

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



TESIS DOCTORAL

**Interacción DNA - historia H1 y sus dominios  
conformacionales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Federico Morán Abad**

Madrid, 2015

TF  
1984  
020

Federico Morán Abad



\* 5 3 0 9 8 6 2 9 0 3 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-044244-1

INTERACCION DNA - HISTONA H1 Y SUS DOMINIOS CONFORMACIONALES

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

20/84

© Federico Morán Abad

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984

Xerox 9200 XB 480

Depósito Legal: M-1619-1984

AUTOR: FEDERICO MORAN ABAD

INTERACCION DNA-HISTONA H1 Y SUS DOMINIOS CONFORMACIONALES

DIRECTOR: Dr. D. Francisco Montero Carnerero,  
Profesor adjunto del Departamento de  
Bioquímica de la Facultad de Ciencias  
Químicas de la Universidad Complutense  
de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Bioquímica

1982



El presente trabajo se ha realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense, bajo la dirección del Dr. D. Francisco Montero Camerero, a quien deseo agradecer su constante ayuda y aliento, así como al Dr. D. Luis Franco Vera por su apoyo y valiosos consejos.

Agradezco igualmente al Prof. D. Angel Martín Muñoz, Director del Departamento, el gran interés demostrado en la realización de este trabajo.

Asimismo a todos mis compañeros de equipo y a todos aquellos que han contribuido a la realización de esta Memoria, mi más sincero agradecimiento.



A todos aquellos  
que no se dedican la Tesis  
a si mismos.



ABREVIATURAS

CM-celulosa	Carboximetilcelulosa
CNBr	Bromuro de cianógeno
CNBS	Fragmento C-terminal de la histona H1 obtenido por rotura con NBS
CTB	Idem con trombina
DC	Dicroísmo circular
DEAE-celulosa	Diethylaminoetilcelulosa
GuCl	Cloruro de guanidinio
Hicc	Histona H1 del díptero <u>Ceratitis capi-</u> <u>tata</u>
Hitt	Histona H1 de timo de ternera
NBS	N-Bromosuccinimida
pb	Par de bases
PCA	Acido perclórico
PMSF	Fluoruro de p-metil-fenil-sulfonilo
PSI	Estructura inducida por polímeros y sal en el DNA
r	Relación proteína/DNA en peso
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSC	Solución salina citrato (NaCl 0.15M, citrato sódico 0.015M)
TCA	Acido tricloroacético
Tm	Temperatura de transición
TRC	Péptido resistente a hidrólisis tripti- ca controlada de histona H1
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
u	unidades de DC (grados $\times$ cm <sup>2</sup> / decimol)
UV	Ultravioleta



**INDICE**

	<u>Página</u>
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1. ESTRUCTURA DE LA HISTONA H1 .....	2
1.1.1. Estructura primaria de las histonas H1 .....	3
1.1.2. Estructuras secundaria y terciaria de la histona H1 .....	5
1.1.3. Modificación de la estructura secundaria y ter- ciaria de la histona H1 como consecuencia de la nitración .....	10
1.2. H1 Y ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	
1.3. AGREGACION DE LA H1 DEL DIPTERO CERATITIS CAPITATA POR PUENTES DISULFURO .....	16
1.4. ESTRUCTURA PSI DEL DNA .....	17
1.4.1. Antecedentes .....	17
1.4.2. Inducción de estructura PSI por histona H1 .....	19
1.4.3. Contribución de estructura PSI en cromatina ....	21
1.5. ESTUDIOS DE DESNATURALIZACION TERMICA .....	24
1.5.1. Desnaturalización térmica de nucleoproteínas ...	25
1.5.2. Modelos semiempiricos de transición hélice-cade- na de DNA unido a ligandos. Estudio particular de estas proteínas .....	29
1.5.2.1. Antecedentes .....	29
1.5.2.2. DNA unido a ligandos .....	32
1.6. DIRECCION DE LA INVESTIGACION REALIZADA .....	34
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	36
2.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS PROTEINAS UTILIZA- DAS .....	37
2.1.1. Histonas H1 .....	37

	<u>Página</u>
2.1.2. Obtención de los TRCs .....	39
2.1.3. Obtención de los fragmentos CNBS .....	39
2.1.4. Obtención de los fragmentos CTB .....	40
2.1.5. Obtención de las fracciones oxidadas de Hicc .....	41
2.2. AISLAMIENTO DE DNA DE TIMO DE TERNERA .....	42
2.3. FORMACION DE COMPLEJOS DNA-PROTEINA .....	43
2.3.1. Con DNA de gran tamaño .....	43
2.3.2. Con DNA sonicado .....	45
2.4. DIGESTION CON NUCLEASA DE COMPLEJOS HI-DNA .....	45
2.5. TECNICAS ESPECTROSCOPICAS .....	46
2.5.1. Espectroscopía de absorción .....	46
2.5.2. Dicroísmo circular .....	46
2.6. DESNATURALIZACION TERMICA .....	47
2.7. TECNICAS ANALITICAS .....	48
2.7.1. Electroforesis .....	48
2.7.2. Análisis de aminoácidos .....	48
2.7.3. Cromatografía centrífugada en DEAE-celulosa .....	49
2.7.4. Análisis de RNA y proteína .....	50
2.7.5. Cálculo de concentración de DNA y proteína en com plejos .....	51
2.8. TRATAMIENTO AUTOMATICO DE DATOS .....	52
2.8.1. Cálculo de la hipercromicidad y curva derivada de las curvas de desnaturalización térmica .....	52
2.8.2. Descomposición en gaussianas .....	53
2.8.3. Ajuste de las curvas cinéticas mediante exponencia les .....	54
2.8.4. Ajuste teórico de las curvas de transición térmica .....	55
2.8.4.1. DNA libre .....	55
2.8.4.2. DNA-ligando .....	57

	<u>Página</u>
3. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	60
3.1. MATERIALES UTILIZADOS .....	61
3.2. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LOS COMPLEJOS DNA-PROTEINA ..	68
3.2.1. DNA-histona H1 .....	68
3.2.1.1. Complejos con H1 nativa .....	69
3.2.1.2. Complejos con H1 nitrada .....	82
3.2.1.3. Digestión triptica del complejo .....	83
3.2.2. Complejos DNA-dominios estructurales de la histona H1 .....	88
3.2.2.1. Complejos con la región C-terminal .....	88
3.2.2.2. Complejos con la región globular .....	94
3.2.3. Complejos DNA-agregados de Hlcc .....	99
3.3. ESTUDIOS CINETICOS DE LA FORMACION DE ESTRUCTURA PSI ..	100
3.3.1. Complejos con H1 y dominios conformacionales .....	113
3.3.2. Complejos con Hlcc y agregados .....	118
3.4. DIGESTION CON NUCLEASA DE COMPLEJOS DNA-CNBS .....	119
3.5. DESNATURALIZACION TERMICA DE LOS COMPLEJOS.....	120
3.5.1. Histona H1 nativa .....	129
3.5.2. Dominios estructurales de la histona H1 .....	133
3.5.3. Histona Hlcc y agregados .....	140
3.6. AJUSTE DE LAS CURVAS DE TRANSICION TERMICA .....	151
3.6.1. Cálculo de los parámetros termodinámicos y de coo- peratividad del DNA utilizado .....	151
3.6.2. Ajuste de los complejos DNA-TRC .....	154
4. <u>CONCLUSIONES</u>	158
5. <u>APENDICE</u>	163
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	166

1. INTRODUCCION

### 1.1. ESTRUCTURA DE LA HISTONA H1

Mientras que el papel estructural de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 o histonas internas (Isenberg, 1976) está perfectamente establecido en la actualidad (Felsenfeld, 1978), resultando necesarias para el mantenimiento de la estructura del "core" nucleosomal (Finch et al., 1977), el papel preciso de la histona H1 no se conoce aun, aunque generalmente se le ha relacionado con el DNA internucleosomal (Noel y Kornberg, 1977). Asimismo, en la actualidad se acepta que la histona H1 proporciona una mayor compactación de los nucleosomas en la fibra de la cromatina (Littan et al, 1965; Bradbury et al, 1973; Finch y Klug, 1976; Renz et al, 1977); pero a pesar de los intentos hechos con el fin de dilucidar el modo de unión de la H1 al DNA en la fibra de cromatina (Vogel y Singer, 1976; Christiansen y Griffith, 1977; Gaubat et al, 1977; Thoma et al, 1979; Boulikas et al, 1980 y Allan et al, 1980), este aspecto permanece aun poco claro. Aunque normalmente se acepta la existencia de una molécula de H1 por nucleosoma (Kornberg, 1974; Varshavsky et al, 1976; Hayashi et al, 1978), en núcleos de eritrocito de pollo, que contiene tanto H1 como H5, se obtienen relaciones de 1.3 moléculas por nucleosoma, pareciendo indicar que todos los nucleosomas poseen H5 y además, alrededor del 30% contiene también H1, quizá unido a un segundo sitio de baja afinidad (Bates y Thomas, 1981). En próximo apartado se hará una discusión más exhaustiva de la posible participación de la histona H1 en la estructura de la cromatina. No cabe duda que la estructura de la molécula resulta un aspecto clave para comprender su función. En los últimos años se ha desarrollado mucho este estudio. Trataremos de hacer un breve resumen de los aspectos más interesantes del mismo.

### 1.1.1. Estructura primaria de las histonas H1.

Del conjunto de las histonas, las pertenecientes al "core" nucleosomal o histonas internas, de menor tamaño que la H1, fueron las primeras en ser secuenciadas (Delange et al, 1969; Ogawa et al, 1969; Delange et al, 1972; Olson et al, 1972; Iwai et al, 1972; Ycoman et al, 1972; Santière et al, 1974). Un hecho que resulta bastante llamativo es la gran conservatividad que presentan estas histonas en los distintos materiales en los que se conoce su estructura primaria.

La H1 se secuenció con posterioridad. Además de presentar dificultades para este estudio algunas regiones de la molécula, posee diferentes subfracciones, incluso dentro de un mismo tejido, hecho que también entorpece su secuenciación.

Los primeros datos precisos sobre estructura primaria de histona H1 se realizaron sobre la subfracción ATL3 de timo de conejo (Bustin y Cole, 1969; Hall y Cole, 1971; Cole, 1977). Casi simultáneamente se consiguió conocer también la secuencia de la histona H1 de testículo de trucha (McLeod et al, 1977).

Parece bastante claro, realizando un estudio comparativo de las anteriores secuencias, la existencia en la molécula de H1 de tres regiones claramente diferenciadas. La región N-terminal, que comprende aproximadamente 40 residuos, posee un alto contenido de lisina y prolina. Este fragmento difiere bastante de unas subfracciones a otras. A continuación viene una región, de aproximadamente 80 residuos (del 40 al 120) en mamíferos, y que contiene la mayoría de los residuos hidrofóbicos de la molécula (Jones et al, 1974; Isenberg, 1979). Esta región parece la más conservativa, tanto en tamaño como en secuencia. Por último, la región C-terminal, que contiene el resto de los aminoácidos (aproximadamente 100 residuos), es la parte más básica, y con péptidos del tipo Pro-Lys-Lys-Pro y Pro-Lys-Lys-Ala que se repiten con relativa frecuencia a -

lo largo de su estructura (Cole, 1977). Esta región, como cabe esperar por su basicidad, se une fuertemente al DNA (Bradbury et al, 1973). Estas conclusiones se vieron reforzadas cuando el estudio se extendió a las moléculas de H1 de invertebrados, concretamente la histona  $\phi$  de equinodermo (Palau et al, 1969, Strickland et al, 1976 y 1980 a; Strickland et al, 1980 b) y la histona H1 Psammechinus miliaris (Schaffner et al., 1978) y del maiz Zea mays (Hurley y Stout, 1980).

Estas características estructurales también se encuentran en la histona que sustituye parcialmente a la H1 en eritrocitos de ave, denominada H5 (Champagne et al., 1967 y 1968), en los materiales en los cuales se ha estudiado (Yaguchi, 1979; Garel et al., 1975; Brian et al., 1980).

También se han llevado a cabo estudios parciales sobre la estructura primaria de la histona H1 de Ceratitidis capitata (Barbero, 1981 y 1982). La secuencia de un fragmento de 27 residuos de la parte central de la molécula pone de manifiesto la semejanza de esta región con la homóloga de H1 de embrión y esperma de erizo de mar. Sin embargo existen mayores diferencias con respecto a la H1 de mamíferos. Hay que destacar la presencia, en este caso, de cisteína en esta región central (Barbero et al., 1980). Además de en Ceratitidis capitata también se ha descrito su presencia en H1 de Drosophila melanogaster (Rodríguez- Alfageme et al., 1974).

Resumiendo, la histona H1 es sin duda la más variable de todas las histonas, poseyendo tres dominios estructurales claramente definidos, de los cuales el central, que contiene la gran mayoría de los residuos hidrofóbicos de la molécula, es el más conservativo.

### 1.1.2. Estructura secundaria y terciaria de la histona H1.

También desde el punto de vista de su estructura secundaria y terciaria la histona H1 posee grandes diferencias con respecto a las histonas internas, lo que es un claro reflejo de su peculiar estructura primaria, comentado en el apartado anterior.

Las transiciones conformacionales inducidas al aumentar la fuerza iónica del medio producen un menor porcentaje de estructura secundaria ordenada (estructura  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ ), que las otras cuatro histonas (Bradbury et al., 1965; Jirgerson y Hnilica, 1965; Bradbury et al., 1967). La histona H1 de insecto se comporta a este respecto de forma similar a la de mamífero (Barbero et al., 1980) y también a la H5 de eritrocitos de ave (Willians y Selgy, 1973).

Estudios posteriores, realizados exhaustivamente sobre H1 de timo de ternera y H5 de eritrocito de pollo, fundamentalmente mediante DC y FMN, revelaron la existencia de estructuras plegadas específicamente, de forma similar a como lo hacen las proteínas globulares, en la región 40-115 de H1 de timo. Esta estructuración se provocaba al aumentar la fuerza iónica del medio o el pH (Bradbury et al., 1975a). Toda la estructura ordenada detectada correspondía a  $\alpha$ -hélice, no siendo aparente la presencia de estructura  $\beta$  (Bradbury et al., 1965, Guillot et al., 1977). A la vista de la secuencia de esta región se puede predecir teóricamente que las regiones de  $\alpha$ -hélice comprenden los fragmentos 42-55 y 58-75 (Lewis y Bradbury, 1974). La histona H1 de esperma de erizo de mar se comporta de forma similar a la H1 de mamífero, frente a cambios de fuerza iónica y pH (Puigdomenech et al., 1975).

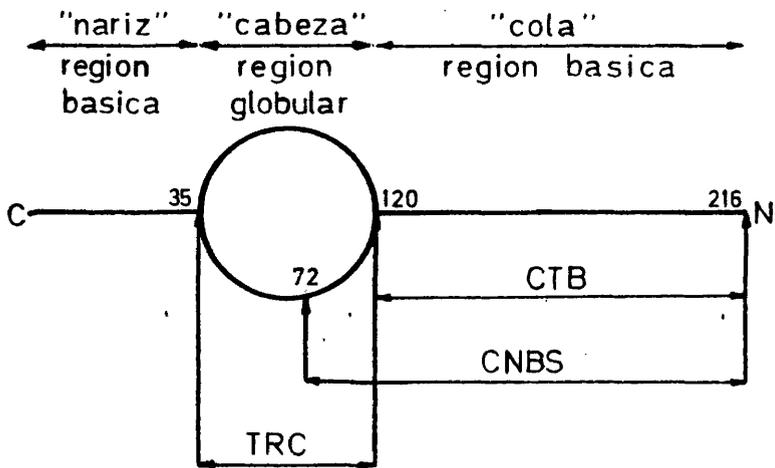
Los diferentes métodos de fragmentación, química y enzimática, de que se dispone actualmente han hecho posible un estudio más exhaustivo de la estructura tridimensional de la H1. Así, la digestión controlada con quimotripsina da lugar a dos péptidos (1-106 y 107- C-terminal), que fueron estudiados por FMN y DC (Bradbury et al., 1975b). Mientras que

el péptido correspondiente a la parte N-terminal de la molécula era capaz de estructurarse al aumentar la fuerza iónica, el correspondiente a la parte C-terminal no lo hacía, poseyendo en cambio una alta capacidad para interaccionar con el DNA.

Por otra parte la digestión con trombina, que rompe preferentemente en la región Pro<sup>119</sup> - Lys - Lys - Ala<sup>122</sup>, proporciona de nuevo dos péptidos para realizar estos estudios estructurales (Chapman et al., 1976). La totalidad de la estructura de  $\alpha$ -hélice se encuentra en el fragmento N-terminal (1-122), mientras que el otro fragmento no posee prácticamente estructura ordenada. La transición, tanto en la molécula intacta como en el péptido N-terminal, según los experimentos realizados por Bradbury et al. (1975a), con el pH resulta no cooperativa; aunque Smerdon e Isenberg, (1976) por el contrario obtienen un 100% de cambio estructural en un estrecho margen de pH. Los resultados sobre H1 de Ceratitis capitata y timo de ternera obtenidos por Barbero et al. (1980) confirman estos últimos resultados. Siguiendo una estrategia semejante de fragmentación, se ha realizado un estudio similar con histona H5, en este caso con rotura específica con CNBr y NBS, fundamentalmente, llegándose a conclusiones parecidas (Crane-Robinson et al., 1976).

La digestión controlada de H1 de timo de ternera con tripsina, en alta fuerza iónica (en cuyo medio la molécula se encuentra estructurada al máximo) da lugar a un péptido límite resistente a la digestión, que corresponde a la región 35-120 de la molécula, y que es capaz de adquirir una estructura globular en condiciones de pH y fuerza iónica fisiológicas (Hartman et al., 1977). Este fragmento contiene el total de la estructura ordenada de la molécula. Estos autores propusieron, a la vista de estos datos, la disposición espacial de los distintos dominios estructurales de la histona H1 mostrados en la Figura 1.

Posteriormente se han conseguido péptidos semejantes en H5 de eritrocito de pollo (Avilés et al., 1978) y en el díptero Ceratitis ca-



**Figura 1.** Modelo esquemático de la histona H1 de timo de ternera, con los tres dominios estructurales (Hartman et al., 1977) y los fragmentos utilizados para la formación de los complejos (Chapman et al., 1976).

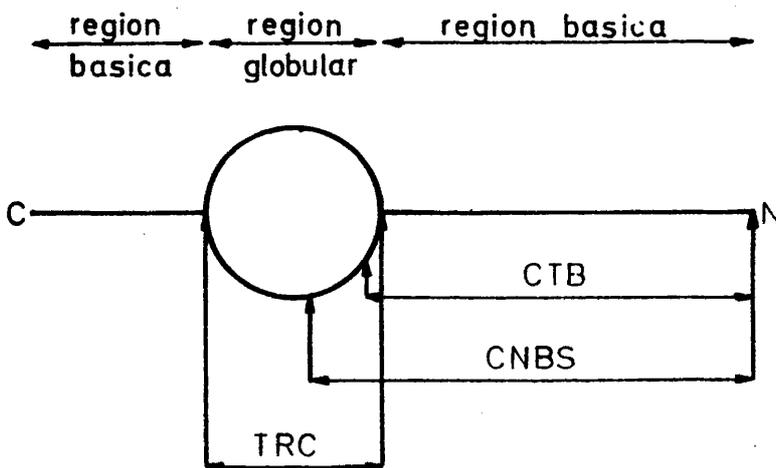
pitata (Barbero et al., 1980). El estudio detallado del primero por RMN (Chapman et al., 1978a y 1978b) y por dicroísmo circular y espectroscopia de diferencia del segundo (Barbero et al., 1980) conducen a idénticas conclusiones. También se han obtenido resultados semejantes con la histona H1 de esperma de erizo de mar (Puigdomenech et al., 1980). El estudio microcalorimétrico de esta región (Tiktopulo et al., 1982) realizado sobre H1 y H5 de eritrocito de pollo, nuevamente confirma la idea de que el fragmento obtenido con este tipo de digestión controlada es un dominio completamente compacto y es la única región completamente plegada de la molécula. Parece, por tanto, que esta disposición estructural en las histonas H1 es bastante general.

Existen en la región globular de la histona H1 (denominada también como TAC) de Ceratitidis capitata algunas peculiaridades, como es la presencia de cisteína, metionina y dos residuos de tirosina, a diferencia del único que posee la homóloga de timo de ternera. Una de estas tirosinas se encuentra orientada hacia el exterior de la molécula, mientras que la otra es completamente similar a la de timo de ternera estando rodeada de residuos apolares (Barbero et al., 1980).

Aunque, como se ha dicho, la totalidad de la estructura ordenada se encuentra en el péptido TAC, las regiones C y N-terminales deben tener un efecto modulador de esta estructura, ya que parece que la misma se relaja al privar a la molécula de dichas regiones (Giancotti et al., 1981; Barbero, 1981; Morán et al., manuscrito en preparación).

La aplicación de todas estas técnicas (digestión controlada con tripsina, digestión límite con trombina, y roturas específicas con CNBr y NBS) sobre la molécula de H1 de Ceratitidis capitata, han permitido aislar distintos péptidos de la molécula. En la Figura 2 se muestra, muy resumidamente, los dominios estructurales que se aíslan con estos procedimientos (Barbero, 1981).

a



**Figura 2.** Modelo esquemático de la histona H1 de Ceratitidis capitata, con los tres dominios estructurales y los fragmentos utilizados para la formación de los complejos (Barbero et al., 1980; Barbero, 1981).

Sin duda la existencia de estos tres dominios estructurales en la molécula de H1 deben de tener una gran importancia en la función que esta histona desempeña en la cromatina. La región globular de la molécula, que como se ha discutido anteriormente es muy conservativa, es posible que esté implicada en interacciones proteína-proteína, sin descartar la posible existencia de interacciones específicas con determinadas estructuras del DNA, tal como DNA superhelicoidal (Vogel y Singer, 1976 y 1976). La modificación covalente de la histona por fosforilación no modifica aparentemente esta especificidad (Singer y Singer, 1978), a pesar de que se había descrito que dicha modificación conduce a la separación de la parte globular de la molécula, y presumiblemente, la región N-terminal (Glotov et al., 1977), aunque también se sabe que la modificación selectiva en la serina 37 no afecta a la interacción (Glotov et al., 1978). Las regiones N y C-terminales, por otra parte, debido a su gran basicidad, tienden a interactuar, se cree que inespecíficamente, con los fosfatos proporcionados por el DNA.

#### 1.1.3. Modificación de la estructura secundaria y terciaria de H1 como consecuencia de la nitración.

El tratamiento de proteínas con tetranitrometano conduce a la nitración específica de las tirosinas que posea la molécula. En cualquier caso, la extensión de la modificación depende de la accesibilidad de los residuos de tirosinas en la molécula. Esta técnica se ha utilizado con frecuencia en el estudio estructural de numerosas proteínas, tales como ribonucleasa (Beaven y Gratzer, 1968), aldolasa (Christen y Riordan, 1968), H1 de timo de ternera (Bustin, 1971; Bradbury et al., 1976) y H1 de Ceratitís capitata y su zona globular (Barbero, 1981).

El grado y velocidad de nitración de las histonas H1 de timo de ternera y Ceratitís capitata depende de las condiciones en las que se lleve a cabo (Barbero, 1981). En condiciones desestructurantes la ni-

tración es más eficiente y rápida que en condiciones estructurantes. De hecho en estas condiciones se puede conseguir la nitración de un único residuo de tirosina (el externo) en H1 de insecto. La modificación de este residuo no provoca pérdida de  $\alpha$ -hélice. En cambio la modificación del residuo interno de tirosina conduce a una pérdida de dicha estructura. Lógicamente, por todo lo dicho anteriormente, la nitración afecta exclusivamente a la zona globular. Será interesante estudiar como esta modificación influirá en la interacción con el DNA.

## 1.2. H1 Y ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

Existe toda una serie de evidencias experimentales que ponen de manifiesto el importante papel que, sin duda, debe jugar la histona H1 en la estructura y función de la cromatina. Como ejemplo, baste citar algunos de estos resultados, los cuales serán comentados posteriormente con mayor detalle. Así, la cromatina desprovista de H1 muestra una mayor actividad transcripcional "in vitro" (Simpson, 1974b), menor contribución en la transición térmica a altas temperaturas (Reeck et al., 1972) y mayor viscosidad intrínseca (Henson y Walker, 1970 y 1971; Lewis et al. 1976).

Los experimentos de digestión de cromatina con nucleasas han arrojado bastante luz sobre la posible localización y papel de la histona H1 en la cromatina. La digestión de cromatina con nucleasa micrococcal proporciona cuatro intermediarios en su curso. El primero de ellos corresponde a octanucleosomas, que poseen una estructura compacta (Hozier et al. 1977). En segundo lugar aparece una partícula cuyo tamaño es variable dependiendo del organismo (185-205 pares de bases de DNA) que se denomina nucleosoma (Noll, 1974; Axel, 1975; Sollner et al., 1975; Shaw et al., 1976; Noll y Kornberg, 1977). Esta partícula contiene el octámero de histonas internas y una molécula de H1 o H5. Conforme progresa la digestión apare-

ce otro fragmento, de 160 pares de bases, que continua poseyendo , en la misma proporción, todas las histonas del nucleosoma ( Varshavsky et al., 1976; Whitolck y Simpson, 1976; Bakayev et al., 1977; Todd y Ganard, 1977; Noll y Kornberg, 1977). A este fragmento se le denominó "cromatosoma" (Simpson, 1978). Este es el mínimo fragmento de cromatina capaz de seguir manteniendo unida H1 y muestra una longitud muy constante, independiente del organismo del que se extraiga ( Morris, 1976; Noll, 1976; Lohr et al. 1977). Por último aparece un fragmento límite, de 140 pares de bases, también constante en tamaño, que unicamente posee el octámero de histonas internas, denominado "core" nucleosomal. Se cree que los 20 pb de exceso del cromatosoma con respecto al "core" se distribuyen en fragmentos de 10 pb a cada extremo de este último (Simpson, 1978).

Como consecuencia de una variación en la fuerza iónica se pueden inducir importantes cambios en la estructura de la cromatina. De hecho, al aumentar ésta se produce una condensación, que ocurre tanto en presencia como en ausencia de H1. No obstante, el grado de condensación y aspecto en microscopía electrónica que ofrecen ambas preparaciones son distintos (Thoma et al, 1979). En la condensación deben influir aspectos diferentes, ya que , tal como mostró Vollenwheider (1975) también es posible inducir condensación en DNA libre al aumentar la fuerza iónica. De lo que no cabe duda es que la H1 también ha de jugar un papel importante en estos cambios.

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriormente descritos, Thoma et al. (1979) propuso un modelo sobre la localización de la H1 en el nucleosoma, según el cual esta histona estabilizaría 20 pb del DNA en el cromatosoma, y al formar grados superiores de organización, como el solenoide, pasaría a una localización interna del mismo. Esta posible localización interna ha sido detectada por diversas técnicas (Chalkley y Hunter, 1975; Olin y Wright, 1973; Thomas y Kornberg, 1975).

Además debe existir una proximidad espacial entre la H1 y algunas de las histonas del core, ya que ha sido posible obtener, por técnicas de reticulación covalente en cromatina nativa, dímeros de H1-H2A (Bonner y Stedman, 1979), H1-H2B, H1-H3 (Mardison, 1977) y polímeros H1-H3-H4 (Glotov et al., 1978), demostrándose posteriormente que la posible interacción entre estas moléculas se realizaba por sus zonas globulares (Boulikas et al., 1980).

A la hora de localizar los distintos dominios estructurales de la molécula de H1 en el cromatosoma, resultaron muy interesantes los experimentos de Allan et al. (1980) utilizando distintos fragmentos de la molécula de histona, confirmandose en parte los anteriores resultados. Experimentos más recientes (Ishimi et al., 1981) muestran que la región N-terminal de la molécula de H1 obtenida por digestión con trombina ocupa y protege de la digestión con nucleasa micrococcal alrededor de 20 pb del DNA espaciador internucleosomal o "linker"; mientras que el fragmento C-terminal restante protege la digestión del DNA del "core" nucleosomal. Ha bida cuenta que la región N-terminal contiene prácticamente toda la zona globular de la molécula, estos resultados contradicen, en parte, lo anteriormente expuesto.

A partir de diversos hechos experimentales Belyavsky et al. (1980) elaboró un modelo en el cual las histonas internas se distribuyen de forma análoga que en el "core" nucleosomal, pero con un desplazamiento en sus puntos de unión al DNA de 10 nucleótidos en ambas cadenas a partir del extremo 5'-terminal del cromatosoma. Las histonas internas sufren una expansión de modo que llegan a ocupar la longitud total del mismo. La histona H1 se une principalmente a los extremos del DNA del cromatosoma, aunque también lo hace a otras diversas regiones de 4 pb, con una periodicidad de 10. Esta disposición explicaría la obtención de complejos de reticulación con otras histonas del "core", como se comentó anteriormente.

La ordenación lineal en cuentas de collar a que da lugar la sucesión de nucleosomas, con un diámetro de  $100 \text{ \AA}$ , es únicamente un primer nivel estructural de la fibra de cromatina. Su condensación posterior origina otros niveles estructurales superiores, teniendo lugar como consecuencia un mayor empaquetamiento del DNA.

Es posible observar, en determinadas condiciones, filamentos de  $300 \text{ \AA}$  de diámetro (Du Praw, 1966), posiblemente originados por pliegamientos del filamento fino (Ris, 1975). La histona H1 parece tener un papel muy importante en la formación y estabilización de estas estructuras (Noll y Kornberg, 1977; Henson y Walker, 1970; Lewis et al., 1976). Además de la presencia de H1, la fuerza iónica también resulta crítica para la formación de estos filamentos (Olins y Olins, 1974). Los datos de microscopía electrónica (Finch y Klug, 1976) y de dispersión de neutrones (Carpenter et al., 1976) sugieren una disposición solenoidal de esta estructura, con un número de seis nucleosomas por vuelta como el más aceptado, como reflejan los estudios de birrefringencia eléctrica realizados por Marion y Roux (1978). Aunque la orientación de los nucleosomas no se conoce con seguridad, los resultados de McGhee et al (1980) sugieren una disposición ortogonal.

Un modelo alternativo al del solenoide es el de los "superbeads", agrupaciones de ocho nucleosomas que dan lugar a partículas discretas de aspecto globular. De hecho estas unidades se ponen de manifiesto en el tratamiento de cromatina con nucleasas específicas de DNA monocatenario (Fujimoto et al, 1979) y la existencia de una pausa en la digestión con nucleasas (Hozier et al, 1977) en la cual se liberan partículas de estas características, como se comentó anteriormente. De hecho hay que recalcar el posible papel de la H1 en el mantenimiento de esta estructura, ya que la afinidad de polinucleosomas por H1 se incrementa al aumentar la longitud de éstos, llegando a un valor máximo para el octanucleosoma (Renz et al., 1977; Campbell et al., 1978).

Schmith y Ramanathan (1980) proponen un nivel terciario de organización para la fibra solenoidal, en la cual tendría nuevamente un papel fundamental la presencia de H1 y su afinidad por zonas ricas en AT, zonas que por otra parte no están distribuidas al azar, sino que se encuentran concentradas en los espacios internucleosomales. Esta organización daría lugar a una hélice de 1000 Å de espesor, comprendiendo cada vuelta de esta hélice doce de las del solenoide.

Los estudios realizados sobre complejos H1-DNA y cromatina han contribuido también al conocimiento sobre el posible papel de la H1 en la estructura de la cromatina. Así, la H1 solamente induce compactación en los polinucleosomas a relativamente altas concentraciones de sal (Müller et al., 1978; Renz et al., 1977) lo que no ocurre a baja fuerza iónica. Paralelamente a estas observaciones sobre el efecto de la unión de H1 a regiones de DNA espaciador en polinucleosomas, resultan bastante informativos los experimentos sobre complejos H1-DNA en ausencia de otras histonas (Renz y Day, 1976). En este sistema, también la fuerza iónica resulta una variable crucial. A baja fuerza iónica, las moléculas de H1 se unen no cooperativamente al DNA, y además la molécula no discrimina entre trozos ricos en AT y GC. Por el contrario, a altas concentraciones de sal, las moléculas de H1 se unen cooperativamente y selectivamente al DNA, formando en este caso estructuras compactas, visualizadas por microscopía electrónica como formas toroidales (Olins y Olins, 1971; Cole et al., 1977). Cuando se neutralizan las cargas del DNA en un 90% aparecen también estructuras toroidales con un radio interno de 150 Å (Wilson y Bloomfield, 1979). Estas estructuras, inducidas tanto por H1 como por neutralización de cargas, aparecen muy estables (Olins y Olins, 1971; Haynes et al., 1970; Cole et al., 1977; Chatteraj et al., 1978 y Wilson y Bloomfield, 1979).

Cole et al (1977) proponen que la neutralización de cargas del DNA provocada por la H1 transforma las moléculas de DNA en sustancias hidrofóbicas, lo cual conduciría a la forma geométrica que adoptan los

agregados. No obstante existen suficientes datos como para hacer pensar que esto no es así. Por ejemplo, los complejos de polilisina-DNA se encuentran altamente solvatados (Shapiro et al., 1969) y el efecto de la adición de disolventes orgánicos no afecta a los espectros de DC de la forma que lo haría si hubiera interacciones hidrofóbicas implicadas (Fasman et al., 1970).

Glotov et al. (1978) y Manning et al. (1979) confirmaron estos resultados y discutieron el importante papel que la fuerza iónica posee en el efecto de la H1 sobre la coformación del DNA, lo que explicaría en parte el comportamiento estructural de la cromatina sometida a los cambios de fuerza iónica discutidos anteriormente.

### 1.3. AGREGACION DE LA H1 DEL DIPTERO CERATITIS CAPITATA POR PUENTES DISULFURO

Tal como se ha comentado anteriormente la H1 de Ceratitis capitata posee en su molécula cisteína (Franco et al., 1974). Este hecho capacita a dicha molécula para formar agregados en condiciones desnaturizantes por formación de puentes disulfuro. Estos agregados se pueden aislar por cromatografía en Biogel (Franco et al., 1977). Recientemente se ha realizado un estudio riguroso sobre estas especies moleculares (Morán et al., manuscrito en preparación) comprobándose que aparecen tres productos fundamentales como consecuencia de la oxidación, que se separan en Biogel en tres fracciones fundamentales, denominadas BG1, BG2 y BG3. La BG1 está formada por multímeros de alto peso molecular y posee dos residuos de cisteína por molécula de H1. La fracción BG2 está formada por dímero de H1, y solo posee un residuo de cisteína; y por último, la fracción BG3 se trata de monómero con dos residuos de este aminoácido. Cuando BG3 se somete de nuevo a condiciones oxidantes, no agrega, por lo que se supone que está formando puentes disulfuros intramoleculares. Esta suposición

se ve confirmada por el hecho de que al reducir y reoxidar dicha fracción da lugar nuevamente a BG1.

Como consecuencia de la agregación y oxidación de H1 tienen lugar ligeras modificaciones estructurales, que se ponen de manifiesto por distintas técnicas. Así, mientras BG3 prácticamente no modifica el contenido  $\alpha$ -hélice, tiene lugar un ligero aumento de la misma en BG1 y BG2. En cambio, los espectros de DC en el UV próximo de las distintas fracciones indican que no debe existir variación en el entorno de las tirosinas, si bien la digestión controlada con tripsina, en condiciones idénticas a las realizadas para H1 nativa (Barbero et al, 1980) de BG1 y BG2, no dan lugar a fragmento límite semejante al TFC, aunque sí aparece dicho péptido con BG3.

Todos estos hechos llevan a concluir que la agregación de la histona H1 de Ceratitis capitata por puentes disulfuro y la formación de puentes disulfuro intracatenarios dan lugar a modificaciones estructurales de la misma, que sin duda tendrán su transcendencia en la interacción entre esta histona y el DNA. Cual sea la transcendencia de esta modificación se desconoce por el momento. Sin embargo, existen en la cromatina de insecto suficientes peculiaridades como para pensar que este hecho pueda jugar un papel real en la estructura y /o función del material genético.

#### 1.4. ESTRUCTURA PSI DEL DNA

##### 1.4.1. Antecedentes.

Se había observado que el DNA de alto peso molecular, en presencia de polímeros neutros y a ciertas fuerzas iónicas, daba lugar a transiciones cooperativas en su estructura, originándose configuraciones moleculares compactas (Lerman, 1971) que variaban su coeficiente de sedi

mentación. Utilizando mayores concentraciones de DNA se pueden apreciar también cambios en las mismas condiciones, en el espectro de DC del complejo (Jordan et al, 1972). En estos experimentos, en los cuales se utilizó óxido de polietileno (PEO), se perdía completamente el espectro de DC conservativo del DNA, apareciendo una banda de elipticidad negativa sobre los 275 nm, con valores de elipticidad molar o residuo de -120000. Jordan et al (1972) denominaron a esta estructura del DNA estructura PSI (Polymer-Salt-Induced structure). Adler y Fasman (1971) sugirieron que el DNA, en estas condiciones, proporcionaba agregados que poseían algún tipo de estructura periódica aunque asimétrica. También, mediante estudios de fluorescencia y microscopía, Lerman (1973) propuso una disposición de moléculas paralelas para esta estructura. Posteriormente Sipski y Wakner (1977) demostraron que, en los complejos con PEO, el DNA disponía sus fibras en haces paralelos, arracimados, rodeados por el polímero en cuestión. Es decir, no necesariamente se pierden las características de estructura B del DNA en esta situación, si bien da lugar a modificaciones espectrales, tal es el caso del DC, bastante drásticas.

Los estudios de difracción de RX sobre complejos de polilisina-DNA (Haynes et al, 1970; Carroll, 1972 y Zama, 1974) y sobre núcleos histonas (Wilkins et al, 1959; Zubay y Wilkins, 1962 y 1964, y Pardon et al, 1967), y de dispersión de luz de PEO-DNA (Maniatis, 1971) muestran que, en efecto, la estructura B del DNA se sigue conservando en los complejos. Los espectros Raman de nucleosomas aislados (Goodwin y Brahms, 1978) y de difracción de rayos X sobre fibra de cromatina (Bram, 1971) confirman la anterior afirmación.

Los estudios cinéticos realizados también por Jordan et al (1972) sobre estos complejos, aunque muy poco detallados, permiten concluir que existen dos etapas fundamentales en la formación de esta estructura. La primera de ellas consiste en el paso de fibras extendidas de DNA unidas al polímero a una estructura compacta, pero desordenada. Posteriormente

te existe una transición a una estructura también compacta, pero ordenada, del complejo. Estos dos pasos, lógicamente, dependen críticamente de la concentración de DNA, PEO y sal existentes.

Estructuras bastantes semejantes a las descritas también se habían encontrado en disoluciones concentradas de DNA dispuestas en películas muy estrechas en las cuales se disminuye mucho la humedad relativa (Junis-Schneider y Maestre, 1967), y complejos de DNA con polilisina Shapiro et al 1969; Cohen y Kidson, 1968).

#### 1.4.2. Inducción de estructura PSI por histona H1.

Parece bastante claro hoy día la diferencia existente entre la H1 y el resto de las histonas en su capacidad de modificar la estructura del DNA (Tallinder et al, 1979). Los primeros estudios de DC realizados por Fasman et al (1970) sobre complejos de DNA y H1 de timo de ternera pusieron de manifiesto, en determinadas condiciones de concentración de DNA, fuerza iónica y relación H1/DNA, la pérdida del espectro conservativo del DNA. Concretamente, a concentraciones moderadas de sal (NaF 0.14M) y conforme aumenta  $r$  (relación H1/DNA), la banda de elipticidad positiva a 275 nm decrece, la banda a 245 nm incrementa su magnitud y ambas se desplazan al rojo, teniendo lugar otras alteraciones a longitudes de onda inferiores. Sin embargo estos efectos no se observan cuando la concentración de sal es baja (NaF 0.01M). A  $r=3$  (residuos de proteína/residuos de DNA), en NaF 0.14M, aparece una banda negativa a 270 nm con un valor de elipticidad molar por residuo de DNA de aproximadamente -100000. Estos cambios en DC no tienen reflejo en el espectro de absorción, que permanece prácticamente inalterado. Por tanto existen tres factores fundamentales que influyen en la formación de esta estructura: relación H1/DNA, concentración de DNA y fuerza iónica.

Posteriormente se ha visto que las distintas subfracciones

de H1 poseen diferente capacidad de inducir este tipo de estructura. Concretamente se han ensayado las cuatro subfracciones de H1 de conejo (RTL1, RTL2, RTL3 y RTL4), observándose apreciables diferencias entre ellas (Welch y Cole, 1979). Las diferentes subfracciones de H1 presentan una variación de hasta el 35% en la parte N-terminal de su molécula (residuos 1-4) (Hall y Cole, 1971). Estas diferencias pueden originar una diversidad de interacciones de las diferentes subfracciones al DNA. Además, Fasman et al (1972) sugirieron que precisamente esta región modulaba en cierto modo la interacción de la parte C-terminal de la molécula.

También la modificación covalente de H1 puede influir apreciablemente en su capacidad de inducción de estructura PSI. Así, tanto la fosforilación (Adler et al, 1971), como la maleilación (Burnotte et al, 1973) de la H1 disminuyen dicha capacidad.

Debido a la alta proporción de lisina en la molécula de H1 se pensó que el estudio con polipéptidos sintéticos podía orientar sobre la influencia de estos residuos en las variaciones conformacionales del DNA, así como la influencia de otros residuos, también abundantes en dicha región. Con este fin, Ong et al (1976) estudiaron los complejos de DNA con poli (Lys<sup>x</sup>, Leu<sup>x</sup>), poli(Lys<sup>x</sup>, Leu<sup>y</sup>) y poli (Lys). La mayor capacidad de inducción de estructura PSI se encontró en el péptido (Lys<sup>84</sup>, Leu<sup>16</sup>), que es incluso mayor que el provocado por poli (Lys), pareciendo como si la leucina potenciara esta capacidad. Sin embargo, esta capacidad potenciadora existe únicamente cuando la leucina se encuentra intercalada entre lisinas. Si, por el contrario, existen zonas ricas en lisinas y otras en leucinas, dicho efecto desaparece, llegando incluso, cuando la cantidad de leucina es apreciable en el péptido, a aparecer algo de estructura A en el DNA. La utilización de otros péptidos sintéticos, tales como poli (Lys<sup>x</sup>, Val<sup>y</sup>) y poli (Lys<sup>x</sup>)-(Val<sup>y</sup>) no muestran el efecto anteriormente mencionado (Mandel y Fasman, 1976).

De los distintos resultados anteriores parece claro que, de todas las histonas, la H1 es la única capaz de inducir estructura PSI en el DNA, y es su alto contenido en lisina lo que le confiere esta característica.

#### 1.4.3. Contribución de estructura PSI en cromatina.

Aunque, tal como se vio, la estructura secundaria del DNA no se ve profundamente afectada como consecuencia de su integración en cromatina, sí lo hace el espectro de DC. Por ejemplo, el espectro de DC de partículas "core" nucleosomal, está significativamente alterado con respecto al del DNA libre (Ramsay-Shaw et al., 1974; Mandel y Fasman, 1976b; Whitlok y Simpson, 1976; Olins et al., 1977a; Tatchell y Van Holde, 1977; Cowman y Fasman, 1978). Tanto las interacciones histona-DNA como histona-histona, son importantes para mantener esta conformación alterada del DNA (Olins et al., 1977b; Lylley y Tatchell, 1977; Whictlock y Simpson, 1977).

De este modo, aunque la estructura PSI se obtiene fundamentalmente en complejos DNA-H1, también se ha detectado en cromatina. De hecho, el espectro DC de cromatina nativa presenta menor elipticidad a 280 nm que el espectro de DNA libre (Fasman, 1978). La liberación de H1 de nucleosomas aislados, provoca una recuperación parcial del espectro conservativo del DNA (Hjelm y Huang, 1974; McCleary y Fasman, 1980). Por otra parte, al digerir cromatina con tripsina se recupera el espectro conservativo del DNA, coincidiendo precisamente con la digestión de H1, que es la histona más fácilmente degradable (Lilley y Tatchell, 1977). De todas formas la cinética de estos procesos es muy compleja, apareciendo en algunas situaciones transiciones cooperativas (Nieto-Sandoval, 1982). En algunos casos el espectro de DC de cromatina origina bandas de elipticidad negativa sobre los 268 nm, que llegan a alcanzar valores de -50.000

grados  $\times \text{cm}^2 / \text{decimol (u)}$ . Tal es el caso de la cromatina reducida de esperma de equino (Sipki y Wagner, 1977).

El papel del H1 en el mantenimiento de esta estructura PSI en cromatina ha sido, en parte, dilucidado por Cowman y Fasman (1978, 1980). Estos autores realizaron los espectros de DC de cuatro tipos de preparaciones distintas de mononucleosomas. Dichas preparaciones diferían tanto en la longitud media del DNA como en el contenido en proteínas H1 y H5, y su espectro de DC presentaba serias diferencias, en función precisamente de estas variaciones. Posteriormente investigaron por separado la influencia de estos factores, y desde luego la separación de las histonas H1 y H5 regenera en parte el espectro conservativo del DNA, por lo que parece que estas proteínas son las responsables de la posible presencia de estructura PSI en los mononucleosomas, y por tanto en la cromatina. La diferencia de los espectros de DC de nucleosomas con H1 y sin ella, proporcionan un espectro característico de estructura PSI, si bien las elipticidades obtenidas son muy pequeñas en comparación con las que la molécula de H1 por sí sola puede inducir en el DNA en los complejos H1-DNA.

Por otra parte también parece que el tamaño de la región internucleosomal ("linker") también juega un papel importante en la conformación final que adoptan los nucleosomas. Watanabe e Iso (1981) han estudiado este efecto sobre cromatina desprovista de H1, aislada de timo de ternera y han encontrado una fuerte dependencia en este sentido. Por tanto en la formación de estas estructuras no solamente influyen las proteínas unidas al DNA sino el tamaño del mismo.

Tal como se dijo, la separación selectiva de H1 de cromatina provoca un aumento de elipticidad positiva a los 280 nm. Un efecto semejante se observa en mononucleosomas, donde pasa la elipticidad a 283 nm de 4.100 u a 5.200 u, cuando se separan selectivamente H1 y H5

con NaCl 0.6 M (McCleary y Fasman, 1980). Cuando estos mononucleosomas se reconstituyen nuevamente con H1 y H6 se observa un decrecimiento de la elipticidad.

De todo lo dicho parece bastante claro que la cromatina, en sus distintos niveles de complejidad, posee alguna contribución de estructura PSI, y que la H1 es la histona responsable de ella, habida cuenta que es la única que en complejos DNA-histona es capaz de provocarla y que su liberación de la cromatina conduce a cambios espectrales con una pérdida de dicha estructura.

Además, la H1 induce la formación de estructuras sobre el DNA, observables en microscopía electrónica, que el resto de las histonas son incapaces de inducir. Por ejemplo, Cole et al. (1975) encontraron que utilizando DNA de bajo tamaño molecular y altas relaciones H1/DNA (aproximadamente 1.3 moles de aminoácido/moles de fosfato) se formaban unas estructuras que en microscopía electrónica aparecían como pequeños toroides, tal como se dijo en el apartado 1.2. Anteriormente ya se había observado un efecto semejante pero muy minimizado. La longitud media de las circunferencias externas era de alrededor de 1600 Å, muy superior a la longitud mínima de persistencia del DNA, que se calcula sobre 400-900 Å en NaCl 0.2 M (Bloomfield et al., 1974). Sin embargo, hasta la fecha no se ha relacionado la formación de estos agregados con la capacidad de formación de estructura PSI que posee la H1.

Estudios recientes de microscopía electrónica han mostrado que, en condiciones precisas de fuerza iónica y concentración de DNA (0.14 M en NaCl y 0.018 mg/ml), estando el DNA sonificado, la H1 es capaz de inducir estas estructuras de tipo toroidal incluso a relaciones muy inferiores a 0.8 (mg proteína/mg DNA). La utilización de la parte C-terminal de la molécula de H1, obtenida por fragmentación selectiva con NBS, potencia mucho esta capacidad, encontrándose a relaciones de 0.5 prácti-

camente todo el DNA en forma toroidal y mostrándose esta formación cooperativa respecto de la relación, ocurriendo el cambio principal a relaciones comprendidas entre 0.2 y 0.3 (Suau, comunicación personal).

#### 1.5. ESTUDIOS DE DESNATURALIZACION TERMICA

Las interacciones entre las histonas y el DNA son complejas en general y se pueden examinar desde diversos puntos de vista, utilizando distintas técnicas. Acabamos de estudiar como el DC proporciona una información bastante precisa de las mismas, a nivel estructural. Las curvas de desnaturalización térmica han sido, al menos históricamente, otra fuente valiosa de información respecto a estas interacciones.

Como consecuencia de la desnaturalización térmica del DNA, que implica una transición doble hélice-cadena sencilla estadística, se produce una variación en numerosas propiedades físicas de la macromolécula. Uno de estos cambios, fácilmente medible experimentalmente, es la hipercromicidad, que tiene lugar fundamentalmente, como consecuencia de la diferente interacción de apilamiento entre las bases entre una forma y otra (Tinoco, 1960 y 1961; DeVoe, 1965; Felsenfeld y Hirschman, 1965). Esta transición ocurre en un estrecho marco de temperatura (Marmur y Doty, 1962) y por tal motivo también se le suele denominar curva de fusión. La temperatura a la cual se tiene el 50% de DNA nativo y el 50% de DNA desnaturalizado se le denomina temperatura de transición o de fusión ( $T_m$ ) y su valor depende tanto de factores composicionales del propio DNA (composición de bases), como de la fuerza iónica del medio y la asociación de ligandos, tales como proteínas. En este último caso pueden aparecer transiciones polifásicas, cuya interpretación da una valiosa información sobre los complejos. En primer lugar, se hará una ligera revisión de los datos experimentales sobre curvas de transición térmica de nucleoproteínas y

posteriormente se introducirán los conceptos fundamentales de termodinámica estadística aplicados a estos estudios.

#### 1.5.1. Desnaturalización térmica de nucleoproteínas.

Los primeros estudios realizados sobre complejos histona-DNA (Huang et al., 1967) fueron, aunque ilustrativos, poco rigurosos e imprecisos. En otros sistemas más simples, tales como polilisina-DNA y poliarginina-DNA, aparecían curvas de transición bifásicas. La primera transición correspondía al DNA libre y la otra, de temperatura superior, al DNA que interactuaba con el ligando (Tsuboi et al., 1966; Leng y Felsenfeld, 1966; Olins et al., 1967 y 1968; Kawashima et al., 1969). El hecho de que aparecieran dos transiciones bien diferenciadas se interpretó como debido a una cooperatividad en la asociación de estos polipéptidos al DNA, sin embargo, veremos más adelante que esto no tiene porqué ser así.

La estabilización térmica del DNA en forma de nucleohistona refleja la neutralización parcial de las cargas negativas del DNA por moléculas cargadas positivamente. De esta forma se reducirá la repulsión electrostática entre las dos cadenas de la doble hélice, necesitándose temperaturas más altas para su separación. Sin embargo, no sólo la interacción iónica está implicada en la formación de los complejos DNA-proteína, ya que las interacciones hidrofóbicas también pueden tener influencia. Este tipo de interacciones tienen particular interés en el caso de las histonas H3 y H4, son menos intensos para la H2A y H2B y participan muy poco en el caso de la H1 (Bartley y Chalkley, 1972). La importancia de estas interacciones hidrofóbicas tanto en cromatina como en la asociación de polímeros de lisina con el DNA, han sido puestas de manifiesto por Schwartz y Fasman (1979), realizando curvas de transición térmica en presencia de etilenglicol. Lógicamente, si estas interacciones hidrofóbicas tienen real-

mente algún papel, será por medio de las zonas globulares de las moléculas respectivas.

Se puede comprobar, efectivamente, que los diferentes dominios estructurales de las histonas estabilizan de forma distinta el DNA. Así, la rotura específica de H2B con CNBr proporciona dos regiones, una de las cuales (la N-terminal) contiene la mayoría de la zona polar de la molécula y su asociación con el DNA, además de la fusión del DNA libre, proporciona una única fusión de alrededor de 70°C (Li y Bonner, 1971). Aunque previamente se hicieron numerosos experimentos con complejos H1 y DNA (Olins, 1969; Olins y Olins, 1974), los trabajos más recientes han sido realizados por Palau et al. (1977) y Avilés et al. (1978) apareciendo también una bifasicidad. Esta bifasicidad también aparece cuando se utiliza el fragmento C-terminal de la molécula de H1 obtenido por rotura específica con NBS. Sin embargo, estos autores obtienen poca resolución en las curvas debido a que utilizan una relativamente alta fuerza iónica (NaCl 0.14 M). Interpretan la aparición de bifasicidad como un efecto de la posible cooperatividad de la asociación de H1 al DNA. Sin embargo, como se discutirá posteriormente pueden existir otras causas (McGhee, 1976). No obstante Iovcheva y Dessev (1980), encuentran efectivamente, en experimentos de retención en filtros de nitrocelulosa, una interacción cooperativa de la H1 al DNA, en determinadas condiciones de fuerza iónica. Sin embargo, este comportamiento cooperativo se pierde cuando la H1 se encuentra fosforeilada (Knipper et al., 1978).

Además de estos efectos primarios, anteriormente comentados, las interacciones que conducen a la agregación entre complejos de nucleoproteínas, la formación de superenrollamientos de cromatina, etc., también pueden tener un efecto significativo en la estabilización térmica del DNA. Todos estos hechos deben quedar reflejados en las curvas de transición térmica realizadas en cromatina. Los primeros estudios fueron realizados por Bonner (1971) sobre cromatina de guisante donde aparecen curvas multifási-

cas, concretamente con cuatro transiciones (Li y Bonner, 1971), atribuibles a distintas regiones del complejo. La primera transición (Tm1) sería la fusión del DNA libre; la Tm2 es más difícil de asignar, pudiendo deberse o bien a trozos de DNA unidos a proteínas no histonas o trozos cortos de DNA libre entre dos segmentos de DNA unido a histonas. Las Tm3 y Tm4 se asignan al DNA interaccionando con las regiones globulares y polares de las histonas, respectivamente. De hecho, los complejos DNA-histona suelen dar curvas bifásicas (Hwan et al., 1975; Shih y Bonner, 1970; Leffak et al., 1974; Li y Bonner 1971; Ansevin y Brown, 1971; Yu et al., 1976). También los estudios de desnaturalización térmica muestran distintas propiedades de la cromatina en diferentes estados funcionales de la misma, concretamente en fase G1 y fase S. Estos estudios se realizaron sobre células HeLa S-3, indicando la existencia de distintas superestructuras en ambas fases (Dolby et al., 1979).

En la interpretación de los perfiles de desnaturalización térmica de cromatina hay que considerar, por tanto, diversos factores. En primer lugar, las contribuciones de DNA libre espaciador, que conecta los nucleosomas adyacentes. En segundo lugar, la interacción entre los complejos de histonas en los distintos nucleosomas y el empaquetamiento de estos en la cromatina. Las curvas de desnaturalización térmica de cromatina muestran que tan solo existe una pequeña fracción de DNA (aproximadamente 5%) que funde a temperaturas bajas. Esta contribución se desplaza a temperaturas más altas, al aumentar el tamaño del oligómero, llegando a ser a 52-54°C en el pentanucleosoma. Esto indica que existe una pequeña cantidad de DNA que se une debilmente a la partícula central pero que llega a estar protegida cuando es mayor el tamaño del oligómero (Mandel y Fasman, 1977). La banda de más alta temperatura de fusión, Tm4, también aumenta progresivamente en función del tamaño del oligómero, posiblemente debido a una interacción proteína-proteína y/o proteína-ácido nucleico entre nucleosomas adyacentes (Van Holde et al., 1974; Baldwin et al., 1975).

o bien debido al cambio de disposición espacial de la H1 como consecuencia de un cambio estructural.

Si se realiza la desnaturalización térmica de mononucleosomas, se reduce considerablemente la complicación de sus perfiles. Así, las partículas "core" aisladas manifiestan dos transiciones térmicas únicamente ( $T_{m2}$  y  $T_{m3}$ ) (Cowman y Fasman, 1980). La primera transición implicaría cambios estructurales sólo en el DNA de los extremos del "core", correspondiendo aproximadamente a 40 pb (Van Holde et al., 1980). Si se realiza la reconstitución de estas partículas con poli-dAT, se puede demostrar que la fusión de los primeros 40pb pertenecen al DNA de los extremos de las mismas. (Weischet et al., 1978; Simpson, 1979).

Cuando los mononucleosomas aislados de eritrocito de pollo se les separa selectivamente la H1 y H5, sus curvas de desnaturalización térmica también aparecen polifásicas. La primera de las transiciones depende de la longitud del DNA espaciador, por lo que debe corresponder a este fragmento (Cowman y Fasman, 1980). Sin embargo, con los datos obtenidos por desnaturalización térmica no se ha podido discernir si el efecto de la histona H1 sobre la estabilización del DNA es el resultado de la interacción directa de esta histona con el DNA del "core" o es un efecto directo de la estabilización del DNA del "linker". Es decir, que tanto la H1 como la H5 afectan a las propiedades físicas tanto del DNA del "core" como del DNA espaciador (Cowman y Fasman, 1980).

En resumen, a partir de las curvas de desnaturalización térmica se pueden extraer numerosas conclusiones estructurales sobre la cromatina en sus diversos grados de complejidad. Evidentemente, aunque se ha sugerido que las curvas de fusión de cromatina no son otra cosa que la suma de los efectos de cada una de las histonas por separado (Tsai et al., 1975), existen en la estructura de la cromatina hechos que pueden modificar esta suposición. De cualquier forma, el estudio de la interacción

de cada histona por separado con el DNA es una manera de conocer su contribución potencial a la estabilización térmica de éste en la cromatina.

1.5.2. Modelos semiempíricos de transición hélice-cadena de DNA unido a ligandos. Estudio particular de estas proteínas.

1.5.2.1. Antecedentes

Dentro de todos los modelos descritos hasta la fecha para transiciones hélice-cadena en biopolímeros, quizá sea el de Ising (1925) el más utilizado por su generalización y facilidad de tratamiento. Una revisión exhaustiva del desarrollo del modelo fue publicada por Poland y Scheraga (1970), y más recientemente, para DNA por Wada et al., (1980). Con el objeto de simplificar es conveniente considerar el DNA como una cadena polinucleotídica homogénea, infinitamente larga, no existiendo interacción entre residuos muy alejados de la cadena, sino únicamente entre los vecinos más próximos. Estas afirmaciones se pueden generalizar bastante, de hecho, según Scheffler et al., (1970) a partir de una longitud de 50 pb la cadena se puede considerar infinita. Sin embargo, cuando se utilizan ligandos unidos al DNA son necesarias longitudes mayores, hasta de 300 pb, dependiendo de la naturaleza del ligando (Schellman, 1974). Ahora bien, existen algunas excepciones como la influencia de los residuos terminales en DNA de fago  $\lambda$  (Gotoh y Wada, 1979).

Como es bien sabido (Birshtein y Ptitsyn, 1966; De Voe, 1969) solamente se prefieren dos parámetros para describir este modelo, denominados  $s$  y  $g$  en la nomenclatura de Zimm (1960). El primero de ellos,  $s$ , representa la constante de equilibrio entre un par de bases en estado helicoidal contiguas a un par de bases ya unidas y el mismo par de bases en estructura estadística. Si, como es convencional, el peso estadístico de un par de bases en cadena estadística se define como la unidad, el

peso estadístico de un par de bases en estado helicoidal será  $\underline{s}$ . Cuando el DNA se encuentra libre la  $T_m$  coincide con un valor de  $\underline{s}$  igual a 1. (Litan y Lifson, 1965; Crothers y Zimm, 1964). La dependencia de  $\underline{s}$  con la temperatura normalmente se representa por la ecuación de Van't Hoff, utilizando un valor experimental para el incremento de entalpía por par de base ( $\Delta H_s^0$ ). Se ha calculado calorimétricamente  $\Delta H_s^0$  tanto para polinucleotidos sintéticos (Steiner y Kitzinger, 1962; Rawitscher et al., 1963; Neuman y Ackermann, 1967; Krakauer y Sturtevant, 1968; Scheffler y Sturtevant, 1969) como para DNAs nativos (De Voe y Tinoco, 1962; Privalov et al., 1965; Bunville et al., 1965). El valor del incremento de entropía ( $\Delta S_s^0$ ) se puede calcular a partir del valor de la  $T_m$ . Evidentemente, estos valores dependerán críticamente en el medio en el cual el DNA se encuentra disuelto, sobre todo el  $\Delta H_s^0$ . Alternativamente se pueden aproximar estas contribuciones por ajuste de las curvas de transición térmica, como se detallará posteriormente.

El segundo parámetro requerido en este modelo es el parámetro de nucleación, iniciación o cooperatividad, llamado  $\sigma$ . Tiene el sentido de peso estadístico de iniciación de una secuencia helicoidal, y tiene una contribución fundamentalmente entrópica, considerándose por tanto, que es prácticamente independiente de la temperatura. Su valor se puede calcular, también, por ajuste de las curvas de transición térmica, ya que de él depende fundamentalmente la pendiente de la curva de transición en el punto de  $T_m$ .

Con el valor de estos dos parámetros establecidos a cada temperatura, es posible calcular la constante de equilibrio entre dos conformaciones determinadas de la molécula, como relación entre las funciones de partición correspondientes. Sin embargo, más interesante es conocer a cada temperatura la función de partición total o suma de las funciones de partición de todas las conformaciones de la molécula, que denotaremos por  $Z_A$ , ya que a partir de ellas se puede calcular cualquier

valor medio; entre otros la fracción helicoidal en el equilibrio, que realmente es lo que representa la curva de transición térmica (Poland y Scheraga, 1970):

$$f = 1/M \times (\partial \ln Z_A / \partial \ln s)$$

donde  $f$  es la fracción helicoidal en el equilibrio y  $M$  el número total de interacciones entre pares de bases que puede proporcionar la cadena.

Un método bastante general para obtener la expresión de  $Z_A$  aplicable a cadena infinitas, es el de las funciones generatrices, desarrollado por Lifson (1964), aplicados por él a polipéptidos y posteriormente por Litan y Lifson (1965) a polinucleotidos, además de por otros autores (Bradly y Lifson, 1968; Latt y Sober, 1967; Poland y Scheraga, 1970; Schellman, 1974).

Según este modelo la función de partición total se puede expresar como

$$Z_A = X_1^N$$

donde  $N$  es el número total de residuos de la cadena y  $X_1$  es la raíz mayor de la ecuación

$$\begin{vmatrix} T(x) & 1 \\ 1 & V(x) \end{vmatrix} = 1$$

siendo  $T(x)$  y  $V(x)$  las funciones generatrices para los estados conformacionales posibles, y toman la forma

$$T(x) = \sum_{i=1}^{\infty} t_i / x^i$$

$$V(x) = \sum_{i=1}^{\infty} v_i / x^i$$

donde  $t_i$  y  $v_i$  son los pesos estadísticos de secuencias ininterrumpidas en las dos conformaciones posibles.

De esta forma, como  $Z_A$  es una función de  $s$  y la dependencia de  $s$  con la temperatura es conocida, se pueden establecer las curvas de transición térmica teóricas y ver cómo varían en función de los distintos parámetros. Lifson y Roig (1961) estudiaron empíricamente la dependencia de  $f$  frente a  $s$  para un valor constante de  $\sigma$ , para una cadena polipeptídica de cualquier longitud. Posteriormente Poland y Scheraga (1965) realizaron una aproximación cuadrática de este modelo obteniendo resultados bastante convincentes. Shih y Fasman (1970) extendieron estos estudios a proteínas complejas.

Según lo anteriormente expuesto, una vez calculado  $X_1$ , la fracción molar de estructura helicoidal en el equilibrio vendrá expresada como

$$f = \frac{N}{M} \cdot \frac{\partial \ln x_1}{\partial \ln s}$$

Posteriormente Fixman y Freire (1977) propusieron algoritmos adecuados para la evaluación teórica de las curvas de transición térmica para DNA con una secuencia de bases dada. De esta forma se han calculado curvas de transición térmica para DNA de secuencia conocida (Lyubchenko et al., 1978; Vologodskii y Frankamenetskii, 1978), y corroborado lo apropiado del método por Lyubchenko et al., (1982) para formas aplicativas del DNA de  $\phi X 174$ , en contraposición al método alternativo propuesto por Azbel (1980a, 1980b y 1980c).

#### 1.5.2.2. DNA unido a ligandos.

Tal como se ha comentado en el apartado anterior, la unión de ligandos al DNA modifica el perfil de la curva de transición térmica, dependiendo esta modificación de muchos factores, tales como el tamaño del ligando (que en último término se traduce en número de pares de bases ocupados), la constante de asociación del ligando al DNA, y la cooperatividad

en la asociación. El tamaño del ligando puede variar en un amplio margen, y por tanto el número de pb ocupado. Puede tomar valores de 1-2pb para iones y colorantes, 3-6 para drogas, como la hetropsina (wartell et al., 1974 ; Zasedateloev et al., 1974) y actinomicina (Sobell y Jain, 1972; Müller y Crothers, 1968), y probablemente 20-30 pb para histonas y proteínas (Phillips, 1971). Von Hippel y McGhee (1974) han desarrollado tratamientos para poder determinar este parámetro a partir de datos experimentales. Un modelo alternativo para determinar estos parámetros en la asociación de proteínas inespecíficas y DNA es el desarrollado por Woodbury (1981) exponiendo que existe una libre translación del ligando a lo largo de la cadena polinucleotida en vez de una unión a estos distintos de la red de la misma. Sin embargo, los valores obtenidos son prácticamente los mismos.

La constante de asociación es otro parámetro que afecta drásticamente a las curvas de fusión, y su valor puede variar desde  $10^{-3} M^{-1}$  hasta  $10^{10} M^{-1}$  (Liu y Riggs, 1972). La constante de asociación de las histonas al DNA en doble hélice debe de ser varios órdenes de magnitud superiores a los valores dados anteriormente. El factor de cooperatividad también puede tomar valores comprendidos entre 1 (no cooperatividad) y  $10^3$  (Alberts y Frey, 1970).

El problema se centra ahora en poder establecer un modelo que convenientemente resuelto de lugar a las curvas de transición obtenidas en estos complejos. O lo que es lo mismo, la interpretación a nivel de parámetros moleculares de las curvas de transición térmica. McGhee (1976) realizó un serio intento a este fin, aplicando el modelo de Ising anteriormente comentado y estudiando el papel de los distintos parámetros en el resultado final obtenido. Por ajuste numérico de las curvas experimentales obtenidas con el desarrollo del modelo planteado es entonces posible determinar dichos parámetros. Así lo hace el autor, como un ejemplo, con la netropsina. El punto crucial del tratamiento del modelo está

en la elaboración de las funciones generatrices de secuencia para las distintas situaciones concretas en las que se puede encontrar un par de bases en el DNA, a saber, en doble hélice libre o interaccionando con el ligando, en cadena estadística libre o interaccionando con el ligando. Naturalmente en este estudio se limita a un único ligando, sin desigualdades estructurales. Un método alternativo para obtener ajustes de curvas de desnaturalización térmica de nucleoproteínas es el propuesto por Chipev y Staynov, (1979), sin embargo, contiene serias simplificaciones que no lo hace adecuado para un estudio riguroso de estos complejos.

Los problemas con las moléculas objetos de nuestro estudio histonas y proteínas cromosomales no histonas, carecen en general de esta homogeneidad estructural, como se ha comentado en los apartados anteriores. Normalmente las histonas tienen una distribución no estadística de aminoácidos que dan como resultado dominios estructurales definidos, los cuales, individualmente poseerán distintos valores de los parámetros antes enumerados. El conocimiento de estos valores resulta de gran interés en orden a comprender el papel exacto de cada dominio estructural en la cromatina.

#### 1.6. DIRECCION DE LA INVESTIGACION REALIZADA

Parece bastante claro que la histona H1 debe jugar un papel importante en la superestructura de la cromatina, aunque dicho papel no está completamente esclarecido. Existen dos características en esta histona que la distinguen del resto: por una parte su particular estructura tridimensional, con dominios conformacionales bien definidos; y por otra, la variabilidad que presenta de unos organismos a otros, que es mayor que la del resto de las histonas. Sin duda los distintos dominios conformacionales de la histona han de jugar un papel importante en el efecto que esta molécula ejerce sobre el DNA, como consecuencia de la interacción. Conocer la potencialidad de cada dominio, constituye un problema, por tanto, que

tiene sumo interés resolver.

Por estas razones, se propone como objetivo fundamental de esta Memoria, realizar un estudio exhaustivo de la interacción de los distintos dominios conformacionales de la H1 con el DNA; fundamentalmente las regiones globular y C-terminal de la molécula. Este estudio se realizará desde varios puntos de vista. En primer lugar, aquellos aspectos estructurales y conformacionales del DNA que varían como consecuencia de la interacción, así como los aspectos cinéticos de dichas modificaciones. En segundo lugar, la estabilización térmica del DNA como consecuencia de la formación del complejo. El ajuste teórico, según el modelo de McGhee(1976), de las curvas de transición térmica de los complejos más simples, permitirán, por otra parte, el cálculo de parámetros fundamentales del complejo. Este es un aspecto muy poco explorado en la actualidad, para el caso de complejos con histonas, y permite un nuevo enfoque del problema.

La mayoría de estos estudios, es interesante realizarlos utilizando histonas H1 de distintas fuentes, con fines comparativos. Por tal motivo, el estudio se ha realizado con histona de timo de ternera y del díptero Ceratitis capitata. La H1 de este último posee peculiaridades en su molécula que la hacen sumamente interesante; como es el hecho de poseer la capacidad de autoagregar mediante puentes disulfuro. También se han extendido los anteriores estudios a los complejos formados con las distintas fracciones agregadas aisladas de H1 del insecto, y DNA. Con ello se pretende conocer la posible implicación de estas modificaciones en la estructura de cromatina.

El conjunto de estos estudios, permitirán poseer un mayor conocimiento sobre el papel que juegan los distintos dominios conformacionales de la histona H1 sobre la estructura de la cromatina, utilizando como sistema modelo los complejos entre dichos dominios y el DNA. Por otra parte, constituyen un intento de aproximación teórica al estudio de las curvas de transición térmica, aunque en este caso dicho estudio se ha limitado a los casos más simples, por necesidades del modelo.

2: MATERIALES Y METODOS

## 2.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS PROTEINAS UTILIZADAS

### 2.1.1. Histonas H1.

Los materiales biológicos utilizados fueron timo de ternera y el díptero Ceratitidis capitata. El timo de ternera fue cedido por el Matadero Municipal de Madrid y congelado instantáneamente, tras su extracción, en aire líquido y posteriormente utilizado en el momento o guardado a  $-60^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

El díptero holometábolo Ceratitidis capitata fue cedido por el Instituto de Investigaciones Agronómicas. Para su utilización los insectos, en estado adulto farato, fueron lavados de toda posible contaminación procedente de la dieta.

El método utilizado en la obtención de cromatina fue el descrito por Dicks y Johns (1969) modificado por Franco y col. (1974). Para histona H1 de Ceratitidis capitata todas las operaciones se realizaron a una temperatura entre 0 y  $4^{\circ}\text{C}$  trabajando en cámara frigorífica y con baño de hielo.

El material intacto se homogeneizó en 5 volúmenes de disolución de NaCl 0.14 M y citrato trisódico 0.01 M a pH = 7.5 en presencia de PMSF 50 mM como inhibidor proteolítico. Se homogeneizó en un homogeneizador de aspas Omni-Mixer Sorvall durante 5 minutos. El homogeneizado se filtró a través de un colador de malla fina (equivalente a 4 capas de gasa). El filtrado se centrifugó en un rotor angular GS-3 en centrifuga Sorvall RC-5 a 1500 g durante 20 minutos. El sedimento resultante se lavó repetidas veces con una solución de NaCl 0.14 M, tris 0.01 M a pH 7.5, utilizando para homogeneizar la solución el mismo sistema anteriormente citado. El precipitado fue recogido por centrifugación en el mismo rotor durante 15 minutos. El lavado se repitió hasta clarificar suficientemente

el sobrenadante. El producto final de este proceso es cromatina cruda.

A partir de cromatina cruda las histonas H1 se obtuvieron según el método descrito por Johns y Butler (1962).

Al sedimento de cromatina cruda se le añadió medio volumen de PCA 5% (p/v) con respecto al peso inicial del material biológico. Se homogeneizó en las mismas condiciones descritas. El material insoluble se separó por centrifugación en los mismos rotor y centrifuga a 3000 g durante 30 minutos. Seguidamente el sobrenadante se clarificó a través de placa de vidrio filtrante poro nº 4.

La histona H1 se precipitó del sobrenadante por adición de TCA 100% (p/v) hasta una concentración final de 18% (p/v). Se recogió por centrifugación en centrífuga Christ a 3000 rpm durante 40 minutos. El precipitado se lavó de nuevo con TCA 18% (p/v) y después un lavado con acetona-HCl 0,2% seguido de cuatro lavados más con acetona, proceso realizado en centrífuga de mesa. Los restos de acetona se eliminaron gaseando nitrógeno y secando a vacío.

La posterior purificación de esta histona se realizó por cromatografía en CM-celulosa (Johns, 1964) según se describe a continuación: Se empleó carboximetil celulosa CM-52 Wathman dispuesta en una columna de 40 cm. de longitud y 1.9 cm. de diámetro. El equilibrado de la resina se realizó con tampón de ácido bórico 7 mM, NaOH 3 mM a pH 9.0. La elución de la muestra se llevó a cabo mediante un gradiente continuo y creciente de NaCl entre 0 y 1.0 M logrado con dos disoluciones de 300 ml. del tampón antes citado. La muestra de proteína, 100 mg de histona H1 cruda, se aplicó disuelta en el primer tampón a una concentración de 5 mg/ml. Se recogieron fracciones de 4 ml aproximadamente, empleando un flujo de unos 12 ml/hora.

Los resultados de la cromatografía se siguieron mediante la medida de la absorbancia en el U.V. a 230 nm, en un espectrofotómetro

Varian modelo 635, de las diversas fracciones. Las fracciones resultantes a un mismo pico se reunieron y precipitaron con TCA 100% (p/v) hasta una concentración final del 18% y después se siguió el mismo procedimiento de secado que para la extracción de la histona H1 cruda.

#### 2.1.2. Obtención de los TACs.

Las fracciones resistentes a hidrólisis triptica controlada (TAC) de ambas histonas, se prepararon utilizando una modificación del método descrito por Hortman et al. (1977). Las histonas se disolvieron en tampón NaCl 1.0 M, fosfato sódico 0.3 M a pH 8.0 y a una concentración de 10 mg/ml. A la disolución de proteína se añadió tripsina (Worthington), tratada con TPCK (1 tosilamido - 2 fenil - clorometilcetona), inhibidor de la actividad quimotriptica en proporción enzima/histona de 1:1000 (p/p) y la solución se incubó a 22°C, durante 60 minutos para la histona de timo y 90 minutos para la de insecto (Barbero, 1981). La reacción se detuvo por adición de inhibidor de soja cristalizado en relación inhibidor/enzima de 2:1 (p/p). Seguidamente se añadió TCA 100% (p/v) hasta una concentración final de 18% (p/v), el precipitado resultante se centrifugó, se lavó y se secó del mismo modo que el descrito en 2.1.1. para las histonas nativas. Por último el precipitado final se secó y se purificó por cromatografía en Sephadex G-75 de acuerdo con Hartman et al. (1977).

#### 2.1.3. Obtención de los fragmentos CNBS.

Los fragmentos C-terminales obtenidos mediante tratamiento con N-Bromosuccinimida de las histonas H1 (que se han denominado CNBS) se obtuvieron siguiendo el método de Bustin y Cole (1969) y posterior fraccionamiento por cromatografía en Sephadex G-100 (Barbero, 1981).

Las histonas se disolvieron en ácido acético 50% (v/v) a

una concentración de  $1.2 \times 10^{-6}$  moles de proteína en 8 ml; a esta solución preparada recientemente de N-Bromosuccinimida 17.8 mg/ml en ácido acético al 50% (v/v). La reacción fue seguida espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Cary modelo 118, para lo cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción y se espectro se comparó con el de las alícuotas de una muestra control idéntica a la anterior, pero en la que no se añadió proteína. Al cabo de tres horas, se realizó una segunda adición,  $12 \times 10^{-6}$  moles, de una nueva solución idéntica de N-Bromosuccinimida preparada en el momento. Después de cuatro horas de la segunda adición, la mezcla de reacción se concentró en un rotavapor a 3 ml para la posterior separación de los péptidos resultantes.

Para el fraccionamiento cromatográfico, las mezclas de reacción se aplicaron en una columna de Sephadex G-100 (100 cm x 1.8 cm) previamente equilibrada con una solución de HCl 0.01 N. El material proteico se aplicó disuelto en el eluyente a una concentración de 24 mg/ml. La cromatografía se realizó a un flujo de 13 ml/hora, siendo de 3 ml cada fracción recogida. La proteína se valoró en cada fracción por medida de la absorbancia a 230 nm.

Las fracciones correspondientes al pico que eluye en segundo lugar (que corresponde a la región terminal de la histona H1, tanto de timo como de insecto; Barbero, 1981) se juntaron y la proteína se precipitó, lavó y secó del mismo modo que se indica en 2.1.1.

#### 2.1.4. Obtención de los fragmentos CTB.

Los fragmentos correspondientes a la región C-terminal de la histona H1, tanto de timo como de insecto (CTB), se obtuvieron mediante la hidrólisis con trombina de la histona nativa según el método descrito por Chapman et al. (1976).

Las muestras de histona se disolvieron en un tampón Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM pH 8.0 a una concentración aproximada de 18 mg/ml. La trombina sólida (Sigma 850-1) se añadió a la disolución de histona (100 N.I.H. unidades por cada 100 mg de histona) y se incubó la mezcla de reacción durante 4 horas a 37°C en baño de agua. A diferentes tiempos de incubación se recogieron alícuotas que se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida, con el fin de observar las posibles semejanzas y diferencias entre las digestiones con el enzima de ambas histonas.

Después de las cuatro horas, la mezcla de reacción se aplicó en una columna de carboximetilcelulosa (40 cm x 1.8 cm) y NaCl 1.0 M en tampón fosfato 50 mM pH 6.8 tal y como se describe por Chapman et al. (1976). Las fracciones resultantes se recogieron y valoraron igual que en los casos anteriores. Los picos que eluyen en tercer lugar se precipitaron con igual tratamiento que en el apartado 2.1.1.

#### 2.1.5. Obtención de las fracciones oxidadas de Hlcc.

La oxidación de histona Hlcc se llevó a cabo según el método descrito por Marzluff et al. (1972) tal como se explica a continuación.

La muestra de histona se disuelve en tampón de Cloruro de guanidinio 6 M, tris-HCl 0.3 M, pH 8.3 en una concentración aproximada de 10 mg/ml y se incuba durante dos horas, a 27°C en baño termostático, con agitación constante. Posteriormente se dializa exhaustivamente frente a agua (5 veces frente a un litro de agua, durante seis horas cada vez y la última frente a dos litros de 12 horas de duración). Una vez dializado se precipita mediante TCA 100% (p/v) y se lava y seca como se indicó en el apartado 2.1.1. El resultado, mezcla de las distintas fracciones oxidadas, se disolvió en la mínima cantidad de HCl 0.01 N y se fraccionó

mediante cromatografía en Biogel P-100 (Sommer y Chalkley, 1974), equilibrado en el mismo medio. La cromatografía se realizó con un flujo de 6 ml/hora y tomando fracciones de 2.5 ml. Las distintas fracciones pertenecientes a un mismo pico se juntaron y precipitaron con TCA siguiendo el mismo proceso descrito en todos los apartados anteriores.

## 2.2. AISLAMIENTO DE DNA DE TIMO DE TERNERA

El material biológico de partida ha sido timo de ternera para la extracción de DNA, obtenido como se dijo anteriormente.

El timo congelado se trocea y se homogeneiza en 4 volúmenes de SSC (0.15 M NaCl y 0.015 M citrato trisódico) filtrando posteriormente por un colador de malla fina y centrifugando 10 minutos a 12000 x g. Sobre el sedimento se repite tres veces esta operación añadiendo 4 volúmenes de 0.14 M NaCl. El rendimiento de este proceso es núcleos de las células de timo. El sedimento se resuspende en 24 volúmenes de 0.14 M NaCl y se le añade el volumen necesario de SDS al 5% y se agita vigorosamente durante 3 horas a temperatura ambiente. En este proceso los núcleos se lisan por la acción del detergente, dejando libre el material nuclear. A continuación se procede a desproteínizar añadiendo NaCl sólido hasta una concentración final 1.0 M. Una vez disuelto se centrifuga durante 2 horas a 30000 x g con lo cual se separan las proteínas que precipitan. Sobre el sobrenadante se añade un volumen igual de etanol 96% formando en lo posible dos fases. Posteriormente se recoge el DNA precipitado por el etanol, haciendo girar una varilla, en forma de huso. Se lava dos veces con etanol 96% frío dejándolo secar sobre papel de filtro. Con el fin de seguir desproteínizando este DNA se deja hinchando una noche en 14 volúmenes de  $10^{-4}$  M NaCl, facilitando la disolución al día siguiente con un poder de holgura aproximada 0.2 mm. A continuación

se le añade SDS al 5% en etanol 50% y se repite todo el proceso anterior. Esta última operación se hace dos veces si se quiere desproteinizar en mayor grado el DNA. El DNA extraído de este último proceso se seca con acetona sobre papel de filtro y se guarda seco en un frigorífico para su posterior caracterización y utilización.

En muchos experimentos se utilizó DNA fragmentado. Este DNA de pequeño tamaño molecular (aproximadamente 400 pb) se obtuvo a partir del DNA de gran tamaño mediante sonicado en EDTA 1 mM, fosfato 1 mM y pH 7.0 con una concentración aproximada de 0.25 mg/ml, se sometió a sonicado durante tres series de 30 sg espaciadas otros 30 sg, a una intensidad de 14 microns. (Britten et al., 1974).

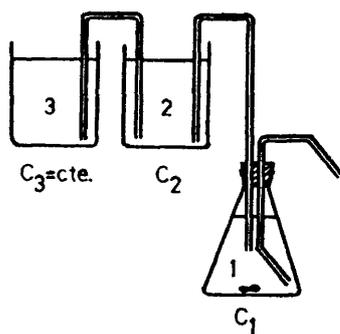
Esta solución de DNA sonicado resultante se utilizó directamente en la formación de los complejos.

### 2.3. FORMACION DE COMPLEJOS DNA-PROTEINA

#### 2.3.1. Con DNA de gran tamaño.

Debido a que la adición directa de histona H1 a una disolución de DNA de gran tamaño, en las condiciones de concentración y fuerza iónica requeridas en la presente memoria, provocan la precipitación del complejo; los complejos con este DNA se realizaron mediante el método de diálisis en gradiente lineal descrito por CarroI (1971).

Las soluciones de DNA y proteína en tampón EDTA 1 mM fosfato sódico 1 mM, pH 7.0 a la concentración y relación requeridas para el complejo se mezclaron en NaCl 2 M. Posteriormente esta mezcla se introdujo en una bolsa de diálisis y se procedió a su diálisis en gradiente lineal mediante el sistema descrito en la figura 3. Las condiciones iniciales en cada recipiente detallado en la figura, fueron siempre un litro de tampón EDTA 1 mM, fosfato sódico 1 mM, pH 7.0, con los siguientes grados



**Figura 3.** Sistema utilizado para la diálisis en gradiente de los complejos (Carrol, 1971)

$C_1$ : EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, NaCl o KF 10mM pH=7.0

$C_2$ : EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, NaCl 0.5 M pH=7.0

$C_3$ : EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, NaCl 1.0 M pH=7.0

de concentración de sal : (1) NaCl 1 M, (2) NaCl 0.5 M, (3) NaCl o KF, según el caso, 10 mM. Por último se dializó frente a dos litros del tampon citado, sin nada de sal, durante 12 horas.

#### 2.3.2. Con DNA sonificado.

Dado que el DNA sonificado no precipita al añadirle la histona en las condiciones estudiadas, los complejos se realizaron mezclando lentamente las soluciones de DNA y proteínas, previamente valoradas, en las proporciones adecuadas según el caso. Las soluciones de DNA han tenido siempre la concentración de 0.25 mg/ml y las de proteína valores variables entre 0.4 y 0.2 mg/ml.

#### 2.4. DIGESTION CON NUCLEASA DE COMPLEJOS H1-DNA

En los experimentos de digestión con nucleasa de DNA se utilizó nucleasa de micrococo de Sigma. El medio de digestión utilizado fue  $MgCl_2$  1 mM,  $CaCl_2$  1 mM, fosfato sódico 2 mM, NaCl 10 mM y pH 7.0.

El DNA se disolvió y sonicó en este medio siendo su concentración de 0.025 mg/ml. La proteína también se disolvió en el mismo medio y su concentración 0.18 mg/ml. Se formaron los complejos por adición directa a las relaciones requeridas y se dejaron 24 horas a 4°C. La digestión se realizó a 24°C añadiendo a cada complejo y al DNA control una solución de nucleasa de  $10^4$  mg/ml, hasta obtener una relación enzima/DNA de 0.01 (p/p) y siguiendo la cinética en el espectrofotómetro DU-8 registrando un espectro cada 2 minutos.

## 2.5. TECNICAS ESPECTROSCOPICAS

### 2.5.1. Espectroscopia de absorción.

Los espectros de absorción se registraron en dos espectro fotómetros, según los casos: en un Cary modelo 118 y en Beckman modelo DU-8, con accesorio de barrido de longitudes de onda. Los espectros de DNA y complejos se registraron entre 350 y 330 nm, con rendija 0.5 mm y velocidad de barrido de 0.4nm/sg. Se restó la dispersión medida entre 350 y 315 nm, debido a la turbidez, en los casos en que esta se daba (Donovan, 1973). Los espectros de proteína se realizaron de igual modo pero entre 350 y 205 nm.

La concentración de DNA se calculó por absorción a 258 nm tomando  $E_{258} = 19.98$ , para una solución de 1 mg/ml en agua y 1 cm de paso óptico (Adber et al., 1971). La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente en HCl 0.01 N a cuatro longitudes de onda, 205, 210, 215 y 225 nm tomando  $E_{205} = 310$ ;  $E_{210} = 205$ ;  $E_{225} - E_{215} = 1/1.44$  para una solución del 1% y 1 cm de paso óptico (Barbero, 1931)

Para la realización de las cinéticas seguidas por absorción se utilizó el espectrofotómetro DU-8 con el accesorio de cinéticas. Este accesorio permite hacer medidas, a una longitud de onda fija, al variar el tiempo, y a una temperatura fija determinada.

### 2.5.2. Dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular se llevaron a cabo en un dicrografo Jobin-Yvon (Mark III). Se utilizaron células de 1cm de paso óptico y los espectros se realizaron a una sensibilidad variable, según los casos, entre  $5 \times 10^{-6}$  y  $5 \times 10^{-5}$  incremento de absorbancia/mm. La anchura de rendija empleada fue de 2 nm en todos los casos. Los resul

tados se expresan en elipticidades molares con dimensiones de  $u = \text{grados} \times \text{cm}^2/\text{dmol}$  de residuo de DNA, calculadas a partir del espectro de acuerdo con la ecuación:

$$(\theta) = \frac{H \times S \times 342}{C \times L} \times 3300 \text{ u.}$$

donde H es la altura en mm, S la sensibilidad, C la concentración en mg/ml y L el paso óptico en cm.

Las cinéticas, registradas por dicroísmo circular, se realizaron fijando la longitud de onda (270 nm) y registrando la elipticidad a una velocidad constante de carta de 0.1 mm/sg.

## 2.6. DESNATURALIZACION TERMICA

Las curvas de desnaturalización térmica de DNA y complejos se realizaron en un espectrofotómetro termostatzado Beckman modelo DU-8 con el accesorio de "Tm,s", y utilizando un sistema de seis cubetas de 0.34 ml, que permite registrar la curva de fusión de 5 muestras simultáneamente, añadiendo en la primera el blanco. Las curvas de transición se realizaron subiendo la temperatura 1°C cada dos minutos y registrando la absorción a 260 nm, de modo automático a cada temperatura entre 40 y 100°C. La rendija utilizada fue 0.5 mm. Los resultados se obtuvieron digitalizados e impresos para su posterior tratamiento. Se representa hipercromicidad frente a temperatura y otras veces fracción de DNA desnaturalizado frente a temperatura.

## 2.7. TECNICAS ANALITICAS

### 2.7.1. Electroforesis.

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de poli-acrilamida al 15% convencionales. Para su preparación y posterior desarrollo se siguió el procedimiento descrito por Panyim y Chalkley (1969).

La presencia de material proteico en los geles se detectó por teñido con una disolución de Negro Amido al 0.5% (p/v) en ácido acético 1 N, lavando después repetidas veces con agua destilada para eliminar el colorante no fijado específicamente a proteínas. Los geles se acabaron de desteñir electroforéticamente.

### 2.7.2. Análisis de aminoácidos.

La determinación de la composición de aminoácidos de las diversas proteínas y péptidos se llevó a cabo como se expone a continuación.

Primeramente se sometió el material proteico a una hidrólisis ácida con HCl azeótropo 5.7 N, que contenía fenol al 0.1%, en una concentración de 1 mg/ml durante 24 horas a 110°C. El proceso se realizó en tubos Pyrex cerrados previamente a vacío. Una vez terminada la hidrólisis, se abrió el tubo, se desecó a vacío sobre hidróxido sódico y se dieron diversos lavados con agua destilada hasta la total eliminación del ácido clorhídrico. Con cada muestra se realizaron en todos los casos un mínimo de tres determinaciones.

A continuación se realizó una cromatografía de cambio de ión del residuo seco del hidrolizado, en un analizador automático de aminoácidos Durrum D-500 provisto de un computador PDP-8 M que automáticamente realiza todas las operaciones de acuerdo con un programa previamen

te seleccionado.

El residuo seco del hidrolizado se disolvió en tampón citrato a pH 2.2, a una concentración de 1 mg/ml, antes de ser introducido en el analizador. El tiempo de duración del análisis fue de 80 minutos y el proceso de elución se realizó con disoluciones tampón de citrato sódico a valores de pH 3.25, 4.25, y 7.09. Finalizado el análisis, la resina se regeneró con lavados de NaOH 0.3 N conteniendo 0.25 g/l de EDTA.

La composición de aminoácidos en % molar se determinó a partir de los datos del análisis.

### 2.7.3. Cromatografía centrifugada en DEAE-celulosa.

Para controlar el tamaño molecular medio del DNA utilizado en los complejos, se utilizó la cromatografía discontinua centrifugada en DEAE-celulosa, descrita por Dávila et al (1965) y revisada por Mingot y Dávila (1974). Se resuspenden 0.5 g de DEAE-celulosa en 15 ml de agua destilada y esta suspensión se depositó en la parte superior de un tubo de centrifuga especialmente diseñado que consta de dos cámaras (superior e inferior) separadas por una placa perforada, desmontables y unidas entre sí por una rosca. Se centrifugó durante 2 minutos a la mínima velocidad. El agua pasó a la parte inferior de la cámara y se volvió a resuspender y centrifugar en las mismas condiciones. A continuación se pasó a su través 10 ml de una disolución de DNA en 0.1 x SSC a una concentración aproximada de 6 unidades de absorbancia y se centrifugó durante dos minutos en las mismas condiciones. La centrifugación acelera el proceso cromatográfico, pero no es conveniente aplicar mucha velocidad ya que es necesario que se establezca perfectamente el equilibrio para conseguir una buena resolución, y si se acelera excesivamente la operación éste aparece perturbado. Con esta operación el DNA queda

TABLA I: Relación de los distintos eluyentes utilizados en la cromatografía centrífugada en DEAE-celulosa, así como el tamaño molecular medio del DNA en cada eluido ( Mingot y Dávila, 1974).

Fracción	Eluyente	Tamaño DNA
2	NaCl 0.14M, fosfato sódico 0.01M, pH 7.0	Nucleótidos, oligonucleótidos
3	NaCl 0.50M, fosfato sódico 0.01M, pH 7.0	Oligonucleótidos hasta $1 \times 10^6$ Daltons
4	NaCl 1.0 M, fosfato sódico 0.01M, pH 7.0	$1 \times 10^6$ Daltons
5	NaCl 2.0 M, $\text{NH}_4\text{OH}$ 0.2M	$3 \times 10^6$ Daltons
6	NaCl 2.0 M, $\text{NH}_4\text{OH}$ 0.4M	$10 \times 10^6$ Daltons
7	NaCl 2.0 M, $\text{NH}_4\text{OH}$ 1.0M	$20 \times 10^6$ Daltons
8	NaOH 1.0 M	$50 \times 10^6$ Daltons

fijado a la DEAE-celulosa, de la cual se separó con respecto a sus diferentes tamaños moleculares haciendo pasar sucesivos eluyentes, cuya composición se expresa en la tabla I. La concentración de cada fracción se obtuvo midiendo la absorbancia a 260 nm.

#### 2.7.4. Análisis de RNA y proteína.

Para determinar la contaminación en RNA y proteína en el DNA obtenido se siguió el método de Schmith-Thanhauser descrito por Munro y Fleck (1966). Este método se basa en las distintas condiciones de hidrólisis de RNA (básica) y DNA (ácida) junto con la precipitación de los

ácidos nucleicos macromoleculares en medio ácido, frente a la solubilidad en dicho medio de los nucleótidos y oligonucleótidos cortos de ambos ácidos.

A 2 ml de la solución de DNA a estudiar, que debe de tener, al menos, una concentración de 1 mg/ml, se le añade 1 ml de PCA 0.6N frío, y se deja precipitar en baño de hielo durante 15 minutos; posteriormente se centrifuga en centrifuga de mesa y sobre el precipitado se añaden 2 ml de PCA 0.2 N frío y se repite la operación. Los dos sobrenadantes juntos forman la fracción soluble en ácido y en ella se valora la proteína por el método de Lowry (Lowry et al 1951). El precipitado se resuspende en 2 ml de KOH 0.3 N y se incuba con agitación 1 hora a 37°C. Una vez enfriado en hielo, se añaden 2 ml de PCA 0.6 N frío y se deja precipitar en hielo durante 30 minutos, posteriormente se centrifuga y sobre el precipitado se repite la operación. El sobrenadante de ambas operaciones, que es el RNA hidrolizado, se junta y se mide la absorbancia a 260 nm. El precipitado se resuspende en 4 ml de PCA 0.6 N y se incuba a 70°C durante 20 minutos. Una vez enfriado en hielo se centrifuga, y al precipitado se le añaden 2 ml de PCA 0.6 N frío y se centrifuga de nuevo. Los dos sobrenadantes, que son el DNA hidrolizado, se juntan y se mide la absorbancia a 260 nm. El tanto por ciento de contaminación de RNA se calcula dividiendo la absorbancia de la fracción RNA por la de la fracción DNA y multiplicando por 100.

#### 2.7.5. Cálculo de concentración de DNA y proteína en complejos.

Debido a que en los complejos formados mediante diálisis se producen, sin duda, cambios en las concentraciones de DNA y proteína, ha sido necesario calcular su concentración una vez formados. Para ello a una alícuota de la solución del complejo se le añade una solución SDS al 5% (p/v) hasta llevarlo al 0.1% (p/v). En estas condiciones la proteí

na se desprende del DNA y se valora éste por espectrofotometría, como se indicó en el apartado 2.4.1. (Shih y Fasman, 1971). A otra alícuota se le añade HCl hasta concentración final HCl 0.25 N, con el fin de precipitar cuantitativamente el DNA; posteriormente se centrifuga a 10.000 rpm en rotor angular SS-34 en una centrifuga Sorwall RC-5 durante 1 hora, valorando la proteína del sobrenadante espectrofotométricamente según se indicó en el apartado anteriormente citado.

## 2.8. TRATAMIENTO AUTOMÁTICO DE DATOS

### 2.8.1. Cálculo de la hipercromicidad y curva derivada de las curvas de desnaturalización térmica.

Dado que los datos obtenidos experimentalmente en las curvas de transición nos relacionan la absorción del complejo a cada temperatura, y con el fin de corregir las posibles diferencias en concentración, se han transformado las absorbancias en hipercromicidad a cada temperatura, según la expresión:

$$HC(T) = \frac{A_{260}(T) - A_{260}(25^{\circ}\text{C})}{A_{260}(25^{\circ}\text{C})} \times 100$$

donde HC es la hipercromicidad a la temperatura T,  $A_{260}(T)$  y  $A_{260}(25^{\circ}\text{C})$  la absorbancia a 260 nm a cada temperatura y a 25°C, respectivamente.

De este modo las curvas de desnaturalización térmicas son comparables entre sí, independientemente de la concentración de DNA en el complejo.

Otra transformación utilizada, alternativamente, ha sido normalizar las hipercromicidades, resultando la fracción de DNA desnaturalizado en función de T:

$$f(T) = \frac{HC(T)}{HC(100^{\circ}\text{C})}$$

siendo  $f(T)$  la fracción en tantos por uno, y  $HC(100^{\circ}\text{C})$  la hipercromicidad

a la temperatura más alta (que puede variar entre 95 y 100°C, según los casos).

Con el fin de detectar con más exactitud las diferentes transiciones térmicas, se ha calculado en todos los casos la derivada de la curva de transición, mediante un programa en BASIC utilizando un procesador HP-85. El programa tiene como entrada los datos de absorción y temperatura y como salida hipercromicidad, fracción de DNA desnaturalizado y la derivada de ambas curvas, calculada según el algoritmo que se describe a continuación. Para calcular la derivada en un punto se toma un intervalo de un número impar ( $2n + 1$ ) de puntos, compuesto por el punto en cuestión y los  $n$  anteriores y  $n$  posteriores. Se ajusta la recta por regresión lineal mediante mínimos cuadrados correspondientes a dicho intervalo, y se toma como pendiente en el punto citado, la pendiente de la recta ajustada. De este modo se procede iterativamente a lo largo de todos los puntos de la curva de transición (excepto los  $n$  primeros y  $n$  últimos). El presente procedimiento tiene el fin de paliar en lo posible al ruido experimental, que provocaría alteraciones puntuales de pendiente en la curva de transición y que darían una derivada en forma de sierra. Este método será tanto más correcto cuanto menor sea la diferencia entre las temperaturas contiguas. Para los intervalos de temperaturas usadas (1°C), un ajuste con 5 puntos da unos resultados razonablemente buenos.

### 2.3.2. Descomposición en gaussianas.

La descomposición en gaussianas (de cuya importancia y necesidad se tratará en el apartado 3.5.) se realizó mediante el programa de cálculo MORDOR. El programa, escrito en FORTRAN IV-BMDP se ejecutó en un ordenador IBM 360-65I con sistema operativo OS/360 (Del Centro de Cálculo de la Universidad Complutense de Madrid). El programa de ajuste utiliza la rutina 3R del paquete BMDP, de la biblioteca de programas de dicho

Centro. Esta rutina realiza el ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados. La curva derivada experimental fue ajustada a un conjunto de gaussianas, de acuerdo con la ecuación:

$$DT = \sum_{i=1}^N H_i \cdot \text{EXP} (-A_i \cdot (X - T_i)^2)$$

de donde DT es la derivada teórica, X la variable dependiente, es decir la temperatura, y  $H_i$ ,  $A_i$  y  $T_i$  los parámetros de la gaussiana i-ésima. El programa de cálculo prueba ajustes para  $N = 2$  hasta  $N = 6$ , quedándose en cada caso con el mejor ajuste según criterio de mínimos cuadrados. Como se indicará más adelante, en el apartado 3.5., la selección del número de gaussianas (N) óptimo se hace posteriormente y atendiendo a otros criterios.

Por último el resultado seleccionado fue procesado en un microprocesador HP-85 mediante un programa en BASIC que calcula el área de cada gaussiana y su contribución al total en tantos por ciento, dibujando posteriormente las distintas curvas y la curva suma de ellas.

### 2.8.3. Ajuste de las curvas cinéticas mediante exponenciales.

Los datos experimentales de las distintas cinéticas realizadas en la presente memoria fueron procesados y ajustados mediante el programa de cálculo ABARDUSA.

Este programa de FORTRAN IV-BMDP es básicamente similar al descrito en el apartado anterior y se ejecutó en el mismo ordenador. En el presente caso las curvas cinéticas se ajustaron a un conjunto de exponenciales, resultado de un conjunto de procesos cinéticos de primer orden, según la siguiente expresión:

$$y = \sum_{i=1}^N A_i (1 - e^{-K_i \cdot t})$$

donde  $y$  es la función teórica a ajustar con la experimental ( que será variación de elipticidad a una longitud de onda fija o cualquier otra medida proporcional);  $t$  es el tiempo,  $A_i$  es la contribución de la función a tiempo infinito del proceso  $i$ -ésimo y  $K_i$  su constante cinética aparente. En todos los casos se han ajustado las cinéticas para  $N = 1, 2, 3,$  y  $4$ , seleccionandose en cada caso el mejor ajuste, como función de los parámetros  $K_i$  y  $A_i$ ; por el mismo procedimiento de mínimos cuadrados. Posteriormente el número,  $N$ , de exponenciales (o procesos cinéticos) se seleccionó de acuerdo con los criterios que se expondrán en el apartado 3.3.

Por último, como en el ajuste de gaussianas, el ajuste se leccionado se procesó con un HP-85, para su dibujo y cálculo de las contribuciones relativas de cada proceso individual.

#### 2.8.4. Ajuste teórico de las curvas de transición térmica.

Con el fin de determinar parámetros interesantes en la asociación ligando-DNA, se realizó el ajuste teórico de las curvas de transición térmica, a partir del modelo de Ising (1925), utilizando la aproximación para cadenas de longitud infinita de funciones generatrices. Debido a la distinta complejidad del método para DNA libre y asociado a ligando, el cálculo realizado difiere en ambos casos.

##### 2.8.4.1. DNA libre.

En este caso las funciones generatrices adoptan la siguiente expresión (McGhee, 1976):

a) Asociada a secuencias con pares de bases en estructura helicoidal.

$$T(x) = \sum_{i=1}^{\infty} \frac{t_i}{x^i} = \frac{s}{x} + \left(\frac{s}{x}\right)^2 + \left(\frac{s}{x}\right)^3 + \dots = \frac{s}{x-s}$$

Esta última igualdad es cierta bajo las condiciones en que la serie es convergente.

b) Para regiones en cadena estadística.

$$V(x) = \sum_{i=1}^{\infty} \frac{v_i}{x^i} = \frac{1}{\sqrt{x}} + \left(\frac{1}{\sqrt{x}}\right)^2 + \left(\frac{1}{\sqrt{x}}\right)^3 + \dots = \frac{1}{\sqrt{x} - 1}$$

Tal como se vió en el apartado 1.5.2. la función de partición total del DNA a una determinada temperatura viene dada por:

$$Z = X_1^N$$

donde  $X_1$  es la raíz real mayor de la ecuación

$$\varphi(x) = \begin{vmatrix} -1 & v(x) \\ \sigma T(x) & -1 \end{vmatrix} = 0$$

que desarrollado conduce a la expresión

$$\sigma \cdot \frac{s}{x-s} \cdot \frac{1}{\sqrt{x}-1} - 1 = 0$$

es decir

$$y^3 - y^2 - sy + s - \sigma s = 0$$

donde  $y = \sqrt{x}$

Esta ecuación de tercer grado se resolvió mediante el algoritmo detallado en el Apéndice, denominándose  $y_1$  a la raíz mayor.

El cálculo de la fracción helicoidal en el equilibrio, como se vió en el citado apartado, vendrá dado por la expresión

$$f = \frac{N}{M} \frac{\partial \ln x_1}{\partial \ln s} \rightarrow \frac{\partial \ln x_1}{\partial \ln s}, \text{ cuando } N \rightarrow \infty$$

es decir

$$f = \frac{s}{x_1} \frac{\partial x_1}{\partial s} = - \frac{s}{x_1} \left( \frac{\frac{\partial \varphi(x)}{\partial s}}{\frac{\partial \varphi(x)}{\partial x}} \right)_{x=x_1}$$

que resuelta da

$$f = \frac{1}{1 - \frac{y_1^2 - s}{2y_1(y_1 - 1)}}$$

Como  $s$  es una constante de equilibrio, su valor estará relacionado con la temperatura por la expresión:

$$s = \text{Exp} \left( \frac{\Delta S_s^0}{R} - \frac{\Delta H_s^0}{RT} \right)$$

donde  $R$  es la constante de los gases perfectos y  $T$  la temperatura absoluta, suponiendo que tanto  $\Delta S_s^0$  como  $\Delta H_s^0$  son independientes de la temperatura. Esto es cierto para  $\Delta S_s^0$ , en cambio únicamente es una aproximación válida para  $\Delta H_s^0$  en un intervalo pequeño de temperatura.

El ajuste numérico de las curvas teóricas así obtenidas, con las experimentales se realizó mediante el programa GENARA que utiliza la rutina 3R del paquete de programas BMOP, de ajuste no lineal.

Este programa tiene dos partes: una primera que resuelve la ecuación de tercer grado para cada temperatura y otra segunda que, utilizando la rutina de ajuste no lineal (3R) del paquete de programas BMOP (biblioteca de programas del CCUM), calcula la mejor aproximación por mínimos cuadrados entre las dos curvas, teórica y experimental.

#### 2.8.4.2. DNA-ligando.

En este caso, además de las funciones generatrices indicadas en el apartado anterior, aparecen dos más como consecuencia de la unión del ligando (McGhee, 1976):

a) Para secuencias de pares de bases en estado helicoidal asociadas a

ligando:

$$U(x) = \sum_{i=1}^{\infty} \frac{u_i}{x^i} = \left( \frac{s}{x} \right)^{n_h} K_h L + \left[ \left( \frac{s}{x} \right)^{n_h} K_h L \right]^2 w_h + \left[ \left( \frac{s}{x} \right)^{n_h} K_h L \right]^3 w_h^2 + \dots = \frac{s^{n_h} K_h L}{x^{n_h} - w_h s^{n_h} K_h L}$$

donde  $n_h$  es el número de pares de bases ocupados por una molécula de ligando,  $K_h$  es la constante intrínseca de asociación del ligando al DNA,  $w_h$  es el factor de cooperatividad de asociación del ligando al DNA, y  $L$  la actividad de ligando libre. El subíndice "h" se refiere al estado helicoidal.

b) Para regiones de DNA en cadena estadística asociado a ligando:

$$w(x) = \sum_{i=1}^{\infty} \left( \frac{w_i}{x^i} \right) = \frac{K_c L}{\sqrt{x^{n_c}}} + w_c \left( \frac{K_c L}{\sqrt{x^{n_c}}} \right)^2 + w_c^2 \left( \frac{K_c L}{\sqrt{x^{n_c}}} \right)^3 + \dots =$$

$$= \frac{K_c L}{\sqrt{x^{n_c}} - w_c K_c L}$$

donde el subíndice "c" se refiere ahora al estado de cadena estadística.

Ahora  $x_1$  será la mayor raíz real de la ecuación:

$$\varphi(x) = \begin{vmatrix} -1 & U & V & W \\ T & -1 & V & W \\ \sigma T & \sigma U & -1 & W \\ \sigma T & \sigma U & V & -1 \end{vmatrix} = 0$$

En este caso la ecuación no se puede resolver de modo analítico, teniendo que calcular  $x_1$  mediante aproximación numérica a cada temperatura. Este hecho impide la utilización de la rutina 3R del paquete BMDP, teniendo que recurrir a un método alternativo. Para ello se construyó el programa SIGMUND, que calcula el valor aproximado de la raíz máxima que anula el determinante, para calcular  $f$  a cada temperatura, para un conjunto determinado de los parámetros; una vez construida así la curva de fusión teórica, se calcula la desviación con los puntos experimentales mediante la suma de diferencias (residuales) al cuadrado de cada punto. Posteriormente se cambia el valor de los parámetros y se repite el proceso, calculando otra desviación. El método seguido para generar conjuntos de parámetros, ha sido el de exploración exhaustiva, que consis

- 59 -

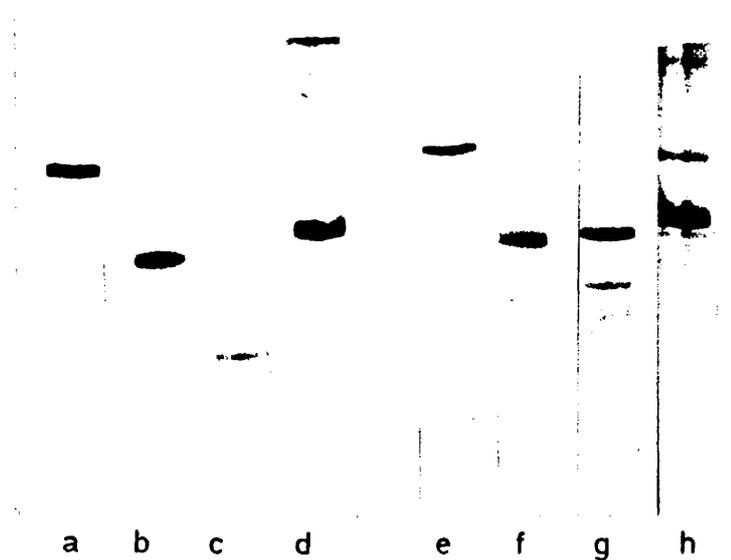
te en fijar un intervalo de variación de cada parámetro y dividirlo en un número entero de partes; y así chequear todas las combinaciones posibles de valores de los parámetros generados.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1. MATERIALES UTILIZADOS

Las histonas H1 de timo de ternera y Ceratitidis capitata (H1tt y H1cc) fueron extraídas según se indica en el apartado 2.1. En la figura 4 se muestran las imágenes electroforéticas de las dos histonas. Hay que resaltar que la histona H1 en este estado, que llamaremos nativo, presenta una ligera contribución de histona agregada, que es la banda de menor movilidad electroforética. Esta contribución podría tener significado in vivo o ser simplemente resultado de las condiciones oxidantes de la electroforesis. En cualquier caso la contribución de agregado es muy pequeña. En la misma figura se muestran las imágenes electroforéticas de los fragmentos de histona H1 utilizados: región resistente a tripsina (TRC) y región C-terminal obtenida mediante rotura con NBS (CNBS) y trombina (CTB) y posterior purificación mediante cromatografía, tal como se detalla en el apartado citado. Como se observa en la figura se obtienen con el necesario grado de pureza. En la tabla II se muestran los resultados de análisis de aminoácidos de las muestras; completamente similar. Por otra parte, a los obtenidos previamente por Barbero (1981). Hay que destacar la presencia de cisteína en la histona H1cc que le permite formar agregados por puentes disulfuro intermoleculares, tal y como se comentó en la introducción (Franco et al., 1977).

Por otro lado, como se indicó en la introducción, el análisis de aminoácidos de H1cc refleja la contribución correspondiente a uno o dos restos de cisteína, es decir, que existe una microheterogeneidad molecular, poseyendo una fracción dos residuos de cisteína por molécula, y otra, en cambio solamente una. (Barbero, 1982, resultados no publicados.) Al producir la agregación en condiciones oxidantes se obtienen como productos finales monómeros con puentes disulfuros intramoleculares, dímeros formados casi exclusivamente por la subfracción que únicamente



**Figura 4.** Electroforesis en geles de poliacrilamida de los distintos materiales proteicos utilizados:  
De timo de ternera:(a) Hltt;(b) TRC;(c) CTB  
(d) CNBS.  
De Ceratitidis Capitata:(e) Hlcc;(f) TRC;(g) CTB  
(h) CNBS.

TABLA II: Composición de aminoácidos de los distintos péptidos y proteínas utilizados en los complejos

Aminoácido	Timo de Ternera				Ceratitís capitata						
	HI	TRC	CNBS	CTB	HI	TRC	CNBS	CTB	BG1	BG2	BG3
ASX	2.5	6.1	4.1	1.1	4.7	5.9	3.0	3.3	4.7	4.4	4.6
THR	5.6	5.5	6.1	5.9	7.0	6.8	7.9	7.9	7.0	7.1	7.1
SER	5.6	10.6	7.5	4.6	11.5	10.6	12.7	12.7	10.9	10.9	10.6
GLX	3.7	7.6	3.7	1.6	4.9	6.8	5.1	5.3	5.5	5.2	5.4
PRO	9.2	4.7	16.4	9.5	5.1	5.9	4.3	3.5	5.4'	5.0	5.1
GLY	7.2	11.7	9.1	5.9	7.5	6.2	11.3	9.0	7.9	7.2	7.1
ALA	24.3	16.2	36.9	29.4	16.7	16.5	17.9	18.0	18.0	18.5	18.6
CYS	-	-	-	-	0.5 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	-	-	trazas	trazas	trazas
VAL	5.4	6.7	6.9	3.5	5.2	6.7	4.3	4.2	6.5	5.7	5.6
MET	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.7'	0.0	0.0	0.4	0.5	0.6
ILE	1.5	2.3	1.0	0.9	2.8'	5.6	1.3	1.0	3.0	3.2	3.5
LEU	4.5	9.5	5.3	1.3	3.5	6.6	3.2	2.9	2.1	4.1	5.1
TYR	0.9	1.0	-	0.0	1.3	2.0	-	0.8	1.3	1.7	1.8
PHE	0.9	1.4	0.9	0.0	0.8	2.0	0.3	0.5	0.6	1.0	1.0
LYS	26.8	14.4	52.4	35.8	25.1	13.2	27.0	32.5	24.4	24.4	21.5
HIS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	1.1	0.1	0.2	0.8	0.5	0.6
ARG	1.8	2.4	1.1	1.1	1.7	2.5	0.0	1.1	1.3	1.1	1.5

<sup>a</sup> Determinado como carboximetilcisteína.

posee un residuo de cisteína por molécula, y plímeros de alto peso molecular compuestos por ambas subfracciones. Estas subfracciones se pueden aislar por cromatografía en Biogel P-100 según se indica en el apartado 2.1.5. En la figura 5 se muestra el perfil de elución de la cromatografía. Se distinguen tres fracciones mayoritarias, denominadas BG1, BG2, y BG3. El análisis de aminoácidos e imágenes electroforéticas de estas fracciones se muestran en la tabla II y figura 6, respectivamente, en comparación con la histona nativa y oxidada antes de fraccionar. Aunque el análisis de la tabla no muestra el contenido en cisteína, un análisis de aminoácidos más reciente refleja, por carboximetilación de la proteína, un contenido en cisteína correspondiente a dos cisteínas para BG3, una para BG2 y entre una y dos para BG1 (Barbero, resultados no publicados).

El DNA de timo de ternera, extraído según el método de Kay (1952) tal como se detalla en el apartado 2.2., se ha caracterizado mediante espectro de absorción y curva de desnaturalización térmica. El contenido de RNA y proteína se ha determinado por el método de Schmith-Tannhauser (Munro y Fleck, 1966). La contaminación máxima de RNA detectada ha sido del 2%, siendo del 0.5% la determinada para proteína. El tamaño medio del DNA extraído se ha calculado mediante cromatografía centrífuga en DEAE-celulosa, según se detalla en el apartado 2.7.3. En la figura 7 se muestra la contribución de las distintas fracciones de elución de la cromatografía para una muestra tipo del DNA extraído. El cálculo del tamaño molecular medio da, aproximadamente,  $1.7 \times 10^7$  daltons.

Con el fin de determinar con mayor exactitud la transición térmica se ha calculado la curva derivada de la curva de transición térmica, según se indica más adelante en el apartado 3.5., y se ha descompuesto la curva derivada en gaussianas (también se indicará más adelante como). La descomposición en gaussianas de la derivada de la curva de desnaturalización térmica del DNA obtenido, muestra la existencia de dos

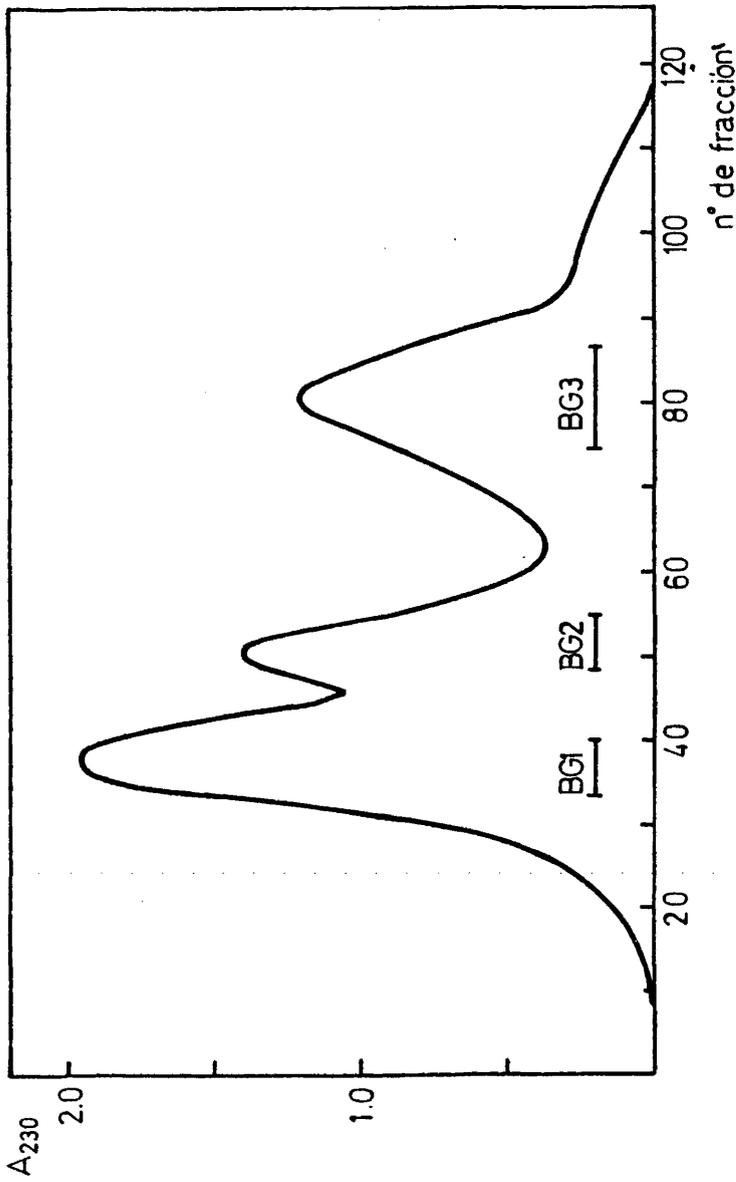
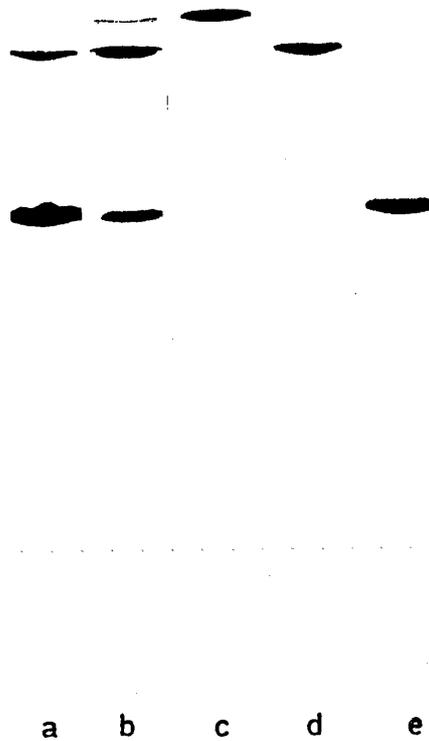


Figura 5. Perfil de elución de la cromatografía en Biogel-P100 de los productos resultantes de la oxidación de la histona H1 de Ceratitidis capitata.

66



**Figura 6.** Electroforesis de los picos resultantes de la cromatografía en Biogel-P100. (a) H1 nativa; (b) resultado de la oxidación; (c) pico 861; (d) pico 862; (e) pico 863.

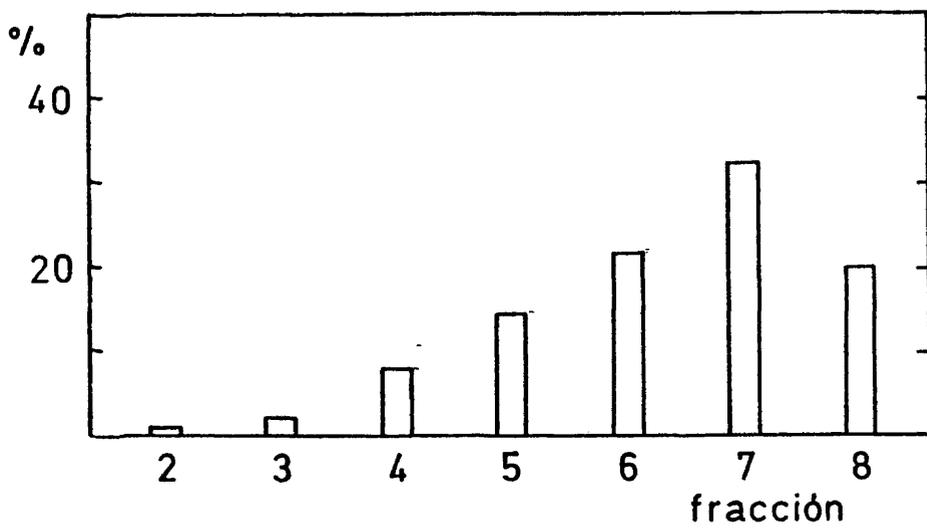


Figura 7. Distribución de tamaños moleculares del DNA de timo de ternera utilizado, obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa.

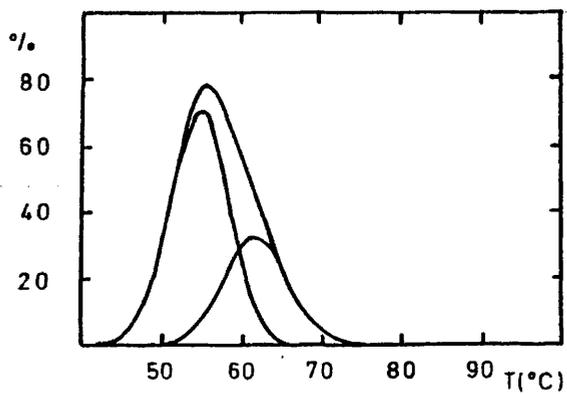


Figura 8. Curva derivada de la curva de transición térmica de DNA, con las dos gaussianas correspondientes a las dos transiciones fundamentales.

transiciones fundamentales, tal como se observa en la figura 8. La primera de ellas a 55°C, que representa las dos terceras partes del total del DNA, y el resto que funde a 62°C. Esta última transición posiblemente sea debida a la existencia de zonas ricas en G-C

### 3.2. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LOS COMPLEJOS DNA-PROTEINA

#### 3.2.1. DNA-Histona H1.

Como se ha comentado ampliamente en la introducción, la asociación de la histona H1 al DNA provoca una serie de cambios estructurales que conducen a una variación de propiedades físicas; una de las cuales, la actividad óptica, resulta especialmente llamativa. Por tanto el DC parece una técnica adecuada para realizar estos estudios. Como se vió, la histona H1 al unirse al DNA en determinadas condiciones de concentración, pH y fuerza iónica, modifica el espectro conservativo de DC del DNA. (Fasman et al., 1970). Esta modificación, que es del mismo tipo que la que presenta la cromatina nativa (Shih y Fasman, 1970) y no se ha observado al hacer complejos con otras histonas (Shih y Fasman, 1971; Adler et al., 1974; Adler et al., 1975). A la estructura responsable de este cambio en el espectro se le ha denominado estructura PSI (Jordan et al., 1972).

En primer lugar se ha realizado un estudio comparativo de estos complejos utilizando H1tt y H1cc nativas. Una vez hecho esto se pretendió observar cual sería el efecto de una modificación estructural en la molécula de H1 sobre la estructura del complejo. Con este fin se utilizó H1 nitrada, modificación que altera la estructura de la región globular de la molécula, tal como se indicó en la Introducción. En este primer conjunto de experimentos se utilizó DNA de alto tamaño molecular.

Posteriormente fue preciso utilizar DNA sonificado, ya que a determinadas relaciones proteína/DNA y en algunas de las condiciones especificadas posteriormente, precipitaba el complejo.

#### 3.2.1.1. Complejos con H1 nativa.

Los complejos se formaron mediante diálisis, por el método de Carrol (1971) (Ver apartado 2.3.1.) de la mezcla de proteína y DNA a la relación deseada en medio de elevada fuerza iónica (NaCl 2.0 M), hasta llevarlo a la concentración de sal deseada. Se utilizó DNA de timo de ternera de gran tamaño molecular ( $1.7 \times 10^7$  Daltons) e histonas H1 de timo de ternera y Ceratititis capitata, con fines comparativos. A la hora de estudiar el complejo influyen tres factores fundamentalmente: concentración de DNA, relación histona/DNA y fuerza iónica. El pH influye, de facto, pero en este caso se han realizado todos los complejos a pH 7.0. La influencia de la concentración de DNA sólo se ha estudiado en algunos casos, con el fin de establecer las condiciones donde se logra mejor la inducción de estructura PSI. En la figura 9 se muestran los espectros de DC de complejos DNA-H1cc en KF 0.11M para  $r=0.2$  (mg proteína/mg DNA), uti lizando dos concentraciones distintas de DNA: 0.07 y 0.04 mg/ml. Como se puede observar la concentración de DNA es importante a la hora de forma se la estructura PSI. Mientras que para una concentración de DNA de 0.07 mg/ml se llega, en estas condiciones, a inducir una contribución considerable de estructura PSI (la elipticidad a 270 nm vale -5000), con la con centración de 0.04 mg/ml el espectro de DC no varía mucho del espectro conservativo del DNA. Los resultados obtenidos con histona de timo de ter nera son completamente similares, de acuerdo con lo observado por Fasman et al (1970) donde los complejos formados con DNA  $10^{-4}$  M (moles de fosfato) presentaban mucha menos capacidad de inducción de estructura PSI que los formados con DNA  $10^{-3}$  M (moles de fosfato). Este hecho se podría inter pretar como la existencia de una fase de nucleación previa a la formación

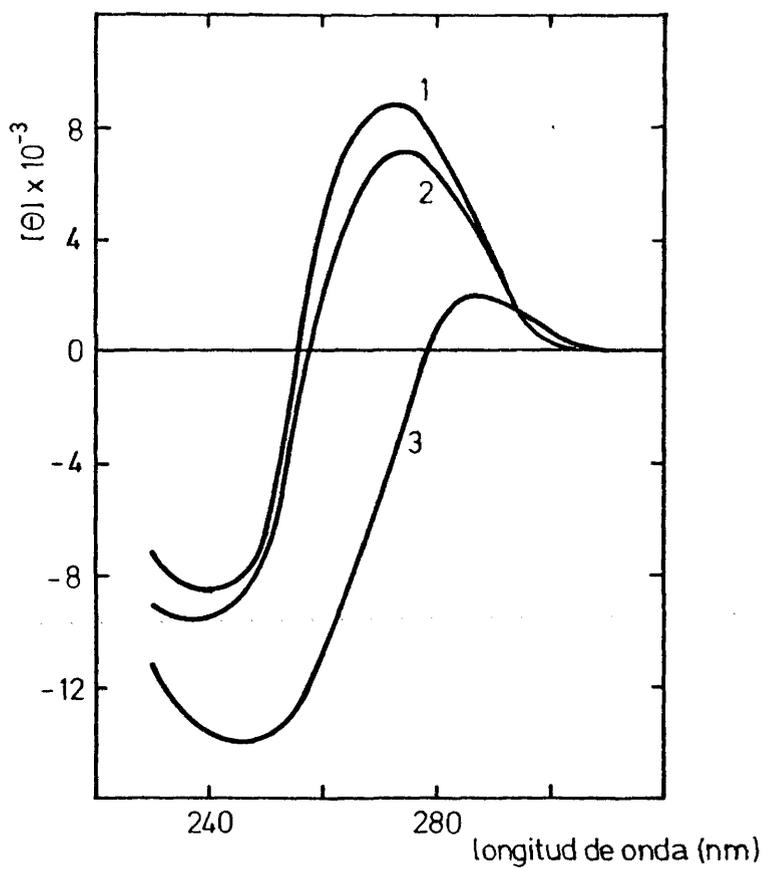


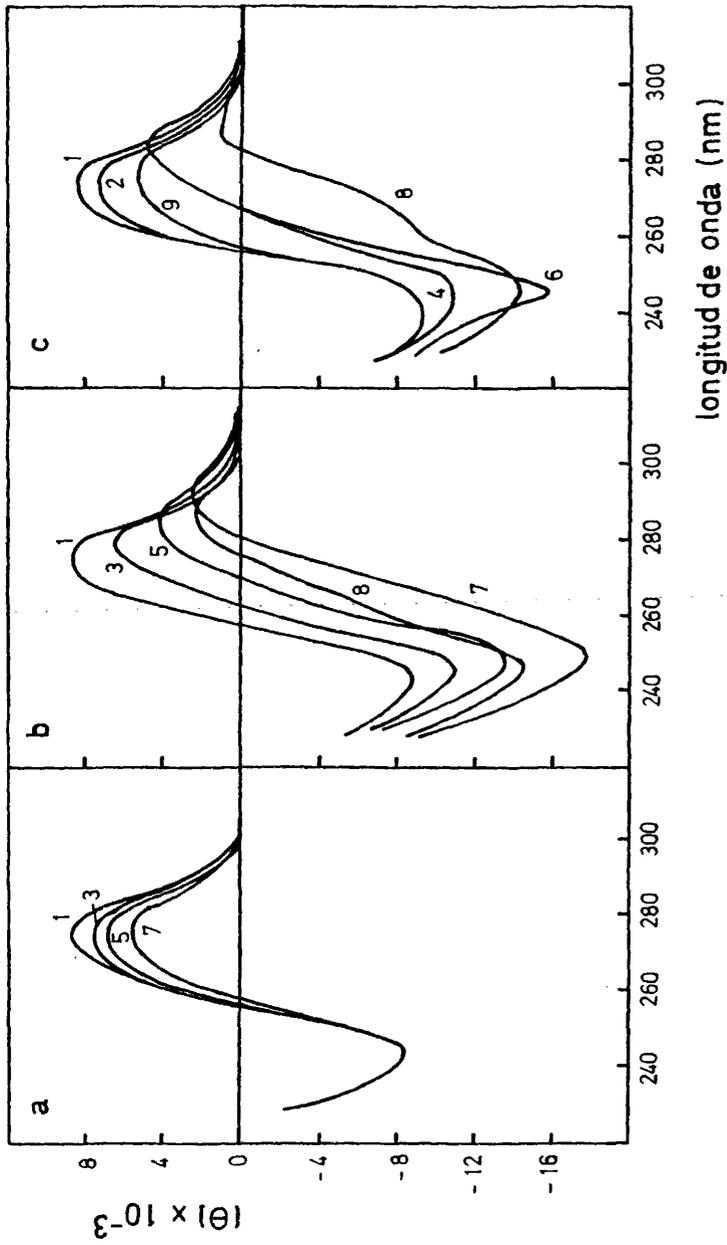
Figura 9. Influencia de la concentración de DNA en los espectros de DC de complejos DNA-HIcc para  $r=0.2$  en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, KF 0.11M, pH 7.0: (1) DNA control; (2) 0.05 mg/ml; (3) 0.07 mg/ml.

de la estructura PSI, para lo cual la concentración de DNA es un factor decisivo.

Por otro lado a concentraciones más elevadas de DNA tiene lugar la precipitación del complejo, en estas condiciones, durante la diálisis. Por tanto, habrá que buscar una concentración de DNA ni muy baja ni muy alta, para formar los complejos.

Las relaciones proteína/DNA ( $r$ , en mg proteína/mg DNA) utilizadas han sido de 0.12 y 0.25 para H1cc y 0.25 para H1tt. Se intentó también  $r = 0.5$  pero se producía la precipitación del complejo durante la diálisis. En la figura 10 se muestran los espectros de DC de los complejos para distintas concentraciones de KF. Como puede observarse en la figura 10-a que corresponde a H1cc, para  $r = 0.12$  no se produce inducción considerable de estructura PSI. Cuando  $r$  se aumenta a 0.25, resulta una fuerte inducción de DNA-PSI. En estos espectros (figura 10-b) hay que resaltar como a partir de KF 0.35 M empieza a desaparecer la contribución de estructura psi como resultado de la parcial disociación del complejo. Por último en la figura 10-c se muestran los resultados obtenidos con H1tt. Como se ve el comportamiento es similar para ambas histonas, si bien parece ser que esta histona comienza a disociarse a concentraciones de KF ligeramente superiores (0.40 M). Como se puede deducir de estos resultados, se ve que la fuerza iónica juega un papel muy importante en la inducción de estructura PSI. Este comportamiento detectado por Jordan et al., (1972) con polímeros sintéticos, coincide con lo observado por Fasman et al., (1970) para H1tt. Por otro lado  $r$  es decisivo, de modo que por debajo de un cierto límite no se logra inducir estructura PSI. Por último hay que resaltar la semejanza de ambas histonas al inducir estructura PSI en el DNA, en estas condiciones.

Debido a la dificultad experimental en la formación de complejos con DNA de gran tamaño molecular se pensó en la posibilidad de reducir el tamaño con el fin de evitar la precipitación (que generalmente



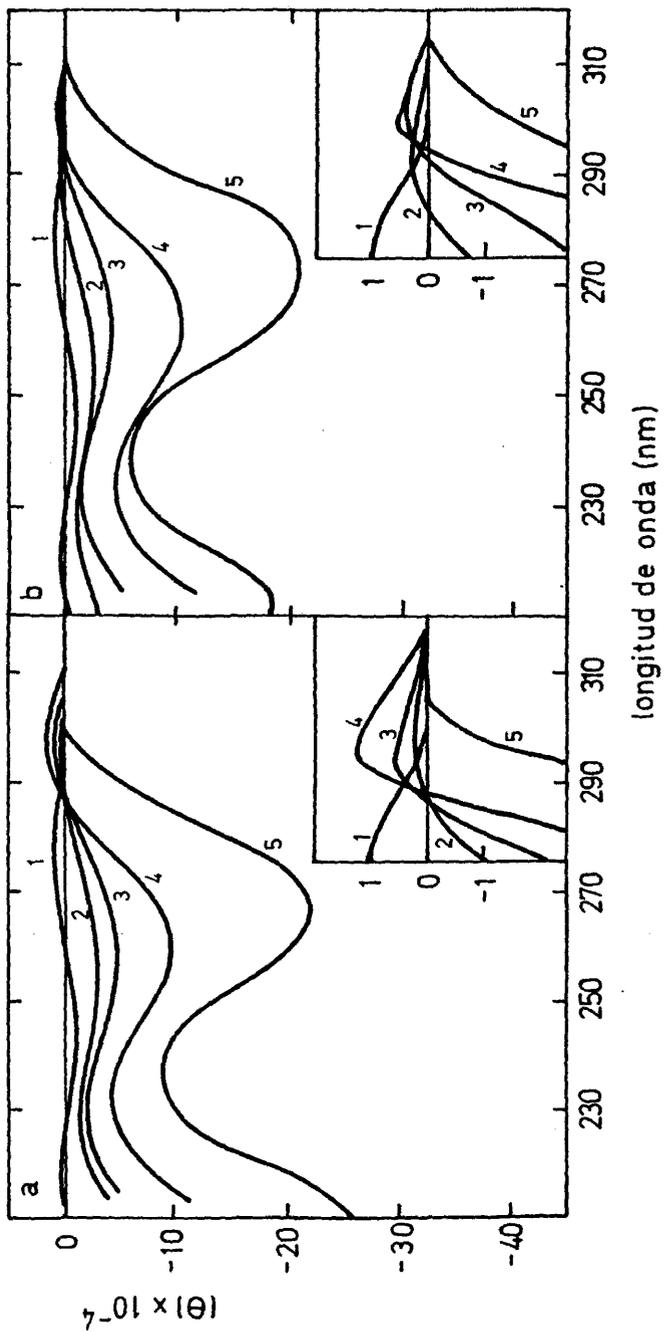
**Figura 10.** Espectros de DC de complejos DNA-histona H1, en función de  $\lambda$  y fuerza iónica en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 : (a) DNA-H1cc,  $r = 0.12$ ; (b) DNA-H1cc,  $r = 0.25$ ; (c) DNA-H1tt,  $r = 0.25$ . Las curvas corresponden a las siguientes concentraciones de KF(M): (1) 0.0; (2) 0.03; (3) 0.08; (4) 0.11; (5) 0.13; (6) 0.17; (7) 0.25; (8) 0.35; (9) 0.40

se produce por entrecruzamiento), dentro de los límites en que se sigan conservando las demás propiedades físicas de un DNA de gran tamaño. Como se detalló en el apartado 2.2., al sonicar el DNA se producen fragmentos de un tamaño medio aproximado de 400 pb. La utilización de DNA sonicado permite formar los complejos por adición directa de la solución de proteína a la solución de DNA; de esta forma la determinación de las concentraciones de DNA y proteína es mucho más fiable. Por otro lado se logran mayores relaciones histona/DNA. En la Introducción se comentó ampliamente como Cole et al. (1977) formaron complejos con H1 y DNA de tamaño corto y observaron por micrografía electrónica la presencia de estructuras de forma toroidal en preparados de complejos de DNA-H1 (en determinadas condiciones de concentración y fuerza iónica). Estas estructuras no han sido detectadas en complejos de DNA de gran tamaño molecular. Por tanto parece interesante estudiar este fenómeno seguido por DC. Por último, hay que hacer la consideración de que al disminuir el tamaño del DNA, aunque nos alejemos del modelo de cromatina, posiblemente potenciaremos la capacidad que tiene la histona H1 de inducir estructura PSI en el DNA; de esta capacidad podremos deducir propiedades que pueden ser importantes a nivel de cromatina.

En el presente estudio, con DNA sonicado, algunas variables menos interesantes se han mantenido constantes, escogiéndose el valor más adecuado. Así, la concentración de DNA ha sido siempre de 0.018 mg/ml. Como se puede comparar con los resultados vistos anteriormente, la concentración de DNA es sensiblemente inferior; pese a ello, el efecto detectado en DC es muchísimo más notorio, como se verá a continuación. Los complejos se han formado en EDTA 1 mM, fosfato 1 mM, NaCl 0.14 M y pH = 7. La presencia del EDTA se justifica para impedir la digestión del DNA por contaminación de nucleasas que pudieran permanecer en los preparados, durante las incubaciones de 24 horas a temperatura ambiente. El parámetro considerado como variable en este estudio ha sido la relación

proteína/DNA,  $r$ . La selección de este parámetro como variable ha sido porque, como se vió anteriormente, es el parámetro más determinante de la inducción de estructura PSI.

En la figura 11 se muestran los espectros de DC para complejos DNA-H1tt realizados a 1 hora y 24 horas de suformación. En ambos casos se muestran las relaciones  $r = 0$  (control), 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4; relaciones superiores presentaban cierto grado de turbidez, como resultado de la precipitación del DNA. El primer hecho relevante es la contribución de elipticidad negativa a 265-270 nm que varía muchísimo de unos complejos a otros, llegando a ser del orden de -200.000 u. Hay que resaltar que los máximos valores obtenidos por Fasman et al. (1970) fueron de -160.000 u, y esto para  $r = 3.0$  moles aminoácido/moles fosfato, que equivaldrían a aproximadamente 9 mg proteína/mg DNA. Tampoco Jordan et al. (1972) con polímeros sintéticos lograron contribuciones tan grandes. Y, por último, los valores máximos que se mostraron anteriormente con DNA de gran tamaño fueron de -18.000 u. Por tanto el resultado observado con DNA sonicado es sumamente llamativo. Por otro lado hay que destacar la aparición, como se ve en el recuadro de la figura 11, de una contribución de elipticidad positiva, de aproximadamente 9000 u, en la zona del UV más próximo (290-310 nm) que aparentemente se va corriendo hacia el rojo al ir aumentando  $r$  y que llega a desaparecer para  $r = 0.4$ . Este resultado podría ser debido no a un corrimiento hacia el rojo de una banda real, sino a la aparición de una banda de elipticidad positiva sobre los 290 nm que va siendo ocultada por la gran banda negativa de los 270 nm, llegando a una situación de compromiso para  $r = 0.3$ , cuando la contribución negativa no ha alcanzado aún su máxima expresión. Si recordamos la figura 10 (b y c) de espectros de DC de DNA sin sonicar, vemos que, aun que menos, también se detecta este pseudocorrimiento hacia el rojo. Por tanto cabría pensar que la estructura PSI produce en DC al menos dos contribuciones, una positiva y otra negativa, siendo esta última muy pronun-



75

**Figura 11.** Espectros de DC de complejos DNA sonificado-Hitt en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14 M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml realizados a 1 hora (a) y 24 horas (b) de su formación, en función de  $\bar{x}$ : (1) 0.0; (2) 0.1; (3) 0.2; (4) 0.3; (5) 0.4. En los recuadros se muestra ampliada la región del UV próximo.

TABLA III: Datos más significativos de los espectros DC de complejos DNA sonificado-Hltt.

Tiempo	r <sup>a</sup>	Máximo		Mínimo		Máximo		Mínimo	
		$\lambda$ <sup>b</sup>	$\theta$ <sup>c</sup>	$\lambda$	$\theta$	$\lambda$	$\theta$	$\lambda$	$\theta$
1 hora	0	275	10	245	- 12	220	5	210	0
	0.1	295	2	290	- 31	227	- 14	207	- 43
	0.2	295	5	255	- 45	230	- 21	-	-
	0.3	295	13	260	-103	230	- 43	207	-134
	0.4	-	-	265	-230	235	- 87	207	-260
24 horas	0.1	290	3	290	- 25	225	- 10	210	- 33
	0.2	295	4	253	- 42	230	- 19	-	-
	0.3	300	6	263	-106	233	- 46	-	-
	0.4	-	-	273	-220	238	- 62	213	-190

6

<sup>a</sup> mg proteína/mg DNA

<sup>b</sup> nm

<sup>c</sup> x 10<sup>-3</sup> grados cm<sup>2</sup>/ decimol

ciada, sobre todo para complejos con DNA corto. Al comparar las figuras 11-a y 11-b se ve que existen diferencias en los complejos realizados a una hora y a 24 horas. Este hecho hace pensar en la existencia de un cambio lento en la estructura del complejo. Por tanto tendremos, al menos, dos tipos de procesos: uno rápido, que modifica sustancialmente el espectro conservativo del DNA, y otro lento, que es de menor magnitud pero que presenta una ligera tendencia a correr hacia el rojo (unos 5 nm) las distintas bandas. En la tabla III se detalla el valor de las bandas principales (máximos y mínimos) de DC, así como la longitud de onda donde se producen. Como se puede ver la banda de elipticidad negativa a 265 nm llega a valer -230.000 u a 1 hora y para  $r = 0.4$ . Un hecho de resaltar es la disminución de esta contribución a las 24 horas, junto con el desplazamiento al rojo de 8 nm.

Este hecho, de nuevo, no querría decir que con el tiempo se pierda la estructura que produce esa banda negativa, sino que podría justificarse como la aparición con el cambio lento, de otra estructura cuya contribución a 235-238 nm fuera positiva. Este proceso daría como resultado la disminución de elipticidad negativa a 265 nm y el corrimiento hacia el rojo del mínimo.

El mismo estudio se ha realizado con complejos DNA-Hlcc para comprobar si, en estas condiciones, existe alguna diferencia notoria entre los complejos de ambas proteínas. En la figura 12 se muestran los espectros de DC y en la tabla IV los datos numéricos. Como puede verse los resultados son cualitativamente semejantes, si bien cabe resaltar algunas diferencias cuantitativas. Los complejos para  $r = 0.1, 0.2$  y  $0.3$  presentan una mayor contribución de estructura PSI que sus homólogos de Hltt. Sin embargo para  $r = 0.4$  la contribución de Hlcc es menor. Estas diferencias, dada la magnitud de las bandas de DC, pueden perfectamente, en marcarse dentro del error experimental. Como ya se comentó anteriormente la contribución al DC de la estructura PSI es de tal magnitud, que varia

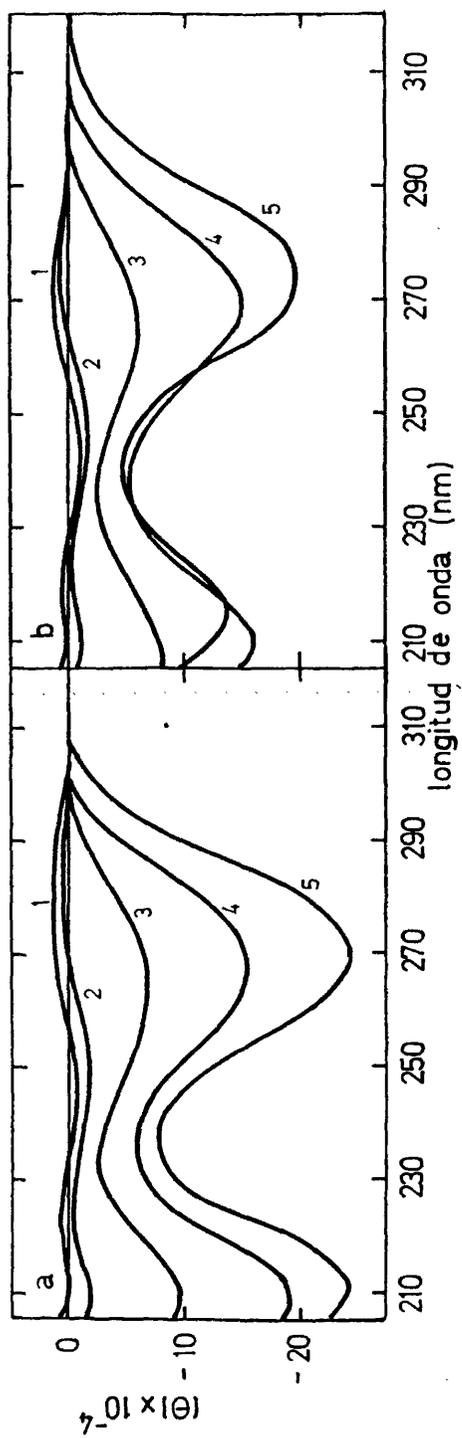


Figura 12. Espectros de DC de complejos DNA sonificado-Hlcc en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml realizados a 1 hora (a) y 24 horas (b) de su formación, en función de  $\bar{x}$ : (1) 0.0; (2) 0.1; (3) 0.2; (4) 0.3; (5) 0.4.

TABLA IV: Datos más significativos de los espectros DC de complejos DNA sonificado-Hlcc.

Tiempo	r <sup>a</sup>	Máximo		Mínimo		Máximo		Mínimo	
		λ <sup>b</sup>	θ <sup>c</sup>	λ	θ	λ	θ	λ	θ
	0	275	10	245	-12	220	5	210	0
1 hora	0.1	280	5	260'	-20	225	-5	210	-20
	0.2	-	-	265	-70	232	-25	210	-100
	0.3	-	-	265	-160	235	-50	210	-190
	0.4	-	-	270	-245	235	-80	210	-245
24 horas	0.1	275	5	245	-15	225	-5	210	-15
	0.2	-	-	265	-60	237	-25	210	-80
	0.3	-	-	270	-150	235	-50	210	-165
	0.4	-	-	275	-200	240	-45	215	-140

49

a mg proteína/mg DNA

b nm

c x 10<sup>-3</sup> grados x cm<sup>2</sup>/decimo1

ciones insignificantes en cualquiera de los parámetros ( $r$ , fuerza iónica concentración) podrían producir alteraciones notables del espectro. Por tanto las diferencias no podrían significar una interacción diferente entre ambos complejos.

Como se dijo en la Introducción, el descenso de elipticidad en cromatina a 270 nm podría deberse a una pequeña contribución de estructura PSI. De acuerdo con los resultados de Sipéki y Wagner (1977) la contribución tan particular al DC de la estructura PSI podría deberse a zonas de DNA en doble hélice dispuestas en paralelo. Según este criterio, es de esperar que el efecto observado en DNA de pequeño tamaño sea debido a un mayor empaquetamiento del DNA en haces paralelos que el observado por Sipéki y Wagner en cromatina reducida de esperma de caballo. Si este resultado se complementa con las observaciones al microscopio electrónico de Cole et al. (1977), cabría pensar en la estructura de forma toroidal donde el DNA es forzado por la histona a enrollarse en haces paralelos a todo lo largo del toroide. Esta disposición justificaría el hecho de que con DNA de gran tamaño no se induzca tanta contribución de estructura PSI. El gran tamaño del DNA dificultaría la disposición toroidal. Ahora bien, aunque poco, si se da algo de contribución de estructura PSI, por tanto cabría esperar que si no todo, naturalmente, sí una pequeña parte del DNA es obligada por la histona a adoptar una situación en la cual la doble hélice discorra un trecho en haces paralelos. Por otra parte, como ya se ha discutido anteriormente, dada la gran magnitud en DC que esta estructura representa, sería pequeñísimo el porcentaje de la misma necesario para justificar las desviaciones de los espectros de DC de la cromatina nativa con respecto al DNA conservativo. En la figura 13 se muestra esta contribución a la estructura PSI de la cromatina nativa reflejada en DC, junto con la misma contribución de complejos DNA sonificado-H1. Como se ve, la diferencia es notoria. Por último abundar en lo ya dicho en la Introducción acerca de que el descenso en elipticidad a

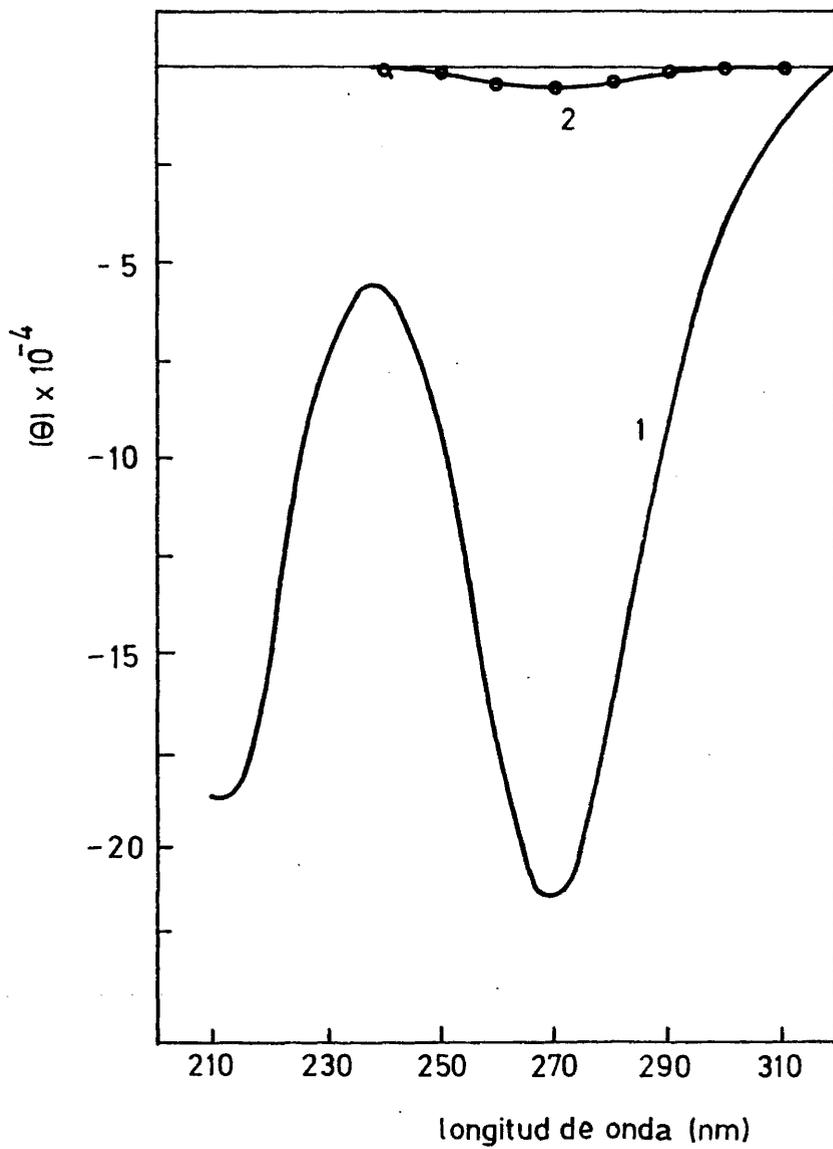


Figura 13. Comparación de los espectros de DC del complejo DNA soni-  
cado-H1tt en EDTA 1 mM, fosfato 1mM, NaCl 0,14M, pH=7.0  
y  $r=0.4$  (1), con la contribución de estructura PSI en cro-  
matina nativa (2), (Shih y Fasman, 1970).

La formación de los complejos DNA-Hi de tipo in vitro con el DNA se debe a la presencia de la histona nativa en el DNA ya liberada del nucleosoma, durante la digestión con un tipo de enzimas particular.

Se ha observado, como en la formación de los complejos in vivo en el organismo. Por un lado la incorporación de DNA, fuerza la liberación de la histona nativa /DNA. Y por otro lado influye de forma importante, la liberación de DNA. Además se ha comprobado que si bien la Hicc tiene una mayor afinidad por el DNA que la Hicc, en el organismo, las dos, por tanto se puede considerar que ambas histonas interactúan de forma similar con el DNA.

2.1.1.1. Quantificación con Hicc nativa.

Los complejos DNA-Hi de tipo in vitro de Cervus y Capra se han formado utilizando DNA de gran tamaño. Se ha observado que en estas condiciones, precipitan mejor los complejos. Quizá esta característica se deba a la liberación de la histona nativa y al entrecruzamiento de las histonas HI al utilizar una fijación. En algunas de las relaciones histona/DNA se han encontrado valores diferentes de DNA: a aproximadamente 0.030 y 0.010 mg/ml, los cuales observamos notablemente menores que las utilizadas en los complejos in vivo nativos, para DNA sin sonicar. En la figura 10 se muestran los resultados de DC en NDI 0.1 M para estos complejos. Comparando los resultados de las curvas 1-3 y 4-5 entre sí, la concentración de DNA para un tipo de fijación de la estructura PSI. Otro aspecto importante es la obtención de mayores contribuciones de elutriación para los complejos de histona nativa; llega a v<sub>2</sub> de 1.000 u a 1.000 mg/ml el complejo DNA-Hicc nativa, con concentración de DNA de 0.010 mg/ml. La razón de esta diferencia podría estar en

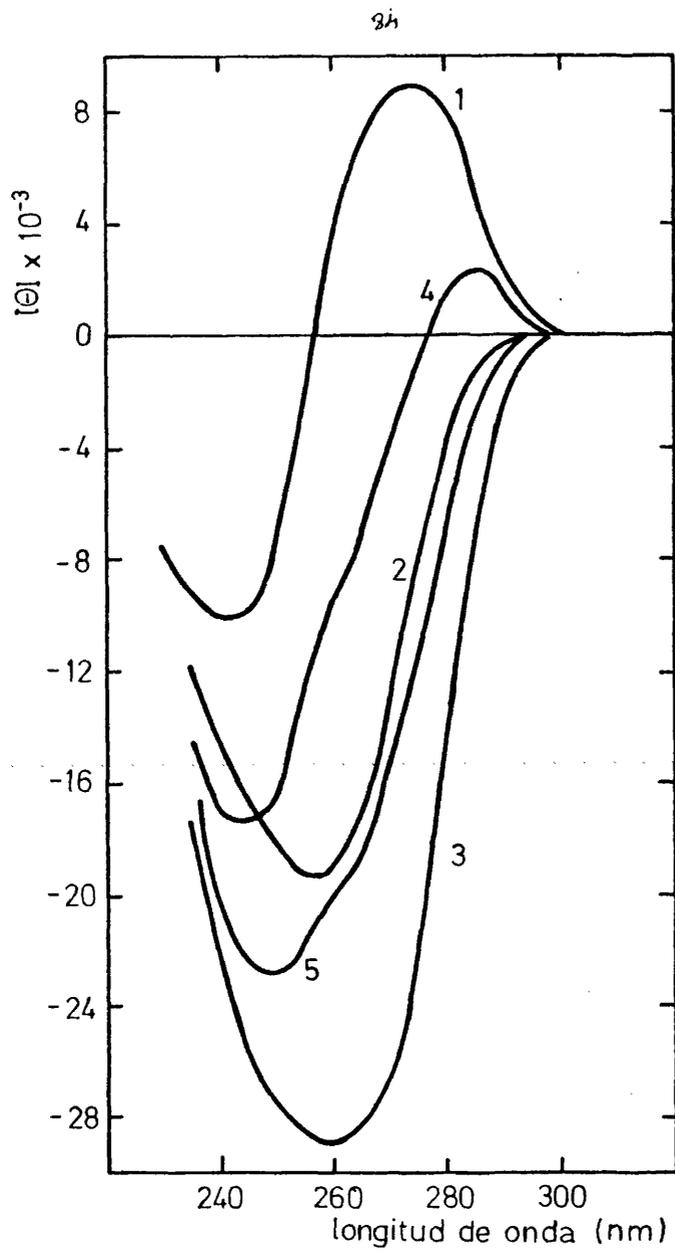
la mayor relación ( $r = 0.5$ , que es el doble que en los complejos citados) de proteína/DNA, y no en una mayor capacidad intrínseca de la histona nitrada de formar estructura PSI. Este dato vendría a corroborar lo ya expuesto en el apartado anterior en el sentido de que la relación histona/DNA es el parámetro más importante a la hora de formar la estructura PSI.

De estos resultados se puede deducir que no existen, en primer lugar, grandes diferencias en el comportamiento de los complejos de ambas histonas. Considerese que las diferencias en los espectros se deben a la diferencia real en concentración de DNA de los cuatro complejos, como se indica en el pie de la figura 14. Por otro lado la comparación de estos resultados con los obtenidos para complejos con histonas nativas lleva a concluir que no existen diferencias importantes por el hecho de modificar la región globular de la molécula de histona.

Este resultado no está en total desacuerdo con los observados por Adler et al. (1971) en complejos con H1 fosforilada y por Gurnotte et al. (1973) con histona maleilada, ya que la fosforilación (que afecta a los residuos de serina) y sobre todo la maleilación (que afecta a lisinas) modifican sobre todo la región C-terminal de la molécula, mientras que la nitración afecta, como se ha dicho, exclusivamente a la región globular de la histona.

### 3.2.1.3. Digestión triptica del complejo.

Dado el alto contenido en residuos básicos, fundamentalmente lisina, de la región C-terminal de la histona H1 (ver tabla II), la hidrólisis triptica de la histona se produce con relativa facilidad, aún en condiciones estructurantes (Hartman et al, 1977; Barbero et al, 1980) empezando por esta región de la molécula; por tanto en estas condiciones, mediante hidrólisis triptica controlada (relación enzima/histona de 1/1000) se puede obtener un péptido resistente a la hidrólisis durante al menos

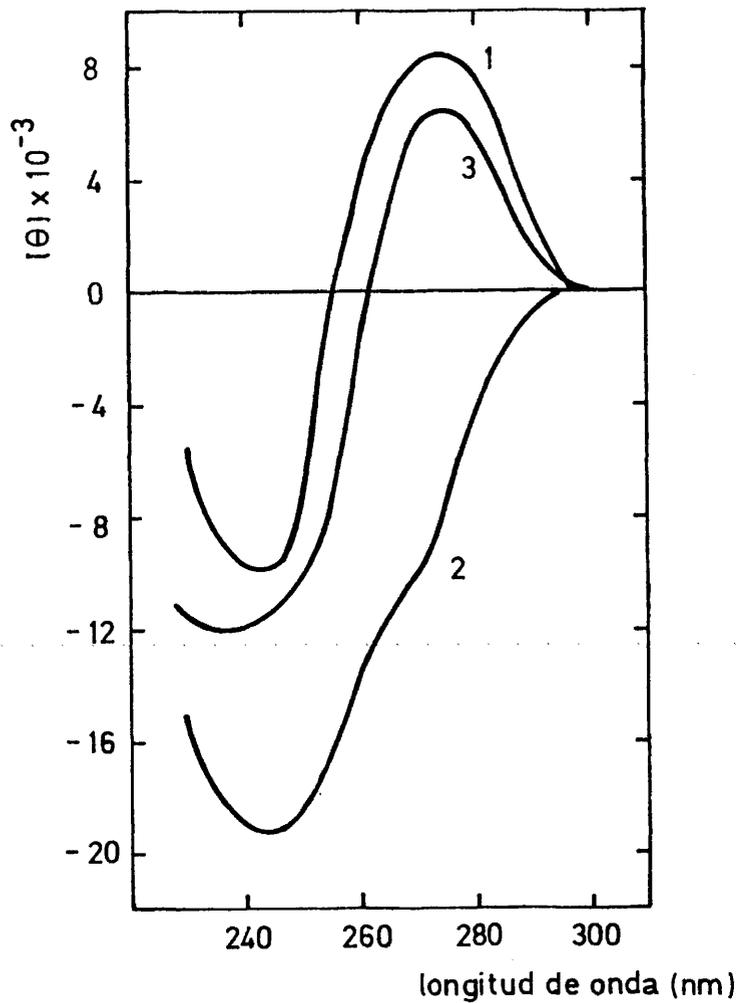


**Figura 14.** Espectros de DC de complejos de DNA-HI modificada por nitración para  $r = 0.5$ . (1) DNA control en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, KF 0.15 M, pH 7.0; (2) DNA-H1tt concentración de DNA 0.015 mg/ml; (3) DNA-H1tt concentración de DNA 0.030 mg/ml; (4) DNA-H1cc concentración de DNA 0.015 mg/ml; (5) DNA-H1cc concentración de DNA 0.030 mg/ml.

las dos primeras horas; como muestran los resultados obtenidos por los autores antes citados. Este péptido corresponde a la región globular de la molécula, y a tiempos mayores de hidrólisis es hidrolizado también .

Con el fin de proceder a la hidrólisis triptica de complejos DNA-HI en estructura PSI, se procedió a la formación de complejos DNA-HIcc en KF 0.30 M,  $r = 0.25$ , para una concentración de DNA de 0.08 mg/ml y el resto de las mismas condiciones experimentales que se vieron en el apartado 3.2.1.1., para complejos con DNA sin sonicar. La curva 2 de la figura 15 muestra el espectro de DC de este complejo comparado con el de DNA (curva 1). Se procedió a la hidrólisis triptica añadiendo tripsina en relación 1/1000 y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Con el fin de seguir el transcurso de la hidrólisis se sacaron alícuotas del medio de hidrólisis a distintos tiempos y una vez parada la digestión se procedió a hacer la electroforesis en urea del contenido en proteína de estas alícuotas. La figura 16 muestra las imágenes electroforéticas para distintos tiempos de digestión. Como puede observarse a 2 horas de digestión todavía existe una contribución importante de péptido resistente a la hidrólisis. La curva 3 de la figura 15 muestra el espectro de DC del complejo al cabo de 1 hora de digestión. Como puede verse, al comparar con la imagen electroforética del contenido en proteína a una hora de digestión, pese a que la contribución de TRC en este punto es muy grande, el espectro de DC muestra la pérdida casi total de la estructura PSI del complejo. Este resultado lleva a deducir la importancia de la región C-terminal de la molécula en el mantenimiento de la estructura PSI.

Como se ha ido viendo a lo largo de todo este apartado, las histonas HI tanto de timo de ternera como de Ceratitidis capitata poseen, en ciertas condiciones, la capacidad de alterar sensiblemente la estructura del DNA y esto va reflejado en los espectros de DC. Por otro lado, la modificación de la región globular de la molécula no parece afec



**Figura 15.** Digestión triptica del complejo DNA-HIcc r. 0.25 en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, KF 0.30 M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.08 mg/ml; espectros de DC: (1) DNA control; (2) complejo antes de comenzar la digestión; (3) complejo después de 1 hora de digestión.

81

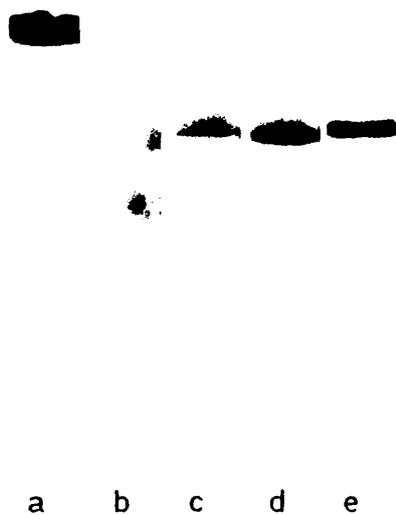


Figura 16. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la digestión con tripsina del complejo DNA-Hlcc a diferentes tiempos (min): (a) 0; (b) 6; (c) 35; (d) 60; (e) 120.

tar a la formación de esta estructura; mientras que la región C-terminal es completamente necesaria. Se plantea, pues, el problema de si será capaz la región C-terminal aislada de formar estructura PSI con el DNA, o quizá sea necesaria la presencia de la molécula completa. Para poder determinar estos interrogantes se procedió a formar complejos con las distintas regiones aisladas de la molécula de H1.

### 3.2.2. Complejos DNA-dominios estructurales de la histona H1.

De los tres dominios estructurales descritos en la histona H1 (Hartman et al., 1977; Barbero et al., 1980; Barbero, 1981) la región N-terminal es la única que no ha sido aislada por la falta de un punto de rotura específica que rinda esta región. Por tanto el presente estudio se ha realizado sólo con las regiones C-terminal y globular. Dado que es con DNA sonificado con el que se ha observado mayor efecto en DC (apartado 3.2.1.1.), los complejos se han formado con este DNA.

#### 3.2.2.1. Complejos con la región C-terminal

Se han utilizado para este estudio dos tipos de fragmentos que contienen la región C-terminal, obtenidos mediante rotura con NBS (que llamaremos CNBS) y con trombina (CTB), respectivamente (ver el apartado 3.1.). Como se dijo en la introducción (ver figura 1), el fragmento CNBS (residuos 72-216) contiene parte de la zona globular de la molécula, residuos 72 al 120 (Cole, 1977), mientras que el obtenido con trombina (residuos 120-216) representa exclusivamente la región C-terminal (Barbero, 1981).

Las condiciones experimentales han sido las mismas que las utilizadas con la molécula intacta, con el fin de poder comparar los resultados (apartado 3.2.1.1.). Puesto que la estructura PSI inducida en el DNA es similar tanto para H1tt como para H1cc, los complejos se han

formado solo con regiones C-terminal y globular de la histona de timo. En las figuras 17 y 18 se muestran los espectros de DC de los complejos formados con CNBS y CTB, respectivamente, en ambos casos a 1 hora y 24 horas de su formación, para distintas relaciones histona/DNA ( $r = 0, 0.1, 0.2, 0.3$  y  $0.4$ ). Las tablas V/ y VI contienen el resumen de los datos numéricos ( máximos y mínimos) de los espectros de D.C.

Como se puede deducir de la comparación de estos resultados con los obtenidos con la molécula intacta, la inducción de estructura PSI en complejos con estos fragmentos C-terminales es también muy llamativa, llegándose a superar los valores de elipticidad obtenidos en complejos con la histona nativa (el mínimo a 270 nm llega a alcanzar  $-360.000$  u). Si comparamos la inducción de estructura PSI de ambos fragmentos C-terminales se observa que es del mismo orden, no notándose diferencias relevantes.

Ya se comentó en la introducción que al intercalar residuos hidrofóbicos en poli-lisina se potenciaba su capacidad de inducción de estructura PSI (Ong et al., 1976; Mandel y Fasman, 1976). Como también se dijo entonces la parte C-terminal de la molécula de H1 posee secuencias repetitivas del tipo Prol-tryls-lys-Pro y Pro-lys-lys-Ala, y aún cuando no existen experimentos con polímeros de esta naturaleza es de esperar que la gran capacidad de inducción de estructura PSI de la parte C-terminal de la molécula de H1 tenga una causa semejante.

Los resultados anteriores pueden estar relacionados con las observaciones en microscopía electrónica realizadas por Suan (Comunicación personal) sobre dichos complejos en las mismas condiciones. En dichas microfotografías se observan, de nuevo, la formación de las estructuras en forma toroidal, que aumentan de tamaño al aumentar la relación histona/DNA. Además, se observa también un entretejido de DNA que cubre como una malla las zonas entre los toroides; quizá esta fracción de DNA

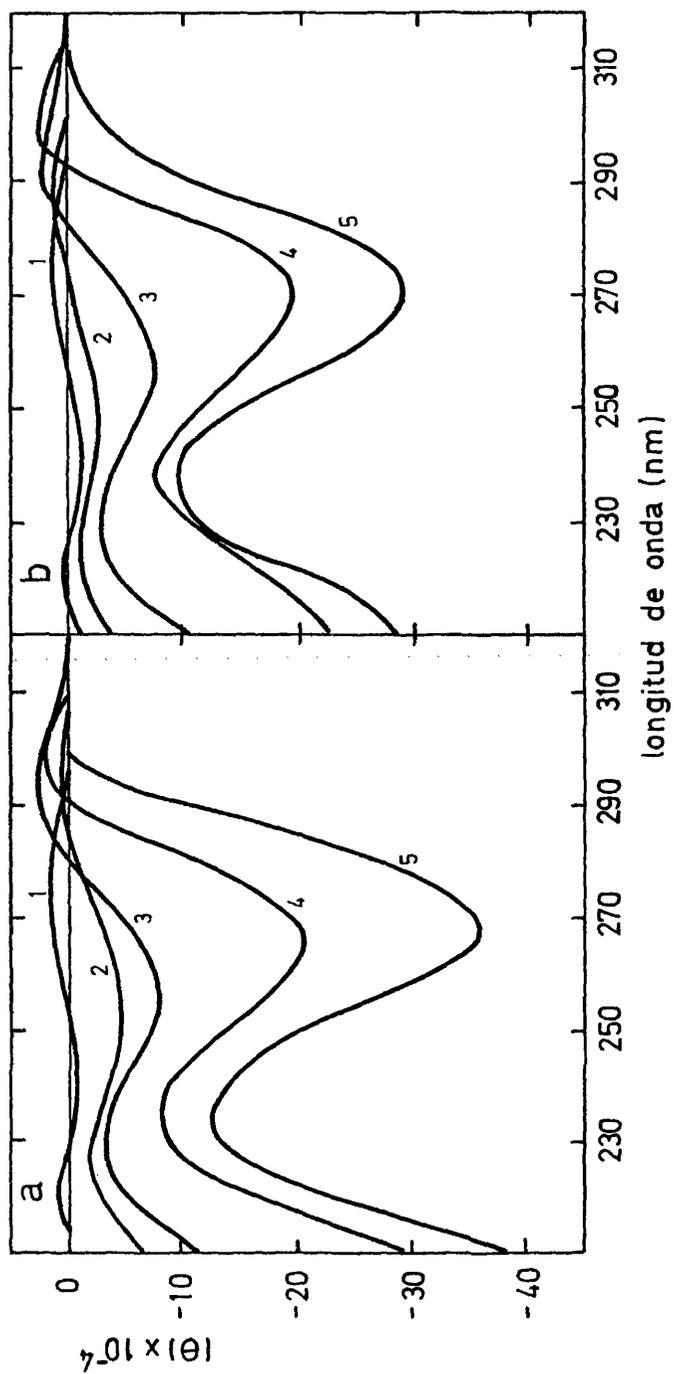
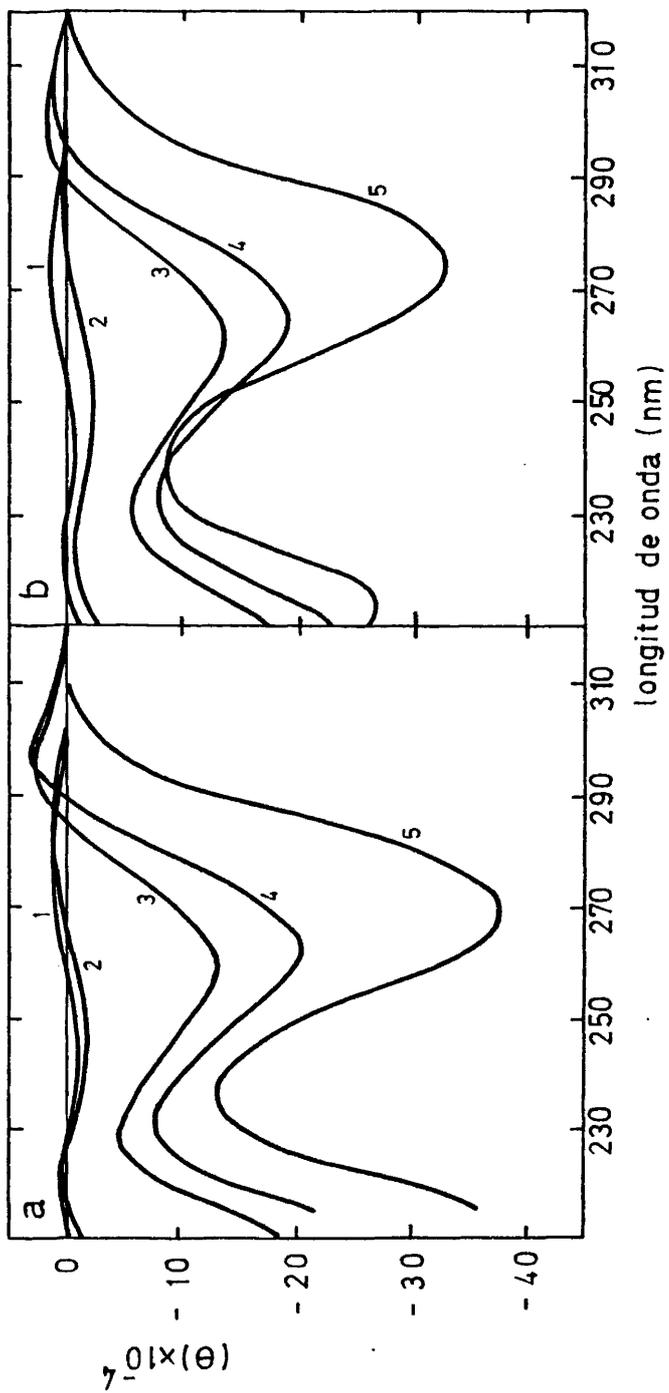


Figura 17. Espectros de DC de complejos DNA sonificado-CNBS de H1 de timo de ternera en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.016 mg/ml, realizados a 1 hora (a) y 24 horas (b) de su formación, en función de  $\bar{x}$ : (1) 0.0; (2) 0.1; (3) 0.2; (4) 0.3; (5) 0.4.



**Figura 16.** Espectros de DC de complejos DNA sonificado-CTB de HI de timo de ternera en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml, realizados a 1 hora (a) y 24 horas (b) de su formación, en función de  $\lambda$ : (1) 0.0; (2) 0.1; (3) 0.2; (4) 0.3; (5) 0.4.

TABLA V: Datos más significativos de los espectros DC de complejos DNA sonificado-CNBS.

Tiempo	r <sup>a</sup>	Máximo		Mínimo		Máximo'		Mínimo'	
		λ <sup>b</sup>	θ <sup>c</sup>	λ	θ	λ	θ	λ	θ
	0	275	10	245	- 12	220	5	210	0
1 hora	0.1	292	5	255	- 50	227	- 21	207	- 68
	0.2	292	26	255	- 85	227	- 32	207	-120
	0.3	297	10	263	-220	230	- 90	207	-290
	0.4	-	-	265	-324	235	-130	207	-385
24 horas	0.1	285	9	250	- 28	225	- 8	208	- 36
	0.2	292	23	255	- 76	227	- 29	205	-120
	0.3	296	24	270	-200	238	- 80	210	-230
	0.4	-	-	270	-270	235	- 97	210	-280

<sup>a</sup> mg proteína/mg DNA

<sup>b</sup> nm

<sup>c</sup> x 10<sup>-3</sup> grados x cm<sup>2</sup>/decimo1

TABLA VI: Datos más significativos de los espectros DC de complejos DNA sonificado-CTB

Tiempo	r <sup>a</sup>	Máximo		Mínimo		Máximo		Mínimo	
		λ <sup>b</sup>	θ <sup>c</sup>	λ	θ	λ	θ	λ	θ
	0	275	10	245	- 12	220	5	210	0
1 hora	0.1	280	11	248	- 19	223	2	207	- 18
	0.2	295	28	257	-140	228	- 40	-	-
	0.3	295	29	262	-202	228	- 90	-	-
	0.4	-	-	270	-380	235	-131	-	-
24 horas	0.1	286	7	250	- 21	224	- 3	208	- 23
	0.2	296	15	262	-135	229	- 55	204	-186
	0.3	298	11	264	-191	232	- 90	208	-236
	0.4	-	-	273	-330	239	- 96	213	-270

a mg proteína/mg DNA

b nm

c x 10<sup>-3</sup> grados x cm<sup>2</sup>/decimal

sea la responsable de alguna de las bandas observadas en DC o bien de alguno de los procesos cinéticos.

Con el fin de comparar de forma más precisa la capacidad de inducción de estructura PSI de las fracciones C-terminales y de la histona H1, se ha representado en la figura 19 el valor de la elipticidad a 270 nm frente a r. En ella se puede apreciar el orden creciente de capacidad de inducción de estructura PSI: primero CTB, después CNBS y por último H1tt. Como se había dicho antes, el comportamiento cualitativo es semejante para los tres complejos. Por otra parte se observa un efecto cooperativo en la inducción de estructura PSI con la variación de r.

Para comprobar el grado de contribución de la proteína en la región del UV lejano, se formaron complejos para la relación  $r = 0.4$ , en las mismas condiciones antes dichas pero variando el orden de adición de la proteína y del NaCl. Los espectros de DC se muestran en la figura 20. Como se observa, la contribución del complejo sin NaCl (curva 1) en la zona referida del espectro es despreciable frente a la contribución del complejo en NaCl 0.14 M, es decir formando estructura PSI. Este resultado parece demostrar que el descenso de elipticidad detectado en la región del UV lejano, en los complejos en estructura PSI, no es debido a la contribución de la proteína, sino resultado de la citada estructura.

De todos estos resultados puede deducirse que la región C-terminal de la molécula, no sólo es capaz de inducir estructura PSI en el DNA, como la molécula entera, sino que este efecto se ve potenciado.

#### 3.2.2.2. Complejos con la región globular.

La región globular (TRC) ha sido aislada como fragmento resistente a hidrólisis triptica controlada (apartado 2.1.2.). Los complejos se realizaron en las mismas condiciones que las anteriores, excepto que se han aumentado los valores de r de forma considerable: 0, 1.0, 2.0, 3.0

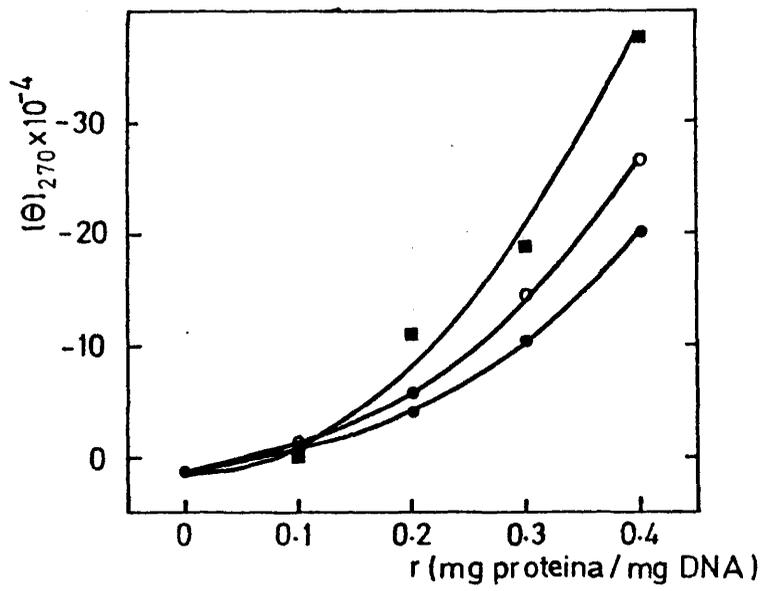
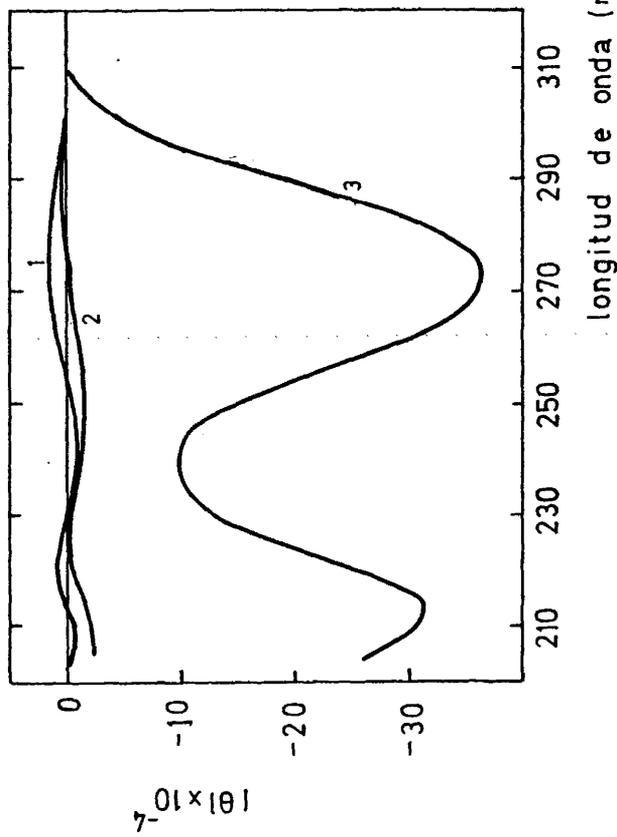


Figura 19. Variación de la elipticidad a 270 nm en función de  $r$ , para los diferentes complejos a las 24 horas de su formación: ( $\bullet$ ) H1tt; ( $\circ$ ) CNBS; ( $\blacksquare$ ) CTB.



**Figura 20.** Comparación de los espectros de DC de complejos DNA-CNBS  $r=0.4$ , en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml. (1) DNA control; (2) complejo formado al mezclar las soluciones de DNA y proteína en la relación adecuada y posterior adición de sal; (3) complejo formado al mezclar las soluciones de DNA y proteína en las condiciones de fuerza iónica deseadas, a 1 hora de su formación.

y 4.0. La figura 21 muestra los espectros de DC del complejo  $r=0.4$  en comparación con el DNA. Como puede apreciarse la variación es muy pequeña, pese a la gran cantidad de proteína. La variación existente en la zona del UV lejano puede deberse simplemente a la contribución de la proteína en esa zona. De estos resultados se puede deducir que la región globular de la histona H1 no induce estructura PSI, si bien no impide que se forme, en absoluto, cuando forma parte de la molécula de histona. Este resultado está de acuerdo con los resultados de digestión triptica detallados en el apartado 3.2.1.3, donde la estructura PSI desaparecía, aun permaneciendo sin digerir la zona globular.

Como se ha ido viendo a lo largo de los dos últimos apartados, la capacidad de inducción de estructura PSI reside en la región C-terminal, siendo nula la contribución de la región globular. También se ha visto que la región C-terminal produce una mayor contribución que la histona nativa. Este resultado no es de extrañar ya que, como se comentó en la introducción, la parte C-terminal de la molécula de H1 es sin duda la más básica y, por tanto, la que más fuertemente interacciona con el DNA (Bradbury et al, 1975). Dicha región posee, como se dijo, un alto contenido en secuencias repetitivas de Pro-Lys-Lys-Pro y Pro-Lys-Lys-Ala (Cole, 1977). Aunque es de esperar que la H1cc también presente una composición similar, sin embargo posiblemente sea menos básica, ya que la molécula posee menor proporción de lisinas (Franco et al, 1974). Este hecho podría explicar las ligeras diferencias observadas en cuanto a la interacción de H1tt y H1cc.

El hecho de que la histona induzca menos estructura PSI podría deberse a que a una misma relación (i.e.  $r=0.4$ ) en realidad existe menos cantidad de región C-terminal que en el complejo, a la misma relación, de esta región aislada. Pero también podría deberse a que la región globular limitara, de algún modo, la acción de la región C-terminal,

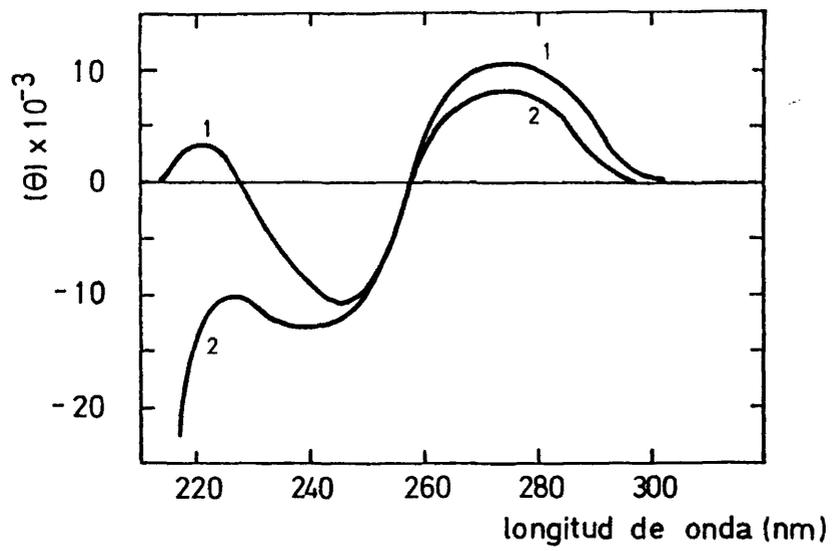


Figura 21. Espectros de DC del complejo DNA-TRC de HI de timo de ternera,  $r= 4.0$  en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14 M pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml: (1) DNA control; (2) complejo.

en el caso de la molécula entera. Se podría considerar el valor de elipticidad a 265 del complejo DNA-CTB a  $r=0.4$ , que es  $-360000$  u, como el 100% de estructura PSI que se podría lograr en estas condiciones (es decir, siendo toda la proteína región C-terminal); dado que la región globular supone un 39% de la molécula de histona, la contribución relativa que restaría a la molécula sería de  $-122400$  u a 265 nm. Entonces si se corrige la contribución de la molécula entera, que es  $-200000$  u, con esta cantidad resultaría una banda a 265 de  $-322400$  u. Como se ve este resultado estaría lejos aun de alcanzar los  $-360000$  u, por tanto cabría pensar en que la región globular no sólo no favorece la acción de la región C-terminal en la molécula intacta, sino que la dificulta; aunque, eso sí, este efecto sería mucho menor del que parece a simple vista. Abundando en este hecho sería interesante comprobar si los radios de persistencia de las formas toroidales del DNA en presencia de H1 son iguales o distintas que con la región C-terminal, pues así se podría comprobar hasta que punto afecta la presencia de la región globular en la estructura del complejo.

### 3.2.3. Complejos DNA-agregados de H1cc.

Ya se dijo en el apartado 3.1. que la histona H1 de *Ceratitis capitata* tiene uno o dos restos de cisteína en la cadena (Franco et al, 1977), propiedad que le permite formar, en condiciones de oxidación, diversos agregados, que eluyen en Biogel P-100 en tres fracciones principalmente que denominaremos BG1, BG2, y BG3. Como ya se comentó anteriormente se tratan del monómero (con puente disulfuro intracatenario), el dímero y el multímero. Podría resultar interesante estudiar como influye la agregación en la capacidad de unirse estas proteínas al DNA; porque bien podría ser un mecanismo que tuviera cierta importancia "in vivo" (a nivel de regulación de la transcripción o alguna que otra función cromo-

somal). Puesto que una de las propiedades más interesantes de la histona H1 es la de inducir estructura PSI en el DNA puede plantearse la pregunta de si la histona oxidada conservará o no esta capacidad estructural.

En las figuras 22, 23, y 24 se muestran los espectros de DC de los complejos con BG1, BG2, y BG3, respectivamente, a 1 hora y 24 horas de su formación. En las tablas VII, VIII y IX se resumen los datos numéricos más relevantes de los espectros. Como puede deducirse de nuevo, el comportamiento sólo difiere del de la H1cc nativa en el aspecto cuantitativo; en este sentido la histona oxidada, en general, tendría menor capacidad de inducir estructura PSI, aunque poco menor. Si comparamos entre si la capacidad de formar estructura PSI de las tres fracciones oxidadas podemos deducir que la que más se asemeja al comportamiento de la H1 nativa es la fracción BG3, siendo la que menos la BG1. Este resultado estaría de acuerdo con la hipótesis de que el BG1 se trata de un multímero, que obviamente interacciona con mayor dificultad con el DNA. Mientras que el monómero, si bien el puente disulfuro intracatenario puede modificar la estructura de la molécula, no parece que esto afecte mucho a la capacidad de interacción con el DNA. Por último, el dímero BG2 ocuparía un lugar entre estos dos extremos. Estos resultados llevarían a concluir que, al menos en el aspecto estructural estudiado, la oxidación de la histona H1 de insecto no lleva a alteraciones notorias de los complejos, aunque este hecho no quita el que puedan existir otras diferencias distintas a la estudiada por DC, como se verá más adelante.

### 3.3. ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURA PSI

Como se ha ido viendo a lo largo del apartado anterior, la inducción de estructura PSI en el DNA por parte de la histona H1, la región C-terminal y las distintas fracciones agregadas de la histona H1cc,

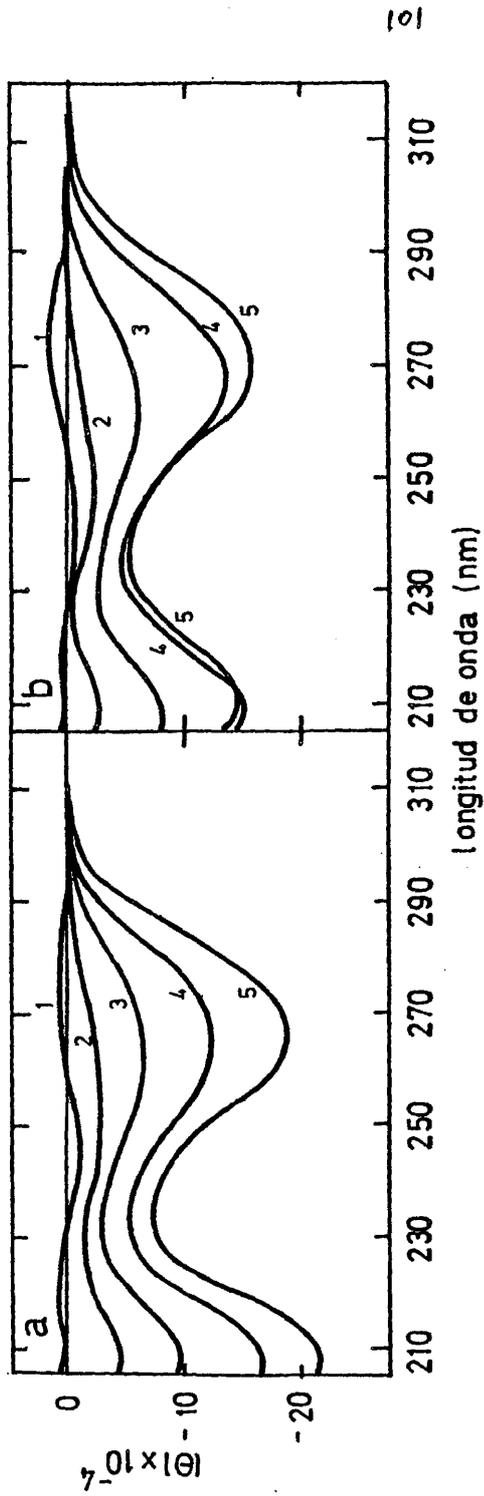


Figura 22. Espectros de DC de complejos DNA-861 en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14 M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml, realizados a 1 hora (a) y 24 horas (b) de su formación, en función de  $\bar{c}$  : (1) 0.0; (2) 0.1; (3) 0.2; (4) 0.3; (5) 0.4.

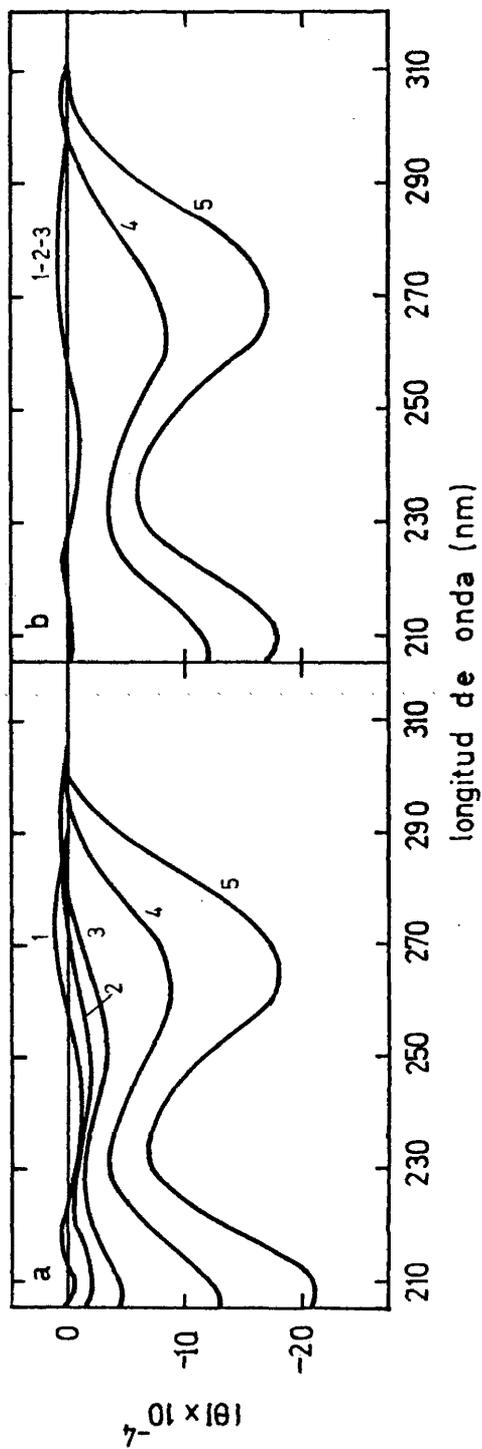
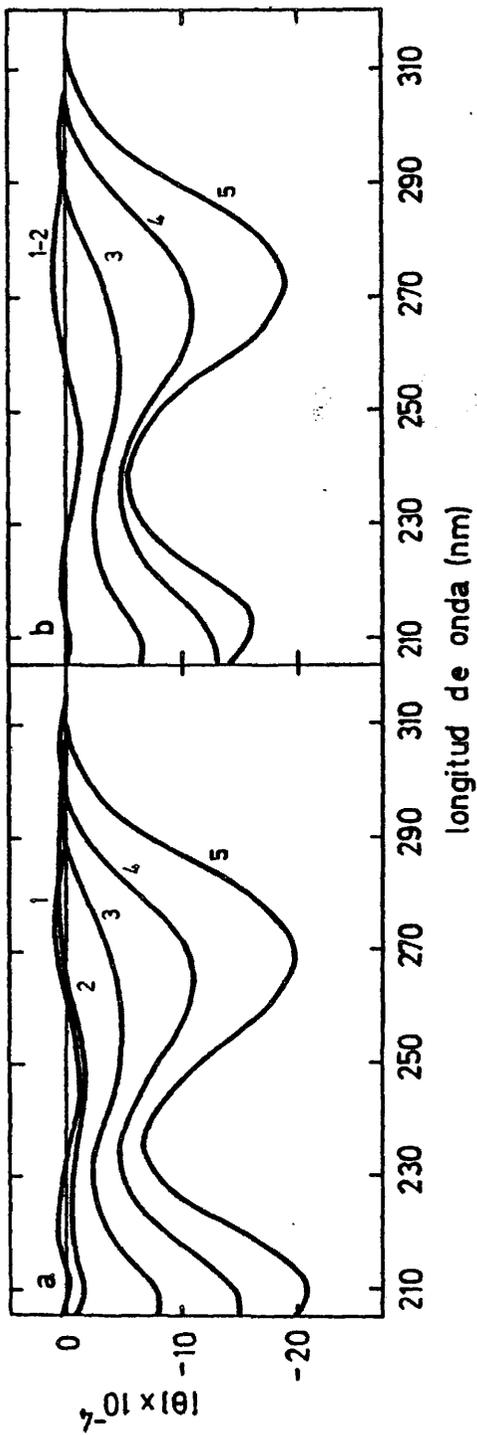


Figura 23. Espectros de DC de complejos DNA-862 en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14 M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml, realizados a 1 hora (a) y 24 horas (b) de su formación, en función de  $\bar{x}$ : (1) 0.0; (2) 0.1; (3) 0.2; (4) 0.3; (5) 0.4.



103

Figura 24. Espectros de DC de complejos DNA-EDTA en EDTA 1mM, fosfato 1mM, NaCl 0.14 M, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml, realizados a 1 hora (a) y 24 horas (b) de su formación, en función de t: (1) 0.0; (2) 0.1; (3) 0.2; (4) 0.3; (5) 0.4.

TABLA VII: Datos más significativos de los espectros DC de complejos DNA sonificados BGL.

Tiempo	r <sup>a</sup>	Máximo		Mínimo		Máximo		Mínimo	
		λ <sup>b</sup>	θ <sup>c</sup>	λ	θ	λ	θ	λ	θ
	0	275	10	245	- 12	220	5	210	0
1 hora	0.1	-	-	252	- 30	230	- 15	210	- 45
	0.2	-	-	262	- 65	232	- 30	210	-100
	0.3	-	-	265	- 80	232	- 55	210	-170
	0.4	-	-	265	-190	235	- 70	210	-220
24 horas	0.1	290	2	247	- 20	225	- 5	210	- 25
	0.2	-	-	262	- 60	230	- 25	210	- 80
	0.3	-	-	267	-140	235	- 50	210	-150
	0.4	-	-	270	-160	237	- 50	210	-150

a mg proteína/mg DNA

b nm

c x 10<sup>-3</sup> grados x cm<sup>2</sup>/decimol

TABLA VIII: Datos más significativos de los espectros DC de complejos DNA sonificado-862.

Tiempo	r <sup>a</sup>	Máximo		Mínimo		Máximo		Mínimo	
		b λ	c θ	λ	θ	λ	θ	λ	θ
1 hora	0	275	10	245	-12	220	5	210	0
	0.1	285	5	247	-20	220	-5	210	-20
	0.2	290	5	250	-30	225	-10	210	-45
	0.3	300	5	260	-90	230	-35	210	-120
24 horas	0.4	-	-	265	-180	233	-70	210	-205
	0.1	275	10	245	-12	225	5	210	-5
	0.2	275	10	245	-12	225	5	210	-5
	0.3	302	3	262	-80	232	-30	210	-100
0.4	-	-	270	-160	235	-55	210	-160	

105

a mg proteína/mg DNA

b nm

c x 10<sup>-3</sup> grados x cm<sup>2</sup>/ decimol

TABLA IX: Datos más significativos de los espectros DC de complejos DNA sonicated-86G3.

Tiempo	r <sup>a</sup>	Máximo		Mínimo		Máximo		Mínimo	
		$\lambda$	$\theta$	$\lambda$	$\theta$	$\lambda$	$\theta$	$\lambda$	$\theta$
	0	275	10	245	-12	220	5	210	0
1 hora	0.1	282	8	247	-15	225	-5	210	-15
	0.2	295	5	255	-50	230	-25	210	-75
	0.3	300	2	263	-110	232	-45	210	-145
	0.4	-	-	268	-195	235	-70	210	-210
24 horas	0.1	275	10	245	-12	220	5	210	0
	0.2	295	4	257	-45	230	-20	210	-70
	0.3	-	-	267	-110	235	-45	210	-80
	0.4	-	-	270	-190	240	-50	210	-160

106

<sup>a</sup> mg protefina/mg DNA

<sup>b</sup> nm

<sup>c</sup> x 10<sup>-3</sup> grados x cm<sup>2</sup> / decimol

no es un proceso instantáneo, sino que conlleva un proceso cinético con al menos dos cambios, uno rápido y otro lento, aunque podría haber más. Este hecho fue primeramente observado por Jordan et al (1972), como se comentó ampliamente en la introducción, al inducir estructura PSI en DNA de fago T7 mediante PEO. Sobre este aspecto cinético de la formación de estructura PSI no se ha insistido mucho más. Dadas estas circunstancias, parece interesante plantear un estudio cinético más exacto, mediante el cual se pudieran detectar y calcular las constantes aparentes de al menos, los dos procesos antes mencionados: el cambio rápido inicial en el espectro y el cambio lento que se produce entre la primera hora y las 24 horas.

Debido a que el cambio más drástico del espectro de DC se produce en la zona de 270 nm, se va a tomar la variación de elipticidad a ésta longitud de onda al formar el complejo, como índice del proceso de inducción de estructura PSI. Para el ajuste cinético se considera el proceso global como suma de los distintos procesos individuales de que se compone. Según esto si consideramos cada uno como un proceso cinético de primer orden, la variación de elipticidad a 270 nm vendrá dada por la ecuación exponencial:

$$(\theta)_{270} = - \sum_{i=1}^n D_i (1 - e^{-K_i t})$$

donde  $K_i$  es la constante aparente de cada proceso cinético individual,  $D_i$  es la contribución a tiempo infinito,  $n$  es el número de procesos individuales y  $t$  el tiempo en minutos. Si tomamos como valor cero la elipticidad a 270 nm antes de inducir la estructura PSI (tiempo cero), el signo menos es debido a que la elipticidad disminuye al transcurrir el proceso. Como se ha visto a lo largo de todo el apartado 3.2., la contribución en diroismo circular a 270 nm de los distintos complejos toma valores muy dispares, desde aproximadamente -9000 hasta -360000. Con el fin de compensar estas diferencias para poder comparar las cinéticas de los diferentes procesos se han normalizado en tantos por ciento, tomando como 100% la

contribución a tiempo infinito de cada proceso. De esta forma la ecuación de ajuste pasa a ser:

$$C(t) = \sum_{i=1}^n A_i (1 - e^{-K_i t})$$

donde ahora  $C(t)$  representa el tanto por ciento de la elipticidad total a 270 nm de dicho complejo a cada tiempo  $t$ , y  $A_i$  representa la contribución, en tanto por ciento, a tiempo infinito de cada proceso cinético individual. El ajuste de esta ecuación exponencial se llevó a cabo mediante el programa ABAROUSA (ver apartado 2.8.3.), mediante el cual se ajustan los datos experimentales de una a cuatro exponenciales, seleccionando posteriormente el mejor de estos ajustes. Los criterios seguidos para esta selección han sido los siguientes: menor suma de residuales (diferencia entre el valor observado y calculado para cada punto) de todos los puntos; distribución lo más aleatoria posible de los valores residuales (esto es para evitar vicios en alguna de las regiones del ajuste) como índice de que la dispersión se debe al ruido experimental y no a defectos en el ajuste; y por último chequear el comportamiento estadístico de los residuales, representando la probabilidad normal de cada residual en función del valor de cada uno de ellos, esta representación debe aproximarse en lo posible a una recta, para que la dispersión de residuales cumpla este requisito estadístico. En la tabla X se muestra el listado de salida de ordenador para un ajuste, mediante el citado programa, con tres exponenciales. Este ajuste ha sido considerado bueno, pues, como se puede apreciar en la figura 25, los valores calculados y observados coinciden bastante (esto es, tienen residuales pequeños). Por otro lado la dispersión de residuales es suficientemente aleatoria (figura 26) y la representación de la probabilidad normal se ajusta bastante bien a una recta (figura 27). Como se puede observar por la tabla X, en este caso los valores de la cinética no están normalizados, teniéndose que hacer a continuación mediante un programa en BASIC procesado en el microprocesador

TABLA X. Listado de salida del programa ABAROUSA, para el ajuste mediante tres exponenciales del proceso cinético de inducción de estructura PSI en un complejo DNA-Hlcc  $r=0.4$ , seguido como variación de elipticidad a 270 nm. Las unidades son : "tiempo" en minutos; "y", incremento de alturas en el espectro, en mm, tomado como cero la elipticidad a 270nm antes de comenzar la cinética.

CASE NO. NAME	PREDICTED Y	OBSERVED Y	RESIDUAL	TIEMPO
1	0.0	0.0	0.0	0.0
2	59.801422	60.000000	0.198578	1.000000
3	90.421371	80.000000	-0.421371	2.000000
4	91.683640	91.500000	-0.183640	3.000000
5	100.081909	100.000000	-0.081909	4.000000
6	107.128693	108.000000	0.871307	5.000000
7	113.257401	113.000000	-0.257401	6.000000
8	119.654495	119.000000	0.345505	7.000000
9	123.439102	124.000000	0.560898	8.000000
10	127.703537	127.000000	-0.703537	9.000000
11	131.523941	131.500000	-0.023941	10.000000
12	134.964188	135.000000	0.035812	11.000000
13	138.078003	138.000000	-0.078003	12.000000
14	140.910843	141.000000	0.089157	13.000000
15	143.501022	143.000000	-0.501022	14.000000
16	145.881012	146.000000	0.118988	15.000000
17	148.078217	147.500000	-0.578217	16.000000
18	150.115936	150.000000	-0.115936	17.000000
19	152.013870	152.000000	-0.013870	18.000000
20	153.788742	153.500000	-0.288742	19.000000
21	155.454849	155.500000	0.045151	20.000000
22	157.024261	157.000000	-0.024261	21.000000
23	158.507355	159.000000	0.492645	22.000000
24	159.913010	160.000000	0.086990	23.000000
25	161.248764	161.500000	0.251236	24.000000
26	162.521179	162.500000	-0.021179	25.000000
27	163.735855	164.000000	0.264145	26.000000
28	164.897659	165.000000	0.102341	27.000000
29	166.010803	166.000000	-0.010803	28.000000
30	167.078949	167.000000	-0.078949	29.000000
31	168.105316	168.000000	-0.105316	30.000000
32	172.698074	173.000000	0.301926	35.000000
33	176.557495	177.000000	0.442505	40.000000
34	179.836594	180.000000	0.163406	45.000000
35	182.638046	182.500000	-0.138046	50.000000
36	185.037964	184.500000	-0.537964	55.000000
37	187.096664	187.000000	-0.096664	60.000000
38	189.863800	188.500000	-0.363800	65.000000
39	190.381165	190.000000	-0.381165	70.000000
40	191.684250	191.500000	-0.184250	75.000000
41	192.803421	193.000000	0.196579	80.000000
42	193.764648	194.000000	0.235352	85.000000
43	194.590271	195.000000	0.409729	90.000000

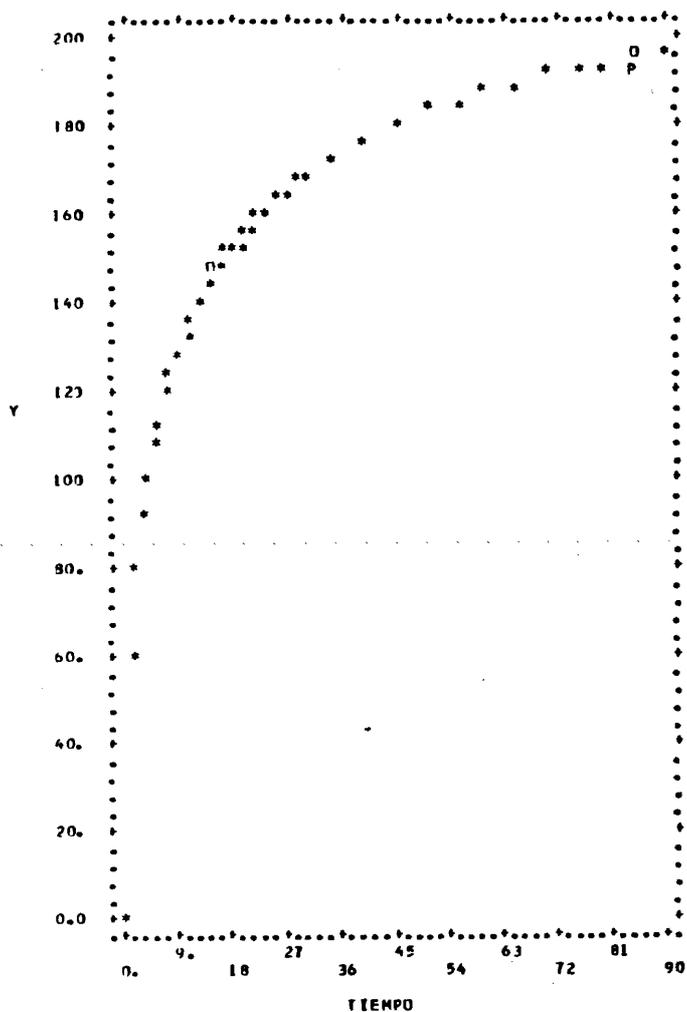


Figura 25. Salida del programa ABARQUSA. Ajuste mediante exponenciales, representación de los valores calculados (P) y observados experimentalmente (O); los asteriscos marcan los puntos de coincidencia de ambos valores.

111  
112

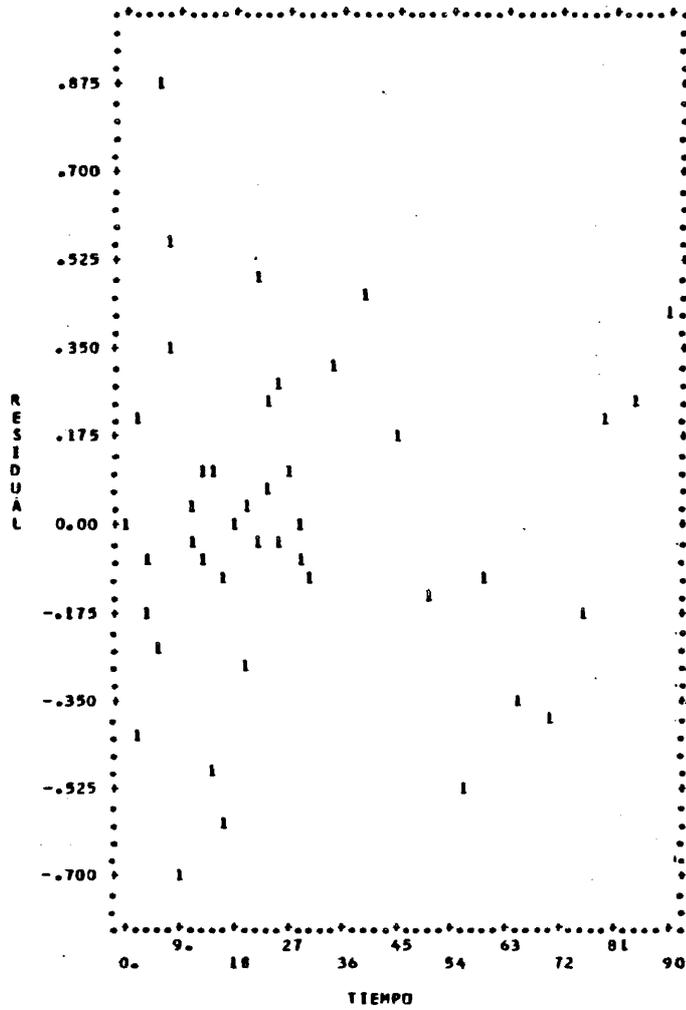


Figura 26. Salida del programa ABAROUSA. Representación gráfica de los valores residuales frente al tiempo.



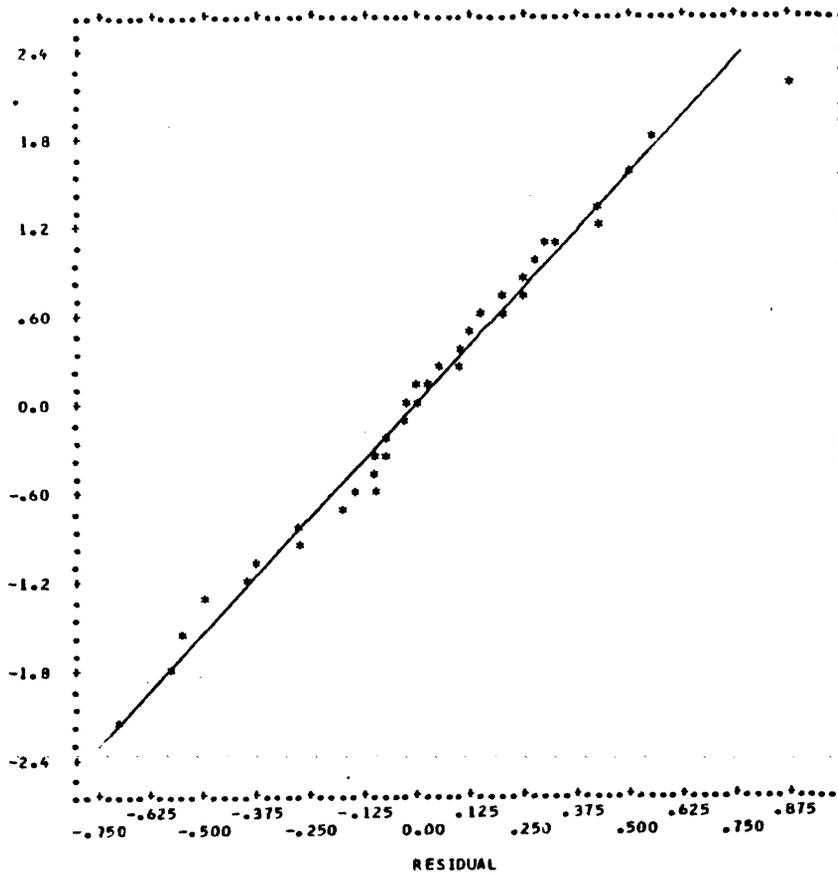


Figura 27. Salida del programa ABAROUSA. Representación gráfica de la probabilidad normal de cada residual (ordenadas) frente al valor de cada uno (abcisas).

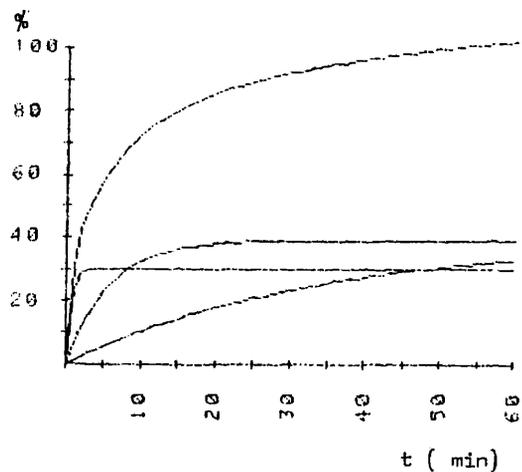


Figura 28. Gráfico realizado mediante microprocesador HP-85 para las tres exponenciales calculadas por el programa de ajuste ABAROUSA y la curva resultante de la adición de éstas.

HP85; este programa además representa la curva cinética del proceso global junto con las curvas de los distintos procesos individuales que resultan del ajuste (figura 28).

### 3.3.1. Complejos con H1 y dominios conformacionales

En primer lugar se realizaron las cinéticas de complejos de H1tt con DNA de gran tamaño, en las mismas condiciones experimentales descritas en el apartado 3.2.1.1. para los espectros de DC. La cinética se registró al añadir la sal al complejo ya formado en las condiciones requeridas en cada caso. La relación  $r$  fue 0.25 y se varió la fuerza iónica con el fin de ver su influencia sobre la cinética. El resultado del ajuste cinético se muestra en la tabla XI (a, b, y c). Como se ve en los tres casos el mejor ajuste implica dos procesos, uno rápido y otro lento. Las constantes cinéticas aparentes son, como se puede comprobar, del mismo orden en los tres complejos (una aproximadamente  $0.07 \text{ min}^{-1}$  y otra  $2.4 \text{ min}^{-1}$ ), variando la contribución a tiempo infinito de cada uno, de forma que en KF 0.11M el proceso que presenta mayor contribución (67%) es el lento, mientras que en KF 0.17 y 0.34M el proceso rápido cobra mayor contribución (56 y 63% respectivamente). Como se ve en todos ellos al cabo de poco más de 1 hora el proceso ha alcanzado el 100% de contribución.

Por otro lado se han realizado también las cinéticas con histona H1 nitrada de ambas especies. El resultado se muestra en la tabla XI (d, e, y f), donde los complejos se han realizado para dos concentraciones distintas de DNA en el complejo de histona de timo de ternera. Comparando los ajustes d y e se aprecia como la cinética del complejo H1tt nitrada es mucho más rápida en sus dos procesos que la de H1cc nitrada, para concentraciones de DNA similares. Este hecho vendría a corroborar las ligeras diferencias de afinidad por el DNA de ambas histonas, detectadas en DC (apartado 3.2.1.). Hay que resaltar el hecho de

TABLA XI: Ajuste de las cinéticas de inducción de estructura PSI de complejos DNA-HI, registradas como variación de elipticidad a 270 nm

Cinética	Proteína	r	Fuerza iónica	Conc. DNA (mg/ml)	K <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	A <sub>3</sub>	1 hora	2 horas
a	Htt	0.25	KF 0.11 M	0.060	0.086	67	2.5	33	-	-	98.6	100
b			KF 0.17 M		0.061	44	2.4	56	-	-	99.0	100
c			KF 0.35 M		0.076	37	2.4	63	-	-	99.6	100
d	HICG nitrosa	0.5	NaCl 0.15 M	0.029	0.098	47	1.19	53	-	-	99.8	100
e	Htt nitrosa	0.5	NaCl 0.15 M	0.033	0.243	34	1.86	66	-	-	100	100
f				0.017	0.057	20	0.378	18	1.94	62	99.3	99.9

11k

K<sub>i</sub>: Constante cinética aparente del proceso i-ésimo (min<sup>-1</sup>)

A<sub>i</sub>: Contribución del proceso i-ésimo (%)

que a menor concentración de DNA el proceso no se ha podido ajustar a dos exponenciales, siendo necesaria una tercera. Esto significa la existencia de tres procesos, uno de ellos más lento que todos los anteriores de constante aparente  $0.057 \text{ min}^{-1}$  y un 20% de contribución. Este hecho llevaría a considerar, de nuevo, la gran importancia de la concentración de DNA como factor decisivo en la formación del complejo en estructura PSI; ya que por debajo de un cierto valor el proceso lento tomaría mayor importancia pudiéndose llegar a una situación donde no se forme la citada estructura.

Comparando estos resultados con los observados por Jordan et al (1972) en complejos DNA-PEO, tal como se señaló en la introducción, se podría considerar el proceso cinético rápido como la formación de una estructura compacta, pero desordenada, del DNA en el complejo. Naturalmente este paso debe depender bastante de la relación proteína/DNA y de la concentración de DNA. En segundo lugar se daría al menos una transición lenta, que coincidiría con la ordenación de la estructura compacta inicial; esta cinética dependería en menor medida de  $r$  y de la concentración de DNA. Como se puede observar comparando las cinéticas a, b y c de la tabla XI la constante cinética del proceso rápido, de compactación desordenada, es prácticamente la misma para las tres; este hecho estaría de acuerdo con lo dicho anteriormente ya que las tres cinéticas se han realizado a la misma concentración de DNA y mismo  $r$ . Por otro lado, las diferencias mayores corresponden al segundo proceso, de ordenamiento, que dependería, en este caso, de la fuerza iónica. A continuación se realizaron las cinéticas de los complejos con DNA sonificado. Con el fin de poder comparar todos los resultados, se han hecho, para los distintos complejos, siempre en las mismas condiciones:  $r=0.4$ , NaCl 0.14M, EDTA-fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml. En la tabla XII se muestran los resultados del ajuste mediante exponenciales con el programa ABAROUSA. Como se puede ver en todos los casos el mejor ajuste se-

TABLA XII: Ajuste de las cinéticas de inducción de estructura PSI de complejos DNA sonicado- H1tt, CNBS y CTB.

Complejo	$K_1$	$A_1$	$K_2$	$A_2$	$K_3$	$A_3$	Contribución	
							1 hora	2 horas
a H1tt	0.026	42	0.216	30	1.75	28	91	98
b CNBS	0.050	29	0.285	32	1.89	40	98	99
c CTB	0.023	31	0.28	44	0.88	25	92	98
d CNBS (adición de sal posterior)	0.019	15	0.5	25	6.46	60	95	98

TABLA XIII: Ajuste de las cinéticas de inducción de estructura PSI de complejos DNA sonicado - H1 de *Ceratititis capitata* y fracciones oxidadas.

Complejo	$K_1$	$A_1$	$K_2$	$A_2$	$K_3$	$A_3$	$K_4$	$A_4$	Contribución	
									1 hora	2 horas
H1cc	0.030	39	0.174	39	1.55	30	-	-	94	97
BG1	0.011	29	0.038	32	0.150	25	4.61	14	82	92
BG2	0.024	48	0.162	52	-	-	-	-	89	97
BG3	0.048	38	0.256	31	0.784	31	-	-	98	99

Nota:  $K_i$ : Constante cinética aparente del proceso i-ésimo ( $\text{min}^{-1}$ )  
 $A_i$ : Contribución del proceso i-ésimo. (%)

leccionado implica tres procesos cinéticos correspondientes a cambios rápido, intermedio y lento. Las cinéticas a, b y c de la citada tabla, corresponden a los complejos formados con H1tt, CNBS y CTB, respectivamente. En todas ellas la cinética se registró al añadir la proteína al DNA, ambos en las condiciones de fuerza iónica deseadas (NaCl 0.14M). La cinética d, de la misma tabla, corresponde a la registrada al añadir NaCl a un complejo ya formado DNA-CTB ( $r=0.4$ , figura 20, curva 1) en ausencia de sal, hasta llevarlo a una concentración final de 0.14M.

Las diferencias entre las tres cinéticas realizadas al añadir la proteína al complejo, de nuevo son poco significativas. No obstante cabría resaltar algunos puntos. El cambio mayor en el complejo con H1tt (42%) es resultado del cambio lento ( $K=0.026 \text{ min}^{-1}$ ), es decir de la fase de ordenación de la estructura compacta formada por el cambio rápido, según se comentó anteriormente, esto hace que el proceso global resulte algo más lento. Sin embargo el complejo formado con CNBS presenta su contribución mayor (40%) como resultado de la fase de compactación desordenada, mientras que el complejo DNA-CTB, al contrario de lo que se podría preveer, presenta su mayor contribución (44%) como resultado del proceso cinético intermedio, no descrito anteriormente, y que vendría a ser una primera fase del ordenamiento, algo más rápida que la segunda (que sería la que se observa en los otros complejos). De nuevo parece como si la región globular ejerciera un papel modulador, pero sólo cuando está integrada en la molécula, pues como se deduce de la cinética del complejo DNA-CNBS, la región C-terminal con algo de región globular provoca la formación de estructura PSI más rápidamente que dicha región aislada (complejo DNA-CTB).

Un resultado significativo es el del complejo formado primero por la adición de DNA y CNBS y posterior adición de sal. Como se ve en la tabla VIII, ajuste d, el proceso mayoritario (60%) es uno muy rápido ( $K=6.46 \text{ min}^{-1}$ ). Este hecho se podría interpretar como que al estar ya

la proteína unida al DNA, aun en ausencia de sal, el complejo está ya algo estructurado y esta estructura al situarla en las condiciones de fuerza iónica adecuadas, pasa de modo muy rápido a formar estructura PSI, aunque en menor contribución. Es lógico que este proceso sea muy rápido pues de alguna forma el complejo estaba espacialmente predispuesto. Es decir, que el orden de adición a la hora de formar el complejo, influye no sólo en la contribución de estructura PSI formada (figura 20), sino también en la cinética del proceso.

### 3.3.2. Complejos con Hlcc y agregados.

El resultado de la descomposición en exponenciales de las cinéticas de formación de estructura PSI por H1 de *Ceratitidis capitata* y los agregados obtenidos por oxidación (BG1, BG2, y BG3) se muestran en la tabla XIII.

Si comparamos el comportamiento cinético de las histonas Hlcc y Hlcc, apartado anterior, comprobamos que ambos son muy parecidos pues tienen tres procesos, rápido, intermedio y lento con contribuciones similares (30, 31 y 39% respectivamente). El complejo DNA-BG3 presenta una cinética muy similar a la del complejo con H1 nativa, aunque un poco más rápida, ya que se alcanza el estado final un poco antes (a una hora el 98% frente al 94% de H1 nativa). Ahora bien, en esta cinética, el proceso rápido o fase de compactación desordenada ( $K=1.55 \text{ min}^{-1}$ ) ha disminuido ligeramente, si bien esto es compensado por un incremento en la constante aparente de los otros dos procesos. El mejor ajuste de cinética del complejo DNA-BG2 se logra con dos exponenciales. Este resultado parece indicar como si el hecho de la agregación de dos moléculas de histona dificultara la fase de compactación. En conjunto esta cinética transcurre más lenta que las anteriores (sólo el 89% al cabo de una hora de formar el

complejo). Por último el complejo DNA-BG1 presenta una cinética mucho más compleja; el ajuste sólo se logra utilizando 4 exponenciales. Ahora bien, pese a tener un proceso rapidísimo ( $K=4.61$ ), éste representa una contribución de sólo un 14%, es como si el gran volumen de esta fracción favoreciera un agrupamiento desordenado rapidísimo pero de escasa contribución. Por lo demás el proceso global resultaría, lógicamente, más lento todavía que los anteriores.

Estos resultados permiten deducir ya algunas diferencias en el comportamiento de los distintos agregados, diferencias que, a la vista de los espectros de DC, eran difíciles de discernir. La fracción BG3 al tener un puente disulfuro intramolecular no consigue inducir tanta estructura PSI como la molécula nativa, pero al ser más compacta, el proceso es un poco más rápido. La fracción BG2, dímero, también forma menos PSI y al ser de mayor tamaño, el proceso cinético está algo impedido y va más lento. Por último, el multímero BG1, a tiempo suficientemente alto, llega a inducir tanta estructura PSI como el resto de las fracciones, pero el proceso es más lento debido al gran impedimento estérico que debe suponer formar el complejo con el multímero.

#### 3.4. DIGESTION CON NUCLEASA DE COMPLEJOS DNA-CNBS

Es lógico pensar que si los complejos señalados anteriormente, conducen a algún tipo de estructura compacta (tal como parece por los datos de microscopía electrónica), presenten algún tipo de resistencia a la digestión por nucleasas. Si esto fuera así, indicaría una protección del DNA como consecuencia de esta estructura, y al mismo tiempo sería posible observar si existe algún tipo de comportamiento cooperativo en la formación de la misma. También, la obtención de zonas límite de digestión, permitiría el aislamiento de las mismas y el cálculo de su estequiometría, tamaño del DNA, etc. En la presente memoria únicamente se

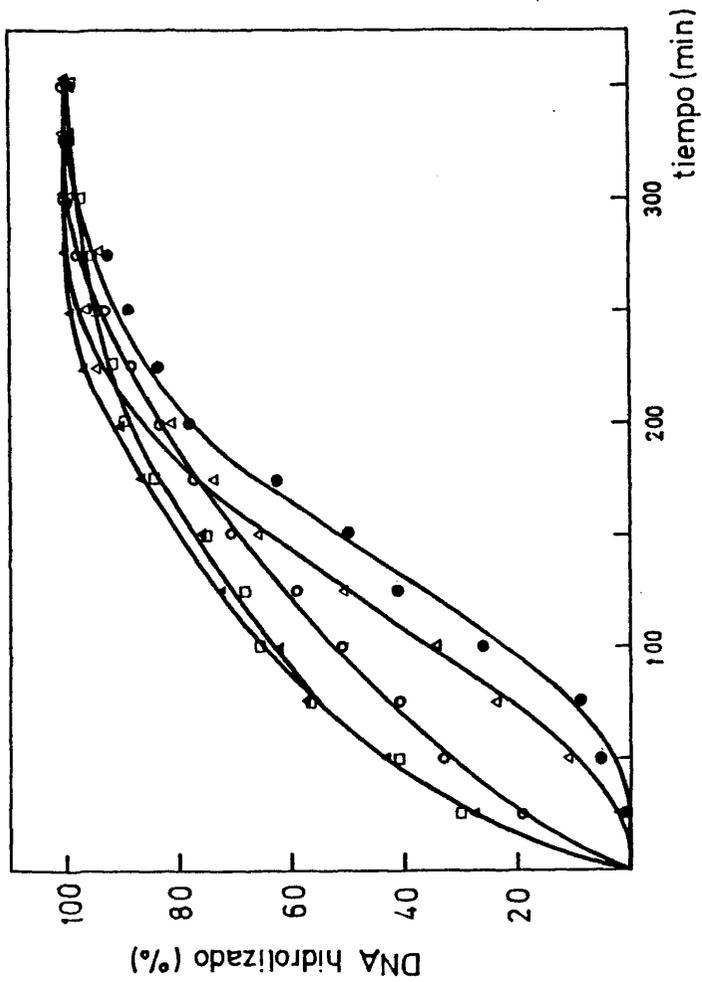
presentan los resultados de la digestión con nucleasa micrococcal sobre complejos DNA-CNBS, a las distintas relaciones  $r=0$ . (control), 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4; siguiendo el esquema experimental detallado en el apartado 2.4.

En la figura 29 se muestra el tanto por ciento de DNA digerido frente al tiempo para los distintos complejos, calculado a partir de la variación de la absorción a 260 nm, después de seis horas a 25°C. Como puede observarse aparecen varios hechos interesantes. A  $r=0.1$  y 0.2 no existe ningún impedimento en la digestión, apareciendo a  $r=0.3$  cierta dificultad, y a  $r=0.4$  solamente se ha digerido el 52% del DNA total, al cabo de las seis horas. Parece como si existiera un efecto cooperativo, en dependencia de la relación proteína/DNA, para la formación de una determinada estructura que protege, precisamente, al DNA de la digestión. Este efecto cooperativo también había sido observado al estudiar la variación de estructura PSI, como elipticidad a 270nm, en función de  $r$  (ver el apartado 3.2.2.1. y la figura 19), donde se aprecia como al ir aumentando  $r$  la elipticidad negativa a 270 nm va aumentando poco a poco al principio, para luego dar un aumento brusco hasta  $r=0.4$ .

Por otro lado los aspectos de las curvas cinéticas para  $r=0.3$  y 0.4 difieren completamente de las de las otras relaciones y de la del DNA control, en el sentido de que las primeras presentan un comportamiento sigmoideo, mientras que el de las segundas es hiperbólico. Este resultado indicaría que no sólo se da cooperatividad en función del aumento de  $r$ , sino que la propia cinética de cada complejo en las relaciones  $r=0.3$  y 0.4 presenta un comportamiento cooperativo, es decir que existe una resistencia inicial a la digestión para luego digerirse rápidamente hasta rendir la fracción resistente a seis horas.

### 3.5. DES NATURALIZACION TERMICA DE LOS COMPLEJOS

Como se indicó en la introducción el DC nos da información



**Figura 29.** Digestión con nucleasa de complejos DNA sonificado-CNBS de HI de tino de ternera, realizados en  $MgCl_2$  1mM,  $CaCl_2$  1mM, fosfato sódico 2mM, NaCl 10mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.018 mg/ml para las siguientes relaciones,  $\Gamma$ : (●) 0.4; (■) 0.3; (▲) 0.2; (○) 0.1; (□) 0.0.

acerca de la estructura de los complejos, pero no nos dice nada sobre su estabilidad, ni permite deducir parámetros termodinámicos, constantes de asociación, etc. Con este fin se ha recurrido a la técnica de desnaturalización térmica de los complejos. Este estudio se ha realizado formando los complejos con DNA sonicado. Esto es debido a que en este estudio se necesitan relaciones más altas de proteína/DNA, un conocimiento exacto de la relación  $r$  deseada y, lo que es más importante, una concentración de sal baja y lo más exacta posible. Todos estos requisitos resultan casi imposibles de conseguir por el método de formación de complejos solubles mediante diálisis, sobre todo el obtener valores de  $r$  superiores a 0.5 sin que precipite.

Aunque los aspectos experimentales y de método fueron expuestos en el apartado 2.3.2., se va a detallar aquí el sistema seguido para la descomposición en gaussianas y los criterios para la selección de un conjunto determinado de ellas. Para ello se va a elegir una curva cualquiera, polifásica, y se describirá todo el proceso seguido. Concretamente la seleccionada es la correspondiente al complejo DNA-H1tt a  $r=0.6$ .

Las curvas de transición experimentales se trazan tomando puntos discretos a cada temperatura (ver el apartado 2.6) y por tanto poseen un cierto error experimental o dispersión por ruido. Para calcular la derivada corrigiendo, en lo posible, este ruido experimental, pues de lo contrario daría una curva en forma de dientes de sierra, se utilizó un programa automático que calcula la pendiente de cada uno de los puntos mediante regresión lineal por mínimos cuadrados, tal como se detalló en el apartado 2.8.1.

Una vez calculada la curva derivada, que representa el valor de la derivada de la curva de transición térmica a cada temperatura, el programa MORDOR ajusta la curva experimental al mejor conjunto de gaussianas, probando de dos a seis mediante un programa de regresión no li-

neal (apartado 2.8.2). Los criterios a la hora de escoger un conjunto de gaussianas han sido los mismos que los expuestos en el apartado 3.3. En la tabla XIV muestra el resultado de este ajuste para la curva derivada de la transición del complejo anteriormente señalado. Como se ve, aunque el ajuste con error mínimo es el primero, los valores de altura máxima de la primera y tercera gaussianas son muy pequeños, por lo que hace pensar que sea un artefacto del método. Considérese que una curva cualquiera con N puntos experimentales se puede ajustar a un conjunto de N gaussianas de altura el valor de la ordenada en cada punto, de anchura despreciable y centrada cada una en su punto concreto. Este ajuste daría un error próximo a cero. Por otra parte, aunque no se muestra en la tabla, el comportamiento estadístico de los residuales no es del todo al azar, presentando una ligera preponderancia negativa.

Si fijamos nuestra atención en el ajuste segundo observamos que se han anulado las gaussianas primera y tercera, hecho que prueba que el primer ajuste introducía un artefacto. Este ajuste (Tabla XV, Figura 30) es aceptable, la dispersión de puntos es bastante estadística (figura 31) y la representación de la probabilidad normal frente a los residuales (figura 32) se aproxima considerablemente a una recta. El resto de los ajustes presentan errores demasiado grandes como para ser tenidos en cuenta.

En la figura 33 se muestran los puntos experimentales de la derivada en cuestión, junto con la curva derivada suma de las tres gaussianas dadas por el citado ajuste segundo. Como puede apreciarse el ajuste es bastante bueno. Por último, del cálculo de las áreas de las tres gaussianas referidas al área total se puede deducir la contribución relativa que representa cada transición respecto del total. En resumen, la descomposición en gaussianas aporta un mayor conocimiento de la curva derivada de la curva de transición térmica, pues nos permite, no solo calcular las  $T_m$  con mayor exactitud desechando los posibles artefactos, si-

TABLA XIV : Ajuste mediante gaussianas de la curva derivada de la transición térmica del complejo DNA-H1tt,  $r=0.6$  utilizando el programa MORDOR.

Gaussianas	Parámetros	Ajuste				
		1	2	3	4	5
1ª	H	5.9	0.0	7.4	10.4	23.0
	A	0.069	0.293	0.116	0.081	0.029
	T	57.7	40.0	55.7	65.1	62.1
2ª	H	24.6	23.9	23.0	18.5	50.0
	A	0.034	0.023	0.038	0.040	0.011
	T	63.5	62.9	61.9	60.6	78.6
3ª	H	6.9	0.0	0.0	50.1	-
	A	0.162	1.0	0.930	0.011	-
	T	68.8	65.5	67.4	78.5	-
4ª	H	20.4	10.4	48.4	-	-
	A	0.058	0.119	0.008	-	-
	T	75.2	75.6	77.2	-	-
5ª	H	41.8	45.8	-	-	-
	A	0.014	0.012	-	-	-
	T	80.7	79.5	-	-	-
6ª	H	0.0	-	-	-	-
	A	0.082	-	-	-	-
	T	88.9	-	-	-	-
residuales		11.8	20.2	901.1	84.3	100.9

Nota:  $H_i$ ,  $A_i$  y  $T_i$  son los parámetros que caracterizan cada gaussiana según se describe en el texto.

**TABLA XV.** Listado de salida del programa MORDOR, para la descomposición en tres gaussianas de la curva derivada de la curva de transición térmica del complejo DNA-H1tt,  $r = 0.6$ .

CASE NO. NAME	PREDICTED DERIV	OBSERVED DERIV	RESIDUAL	TEMP
1	0.144481	0.0	-0.144481	48.000000
2	0.280539	0.0	-0.280539	49.000000
3	0.520235	0.0	-0.520235	50.000000
4	0.921386	0.200000	-0.721386	51.000000
5	1.558578	0.900000	-0.658579	52.000000
6	2.518147	1.799999	-0.718147	53.000000
7	3.886165	3.200000	-0.686165	54.000000
8	5.729117	5.700000	-0.029118	55.000000
9	8.069272	8.200000	0.130728	56.000000
10	10.860355	11.299999	0.439644	57.000000
11	13.971440	14.500000	0.528560	58.000000
12	17.187668	17.399994	0.212326	59.000000
13	20.233444	20.299988	0.066544	60.000000
14	22.817398	22.659997	-0.117401	61.000000
15	24.691315	24.699997	0.008682	62.000000
16	25.708130	25.899994	0.191864	63.000000
17	25.862591	25.500000	-0.362591	64.000000
18	25.304294	24.799988	-0.504303	65.000000
19	24.310425	23.799988	-0.510437	66.000000
20	23.238464	23.199997	-0.038467	67.000000
21	22.461304	23.199997	0.738693	68.000000
22	22.319504	23.099991	0.780487	69.000000
23	23.120178	23.599991	0.479813	70.000000
24	25.188049	24.699997	-0.488052	71.000000
25	28.866135	28.000000	-0.866135	72.000000
26	34.254486	34.199997	-0.054489	73.000000
27	40.693085	41.199997	0.506912	74.000000
28	46.591446	47.000000	0.408554	75.000000
29	50.253098	50.000000	-0.253098	76.000000
30	51.142853	50.299988	-0.842865	77.000000
31	50.147858	50.599991	0.452133	78.000000
32	48.530607	45.059991	-3.470616	79.000000
33	46.885056	47.199997	0.314941	80.000000
34	45.072128	44.699997	-0.372131	81.000000
35	42.750946	41.699997	-1.050949	82.000000
36	39.755310	35.299988	-4.455322	83.000000
37	36.139206	36.159997	0.060791	84.000000
38	32.082611	33.000000	0.917389	85.000000
39	27.807434	29.500000	1.692566	86.000000
40	23.530411	21.899994	-1.630417	87.000000
41	19.433919	20.000000	0.566081	88.000000
42	15.677527	16.000000	0.322473	89.000000
43	12.344617	12.000000	-0.344617	90.000000
44	9.429409	9.000000	-0.429409	91.000000
45	7.121543	7.000000	-0.121543	92.000000
46	5.217731	6.000000	0.782269	93.000000
47	3.732175	4.000000	0.267825	94.000000
48	2.606245	2.000000	-0.606245	95.000000
49	1.776813	1.000000	-0.776813	96.000000
50	1.182610	0.0	-1.182610	97.000000
51	0.768445	0.0	-0.768445	98.000000
52	0.487482	0.0	-0.487482	99.000000

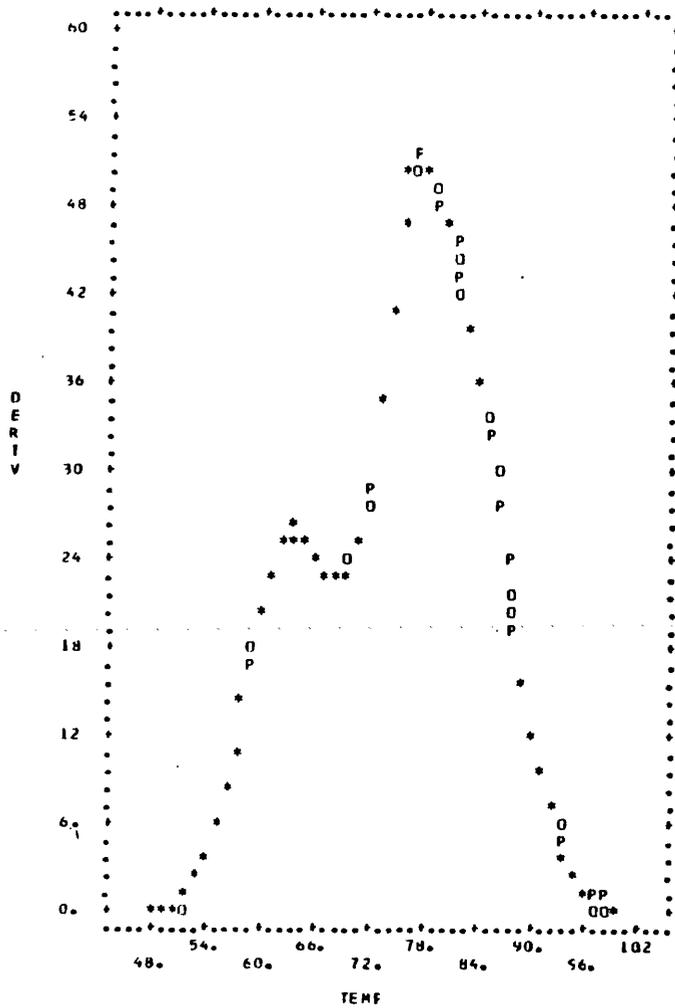


Figura 30. Salida del programa MORDOR. Descomposición en gaussianas, representación de los valores calculados (P) y observados experimentalmente (O), frente a la temperatura. Los asteriscos muestran los puntos donde coinciden ambos valores.

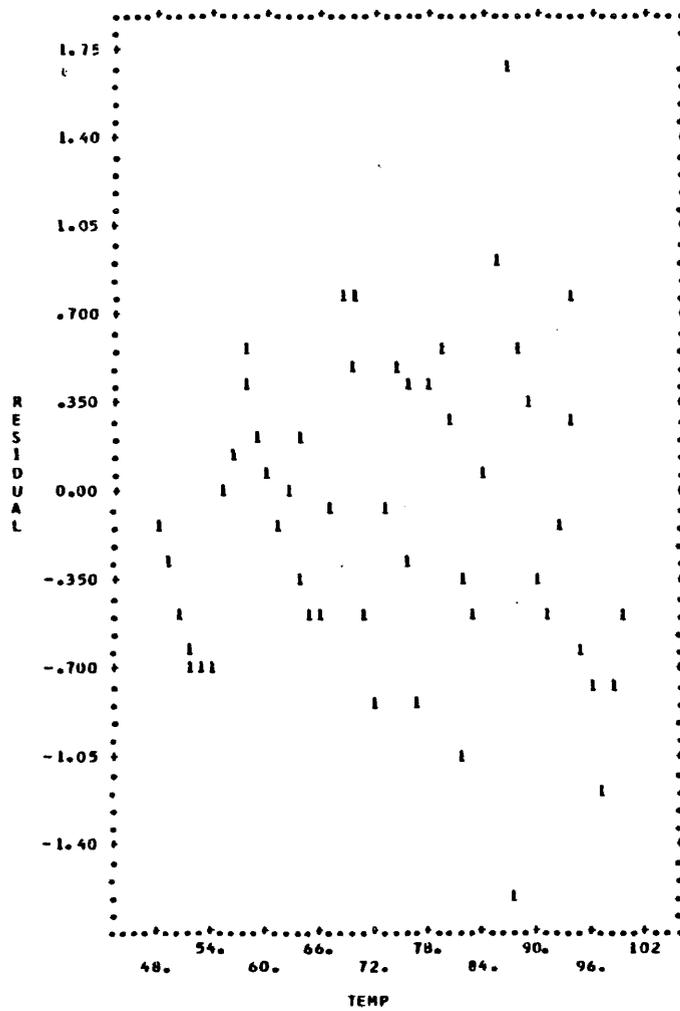


Figura 31. Salida del programa MORDOR. Representación gráfica de los valores residuales frente a la temperatura.

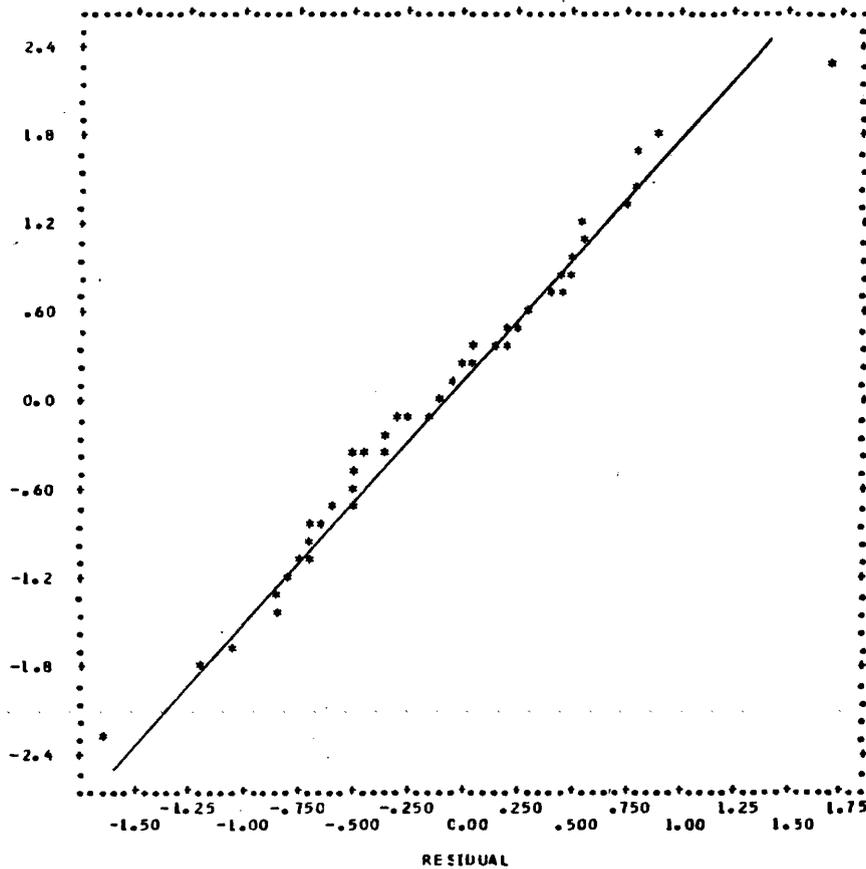


Figura 32. Salida del programa MORDOR. Representación gráfica de la probabilidad normal de cada residual (ordenadas), frente al valor de cada uno (abcisas).

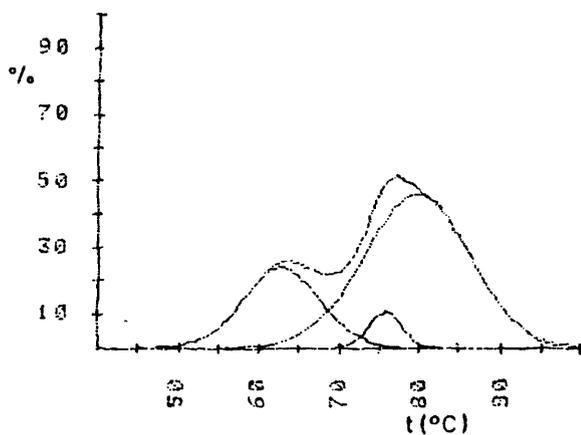


Figura 33. Gráfico realizado mediante el microprocesador HP-85 para las tres gaussianas calculadas por el programa MORDOR, junto con la curva resultante de la adición de éstas.

no localizar posibles picos solapados y, lo que es más importante, calcular las contribuciones relativas de las distintas transiciones.

Con el fin de hacer un estudio comparable al realizado mediante DC, se han formado complejos con H1 de timo de ternera y de Ceratitis capitata, así como con sus distintos dominios estructurales. También se ha realizado este estudio con los agregados de H1 de insecto. En todos los casos el medio utilizado ha sido EDTA 1 mM, fosfato 1 mM, pH 7 y las relaciones proteína/DNA variables, desde 0 hasta 1.6 (P/P). En algunos casos las relaciones 1.4 y 1.6 presentaban ya cierto grado de turbidez. Los complejos TRC-DNA, debido posiblemente a la baja constante de afinidad de este fragmento al DNA, fueron formados a relaciones mayores (de 0 a 4). La concentración de DNA utilizada en todos los casos fué de 0.030 mg/ml.

### 3.5.1. Histona H1 nativa.

Las curvas derivadas de las curvas de transición térmica de complejos DNA-H1 de tt se realizaron tal como se indicó anteriormente a las relaciones  $r = 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2$ . En la figura 34 se muestran sólo las curvas más representativas y en la tabla XVI los datos numéricos de  $T_m$  y contribuciones calculadas mediante la descomposición en gaussianas. Hay que resaltar, en primer lugar, la gran estabilización que se logra en el DNA al ir aumentando la cc de histona, llegando a elevar la  $T_m$  a  $90^{\circ}\text{C}$  para el complejo  $r = 1.2$ , siendo la del DNA control de  $56^{\circ}\text{C}$  en las mismas condiciones. Por otro lado, para concentraciones intermedias de histona se producen curvas polifásicas que indican zonas de DNA que funden a distintas temperaturas, por tanto, que tienen diferente estabilidad. Para poder justificar las distintas transiciones hay que recordar lo dicho en el apartado 1.1. referente a la estructura de la histona H1 y la contribución de sus diferentes dominios estructurales: Región globular (39%), C-terminal (45%) y N-terminal (16%). Siendo las

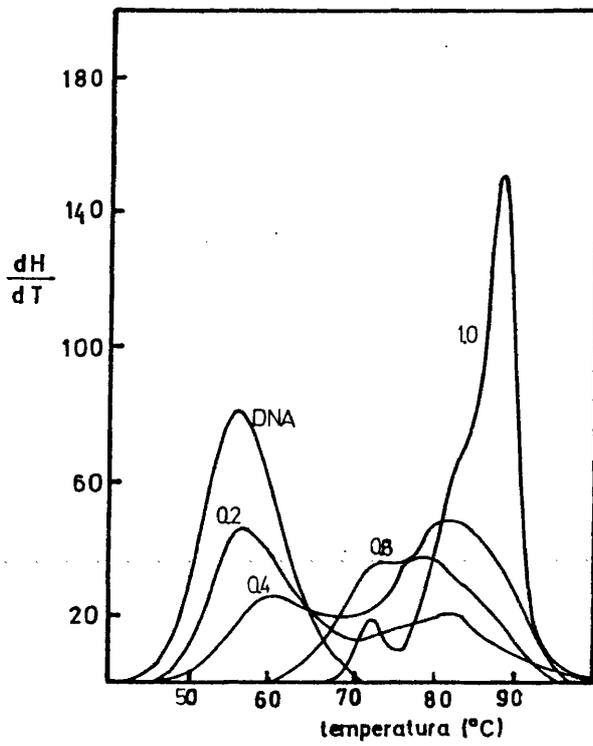


Figura 34. Curvas derivadas de las curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-Hltt en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml, para las distintas relaciones,  $r$ , indicadas.

TABLA XVI: Datos de  $T_m$  y contribución de cada transición (en %) para complejos DNA-Hltt.

r	nº transiciones	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)
0	2	55.0	67	61.4	33	-	-	-	-
0.2	3	55.2	31,6	61.5	28.0	79.8	40.4	-	-
0.4	3	60.0	29.4	67.0	4.6	79.6	66.0	-	-
0.8	3	71.6	5.9	76.3	46.3	85.0	47.7	-	-
1.0	4	72.5	8.1	83.0	38.0	87.9	49.4	91.7	4.4
1.2	3	83.0	44.7	87.9	50.7	91.9	4.6	-	-

TABLA XVII: Datos de  $T_m$  y contribución de cada transición (en %) para complejos DNA-CNBS.

r	nº transiciones	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)
0	2	55.0	67	61.4	33	-	-
0.2	3	56.5	53.4	64.4	12.2	78.2	34.4
0.4	3	58.9	45.7	68.2	7.9	80.1	46.4
0.8	3	72.7	25.0	84.0	46.3	88.2	26.7
1.0	3	82.2	10.7	87.1	77.9	92.2	11.4

regiones C-terminal y N-terminal fundamentalmente básicas (es decir, en total el 55% de la molécula) las que interaccionan preferentemente con el DNA, interacción que, como se dijo, es inespecífica. El complejo  $r = 0.4$  presenta tres transiciones, si bien la de  $67^{\circ}\text{C}$  supone solo un 4.6% y puede considerarse despreciable. Si consideramos los pesos moleculares medios por aminoácido (110 daltons) y por nucleótido (340 daltons), la relación de 0.4 Mg de proteína/mg de DNA se puede convertir en 1.24 moles de aminoácido/mol de fosfato. Este dato nos indica que a esta relación aproximadamente todo el DNA puede estar interaccionando con la histona, considerando que ésta está plegada en su región globular, y por tanto, algunos restos no pueden interaccionar con el DNA. De todo este planteamiento se infiere que la transición de  $79.6^{\circ}\text{C}$  puede deberse a la fracción de DNA que interacciona con la región C-terminal de la molécula, y la transición de  $60^{\circ}\text{C}$  a la fracción que interacciona, de forma mucho más débil, con la región globular de la molécula.

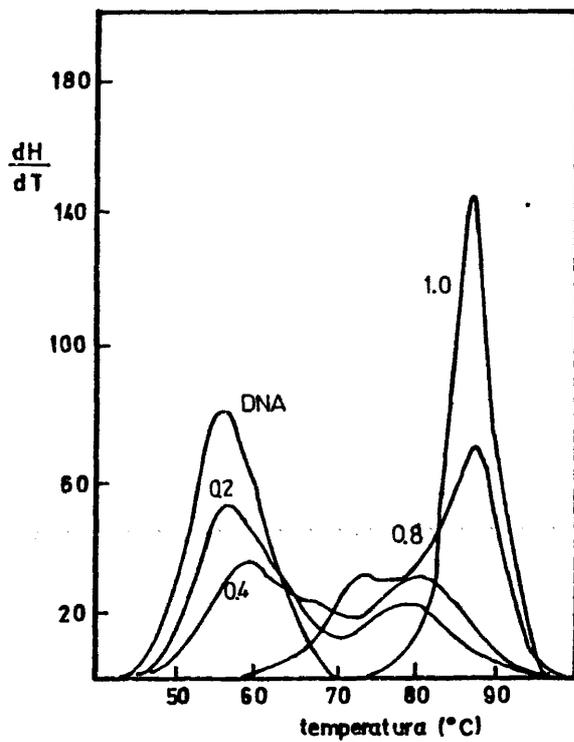
Los complejos a  $r = 0.2$  presentan tres transiciones (tabla XVI), a  $55.2$ ,  $61.5$  y  $79.8^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Según la discusión hecha anteriormente a esta relación el DNA no puede estar interaccionando en su totalidad con la histona ya que sólo hay 0.75 moles de aminoácido/mol de fosfato. Así lo refleja la presencia de una transición a  $55.2^{\circ}\text{C}$  correspondiente a DNA libre con una contribución del 31.6%. Las otras dos transiciones corresponderán a las regiones de DNA interaccionando con la región globular y con la región C-terminal, que representan el 28% y el 40.4%, respectivamente, del total de la transición. Es decir, del total del DNA presente. Si seguimos aumentando la relación proteína/DNA desaparecen completamente las transiciones de  $56^{\circ}\text{C}$  (DNA libre) y  $62^{\circ}\text{C}$  (DNA interaccionando con región globular), y presenta otra nueva transición a  $85^{\circ}\text{C}$ , permaneciendo la de aproximadamente  $77^{\circ}\text{C}$  (interacción con las zonas polares de la molécula). A relaciones aun mayores el equilibrio se desplaza más todavía, llegando incluso a desaparecer la transición de los

76°C, proporcionando un estado superestable con transiciones altamente cooperativas entre 83 y 92°C que podrían deberse a la formación de algún tipo de estructura compacta y, por tanto, muy estable. Relaciones superiores a  $r = 1.2$  producen la precipitación del complejo. Hay que considerar que este resultado, si bien en otras condiciones de fuerza iónica y concentración de DNA, está de acuerdo en el aspecto conceptual con el observado mediante DC en el apartado 3.2.1. en tanto en cuanto ambos presuponen la adopción de un nuevo tipo de estructura en el DNA por la acción de la histona

### 3.5.2. Dominios estructurales de la histona H1.

Con el fin de poder relacionar las distintas transiciones del complejo DNA-H1 con las diferentes regiones de la molécula de histona, se formaron complejos con estos dominios estructurales por separado y el DNA, en las mismas condiciones que en el apartado 3.5.1.

En la figura 35 y tabla XVII se muestran los resultados de la desnaturalización térmica de los complejos formados con CNBS a distintas relaciones  $r$ . Si comparamos con los resultados de los complejos con H1 nativa se puede comprobar que no existen grandes diferencias al menos en el aspecto cualitativo. Cabía esperar que este resultado fuera así, ya que si las regiones C-terminal y N-terminal representan el 61% de la molécula, la región C-terminal representa aproximadamente el 60% en el péptido CNBS. Es decir, las diferencias se deben sobre todo al tamaño distinto de ambas proteínas, como se observa del estudio comparativo de las figuras y tablas citadas. Estos resultados son concordantes con los obtenidos previamente por Avilés et al. (1978) aunque las curvas de desnaturalización térmica y condiciones experimentales desarrolladas por estos autores fueron menos precisas. En esta línea hay que resaltar que los complejos con CNBS, cuando  $r$  es elevado, estabilizan más al DNA que los homólogos

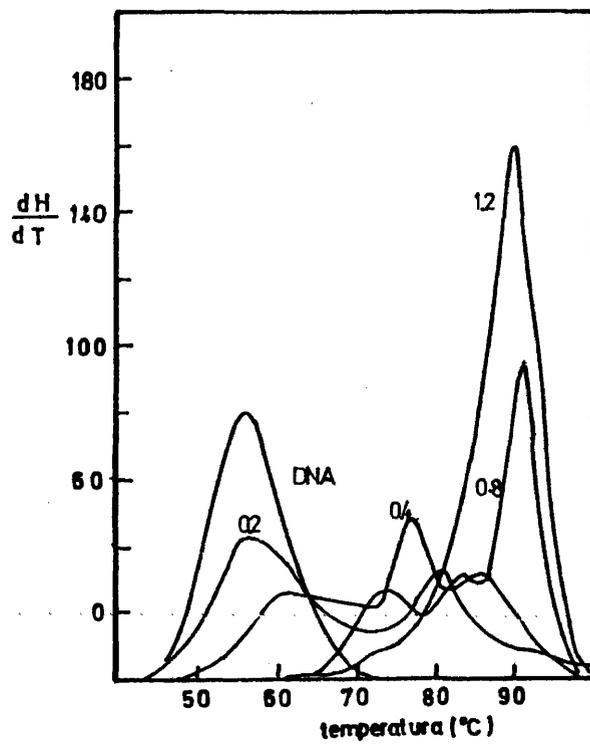


**Figura 35.** Curvas derivadas de las curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-CNBS de H1 de timo de ternera en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml, para las distintas relaciones,  $r$ , indicadas.

de H1.

Un estudio similar se ha realizado con los complejos DNA-CTB. El resultado se muestra en la figura 36 y en la tabla XVIII. Como se comentó en el apartado 3.1., la fracción denominada CTB corresponde íntegramente a la región C-terminal de la histona H1. Como se ve, el comportamiento difiere sustancialmente del comentado anteriormente para complejos con H1 y CNBS. Para  $r = 0.2$  no se observa, lógicamente, transición correspondiente a estabilización por zona globular a  $64^{\circ}\text{C}$ . Para  $r = 0.4$  la curva se presenta particularmente compleja, apareciendo tres transiciones con contribuciones muy parecidas. El perfil para  $r = 0.8$  tiene un aspecto similar sólo que desplazado a temperaturas mayores, dando una transición de aproximadamente el 50% a  $90.5^{\circ}\text{C}$ . Esto supone una gran estabilización del DNA por parte de este péptido. Por último, para  $r = 1.0$  y  $1.2$  aparece una sólo transición a  $89.3^{\circ}\text{C}$  de altísima cooperatividad a juzgar por el valor de la derivada. Esto puede ser debido a la formación de una superestructura compacta como se comentó anteriormente. Es de notar que la aparición de la última transición corresponde a un valor de  $r$  en el cual posiblemente todo el DNA esté saturado, condición quizá previa a la formación de la superestructura a la que nos venimos refiriendo. En estos complejos resulta particularmente interesante el comportamiento para  $r = 0.4$  y  $0.8$ , donde pese a que el complejo se forma con una fracción de proteína particularmente homogénea en secuencia como es la región C-terminal (Cole, 1977 y Bradbury et al., 1975) donde el 90% son lisina, alanina y prolina, las curvas presentan comportamiento polifásico

Este hecho hace descartar la existencia de distintos dominios de unión del fragmento CTB al DNA. Para poder justificar la aparición de tres transiciones hay que recurrir a otro tipo de argumentos. Podría deberse a la formación de regiones con la citada superestructura del complejo, que daría cuenta de las transiciones de  $86.2$  a  $90.5^{\circ}\text{C}$  (lógicamente con contribución superior a  $r = 0.8$ ). Por otro lado, habría regiones



**Figura 36.** Curvas derivadas de las curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-CTB de H1 de timo de ternera en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml, para las distintas relaciones,  $r$ , indicadas.

TABLA XVIII: Datos de  $T_m$  y contribución de cada transición (en %) para complejos DNA-CTB.

r	nº transiciones	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)
0	2	55.0	67.0	61.4	33.0	-	-
0.2	2	57.7	65.0	77.8	32.0	-	-
0.4	3	62.2	43.5	77.1	28.3	86.2	28.2
0.8	3	72.0	20.9	82.8	29.6	90.5	49.5
1.0	2	87.0	38.2	90.0	61.8	-	-
1.2	1	89.3	100.0	-	-	-	-

TABLA XIX: Datos de  $T_m$  y contribución de cada transición (en %) para complejos DNA-TRC

r	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)	$T_m(^{\circ}\text{C})$	(%)
0	55.0	67.0	61.4	33.0
1.0	57.0	46.1	63.9	53.9
2.0	60.5	45.6	67.1	54.4
3.0	62.2	43.1	70.0	56.9
4.0	63.7	41.0	70.2	59.0

con DNA estabilizado por la fracción CTB, sin llegar a adoptar una conformación especial, y con  $T_m$  entre 62.0 y 72.0°C. La transición intermedia (entre 77 y 83°C) que tiene en ambos casos aproximadamente la misma contribución de 29%, podría deberse a las regiones que limitan las dos anteriormente citadas.

Por último, en la figura 37 y tabla XIX se muestran las curvas y datos más significativos de desnaturalización térmica de complejos DNA-TRC. Como se ve el comportamiento de la región globular de la molécula al unirse al DNA es completamente distinto al observado para la histona H1 nativa y los fragmentos CNBS y CTB. Para empezar, se necesitan relaciones mucho mayores entre proteína/DNA para poder estabilizar de forma apreciable el DNA. Este hecho hace suponer una afinidad del TRC muy baja por el DNA. Cuando se aumenta  $r$  la transición se va desplazando a temperaturas mayores aunque muy poco, y conservando la relación entre las dos transiciones del DNA, si bien la transición de 61.4 que representaba un 33% pasa a ser de aproximadamente 50%. Todo este comportamiento es bastante similar al que se produciría en el DNA al aumentar ligeramente la fuerza iónica y en conjunto se puede considerar una transición monofásica. Así pues, se puede deducir que el TRC se une de forma sumamente débil al DNA; lo hace de forma inespecífica, incluso a zonas posiblemente ricas en GC.

Como puede observarse de la comparación de los resultados expuestos en los apartados 3.5.1. y 3.5.2. no parece que se pueda deducir el comportamiento de la histona nativa por adición del comportamiento de la región C-terminal y la región globular. Este hecho se podría deber, en principio, a la falta de la región N-terminal, que representa el 16% de la molécula. Al no tener aislada esta región no se ha podido comprobar este hecho, pero todo parece indicar que la situación no fuera a variar mucho, y el comportamiento de la histona no se pueda deducir de la adición de com

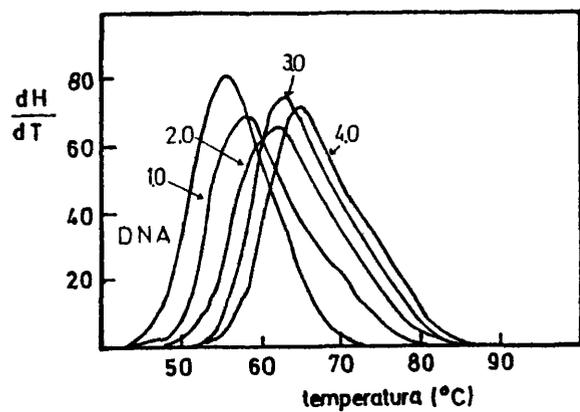


Figura 37. Curvas derivadas de las curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-TRC de HI de timo de terna en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml, para las distintas relaciones,  $r$ , indicadas.

portamientos de las regiones N-terminal, globular y C-terminal. El dato que está más a favor de esta hipótesis es el hecho de que el fragmento CNBS, pese a no poseer la zona N-terminal, reproduce y llega a superar el comportamiento de la histona nativa. La causa de esta diferencia radica en el papel de la región globular. Si bien esta región tiene una afinidad muy baja por el DNA, como demuestran las curvas de transición de complejos DNA-TRC, el hecho de estar unidos covalentemente a la región C-terminal le confiere una característica especial a la asociación, en tanto en cuanto el hecho de que se una la región C-terminal al DNA condiciona que al lado se una la región globular. Esto hace que, la región globular libre, de lugar a una transición distinta que cuando se encuentra unida a la región C-terminal.

Por último, comparando los resultados de los complejos DNA-H1 y DNA-CTB, cabría conferirle a la región globular un papel moderador en la unión y quizás en el mantenimiento de la superestructura citada.

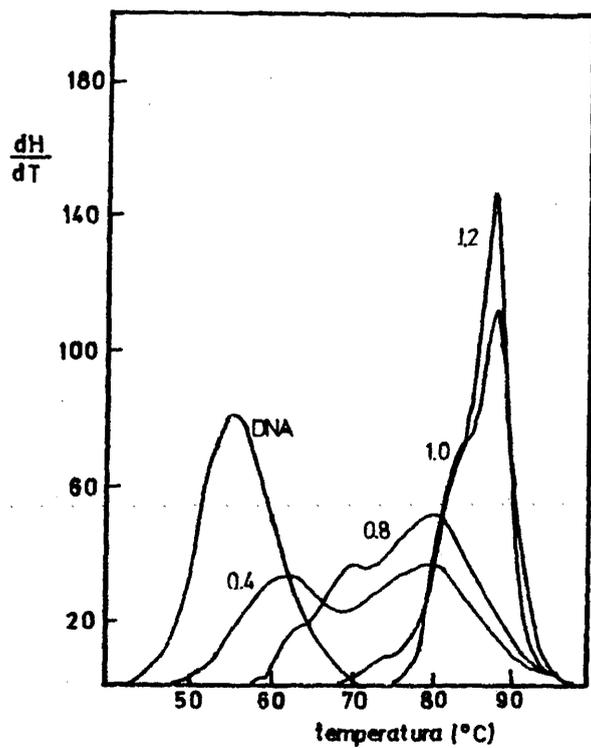
Por otro lado, se han realizado complejos, en las mismas condiciones, con las regiones C-terminal y globular de la H1cc. Los resultados, no mostrados, son semejantes que los obtenidos con sus homólogos de tino de ternera

### 3.5.3. Histona H1cc y agregados.

Como se vió en el apartado 3.3.3. el estudio estructural hecho por DC de los complejos DNA-H1cc, BG1, BG2 y BG3 apuntaba algunas diferencias en cuanto a la capacidad de inducción de estructuraPSI de los distintos agregados, referida a la histona nativa. También se apuntaba en el citado apartado la posible importancia que este hecho pudiera tener a nivel de cromatina. Por tanto, parece importante el hacer un estudio paralelo de la estabilidad de estos complejos con el fin de poder resaltar las posibles diferencias, si las hubiera.

Los complejos se realizaron en las mismas condiciones experimentales descritas al comienzo de este apartado (3.5.). Las relaciones proteína/DNA fueron de 0, 0.4, 0.8, 1.0 y 1.2, no produciéndose precipitación en ninguno de los cuatro. En las figuras 38, 39, 40 y 41 se muestran las curvas derivadas de los perfiles de transición térmica de estos cuatro complejos a las relaciones indicadas. Así mismo, en la tabla XX se detallan los valores de las temperaturas de transición con sus contribuciones relativas. A primera vista se observa que en general las fracciones B61 y B62 estabilizan menos el DNA que la histona nativa. Por otro lado, la fracción B63 estabiliza el DNA de forma parecida a la H1, aunque también ligeramente menos. Para  $r = 0.4$  el comportamiento de los cuatro complejos resulta similar. Aparecen dos transiciones, a aproximadamente 60 y 80°C, con contribuciones entre 40 y 60%. Si bien hay que resaltar que la fracción B61 presenta una transición intermedia a 66.5°C que representa un 35%. Para  $r = 0.8$  las diferencias se acentúan más, separándose en dos grupos. Los complejos con H1 y B63 presentan una transición mayoritaria (80-96%) a 80°C y la otra, de poca contribución, a 69°C aproximadamente. Por otro lado, a esta relación los complejos con B61 y B62 presentan todavía una transición a 64°C. Para  $r = 1.0$  el comportamiento de los cuatro complejos es diferente. Por una parte en la histona nativa aparece una transición a 88.6°C, con contribución de 54.2%, mientras que esta transición es sólo del 19.2% en el complejo B63, no ha aparecido aún en los otros dos complejos. Por último, cuando la relación es 1.2, las diferencias se acentúan. Hay que resaltar que a esta relación el complejo con B61 todavía presenta un 21.0% que funde a 73.1°C, mientras que a 89.3°C sólo funde el 15.1%. Estas dos transiciones representan en el B62 el 7.3% y el 38.6%, es decir, estabiliza ligeramente más el DNA que la fracción B61.

Del análisis de estos resultados y a la vista de lo dicho en el apartado 3.1. sobre la naturaleza de estos complejos, se puede deducir que: primero, la fracción B63, que tiene un puente disulfuro intracatenario es la que más conserva la capacidad de unirse y estabilizar al



**Figura 38.** Curvas derivadas de las curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-Hlcc en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml para las distintas relaciones,  $r$ , indicadas.

143

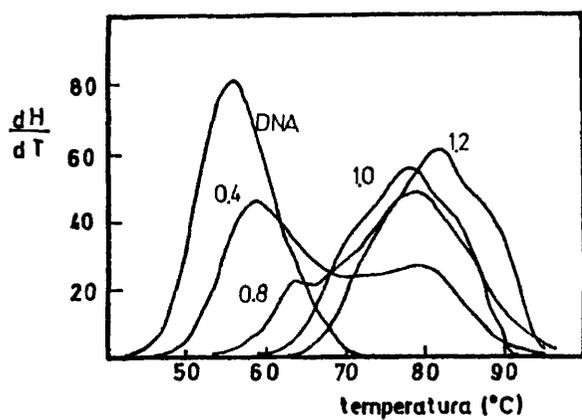


Figura 39. Curvas derivadas de las curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-BG1 en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml, para las distintas relaciones,  $r$ , indicadas.

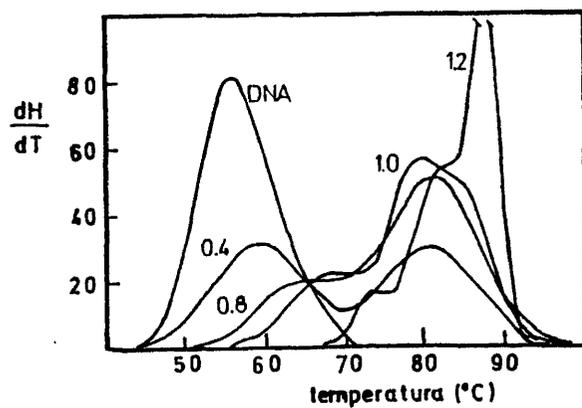
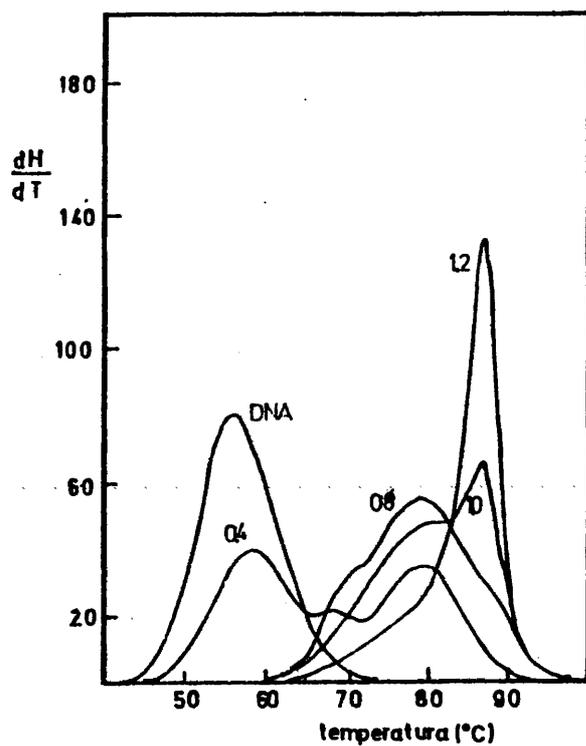


Figura 40. Curvas derivadas de las curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-BG2 en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml, para las distintas relaciones,  $r$ , indicadas.

144



**Figura 41.** Curvas derivadas de las curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-BG3 en EDTA 1mM, fosfato - sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml para las distintas relaciones,  $r$ , indicadas.

TABLA XX: Datos de Tm y contribución de cada transición (en %) para complejos DNA-Hlcc, B61, B62 y B63.

Muestra	nº transiciones	Tm	%	Tm	%	Tm	%
DNA control	2	54.8	67.3	60.8'	32.7	-	-
Hlcc	2	61.3	37.6	79.1	62.4	-	-
	3	63.7	7.8	69.4	11.4	79.9	80.8
	3	75.1	5.8	83.3	40.0	88.6	54.2
	2	83.7	46.7	88.5	53.3	-	-
B61	3	57.8	34.6	66.5	35.1'	80.0	30.2
	2	63.5	13.2	78.5	86.8	-	-
	3	69.8	23.1	78.1	63.5	85.0	13.4
	3	73.1	21.0	81.6	63.9	89.3	15.1
B62	2	59.1	50.7	80.5	49.3	-	-
	2	64.3	24.5	80.7	75.5	-	-
	3	68.5	28.8	78.6	35.5	85.0	35.7
	3	72.8	7.3	82.3	54.1	87.7	38.6
B63	2	59.0	49.9	78.9	50.1	-	-
	2	69.0	3.6	79.1	96.4	-	-
	3	73.5	25.1	82.0	55.7	87.3	19.2
	2	82.0	51.9	86.8	48.1	-	-

145

DNA, aunque es ligeramente inferior a la de la histona nativa; segundo, la fracción BG2, dímero, presenta ya demasiado tamaño como para poder formar la superestructura del DNA referida en apartados anteriores, que hacía que no se desnaturalizara hasta los 89°C, por lo menos en cantidad apreciable; y por último, el multímero BG1 presenta un gran impedimento estérico a la hora de la interacción, que dificulta aún más la inducción de la citada superestructura en el dímero. Además, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos al realizar el estudio cinético de formación de los complejos en presencia de sal y su capacidad de inducir estructura FSI (apartados 3.3.2. y 3.2.3., respectivamente). Allí se veía que los distintos agrégados de H1 se podían ordenar según su capacidad de inducir dicha estructura de la siguiente forma: BG3 > BG2 > BG1.

Estas características antes mencionadas podrían tener un significado estructural o funcional en la cromatina del insecto, ya que la oxidación de las histonas provocaría un cierto grado de relajamiento de la fibra de cromatina como consecuencia de la menor interacción de la H1 oxidada con el DNA.

Por último, sólo hacer un comentario en cuanto a la comparación de los complejos de H1 de ternera y de Ceratitis capitata con DNA. Como se puede observar de la comparación de las figuras 34 y 38 así como de las tablas XVI y XX, la histona H1 de timo de ternera interacciona, en general, ligeramente de modo más fuerte con el DNA que su homóloga de insecto. Este dato vendría a abundar en lo ya observado por DC en el apartado 3.2.1.

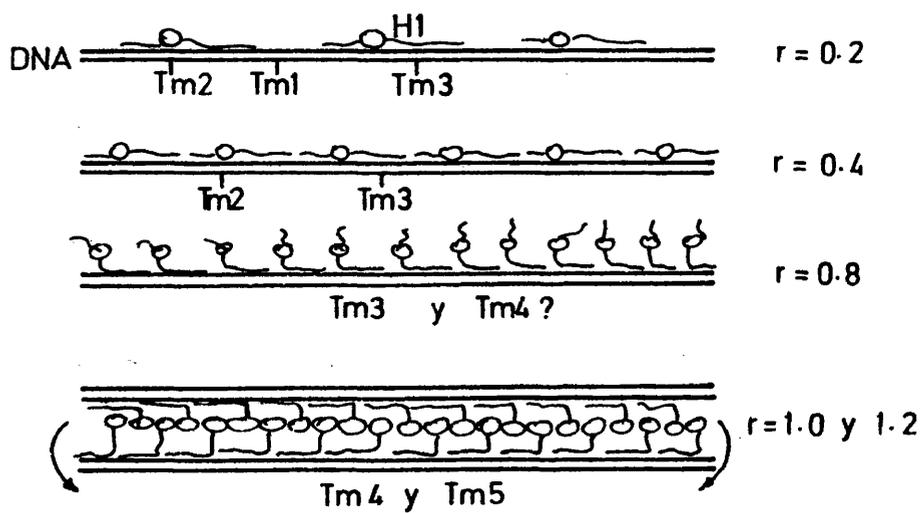
A la vista de los resultados de desnaturalización térmica, tratados a lo largo de los apartados 3.5. y 3.6. se ha propuesto el siguiente modelo con el fin de ilustrar, en lo posible, el comportamiento de los complejos frente a la citada técnica, e intentar extrapolar, también en lo posible, para justificar el comportamiento en DC.

En la figura 42 se muestra el modelo indicado. Como se puede apreciar, para relaciones bajas de  $r$ , i.e. 0.2, la cantidad relativa de proteína no es suficiente para saturar el DNA, permaneciendo regiones libres que darían cuenta de la transición  $T_{m1}$  de  $56^{\circ}\text{C}$  (ver figura 34 y tabla XVI para complejos DNA-H1tt, y siguientes para otros complejos). Por otro lado, como se dijo, la histona interaccionaría con sus regiones polares con el DNA, estabilizándolo hasta aproximadamente  $75-80^{\circ}\text{C}$  ( $T_{m3}$ ). Por último, el hecho de que la región polar interaccione fuertemente con el DNA obliga, de algún modo, a la interacción de la región globular de la molécula con una zona fija del DNA, impidiendo que se desplace a lo largo de la doble hélice, como ocurre cuando dicha zona globular se encuentra libre, y, por tanto, estabilizando dicha zona. Esta estabilización daría cuenta de la transición  $T_{m2}$ , a aproximadamente  $60^{\circ}\text{C}$ .

Cuando la relación es  $r = 0.4$ , ya hay suficiente cantidad de proteína, como se vió, para interaccionar con todo el DNA. Este hecho justifica la desaparición de la transición  $T_{m1}$  de  $56^{\circ}\text{C}$ , puesto que ya no queda DNA libre. Por tanto aparecerán dos transiciones, una mayoritaria,  $T_{m3}$ , entre  $75$  y  $80^{\circ}\text{C}$  correspondiente al DNA estabilizado por las regiones polares y otra,  $T_{m2}$ , de menor contribución, a  $60^{\circ}\text{C}$  correspondiente a la interacción con las regiones globulares.

A partir de  $r = 0.4$  el número de residuos de proteína es superior al de DNA. Así, para  $r = 0.8$ , el contenido en proteína es aproximadamente el doble que el contenido en DNA. En estas condiciones la interacción más fuerte (regiones polares) desplaza a la interacción más débil (regiones globulares). Como la región C-terminal es aproximadamente el 50% de la molécula, a esta relación con sólo las regiones C-terminales se podría estabilizar todo el DNA, dando cuenta de la transición  $T_{m3}$ . Ahora bien, en este caso no se ha contado con las regiones N-terminales que muy bien podrían interaccionar a su vez con otra cadena de DNA, empezando

148



**Figura 42.** Modelo propuesto para justificar las distintas transiciones térmicas de los complejos DNA-H1, para las distintas transiciones indicadas ( $^{\circ}\text{C}$ ): Tm1 = 56; Tm2 = 60; Tm3 = 75-80; Tm4 = 85; Tm5 = 90.

a formar ya algo de complejos formados no por asociación simple de histona al DNA sino por asociación de complejos DNA-histona. La formación de estos complejos justificarían la estabilización más aun del DNA, dando cuenta de la transición Tm4 (aproximadamente a 85°C).

Por último, cuando la relación de proteína/DNA es mayor aun, empezarían a cobrar importancia las interacciones hidrofóbicas histona-histona, por sus regiones globulares, pudiendose consolidar así, la superestructura que ya había empezado a producirse a  $r = 0.8$ . Esta mayor estabilización da cuenta de la transición Tm5 a 90°C.

El complejo así formado daría lugar a las partículas toroidales observadas por microscopía electrónica en medios de fuerza iónica más elevada, ya que este hecho favorecería la interacción hidrofóbica histona-histona en "clusters" cerrados y rodeados de DNA. Contando con el tamaño de persistencia del DNA, es, desde este modelo, completamente lógica la formación de estructuras toroidales, con la histona por dentro del toroide e interaccionando con sus colas polares con el DNA que transcurriría envolviendo este anillo.

Los resultados observados con los dominios conformacionales de la histona H1 también se pueden adaptar, lógicamente, al modelo propuesto. El fragmento CNBS, presenta un comportamiento en todo similar al descrito para complejos con H1 intacta. De acuerdo con la estructura de este fragmento, que contiene casi el 50% de la región globular (como ya se discutió ampliamente en el apartado 3.2.2.) el planteamiento del modelo sería el mismo exceptuando que el hecho de que la región globular sea la mitad y que no exista la región N-terminal, le confieren mayor accesibilidad al DNA, hecho que justifica el que a una misma relación sea mayor la capacidad de estabilizar el DNA o de inducir superestructura, para el CNBS que para la histona intacta (comparar las figuras 34 y 35 o

las tablas XVI y XVII).

Para los complejos CTB vale todo lo dicho excepto que - aquí, al no poseer región globular, la interacción hidrofóbica descrita por el modelo no debe jugar un papel muy importante, aunque si necesario, pues como se ha apuntado en la introducción los polipéptidos completamente polares (como poli-Lys) no inducen este tipo de superestructura en el complejo. Por otro lado la no existencia de la región globular justifica el que a  $r = 0.2$  no se dé la transición  $Tm2$  (figura 36 y tabla XVIII).

Los resultados observados para los complejos formados con Hlcc y sus fracciones agregadas se pueden contemplar perfectamente a la luz del presente modelo; que justificaría, por un lado, la gran similitud en cuanto al comportamiento de los complejos con Hltt y Hlcc, y por otro lado las pequeñas diferencias observadas entre los complejos con Hlcc y sus fracciones agregadas. En este último caso, resulta evidente el que a relaciones bajas las diferencias sean menores todavía, pues, como ya se dijo, la proteína no encuentra gran impedimento para interactuar con el DNA. Ahora bien, a relaciones altas la interacción histona-histona y la formación de la citada estructura compacta se ven más impedidas en los agregados B61 y B62, como se observa en sus respectivos perfiles de desnaturalización térmica (figuras 39 y 40), debido al mayor volumen de estos complejos. Y, por último, quizá la pérdida en parte de la estructura globular del agregado intramolecular B63 dificulte la interacción hidrofóbica, ocasionando, así, una mayor dificultad en la formación de la superestructura del complejo.

### 3.6. AJUSTE DE LAS CURVAS DE TRANSICION TEPMICA

Tal como se comentó en el apartado 1.5.2., el ajuste de curvas de transición térmica, según el modelo allí detallado, permiten el cálculo de toda una serie de parámetros sumamente interesante en la asociación de ligandos al DNA. Con este fin se ensayó este procedimiento en los complejos que proporcionaban curvas de transición más simples; tal es el caso de los complejos DNA-TRC

#### 3.6.1. Cálculo de los parámetros termodinámicos y de cooperatividad del DNA utilizado.

Para alcanzar los objetivos anteriormente expuestos es preciso, como paso previo, definir completamente el DNA utilizado. Para ello se hace necesario conocer el  $\Delta H_S^0$ ,  $\Delta S_S^0$ ,  $T_m$  y  $\sigma$  del DNA del timo de ternera en el medio en el cual se han formado los complejos.

Aunque el  $\Delta H_S^0$  se puede calcular calorimetricamente y conociendo este valor, junto con la  $T_m$ , calcular  $\Delta S_S^0$ , alternativamente se puede conseguir el valor de ambos parámetros por ajuste de la curva de transición del DNA libre. En el presente caso la curva de transición no es rigurosamente monofásica, ya que se trata de un DNA nativo con pequeñas heterogeneidades en su molécula.

En este sentido se ha realizado el ajuste para las dos transiciones mayoritarias y para el conjunto considerado como una única transición. El método empleado se describió en el apartado 2.8.4.1.

En la tabla XXI se muestran los valores obtenidos mediante estos ajustes y en la figura 43 se representan las curvas teóricas y experimentales para su comparación. Como se puede observar en dicha figura el ajuste es bastante bueno en la región próxima a la  $T_m$ , pero empieza a desviarse en los extremos. Esto posiblemente sea debido a que no se cumple

Tabla XXI. Resultados del ajuste teórico de las curvas de transición térmica de DNA. Cálculo de parámetros termodinámicos y de cooperatividad.

Curva experimental	$\sigma$	$\Delta H_s^0$ (b)	$\Delta S_s^0$ (c)	$T_m^{(d)}$ calculada por	
				ajuste	derivada
DNA sonificado	$4.5 \times 10^{-3}$	8173	24.78	56.8	56.5
Dos gaussianas <sup>a</sup>	$4.1 \times 10^{-3}$	8173	24.85	55.9	55.5
1ª gaussiana <sup>a</sup>	$2.3 \times 10^{-3}$	8123	24.77	55.0	55.0
2ª gaussiana <sup>a</sup>	$2.3 \times 10^{-3}$	8290	24.70	62.6	61.5

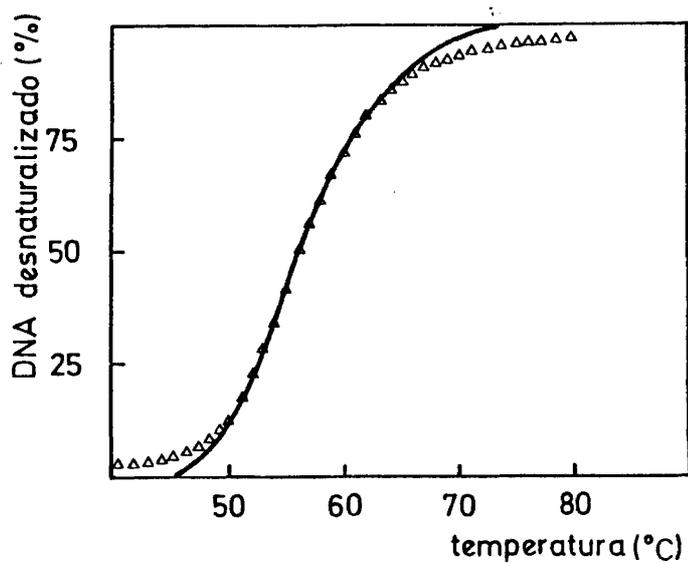
152

<sup>a</sup> Curva de transición calculada al integrar las distintas gaussianas en las que se descompone la curva derivada de la de transición del DNA.

<sup>b</sup> Unidades: calorías.

<sup>c</sup> Unidades: calorías/°K.

<sup>d</sup> Unidades: °C.



**Figura 43.** Curva de desnaturalización térmica de DNA sonificado, en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml ( trazo continuo), junto con los puntos correspondientes al ajuste teórico mediante el programa GENARA, con los parámetros indicados en el texto (Δ).

estrictamente la ley de Van't Hoff. En la tabla se ve que la concordancia entre la  $T_m$  teórica y experimental en todos los casos, con una desviación máxima de  $1.1^{\circ}\text{C}$ , y el error del ajuste es pequeño. Los valores de  $\Delta S_s^{\circ}$  resultaron muy similares en todos los casos y parecidos a los descritos por Scheffler y Sturtevant (1969) para poli d(AT). Este resultado no es de extrañar ya que la pérdida de libertad rotacional en todas las bases como consecuencia del apilamiento es muy semejante. En cambio el incremento de entalpía difiere ligeramente en los distintos ajustes y son superiores al caso mencionado anteriormente. Indudablemente en el mayor valor de  $\Delta H_s^{\circ}$  influyen tanto efectos composicionales como del medio en el cual el DNA se encuentra disuelto. En este caso el contenido en GC del DNA del timo de ternera aumentará el  $\Delta H_s^{\circ}$ , y como consecuencia la  $T_m$ .

La variación más significativa con respecto al poli d(AT) se obtiene en el valor del parámetro  $\sigma$ , que frente a  $10^{-4}$  para el caso anterior, aparece incrementado en un orden de magnitud para el DNA de timo de ternera. Como se comentó en la Introducción este parámetro da cuenta de la cooperatividad de la transición, y está íntimamente relacionado con la pendiente de la curva de desnaturalización en la  $T_m$ . El hecho de que aparezca menos cooperatividad en DNA de timo de ternera que en poli d(AT) es explicable en razón de la heterogeneidad molecular del primero.

### 3.6.2. Ajuste de los complejos DNA-TRC.

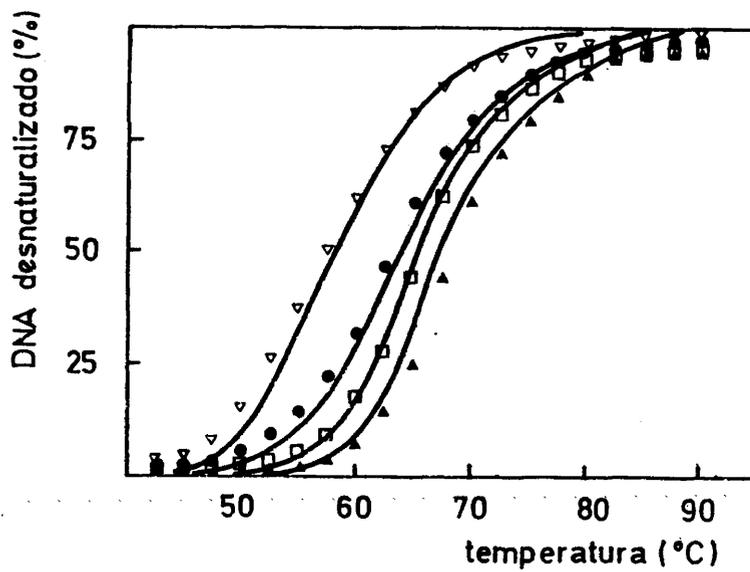
El método de ajuste utilizado considera la actividad del ligando libre,  $L$ , constante durante toda la transición. Por esta razón se han ajustado los complejos DNA-TRC, ya que dada la baja afinidad de esta región con el DNA cabe pensar que la constante intrínseca de asociación sea muy pequeña, pudiéndose hacer la simplificación de considerar la cantidad de ligando libre prácticamente igual a la cantidad de ligando total y, por tanto, constante durante toda la transición. Efectivamente McGues (1976) comprobó que esta simplificación es válida. Un método alternativo consiste en realizar la transición frente a un reservorio infinito de li-

gando, pero no se ha podido realizar por imposibilidad experimental.

Los complejos ajustados por este método han sido los correspondientes a las relaciones 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0. Con el fin de facilitar el ajuste se ha supuesto una transición monofásica en todos los casos. Esta suposición no conlleva gran error, pues como se puede apreciar en la figura 37 en todos los casos es posible considerar una única transición. Las concentraciones de ligando total utilizadas han sido de  $1.9 \times 10^{-6}$ ,  $3.9 \times 10^{-6}$ ,  $5.8 \times 10^{-6}$  y  $7.8 \times 10^{-6}$  M. Con estos valores el mejor conjunto de parámetros que permiten el ajuste de los cuatro complejos simultáneamente ha sido:  $K_h = 0.14 \text{ M}^{-1}$ ,  $n_h = 4$  pb y  $w_h = 1.4$ ; resultando  $K_c \leq 0$ , el resto de los parámetros no tienen sentido. En la figura 44 se muestran las curvas experimentales con los puntos calculados por el ajuste teórico. Como puede observarse, de nuevo, la desviación de la curva es mayor según se separan de la  $T_m$ .

El bajo valor de  $K_h$  explica la apariencia monofásica de las curvas. McGhee (1976) ya discutió la influencia que la  $K_h$  posee sobre la aparición de polifasicidad. Ello se confirma en el caso del TRC, y algunos aspectos de estos resultados ya se han discutido en el apartado anterior. Los cálculos aquí presentados ratifican lo allí dicho. La  $T_m$  se desplaza hacia temperaturas superiores al aumentar  $\underline{r}$ , pero las curvas aparecen monofásicas, debido a la libertad que debe tener la molécula para desplazarse a lo largo del DNA. Por otra parte, el bajo valor de la cooperatividad de unión del TRC al DNA ( $w_h$ ), no modifica sustancialmente estos resultados. Para conseguir curvas polifásicas con bajo valor de  $K_h$  es necesario que  $w_h$  alcance valores más elevados (McGhee, 1976).

La situación es completamente distinta cuando el TRC se encuentra unido covalentemente al resto de la proteína, como es el caso de la H1 intacta. Esta situación en el sistema se comporta como si existiera un  $w_h$  muy alto, ya que allí donde se asocia la parte C y N-terminal de la molécula, que deben tener un elevado valor de  $K_h$ , necesariamente debe unir-



**Figura 44.** Curvas de desnaturalización térmica de complejos DNA-TRC de H1 de timo de ternera, en EDTA 1mM, fosfato sódico 1mM, pH 7.0 y concentración de DNA 0.030 mg/ml, junto con los puntos correspondientes al ajuste teórico mediante el programa SIGMUND, según el modelo de McGhee (1976), para las relaciones  $r$  : ( $\nabla$ ) 1.0; ( $\bullet$ ) 2.0; ( $\square$ ) 3.0; ( $\triangle$ ) 4.0.

se también la región globular, no pudiendo discurrir libremente, como en el caso anterior, a lo largo del DNA. Ello hace que aparezca una transición correspondiente a dicha región globular, que no altera la  $T_m$  al aumentar  $\underline{g}$ , sino únicamente su contribución relativa con respecto al DNA libre. No obstante se ha demostrado que, incluso en la molécula intacta de H1, la interacción de la región globular con el DNA es bastante relajada, mientras que las partes N y C-terminales de la molécula se encuentran altamente inmovilizadas (Lawrece et al., 1980).

El valor de  $n_h$  resulta bastante razonable, ya que la molécula total se cree que, aproximadamente, cubre 20 pb, del nucleosoma, siendo la mayor parte de ellas ocupadas por las regiones polares, que son las más extendidas y las que poseen la casi totalidad de los residuos básicos.

158

#### 4. CONCLUSIONES

El presente trabajo ha tenido como finalidad conocer más a fondo la interacción de la histona H1 con el DNA, y asignar, en lo posible, a cada uno de los dominios estructurales de la molécula su papel en dicha interacción a la hora de formar los complejos. A lo largo de las investigaciones detalladas en esta memoria se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- 1.- La interacción de la histona H1 con el DNA provoca cambios apreciables en el espectro conservativo del DNA en dicroísmo circular. Estos cambios espectrales son consecuencia de la formación de la estructura PSI.
- 2.- La proporción de estructura PSI formada, depende críticamente de la fuerza iónica, concentración de DNA y relación proteína/DNA; incrementándose esta estructura considerablemente al aumentar sobre todo estos dos últimos factores.
- 3.- El tamaño del DNA afecta profundamente la formación de estructura PSI. De este modo, al disminuir el tamaño del DNA, concretamente mediante sonicado, se ha llegado a inducir grandes contribuciones de esta estructura, incluso a bajas relaciones proteína/DNA.
- 4.- La nitración específica de las tirosinas de la histona H1 no modifica sustancialmente la capacidad de inducción de estructura PSI de la molécula. Teniendo en cuenta que esta modificación covalente altera considerablemente la región globular de la histona H1, se deduce que esta región no debe jugar un papel decisivo en la formación de dicha estructura.
- 5.- La digestión triptica de complejos DNA-H1, lleva a la desaparición de la estructura PSI, aun en aquellos estadios de la digestión en los cuales todavía la región globular no se ha hidrolizado. Este hecho viene a confirmar la conclusión anterior.

- 6.- La región C-terminal de la molécula de H1, por separado, presenta mayor capacidad de inducir estructura PSI que la histona intacta en la misma proporción. Esto se puede interpretar como que la región globular juega un posible papel modulador en dicha capacidad.
- 7.- El estudio cinético de la inducción de estructura PSI, tanto por H1 como por los distintos fragmentos C-terminales, pone de manifiesto la existencia de al menos, dos procesos distintos en este cambio estructural. Estos procesos pueden corresponder con un primer paso rápido de formación de estructuras compactas desordenadas y un segundo paso más lento correspondiente a la ordenación de estas estructuras.
- 8.- Las cinéticas de formación de estructura PSI con DNA de gran tamaño y DNA sonificado aparecen diferentes. Por otro lado el fragmento CNBS induce la estructura PSI más rápidamente que la histona intacta y que el fragmento CTB, en las mismas condiciones. Este hecho indica que la región globular ejerce un papel modulador en el proceso, pero es necesaria la presencia de toda esta región.
- 9.- La digestión con nucleasa de micrococo de los complejos formados con DNA-H1tt pone de manifiesto la existencia de una cierta resistencia a la digestión, en los complejos con  $\alpha$  superior a 0.3. Este hecho está relacionado sin duda con la existencia de las estructuras compactas detectadas con microscopio electrónico.
- 10.- La desnaturalización térmica de los complejos muestra distintos grados de estabilización del DNA, poniéndose de manifiesto, en condiciones en que el DNA no se encuentra saturado, tres transiciones correspondientes al DNA libre, DNA estabilizado por la región globular y DNA estabilizado por las regiones polares, habiéndose calculado los porcentajes relativos de cada transición.

- 11.- En condiciones tales que el DNA está sobresaturado de histona o fragmento correspondiente a la región C-terminal, aparece una transición mayoritaria, de alta cooperatividad a temperaturas comprendidas entre 85 y 92 °C. Esta transición se ha asignado a la formación de una superestructura en el complejo que conduce a una gran estabilización del DNA.
- 12.- El comportamiento del TRC aislado difiere considerablemente del observado cuando forma parte de la molécula intacta de H1. Esta diferencia se debe a la muy distinta cooperatividad en la unión de esta región al DNA cuando hace de forma aislada y formando parte de la molécula de H1.
- 13.- El ajuste teórico de las curvas de transición térmica de los complejos DNA-TRC, según el modelo de Ising proporciona los siguientes valores para los parámetros principales de la asociación:  $K_C \approx 0.$ ,  $K_h = 0.14$ ,  $n_h = 4$  y  $w_h = 1.4$ . Estos resultados confirman las conclusiones anteriores.
- 14.- Se ha comprobado como el comportamiento de las histonas H1 y regiones de la molécula, de distintas fuentes (timo de ternera y Ceratitidis Capitata), frente a los estudios descritos anteriormente, es muy similar. Aunque se ha puesto de manifiesto que, en general todos los efectos estructurales, cinéticos y de estabilización térmica sobre el DNA, se encuentran ligeramente incrementados en el caso de la H1 de timo de ternera con respecto a su homólogo de Ceratitidis capitata.
- 15.- El estudio comparado de las distintas regiones de la molécula pone de manifiesto, la no aditividad de sus efectos, respecto de la molécula intacta.

- 16.- Así mismo, el estudio comparado, desde el punto de vista cinético, estructural y de estabilidad de los complejos formados por las distintas fracciones oxidadas de la histona H1 de Ceratitis Capitata, lleva a concluir, que la oxidación de dicha histona hace disminuir todos los efectos estructurales, cinéticos y de estabilidad térmica sobre el DNA, formando complejos posiblemente mas relajados.
- 17.- El efecto comentado en la conclusión anterior, podría tener gran importancia a nivel de la estructura de la cromatina del insecto.

163

S. APENDICE

»

RESOLUCION DE LA ECUACION DE TERCER GRADO

Sea la ecuación general

$$x^3 + a_2 x^2 + a_1 x + a_0 = 0$$

donde el coeficiente de  $x^3$  ha de ser la unidad; en caso de que no sea así, se divide por dicho coeficiente toda la ecuación.

Si  $a_2 \neq 0$  hacemos el cambio  $x = y - a_2/3$  (1)

Sustituyendo

$$(y - a_2/3)^3 + a_2 (y - a_2/3)^2 + a_1 (y - a_2/3) + a_0 = 0$$

Simplificando

$$y^3 + p y + q = 0$$

donde

$$p = a_1 + \frac{1}{3} a_2^2 \quad q = \frac{2}{27} a_2^3 - \frac{1}{3} a_1 a_2 + a_0$$

Si  $q = 0$  la solución es trivial y si  $p = 0$  también.

Para  $q \neq 0$  y  $p \neq 0$  hacemos el cambio  $y = z - p/3z$  (2)

Sustituyendo

$$\left(z - \frac{p}{3z}\right)^3 + p \left(z - \frac{p}{3z}\right) + q = 0$$

operando

$$\frac{z^6 + q z^3 - \frac{p^3}{27}}{z^3} = 0$$

es decir  $z^6 + q z^3 - \frac{p^3}{27} = 0$

haciendo un nuevo cambio  $z^3 = t$  (3)

resulta una ecuación de segundo grado en t

$$t^2 + q t - \frac{p^3}{27} = 0$$

cuyas soluciones son

$$t = \frac{-q \pm \sqrt{q^2 - \frac{4p^3}{27}}}{2}$$

Las dos soluciones de esta ecuación, que pueden ser complejas, al deshacer el cambio (3) proporcionan seis soluciones (contando de nuevo con las soluciones complejas), que al deshacer los cambios (2) y (1) proporcionan seis soluciones que deben ser siempre iguales dos a dos.

166

6. BIBLIOGRAFIA

- Adler, A.J. y Fasman, G.D. (1971) J. Phys. Chem. (Wash.) 75, 1516-1526.
- Adler, A.J., Schaffhausen, B., Langan, T.P. y Fasman, G.D. (1971) Biochemistry 10, 909-913.
- Adler, A.J., Ross, D.G., Chen, K., Stafford, P.A., Woiszwilllo, M.J. y Fasman, G.D. (1974) Biochemistry 13, 616.
- Adler, A.J., Moran, E.C. y Fasman, G.D. (1975) Biochemistry 14, 4179.
- Alberts, B.M. y Frey, L. (1970) Nature, 227, 1313-1318.
- Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C. y Avilés, F.J. (1980) Nature 288, 675.
- Ansevin, A.T. y Brown, B.W. (1971) Biochemistry 10, 1133.
- Avilés, F.J., Chapman, G.E., Kneale, G.G., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 363.
- Avilés, F.J., Díez-Caballero, T., Palau, J. y Albert, A. (1978) Biochimie 60, 445-451.
- Axel, R. (1975) Biochemistry 14, 2921.
- Azbel, M.Ya. (1980a) Biopolymers 19, 61-80.
- Azbel, M.Ya. (1980b) Biopolymers 19, 81-93.
- Azbel, M.Ya. (1980c) Biopolymers 19, 95-109.
- Bakayev, V.V., Bakayeva, T.G. y Varsharsky, A.J. (1977) Cell. 11, 619.
- Baldwin, J.P., Bosely, P.G., Bradbury, E.M. e Ibel, K. (1975) Nature. 253, 245-249.
- Barbero, J.L., Franco, L., Montero, F. y Morán, F. (1980) Biochemistry 19, 4080.
- Barbero, J.L. (1981) "Estudios estructurales en la histona H1 de Ceratitis capitata". Tesis doctoral. Facultad de Químicas. Universidad Complutense.

- Barbero, J.L. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* (en prensa).
- Bartley, J.A. y Chalkley, R. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3647.
- Bates, D.L. y Thomas, J.O. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 5883-5893.
- Beaven, B.H. y Gratzel, W.B. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 168, 456.
- Belyavsky, A.V., Bevykin, G.S., Gognadze, E.G. y Mirzabekov, A.D. (1980) *J. Mol. Biol.* 139, 519.
- Birshtein, T.M. y Ptitsyn, O.B. (1956) "Conformations of Macromolecules". Interscience, New York.
- Bloomfield, V.A., Crothers, D.M. y Tinoco, I. (1974) "Physical Chemistry of Nucleic Acids". Harper and Row. New York.
- Bonner, W.M. y Stedman, J.D. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2190.
- Boulikas, T., Wiseman, J.M. y Garrard, W.T. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 127.
- Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Phillips, D.M.P., Johns, E.W. y Murray, K. (1965) *Nature*, 205, 1315.
- Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Goodman, H., Rattle, H.W.E. y Stephens, R.M. (1967) *J. Mol. Biol.* 29, 507.
- Bradbury, E.M., Cary, P.D. y Rattle, H.W.E. (1973) *Nature* 241, 123.
- Bradbury, E.M., Cary, P.D., Champagne, G.E., Crane-Robinson, C., Danby, S.E., Rattle, H.W.E., Boublick, M., Palau, J. y Avilés, J.F. (1975a) *Eur. J. Biochem.* 52, 605.
- Bradbury, E.M., Champagne, G.E., Danby, S.E., Hartman, P.G. y Riches, P.L. (1975b) *Eur. J. Biochem.* 57, 521.
- Bradley, D. y Lifson, S. (1968) "Molecular Associations in Biology" pp. 261-270. Ed. B. Pullman, Academic Press, New York.
- Bram, S. (1971) *J. Mol. Biol.* 58, 277-288.

- Briand, G., Kniecik, D., Sautiere, P., Wouters, D., Borie-Loy, O., Biserte, G., Mazen, A. y Champagne, M. (1980) FEBS Letters 112, 147.
- Britten, R.J., Graham, D.E. y Neufeld, B.R. (1974) Methods in Enzymology 29, 363-418.
- Bunville, L.G., Geiduschek, E.P., Rawitscher, M.A. y Sturtevant, J.M. (1965) Biopolymers, 3, 213.
- Burnotte, J., Stollar, B.D. y Fasman, G.D. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 155, 428-435.
- Bustin, M. y Cole, R.D. (1969) J. Biol. Chem. 244, 5291.
- Bustin, M. (1971) Biochim. Biophys. Acta 251, 172.
- Campbell, A.M. y Cotter, R.I. (1978) Nucleic Acids Res. 4, 2877.
- Carpenter, B.G., Baldwin, J.P., Bradbury, E.M. e Ibel, K. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 1739.
- Carrol, D. (1971) Anal. Biochem. 44, 496-502.
- Carrol, D. (1972) Biochemistry 11, 421.
- Cohen, P. y Kidson, C. (1968) J. Mol. Biol. 35, 241.
- Cole, R.D., Lawson, G.M. y Hsiang, M.W. (1975) "Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. XLIII, pp. 253-263.
- Cole, R.D. (1977) "The Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus" (Ts'ao, P.O.P., Ed.) Vol. I, pp. 93-104, Amsterdam.
- Cowman, M.K. y Fasman, G.D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4759-4763.
- Cowman, M.K. y Fasman, G.D. (1980) Biochemistry 19, 532-541.
- Crane-Robinson, C., Danby, S.E., Bradbury, E.M., Garel, A., Kovacs, A. M., Champagne, M. y Daune, M. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 379.

- Crothers, D.M. y Zimm, B.H. (1964) J. Mol. Biol. 9, 1.
- Chalkley, R. y Hunter, C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1304.
- Champagne, M. y Mazen, A. (1967) C.R. Acad. Sci. Paris 265, 2100.
- Champagne, M., Mazen, A. y Wilhelm, X. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1261.
- Chapman, G.E., Hartman, P.G. y Bradbury, E.M. (1976) Eur. J. Biochem. 61, 69.
- Chapman, G.E., Hartman, P.G., Cary, P.O., Bradbury, E.M. y Lee, D.R. (1978 a) Eur. J. Biochem. 86, 35.
- Chapman, G.E., Avilés, F.J., Crane-Robinson, C. y Bradbury, E.M. (1978 b) Eur. J. Biochem. 90, 287.
- Chatteraj, D.K., Gosule, L.G. y Schellman, J.A. (1978) J. Mol. Biol. 121, 327-337.
- Christen, P. y Riordan, J.F. (1968) Biochemistry 7, 1531.
- Christiansen, G. y Griffith, J. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 1837.
- Dávila, C., Charles, P. y Ledoux, L. (1965) J. Chromatog. 19, 382.
- Delange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. y Bonner, J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 319.
- Delange, R.J., Hooper, J.A. y Smith, E.L. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 882.
- De Voe, H. y Tinoco, I. (1962) J. Mol. Biol. 4, 500.
- De Voe, H. (1965) J. Chem. Phys. 43, 3199.
- De Voe, H. (1969) "Structure and Stability of Biological Macromolecules" Eds. S.N. Timasheff y G.D. Fasman, Marcel Dekber, New York.
- Dicks, C. y Johns, E.W. (1969) Comp. Biochem. Physiol. 31, 529.

- Dolby, T.W., Ajiro, K., Borun, T.W., Gilmour, R.S., Zweidler, A., Cohen, L., Miller, P. y Nicolini, C. (1979) *Biochemistry* 18, 1333-1344.
- Donovan, J.W. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1961.
- Du Praw, E.J. (1966) *Nature* 209, 577.
- Fasman, G.D., Schaffhausen, B., Goldsmith, L. y Adler, A. (1970) *Biochemistry* 9, 2814-2822.
- Fasman, G.D., Valenzuela, M.S. y Adler, A.J. (1971) *Biochemistry* 10, 3795-3801.
- Fasman, G.D. (1978) *Methods in Cell Biol.* Vol. XVIII, Eds. G. Stein, S. Stein y L.J. Kleinsmith. pp. 327 Acad. Press., New York.
- Felsenfeld, G. y Hirschman, S.Z. (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 407.
- Felsenfeld, G. *Nature* 271, 115.
- Finch, J.T. y Klug, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1897.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushiton, B., Levitt, M. y Klug, A. (1977) *Nature* 269, 29.
- Fixman, M. y Freire, J.J. (1977) *Biopolymers* 16, 2693-2704.
- Franco, L., Montero, F., Navlet, J.M., Perera, J. y Rojo, M.C. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 53.
- Franco, L., Montero, F. y Rodriguez-Molina, J.J. (1977) *FEBS Letters* 78, 317.
- Fujimoto, M., Kalinski, A., Pritchard, A.E., Kowalski, D. y Laskowski, M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 7405.
- Garel, A., Mazen, A., Champagne, M., Sautiers, P., Kniecik, D., Loy, O. y Biserte, G. (1975) *FEBS Letters* 50, 195.
- Gaubatz, J., Hardison, R., Murphy, J., Eichner, M.E. y Chalkley, R. (1977) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 265.

- ≈ Giaccotti, V., Russo, E., Cosini, S., Cary, P.D. y Crane-Robinson, C. (1981) *Biochem. J.* 197, 655.
- Glotov, B.O., Nikolaev, L.G., Kurochkin, S.N. y Severin, E.S. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 1065-1082.
- Glotov, B.A., Itkes, A.V., Nicolaiev, L.G. y Severin, E.S. (1978) *FEBS Letters* 91, 149.
- Glotov, B.O., Nikolaev, L.G. y Severin, E.S. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 2587-2604.
- Goodwin, D.C., y Brahm, J. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 835-850.
- Gotoh, O., Wada, A. y Yabuki, S. (1979) *Biopolymers*, 18, 805-824.
- Guillot, J.G., Pezolet, M. y Pallotta, D. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 491, 423
- Hardison, R.C., Zeitler, D.P., Murphy, J.M. y Chalkley, R. (1977) *Cell* 12, 417.
- Hartman, P.G., Chapman, G.E., Moss, T. y Bradbury, E.M. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 45.
- Hayashi, K., Hofstaetter, T. y Yakuwa, N. (1978) *Biochemistry* 17, 1880-1883.
- Haynes, M., Garrett, R.A. y Gratzner, W.B. (1970) *Biochemistry* 9, 4410-4416.
- Henson, P. y Walker, I.O. (1970) *Eur. J. Biochem.* 14, 345.
- Henson, P. y Walker, I.O. (1971) *Eur. J. Biochem.* 22, 1.
- Hjeltn, R.P. y Huang, R.C.C. (1974) *Biochemistry* 13, 5275-5283.
- Hozier, J., Renz, M. y Nehls, P. (1977) *Chromosoma* 62, 301.
- Huang, R.C.C., Bonner, J. y Murray, K. (1964) *J. Mol. Biol.* 8, 54.

- Hurley, C.K. y Stout, J.T. (1980) *Biochemistry* 19, 410.
- Hwan, J.C., Leffak, I.M., Li, H.J., Huang, P.C., y Mura, C. (1975) *Biochemistry*, 14, 1390.
- Iovcheva, Ch. y Dessev, G.N. (1980) *Molec. Biol. Rep.* 6, 21-25.
- Isenberg, I. (1976) *Search and Discovery*, un volumen dedicado a Albert Szent-Gyorgy (Kaminer, B., Ed.) Academic Press, New York.
- Isenberg, I. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* 48, 159.
- Ishimi, Y., Yasuda, H., Ohba, Y. y Yamada, M. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8249-8251.
- Ising, S. (1925) *J. Chem. Phys.* 40, 3705.
- Iwai, K., Hayashi, H. e Ishikawa, K. (1972) *J. Biochem.* 72, 357.
- Jirgensons, B. y Hnilica, L.S. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 109, 241.
- Jones, G.M.T., Rall, S.C. y Cole, R.D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2548.
- Jordan, C.F., Lerman, L.S. y Venable, J.H. (1972) *Nature New Biol.* 236, 67-70.
- Kawashima, S., Inoue, S., y Ando, T. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 186, 145.
- Kay, E.R., Simmons, N.S. y Dounce, A.L. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* 74, 1724.
- Knippers, R., Otto, B. y Böhme, R. (1978) *Nucleic Acids Res.* 6, 2113-2131.
- Kornberg, R.D. (1974) *Science* 184, 868-871.
- Krauer, H. y Sturtevant J.M. (1968) *Biopolymers*, 6, 491.
- Latt, S.A. y Sober, H.A. (1967) *Biochemistry* 6, 575-584.
- Lawrence, J.J., Berne, L., Ouvrier-Buffet, J.L. y Piette, L.H. (1980)

- Eur. J. Biochem. 107, 263-269.
- Leffak, I.M., Hwan, J.C., Li, H.J. y Shih, T.Y. (1974) Biochemistry 13, 1116.
  - Lang, M. y Felsenfeld, G. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56, 1325.
  - Lerman, L.S. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8, 1886.
  - Lerman, L.S. (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 59-73.
  - Lewis, P.N. y Bradbury, E.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 336, 153.
  - Lewis, E.A., De Buysere, M.S. y Ress, A.W. (1976) Biochemistry 15, 186.
  - Li, H.J. y Bonner, J. (1971) Biochemistry 10, 1461.
  - Li, H.J., Chaug, C. y Weiskopf, M. (1973) Biochemistry 12, 1763.
  - Lifson, S. y Roig, A. (1961) J. Chem. Phys. 34, 1963.
  - Lifson, S. (1964) J. Chem. Phys. 40, 3705.
  - Lilley, D.M.J. y Tatchell, K. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 2039-2055.
  - Litan, A. y Lifson, S. (1965) J. Chem. Phys. 42, 2528.
  - Littau, V.C., Burdick, C.J., Allfrey, V.G. y Mirsky, A.Z. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1204.
  - Liu, S.Y. y Riggs, A.D. (1972) J. Mol. Biol. 72, 671-690.
  - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farrand, A.L. y Randall, P.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
  - Lyubchenko, Yu.L., Vologodskii, A.V. y Frank-Kametskii, M.D. (1978) Nature, 271, 28-31.
  - Lyubchenko, Yu. L., Kalambet, Yu.A., Lyamichev, V.I. y Borovik, A.S. (1982) Nucleic Acids Res. 10, 1867-1876.
  - Mandel, R. y Fasman, G.D. (1976) Biochemistry 15, 3122-3130.

- Mandel, R. y Fasman, D.G. (1976b) *Nucleic Acids Res.* 3, 1839-1855.
- Mandel, R. y Fasman, G.D. (1977) " Organization and Expression of the Eukariotic Genome" Eds. E.M. Bradbury y K. Javaherian, Academic Press.
- Mariatis, T. (1971) Thesis, Vanderbilt Univ.
- Manning, G.S. (1979) *Biopolymers*, 18 , 2929-2942.
- Marion, C. y Roux, B. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5 , 4431.
- Marmur, J. y Doty, P. (1972) *J. Mol. Biol.* 5, 109.
- Marzluff, W.F., Sanders, L.A., Miller, D.M. y McCarty, K.S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 2026.
- McCleary, A.R. y Fasman, G.D. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 603-614.
- McGhee, J.D. y Von Hippel, P.H. (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 469-489.
- McGhee, J.D. (1976) *Biopolymers* 15, 1345-1375.
- McGhee, J.D., Rou, D.C., Charney, E. y Felsenfeld, G. (1980) *Cell* 22, 87.
- McLeod, A.R., Wong, N.C.W. y Dixon, G.H. (1977) *Eur. J. Biochem.* 78, 281.
- Mingót, F. y Dávila, C.A. (1974) *J. Chromatog.* 94, 75.
- Morán, F., García, M., Franco, L. y Montero, F. (1982) Manuscrito en preparación.
- Müller, W. y Crothers, D.M. (1968) *J. Mol. Biol.* 35, 251-290.
- Müller, V., Zentgraf, H., Eicken, I. y Keller, W. (1978) *Science* 201, 406-415.
- Munro, H.N. y Fleck, A. (1966) "Methods of Biochemical Analysis" Interscience Publishers 14, 159.
- Neumann, E. y Ackermann, T. (1967) *J. Phys. Chem.* 71, 2377.

- Nieto-Sandoval, R.M. (1982), Tesis Doctoral, Fac. de CC Biológicas, U. Complutense.
- Noll, M. (1974) *Nature* 251, 249.
- Noll, M. y Kornberg, R.D. (1977) *J. Mol. Biol.* 109, 393.
- Ogawa, Y., Quagliariotti, G., Jordan, J., Taylor, C.W., Starbuck, W.C. y Busch, H. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4387.
- Ohlenbusch, H., Olivera, B.B., Tuan, D. y Davison, N. (1967) *J. Mol. Biol.* 25, 299.
- Olins, D.E., Olins, A.L. y Von Hippel, P.H. (1967) *J. Mol. Biol.* 24, 157.
- Olins, D.E., Olins, A.L. y Von Hippel, P.H. (1967b) *J. Mol. Biol.* 33, 265.
- Olins, D.E. (1969) *J. Mol. Biol.* 43, 439-460.
- Olins, D.E. y Olins, A.L. (1971) *J. Mol. Biol.* 57, 437-455.
- Olins, A.L. y Olins, D.E. (1973) *Science* 183, 330.
- Olins, D.E. y Wright, E.B. (1973) *J. Cell. Biol.* 59, 304.
- Olins, A.L. y Olins, D.E. (1974) *Biochemistry* 13, 330-332.
- Olins, D.E., Bryan, P.N., Harrington, R.E., Hill, W.E. y Olins, A.L. (1977a) *Nucleic Acids Res.* 4, 1911-1931.
- Olins, A.L., Breillatt, J.P., Carlson, R.D., Senior, M.B., Wright, E.B. y Olins, D.E. (1977b) "Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus", Ed. Ts'o, P.O.P.. Vol 1, pp 211-237, Elsevier, North Holland, Amsterdam.
- Olson, M.O.J., Jordan, J. y Busch, H. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 50.
- Ong, E.C., Snell, Ch. y Fasman, G.D. (1976) *Biochemistry* 15, 468-476.
- Palau, J., Ruiz-Carrillo, A. y Subirana, J.A. (1969) *Eur. J. Biochem.* 7, 209.

- Palau, J., Climent, F., Aviles, F.J., Morros, A. y Soliva, M (1977) Biochem. Biophys. Acta 476, 108-121.
- Pardon, J.J., Wilkins, M.H.F. y Richard, B.M. (1967) Nature 215, 508.
- Phillips, D.M. (1971) "Histones and Nucleohistones", Plenum Press, - London.
- Polacow, I. y Simpson, R.J. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 202.
- Poland, D.C. y Scheraga, H.A. (1965) J. Chem. Phys. 43, 2071-2074.
- Poland, D.C. y Scheraga, H.A. (1970) "Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers", Academic Press, New York.
- Privalov, P.L., Kafiani, K.A. y Monaselidze, D.R. (1965) Biophysics 10, 433.
- 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, 7175-7190.
- Ramsay-Shaw, B., Corden, B., Sahasrabudhe, C.G. y Van Holde, K.E. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 1195-1198.
- Rawitscher, M.A., Ross, P.D. y Sturtevant, J.M. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85, 1915.
- Reeck, G.R., Simpson, R.T. y Soler, H.A. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2317.
- Renz, M. y Day, L.A. (1976) Biochemistry 15, 3220-3228.
- Renz, M., Nehls, P. y Hozier, J. (1977) Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 42, 245-252.
- Renz, M., Nehls, P. y Hozier, J.P. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1879.

- Ris, H. (1975) "The Structure and Function of Chromatin" CIBA Foundation 28, 7, ASP (Elsevier-Excerpta Medice-North Holland), Amsterdam.
- Rodriguez-Alfageme, G., Zweidler, A. Mahowald, A. y Cohen, L.H. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3729.
- Sautiere, P., Tyron, D., Laine, B., Mizon, J., Ruffin, P. y Biserte, G. (1974) Eur. J. Biochem. 41, 563.
- Schaffner, W., Kunz, G., Daetwyler, H., Telford, J., Smith, H.O. y Birnstiel, M.L. (1978) Cell 14, 655.
- Scheffler, I.E. y Sturtevant, J.M. (1969) J. Mol. Biol. 42, 577-580.
- Scheffler, I.E., Elson, E.L. y Baldwin, R.L. (1970) J. Mol. Biol. 48, 145-171.
- Schellman, J.A. (1974) Israel J. Chem. 12, 219-238.
- Schmith, K.S. y Ramanathan, B. (1980) J. Theor. Biol. 83, 297.
- Schwartz, A.M. y Fasman, G.D. (1979) Biopolymers 18, 1045-1063.
- Shapiro, J.T., Leng, M. y Felsenfeld, G. (1969) Biochemistry 8, 3219-3232.
- Shaw, B.R., Herman, T.M., Kovacic, R.T., Beandreau, G.S. y Van Holde, K.E. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 505.
- Shih, T.Y. y Bonner, J. (1970) J. Mol. Biol. 48, 469.
- Shih, T.Y. y Fasman, G.D. (1970) J. Mol. Biol. 52, 125.
- Shih, J. y Fasman, G.D. (1971) Biochemistry 10, 1675.
- Shousun, C.S. y Jernigan, R.L. (1979) Biopolymers, 18, 83-100.
- Simpson, R.T. (1974 a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2743.
- Simpson, R.T. (1974 b) "Current Topics in Biochemistry" (Anfinsen, C. B. y Schechter, A.N., Ed.) pp. 135, Academic Press, New York.

- Simpson, R.T. (1978) *Biochemistry* 17, 5525.
- Simpson, R.T. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 10123-10127.
- Singer, D.S. y Singer, M.F. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 2531.
- Singer, D.S. y Singer, M.F. (1978) *Biochemistry* 17, 2086-2095.
- Sipski, M.L. y Wagner, T.E. (1977) *Biopolymers* 16, 573-582.
- Smerdon, M.J. e Isenberg, I. (1976) *Biochemistry* 15, 4233.
- Sobell, H.M. y Jain, S.C. (1972) *J. Mol. Biol.* 68, 21-34.
- Solinner-Webb, B. y Felsenfeld, G. (1975) *Biochemistry* 9, 3103.
- Sommer, L. y Chalkley, R. (1974) *Biochemistry* 13, 1025.
- Steiner, R.F. y Kitzinger, C. (1962) *Nature*, 194, 1172.
- Strickland, W.N., Schaller, H., Strickland, M. y Von Holt, C. (1976) *FEBS Letters* 66, 322.
- Strickland, W.N., Strickland, M., Groot, P.C., Von Holt, C. y Wittmann-Liebold, B. (1980 a) *Eur. J. Biochem.* 104, 559.
- Strickland, W.N., Strickland, M., Brandt, W.F., Von Holt, C., Lehmann, A. y Wittmann-Liebold, B. (1980 b) *Eur. J. Biochem.* 104, 567.
- Taillandier, E., Taboury, J., Liquier, J., Gadenne, M.C., Champagne, M. y Brahms, J. (1979) *Biopolymers*, 18, 1877-1888.
- Tatchell, K. y Van Holde, K.E. (1977) *Biochemistry* 16, 5295-5303.
- Thoma, F., Koller, T.H. y Klug, A. (1979) *J. Cell Biol.* 83, 403.
- Thomas, J.D. y Kornberg, R.D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2626.
- Tiktopulo, E.I., Privalov, P.L., Odintsova, T.I., Ermokhina, T.M., Krashennnikov, I.A., Avilés, F.X., Cary, P.O. y Crane-Robinson, C. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 327-331.

- Tinoco, I. (1960) J. Amer. Chem. Soc. 82, 4785.
- Tinoco, I. (1961) J. Amer. Chem. Soc. 83, 5047.
- Tsai, Y.H., Ansevin, A.T. y Hnilica, L.S. (1975) Biochemistry 14, 1257-1265.
- Tsuboi, M., Matsuo, K. y Ts'o, P.O.P. (1966) J. Mol. Biol. 15, 256.
- Tunis-Schneider, M.J.B. y Maestre, M.F. (1967) J. Mol. Biol. 52, 589.
- Van Holde, K.E., Sahasrabudde, C.G. y Shaw, B.R. (1974) Nucleic Acids Res. 1, 1579-1585.
- Van Holde, K.E., Allen, J.R., Tatchell, K., Weischet, W.O. y Lohr, D. (1980) Biophys. J. 10, 271-281.
- Varshevky, A.J., Bakayev, V.V. y Georgiev, G.P. (1976) Nucleic Acids Res. 3, 477-492.
- Vogel, F. y Singer, M.F. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2597-2600.
- Vogel, T. y Singer, M.F. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2334-2338.
- Vollenweider, H.J., Sogo, J.M. y Koller, T.H. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 83.
- Vologodskii, A. V. y Frank-Kamenetskii, M.D. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 2547-2556.
- Wada, A., Yabuki, S. y Husimi, Y. (1980) Crit. Rev. Biochem. 9, 87-144.
- Wartell, R.M., Larson, J.E. y Wells, R.D. (1974) J. Biol. Chem. 101, 6719-6731.
- Weischet, W.O., Tatchell, K., Van Holde, K.E. y Klump, H. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 139-160.
- Welch, S.L. y Cole, R.D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 662-665.

- Whitlock, J.P., Jr. y Simpson, R.T. (1976) *Biochemistry* 15, 3307.
- Whitlock, J.P. y Simpson, R.T. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3, 2255-2266.
- Wilkins, M.H.F., Zubay, G., y Wilson, H.R. (1959) *J. Mol. Biol.* 1, 179.
- Williams, R.E. y Selgy, V.L. (1973) *FEBS Letters* 33, 1907.
- Woodbury, Ch.P. (1981) *Biopolymers*, 20, 2225-2241.
- Yaguchi, M., Roy, C. y Seligy, V.L. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1400.
- Yeoman, L.C., Olson, W.O., Sugano, N., Jordan, J.J., Taylor, C.W., Starbuck, W.G. y Busch, H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6018.
- Yu, S.S., Li, H.J. y Shih, T.Y. (1976) *Biochemistry* 15, 2034.
- Zama, M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 366, 124.
- Zasedatelev, A.S., Gurskii, G.V., Zimmer, Ch., y Thrum, H. (1974) *Mol. Biol. Rep.* 1, 337-342.
- Zimm, B.H. (1960) *J. Chem. Phys.* 33, 1349.
- Zubay, G. y Wilkins, M.H.F. (1962) *J. Mol. Biol.* 4, 444.

