

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Interacción histonas-DNA, acetilación de histonas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ricardo Castro González

DIRECTOR:

Ángel Pestaña Vargas

Madrid, 2015

Ricardo Castro González

TP
1980
013



x-55-102808-1

**INTERACCION HISTONAS-DNA: ACETILACION
DE HISTONAS.**

Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
1979



BIBLIOTECA

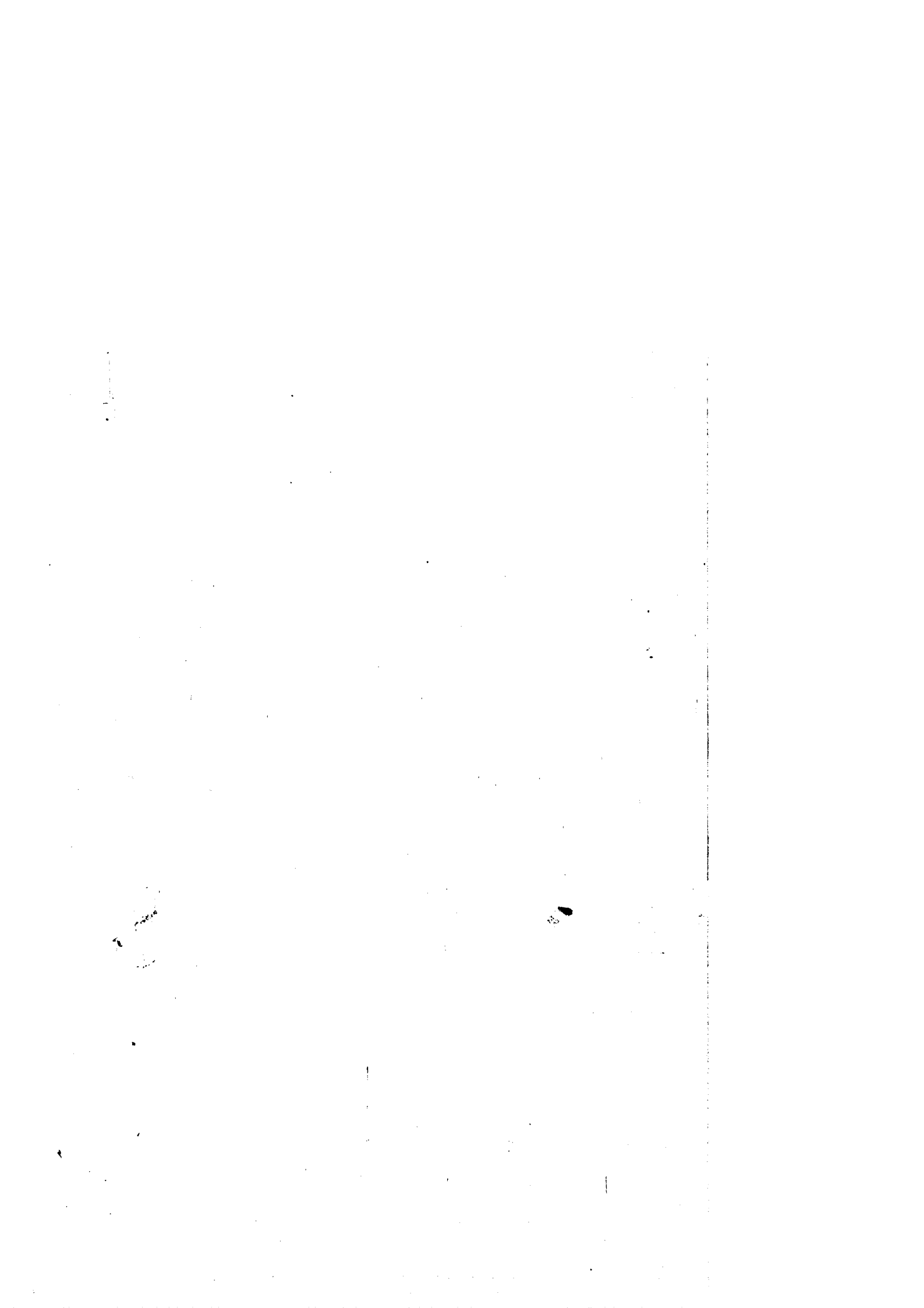
© Ricardo Castro González
Editorial de la Universidad Complutense de Madrid
Servicio de Reprografía, Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-41477-1979

FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD DE MADRID

INTERACCION HISTONAS-DNA:
ACETILACION DE HISTONAS

TESIS PRESENTADA PARA
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
POR EL LICENCIADO
RICARDO CASTRO

MADRID, 1979

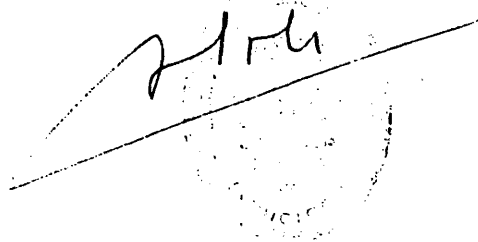


INSTITUTO DE ENZIMOLOGIA Y PATOLOGIA
MOLECULAR DEL C. S. I. C.
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma
ARZOBISPO MORCILLO, s/n
MADRID-34 - SPAIN

ALBERTO SOLS, Director del Instituto de Enzimología
y Patología Molecular del Consejo Superior de Inves-
tigaciones Científicas

C E R T I F I C O : que D. Ricardo Castro González
ha realizado su tesis doctoral "Interacción histonas-
DNA: acetilación de histonas" en este Instituto.

Madrid, 3 de Julio de 1979

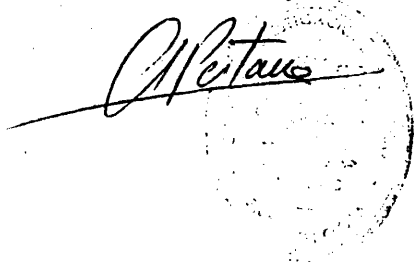

A circular official stamp is partially visible behind the signature, containing the text "INSTITUTO DE ENZIMOLOGIA Y PATOLOGIA MOLECULAR DEL C. S. I. C." and "MADRID".

INSTITUTO DE ENZIMOLOGIA Y PATOLOGIA
MOLECULAR DEL C. S. I. C.
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma
ARZOBISPO MORCILLO, s/n
MADRID - 34 - SPAIN

D. Angel Pestaña Vargas, Doctor en Medicina y Colaborador Científico del CSIC, adscrito al Instituto de Enzimología y Patología Molecular,

CERTIFICO por la presente que D. Ricardo Castro Gonzalez, Licenciado en Veterinaria, ha efectuado bajo mi dirección el trabajo, que con el título "Interacción Histonas-DNA: Acetilación de Histonas", presenta para la obtención del Grado de Doctor.

Lo que a efectos oportunos firmo en Madrid, a 4 de Julio de 1979.

A handwritten signature in cursive script, reading "A. Pestaña", is written over a circular stamp. The stamp is faint and mostly illegible, but appears to be an official seal of the institution.

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Enzimología del C.S.I.C. y Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma.

Quiero agradecer primeramente al Dr. Angel Pestaña la ayuda y colaboración prestadas para este trabajo. Sin su dirección no hubiera sido posible la realización del mismo.

Al Dr. Alberto Sols por su acogida en el Instituto.

Al Dr. Manuel Rufz Amil por haber aceptado ser ponente de esta Tesis Doctoral.

A Mari Paz Cardona y al Dr. Enrique Tabarés, su imprescindible aportación con los cultivos de células. A Pilar García, su generosa ayuda para la confección técnica de esta tesis, quitándose muchas horas de su propio descanso. A Antonio Fernández, por la realización de las gráficas.

A todos los compañeros del Instituto de Enzimología, con mención especial de los Drs. Roberto Marco y Jesús Sebastián y mis compañeros del laboratorio B-16, por sus inapreciables ayudas en momentos importantes de mi trabajo.

Este trabajo ha sido realizado con una ayuda del PFPI del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y una Beca de Investigación de la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid. Mi reconocimiento a ambas instituciones.

A todas las personas e Instituciones siguientes: a las mencionadas en el capítulo de agradecimientos, al Dr. Eduardo Zorita, al C.M. Cesar Carlos, a los veterinarios, a mi familia, a mis amigos científicos extranjeros y a todos los que en el país realizan una labor creativa, marginada o desinteresada.

Iré hacia la inmensidad;
Iré hacia el fragor de las aguas.
¡Tengo sed! Iré hacia la inmensidad del mar...

Claudel.

Todo proceso que no nos hace crecer,
indefectiblemente nos deteriora.

Juana de los Palotes.

INDICE

INTRODUCCION

<u>Cromatina: Niveles de organización</u>	1
<u>Aspectos estructurales</u>	3
Composición: Histonas y DNA. Proteínas no histónicas	3
Histonas: Tipos. Propiedades de las estructuras 1 ^{as} y 3 ^{as}	5
Estructura básica: Nucleosoma. Interacciones histona-DNA e histona-histona	9
Estructuras de orden superior: papel de la H1	22
Modificaciones enzimáticas de las histonas	24
<u>Aspectos funcionales</u>	30
Cromatina activa e inactiva	30
Estructura del nucleosoma de genes en transcripción	33
Acetilación de histonas y cromatina activa	39
<u>Objetivos</u>	44
<u>METODOLOGIA</u>	47
Preparación de DNA nativo, desnaturalizado y fragmentado	49
Preparación de proteínas	49
Histonas nativas: fraccionamiento	51
Histonas acetiladas químicamente: obtención	51
Medio de interacción proteína-DNA	53
Medida de actividades proteolíticas	53
Determinación de DNA en núcleos con DABA	54
Sistema de retención en filtro	54
Preparación del DABA	55

Medidas espectrofluorométricas	55
Obtención de células (hepatocitos, células HeLa)	55
Obtención de núcleos y cromatina	56
Sistema endógeno de acetilación de histonas en células enteras y núcleos aislados	58
Extracción de histonas	59
Análisis de las histonas enzimáticamente modificadas	60
Sistema endógeno de transcripción en células enteras	60
Sistema endógeno de transcripción en núcleos aislados	61
Extracción de ácidos nucleicos: de rRNAs a partir de ribosomas .	61
De RNAs transcritos a partir de células o núcleos	63
Aislamiento y cuantificación de los RNAs iniciados	64
Análisis de los RNAs transcritos	65
RESULTADOS Y DISCUSION	68
I. <u>Aspectos estructurales</u>	69
I.A. <u>Fundamentos de la metodología</u>	69
I.A.1. El uso de DABA como un reactivo del DNA	70
I.A.2. Espectros fluorométricos con DABA	71
I.A.3. Retención en filtros de nitrocelulosa de complejos DNA- proteínas: curvas patrón. Efecto del pretratamiento de los filtros	71
I.B. <u>Influencia de factores ambientales en la interacción histo- na-DNA.</u>	75
I.B.1. Influencia del tiempo	75
I.B.2. Influencia de la temperatura	75
I.B.3. Influencia del PMSF en el medio de reacción	79

I.B.4. Influencia de la fuerza iónica	79
I.C. <u>Proteasas</u>	81
I.C.1. Su presencia en DNA: cuantificación por fluorescamina ..	81
I.C.2. Eliminación lavando el DNA con alta sal	86
I.C.3. Afinidad por DNA	86
I.C.4. Cinética hiperbólica con DNA sin proteasas	88
I.D. <u>Condiciones para la interacción histonas-DNA óptima</u>	88
II. <u>Influencia de los ligandos</u>	90
II.A. <u>DNA</u>	90
II.A.1. Influencia de la estructura primaria	90
II.A.2. Tamaño del DNA	92
II.A.3. Influencia de la estructura secundaria	94
II.A.4. Efecto de la sal: consideraciones	96
II.B. <u>Histonas</u>	101
II.B.1. Curvas de interacción DNA-histonas individuales. Efecto de la sal	101
II.B.2. Movilidad de las histonas	109
II.B.3. Consideraciones finales: Cooperatividad dinámica	111
II.B.4. Histonas acetiladas	115
III. <u>Aspectos funcionales</u>	119
III.A.1. Fundamentos de la metodología	119
III.B.1. Núcleos y cromatina de hígado de rata	120
III.B.2. Acetilación: aspectos enzimáticos	120
III.B.3. Análisis electroforético de histonas acetiladas	123
III.B.4. Transcripción de cromatina v núcleos	124

III.B.5. Análisis electroforético de RNAs transcritos	131
III.B.6. Butirato sódico: acción sobre la acetilación de histonas en núcleos de hígado y en hepatocitos en suspensión	137
III.C.1. Células HeLa: Histonas hiperacetiladas	142
III.C.2. Análisis de RNAs transcritos en células	142
III.C.3. Transcripción de núcleos	145
III.C.4. Efecto de la acetilación de histonas sobre la transcripción en núcleos: Elongación	145
III.C.5. Iniciación	150
III.C.6. Consideraciones finales: Regulación específica	152
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFIA	159

Lista de abreviaturas

- BSA: Albúmina de suero bovino
- ^{14}C -Acetil CoA: ^{14}C -Acetil Coenzima A
- CT DNA: ADN de timo de ternera
- DABA: Acido 5,3 diamino benzoico
- DNAasa: Desoxiribonucleasa
- DTE: Ditoleritrol
- DTT: Ditiotretol
- EDTA Na: Acido etilendiamin tetracético, sal disódica
- HAP: Hidroxiapatito
- MET: β -Mercaptoetanol
- NCS: Solubilizador de tejidos, Amersham-Searle
- PMSF: p-Fluoro fenil metil sulfonilo
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- RNAasa: Ribonucleasa
- SDS: Dodecil sulfato sódico
- TCA: Acido tricloroacético
- TEMED: N,N,N',N'-Tetrametilendiamina
- Tris: Tris-(hidroximetil)-aminoetano
- UTs: Unidades de transcripción

INTRODUCCION



CROMATINA: NIVELES DE ORGANIZACION

El problema del empaquetamiento de largas moléculas de DNA en los cromosomas se resuelve en eucariotes y procariotes en varios niveles es tructuralmente diferentes, según el grado de organización, así como a diferentes niveles de función, esencialmente transcripción y replica-
ción.

Propiamente dicho, cromatina es el término utilizado para designar el complejo nucleoproteico que se encuentra dentro de la membrana nuclear de las células eucarióticas, bien en una forma más o menos dispersa durante la interfase, u organizada en cromosomas durante la mitosis, según se ve al microscopio óptico.

La microscopía electrónica ha llegado ya a visualizar el nivel pri mario de organización de la cromatina como una fibra de 100 Å de diámetro, condensada regularmente en base a unas unidades repetitivas que le confieren la forma de un rosario de cuentas. Estas unidades, los nucleo somas, están formadas fundamentalmente por unas proteínas llamadas histonas y, por supuesto, por DNA, ambos acomplejados de una manera defini da y estable en solución. Es realmente apasionante observar como ya a este nivel primario de organización, el nucleoide procariótico aparece también como una fibra con características semejantes, si bien en los procariotes no hay histonas. Su función sería probablemente suplantada por un tipo de proteínas semejantes, junto con poliaminas (proteína HU de Rouviere-Yaniv; proteínas BH de Varshavsky y Col).

A un nivel superior de organización estructural, las cadenas de nucleosomas sufren un plegamiento ("folding") resultando en una fibra gruesa de 200-300 Å, que se observa al microscopio electrónico tanto en núcleos en interfase como en cromosomas mitóticos. Las cadenas de nucleosomas se enrollarían ("coiling") dando una estructura más o menos continua de varios nucleosomas por vuelta, siguiendo probablemente una disposición helicoidal (1, 2). La fibra gruesa de 200-300 Å sufre todavía nuevos enrollamientos para dar nuevas estructuras de orden superior, que aparecen como lazos ("loops") o dominios ("domains"). El tamaño medio de estos dominios se estima en 50.000 pares de bases, en términos, muy redondos. Se sabe todavía muy poco acerca de estas estructuras, salvo que las proteínas no histónicas y RNA estarían implicados. Estas proteínas están agrupadas en un núcleo central o andamio ("scaffold") que tiene la forma y tamaño del cromosoma (3). El DNA aparece entonces anclado en forma de lazos a esta estructura. Nuevamente es de destacar, que también el nucleoide procariótico está organizado en lazos o dominios con un tamaño aproximado (4). Finalmente, todavía falta por esclarecer como a partir de esas fibras gruesas de 250 Å unidas a ese andamio central se genera la arquitectura final del cromosoma en metafase, que es donde el DNA tiene el valor más alto de empaquetamiento, alrededor de 7.000 (es decir, el cociente entre la longitud lineal del DNA y la que tiene el cromosoma). Esta amplia panorámica de los diversos niveles de organización de la cromatina, que estudiaremos en algún detalle más tarde, no solo tratan de justificar el empaquetamiento del DNA, sino elucidar como están relacionados con la expresión de una cé-

lula determinada. Es el constante problema de relacionar la estructura y la función. A lo largo de esta introducción, nos iremos dando cuenta de como realmente se establece o se supone que se establece esta relación, al menos en el nivel del nucleosoma, pues a niveles de estructura de orden superior, la información es todavía escasísima. Naturalmente, el día en que se comprenda definitivamente, se habrán sentado las bases del complejo problema de la regulación de la expresión genética en cromatina, y con ello de la diferenciación y el desarrollo.

Pasemos a un análisis en detalle de estos diferentes niveles de organización de la cromatina, tanto estructural como funcionalmente.

ASPECTOS ESTRUCTURALES

Composición: Histonas y DNA. Proteínas no histónicas.

La cromatina. contiene proteínas básicas y otras, RNA y DNA o material genético propiamente dicho.

Las proporciones relativas de los componentes de la cromatina varían según el tejido, organismo y método de preparación.

Sin embargo, las proteínas básicas, las histonas, constituyen siempre la cantidad mayor del componente proteico, salvo quizás en el periodo mitótico. Las proteínas no histónicas son menos básicas, al ser sus puntos isoeléctricos menores que los de las histonas.

La masa total proteica podría considerarse como dos veces la del DNA, y está repartida de tal manera que usualmente hay un poco más en peso de histona que de DNA y algo menos de proteínas no histónicas. Hay

también una pequeña cantidad de RNA, 5/10% del DNA, del que algo comprendería un componente estructural, mientras que mucho podría ser cadenas de RNA nacientes que no han completado todavía su síntesis. Como ejemplo, la cromatina de las células HeLa en interfase tiene la siguiente composición total (5) relativa al contenido de DNA:

DNA	100
Histonas.....	115
No histonas	86
RNA	12

En los cromosomas en metafase el contenido de histonas es el mismo, pero la proteína no histona aumenta hasta un valor de 355, en relación al DNA.

Quizás convenga decir aquí algunas palabras sobre las proteínas no histonas, porque de las histonas nos ocuparemos en adelante larga y profusamente.

Utilizando la técnica del sistema en gel bidimensional (6), en la que las proteínas se separan en la primera dimensión por isoelectroenfoque y en la segunda dimensión por electroforesis en presencia de SDS, se han llegado a demostrar unas 400 proteínas no histónicas en núcleos de células HeLa, la mayoría en menos de 10.000 copias por núcleo (7). Posiblemente muchas de ellas podrían ser contaminantes nucleoplásmicos, o hasta citoplásmicos, que se unen a la cromatina durante su aislamiento, así como proteínas de membranas, cuya unión al material cromatínico, podría ser o no estructuralmente significativo.

Además de proteínas propiamente estructurales, entre las no histónicas se encuentran diversas actividades enzimáticas (por ejemplo las RNA polimerasas, las enzimas acetilantes de histonas,...) y otros reguladores genéticos (por ejemplo, las que se unen a los receptores citoplásmicos de las hormonas esteroideas).

La medida de la unión específica ("specific binding"), presenta un problema. Lin Y. Riggs, 1975, resaltaron que cualquier proteína con una afinidad alta por una secuencia particular de DNA debe tener también una afinidad determinada, aunque menor, por el DNA en general, y por ello sugirieron que en eucariotes, habría muchas copias de una proteína reguladora cualquiera unidas inespecíficamente por cada una de las unidas específicamente.

Conviene que destaquemos aquí la existencia de un grupo especial de proteínas no histónicas, las llamadas HMG (de "high mobility group", por referencia a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida), cuya importancia va en aumento. No obstante, no se conoce todavía su papel. Hay unas $10^5 - 10^6$ copias de cada una por núcleo, pudiendo detectarse en nucleosomas aislados (8).

Histonas: Tipos. Propiedades de las estructuras 1^{as} y 3^{as}.

Tipos

Todos los eucariotes contienen 5 tipos de histonas: dos histonas ricas en arginina, H3 y H4; dos histonas ricas en lisina, H2a y H2b; y una histona muy rica en lisina, H1.

Otras histonas o proteínas semejantes aparecen específicamente en células muy concretas, por ejemplo, en los eritrocitos de vertebrados no mamíferos, H5, y en algunas células espermatogénicas, protaminas.

La tabla I nos presenta algunas de las características de las 5 histonas típicas respecto a sus pesos moleculares aproximados, valores redondos en % de los tipos de aminoácidos, y composición en lisina y arginina, en virtud de la cual se clasifican:

TABLA I

	<u>P.M. ($\times 10^{-3}$)</u>	<u>Composición en aminoácidos</u> <u>% (básicos, ácidos, hidrofóbicos)</u>			<u>Lys/Arg</u>
H1	21	30	5	10	20
H2a	14	25	15	25	1
H2b	13,8	25	15	15	2,5
H3	15,3	25	15	20	0,72
H4	11,2	25	10	25	0,72

Estas cifras son las de la cromatina de timo de ternera, pero pueden aplicarse aproximadamente a la mayoría de los organismos.

Estructura primaria: Conservación, variantes.

Es muy importante destacar aquí que las secuencias de histonas varían muy poco de una especie a otra, es decir son enormemente conservativas.

Se admite que los valores de mutación puntual por 100 residuos y

100 millones de años son de 0,15 para las H3 y H4, 1 para las H2a y H2b, y de 4 para el H1 (compárense con los valores conocidos para otras proteínas: Citocromo C, 3; hemoglobina, 14; etc...). De hecho, las histonas H3 y H4 poseen las secuencias proteicas más altamente conservadas que se conocen hasta la fecha en la naturaleza. Tal conservación supone que cada residuo a lo largo de la cadena de la H3 y H4, está implicado en interacciones esenciales para la función de estas moléculas, para la supervivencia del organismo. Las diferencias que hemos citado para los tres grupos de histonas, pueden tener un significado funcional.

Frente a este hecho general, va siendo cada vez más claro la existencia de variantes en la estructura primaria de las histonas H1, H3, H2a y H2b, no sólo cuando se comparan diferentes organismos o diferentes tejidos del mismo organismo, sino también para un mismo tejido y durante la embriogénesis (9,10). La cuestión central que subyace debajo de este hecho es si esta heterogeneidad en las histonas, y por consiguiente en los nucleosomas que forman, junto con la que también proporcionarían las modificaciones enzimáticas postsintéticas de las histonas (acetilación, fosforilación, metilación, y poli-ADP-ribosilación) y la presencia de las proteínas no histónicas HMG, podría estar relacionada con modulaciones específicas de la estructura básica de la cromatina y por consiguiente estar implicada posiblemente en la expresión genética diferencial. A este respecto, la regulación coordinada de la síntesis de las variantes de histonas durante la embriogénesis del erizo de mar, sugiere una fuerte correlación entre diversidad de histonas, cambios en estructura de la cromatina y expresión de un programa de desarrollo.

Estructura terciaria: Asimetría, interacciones.

Otra propiedad importante de las histonas que relaciona las estructuras primaria y terciaria y con ello su papel en los nucleosomas y estructuras de orden superior, es la distribución asimétrica de los aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica. Las cuatro histonas que constituyen el núcleo del nucleosoma como veremos más adelante, a saber: H2a, H2b, H3 y H4, poseen unas regiones N-terminales (comienzo de la cadena polipeptídica) bien definidas, muy básicas, mientras que las regiones C-terminales (fin de la cadena) de las H3 y H4 y las centrales de las H2a y H2b son apolares.

Esta situación condiciona su estructura tridimensional y con ello las posibilidades de interacción intermoleculares. En principio, tal asimetría conduce a pensar que las regiones N-terminales muy básicas, cargadas positivamente, son los sitios primarios de interacción con las cargas negativas portadas por los grupos fosfato del DNA, mientras que las regiones apolares están implicadas en interacciones histona-histona.

Por otro lado, conformacionalmente, las zonas ricas en residuos apolares tienden a adoptar una estructura en hélice, mientras que las ricas en cadenas laterales polares (lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico), protagonizarán una serie de repulsiones electrostáticas que evitan la formación de estructura en hélice. Además no hay que olvidar la gran importancia de las características del medio en que se encuentre la proteína, especialmente en lo referente a la fuerza iónica, y así la extensión de la formación de hélice incrementa con la fuerza iónica cooperativamente (11).

El descubrimiento de complejos en solución entre histonas especi-

ficas: (H3, H4)₂, (H2b, H2a) y (H4, H2b) (12), y su estudio detallado por resonancia magnética nuclear (RMN) y otras técnicas físicas (13), apoyan que el núcleo de histonas que forman el nucleosoma corresponde a su asociación por las regiones apolares, mientras que las regiones N-terminales básicas interaccionarían con el DNA nucleosomal, el inter nucleosomal o ambos. Ahora entendemos mejor el significado de la fuerte conservación de las histonas, a saber, que los residuos de la superficie, los más susceptibles a la alteración durante la evolución en otras proteínas, son tan importantes en las histonas como los residuos internos de sus zonas globulares. Estos últimos aseguran un correcto plegamiento, mientras que aquellos hacen que la superficie interactúe extensa y específicamente con otras moléculas, histonas y DNA.

La H1, que no está implicada en la formación del núcleo o corazón del nucleosoma ("nucleosomal core"), posee una estructura semejante en el sentido de que consta de una región central globular, flanqueada a cada lado por regiones básicas.

La fig. 1, nos muestra los modelos de la estructura de los complejos entre histonas (H3, H4)₂ y (H2a, H2b), así como la de la H1.

Estructura básica: Nucleosoma. Interacciones histona-DNA e histona-histona.

Está incremantándose de una manera exponencial la información de que se dispone sobre el nucleosoma. Los investigadores han trabajado en dos direcciones, o examinando la estructura interna del nucleosoma, o especulando sobre la manera de ensamblar cadenas de nucleosomas para ob-

tener los altos grados de estructura y compactación del DNA, que son característicos de la cromatina en el núcleo.

El nucleosoma se define como la partícula que contiene la longitud entera de DNA, que es generada repetitivamente en los momentos primeros de la digestión con nucleasa estafilocócica.

El nucleosoma consta de una longitud bien definida de DNA (14, 15), aproximadamente 200 pares de bases, acompañada con un octámero (16) de histonas. El octámero contiene dos copias de cada histona H2a, H2b, H3 y H4; H1 no forma parte propiamente del nucleosoma, pero está asociada con él.

DNA.

Con la progresiva acumulación de datos sobre su estructura, estas características generales del modelo del nucleosoma se han confirmado, pero los detalles se han modificado, como era de esperar.

Está ya claro que la cantidad de DNA por octámero de histonas puede variar entre 140 y 240 pares de bases, dependiendo del organismo y tejido de los que se aislen los nucleosomas, (17-21); incluso para un solo tipo de células esta longitud no es homogénea (18, 19).

La evidencia para esta variabilidad viene de estudios de digestión de núcleos celulares con nucleasa estafilocócica, cuyos primeros puntos de ataque se localizan dentro de las regiones espaciadora ("spacer") o de acoplamiento ("linker"), que separan las unidades repetitivas.

Una digestión limitada libera oligómeros y monómeros de nucleosomas, de manera que la extrapolación a tiempos cero da el tamaño de la

unidad repetitiva fundamental.

Si la digestión es más larga, se consigue una degradación preferencial rápida del DNA espaciador conduciendo, en el caso del monómero, a la aparición de un corazón ("core") nucleosomal relativamente estable, que contiene el octámero de histonas y 140 pares de bases de DNA (20-22).

El tamaño de este segmento es invariante en todas las muestras de cromatina examinadas hasta hoy. Por consiguiente, la variabilidad en la longitud del DNA en la repetición nucleosomal, proviene de la variación de la longitud de las regiones espaciadoras que separan los corazones de los nucleosomas.

Los estudios realizados sobre estos corazones han sido posibles gracias a las técnicas físicas de difracción de neutrones, de rayos X y microscopía electrónica, sobre material nucleosomal en solución (23, 24), o cristalizado; y gracias por otro lado a las técnicas bioquímicas de digestión con nucleasas del DNA nucleosomal (25).

El modelo que se dibuja de los estudios físicos estaría de acuerdo con el que nos muestra la figura 2: el corazón nucleosomal es un cilindro de unos 110 Å de diámetro y 55 Å de altura. Considerando la resolución actual de estas técnicas, no se ha determinado todavía el camino exacto seguido por el DNA, aunque lo colocan sin ambigüedad en la periferia de la partícula. Se asume por lo tanto que los 140 pares de bases del DNA forman una superhélice uniforme envuelta alrededor del cilindro, con un diámetro de unos 100 Å y un paso de hélice de unos 28 Å, dando aproximadamente 1 3/4 vueltas de hélice sobre el núcleo de histo

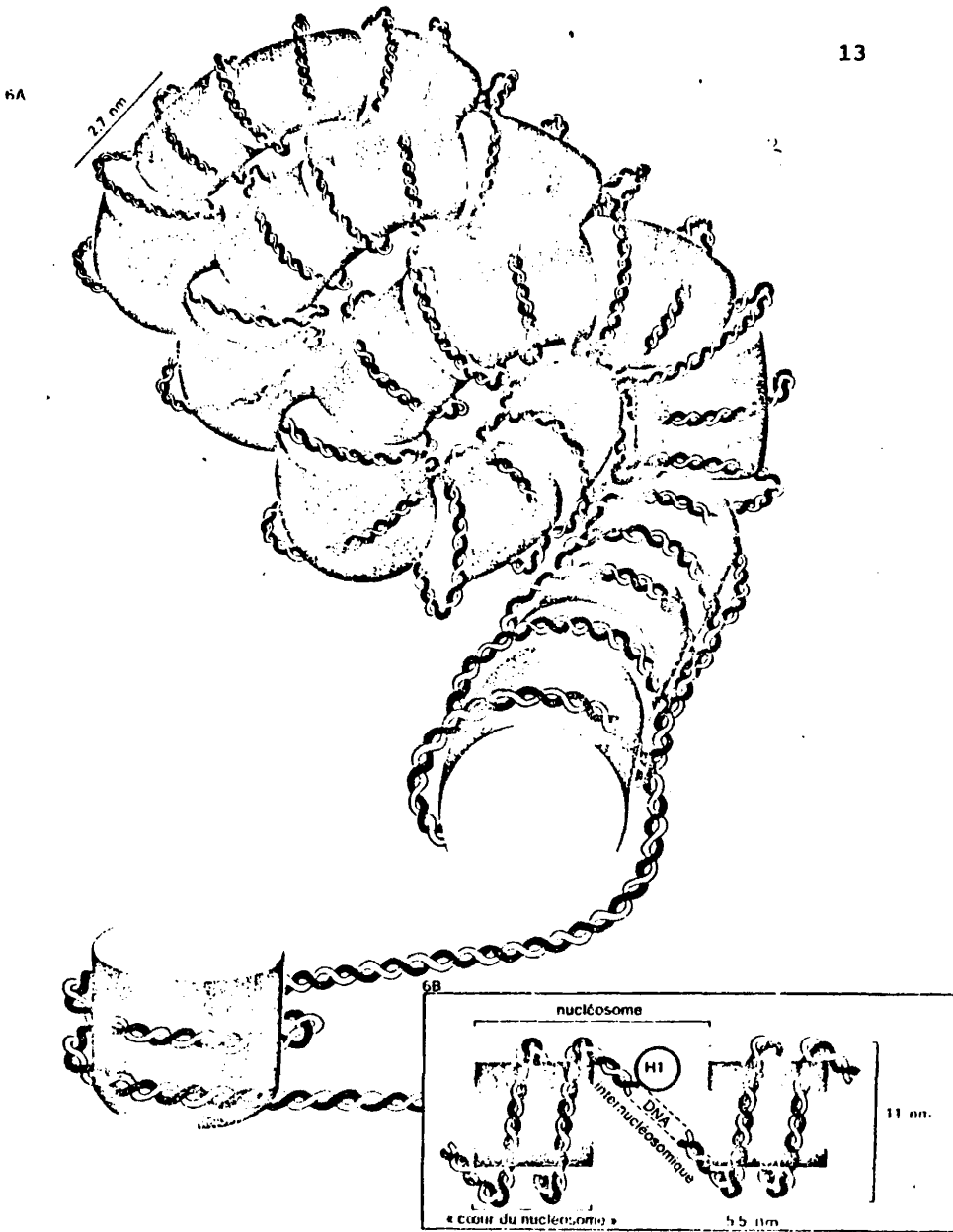


Fig. 2,- Estructura en solenoide de la fibra de cromatina. Observense las medidas que corresponden a un nucleosoma. ('La chromatine', E.M. Bradbury. La Recherche N° 91, Juillet-Aout 1978).

nas, correspondiendo lógicamente 80 pares de bases por vuelta de DNA en forma B.

Los estudios con nucleasas, DNAasa I principalmente, han mostrado como el DNA nucleosomal sufre una serie de cortes, produciendo una serie de bandas discretas correspondientes a tamaños de DNA que son múltiplos enteros de 10 nucleótidos (26), tal y como se observa en geles de electroforesis y previa desnaturalización de los productos (ya que esta enzima realiza cada corte sobre una sola de las bandas). Es por ello evidente que dentro del nucleosoma hay sitios discretos de ataque, que además no son igualmente accesibles, en respuesta a la propia estructura del nucleosoma. La fig. 3 muestra el camino propuesto del DNA en superhélice alrededor del corazón del nucleosoma, mostrando además los sitios de ataque nucleásico. Este modelo presenta la cuestión de cual es el origen de la separación de 10 nucleótidos entre los sitios de ataque nucleásico; la respuesta está relacionada con el paso de rosca de 10 pares de bases de las fibras de DNA, en la forma B, de manera que esta periodicidad existe también en el DNA nucleosomal. Crick y Klug, 1975, propusieron como explicación concreta el modelo de la hélice agudada ("Kinky helix"), donde segmentos lineales de DNA son doblados discontinuamente a intervalos de 10 pares de bases, formándose una especie de codos o ángulos en esos puntos, que serían los sitios susceptibles a las nucleasas. Noll, 1974, ha propuesto en cambio que el doblamiento del DNA es continuo, de tal manera que cada punto del DNA sufriría la misma fuerza de tensión alrededor del núcleo de histonas; en este caso, cada banda del DNA sería susceptible a la nucleasa en aquel punto en que sobresaliera más de la superficie del nucleosoma, es decir cada 10

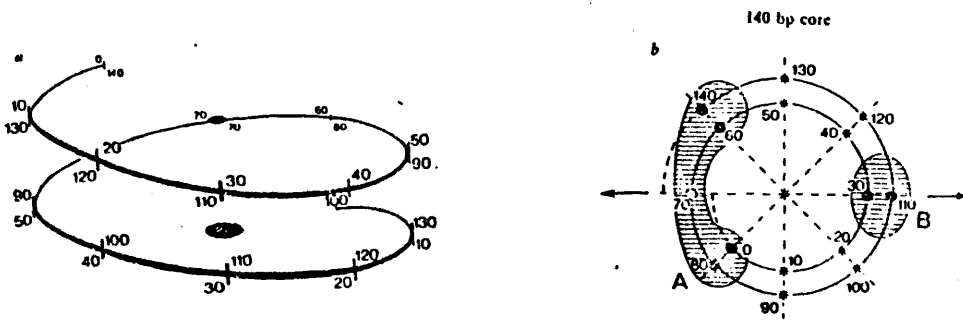


Fig. 3.A.- Diagrama de las $1\frac{3}{4}$ vueltas de la superhélice DNA mostrando las 140 pb que corresponden al corazón nucleosomal.

B.- Frecuencia de corte por la DNAasa I para los distintos sitios susceptibles en el DNA nucleosomal.

(*: frecuencia alta, 0: frecuencia media, ◯: frecuencia baja). Observense en ambos dibujos la situación del eje binario.

("Structure of nucleosome core particles of chromatin", J.T. Finch y Enl. Nature, Vol.269, 1 Sept. 1977.)

nucleótidos (para entender este último modelo, debemos considerar que el plano bidimensional del DNA es perpendicular al de la superficie del cilindro sobre el que se enrolla).

Histonas.-

Como ya se ha dicho anteriormente, no hay ninguna duda de que en casi todas las especies eucarióticas todos los nucleosomas contienen dos de cada una de las histonas H3, H4, H2a y H2b. Tal evidencia proviene de estudios inmunológicos con anticuerpos para cada histona frente al nucleosoma ensamblado "in vivo" (27), de experimentos de reconstitución "in vitro" en los que las cuatro histonas son requeridas en cantidades equimolares para ensamblar un nucleosoma (28), de experiencias de entrelazado químico ("cross-linking") de histonas en cromatina mostrando un octámero (29) y de las medidas precisas de los cocientes histona/DNA para cada histona (30,31).

Hay una quinta histona asociada con el nucleosoma, la H1 o una de sus variantes. Es muy probable que haya sólo una molécula/nucleosoma (32), a pesar de los muchos datos en la literatura de que la estequiometría real podía ser 1:1 para las cinco histonas. La localización de las histonas en el nucleosoma puede ser analizada en su relación entre ellas mismas y en relación al DNA nucleosomal. Aunque ya hemos apuntado algunos aspectos anteriormente respecto a este tema de las interacciones, es ahora el momento de evaluar su exacto conocimiento dentro del nucleosoma. Conviene destacar que si todos los campos de la cromatina deben ser desarrollados, este es uno de los que más lo necesitan por

la escasez de información, si bien no faltan las especulaciones.

Los experimentos de "cross-linking" más recientes (17,19) han confirmado que hay dos regiones de histonas en el nucleosoma, una conteniendo el octámero, la otra conteniendo la H1. Los estudios de digestión con nucleasas han mostrado también que la H1 es liberada durante la aparición del corazón a partir del nucleosoma (33-35), y por consiguiente es tá probablemente unida al DNA espaciador ("linker"), pues aparece simul táneamente un fragmento de unos 35 pares de bases con la H1 unido al mis mo (36).

Por otro lado, los estudios de "cross-linking" han mostrado también que los contactos entre histonas en el nucleosoma son los mismos que en cromatina completa.

Si se elimina el DNA del nucleosoma tratando este con ClNa 2M, es posible obtener en solución el corazón proteico como tal octámero (37), aunque es punto de controversia todavía su estabilidad, de manera que las especies predominantes serían más bien tetrámeros (38). Pues bien, Weintraub, Worcel y Alberts, 1976, han predicho un modelo de nucleosoma que intenta relacionar su estructura y función y que no excluye que bajo condiciones apropiadas y en combinación con el DNA, ese octámero de histonas podría dividirse en dos tetrámeros heterotípicos simétricos, rindiendo medios-nucleosomas que han sido ya observados al microscopio electrónico (39).

Conviene que destaquemos ya la importancia de este modelo, que resume muchos de los datos hasta hoy obtenidos sobre el nucleosoma y que se basa en un aspecto muy importante de su estructura, su probable simetría binaria. La fig. 4 muestra una representación esquemática de

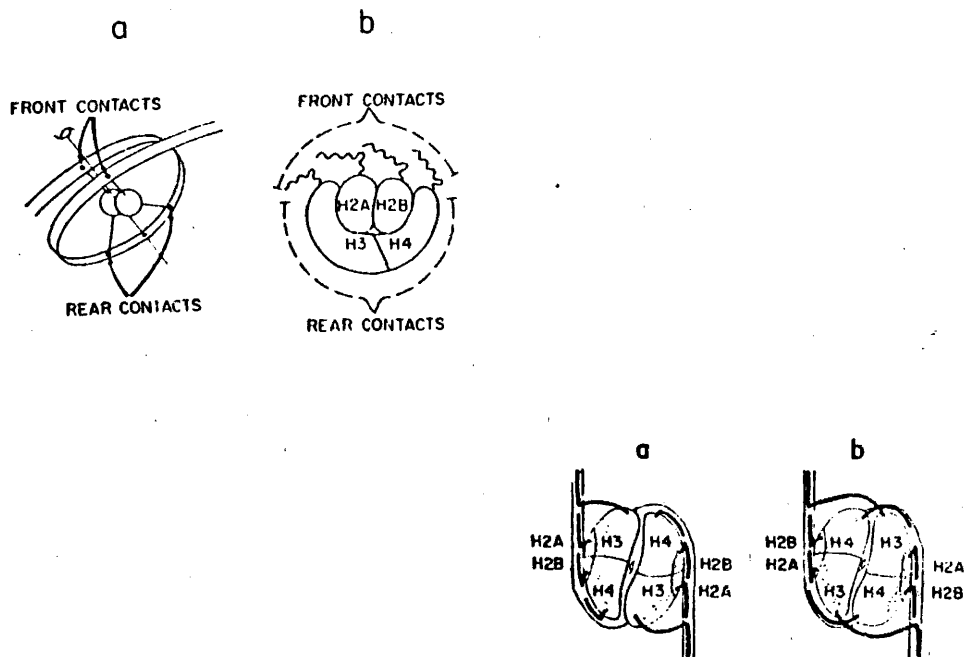


Fig.4.- Representación esquemática del modelo de nucleosoma, basado sobre dos medio-nucleosomas apareados simétricamente. Se muestra también una disposición posible de las histonas dentro del tetrámero. Observen se los contactos con el DNA.

Representación esquemática de dos posibles variantes sobre la visión posterior del modelo del nucleosoma.

Observense los contactos de los extremos N-terminales de las histonas con el DNA.

("A model for chromatin based upon two symmetrically paired half-nucleosomes", H. Weintraub y Col. Cell, Vol. 9, November 1976.)

un modelo de nucleosoma basado sobre dos medios-nucleosomas apareados simétricamente.

Aparte del encuentro de un par de cada histona en el nucleosoma, la existencia de un posible eje de simetría rotacional binaria, es soportada por la forma de comportamiento del DNA nucleosomal frente a las DNAasas I y II. Ya hemos visto como los cortes de la DNAasa I se producen a lo largo de todo el DNA con una periodicidad de 10 pares de bases; sin embargo, hay importantes variaciones en las frecuencias de corte para cada punto, de manera que las sensibilidades a la enzima son semejantes para cada dos puntos separados 80 pares de bases, es decir, la longitud de una vuelta de hélice del DNA siguiendo el recorrido de este en el nucleosoma, pero solo 28 \AA transversalmente, que es el paso de rosca de ese DNA así enrollado. De esta manera, los puntos sobre la doble hélice del DNA separados 80 pares de bases están situados lo más cerca posible, 28 \AA , y pueden ser protegidos de forma semejante por tener el mismo ambiente local. Naturalmente, este modelo de ataque con variación en las frecuencias sería concomitante con el de una distribución simétrica de los contactos DNA-proteína. Por otro lado, se ha observado que la DNAasa II corta el DNA de la cromatina a intervalos de 100 pares de bases bajo ciertas condiciones iónicas (40).

Ello está sugiriendo que además de cortes en sitios preferenciales entre los corazones nucleosomales, podría haber otro en el medio de cada corazón.

Mirzabekov y Col. con estudios de "cross-linking" histona-DNA, parecen llegar a la conclusión de que hay una molécula de histona de ca-

da tipo unida a cada banda del DNA y que dos moléculas de cada histona H2a, H2b, H3 y H4, están dispuestas simétricamente sobre las dos bandas del duplex DNA en el corazón nucleosomal. H4 y H3 parecen estar unidas a los extremos 5' y 3' respectivamente de cada banda del DNA. Este mismo investigador apunta que tal interacción de las histonas con una banda del DNA, la cual soporta nuevamente el modelo de Weintraub y Col, 1976, podía no interferir con los procesos de transcripción y replicación. Por otro lado, ha mostrado en un estudio paralelo que las histonas están situadas principalmente fuera de los huecos mayor y menor del DNA, dejando el menor bien expuesto, lo cual podría ser importante para la interacción con proteínas reguladoras implicadas en la expresión genética.

Una gran parte del trabajo desarrollado sobre el tetrámero, ha sido centrado sobre la cuestión de si las regiones NH_2 -terminales de las histonas tienen una conformación diferente del resto de la molécula. La cuestión surge del hecho que ya hemos descrito, de que los aminoácidos básicos están localizados principalmente en estas regiones NH_2 -terminales y de la demostración por Weintraub y Col, (41), 1974, de que la tripsina libera residuos de 20-30 aminoácidos de estas regiones cuando se ataca la cromatina. Esto junto con la pronta evidencia suministrada por la RMN (42), condujo a la idea de que las histonas se asocian entre sí esencialmente a través de sus regiones COOH -terminales, más bien globulares, y que las colas NH_2 -terminales se extienden hacia fuera para envolver el DNA. La fig. 4 nos muestra como el modelo de Weintraub y Col representa estas colas interaccionando con el DNA en el nucleosoma. (Vease también la fig. 1).

Kornberg, 1974, fué el primero que sugirió que las histonas H3 y H4 podían jugar un papel único en la estructura del nucleosoma. Se sabe que los nucleosomas pueden ser reensamblados mezclando DNA e histonas en condiciones controladas, de manera que las estructuras obtenidas poseen las mismas características que los nucleosomas nativos. Fué de esta manera como se encontró que las H3 y H4 son necesarias y suficientes para la generación de un complejo semejante al nucleosoma, aunque algo más pequeño. Parece que H3-H4 sólo, pueden organizar 140 pares de bases de DNA en una manera muy similar a como lo hacen en el corazón nucleosomal completo, tal y como se ha comprobado por microscopía electrónica, difracción de rayos X, digestión con nucleasas, etc..., aunque debe ser demostrado todavía que estas partículas H3-H4 se asocian como los tetrámeros $(H3)_2-(H4)_2$ (Simpson y Col, 1977). (Ver fig. 1).

Debemos tener presente, que las histonas ricas en arginina han sido las más estrictamente conservadas durante la evolución en su estructura primaria, y que son también las más fuertemente unidas de todas las histonas al DNA.

Pero ¿cual sería entonces el papel de las histonas H2a y H2b?. La hipótesis es que podrían jugar un doble papel: por un lado, interactuar con la partícula subnucleosomal H3-H4 ayudando a estabilizar el plegamiento del DNA en el corazón nucleosomal; y por otro lado, unirse junto con la H1 al DNA espaciador ("linker DNA"). De esta manera, la conservación de la longitud del DNA del corazón, 140 pares de bases, sería debida a la conservación en la secuencia de aminoácidos de las H3 y H4 (43), mientras que la variación en la longitud del DNA espaciador lo sería (44) por variaciones en la estructura de las H2a, H2b y H1. De

hecho ambos, DNA corazón y espaciador, están contenidos en nucleosomas carentes de H1, indicando que el espaciador no está formado solo por H1 sino que podría implicar a las H2a y H2b (28, 45). Hemos ya comentado además el hecho de la variabilidad de las estructuras primarias de las histonas H2a y H2b, especialmente en las regiones básicas, lo cual conduce a la interesante posibilidad de que estas variabilidades en las zonas que interaccionan con el DNA, podrían definir quizás en parte y junto con la H1, la longitud variable del DNA espaciador. Evidentemente, las regiones conservadas de las H2a y H2b son importantes para las interacciones histona-histona en orden a mantener un corazón de histonas estable.

Estructuras de orden superior: papel de la H1.-

Como ya señalamos al principio, los nucleosomas están implicados en órdenes superiores de estructuración, con el fin de plegar el DNA en la forma tan extremadamente compacta que se encuentra en el núcleo. La atención se ha centrado sobre los dos primeros niveles de organización, un filamento de cromatina delgado, 100 Å en diámetro, y una fibra más gruesa, con un diámetro de 200-300 Å. La fibra delgada es casi con toda seguridad, una cadena lineal de corazones nucleosomales en contacto unos con otros. La fibra gruesa parece ser generada por enrollamiento de la fibra delgada. Los estudios de difracción de neutrones de la fibra de cromatina de 300 Å, sugieren que los nucleosomas están dispuestos en un solenoide con un paso de rosca de 100 Å, un diámetro de 300 Å y un hueco central de 100 Å (46). El paso de rosca está determinado probablemente, por el empaquetamiento lado a lado de nucleosomas sobre

las vueltas adyacentes del solenoide. Estos mismos solenoides se observan en micrografías electrónicas de oligómeros de nucleosomas si el Mg^{2+} está presente, si falta solo es visible la fibra delgada de 100 Å (1). Que la histona H1, la fuerza iónica y/o cationes divalentes están implicados en el mantenimiento de estructuras de cromatina de orden superior, son hechos que ya se conocían desde hace tiempo (2, 28, 35, 45, 47-49).

Hay buenas razones para pensar que las interacciones entre nucleosomas están modificadas o estabilizadas por la H1, puesto que ya hemos mencionado que esta histona está unida a la cromatina al menos en parte a través del DNA espaciador. La presencia de H1 en cromatina, o su adición a una cromatina sin ella, resulta en una compactación de la cadena nucleosomal; su eliminación permite la apertura de la estructura hacia las formas conocidas en collar de perlas (50-52). Estudios sobre la unión ("binding") de la H1 a oligómeros de nucleosomas, han mostrado un incremento continuo en afinidad hasta el octanucleosoma, a partir del cual ya no muestra dependencia con el tamaño. Esto sugiere que los octanucleosomas son capaces de formar una unidad estable de estructura de orden superior, y de hecho las micrografías electrónicas de fracciones de oligonucleosomas conteniendo H1, revelan la presencia de estructuras esféricas de aproximadamente 200 Å de diámetro, de 6-10 nucleosomas, y que se han denominado supercuentas ("superbead") (2). No se sabe todavía si esta sería la forma habitual de estructuración en la cromatina nativa. Ha sido señalado (2) que la exposición de la cromatina a muy bajas fuerzas iónicas, desorganiza la fibra gruesa de cromatina de 300 Å y altera la unión dependiente de tamaño de la H1, qui-

zās por interrupción de sus interacciones cooperativas.

No está claro como la H1 contribuye a la compactación de oligonucleosomas: podría formar puentes entre las vueltas de superhélice (52), y/o bien conectar regiones espaciadoras entre ambos lados de un solo nucleosoma (53). Conviene subrayar que de todas las histonas, la H1 presenta la máxima variación en secuencia de aminoácidos, y podría especuarse que el tamaño variable de la región espaciadora entre corazones nucleosomales está correlacionado con las subespecies de H1 unidas al mismo (54, 55). A ello podrían contribuir también las H2a y H2b como ya hemos señalado.

Modificaciones enzimáticas de las histonas.-

Las histonas sufren una variedad de modificaciones enzimáticas post sintéticas, específicas de secuencia, y en posiciones particulares de la secuencia de aminoácidos (43, 56).

Las cadenas laterales de los residuos de lisina pueden ser N-acetilados, o N-metilados (mono-di- o trisubstituido); los residuos serina pueden ser O-fosforilados; los residuos histidina y arginina pueden ser N-metilados; y el residuo NH₂-terminal de la histona puede ser acetilado. La variedad estructural introducida por estas modificaciones, contrasta fuertemente con las restricciones estructurales impuestas por la alta conservación de las secuencias de aminoácidos de las histonas, particularmente H3 y H4. Una posible interpretación es que una unión firme y precisa de las histonas con el DNA y entre ellas mismas es estructuralmente crítico (de aquí la conservación de sus secuencias), pero que la liberación de estas interacciones es también esencial para

funciones cromosomales particulares (replicación, transcripción), y esto podría lograrse introduciendo perturbaciones estructurales a través de modificaciones enzimáticas de las cadenas laterales de aminoácidos.

Estos diferentes tipos de modificaciones tienen consecuencias diferentes: la N-acetilación provoca la pérdida de una carga positiva; la N-metilación de lisina no provoca un cambio de carga pero sí un incremento en la basicidad del nitrógeno y un incremento de la hidrofobicidad; la O-fosforilación introduce dos cargas negativas; la poli (ADP)-ribosilación introduce una carga y media negativa por cada residuo ADP-ribosa incorporado. Los grupos ϵ -N-acetilo y los O-fosfato son metabólicamente inestables y se recambian rápidamente, mientras que los grupos acetilo NH_2 -terminales y los N-metilo son estables. Esta capacidad de recambio ha despertado un considerable interés, pues podría conferir algún tipo de especificidad celular.

Los estudios de secuenciación de aminoácidos, han permitido conocer con detalle algunas características de estos procesos, en cuanto al tipo de histonas y residuos modificados. Aunque en muchos casos se han establecido las posiciones de las modificaciones en la secuencia, su significado biológico preciso está lejos todavía de ser entendido.

La fig. 1 nos muestra las posiciones numéricas de los residuos de lisina, en las regiones N-terminales de las histonas nucleosomales, que pueden ser modificados por los distintos tipos.

La tabla II trata de ser un resumen de algunas de las características de la metilación, fosforilación y poli (ADP)-ribosilación de histonas; la acetilación es tratada a continuación con más detalle.

TABLA II

<u>Proceso</u>	<u>Histona y grupo modificado</u>	<u>aminoácido:posiciones</u>	<u>especificidad enzimática</u>	<u>fase del ciclo</u>	<u>Posible función</u>
Metilación	H4 ε-N-lisina	Posición 20, con 0-2 metilos (timo ternera)	Lisinas situadas a 3-4 residuos de una lisina acetilada, y proteínas a una lisina fosforilada en la H3.	Fase S	Favorecer la disposición de las histonas sobre el DNA en replicación.
	H3 ε-N-lisina	Posiciones 9 y 27, con 0-3 metilos (timo ternera y testículos trucha)	Serinas situadas a 2-5 residuos de un aminoácido básico como lisina y arginina.	Fase S(H1), mitosis (H1, H3) y a lo largo de todo el ciclo en células en división.	Descendensación de la cromatina para la replicación (fase S, H1) o deposición de protaminas. Condensación del cromosoma (metafase, H1 y H3).
Fosforilación	H1 preferentemente. O-serina	Hasta 7 aminoácidos.			
	Resto de histonas. O-serina				
Poli (ADP)-ribosilación.	H1 γ-C-ac. glutámico	3 sitios, con 0-7 ADP-ribosas (testículos trucha)			Modular acción de H1 en cromatina.

Los estudios sobre acetilación de histonas han puesto de manifiesto la existencia de dos tipos de acetilación: a/metabólicamente estable, en el residuo serina N-terminal de las histonas H1, H2a y H4, y b/ acetilación metabólicamente inestable en los residuos internos de lisina, en la forma ϵ -N-acetil lisina, que ocurre fundamentalmente en las histonas ricas en arginina H3 y H4 (57, 58).

La acetilación N-terminal estable es inhibida por cicloheximida (59), y se asocia con la biosíntesis de histonas. Se han aislado enzimas acetiltransferasas citoplásmicas capaces de acetilar histonas, de características diferentes a las nucleares (60); y se han aislado péptidos nacientes de polisomas con movilidad similar a la de las histonas, identificándose el grupo acetilado como N-acetil serina (61). Cuando las moléculas de histonas entran en el núcleo celular, pueden sufrir el segundo tipo de acetilación, la de residuos internos de lisina dentro de la cadena polipeptídica. La reacción resulta en la neutralización de la carga positiva sobre el grupo ϵ -amino del residuo de lisina afectado.

Los sitios específicos de acetilación han sido identificados por estudios de secuencia de proteínas, y con el uso de histonas de varias especies. En la H4, se acetilan los residuos lisina de las posiciones 5, 8, 12, y 16 en la región amino terminal (58, 62), (ver fig. 5). La lisina de la posición 16 es el sitio principal de acetilación interna de la H4. En la H3 las posiciones son 9, 14, 18 y 23 (63, 64). H3 y H4 son las fracciones que presentan mayor grado de acetilación "in vivo", aunque también las H2a y H2b son susceptibles, pero en menor grado. La H1 no se acetila en la mayoría de los sistemas estudiados, pero en células en cultivo p.ej. CHO, sí es posible detectarlo (65).

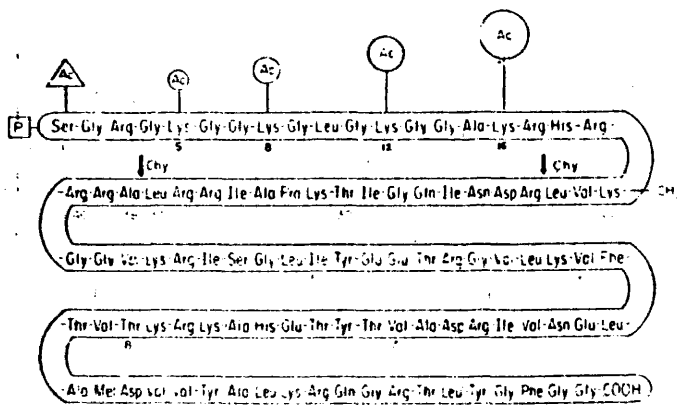


Fig. 5.- Secuencia de aminoácidos de la H₄, mostrando los sitios susceptibles de acetilación enzimática.
 ("Processing of newly synthesized histone molecules", A. Rufz Carrillo y Col. Science, Vol. 190, 10 October 1975).

Las moléculas individuales de histona con secuencias de aminoácidos idénticas, pueden diferir con respecto a su grado de acetilación. El resultado es que preparaciones puras de histonas H3 o H4 son heterogéneas internamente. Cada clase de histona comprende una mezcla de cadenas polipeptídicas, algunas de las cuales están acetiladas internamente en diferentes grados mientras que otras no lo están en absoluto. Cada una de las subfracciones pueden además diferir con respecto a otras formas de sustitución, tales como metilación o fosforilación.

La ϵ -N-acetilación de H2a, H2b, H3 y H4 sucede en la fase S del ciclo celular, en varios tejidos así como en células en cultivo. Se ha sugerido que los ciclos de acetilación y deacetilación (56), podrían ser esenciales para el ensamblaje de las nuevas histonas sintetizadas en la cromatina y para la consecución de una adaptación final correcta. Es decir, que la acetilación múltiple de los residuos lisina en las regiones más básicas de las nuevas moléculas H4 sintetizadas, al reducir la repulsión electrostática, permitiría a estas regiones asumir una conformación α -helicoidal y lograrse así un ajuste más controlado y preciso de la H4 sobre la hélice DNA (64). El modelo requiere una acetilación múltiple de cada cadena nueva sintetizada, a fin de asegurar su unión correcta al DNA.

Por otro lado, dado que el modelo del nucleosoma presenta problemas inmediatos con la transcripción, ya que la RNA-polimerasa debe necesariamente caminar sobre el DNA, es necesario postular que las interacciones histona-histona ó histona-DNA están interrumpidas, al menos temporalmente. La acetilación de los residuos de lisina en las regiones básicas de la molécula de histona, debilitaría las interacciones iónicas

entre las histonas y el DNA, de manera que el alto recambio de los acetilos, permitiría al nucleosoma restablecer interacciones críticas brevemente después de que hayan sido rotas.

El estudio de efectos directos de la acetilación de histonas sobre la estructura del DNA, han sido posibles gracias al desarrollo de métodos cromatográficos y electroforéticos, para la purificación de subfracciones de histonas que difieren en su grado de acetilación (66). La H4 de núcleos de timo de ternera ha sido separada en sus subfracciones naturales cero, mono y multi-acetiladas. Cada una de ellas fué comparada con respecto a sus interacciones con DNA, con el uso del dicroísmo circular para seguir cambios en la conformación. Los resultados indican que la forma monoacetilada de la H4 es menos efectiva que la no acetilada en la alteración de la conformación del DNA, aunque ambas se unen al ácido nucleico (67). Esta es la primera evidencia directa de que la acetilación de residuos lisina en histonas, puede alterar sus interacciones con DNA.

Por lo tanto, un cambio en la conformación del DNA como resultado de la acetilación de histonas, podía suministrar una base física para las numerosas correlaciones que hay entre acetilación y cambios en la estructura y función de la cromatina.

ASPECTOS FUNCIONALES

Cromatina activa e inactiva.-

Elucidar una estructura es fascinante por sí misma, pero para los biólogos moleculares, la cuestión central es siempre la de cual es el -

significado de una estructura dada en términos de su función. Intuitivamente, y de acuerdo con el concepto clásico de que las histonas juegan un papel en la represión no específica de la actividad genética (68,69), el empaquetamiento del DNA en nucleosomas compactos por fuerte asociación con histonas, parece excluir una transcripción eficiente por la maquinaria transcripcional.

Ya que cualquier modelo de estructura de cromatina debe en último extremo justificar, al nivel molecular, la transcripción selectiva de solo una parte del genoma, no es sorprendente que muchos grupos hayan intentado durante estos últimos años establecer si la organización nucleosomal es ubicua en el genoma. Obviamente, no se puede estudiar la estructura de la cromatina activa y compararla con la de la cromatina inactiva (inerte), sin conocer si la expresión o no expresión de un gen determinado, de un tejido o célula determinadas, está realmente relacionado de una manera directa con la regulación de su velocidad de transcripción y no con los sucesos posttranscripcionales. Por ello, conviene que brevemente mostremos alguna evidencia reciente de que al menos en algunos sistemas, la expresión genética está regulada al nivel de la iniciación del RNA.

La visualización de unidades de transcripción ribosomales activas (UTs) y su modulación a diferentes estados de desarrollo (70,71), suministra una fuerte evidencia de que la transcripción del rDNA está regulada. Otros estudios sugieren que la expresión de genes no ribosomales podía estar también regulada al nivel de transcripción, ya que se han visualizado UTs no ribosomales delimitadas por sitios de iniciación y terminación (70). Sin embargo, estos últimos resultados no excluyen que

en un organismo dado, un gen determinado (los genes para la globina u ovoalbúmina, p. ej.) pueda ser transcrito en todos los tipos celulares, y que sus RNAs transcritos sean degradados rápidamente y no se acumulen a menos que otros sucesos posttranscripcionales sucedan. Tal posibilidad no es muy consistente, al menos en el caso de los genes de la ovoalbúmina de pollo y globina, ya que las moléculas de RNA polimerasa en transcripción aparecen sobre estos genes solamente en las células donde se expresan (72). Los estudios inmunológicos de Jamrich y Col. y de Elgin y Col., los cuales muestran que la distribución de la RNA polimerasa II está correlacionada con el estado transcripcional (activo e inactivo) de un locus dado en el genoma *Drosophila*, soportan también la conclusión de que no todos los genes que pueden ser expresados en un organismo, son transcritos en cualquier momento en una célula determinada.

El aislamiento de cromatina activa es una etapa importante para estudiar su estructura, aunque este camino es materia de controvertidas discusiones científicas. Las otras dos vías son buscar genes activos en nucleosomas, y estudiar cromatina en el microscopio electrónico. J.M. Gottesfeld y Col. (73), han descrito una interesante metodología para la preparación de cromatina activa, en la que se realiza una digestión de cromatina total con DNAasa II de bazo, seguida de la precipitación de cromatina inactiva con Cl_2Mg . La cromatina soluble en Mg^{2+} contiene RNA naciente e incluye secuencias de DNA transcribibles, pero excluye secuencias de DNA inactivas. Más aún, en un rango diverso de tipos de células, la cantidad de cromatina soluble en Mg^{2+} se correlaciona con la actividad total transcripcional. La cromatina soluble en Mg^{2+} muestra la misma longitud repetitiva de DNA, 200pb, y el mismo complemento de

histonas que la cromatina inerte, lo cual implica que la repetición del DNA es una propiedad de una clase de estructuras de cromatina más bien que de una estructura única. Aunque su interpretación podía ser complicada por el hecho de que no todos los genes rDNA son necesariamente activos en un momento determinado, los estudios basados sobre digestión con nucleasa estafilocócica de la cromatina, han indicado que los genes ribosomales transcritos activamente están contenidos en la estructura nucleosomal (74). Estudios similares sobre el material cromatínico de genes transcritos o sobre genes específicos transcritos (globina y ovoalbúmina), han mostrado también que el DNA de estos genes es encontrado, tras digestión con nucleasa estafilocócica, en partículas sedimentando como los nucleosomas o en fragmentos de DNA con la longitud del corazón nucleosomal (75). Ya que las histonas son responsables de la estructura periódica repetitiva de la cromatina inerte, parece muy probable que las histonas están asociadas con genes activamente transcritos. Esta conclusión es además soportada por los estudios de Cech y Col, los cuales muestran la ausencia de largas (>400 pb) regiones de DNA libres de proteína (presumiblemente libres de histonas) en células, y por los estudios inmunológicos y bioquímicos que indican que las histonas, con la posible excepción de H1, están presentes sobre genes ribosomales y no ribosomales activos en transcripción.

Estructura del nucleosoma de genes en transcripción.-

Aunque todos los resultados antes mencionados sugieren que la cromatina en transcripción está organizada de una manera muy similar a la de la cromatina inerte, varias líneas de evidencia, bioquímicas y de mi-

croscopía electrónica, indican que los genes activamente transcritos, no están empaquetados en nucleosomas regularmente compactados como se han definido previamente.

Los genes transcritos son degradados por la DNAasa I mucho más rápidamente a fragmentos no hibridizables que los inactivos, lo cual puede ser considerado como una prueba de la estructura interna del nucleosoma. Esto fué demostrado primeramente para los genes de la globina de las células rojas de la sangre en embriones de pollo (76), y confirmado para otros sistemas con genes ribosomales y no ribosomales, y hasta para genes de adenovirus activos integrados en el genoma de células transformadas (77). En este último caso, se mostró claramente que el incremento en sensibilidad a la DNAasa I está limitado a la unidad de transcripción y quizás a unos pocos nucleosomas a ambos lados. La estructura alterada de cromatina en transcripción es revelada también por digestión con DNAasa II, la cual la ataca a una velocidad mucho más rápida que a la cromatina inactiva (78). Este hecho es la base de la metodología de fraccionamiento de la cromatina que hemos descrito antes. Los nucleosomas completos de la cromatina soluble en Mg^{2+} , sedimentan más rápido que los de la cromatina inerte. Aquellos contienen RNA y proteínas no histonas, así como histonas, y son particularmente sensibles a la DNAasa I pancreática. Otros experimentos sugieren que los nucleosomas solubles en Mg^{2+} , contienen regiones de DNA en una conformación más extendida (Gottesfeld y Col.). Bajo la acción de la RNAasa, los nucleosomas solubles en Mg^{2+} , adoptan muchas de las características estructurales de los nucleosomas inertes, así que los resultados de Gottesfeld son interpretados en el sentido de que la cromatina activa está en una estructura diferente a la inerte, pero que de alguna manera la primera es interconvertible a la -

segunda.

Similarmente, Bellard y Col. han mostrado que la subunidad cromatínica repetitiva de un gen activamente transcrito, ovoalbúmina de oviducto de gallina ponedora, es liberada más rápido por digestión con nucleasa estafilocócica que la de los genes no transcritos. No se sabe si los genes ribosomales activos se comportan igual.

No está claro todavía si la mayor sensibilidad a la DNAasa I se conserva en subunidades aisladas de cromatina en transcripción, por digestión con nucleasa estafilocócica, o si es una propiedad única de la fibra de cromatina sin digerir (75, 76). No está claro si esta mayor velocidad de digestión refleja una velocidad de corte mayor en los intervalos normales de 10 nucleótidos, o la aparición de nuevos sitios de corte, aunque para genes ribosomales activos no se han encontrado fragmentos de 10 nucleótidos (o múltiplos de 10) a cualquier tiempo (74).

Usando la técnica de Miller y Beatty (1969) (79), todos los estudios de microscopía electrónica (70, 71, 80) coinciden en la ausencia de nucleosomas sobre los genes ribosomales transcritos activamente, ya que las medidas de UTs ribosomales indican que el DNA debe estar extendido en la forma B. Sin embargo, el DNA no está de ninguna manera desnudo, sino que está asociado con proteínas básicas (Foe). Existe alguna controversia, posiblemente debida a variaciones en las condiciones de dispersión del material, sobre si los nucleosomas están presentes o no en las regiones espaciadoras. Se ha sugerido que algunas de las partículas vistas en las regiones espaciadoras, podrían ser moléculas RNA polimerasa.

Hay evidencia inmunológica de microscopía electrónica, de que las histonas permanecen asociadas con UTs no ribosomales, activas transcripcionalmente. Si los nucleosomas están presentes o no en ellas es todavía una cuestión de debate (70, 81), ya que hay dificultades en la determinación segura del cociente de compactación. Pero en cualquier caso, los segmentos de cromatina asociados con fibras ribonucleoproteicas no ribosomales nacientes, exhiben una periodicidad reducida en la estructura repetitiva cuando se compara con cromatina inactiva, y no son visibles estructuras semejantes a nucleosomas, en las UTs tan activas de los lazos de los cromosomas plumosos (Franke).

¿Cual es entonces la explicación de los resultados aparentemente contradictorios que acabamos de exponer?. De un lado, la presencia de nucleosomas sobre cromatina en transcripción, es sugerida por el encuentro de genes activos, con la misma longitud repetitiva del DNA que la de la cromatina inerte, y por la asociación de histonas con ellos. Por otro lado, estudios de digestión con DNAasa I demuestran que la estructura del nucleosoma está alterada, y las observaciones de microscopía electrónica indican que el DNA de cromatina en transcripción no está compactado en nucleosomas. La explicación de esta paradoja aparente podría basarse sobre las propiedades dinámicas de los nucleosomas abiertos: en las regiones de transcripción, la estructura compacta del nucleosoma está abierta (extendida); las histonas están presentes sobre el DNA y lo protegen en gran medida frente a las digestiones con nucleasa esta filocócica y DNAasa II, pero no contra la digestión con DNAasa I. La microscopía electrónica podría mostrarnos la presencia o ausencia de nucleosomas en la cromatina en transcripción, si el estado "in vivo" fuera

un equilibrio que pudiera ser desplazado hacia la forma extendida o la compacta, según las condiciones utilizadas para el aislamiento y visualización de la cromatina.

La existencia de una organización nucleosomal alterada en la cromatina en transcripción plantea dos cuestiones esenciales: ¿Cómo puede la RNA polimerasa transcribir el DNA con las histonas unidas todavía al mismo?, y ¿cuales son los mecanismos que promueven la apertura del nucleosoma?. Las respuestas a ambas no están elucidadas ni mucho menos. Respecto a la primera cuestión, aunque los resultados actuales y los de Mirzabekov y Col. soportan el modelo de Weintraub y Col. (1976), queda todavía mucho por hacer.

Respecto a la segunda, a pesar de los numerosos candidatos, no tenemos todavía ninguna información clara identificando los factores responsables de la inducción, y mantenimiento de una conformación nucleosomal activa alterada, localizada en regiones de la cromatina muy específicas por cambios estructurales, ¿Preceden o resultan del proceso transcripcional?. Parece improbable que los componentes de la maquinaria de transcripción sean los responsables de tal conformación nucleosomal alterada.

Las observaciones de microscopía electrónica de Foe y Franke sugieren, al menos en el caso de las UTs ribosomales: la transición de una estructura compacta nucleosomal a la de una fibra desorganizada y extendida de 70 Å, podía preceder la iniciación de la transcripción. Además, la sensibilidad a la DNAasa I de los genes no ribosomales en transcripción, no está correlacionada con la velocidad de transcripción (82), y en el

caso de la ovoalbúmina, parece ser reténida incluso después de acabada la transcripción. Similarmente, la distribución de algunas proteínas no histónicas en cromosomas politénicos de *Drosophila* ha sugerido a Elgin y Col. que los loci que serán, son, o han sido activos en la transcripción en un periodo de desarrollo determinado, pudieran tener un estado de cromatina diferente del de la cromatina inerte, nunca transcrita. Sin embargo, la generalidad de un modelo estructural que sería necesario, pero no suficiente, para permitir la transcripción, es cuestionable a la vista de los resultados de Camerini, Otero y Col., los cuales no concuerdan con el reportaje previo de Weintraub y Groudine (1976) de que los genes de globina, son digeridos específicamente por la DNAasa I en núcleos de eritrocitos maduros, donde ya no son transcritos.

Además de los componentes de la maquinaria de transcripción, otros muchos factores potenciales podían estar implicados en tal alteración estructural de nucleosoma activo. Las subunidades activas están muy enriquecidas en proteínas no histónicas (78), y hay evidencia circunstancial inmunológica y bioquímica, de que algunas proteínas no histónicas específicas podían estar implicadas, incluyendo las proteínas HMG (83, 84).

Un fuerte candidato son, por supuesto, las modificaciones de histonas, especialmente acetilación y fosforilación, ya que hay muchas correlaciones entre estas modificaciones y cambios de actividad en cromatina (85, 86), como veremos en el siguiente apartado. La mayoría de estas modificaciones suceden, como sabemos, en las regiones NH_2 -terminales de las histonas y podían estar implicadas por consiguiente en la mayor sensibilidad a la DNAasa I, ya que la eliminación de los extremos NH_2 -ter

minales con tripsina, aumenta la velocidad de digestión con DNAasa I. La acetilación "in vitro" de la cromatina incrementa drásticamente su susceptibilidad a la digestión con DNAasa I (86). Por otro lado, Allfrey y Col. han encontrado que la sensibilidad a la DNAasa I de la cromatina altamente acetilada de células HeLa tratadas con butirato (87) es incrementada, y que su digestión libera preferencialmente subunidades enriquecidas en histonas acetiladas.

Acetilación de histonas y cromatina activa.-

Como acabamos de decir, un candidato óptimo para interrumpir las interacciones histona-histona o histona-DNA, al menos temporalmente, y permitir el paso de la RNA polimerasa a través del nucleosoma, es la modificación de las histonas, o por fosforilación o por acetilación.

La fosforilación de histonas se da principal y extensivamente en tres fracciones de histonas en células en división, pero solamente en un pequeño grado en las células que no se dividen. Más aún, la principal histona modificada es H1, la cual no se encuentra dentro del nucleosoma. Además, todos los estudios han indicado que la fosforilación de histonas en la interfase y su subsiguiente recambio, suceden a velocidades relativamente bajas (así la $t_{1/2}$ para la hidrólisis de los fosfatos de la H1 es de 4-5 horas (88). La fosforilación de la H1, por consiguiente, no parece ser un candidato muy prometedor.

La acetilación de histonas ocurre en una forma metabólicamente muy activa sobre todas las histonas nucleosomales. La modificación es rápida y es igualmente eliminada con gran velocidad (3-30 minutos), de manera que permite al nucleosoma reestablecer interacciones críticas breve-

mente después de que hayan sido rotas. El nivel en equilibrio dinámico de la monoacetilación, puede llegar a afectar al 30-40% de las histonas totales según el tejido. Ciertamente, al menos 40% de todas las moléculas H3-H4 aparecen modificadas durante un intervalo de 10', un grado de modificación mucho más grande del que sería esperado, si ocurriera solamente en la región de genes activos (89). La modificación más extensiva sin embargo, con 3-4 grupos acetatos por histona, ocurre en una fracción mucho más pequeña de las histonas totales y podía ser un candidato para permitir la transcripción en genes activos. Además, se podría esperar que las histonas más altamente modificadas interaccionasen mucho menos fuertemente con DNA, y tal clase de modificación podría por consiguiente tener un papel más efectivo en cambiar la estructura de la cromatina. Desde el descubrimiento de la acetilación de histonas "in vivo" en 1964 (90), han sido encontradas numerosas correlaciones con la capacidad de síntesis de RNA en tipos de células de diferentes especies y filos. Así, desde linfocitos de ternera (91) hasta las células del gusano de la harina Planococcus citrii, en el cual los cromosomas maternos genéticamente activos, incorporan siete veces más acetato radiactivo que los cromosomas inactivos del juego paterno (92). En las células del protozoo Tetrahymena pyriformis, el macronúcleo y el micronúcleo contienen complementos de histona equivalentes, pero algunas de las histonas del macronúcleo, activo en la síntesis del RNA, aparecen en sus formas acetiladas, mientras que en el micronúcleo inactivo no lo están (93).

Aparte de tales correlaciones espaciales, hay numerosos ejemplos de una mayor acetilación de histonas en los estudios tempranos de la activación genética; p.ej. en linfocitos estimulados por mitógenos como la

fitohemaglutínina (94), en hepatocitos durante la regeneración del hígado tras hepatectomía parcial (95), y en diferentes células endocrinas blanco tras la estimulación por la hormona apropiada (96) (estrógenos sobre útero de rata, aldosterona sobre riñón). En todos los casos, el incremento de la acetilación de histonas precede un incremento en la síntesis de RNA.

Si bien de estas evidencias, no se puede concluir que la acetilación de histonas sea, por sí sola, causa suficiente para la inducción de la síntesis de RNA. Así, en el caso de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina, si se bloquean con cortisol, se inhibe la síntesis de RNA mientras que la acetilación de histonas continúa (97). También se han observado casos en los que no se da esta correlación temporal; así, cuando se estudia comparativamente la acetilación de la cromatina nucleolar y extranucleolar en células de hepatoma, que difieren notablemente en cuanto a capacidad de transcripción, no se encuentran diferencias en cuanto al grado de acetilación (98). Por ello, se ha postulado que los cambios producidos en la estructura de la cromatina a través de la acetilación de histonas, sería un prelude para que reacciones más específicas puedan después iniciar la síntesis de RNA en genes particulares (99).

Inversamente, hay también correlaciones entre la deacetilación y la inactivación genética. P.ej. en las células espermáticas maduras del equinodermo Arbacia lixula, que son incapaces de sintetizar RNA, las histonas H3 y H4 están totalmente en las formas no acetiladas (100, 101); en cambio, si están parcialmente acetiladas en las células espermáticas precursoras. En los núcleos de eritrocitos de aves hay un decrecimiento

progresivo en la proporción de moléculas de histonas acetiladas, a medida que las células maduran y pierden su capacidad para la síntesis de RNA (66).

En la inactivación de los núcleos de hepatocitos por el carcinógeno aflatoxina B1, uno de los hechos que suceden primero es una pérdida de acetato de las moléculas de histona acetiladas previamente; ello sucede en los 15' siguientes a la inyección del carcinógeno (102) y es seguido por la supresión de la síntesis de RNA. En células de cultivo (fibroblastos), se ha observado una disminución en la velocidad de acetilación de histonas con el envejecimiento del cultivo (103).

Aunque estos estudios demuestran por lo tanto una fuerte correlación entre la acetilación de histonas y una mayor capacidad sintética de RNA, ambos hechos son todavía correlativos. Esta correlación debe ser todavía demostrada, mediante "tests" directos del efecto de la acetilación de histonas sobre la estructura de la cromatina.

Los esfuerzos dirigidos a este propósito presentan ya dificultad de encontrar el sistema biológico adecuado. Es el constante problema de la Bioquímica.

Para empezar, se ha hecho uso de la acetilación química de la cromatina utilizando anhídrido acético (104) o adenilato de acetilo (105). Mediante estos tratamientos se logra acetilar las histonas y en función de las condiciones del tratamiento, puede lograrse un grado de acetilación comparable en extensión con el enzimático.

Con cromatina acetilada químicamente con anhídrido acético, Marushige (106) ha encontrado una estimulación de la velocidad de elongación

durante la transcripción de la cromatina. Otros investigadores (107) han reportado también un incremento en el número de sitios disponibles para iniciación. En ambos casos, la habilidad de la cromatina para soportar la síntesis de RNA fué ensayada con RNA polimerasa de E. Coli.

Por otro lado, con esta misma cromatina se han detectado unas mayores velocidades de digestión por DNAasa I y nucleasa estafilocócica (86).

Sin embargo, en la acetilación química no se logra la alta especificidad de sitio que se consigue enzimáticamente (108), y podría por consiguiente cuestionarse si estos estudios tienen alguna relevancia para los procesos "in vivo". Por lo tanto, un obstáculo importante para el estudio del papel de la acetilación de histonas en la función celular, ha sido la imposibilidad de aislar cromatina conteniendo histonas acetiladas extensivamente y que hayan sido modificadas en los sitios correctos. La observación reciente de Riggs y Col (1977) (87), de que el tratamiento de células HeLa o de eritroleucemia de Friend con bajas concentraciones de n-butilato sódico, conduce a una acetilación extensiva de H3 y H4, ha permitido una posterior evaluación del papel de la acetilación de las histonas ricas en arginina en la estructura cromatínica. N-butilato sódico tiene diversos efectos sobre varios tipos de células incluyendo, en al menos un caso, la activación de un gen específico (109). El tratamiento con butirato bloquea también la síntesis de DNA (110) y la división celular (111). Finalmente, produce una hiperacetilación de las histonas H3 y H4, principalmente a través de una inhibición no competitiva (112) de las actividades deacetilantes. Todos estos efectos son completamente reversibles, si se elimina el butirato del medio.

OBJETIVOS

Objetivo del trabajo

El objetivo general de nuestro trabajo era el de contribuir al entendimiento de las interacciones proteína-DNA. Al habernos centrado sobre las interacciones DNA-proteínas nucleares (histonas esencialmente), hemos entrado en un campo donde las resultantes de tales interacciones, podían tener profundas implicaciones fisiológicas en la célula, influir sobre la expresión genética.

La cromatina por lo tanto, se ofrece como un material ideal para estudiar aspectos estructurales y funcionales. Por ello, nuestro objetivo ha sido doble:

a/ Caracterización de las condiciones que afectan las interacciones DNA-histona "in vitro", en base a una metodología fluorométrica.

Esta técnica, basada en la detección microfluorométrica del DNA retenido en filtros de nitrocelulosa a través de las proteínas con las que haya interactuado, presenta las ventajas de su independencia frente al marcaje radiactivo de DNA, y de su sencillez.

b/ Estudio de la influencia de la acetilación de histonas sobre los procesos de transcripción "in vitro", en base a un sistema biológico de condiciones lo más fisiológicas posibles, como es el de los núcleos.

El sistema de núcleos aislados a partir de sus células, ofrece grandes ventajas fisiológicas. Nos permite utilizar las actividades enzimáticas endógenas de acetilación de histonas y transcripción. Por otro lado, mantiene la mayoría de las proteínas reguladoras nucleares de la célula. Es quizás, el mejor sistema manejable bioquímicamente

para acercarse a comprender la realidad "in vivo".

En resumen, hemos intentado una síntesis de los aspectos estructurales y funcionales de las interacciones histona-DNA, en base a la influencia del posible papel regulador en la expresión genética de una modificación química de las histonas, la acetilación. Ello nos ha exigido la puesta a punto y desarrollo de una compleja metodología en conjunto.

METODOLOGIA

Lista de tampones

Tampón N	Tris-ClH	10 mM, pH 8
	sacarosa	0,25 M
	Cl ₂ Mg	5 mM
Tampón N'	Tris-ClH	10 mM, pH 8
	Sacarosa	2,2 M
	Cl ₂ Mg	5 mM
Tampón R	Tris-ClH	10 mM, pH 8
	Sacarosa	0,25 M
	DTT	0,5 mM
Tampón C ₁	Tris-ClH	10 mM, pH 8
	Glicerol	12,5%
	DTT	0,5 mM
	EDTA Na	0,1 mM
Tampón L	Tris-ClH	10 mM, pH 8
	Acetato Mg	2 mM
	Cl ₂ Ca	3 mM
	DTE	0,5 mM
Tampón H	Tris-ClH	10 mM, pH 7,5
	Cl ₂ Mg	1,5 mM
	ClK	10 mM
Tampón C ₂	Sacarosa	30%
	CO ₃ HNa	22 mM
	CO ₃ HK	13 mM
	PO ₄ H ₂ K	14 mM
	Cl ₂ Mg	5 mM
	Cl ₂ K	90 mM
	DTE	1 mM
Tampón AM	Acetato Na	50 mM, pH 5,1
	Cl ₂ Mg	5 mM
	Cl ₂ K	25 mM
	SDS	2%
Tampón EF	Tris-ClH	40 mM, pH 7,6
	acetato Na	20 mM,
	EDTA Na	2 mM

Preparación de DNA nativo, desnaturalizado y fragmentado.-

El DNA se obtiene de fuentes comerciales (Worthington, Sigma o Boehringer). Se cuantifica por pesada aproximada y se disuelve en agua destilada u otro disolvente por agitación continua durante 24 horas.

La cuantificación exacta de estas soluciones se realiza por espectrofotometría, considerando que 1 mg/ml de DNA da una absorción de 24 unidades ópticas a una longitud de onda de 260 nm.

El DNA desnaturalizado se obtiene calentando a ebullición una solución de DNA nativo durante unos 15 a 20', y enfriando rápidamente en hielo. A continuación se pasa por una columna de HAP y se eluye con un tampón fosfato potásico (113).

La fig. 6 muestra la separación que se logra de las fracciones desnaturalizada y la que continúa en doble banda, a pesar del tratamiento térmico aplicado.

El DNA fragmentado se obtiene mediante fragmentación mecánica en "VirTis" (114), a distintos nº de minutos y velocidades de tratamiento. El DNA se suspende en un tampón adecuado, con acetato Na y glicerol. Tras la fragmentación, se precipita con 2 vol de etanol a -20°C toda la noche. Se pasa luego por una columna de Biogel A 50 p. ej., siguiéndose el perfil de elución mediante absorción a 260 nm de las fracciones.

Preparación de proteínas.-

Las proteínas se obtienen de fuentes comerciales (histonas y BSA de Sigma). Las proteínas se disuelven en el disolvente adecuado y se cuantifican mediante la reacción de Lowry (115), o por medida espectrofotométrica.

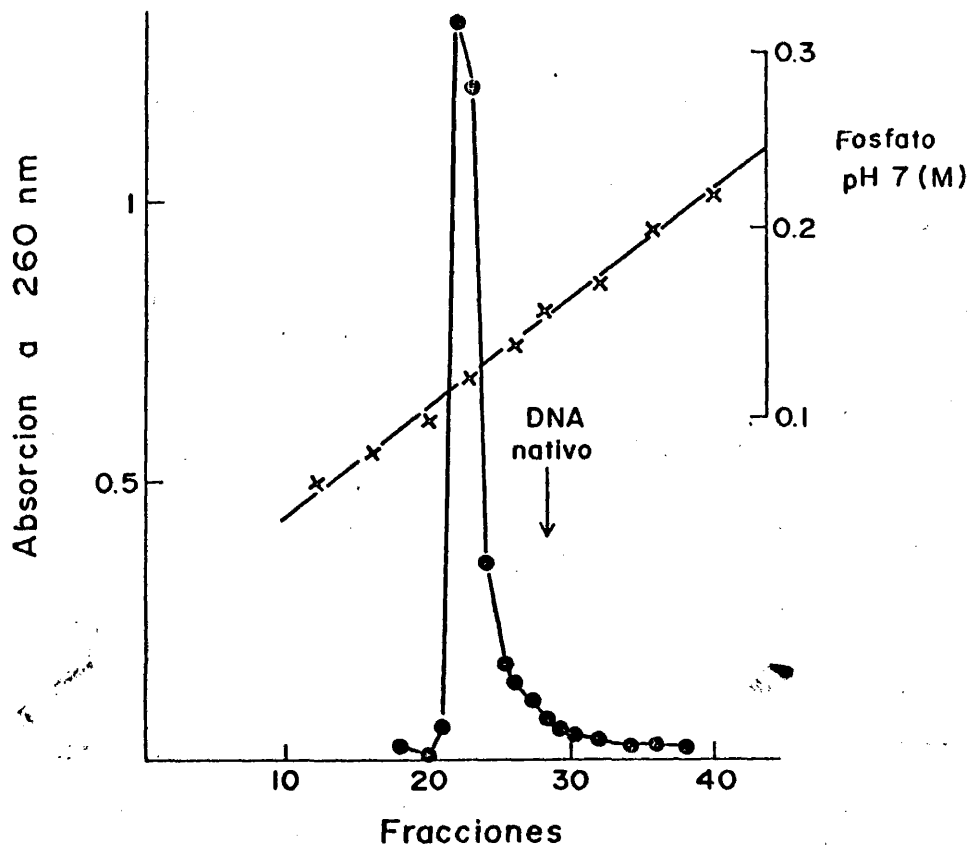


Fig. 6.- Aislamiento de DNA de banda sencilla en hidroxapatito.

métrica. En este último caso se considera que para las histonas, 1 mg/ml da una absorción de 3,5 unidades ópticas a una longitud de onda de 230 nm.

Histonas nativas: fraccionamiento.-

El fraccionamiento de las diversas histonas se ha logrado siguiendo el procedimiento de extracción de Johns (116, 117) a partir de timo de ternera. La fracción que contiene la H3 se repurificó por cromatografía de afinidad en Sepharosa 4B organomercuriada (118, 119), ya que esta histona es la única con grupos sulfidrilo por los que interaccionaría con la resina.

La fig. 7 muestra los diagramas electroforéticos obtenidos para algunas de las histonas. Su índice de pureza ronda el 95%.

Histonas acetiladas químicamente: obtención.-

Histonas de fuente comercial se acetilaron químicamente con H³-anhídrido acético siguiendo el procedimiento de Simpson (104). Aplicando el método de la fluorescamina desarrollado por Castell y Col. (120), en el que este reactivo reacciona con los grupos amino libres, hemos estimado que alrededor de un 35% de los grupos aminos fueron acetilados.

La repurificación de las histonas acetiladas, a fin de eliminar la radiactividad contaminante, se realiza haciendo la solución 0,2 N ClH, y precipitándola con acetona a -20°C. El precipitado se lava con acetona también.

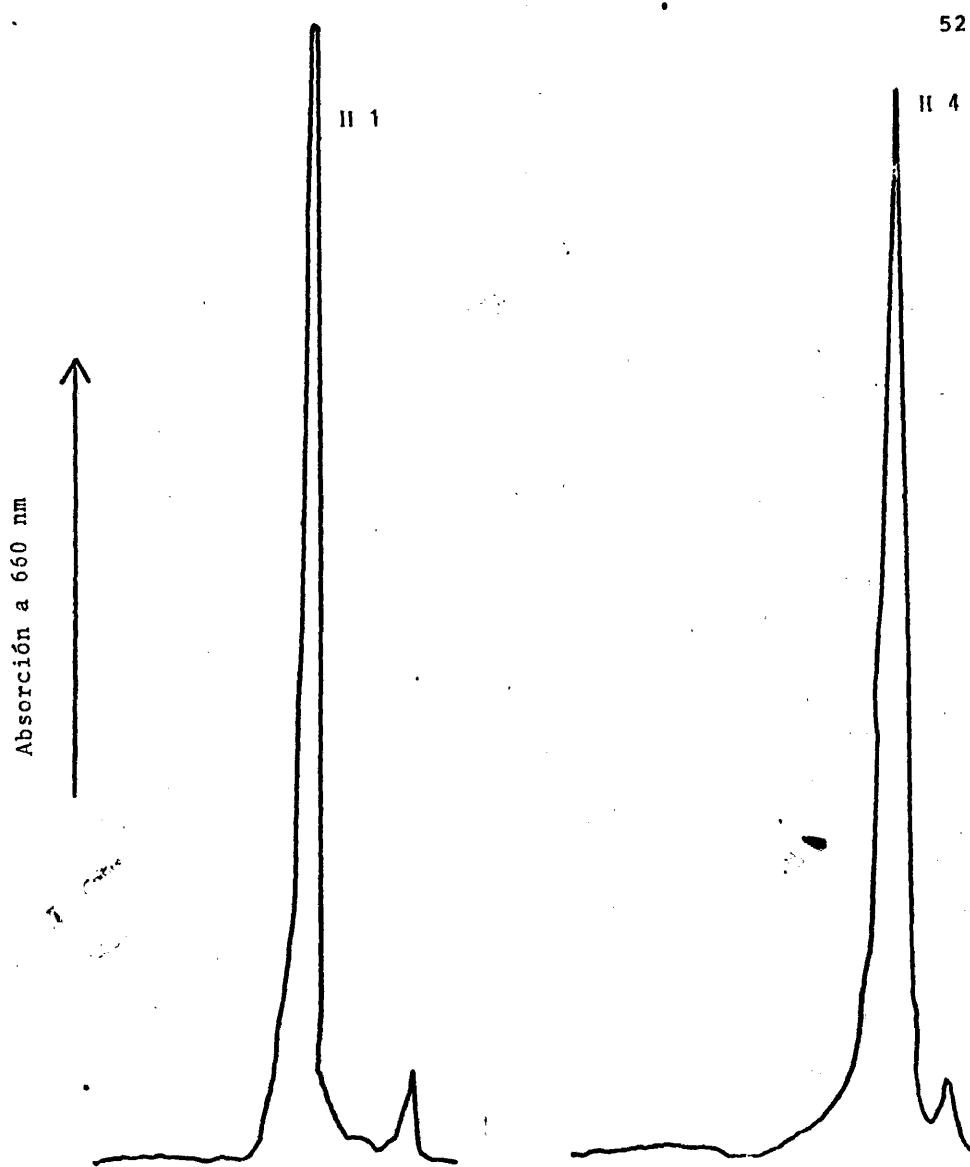


Fig. 7.- Registro gráfico de los electroforegramas de histonas de tipo H1 y H4.

Medio de interacción proteína-DNA.-

Se preparan mezclas de reacción de 1 ml con los siguientes componentes:

DNA: 5 µg
 Histonas o protaminas: 1 µg-20 µg
 BSA: 40 µg
 Tris 10 mM, pH 7: 10 mM
 Cl₂Mg: 1 mM
 EDTA Na: 0,1 mM

Se permitía luego que se diera la interacción, durante tiempos variables que se indican. La T^a de reacción eran la ambiental o la de 0°C en hielo, tal y como se indica en cada caso.

Medida de actividades proteolíticas.-

La actividad proteolítica se mide con un método extremadamente sensible, basado en la fluorescamina (120). La mezcla de reacción contiene por ml: 25 µg de protamina.

10 mM de tampón fosfato potásico, pH 7.

6,5 µg de DNA o cantidades equivalentes (sobre la base del volumen) del extracto con las proteínas.

A los tiempos apropiados, alícuotas de 100 µl son transferidas a viales de cristal pequeños, diluidas con 100 µl de tampón borato 0,05 M, pH 8,5 y hechas reaccionar con 100 µl de fluorescamina (Fluka), 0,03% en acetona.

Después de diluir con 2 ml de agua bidestilada, la fluorescencia

resultante es leída en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer a 375 nm y 475 nm para las longitudes onda de excitación y emisión, respectivamente.

Determinación de DNA en núcleos con DABA.-

Aplicando el DABA a un sistema de retención en filtro de células enteras, Cattolico y Gibbs (124) determinaron el contenido de DNA celular. Nosotros hemos aplicado la misma metodología para la medida de DNA en nuestros núcleos. Tras ser filtrados a través de un filtro Millipore, 0,45 μ m, se lavaban con TCA 5% y etanol: agua (2:1). A continuación se siguen los mismos pasos que para la detección del DNA en los complejos proteína-DNA retenidos en filtro.

Sistema de retención en filtro.-

A los tiempos deseados se filtraba por un filtro (121, 122) Millipore 0,45 μ m, especialmente acoplado en una unidad múltiple de filtrado, y se seguía de 2 lavados con el mismo tampón en que se había realizado la interacción, más otros dos de una mezcla de etanol: agua (2:1). A continuación se colocaban los filtros sobre los fondos de vialitos pequeños y se secaban en estufa a 60°, o bien en desecador con sulfúrico durante una noche. De una solución de DABA en agua destilada de 0,2 g/ml, se depositan sobre cada filtro 100 μ l, cantidad suficiente para cubrirle. Los vialitos tapados se incubaban a 60°C, 30', en un baño de agua termosta-

tizado. A continuación se dejaban enfriar durante unos minutos, añadiéndose luego a cada vial 2 ml de una sol. de ClH 1N en agua bidestilada. Este volumen de líquido es el que se traspasa a una cubeta apropiada para su

lectura espectrofluorométrica.

Preparación del ácido diaminobenzoico (DABA).-

El DABA se prepara en su forma clorhidrato siguiendo el procedimiento Cattolico y Gibbs (124).

Las medidas espectrofluorométricas se realizan en un espectrofluorómetro Perkin Elmer modelo 204 a unas longitudes de ondas de excitación y emisión de 385 y 500 nm respectivamente, que son los óptimos que hemos deducido de los espectros de excitación y emisión.

Obtención de células (hepatocitos, líneas celulares).-

Hepatocitos a partir de hígado de rata.

La metodología siguiente se desarrolló gracias a la desinteresada aportación teórica y práctica de Amelia Nieto. Un hígado procedente de una rata de tamaño medio, se anestesió con Nembutal (6 mg/100 g). Tras sujetarla convenientemente en decúbito supino, se le pela con unas tijeras la parte interior del muslo descubriendo la femoral, por la que inyectamos heparina. A continuación se abre la pared del abdomen hasta el diafragma, mostrándose la vena porta. Esta y la cava se canulan, acoplándose a un sistema de perfusión con la siguiente solución: ClNa: 0,77 M, ClK: 30 mM, PO₄H₂K: 8 mM, SO₄Mg: 8 mM, CO₃HNa: 16 mM y glucosa: 10 mM. Tras unos minutos de perfusión se añade colagenasa al tampón y se perfunde 15' más. Tras estos, se extrae el hígado de la cavidad abdominal, eliminándose la cápsula mediante unas pinzas. La resuspensión del hígado ya descapsulado en el tampón de incubación (semejante al de perfusión, más Cl₂ Ca 2,5 mM) se realiza por simple agitación o ayudados de una varilla.

Se realizan dos lavados de las células con el tampón de incubación, a 50 g x 1'. El precipitado final se resuspende en el tampón de incubación anterior, añadiéndose además piruvato 0,1 mM y lactato 1 mM. Se colocan los matraces en los que están las células en un baño a 37°C, con agitación. Cada 60' se toman muestras para extracción con SO_4H_2 0,4 N y para estudio de viabilidad con azul Tripan 0,4%. Cada 60' también se gasea la suspensión con O_2 puro durante 2'.

Células HeLa.-

Los cultivos de células HeLa en monocapa han sido proporcionados por el Dr. Tabarés y Mari Paz Cardona del Dpto. de Microbiología de esta Facultad. Tras su inculación a un medio nuevo para subcultivo se incuban 48-72 horas, tras las cuales estaban las células ya casi confluentes formando una monocapa.

Obtención de núcleos y cromatina.-

a) Obtención de núcleos en células hepáticas.

Siguiendo en lo esencial a Pomerai y Col (125), hemos elaborado el siguiente protocolo para la obtención de núcleos y cromatina a partir de hígado de rata:

hígado de rata (12 g)

- homogeneización en 40 ml
de tampón N.
- filtración por una doble
gasa con lana de vidrio
- centrifugación 15' x 1000g. 0°C

precipitado

- homogeneización en 15 ml del tampón N y 0,1% Tritón X-100
- dilución con 4-5 volúmenes del tampón N'.
- deposición sobre tubos de centrifuga con el mismo medio N'.
- centrifugación 60' x 100.000 g

precipitado nuclear ——— resuspensión en tampón R.

- homogeneización breve en 30 ml del tampón C₁.
- centrifugación 15' x 15.000 g, 4°C.

precipitado cromatina ——— resuspensión en el tampón C₁.Obtención de núcleos de c. HeLa.

Siguiendo a Bombik y Col (126) en base al siguiente esquema:

resuspensión de células

- centrifugación 800 g x 5'

precipitado

- lavado 2 veces con tampón fosfato salino pH 7,2.
- lisis con homogeneizador
- adicción de triton 0,25% (10').
- centrifugación 800 g x 5'

precipitado nucleico

- lavado con el tampón anterior + sacarosa 0,25 M (2 veces)
- centrifugación 800 g x 5'.

precipitado nucleico parcialmente purificado

- resuspensión en el tampón con sacarosa 0,25 M.
- deposición sobre el tampón con sacarosa 0,88 M.
- centrifugación 1.200 g x 10'

precipitado nucleico purificado.

Este sistema es adecuado para la obtención de unos núcleos lo más limpios posibles de material citoplasmático, en vistas a análisis de proteínas nucleares. La utilización del detergente Triton x-100 llega a eliminar, incluso, la membrana más externa del núcleo. Sin embargo, cuando se trata de cuantificar la capacidad endógena de transcripción no es conveniente su uso, pues aquella se ve sensiblemente afectada (127). Para este objetivo nos decidimos por la metodología desarrollada por Di Girolamo (127).

resuspensión de células

| centrifugación 800g x 5'

precipitado

| lavado una vez con el medio de crecimiento (medio Eagle, modificado por Dulbecco + 10% suero fetal de ternera).

precipitado

| resuspensión en tampón hipotónico H ($\approx 5 \times 10^6$ células/ml)
(10' en hielo)

| lisis por homogeneización

| adición de medio C₂

| centrifugación 350g x 10'

precipitado nuclear (resuspensión en medio C₂)

Sistema endógeno de acetilación de histonas en células enteras y núcleos aislados.-

En células enteras

En cultivos de células HeLa se procede a la acetilación de histonas mediante la utilización de butirato Na en el medio.

En 1978 (128) se ha descrito que entre otros efectos, este ácido graso de cadena corta tiene el de inhibir las actividades deacetilasas para las histonas. Es por ello un truco fisiológico, que nos permite obtener un alto grado de acetilación de las histonas en la propia célula. A tal fin, tras 72 horas a 37°C de cultivo celular, se añade al mismo de una solución estéril de butirato Na para lograr una concentración final de 7 mM ó más alta (128). Se incuban otras 24 horas más y se procede a la recolección de las células con ayuda de una varilla de vidrio cubierta de goma. Cuando se quiere seguir radiactivamente la acetilación, antes de recoger el cultivo (p. ej. 1/2 hora antes) se le añade H³-acetato, o bien se sedimentan previamente las células de una parte del cultivo resuspendiéndose en un medio nuevo con H³-acetato, e incubándose un tiempo más.

En núcleos aislados

Cuando se han utilizado estos (así con los de hepatocitos); se procede a su incubación en el tampón R de suspensión con ¹⁴C-Acetil Co-A durante 60' y a la T^a de 37°C (129).

Extracción de histonas.-

Sobre los núcleos se procede a la extracción de histonas utilizando SO₄H₂ 0,4 N. Tras una homogeneización en este medio se deja en hielo una hora, agitando de vez en cuando, tras la cual se realiza una centrifugación de 5000 rpm x 10', quedando las histonas en el sobrenadante.

Sobre este sobrenadante añadimos 4 volúmenes de etanol o TCA para que quede al 20%, y lo dejamos una noche en el congelador a -20°C . Se realiza una centrifugación de 15.000 rpm x 10', obteniendo un precipitado de histonas que lavamos con acetona un par de veces. El último precipitado se deja secar en una campana de desecación en vacío.

Análisis de las histonas enzimáticamente modificadas.-

El análisis de estas proteínas se realiza en geles de poliacrilamida en tubo, según Panyim y Chalkely (130).

Se trata de geles largos de 22 cm. de longitud, a fin de favorecer una buena separación de las distintas histonas y el discernimiento entre las bandas electroforéticas que corresponden a las formas multiacetiladas para cada histona.

Son geles de poliacrilamida 15% en acético-2,5 M urea, preelectroforetizados varias horas para eliminar iones. La muestra de histonas se disuelve en un disolvente con acético, urea, MET y glicerol. La electroforesis se realiza a 1-2 mamp/tubo hasta que el citocromo C migre en tubo aparte 3/4 del gel, pues está descrito que su migración es semejante a la de la histona H₂a. Se extrae el gel y se tiñe con "amido black" durante al menos 5 horas. La destinción se realiza en acético 7,5% y etanol 40%.

La densitometría del gel se realiza a 610 nm de longitud de onda.

Sistema endógeno de transcripción con células enteras.-

Cuando nos ha interesado estudiar la transcripción en células ente

ras como en el caso de las células HeLa, hemos procedido a la adicción al medio que bañaba la monocapa de estas células de H^3 -uridina, volviendo a incubar a $37^\circ C$ durante los tiempos que nos interesaban.

Sistema endógeno de transcripción en núcleos aislados.-

La transcripción en núcleos aislados se sigue por la incorporación radiactiva de H^3 -UTP en material ácido precipitable (TCA 5-20%), y por consiguiente retenible en filtro de fibra de vidrio GFC. Los núcleos se resuspenden en la concentración deseada (normalmente 0,25-1 unidad de A260 por 200 μl de vol. final de reacción) en la solución de transcripción.

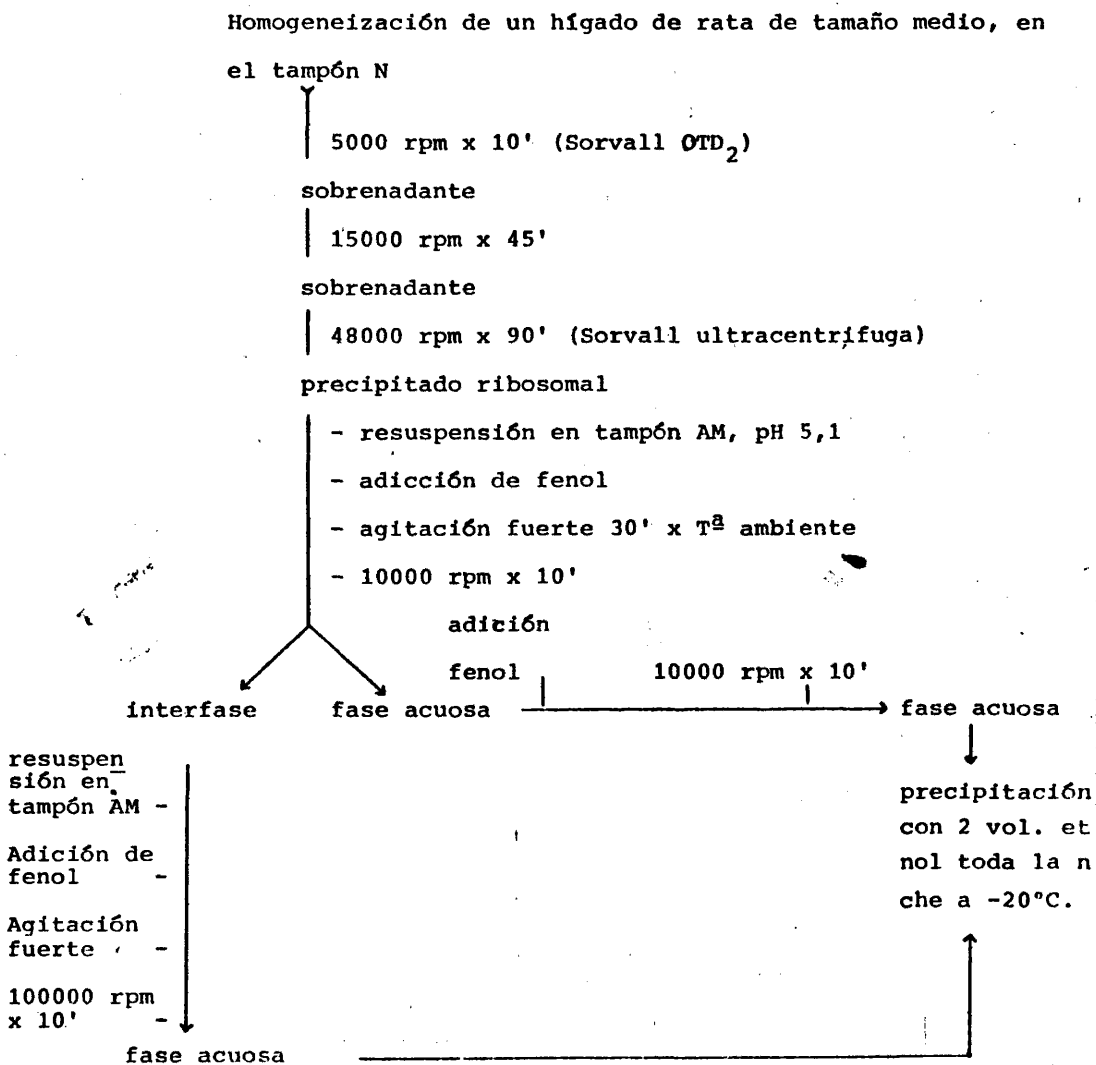
En esta las concentraciones finales para núcleos de hígado de rata son (125): Tris-ClH pH 8, 25 mM; $SO_4(NH_4)_2$ 0,25 M; ATP, CTP y GTP, 0,25 mM, UTP: 0,05 mM; DTE: 0,5 mM; Cl_2Mn ; 2 mM; macaloide, adsorbente de nucleasas (131): 0,2%; H^3 -UTP: 10 μl /200 μl vol. reacción, de H^3 -UTP Sigma, 82×10^{-6} mM, y una actividad específica de 12,2 Ci/nmol.

Cuando se han utilizado núcleos de células HeLa, las incubaciones se han hecho en el medio C_2 ya descrito. Las concentraciones de los nucleótidos son de 0,1 mM, excepto para H^3 -UTP que es de 0,001 mM (127). Se realizan las incubaciones a los tiempos deseados, a $37^\circ C$ ó $26^\circ C$, parando la reacción por la adicción de TCA. Durante todo el proceso de transcripción y extracción de RNAs, puede utilizarse dietilpirocarbonato al 0,01% como inhibidor de nucleasas.

Extracción de ácidos nucleicos: De rRNAs a partir de ribosomas.-

Con fines analíticos de determinación de tamaños moleculares de

RNAs transcritos, utilizamos como marcadores los rRNAs 28 y 18 S, y el 4S tRNA, este último comercial (Boehringer, de levadura). Aquellos se extrajeron apartir de ribosomas de hígado de rata, según el siguiente protocolo (132):



De RNAs transcritos a partir de células o núcleos.-

Según Wilkinson y Col. (133):

Precipitado nuclear o celular

- acetato Na 10 mM, pH 5,1 (5 ml)
- Cl Na 0,15 M
- SDS al 0,3% final
- homogeneización
- fenol/cresol/hidroxiquinolina (5 ml)
- 8' x 60°C y 15' de agitación
- 10 K x 5'

fase acuosa más interfase

- fenol/cresol/hidroxiquinolina (5 ml)
- 2' x 60°C y 5' de agitación x 2 veces
- 10 K x 5'

fase acuosa

- 2 vol. | etanol 95%
- | acetato Na 2%
- precipitación toda la noche a -20°C
- 15 K x 15'

precipitado RNAs

- 2-3 lavados con | etanol 75%
- | acetato Na 1%
- ↓
- 15 K x 15'

precipitado RNAs

Cuando se han utilizado los nucleotidos SH-γ-ATP ó SH-γ-GTP, en la transcripción, a fin de poder medir iniciación, se ha recurrido a un pro

cedimiento especial de extracción (134), dada la estabilidad de los grupos -SH:

Medio de transcripción

dilución de 10 veces para lograr unas concentraciones finales

de acetato sódico 0,1 M pH 5

EDTA 10 mM

SDS 0,1%

extracción de RNAs con un volumen de fenol saturado en agua: cloroformo (1:1), en hielo, 15'-20'. Agitación intermitente en "Vortex" durante unos segs.

centrifugación de 10 K x 5'

fase acuosa

- se hace Tris-ClH 0,1 M, pH 7,9

- precipitación etanólica usual

RNAs

Todo el material de vidrio se esteriliza, así como las soluciones, en estufa o autoclave.

Aislamiento y cuantificación de los RNAs iniciados.-

Utilizando la cromatografía de afinidad, es posible mediante columnas de agarosa-Hg retener los RNAs que hayan iniciado durante la transcripción, siempre que en el medio de incubación figuren HS- γ -ATP ó HS- γ -GTP (134).

La columna de agarosa-Hg se prepara como ya se ha descrito para la purificación de la histona H₃.

Previamente al pase de los RNAs transcritos aislados por la columna de afinidad, conviene una previa eliminación de cualquier sal y nucleotidos contaminantes, mediante un pase previo por una columna de Sephadex G-10 p.ej.

La elución en la columna de agarosa-Hg de los RNAs unidos, y por consiguiente iniciados en su transcripción, se logra añadiendo 10 mM DTT o DTE al tampón de elución.

La elución de las columnas puede seguirse por cuentas, tomando una alícuota de cada fracción directamente sobre un filtro y posterior recuento, con líquido de centelleo, de radiactividad.

Las columnas son recuperables mediante lavados con los tampones adecuados.

Análisis de los RNAs transcritos.-

Siguiendo a Peacock (135) se preparan con tubos de electroforésis de cuarzo, geles de poliacrilamida (2,4%)-agarosa (0,6%), a partir de la siguiente mezcla:

Acrilamida 20%	Acrilamida 19 g/100 ml	2,4 ml.
	Metilbisacrilamida 1 g/100 ml	
Agarosa.....	120 mg en 12,6 ml H ₂ O, 20' a ebullición, luego en un baño a 40-45°C.	
Tampón EF (x 10).....		2 ml
Glicerol, 100%		2 ml
TEMED		0,02 ml
Persulfato fresco.(1%).....		1 ml(0,05% final)

Antes de añadir el persulfato se desgasea la mezcla en una bomba de vacío durante 1'. Se añade el persulfato y rápidamente se procede al llenado de los tubos, ya convenientemente limpios, y colocados en posición vertical. Se tienen en el frigorífico durante 90'-120', en los que se da la polimerización. A continuación ya se pueden utilizar.

A veces es necesario insertar en el interior de la parte inferior una arandelita de goma a fin de evitar que el gel se salga, lo que tiende a ocurrir mientras más baja es la concentración de acrilamida. Se procede con ellos a una preelectroforésis durante varias horas en el tampón EF + 0,30% SDS, y a 6 mamp/tubo. Para el análisis de RNAs se procede a resuspender la muestra en el mismo tampón de EF, añadiendo además una gota de glicerol a fin de dar densidad a la muestra. Con una micropipeta se coloca sobre la parte superior del gel, sin importar que el tubo esté ya colocado en la cubeta de electroforésis y cubierto con el tampón de EF. Se puede o no añadir un colorante como azul de bromofenol, a fin de seguir la deposición de la muestra y la electroforésis posteriormente. Se procede entonces a esta, realizándose a 6 mamp/tubo y durante los tiempos que más interesen. Tengase en cuenta que, usualmente, a la muestra de RNAs transcritos se añaden los rRNAs y tRNAs marcadores y que la marcha de la electroforésis se puede seguir por densitometrias, en un espectrofotómetro a A260 de los tubos de cuarzo. Realizada esta operación, puede continuarse la electroforésis con los mismos geles. Utilizando esta misma técnica de densitometría, podemos realizar un análisis de los RNAs introducidos en la muestra por simple absorción a 260 nm (en este caso, pues, no deberemos poner también los RNAs marcadores exógenos).

Para el estudio de los transcritos que hayan incorporado radiactividad, bien a partir del nucleósido (en el caso de células enteras) o del nucleótido (en el caso de núcleos aislados), se procede a un fraccionamiento del gel en rodajas de 1-2 mm. y el posterior recuento de la radiactividad que contienen. A tal efecto, el gel se fracciona mediante un aparato "ad hoc" manual de cuchillas múltiples, más rápido que los prototipos comerciales, en el que una serie de cuchillas de afeitar se ordenan paralelamente, y separadas entre cada 2 una distancia de cerca de 2 mm, sobre 2 soportes metálicos, como si fuera una escalera. Este aparato se aplica directamente sobre el gel previamente congelado con nieve carbónica, y por presión se produce el fraccionamiento de toda la longitud del mismo.

Estas rodajitas se colocan ordenadamente sobre vialitos, en los que hay 3 ml de un líquido de centelleo para geles, hecho a base de:

50 partes de líquido de centelleo normal (para filtros)

5 partes NCS (solubilizador de tejidos)

1 parte de amoníaco

Se taponan los vialitos y se incuban toda la noche a 37°C. A continuación se procede al contaje radiactivo en el contador de centelleo.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. ASPECTOS ESTRUCTURALES.-

I.A. Fundamentos de la metodología.-

Los métodos para el estudio de las interacciones entre ácidos nucleicos y proteínas, son importantes para el entendimiento de la estructura de la cromatina y la base fisiológica del control de la expresión genética.

Un gran número de métodos son hoy utilizados para estudiar estas interacciones (136, 137). Con el fin de incrementar la sensibilidad, la mayoría de ellos utilizan moléculas marcadas. Este abordaje a pesar de ser el más útil, no está exento de problemas.

No siempre es posible obtener ácidos nucleicos o proteínas de fuentes definidas, con actividades específicas suficientemente altas. El marcaje "in vivo" es algunas veces difícil o incluso imposible, o da solamente preparaciones de actividades específicas bajas. El marcaje "in vitro" es siempre posible, pero implica normalmente la modificación química de los nucleótidos o aminoácidos, y la repercusión de esta modificación sobre la conducta de la molécula podía ser crítica algunas veces; más aún, en muchos casos el mecanismo preciso y los detalles completos de las reacciones implicadas, no están bien caracterizados. Incluso en el caso de los recientes métodos enzimáticos para el marcaje "in vitro" del DNA (138, 139), no está claro si se da un marcaje estadístico completo de todas las moléculas presentes.

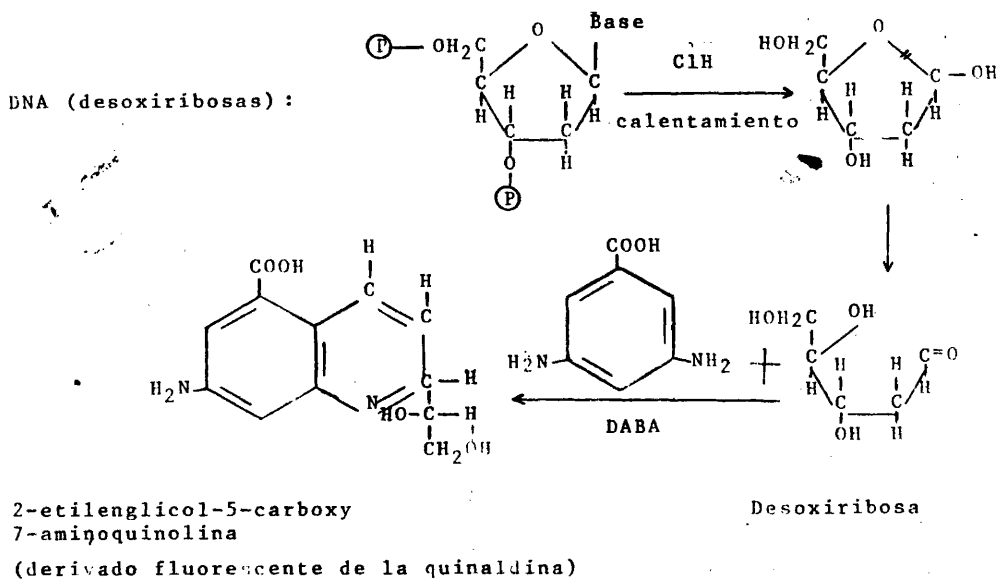
Encarados con todos estos problemas, hemos encontrado valioso para nuestro trabajo desarrollar métodos alternativos. Ellos deberían ser también sensibles, pero no basados en los principios como los arriba ex

puestos ni sujetos a los mismos inconvenientes. Los métodos basados en fluorescencia, parecían ofrecer tal posibilidad.

I.A.1. El uso de DABA como un reactivo del DNA.-

Por todo lo dicho hemos aplicado el ácido diaminobenzoico (DABA) (123, 124, 140) al estudio de la interacción de las histonas y protaminas con DNA, usando filtros de celulosa para recoger los complejos DNA-proteínas (121). Este método puede ser usado en el rango del microgramo. Se basa en el hecho de que las desoxirribosas del DNA en medio ácido concentrado, dan aldehídos del tipo $R-CH_2-COH$, con las que reaccionaría el DABA dando un producto fluorescente

El siguiente esquema intenta dar una idea sobre la marcha de esta reacción:



(De "Fluorescence". Guilbault. Editorial Marcel Dekker, 1971)

I.A.2. Espectros fluorométricos con DABA.-

La fig. 8 muestra los espectros de excitación y emisión para el producto resultante de la reacción DNA-DABA en medio ácido, tanto sin filtro, como cuando el DNA se ha depositado previamente sobre un filtro de nitrocelulosa, sobre el que se realiza también la reacción. Obsérvese que los óptimos están en la zona de 390 y 500 nm para la excitación y emisión respectivamente.

I.A.3. Retención en filtros de nitrocelulosa de complejos DNA-proteínas: curvas standard. Efecto del pretratamiento de los filtros.-

El ensayo microfluorométrico del DNA con el reactivo DABA que estamos describiendo, es una modificación del método desarrollado por Cattó lico y Gibbs (124), para la medida de DNA total celular. Las etapas a realizar aplicando esta metodología son, por lo tanto, las siguientes:

- 1/ reacción de interacción.
- 2/ retención del complejo DNA-proteína en filtros y lavado.
- 3/ detección de DNA: reacción con DAF y lectura fluorométrica.

La emisión de fluorescencia es una función lineal de la cantidad de DNA y ambos, DNA libre y DNA presente en los complejos nucleoproteicos, producen esencialmente curvas de calibración idénticas. La fig. 9 ilustra la excelente respuesta del método, tanto en la retención del complejo DNA-proteína como en la detección de DNA. La retención inespecífica de DNA libre en las membranas de celulosa es muy pequeña (Tabla III).

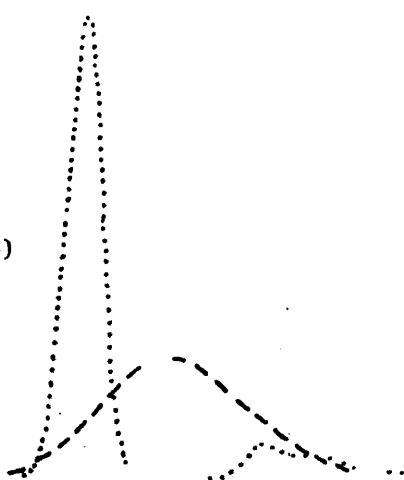
Todas las marcas de filtros ensayadas (ésteres de celulosa Millipore, 0,45 μm de tamaño de poro; nitrocelulosa de Sartorius, 0,15 μm ; y

Fig. 8.- Espectros fluorométricos de emisión y excitación de los productos resultantes de la reacción DNA-DABA. La metodología se describe en el texto, en la sección correspondiente.

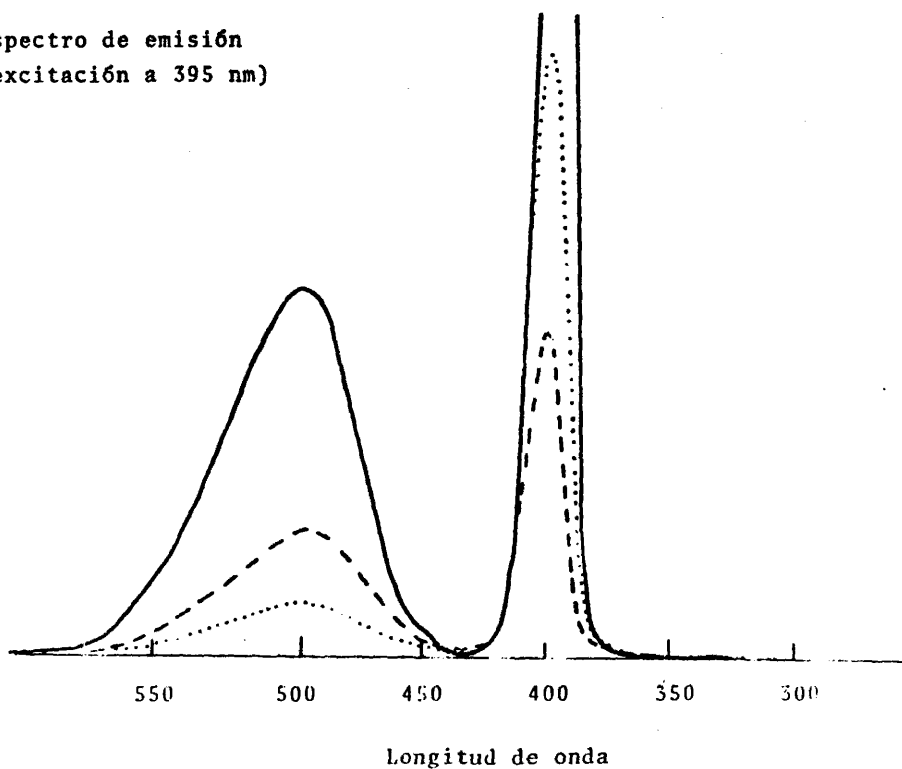
Espectro de excitación
(emisión a 492 nm)

72

- DABA
- Filtro + DABA
- DMA + DABA (en filtro)



Espectro de emisión
(excitación a 395 nm)



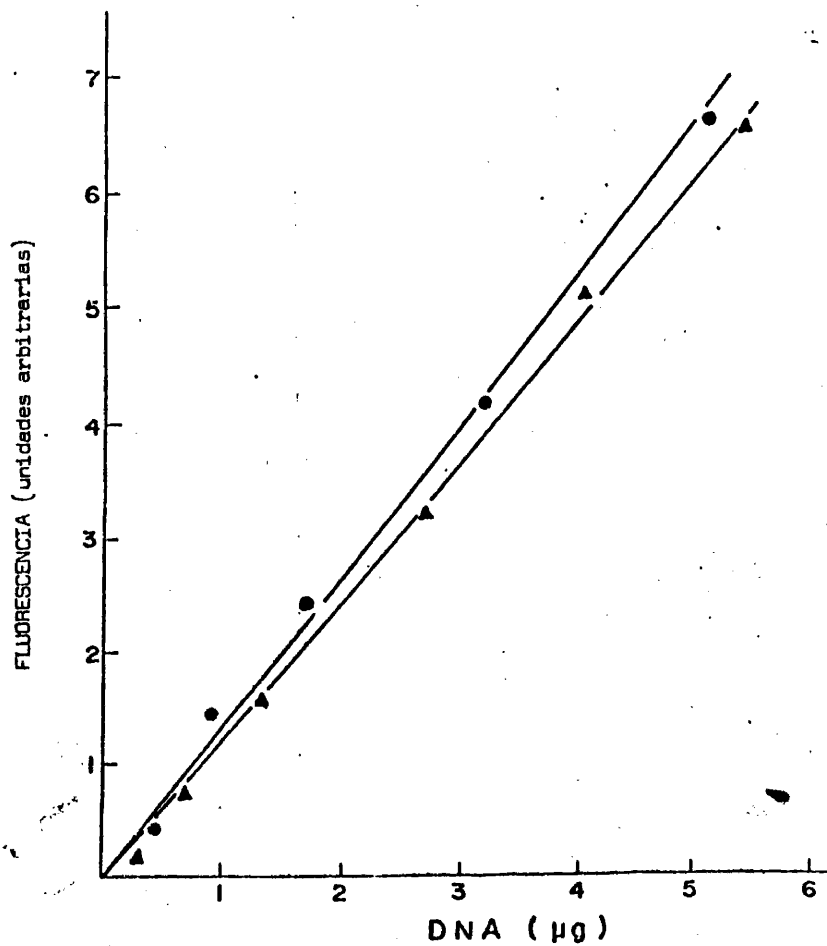


Fig. 9.- Curvas patrón de DNA y complejos Protamina-DNA. La curva DNA libre (●) se obtuvo pipeteando alícuotas de una solución de DNA, directamente sobre viales de cristal conteniendo filtros. La curva para los complejos nucleoproteicos se obtuvo usando diferentes alícuotas de una solución nucleoproteica - (6,8 g de DNA y 15 g de protamina /ml). Tras filtración por filtros Millipore (▲), se hizo la reacción con DABA como se describe en Métodos.

celulosa pretratada de Gelman, Metricel, 0,20 μ m) producían blancos comparables, pero los filtros Millipore (HAWP) eran los más convenientes para uso rutinario, porque producen las velocidades más altas de filtración.

El recomendado pretratamiento de los filtros con KOH (121), fué en contrado destructivo para algunos grupos de membranas Millipore, y por consiguiente, se investigó el requerimiento de tal pretratamiento. En la tabla III se muestra que los filtros Millipore no tratados daban blancos de fluorescencia y retención inespecífica de DNA tan bajo como los tratados, al mismo tiempo que la consistencia y manejo de los filtros era substancialmente mejor.

TABLA III

Efecto del pretratamiento con KOH sobre la resistencia y retención de DNA en membranas de celulosa.

	<u>Lectura fluorométrica</u>			
	<u>Tampón^a</u>	<u>DNA^b</u>	<u>Histona-DNA^c</u>	<u>manejo</u>
Membrana Sartorius				
45' en KOH 0,5 M	0,50	0,47	4,4	bueno
Membrana Millipore				
45' en KOH 0,5 M	0,57	0,53	4,6	malo
15' en KOH 0,5 M	0,43	0,40	4,6	malo
No tratamiento con KOH	0,45	0,46	4,8	bueno

a/ los filtros eran lavados con el tampón de interacción y etanol al 66%.

b/ se depositaban 5 μ g de DNA sobre los filtros, y se lavaban de la misma manera.

c/ Se filtraban unas mezclas de 5 μg de DNA y 15 μg de histona, y se lavaban de la misma manera.

I.B. Influencia de factores ambientales en la interacción histona-DNA.-

Como paso previo, nos propusimos la caracterización de nuestro sistema de interacción proteína-DNA. Es decir, quisimos ver que factores ajenos a la propia naturaleza de los ligandos, podrían afectar su interacción. Con tal objetivo, se estudió la interacción de histonas y proteínas con un DNA de timo de ternera altamente polimerizado (casa Worthington).

Hemos podido comprobar como en nuestras condiciones de ensayo, la forma de las curvas de retención es dependiente del tiempo y temperatura de incubación, así como de la fuerza iónica del medio en el que la reacción toma lugar.

I.B.1. Influencia del tiempo.

La fig. 10 muestra el tipo de curvas que se obtiene para la interacción histonas-CT DNA durante tiempos variables, a T^{a} ambiente. Obsérvese como a medida que transcurre el tiempo, la curva se va haciendo progresivamente más sigmoidal. A tiempos cortos, 5', la curva es siempre hiperbólica.

I.B.2. Influencia de la temperatura.

Cuando las mismas reacciones tienen lugar durante los mismos tiempos, pero a 0°C (hielo fundente), se da un enlentecimiento de la transformación del tipo de curva hiperbólico al sigmoidal (fig. 11). Obsérvese

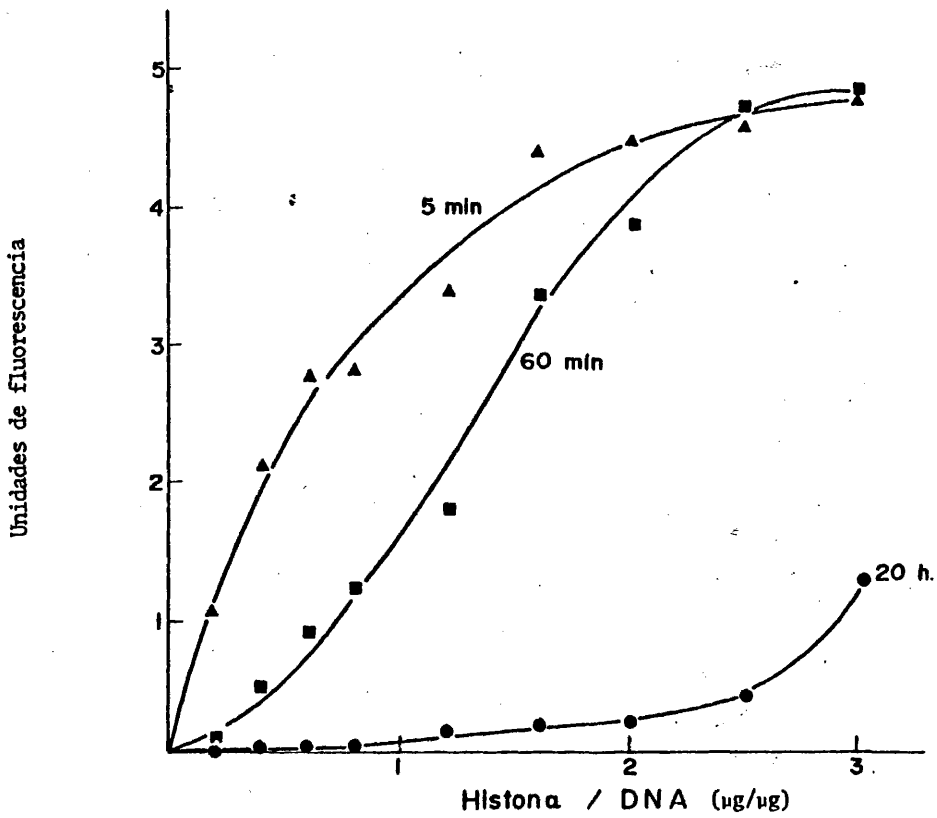


Fig. 10.- Efecto de la incubación a temperatura ambiente sobre las curvas de retención de DNA. Las mezclas de reacción completas, se dejaron a temperatura ambiente ($22-23^{\circ}\text{C}$) por los tiempos indicados, antes de ser filtradas.

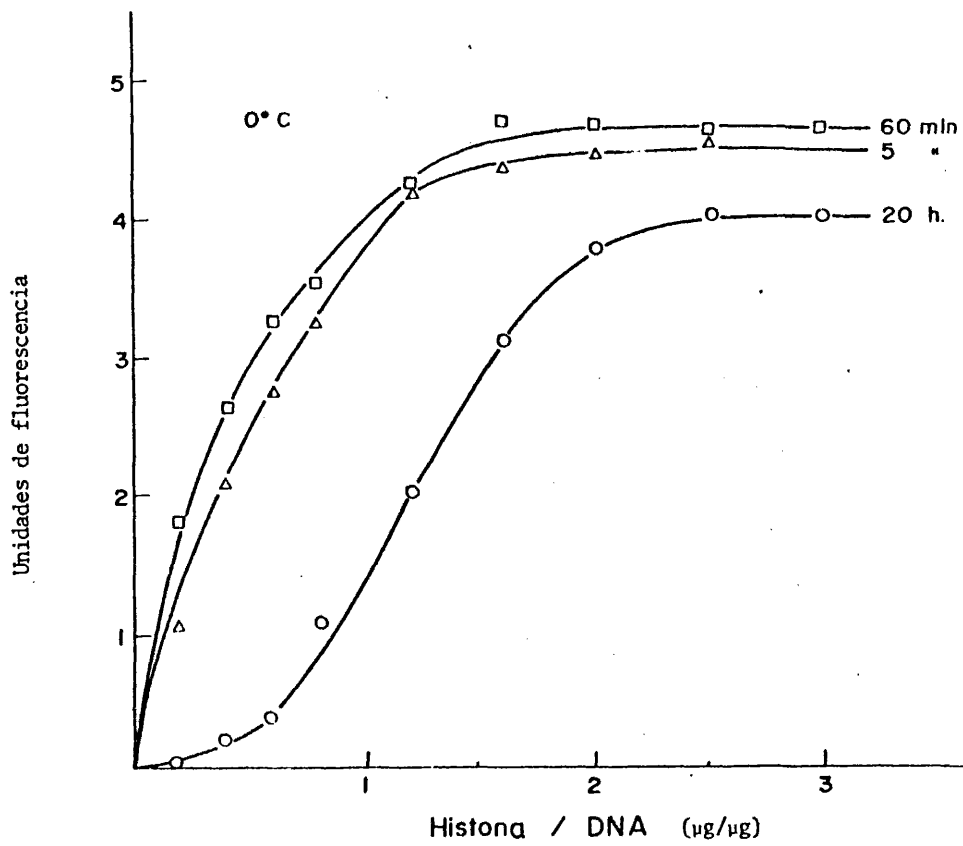


Fig. 11.- Efecto de la incubación a 0°C sobre la curva de retención de DNA (vease fig. 10).

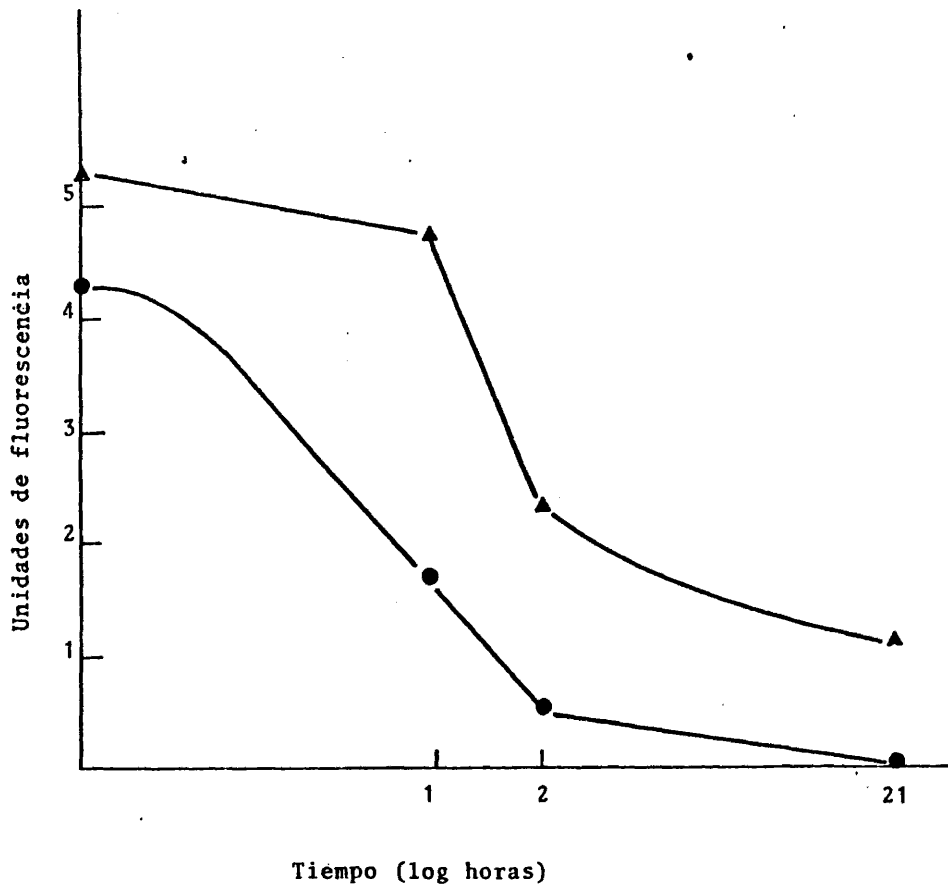


Fig: resumen de los efectos tiempo-temperatura sobre la retención del DNA. La interacción histonas-DNA transcurrió durante los tiempos indicados, a 0°C (▲) o t^oambiente (●), para una relación - histonas/DNA de 0,8 (µg/µg).

se como la curva de 60' de interacción, antes ya sigmoide, es claramente hiperbólica, exactamente igual que la de 5'. Por otro lado, para 20 horas, claramente la curva es ahora sigmoide, si bien no llega al mismo nivel de saturación que las precedentes.

I.B.3. Influencia del PMSF en el mediodo reacción.

El hecho de que el tipo de curva resultante de la interacción histona-DNA fuera dependiente del tiempo y temperatura de la reacción, nos sugirió la posible implicación de actividades proteolíticas como causa de tal dependencia. Con el objeto de corroborar tal hecho, procedimos a añadir al medio de interacción un conocido inhibidor de proteasas, el PMSF.

El fluoro fenil metil sulfonilo, PMSF, es un inhibidor de proteasas con serina en la estructura primaria de su centro activo, ya que se fija a este aminoácido.

La fig. 12 muestra como la curva sigmoide obtenida a 2 horas de incubación, es revertida a una forma hiperbólica en presencia de este inhibidor de proteasas a 1-2,5 mM. Sin embargo, su efecto no parece prolongarse más allá de unas cuantas horas más, posiblemente con motivo de degradarse.

I.B.4. Influencia de la fuerza iónica.

Después de dos horas de incubación a T^a ambiente, se encuentra que 0,15 M ClNa es la concentración de sal mínima, requerida para lograr curvas hiperbólicas reproducibles para la retención de DNA.

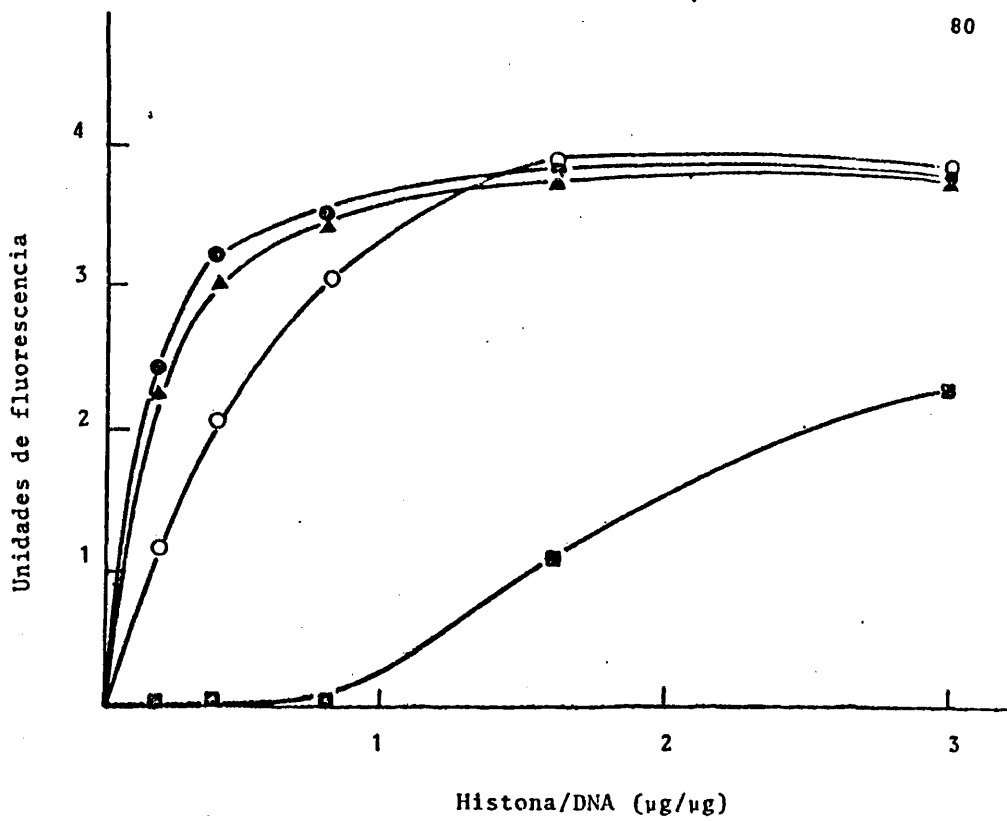


Fig. 12.- Efecto del inhibidor de proteasas serfnicas PMSF sobre la curva de interacción, a distintos tiempos de incubación - (●: 2 horas;▲: 6 horas;■: 20 horas) y concentraciones (○: 1 mM PMSF; figuras llenas: 2,5 mM PMSF). La t^a de incubación fué la ambiental.

Concentraciones más bajas de ClNa dan curvas de forma progresivamente menos sigmoidal, a medida que la concentración va aumentando, (fig.13).

Cuando se estudia el efecto de concentraciones de ClNa superiores (fig. 14), se observa un descenso en la capacidad de retención de DNA a partir de 0,4 M ClNa. Es interesante hacer resaltar, que esta es la concentración salina a partir de la cual empieza a separarse la H1 del DNA en la cromatina.

Este efecto de la sal tiene lugar directamente sobre la propia interacción, y no sobre la capacidad de retención del filtro (141). Cuando se estudiaron la influencia del tiempo y temperatura de reacción y presencia de PMSF en la interacción de protaminas-DNA, se llegó a las mismas conclusiones (fig. 15).

I.C. Proteasas.-

I.C.1. Su presencia en DNA: cuantificación por fluorescencia.

Los efectos de PMSF, temperatura y duración de la incubación sobre las formas de las curvas de retención, sugerían la implicación de una proteasa. Aunque las marcas comerciales de DNA eucariótico aparecen libres de proteasas cuando se ensayaban por métodos usados normalmente (142, 143), la actividad proteolítica podía ser detectada fácilmente en el DNA (fig. 16, círculos llenos) con el método microfluorométrico, particularmente en el caso de preparaciones de DNA de alto peso molecular (144). Estudios de este laboratorio han mostrado que el DNA de la casa Worthington presenta, al menos, cinco veces más actividad proteolítica total que DNAs de otras casas comerciales, si bien los valores son varia

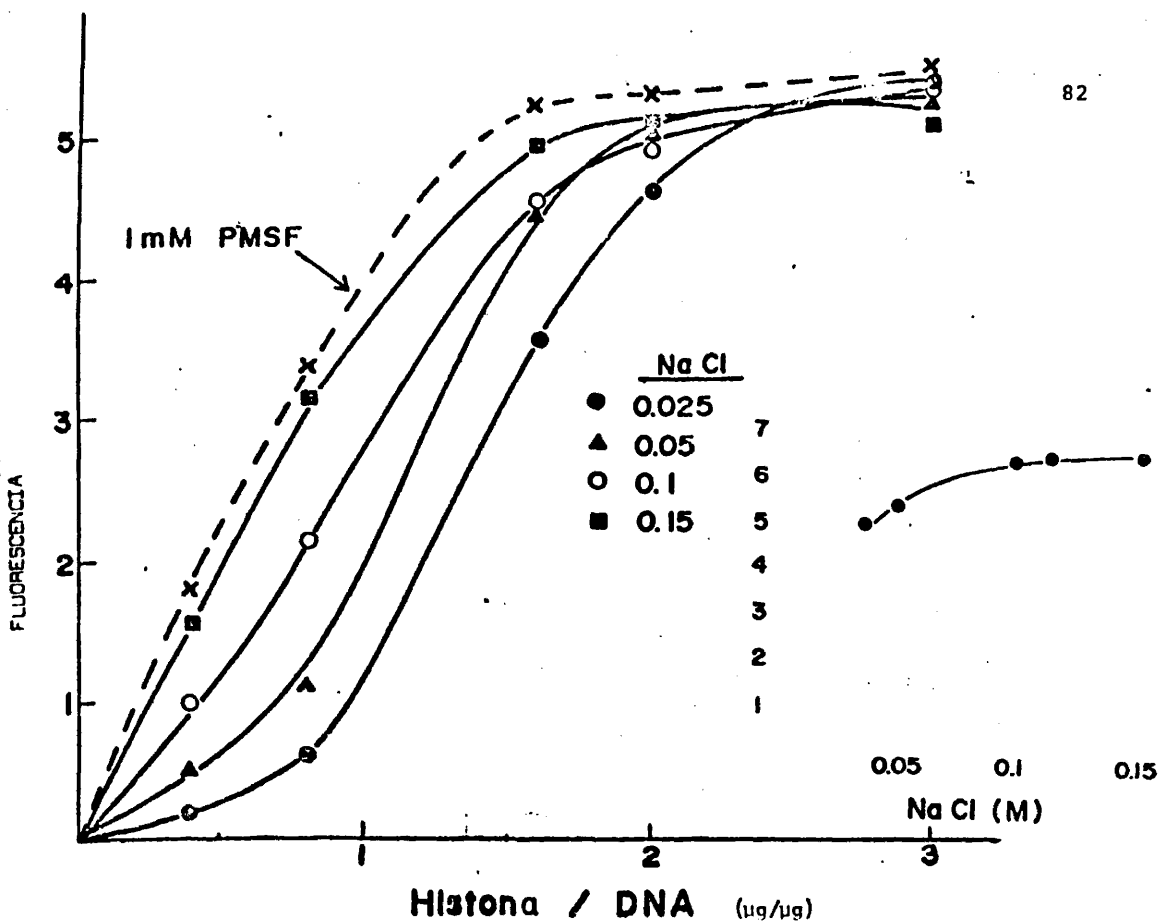


Fig. 13.- Influencia de la concentración de Cl Na sobre la curva de interacción tras incubación por 2 h a t^a ambiente. La fig. interior representa el efecto de la concentración de Cl Na sobre la interacción histonas/DNA, a una relación de 1:1 en peso (μg/μg).

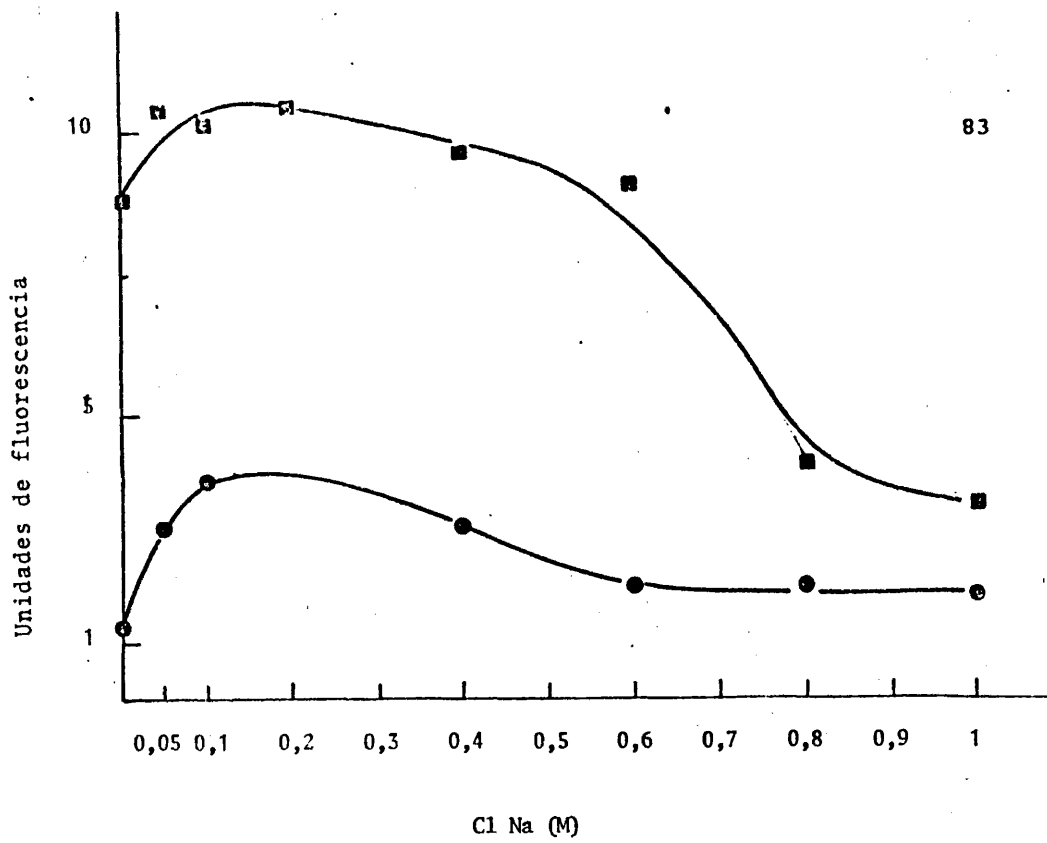


Fig. 14.- Efecto del Cl Na a altas concentraciones sobre la capacidad de retención del DNA, para los cocientes histona/DNA de 0,3 (●) y 3 (■) en peso ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$), a temperatura ambiente.

Fig. 15.- Estudio de los efectos del tiempo y de la t^a , del Cl Na a 0,15 M y del PMSF, sobre la curva de interacción de las protaminas con DNA. (La t^a de reacción era la ambiente), salvo para Δ : 0^a C; \circ : no Cl Na; \bullet : Cl Na 0,15 M; \blacktriangle : PMSF 2,5 mM).

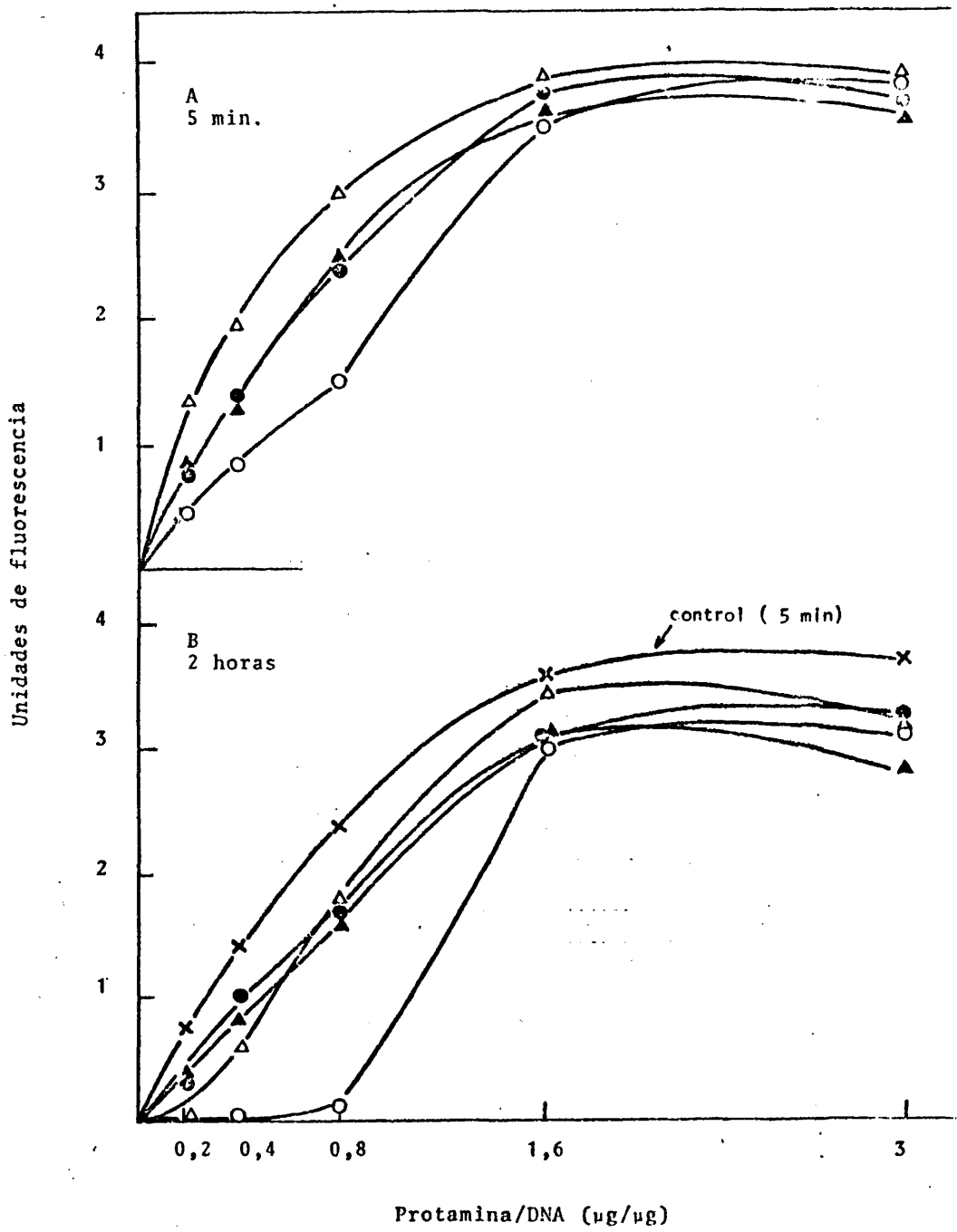
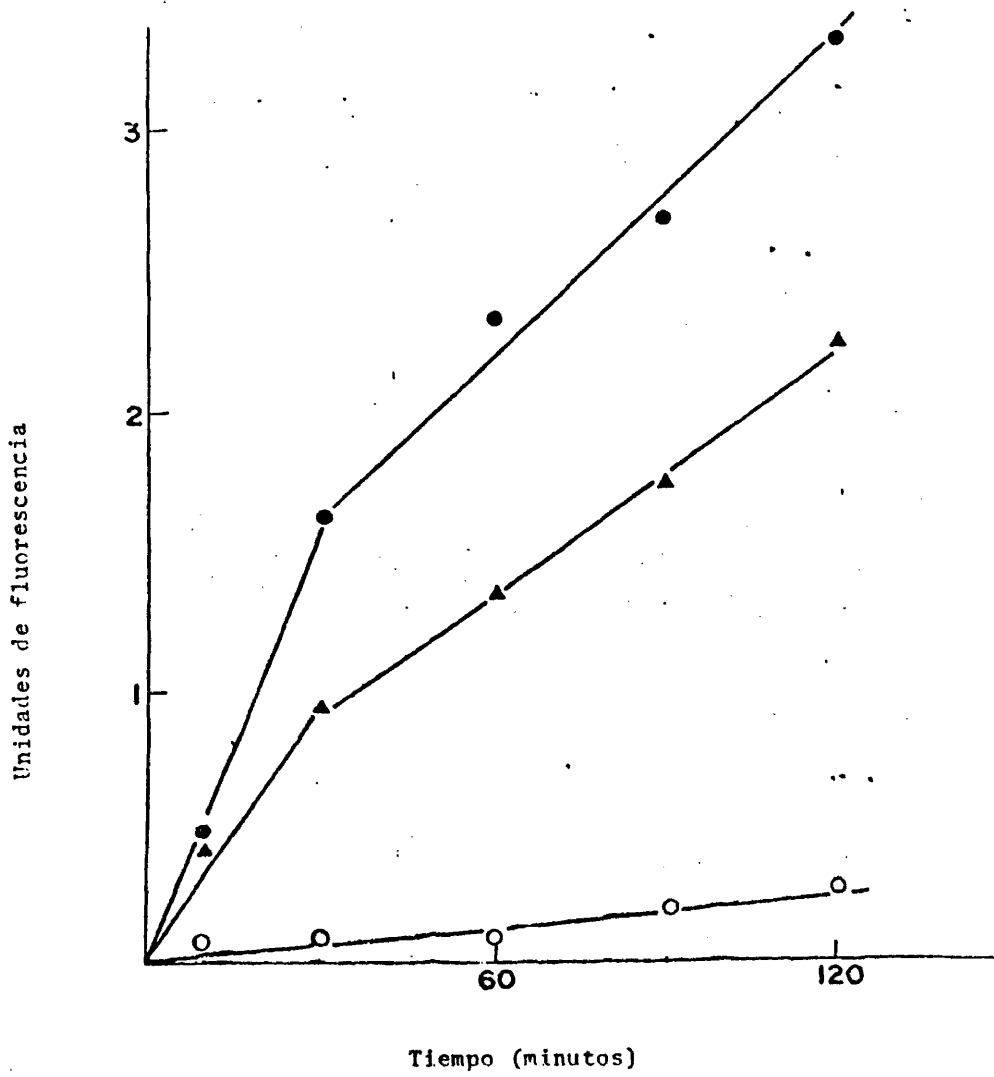


Fig. 16.- Detección fluorométrica con fluorescamina de actividades proteolíticas en el DNA, y su eliminación por lavado con una -- concentración alta de sal. La actividad proteolítica fué determinada (ver Métodos) en la preparación de DNA nativo (●) y en el DNA lavado con sal (○), a una concentración final de 6,8 µg de DNA/ ml. La actividad proteolítica fué también determinada en el extracto salino dializado (▲).



bles. Los DNAs de microorganismos aparecen exentos de las mismas (144).

I.C.2. Su eliminación lavando el DNA con ClNa 2,5 M.

Si el DNA se trata con ClNa 2,5 M por agitación toda la noche se obtiene un extracto salino, tras la precipitación etanólica del DNA en frío, rico en actividad proteolítica (fig. 16). En estas condiciones, la actividad residual del DNA es muy escasa. No se recupera en el extracto salino la actividad proteolítica total, seguramente como consecuencia de una inactivación por ClNa, si bien, naturalmente, se dializó posteriormente.

I.C.3. Afinidad por DNA.

Es posible lograr la reconstitución del complejo DNA-proteasa, en base a la afinidad entre ambos. A tal efecto, se mezcla el extracto salino y el DNA lavado, agitándose 15'-30'. A continuación se pasa por una columna Biogel A 50, eluyéndose con un tampón fosfato. La fig. 17 muestra la elución obtenida seguida por las A230 y A260. Obsérvese el pico que corresponde al complejo reconstituido DNA-proteasa. Las actividades proteolíticas de estas fracciones sobre protaminas, coinciden con los máximos de absorción espectrofotométricas. Es igualmente posible, recuperar entonces las actividades proteásicas en el complejo. La Tabla IV muestra los resultados de la aplicación de la fluorescamina a la detección proteolítica en DNA total, lavado y reconstituido (este último, procedente de la precipitación etanólica en frío de una mezcla agitada de DNA ya extraído, con el extracto salino).

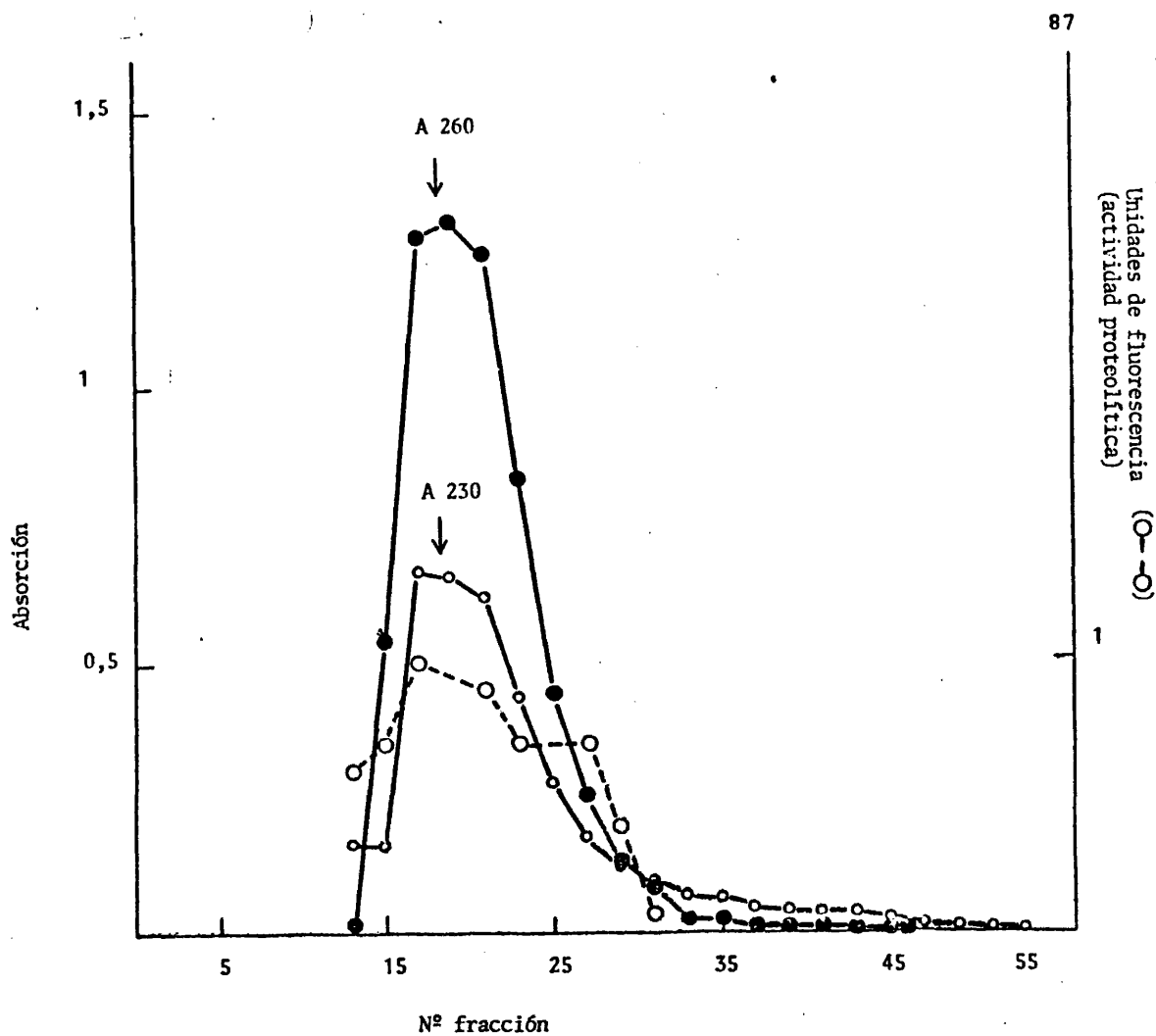


Fig. 17.- Reconstitución y aislamiento del complejo DNA-proteasas por cromatografía en columna. Una mezcla de DNA lavado con alta sal y extracto salino, se pasó por una columna Biogel A 50 tras agitación de la mezcla. Obsérvese la coincidencia de los máximos correspondientes a las absorciones ópticas a 260 (●) y 230 (○) nm, así como con el correspondiente a la actividad proteolítica del complejo (○), medido por el método de la fluorescamina.

TABLA IV

Unidades fluorométricas netas

	<u>15 min.</u>	<u>195 min.</u>
CT DNA Worthington	0,05	0,94
DNA extraído	0,03	0,4
DNA extraído + Extracto salino	0,09	1,27

I.C.4. Cinética hiperbólica con DNA sin proteasas.-

El DNA resultante de la extracción salina carece, pues, de actividad proteolítica. La curva de interacción entre este DNA e histonas es hiperbólica, incluso después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente y en ausencia de sal (fig. 18 A). Compárese con la curva obtenida para el mismo DNA sin tratar y tiempo de interacción (fig. 13). La fig. 18 B muestra como cuando el DNA utilizado para la interacción carece de actividades proteolíticas (p.ej. el DNA de E. Coli), se obtiene el mismo tipo de curvas que con el CT DNA de Worthington extraído.

I.D. Condiciones para la interacción histonas-DNA óptima.-

Por lo tanto, hemos mostrado como en ciertas preparaciones comerciales de DNA eucariótico de alto peso molecular hay actividades proteásicas contaminantes, indetectables por métodos convencionales. Estas afectan significativamente la forma de la curva de interacción. Es conveniente por lo tanto enfatizar sobre la necesidad de controles apropiados, an

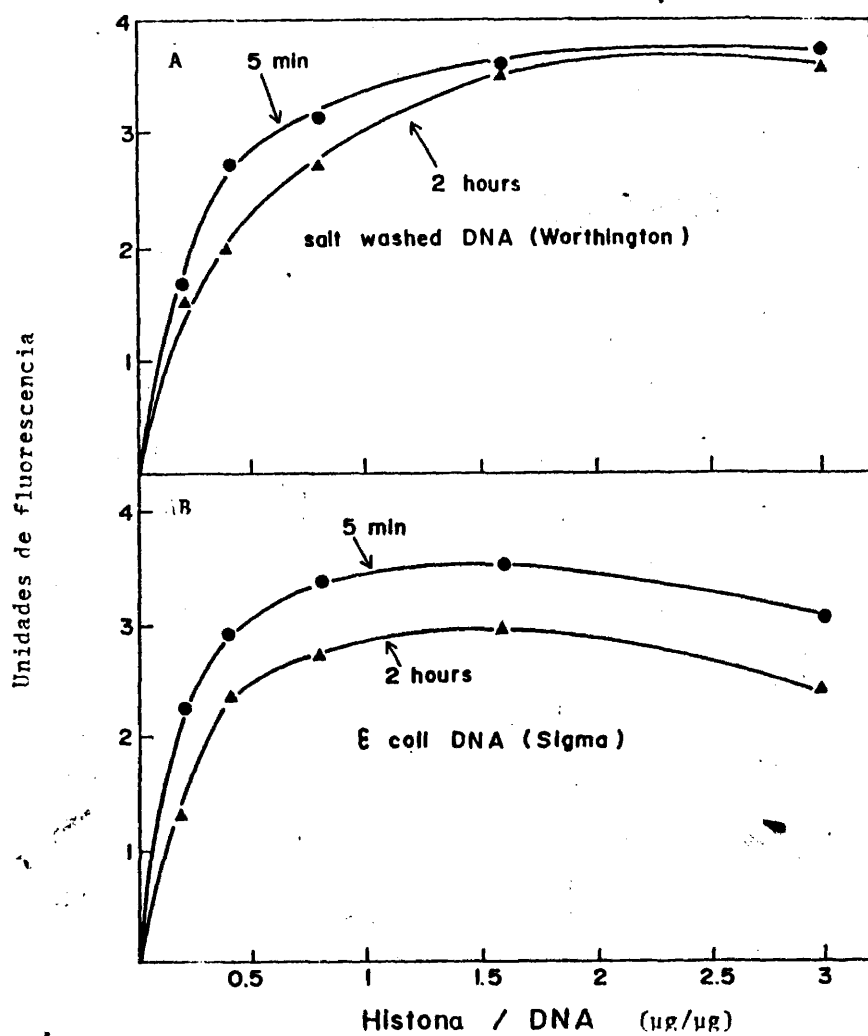


Fig. 18.- Curvas de retención de complejos de histonas con DNA sin proteasas.

A.- DNA de Timo (Worthington) lavado con 2M Cl Na.

B.- DNA de E. Coli.

La reacción de interacción se efectuó a t^a ambiente, por los tiempos indicados.

tes de intentar cualquier interpretación funcional basada en la forma de las curvas de interacción. En particular, es muy útil el ensayo directo de actividades proteolíticas en el DNA. De otra manera, habrá que limitarse a tiempos cortos de interacción (5'), a añadir inhibidores de proteasas como PMSF al medio de interacción, o a realizar una previa extracción de las actividades proteolíticas del DNA, p.ej. mediante un lavado 2,5 M ClNa.

Considerando lo expuesto, estamos ya en condiciones de estudiar la influencia de los ligandos DNA y proteínas, sobre su interacción recíproca, en condiciones en que no cabe esperar artefactos debidos a proteasas contaminantes.

II: INFLUENCIA DE LOS LIGANDOS

II.A. DNA.-

Cuando se realizan estos experimentos de interacción utilizando diversos DNAs, hay que preguntarse por la posible influencia de variaciones en la interacción dependiendo de su tamaño, composición en bases o estructura primaria y estructura secundaria.

II.A.1. Estructura primaria.

Se ha estudiado la influencia de la composición total en bases del DNA en la interacción con histonas.

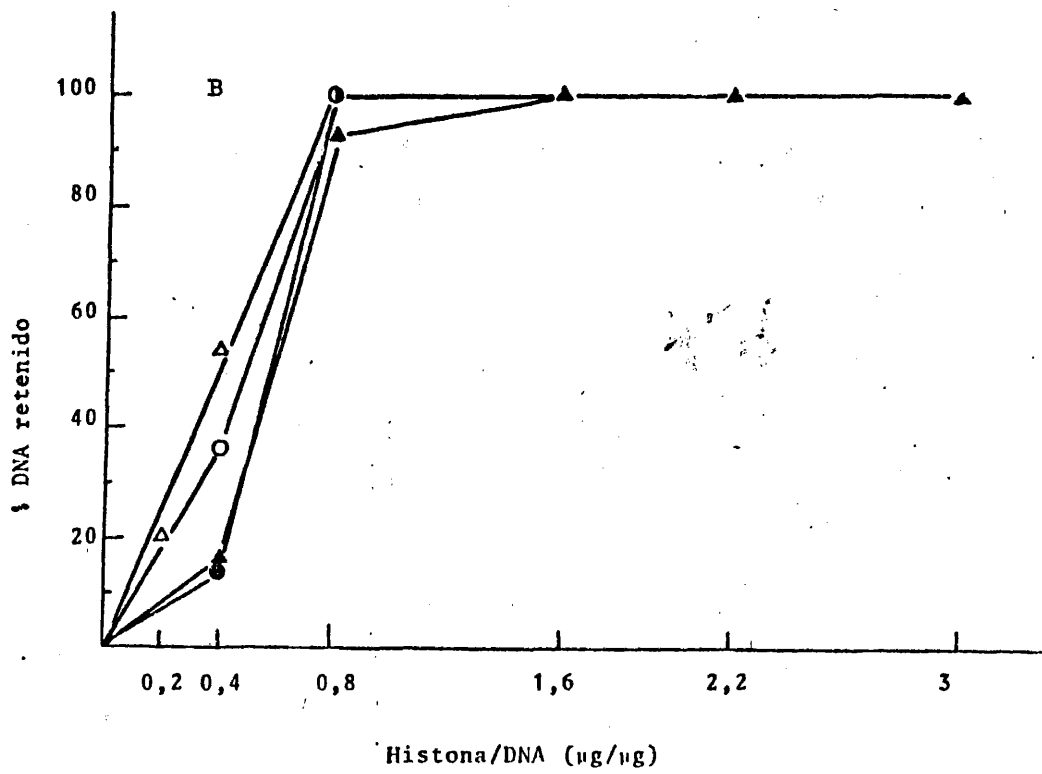
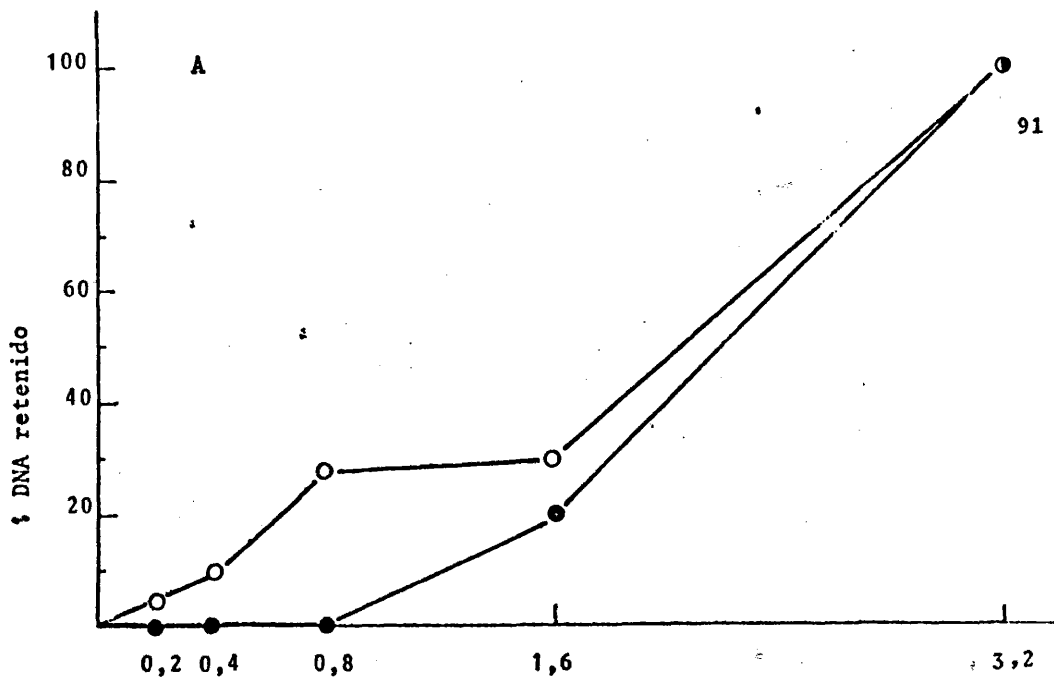
Cuando se utilizan los polidesoxinucleótidos poli d(G-C) y poli d(A-T) en cadena doble, puede verse (fig. 19 A) que no hay apenas diferencias en el tipo de curva con histonas totales.

Es señalable la sigmoicidad de ambas curvas, aunque el nivel de

Fig. 19.- Curvas de interacción de polidesoxi (G-C) y polidesoxi (A-T) en cadena doble con histonas.

- A.- Interacción entre polidesoxi (G-C) (○) y polidesoxi (A-T) (●) con histonas totales.
- B.- Interacción entre polidesoxi (G-C) (triángulos) y polidesoxi (A-T) (círculos) con H₄, en ausencia (●, ▲) o presencia (○, △) de Cl Na 0,15 M.

Las incubaciones fueron realizadas a t^a ambiente durante 15 minutos.



saturación parece ser mayor en el caso del poli d(G-C).

Cuando se realiza el mismo experimento, pero utilizando solo la H4, no se detectan diferencias con respecto a la composición de bases, tanto en presencia como en ausencia de ClNa 0,15 M (fig. 19 B). Obsérvese como se llega a la saturación a relaciones H4/DNA más bajas que con histonas totales, lo cual podría ser indicativo de una alta afinidad de la H4 con este tipo de homopolímeros.

Por otro parte, destacamos las diferencias de las curvas de interacción obtenidas con/sin ClNa 0,15 M, cuyo significado se discutirá más adelante.

Los resultados que muestra la figura 19 B están, en cambio, en contradicción con los de Clark y Felsenfeld (145), quienes afirmaban que los sitios de unión natural de las histonas ricas en arginina son las secuencias ricas en G-C.

II.A.2. Tamaño del DNA.

Cuando una solución de DNA se fragmenta mecánicamente, tal y como se describe en la Metodología, y se pasa por una columna de Biogel, p. ej. A50, se obtienen una serie de fracciones con una graduación en los tamaños del DNA.

A fin de estudiar la influencia del tamaño del DNA en la interacción con proteínas, se toman las correspondientes alícuotas de cada fracción para hacerlas reaccionar con protaminas, y se estudia su capacidad de retención en filtro mediante la metodología del DABA. La fig. 20 muestra que no hay diferencias apreciables, o no somos capaces de detectar-

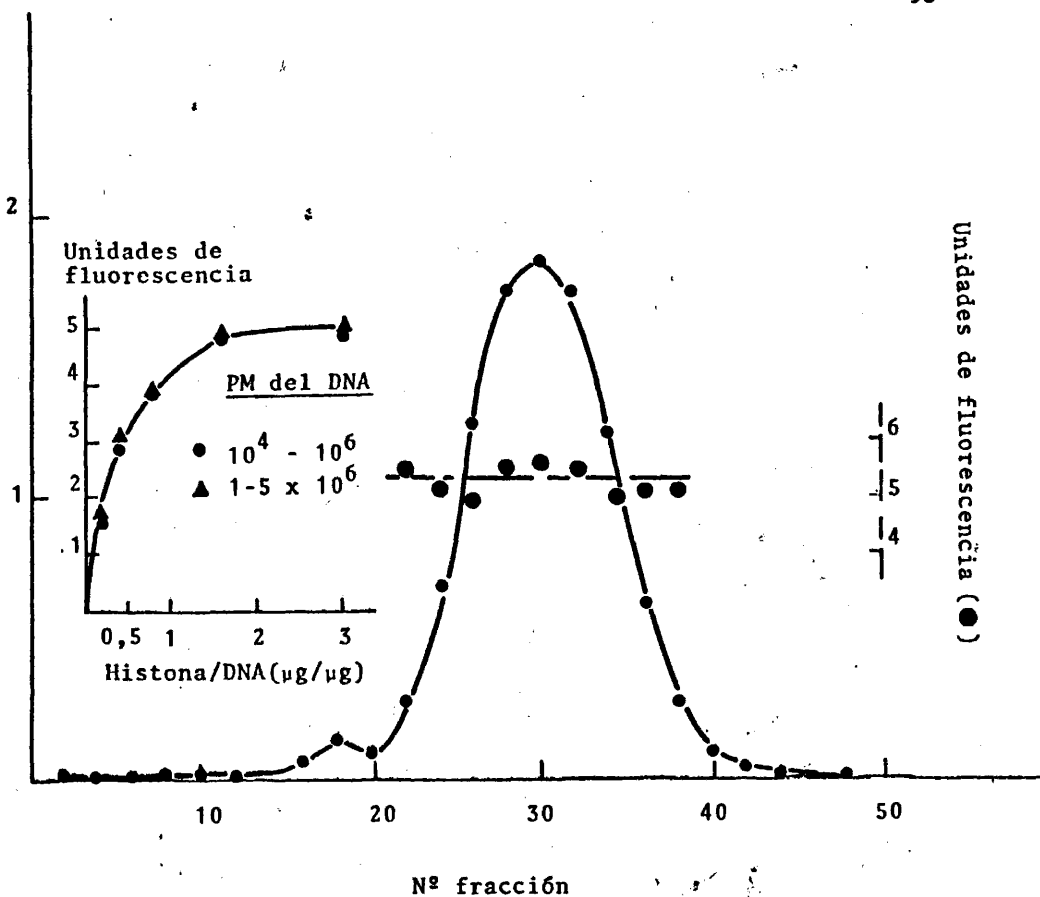


Fig. 20.- Estudio de la influencia del tamaño del DNA sobre la interacción histonas-DNA.

Pase por una columna de Biogel A 50 de una solución de CT DNA tras ser fragmentada en un VirTis a velocidad media (ver Métodos). Las fracciones eluidas, conteniendo fragmentos de DNA de distinto PM, se siguieron por absorción óptica a 260 nm (●). Fueron hechas interaccionar en las mismas condiciones con protaminas (a una relación de protaminas: DNA de 2:1, µg/µg) (●), a t^a ambiente y en ausencia de Cl Na.

La fig. interior muestra una curva de interacción normal histonas-DNA para dos clases de tamaños de DNA fragmentado, separados por una columna de Biogel A5. La reacción tuvo lugar a t^a ambiente durante 5 min, en ausencia de Cl Na.

las, en su capacidad total de interacción con las proteínas, al menos entre los tamaños máximo y mínimo de nuestros fragmentos de DNA.

Cuando un DNA se pasa por una columna de Bio Gel A 5, es posible p. ej. separar el DNA entre varios límites aproximados de tamaño. La misma figura 20 muestra como para dos grupos de tamaños, las curvas de interacción histona/DNA son idénticas, lo cual es consistente con los resultados anteriores.

II.A.3. Estructura secundaria.

Cuando previamente a la interacción proteína-DNA, este último se preincuba durante un tiempo dado a diversas T^{as} , enfriándose rápidamente en hielo al acabar, es posible obtener DNAs con distinto grado de estructura secundaria. El tratamiento térmico desestabiliza la doble banda de DNA, al romper los puentes de hidrógeno entre las bases. Se obtienen así en un DNA zonas de bandas sencillas, junto con otras de banda doble que mantienen su estructura nativa. Cuando estos distintos DNAs se hacen interaccionar con histonas, se obtienen curvas progresivamente más sigmoidales cuando el tratamiento térmico ha sido mayor. Esto se ilustra en la fig. 21. Cuando el DNA se somete a $100^{\circ}C$, T^a a la que es de esperar una desnaturalización total, su curva de interacción es la más sigmoide de todas.

Si tras un tratamiento térmico de $100^{\circ}C$, el DNA se eluye en una columna de hidroxiapatito (ver Metodología), es posible obtener en unas cuantas fracciones todo el DNA que está en banda sencilla, separándolo del que se mantenga en cadena doble. Cuando se estudia la interacción con histonas del DNA en banda sencilla, se obtiene un tipo de curva sig

moidal (fig. 22), frente al DNA nativo, que es hiperbólica como sabemos.

Conviene que hagamos énfasis en los hechos de que estas interacciones las hemos realizado a tiempos cortos, 5', eliminando toda posibilidad de resultados dependientes de actividades proteolíticas. Por otro lado, el tratamiento térmico que se aplica al DNA, desnaturizará con gran seguridad las posibles proteínas contaminantes.

También cuando son histonas individuales, H1 y H4, las que se hacen interaccionar con DNA desnaturizado, se obtienen curvas de tipo sigmoide. Véase fig. 23.

Todos estos resultados muestran, por otro lado, que la unión de las histonas al DNA desnaturizado es menos fuerte que con el DNA nativo. Este hecho ya había sido apuntado por Bonner y col. (146), quienes sugieren que esta menor capacidad de unión a consecuencia de la desnaturización del DNA, podía ser explicada en parte por el descenso en la densidad de carga del DNA y por pérdida de la estructura secundaria, tal como la de los huecos de la doble hélice.

Las consideraciones que acabamos de hacer sugieren, por consiguiente, la existencia de un mecanismo cooperativo en la interacción DNA de banda sencilla-proteínas. Las consecuencias funcionales (transcripción, replicación) de este hecho, son obvias.

II.A.4. Efecto del ClNa: consideraciones.

Cuando la interacción histonas-DNA se realiza en las condiciones en que las proteasas no son detectables, el ClNa a 0,15 M revierte las curvas sigmoideas hacia formas hiperbólicas. Ello ocurre con independen-

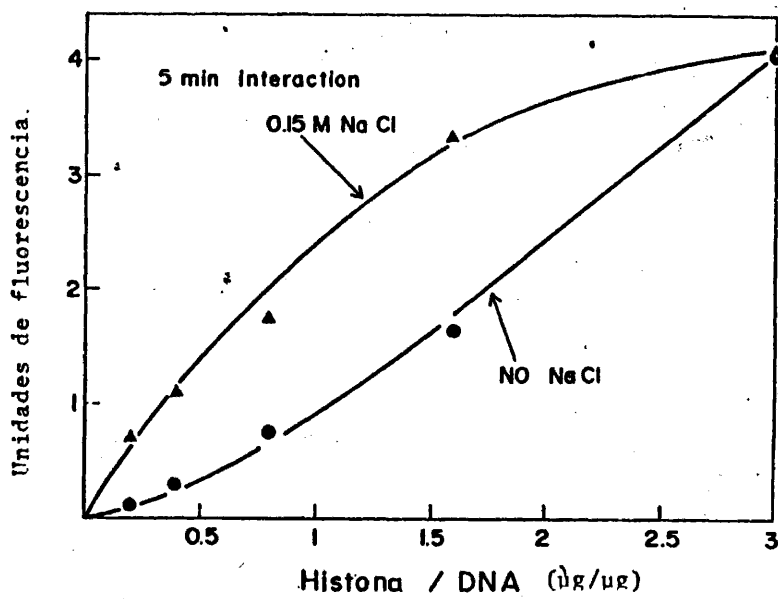


Fig. 22.- Interacción de histonas con DNA de banda sencilla y efecto del Cl Na (0,15 M). La incubación fue hecha a t^a ambiente - por 5 min..

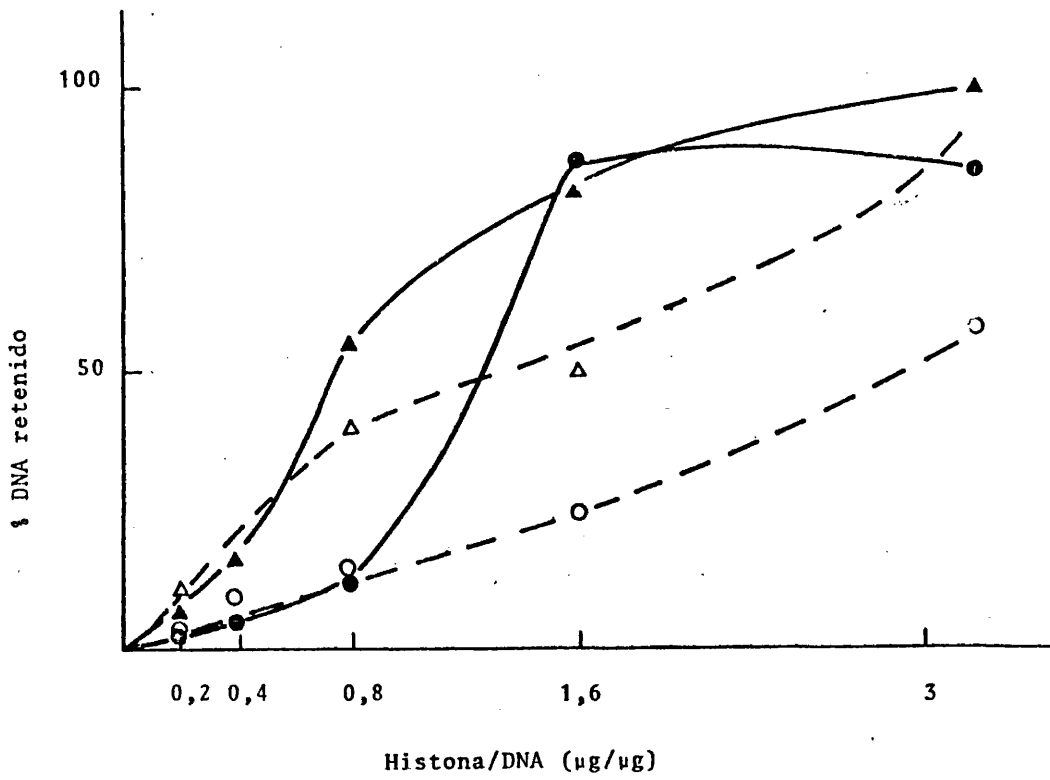


Fig. 23.- Interacción de las histonas H1 y H4 con DNA en banda sen cilla y efecto del Cl Na (0,15M). La incubación fué hecha a t^aambiente por 15 min. (—: H1; ---: H4; ○, ●: sin Cl Na; △, ▲: Cl Na 0,15 M).

cia de la procedencia o grado de estructura secundaria del DNA, así como del tipo de proteína básica (histonas o protaminas) utilizada en la interacción.

La fig. 24 nos muestra tal efecto para dos DNAs de microorganismos M. lysodeikticus y E. coli, con histonas o con protaminas. Las figs. 22 y 23, hechas con DNA desnaturizado, también lo muestran y tanto para histonas totales como individuales.

E incluso con los homopolímeros poli d(A-T) y d-(G-C), p.ej. con la H4, como se ha señalado anteriormente (fig. 19 B).

Pero incluso cuando sabemos que una curva sigmoide aparece por efecto de las actividades proteásicas, el ClNa la revierte igualmente a una hiperbólica. Y tanto con histonas (fig. 13), como con protaminas (fig. 15 B). Sin embargo, una prueba más de que este efecto del ClNa a 0,15 M es independiente de la presencia o ausencia de proteasas, radica en el hecho de que la actividad enzimática total de las proteasas sólo se empieza a afectar por el ClNa a partir de 0,5 M, para llegar a ser el 50% de la original a concentraciones de 2 M (144).

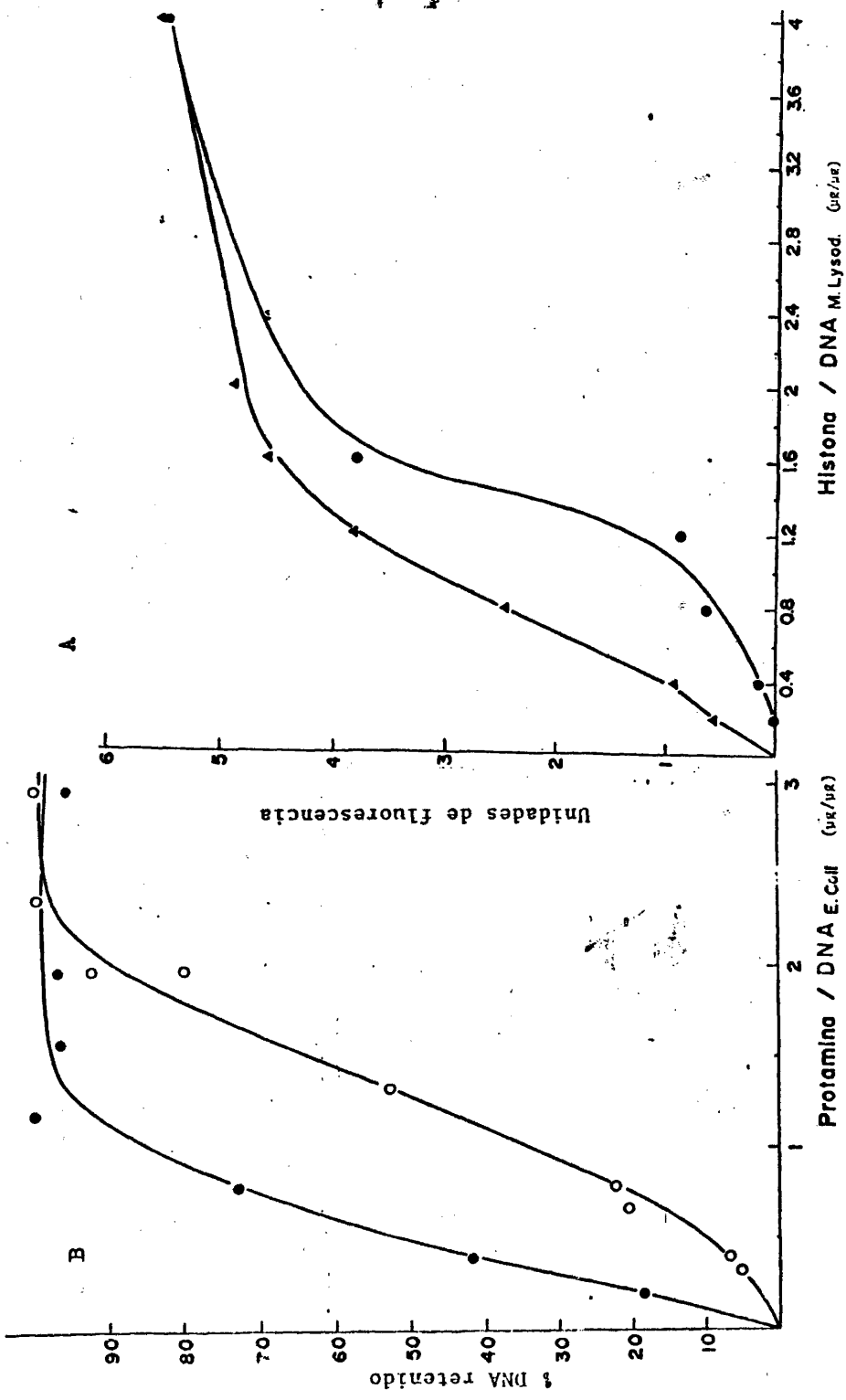
Por otro lado, en los casos en que se ha utilizado DNA desnaturizado, este efecto del ClNa no parece ser debido a una renaturalización del DNA desnaturizado. Se sabe que la sal favorece la renaturalización, lo cual podría explicar en nuestro caso la transición de curva sigmoide a hiperbólica que se observa por su efecto.

Con tal motivo, se procedió a pasar por sendas columnas de hidroxipatito 2 muestras de DNA desnaturizadas termicamente y recién enfriadas en hielo, una de ellas con 0,15 M ClNa (y lo mismo en todos los tam

Fig. 24.- Efecto del Cl Na sobre la Interacción de proteínas con DNAs de microorganismos, libres de actividades proteolíticas.

A.- Curva de Interacción de histonas totales con DNA de Micrococcus lysodeikticus (●: sin Cl Na; ▲: con Cl Na 0,15 M).

B.- Curva de Interacción de protaminas con DNA de E. Coli. (○: sin Cl Na; ●: con Cl Na 0,15 M).



pones para la columna correspondiente). Al realizar la elución a 4°C (fig. 25) se observa que, en el caso del tratado con sal, eluye a una concentración salina ligeramente superior que el no tratado. En la columna de HAP, el DNA de banda doble eluye a una fuerza iónica bastante mayor que el de banda sencilla. Sin embargo, la fig. 25 muestra que la diferencia de fuerza iónica a que eluyen las muestras tratadas y sin tratar con ClNa, no justifica la mucho mayor con la que se separan los DNA de banda doble y sencilla. Las diferencias de salida en la elución, son atribuibles a la disminución del efecto eluidor del gradiente de fosfato utilizado, por parte de los cloruros de la sal (113). Sería necesario esperar tiempos más largos (mínimo, varias horas), que nunca se dieron para nuestros experimentos de interacción, para detectar esa influencia de la sal en la renaturalización.

II.B. Histonas

Al estudiar la influencia de las distintas histonas como causa de alguna especificidad significativa en sus interacciones con el DNA, nos hemos centrado en: tipo de histonas y afinidades con dos tipos de DNA (timo de ternera y Artemia salina), efecto de la sal, dinámica de las interacciones y estudio de la interacción DNA-histonas acetiladas.

II.B.1. Curvas de interacción DNA-histonas individuales. Efecto de la sal.

Cuando se estudió la interacción entre DNA de timo de ternera y diversas histonas individuales, fraccionadas por nosotros, se obtuvo el tipo de curvas que muestra la fig. 26 A.

Fig. 25.- Estudio del efecto del Cl Na sobre la renaturalización de DNA desnaturalizado, por cromatografía en columna.

Dos muestras de DNA tratadas a 100° C durante 15 min, y enfriadas en hielo durante un mínimo de 30 min. más, fueron cromatografiadas sucesivamente en una misma columna de hidroxapatito. A una de ellas (●) se le añadió Cl Na para lograr una concentración final de 0,15 M, así como DNA nativo. La elución se realizó con un tampón de fosfato, con o sin Cl Na 0,15 M, e igualmente la previa equilibración de la columna.

Las flechas indican las posiciones de los máximos de absorción óptica de los DNAs a 260 nm, sobre las rectas correspondientes a los índices de refracción de las fracciones.

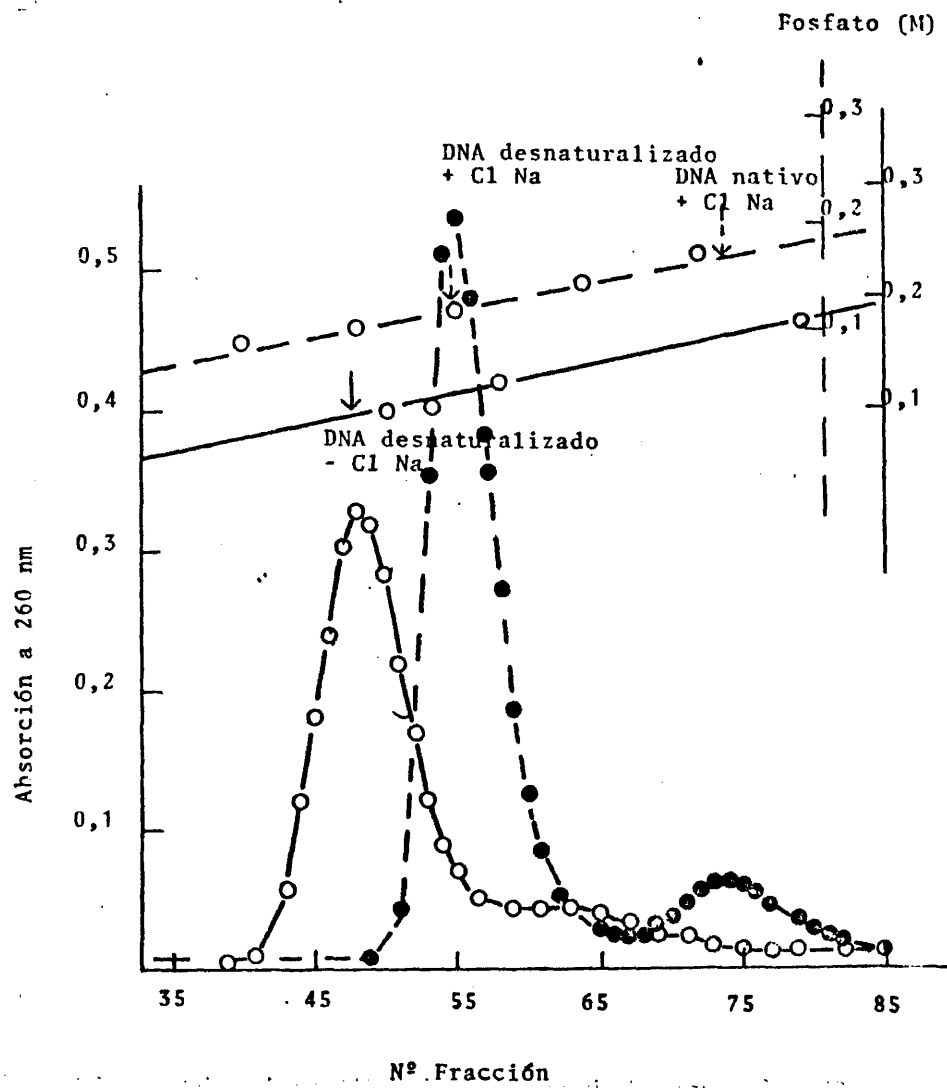
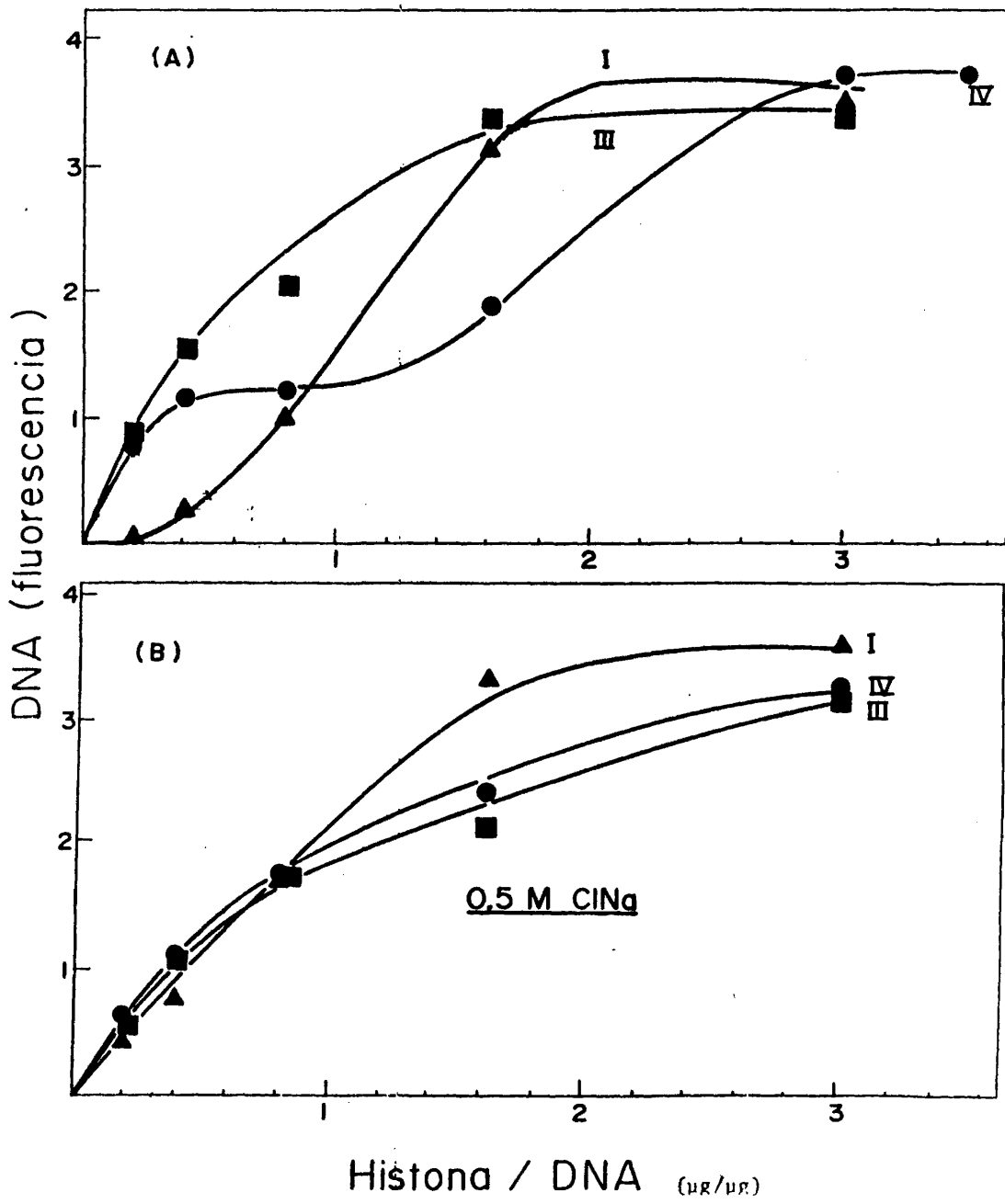


Fig. 26.- Curvas de Interacción del CT DNA con las histonas H1, H3, y H4.
Efecto del Cl Na a 0,5 M. La interacción tuvo lugar a t^{ambiente}
durante 5 min. (▲: H1; ■: H3; ●: H4).



Obsérvese especialmente las curvas obtenidas para la H1, de forma sigmoidal, y la H4, hiperbólica bifásica, mientras que la H3 muestra una curva hiperbólica normal en su interacción con el DNA.

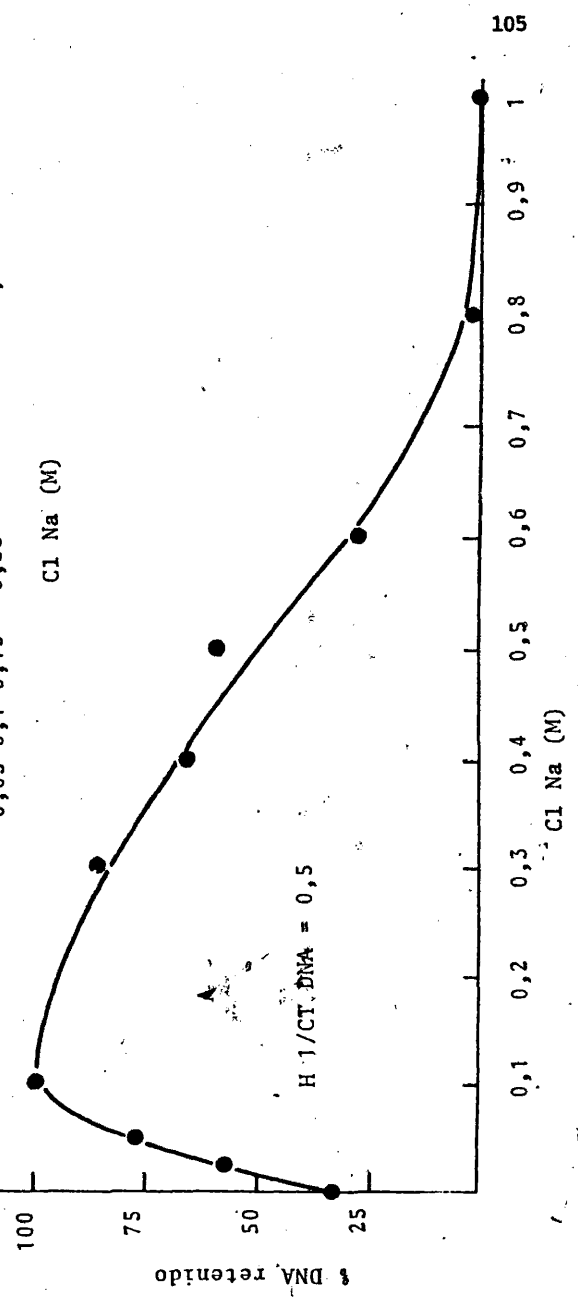
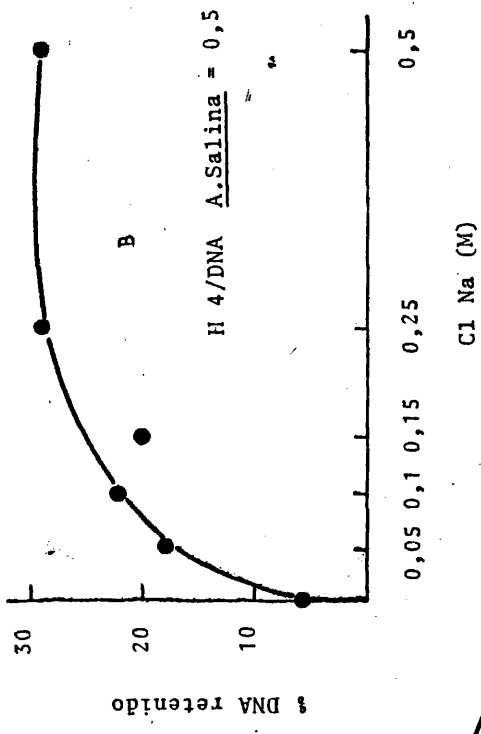
La interacción de la H1, podría, en ciertas condiciones, responder a un mecanismo cooperativo (147-149). La curva para la H4 sugiere la existencia de 2 tipos de unión distintos, bien por existir dos sitios con afinidad diferente en al menos uno de los ligandos, o porque uno de ellos esté presente en dos formas moleculares que varíen en cuanto a su capacidad de retención de DNA.

Al estudiar la influencia de la fuerza iónica sobre la interacción, se observa como la presencia del ClNa a 0,5 M tiene un efecto significativo, consistente en revertir las curvas sigmoidales hacia formas hiperbólicas. La fig. 26 B muestra tal transición, excepto para la H3, que ya es hiperbólica a baja fuerza iónica.

Es interesante resaltar, para el efecto de la fuerza iónica sobre la interacción H1-DNA, el hecho de que mientras sobre cromatina con 0,5M ClNa se logra extraer cerca del 90% de la H1, en nuestro caso la capacidad de retención del DNA se mantiene, e incluso es superior a bajas relaciones histona/DNA, en presencia de tal concentración salina. Esto nos llevó a estudiar la influencia de diversas concentraciones de ClNa, obteniéndose los resultados que muestra la fig. 27 A. Puede observarse, que existe un óptimo de interacción H1-DNA en el rango de concentración 0,1-0,2 M ClNa, y unos mínimos a concentraciones inferior y superior al óptimo.

Esta influencia del ClNa sobre la interacción H1-DNA, parece estar de acuerdo con un efecto de estructuración a baja fuerza iónica, y otro

Fig. 27.- Efecto de la concentración de Cl Na sobre la interacción H1-CT DNA y H4-DNA de A. Salina, a una relación de proteína: DNA de 0,5:1 (5 μ g H1: 10 μ g CT DNA/ml, 3 μ g H4: 6 μ g DNA A. Salina/ml). La interacción tuvo lugar a temperatura ambiente durante unos 15 min.



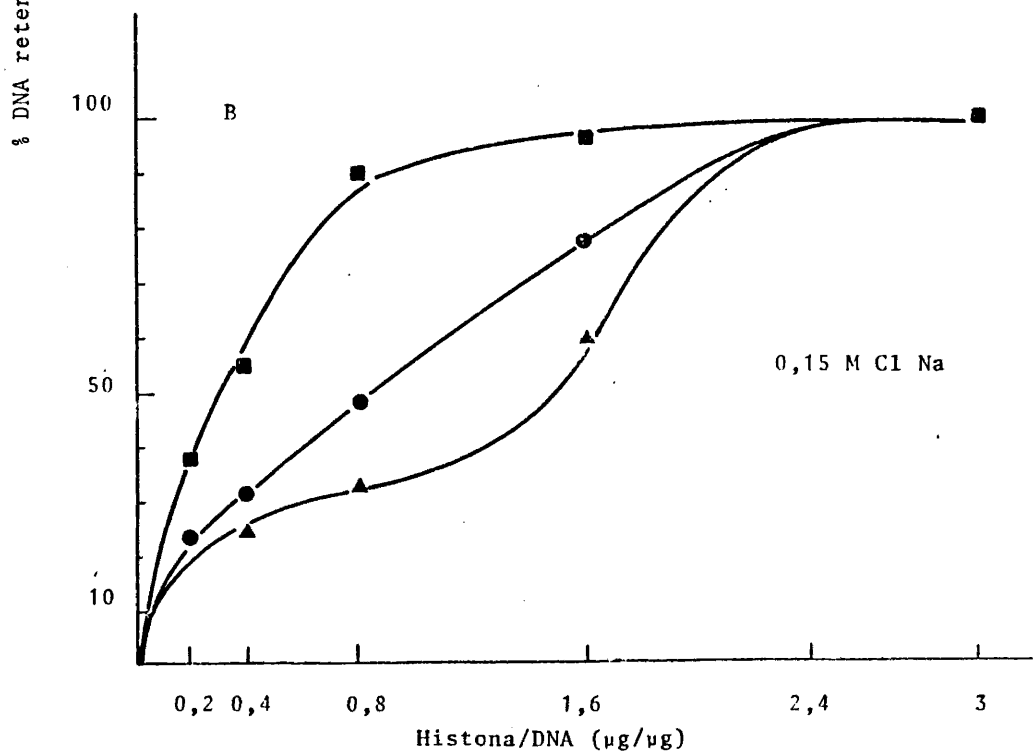
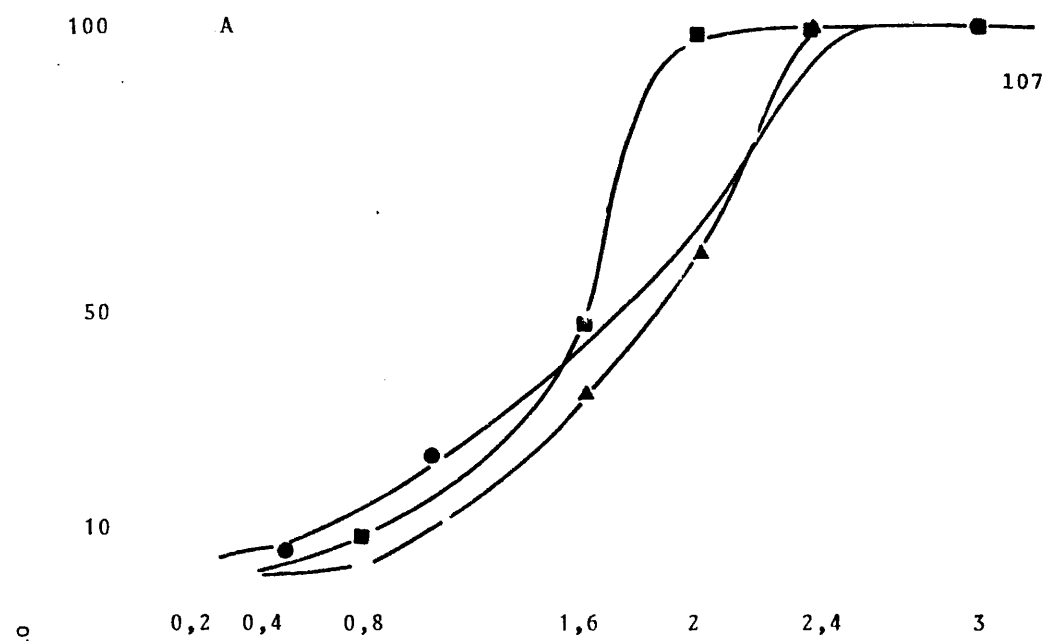
de perturbación clara de las interacciones normales a fuerzas iónicas mayores.

Estos aspectos podrían ser considerados también, a la luz de las últimas evidencias sobre el papel de la H1 en la superestructuración de la cromatina. En la Introducción se desarrolló tal problemática y la evidente influencia de los iones en la misma. Por otro lado, Severin y Col (150), en sus estudios turbidimétricos de las interacciones de H1 con DNA, han propuesto un mecanismo de condensación del DNA por la H1 dependiente de la fuerza iónica. A muy bajas fuerzas iónicas, los complejos H1-DNA no interaccionarían entre sí. A partir de 0,15 M ClNa, habría un progresivo entrelazamiento entre ellos, bien por uniones más o menos específicas o por la formación de puentes policationicos, de manera que cada molécula de histona se acomplejaría con más de una molécula de DNA.

Al realizar el mismo tipo de experimentos con DNA de Artemia salina, sorprendentemente nos encontramos con los resultados de la fig. 28 A y B. Es de destacar la acusada sigmoidicidad observable con histonas totales, o con las H1 y H4, en ausencia de sal.

Cuando la interacción se realiza en presencia de 0,15 M ClNa, se observa en primer lugar el efecto de reversión de las curvas hacia formas hiperbólicas, si bien con características particulares para cada histona. La H1 satura el DNA a bajos cocientes histona/DNA, bastante más bajos que con histonas totales. Es decir, las otras histonas o bien compiten en su unión al DNA con la H1, o su unión es de distinto tipo. La interacción H4-DNA responde claramente a esta diferente especificidad. El tipo de curva obtenida es bifásica (compárese con la de baja fuerza iónica). Parece pues, como que la presencia del ClNa diera lugar a un

Fig. 28.- Curvas de interacción de DNA de A. Salina con las histonas H1 y H4, así como con las histonas totales, en la ausencia o presencia de 0,15 M Cl Na. DNA de A. Salina, obtenido tal y como se describe en el texto, se hizo interaccionar con histonas totales (●), H1 (■) y H4 (▲), en la ausencia (A) o presencia de Cl Na a 0,15 M (B). La incubación se realizó a t^a ambiente durante 15 min.



nuevo tipo de unión que no aparece en su ausencia.

El estudio de la influencia de diversas concentraciones de ClNa sobre esta interacción, aparece en la fig. 27 B. Se comprueba como 0,15 M ClNa , parece representar la mínima concentración para lograr un nivel de saturación, y a partir de la cual ya no se ve afectado, al menos hasta 0,5 M.

Al comparar la influencia del mismo rango de concentraciones de ClNa sobre las interacciones del DNA con H1 y H4 (fig. 27), las diferencias observadas pueden explicarse por el carácter más electrostático de la interacción con H1. Por el contrario, las fuerzas hidrofóbicas serían más importantes en la interacción de H4 con DNA. El mismo hecho de la curva bifásica, debe tener relación con el tipo de fuerzas (iónicas e hidrofóbicas) que mantienen la interacción H4-DNA, las cuales se verían afectadas de esa manera por la sal. (Sin excluir la posibilidad de que la causa originaria de tal hecho radique en las moléculas de H4, ¿quizás en las formas no y monoacetiladas, que son las mayoritarias para la H4 extraída?).

Queda todavía una cuestión pendiente: ¿por qué se obtienen curvas diferentes cuando se utiliza el DNA de timo de ternera frente al de A. salina, especialmente a bajas fuerzas iónicas?. Es difícil suponer que sea debido a un problema de composición total en bases, ya que ambos DNAs tienen un 65% de riqueza en A-T (151). Es más, la fig. 19 B nos había mostrado que la H4 no parecía distinguir entre 2 homopolímeros de (A-T) ó (G-C).

Probablemente, estas diferencias pueden guardar relación con la posible existencia de secuencias específicas en el DNA de Artemia utiliza

do. De hecho, este DNA corresponde a unos fragmentos de restricción del DNA total, con $1,5-2 \cdot 10^6$ de PM, producidos por la acción de endonucleasas endógenas (152). Este mecanismo podría generar fragmentos de DNA, que teniendo la misma composición de bases que el DNA total, estuvieran enriquecidos en ciertas secuencias específicas. La fig. 29, mostrando la interacción entre H1 y H4 con DNA de Micrococcus lysodeikticus, 25% de A-T, a 0,15 M ClNa, podría apoyar también estos hechos.

La visión global de este último problema, nos llevaría a admitir una influencia del tipo de secuencias del DNA en la interacción con las histonas. Este hecho no está, hoy por hoy, ni excluido ni admitido.

II.B.2. Movilidad de las histonas.

Cuando se estudió la influencia del tiempo de incubación sobre la dinámica de la interacción DNA-histonas, llegamos a comprobar que la caída en los valores de DNA retenido a medida que transcurre el tiempo, no es exclusivo de la presencia de proteasas.

La Tabla V nos muestra los valores de retención de DNA en unidades fluorométricas para la interacción histonas-DNA, cuando se realiza con CT DNAs de la casa Sigma, o bien de la Worthington, pero desnaturizadas térmicamente o lavadas con ClNa 2,5 M, condiciones todas ellas en las que las actividades proteolíticas son nulas o escasas (5% como máximo de la del CT DNA w).

Se observa como a bajas relaciones histona/DNA, los cocientes 2 horas/5 minutos son muy bajos en relación con los obtenidos a valores de saturación. Ello sugiere la existencia de un mecanismo de movilidad o intercambio de histonas entre diferentes moléculas de DNA, algo que ya

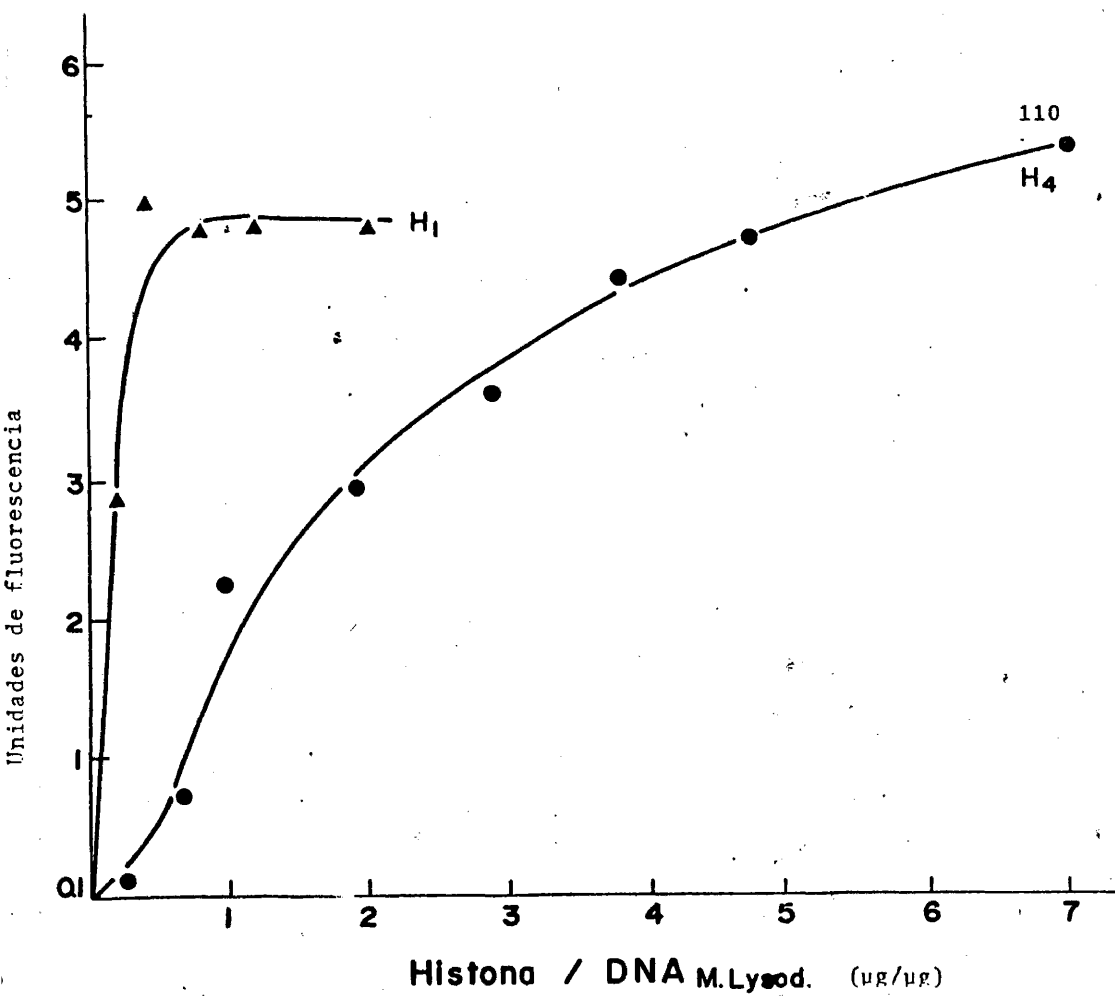


Fig. 29.- Curva de interacción de DNA de *M. lysodeikticus* con H1 y H4, en presencia de 0,15 Cl Na. La t^ade incubación fué la ambiental.

se ha sugerido por otros investigadores (153-155), e incluso para nucleosomas (156). Es decir, creemos que existe la posibilidad de que las histonas se puedan pegar y despegar de un fragmento determinado de DNA, y/o bien de la de que puedan deslizarse a lo largo del mismo.

TABLA V

	<u>Histona/DNA</u>	<u>5 min.</u>	<u>2 horas</u>	<u>2h/5m.</u>
CT DNA, Sigma	0,4	1,69	0,45	0,27
" "	3	3,79	3,44	0,91
W DNA desnaturalizado	0,4	0,37	0,27	0,73
termicamente	3	3,42	3,55	1,04
W DNA lavado con ClNa 2,5 M	0,4	2,42	0,41	0,17
" " " "	3	3,52	3,53	1,00

Cuando el mismo tipo de experimento se realiza con histonas individuales, p.ej. la H4, se obtienen los resultados de la fig. 30. Obsérvese el cambio que experimenta el valor de retención de DNA a medida que transcurre el tiempo, para una relación H4/DNA baja, y a una concentración de 0,15 M ClNa y temperatura de 37°C (es decir, incluso en condiciones de fuerza iónica y temperatura fisiológicas). Esta caída en la capacidad de retención de DNA por la H4, podría contribuir a explicar el cambio de la curva hiperbólica (fig. 28 B) a la sigmoide (fig. 28 A) con el paso del tiempo. Este hecho es discutido a continuación a la luz de una tesis más general.



II.B.3. Consideraciones finales: cooperatividad dinámica.

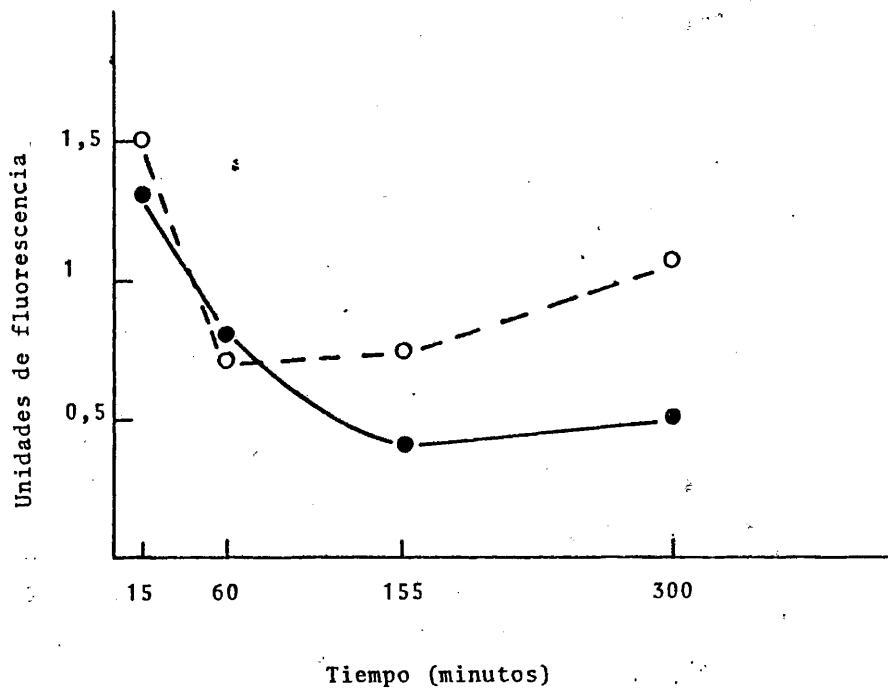


Fig. 30.- Efecto de la influencia del tiempo sobre la interacción H4-DNA A. Salina, a una relación de H4:DNA de 0,4: 1 -- (µg/µg), en presencia de Cl Na 0,15 M y a las temperaturas de 0° C (O) o 37° C (●).

La fig. 31 intenta ser un resumen de todos los aspectos que vamos a considerar acerca de las interacciones histona-DNA.

Excluída definitivamente en nuestros experimentos la posibilidad de artefactos por proteasas contaminantes, hemos mostrado la aparición en ciertos casos de curvas de interacción sigmoides.

Aparecen a veces a tiempos muy cortos de interacción (5'), o bien tras un período más largo (p.ej. 2 horas), como hemos mostrado. Por otro lado, el ClNa es capaz siempre de revertirlas hacia interacciones de representación hiperbólica.

¿Cómo podíamos conjugar estos hechos a la luz de nuestra experiencia y lo descrito en la literatura científica?. Creemos que nuestros resultados son explicables en virtud de una cooperatividad dinámica. Es decir, existe inicialmente la posibilidad de un intercambio y deslizamiento de las histonas entre distintos fragmentos de DNA, y posiblemente dentro de una misma molécula. Pues bien, cuando el proceso de interacción es cooperativo, es decir, que la unión de unas histonas favorece las uniones subsiguientes de nuevas moléculas de histona, es lógico esperar la aparición de agrupamientos de histonas a lo largo del DNA. El ClNa actuaría en este esquema rompiendo la cooperatividad, el agrupamiento (aunque no necesariamente la redistribución al azar de las histonas), seguramente por alteraciones electrostáticas y conformacionales sobre las histonas y el DNA.

El transcurso del tiempo, al ofrecer a las histonas cualquier posibilidad de los movimientos de que sean capaces, facilitaría también una distribución no al azar de las histonas, una interacción sigmoide, en aquellos casos en los que la cooperatividad no es tan fuerte y necesita

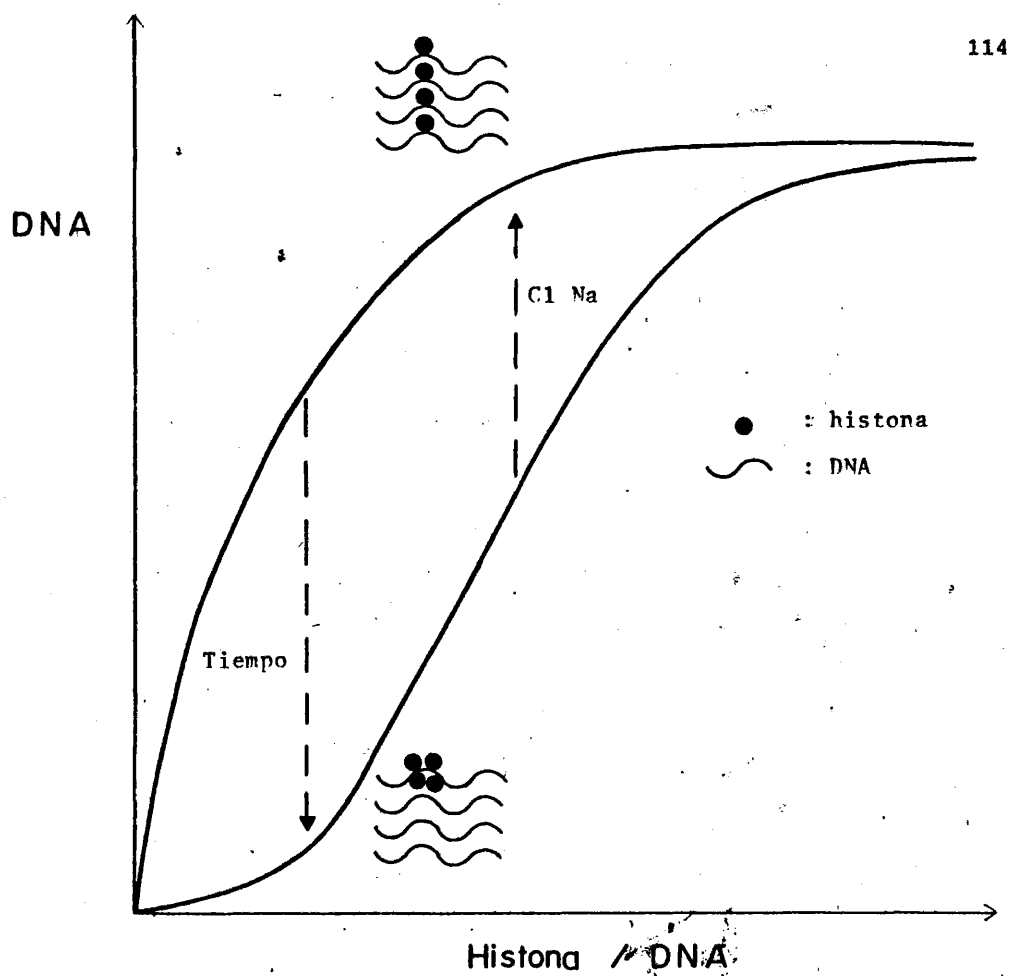


Fig. 31.- Esquema gráfico de la Interacción histonas-DNA, mostrando el fenómeno de la cooperatividad y las influencias del -- tiempo y Cl Na.

tiempo.

Frente a estas consideraciones teóricas, existe también el hecho práctico de cuántas moléculas de histona serían necesarias para retener una molécula de DNA. Parece lógico pensar que en aquellas moléculas de DNA en las que las histonas se hubieran distribuido al azar, habría mayor número de puntos de retención por el filtro; en cambio, si se distribuyen por agrupamientos cooperativos, el número de puntos sería menor, siendo limitante la cantidad de histona (bajos cocientes histona/DNA). Este hecho, así como la fuerza de retención por el filtro de aquellas zonas de DNA acomplejadas con una o varias histonas en grupo, justificarían también el tipo de curvas obtenidas en base a la hipótesis formulada.

Histonas acetiladas.

Puesto que el segundo de nuestros objetivos era investigar la inflcia de la acetilación de histonas en la transcripción, nos propusimos previamente estudiar la interacción histonas acetiladas-DNA con nuestra metodología de retención en filtro.

A tal efecto, acetilamos histonas totales de timo de ternera con anhídrido acético tritiado, en condiciones en que sólo se modifican los grupos amino ϵ de las lisinas internas. El grado de acetilación resulta te fué medido por incorporación de tritio y por enmascaramiento de grupos aminos libres, ensayado con fluorescamina. La fig. 32 nos muestra que fué del orden de un 35%, lo que supone un valor de unos 13 acetilos incorporados por molécula de histona (considerada esta como un valor medio de las cinco histonas existentes).

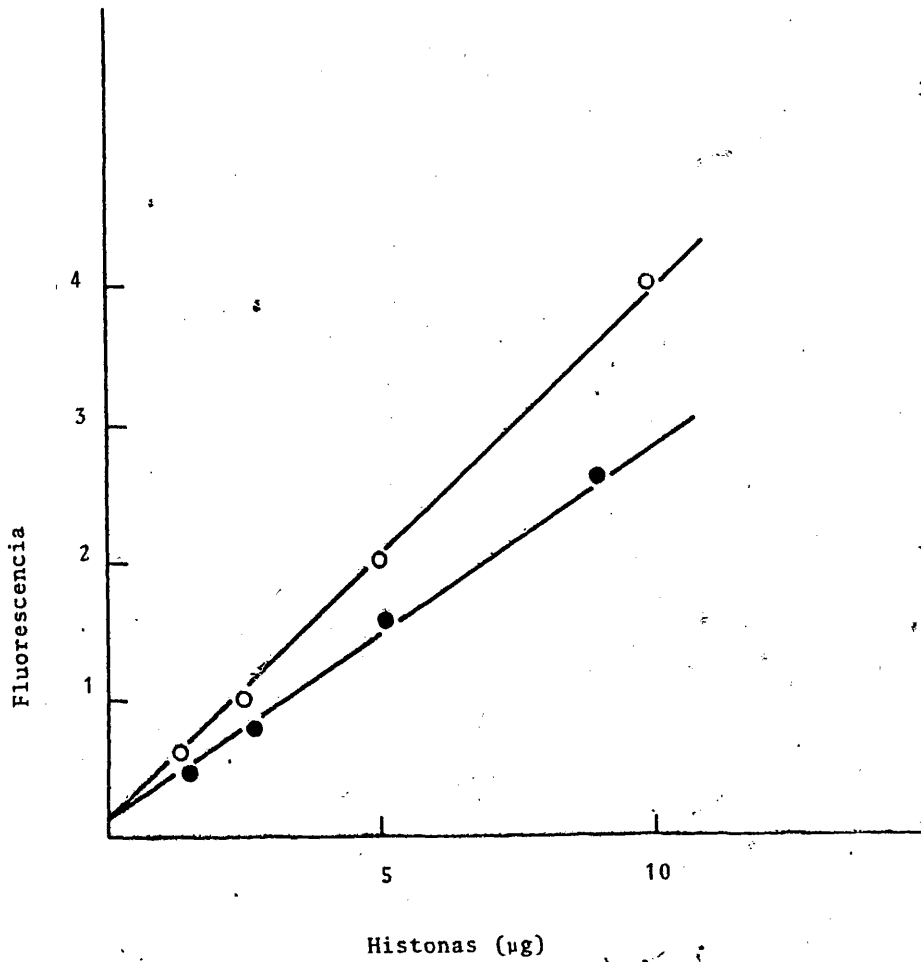


Fig. 32.- Determinación del grado de acetilación de histonas totales tratadas con anhídrido acético, medido con fluorescamina. Histonas totales comerciales de tino de ternera fueron acetiladas químicamente con anhídrido acético. A continuación se les aplicó el método de la fluorescamina. (Ver Metodología).
(Histonas nativas:○; histonas acetiladas:●).

Estas histonas acetiladas se compararon con las no acetiladas con respecto a la ligazón a DNA, en presencia de concentraciones variables de ClNa. Los resultados de este estudio muestran (ver fig. 33) que no hay diferencias en las curvas de interacción de ambos tipos de histonas, hasta concentraciones salinas de 0,15 M. A concentraciones superiores, se empiezan a poner de manifiesto diferencias de afinidad, que son máxi mas a 0,5 M ClNa. A partir de esta concentración, se afecta también la ligazón de histonas no modificadas.

Estos experimentos ponen de manifiesto una perturbación de la inter acción histonas-DNA, a resultas de la acetilación química. El hecho de que esta perturbación sea solo observable a concentraciones relativamen te altas de ClNa, sugiere que la principal fuerza de las interacciones en nuestras condiciones de ensayo, son esencialmente de carácter electros tático.

Por otro lado, estos resultados nos sugieren la cuestión de si tie ne algún sentido fisiológico esta menor afinidad de las histonas aceti ladas con el DNA. La parte segunda de nuestro trabajo, que vamos a desa rrollar a continuación, trata de acercarse a la elucidación de este pro blema.

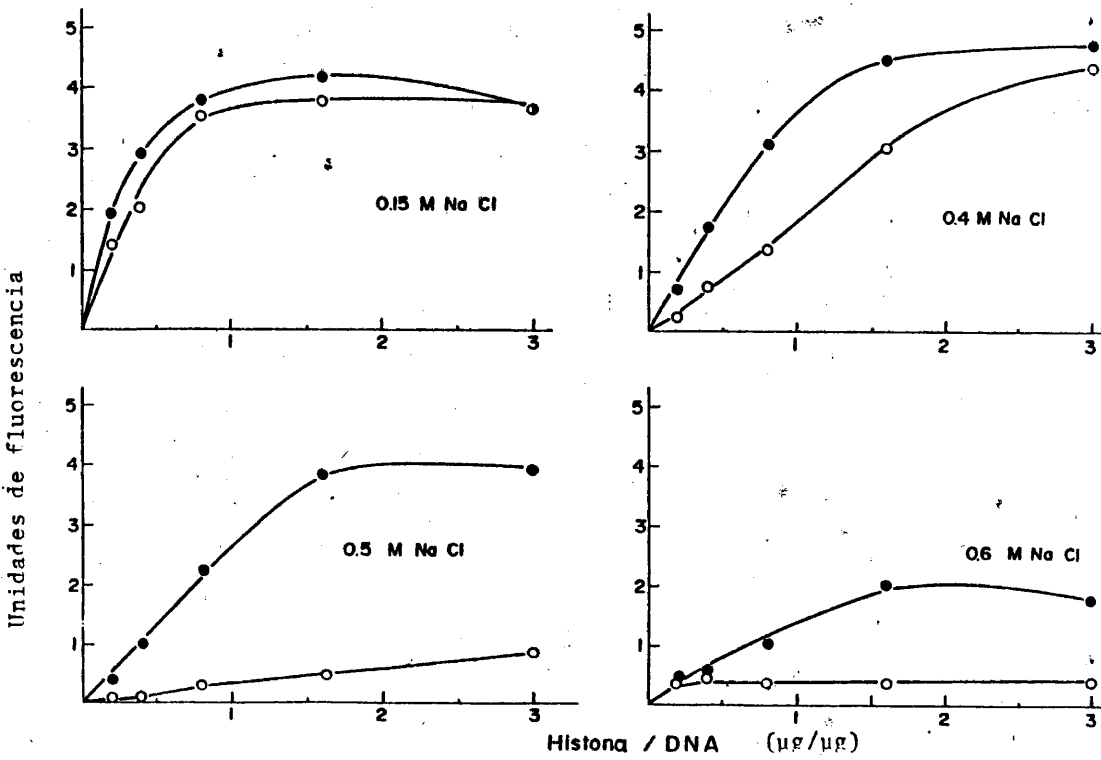


Fig. 33.- Influencia de la acetilación de histonas sobre la interacción con DNA a diferentes concentraciones salinas. Reacción de interacción por 5 min a t° ambiente. (Histonas totales nativas: ●; histonas acetiladas: ○).

III. ASPECTOS FUNCIONALES

III.A.1. Fundamentos de la metodología.

Las grandes distancias que separan el mundo puramente físico-químico del auténticamente fisiológico-biológico, se traducen ya para el investigador en la dificultad de encontrar el sistema biológico adecuado para su trabajo experimental.

Nosotros hemos partido de la idea de que si queríamos estudiar la influencia causal de un proceso fisiológico, el de la acetilación de histonas, sobre otro, la transcripción de la cromatina, deberíamos elegir aquel sistema en el que pudiéramos conseguir: a/ el máximo grado posible de acetilación de las histonas (confiando que ello implicaría un mayor efecto a su vez en la transcripción) ; b/ realizar el estudio de esta influencia en las condiciones más fisiológicas posibles; y c/ situarla al nivel más directo posible. Sin duda, los núcleos aparecían como el más apropiado, dado que nos permitía mantener en una estructura cerrada y relativamente estable los tres tipos de moléculas que nos preocupan esencialmente: histonas, RNA polimerasas y DNA; así como la mayoría de las moléculas con un posible papel regulador a nivel de cromatina. Por lo tanto, nos ofrecía la posibilidad de utilizar sus actividades enzimáticas endógenas, siempre que el trato fuera cuidadoso. La propia cromatina podría también utilizarse, y de hecho lo intentamos, pero obviamente es menos completo que el sistema de núcleos ; más difícil de manejar.

Como ya hemos apuntado, durante el desarrollo de nuestro trabajo se reportó que el Butirato Na producía en una serie de células una hiper-

acetilación de histonas. Ello nos permitía cumplir con otra de las condiciones previas que hemos citado, la de lograr un alto grado de acetilación de histonas; y además (de aquí su gran interés), fisiológico, en los sitios de las histonas que se acetilan usualmente en la célula. Por otro lado, la presencia de butirato a lo largo de todas las manipulaciones experimentales de los núcleos, incluida la transcripción, garantiza el mantenimiento de la hiperacetilación de histonas por inhibición de las actividades deacetilantes.

III.B.1. Núcleos y cromatina de hígado de rata.

Pomerai, Chesterton y Butterworth (125) han estudiado diversos métodos de preparación de cromatinas, encontrando que el que ellos han desarrollado proporciona una cromatina en buen estado funcional. Siguiendo sus indicaciones, hemos obtenido núcleos y cromatina a partir de hígados de rata.

La fig. 34 muestra los espectros de absorción ultravioleta de ambas preparaciones. Obsérvese su semejanza, indicador de que la preparación de la cromatina no ha eliminado muchas de las proteínas nucleares.

III.B.2. Acetilación: aspectos enzimáticos.

En la fig. 35 se resume la caracterización del sistema de acetilación de núcleos aislados de hígado de rata a pH 8, (a pH > 9, hay una acetilación química (157), fuerza iónica de 0,25 M $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y temperatura de incubación de 37°C. Del estudio de la cinética en función de la concentración de uno de los sustratos, acetil CoA, se deduce una K_m de 1-2 μM , en estas condiciones. Tomamos como óptimo el valor de 4 μM , puesto que es el valor más bajo que alcanza el nivel de saturación.

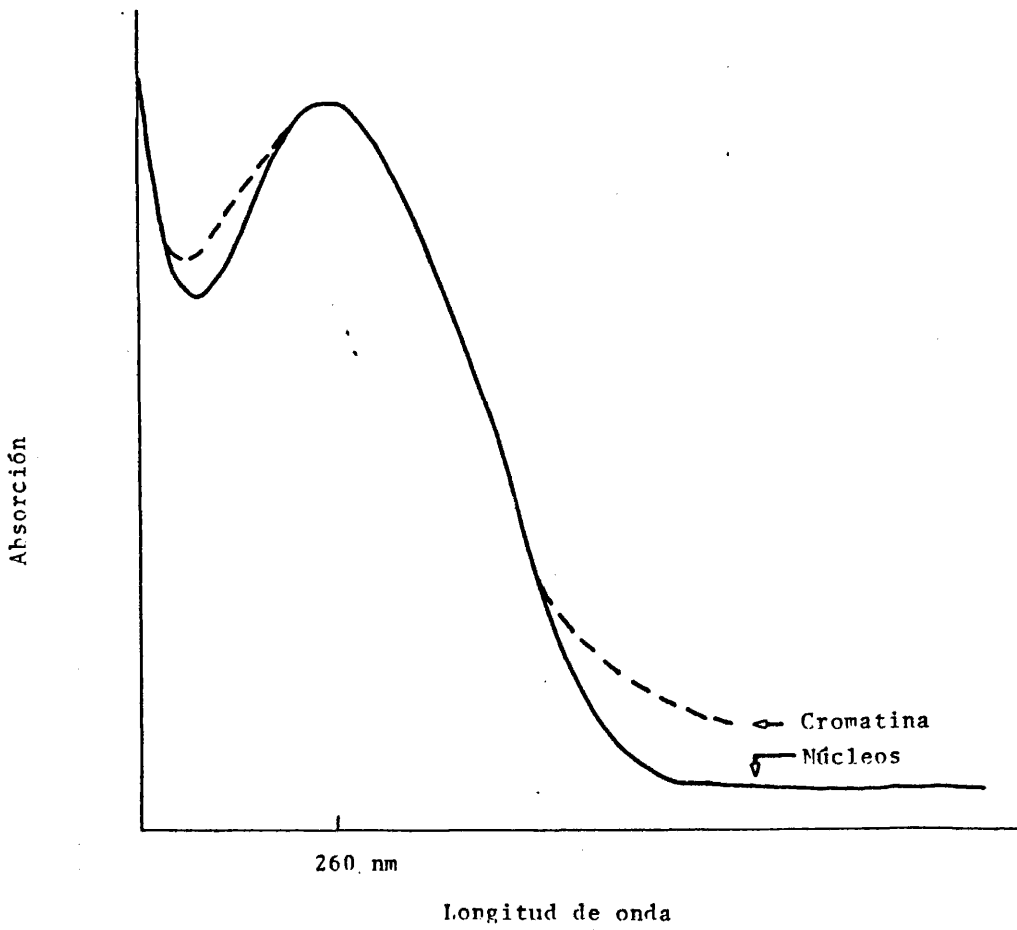
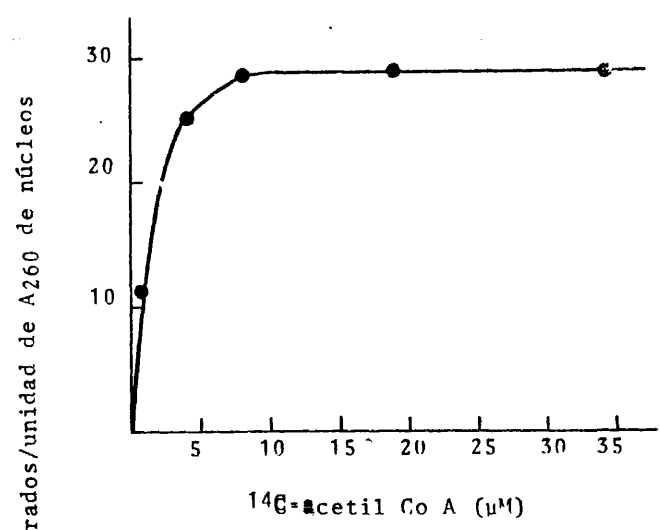
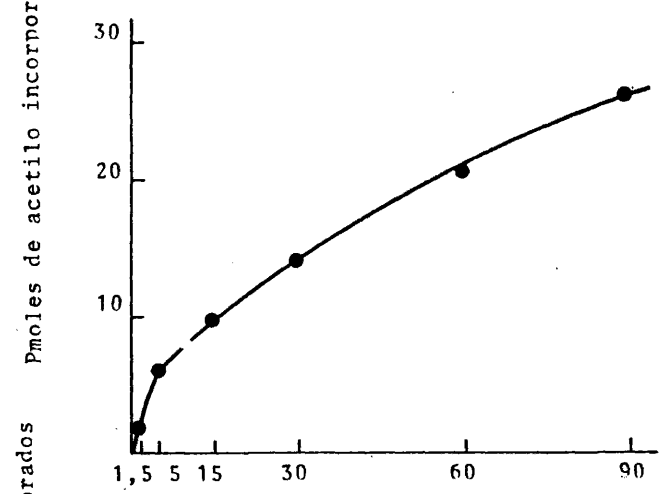


Fig. 34.- Espectros de absorción ultravioleta de núcleos y cromatina, obtenidos siguiendo el procedimiento descrito en el texto.

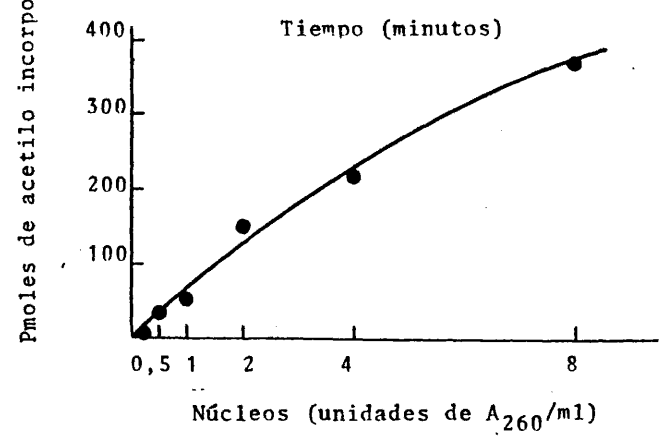
Fig. 35.- Caracterización del sistema endógeno de acetilación enzimática en núcleos de hígado de rata: Influencia a/ de la concentración de acetyl Co A (reacción de 10 min. a 30°C), b/ del tiempo de incubación (a 30°C) y c/ de la concentración de núcleos en la reacción (60 min. a 37°C).



a



b



c

Al hacer la curva de tiempo, se observa un rápido incremento en los primeros minutos, para luego darse una incorporación más lenta pero progresiva. Treinta a sesenta minutos parecen tiempos suficientemente adecuados para nuestros experimentos.

Finalmente el sistema responde linealmente a la concentración de uno de sus sustratos, las histonas o lo que es lo mismo, los núcleos; si bien hay que señalar, que también se aumenta la actividad total del enzima, aunque manteniendo una relación fija con la cantidad de histonas, por el hecho lógico de que ambos van juntos en los núcleos. La curva nos muestra por otro lado que las cantidades de acetil CoA empleadas no son limitantes, al menos en el rango de concentración de núcleos estudiado, expresado en unidades de absorción óptica a 260 nm. Siendo ello así, lo mejor es, desde luego, utilizar la concentración más alta posible de núcleos, pero usualmente hemos utilizado 0,25-10.D. 260 nm por tubo de reacción.

III.B.3. Análisis electroforético de histonas acetiladas.

Cuando sobre los núcleos acetilados, o sobre la cromatina obtenida de ellos, se procede a la extracción de las histonas con ácido SO_4H_2 0,4 N, es posible a continuación analizar estas histonas en geles de acrilamida urea-acético y cuantificar la incorporación radiactiva del ^{14}C -acetato. A pesar de realizar dos veces sucesivas la extracción con sulfúrico, siempre queda un precipitado residual en el que es posible encontrar hasta un 15% de la radiactividad total. Ello no es de extrañar, puesto que es conocido que las proteínas no histónicas tales como las HMG, no extraíbles, pueden ser también acetiladas (158).

Cuando se hace una electroforésis en gel de una muestra de histonas, es posible obtener el densitograma que aparece en la fig. 36. Si el gel se fracciona en rodajas y se cuenta su radiactividad, se obtienen los porcentajes de acetilación, respecto al total de todas las histonas, que muestra la fig. 36.

Destaca el alto porcentaje de acetilación de la H3. Nuestros resultados son parecidos a otros ya reportados con el mismo sistema (157). Aquí mismo se menciona también, que cerca del 35% de los acetilos incorporados a la H3 son grupos O-acetilos, en contraposición al resto, N-acetilos, que son también los comunes en las otras histonas.

III.B.4. Transcripción de cromatina y núcleos.

En base al trabajo de Pomerai y Col. empezamos caracterizando nuestro sistema de transcripción de cromatina. La fig. 37 muestra como diversas concentraciones de cromatina se transcriben en función del tiempo, siendo 30'-60' de incubación suficientemente adecuados, ya que aunque la gráfica no lo muestra, a las dos horas de transcripción se ha conseguido un nivel de saturación en la incorporación de H^3 -UTP como UMP. Ello es consecuencia, sin duda, de que la cromatina sufre con el paso del tiempo transformaciones en su estructura funcional, de manera que la actividad de las RNA polimerasas endógenas debe estar bastante afectada. A ello hay que unir que en nuestro caso se utiliza una temperatura de 37°C, en la que las actividades nucleásicas están bastante favorecidas. Si se utiliza una temperatura más baja la incorporación es menor, si bien a tiempos largos, la incorporación supera a la obtenida a temperaturas más altas. Cuando ha interesado disminuir al máximo la acción

Fig. 36.A.- Distribución de proteína y ¹⁴C-acetilo en las histonas extraídas de preparaciones de núcleos y cromatina de hígado de rata, tras análisis electroforético en geles.
La determinación de proteína se realizó por pesada de los recortes correspondientes a cada histona del papel densitograma. La determinación radiactiva del ¹⁴C, según se describe en Metodología.

B.- Densitograma de un gel con histonas extraídas de cromatina.

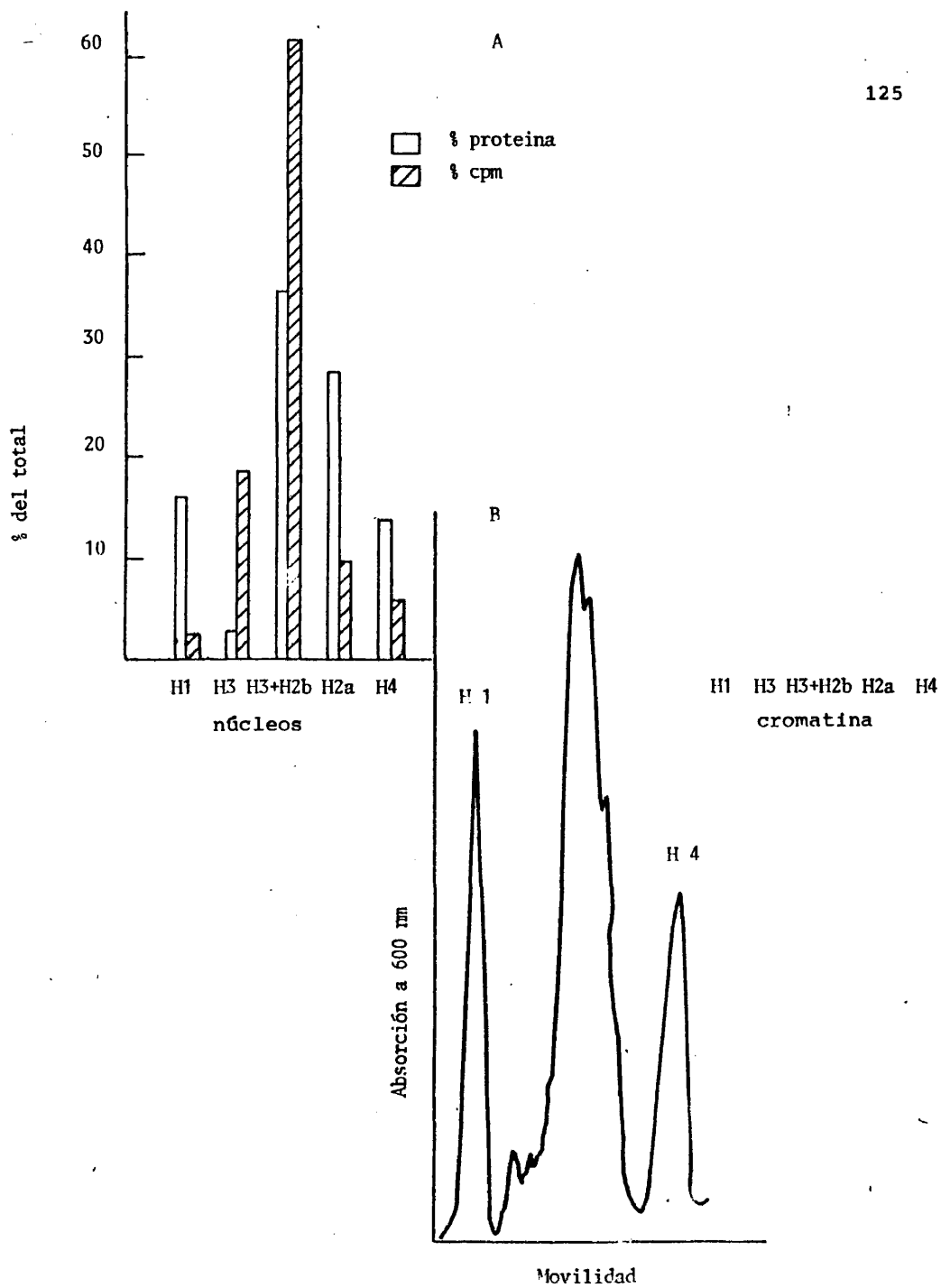
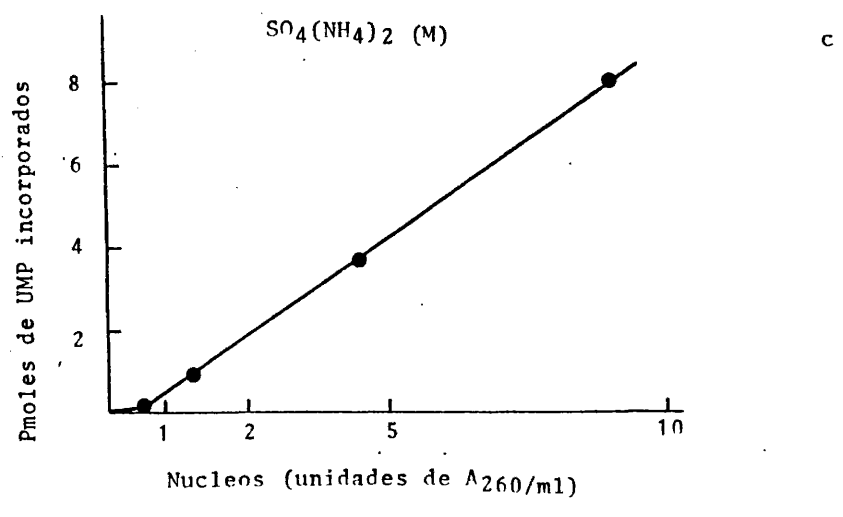
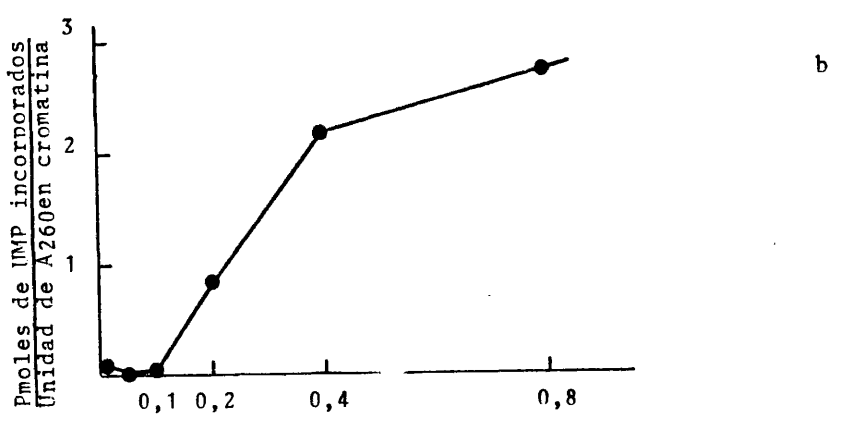
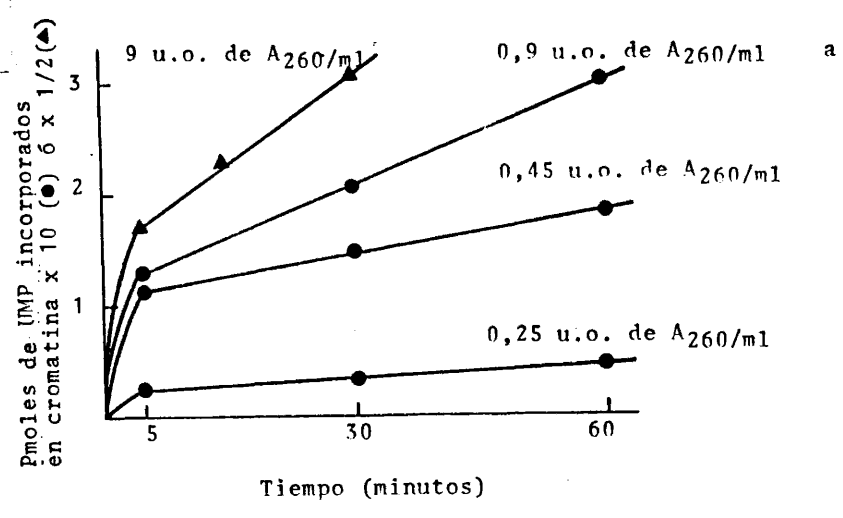


Fig. 37.- Caracterización del sistema endógeno de transcripción en cromatina y núcleos de hígado de rata. Se ha estudiado: a/ la influencia de la concentración de cromatina y tiempo de reacción y b/ la influencia de la concentración de sulfato amónico, en la transcripción de cromatina. Así como c/ la influencia de la concentración de núcleos en su transcripción. Las reacciones tuvieron lugar a 35-37°C durante 30 min.



nucleásica, hemos recurrido a temperaturas de 26-28°C. Por otro lado, hemos reproducido la propia experiencia reportada por los autores (125) acerca de la influencia de la fuerza iónica en la transcripción. Utilizando $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, se encuentra que a medida que aumenta la concentración de estasal, lo hace la incorporación de UMP, siguiendo un tipo de curva de forma sigmoidal (fig. 37). Naturalmente, hay que tener en cuenta que es de desear la utilización de la concentración salina más alta posible, siempre que no afecte a la propia estructura de la cromatina, ni las actividades enzimáticas. Así sabemos que ya a 0,4 M ClNa, empieza a separarse la H1. Alrededor de este valor gira el óptimo a utilizar, 0,25 M $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Cuando estas cromatinas transcritas se depositan sobre un gradiente de sacarosa 2-10% con formamida, y se centrifugan a alta velocidad, es posible obtener los resultados que muestra la fig. 38. Los inconvenientes, sin embargo, de este análisis en gradiente con formamida se centran en que no son realmente lineales sino convexos, y en que la resolución no es suficientemente buena. Quizás la electroforesis en geles para nucleicos pudiera ser una buena alternativa.

Hemos encontrado más adecuado para nuestros propósitos realizar la transcripción en núcleos, en las mismas condiciones descritas arriba para cromatina. El micropipeteo de alícuotas homogéneas resulta más fácil, lo que no sucedía con la cromatina, la cual llega a formar a veces una especie de sustancia gelatinosa, precipitada en el fondo de los tubos de transcripción. Ello nos obligaba a su previa homogeneización, lo menos posible a fin de evitar su fraccionamiento y rotura, en un homogeneizador. Claramente, así se perdían parte de las ventajas que se buscaban

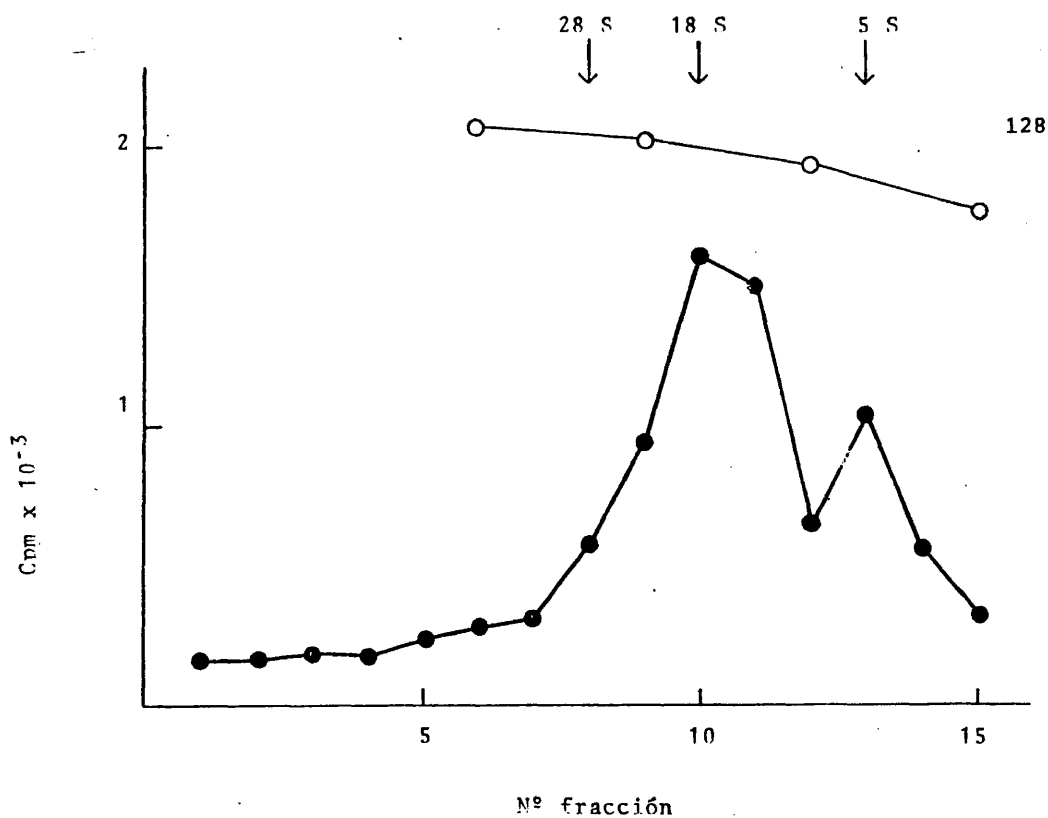


Fig. 38.- Gradiente de sacarosa-formamida al 2-10% de un transcrito de cromatina de hígado de rata. Se transcribió cromatina de hígado de rata en un volumen de 150 μ l durante 30 min a 35°C. (ver Metodología). La reacción fué parada añadiendo SDS hasta el 1% y un volumen igual de formamida. La muestra total fué centrifugada en un gradiente de sacarosa 2-10%, formamida 85%, EDTA 2 mM y Tris-Cl H 10 mM, pH 8. La centrifugación se realizó a 286.000 g durante 17 horas y 2°C, en un rotor SW 56. Las fracciones del gradiente fueron precipitadas con TCA 5%-pirofosfato 2% y filtradas por filtros de fibra de vidrio y posterior recuento, con líquido de centelleo, de la radiactividad.

con la metodología de Pomerai y Col. en la obtención de cromatina: evitar cualquier proceso que pudiera perturbar su estado, tal y como se encontraría en el núcleo.

La fig. 37 muestra una respuesta lineal de la incorporación de UMP frente a la concentración de núcleos.

La fig. 39 muestra el efecto de la influencia de la concentración de UTP frío, manteniendo fija la cantidad de H^3 -UTP. Obsérvese como el óptimo se sitúa en 50 μ M. La caída que se observa posteriormente podía ser debida a la quelación por el nucleótido del Mn^{2+} , con lo que la concentración de este libre disminuiría (de hecho lo que se debe hacer es poner siempre una misma cantidad equimolar del ión y de los nucleótidos, independientemente del valor de Mn^{2+} libre), así como de la dependencia de la síntesis de las propias concentraciones de los nucleótidos.

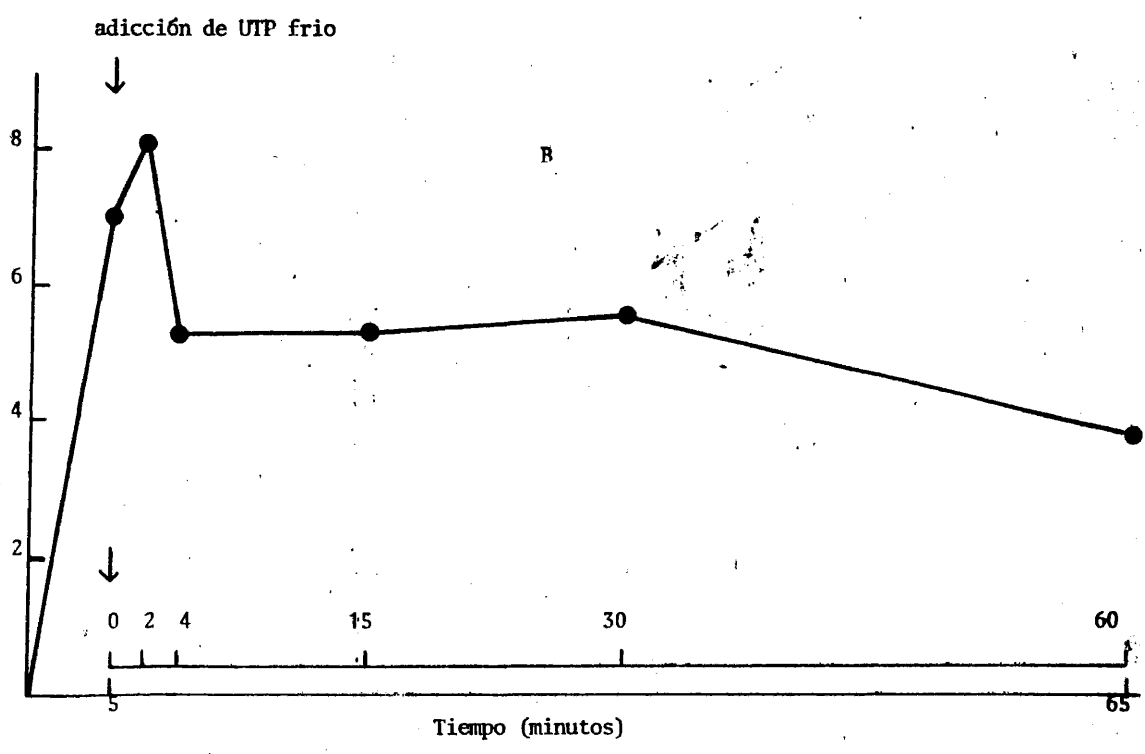
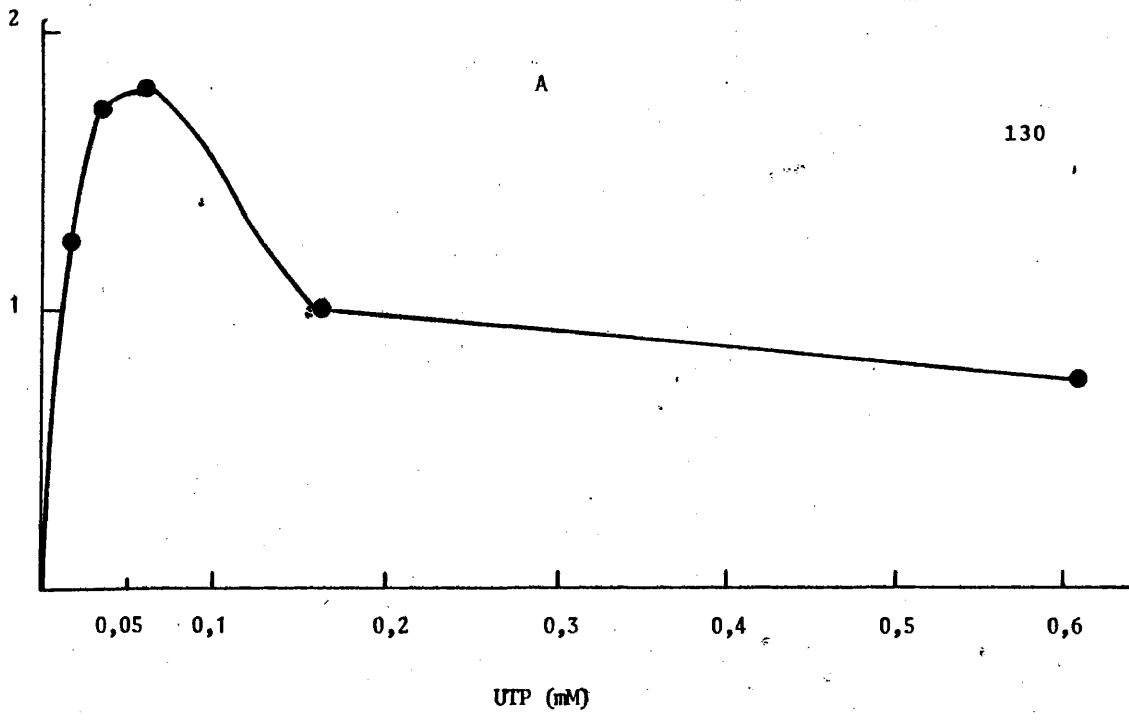
Con el fin de tener una idea aproximada sobre la capacidad total nucleásica de los núcleos, se procede a un experimento de caza, en el que tras un breve tiempo de incubación se añade un alta cantidad de UTP frío, reduciendo prácticamente a la nada la incorporación del H^3 -UTP. De esta manera, es posible seguir la caída a lo largo del tiempo de la radiactividad incorporada. La fig. 39 muestra tal experimento. De él se deduce que la actividad nucleásica total es del orden de un 20%. Su influencia final podría ser considerable si el tiempo de incubación es suficientemente largo (obsérvese como a los 60', su acción representa ya un 45%).

Este hecho nos urge a extremar nuestras condiciones de control de actividades nucleásicas. A tal fin utilizamos el macaloide, substancia conocida como inhibidor de las nucleasas (131) al ser un silicato adsorbente de estas proteínas. La tabla VI muestra que la presencia de macaloide

Fig. 39.A.- Influencia de la concentración de UTP sobre la transcripción de núcleos de hígado de rata. La reacción se realizó a 37°C durante 60 min.

B.- Determinación de las actividades nucleásicas en núcleos de hígado de rata. Tras 5 min. de incubación de una muestra de núcleos se añadió al medio de incubación un exceso de UTP frío, 10 veces la concentración original - en la reacción, prolongándose la reacción por 60 min más. La t^a de la reacción fué de 37°C.

El macaloide estaba presente en ambos experimentos.



no afecta a la transcripción a tiempos cortos, en núcleos aislados.

TABLA VI

	<u>Tiempo de transcripción</u>		
	<u>0'</u>	<u>30'</u>	<u>cpm netas</u>
Sin Macaloide	1719 cpm	13259 cpm	11.540
Con Macaloide	2010 cpm	13570 cpm	11.560

El macaloide debe estar presente no sólo en el medio de incubación, sino que todas las soluciones con las que tienen contacto los núcleos hasta su obtención, deben ser también tratadas con él mediante su resuspensión por agitación en ellas, para ser sedimentado luego y eliminado por centrifugación. Presenta, no obstante, el inconveniente de provocar la agregación de los núcleos. Independientemente de la utilización de este inhibidor, debe trabajarse siempre en las máximas condiciones de esterilidad posible (tratamiento térmico en autoclave de las soluciones). Todavía realizamos una prueba más con los núcleos, en base a la posible influencia de una preincubación en la capacidad de transcripción posterior. Y ello, por el simple hecho de que la acetilación previa de las histonas exige una incubación.

Realizado este experimento, comprobamos desafortunadamente que la capacidad de transcripción de núcleos previamente incubados era drásticamente reducida, respecto a núcleos control que habían permanecido en hielo. (fig. 40).

III.B.5. Análisis electroforético en geles de RNAs transcritos.

Con la técnica de electroforesis en geles de acrilamida-agarosa en

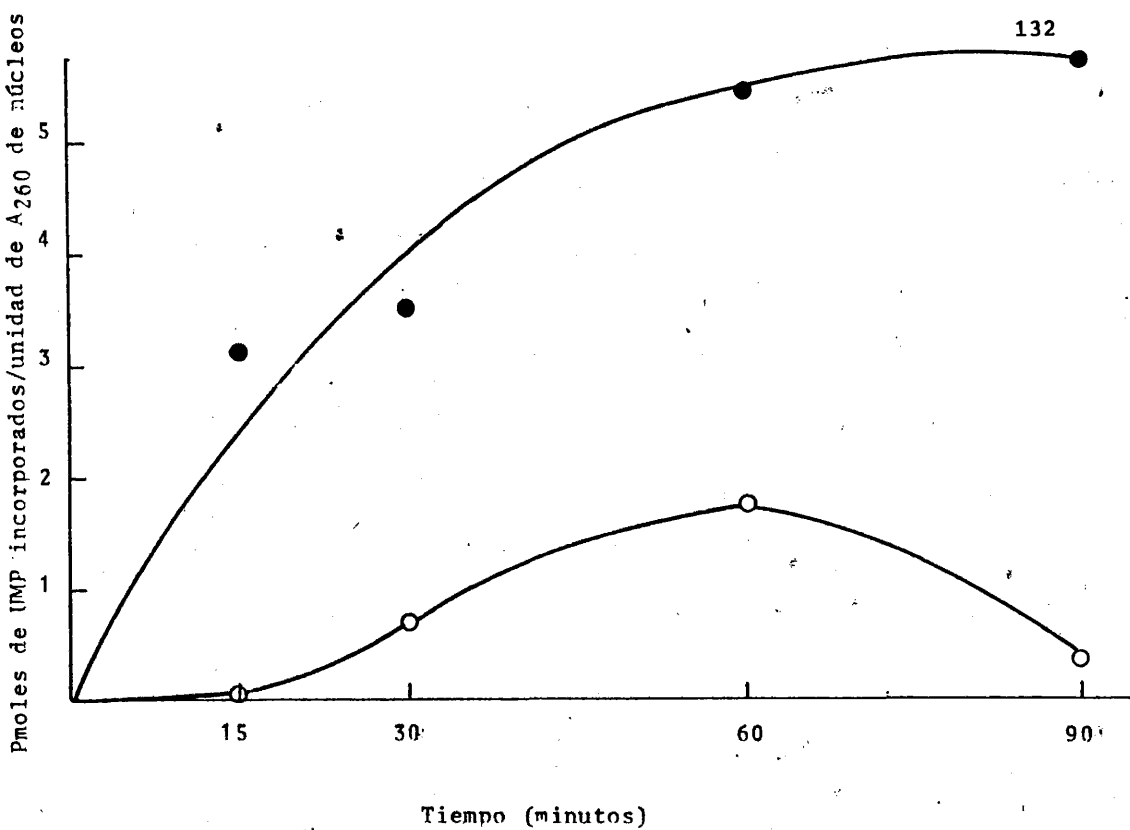


Fig. 40.- Efecto de la preincubación sobre la capacidad de transcripción de núcleos de hígado de rata. Se prepararon dos preparaciones de núcleos. Una fue preincubada 60 min. a 0°C (●), y la otra a 37°C (○), en presencia de EDTA 2 mM. A continuación se transcribieron durante 90 min. a 37°C, con agitación, tras ser sedimentados por centrifugación del tampón R en el que fueron preincubados.

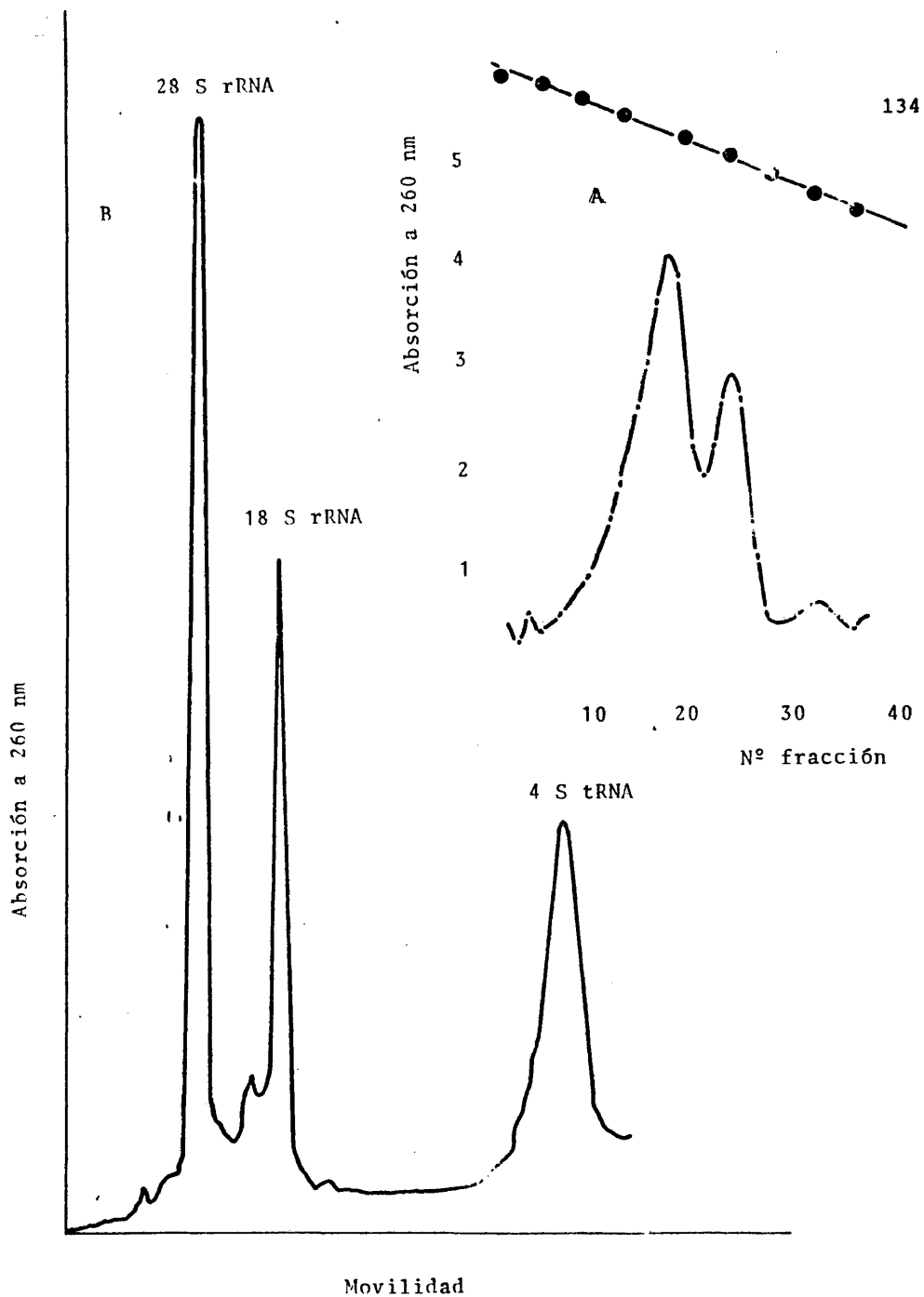
condiciones desnaturalizantes (SDS, 0,3%), pretendemos un análisis detallado por tamaños moleculares de los RNAs transcritos. Para tal finalidad necesitamos, desde luego, disponer de algunos RNAs de tamaños conocidos que podamos tomar de referencia. Se utilizan comúnmente los RNAs ribosomales 28, 18 y 5S, y el 4S tRNA. Nosotros hemos aislado, siguiendo el procedimiento descrito en Métodos, los RNAs a partir de ribosomas de hígado de rata. Vease la fig. 41, que nos muestra un gradiente en sacarosa 5-20% y con SDS, en el que aparecen fraccionados los 3 RNAs característicos. Cuando con estos RNAs se hace una electroforesis en gel, se obtiene el perfil de absorción óptica a 260 nm que muestra la misma fig. 41, en el que aparecen claramente delimitados. Obsérvese su mucha mayor resolución frente al análisis en gradiente de sacarosa.

Analizados de la misma manera los RNAs transcritos y aislados a partir del sistema de núcleos, observamos extrañamente una falta de correspondencia entre las cpm ácido precipitables de los RNAs aislados y las distribuidas a lo largo de los geles. Es decir, en nuestros geles había una cantidad de cpm mucho mayor, especialmente hacia el final del gel, avanzando con el frente de electroforesis. Ello nos hizo sospechar especialmente de la fuerte contaminación de nuestras muestras de RNAs con H^3 -UTP contaminante, no precipitable con TCA. Con el fin de eliminar tal interferencia, procedimos previamente a pasar la muestra de RNAs por una columna de Sephadex G-25 (expuesta o hervida anteriormente a un pH de 12; a fin de eliminar posibles nucleasas contaminantes). De esta manera podíamos eliminar el H^3 -UTP contaminante, así como los nucleicos degradados y/o menores de 5.000 de P.M. La fig. 42 nos muestra una elución típica en estos casos. Los nucleicos excluidos eran precipitados de nuevo, y utilizados para su análisis en geles de electroforesis. La fig. 43

Fig. 41.- Fraccionamiento de los rRNAs marcadores por centrifugación en gradiente y electroforesis en gel.

A.- Gradiente de sacarosa 5-20%, con SDS 0,1%, de los rRNAs. La centrifugación se realizó en un rotor SW 27, 17 horas a 24000 rpm, a 4°C.

B.- Densitograma de un gel de electroforesis de los rRNAs y 4S tRNA. La electroforesis se prolongó hasta que el azul de bromofenol se encontraba a 2 cm del final del gel (ver Metodología).



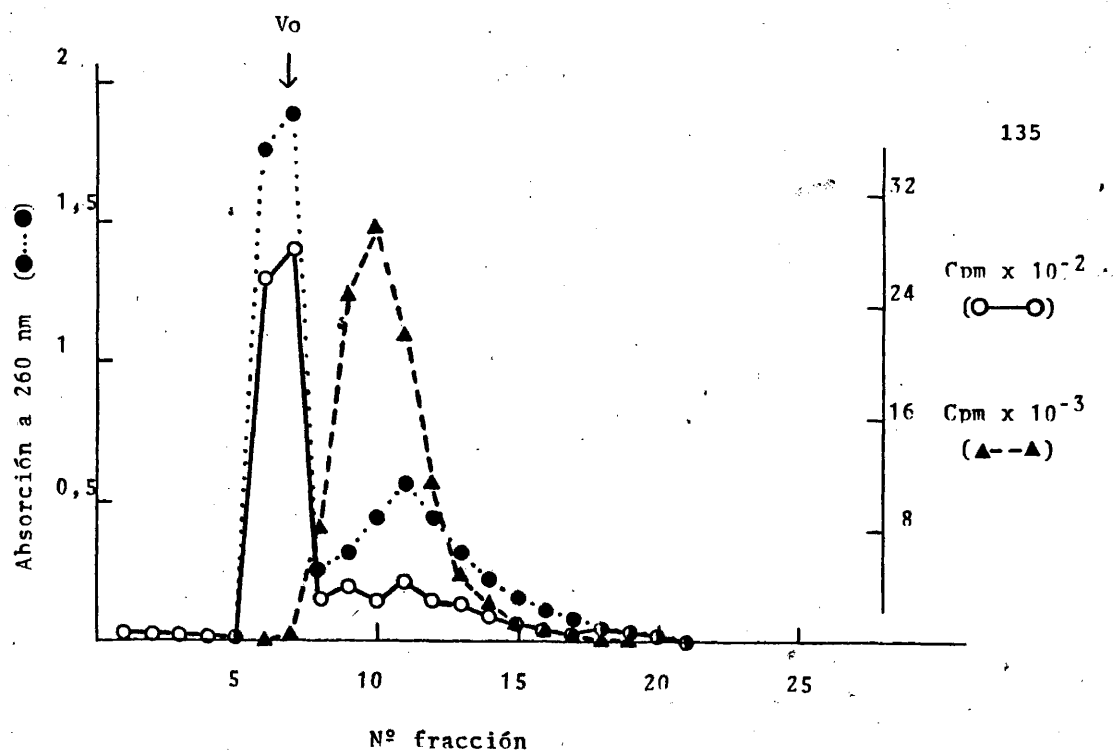


Fig. 42.- Análisis cromatográfico en una columna de Sephadex G-25,
de una muestra de RNAs transcritos en núcleos de hígado de rata.

(O:cpm precipitables por TCA; ▲:cpm totales).

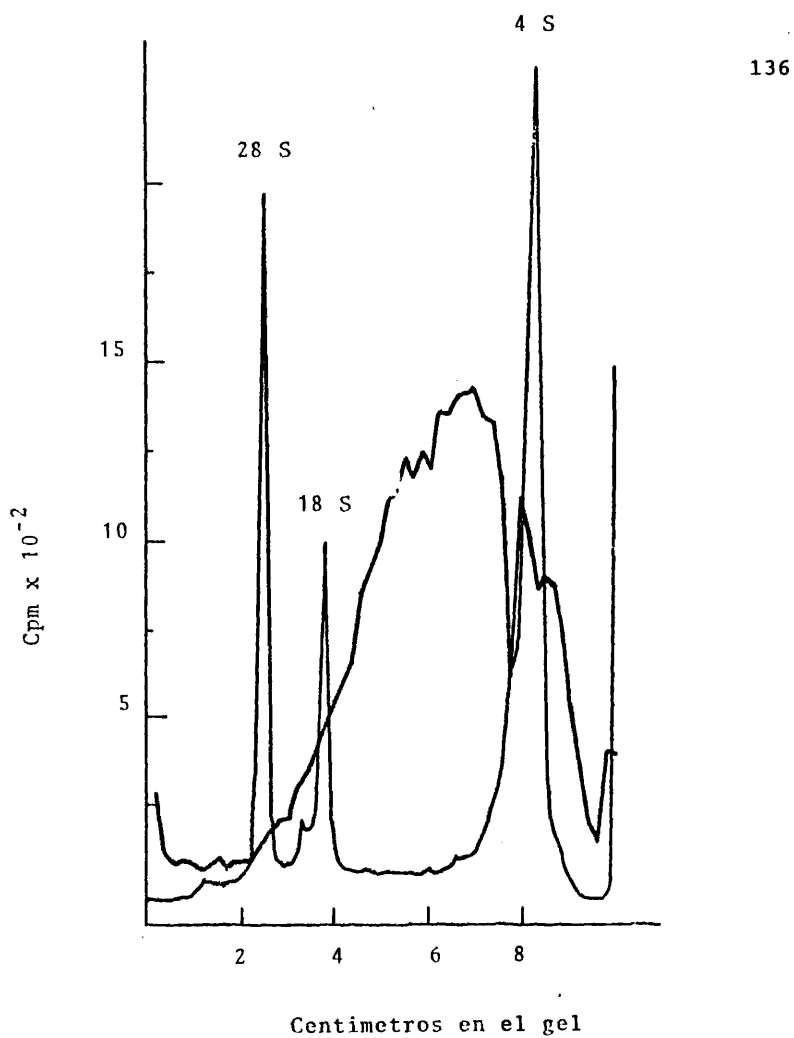


Fig. 43.- Análisis electroforético en gel de una muestra de RNAs transcritos en núcleos de hígado de rata, y previamente excluidos en una columna de Sephadex G-25. Los núcleos fueron transcritos a 37°C durante 30 min. La electroforesis se prolongó hasta que el azul de bromofenol estaba a 2 cm del final del gel. La muestra contenía RNAs transcritos, radiactivos, y rRNAs marcadores (estos últimos se siguieron por absorción a 260 nm).

muestra el detalle de su análisis en el gel. Obsérvese que sus tamaños se sitúan principalmente entre los del 18S y 4S, de una manera parecida a como hemos mostrado en la fig. 38 para el análisis, en gradiente, de RNAs transcritos directamente en cromatina. Sin embargo, si no hay un interés especial en el análisis de los transcritos de bajo P.M. y al mismo tiempo queremos eliminar el H^3 -UTP contaminante, una manera directa de ahorrarse la cromatografía en Sephadex, es la de correr el gel lo suficiente como para que el 4S tRNA esté ya a punto de salir. De esta manera, cualquier nucleico de P.M. inferior al de 4S, incluido el H^3 -UTP, será eliminado del gel.

III.B.6. Butirato sódico: acción sobre la acetilación de histonas en núcleos de hígado y en hepatocitos en suspensión.

Buscando lograr en nuestro sistema la máxima acetilación fisiológica de histonas posible, incubamos núcleos de hígado de rata en presencia de Butirato Na 10 mM. La gráfica de la fig. 44 muestra la mayor incorporación final de acetilos a distintos tiempos. Algo semejante ha sido reportado posteriormente a nuestro trabajo, incubando cortex cerebral de rata en láminas muy delgadas (159).

Como un 50-70% más en el caso de los tratados con butirato Na, frente a los controles. Insistiremos de nuevo aquí, en que este efecto es consecuencia de la inhibición de las actividades deacetilantes. Cuando las histonas de núcleos tratados se aislaban y analizaban en geles largos, que permiten una mejor resolución, se obtuvieron los resultados de la fig. 45. Se observa que el tratamiento con butirato determina una redistribución de acetilo en todas las histonas, con aparición de las formas

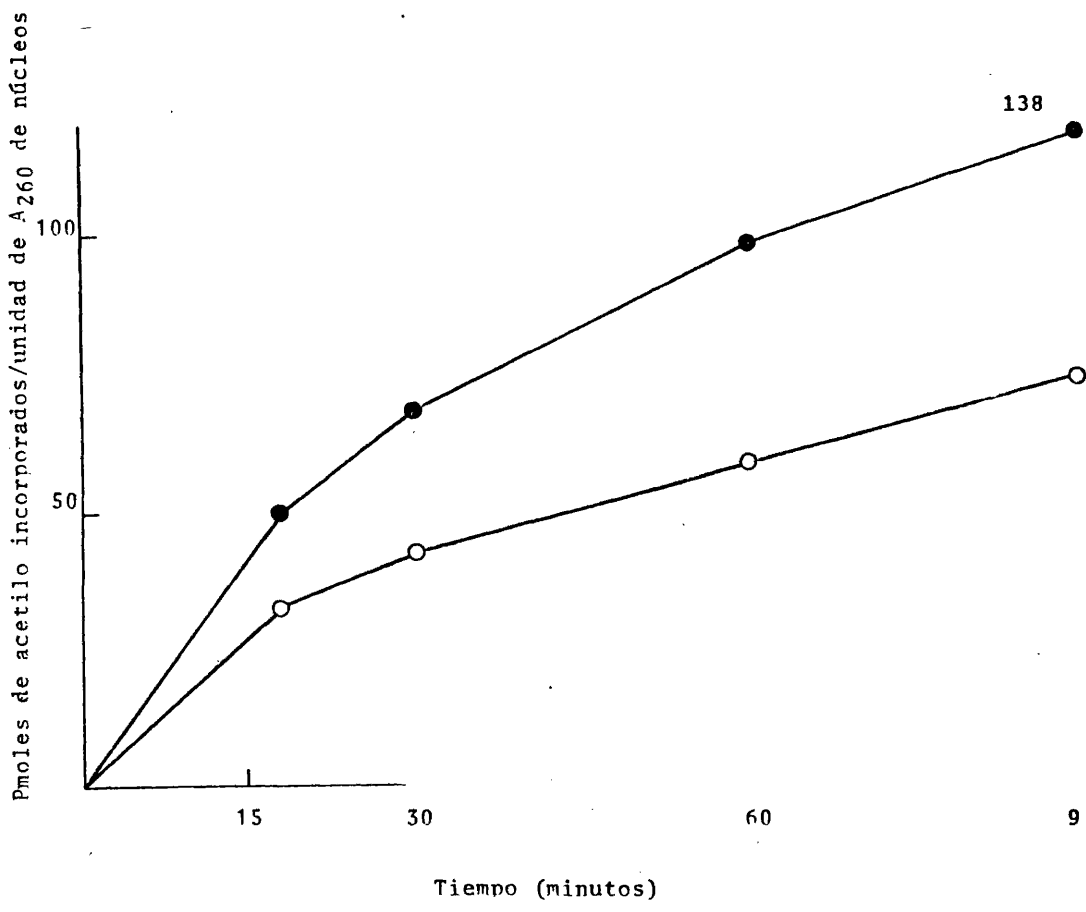
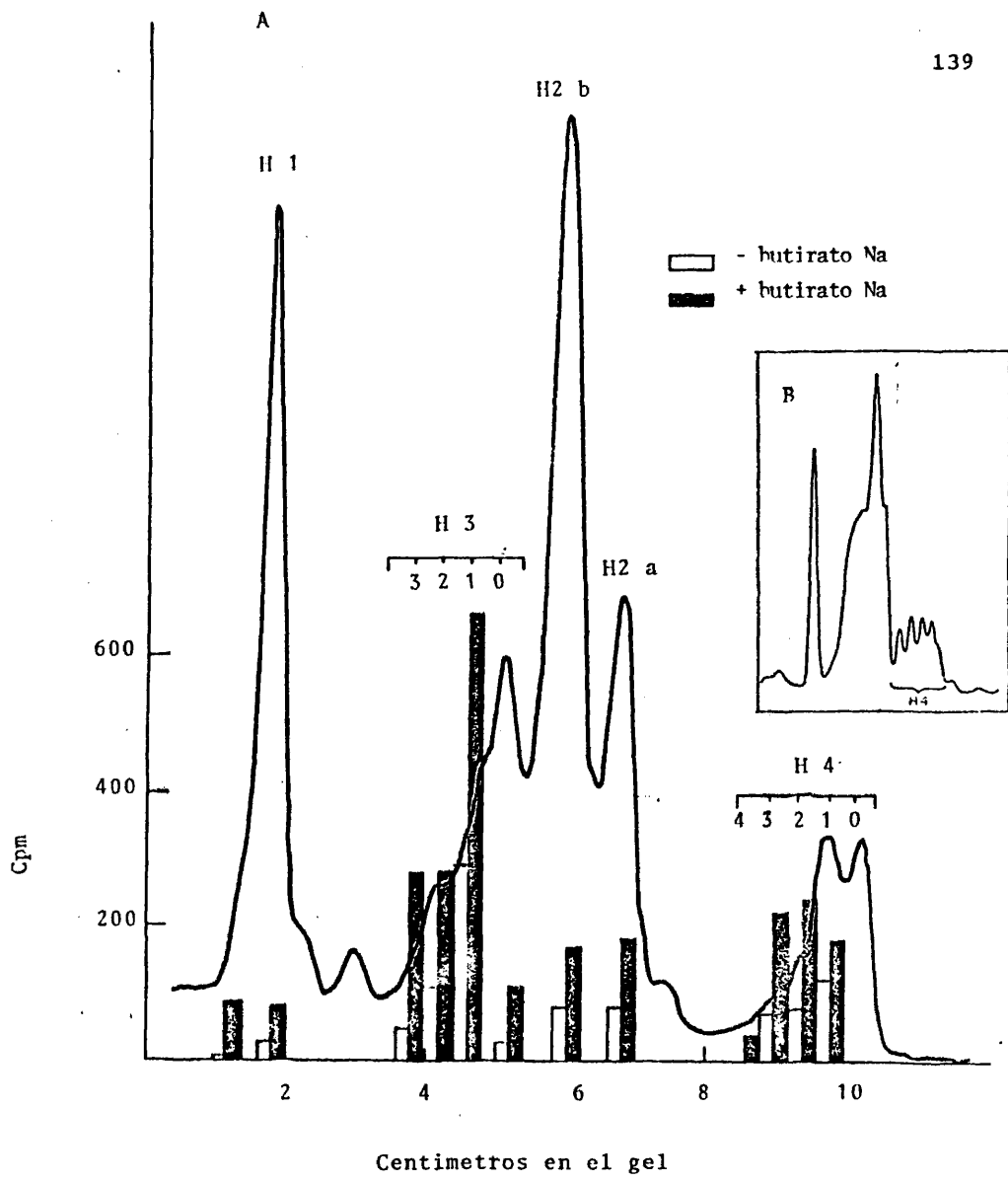


Fig. 44.- Influencia del butirato sódico sobre la incorporación de acétilos por los núcleos de hígado de rata. Sendas preparaciones de núcleos fueron incubadas con ¹⁴C-acetil Co A a 37°C, en la ausencia (O) o presencia de butirato Na 10 mM (●).

Fig. 45.- Distribución de ^{14}C -acetilo en las histonas extraídas de núcleos de hígado de rata, acetilados en presencia de butirato sódico, tras análisis electroforético en geles largos. (Ver fig. 44)

- A.- **Observense las formas multiacetiladas (1-4 acetilos) para las histonas H3 y H4.**
 - B.- **Observense las formas multiacetiladas de la H4 extraída de un cultivo de células HeLa, crecidas 24 horas en presencia de butirato Na 5 mM.**
- (De "n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythrocyte cells", M.G. Riggs y Col. Nature, Vol. 268, 4 Aug. 1977).**



multiacetiladas de las H3 y H4. Aunque este hecho implicaba un notable avance para nuestro trabajo, no habíamos conseguido, sin embargo, el grado máximo de acetilación descrito para otros sistemas en presencia de butirato Na, durante varias horas como mínimo (vease la fig. 45 B obtenida de la bibliografía para histonas de células HeLa, crecidas en presencia de este ácido graso). Este hecho, unido a la necesidad de proteger el núcleo durante la acetilación, de manera que llegara en condiciones óptimas a la transcripción (recuérdese la discusión centrada en torno a la fig. 40), nos aconsejaban derivar hacia un sistema celular. Con células sería más de esperar que se obviarán los inconvenientes apuntados.

Por lo dicho, procedimos a estudiar el efecto del butirato Na sobre una suspensión de hepatocitos de rata, aislados a partir de hígado de rata perfundido (vease Métodos). Al medio de incubación se añadía H^3 -acetato, que mediante pase previo en el sistema metabólico de la célula a acetil-CoA, nos permitiría estudiar su incorporación a las histonas. Puede observarse en la fig. 46 el efecto inesperado del butirato Na, en cuya presencia la incorporación total de acetilos a las histonas parece ser menor que para las células no tratadas. Este hecho podía tener varias explicaciones. Nosotros creemos que se trata, en realidad, de un efecto tóxico sobre el hepatocito por parte del butirato Na, alterando la maquinaria metabólica celular. Por otro lado, el estudio de la viabilidad de las células así incubadas por exclusión del Tripán azul (que solo tiñe la célula muerta), mostraba que aquella caía rápidamente a lo largo del tiempo, de manera que a las cuatro horas se podía considerar de <50%. Obviamente, estos hechos no favorecerían su adopción como el sistema ideal.

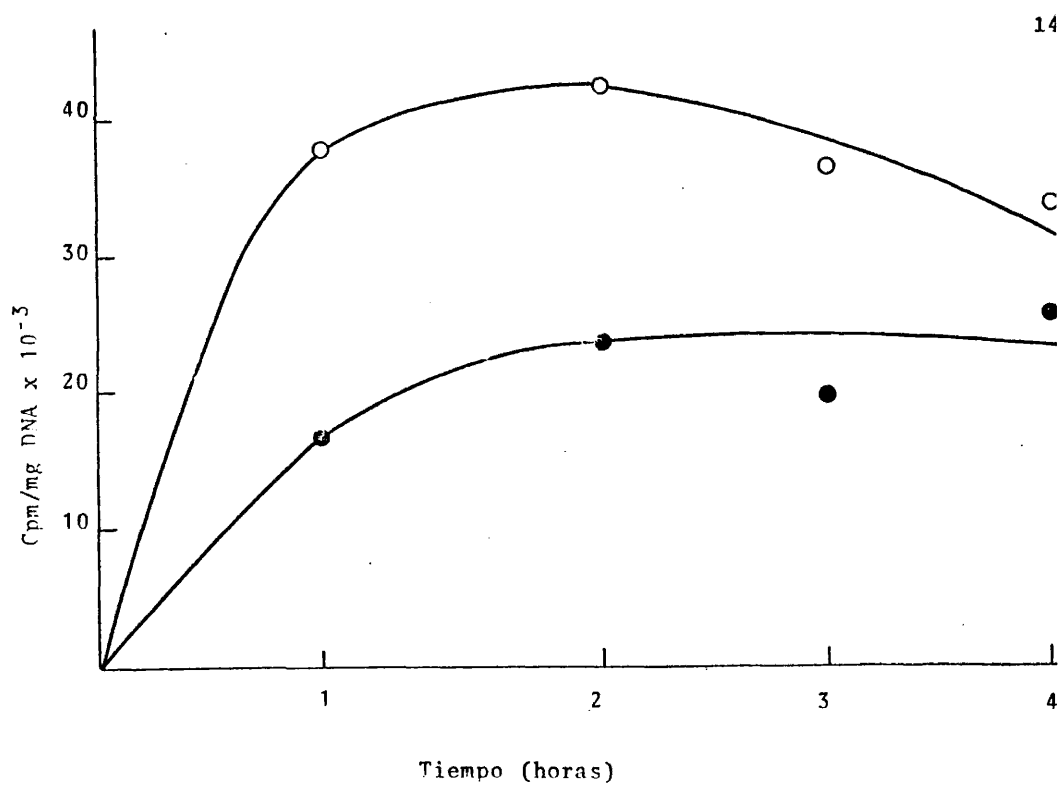


Fig. 46.- Influencia del butirato sódico sobre la incorporación de acetilos, en las histonas, por hepatocitos de rata. Sendas preparaciones de hepatocitos fueron incubadas con ^3H -acetato a 37°C (ver Metodología), en la ausencia (O) o presencia de butirato Na 10 mM (●). La radiactividad fué medida en los extractos sulfúricos -- 0,4 N de los hepatocitos.

III.C.1. Células HeLa: histonas hiperacetiladas.

Definitivamente, solo nos quedaba la posibilidad de probar con un cultivo celular. Escogimos el de las células HeLa en monocapa, que era en el que primero se había descrito (87) el alto grado de hiperacetilación de histonas, logrado en presencia de 5 mM, butirato sódico en el medio de cultivo durante veinte horas. Cuando las histonas extraídas de estas células así tratadas se analizaban en geles de electroforésis, pudimos observar por fin, la aparición del perfil típico de formas multiacetiladas de la H4 que se había descrito para estos casos. Vease la fig. 47 y compárese con el descrito en la bibliografía, el de la fig. 45 B.

III.C.2. Análisis de RNAs transcritos en células HeLa.

Antes de continuar adelante, se comprobó la capacidad de funcionamiento de nuestro sistema celular y la validez de nuestros métodos de extracción y análisis de nucleicos. A tal efecto, procedimos a dar un pulso de H^3 -uridina de 30' a un cultivo de células HeLa.

Aislados los RNAs y analizados en un gel de acrilamida-agarosa, al 2,4%, el tiempo suficiente para que solo aparecieran los RNAs de mayor tamaño que el 18 S, se obtuvo la gráfica de la fig. 48 A. Cuando se fraccionó el gel en rodajas, se comprobó que la radiactividad se situaba en las primeras fracciones. Ello daba a entender, como era de esperar, que la radiactividad estaba todavía incorporada en los precursores de los RNAs, pero no nos proporcionaba más información por no haber penetrado suficientemente en el gel. Por ello, se preparó un nuevo gel de una concentración de acrilamida menor, 1,7%. Obsérvese en la gráfica correspondiente de la misma figura 48 B, como se distribuye la radiactividad de

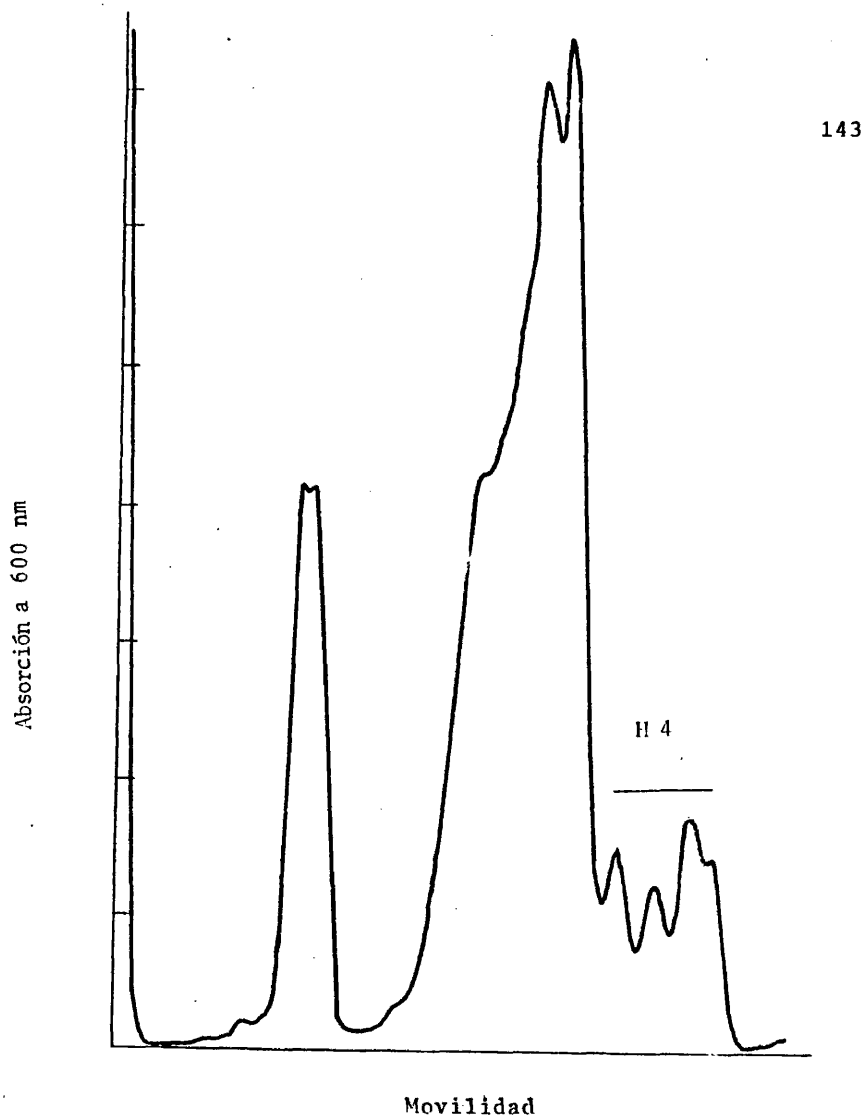
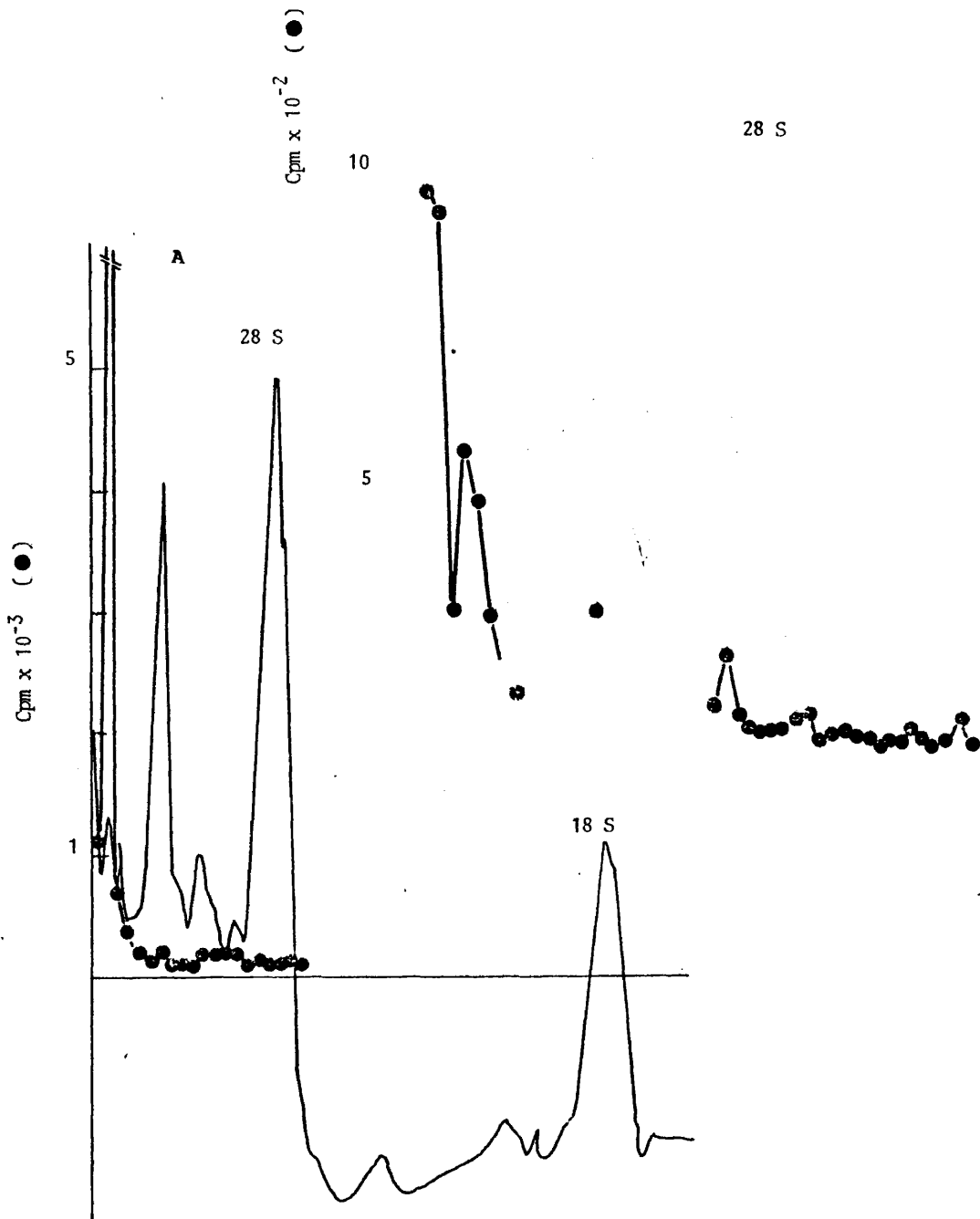


Fig. 47.- Densitograma de un gel con histonas extraídas de células HeLa, cultivadas en presencia de butirato sódico.

Fig. 48.- Distribución de ^3H -uridina en los RNAs transcritos
extraídos de células HeLa, tras análisis electrofo
rético en geles (ver el texto)

B



precursores mayores que el 28 S. Mediante un plot semilogarítmico, representado el logaritmo del tamaño molecular o de las unidades S, en función de la distancia recorrida en el gel, se obtiene siempre una recta con la cual se puede identificar el tamaño molecular de cualquier pico. Pero obviamente, este no era nuestro interés primario.

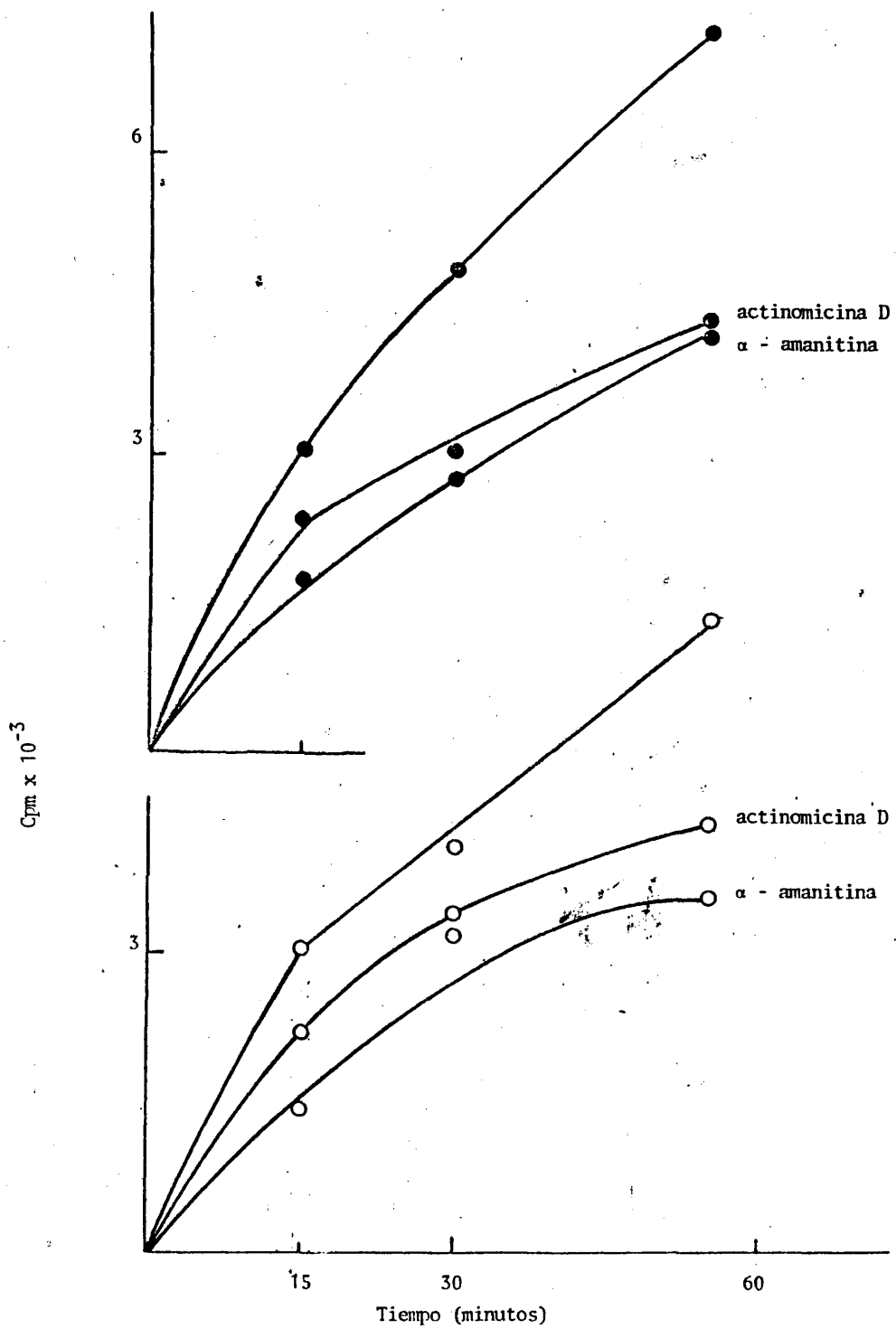
III.C.3. Transcripción de núcleos.

Siguiendo el procedimiento de Busiello y Di Giromalo para la obtención de núcleos a partir de células, mediante simple choque hipoosmótico, pudimos caracterizar el sistema endógeno de transcripción en los núcleos procedentes de células HeLa en cultivo.

Decidimos ya aquí utilizar la temperatura de 26°C, que es a la que las actividades nucleásicas son menos activas. La fig. 49 muestra las respuestas de los núcleos aislados de células, cultivadas en la presencia y ausencia de butirato Na, frente a los inhibidores de la transcripción- α -amanitina (que inhibe la RNA polimerasa II a concentraciones <5 $\mu\text{g/ml}$), y actinomicina D (inhibidor a bajas concentraciones de la RNA polimerasa I, pero de toda la actividad transcripcional, a las más altas) (160). Sorprende, en principio, que no sea mayor el porcentaje de inhibición logrado con actinomicina D a la concentración indicada. Quizás, parte de la explicación resida en la síntesis de una familia de pequeños RNAs en células HeLa, cuya síntesis sólo se anula a una concentración alta de actinomicina D (161), así como en la especificidad de la transcripción, que desconocemos para nuestro sistema de núcleos.

III.C.4. Efectos de la acetilación de histonas sobre la transcripción en núcleos: Elongación.

Fig. 49.- Efecto de la α -amanitina y actinomicina D sobre la transcripción de núcleos aislados de células HeLa, cultivadas en la ausencia o presencia de butirato sódico. La concentración del butirato Na en el cultivo correspondiente(●) fué de 7 mM durante 24 horas. La transcripción se realizó a 26°C. La concentración de los inhibidores fué de 3,5 μ g/ml.(○): sin butirato Na.



Si nuestro objetivo era acercarnos a vislumbrar el efecto "directo" de la acetilación de histonas sobre la transcripción, en la cromatina de núcleos aislados de células crecidas en presencia de butirato Na, ahora estábamos ya en condiciones de intentarlo.

¿Cuál podría ser el efecto de la hiperacetilación de histonas logrado de esta manera?. El problema se empezaba planteando al nivel más sencillo, el de las velocidades totales de transcripción. Con la finalidad de comprobar si había alguna diferencia a tal nivel, procedimos a transcribir núcleos a distintas concentraciones y tiempos relativamente largos. La fig. 50 muestra que no parece haber unas diferencias claramente significativas, y si acaso, los núcleos hiperacetilados muestran una menor capacidad total de transcripción.

Otra posibilidad, radica en acercarse más al nivel de iniciación. Cuando se hace el mismo tipo de experimento a tiempos cortos, podría ser posible encontrar diferencias en las velocidades iniciales de transcripción. A 37°C, la incorporación sería mayor que la habitual de 26°C. La fig. 50 muestra que podría existir tal posibilidad, aunque curiosamente a favor de los núcleos no hiperacetilados.

Un estudio cuidadoso de las situaciones expuestas, exige un análisis en detalle de los RNAs transcritos.

La fig. 51 muestra el perfil de los RNAs transcritos. En ambos casos difiere y de tal manera, que parece haber un predominio para los núcleos hiperacetilados, de RNAs de menor peso molecular que para los controles. Compárense los cocientes de las relaciones de cpm entre ambos casos.

Fig. 50 A.- Transcripción de núcleos aislados de células HeLa, crecidas en la ausencia o presencia de butirato sódico, - 7 mM, 24 horas. Los núcleos fueron utilizados en distintas concentraciones y tiempos de transcripción, a 26°C.
B.- Medida de las velocidades iniciales de transcripción.-
La transcripción fue realizada a 37°C, durante los tiempos cortos que se indican.
(+ But. Na: ● ; - But. Na: ○).

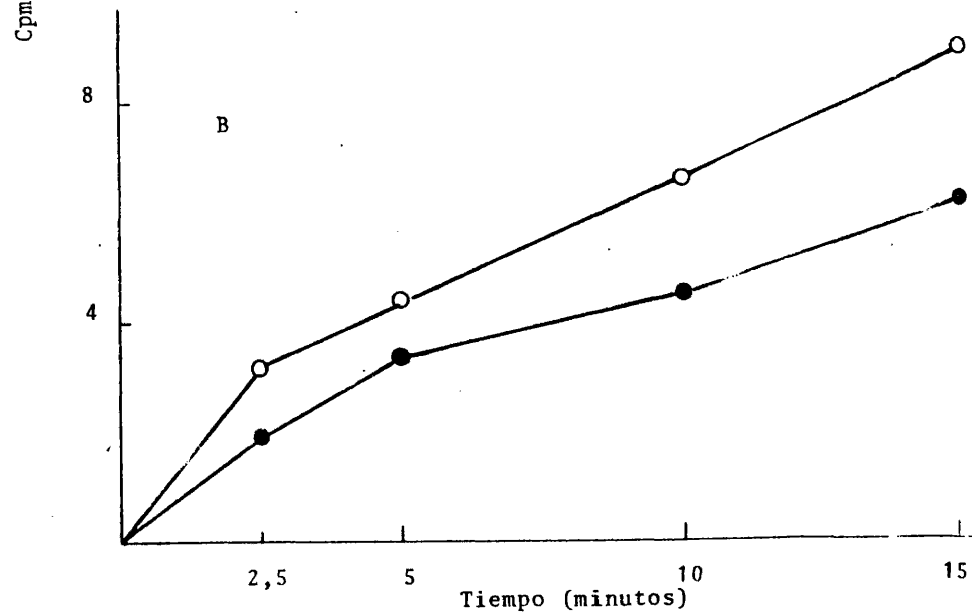
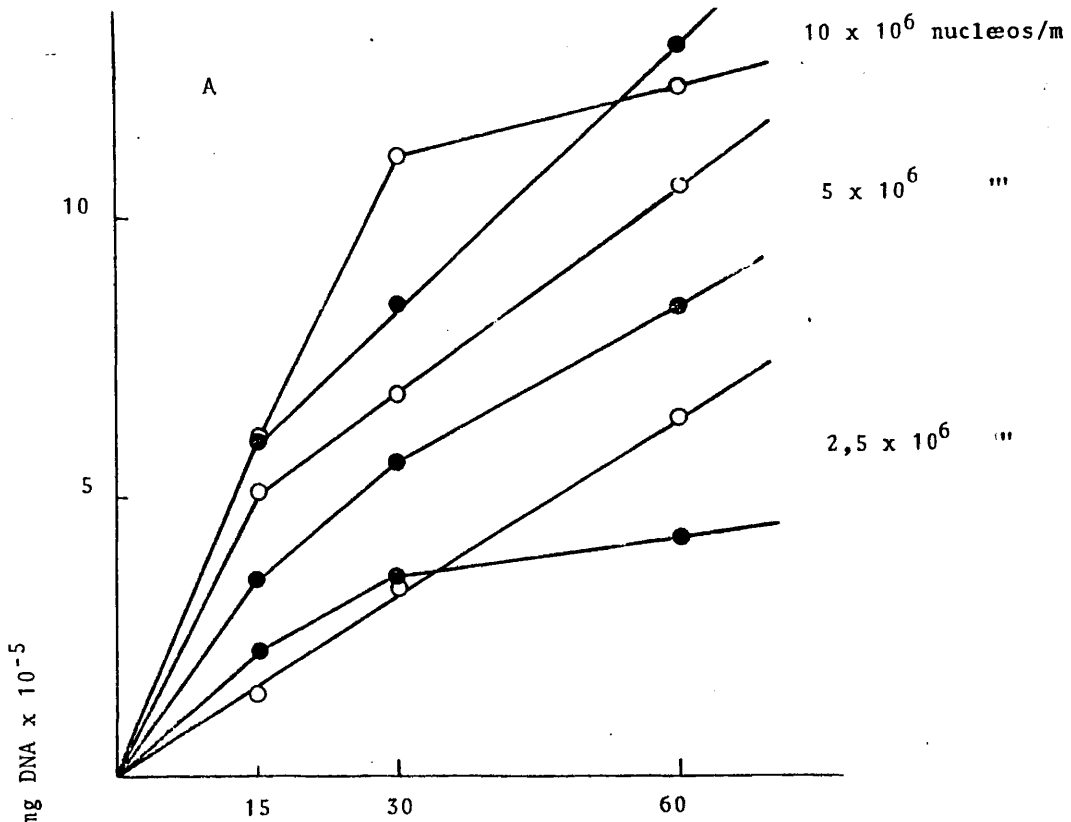
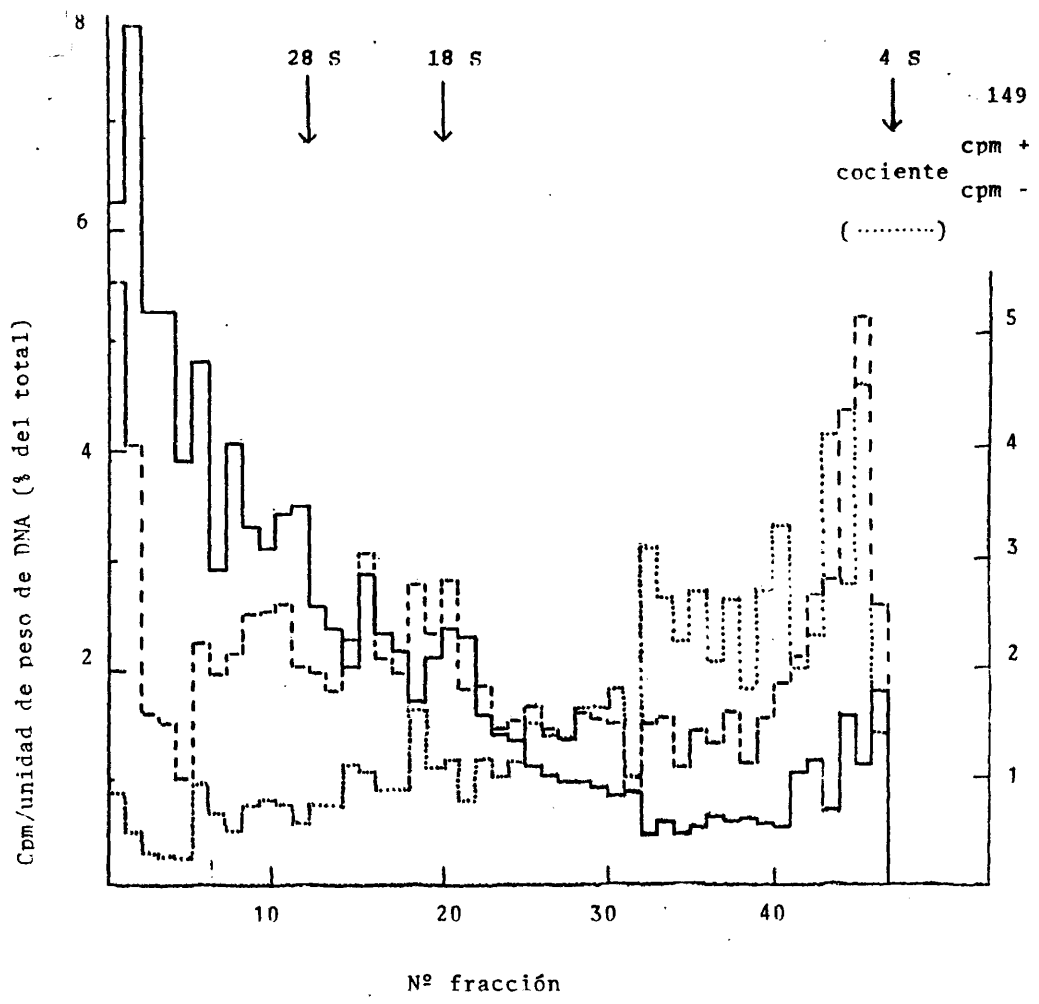


Fig. 51.- Perfil de distribución por tamaños moleculares de los RNAs transcritos en núcleos procedentes de células HeLa, crecidas en la ausencia o presencia de butirato sódico. Las células HeLa fueron crecidas 24 horas en presencia de butirato Na 7 mM. La transcripción se realizó a 26°C durante 40 min. Las muestras depositadas sobre cada gel contenían las cpm precipitables correspondientes a la misma cantidad de DNA nuclear. La representación se ha hecho en ambos casos - (+ but. Na: ---; - but. Na —) representando el tanto por ciento de cada fracción con respecto a las cpm totales.



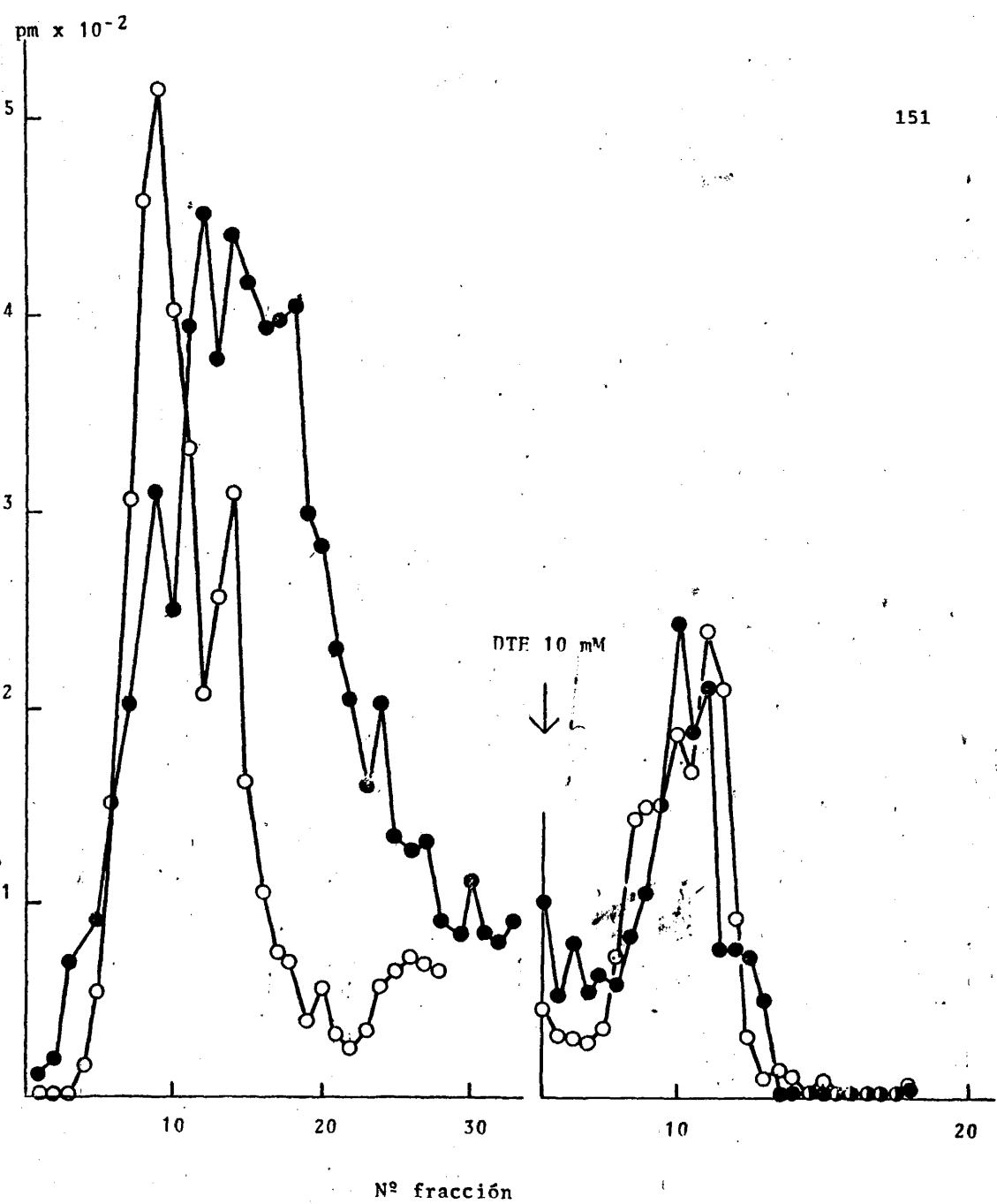
III.C.5. Iniciación.

Ya que la iniciación de la síntesis de RNA es probablemente una etapa crítica en el control de la expresión génica, su estudio detallado es de una importancia considerable. Sin embargo, ha estado limitado por la falta de una metodología sensible.

La incorporación de (γ - ^{32}P) o (β - ^{32}P) ribonucleótidos en RNA iniciado, resulta en la incorporación de solo un átomo ^{32}P por cada cadena iniciada, con lo cual solo es posible detectar la iniciación de RNA de bajo P.M. (162). Se ha descrito recientemente (134), un método cromatográfico de afinidad para iniciación de RNA, el cual permite el aislamiento de RNA iniciado conteniendo marcaje radiactivo a lo largo de toda la longitud de los transcritos. El método utiliza análogos de los nucleósidos trifosfatos, conteniendo un sulfuro sobre el fosfato gamma. Ya que la formación del puente fosfodiéster requiere la eliminación de los fosfatos β - y γ - de los nucleótidos precursores, la incorporación de un nucleósido de purina 5' (γ -S) trifosfato en RNA, resulta en la retención del sulfuro solamente en el extremo 5' de los transcritos que iniciaron con esa purina específica. Estos transcritos conteniendo sulfuro pueden unirse entonces selectivamente a una columna de afinidad de agarosa-mercurio.

Al hacer uso por lo tanto, junto a CTP y H^3 -UTP, de los nucleótidos iniciadores de la transcripción HS- γ -ATP y HS- γ -GTP, era posible aislar los RNAs iniciados y separarlos de los unicamente elongados mediante una cromatografía en columna de agarosa-Hg. La fig. 52 muestra el resultado de tal experimento. La adicción de DTE 10 mM señala el momento en que

Fig. 52.- Análisis cromatográfico en columna de agarosa-Hq, de los RNAs iniciados con HS- γ -ATP y HS- γ -GTP en la transcripción de núcleos de células HeLa, crecidas en la ausencia o presencia de butirato sódico. Las células HeLa fueron crecidas 24 horas en presencia de butirato Na 7 mM. La transcripción se realizó a 26°C durante 45 min. (+ but. Na: ● ; - but. Na: ○)



los RNAs iniciados, y por consiguiente, supuestamente retenidos en la columna por afinidad con los iones Hg^{2+} , empiezan a ser eluidos. La cuantificación de los resultados atribuye unos porcentajes de RNAs iniciados de 29% y 21% para los núcleos controles e hiperacetilados respectivamente, según se muestra en la tabla:

TABLA VII

	cpm	
	<u>-Butirato Na</u>	<u>+Butirato Na</u>
Fracciones (1-28) eluidas sin DTE	4023	6700
Fracciones (29-54) eluidas con DTE	1623	1780
% RNAs iniciados	29	21

Los valores, que no están alejados de los descritos (134), son muy semejantes también entre sí, y en todo caso hablan en favor de una menor capacidad de iniciación para la cromatina de los núcleos hiperacetilados.

III.C.6. Consideraciones finales: Regulación específica.

Los resultados obtenidos sugieren en principio que no hay, o no se muestra en nuestro sistema de núcleos, una relación directa entre acetilación de histonas y transcripción. De hecho con sistemas de reconstitución con el DNA del SV 40, no se ha encontrado (163). Por otro lado, existe el hecho de que no se sabe bien como el butirato Na afecta la dinámica celular; es decir, si influye sobre otras actividades enzimáticas además de las deacetilantes de histonas. De hecho, la naturaleza no competitiva de su inhibición y la falta de especificidad según la longitud de la cadena del ácido graso (pues otros también inhiben las acti

vidades deacetilantes aunque menos (112), sugieren que el n-butirato podría ser un detergente inhibidor de alta afinidad para estas enzimas. Ello nos pone en guardia contra la interpretación de los cambios producidos en las células tratadas con butirato, como debidos a la hiperacetilación de histonas que provoca.

Es más, el análisis de las proteínas procedentes de células de hepatoma de rata crecidas con butirato, muestra muy pocas diferencias con respecto a los controles (164).

Por otro lado, está adquiriendo gran importancia la supuesta participación de las llamadas proteínas no histónicas HMG en la estructuración, al menos, de las zonas transcribibles de la cromatina (165). Y posiblemente, no solo a un mero nivel estructural, sino funcional, ya que se ha comprobado recientemente en los genes para la globina de eritrocitos de embrión de pollo, que son ellas las que confieren la sensibilidad a la DNAasa I de las zonas de la cromatina en que se encuentran estos genes.

Finalmente, no podemos dejar de mencionar el hecho tan importante de que hay una heterogeneidad acusada en la accesibilidad de los distintos nucleosomas, dentro de la célula, a la acetiltransferasa de las histonas (112).

Parece, pues, que la acetilación de histonas por sí mismo no es suficiente, aunque podría ser necesario, para inducir la actividad génica. Más aún, tendría efecto sobre zonas muy específicas de la cromatina (no tendría porque esperarse un incremento enorme en la transcripción de todos los genes tras la hiperacetilación por el butirato, porque ello supondría seguramente la desorganización y el caos celular). Es decir, que

Conclusiones.-

- 1.- Se ha desarrollado una metodología original para el estudio de las interacciones DNA-proteínas, basada en la detección microfluorométrica del DNA retenido en filtros de celulosa tras reaccionar con DABA.
- 2.- El estudio de los factores ambientales de la interacción DNA-proteína ha mostrado su dependencia de los siguientes factores:
 - Tiempo
 - Temperatura
 - Fuerza iónica

La influencia del tiempo y temperatura sobre la interacción se justifica, con ciertos DNAs, por la presencia de actividades proteolíticas en los mismos. Estas actividades proteolíticas, no detectables convencionalmente, son susceptibles de inhibición por PMSF 1-2 mM y extracción por lavado con ClNa 2,5 M. La presencia de proteasas no es, sin embargo, explicación suficiente en todos los casos.

El ClNa, a 0,15 M, se ha mostrado como la concentración mínima necesaria para revertir una curva de interacción con forma sigmoideal a una hiperbólica, posiblemente por un efecto de estructuración de los ligandos. Concentraciones altas, disminuyen la retención de DNA por proteína en filtro, seguramente por un efecto de neutralización de las cargas electrostáticas en ambos ligandos.

- 3.- El estudio de la influencia de la estructura de los ligandos, en la interacción DNA-histonas, ha mostrado las siguientes dependencias:
 - A/ Para el DNA:

- del grado de desnaturalización, con curvas más sigmoidales al ser mayor este.
- de su estado en banda sencilla, con curva sigmoidal, o en banda doble, con curva hiperbólica. El ClNa a concentración 0,15 M revierte la curva sigmoidal a hiperbólica.

B/ Para las histonas:

- del tipo de histona, con curvas sigmoidales (H1), o bifásicas (H4), o hiperbólicas simples (resto de histonas). El ClNa revierte las curvas sigmoidales a hiperbólicas.
- de modificaciones químicas, acetilación, con una afinidad menor por el DNA frente a las histonas nativas. Histonas acetiladas químicamente, en aproximadamente un 35% de sus grupos amino susceptibles, muestran a 0,5 M ClNa las mayores diferencias en afinidad por el DNA respecto a las nativas.

4.- Las curvas de interacción sigmoidal deben responder a un mecanismo cooperativo y dinámico, con posibilidad de cambio en los sitios de unión de las histonas al DNA. Las curvas bifásicas sugieren la existencia de dos sitios de unión distintos.

5.- Es posible utilizar el sistema de núcleos de células, para el estudio de las actividades enzimáticas endógenas de acetilación y transcripción. El butirato sódico se ha mostrado como un agente capaz de lograr una hiperacetilación de histonas, directamente sobre núcleos o sobre células.

- 1.- Finch, J.T. & Klug, A. Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 1897, 1976.
- 2.- Renz, M., Nehls, P. & Hozier, J. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 1879, 1977.
- 3.- Adolph, K.W., Cheng, S.M., Paulson, J.R. & Laemmli, V.K. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 4937, 1977.
- 4.- Pettijohn, D.E. Crit. Rev. Biochem. 4: 175, 1976.
- 5.- Sadgopal, A. & Bonner, J. Biochim. Biophys. Acta. 207: 227, 1970.
- 6.- O'Farrell, P.H. J. Biol. Chem. 250: 4007, 1975.
- 7.- Peterson, J.L. & Mc Conkey, E.H. J. Biol. Chem. 251: 548, 1976.
- 8.- Goodwin, G.H., Woodhead, J.L. & Johns, E.W. FEBS Lett. 73: 85, 1977.
- 9.- Cohen, L.H., Newrock, K.M. & Zweidler, A. Science. 190: 994, 1975.
- 10.- Zweidler, A. Organization and Expression of Chromosomes. V.G. Allfrey, E.K.F. Bautz, B.J. Mc Carthy, R.T. Schimke & A. Tissieres (EDS), p. 187. Dahlem Konferenzen, Berlin, 1976.
- 11.- Isenberg, I. Seventh Edmond de Rothschild School in Molecular Biophysics on "The Structure of Chromatin". Israel, 1979.
- 12.- Van Holde, K.E. & Isenberg, I. Accs. Chem. Res. 8: 327, 1975.
- 13.- Møes, T., Cary, P.D., Abercrombie, B.D., Crane-Robinson, C. & Bradbury, E.M. Eur. J. Biochem. 71: 337, 1976.
- 14.- Hewish, D.R. & Burgoyne, L.A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52: 504 1973.
- 15.- Noll, M. Nature, 251: 249, 1974.
- 16.- Kornberg, R.D. Science, 184: 868, 1974.
- 17.- Kornberg, R.D. Structure of Chromatin. Ann. Rev. Biochem., 1977.
- 18.- Lohr, D., Tatchell, K. & Van Holde, K.E. Cell, 12: 829, 1977.
- 19.- Prunell, A., Baer, B. & Kornberg, R.D. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 42, 1977.

- 20.- Sollner Webb, B. & Felsenfeld, G. *Biochemistry*, 14: 2915, 1975.
- 21.- Axel, R. *Biochemistry*, 14: 2921, 1975.
- 22.- Shaw, B., Herman, T., Kovacic, R., Beaudreau, G. & Van Holde, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 505, 1976.
- 23.- Richards, B., Pardon, J., Lilley, D., Cotter, R. & Wooley, J. *Cell. Biol. Int. Rep.* 1: 107, 1977.
- 24.- Suau, P., Kneale, G.G., Braddock, G.W., Baldwin, J.P. & Bradbury, E.M. *Nucleic Acids Res.*, 4: 3769, 1977.
- 25.- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M. & Klug, A. *Nature*, 269: 29, 1977.
- 26.- Noll, M. *Nucleic Acids Res.* 1: 1573, 1974.
- 27.- Bustin, M., Goldblatt, D. & Sperling, R. *Cell* 7: 297, 1976.
- 28.- Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. *Cell* 4: 281, 1975.
- 29.- Thomas, J.O. & Kornberg, R.D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 2626, 1975.
- 30.- Olins, A.L., Carlson, R.D., Wright, E.B. & Olins, D.E. *Nucleic Acids Res.* 3: 3271, 1976.
- 31.- Joffe, J., Keene, M. & Weintraub, H. *Biochemistry* 16: 1236, 1977.
- 32.- Goodwin, G.H., Nicolas, R.H. & Johns, E.W. *Biochem. J.* 167: 485, 1977.
- 33.- Varshavsky, A.J., Bakayev, V.V. & Georgiev, G.P. *Nucleic Acids Res.* 3: 477, 1976.
- 34.- Simpson, R.T. & Whitlock, J.P. Jr. *Cell* 9: 347, 1976.
- 35.- Noll, M. & Kornberg, R.D. *J. Mol. Biol.* 109: 393, 1977.
- 36.- Bakayev, V.V., Bakayeva, T.G. & Varshavsky, A.J. *Cell* 11: 619, 1977.
- 37.- Thomas, J. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* 42, 1977.
- 38.- Weintraub, H., Palter, K. & Van Lente, F. *Cell* 6: 85, 1975.
- 39.- Oudet, P., Spadafora, C. & Chambon, P. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* 42, 1977.
- 40.- Altenburger, W., Hörz, W. & Zachau, H. *Nature* 264: 517, 1976.

- 41 - Weintraub, H. & Van Lente, F. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 4249, 1974.
- 42.- Bradbury, E.M. & Rattle, H.W.E. Eur.J.Biochem. 27: 270, 1972.
- 43.- Elgin, S.C.R. & Weintraub, H. Ann. Rev. Biochem. 44: 725, 1975.
- 44.- Crompton, J.L., Bellard, M. & Chambon, P. Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 4382, 1976.
- 45.- Bellard, M., Oudet, P., Germond, J.E. & Chambon, P. Eur.J.Biochem. 70: 543, 1976.
- 46.- Carpenter, B.G., Baldwin, J.P., Bradbury, E.M. & Ibel, K. Nucleic Acid Res. 3: 1739, 1976.
- 47.- Littau, V.C., Burdick, C.J., Allfrey, V.G. & Mirsky, A.E. Proc. Natl. Acad. Sci. 54: 1204, 1965.
- 48.- Mirsky, A.E., Burdick, C.J., Davidson, E.H. & Littau, V.C. Proc. Natl. Acad. Sci. 61: 592, 1968.
- 49.- Bradbury, E.M., Carpenter, E.G. & Rattle, H.W.E. Nature 241: 123, 1973.
- 50.- Keller, W., Wendel, I., Eicken, I. & Zentgraf, H. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 42, 1977.
- 51.- Varshavsky, A.J., Bakayev, V.V. & Georgiev, G.P. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 42, 1977.
52. Christiansen, G. & Griffith, J. Nucleic Acids Res. 4: 1837, 1977.
- 53.- Hardison, R., Gaubatz, J. & Chalkley, R. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 42, 1977.
- 54.- Morris, N.R. Cell 8: 357, 1976/ 9: 627, 1976.
- 55.- Noll, M. Cell 8: 349, 1976.
- 56.- Dixon, G.H. Organization and Expression of Chromosomes. V.G. Allfrey et al. (EDS.), p. 197. Dahlem Konferenzen, Berlin, 1976.
- 57.- Gershey, E.L., Vidali, G. & Allfrey, V.G. J. Biol. Chem. 243: 5018, 1968.
- 58.- De Lange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. & Bonner, J. J. Biol. Chem. 244: 319, 1969.

- 59.-Marzluff,W.F. & Mac Carthy,K. J.Biol. Chem., 245: 5635, 1970.
- 60.- Pestaña,A., Sudilovsky,O. & Pitot,H.C. FEBS Lett., 19: 83, 1971.
- 61.- Pestaña,A. & Pitot,H.C. Nature, 247: 200, 1974.
- 62.- Candido,E.P.M. & Dixon,G.H. J. Biol. Chem., 247: 3868, 1972.
- 63.- Pathy,L., Smith,E.L. & Johnson,J. J.Biol.Chem. 248: 6834, 1973.
- 64.- Louie,A.J., Candido,E.P.M. & Dixon,G.H. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 38: 803, 1973.
- 65.- Sopherd,G.R., Noland,B.J. & Hardin,J.M. Biochim. Biophys. Acta. 228: 544, 1971.
- 66.- Ruiz Carrillo,A., Wangh,L.J, Littau,V.C. & Alfrey,V.G. J.Biol.Chem. 249: 7358, 1974.
- 67.- Adler,A.J. et al. J.Biol.Chem. 249: 2911, 1974.
- 68.- Stedman,E. & Stedman,E. Philos.Trans. R. Soc. Lond. B 235: 565, 1951.
- 69.- Huang,R.G.C. & Bonner,J. Proc. Natl. Acad. Sci. 48: 1216, 1962.
- 70.- Foe,V.E., Wilkinson,L.E. & Laird,C. Cell 9: 131, 1976.
- 71.- Franke,W.V., Scheer,U., Trendelenburg,M.F., Spring,H. & Zentgraf,H. Cytobiologie 13: 401, 1976.
- 72.- Orkin,S.H. & Swedlow,P.S. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 2475, 1977.
- 73.- Gottesfeld,J.M., Garrard,W.T., Bagi,G., Wilson,R.F. & Bonner,J. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 2193, 1974.
- 74.- Mathis,D. & Gorovsky,M.A. Biochemistry 15: 750, 1976.
- 75.- Garel,A. & Axel,R. Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 3966, 1976.
- 76.- Weintraub,H. & Groudine,M. Science 193: 848, 1976.
- 77.- Flint,S.J. & Weintraub,H.M. Cell 12: 783, 1977.
- 78.- Gottesfeld,J.M. & Butler,P.J.G. Nucleic Acids Res. 4: 3155, 1977.
- 79.- Miller,O.L. & Beatty,B.R. Genetics (Suppl.) 61: 134, 1969.
- 80.- Woodcock,C.L.F., Frado,L.L.Y., Hutch,C.L. & Ricciardiello,L. Chromosoma 58: 33, 1976.

- 81.- Laird,C.D., Wilkinson,L.E., Foe,V.E. & Chooi,W.Y. *Chromosoma* 58: 169, 1976.
- 82.- Garel,A., Zolam,M. & Axel,R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 4867, 1977.
- 83.- Levy,W.B., Gjerset,R.A. & Mc.Carthy,B.J. *Biochim.Biophys.Acta* 475: 168, 1977.
- 84.- Allfrey,V.G. *Chromatin and chromosome structure* (Ed. H.J. Li & R.A. Eckhardt), p.167. Academic Press, New York, 1977.
- 85.- Johnson,E.M. & Allfrey,V.G. *Biochemical actions of hormones* (Ed. G. Litwack), vol. 5. Academic Press, New York, 1977.
- 86.- Wallace,R.B., Sargent,T.D., Murphy,R.F. & Bonner,J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 3244, 1977.
- 87.- Riggs,M.G., Whittaker,R.G., Neumann,J.R. & Ingram,V.M. *Nature* 268: 462, 1977.
- 88.- Balhorn,R., Jackson,V., Granner,D. & Chalkley,R. *Biochemistry*.14: 2504, 1975.
- 89.- Jackson,V., Shires,A., Chalkley,R. & Granner,D. *J. Biol. Chem.* 250: 4856, 1975.
- 90.- Allfrey,V.G., Faulkner,R.M. & Mirsky,A.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51: 786, 1964.
- 91.- Allfrey,V.G., *Can. Cancer Conf.* 6: 313, 1964.
- 92.- Berlowitz,L. & Pallotta,D. *Exp. Cell. Res.* 71: 45, 1972.
- 93.- Gorovsky,M.A., Pleger,G.L., Keevert,J.B. & Johmann,C.A. *J. Cell. Biol.* 57: 773, 1973.
- 94.- Pogo,B.G.T., , Allfrey,V.G. & Mirsky,A.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55: 805 , 1966.
- 95.- Pogo,B.G.T., Pogo,A.O., Allfrey,V.G. & Mirsky,A.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59: 1337, 1968.
- 96.- Libby,P.R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 59, 1968/ *Biochem. J.* 130: 663, 1972.

- 97.- Ohno, T., Terayama, H., Takaku, F. & Nakao, K. *Biochim. Biophys. Acta.* 179: 214, 1969.
- 98.- Wilhelm, J.A., Groves, C.J. & Hnilica, L.S. *Biochim. Biophys. Acta.* 238: 295, 1971.
- 99.- Allfrey, V.G. *Fed. Proceedings.* 29: 1447, 1970.
- 100.- Wangh, L., Ruiz Carrillo, A. & Allfrey, V.G. *Arch. Biochem. Biophys.* 150: 44, 1972.
- 101.- Ruiz Carrillo, A. & Palau, J. *Dev. Biol.* 35: 115, 1973.
- 102.- Edwards, G.S. & Allfrey, V.G. *Biochim. Biophys. Acta* 249: 354, 1973.
- 103.- Ryan, J.M. & Cristofalo, V.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 735, 1972.
- 104.- Simpson, R.E. *Biochemistry*, 10: 4466, 1971.
- 105.- Kimball Shewmaker, C., Cohen, Bennet N. & Wagner, Thomas E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 342, 1978.
- 106.- Marushige, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 3937, 1976.
- 107.- Oberhauser, H., Csordas, A., Puschendorf, B. & Grunicke, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84: 110, 1978.
- 108.- Wong, T.K. & Marushige, K. *Biochemistry*, 15: 3041, 1976.
- 109.- Leder, A. & Leder, P. *Cell*, 5: 319, 1975.
- 110.- Hagopian, H.K., Riggs, M.G., Swartz, L.A. & Ingram, V.M. *Cell*, 12: 855, 1977.
- 111.- Ginsburg, E., Salomon, D., Sreevalsan, T. & Freese, E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 2457, 1973.
- 112.- Cousens, Lawrence S., Gallwitz, Dieter & Alberts, Bruce M. *J. Biol. Chem.* 254: 1716, 1979.
- 113.- Bernardi, Giorgio. *Methods in Enzymology*. Vol. XXI: 95, 1971.
- 114.- Skalka, A. *Methods in Enzymology*. Vol. XXI: 341, 1971.

- 115.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
- 116.- Johns, E.W. Biochem. J. 92: 55, 1964.
- 117.- Johns, E.W. Biochem. J. 105: 611, 1967.
- 118.- Affinity Chromatography. Principles & Methods. Pharmacia Fine Chemicals.
- 119.- Ruíz Carrillo, A. & Allfrey, V.G. Arch. Biochem. Biophys. 154: 185, 1973.
- 120.- Castell, J.V., Pestaña, A., Castro, R. & Marco, R. Anal. Biochem. 90: 551, 1978.
- 121.- Lin, S.Y. & Riggs, A.D. J. Mol. Biol. 72: 671, 1972.
- 122.- Lin, S.Y., Lin, D. & Riggs, A.D. Nucleic Acids Res. 3: 2183, 1976
- 123.- Kissane, J.M. & Robbins, E.J. J. Biol. Chem. 233: 184, 1958.
- 124.- Cattolico, R.A. & Gibbs, J.P. Anal. Biochem. 69: 572, 1975.
- 125.- Pomerai, D.I., Chesterton, C.J. & Butterworth, P.H.W. Eur. J. Biochem. 46: 461, 1974.
- 126.- Bombik, B.M., Huang, C.H. & Baserga, R. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 69, 1977.
- 127.- Busiello, E. & Di Girolamo, M. Eur. J. Biochem. 55: 61, 1975.
- 128.- Sealy, L. & Chalkley, R. Cell 14: 115, 1978.
- 129.- Cano, A. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 1978.
- 130.- Panyim, S. & Chalkley, R. Arch. Biochem. Biophys. 130: 337, 1969.
- 131.- V.M. Stanley, J.R. & Bock, R.M. Biochemistry, 4: 1302, 1965.
- 132.- Audina, Jesús Sebastián. Comunicación personal.
- 133.- Wilkinson, D.S., Cihak, A. & Pitot, H.C. J. Biol. Chem. 246: 6418, 1971.
- 134.- Smith, M.M., Reeve, A.E. & Huang, R.C.C. Cell, 15: 615, 1978.

- 135.- Peacock, A.C. & Dingman, C.W. *Biochemistry*, 6: 1818, 1967.
- 136^a.- Parish, J.H. *Principles and Practice of Experiments with Nucleic Acids*. Longman, Londres, 1972.
- 137^a.- Gelowick, S.P. & Kaplan, N.O. *Methods in Enzymology*. Vols. 20 & 21. Academic Press, New York/London, 1971.
- 138^a.- Kelly, R.B., Cozarelli, N.R., Deutscher, M.P., Lehman, I.R. & Kornberg, J.R. *J. Biol. Chem.* 245: 39, 1970.
- 139^a.- Lillehavg, J.R., Kepple, R.K. & Kepple, K. *Biochemistry*, 15: 1858, 1976.
- 140^a.- Hinegardner, R.T. *Anal. Biochem.* 39: 197, 1971.
- 141.- Castro, R. Observaciones experimentales propias/ Jesús Avila. Comunicación personal.
- 142.- Furlan, M., Jerico, M. & Suhar, A. *Biochim. Biophys. Acta*, 167: 154, 1976.
- 143.- Ta Chong, M., Garrad, W.T. & Bonner, J. *Biochemistry*, 13: 5128, 1974.
- 144.- Pestaña, A. *Biochim. Biophys. Acta*, 521: 547, 1978.
- 145.- Clark, R.J. & Felsenfeld, C. *Nature New Biology*, 240: 226, 1972.
- 146.- Akinrimisi, E.O., Bonner, J. & Ts'o, Paul O.P. *J. Mol. Biol.* 11: 128, 1965.
- 147.- Renz, M. & Day, L.A. *Biochemistry*, 15: 3220, 1976.
- 148.- Avilés, F.J. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona, 1975.
- 149.- Knippers, R., Otto, B. & Böhme, R. *Nucleic Acids Res.* 5: 2113, 1978.
- 150.- Glotov, B.O., Nikolaev, L.G. & Severin, E.S. *Nucleic Acid Res.* 5: 2587, 1978.
- 151.- Cruces, Jesús. Comunicación personal.
- 152.- Cano, A., Estepa, I. & Pestaña, A. "International Symposium on The Brine Shrimp *Artemia Salina*". Corpus Christi, Texas. Abstracts, 1979 (en prensa).

- 153.- Doenecke, D. & Mc Carthy, B.J. Eur. J. Biochem. 64: 405, 1976.
- 154.- Clark, R.J. & Felsenfeld, G. Nat. New. Biol. 229: 101, 1971.
- 155.- Varshavsky, A.J. & Georgiev, G.P. Biochim. Biophys. Acta, 281: 669, 1972.
- 156.- Kornberg, R. Seventh Edmond de Rothschild School. Israel, 1979.
- 157.- Gallwitz, D. & Sekeris, C.E. Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 350: 150, 1969.
- 158.- Sterner, R., Vidalli, G., Heinrikson, R.L. & Allfrey, V.G. J. Biol. Chem. 253: 7601, 1978.
- 159.- Kanungo, M.S. & Thakur, M.K. Biochem. Biophys. Res. Commun. 87: 266, 1979.
- 160.- W.F. Marzluff, J.R. Methods in Cell Biology. Vol. XIX, p. 137, 1978.
- 161.- Benecke, B.J. & Penman, S. Cell, 12: 939, 1977.
- 162.- Marzluff, W.F., Murphy, E.C. & Huang, R.C.C. Biochemistry, 12: 3440, 1973.
- 163.- Mathis, D.J., Oudet, P., Wasyluk, B. & Chambon, P. Nucleic Acids Res. 5: 3523, 1978.
- 164.- Alberts, B., Worcel, A. & Weintraub, H. The Organization and Expression of the Eukaryotic Genome (Bradbury, E.M. & Javaherian, K. Eds.), p. 165. Academic Press, New York, 1977.
- 165.- Levy, W.B., Connor, W. & Dixon, G.H. J. Biol. Chem. 254: 609, 1979.

