

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Aislamiento y caracterización de la histona H3 de  
saccharomyces cerevisiae : estudio estructural comparado  
con la histona H3 de timo de ternera**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Ricardo Belmonte Avilés**

DIRECTOR:

**Luis Franco Vera**

Madrid, 2015

José Ricardo Belmonte Avilés

JP  
1981  
-----  
072



\* 5 3 0 9 8 5 5 4 2 X \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-63-0442 13-1

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA HISTONA H<sub>3</sub>  
DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE, ESTUDIO ESTRUCTURAL COMPARADO  
CON LA HISTONA H<sub>3</sub> DE TIMO DE TERNERA

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1981



BIBLIOTECA

© José Ricardo Belmonte Avilés  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1981  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-8040-1981

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA HISTONA H3  
DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE, ESTUDIO ESTRUCTURAL  
COMPARADO CON LA HISTONA H3 DE TIMO DE TERNERA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
QUIMICAS POR EL LICENCIADO  
JOSE RICARDO BELMONTE AVILES



El presente trabajo se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Prof.Dr. D. Luis Franco Vera. A él y al director del Departamento, Prof.Dr.D. Angel Martín Municio, debo expresar mi más profundo agradecimiento por sus enseñanzas y dedicación.

También debo agradecer la ayuda y colaboración de todos mis compañeros, en especial de los Profs. José Luis Barbero, Blanca Fernández, Gonzalo González, Consuelo Jiménez, Isidoro López-Braña, Gabriel Márquez, Francisco Montero, Federico Morán, Rosa Nieto y Julián Perera.

Por la ayuda y el trabajo dedicado quiero expresar mi agradecimiento a Mari Nieves García y a Jacinto M. Navlet.

MADRID SEPTIEMBRE 1980



INDICE

	pagina
1.- INTRODUCCION	
1.1.- HISTONAS	2
1.2.- PROTEINAS CROMOSOMALES NO HISTONAS	8
1.3.- ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	10
1.4.- ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LAS HISTONAS	17
1.5.- CARACTERISTICAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y DIRECCION DE LA INVESTIGACION PROPUESTA	22
2.- PARTE EXPERIMENTAL	28
2.1.- MATERIAL BIOLÓGICO	28
2.2.- AISLAMIENTO DE LA HISTONA H3 DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	28
2.2.1.- Preparación de cromatina purificada	28
2.2.2.- Extracción con etanol-HCl y precipi- tación fraccionada	29
2.2.3.- Purificación de la histona H3 de S. cerevisiae	30
2.2.3.1.- Cromatografía en carboximetil- celulosa	31
2.2.3.2.- Cromatografía en Bio-Gel P-100	31
2.3.- AISLAMIENTO DE LA HISTONA H3 DE TIMO DE TERNERA	32
2.3.1.- Obtención de la histona H3 de timo	32
2.3.2.- Purificación de la histona H3 de timo	33
2.4.- RUTAS ALTERNATIVAS PARA LA OBTENCION DE LA HISTONA H3 DE S.CEREVISIAE	33
2.4.1.- Extracción etanol-HCl y posterior dialisis	34

## pagina

2.4.2.- Fraccionamiento a partir de mezclas de histona	34
2.4.2.1.- Aislamiento de histonas totales	34
2.4.2.2.- Fraccionamiento por dialisis frente a etanol	35
2.4.2.3.- Cromatografía en Bio-Gel P-10	35
2.5.- DEGRADACION SECUENCIAL AUTOMATICA	36
2.5.1.- Química del proceso	36
2.5.1.1.- Reaccion de acoplamiento	37
2.5.1.2.- Reacción de ruptura	37
2.5.1.3.- Reacción de conversión	38
2.5.2.- Técnica y procedimiento	40
2.5.3.- Identificación de PTH-aminoácidos	41
2.5.3.1.- Cromatografía gas-líquido	41
2.5.3.2.- Cromatografía en placas de poliamida	43
2.6.- METODOS ANALITICOS	45
2.6.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida	45
2.6.2.- Analisis de aminoácidos	47
2.6.3.- Valoración cuantitativa de DNA	49
2.7.- METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS	50
2.7.1.- Espectros de absorcion en el ultravioleta	50
2.7.2.- Espectros de dicroísmo circular	52
3.- RESULTADOS	53
3.1.- AISLAMIENTO DE LA HISTONA H3 DE S.CEREVISIAE	53

	pagina
3.2.- PURIFICACION DE LA HISTONA H3 DE S.CEREVISIAE	56
3.3.- RUTAS ALTERNATIVAS DE OBTENCION DE LA HISTONA H3 DE S. CEREVISIAE	66
3.3.1.- Dialisis del extracto etanol-HCl	69
3.3.2.- Fraccionamiento a partir de mezclas de histona	69
3.3.2.1.- Fraccionamiento por dialisis frente a disolventes apolares	71
3.3.2.2.- Cromatografía en Bio-Gel P-10	73
3.4.- DATOS SOBRE ESTRUCTURA PRIMARIA	76
3.5.- ESTUDIO ESTRUCTURAL	82
3.5.1.- Estructuración del entorno de las tirosinas	83
3.5.2.- Valoración de las tirosinas	88
3.5.3.- Estructuración global con la fuerza iónica	97
3.5.4.- Cinética de la estructuración	102
3.5.5.- Estructuración global con el pH	108
3.5.6.- Estructuración inducida por el etanol	113
4.- DISCUSION	118
5.- CONCLUSIONES	131
6.- BIBLIOGRAFIA	136

ABREVIATURAS usadas en el texto.

PCNH: Proteínas Cromosomales no-histonas

HMG: de "High mobility group" proteínas con elevada movilidad electroforética.

LMG: de "Low mobility group" proteínas con baja movilidad.

pb: pares de bases.

PMSF: p-metil-sulfonil-fluoruro.

PTH-aa.: fenil-tiohidantoina de un aminoácido.

FITC: fenilisotiocianato.

ATZ-aa.: anilintiazolinona derivado de un aminoácido.

PTC-péptido: feniltiocarbamil derivado de un péptido.

PCA: ácido perclórico.

CD: dicroísmo circular.

UV: ultravioleta.

SDS : dodecil sulfato sódico.



## 1. INTRODUCCION

## 1.- INTRODUCCION

La información genética de todos los organismos se encuentra en el DNA celular, idéntico para todas las células del organismo, pero es te no existe libre en el núcleo de las células. En los organismos eucarióticos, el material genético se presenta formando un complejo de varias especies moleculares, para dar una estructura de orden superior conocida como cromatina.

Para conocer la función de la cromatina, término solo posible de definir con un criterio operativo (Van Holde, 1975) es necesario conocer su estructura y composición. Esta estructura ha de considerarse no como algo estático sino que ha de estudiarse desde un punto de vista totalmente integrado con su función biológica. En el estudio del material genético ha de encontrarse la explicación de todos los procesos y mecanismos de control de la expresión genética.

La cromatina se encuentra localizada en el núcleo, claramente diferenciado, durante la interfase del ciclo celular, momento en que el DNA se transcribe para dar m-RNA. Las distintas especies moleculares que la componen (DNA, RNA, proteínas básicas y proteínas neutras o ácidas) varían en proporción según la fase del ciclo celular, de un modo posiblemente relacionado con su actividad. Sin embargo, la relación DNA/proteínas básicas (histonas) permanece constante (Johns, 1971).

### 1.1. Histonas

De los distintos componentes, que forman parte de la cromatina, las histonas son las proteínas básicas que se encuentran asociadas al

DNA en una proporción cuantitativamente similar. Es difícil dar una definición de histonas con criterios funcionales, pues en algún caso (H1) esta función no está claramente determinada.

Las histonas mejor conocidas son las de timo de ternera, por la facilidad de aislamiento de su cromatina, y han sido plenamente fraccionadas e identificadas tanto mediante métodos de extracción selectiva y precipitación fraccionada (Johns, 1964; 1967) como mediante la utilización de técnicas cromatográficas (Fambrough y Bonner, 1966; 1968).

Las histonas se han clasificado fundamentalmente por criterios operativos (Johns, 1971) y de composición de aminoácidos. Existen 5 fracciones principales: la H1, muy rica en Lisina, H2B, moderadamente rica en Lisina, dos ricas en arginina, H3 y H4, y la H2A con una relación Lys/Arg próxima a la unidad. También han sido clasificadas utilizando la proporción de otros aminoácidos o según las características de su medio de extracción selectiva. Las histonas se han encontrado en todos los organismos eucarióticos investigados hasta la fecha (Isenberg, 1979), con la excepción de la H1 que no se ha podido encontrar en algunos eucariontes inferiores (Franco y col., 1974; Franco y López Braña, 1978).

Además de las cinco histonas citadas existen algunas histonas específicas, propias de algún organismo o tejido. Por ejemplo la histona H5, presente en eritrocitos nucleados en los que sustituye parcialmente a la histona H1 (Neelin y col., 1964; Edwards y Hnilica, 1968) o la histona  $\phi$ 1, que también sustituye a la H1 en el esperma de algunos invertebrados marinos (Puigdoménech y col., 1975).

El estudio estructural de las histonas ha conducido a algunas conclusiones de gran interés. Se han realizado abundantes estudios sobre

la estructura primaria de las histonas y se ha conseguido establecer las secuencias completas de 4 fracciones de timo de ternera (excepto H1) (Bonner y col., 1969; Ogawa y col., 1969; Iwai y col., 1970; DeLange y col., 1969 y 1972; Yeoman y col., 1972; Sautiere y col., 1972) así como en otros muchos organismos.

El análisis de la secuencia de cada una de las fracciones de histona revela una notable asimetría secuencial en la distribución de los aminoácidos. La mayoría de los residuos básicos y otros residuos inestabilizadores de la  $\alpha$ -hélice se encuentran, en las histonas H2A, H2B, H3 y H4, en el tercio amino-terminal de la molécula (Johnson y col., 1974; DeLange y col., 1971) mientras que la región carboxilo-terminal contiene la mayoría de los residuos hidrofóbicos. Este hecho hace que, en condiciones fisiológicas, las histonas citadas presenten dos dominios estructurales claramente diferenciados: un extremo flexible, incapaz de plegarse, con conformación estadística, que corresponde a la región N-terminal y una zona más rígida, formada por el resto de la molécula con posibilidad de presentar una estructura terciaria globular (Edwards y Shooter, 1970; Chapman y col., 1976; Sautiere y col., 1975).

La estructura de las histonas H1 y H5 presenta diferencias con este modelo. La histona H1 consta de tres dominios estructurales, conteniendo en su extremo C-terminal unos 80 residuos de los cuales el 90% son lisina, alanina y prolina (Cole, 1977) ocupando la zona globular una posición central en la molécula (Hartman y col., 1977) y presentando dos extremos flexibles en conformación estadística (Johnson y col., 1974). La histona H5 también contiene una zona globular pero situada en la zona N-terminal de la molécula (Crane-Robinson y col., 1977).

El estudio comparado de las secuencias de las histonas ha revelado también que se trata de proteínas muy conservativas aunque no todas en el mismo grado. Actualmente se prefiere hablar con más precisión de la conservatividad de cada dominio por separado (Isenberg, 1979). Así las histonas H3 y H4 de timo de ternera solo difieren en 2 y 4 residuos respectivamente de su homóloga de guisante (DeLange y col., 1969; Patthy y col., 1973). Se trata pues de dos proteínas extremadamente conservativas en sus dos dominios, carboxilo y amino terminal. Esto hace preguntarse la importancia que ha de tener la totalidad de la estructura en la funcionalidad de estas histonas. La razón es fácilmente comprensible en el caso de la mitad carboxilo terminal que, como se verá, es la responsable de la interacción histona-histona y esta debe ser la causa responsable de la presión evolutiva que ha determinado su conservación. No está tan clara, sin embargo, la causa de la presión evolutiva responsable del mantenimiento de la secuencia del extremo que presenta conformación estadística (N-terminal).

La histona H2B es, en cambio, un híbrido evolutivo en el que se ha conservado la secuencia de la parte globular variando ampliamente el resto (Hayashi y col., 1977) y algo análogo ocurre con la histona H1, quizá la menos conservativa de las histonas (Kinkade y col., 1966; Bustin y Cole, 1969; Rall y Cole, 1971) pero que sin embargo es muy conservativa en su zona globular que en la H1 ocupa la posición central de la molécula (Jones y col., 1974).

Las histonas pueden presentarse en más de una variante, diferenciándose los distintos subtipos generalmente por el cambio en la secuencia de unos pocos aminoácidos.

Este fenómeno fué inicialmente descrito con la H1 que muestra subfracciones distintas incluso de tejido a tejido de un mismo organismo (Kinkade y Cole, 1966; Bustin y Cole, 1969). La utilización de técnicas de alta resolución tales como electroforésis en geles con triton (Zweidler y Colon, 1972) ha mostrado la existencia de subfracciones no solo para la H1 sino también para H2A, H2B y H3.

Se ha sugerido que la presencia de los diferentes subtipos de histona podría estar relacionada con la remodelación de la cromatina que ocurre durante el desarrollo de nuevos tipos de células (Newroch y col. 1978; Weintraub y col. 1978). La variación en la histona podría provocar cambios estructurales en la cromatina que estarían relacionados con la regulación de los genes que han de ser expresados.

La mayoría de los cambios descritos tienen lugar en la zona globular y especialmente en regiones que tienen abundancia de residuos ácidos y que deben encontrarse en la región superficial de la zona globular de la proteína siendo responsables de variaciones en la interacción histona-histona (Franklin y Zweidler, 1977).

Las histonas pueden además ser modificadas químicamente después de su síntesis, modificación que tiene lugar en el citoplasma (Liew y col., 1970).

Se conocen cinco tipos de modificaciones postsintéticas: acetilación, metilación, fosforilación, poli-(ADP)-ribosilación y la formación de la proteína A-24.

La acetilación suele ocurrir en las Lisinas del extremo aminoterminal de las histonas. Los lugares de acetilación son conservativos y la presencia de  $\epsilon$ -N-acetil-Lisina parece estar relacionada con las re-

giones activas del genoma (Dixon y col., 1975; Allfrey, 1977). En cambio la fosforilación específica de restos de serina y treonina parece ocurrir, en algunos casos, durante la fase S del ciclo celular y podría ser un desencadenante para la mitosis (Bradbury y col., 1974); también se ha sugerido que los diferentes niveles de organización de la cromatina podrían estar asociados con distintos tipos de fosforilación (Gurley y col., 1978).

Relacionado con la modificación covalente se halla la oxidación de la histona H3 (DeLange y Smith, 1975). Esta histona posee, en tamo, dos cisteínas, en posiciones 96 y 110. La última parece ser accesible y podría conducir por oxidación a dímeros de histona a través de un puente disulfuro, dímeros que, "in vivo", solo aparecen en metafase.

Las histonas interaccionan entre si formando complejos tanto "in vitro" como "in vivo". Estas interacciones se han estudiado por métodos de entrecruzamiento (Thomas y Kornberg, 1974; Celis y col., 1976) y por reconstitución de complejos a partir de histonas aisladas (Isenberg, 1979). Las conclusiones de estos estudios sugieren la existencia en la cromatina de un octámero de histonas constituido por un tetrámero de H3 y H4 y dos dímeros H2A-H2B. Las histonas forman complejo entre si cuando se encuentran en estado nativo, no desnaturalizado, y son las regiones carboxilo-terminales, hidrófobas, las primariamente responsables de la interacción histona-histona según se deduce de estudios de RMN (Moss y col., 1976; Bohm y col., 1977), quedando libres las regiones amino terminales que serían las responsables de la interacción con el DNA.

El conjunto de interacciones histona-histona y las intensidades

relativas de las diferentes interacciones resulta ser de las mismas características en todos los casos estudiados (D'Anna e Isenberg, 1974; Spiker e Isenberg, 1977; Mardian e Isenberg, 1978; Glover y Gorovsky, 1978) resultando ser muy conservativo, incluso en el caso de que los complejos se realicen entre histonas de organismos diferentes (Spiker e Isenberg, 1977). La conservatividad existe no solo en cuanto al esquema de interacción sino que incluso las propias superficies de interacción de las moléculas de histona parecen haber sido altamente conservadas en la evolución.

La conservatividad de las interacciones entre histonas ha permitido utilizar estas interacciones como criterio para la caracterización de las diferentes fracciones de histona en cualquier material biológico utilizado, junto con criterios de estructura 1<sup>a</sup> y otros especiales en algún caso (Isenberg, 1979).

Este criterio resulta especialmente útil para unas proteínas como las histonas que no permiten una caracterización inmediata y unívoca, basada en criterios funcionales.

#### 1.2.- Proteínas cromosomales no histonas.

El resto de las proteínas presentes en la cromatina además de las histonas se definen por exclusión de estas. Será pues un grupo muy heterogéneo con funciones muy dispares, comprendiendo enzimas (nucleasas, DNA polimerasa, etc...), proteínas estructurales e incluso algunas que no son propiamente proteínas cromosomales, pero que pueden contaminar la cromatina como consecuencia bien del proceso de extracción o bien porque estén asociadas al RNA de alto peso molecular que se está trans

cribiendo (Penderson, 1974).

Su importancia surge del hecho de que las histonas no pueden, por su constancia y poca heterogeneidad, estar implicadas en los procesos de regulación específica de la expresión genética (Hnilica, 1972). Por el contrario las proteínas cromosomales no histonas son tremendamente heterogéneas y variables.

A pesar de este problema este grupo recibe cada día mayor atención, pues algunas PCNH parece que estimulan la transcripción por RNA polimerasa de un DNA aislado o de cromatina (Stein y col., 1974; Spelsberg y col., 1973; Kostraba y Wang, 1973; Stein y col., 1976; James y col., 1977; Bekhor y Samal, 1977; Johns y col., 1975) y se ha sugerido también que estas proteínas juegan un papel importante en la regulación de la expresión genética (Paul y col., 1973; Yabuki y Iwai, 1977; Kostraba y col., 1977).

Otra función en la que se ha sugerido que podrían intervenir estas proteínas, sería en el mantenimiento de la estructura de la cromatina (Goodwin y col., 1977; Chan y Liew, 1977; Staron y col., 1977) y de los cromosomas en metafase (Kenneth y col., 1977).

No existe un criterio químico apropiado para definir al conjunto de estas proteínas ya que presentan gran variabilidad de peso molecular y composición de aminoácidos (Lesturgeon y Rusk, 1973). El panorama se ha aclarado un poco con la aparición de técnicas como la electroforesis bidimensional (Peterson y McConkey, 1976) que ha permitido comprobar que las variaciones entre tejidos e incluso las interespecíficas no son tantas como se había supuesto en principio y también son menos trascendentes los cambios a lo largo del desarrollo (Wu y col., 1975).

Un grupo de PCNH que es objeto de intenso estudio es el de aquellas que se extraen conjuntamente con las histonas por extracción salina, o junto con la histona H1 por extracción con ácido perclórico al 5% (Johns y Forrester, 1969). Su fraccionamiento por precipitación con ácido Tricloroacético da lugar a dos grupos de proteínas: Las LMG y las HMG cuyo nombre deriva de su movilidad electroforética.

Las HMG, que se caracterizan por su alta movilidad electroforética y por contener elevadas proporciones de aminoácidos básicos y ácidos (Goodwin y col., 1978), están presentes en otros organismos (Watson y col., 1977; Franco y col., 1977, 1979) y se ha estudiado su secuencia en algunos casos (Walker y col., 1976, 1977, 1978) y su conformación (Sanders, 1977; Lary y col., 1976) aunque el conocimiento que de ellas se tiene aun no es satisfactorio.

### 1.3.- Estructura de la cromatina.

El estudio de la estructura de la cromatina se afrontó de un modo secuencial por técnicas físicas y bioquímicas que llevaron a la adopción de un modelo de cromatina discontinua y repetitiva.

Los estudios de difracción de rayos X (Richards y Pardon, 1970; Pardon y col., 1967; Garret, 1971) condujeron a un modelo de superhlice continua de DNA mantenida por su interacción con las histonas. La H1 no parecía fundamental para el mantenimiento de la estructura según se deducía de las imágenes de difracción, apenas alteradas, de cromatina con la H1 eliminada selectivamente. Este modelo, universalmente aceptado, se superó a partir de los datos ofrecidos por la microscopía electrónica (Olins y Olins, 1973) que encontraron para la cromatina una dis

posición análoga a las cuentas de un collar, de 80 Å de diámetro, a cada una de las cuales denominaron cuerpos v.

Este modelo de organización discontinua de la cromatina tuvo un fuerte apoyo en el hecho de que el DNA de la cromatina mostraba una periodicidad estructural en la digestión con nucleasas. (Hewish y Burgoyne, 1973; Van Holde y col., 1974; Honda y col., 1974; Sollner-Webb y Felsenfeld, 1975). En todos los casos y con distintas nucleasas el DNA extraído del digerido presentaba una distribución, no continua sino discreta, de fragmentos múltiples de 200 pares de bases. Esta cromatina digerida con nucleasas durante distintos tiempos mostraba en microscopía electrónica unas partículas análogas a las que se visualizan en la cromatina intacta (Van Holde y col., 1974).

Actualmente se acepta para estas subunidades básicas de la cromatina el nombre de nucleosomas (Oudet y col., 1975). El tamaño del DNA asociado a los nucleosomas depende del tiempo de digestión llegándose a un tamaño límite de 140 p.b. (Sollner -Webb y Felsenfeld, 1975; Shaw y col., 1976; Noll, 1976) cuando se ha digerido un 50% del DNA de la cromatina.

Si bien estos estudios se hicieron en cromatina de timo, se ha demostrado la existencia de estos monomeros o nucleosomas en todos los organismos eucarióticos (Sares y col., 1976; Schmidt, 1977; Reeves, 1976; Phillips y Gigot, 1977; Cheah y Osborne, 1977) así como en todo tipo de células somáticas de organismos pluricelulares. El tamaño del nucleosoma límite es constante por digestión prolongada (140 pb) no así el obtenido a tiempos cortos que parece depender de la presencia o abundancia relativa de las histonas ricas en lisina (Morris 1976; Noll, 1976). Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae*, que carece de H1

(Franco y col., 1974) el tamaño es de unos 155 pares de bases (Lohr y Van Holde, 1975).

Esta estructura nucleosomal existe en la cromatina independientemente del estado en que esta se presenta (Bosloch y col., 1976; Howze y col., 1976; Levy-Wilson y Dixon, 1979; Neeves y Jones, 1976; Gaubatz y col., 1979) y su aparición está íntimamente ligada a la presencia de las cuatro histonas H2A, H2B, H3 y H4 y no a la de H1 que solo variaría la longitud del DNA internucleosomal. Los nucleosomas no aparecen cuando se sustituyen las histonas por protaminas o polilisina (Honda y col. 1974; Doenecke, 1977).

#### Organización del nucleosoma.

El nucleosoma consta pues de alrededor de 200 pares de bases de DNA a los que se une un octamero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. También, de modo algo distinto, una molécula de H1 está asociada al nucleosoma. El nucleosoma límite estable posee solo el octámero de histonas y 140 pb de DNA (Soliner-Webb y Felsenfeld, 1975; Shaw y col., 1976) la longitud variable en el nucleosoma corresponderá pues a las regiones internucleosomales.

Los estudios físicos de dispersión de neutrones demostraron que el DNA se encuentra en el exterior del nucleosoma límite (Baldwin y col., 1975) y sugirieron una forma de elipsoide de revolución para el nucleosoma, con un eje mayor de unos  $100 \text{ \AA}$  y el menor de  $50 \text{ \AA}$  (Pardon y col., 1977; Richards y col., 1977; Cary y col., 1978).

Estos datos se vieron confirmados mediante estudios de difracción de rayos X que muestran que el nucleosoma es un disco de  $110 \text{ \AA}$  de diá-

metro y 57 Å de altura pudiéndose asegurar que el DNA está localizado en la periferia (Felsenfeld, 1979; Finch y col., 1977). El DNA se encontraría envolviendo el octámero de histonas formando aproximadamente 1.7 vueltas de superhélice. (HJelm y col., 1977; Suau y col., 1977).

Los siguientes datos más importantes sobre la constitución del nucleosoma vinieron dados por una técnica bioquímica: La digestión de la cromatina por nucleasas. Aunque el DNA internucleosomal es fácilmente digerible, el nucleosoma límite también se digiere aunque con menor velocidad.

El análisis por electroforesis de los fragmentos producidos por digestión del núcleo con DNasa I muestran una serie de bandas que corresponden a fragmentos de DNA múltiplos de 10 nucleótidos y van de 40 a 140 pares de bases (Morris, 1976; Noll, 1974).

Esta subestructura universal (Lohr y col., 1977), es evidente que debe corresponder a la existencia de unos determinados sitios de digestión dentro del nucleosoma y dada la diferente intensidad de las bandas unos lugares de ruptura serán favorecidos respecto a otros.

La existencia de sitios preferentes de ataque de las nucleasas al DNA mitocondrial ha de ser un reflejo de los puntos de contacto existentes entre DNA e histonas (Finch y col., 1977).

Este hecho se estudió mediante técnicas de reticulación covalentes histonas-DNA (Simpson, 1976) y de digestión del monómero de nucleosoma con enzimas proteolíticas (Lilley y Tatchell, 1977).

A partir de estos estudios se ha propuesto que las histonas se sitúan secuencialmente a lo largo de los 140 pb de DNA en la forma H3-H4-

-H2B-H2A-H2A-H2B-H4-H3 (Trifonov, 1978; Mirzabekov y col., 1978), esto supone una disposición simétrica para el nucleosoma que está plenamente de acuerdo con la disposición simétrica de los puntos accesibles a la rotura con nucleasas. Asimismo, se propone que el nucleosoma es capaz de desenrollarse en dos mitades simétricas, quizá como parte del mecanismo de replicación o transcripción (Weintraub y col., 1976) idea apoyada por pruebas físico-químicas (Olins y col., 1977) y de microscopía electrónica (Oudet y col., 1978) sobre el efecto de la fuerza iónica o disolventes desnaturizantes en la estructura del nucleosoma.

Para discernir el papel de cada histona en la organización del nucleosoma son especialmente útiles los estudios de reconstitución. Se han conseguido, mezclando en determinadas condiciones las histonas y el DNA, regenerar unas partículas que presentan similitudes con los nucleosomas; observadas con el microscopio electrónico (Germond y col., 1975) en su digestión con nucleasas (Camerini-Otero y col., 1976; Axel y col., 1974) o en su coeficiente de sedimentación (Tatchell y Van Holde, 1977).

Si en la reconstitución del nucleosoma se omiten una o más histonas puede estudiarse el papel relativo de cada una de ellas. Así se pudo comprobar que las histonas H3 y H4 son necesarias y suficientes para regenerar una partícula semejante al nucleosoma, que origina fragmentos semejantes en tamaño, pero no en distribución, a los que originan los nucleosomas nativos cuando se digieren con nucleasas (Camerini-Otero y col., 1976; Sollner-Webb y col., 1976). Estas partículas son también semejantes al nucleosoma en su resistencia característica al ataque con Tripsina o quimotripsina y su espectro de difracción de rayos

X (Boseley y col., 1976; Moss y col., 1977). Es evidente que estas histonas juegan un papel central en la formación del nucleosoma, lo cual está en concordancia con el hecho de que las histonas ricas en arginina son las mas conservativas en su secuencia y las mas fuertemente unidas al DNA, con el que interaccionan por sus restos básicos que se unen a los grupos fosfatos del DNA, como se comprobó por resonancia magnética nuclear (Levy y col., 1978).

La zona peor conocida es la internucleosomal, es decir el trozo de DNA, 60 pb, mas accesible a la digestión con nucleasas. Se piensa que debe estar muy relacionada con la función de la histona H1 que podría estabilizar el nucleosoma, aunque no fuera necesaria en su formación (Bina-Stein y Singer, 1977; Singer y Singer, 1976) o bien el papel de la H1 podría ser el de separación de nucleosomas entre si; la cromatina de levadura que no posee H1 (Franco y col., 1974) presenta un espaciado internucleosomal corto y variable.

Esto confirmaría también que el nucleosoma no es algo estático sino que el octamero de histonas se puede desplazar a lo largo del DNA. También el nucleosoma debe ser capaz de sufrir cambios estructurales y funcionales que respondan de las diversas funciones que ha de tener la cromatina; como transcripción, replicación, estos cambios estaran asociados a cambios en aquellos componentes que mantienen la estructura es decir, las histonas.

La estructura del nucleosoma no da cuenta del alto grado de compactación que ha de tener el DNA en el interior del núcleo en las células eucarióticas.

Ha de existir algún tipo de plegamiento superior de estos nucleo-

somas y se ha sugerido a partir de datos de microscopía electrónica (Du Praw, 1966; Ris, 1975) y de difracción de neutrones (Carpenter y col., 1976) que los nucleosomas se pliegan en forma de solenoide con un paso de rosca de 100 Å, un diámetro de 300 Å y un hueco central de 100 Å de diámetro. Son necesarios oligómeros de al menos 8 nucleosomas para que sus propiedades físicas, por ejemplo dicroísmo circular y unión de bromuro de etidio, sean semejantes a las de la cromatina nativa (Laurence y col., 1976). Este octámero de histonas sería capaz de formar una unidad estable en estructuras de orden superior. Este solenoide de 300 Å de diámetro aun no es capaz de explicar el grado total de la compactación del DNA en los cromosomas.

Esta claramente demostrada la presencia de la histona H1 en las superestructuras tipo solenoide aunque no esté clara su localización (Finch y Klug, 1976; Fredericq, 1976; Baldwin y col., 1975) y la estructura desaparece cuando se eliminaba H1 dando la típica forma de cuentas de collar (Varshausky y col., 1976).

Sin embargo, en las condiciones en que normalmente se eliminan la H1 también se extraen la mayoría de las PCNH lo que plantea duda acerca de si es realmente la histona H1 la que provoca la compactación de los oligómeros de nucleosoma. En este sentido se ha sugerido que las proteínas HMG pueden sustituir, al menos parcialmente, a la H1 en la inducción de superestructura en la cromatina de levadura (Franco y col., 1979; Lopez Braña, 1979). La H1 podría estar implicada en la estructuración final de la cromatina que conduce al cromosoma (Gurley y col., 1975) y las moléculas de H1 podrían conectar regiones internucleosomales de distintos cromosomas con cada una de sus dos regiones básicas (Hardson y col., 1978).

#### 1.4. Estudio estructural de las histonas.

Estudiar las condiciones y circunstancias en que tienen lugar los cambios conformacionales de una proteína es una buena aproximación al conocimiento de su función. Al no haberse podido obtener las histonas en forma cristalina los estudios estructurales se han realizado con las histonas en disolución, con técnicas, que si bien permiten menos resolución que la difracción de rayos X, dan una imagen más real de los posibles cambios estructurales que sufren las histonas como respuesta a la variación de las condiciones del medio; del mismo modo que la estructura de la cromatina se vislumbra como algo dinámico y probablemente interrelacionado con variaciones estructurales en las histonas. Las técnicas más utilizadas han sido espectroscópicas: dispersión de luz, anisotropía de fluorescencia, dicroísmo circular, espectroscopía ultravioleta de diferencia y resonancia magnética nuclear; de las que se obtiene información perfectamente confrontable y coordinada.

La extremada conservatividad de la secuencia de las histonas implica una función altamente específica en la cromatina, según se ha visto en el apartado anterior. Esta función específica lleva consigo una conformación exacta y posiblemente cambios conformacionales muy controlados de la cadena polipeptídica. Un tercer aspecto importante del estudio estructural es saber que regiones específicas de las histonas están implicadas en el cambio conformacional y en las interacciones específicas histona-DNA e histona-histona.

Un problema para el estudio estructural de las histonas se presenta cuando se intenta definir un "estado nativo" para estas. Los métodos usuales de preparación de histonas (Johns 1964) llevan consigo la uti-

lización de disolventes desnaturalizantes y en los preparados resultantes las histonas están en un estado desordenado con mayor o menor proporción de cadena estadística. Por otra parte cuando se obtienen histonas en condiciones relativamente suaves (Van der Westhuyzen y Von Holt, 1971; Kornberg y Thomas, 1974) no se obtienen fracciones puras de histona sino complejos, reflejo de su situación en la cromatina.

Debido a que las histonas no tienen una función específica como proteínas aisladas puede usarse un criterio indirecto para considerarlas en estado nativo. Cuando a las histonas en disolución acuosa se les añade sal experimentan una transición altamente cooperativa en que la molécula se reordena y adquiere una estructura globular. El proceso se diferencia del que ocurre en las proteínas globulares (Isenberg, 1977) en que en el caso de las histonas probablemente solo se reordene una parte de la molécula debido a la distribución asimétrica de aminoácidos. (Van Holde e Isenberg, 1975).

Un fenómeno que dificulta el estudio de esta renaturalización es el hecho de que simultáneamente se produce la agregación de las moléculas de histona para formar grandes polímeros. Afortunadamente ambos fenómenos ocurren con escalas de tiempo muy distintas si la proteína está a baja concentración (Isenberg, 1977) o bien se mantiene la disolución a baja temperatura (Smerdon e Isenberg, 1973, 1974); siendo rápida la renaturalización y la agregación un proceso más lento, lo cual permite estudiar ambos procesos por separado.

Es interesante destacar que la agregación no es un simple proceso de yuxtaposición sino que la proteína, ya reordenada previamente, experimenta un cambio en su estructura 2<sup>a</sup> así como en la 3<sup>a</sup>. Así por

ejemplo, la forma globular de la H4 no presenta hoja- $\beta$  en proporciones detectables mientras que la forma agregada presenta un 33% de los restos de aminoácidos en conformación  $\beta$  (Li y col., 1972) similarmente la H3 de timo de ternera presenta un 33% de residuos en hoja  $\beta$  en su forma agregada frente a prácticamente nada en la forma reordenada (D'Anna e Isenberg, 1974).

Las histonas disueltas en agua están muy poco estructuradas. La anisotropía de las tirosinas es muy pequeña pues estas no se encuentran en posición rígida, según se deduce de los datos de fluorescencia y de dicroísmo circular en el U.V. próximo. Del mismo modo el CD en el U.V. lejano indica que la estructura secundaria es fundamentalmente de cadena estadística (Li y col, 1972; Wickett y col, 1972; D'Anna y Isenberg 1972, 1974).

Cuando se adiciona sal hasta una concentración similar a la fisiológica todas las histonas sufren cambios inmediatos en las propiedades ópticas anteriormente citadas. Con baja concentración de proteína, del orden de  $10^{-5}$  M, las histonas H3 y H4 sufren además un cambio más lento, que puede durar minutos u horas, cuya velocidad depende de la concentración de histona, el tipo de sal utilizada, la concentración de sal y la temperatura de la disolución. A esta concentración las histonas H2A y H2B muestran solo el cambio inmediato (Li y col, 1972; Wickett y col, 1972; Wickett y Isenberg, 1972; Smerdon y Isenberg, 1973; D'Anna e Isenberg 1972, 1974).

A estos dos procesos se les ha denominado cambio rápido y cambio lento respectivamente. Esta distinción es muy útil una vez demostrada la naturaleza independiente de los dos procesos inducidos por sal y

permite el estudio y la comprensión de cada uno por separado. Los estudios de dispersión de luz muestran que solo ocurre agregación durante el cambio lento y que el cambio rápido no es simplemente la 1<sup>a</sup> parte del cambio lento; los datos de dicroísmo circular muestran que en el paso rápido hay formación de hélice- $\alpha$  mientras que el cambio lento está asociado con la formación de hoja  $\beta$ .

Puede identificarse este cambio rápido con el proceso de renaturalización de las proteínas globulares que se ha comentado anteriormente.

El cambio rápido ocurre apreciablemente para concentraciones 0.15 M en NaCl o 5 mM en fosfato, ambos valores típicamente fisiológicos. Esto puede tomarse como una indicación de que la conformación que se adquiere en el cambio rápido es semejante a la nativa.

Si se admite que el cambio rápido ocurre mediante un proceso "todo o nada" entre dos estados, para cualquier concentración de sal se tiene un equilibrio entre las moléculas en el estado desnaturalizado y el estado reordenado. El valor de la propiedad óptica con la que se esté midiendo el cambio es proporcional al valor de la constante de este equilibrio. Si el cambio es muy cooperativo deberá obtenerse el mismo valor por cualquier técnica utilizada pues se están midiendo 2 aspectos de un mismo fenómeno (o simultáneos). Así el dicroísmo circular en el ultravioleta lejano mide la orientación relativa de los planos que contienen a los distintos enlaces peptídicos mientras que la anisotropía de fluorescencia es una función de la rigidez de las tirosinas. Experimentalmente la constante del reordenamiento medida por cualquiera de ambas técnicas es muy similar para las histonas H3 y H4, lo cual prueba que la transición es altamente cooperativa (Li, 1977).

No todos los iones salinos son igualmente eficaces en la inducción de estructura. El cambio rápido se produce aun a fuerza iónica baja y está asociado, al parecer, con la neutralización de las cargas + de la histona lo que permitiría a esta adquirir una estructura más compacta. Los iones grandes, divalentes como  $\text{SO}_4^{=}$  o  $\text{HPO}_4^{=}$  son los que presentan mayor afinidad por las histonas. Estos iones son mas eficaces que el  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y este tiene a su vez mayor afinidad que  $\text{Cl}^-$  o  $\text{F}^-$ . Por el contrario, para que se produzca el cambio lento es necesario una determinada concentración salina por debajo de la cual no se produce en absoluto (0.15 M para el  $\text{F}^-$ ; 0.001 M para  $\text{HPO}_4^{=}$ ). Así pues, parece necesario que se hayan neutralizado suficientes cargas para que en el dímero de unión no-específica formado en el cambio rápido se formen los puentes intercatenarios necesarios para la estabilización de la hoja- $\beta$ .

La mayor parte del estudio estructural de histonas ha sido realizado con histonas de timo de ternera; es de destacar que las 4 histonas internas, en su estado reordenado, tienen aproximadamente el mismo contenido en  $\alpha$ -hélice. Se ha sugerido (D'Anna e Isenberg, 1974 b) que esta similitud en las estructuras secundarias puede ser la base de las interacciones histona-histona no solo en la autodimerización sino en los complejos cruzados (Li y cols., 1972; Smerdon e Isenberg, 1974; Skandrani y Col, 1972; Kelley, 1973). Esto viene limitado por la elección de los patrones para la determinación de los contenidos en estructuras  $\alpha$  y  $\beta$  (Greenfield y Fasman, 1969).

La H3 de timo de ternera, por ejemplo, que tiene un comportamiento enteramente análogo a la H4, presenta un cambio rápido muy sensible a la concentración de sal (hasta 0.010 M de fosfato) y llega a tener

19 restos en conformación de  $\alpha$ -hélice a una concentración  $10^{-5}$  M de histona. No presenta cambio lento para concentraciones de fosfato menores de 1.5 mM y por encima de este valor sufre un cambio dependiente del tiempo durante el cual agrega. Al final de la agregación presenta 11 restos en  $\alpha$ -hélice y 33 restos en hoja- $\beta$  por molécula de histona (D'Anna e Isenberg, 1974; Li, 1977).

Se ha realizado en otros casos el estudio estructural de fragmentos de histona con el fin de identificar que zonas concretas de la molécula intervienen en la adquisición de estructura (Pekary y col, 1975; Lewis y cols, 1975). La mayor parte de estos estudios han sido realizados con la H4 en la que se distinguirían tres zonas. Un solo fragmento (25-67) muestra estructuración y da lugar a interacción después de la adición de sal. Este fragmento muestra un cambio rápido con formación de  $\alpha$ -hélice y agregación pero ningún cambio estructura dependiente del tiempo. El cambio lento que implica formación de hoja  $\beta$  tiene lugar en la región C-terminal (73-100) mientras que la región N-terminal no interaccionaría y se mantendría probablemente en conformación estadística. Hay que ser cuidadosos en la extrapolación de estos datos, muy útiles, pues en la molécula intacta el comportamiento de una región está íntimamente afectado por otra y viceversa.

#### 1.5. Características del material biológico y dirección de la investigación propuesta.

La organización nucleosomal de la cromatina, aparece en todos los organismos eucarióticos, desde mamíferos superiores hasta microorganismos

mos. La presencia de histonas puede ser tomada así como un rasgo distintivo de los organismos eucarióticos. Todos los estudios ponen también de manifiesto la extraordinaria conservatividad de las histonas tanto en su número como en su secuencia o estructura con ligeras variaciones específicas como la ausencia de H1 en *Physarum polycepalum* (Hozier y Kau , 1976) o la presencia de H5 en eritrocitos nucleados.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un material biológico especialmente interesante por la relativa simplicidad de su material genético que al mismo tiempo es enteramente similar al de organismos superiores. Rozijn y Tonino (1964) observaron la ausencia de cromosomas condensados en *S.cerevisiae* durante la división celular, a pesar de la presencia de núcleos perfectamente definidos. Los mismos autores (Tonino y Rozijn, 1966) describieron el primer fraccionamiento incompleto de las histonas de levadura en el que no encontraron H1, hecho que relacionaron con la ausencia de cromosomas condensados.

Los fraccionamientos de histonas de levadura no han conseguido hasta fecha reciente (Mardian y Isenberg, 1978; Fernández, 1979) una completa separación y caracterización de sus componentes.

Anteriormente se habían utilizado diversos métodos de fraccionamiento; Wintersberger y col (1973) obtuvieron por primera vez una imagen electroforética clara de histonas de *S.cerevisiae*, aisladas a partir de núcleos de células en fase de crecimiento exponencial. Caracterizaron bandas de movilidad semejante a H4, H2A y H2B-H3 de organismos superiores pero no aparecía ninguna comparable a la H1. Franco y col (1974) realizaron el primer fraccionamiento de histonas de levadura mediante una modificación del método de Johns (1964) a partir de nucleo-

histona obtenida por el método de Tonino y Rozijn (1966). Aislaron las histonas H4, H2A y H2B pero no encontraron H3 ni H1. Brandt y Von Holt (1976) pusieron de manifiesto la existencia de H3. Sin embargo, a pesar de muchos esfuerzos no se ha conseguido encontrar una histona semejante a H1 (Franco y col, 1974; Fernández, 1979; Thomas y col, 1976).

Lopez-Braña (Franco y López-Braña, 1978) puso a punto un procedimiento para aislar cromatina de levadura con buen rendimiento.

Esto presenta problemas, ya que la cantidad de DNA por célula es unas 100 veces menor que en organismos superiores lo cual dificulta su extracción, el método está basado en la eliminación de la enorme cantidad de lípidos existentes en la cromatina cruda mediante tratamiento con detergentes no iónicos.

Esta cromatina es lo suficientemente pura con vista a extraer histonas o para realizar estudios sobre su estructura. El primer análisis sobre su estructura fue llevado a cabo por Lohr y Van Holde (1975) que demostraron la existencia de nucleosomas, aunque con un tamaño, alrededor de 160 pb, menor que en eucariontes superiores. Estudios posteriores han confirmado este hecho (Thomas y Farber 1976, Nelson y col, 1977) muestra que al menos un 80-90% del genoma de levadura está organizado de forma repetitiva. El tamaño del nucleosoma límite es de alrededor de 140 pb (Lohr y col, 1977), semejante al de eucariontes superiores y el de menor tamaño del nucleosoma total puede relacionarse con la ausencia de H1.

Se han realizado estudios con las histonas H2A, H2B, H3 y H4 presentes en levadura. Con la excepción de H4 su movilidad electroforética

es ligeramente distinta a la de histonas de organismos superiores, tanto en geles de poliacrilamida al 20% (Franco y col, 1974) como en geles al 15% en presencia de urea (Mardian e Isenberg, 1974); igualmente presentan diferencias en su comportamiento cromatográfico (Brandt y Von Holt, 1976) y en su capacidad de extraerse con disolventes orgánicos (Franco y col, 1974).

Teniendo en cuenta que su composición es muy similar a la de las histonas de timo de ternera (Mardian e Isenberg, 1978; Fernández, 1979) y que su movilidad electroforética en presencia de SDS es también idéntica a la de histonas de organismos superiores (Thomas y Farber, 1976) se ha postulado que aquellas diferencias podían deberse a la asociación de histonas de levadura con lípidos, hecho que se ha demostrado en algunas histonas de vegetales (Fazal y Cole, 1977). Se han realizado muy pocos trabajos sobre estructura de histonas y únicamente se ha caracterizado que H3 y H4 presentan cambio conformacional lento y rápido con la adición de fosfato (Fernández, 1979).

Teniendo en cuenta esta ausencia de trabajos sobre las histonas de levadura y el interés de este material, el trabajo descrito en la presente memoria se centra en primer lugar en poner a punto un método de aislamiento a gran escala de la histona H3 de levadura especialmente interesante por su gran semejanza con la homóloga de timo (Brandt y Von Holt, 1976). Posteriormente se enfoca a la caracterización de esta histona, una vez que se dispuso de ella en suficiente grado de pureza, caracterización que se realiza por métodos químicos y físicos.

El estudio estructural de la histona es de especial interés pues por primera vez se han aplicado a esta histona métodos espectrofotométricos de elevada sensibilidad como espectrofotometría de diferencia o dicroísmo circular en el U.V. próximo. Esto permite obtener una imagen muy completa de los cambios estructurales de esta proteína y de su estructura 2<sup>a</sup>. Algunos trabajos se han llevado a cabo de un modo comparativo con la histona H3 de Timo lo que permite obtener algunas conclusiones generales sobre la estructura de esta proteína.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

## PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Material Biológico.

Para el presente trabajo se utilizó levadura comercial prensada (*Saccharomyces cerevisiae*) de la marca Hércules (Compañía de Industrias Agrícolas S.A., Valladolid).

El timo se extrajo a continuación del sacrificio de los animales, e inmediatamente se congeló en aire líquido. Se conservó a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Fue proporcionado por el Matadero Municipal de Madrid.

### 2.2. Aislamiento de la Histona H3 de *S.cerevisiae*.

#### 2.2.1. Preparación de cromatina purificada.

Se utilizó el método de Franco y Lopez Braña (1978). La homogenización de la levadura se realizó en medio A; tampón fosfato 5 mM, pH 6.5, conteniendo  $\text{Mg SO}_4$  1 mM y PMSF 0,7 mM-isopropanol 1% para evitar proteólisis (Woodhead y Johns 1976). La proporción fue de 900 ml de medio A por cada 500 g de levadura, agitándose durante 20 h (movimiento de vaiven de amplitud 7,5 cm y frecuencia de 150 oscilaciones/minuto) en recipientes de plástico de forma rectangular que contenían 180 ml de perlas de vidrio de 2,5 mm de diámetro, 250 g de perlas de vidrio de 6 mm y 10 bolas de porcelana de 25 mm. La temperatura se mantuvo constante a  $4^{\circ}\text{C}$  durante este proceso y todos los posteriores.

El homogeneizado se centrifugó a 8000 g durante 40 minutos recogiendo un sedimento en tres capas: la inferior, blanquecina, está formada fundamentalmente por células sin romper; la intermedia por paredes celulares y la superior, mas oscura, que contiene casi todo el

DNA celular, en la que se encuentra presente la cromatina.

Una vez recogido el sedimento de cromatina se lavó cuatro veces con medio A suplementado con PMSF y dos con NaCl 0,14 M-Tris 5 mM, pH 7.5; el sedimento se designa en adelante como cromatina cruda.

La cromatina cruda se sometió a dos lavados con sacarosa 0,25 M-MgSO<sub>4</sub> 1 mM-Tris 5 mM-Triton X-100 al 5%. El sedimento se resuspendió en medio B (tampón Tris 5 mM, pH 8.0, MgSO<sub>4</sub> 1 mM) y se colocó, en alícuotas de 10 ml, sobre un gradiente de sacarosa. Este gradiente se preparó en tubos de centrifuga de 50 ml, poniendo dos capas de disoluciones de sacarosa de 15 ml cada una, la inferior 2 M en medio B y la superior 1.5 M en el mismo tampón; a continuación se centrifugó en rotor flotante de Sorvall HB4 durante 3 horas a 27.000 g.

El sedimento resultante, cromatina purificada, se sometió a varios lavados con NaCl 0,14 M- Tris 5 mM para su ulterior utilización.

En ocasiones se utilizó la cromatina obtenida antes de realizar la centrifugación en gradiente por considerarse con suficiente grado de pureza.

#### 2.2.2. Extracción con Etanol-HCl y precipitación fraccionada.

Se trata de una variante del método de Johns (1967). La cromatina purificada se lavó con etanol al 90% y se extrajo durante 18 h con etanol-HCl 1,25 (4:1 v/v) utilizando 2 ml de medio de extracción por cada mg de DNA presente en la cromatina. La extracción se lleva a cabo en un agitamatrazes (marca Gallenkamp) en presencia de perlas de vidrio de 2,5 y 6 mm de diámetro. El homogeneizado se centrifugó 15 minutos a 1.100 g y el sedimento se extrajo dos veces durante 4 h cada una, con

la mitad de volúmen de etanol-HCl. Los sobrenadantes se mezclaron y el sedimento fue desechado.

El extracto soluble en etanol-HCl se filtró por un embudo con placa de vidrio poroso nº 4 y se sometió a precipitación fraccionada. El método que a continuación se expone constituye una modificación del de Franco y col (1974) que permite el fraccionamiento óptimo de histonas ricas en arginina de levadura. Las condiciones óptimas de precipitación se obtuvieron como se indica en el apartado 3.1 de resultados.

Al extracto soluble en EtOH-HCl se añadieron 1.5 volúmenes de acetona y después de separar por centrifugación el precipitado formado se añadió al sobrenadante otro volúmen de acetona con lo que se obtuvo un nuevo precipitado que también se separó, añadiéndose de nuevo al sobrenadante 1,5 volúmenes de acetona y separándose el precipitado formado. Cada uno de estos precipitados se lavó dos veces con mezclas de Etanol-HCl y acetona de la misma composición que el extracto de precipitación, tres veces con acetona y se secó a vacío, al precipitado con 1,5 volúmenes se le denominará en adelante H3 cruda.

Alternativamente, en ocasiones, al sobrenadante de la adición de 1,5 volúmenes de acetona se añadió 0,5 volúmenes de acetona y se separó el precipitado formado.

Todas las operaciones detalladas se realizaron a temperaturas inferiores a 4°C a excepción de los lavados con acetona.

### 2.2.3. Purificación de la Histona H3.

Se utilizó el material obtenido por precipitación con 1.5 volúmenes de acetona del extracto obtenido con EtOH-HCl 1.25 (4:1 v/v) de la

cromatina purificada (H3 cruda).

#### 2.2.3.1. Cromatografía en carboximetil-celulosa.

Se realizó siguiendo, en general, el método de Johns y col., (1960). Para ello se disolvieron cantidades variables -de 10 a 30 mg- de H3 cruda en 5 ml del primer eluyente y se aplicaron a una columna (1,5 x 30 cm) cargada con carboximetil celulosa CM-52 Whatman equilibrada con el primer eluyente de desarrollo. La elución se realizó con los cinco sistemas siguientes:

- I.- Tampón de pH 4.2; constituido por ácido acético 0,1 M y NaOH 0,03 M.
- II.- Tampón de pH 4.2; constituido por ácido acético 0,17 M, NaOH 0,051 M y NaCl-0,042 M.
- III.- HCl 0,01 N.
- IV.- HCl 0,02 N.
- V.- HCl 0,1 N.

El flujo se ajustó a 0,5 ml/minuto y se recogieron fracciones de 5 ml. La elución se siguió por determinación de la absorbancia a 278 nm. Las fracciones resultantes se dializaron frente a agua destilada durante 36 horas antes de ser liofilizadas.

#### 2.2.3.2. Cromatografía en Bio-Gel P-100. (Sommer y Chalkley, 1974).

El Bio-Gel P-100 se preparó de la siguiente manera: Se tomaron 40 g de Bio-Gel P-100 (100-200 Mesh; Bio-Rad) mantenidos durante una noche en 1 litro de HCl 0,01 N ; se empaquetaron en una columna (2.5 x 90 cm) y se equilibró utilizando 1 litro de HCl 0,01 N como eluyente. Se aplicó H3 cruda -10 a 30 mg- disuelta en el mínimo volumen posible de elu-

yente y se ajustó el flujo a 15 ml/hora bajo una presión hidrostática de 60 cm. Se recogieron fracciones de 2 ml y la histona se detectó por medida de la absorción a 230 nm, juntándose las fracciones apropiadas que se dializaron frente a agua destilada y se liofilizaron. En otras ocasiones las fracciones se concentraron previamente a 1/10 de su volúmen en un condensador Diaflo, marca Amicon, con membrana PM 10 y se precipitaron con 7 volúmenes de acetona-HCl. El desarrollo total de la cromatografía dura 48 h aproximadamente lavándose la columna con HCl 0,01 N-Azida sodica 2 mM después de cada periodo de utilización.

### 2.3. Aislamiento de la Histona H3 de timo de ternera.

#### 2.3.1. Obtención de la histona H3 cruda.

Se siguió el método descrito por Johns (1964).

Se tomaron 90 gr de timo y se homogeneizaron en 700 ml de NaCl 0,9% durante dos minutos en un homogeneizador de espas. El homogeneizado se filtró por gasa y se centrifugó a 1.100 g durante 30 minutos y el sedimento se lavó 5 veces con el mismo medio, pero en este caso las centrifugaciones se realizaron durante 15 minutos.

De parte del sedimento se prepararon histonas totales por extracción ácida con HCl 0,25 y posterior precipitación con 7 volúmenes de acetona. El resto del sedimento se lavó con 700 ml de EtOH 90% y tras centrifugación se extrajo con 400 ml de EtOH-HCl 1,25 (4:1 v/v) por agitación con bolas de vidrio de 2,5 y 6 mm de diámetro durante 18 h. y el homogeneizado se centrifugó a 1100 g durante 15 min.

La extracción se repitió otras dos veces, tres horas cada una,

con la mitad del medio de extracción, uniéndose los sobrenadantes.

El extracto se filtró por placa porosa del nº4 y se dializó frente a 1200 ml de Etanol absoluto durante 18 h renovándose entonces el medio de diálisis y prosiguiendo esta durante 3 h, esta operación se repitió otra vez. El precipitado de la bolsa de diálisis (H3 cruda) se lavó una vez con el medio de diálisis, tres veces con acetona seca y se secó a vacío. Se obtuvieron 223 mg de H3 cruda.

#### 2.3.2. Purificación de la histona H3 Timo.

En general se purificó por diálisis frente a etanol siguiendo el método de Oliver (1972) según se describe a continuación.

Se tomaron 50 mg de H3 cruda y se disolvieron en Etanol-HCl 1,25 (4:1 v/v) hasta conseguir una absorbancia de 6 unidades a 230 nm (Concentración de proteína de 1,8 mg/ml). La disolución se dializó frente a 7 volúmenes de etanol anhidro durante 5 h con agitación. El precipitado de la bolsa de diálisis se recuperó por centrifugación a 12000 g durante 5 minutos y el sedimento se lavó una vez con el medio externo de la diálisis, 4 veces con acetona anhidra y se secó a vacío. Se obtuvieron unos 38 mg de H3 pura.

En ocasiones la purificación de H3 de timo de ternera se llevó a cabo por cromatografía en carboximetil-celulosa como se describió en el apartado 2.2.3.1. En estas condiciones la histona H3 eluye con el 4º eluyente.

#### 2.4. Rutas alternativas para la obtención de la histona H3 de S.cerevisiae.

#### 2.4.1. Extracción con EtOH-HCl y posterior diálisis.

Es una variante del método de Johns (1964) para la H3 de timo de ternera. El extracto con etanol-HCl 1,25 (4:1 v/v) obtenido según el método descrito en el apartado 2.2.1 se dializó directamente frente a 10 volúmenes de etanol durante 18 h a la temperatura de 4°C. El precipitado (H3 cruda) se recuperó por centrifugación y se lavó una vez con el medio de diálisis, tres veces con acetona anhidra y se secó a vacío. Al sobrenadante, que contiene fundamentalmente H4 y los restos de H3 que no hayan precipitado con la diálisis, se añadió 1 volumen de acetona y el precipitado obtenido se recuperó de manera similar.

En ocasiones el extracto obtenido con EtOH-HCl se precipitó directamente con 4 volúmenes de acetona obteniéndose así la fracción de histonas ricas en arginina de levadura para su fraccionamiento posterior.

#### 2.4.2. Fraccionamiento a partir de mezclas de Histona.

##### 2.4.2.1. Aislamiento de histonas totales de *S.cerevisiae*.

Las histonas se obtuvieron a partir de cromatina purificada siguiendo el método de Johns (1967).

A un volumen de cromatina resuspendido en agua se añadió un volumen igual de HCl 0,5 N. La suspensión se agitó toda la noche a temperatura inferior a 4°C y posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos. El ácido diluido solubiliza las histonas y proteínas básicas permaneciendo insolubles el DNA y las proteínas ácidas. El sobrenadante se clarificó por filtración a través de una placa de vidrio poroso nº4 y a continuación se precipitaron las histonas con 8 volúmenes de acetona. En ocasiones, y para favorecer la precipitación, se añadió

ron unas gotas de  $H_2SO_4$ , ya que los sulfatos de histona son más insolubles que sus hidroclo<sup>r</sup>uros. El precipitado se lavó varias veces con acetona y se secó a vacío.

#### 2.4.2.2. Fraccionamiento por diálisis frente a etanol.

El material a fraccionar (histonas ricas en arginina, precipitadas con 2,5 volúmenes de acetona del extracto Etanol-HCl) se disolvió en HCl 0,25 en una proporción de 1 mg/ml y se dializó frente a 10 volúmenes de etanol 88%/HCl 0,25 N durante 18 h. A continuación se efectuó una nueva diálisis frente a 10 volúmenes de Etanol: HCl 1,25 (4:1 v/v) durante 3 h. El precipitado formado, correspondiente a las histonas moderadamente ricas en lisina presentes como contaminantes, se separó por centrifugación y se desechó. El sobrenadante de la diálisis se sometió a nueva diálisis frente a 10 volúmenes de etanol absoluto durante 18 h, después de las cuales se renueva el medio y se prolonga la diálisis 3 horas más.

El precipitado obtenido (H3 cruda) se lavó con el medio de diálisis, con acetona anhidra y se secó a vacío. Al sobrenadante se añadieron 4 volúmenes de acetona y el precipitado formado se recuperó de manera similar.

#### 2.4.2.3. Cromatografía en Bio-Gel P-10 (Kecskes et al, 1976).

Se utilizó una columna de 2.2 x 110 cm con una presión hidrostática de trabajo de 80 cm. Para empaquetarla se utilizaron 25 gr de Bio-Gel P-10 seco dejado hinchar durante 24 h en 500 ml de HCl 0,01 N. Se desgasificó el gel antes de introducirlo en la columna.

La columna se probó con histonas totales de timo y posteriormente se aplicaron histonas totales de levadura e histonas ricas en arginina. Las cantidades aplicadas oscilaron entre 10 y 30 mg recuperándose un 80% del material aplicado.

El flujo se ajustó entre 10-15 ml/hora recogiendo fracciones de 2 ml que se analizaron por su absorción a 230 nm. Las fracciones correspondientes a cada pico se juntaron, se dializaron frente a agua destilada y se recuperaron por liofilización.

Las cromatografías se desarrollaron a temperatura ambiente en presencia de azida sodica 2 mM.

## 2.5. Degradación secuencial automática.

### 2.5.1. Química del proceso.

Está basado en el método de degradación de Edman (1950) automatizado que consiste en la reacción de la proteína o péptido con isotiocianato de fenilo. El fenil-tiocarbamil-péptido que se forma es ciclizable con separación del resto N-terminal como un derivado de feniltiohidantoina (PTH-aminoácido) en condiciones que no afectan al resto de los enlaces peptídicos. La ruptura no da lugar directamente a la formación de la tiohidantoina, sino a un derivado de anilino-tiazolinona (ATZ-aminoácido) bastante inestable, que puede convertirse fácilmente por calefacción en medio ácido acuoso en su isómero la feniltiohidantoina.

La degradación secuencial se lleva a cabo en tres fases: acoplamiento, ruptura y conversión (Edman 1960; Blombäck; Edman y col., 1966).

#### 2.5.1.1. Reacción de acoplamiento.

Puesto que el isotiocianato de fenilo (PITC) reacciona solo con los grupos amino no-protonados, el pH del medio debe ser alcalino. Por debajo de pH 8.5, la reacción de acoplamiento es demasiado lenta. Por encima de pH 10 el isotiocianato se hidroliza rápidamente. Se elige pues un pH entre 9 y 9.5. Análogamente se adopta una solución de compromiso en cuanto al disolvente, que ha de serlo de la proteína y del isotiocianato de fenilo por lo cual se utilizan mezclas de agua con algún sistema orgánico que garantizan la solubilidad de ambos.

Para mantener el pH se utilizó un tampón Quadrol-ácido trifluoroacético 1.0 M, en n-propanol/agua (3:4 v/v), pH 9.0 que posee la suficiente estabilidad a la temperatura de reacción.

Una temperatura de 45°C y un tiempo de unos 60 minutos completan las condiciones de reacción.

Finalizado el acoplamiento, el exceso de isotiocianato, los componentes orgánicos del tampón y algunos subproductos de la reacción (Anilina, feniltiourea) se separan por extracción con benceno. La difeniltio-urea, otro subproducto, poco soluble en benceno, se separa por nueva extracción con un disolvente orgánico más polar, como acetato de butilo. El agua se elimina por evaporación bajo vacío. La proteína seca, como feniltiocarbamil derivado, está preparada entonces para la reacción de ruptura.

#### 2.5.1.2. Reacción de ruptura.

Este paso requiere un medio ácido fuerte no acuoso. Se utilizó el ácido heptafluoro-butírico. La reacción es muy rápida, completándose a

40°C en 15 minutos. El ácido heptafluorobutírico, volátil, se separa bajo vacío lo antes posible, una vez asegurada la ruptura, para evitar reacciones perjudiciales como la posible ciclización a ácido piroglutámico de las glutaminas N-terminales. Después de la evaporación del ácido, el derivado de tiazolinona se separa del péptido residual por extracción con cloruro de butilo.

Después de la evaporación del disolvente, el péptido o proteína acortado en un residuo, está listo para un nuevo ciclo de degradación. La solución que contiene la tiazolinona se evapora a sequedad previamente a su conversión e identificación.

#### 2.5.1.3. Reacción de conversión.

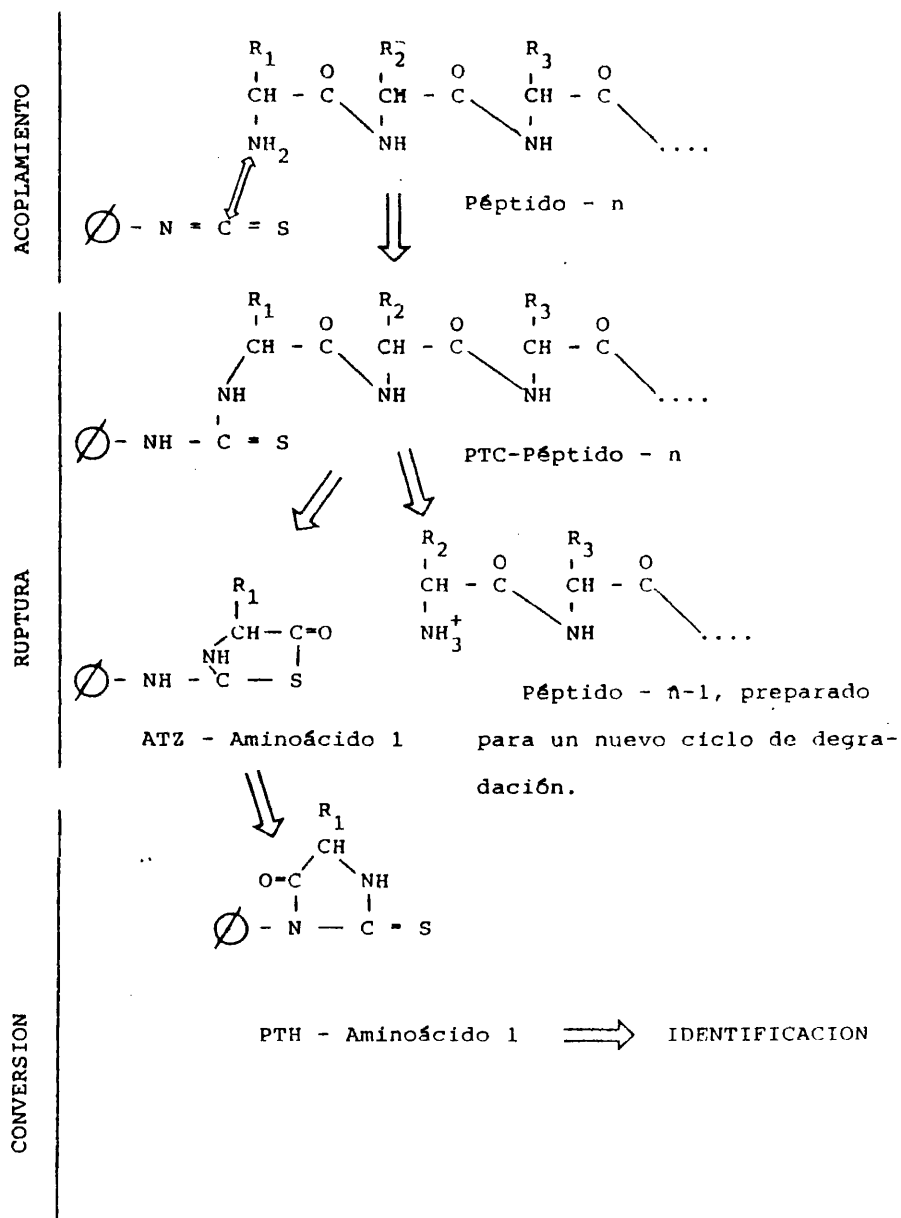
Puesto que las anilintiazolinonas son poco estables, es preferible convertirlas en sus isómeros feniltiohidantoinas (PTHs) antes de proceder a la identificación. De hecho ocurre una conversión parcial durante los procesos de ruptura extracción y evaporación.

Las velocidades de conversión varían de unos aminoácidos a otros. Ilse y Edman (1963) propusieron unas condiciones adecuadas para todos los aminoácidos.

La conversión se produce de un modo eficaz por incubación de las muestras de anilintiazolinonas secas, en HCl 1N durante 10 minutos a 80°C. Los PTH-aminoácidos se extraen de la solución acuosa con acetato de etilo.

Las PTH<sub>s</sub> de histidina, arginina y ácido cisteico, de mayor polaridad, permanecen en fase acuosa debiendo extraerse a un pH 8.0. Ciertos derivados de aminoácidos se destruyen parcialmente durante la conver-

FIGURA 1. Método de degradación de Edman.



si3n; as3 PTH-serina y PTH-treonina sufren  $\beta$ -eliminaci3n con p3rdida del orden del 60% y PTH-asparagina y PTH-glutamina resultan parcialmente desanimadas. Las reacciones descritas se encuentran esquematizadas en la figura 1.

#### 2.5.2. T3cnica y procedimiento.

Las experiencias de secuenciaci3n autom3tica se realizaron en un Sequencer Beckman, modelo 890 B.

El programa utilizado fue b3sicamente igual al desarrollado por Edman y Begg (1967); compuesto de 72 etapas, tiene una duraci3n de dos horas. Los pasos correspondientes a la reacci3n de ruptura se repitieron con el fin de conseguir un mejor rendimiento en cada ciclo (Edman, 1970).

Los reactivos y disolventes utilizados son de grado "sequencer":

Reactivo 1: disoluci3n de isotiocianato de fenilo en heptano al 5% (v/v).

Reactivo 2: Tampon Quadrol-3cido trifluoroac3tico 1,0 M en n-propanol/agua (3:4 v/v) pH 9.0.

Reactivo 3: 3cido n-heptafluorobut3rico anhidro.

Disolvente 1: benceno.

Disolvente 2: acetato de etilo.

Disolvente 3: cloruro de n-butilo.

La prote3na se introdujo en la copa de reacci3n disuelta en agua o en el tampon de Quadrol. Una vez en la copa de reacci3n se llev3 a cabo el programa de aplicaci3n, seguido del de degradaci3n secuencial.

### 2.5.3. Identificación de PTH-aminoácidos.

Los PTH-aminoácidos se analizaron por cromatografía gas-líquido y por cromatografía bidimensional en placas de poliamida. En otras ocasiones se hidrolizaron los PTH (Smithies y col, 1971) identificándose el aminoácido libre en un analizador automático.

#### 2.5.3.1. Cromatografía gas-líquido.

Se utilizó un cromatógrafo Hewlet-Pachard modelo 5750, equipado con doble columna, detector de ionización de llama, programa lineal de temperatura y sistema de inyección en columna. Tanto el soporte como las columnas de vidrio se encontraban silanizadas (Harning, 1963). Las columnas (2 mm de diámetro interno y 1.30 m de longitud) se rellenaron con DC-560 al 10% sobre Chromosorb W, (100-200 mesh) (Pisano y col., 1972). Es necesario utilizar columnas de vidrio, ya que las PTH se descomponen en contacto con el metal.

Los derivados de PTH, resultantes de la conversión, se extrajeron por dos veces con acetato de etilo (0,7 ml), se llevaron a sequedad con nitrógeno y se disolvieron en 2-50  $\mu$ l de acetato de etilo. Para la PTH de arginina, se añadieron 0,2 ml de  $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$  1 M y se extrajeron con acetato de etilo. Una vez secas se disolvieron las PTH-s en 50  $\mu$ l de metanol.

Se inyectaron alícuotas (1  $\mu$ l) de cada muestra de PTH a tres temperaturas diferentes. El gas portador (helio) se ajustó a un flujo de 50 ml/min. La temperatura fue de 265°C para el inyector y 320°C para el detector.

La inyección isoterma se prefirió a la temperatura programada por que los tiempos de elución son más reproducibles. Además, no es preci-

TABLA I.

ORDEN DE ELUCION DE PTH-AMINOACIDOS EN EL METODO DE INYECCION ISOTERMA.

Grupo:		
<u>I (T<sup>a</sup> 180-200°C)</u>	<u>II (T<sup>a</sup> 210-230°C)</u>	<u>III (T<sup>a</sup> 230-250°C)</u>
Alanina	nor-leucina	asparagina
Serina/S-carboximetil cisteína	aspartico (TMS)	glutamina
Glicocola	Metionina	lisina/Tirosina
Cisteico	Glutámico (TMS)	Triptófano
Valina	Fenilalanina	
Dehidrotreonina/prolina	Lisina (TMS)	
Isoleucina/leucina		
Nor-leucina (patrón)		

so esperar entre inyecciones consecutivas a que el aparato recupere la temperatura inicial del programa. Niall, 1973).

En estas condiciones las PTH-aminoácidos se pueden separar en tres grupos en función de la temperatura de desarrollo. Los órdenes de elución se indican en la tabla I.

La PTH-serina, sufre descomposición variable por  $\beta$ -eliminación. El dehidro derivado correspondiente eluye entre PTH-alanina y PTH-glicocola. La PTH-treonina da dos picos en cromatografía de gas. El primero coeluye con la glicocola (producto de ruptura con eliminación de la cadena lateral) y el segundo (dehidro treonina) sale inmediatamente antes de la PTH-prolina.

Algunas PTH-s (His, Tyr, Cys, Lys, Asp, Glu, Asn, Gln) tienen hidrogenos activos y son poco volátiles, descomponiéndose en la columna. Por sililación se bloquearon estos hidrógenos activos, aumentando su volatilidad.

La sililación se realizó mezclando volúmenes iguales (5  $\mu$ l) de bistrimetil-silil-acetamida (BSA) y la PTH disuelta en acetato de etilo. Las PTH de Arg, His y Cya se disuelven en metanol, que se evaporó con nitrógeno antes de sililar.

#### 2.5.3.2. Cromatografía en placas de poliamida.

Se utilizaron placas de poliamida marca Cheng-Ching Trading Co. (Taiwan), cortadas en cuadrados de 7,5 cm de lado. Se corrieron en dos dimensiones con los siguientes sistemas:

Sistema I: Tolueno/n-pentano/ácido acético glacial (60:30:35 v/v/v)  
conteniendo Butil-PDB 250 mg/l.

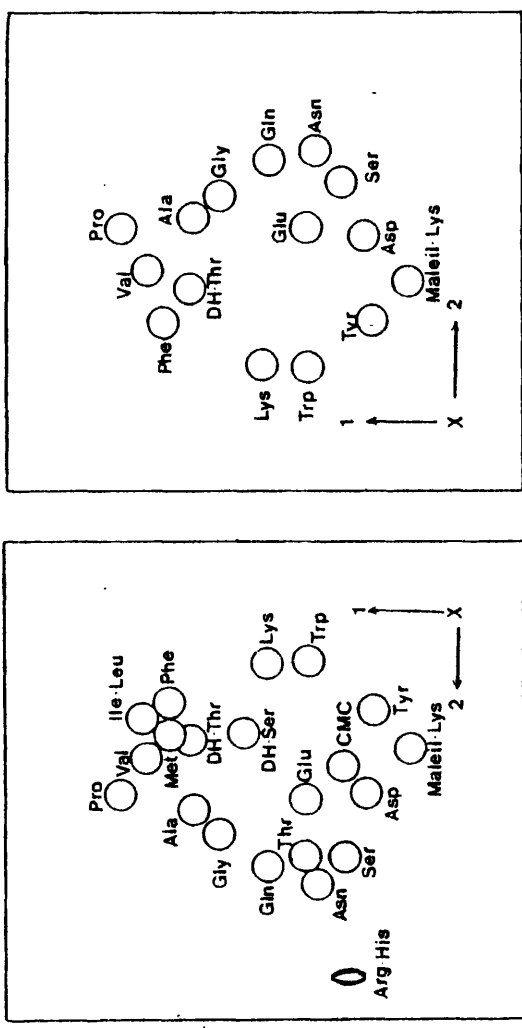


FIGURA 2.- Identificación de PTH-aminoácidos en placas de poliamida.

Sistema II: ácido acético al 35% (v/v).

La utilización del Butil-PDB (2-(4'-tbutilfenil)-1,3,4-oxidazol) incrementa la fluorescencia de las PTH-aminoácidos. Es insoluble en el sistema II.

En cada placa se cargan aproximadamente 0,25 nmol de cada residuo (Kulbe, 1977; Summers y col., 1973). En la figura 2 se indica la posición de los distintos PTH-aminoácidos en las placas desarrolladas.

## 2.6. Metodos analíticos.

### 2.6.1. Electroforésis en gel de poliacrilamida.

Las electroforésis se realizaron según el método descrito por Panyim y Chalkley (1969) en geles de poliacrilamida 15% en presencia de urea 6.25 ó 2.5 M. El pH de desarrollo fue de 3.2 después de realizar la preelectroforésis.

### Polimerización

Los geles se prepararon en tubos de vidrio de 12 cm de longitud y 0,6 cm de diámetro interno. Los tubos de vidrio se trataron con una disolución de diclorodimetil-silano al 0,5% en benceno antes de efectuar la polimerización, con el fin de obtener una superficie perfectamente horizontal en el gel y facilitar su separación del vidrio.

La mezcla de polimerización se preparó en tres fracciones:

Disolución A: acrilamida 60% (p/v), bisacrilamida 0,4% (p/v), en agua.

Disolución B: Acido acético glacial 43.2% (v/v), Temed 4% en agua.

Disolución C: Persulfato amónico 0.2% (p/v), urea 10 M o 4 M, según de que la concentración final requerida fuera 6.25 ó 2.5 M, respectivamente.

Las disoluciones A y B pueden guardarse bastante tiempo a 0°C mientras que la disolución C debe prepararse en el momento de ser utilizada.

Estas disoluciones se mezclan en las proporciones siguientes: 1 volúmen de B, 2 volúmenes de A y 5 volúmenes de C. Los componentes de la mezcla se desgasifican a vacío previamente, para eliminar el aire que podría formar burbujas dentro del gel.

Manteniendo los tubos en posición vertical y tapados por su extremo inferior, se llenaron con la mezcla de polimerización hasta una distancia de 2,5 cm de su extremo superior. Las burbujas que puedan quedar dentro de la disolución, en la parte inferior o adosadas al vidrio, se eliminan presionando el tapon de goma de la parte inferior. Para evitar que la superficie superior del gel quede cóncava, se añadió lentamente sobre cada tubo una capa de agua destilada de 1 cm de espesor evitando que se remueva la superficie, de forma que la interfase entre la capa de agua destilada y la mezcla de polimerización sea plana. Seguidamente se dejan en reposo durante 3 o 4 horas, hasta que se complete la polimerización; transcurrido este tiempo, se retira el agua de la superficie del gel y se sustituye por ácido acético 0,9 N.

#### Preelectroforésis.

Con el fin de eliminar los iones TEMED<sup>2+</sup> y S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup> contenidos en el gel y que perjudican la separación de bandas y su reproducibilidad, los geles se sometieron a preelectroforésis.

Los tubos se colocaron en la cubeta de electroforésis y sus compartimentos se llenaron con ácido acético 0,9 N. A continuación se conectó la fuente de tensión con el polo negativo en el recipiente inferior y se mantuvo durante 6 horas a una intensidad de 2 mA por tubo.

#### Desarrollo de la electroforésis.

Las muestras se disolvieron en un medio de acético 0,18 N-urea 8M en la proporción de 0,2 mg/ml para cada fracción de proteína presente en la muestra.

La disolución de las muestras se aplicó suavemente sobre el gel con la ayuda de una microjeringa conectada en su extremo a un capilar de polietileno. El desarrollo electroforético se hizo en ácido acético 0,9 N durante 3 horas y 30 minutos a una intensidad de 2 mA por tubo, con el polo positivo situado en la cubeta superior.

Transcurrido este tiempo, los geles se recuperaron fracturando el tubo de vidrio.

#### Teñido y revelado.

Los geles se introdujeron durante 12 horas, al menos, en una disolución de negro amido al 0,5% (p/v) en ácido acético 1 N. El desteñido de los geles se realizó por electroforésis transversal o por lavados consecutivos con disolución diluida de acético a una temperatura de 60°C.

#### 2.6.2. Análisis de aminoácidos.

Las proteínas se hidrolizaron con HCl azeotropo-fenol al 0.1% (0,5-1 ml/mg de proteína). La hidrólisis se efectuó a 110°C en tubos Pirex cerrados a vacío. Generalmente se efectuaron hidrólisis de la misma

muestra a diferentes tiempos, con el fin de poder extrapolar los resultados a tiempo cero - para los valores de Ser, Thr y Tyr - y corregir los datos de aquellos residuos de aminoácidos que forman enlaces peptídicos mas resistentes a la hidrólisis Val, Ile-. Finalizado el tiempo de incubación los tubos se abrieron y los hidrolizados se llevaron a sequedad a vacío sobre NaOH. Los hidrolizados se lavaron dos o tres veces con agua destilada con el fin de eliminar la mayor parte posible de HCl y posteriormente se secaron a vacío.

Los análisis de aminoácidos se realizaron en un analizador automático Durrum, modelo D-500, provisto de un computador PDP-8M que automatiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamente seleccionado. El tiempo de análisis fue de 100 minutos. La muestra se aplicó disuelta en tampón citrato, pH 2.2, y el proceso de elución se efectuó con disoluciones tampón de citrato sódico a pH 3.25, 4.25 y 7.09. Para regenerar la columna de resina después de cada análisis se utilizó una disolución de NaOH 0,3N que contenía 0,25 g de EDTA por litro.

Para determinar inequívocamente la presencia de cisteína en el hidrolizado se modificó químicamente la proteína por carboximetilación (Craven y col., 1965) como paso previo a la hidrólisis. Para ello la proteína se disolvió en un tampón Tris-cloruro de guanidinio pH 8 y se incubó, en atmósfera de nitrógeno con ditiotreitól (DTT) durante 1 hora, a 40°C, en una estufa en oscuridad a fin de reducir completamente las cisteínas presentes en la molécula de proteína.

Tras esto se añadió el reactivo iodoacetato en gran exceso manteniéndose la reacción durante 2 horas a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno, previamente se agitó la mezcla de reacción durante 10 minutos.

Al cabo de las dos horas se añadió un exceso de  $\beta$ -mercaptoetanol a la mezcla de reacción y tras una incubación de 15 minutos se eliminaron las sales, aplicándolo a una columna de Shephadex G-25 (100 x 1,2 cm) eluida con  $\text{CO}_3\text{H}_4\text{NH}_4$  0,05 M. El pico correspondiente a la proteína se reconoció por su absorbancia a 230 nm, se dializó exhaustivamente frente a agua destilada y se liofilizó. El resto de las operaciones se realizaron de la forma descrita detectándose la cisteína en forma de carboximetil-cisteína.

### 2.6.3. Valoración cuantitativa de DNA.

El DNA se valoró por absorción ultravioleta a 260 nm sabiendo que para el DNA completamente hidrolizado el coeficiente de extinción correspondiente ( $E_{1\text{ cm}}^{260}$ ) es de 0,224 para una disolución de 0,001%, p/v (Webb y Levy, 1958). En este procedimiento se hace inexcusable la previa separación de otras especies moleculares que acompañan al DNA y también presentan absorción a esa longitud de onda, fundamentalmente el RNA.

Para eliminar estas sustancias que interfieren en la determinación del DNA se siguió el procedimiento descrito por Hill y col., (1971) y que se detalla a continuación. La muestra se precipitó con ácido perclórico (PCA) 1N, con lo cual precipitaron DNA, RNA y proteínas y se incubó el sedimento con NaOH 0,3 N durante una hora a 37°C. En este medio se solubilizan DNA, RNA y algunas proteínas. A continuación se añadió PCA hasta una concentración final 1N con lo cual se precipitó el DNA y las proteínas permaneciendo el RNA hidrolizado en solución. Una vez centrifugado se añadió al sedimento, formado exclusivamente por DNA y proteínas PCA al 1,5% y se incubó a 90°C durante 20 minutos, trans

curridos los cuales la hidrólisis del DNA ha sido completa. La proteína, no hidrolizada, se eliminó por centrifugación, lavándose el sedimento con PCA. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se juntaron y se midió la concentración del DNA mediante absorbancia a 260 nm.

## 2.7. Métodos espectrofotométricos.

### 2.7.1. Espectros de absorción en el ultravioleta.

Las histonas H3 de *S.cerevisiae* y timo de ternera utilizadas en estos experimentos se prepararon y purificaron tal como se ha descrito anteriormente. Las muestras se analizaron electroforéticamente para comprobar su homogeneidad y su composición de aminoácidos es la indicada en los resultados. La concentración de las histonas en agua se determinó espectrofotométricamente.

Después de cada experimento la proteína se recuperó por diálisis exhaustiva frente a agua destilada y posterior precipitación con acetona-HCl.

Los espectros de absorción se realizaron en un espectrofotómetro Cary 118. Ordinariamente se realizó el espectro de absorción desde 350 nm hasta 240 nm. La mayoría de las muestras medidas no presentaban turbidez, lo cual se comprobó por la absorbancia prácticamente nula entre 350 y 310 nm. En algunos casos en que la muestra sí presentó turbidez se corrigió el espectro según el método de Donovan (1969).

Los espectros de diferencia por variación de la fuerza iónica, inducidos por la adición de sal, se realizaron para una concentración de las histonas H3 de S.c. y T.t. entre  $3-6 \cdot 10^{-5}$  M de proteína. Las muestras se disolvieron en agua a pH 6.0 y se colocaron dos alícuotas, cui

dadosamente medidas, de 3 ml en dos cubetas de cuarzo, idénticas, de 1 cm de paso óptico. Las líneas-base disolvente-disolvente y proteína-proteína fueron idénticas indicando que la concentración de la muestra estaba dentro del rango en el cual el fotomultiplicador puede dar una respuesta adecuada.

Se añadieron alícuotas de una solución 3.0 M de KF a pH 6 a la primera cubeta con una microjeringa de precisión. Simultáneamente se añadieron alícuotas idénticas de agua a la segunda cubeta que se tomó como referencia. Los espectros se realizaron a 22°C después de cuidadosa agitación, con una sensibilidad de 0,2-0,5 unidades de absorbancia para toda la escala, entre 320 y 260 nm. El aparato se utilizó en la modalidad de rendija automática, la amplificación se ajustó de modo que la rendija variase entre 0,03 y 0,2 mm.

Para obtener los espectros de diferencia por variaciones de pH se trabajó con una concentración similar de proteína en disoluciones de KF de concentración superior a 0,2 M. El pH de las muestras se elevó adicionando alícuotas  $\leq 3$   $\mu$ l de NaOH 2, 0,5 ó 0,1 N dependiendo del rango de pH. A la cubeta patrón se adicionaron alícuotas idénticas de agua a pH 2.8 y los espectros se realizaron de un modo similar. Entre 260 y 230 nm la sensibilidad se disminuyó a 1-2 unidades de absorbancia.

Los espectros de las histonas H3 en presencia de etanol se realizaron disolviendo la proteína a una concentración de  $6-10 \cdot 10^{-5}$  M en HCl 0,25 y elevando la concentración de etanol por adiciones controladas de Etanol - 90% - HCl 0,25. La sensibilidad del aparato se estableció entre 0,2-0,5 unidades de absorbancia. La concentración final de proteína resultó así ser de  $2-3 \cdot 10^{-5}$  M para las disoluciones más concentradas

en etanol.

#### 2.7.2. Espectros de dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un dicrografo Mark III (Jobin-Yvon). En la región del ultravioleta próximo (320-245 nm) se usaron cubetas de 1 cm de paso óptico y se operó con una sensibilidad de  $1 \cdot 10^{-6} \Delta A \cdot \text{mm}^{-1}$ . Para obtener el espectro en la región del ultravioleta lejano (250-190 nm) se usaron cubetas de 0,05 cm de paso óptico y la sensibilidad se ajustó a  $2 \cdot 10^{-6} \Delta A \cdot \text{mm}^{-1}$ . La fuerza iónica, el pH y la concentración de etanol se ajustaron tal como se describe anteriormente. Para las medidas en el ultravioleta próximo, la concentración de proteína utilizada fue similar a la utilizada en el espectrofotómetro; para las medidas en el ultravioleta lejano las disoluciones se diluyeron 10 veces.

Las elipticidades se expresan como elipticidades molares en grados  $\times$  cm/d mol del residuo en el U.V. lejano ó grado  $\times$  cm/ dmol de proteína en el U.V. próximo.

Para calcular las contribuciones de la estructura secundaria se usaron los métodos de Smerdon e Isenberg (1976) y Greenfield y Fasman (1969) utilizando como patrones poli-L-lisina en distintas condiciones estructurantes.

### 3. RESULTADOS

### 3.- RESULTADOS

#### 3.1.- Aislamiento de la histona H3 de S.cerevisiae.

La obtención de la histona H3 se consiguió por el método descrito en el apartado 2.2.2., a partir de cromatina parcialmente purificada. La figura 3 muestra la imagen electroforética de los materiales obtenidos por precipitación fraccionada con acetona del extracto Etanol-HCl 1,25 (4:1; v/v).

El gel B de la figura 3 nos muestra como el extracto con etanol-HCl contiene tres proteínas mayoritarias correspondientes a histonas; que pueden identificarse en principio (Fernandez, 1979) como las histonas H3, H2A y H4 (Ricas en arginina) de S.cerevisiae.

La precipitación fraccionada del extracto supone un éxito parcial pues con 1.5 volúmenes se logra una buena separación de la banda superior, que debe corresponder a dos proteínas diferentes, H3 y H2A, según la imagen electroforética del extracto total. Con 4 volúmenes se ha conseguido separar la histona H4 en excelente grado de pureza, el análisis de aminoácidos de la H4 se muestra en la Tabla II.

El material precipitado con 2,5 volúmenes de acetona resulta ser una mezcla variable de las tres histonas citadas según nos indica su imagen electroforética. (Fig. 3-D). Las proporciones relativas de las tres histonas dependen ligeramente de las condiciones de extracción, pero obteniéndose una mezcla similar en todos los casos.

El material precipitado con 2,5 volúmenes es pues susceptible de purificación posterior, con el fin de recuperar la H3 que contiene. Por

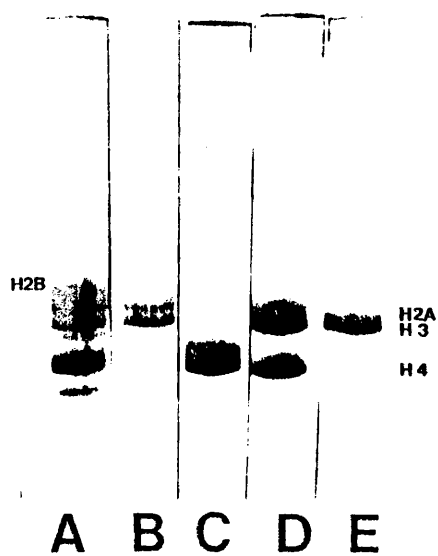


FIGURA 3.- Electroforésis en gel de poliacrilamida

15%-Urea 2.5 M.

- A) Histonas totales de *Saccharomyces cerevisiae*.
- B) Extracto Etanol-HCl de cromatina purificada precipitado directamente con 4 volúmenes de acetona.
- C) Material soluble en etanol-HCl y precipitado con 4 volúmenes de acetona.
- D) Material soluble en etanol-HCl y precipitado con 2.5. volúmenes de acetona.
- E) Material soluble en etanol-HCl y precipitado con 1.5 volúmenes de acetona.

TABLA II.

COMPOSICION DE LA HISTONA H4 DE S.CEREVISIAE COMPARADA CON SU HO-  
MOLOGA DE TIMO.

	<u>H4 S.c.</u>	<u>H4 T.t.</u>
Asx	7,9	4,9
Thr	4,9	6,9
Ser	5,2	2,0
Glx	9,9	5,9
Pro	2,3	1,0
Gly	11,5	16,7
Ala	6,8	6,9
Cys	0,0	0,0
Val	6,3	8,8
Met	0,0	1,0
Ile	6,3	5,9
Leu	9,6	7,8
Tyr	3,9	3,9
Phe	3,3	2,0
His	1,9	2,0
Lys	9,8	10,8
Arg	10,9	13,7
B/A	1,3	2,5
Lys/Arg.	0,9	0,8
	(1)	(2)

(1) Material precipitado con 4 volúmenes de acetona del extracto Etanol HCl de cromatina purificada.

(2) DeLange y col (1968)

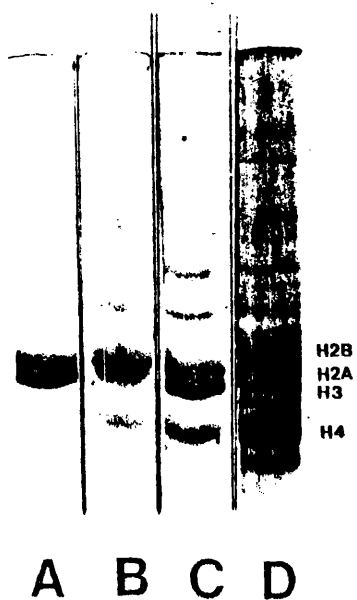
- La composición se da en moles por ciento.

este motivo y para optimizar las condiciones se estudió la influencia de variar las cantidades de acetona añadida al extracto Etanol-HCl. Tras una serie de ensayos, las condiciones idóneas para la precipitación resultaron ser las que se acaban de describir; pues como se muestra en la figura 4-B con 2 volúmenes de acetona ya comienza a precipitar la H4 que no lo hacía con 1.5 volúmenes.

En el gel A de la figura 4, que corresponde al precipitado con 1,5 volúmenes se aprecia que este material corresponde a la mezcla de 2 proteínas, como ya se había razonado. De ellas, la mejor recuperada es la inferior que, como veremos, corresponde a la H3; mientras que con 2 volúmenes precipita muy poca cantidad de H3, haciéndolo todavía la H2A en cantidades apreciables. Las condiciones descritas son así las que permiten la recuperación mas idónea, en pureza y rendimiento, de la H3 aunque no se consiga de un modo completo.

### 3.2.- Purificación de la histona H3 de S.cerevisiae.

En vista de la imposibilidad de fraccionar totalmente las histonas ricas en arginina de S.cerevisiae por precipitación fraccionada, se intentaron otros métodos de purificar el precipitado obtenido con 1,5 volúmenes al que llamaremos H3 cruda. La imagen electroforética de este material parece sugerir la presencia de dos bandas, correspondientes a dos proteínas diferenciadas, figura 4; si bien esto no parece claro en todos los casos, figura 3, e incluso anteriormente fue descrito como una proteína única (Franco y col., 1974). Este hecho se puede relacionar con la técnica de electroforésis empleada en el análisis, consiguiéndose mejor resolución con geles del 15% en presencia de urea 2,5 M, que ha sido la técnica utilizada en este trabajo. Otros factores, que afec



**FIGURA 4.-** Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

- A) Material soluble en etanol-HCl y precipitado con 1.5 volúmenes de acetona.
- B) Material soluble en etanol-HCl y precipitado con 2 volúmenes de acetona.
- C) Histonas ricas en arginina de *S. cerevisiae*.
- D) Histonas totales de *S. cerevisiae*.

tan a la resolución y justifican las diferencias entre unas electroforesis y otras, realizadas con la misma técnica, son el tiempo de desarrollo y la intensidad de corriente. Un mayor tiempo de desarrollo produce mejor separación entre bandas pero la resolución puede disminuir por difusión.

La existencia de dos histonas en Levadura con movilidad electroforética muy similar ya había sido descrita anteriormente (Fernández, 1979). En la figura 5 está representado el perfil de elución de la cromatografía en Bio-Gel P-100 de histonas totales de Levadura. Su imagen electroforética en la misma figura nos indica cómo los picos I, III y IV, que corresponden a proteínas claramente diferentes por sus volúmenes de elución, tienen una movilidad electroforética enteramente similar (Fernández, 1979).

Este hecho sugirió utilizar la cromatografía en Bio-Gel P-100 para separar las dos proteínas presentes en la H3 cruda. En la figura 5-C está representado el perfil de elución correspondiente en el que se han resuelto con claridad dos picos que presentan gran analogía en sus volúmenes de exclusión con los picos III y IV de la cromatografía de histonas totales.

La figura 6 muestra la imagen electroforética de los materiales recuperados en la cromatografía de la H3 cruda. Se ha conseguido el fraccionamiento de las dos proteínas que la constituían y se recupera especialmente el 2º pico con gran pureza. La diferente movilidad electroforética de ambas fracciones es ahora más patente al correr cada material en geles distintos.

Con el fin de mejorar el rendimiento de la purificación de la H3

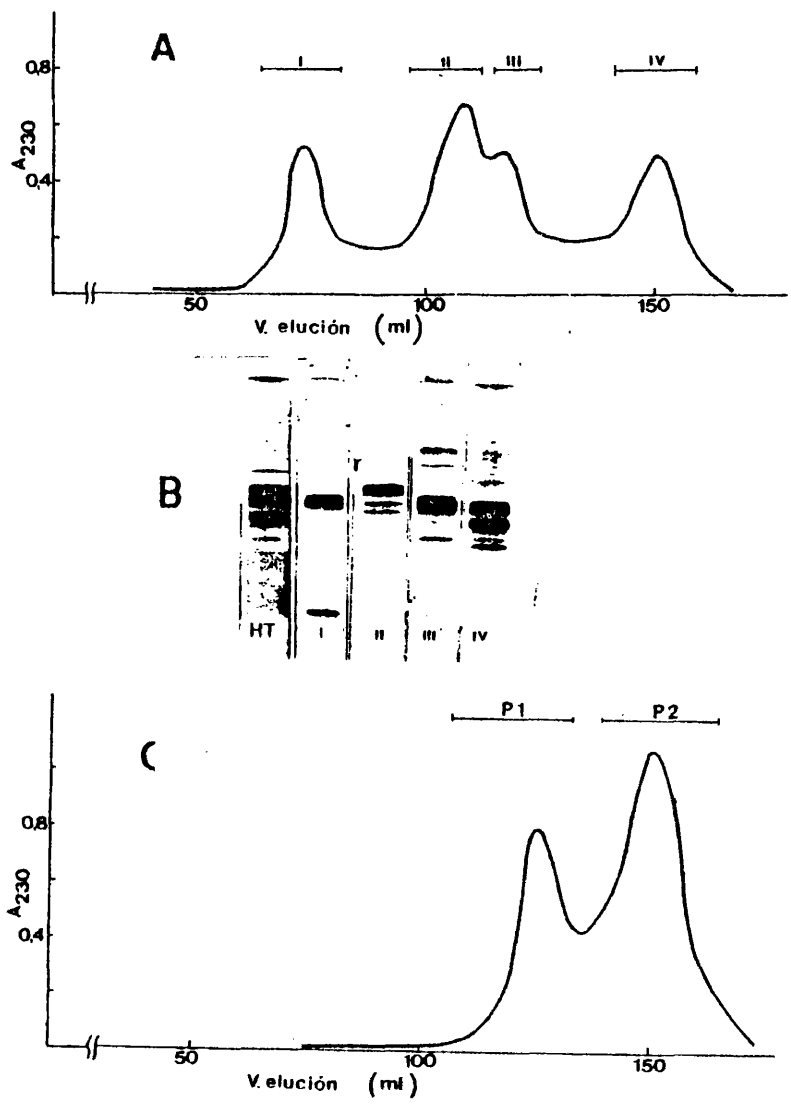


FIGURA 5.- (A) Perfil de elución de la cromatografía de histonas totales de *S.cerevisiae* en Bio-Gel P-100. (B) Electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% de los materiales recuperados en (A). (C) Perfil de elución de H3 cruda en Bio-Gel P-100

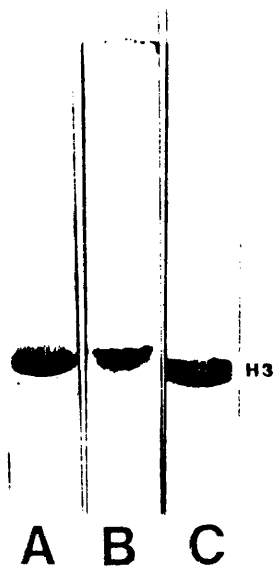


FIGURA 6.- Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

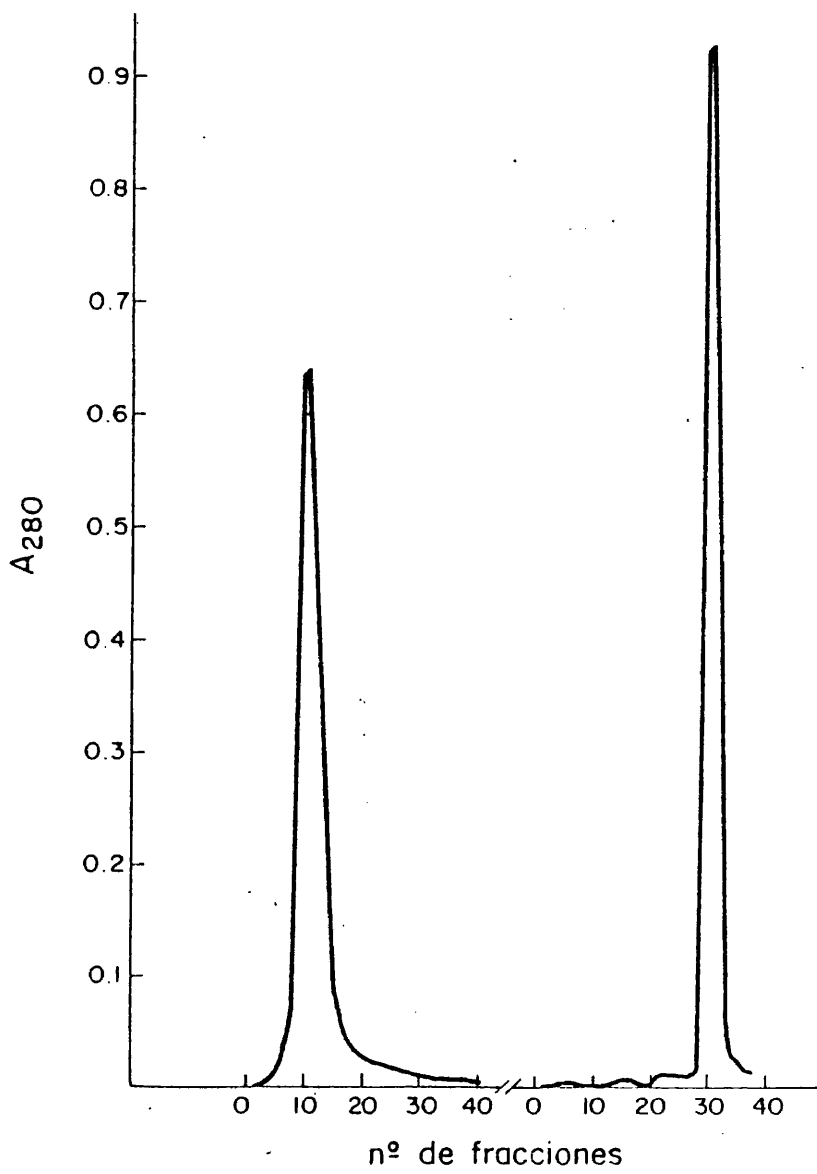
- A) Material soluble en etanol-HCl y precipitado con 1.5 volúmenes de acetona (H3 cruda).
- B) 1<sup>er</sup> pico de la cromatografía en Bio-Gel P-100 del precipitado con 1.5 volúmenes de acetona.
- C) 2<sup>a</sup> pico de la cromatografía del mismo material.

cruda se utilizaron otros procedimientos. Especialmente la cromatografía discontinua en carboximetil-celulosa descrita por Belmonte (1976) (apartado 2.2.3.1. de la parte experimental) se pensó que podría ser útil ya que es capaz de fraccionar las histonas en 2 grupos de ricas en Lisina y ricas en Arginina, como también se había comprobado para Levadura (Franco, 1974). En efecto, el perfil de elución en la figura 7 nos muestra la existencia de dos picos bien definidos y su imagen electroforética en la figura 8 ofrece un resultado enteramente similar al obtenido por cromatografía en Bio-Gel P-100.

La cromatografía en carboximetil-celulosa presenta sobre el Bio-Gel P-100 la ventaja de que la elución se realiza con mayor rapidez y la recuperación del material introducido en la columna es mayor (un 80%) que en el caso del Bio-Gel P-100 (un 50%). El material sale mucho más concentrado de la columna y es más sencillo de recuperar. Por contra ofrece el inconveniente de que, en el caso de las histonas, solo separa en dos fracciones y no es capaz de separar otras proteínas con taminantes, especialmente la H4. El Bio-Gel P-100 en cambio, es en si mismo un procedimiento de purificación selectiva y rinde una H3 con mayor grado de pureza.

El análisis de aminoácidos del 1º y 2º pico de ambas cromatografías permite asignar definitivamente al 1<sup>er</sup> pico como histona H2A (Tabla III) y el 2º pico como H3 (Tabla IV). Ambas histonas presentan una gran semejanza en la composición de aminoácidos con sus homólogas de timo si bien estas semejanzas son mucho mayores en el caso de la H3.

A efectos comparativos se procedió al aislamiento y purificación de la histona H3 de timo de ternera de acuerdo con el método de Johns



**FIGURA 7.-** Perfil de elución de la cromatografía en carboximetil-celulosa del material precipitado con 1.5 volúmenes de acetona del extracto etanol-HCl (H3 cruda). 2<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> tampones.

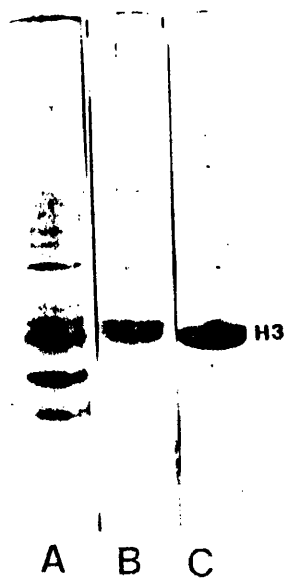


FIGURA 8.- Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

- A) Histonas totales de *Saccharomyces cerevisiae*.
- B) 1<sup>er</sup> pico de la cromatografía en carboximetil-celulosa de material soluble en etanol-HCl y precipitado con 1.5 volúmenes de acetona.
- C) 2<sup>a</sup> pico de la cromatografía del citado material.

TABLA III.

COMPOSICION DE LA HISTONA H2A de S.CEREVISIAE COMPARADA CON SU HOMOLOGA DE TIMO.

	H2A S.c.		H2A T.t.
	1	2	
Asx	8,9	8,2	6,2
Thr	3,8	4,6	3,9
Ser	5,1	6,2	3,1
Glx	8,8	9,3	9,3
Pro	4,3	4,5	3,9
Gly	10,2	9,7	10,9
Ala	13,6	13,6	13,2
Cys	0,0	0,0	0,0
Val	4,6	3,9	6,2
Met	0,0	0,0	0,0
Ile	4,8	3,8	4,8
Leu	11,8	11,9	12,4
Tyr	2,3	2,2	2,3
Phe	1,1	1,1	0,8
His	2,2	1,8	3,1
Lys	10,6	11,8	10,9
Arg	7,5	8,3	9,3
B/A	1,14	1,25	1,5
Lys/Arg	1,41	1,42	1,2
			(3)

- La composición se da en moles por ciento.

- (1) 1<sup>er</sup> Pico de la cromatografía en Bio-Gel P-100 del material precipitado con 1,5 volúmenes de acetona del extracto Etanol-HCl (H3 cruda).
- (2) 1<sup>er</sup> Pico de la cromatografía en carboximetil-celulosa del mismo material.
- (3) Sautiere y col (1972).

TABLA IV.

COMPOSICION DE LA HISTONA H3 DE S.CEREVISIAE COMPARADA CON SU HOMOLOGA DE TIMO.

	1	2	3	Calculados	4	H3 T.t (5)
Asx	5,4	5,5	5,6	5,5	4,4	3,7
Thr	6,0	5,8	5,5	6,3	6,4	7,4
Ser	5,6	5,2	4,7	6,1	6,0	3,7
Glx	11,6	11,7	11,6	11,6	11,6	11,1
Pro	4,4	4,3	4,4	4,4	4,4	4,4
Gly	6,3	6,1	6,2	6,2	5,9	5,2
Ala	11,3	11,3	11,2	11,3	12,4	13,3
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5
Val	4,8	4,8	4,9	4,9	4,5	4,4
Met	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5
Ile	5,2	5,4	5,6	5,6	5,0	5,2
Leu	9,5	9,8	10,7	10,0	9,2	8,9
Tgr	2	2,1	2,1	2,1	2,1	2,2
Phe	3,5	3,7	3,5	3,6	3,6	3,0
His	1,8	1,8	1,8	1,8	1,5	1,5
Lys	10,2	10,0	9,8	10,0	9,9	9,6
Arg	11,8	12,1	11,8	11,9	13,2	13,3
B/A				1,38	1,64	1,6
Lys/Arg				0,84	0,75	0,7

(1) (2) y (3): Hidrolizados a 24, 36 y 48 h respectivamente del 2<sup>a</sup> Pico de la cromatina en CMC de H3 cruda.

(4) 2<sup>a</sup> Pico de la cromatografía en Bio-Gel P-100 de la H3 cruda.

(5) De la secuencia (DeLange y col., 1972).

(1964). El gel B de la figura 9 muestra la histona H3 cruda que se purificó posteriormente por diálisis frente a etanol mostrándose el resultado en el gel C. La histona H2A que no precipita en la diálisis y se recupera del sobrenadante por precipitación con 4 volúmenes de acetona se muestra en el gel D. La pureza de la H3 obtenida es similar a la conseguida por el autor del método y la contaminación es, en cualquier caso, muy pequeña. La cromatografía en carboximetil-celulosa proporciona una preparación de H3 cruda de composición similar a la del gel B de la figura 9.

La figura 10 nos muestra una comparación de las movilidades electroforéticas de la histona H3 de *S. cerevisiae*, gel C y la H3 de timo de ternera, gel D, observándose una clara diferencia de movilidad entre ambas. La H3 de Levadura presenta mayor movilidad que la de timo a pesar de la gran semejanza en su composición de aminoácidos (Tabla IV). Sin embargo, la histona H4 de levadura, gel A, tiene una movilidad similar a la de su homóloga de timo a pesar de presentar mayores diferencias (Tabla II).

### 3.3.- Rutas alternativas de obtención de H3 de *S.cerevisiae*.

El procedimiento descrito hasta aquí consigue la preparación de la histona H3 en excelentes condiciones de pureza, pero no consigue la recuperación completa de esta proteína del extracto Etanol-HCl. De las otras dos proteínas mayoritariamente presentes en el extracto, la H2A se eliminaba con facilidad por procedimientos cromatográficos, mientras que la H4 al tratarse también de una histona rica en arginina eluye conjuntamente con la H3 en los dos métodos usados (Franco y col., 1974; Fernández, 1979). Solo se consigue separar H3 de H4 ajustando con pre-

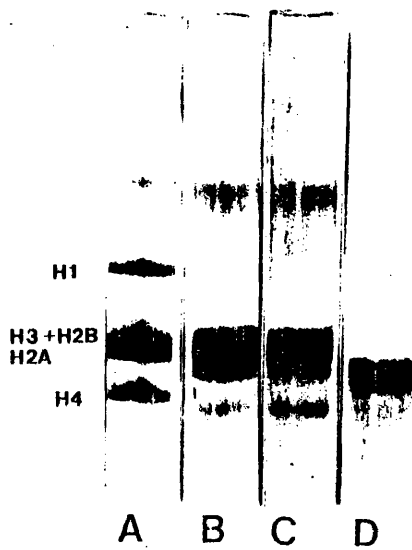
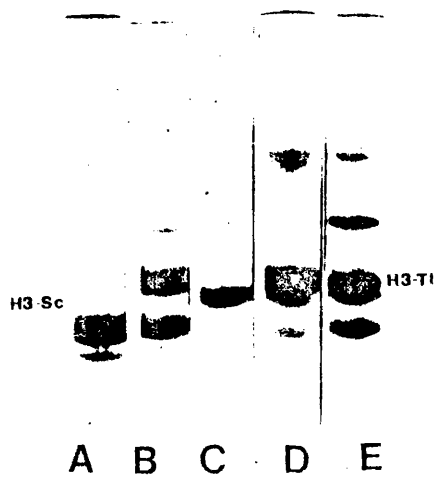


FIGURA 9.- Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

- A) Histonas totales de timo de ternera.
- B) Histona H3 cruda de timo de ternera obtenida por el método de Johns (1964).
- C) Histona H3 de timo de ternera purificada por el método de Oliver y col. (1972).
- D) Histona H2A de timo de ternera.



**FIGURA 10.-** Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 m.  
Comparación de movilidad entre H3 de timo y de levadura.

- A) Histona H4 de *S.cerevisiae*.
- B) Histonas ricas en arginina de *S.cerevisiae*.
- C) Histona H3 de *S.cerevisiae*.
- D) Histona H3 de timo de ternera.
- E) Histonas totales de timo de ternera.

cisión las condiciones de la precipitación fraccionada y a costa de una disminución en el rendimiento.

Todo esto pone de manifiesto la necesidad de conseguir otros métodos preparativos que permitan la recuperación total de la H3, o bien que permitan su separación de la H4 en las mezclas de ambas.

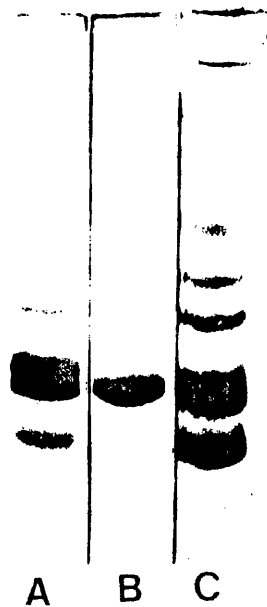
#### 3.3.1.- Diálisis directa del extracto Etanol-HCl.

La aplicación directa del método de Johns (1964) a la obtención de la H3 de Levadura nos proporciona esta histona con elevado grado de pureza según se aprecia en el gel B de la figura 11. Este procedimiento no se usó con asiduidad debido a su bajísimo rendimiento, pues en estas condiciones de hidrofobicidad la mayor parte de la H3 de levadura permanece disuelta en la bolsa de diálisis, a diferencia de lo que ocurre con la H3 de timo, según se aprecia en el gel C de la figura 11 que corresponde al material precipitado con 1 volumen de acetona del sobrenadante de la bolsa de diálisis.

El gel A de la figura 11 nos muestra el material que se obtiene precipitando directamente con 4 volúmenes de acetona el extracto Etanol-HCl. Este material, que denominaremos histonas ricas en arginina, contiene las histonas H2A, H3 y H4, y se sometió a posteriores tratamientos para recuperar la histona H3. Igualmente se hizo con aquellos materiales que la contienen en forma contaminada provenientes del método de purificación inicialmente descrito, como por ejemplo el precipitado con 2,5 volúmenes de acetona del extracto etanol-HCl.

#### 3.3.2.- Fraccionamiento a partir de mezclas de histona.

Los resultados obtenidos son similares cuando el material de par-



**FIGURA 11.-** Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

Diálisis directa del extracto etanol-HCl.

- A) Histonas ricas en arginina de Levadura (material que se extrae con etanol-HCl de cromatina purificada).
- B) Material precipitado en la bolsa de diálisis.
- C) Material que permanece soluble en la bolsa de diálisis y precipita con 1 volúmen de acetona.

tida son histonas totales o histonas ricas en arginina; por lo cual se partió normalmente de este último tipo de material con el fin de conseguir rendimientos superiores. Las técnicas utilizadas permiten además el reciclaje de todos aquellos materiales que contengan la histona H3 mas o menos contaminada por otras histonas.

#### 3.3.2.1. Precipitación selectiva por diálisis frente a etanol.

La figura 12 corresponde a la imagen electroforética de los materiales obtenidos por diálisis de histonas ricas en arginina de levadura frente a etanol absoluto, según el procedimiento descrito en el apartado 2.4.2.2. de la parte experimental. El gel A, de la figura 12, corresponde al material de partida, en que se observa la presencia de las histonas ricas en arginina así como otros contaminantes posiblemente del tipo proteínas no-histonas. A pesar de estos contaminantes en el material de partida se consigue, mediante este procedimiento, que el material precipitado en la bolsa durante la 2<sup>a</sup> diálisis (frente a etanol absoluto) sea histona H3 cruda en excelentes condiciones de pureza (Figura 12-B). El gel C nos indica que la recuperación de esta H3 cruda no ha sido total, como ya veíamos que ocurría en el apartado anterior.

Un factor crítico para este procedimiento es la concentración de proteína disuelta en HCl 0,25 N que se utiliza en la 1<sup>a</sup> diálisis, frente a EtOH 88%-HCl 0,25. No debe ser muy grande, pues durante esta diálisis ocurre una drástica reducción de volumen en la bolsa como consecuencia de la salida de agua, con riesgo de que precipiten únicamente las histonas ricas en Lisina, presentes como contaminantes, y de que también haya una pérdida parcial de la H3. Se consiguió una resolu



FIGURA 12.- Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

Precipitación por diálisis frente a etanol.

- A) Histonas ricas en arginina de *S.cerevisiae*.
- B) Material precipitado en la diálisis frente a etanol absoluto.
- C) Material que permanece soluble en la bolsa de diálisis y precipita con un volúmen de acetona.

ción ideal partiendo de concentraciones iniciales de proteína de 1mg/ml

El material, H3 cruda, obtenido por este método tiene que ser sometido a purificación posterior para eliminar la histona H2A, presente como contaminante. Esto se logra por cromatografía en Bio-Gel P-100 o en carboximetil-celulosa como se ha descrito anteriormente.

#### 3.3.2.2. Fraccionamiento por cromatografía en Bio-Gel P-10.

El procedimiento descrito en el apartado anterior permite recuperar la H3 de aquellas preparaciones en que se encuentra minoritaria o contaminada con H4. Sin embargo, la recuperación no es total o bien exige un procedimiento en varios pasos, lo que supone pérdida de rendimiento. Por este motivo se investigó la cromatografía en Bio-Gel P-10 de la que se tenían datos (Kecskes y col., 1976) de que resolvía a las histonas H3 y H4 de timo.

La figura 13 muestra los perfiles de elución en Bio-Gel P-10 de: A) Histonas totales de timo de ternera, B) Histonas totales de *S.cerevisiae* y C) Histonas ricas en arginina de *S.cerevisiae*. Se observa una gran semejanza de los perfiles y volúmenes de elución muy similares para los diferentes picos. Es interesante destacar en el perfil de elución de histonas totales de Levadura, la ausencia de un primer pico, correspondiente a la H1 en timo.

La figura 14 muestra la electroforésis de los 3 últimos picos de la cromatografía de histonas totales de timo; son especialmente interesantes los geles C y D que corresponden respectivamente a las histonas H3 y H4. En este sistema se resuelven perfectamente al contrario de lo que ocurría en la cromatografía en Bio-Gel P-100, figura 5, en que coelufían.

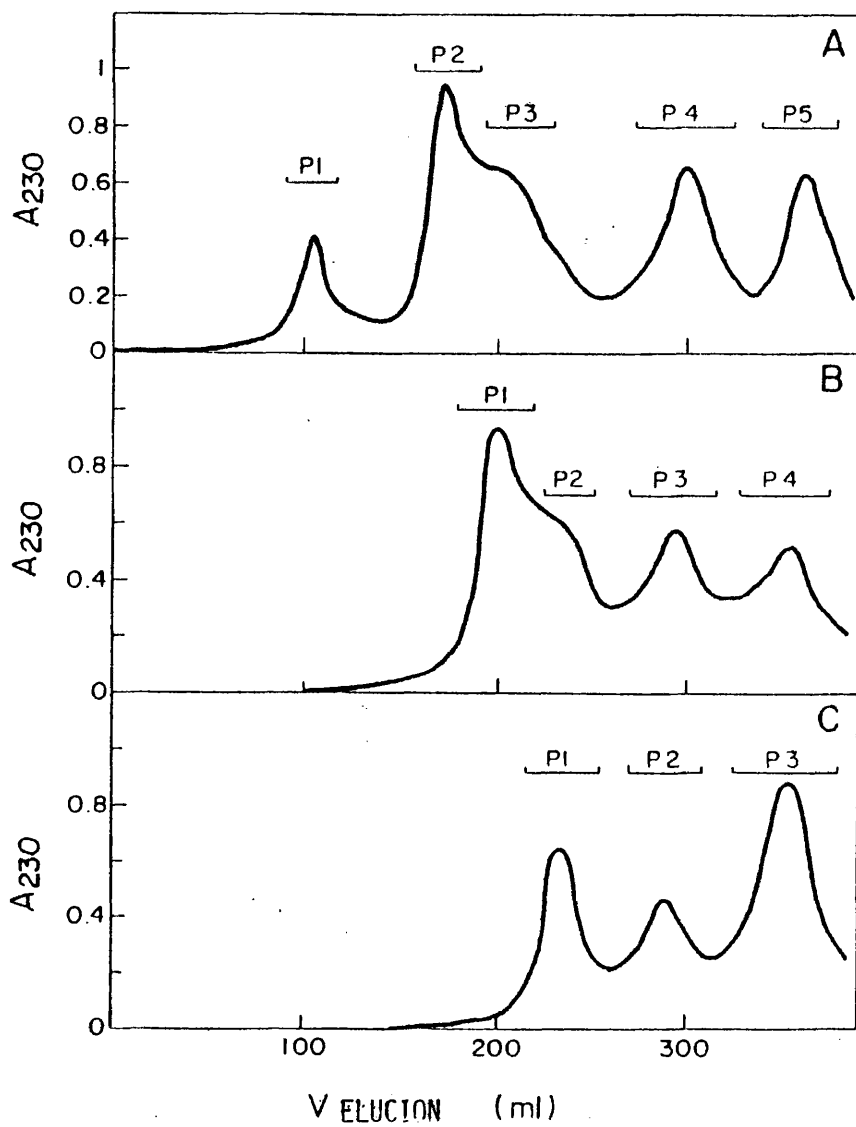


FIGURA 13.- Perfiles de elución de la cromatografía en Bio-Gel P-10 de: A) Histonas totales de timo de ternera, B) Histonas totales de *S.cerevisiae*, C) Histonas ricas en arginina de *S.cerevisiae*.

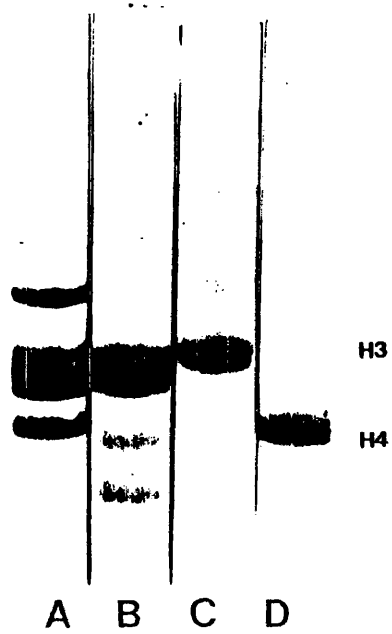


FIGURA 14.- Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

Cromatografía en Bio-Gel P-10 de Histonas totales de timo de ternera.

- A) Histonas totales de timo de ternera.
- B) 3<sup>er</sup> pico de la cromatografía en Bio-Gel P-100 de histonas totales de timo.
- C) 4<sup>a</sup> Pico (H3).
- D) 5<sup>a</sup> Pico (H4).

Un resultado, totalmente similar, se observa en la figura 15, correspondiente a la cromatografía de histonas totales de levadura en la que los geles C y D muestran la imagen electroforética de los dos últimos picos del perfil de elución que se tratan, del mismo modo, de la H3 y H4. Los dos primeros picos de la cromatografía no se resuelven y el gel B nos muestra un material formado por las histonas H2B y H2A.

Ante estos resultados se utilizó la cromatografía en Bio-Gel P-10 como ruta alternativa para la purificación de la H3 de levadura. Así la figura 16 muestra los resultados cuando el material aplicado a la columna es el obtenido con 2.5 volúmenes de acetona en la precipitación fraccionada del extracto Etanol-HCl de cromatina purificada. El gel D de la figura 16 se corresponde con el segundo pico de la cromatografía y se identifica como histona H3 ligeramente contaminada con H4.

En algunos casos la histona H3 recuperada por cromatografía en Bio-Gel P-10 se sometió a ulterior purificación por cromatografía en Bio-Gel P-100 con objeto de eliminar los restos de contaminantes.

La combinación de estos procedimientos permite disponer de un método eficaz para obtener la histona H3 de *S.cerevisiae*, con el suficiente alto grado de pureza como para poder utilizarla en la realización de los estudios estructurales y de secuencia que se describen a continuación.

#### 3.4.- Datos sobre estructura primaria

En la tabla V se muestra una previsión del número de restos de cada aminoácido presentes en la estructura primaria de la H3 de *Saccharomyces cerevisiae*. Se han calculado a partir de los datos del análisis

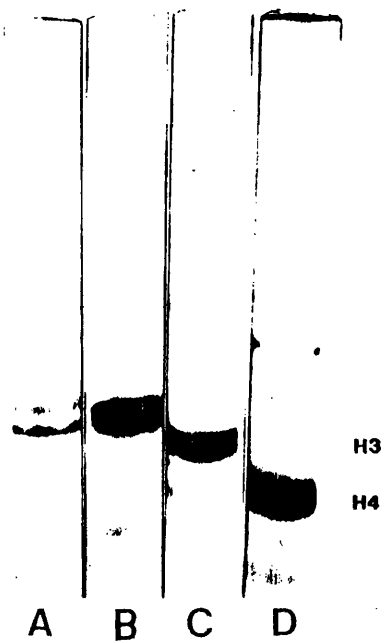
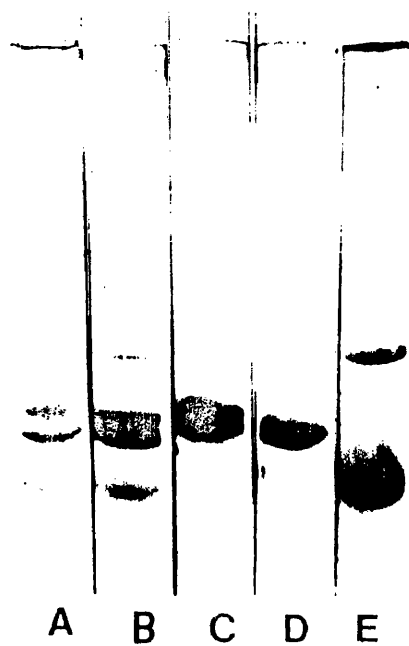


FIGURA 15.- Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

Cromatografía en Bio-Gel P-10 de histonas totales de *S.cerevisiae*.

- A) Histonas totales de levadura.
- B) 2ª Pico de la cromatografía en Bio-Gel P-10 de histonas totales de levadura (H2A + H2B).
- C) 3<sup>er</sup> Pico (H3).
- D) 4ª Pico (H4).



**FIGURA 16.-** Electroforésis en gel de poliacrilamida 15%-Urea 2.5 M.

Cromatografía en Bio-Gel P-10 de histonas ricas en arginina de *S.cerevisiae*.

- A) Histonas totales de levadura.
- B) Histonas ricas en arginina de Levadura.
- C) 1<sup>er</sup> Pico de la cromatografía en Bio-Gel P-10 de histonas ricas en arginina.
- D) 2<sup>a</sup> Pico (H3).
- E) 3<sup>er</sup> Pico (H4).

TABLA V.

PREVISION DEL NUMERO DE RESTOS DE AMINOACIDOS EN LA CADENA DE LA  
H3 DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

	<u>H3-S.c. (%)</u>	<u>H3-S.c. (n<sup>2</sup>)</u>	<u>H3 (T.t.)</u>
Asx	4,4	6	5
Thr	6,4	9	10
Ser	6,0	8	5
Glx	11,6	15	15
Pro	4,4	6	6
Gly	5,9	8	7
Ala	12,4	17	18
Cys	0	0	2
Val	4,5	6	6
Met	0	0	2
Ile	5	7	7
Leu	9,2	12	12
Tyr	2,1	3	3
Phe	3,6	5	4
His	1,5	2	2
Lys	9,9	13	13
Arg.	13,2	18	18
		(1)	(2)

(1) Material purificado en Bio-Gel P-100

(2) DeLange y col.1972.

de aminoácidos (Tabla IV). En el cálculo se ha supuesto una longitud de 135 restos de aminoácido para la cadena, basándose en la identidad de peso molecular con su homóloga de timo (Fernández, 1979).

Resulta especialmente llamativa la ausencia de cisteína y metionina en la H3 de Levadura, tanto más cuanto se había intentado dar una implicación biológica a las cisteínas de la H3. (DeBange y Smith, 1975). De los datos de la tabla V puede deducirse que existe sustitución de unos 6 restos de aminoácido que son : Cys (2), Met (2), Ala (1), y Thr (1) en timo de ternera y Ser (3), Gly (1), Asx (1) y Phe (1) en *Saccharomyces cerevisiae*. De las posibles sustituciones efectuadas durante la evolución la mayoría son conservativas y sólo quizá la desaparición de un resto de Phe podría esperarse que alterara el comportamiento funcional de la H3.

Estos datos parecen sugerir una gran similitud en las secuencias de ambas H3. Para confirmar esto se realizaron dos análisis por el método de degradación secuencial de Edman a partir del extremo N-terminal de la H3 de *S.cerevisiae*.

Se llevaron a cabo sobre 400 nmoles de la proteína intacta consiguiéndose 27 ciclos de degradación. En el primer análisis solo se consiguió llegar hasta el residuo número 18 debido al bajo rendimiento; posiblemente por la existencia de un resto de Pro en la posición 16 que rompe su enlace peptídico con mayor dificultad.

Los resultados de la degradación se muestran en la tabla VI en que también se representa la secuencia del fragmento homólogo de la H3 de timo de ternera observándose la identidad total de ambos. El rendimiento repetitivo fue del 88,1% referido a la Alanina (274 nmoles en

TABLA VI.

ESTRUCTURA PRIMARIA DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LA HISTONA H3 DE S. CEREVISIAE.

H3 S. cerevisiae

	<u>1</u>				<u>5</u>				<u>10</u>
	ALA	ARG	THR	LYS	GLN	THR	ALA	ARG	LYS
11	THR	GLY	GLY	LYS	ALA	PRO	ARG	LYS	GLN
21	ALA	THR	LYS	ALA	ALA	ARG	LYS	.....	LEU

H3 Timo Termera

	<u>1</u>				<u>5</u>				<u>10</u>
	ALA	ARG	THR	LYS	GLN	THR	ALA	ARG	LYS
11	THR	GLY	GLY	LYS	ALA	PRO	ARG	LYS	GLN
21	ALA	THR	LYS	ALA	ALA	ARG	LYS	SER	ALA
31	ALA	THR	GLY	.....	.....	.....	.....	.....	PRO

(1)

(1) DeLange y col., (1972).

el residuo número 1 y 15 nmoles en el residuo número 24).

A la vista de los resultados obtenidos se deduce la práctica identidad de la secuencia de la histona H3 en los dos materiales de trabajo utilizados. La H3 de Levadura y la H3 de timo presentan sin embargo diferencias en su comportamiento electroforético y en su extracción con disolventes orgánicos, según se ha visto anteriormente.

Todo esto justifica el interés de realizar un estudio estructural de ambas proteínas con el fin de aclarar sus semejanzas y diferencias; pues además el conocimiento estructural es la mejor vía inicial de acceso al conocimiento de la función.

### 3.5.- Estudio estructural.

Se realizó por combinación de técnicas espectrofotométricas (espectrofotometría de absorción, de diferencia y dicroísmo circular), según se ha descrito en la parte experimental. Los experimentos se realizaron simultáneamente con las histonas H3 de timo y levadura, encontrándose gran similitud de resultados. Algunos experimentos, que para su discusión necesitaban el conocimiento de la secuencia de la proteína, se realizaron únicamente con la H3 de timo de ternera; pero según se ha visto la homología de secuencias es muy grande y los resultados son perfectamente extrapolables.

El estudio se centra en las variaciones de absorbancia y dicroísmo de dos tipos de cromóforos fundamentalmente. En el ultravioleta próximo (350-260 nm) son las tirosinas, de las que existen 3 restos en la cadena de la H3, las estudiadas; el trabajo es facilitado por la ausencia de triptófano. En el ultravioleta lejano (250-195 nm) es el enlace

peptídico el principal cromóforo y su estudio nos proporciona básicamente información sobre la estructura secundaria de la proteína.

### 3.5.1. Estructuración del entorno de las tirosinas.

La figura 17 corresponde a los espectros de absorción de ambas H3 para los dos valores extremos de fuerza iónica utilizados: H<sub>2</sub>O, pH 6,6 y en KF 0,23 M, pH 6,6. El desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda más altas es compatible con un proceso de estructuración de las histonas, inducida por un aumento de fuerza iónica, que se traduce en la transferencia de residuos de tirosina hacia un entorno hidrofóbico.

Este hecho queda mucho más claro con la observación de los espectros de diferencia, obtenidos por comparación, en espectrofotómetro de doble haz, de la H3 en diversas condiciones de fuerza iónica frente a un patrón de proteína, de la misma concentración, en agua. De este modo las variaciones observadas corresponden únicamente a cambios en el entorno de las tirosinas. La figura 18 muestra que el incremento del coeficiente de extinción a 286 nm producido al pasar la proteína de agua a pH 6,6 a un medio que contiene KF 0,23 M es mayor que  $700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  valor calculado para la transferencia de un cromóforo fenólico desde un medio acuoso al interior de una proteína (Donovan, 1969). Esto ocurre tanto en timo como en levadura.

El valor de  $\Delta\epsilon_{286}$  aumenta de modo hiperbólico con la fuerza iónica en ambas histonas (Figura 18). Aunque la curva correspondiente a la histona de timo de ternera difiere de la de levadura. La representación gráfica de los datos en forma de dobles inversos ( $1/\Delta\epsilon$  frente a  $1/[KF]$ )

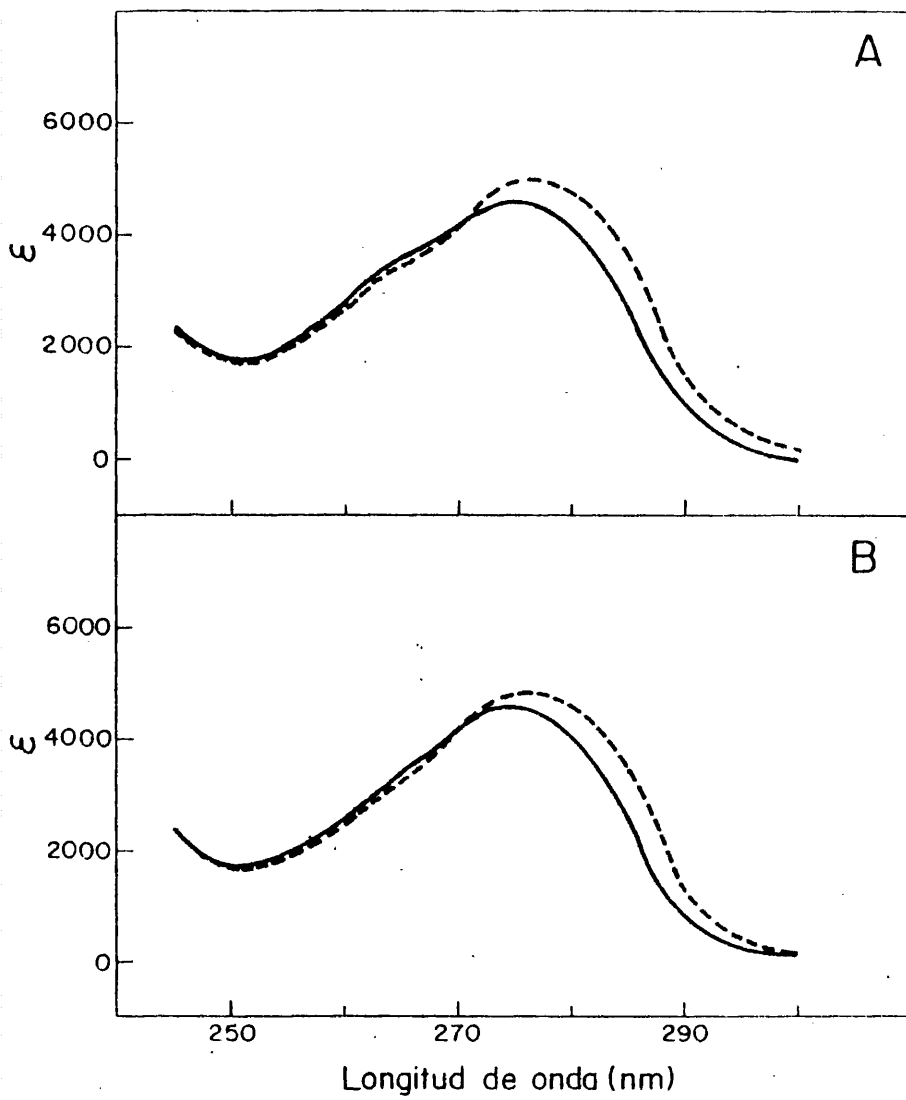
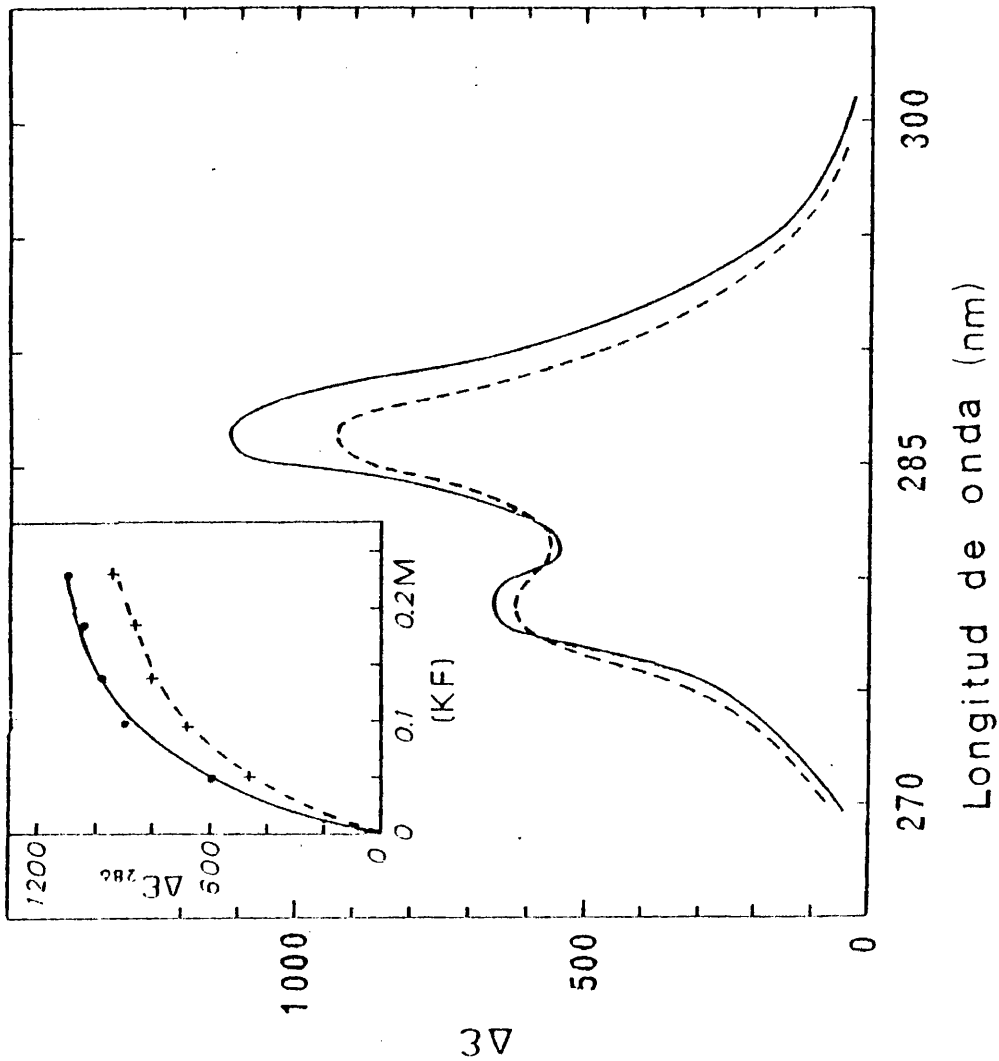


FIGURA 17.- Espectros de absorción de:  
A) Histona H3 de *S.cerevisiae* ( $3,83 \times 10^{-5} M$ ) y  
B) Histona H3 de timo de ternera ( $5,82 \times 10^{-5} M$ ).  
Realizadas en  $H_2O$ , pH 6.6 (—) y en KF 0,18 M, pH 6.6  
(----).

FIGURA 18.- Espectro de diferencia en KF  $0,23 \text{ M}$ . pH 6.6 de la histona H de *S.cerevisiae* (---,  $3,83 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) y de timo de ternera (—,  $5,82 \times 10^{-5} \text{ M}$ ). Variación del coeficiente de extinción de ambas histonas, con la fuerza iónica representada por la concentración de KF.



que se ofrece en la figura 19, pone de manifiesto que el estado de máxima estructuración para ambas histonas es idéntico en lo que se refiere a la hidrofobicidad del entorno de los residuos de tirosina. La coincidencia de las ordenadas en el origen de ambas rectas así lo atestigua. A pesar de esto la H3 de timo está más estructurada a concentraciones de KF bajas (Fig. 18). A partir de las rectas de la figura 19 se pueden calcular unas constantes de afinidad que valen:  $K = 24,6 \text{ M}^{-1}$  para timo de ternera y  $K = 11,6 \text{ M}^{-1}$  para *Saccharomyces cerevisiae*. El cálculo se realiza a partir de la intersección de las rectas con el eje de abscisas y su significado se discutirá posteriormente. A partir de la ordenada en el origen de las rectas de la figura 19, se puede determinar el valor de  $\Delta\epsilon_{286}$  máximo para ambas histonas. Este valor es de  $1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  intermedio entre el esperado para el paso de una y dos tirosinas desde un entorno polar a uno hidrofóbico. Existen varias posibilidades para la justificación de este  $\Delta\epsilon$  observado, como que: a) Una tirosina se estructura totalmente y otra solo parcialmente; b) que sean dos las tirosinas que lo hacen de un modo parcial; y c) que aún en agua una tirosina esté en un entorno parcialmente hidrofóbico y la estructuración medida sea a partir de esta situación, con las dos posibilidades a) y b) y podría llegarse así a dos tirosinas totalmente estructuradas.

Cuando una tirosina, que se encontraba inicialmente en contacto con el disolvente, pasa a encontrarse en un entorno apolar, como consecuencia de la estructuración de la proteína, no solo ocurre un desplazamiento hacia el rojo del pico de absorbancia. También es probable que aparezca una banda de dicroísmo, pues un cromóforo simétrico, como es la tirosina, adquirirá anisotropía debido al entorno asimétrico en

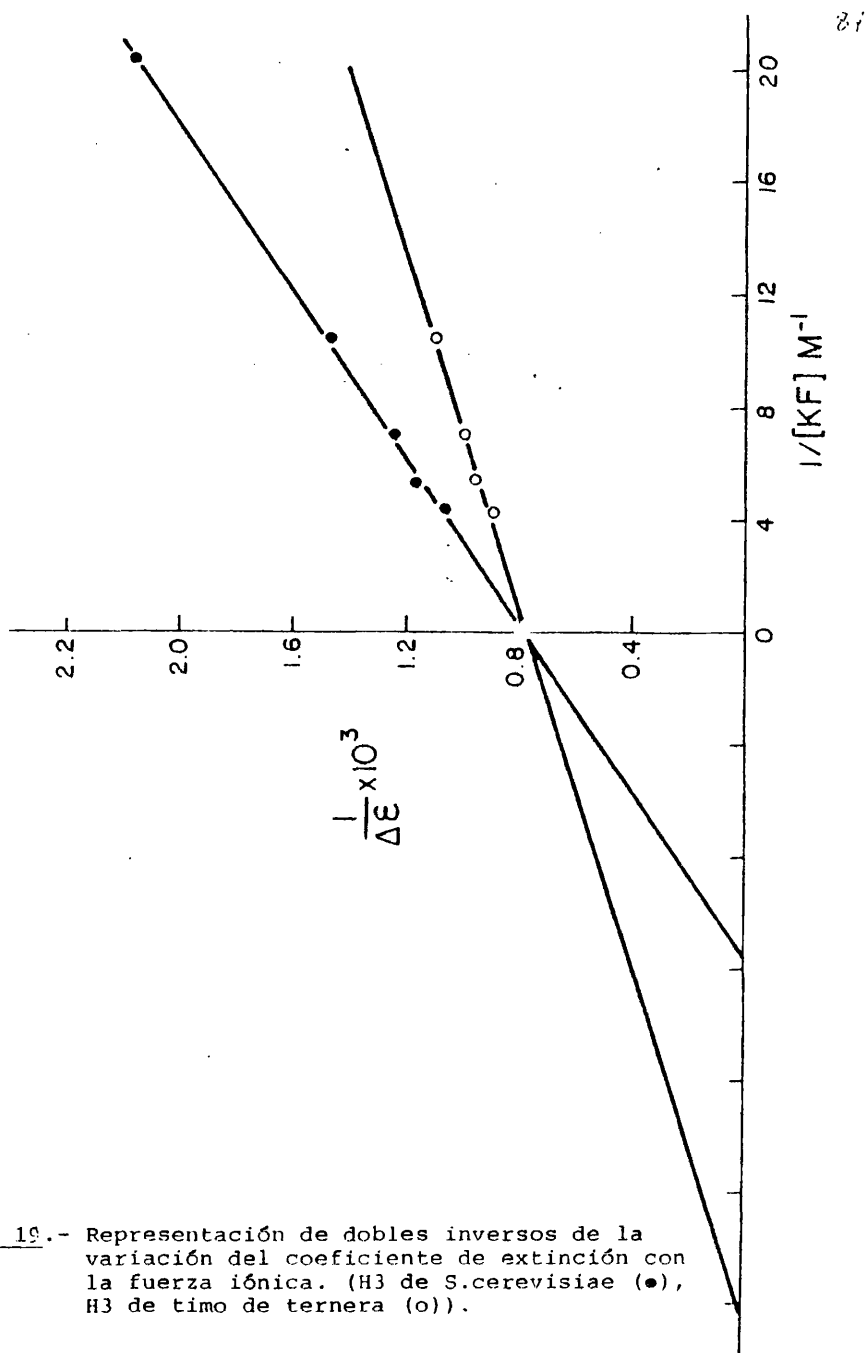


FIGURA 19.- Representación de dobles inversos de la variación del coeficiente de extinción con la fuerza iónica. (H3 de *S.cerevisiae* (●), H3 de timo de ternera (○)).

que se encuentra. La figura 20 muestra efectivamente, los espectros de dicroísmo circular, en la zona del ultravioleta próximo, inducidos por la adición de sal al medio. Se observa en la figura que ya existe una cierta anisotropía, tanto en tимо con en levadura, cuando la proteína se disuelve en H<sub>2</sub>O a pH 3,5, lo cual estaría de acuerdo con la 3<sup>a</sup> hipótesis antes citada. En las condiciones más estructurantes, KF 0,21 M, la elipticidad alcanzada, para una longitud de onda 270-275 nm (pico de absorción de tirosina), tiene un valor aproximado de 2000 grados x cm<sup>2</sup>/dmol prot., tanto para tимо como para levadura, que corresponde a la estructuración de una única tirosina (Sears y Beychock, 1973), resultado bastante coherente con el obtenido a partir de los espectros de diferencia. Al igual que ocurría con la variación del coeficiente de absorción, la variación de elipticidad con la fuerza iónica también sigue una cinética hiperbólica, según se muestra en la figura 20, observándose también que con los valores de fuerza iónica alcanzados, ya se ha conseguido la estabilización de la gráfica.

### 3.5.2.- Valoración de las tirosinas.

La variación de absorbancia o elipticidad de un cromóforo simétrico como la tirosina es debida fundamentalmente a la influencia de las cadenas de aminoácidos que se encuentren espacialmente próximas como consecuencia de la estructuración de la proteína. Es de esperar, según esto, que la estructuración esté asociada con una mayor o menor accesibilidad al medio del grupo funcional de la tirosina.

Esto sugiere la posibilidad de investigar la estructuración de la proteína estudiando la accesibilidad de las Tirosinas al medio median-

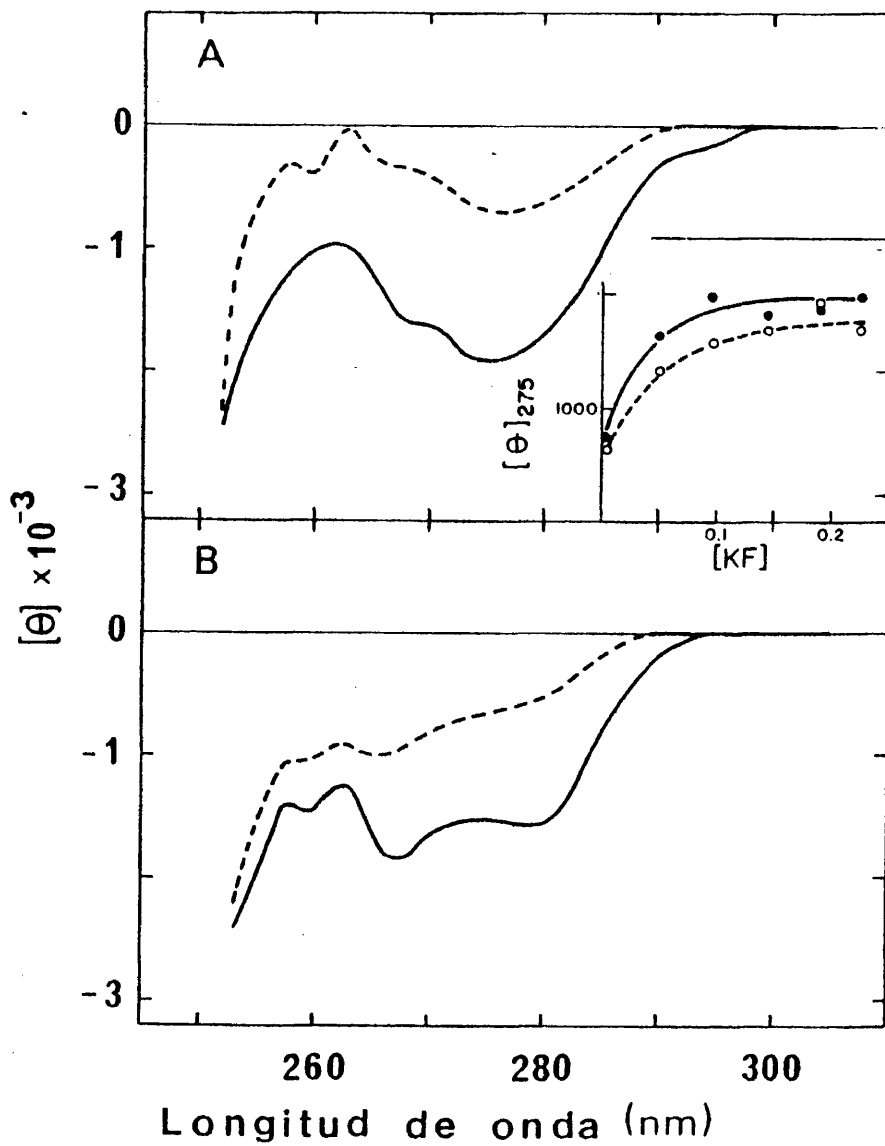


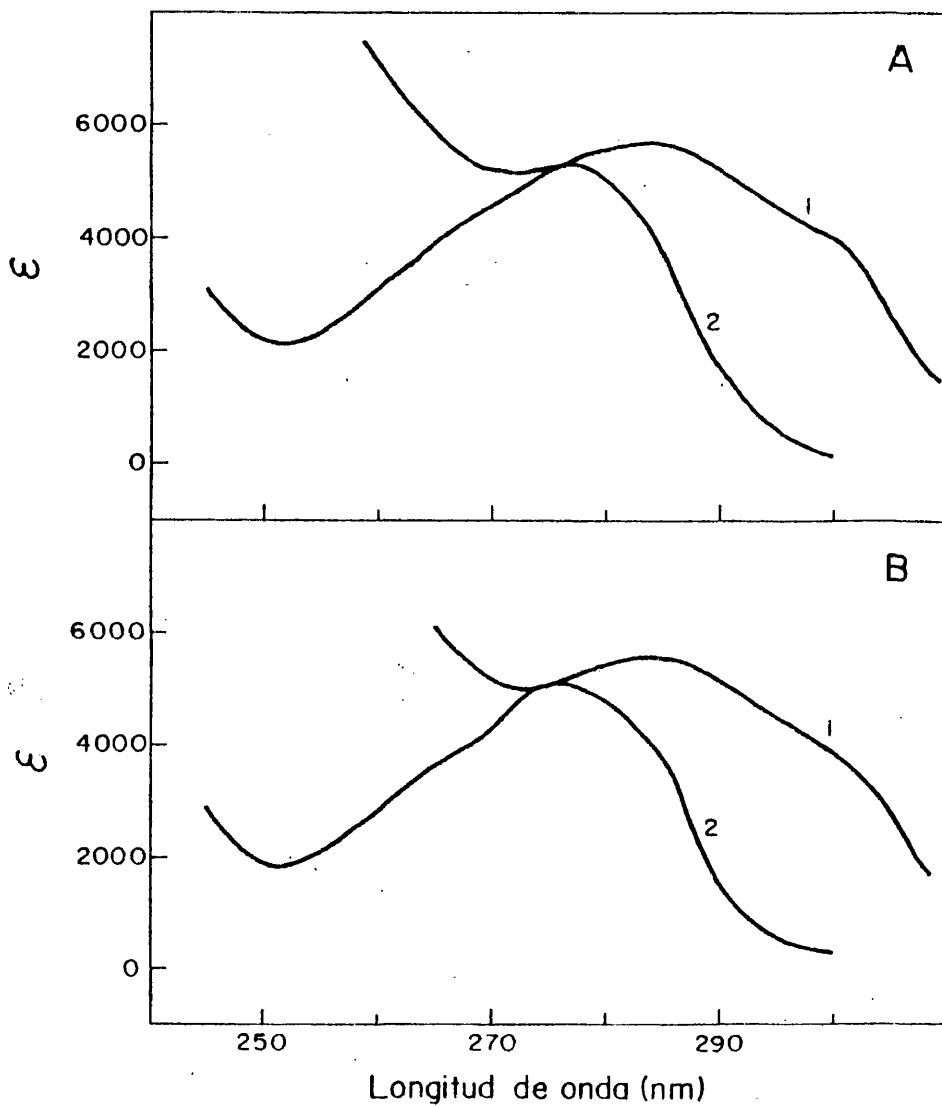
FIGURA 20.- Espectros de dicroísmo circular, en la zona de ultravioleta próximo (250-300 nm) de: A) H3 de *S. cerevisiae* ( $3.83 \times 10^{-5} M$ ) y B) H3 de timo de ternera ( $5.82 \times 10^{-5} M$ ). Realizados en agua a pH 3.5 (---) y en KF 0,21 M pH 6 (—). Variación de la elipticidad molar en  $^{\circ} \cdot \text{cm} / \text{dmol}$  en función de la fuerza iónica.

te la variación del pH, en condiciones en las cuales la proteína se encuentra totalmente estructurada. Esto se consigue para valores 0,2 M de KF en el medio según se comprueba en las figuras 18 y 20.

En la figura 21 se muestran los espectros de absorbancia de H3 de t<sub>1</sub>mo y H3 de levadura en KF 0,2 M; uno para pH aproximadamente neutro y el otro próximo a 11. No puede alcanzarse un pH superior a 12, en ningún caso, porque se produce la precipitación de ambas H3, posiblemente coincidiendo con la pérdida de carga de las argininas presentes en la molécula. Se observa en la figura un gran desplazamiento del espectro que corresponde a la aparición de los picos de absorción de tirosinato, pero es mucho más clara la representación de los espectros de diferencia.

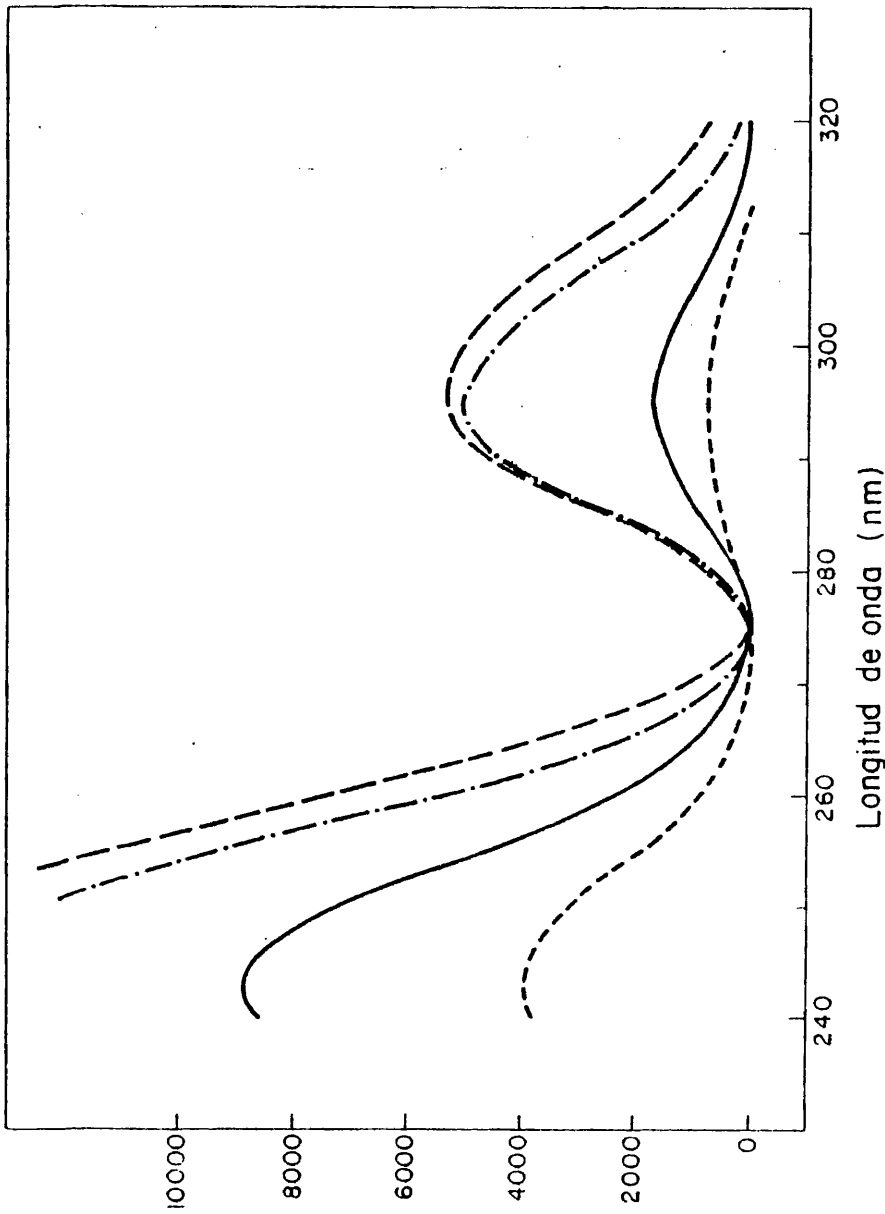
En la figura 22 se representan los espectros de diferencia a pH 9,5, que es el primer valor de pH en que se observa la presencia de tirosinato, y el correspondiente al máximo pH alcanzado. Los picos a 245 nm y 295 nm corresponden a las transiciones <sup>1</sup>La y <sup>1</sup>Lb del tirosinato, siendo el  $\Delta\epsilon_{295}$  medido de  $5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; que corresponde a 2 restos de tirosina que se hubiesen ionizado por molécula. El  $\Delta\epsilon_{295}$  para la transición de  $1\text{Tyr}$  a  $\text{Tyr}^-$  es de  $2500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Donovan, 1969 b).

Este resultado es totalmente similar para ambas H3, siendo pues, 2, las tirosinas que permanecen accesibles al medio cuando la proteína se encuentra estructurada. Estas 2 tirosinas no deben ser igualmente accesibles, sí, como hemos supuesto, no se encuentran en un entorno similarmente estructurado. Se observa efectivamente esta diferencia en la representación de  $A_{295}$  frente al pH, figura 23, que supone una típica curva de valoración de tirosina. A partir de la gráfica es posible



**FIGURA 21.** - Espectros de absorción, en función del pH, de: A) H3 de *S. cerevisiae* ( $3.26 \times 10^{-5} \text{M}$ ) y B) H3 de timo de ternera ( $4.98 \times 10^{-5} \text{M}$ ). Realizados en KF 0,21 M; (1) pH 6.8, (2) pH 10.75.

FIGURA 22.- Espectros de diferencia, en función del pH, realizados en KF 0,21 M. Histona H3 de *S.cerevisiae*; pH 9,5 (---) y pH 11,3 (-·-·-·-·-). Histona H3 de timo de ternera; pH 9,7 (—) y pH 11,7 (— — —).



calcular, en el caso de Levadura, los valores del pK de la transición siendo de 9,6 y 10,9 para las dos tirosinas que se llegan a valorar antes de que la proteína precipite. La 3<sup>a</sup> tirosina, que no se valora, sería así la que anteriormente hemos visto que debe de encontrarse en un entorno totalmente apolar en KF 0,2 M.

Respecto a las 2 tirosinas, que sí se valoran, una estaría parcialmente estructurada en esas condiciones y presenta un pK relativamente alto, 10,9, por estar en un entorno parcialmente apolar. La otra se encontraría no estructurada y relativamente accesible al medio, conservando su valor normal de pK.

Es posible confirmar estos resultados analizando el dicroísmo circular en las longitudes de onda en que absorben tirosina y tirosinato. En las figuras 24 y 25 se representan los espectros de dicroísmo circular, para ambas H3, a tres valores distintos de pH. Es interesante que tanto en tino como en levadura el valor de la elipticidad a 270 nm, que corresponde al máximo de absorción de Tirosina, no sufre variación con el aumento de pH, lo cual es lógico si suponemos que es debido a la Tirosina que se encuentra en un entorno totalmente estructurado en KF 0,2 M (figura 20) y que debe ser, por tanto, la que no se valoró. Si se aprecia, en cambio, a 250 nm y 290 nm un aumento, positivo en el 1<sup>er</sup> caso y negativo en el 2<sup>a</sup>, de la fuerza rotacional que está asociada a los dos máximos de absorción del tirosinato, que o bien sufre un cambio de entorno asociado a la valoración o ya es intrínsecamente anisótropo en su entorno.

Los datos obtenidos hasta el momento nos conforman una imagen estructural muy similar para ambas H3, pero centrada en la situación y

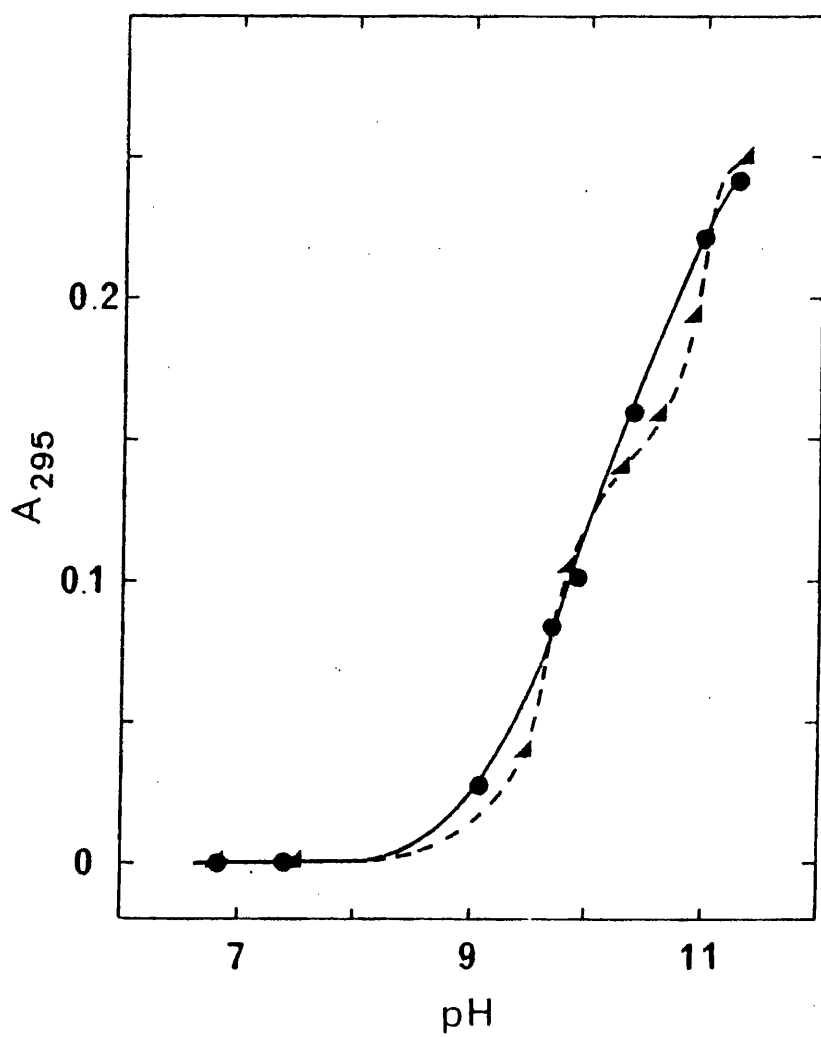


FIGURA 23.- Absorbancia a 295 nm en función del pH de las histonas H3 de *S.cerevisiae* ( $3.26 \times 10^{-5}$  M, ----) y H3 de timo de ternera ( $4.98 \times 10^{-5}$  M, —). Curva de valoración de tirosinas.

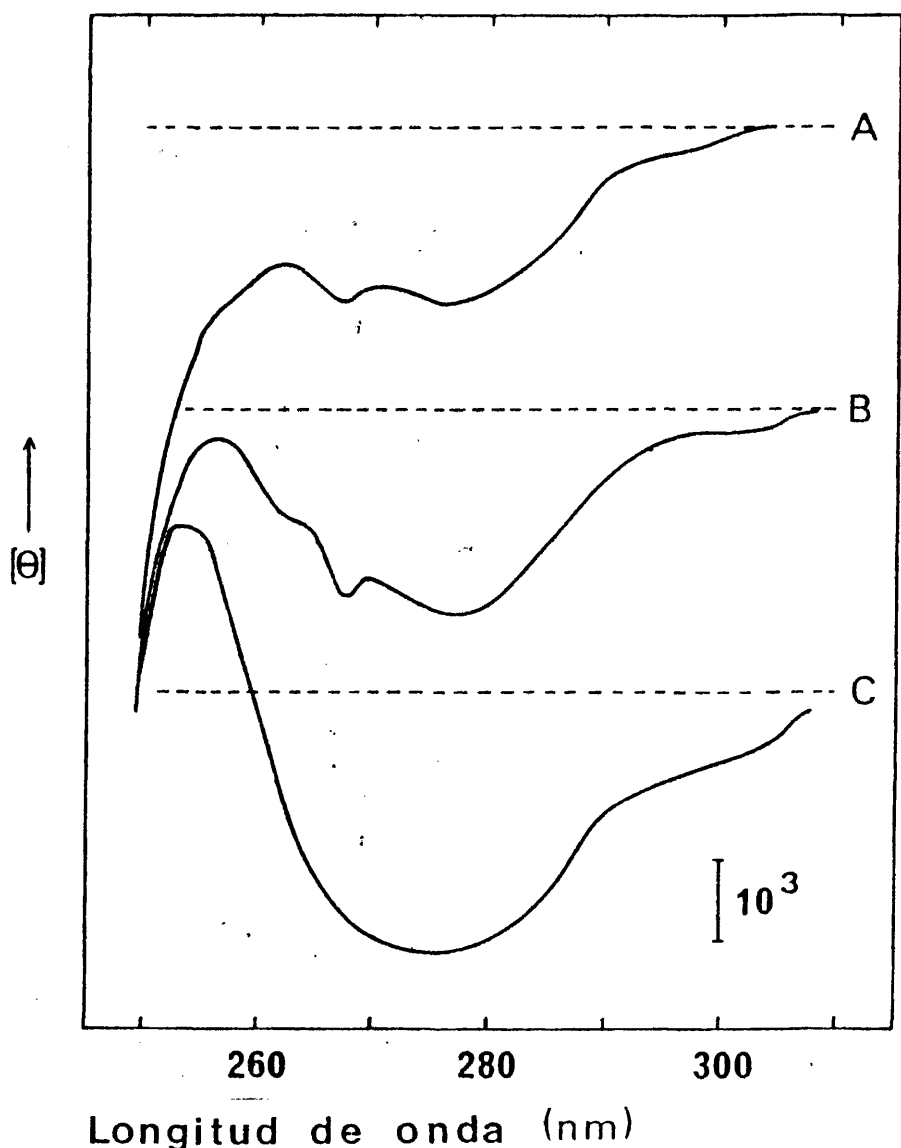


FIGURA 24.- Curvas de dicroísmo circular, en el ultravioleta próximo, de la histona H3 de *S.cerevisiae* ( $3.47 \times 10^{-5}M$ ) en KF 0.2M. A) a pH 6,6, B) a pH 10, C) a pH 10.9.

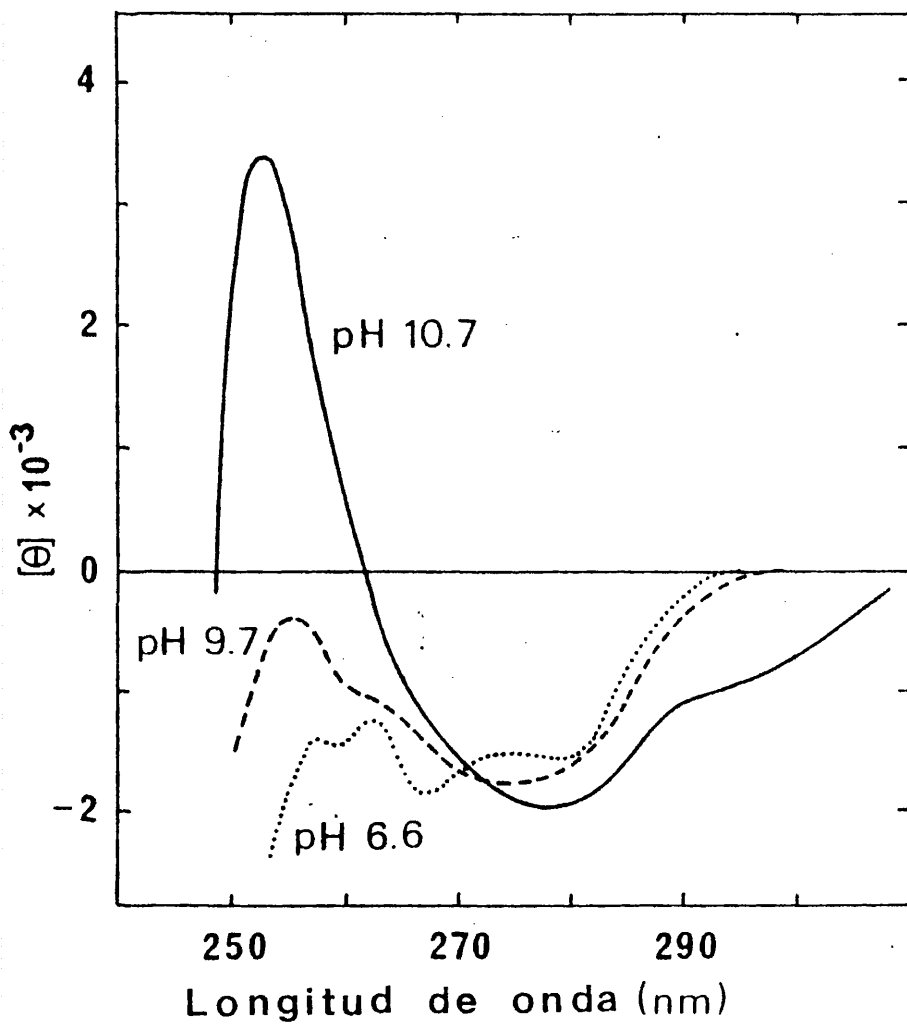


FIGURA 25.- Curvas de dicroísmo circular, en el ultravioleta próximo histona H3 de timo de ternera ( $5,37 \times 10^{-5}$  M) en KF 0,2 M y en función del pH.

cambios conformacionales del entorno de las 3 tirosinas, existentes en cada molécula, que son los cromóforos que absorben en la región del ultravioleta próximo. Se puede conseguir una información complementaria a esta por análisis espectrofotométrico de la H3 en la región del ultravioleta lejano, que proporciona datos referentes a la estructuración global de la proteína; siendo el enlace peptídico el cromóforo que absorbe en esta región del espectro.

### 3.5.3.- Estructuración global con la fuerza iónica.

En las figuras 26 y 27 están representados los espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de las H3 de levadura y timo, respectivamente. Corresponden a la proteína en agua pH 3.5 y en KF 0,21 M pH 6, condiciones para las cuales la H3 se encuentra en su estado de mínima y máxima estructuración respectivamente. Los valores de las contribuciones de  $\alpha$ -hélice, hoja- $\beta$  y cadena estadística a la estructura, calculados según el método de Greenfield y Fasman (1969) están representados en la tabla VII.

TABLA VII.- Tantos por ciento de cada tipo de estructura.

	<u>H3 S.c.</u>		<u>H3 T.t.</u>	
	(1)	(2)	(1)	(2)
$\alpha$ -hélice	18	31	13	24
hoja- $\beta$	0	0	2	4
Cadena estadística	82	69	85	72

(1) H<sub>2</sub>O, pH 3.5

(2) KF 0,2 M, pH 6

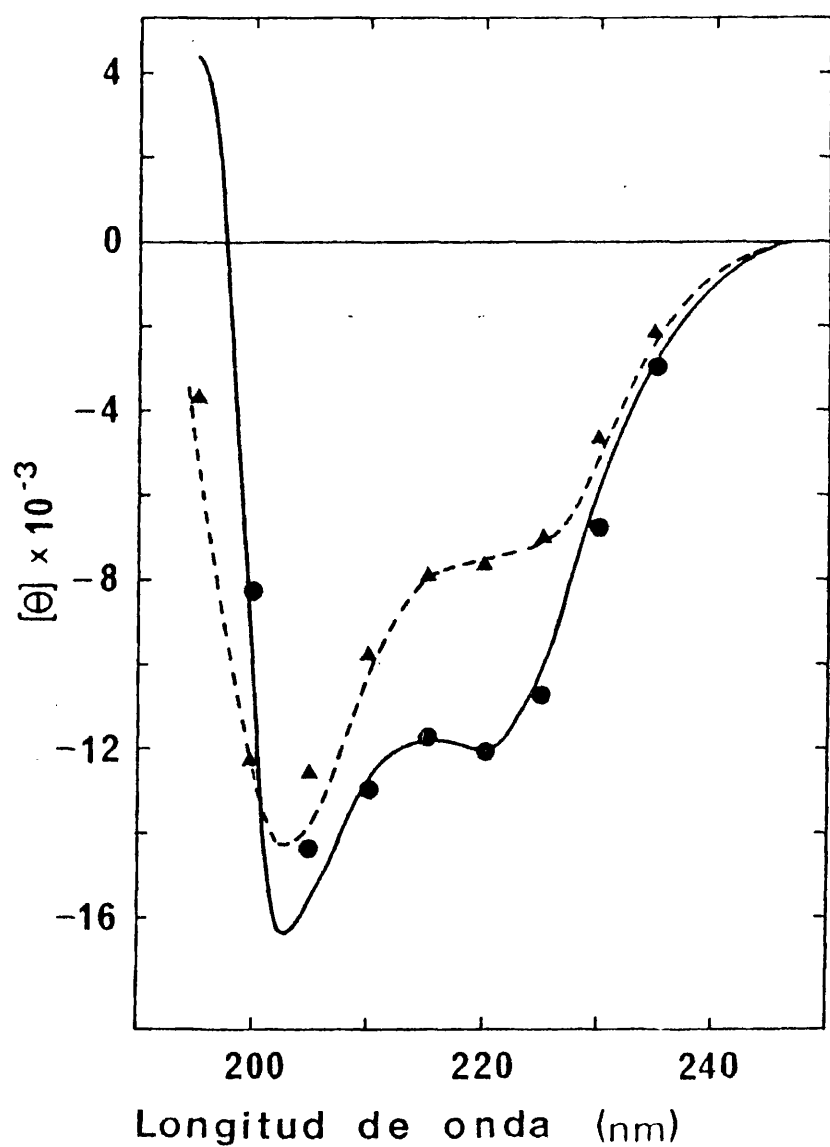


FIGURA 26.- Curvas de dicroísmo circular, en el ultravioleta lejano (195-250 nm) de la histona H3 de *S.cerevisiae* ( $3.83 \times 10^{-5}M$ ). Realizadas en: agua a pH 3.5 (----) y en KF 0,21 M pH 6 (—). Los puntos representados corresponden al ajuste óptimo realizado según el método de Greenfield y Fasman.

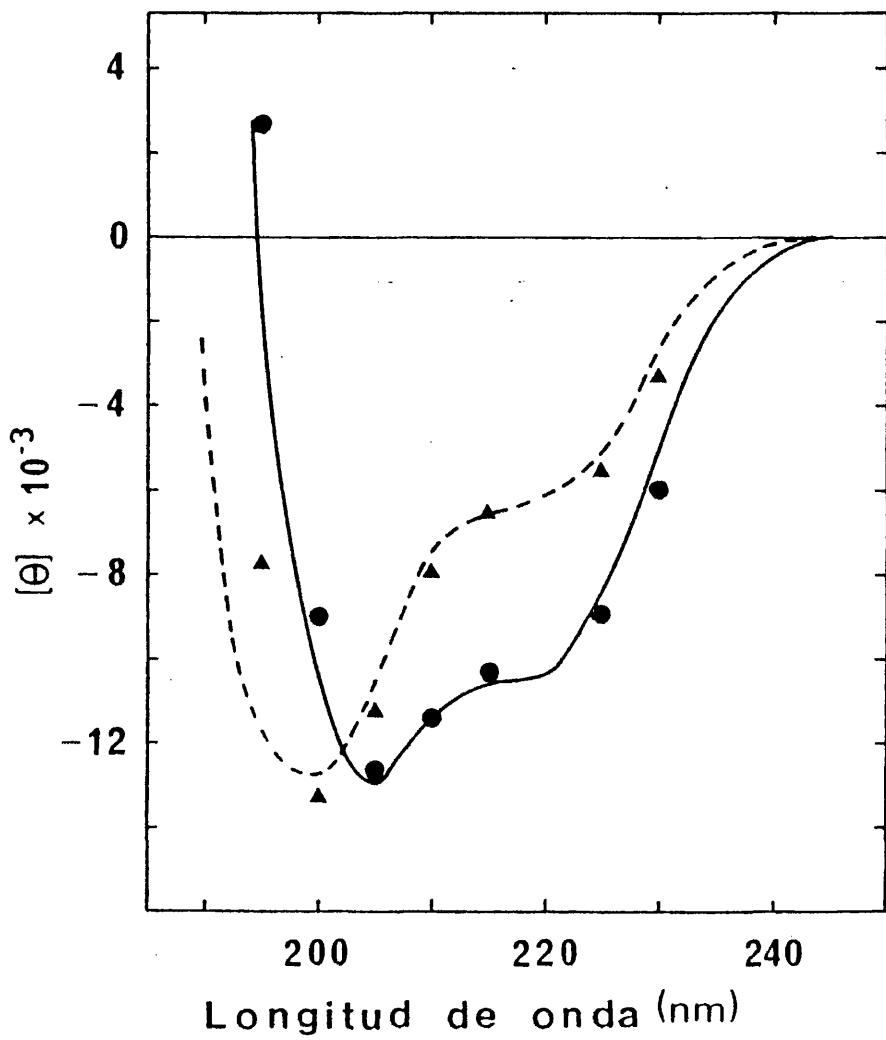


FIGURA 27.- Curvas de dicroísmo circular, en el ultravioleta lejano (195-250 nm), de la histona H3 de Timo de ternera ( $5.82 \times 10^{-5}$  M). Realizadas en agua a pH 3,5 (----) y en KF 0,21 M pH 6 (—).

Los valores de estructuración alcanzados son similares para ambas H3, sobre todo si tenemos en cuenta la proporción de cadena estadística remanente. Un 30% de los restos de aminoácido, en ambas H3, han adquirido estructura en las condiciones del experimento. La hoja- $\beta$  se encuentra normalmente asociada con fenómenos de agregación molecular y esto puede explicar la pequeña diferencia existente entre ambas proteínas pues la agregación dependerá de la concentración de proteína a que se haya realizado el experimento.

Es interesante destacar el alto grado de estructuración (15-18%) que presenta la H3, en condiciones tan desfavorables como agua destilada a pH 3.5. Esto podría estar relacionado con la fuerte asimetría estructural de las histonas, en las que la zona C-terminal de la molécula presenta la mayoría de los residuos hidrofóbicos y es de esperar que se encuentre estructurada en condiciones incluso muy desfavorables, no siendo necesario el apantallamiento previo de las cargas existentes en la cadena por la acción de la fuerza iónica del medio. También es compatible este resultado con las hipótesis que se planteaban sobre la estructuración de las tirosinas.

El aumento de elipticidad, con la fuerza iónica, a 220 nm es de tipo hiperbólico según se aprecia en la figura 28-A. La  $[\theta]_{220}$  es función de la estructura alcanzada por la proteína y la gráfica resulta ser de forma similar a la que se obtenía para las tirosinas (Fig. 18). No es posible en este caso la representación de dobles inversos, con el fin de calcular una constante de afinidad. Esto es debido al elevado ruido que presenta la medida de la elipticidad a estas longitudes de onda; siendo los resultados representados gráficamente, mucho menos

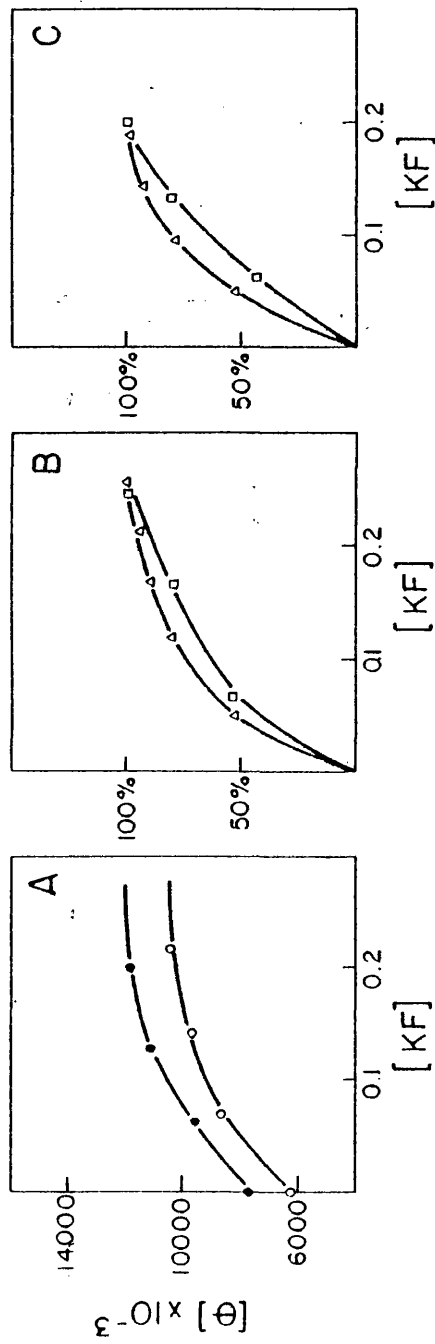


FIGURA 28.- (A) Variación de elipticidad molar a 220 nm con la fuerza iónica (●, levadura; ○, timo) (B) Tanto por ciento de estructuración de la H3 de timo de ternera en función de la fuerza iónica ( $\Delta$ , A<sub>286</sub>;  $\square$ ,  $\theta$  220). C) Tanto por ciento de estructuración en función de la fuerza iónica de  $\bar{H}_3$  de *S.cerevisiae*.

precisos que en el caso de medir incrementos en el coeficiente de extinción.

Dada la similitud de ambas gráficas es interesante comparar ahora, aunque solo sea de un modo semicuantitativo, los valores de fuerza iónica que son necesarios para conseguir la estructuración. En la figura 28 B y C se han representado, a distintos valores de fuerza iónica, los porcentajes de estructuración con respecto a la máxima estructuración adquirida por la proteína. Para esto se han elegido los valores de  $\theta_{220}$  para la estructuración global de la proteína y los de  $\Delta\epsilon_{286}$  para la reordenación del entorno proteico de las tirosinas.

De la figura se deduce que, tanto en levadura como en timo, se estructura con mayor facilidad, menor fuerza iónica, el entorno de las tirosinas, responsable del  $\Delta\epsilon_{286}$ , que el conjunto de la proteína, representado por la aparición de elipticidad a 220 nm. Así, por ejemplo, en el caso de la H3 de levadura para una concentración de KF 0,05 M ya se ha conseguido un 50% del  $\Delta\epsilon_{286}$  máximo esperable, siendo necesaria en cambio una concentración de KF 0,075 M para el mismo incremento de  $\theta_{220}$ . Este hecho parece sugerir que la proteína no se reestructura en un único paso y que distintas partes de su cadena lo harán con distinta facilidad.

#### 3.5.4.- Cinética de la estructuración.

Para justificar la distinta estructuración reseñada en la figura 28 caben distintas posibilidades, y es interesante para analizar mejor este hecho estudiar la cinética de la transformación que ocurre al poner la proteína en condiciones estructurantes. Es posible que el cambio conformacional ocurra según un modelo "todo o nada" para el conjun

to de la proteína o bien que no todas las zonas de la proteína se estructuren con la misma velocidad.

Cuando la histona H3 se pone en condiciones estructurantes (KF 0,2 M) ocurren, según se analizó en la introducción, dos tipos de fenómenos: un cambio rápido, prácticamente instantáneo y que solo es posible medir por extrapolación a tiempo cero y un cambio lento, que se supone asociado con la aparición de estructura  $\beta$  (Li y col., 1972) y que tarda un tiempo mas o menos largo en completarse. Estas transiciones han sido ya descritas para la H3 de timo de ternera por influencia de diversas concentraciones de fosfato (D'Anna y Isenberg, 1974).

En el experimento, que a continuación se describe, se utilizó la H3 de timo, en la que se había detectado la presencia de estructura  $\beta$  (Tabla VII) y se siguió la estructuración mediante la medida de  $\Delta\epsilon_{286}$  y  $[\theta]_{220}$ . Las medidas se llevaron a cabo hasta llegar a una estabilización del valor alcanzado, y los resultados se muestran en la tabla VIII y figura 29 en que se observa que la transformación se ha completado a 100 y 180 minutos respectivamente; alcanzando la magnitud del cambio valores similares a las medidas en los experimentos representados en las figuras 18 y 26, donde la estructuración conseguida es suma de la correspondiente a los cambios lento y rápido.

Los datos de la cinética, tabla VIII, son susceptibles de tratamiento matemático para linearizarlos y a partir de aquí obtener el valor de una constante de tiempo (Li, 1978) según la ecuación:

$$\frac{\Delta X(t_{\infty}, \lambda) - \Delta X(t, \lambda)}{\Delta X(t_{\infty}, \lambda) - \Delta X(t_0, \lambda)} = e^{-t/\tau}$$

TABLA VIII

CINETICA DE LA ESTRUCTURACION DE LA H3 CON LA FUERZA IONICA. CALCULO DE LAS CONSTANTES

DE TIEMPO.

t (min)	$\theta_{220}$ (1)	$\lg(\frac{[\theta]_{220} - [\theta]_{t, 220}}{[\theta]_{220} - [\theta]_{t, 220}})$	t (min)	$\Delta E_{286}$ (2)	$\lg(\frac{\Delta E_{286} - \Delta E_{t, 2}}{\Delta E_{286} - \Delta E_{t, 2}})$
10	7162 (-)	2.50	10	424	2.92
20	7199	2.44	20	534	2.86
30	7211	2.42	30	656	2.78
40	7223	2.40	35	686	2.76
50	7229	2.39	72	1090	2.25
60	7247	2.36	80	1160	
70	7280		90	1240	
80	7320		95	1270	
90	7338		120	1260	
100	7370				
110	7388				
120	7393				
130	7410				
150	7454				
160	7450				
170	7455				
180	7450				
190	7445				

Tg  $\alpha = -0,0028$

$\zeta = 155$  min

Tg  $\alpha = -0,008$

$\zeta = 54$  min.

104

(1) grados x  $\text{cm}^2/\text{dmol}$  residuo

(2)  $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

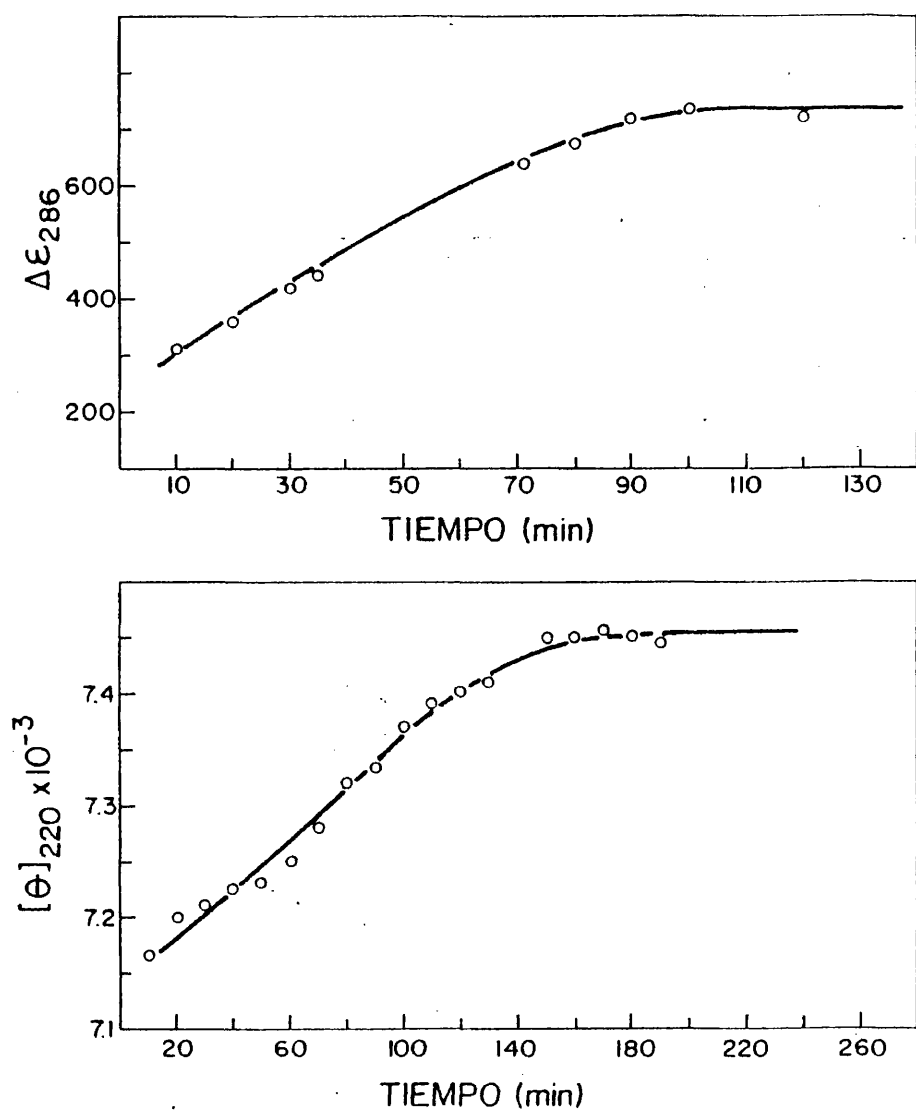


FIGURA 29.- Cinética de la estructuración de la Histona H3 de timo de ternera ( $3.9 \times 10^{-5}$  M) en KF 0,21 M pH 6.6.

en donde  $\Delta X$  representa el aumento de la magnitud óptica estudiada ( $\Delta \epsilon_{286}$  ó  $[\theta]_{220}$ ) y  $\tau$ , constante de tiempo del proceso, tiene el significado físico del tiempo necesario para conseguir un 63% de forma estructurada. Esta constante de tiempo puede relacionarse con una constante cinética aparente según la ecuación:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{2} (K_{app}) \text{ siendo}$$

$K_{app} = 4 K_{23} K_1 (H_0)$  y donde se ha supuesto el siguiente modelo: Las proteínas, que se encuentran parcialmente estructuradas, sufren una transición rápida, al adicionar sal, en que se estructuran de un modo asociado a una dimerización. A continuación se produce una transición mucho más lenta en que se forma estructura  $\beta$  entre los dos componentes del dímero.  $K_1$  es la constante de equilibrio para el cambio rápido,  $K_{23}$  la constante cinética del cambio lento y  $H_0$  la concentración de proteína.

La figura 30 corresponde a la representación logarítmica de la ecuación anterior y, a tiempos cortos, se obtienen unas rectas de las cuales a partir del valor de la pendiente se obtiene una constante de tiempo  $\tau$  para la organización de las tirosinas de 54 minutos y de 155 minutos para la organización global de la proteína. Es evidente la diferencia entre ambos tiempos de organización, lo cual nos descarta que la transición del cambio lento corresponda a un modelo todo o nada, sino que los distintos dominios de la proteína se estructuran progresivamente, lo cual está en perfecta consonancia con el resultado antes descrito (Figura 28 B y C) de que no son necesarios los mismos valores de fuerza iónica para ambas transiciones. Del mismo modo puede deducirse que las transiciones, que presentan en todo caso una

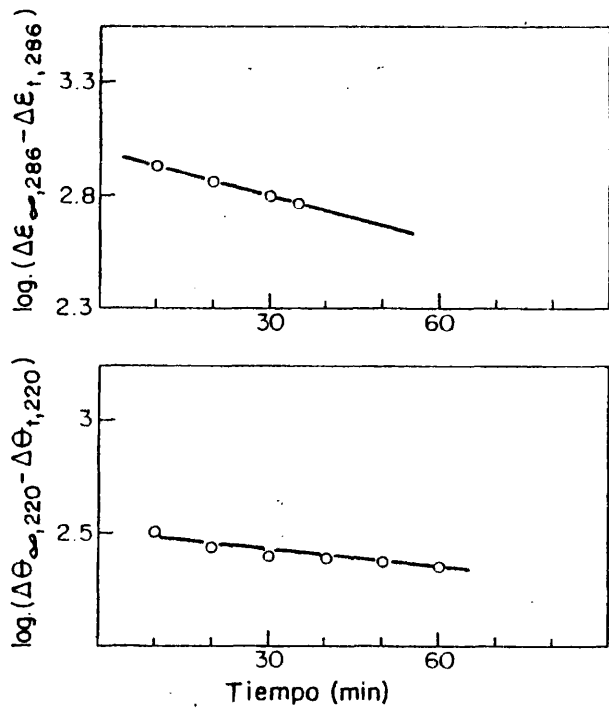


FIGURA 30.- Linearización de la cinética de la estructuración. Histona H3 de timo de ternera. Cálculo de las constantes de tiempo.

cinética hiperbólica, no se realizan de un modo cooperativo ya que la estructuración no parece tener lugar según un proceso "todo o nada".

#### 3.5.5.- Estructuración global con el pH.

Otro aspecto importante para comprender la función de la histona H3 es, desde el punto de vista de su comportamiento estructural, el conocimiento de la influencia que el pH del medio puede tener en la estructura adquirida por la proteína.

Anteriormente se han descrito experimentos en los que se variaba el pH del medio, pero siempre eran realizados de forma que la proteína se encuentre en condiciones estructurantes, por la presencia de concentraciones suficientes, 0,2 M, de KF en el medio. De esta forma se realizaba la valoración de los grupos ionizables que, en la proteína estructurada, quedaban accesibles al medio.

En el experimento que se describe a continuación, realizado con H3 de timo, a la proteína disuelta en agua se le añaden cantidades crecientes de NaOH de forma que se incremente el pH del medio sin hacerlo apreciablemente la fuerza iónica. El cambio conformacional conseguido se siguió por dicroísmo circular en el ultravioleta lejano de forma que los enlaces peptídicos, que forman parte de una porción de proteína estructurada, sean los responsables de la elipticidad medida.

Las curvas obtenidas se analizaron por el procedimiento de Greenfield y Fasman (1969) y los resultados se muestran en las figuras 31 y 32 en las que es patente la existencia de una transición estructural. El dicroísmo circular no puede demostrar inequívocamente la existencia de estructura  $\beta$  pero es de destacar que únicamente suponiendo la exis-

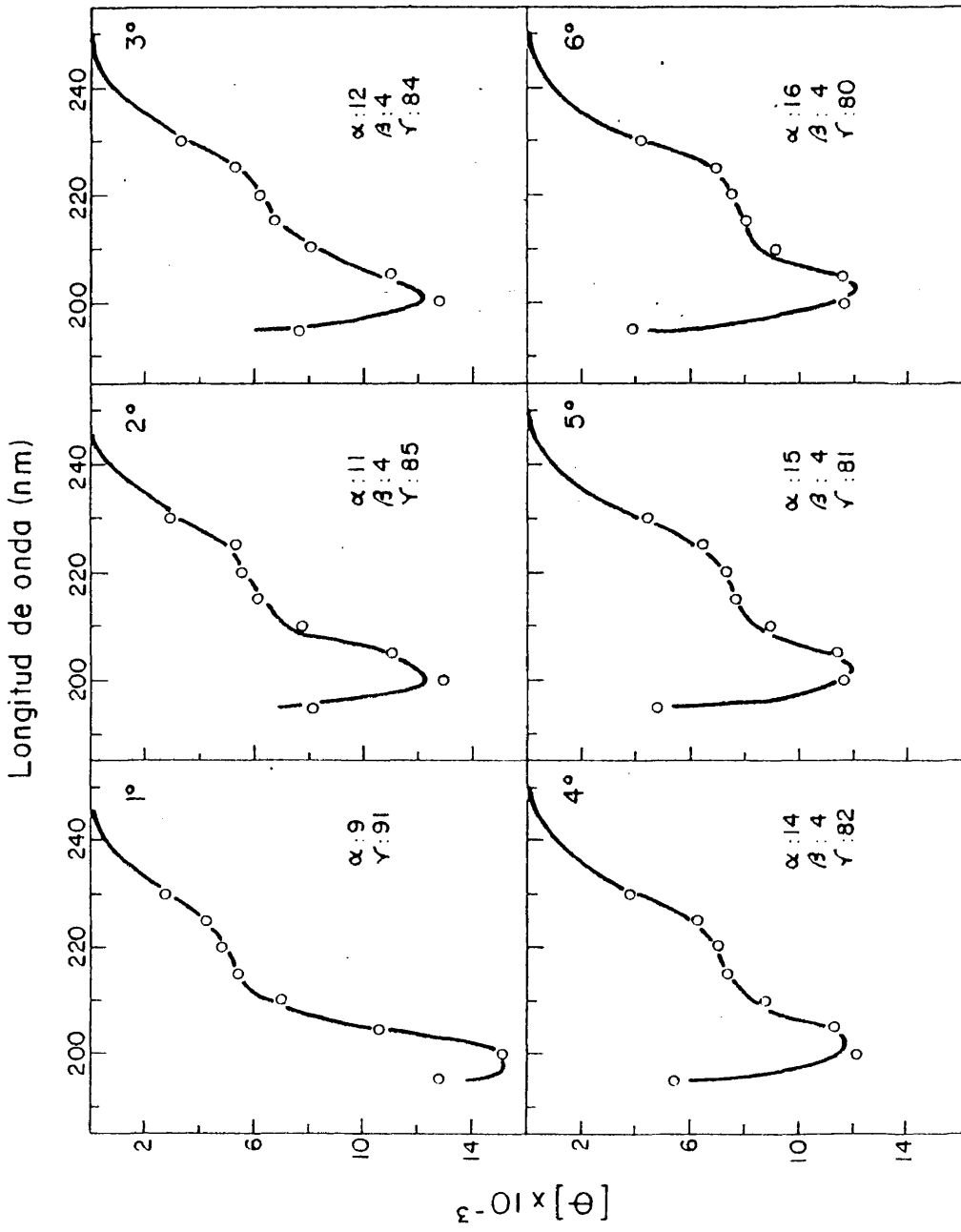


FIGURA 31.-

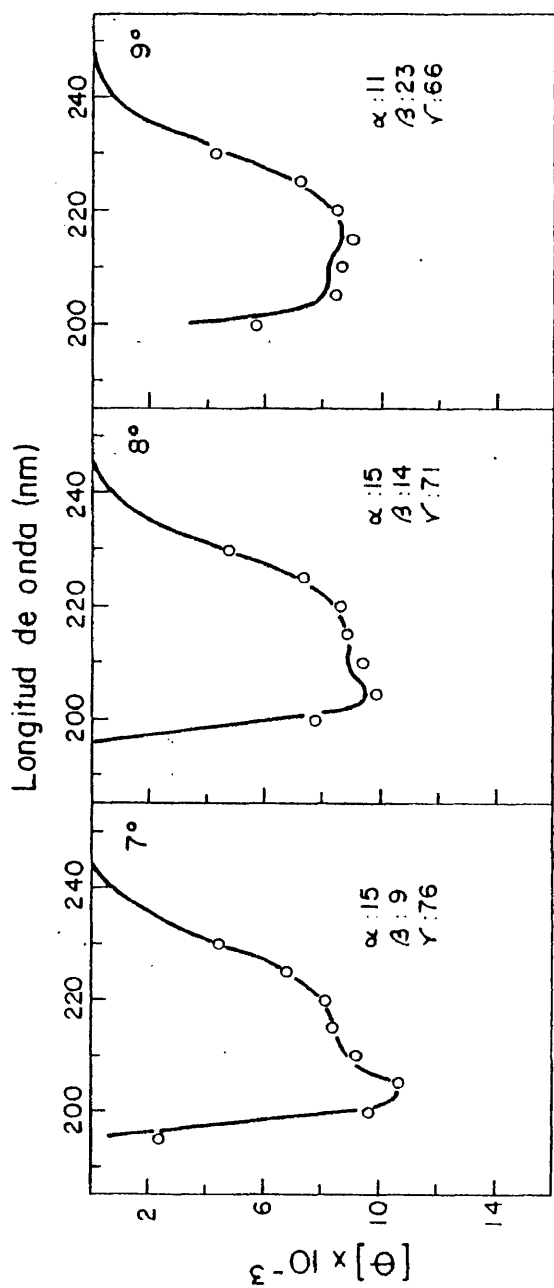


FIGURA 32.- Curvas de dicroísmo circular, en el ultravioleta lejano, de la histona H3 de timo de ternera ( $1.6 \times 10^{-5}$  M) en función del pH. Realizadas a los siguientes valores de pH.  
 (1) 2.8, (2) 6.2, (3) 8.3, (4) 8.6, (5) 8.9, (6) 9.3, (7) 10.2, (8) 11.4 y (9) 12.0.

tencia de estructura  $\beta$  es posible conseguir un buen ajuste teórico de las curvas.

Los resultados se visualizan mucho más claramente en la figura 33 en que están representados los porcentajes de las 3 estructuras analizadas en función del pH siendo los aspectos mas destacables los que se describen a continuación:

La disminución de la proporción de cadena estadística es constante en todo el rango de pH estudiado, de modo que entre pH 3 y 12 adquieren estructura un 25% de los restos de aminoácido de la proteína. Hasta pH 10 se transforma fundamentalmente en hélice  $\alpha$ , que se incrementa en un 7%, y cuya proporción se mantiene constante entre pH 9,5 y 11,5 para disminuir bruscamente a partir de este pH en un 4%. La proporción de hoja- $\beta$  no aumenta prácticamente hasta pH 9,5, manteniéndose en un 4% empezando entonces a hacerlo, presumiblemente a costa de la cadena estadística, es posible que a partir de pH 11,5 el aumento sea también a costa de la desaparición de hélice  $\alpha$ , alcanzándose un valor final del 23% de hoja  $\beta$ . No fue posible realizar medidas a valores de pH superiores a 12 como ya se ha indicado anteriormente.

A partir de los valores de pH de los cambios observados y dada la composición química de la H3, una hipótesis sugerente que los explicaría es el que estén asociados con la valoración de las cadenas laterales de lisina y arginina presentes en la molécula, cuyos pKa estarían modificados respecto a los de los aminoácidos libres. Resulta especialmente significativa, en este aspecto, la brusca aparición de estructura  $\beta$ , resultado de la agregación inter-cadenas proteicas una vez desaparecidas las cargas positivas. Esta agregación daría lugar, a pH superiores a 12, a la precipitación de la H3, ya descrita.

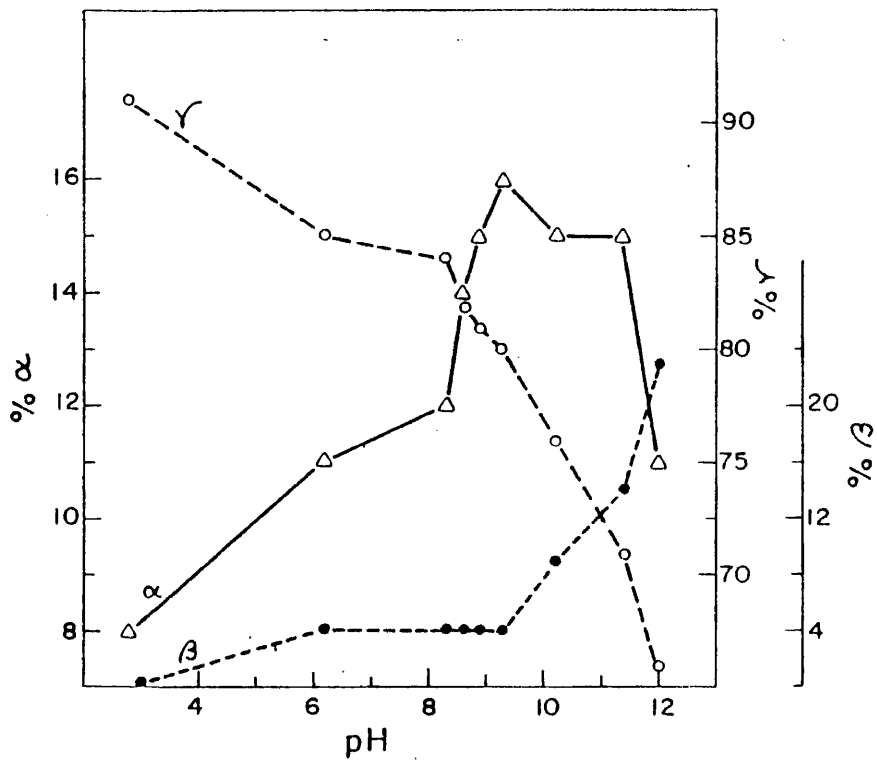


FIGURA 33.- Tantos por ciento de estructura, en función del pH, de la histona H3 de tino de ternera ( $1,6 \times 10^{-5}$  M) en  $H_2O$ . ( $\gamma$  corresponde a cadena estadística).

La estructura que adquiere la H3 como consecuencia de la pérdida de carga de sus grupos ionizables es de un tipo radicalmente distinto a la que se conseguía mediante aumento de la fuerza iónica (tabla VII). El apantallamiento de las cargas por la acción de los iones del medio supone una compactación de la proteína con formación predominante de  $\alpha$ -hélice (hasta un 24%). En cambio la eliminación de esas mismas cargas por incremento del pH provocó interacción de tipo hidrofóbico entre las cadenas de moléculas diferentes con formación de estructura  $\beta$  (hasta un 23%) pero sin que desaparezca totalmente la  $\alpha$ -hélice (un 11%).

#### 3.5.6.- Estructuración inducida por etanol.

El estudio del comportamiento estructural de la histona H3 además de permitirnos una aproximación al mejor conocimiento de su función puede explicar el comportamiento de la proteína en diversas condiciones de trabajo. Fuerza iónica y pH son factores que influyen de un modo natural en los medios fisiológicos; hay otro factor que aunque no esté asociado a la funcionalidad de las proteínas de un modo natural si es significativo en este caso concreto. Se trata en particular de la utilización de disolventes apolares en los medios de extracción, que es un método casi general en la obtención y preparación de histonas. Así por ejemplo, en el método de Johns, descrito en la parte experimental, juegan un papel destacado una extracción con Etanol 80%-HCl 0,25 y una diálisis frente a etanol absoluto. No se han realizado prácticamente estudios del efecto de los disolventes apolares en las proteínas y concretamente del etanol, en parte debido a que la mayoría de las proteínas son insolubles en etanol. Las histonas ricas en arginina son en cambio solubles y esto justifica el interés de estudiar mejor es

te comportamiento.

Siempre se ha tenido la idea del etanol como un agente desnaturante y precipitante de proteínas, aunque su mecanismo de actuación ha sido poco estudiado (Timashoff, 1970; Jirgensons, 1978). Hoy es un hecho conocido que el etanol induce la formación de estructuras altamente ordenadas con alto contenidos en estructuras  $\alpha$  y  $\beta$ . La elevada carga de las histonas ricas en arginina puede ser la responsable de que estas sean relativamente solubles en etanol y el que este se utilice como medio selectivo de extracción. Esto planteó el problema de hasta qué punto las histonas extraídas por este procedimiento se han desnaturado de un modo irreversible y si los estudios realizados con proteínas aisladas de este modo son significativos del comportamiento del material real "in vivo".

En el experimento realizado, a las histonas H3 de timo y levadura, disueltas en HCl 0,25 N, se ha añadido cantidades crecientes de Etanol 90%-HCl 0,25N con objeto de ir incrementando la concentración de etanol sin alterar la de HCl. La estructuración de cada proteína se siguió por dicroísmo circular en el ultravioleta lejano y los resultados se muestran en la figura 34. En las condiciones del experimento no puede alcanzarse una concentración del 80% en etanol pues ocurre una precipitación parcial, no controlable, de la H3 y es imposible, por consiguiente, calcular los valores de elipticidad.

Para ambas H3 se aprecia un alto grado de estructuración por efecto del etanol que debe concretarse en un aumento de la proporción de estructuras  $\alpha$  y  $\beta$  según los valores de  $[\theta]_{220}$  que se representan. La transición debe ser parcialmente cooperativa como se desprende de la exis-

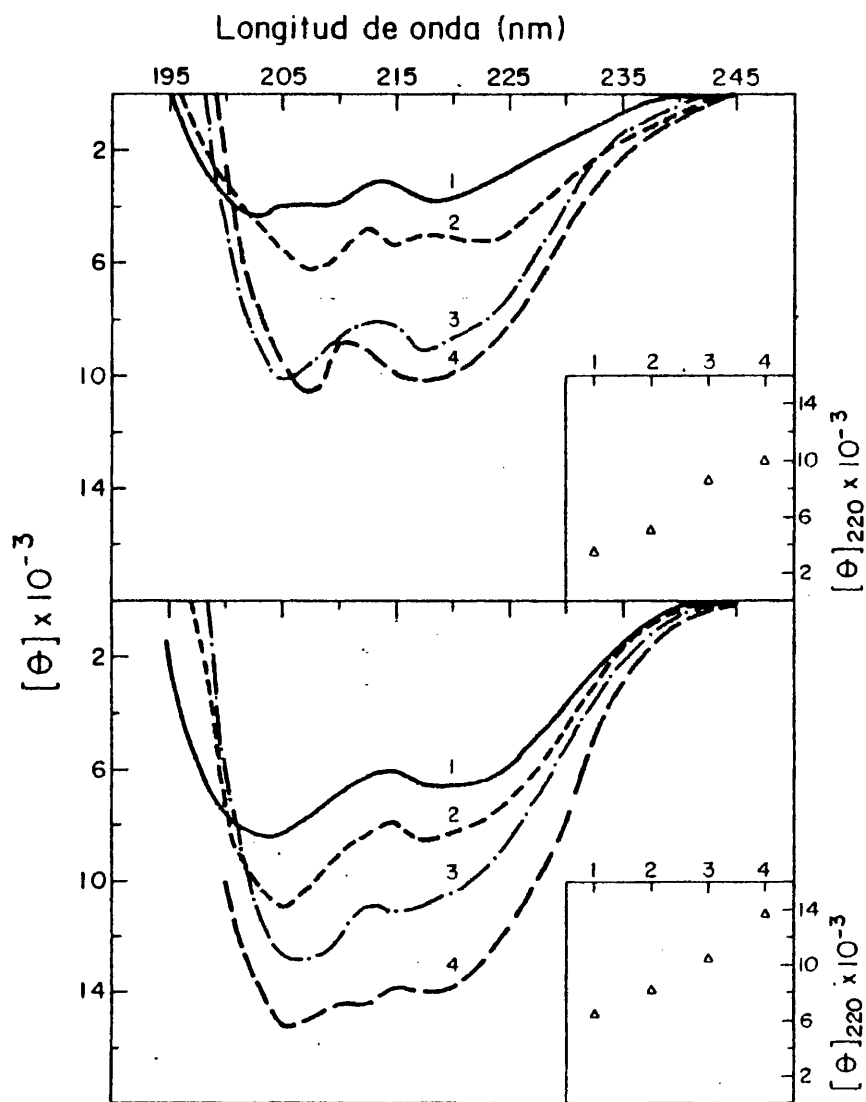


FIGURA 34.- Curvas de dicroísmo circular, en el ultravioleta lejano, de las histonas H3 de *S. cerevisiae* ( $5.7 \times 10^{-5}$  M, gráfica superior) y H3 de timo de ternera ( $10.4 \times 10^{-5}$  M gráfica inferior). Realizadas en: (1) HCl 0,25 (2) Etanol 20% -HCl 0,25 (3) etanol 40%-HCl 0,25 (4) Etanol 60%-HCl 0,25.

tencia de una cinética sigmoidea y es mayor la estructuración alcanzada por la H3 de timo que por la de levadura. Esta diferente estructuración, inversa a la inducida por fuerza iónica, puede ser responsable de la distinta capacidad de solubilización que muestran las dos H3 en el procedimiento de extracción de Johns, con un rendimiento muy inferior en el caso de la H3 de levadura.

En conclusión los tres agentes analizados: concentración salina, incremento del pH y adición de etanol al medio, se muestran capaces de inducir una estructura más organizada en ambas H3 con resultados muy similares para ambos, el tipo de estructura alcanzada depende del tipo de agente utilizado. Los factores que intervienen en cada uno de los casos son diferentes y es interesante discutirlos a la vista de la composición de aminoácidos y la secuencia lo cual se hará en el apartado siguiente.

4. DISCUSSION

#### 4.- DISCUSION

La identificación de las diferentes histonas ha planteado históricamente una serie de dificultades, debido , fundamentalmente, a la ausencia de una función específica que permita distinguir inequívocamente entre las diferentes fracciones. Johns (1971) sistematizó una serie de criterios que, como se ha apuntado en el apartado 1.1, permiten una clasificación de las histonas de timo de ternera en base a propiedades como la composición y la movilidad electroforética.

La conducta de las diferentes fracciones de histona frente a los distintos métodos de fraccionamiento aporta también valiosos datos en cuanto a su identificación. Por ejemplo, dos características de la histona H3 de timo de ternera -citadas por Johns (1971) como exclusivas- son la presencia de cisteína y la precipitación cuantitativa por dialisis de los extractos en EtOH-HCl frente a etanol absoluto.

En el primer estudio sistemático sobre el fraccionamiento de histonas de *S.cerevisiae*, Franco y col. (1974) encontraron que, en las condiciones descritas por Johns (1964) para el aislamiento de la histona H3 de timo de ternera no precipitaba ninguna proteína por dialisis frente a etanol absoluto, a no ser que se partiera de extractos con etanol-HCl más concentrados de lo habitual. Pero el escaso precipitado formado en este caso no contenía cisteína.

Por otra parte, el material recuperado del extracto en etanol-HCl después de separar la histona H4 migraba como una única banda en geles de poliacrilamida al 20% y su composición era parecida a la de la histona H2A. Por estos motivos, se constató en aquel momento que no era posible poner de manifiesto la presencia de H3 en levadura.

El presente trabajo pone de manifiesto la presencia de H3 en levadura. La identificación es posible, fundamentalmente, gracias a los trabajos de secuenciación descritos en el apartado 3.4. Dada la conservatividad de la histona H3 (Isenberg, 1979) dichos resultados, junto con los de las tablas IV y V, permiten una identificación segura. Por otra parte se puede observar que la histona H3 de levadura no posee cisteína (tablas IV y V) y que su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida al 20% coincide con la de la histona H2A (figura 5). Incluso, cuando el tiempo de desarrollo no es largo se confunden las bandas correspondientes a H2A y H3 de levadura, aun en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de urea (vease apartado 3.2.).

A pesar de la identidad de las secuencias N-terminales (tabla VI) y de la semejanza de composición (tablas IV y V) entre la histona H3 de timo de ternera y levadura, ambas histonas se comportan de modo diferente en varias de las técnicas de separación -analíticas o preparativas- empleadas. Así, por ejemplo, sus movilidades electroforéticas son distintas (figura 10). Esta diferencia no se debe a variaciones en el peso molecular (Fernández, 1979) y las previsiones de la tabla V parecen contradictorias con el hecho de que la H3 de levadura tenga una movilidad mayor que su homóloga de timo. En efecto, a igualdad de número de residuos básicos, la histona de timo posee 20 residuos ácidos mientras que la de levadura posee 21. El hecho de que, a pesar de ello, la H3 de levadura tenga mayor movilidad - lo que implicaría una carga positiva mayor- puede explicarse si la proporción de amidas es menor en el caso de la H3 de timo de ternera. Esta ex-

plicación estaría de acuerdo con la conducta semejante de ambas histonas en cromatografías de exclusión (figuras 5 y 13).

Resulta más difícil de explicar el diferente comportamiento de ambas histonas en la extracción con etanol-HCl y en la precipitación con etanol absoluto. Las diferencias cuantitativas en el grado de estructuración inducido por el etanol en ambas histonas (figura 34) puede apuntarse como una posible causa, aunque, por el momento no sea posible decidir sobre la naturaleza de la relación causa-efecto. No obstante, los experimentos recogidos en el apartado 3.5.6 constituyen una vía de aproximación al problema que se describe en esta memoria por vez primera.

Según se prevee en la tabla V, las variaciones entre las histonas H3 de timo de ternera y *S.cerevisiae* afectan a un mínimo de 6 posiciones. Ninguna de las sustituciones se encuentra en la región N-terminal (tabla VI). Este hecho parece hablar en favor de la importancia de dicha región en la molécula. Algo semejante ocurre en la histona H4, en la cual las sustituciones detectadas hasta la fecha se encuentran en la región C-terminal (Isenberg, 1979). Por el contrario en las histonas H2A y H2B, la mayor parte de las variaciones evolutivas tienen lugar en el dominio N-terminal (Isenberg, 1979). Este hecho puede tener relación con el distinto papel que se atribuye a los extremos N-terminales de las histonas. En efecto, las histonas H3 y H4, que se unen fuertemente al DNA nucleosomal, lo hacen a través del extremo N-terminal y esa unión es ya capaz de engendrar un vestigio de la estructura nucleosomal (Camerini-Otero y col. 1976; Sollner-Webb y col, 1976) mientras que los extremos N-terminales de las histonas

H2A y H2B se unen más débilmente al DNA (Felsenfeld, 1978). La investigación presente aporta datos a este respecto, por cuanto, por primera vez, ha permitido constatar la constancia N-terminal de la histona H3 en eucariontes unicelulares.

Se plantea en este momento la cuestión de si las variaciones existentes entre H3 de timo de ternera y de levadura que como ha quedado apuntado tiene lugar en la región C-terminal, es decir, la que adquiere estructuración en condiciones fisiológicas, son de entidad suficiente como para que difieran las estructuras terciarias de dichas histonas. Esta cuestión es de interés por cuanto, como se ha apuntado en el apartado 1.3., la especificidad de las interacciones H3-H4, que es una propiedad derivada de sus estructuras terciarias, es fundamental en el mantenimiento de la estructura de la cromatina. Al estudio de este problema se dedica la segunda parte de la presente memoria.

El estudio de los espectros de diferencia de las histonas H3 al ir aumentando la fuerza iónica de la disolución ha permitido calcular unas constantes para la transición estructural a partir de las representaciones de dobles inversos (figura 19), como se ha descrito en el apartado 3.5.1. El significado físico de estas constantes es doble: por una parte pueden considerarse como la constante de afinidad de las histonas por los iones fluoruro, es decir, la constante de un equilibrio:



en el que H representa la molécula de histona y  $\cdot$ , para simplificar, no se ha tenido en cuenta la estequiometría de la interacción.

1 ALA ARG THR LYS GLN THR ALA ARG LYS SER THR GLY GLY LYS ALA  
 16 PRO ARG ARG LYS GLN LEU LEU ALA THR LYS ALA ALA ARG LYS SER ALA PRO  
 31 ALA THR GLY GLY VAL LYS ILE ARG ARG TYR LYS ARG PRO GLY THR  
 46 VAL ALA LEU ARG LYS LEU LEU ARG ARG TYR LYS SER THR GLU LEU  
 61 LEU ILE ARG LYS LEU PRO PHE GLN ARG LEU VAL ARG GLU ILE ALA  
 76 GLN ASP PHE LYS THR ASP LEU ARG PHE GLN SER SER ALA VAL MET  
 91 ALA LEU GLN GLU ALA CYS GLU ALA TYR LEU VAL GLY LEU PHE GLU  
 106 ASP THR ASN LEU CYS ALA ILE HIS ALA LYS ARG VAL THR ILE MET  
 121 PRO LYS ASP ILE GLN LEU ALA ARG ARG ILE ARG GLY GLU ARG ALA

TABLAIX: Secuencia de la histona H3 de timo de ternera.

DeLange y col. 1972

Por otra parte, las constantes significan también los inversos de las concentraciones de KF para las cuales se ha alcanzado el 50% del cambio de entorno de las tirosinas. Estrictamente hablando, los espectros de diferencia representados en la figura 18 significan que, como consecuencia de la adición de KF, residuos de tirosina de las histonas pasan a un entorno más hidrofóbico. Es evidente que la forma más fácil de explicar esta transición es admitir que, como consecuencia de una estructuración de las histonas inducida por un aumento de la fuerza iónica uno o más residuos de tirosina quedan en el interior de la zona globular. Como se ha apuntado en el apartado 3.5.1, el valor de  $\Delta\epsilon$  máximo, común para las dos histonas e igual al esperado para la transición de 1.8 residuos de tirosina del exterior de una cadena polipeptídica a una región interna hidrofóbica, permite emitir tres hipótesis. Teniendo en cuenta que en agua ya poseen las tirosinas una cierta anisotropía óptica (figura 20), los resultados pueden interpretarse en términos de la hipótesis c) . Esto significaría que dos tirosinas de las tres de la molécula de histona quedan en posición interna al estructurarse la histona. A la vista de la secuencia de la H3 de timo de ternera (tabla IX), es evidente que tales residuos serían el 54 y el 99. De todas formas, no puede descartarse la hipótesis a) es decir, que en el estado final exista una tirosina en el interior de la histona, en un entorno totalmente hidrofóbico (que sería la 99) otra en el exterior (residuo 41) y la tercera en una situación intermedia. Esto es así, porque el hecho de que un residuo de tirosina presente dichroísmo (figura 20) no significa que se encuentre en un entorno hidrofóbico. Con todo, sí exige que el plano del anillo aromático

carezca de libertad de rotación con respecto a alguna carga próxima que perturbe las componentes eléctricas y/o magnéticas de su transición, consideración que sin excluir la hipótesis a) - hace más posible la c). En apoyo de la hipótesis c) se encuentra también el hecho de que, aun en agua destilada, ambas histonas posean ya una proporción de hélice alfa relativamente alta (tabla VII) que podría implicar una inmovilización del residuo de tirosina 99.

Cabe también preguntarse si la estructuración inducida por la adición de KF, que repercute en el entorno de las tirosinas es el punto final del denominado "cambio rápido" o es resultado de un posible "cambio lento" (vease apartado 1.4). Ahora bien, el cambio lento se caracteriza por la adquisición de estructura  $\beta$ , en proporción que, al menos en la H3 de timo de ternera puede llegar al 23% (figura 33) y en las condiciones de pH y concentración de histona a que se ha trabajado en los experimentos recogidos en el apartado 3.5.1 el incremento de estructura beta provocado por la adición de KF es nulo en la histona H3 de levadura y muy escaso en la de timo (tabla VII). Puede pues, descartarse la aparición de cambio lento en las condiciones experimentales utilizadas, al menos en un nivel que altere las conclusiones anteriormente establecidas.

Todavía puede obtenerse otra conclusión de los experimentos indicados en el apartado 3.5.1. la figura 19 pone de manifiesto que, a pesar de que ambas histonas posean una constante de afinidad para  $F^-$  diferente, el grado de estructuración final que se alcanza en el entorno de los residuos de tirosina es semejante en las dos. Las dife-

rencias de estructura primaria que se han comentado anteriormente no influyen, pues, en este aspecto de la estructura terciaria.

Los experimentos recogidos en el apartado 3.5.2 se han realizado en presencia de KF 0.21 M. A esta concentración salina, a pH 6, ya se ha alcanzado practicamente el máximo de estructuración en el entorno de los residuos de tirosina (figuras 18 y 20). Teniendo esto en cuenta se descarta que los cambios espectroscópicos observados como consecuencia del aumento de pH se deban a variaciones estructurales, al menos en lo que se refiere a la adquisición de estructura terciaria (cambio rápido). Más adelante se verá que no puede excluirse una posible perturbación, debida a la aparición de cambio lento, en los espectros de dicroísmo.

Los resultados recogidos en la figura 23 ponen de manifiesto que una de las tres tirosinas de ambas histonas posee un  $pK'_a$  superior a 11.5. Como se ha discutido anteriormente, lo más probable es que dicha tirosina sea una de las dos internas, o bien la de entorno más hidrofóbico caso de aceptar la hipótesis a) anteriormente expuesta.

El aumento de pH tiene, desde un punto de vista cualitativo, dos efectos sobre los espectros de dicroísmo circular que se recogen en las figuras 24 y 25. Por una parte, se aprecia claramente la aparición de bandas debidas a las transiciones  ${}^1L_a$  y  ${}^1L_b$  del tirosinato a medida que se ionizan las tirosinas. Por otra parte, a valores de pH altos se observa también una pérdida de la subestructura de la banda centrada a 275 nm, correspondiente a tirosina sin ionizar. Pero

también se aprecia una diferencia cuantitativa: la elipticidad negativa a 275 nm aumenta, con el pH, aumento que se nota especialmente a valores extremos, como 10.9, en la figura 24.

Por lo que se ha comentado anteriormente no parece probable que la estructura de la histona, que ya se encuentra en KF 0.21 M., sufra una mayor compactación y esta transición estructural podría muy bien ser consecuencia de un cambio lento que comience a producirse a valores de pH altos. En efecto, las constantes de tiempo del cambio lento aumentan con el pH en las histonas de timo de ternera (Li y col, 1972; Li, 1977) y la figura 33 pone de manifiesto que, aun en ausencia de sales, la proporción de lámina  $\beta$ , y por consiguiente, la existencia de cambio lento es considerable a pH mayor o igual a 10.5. De todas formas hay que hacer constar que la posible existencia del cambio lento, inducido por valores altos de pH, no falsea los datos de valoración de los residuos de tirosina, puesto que los valores de  $pK'_a$  recogidos han sido calculados a partir de los espectros de absorción.

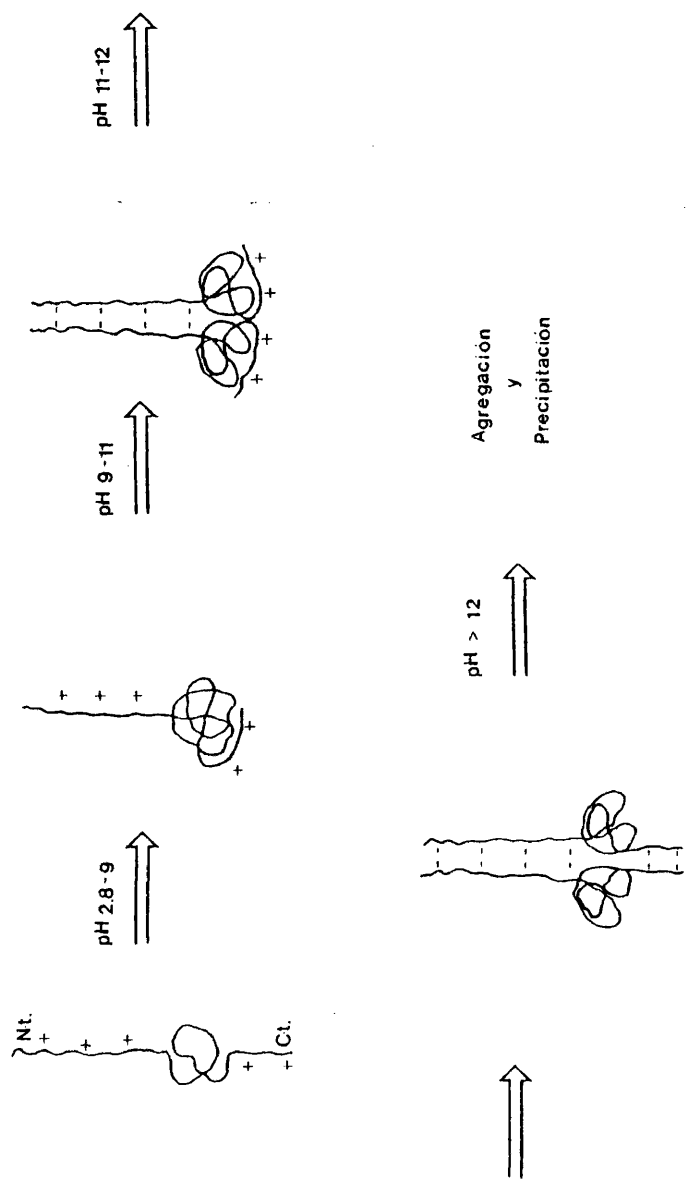
Como se ha apuntado anteriormente (vease apartado 3.5.3) la elipticidad a 220 nm aumenta con la fuerza iónica de modo hiperbólico. Li y col. (1972) adujeron que el plegamiento de las histonas tenía lugar de un modo cooperativo (vease también Isenberg, 1979). Pero esta suposición se basaba en el postulado de que solo son posibles dos estados **estructurales** en las histonas: el estado desestructurado y el completamente estructurado. Evidentemente, de ese postulado se deriva necesariamente la existencia de cooperatividad al suponer un proceso de estructuración "todo o nada", independientemente de que las varia-

ciones de elipticidad sean hiperbólicas o sigmoideas con respecto a la fuerza iónica. Pero los resultados obtenidos en la presente investigación parecen descartar ese modelo. En efecto, como se ha indicado oportunamente los valores de  $(KF)$  para los que se logra un incremento de  $[\theta]_{220}$  igual al 50% del máximo son distintos en ambas histonas de aquellos para los que se consigue un  $\Delta\epsilon_{286}$  de 640 (vease 3.5.1). Esto significa que la constante de equilibrio para la estructuración en el entorno de los residuos de tirosina es diferente de la constante de equilibrio del proceso de adquisición de estructura secundaria, hecho que difícilmente puede reconciliarse con un modelo de estructuración "todo o nada". Si este se descarta, las curvas hiperbólicas recogidas en las figuras 18, 20 y 28 serían indicio de que el plegamiento de las histonas H3 de levadura y de timo de ternera es no cooperativo.

Los estudios cinéticos del cambio conformacional lento, recogidos en el apartado 3.5.4, ponen de manifiesto que también en el cambio lento se estructura a distinta velocidad el entorno de las tirosinas que las zonas en que se producen cambios de estructura secundaria. La aplicación de técnicas como dicroísmo circular en el ultravioleta próximo y espectroscopía de diferencia que se realiza por primera vez en esta investigación para el estudio de cambios conformacionales de las histonas H3, ha permitido llegar a estas conclusiones.

Finalmente hay que indicar que, también por vez primera se ha realizado un estudio completo de las variaciones de estructura secundaria de histonas en función del pH. Los experimentos descritos en el apartado 3.5.5 ponen de manifiesto que a pH menor o igual a 9.5 no tiene lugar el cambio lento -no varía apreciablemente la estructura

FIGURA 35: Modelo de estructuración de la histona H3 en función de la variación del pH; asociado con la pérdida de carga de los residuos básicos de la molécula.



beta- en ausencia de sales. No obstante, a valores de pH superiores comienza a aparecer estructura  $\beta$ , a expensas de cadena estadística entre pH 9.5 y 11 y a expensas de hélice  $\alpha$  a pH mayor que 11. Estos resultados permiten sugerir el modelo de estructuración que se esquematiza en la figura 35. Este modelo sugiere una dimerización de la H3 de modo similar al propuesto por Li (1977) asociada a la posible valoración de los residuos de lisina y que llevaría consigo la adquisición de estructura  $\beta$  a consta de cadena estadística. A pH superior a 11 la valoración de las cadenas laterales de arginina supondría un aumento de estructura  $\beta$  probablemente asociado con la pérdida de estructura globular en el extremo C-terminal (vease tabla IX).

Es de destacar el hecho de que todas las comparaciones estructurales realizadas entre las histonas H3 de timo de ternera y de levadura hayan dado como resultado una notable semejanza entre ambas. Así pues, puede concluirse, para terminar, que las diferencias de estructura primaria tienen escaso reflejo en la estructura terciaria y modo de asociación de las histonas H3. Posiblemente dichas variaciones tengan lugar fuera de los dominios esenciales para la función nucleosomal de estas histonas, lo que permite que las histonas de levadura interaccionen cruzadamente con las de timo de ternera según se desprende de las observaciones de Mardian e Isenberg (1978).

## 5. CONCLUSIONES

### CONCLUSIONES

Como resultado de los experimentos, descritos en la presente memoria, sobre el aislamiento y la purificación de la histona H3 de *Saccharomyces cerevisiae* y las características estructurales de esta histona y de la histona H3 de timo de ternera se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1ª) La histona H3 de *S. cerevisiae* se separa de la cromatina mediante extracción con Etanol 80%-HCl 0,25 N, al igual que su homóloga de timo de ternera. La precipitación por diálisis del medio de extracción frente a etanol absoluto produce un rendimiento bajísimo en histona H3 a diferencia de lo que ocurre con la histona H3 de timo de ternera.
- 2ª) Por precipitación del extracto Etanol-HCl con 1,5 volúmenes de acetona se recuperan selectivamente H3 y H2A con buen rendimiento.
- 3ª) Tanto la cromatografía en Bio-Gel P-100 como la cromatografía en carboximetil-celulosa, son capaces de fraccionar la mezcla de H3 y H2A conseguida por precipitación fraccionada del extracto Etanol-HCl.
- 4ª) La cromatografía en Bio-Gel P-10 resuelve las histonas H3 y H4 de *S. cerevisiae*, al igual que lo hacía con sus homólogas de timo de ternera. Este fraccionamiento no se puede conseguir ni con Bio-Gel P-100 ni con carboximetil-celulosa.

5ª) El análisis de aminoácidos de la histona H3 de *S.cerevisiae* es muy similar al de la H3 de timo de ternera. Solo existe sustitución de unos 6 restos de aminoácido que son: Cys (2), Met (2), Ala (1) y Thr (1) en timo de ternera y Ser (3), Gly(1), Asx (1) y Phe (1) en *S.cerevisiae*.

6ª) La secuencia de los 27 primeros restos de aminoácidos de la histona H3 de *S.cerevisiae* es idéntica a la de H3 de timo de ternera. Este hecho, unido a la composición de aminoácidos, indica la práctica identidad de la estructura primaria de ambas histonas.

A pesar de esto presentan diferencias en su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de urea 2,5M teniendo mayor movilidad la H3 de *S.cerevisiae*.

7ª) La fuerza iónica induce en ambas histonas H3 una estructuración detectable tanto por variaciones de coeficiente de extinción como de elipticidad en el ultravioleta próximo. Esta estructuración supone la transición de más de un residuo de tirosina a un entorno hidrofóbico. Dos hipótesis son válidas para explicar esto: a) Que una Tyr entre a un entorno totalmente estructurado y el de la otra solo se estructure de un modo parcial, b) Que una Tyr esté en un entorno parcialmente estructurado, previamente a la adición de sal, y las dos tirosinas pasen a ocupar un entorno hidrofóbico.

8ª) Solo 2 de las 3 Tyr de ambas histonas H3 son valorables en la proteína estructurada en medios de fuerza iónica alta. El  $pK'_a$  de la tercera Tyr no puede determinarse debido a la insolubilidad de las

proteínas a  $\text{pH} > 12$ . En cualquier caso dicha Tyr debe encontrarse en un entorno que dificulta su ionización.

En *S.cerevisiae* los  $\text{pK}'_a$  de las transiciones son 9,6 y 10,9 correspondiendo el 1° a la Tyr que no se incorpora a la zona globular y permanece accesible al medio.

- 9<sup>a</sup>) La fuerza iónica induce en ambas histonas H3 la aparición de estructura globular con características muy similares. En KF 0.2 M alrededor de un 30% de los restos de aminoácido se encuentran formando parte de estructuras ordenadas. Ambas histonas H3 se encuentran excépcionalmente estructuradas (15-18%) incluso en condiciones muy desfavorables ( $\text{H}_2\text{O}$  destilada,  $\text{pH}$  3.5).
- 10<sup>a</sup>) La transición estructural de la histona H3 de timo de ternera, inducida por la fuerza iónica (KF) presenta un cambio rápido y un cambio lento. La constante de tiempo de la estructuración es distinta para el entorno de las tirosinas (54 minutos) que para la proteína global (155) lo cual descarta que la transición se efectue según un modelo "Todo o nada".
- 11<sup>a</sup>) El incremento del  $\text{pH}$  en medios de baja fuerza iónica induce en la histona H3 de timo de ternera la aparición de estructuras ordenadas. La estructuración adquirida en este caso es de un tipo totalmente distinto a la inducida por la fuerza iónica, alcanzándose hasta un 23% de estructura  $\beta$ . La aparición de estructura  $\beta$  está ligada a la pérdida de carga de los restos de lisina y arginina de la molécula.

12<sup>a</sup>) El etanol induce la aparición de estructuras ordenadas en ambas histonas H3. Las condiciones de extracción de estas resultan ser así no desnaturalizantes. La estructuración es mayor en la H3 de timo de ternera, lo que puede relacionarse con la mayor solubilidad de esta.

6. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Allfrey, V.G. (1977) en "Chromatin and Chromosome Structure" (ed. H.J.Li. R.A. Eckardt) Pg. 167, New York. Academic Press.

Axel, R.; Melchior, W.; Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1974). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71, 4101.

Baldwin, J.P.; Boseley, P.G.; Bradbury, E.W. e Ibel, K. (1975). Nature, 253, 245.

Bekhor, I. y Samal, B. (1977). Archiv. Biochem. Biophys. 179, 537.

Belmonte, J.R. (1976). Tesina de Licenciatura. Facultad de Químicas. Universidad Complutense, Madrid.

Bina-Stein, M. y Singer, M.F. (1977). Nucleic Ac. Res. 4, 117.

Blombäck, B.; Blombäck, M.; Edman, P. y Hessel, B. (1966). Biochim. Biophys. Acta 115; 371.

Bohm, M; Hayashi, H.; Cary, P.D.; Moss, T. y Bradbury, E.M. (1977). Eur. J. Biochem. 77, 487.

Boseley, P.G.; Bradbury, E.M.; Butler-Browne, G.S.; Carpenter, B.G. y Stephen, R.M. (1976). Eur. J. Biochem. 62, 21.

Bostock, C.J.; Christie, S. y Huch, F.T. (1976). Nature 262, 516.

Boublick, M.; Bradbury, E.M. y Crane-Robinson, C. (1970) Eur. J. Biochem. 14, 486.

- Bradbury, E.M.; Inglis, R.J.; Matthews, H.R. y Langan, T.A. (1974). *Nature* 249, 553-56.
- Brandt, W.F. y Von Holt, C. (1976). *FEBS Lett.* 65, 386.
- Bustin, M. y Cole, R.D. (1969). *J. Biol. Chem.* 244: 5286-90.
- Cary, P.D.; Crane-Robinson, C.; Bradbury, E.M.; Javaherian, K.; Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1976). *Eur. J. Biochem.* 62, 583.
- Cary, P.D.; Moss, T. y Bradbury, E.M. (1978). *Eur. J. Biochem.* 89, 475.
- Camerini-Otero, R.D.; Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1976). *Cell* 8, 333.
- Carpenter, B.G.; Baldwin, J.P.; Bradbury, E.M. y Ibel, K. (1976). *Nucleic Ac. Res.* 3, 1739.
- Celis, J.E.; Fink, M. y Kaltaft, K. (1976). *Nucleic Ac. Res.* 3, 1065.
- Cole, R.D. (1977) en "The Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus", vol. I (Ed. P.O.P. Ts'O), pg. 93, North-Holland, Amsterdam.
- Crane-Robinson, C.; Briand, G.; Sautiere, P. y Champagne, M. (1977). *Biochim Biophys. Acta*, 443, 283.
- Craven, G.R.; Steers, E. y Anfinsen, C.B. (1965). *J. Biol. Chem.* 240, 2468.
- Chan, P.K. y Liew, C.C. (1977). *Can. J. Biochem.* 55, 847.
- Chapman, G.E.; Hartman, P.G. y Bradbury, E.M. (1976). *Eur. J. Biochem.* 61, 69.

- Cheah, K.S.E. y Osborne, D.J. (1977). *Biochem. J.* 163, 141.
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1972) *Biochemistry* 11, 4017.
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1973) *Biochemistry* 12, 1035.
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1974). *Biochemistry* 13, 24, 4987.
- D'Anna, J.A. e Isenberg, I. (1974). *Biochemistry*, 13, 4992-97.
- Davis, R.H.; Wilson, R.B. y Ebodi, M.S. (1975). *Eur. J. Biochem.* 53, 101.
- DeLange, R.J.; Fambrough, D.M.; Smith, E.L. y Bonner, J. (1968). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 61, 1145.
- DeLange, R.J.; Fambrough, D.M.; Smith, E.L. y Bonner, J. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 319.
- DeLange, R.J. y Smith, E.L. (1971). *Ann. Rev. Biochem.* 40, 279.
- DeLange, R.J.; Hooper, J. y Smith, E.L. (1972). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 882.
- DeLange, R.J. y Smith, E.L. (1975). *The structure and function of chromatin*. Ciba Foundation Symposium 28. ASP (Elsevier-Excerpta Medica-North Holland) Amsterdam pg. 59.
- Dixon, G.H.; Candido, E.P.M.; Honda, B.M.; Louie, A.J.; MacLeod, A.R. y Sung, M.T. (1975). *The Structure and function of Chromatin*. Ciba. Found. Symp. 28. London, pg. 229-258.
- Doenecke, D. (1977). *Eur. J. Biochem.* 76, 355.

- Donovan, J.W. (1969). *J. Biol. Chem.* 244, 1961-67.
- Donovan, J.W. (1969 b) en "Physical principles and techniques of protein chemistry" part A. pg. 101. Ed. Leach, S.J. Ac. Press. New York.
- Du Praw, E.J. (1966), *Nature* 209, 577.
- Edman, P. y Begg, G. (1967). *Eur. J. Biochem.* 1, 80.
- Edman, P. (1970) en "Protein Sequence Determination" pg. 211 (Ed. Needleman, S.B. Chapman y Hall Limited) London.
- Edman, P. (1960). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 88, 602.
- Edwards, L.J. y Hnilica, L.S. (1968) *Experientia* 24, 228.
- Edwards, P.A. y Shooter, K.U. (1970). *Biochem. J.* 120, 61.
- Fambrough, D. y Bonner, J. (1966). *Biochemistry* 5, 2563.
- Fambrough, D. y Bonner, J. (1968). *J. Biol. Chem.* 243, 4434.
- Fazal, M. y Cole, R.D. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 4068.
- Felsenfeld, G. (1978). *Nature* 271, 115.
- Fernandez, B. (1979) Tesis Doctoral. Facultad de Químicas. Universidad Complutense. Madrid.
- Finch, J.T. y Klug, A. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 1897.
- Finch, J.T.; Lutter, L.C.; Rhoder, D.; Brown, R.S.; Rushton, B.; Levit, M. y Klug, A. (1977). *Nature* 269, 29.

- Franco, L.; Johns, E.W. y Navlet, J.M. (1974). *Eur. J. Biochem.* 45, 83.
- Franco, L.; Montero, F. y Rodriguez-Molina, J.J. (1977). *FEBS Lett.* 78, 317.
- Franco, L. y Lopez-Braña, I. (1978). *Nucleic Ac. Res.* 5: 3743.
- Franco, L.; Lopez-Braña, I. y Perera, J. (1979). XI Intern. Congress of Biochem. Toronto.
- Franklin, S.G. y Zwedler, A. (1977). *Nature* 266: 273-75.
- Frederick, E. (1976). *Biochimie* 58, 96.
- Garret, R.A. (1971). *Biochemistry* 10, 2277.
- Gaubatz, J.; Ellis, M. y Chalkley, R. (1979). *Federation Proc.* 38, 1973.
- Germond, J.E.; Hirt, B.; Oudet, P.; Gross-Bellard, M. y Chambon, P. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1843.
- Goodwin, G.H.; Woodhead, J.L. y Johns, E.W. (1977). *FEBS Lett.* 73, 85.
- Greenfield, N. y Fasman, G.D. (1969). *Biochemistry* 8, 4108.
- Gurley, L.R.; Walters, R.A. y Tobey, R.A. (1975). *The Journal of Biol. Chem.* 250, 3936.
- Gurley, L.R.; Walters, R.A.; Barham, S.S. y Deaven, L.L. (1978) *Exp. Cell. Res.* 111: 373-83.
- Hardison, R.; Gaubatz, J. y Chalkley, R. (1978). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 720.

- Hartman, P.G.; Chapman, G.E.; Moss, T. y Bradbury, E.M. (1977). *Eur. J. Biochem.* 77, 45.
- Hayashi, H.; Iwai, K.; Johnson, J.D.; Bonner, J. (1977). *J. Biochem.* 82: 503-10.
- Herskowitz, T.T. y Sorenson, M. (1968). *Biochem.* 7, 2523.
- Hewish, D.R. y Burgoyne, A.L. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 504.
- Hill, R.J.; Poccia, D.L. y Doty, P. (1971). *J. Mol. Biol.* 61, 445.
- Hjelm, R.P.; Kneale, G.C.; Suau, P.; Baldwin, J.R.; Bradbury, E.M. e Ibel, K.; (1977). *Cell*, 10, 107.
- Hnilica, L.S. (1972) en "The Structure and Biological Functions of histones". Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland Ohio.
- Honda, B.M.; Baillie, D.L. y Candido, E.P.M. (1974). *FEBS Lett.* 48, 156.
- Horning, E.C.; Van den Heuvel, W.J.A. y Creech, B.G. (1963). *Methods Biochem. Anal.* 11, 69.
- Howze, G.B.; Hsic, A.W. y Olins, A.L. (1976). *Expt. Cell. Res.* 100, 424.
- Hozier, J.C. y Kaus, R. (1976). *Chromosome (Berl.)* 57, 95.
- Ilse, D. y Edman, P. (1963) *Australian J. Chem.* 16, 411.
- Isenberg, I. (1977). En "Search and Discovery. A tribute to Albert-Szent-Gyorgyi". Ed. Hammer, B. pp. 197. New York. Acad. Press.

- Isenberg, I. (1979). *Ann. Rev. Biochem.* 48: 159-91.
- Iwai, K.; Ishikawa, K. y Hayashi, H. (1970). *Nature (London)* 226, 1056.
- James, G.T.; Yeoman, L.C.; Matsui, S.; Goldberg, A.G. y Busch, H. (1977). *Biochemistry* 16, 2384.
- Jirgensons (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 534, 123.
- Johns, E.W.; Phillips, D.M.P.; Simson, P. y Butler, J.A.V. (1960). *Biochem. J.* 77, 631.
- Johns, E.W. (1964) *Biochem. J.* 92, 55.
- Johns, E.W. (1967). *Biochem. J.* 104, 78.
- Johns, E.W. y Forrester, S. (1969). *Biochem. J.* 111, 371.
- Johns, E.W. (1971) en "Histones and Nucleohistones". (Phillips, D.M.P., ed.) Cap. 1. Plenum Press, New York, London.
- Johns, E.W.; Goodwin, G.H.; Walker, J.M. y Sanders, C. (1975). *The Structure and function of chromatin. Ciba Foundation Symposium 28. ASP (Elsevier-Excerpta Medica-North Holland) Amsterdam* p. 95.
- Johnson, J.D.; Douras, A.S. y Bonner, J. (1974). *Int. Rev. Cytology, Suppl.* 4, 273.
- Jones, G.M.T.; Rall, S.C. y Cole, R.D. (1974). *J. Biol. Chem.* 249, 2548.
- Kecskes, E.; Sures, I. y Gallwitz, D. (1976). *Biochem.* 15, 12, 2541.
- Kelley, R.I. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1588.

- Kenneth, W.A.; Cheng, S.M. y Laemmli, U.K. (1977). *Cell*. 12, 805.
- Kinkade, J.M. y Cole, R.D. (1966). *J. Biol. Chem.* 241: 5798.
- Kinkade, J.M. y Cole, R.D. (1966). *J. Biol. Chem.* 241: 5790-97.
- Kornberg, R.D. y Thomas, J.D. (1974). *J. Mol. Biol.* 7: 142.
- Kostraba, R.C. y Wang, T.Y. (1973). *Expt. Cell. Res.* 80: 291.
- Kulbe, K.D. (1971). *Anal. Biochem.* 44: 548.
- Laurence, J.J.; Cham, D.C.F. y Piette, L.H. (1976). *Nucleic Ac. Res.* 3, 2879.
- Lestourgeón, W.M. y Rusch, H.P. (1973). *Archiv. Biochim. Biophys.* 155, 144.
- Levy-Wilson, P. y Dixon, G.H. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 1682.
- Lewis, P.N.; Bradbury, E.M. y Crane-Robinson, C. (1975). *Biochemistry* 14: 3391.
- Li, H.J.; Wickett, R.; Morrie Craig, A. e Isenberg, I. (1972). *Biopolymers* 11, 375.
- Li, H.J. (1977) en "Chromatin and Chromosome Structure" (ed. Li, H.J. y Eckhardt, P.A.) cap. 1; pg. 1. New York, Academic Press.
- Liew, C.C.; Haslett, G.W. y Allfrey, U.G. (1970). *Nature* 226: 414-417.
- Lilley, D.M.J. y Tatchell, K. (1977). *Nucleic Ac. Res.* 4, 2039.

- Lohr, D. y Van Holde, K.E. (1975). *Science* 188, 165.
- Lohr, D.; Corden, J.; Tatchell, K.; Kovacic, R.T. y Van Holde, E.E. (1977). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 79.
- Lopez-Braña, I. (1979). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense. Madrid.
- Mardian, J.K.W. e Isenberg, I. (1978). *Biochemistry* 17: 3825-33.
- Mirzabekov, A.D.; Shick, U.V.; Belyavsky, A.V. y Barykin, S.G. (1978). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 75, 4184.
- Morris, N.R. (1976 a) *Cell* 8: 257.
- Morris, N.R. (1976 b) *Cell* 9: 627.
- Moss, T.; Cary, P.D.; Abercrombie, P.; Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 71: 337-50.
- Moss, T., Stephens, R.M.; Crane-Robinson, L. y Bradbury, E.M. (1977). *Nucleic Ac. Res.* 4, 2477.
- Neelin, J.M.; Callahan, P.; Camb, D.C. y Murray, K. (1964). *Can. J. Biochem. Physiol.* 42: 1743.
- Nelson, D.A.; Beltz, W.R. y Rill, R.L. (1977). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 54: 1343.
- Newrock, K.M.; Alfageme, C.R.; Nardi, R.U. y Cohen, L.H. (1978). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 421-31.

- Niall, H.D. (1973) en "Methods in Enzymology" vol. XXVII, pg. 942 (Ed. Hirs, C.H.W. y Timasheff, S.R.) New York, Academic Press.
- Noll, M. (1974). Nature 251, 249.
- Noll, M. (1976 a) Cell 8, 349.
- Noll, M. (1976 b) en "Organization and expression of chromosomes" (Eds. U.G. Allfrey, E.K.F. Bautz, B.J. McCarthy, R.T.S. Schimke y A. Tissieres) p. 239, Dahlen Konferenzen, Berlin.
- Ogawa, Y.; Quagliariotto, G.; Jordan, J.; Taylor, C.W.; Sarbuck, W.C. y Busch, H. (1969). J. Biol. Chem. 244, 4387.
- Olins, A.L. y Olins, A.D. (1973). Science 183, 330.
- Olins, D.E.; Bryan, P.N.; Harrington, R.E.; Hill, E.W. y Olins, A.L. (1977). Nucleic Ac. Res. 4, 1911.
- Oliver, D.R. y Chalkley, R. (1972). Exp. Cell. Res. 73, 295.
- Oliver, D.; Sommer, K.R.; Panyim, S.; Spiker, S. y Chalkley, R. (1972 b). Biochem J. 129, 349.
- Oudet, P.; Gross-Bellard, M. y Chambon, P. (1975). Cell 4, 281.
- Oudet, P.; Spadafora, C. y Chambon, P. (1978). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 42, 425.
- Panyim, S. y Chalkley, R. (1969). Archiv. Biochem. Biophys. 180, 337.
- Pardon, J.F.; Wilkins, M.H.F. y Richards, B.M. (1967). Nature 215, 508.

- Pardon, J.F.; Wilkins, M.H.F. y Richards, B.M. (1977). *Nucleic Ac. Res.* 4, 3199.
- Patthy, L.; Smith, E.L. y Johnson, J. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 6834-40.
- Paul, J.; Gilmour, R.S.; Affara, N.; Birnie, G.; Harrison, R.; Hell, A.; Humphries, S.; Windass, J. y Young, B. (1973). *Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol.* 38, 773.
- Paul, J. (1975). *Symposium on Chromatin Structure. XIII Int. Congress of Genetics* 79, 151.
- Pederson, T. (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 617.
- Pekary, A.E.; Li, H.J.; Chan, S.I.; Hsu, C.J. y Wagner, T.E. (1975). *Biochemistry* 14, 1184.
- Peterson, J.L. y McConkey, E.H. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 548.
- Phillips, G. y Gigot, C. (1977). *Nucleic Acids Res.* 4, 3617.
- Pisano, J.J.; Bronzert, T.J. y Brewer, H.B. (1972). *Anal. Biochem.* 45, 43.
- Puigdomenech, P.; Cabré, O.; Palau, J.; Bradbury, E.M. y Crane-Robinson, C. (1975). *Eur. J. Biochem.* 59, 237.
- Rall, S.C. y Cole, R.D. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 7175.
- Reeves, R. (1976). *Science*, 194, 529.
- Richards, B.M. y Pardon, J.F. (1970). *Expt. Cell. Res.* 62, 184.
- Richards, B.M.; Pardon, J.F.; Lilley, D.; Cotter, R. y Wroley, J. (1977). *Cell. Biol. Int. Rep.* 1, 107.

- Rickwood, P.; Threlfald, G.; MacGillivray, A.J. y Paul, J. (1976). FEBS Lett. 51, 223.
- Ris, H. (1975). The structure and function of chromatin. Ciba Foundation Symp. 28. ASP (Elsevier-Excerpta Medica-North Holland) Amsterdam p.7.
- Rozijn, T.H. y Tonino, G.J.M. (1964). Biochim. Biophys. Acta 91, 105.
- Sanders, C. (1977). Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 1034.
- Sares, I.; Maxam, A.; Cohen, R.H. y Kedes, L.H. (1976). Cell 9, 495.
- Sautiere, P.; Tyrrou, D.; Layne, B.; Mizou, J.; Lambelin-Breynaert, M.D.; Ruffin, P. y Biserte, G. (1972). C.R. Acad. Sci. Ser. D, 274, 1422.
- Sautiere, P.; Wouters-Tyrrou, D.; Layne, B. y Biserte, G. (1975) en "The structure and function of chromatin". Ciba Foundation Symposium 28. ASP (Elsevier-Excerpta Medica-North Holland) Amsterdam p. 78.
- Schmidt, E.R. (1977). Nucleic Ac. Res. 4, 2169.
- Sears, D.W. y Beychock S. (1973), en "Physical principles and techniques of protein chemistry" Part. C. pg. 445. Ed. Leach, S.J. Ac. Press, New York.
- Shaw, B.R.; Herman, T.M.; Kovacic, R.T.; Beaudreau, G.S. y Van Holde, K.E. (1976). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 13, 505.
- Simpson, R.T. (1976). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 4400.
- Singer, D.S. y Singer, M.T. (1976). Nucleic Ac. Res. 3, 2531.

- Skandrani, E.; Mizon, J.; Sautiere, P. y Biserte, G. (1972). *Biochimie* 54, 1267.
- Smerdon, M.J. e Isenberg, I. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 55, 1029.
- Smerdon, M.J. e Isenberg, I. (1974). *Biochemistry* 13, 4046.
- Smithies, D.; Gibson, D.; Fanning, E.M.; Goodfliesch, R.M.; Gilman, J.G. y Ballantyne, D.L. (1971). *Biochemistry* 10, 4912.
- Sollner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1975). *Biochemistry* 14, 2915.
- Sollner-Webb, B.; Camerini-Otero, R.D. y Felsenfeld, G. (1976). *Cell* 9, 179.
- Sommer, K.R. y Chalkley, R. (1974). *Biochemistry* 13, 1022.
- Spelsberg, T.C.; Mitchell, W.M.; Chytil, F.; Wilson, E.M. y O'Malley, B.W. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 312, 765.
- Spiker, S. e Isenberg, I. (1977). *Biochemistry* 16: 1819-26.
- Spiker, S. e Isenberg, I. (1977 b). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 12, 157.
- Staron, K.; Jermanowski, A.; Tyniec, B.; Urbanska, A. y Toczko, K. (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, 475, 131.
- Stein, G.S.; Criss, W.E. y Morris, H.P. (1974). *Life Sciences* 14, 95.
- Stein, J.L.; Reed, K. y Stein, G.S. (1976). *Biochemistry* 15, 3291.

- Suau, P.; Kneale, G.G.; Braddock, G.W.; Baldwin, J.R.; Bradbury, E.M. e Ibel, K. (1977). *Cell* 10, 107.
- Summers, M.R.; Smyters, G.W. y Oroszlan, S. (1973). *Anal. Biochem.* 53, 624.
- Tatchell, K. y Van Holde, K.E. (1977). *Biochemistry* 16, 5295.
- Thomas, J.O. y Kornberg, R.D. (1974). *Science* 184, 865.
- Thomas, J.O. y Kornberg, R.D. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 2626.
- Thomas, J.O. y Farber, U. (1976). *FEBS Lett.* 66, 274.
- Timasheff, S.N. (1970). *Accounts Chem. Res.* 3, 62.
- Tonino, G.J.M. y Rozijn, T.H. (1966), en "The Cell Nucleus. Metabolism and radiosensitivity" p. 125 (Taylor y Francis, ed.). London.
- Trifonov, E. (1978). *Nucleic Ac. Res.* 5, 1371.
- Van der Westhuyzen, D.R. y Von Holt, C. (1971). *FEBS Lett.* 14, 333.
- Van Holde, K.E.; Sahasrabudhe, Ch.G. y Shaw, B.R. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1365.
- Van Holde, K.E. y Isenberg, I. (1975). *Acc. Chem. Res.* 8, 327.
- Varshawsky, A.J.; Bakayev, V.V.; Chumackov, P.M. y Georgiev, G.P. (1976). *Nucleic Ac. Res.* 3, 2101.
- Walker, J.M.; Shooter, K.V.; Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 88.

- Walker, J.M.; Hastings, J.R.B. y Johns, E.W. (1977). *Eur. J. Biochem.* 76, 461.
- Walker, J.M.; Goodwin, G.H. y Johns, E.W. (1979). *FEBS Lett.* 100, 394.
- Watson, D.C.; Peters, E.H. y Dixon, G.H. (1977). *Eur. J. Biochem.* 74, 53.
- Webb, J.M. y Levy, H.B. (1958) en "Methods of Biochemical Analysis" (Glick, D. ed.) Vol. 6, pg. 1, Interscience, London.
- Weintraub, H.; Worcel, A. y Alberts, B. (1976). *Cell* 9, 409.
- Weintraub, H.; Flint, S.J.; Leffak, I.M.; Groudine, M. y Grainger, R.M. (1978). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 401-7.
- Wickett, R.R.; Li, H.J. e Isenberg, I. (1972). *Biochemistry* 11, 2952.
- Wickett, R.R. e Isenberg, I. (1972 b). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2687.
- Wintersberger, V.; Smith, P. y Letnansky, K. (1973). *Eur. J. Biochem.* 33, 123.
- Woodhead, L. y Johns, E.W. (1976). *FEBS Lett.* 62, 115.
- Yeoman, L.C.; Olson, M.Q.J.; Nobuhiki, S.; Jordan, J.J.; Taylor, C.W.; Starbuck, W.C. y Busch, H.J. (1972). *J. Biol. Chem.* 247, 6018.
- Zweidler, A. y Cohen, L.H. (1972). *Fed. Proc.* 31: 926.

