansin, R.L., Stein, J.L. y Stein, G.S. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 173.
- Javaherian, K. (1977) en "Organization and Expression of Eukaryotic Genome"(Ed. E.M. Bradbury; K. Javaherian) p. 51. Academic Press. London.
- Javaherian, K. y Amini, S. (1978) Biochem. Biophys. Res. Com. 85, 1385.
- Javaherian, K., Liu, L.F. y Wang, J.C. (1978) Science 199, 1345.
- Javaherian, K., Sadeghi, M. y Liu, L.F. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 3569.
- Johman, C.A. y Gorovsky, M.A. (1976) Biochemistry 15, 1249.
- Johns, E.W. (1964) Biochem. J. 92, 55.
- Johns, E.W. (1971) en "Histones and Nucleohistones" (Ed. D.M.P. Phillips) Cap. 1. Plenum Press. New York.
- Johns, E.W. (1982) en "HMG Chromosomal Proteins" (Ed. E.W.

Johns) Academic Press. New York.

- Jhonson, J.D., Douras, A.S. y Bonner, J. (1974) Int. Rev. Cytology Suppl. 4, 273.
- Jordan, C.F., Lerman, L.S. y Venoble, J.H.Jr. (1972) Nat. New Biol. 236, 67.
- Kachatrian, H.T., Matnishian, A.A. y Magakian, A. (1985) Biochim. Biophys. Acta 824, 243.
- Kallenbach, N.R., Appleby, D.W. y Bradley, C.H. (1978) Nature 272, 134.
- Karpov, V.L., Bavykin, S.G., Preobrazhenskaya, O.V., Belyavsky, A.V. y Mirzabekov, A.D. (1982) Nucleic Acids Res. 10, 4321.
- Karpov, V.L., Preobrazhenskaya, O.V. y Mirzabekov, A.D. (1984) Cell 36, 423.
- Kimura, T., Mills, F.C., Allan, J. y Gould, H. (1983) Nature, 306, 709.
- Kinkade, J.M. y Cole, R.D. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5790.
- Kissane J.M. y Robins, E. (1958) J. Biol. Chem. 233, 184.
- Kistler, W.S. y Geroch, M.E. (1975) Biochem. Biophys. Res. Com. 63, 378.
- Kistler, W.S., Geroch, M.E., Williams-Ashman, H.G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4532.
- Klevan, L., Armitage, I.M. y Crothers, D.M. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 1607.
- Klevan, L. y Crothers, D.M. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 4077.
- Klug, A., Finch, J.T. y Richmond, T.J. (1985) Science 229, 1109.

- Kohno, K., Yamamoto, M. y Endo, H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Com. 116, 312.
- Komaiko, W. y Felsenfeld, G. (1985) Biochemistry 24, 1186.
- Kornberg, R.D. (1974) Science 184, 868.
- Kornberg, R.D. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 931.
- Kostraba, N.C. y Wang, T.Y. (1973) Exp. Cell Res. 80, 291.
- Labhart, P. y Koller, T. (1982) Cell 28, 279.
- Lacy, E. y Axel, R. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3978.
- Langmore, J.P. y Paulson, J.R. (1983) J. Cell. Biol. 96, 1120.
- Lestourgeon, W.M. y Rusch, H.P. (1973) Arc. Biochem. Biophys. 155, 144.
- Lewitt, M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 640.
- Levy-Wilson, B. , Conner, W. y Dixon, G.H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 609.
- Levy-Wilson, B. y Dixon, G.H. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 4155.
- Levy-Wilson, B. y Dixon, G.H. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1682.
- Levy-Wilson, B., Kuehl, L. y Dixon, G.H. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 2859.
- Levy-Wilson, B., Wong, N.C.W. y Dixon, G.H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2810.
- Lewis, P.N. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 315.
- Li, H.J. y Bonner, J. (1971) Biochemistry 10, 1461.
- Libertini, L.J. y Small, E.W. (1982) Biochemistry 21, 3327.
- Lilley, D.M.J. y Tatchell, K. (1977) Nucleic Acids Res. 4,

2039.

- Lipps, H.J. y Morris, N.R. (1977) Biochem. Biophys. Res. Com. 74, 230.
- Liu, L.F. y Wang, J.C. (1978) Cell 15, 979.
- Lohr, D., Corden, J.C., Tatchell, K., Kovacic, R.T. y Van Holde, K.E. (1977b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 79.
- Lohr, D. y Hereford, L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4285.
- Lohr, D. e Ide, G. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 1909.
- Lohr, D., Kovacic, R.T. y Van Holde, K.E. (1977a) Biochemistry 16, 463.
- Lohr, D. y Van Holde, K.E. (1975) Science 188, 165.
- Lopez-Braña, I. (1979) Tesis Doctoral. Univ. Complutense.
- Losa, R., Thoma, F. y Koller, T. (1984) J. Mol. Biol. 175, 529.
- Lutter, L.C. (1977) J. Mol. Biol. 117, 53.
- Lutter, L.C. (1978) J. Mol. Biol. 124, 391.
- Lutter, L.C. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 41.
- Mandel, R., Kolomijstseva, R. y Brahms, J.G. (1979) Eur. J. Biochem. 96, 257.
- Maniatis, T., Venable, J.H.Jr. y Lerman, L.S. (1974) J. Mol. Biol. 84, 37.
- Manning, G.S. (1978) Quart. Rev. Biophys. 11, 179.
- Mardian, J.K.W. e Isenberg, I. (1978a) Anal. Biochem. 91, 1.
- Mardian, J.K.W. e Isenberg, I. (1978b) Biochemistry 17, 3825.
- Mardian, J.K.W., Paton, A.E., Bunick, G.J. y Olins, D.E. (1980) Science 209, 1534.

- Marekov, L.N. y Beltchev, B. (1981) Anal. Biochem. 115, 93.
- Marmur, J. (1961) J. Mol. Biol. 3, 208.
- Marquez, G., Morán, F., Franco, L. y Montero, F. (1982) Eur. J. Biochem. 123, 165.
- Martinson, H.G., True, R.J. y Burch, J.B.E. (1979) Biochemistry 18, 1082.
- Martinson, H.G., True, R., Burch, J.B. y Kunkel, E. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1030.
- Martinson, H.G., True, R., Lau, C.K. y Mehrabian, M. (1979) Biochemistry 18, 1075.
- Marushige, K. y Bonner, J. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2941.
- Marushige, K. y Dixon, G.H. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5799.
- Marushige, Y. y Marushige, K. (1975) J. Biol. Chem. 250, 39.
- Mathew, C.G.P., Goodwin, G.H., Gooderham, K., Walker, J.M. y Johns, E.W. (1979) Biochem. Biophys. Res. Com. 87, 1243.
- Mathews, H.R. y Bradbury, E.M. (1982) en "Genetic Expression i the Cell Cycle" (Ed. Padilla y McCarthy) Academic Press. New York.
- Mathis, D.J. y Gorovsky, M.A. (1976) Biochemistry 15, 750.
- Mathis, D.J., Oudet, P., Wasylyk, B. y Chambon, P. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 3523.
- May, R. (1971) Z. Allg. Mikrobiol. 11, 131.
- McGhee, J.D. y Felsenfeld, G. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 1115.
- McGhee, J.D., Rau, D.C., Charney, E. y Felsenfeld, G.

- (1980) Cell 22, 87.
- McGillavray, A.J., Carroll, D. y Paul, J. (1971) FEBS Lett. 13, 204.
 - McLeod, A.R., Wong, N.C.W. y Dixon, G.H. (1977) Eur. J. Biochem. 78, 281.
 - McPhie, P. (1971) Methods in Enzymology 22, 23.
 - Mirzabekov, A.D. (1980) Quart. Rev. Biophys. 13, 225.
 - Mirzabekov, A.D. y Rich, A. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1118.
 - Mohberg, J. y Rusch, H. (1971) Exp. Cell Res. 66, 305.
 - Morris, N.R. (1976a) Cell 8, 357.
 - Morris, N.R. (1976b) Cell 9, 627.
 - Moss, T., Cary, P.D., Abercrombie, P., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1976) Eur. J. Biochem. 71, 337.
 - Moss, T., Stephens, R.M., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 2477.
 - Moudrianakis, E.N., Love, W.E., Wong, B.C., Xuong, N.G. y Burlingame, R.W. (1985a) Science 229, 1110.
 - Moudrianakis, E.N., Love, W.E. y Burlingame, R.W. (1985b) Science 229, 1113.
 - Muyldermans, S., Lasters, I., Hamers, R. y Wyns, L. (1985) Eur. J. Biochem. 150, 441.
 - Neelin, J.M., Callahan, P.X., Lamb, D.C. y Murray, K. (1964) Can. J. Biochem. Physiol. 42, 1743.
 - Nelson, D.A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 1565.
 - Nelson, D.A., Beltz, W.R. y Rill, R.L. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1343.
 - Nelson, D., Perry, M.E. y Chalkley, R. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 561.

- 200
- Newrock, K.M., Alfageme, C.R., Nardi, R.V., Cohen, L.H. (1978) Cold Spring Harb. Symp. Quart. Biol. 42, 421.
 - Nicola, N.A., Fulmer, A.W., Schwartz, A.M. y Fasman, G.D. (1978) Biochemistry 17, 1779.
 - Nicolini, C. (1978) en "Chromatin Structure and Function" (Ed. C. Nicolini) p. 613. Plenum Press. New York.
 - Nicolini, C., Baserga, R. y Kendall, F. (1976) Science 192, 796.
 - Noll, M. (1974a) Nature 251, 249.
 - Noll, M. (1974b) Nucleic Acids Res. 1, 1573.
 - Noll, M. (1976) Cell 8, 349.
 - Noll, M. (1977) J. Mol. Biol. 116, 49.
 - Noll, M. y Kornberg, R.D. (1977) J. Mol. Biol. 109, 393.
 - Ogawa, Y., Quagliarotti, G., Jordan, J., Taylor, C.W., Starbuck, W.C. y Busch, H. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4387.
 - Okayama, H., Ueda, K. y Hayashi, O. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1111.
 - Olins, D.E., Bryan, P.N., Harrington, R.E., Hill, W.E. y Olins, A.D. (1977) Nucleic Acids Res. 6, 1911.
 - Olins, A.D. y Olins, D.E. (1973) Science 183, 330.
 - Olins, D.E. y Wright, E.B. (1973) J. Cell Biol. 59, 304.
 - Olson, M.O.J., Jordan, J. y Busch, H. (1972) Biochem. Biophys. Res. Com. 46, 50.
 - Oosterhof, D.K., Hozier, J.C. y Rill, R.L. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 633.
 - Ord, M.G. y Stocken, L.A. (1977) Biochem. J. 161, 583.
 - Osheim, Y.N., Martin, K. y Miller, O.L. (1978) J. Cell Biol. 79, 126.
 - Oudet, P., Gross-Bellard, M. y Chambon, P. (1975) Cell 4,

281.

- Oudet, P., Spadafora, C. y Chambon, P. (1977) Cold Spring Harb. Symp. Quart. Biol. 42, 301.
- Palter, K. y Alberts, B.M. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1160.
- Panyim, S. y Chalkley, R. (1969) Arc. Biochem. Biophys. 130, 337.
- Pardon, J.F., Wilkins, M.H.F. y Richards, B.M. (1967) Nature 215, 508.
- Pardon, J.F., Worcester, D.L., Wooley, J.C., Cotter, R.I., Lilley, D.M.J. y Richards, B.M. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 3199.
- Patthy, L., Smith, E.L. y Johnson, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6834.
- Perez-Grau, L., Bordas, J. y Koch, M.H.J. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 12987.
- Poccia, D.L. e Hinegardner, R.T. (1975) Dev. Biol. 45, 81.
- Preobrazhenskaya, O.V., Karpov, V.L., Nagorskaya, T.V. y Mirzabekov, A.D. (1984) Molek. Biol. (USSR) 18, 18.
- Prunell, A., Kornberg, R.D., Lutter, L.C., Klug, A., Lewitt, M. y Crick, F.H.C. (1979) Science 204, 855.
- Puigdomènech, P., Cabré, O., Palau, J., Bradbury, E.M. y Crane-Robinson, C. (1975) Eur. J. Biochem. 59, 237.
- Puigdomènech, P. y Ruiz-Carrillo, A. (1982) Biochim. Biophys. Acta 696, 267.
- Rabbani, A., Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1978) Biochem. Biophys. Res. Com. 81, 351.
- Rabbani, A., Goodwin, G.H., Walker, J.M., Brown, E. y Johns, E.W. (1980) FEBS Lett. 109, 294.

- Rall, S.C. y Cole, R.D. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7175.
- Rall, S.C., Okinaka, R.T. y Strniste, G.F. (1977) Biochemistry 16, 4940.
- Rattner, J.B. y Hamkalo, B.A. (1978) Chromosoma 69, 363.
- Rattner, J.B. y Hamkalo, B.A. (1979) J. Cell Biol. 81, 453.
- Rattner, J.B., Saunders, C., Davie, J.R. y Hamkalo, B.A. (1982) J. Cell Biol. 93, 217.
- Reeck, G.R., Isackson, P.S. y Teller, D.C. (1982) Nature 300, 76.
- Reeves, R. y Jones, A. (1976) Nature 260, 495.
- Renz, M. y Day, L.A. (1976) Biochemistry 15, 3220.
- Renz, M., Nehls, P. y Hozier, J.P. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1879.
- Richards, B.M. y Pardon, J.F. (1970) Exp. Cell Res. 62, 184.
- Richards, B.M., Pardon, J.F., Lilley, D., Cotter, R. y Wroley, J. (1977) Cell Biol. Int. Rep. 1, 107.
- Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D. y Klug, A. (1984) Nature 311, 532.
- Riggs, M.G., Whittaker, R.G., Neumann, J.R. e Ingram, V.M. (1977) Nature 268, 462.
- Ring, D. y Cole, R.D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11688.
- Riquelme, P.T., Burzio, L.O. y Koide, S.S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3018.
- Ris, H. y Kubai, D.F. (1974) Ann. Rev. Genet. 4, 263.
- Roche, J., Gorka, C.L., Goeltz, P. y Lawrence, J.J. (1985) Nature 314, 197.
- Rodriguez-Alfageme, C., Rudkin, G.T. y Cohen, L.H. (1976)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2038.

- Rozijn, T.H. y Tonino, G.J.M. (1964) Biochim. Biophys. Acta 91, 105.

- Ruiz, A., Wangh, L.J. y Allfrey, V.G. (1975) Science 190, 117.

- Sajdel-Sulkowska, E.M., Bhargava, M.M., Arnoud, M.V. y Halvorson, H.O. (1974) Biochem. Biophys. Res. Com. 56, 496.

- Sandeen, G., Wood, W.J. y Felsenfeld, G. (1980) Nucleic Acids Res. 8, 3757.

- Sautiere, P., Wouters-Tyron, D., Layne, B. y Biserte, G. (1975) en "The Structure and Function of Chromatin" . CIBA Foundation Symp. 28.p. 78 . Elsevier-Excerpta Medica. North Holland. Amsterdam.

- Schroter, H. y Bode, J. (1982) Eur. J. Biochem. 127, 429.

- Schmidt, G. y Tannhauser, S.J. (1945) J. Biol. Chem. 161, 83.

- Schultz, L.D. (1978) Biochemistry 17, 750.

- Sealy, L. y Chalkley, R. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 1863.

- Seyedin, S.M. y Kistler, W.S. (1979) Biochemistry 18, 1371.

- Shasti, K., Isackson, P.J., Fishback, J.L., Land, D.M. y Reeck, G.R. (1982) Nucleic Acids Res. 10, 5059.

- Shaw, B.R., Herman, T.M., Kovacic, R.T., Beaudreau, G.S. y Van Holde, K.E. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 505.

- Shaw, L.M. y Huang, R.C. (1970) Biochemistry 9, 4530.

- Shick, V.V., Belyavsky, A.V., Bavykin, S.G. y Mirzabekov, D. (1980) J. Mol. Biol. 139, 491.

- Shick, V.V., Belyavsky, A.V. y Mirzabekov, A.D. (1985) J. Mol. Biol. 185, 329.

- 212
- Shih, T. y Fasman, G.D. (1970) J. Mol. Biol. 52, 125.
 - Shindo, H., McGhee, J.D. y Cohen, J.E. (1980) Biopolymers 19, 523.
 - Shires, A., Carpenter, M.P. y Chalkley, R. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2714.
 - Shooter, K.V., Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1974) Eur. J. Biochem. 47, 263.
 - Simpson, R.T. (1978a) Biochemistry 17, 5524.
 - Simpson, R.T. (1978b) Cell 13, 691.
 - Simpson, R.T. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10123.
 - Simpson, R.T. y Kunzler, P. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 1387.
 - Simpson, R.T. y Shindo, H. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 481.
 - Simpson, R.T. y Whitlock, J.P.Jr. (1976) Cell 9, 347.
 - Simpson, R.T., Whitlock, J.P.Jr., Bina-Stein, M. y Stein, A. (1978c) Cold Spring Harb. Symp. Quart. Biol. 42, 127.
 - Sledziewski, A. y Young, E.T. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 253.
 - Smerdon, M.J. e Isenberg, I. (1976) Biochemistry 15, 4233.
 - Smith, B.J., Robertson, D., Birbeck, M.S.C., Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1978) Exp. Cell Res. 115, 420.
 - Smith, R.D., Yu, J. y Seale, R.L. (1984) Biochemistry 23, 785.
 - Smith, R.D., Yu, J., Annunziato, A. y Seale, R.L. (1984) Biochemistry 23, 2970.
 - Sobell, H.M., Tsai, C.C., Gilbert, S.G., Jain, S.C. y Sakore, T.D. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3068.
 - Sollner-Webb, B., Camerini-Otero, R.D. y Felsenfeld, G.

- (1976) Cell, 9, 179.
- Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1975) Biochemistry 14, 2915.
 - Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1977) Cell 10, 537.
 - Sollner-Webb, B., Melchior, W. y Felsenfeld, G. (1978) Cell 4, 611.
 - Sommer, A. (1978) Mol. Gen. Gen. 161, 323.
 - Spadafora, C., Bellard, M., Compton, J.L. y Chambon, P. (1976) FEBS Lett. 69, 281.
 - Spelsberg, T.C., Mitchell, W.M., Chytild, F., Wilson, E.M. y O'Malley, B.W. (1973) Biochim. Biophys. Acta 312, 765.
 - Spelsberg, T.C., Steggles, A.W. y O'Malley, B.W. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4188.
 - Sperling, R. y Bustin, M. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 1263.
 - Spiker, S. e Isenberg, I. (1977) Biochemistry 16, 1819.
 - Spiker, S, Mardian, J.K.W. e Isenberg, I. (1978) Biochem. Biophys. Res. Com. 82, 129.
 - Spiker, S. Murray, M.G. y Thompson, W.F. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 815.
 - Stadler, J., Groudine, M., Dodgson, J.B., Engel, J.D. y Weintraub, H. (1980a) Cell 19, 973.
 - Stadler, J., Larsen, A., Engel, J.D., Dolan, M., Groudine, M. y Weintraub, H. (1980b) Cell 20, 451.
 - Stadler, J., Seebeck, T. y Bramn, R. (1978) Eur. J. Biochem. 90, 452.
 - Staron, K. (1985) Biochim. Biophys. Acta 825, 289.
 - Staron, K., Jermanowski, A., Tyriec, B., Urbauska, A. y Tocko, K. (1977) Biochim. Biophys. Acta 475, 131.

- Stein, G.S., Criss, W.E. y Morris, H.P. (1974) Life Sci. 14, 95.
- Stein, J.L., Reed, K. y Stein, G.S. (1976) Biochemistry 15, 3291.
- Steinmetz, M., Streeck, R.E. y Zachau, H.G. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 615.
- Sterner, R., Boffa, L.C. y Vidali, G. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3830.
- Stoute, J.A. y Marzluff, W.F. (1982) Biochem. Biophys. Res. Com. 107, 1279.
- Stratling, W.H. (1979) Biochemistry 18, 596.
- Stratling, W.H., Muller, U. y Zentgraf, H. (1978) Exp. Cell Res. 117, 301.
- Suau, P., Bradbury, E.M. y Baldwin, J.P. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 593.
- Subirana, J.A., Muñoz-Guerra, S., Aymamí, J., Radermacher, M. y Frank, J. (1985) Chromosoma 91, 377.
- Sung, M.T. y Dixon, G.H. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1616.
- Sussman, J.L. y Trifonov, E.N. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 103.
- Takahashi, K. y Tashiro, Y. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 353.
- Tancredi, T. y Temussi, P.A. (1979) Biopolymers 18, 1.
- Tatchell, K. y Van Holde, K.E. (1977) Biochemistry 16, 5295.
- Tatchell, K. y Van Holde, K.E. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3583.
- Tatchell, K. y Van Holde, K.E. (1979) Biochemistry 18,

2871.

- Tekamp, P.A., Valenzuela, P., Maynard, T., Bell, G.I. y Rutter, W.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 955.
- Teng, C.S. y Hamilton, T.H. (1970) Biochem. Biophys. Res. Com. 40, 123.
- Teng, C.S., Teng, C.T. y Allfrey, V.G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3597.
- Thoma, F. y Koller, Th. (1977) Cell 12, 101.
- Thoma, F., Koller, Th. y Klug, A. (1979) J. Cell Biol. 83, 403.
- Thomas, G.J., Prescott, B. y Olins, D.E. (1977) Science 197, 385.
- Thomas, J.O. y Furber, V. (1976) FEBS Lett. 66, 274.
- Thomas, J.O. y Rees, C. (1983) Eur. J. Biochem. 134, 109.
- Thomas, J.O., Rees, C. y Pearson, E. (1985) Eur. J. Biochem. 147, 143.
- Thomas, J.O. y Thompson, R.J. (1977) Cell 19, 633.
- Todd, R.D. y Garrard, W.T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4729.
- Tonino, G.J.M. y Rozijn, T.H. (1966) en "The Cell Nucleus. Metabolism and Radiosensitivity" p. 125.(Ed. Taylor y Francis) London.
- Trifonov, E.N. y Bettecken, T. (1979) Biochemistry 18, 454.
- Tsanev, R. y Petrov, P. (1976) J. Micrs. Biol. Cell. 27, 11.
- Tunis-Schneider, M.J. y Maestre, M.F. (1970) J. Mol. Biol. 52, 521.
- Uberbacher, E.C. y Bunick, G.J. (1985) Science 229, 1112.

- Urban, M.K., Franklin, S. y Zweidler, A. (1979) *Biochemistry* 18, 3952.
- Van Holde, K.E., Allen, J.R., Tatchell, K., Weischet, W.O. y Lohr, D. (1980) *Biophys. J.* 10, 271.
- Van Holde, K.E., Sahasrabudhe, Ch.G. y Shaw, B.R. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 60, 1365.
- Varshavsky, A.J., Bakayev, V.V., Chumackov, P.M. y Georgiev, G.P. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 2101.
- Varshavsky, A.J., Bakayev, V.V. y Georgiev, G.P. (1977) *Nucleic Acids Res.* 3, 477.
- Vidali, G., Boffa, L.C. y Allfrey, V.G. (1977) *Cell* 12, 409.
- Vidali, G., Boffa, L.C., Bradbury, E.M. y Allfrey, E.M. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2239.
- Vogel, T. y Singer, M.F. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2334.
- Von Holt, C., Strickland, W.M., Brandt, W.F. y Strickland, M.S. (1979) *FEBS Lett.* 100, 201.
- Walker, J.M., Hastings, J.R.B. y Johns, E.W. (1977a) *Eur. J. Biochem.* 76, 461.
- Walker, J.M., Hastings, J.R.B., Gaastra, W. y Johns, E.W. (1977b) *Biochem. Biophys. Res. Com.* 73, 72.
- Walker, J.M., Hastings, J.R.B. y Johns, E.W. (1978a) *Nature* 271, 281.
- Walker, J.M., Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1978b) *FEBS Lett.* 90, 327.
- Walker, J.M., Gooderham, K., Hastings, J.R.B., Mayes, E. y Johns, E.W. (1980a) *FEBS Lett.* 122, 264.
- Walker, J.M., Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1979a) *FEBS Lett.* 100, 394.

- Walker, J.M., Gooderham, K. y Johns, E.W. (1979b) *Biochem. J.* 179, 253.
- Walker, J.M., Goodwin, G.H., Johns, E.W., Wietzes, P. y Gaastra, W. (1977) *Int. J. Pept. Prot. Res.* 9, 220.
- Watanabe, K. e Iso, K. (1981) *J. Mol. Biol.* 151, 143.
- Waterborg, J.H. y Matthews, H.R. (1983) *Biochemistry* 22, 1489.
- Watson, D.C. y Dixon, G.H. (1981) *Biosci. Rep.* 1, 167.
- Watson, D.C., Peters, E.H. y Dixon, G.H. (1977) *Eur. J. Biochem.* 74, 53.
- Watson, D.C., Wong, N.C.W. y Dixon, G.H. (1979) *Eur. J. Biochem.* 95, 193.
- Weber, S. e Isenberg, I. (1980) *Biochemistry* 19, 2236.
- Weintraub, H. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1212.
- Weintraub, H., Flint, S.J., Leffak, I.M., Groudine, M. y Grainger, R.M. (1978) *Cold Spring Harb. Symp. Quart. Biol.* 42, 401.
- Weintraub, H. y Groudine, M. (1976) *Science* 193, 848.
- Weintraub, H. y Van Lente, F. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4249.
- Weintraub, H., Worcel, A. y Alberts, B. (1976) *Cell* 9, 409.
- Weisbrod, S. (1982) *Nature* 297, 289.
- Weisbrod, S., Groudine, M. y Weintraub, H. (1980) *Cell* 19, 289.
- Weisbrod, S. y Weintraub, H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 630.
- Weischet, W.O., Allen, J.R., Riedel, G. y Van Holde, K.E. (19) *Nucleic Acids Res.* 6, 1843.

- Weischet, W.O., Tatchell, K., Van Holde, K.E. y Klump, H. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 139.
- Weith, A. (1983) Exp. Cell Res. 146, 199.
- Welch, S.L. y Cole, R.D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 662.
- Welch, S.L. y Cole, R.D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4516.
- Whitlock, J.P.Jr. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7635.
- Whitlock, J.P.Jr. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5684.
- Whitlock, J.P.Jr., Rushizky, G.W. y Simpson, R.T. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3003.
- Whitlock, J.P.Jr. y Simpson, R.T. (1976) Biochemistry 15, 3307.
- Wilhelm, F.X., De Murcia, G.M., Champagna, H.M. y Daune, M.P. (1974) Eur. J. Biochem. 45, 431.
- Wintersberger, U., Smith, P. y Letnansky, K. (1973) Eur. J. Biochem. 33, 123.
- Wolf, B., Berman, S. y Hanlon, S. (1977) Biochemistry 16, 3655.
- Wood, W.I. y Felsenfeld, G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 7730.
- Woodhead, L. y Johns, E.W. (1976) FEBS Lett. 62, 115.
- Worcel, A. (1978) Cold Spring Harb. Symp. Quart. Biol. 42, 313.
- Wrigler, M.H. y Axel, R. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 1463.
- Wu, C. (1980) Nature 286, 854.
- Wu, H.M., Dattagupta, N., Hogan, M. y Crothers, D.M. (1979) Biochemistry 18, 3960.
- Yaguchi, M., Roy, C., Dove, M. y Seligy, V. (1977) Biochem. Biophys. Res. Com. 76, 100.

- 219
- Yaguchi, M., Røy, C. y Seligy, V. (1980) Biochem. Biophys. Res. Com. 90, 1400.
 - Yau, P., Thorne, A.W., Imai, B.B., Mathews, H.R. y Bradbury, E.M. (1982) Eur. J. Biochem. 129, 281.
 - Yeoman, L.C., Olson, M.O.J., Sugano, N., Jordan, J.J., Taylor, C.W., Starbuck, W.C. y Busch, H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6018.
 - Yeoman, L.C., Seeber, S., Taylor, C.W., Fernbach, D.J., Falleta, J.M., Jordan, J.J. y Busch, H. (1976) Exp. Cell Res. 100, 47.
 - Yoshida, M. y Shimura, K. (1984) J. Biochem (Tokio) 95, 117.
 - Yu, S.S., Li, H.J., Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1977) Eur. J. Biochem. 78, 497.
 - Yu, S.H. y Spring, T.G. (1977) Biochim. Biophys. Acta 492, 20.
 - Zama, M., Olins, D.E., Prescott, B. y Thomas, G.J.Jr. (1976) Nucleic Acids Res. 5, 3881.
 - Zentgraf, H. y Franke, W. (1984) J. Cell Biol. 99, 272.