

Ri. 18683083.

R H25A

UNIVERSITAT DE VALENCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUIMICA

I BIOLOGIA MOLECULAR

"SISTEMAS ENZIMATICOS
IMPLICADOS EN EL GRADO DE
ACETILACION DE LAS HISTONAS EN
Saccharomyces cerevisiae"



Memoria presentada por GERARDO
LOPEZ RODAS para optar al
grado de Doctor en Ciencias
Químicas.

UMI Number: U603123

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603123

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

FACULTAD QUIMICA
BIBLIOTECA

Cat.

285

Encuad.

Ent. 4251 Q

Mat. 577.1(043)

Sell.

Test.

T.D.Q

Top.

323



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
I BIOLOGIA MOLECULAR

D. Vicente TORDERA DONDERIS, Doctor en Ciències Biològiques, Professor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICA : Que, D. Gerardo LOPEZ RODAS ha realitzat, sota la direcció en este Departament, el treball de investigació que presenta amb el títol de "Sistemes enzimàtics implicats en el grau de acetilació de les histones en Saccharomyces cerevisiae".

València, 15 de Setembre de 1.987

Fdo: Vicente Tordera Donderis.

"...La investigación científica se basa en un cierto grado de tensión, la tensión entre lo que ya se ha logrado y lo que todavía no se ha conseguido; o el vacío entre lo que se conoce y lo que se debería conocer. Esta tensión es inherente al ser humano y por consiguiente es indispensable al bienestar mental."

FRANKL, V.E. "Man's search for Meaning".

Ed. Hender.

"Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La existencia de una sola persona, aunque estuviera toda ella dedicada al estudio de la vida, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta...por lo tanto este conocimiento sólo podrá ser desarrollado a lo largo de sucesivas edades. Llegará una época en la que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoráramos cosas que para ellos son tan claras...Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado todo recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar...La naturaleza no revela sus misterios de una vez para siempre."

SENECA, Cuestiones Naturales.

Libro 7, Siglo I

A mis padres

A Pilar

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València, bajo la dirección del Dr. Vicente TORDERA DONDERIS, a quien quiero expresar mi agradecimiento por sus consejos y orientación, así como por su constante ayuda durante todas las fases del presente trabajo.

También quiero expresar mi gratitud a todos los miembros del Departamento, en especial a los compañeros de mi grupo de trabajo: Manuel Mateo Sánchez del Pino, Ramón Sendra Pérez y M^a Luisa Salvador Alcober, por su colaboración y apoyo, creando un agradable y estimulante ambiente, imprescindible para la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

- bisacrilamida : N,N'-metilén-bis-acrilamida.
- BSA : Seroalbúmina bovina.
- CECT : Colección española de cultivos tipo.
- CM : Carboximetilo.
- DEAE : Dietilaminoetilo.
- dimetil-POPOP : Dimetilo de 2,2'-p-fenilén-bis-(5-feniloxazol).
- DNasa : Desoxirribonucleasa.
- D.O.I. : Densidad óptica integrada.
- EDTA : Acido etiléndiamino-tetraacético (sal disódica).
- HAT : Histona acetiltransferasa.
- HD : Histona desacetilasa.
- HMG : Proteínas no histonas de alta movilidad electroforética.
- LMG : Proteínas no histonas de baja movilidad electroforética.
- MES : Acido 2-(N-morfolín)-etansulfónico.
- MNasa : Nucleasa de micrococo.
- pb : Pares de bases.
- PEG : Polietilenglicol.
- PMSF : Fluoruro de fenilmetán-sulfonilo.
- PPO : 2,5-difeniloxazol.
- p/v : relación peso/volumen.

-PVP : Polivinil pirrolidona.
-RNasa : Ribonucleasa.
-SDS : Dodecil sulfato sódico.
-TAU : Tritón-ácido acético-urea.
-TCA : Acido tricloroacético.
-TEMED : N,N,N',N'-tetrametil etilén diamino.
-tris : 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol.
-v/v : relación volumen/volumen.

INDICE

INTRODUCCION

	Pág.
1) CROMATINA.	1
1.1.- Composición de la cromatina.	1
1.2.- Niveles de organización de la cromatina.	4
1.2.1.- Organización del nucleosoma.	5
1.2.2.- Estructuras de orden superior.	7
1.3.- Cromatina activa.	10
1.3.1.- Sensibilidad a nucleasas.	10
1.3.2.- Posicionamiento de nucleosomas.	14
1.3.3.- Presencia de proteínas no histonas y de variantes de histonas.	15
2) CROMATINA DE LEVADURA.	18
3) MODIFICACIONES POSTSINTETICAS EN LAS HISTONAS.	21
3.1.- Acetilación.	22
3.2.- Otras modificaciones.	25
3.2.1.- Fosforilación.	25
3.2.2.- Metilación.	26
3.2.3.- Poli-ADP-ribosilación.	27
3.2.4.- Ubiquitinación.	28
4) CONSECUENCIAS ESTRUCTURALES Y/O FUNCIONALES DE LA ACETILACION DE LAS HISTONAS.	30
4.1.- Efecto de la acetilación en la conformación y estabilidad de los nucleosomas y en la estructura de la cromatina.	30
4.2.- Sensibilidad de las regiones hiperacetiladas a la digestión con nucleasas.	34
4.3.- Relación de la actividad transcripcional con la acetilación de histonas.	36
4.4.- Acetilación de histonas y ensamblaje de la cromatina durante la replicación del DNA.	40
4.5.- Acetilación de las histonas durante la espermatogénesis.	42

	Pág.
5) ENZIMAS IMPLICADOS EN LA ACETILACION Y DESACETILACION DE LAS HISTONAS.	43
5.1.- Histona acetiltransferasa.	44
5.2.- Histona desacetilasa.	52
6) OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO.	54

MATERIALES Y METODOS

I) MATERIALES.	56
1) PRODUCTOS QUIMICOS.	56
2) APARATOS.	58
3) MATERIAL BIOLÓGICO.	58
II) PROTOCOLO EXPERIMENTAL.	59
1) MEDIOS DE CULTIVO.	59
2) PROCEDIMIENTOS DE LISIS CELULAR PARA LA OBTENCION DE LA FRACCION PROTEICA.	60
2.1.- Agitación en tampón hipotónico con perlas de vidrio.	60
2.2.- Obtención de protoplastos con Novozym.	61
2.3.- Obtención de núcleos.	62
3) OBTENCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS CRUDAS HAT.	64
3.1.- Precipitación con acetona.	65
3.2.- Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y fraccionamiento con diferentes porcentajes de saturación.	65
3.3.- Precipitación diferencial con el 10 y el 20% de polietilenglicol 8000.	66
3.4.- Ultracentrifugación en presencia de NaCl 0.5 M.	68
4) PURIFICACION DE ACTIVIDADES HAT.	68
4.1.- Cromatografía de adsorción en hidroxipatito.	69

	Pág.
4.2.- Cromatografías de intercambio iónico.	69
4.2.1.- Cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sepharose.	69
4.2.2.- Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose.	70
4.3.- Cromatografía de afinidad en DNA-celulosa.	71
4.4.- Cromatografía de exclusión molecular en Ultrogel AcA34.	71
4.5.- Cromatoenfoque.	72
5) ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA HAT.	72
5.1.- Procedimiento del ensayo enzimático.	72
5.2.- Determinación de las condiciones de ensayo.	74
5.3.- Inhibición de la actividad enzimática por DNA.	75
6) PRODUCCION DE RETICULOCITOS MEDIANTE TRATAMIENTO CON FENILHIDRAZINA.	76
7) EXTRACCION DE HISTONAS MARCADAS RADIATIVAMENTE CON [³H]ACETATO SODICO.	76
8) OBTENCION DE HISTONAS.	77
8.1.- Extracción de histonas de eritrocito.	78
8.2.- Extracción de histonas de levadura.	79
9) OBTENCION DE HMG's.	81
9.1.- HMG de eritrocito.	81
9.2.- HMG de levadura.	82
10) ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA HD.	83
11) OBTENCION DE MONONUCLEOSOMAS Y OLIGONUCLEOSOMAS POR DIGESTION CON NUCLEASA DE MICROCOCCO.	84
12) EXTRACCION DE DNA.	86
13) ELECTROFORESIS EN AGAROSA.	87

	Pág.
14) ELECTROFORESIS Y TRATAMIENTO FLUOROGRAFICO DE LAS HISTONAS.	88
14.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.	89
14.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-TAU.	90
14.3.- Tratamiento fluorográfico de las histonas marcadas.	91
15) TECNICAS ANALITICAS.	92
15.1.- Valoración de DNA.	92
15.2.- Valoración de proteínas.	92

RESULTADOS Y DISCUSION

1) PROCEDIMIENTOS DE LISIS CELULAR.	94
2) OBTENCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS CRUDAS HAT.	97
2.1.- Precipitación con acetona.	99
2.2.- Precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ y fraccionamiento con distintos porcentajes de saturación.	99
2.3.- Precipitación diferencial con el 10 y el 20% de PEG.	103
2.4.- Ultracentrifugación en presencia de NaCl.	106
3) PURIFICACION DE HAT MEDIANTE CROMATOGRAFIAS DE ADSORCION, INTERCAMBIO IONICO Y AFINIDAD.	108
3.1.- Cromatografía de adsorción en hidroxapatito.	108
3.2.- Cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sepharose CL-6B.	109
3.3.- Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose CL-6B.	110
3.4.- Cromatografía de afinidad en DNA-celulosa.	112

	Pág.
4) DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE ENSAYO Y DE OBTENCION DEL MAXIMO DE ACTIVIDAD HAT EN LA CURVA DE CRECIMIENTO.	113
4.1.- Determinación de las condiciones de ensayo.	114
4.1.1.- Variación de la actividad HAT con el pH.	114
4.1.2.- Variación de la actividad enzimática con la temperatura de incubación.	116
4.1.3.- Tiempo de incubación.	118
4.1.4.- Concentración de NH ₄ Cl en el medio de incubación.	120
4.2.- Acetilación química de histonas.	122
4.2.1.- Influencia de la concentración de NH ₄ Cl.	122
4.2.2.- Influencia del pH.	124
4.3.- Determinación del máximo de actividad HAT en la curva de crecimiento de levadura.	126
5) SEPARACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS HAT DE UN EXTRACTO PROTEICO PRECIPITADO CON SULFATO AMONICO.	128
5.1.- Actividad acetiltransferasa no retenida en DEAE-Sepharose.	130
5.2.- Actividad enzimática HAT A de DEAE-Sepharose.	132
5.3.- Actividades HAT BI y HAT BII.	141
5.4.- Especificidad frente a nucleosomas.	147
6) ELUCION EN DEAE-SEPHAROSE DE LOS PRECIPITADOS CON 10 Y 20% DE PEG.	152
6.1.- Precipitación con el 10% de PEG.	153
6.2.- Precipitación con el 20% de PEG.	156
6.3.- Especificidad frente a nucleosomas.	158
7) ULTRACENTRIFUGACION EN PRESENCIA DE NaCl 0.5 M.	163
7.1.- Actividades enzimáticas eluidas de la columna de DEAE-Sepharose.	163
7.1.1.- Actividad histona desacetilasa.	167

	Pág.
7.2.- Localización subcelular de las actividades HAT.	173
7.3.- Extracción de actividades HAT de la cromatina en ausencia o en presencia de 0.5 M de NH_4Cl .	180
7.4.- Especificidad frente a nucleosomas.	189
7.5.- Especificidad de las HAT frente a sustratos no histonas.	192
7.6.- Inhibición de las HAT por el DNA.	197

8) VARIACION DE LAS ACTIVIDADES HAT Y HD EN LA CURVA DE CRECIMIENTO DE LEVADURA.	201
--	-----

DISCUSION GENERAL	209
-------------------	-----

RESUMEN	220
---------	-----

BIBLIOGRAFIA	224
--------------	-----

INTRODUCCION



1) CROMATINA.

En los organismos eucarióticos, el DNA se encuentra empaquetado dentro del núcleo celular en una compleja estructura denominada cromatina. Esta estructura permite que el DNA eucariótico esté confinado en un volumen de diámetro 10^5 veces inferior al de su longitud total y, al mismo tiempo, pueda ser accesible a los diferentes enzimas implicados en los procesos de transmisión de su información.

Resulta por tanto evidente que para el estudio de los procesos y mecanismos de control de la expresión génica, sea preciso conocer la composición y estructura de la cromatina, esencialmente desde un aspecto dinámico que permita dar cuenta de las complejas funciones que posee la misma.

1.1.- Composición de la cromatina.

Los componentes de la cromatina son fundamentalmente DNA, RNA y proteínas, si bien la mayor parte del RNA no puede considerarse como un componente intrínseco de la misma, ya que se debe a la actividad transcripcional del DNA y su proporción varía por lo tanto en función de la actividad celular.

Las proteínas que forman parte de la cromatina se dividen en dos grupos: las histonas, proteínas muy básicas, de bajo peso

molecular y asociadas al DNA, que se encuentran en una proporción en peso de 1:1 respecto a éste y, por exclusión, las proteínas cromosomales no histonas (PCNH), grupo muy heterogéneo que incluye proteínas estructurales, reguladoras y los enzimas implicados en el metabolismo del DNA, las histonas y el resto de componentes de la cromatina.

Las histonas se han clasificado, atendiendo a su composición en aminoácidos, principalmente en cinco tipos mayoritarios: H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Bradbury, 1975). Esta composición se ha encontrado en todos los organismos eucarióticos superiores estudiados (Iseberg, 1979), si bien en los eucariontes inferiores esta norma es más flexible ya que, por ejemplo en el caso de la levadura, la histona H1 no parece estar presente (Franco *et al.*; 1974). En algunos organismos, existen además pequeñas variaciones en cuanto a esta composición, ya que se han encontrado histonas específicas de ciertos organismos o tejidos. Esto ocurre en eritrocito de ave con la histona H5 (Neelin *et al.*, 1964), la histona ϕ 1 en el esperma de algunos invertebrados marinos (Puigdomenech *et al.*, 1975) o la histona H1^o en determinados tejidos de mamíferos con baja proliferación celular (Smith *et al.*, 1984). Estas histonas específicas parecen sustituir parcialmente a la histona H1.

El estudio de la secuencia primaria de un gran número de histonas purificadas en diversos organismos ha puesto de manifiesto dos características principales en las mismas. Por un lado, que las histonas se encuentran entre las proteínas más altamente conservadas durante la evolución, destacando

especialmente el caso de las histonas H3 y H4 (Iseberg, 1979). Por otro lado, que las histonas poseen una distribución peculiar de sus aminoácidos en la cadena polipeptídica. En las histonas H2A, H2B, H3 y H4, existe una acumulación de residuos básicos, y de otros residuos desestabilizadores de la α -hélice, en la región N-terminal de la molécula (aproximadamente 1/3 de la misma), obligándole a adoptar una conformación estadística (DeLange y Smith, 1971; DeLange *et al.*, 1972). La región C-terminal posee una composición de aminoácidos más equilibrada, adoptando una estructura globular (Sautiere *et al.*, 1975; Chapman *et al.*, 1976). La estructura de las histonas H1, H5 y similares es distinta, con regiones básicas en los extremos de las moléculas donde se localizan preferentemente también los residuos desestabilizadores de la α -hélice (Cole, 1977), adoptando una conformación estadística (Johnson *et al.*, 1974) y, por otro lado una zona globular central (Hartman *et al.*, 1977).

Las proteínas cromosomales no histonas se definen como las proteínas que se aíslan junto con el DNA (excluidas las histonas) en la cromatina (Elgin y Weintraub, 1975). Entre las PCNH cabe destacar, por el intenso estudio a que están siendo sometidas, las proteínas HMG (High Mobility Group). Estas proteínas se caracterizan por su elevada movilidad electroforética (Goodwin *et al.*, 1973; Johns, 1982), y por una elevada proporción en residuos básicos y ácidos que llega a ser de más del 50% del total (Goodwin *et al.*, 1978; Walker, 1982). Las HMG han sido descritas en diversos organismos y tejidos, en eucariontes superiores (revisión de Mayes, 1982) mientras que en

eucariontes inferiores, como la levadura, la presencia de estas proteínas no está plenamente confirmada (Spiker *et al.*, 1978; Weber y Iseberg, 1980; Estruch *et al.*, 1980). Las proteínas HMG se han englobado en dos grupos principales que difieren en el peso molecular y en el tipo de interacción con el DNA. Un primer grupo son las HMG de alto peso molecular (alrededor de 26000) que incluye las HMG-1 y HMG-2 (Shooter *et al.*, 1974; Goodwin *et al.*, 1975; Walker *et al.*, 1980) y que parecen interaccionar con el DNA "linker" (revisión de Eink y Bustin, 1985), y un segundo grupo, las HMG de bajo peso molecular (alrededor de 10000), que incluye a las HMG-14 y HMG-17 (Walker *et al.*, 1979 a y b) y que podrían interaccionar con el DNA en el "core" nucleosomal (revisión de Eink y Bustin, 1985). Diversos autores han sugerido que estas proteínas podrían estar asociadas, en su conjunto, con la cromatina activa de los organismos eucariontes (revisión de Goodwin y Matthews, 1982).

1.2.- Niveles de organización de la cromatina.

En los últimos años se ha desarrollado un vertiginoso avance en el conocimiento de la estructura de la cromatina de organismos eucarióticos. Para dicho estudio se han utilizado diferentes e independientes procedimientos de investigación como son microscopía electrónica (Woodcock, 1973; Olins y Olins, 1974), estudios de digestión con nucleasas (Hewish y Burgoyne,

1973; Noll, 1974 a; Shaw et al., 1976) y diversas técnicas físicas y bioquímicas (Kornberg, 1975; Felsenfeld, 1978; Igo-Kemenes et al., 1982; McGhee y Felsenfeld, 1980). El conjunto de estos estudios ha llevado a proponer una estructura para la cromatina en la que dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y una copia de H1, organizan al DNA en una unidad regularmente repetida, representada generalmente a modo de cuentas de un collar, cuya unidad monomérica se denomina nucleosoma (Kornberg, 1974; Oudet et al., 1975).

1.2.1.- Organización del nucleosoma.

El nucleosoma está formado por el octámero de histonas (H2A, H2B, H3, H4)₂, por la histona H1, y por una longitud variable de DNA que oscila alrededor de los 200 pb. Mediante estudios de digestión con nucleasas se ha demostrado que en esta estructura no todo el DNA se encuentra igualmente asociado con las histonas. Así, a tiempos de digestión moderadamente largos, el tamaño del DNA disminuye, estabilizándose en unos 160 pb. Esta estructura, denominada por Simpson (1978) "cromatosoma", incluye a la histona H1. Al aumentar el tiempo de digestión el tamaño del DNA continúa reduciéndose hasta llegar a un punto más estable, de 146 pb, que contiene al octámero de histonas pero sin H1, denominado "core" nucleosomal (Lutter, 1979; Simpson y Kunzler, 1979; Bryan et al., 1979; Prunell et al., 1979).

Las observaciones iniciales realizadas mediante microscopía electrónica de las partículas "core" sugerían que éstas poseían forma esférica (Olins y Olins, 1974; Woodcock *et al.*, 1976) y que el DNA entraba y salía de la partícula por un mismo lugar (Olins *et al.*, 1977). Sin embargo resultados posteriores obtenidos por difracción de rayos X (Finch *et al.*, 1977; Richmond *et al.*, 1984) y dispersión de neutrones (Pardon *et al.*, 1977; Richard *et al.*, 1977) estaban más de acuerdo con una forma discoidal de unos 5.7 nm de altura por 11 nm de diámetro. El DNA nucleosomal, estabilizado por la presencia del octámero de histonas, describiría 1.75 vueltas de superhélice a izquierdas, mediante una curvatura del eje de su hélice, y la histona H1 interaccionaría con 20 pb adicionales de DNA. Los cromatosomas se encontrarían unidos entre sí por un DNA de tamaño variable, entre 10 y 100 pb, dependiendo del origen biológico de la cromatina estudiada, denominado DNA espaciador o DNA "linker" (revisión de Lilley y Pardon, 1979).

Numerosos autores han sustentado durante largo tiempo la idea de que las regiones N-terminal, altamente básicas, de las histonas eran los sitios primarios de interacción con el DNA y que la región globular central estaba implicada en las interacciones histona-histona (revisiones de Lilley y Pardon, 1979; y de Sures y Gallwitz, 1982). Sin embargo, en la actualidad, este modelo simplificado no está del todo confirmado ya que no concuerda con todos los resultados que se poseen. Así, por ejemplo, mediante estudios de digestión de nucleosomas con tripsina, que conduce a la eliminación preferente de las

regiones N-terminal de las histonas, se ha observado que la estructura que poseen los nucleosomas parece verse poco afectada por este tratamiento (Weintraub y Van Lente, 1974; Weintraub, 1975; Lilley y Tatchell, 1977; Grigoriev y Krashennnikov, 1982). Además de la influencia que puedan ejercer los residuos básicos, también se ha sugerido que podrían producirse interacciones secundarias mediante puentes de hidrógeno entre el enlace peptídico y las bases del DNA (Cary *et al.*, 1982). La interacción entre las histonas y el DNA parece pues ocurrir a través de varios dominios estructurales de aquélla.

1.2.2.- Estructuras de orden superior.

Los cromatosomas descritos por Simpson (1978), se encuentran separados entre sí por DNA espaciador adoptando el conjunto una estructura en zig-zag, a una fuerza iónica muy baja, con un diámetro de unos 10 nm, que recibe el nombre de nucleofilamento (Finch y Klug, 1976; Thoma *et al.*, 1979; Worcel *et al.*, 1981). Sin embargo, en núcleos en interfase, en cromosomas metafásicos, o si la fuerza iónica es incrementada, este nucleofilamento se encuentra más plegado formando una fibra compacta de apariencia irregular con un diámetro aproximado de 30 nm (Pooley *et al.*, 1974; Oudet *et al.*, 1975; Finch y Klug, 1976). La estructura de esta fibra debe poseer importantes implicaciones en el mecanismo de regulación transcripcional de

la cromatina. Así por ejemplo, la accesibilidad de diversas proteínas por el DNA, podría ser diferente en distintas regiones de la cromatina, dependiendo de la exacta estructura de la fibra de 30 nm.

El modelo propuesto por diversos autores (Finch y Klug, 1976; Carpenter et al., 1976) consiste en el enrollamiento del nucleofilamento de 10 nm sobre sí mismo, para formar la hebra de 30 nm o solenoide. La histona H1 se dispondría posiblemente sobre el DNA "linker", en el interior del solenoide, uniendo entre sí a nucleosomas adyacentes (Butler y Thoma, 1980; Losa et al., 1984).

Se han utilizado diversas aproximaciones biofísicas y morfológicas para evaluar la densidad de nucleosomas por unidad de longitud a lo largo de la fibra de 30 nm. El número de nucleosomas que existe por vuelta aumenta desde 1 (se trataría por tanto de la estructura del nucleofilamento) a una fuerza iónica prácticamente cero (Sperling y Tardieu, 1976; Thoma et al., 1979), hasta alcanzar los 6-8 nucleosomas por vuelta a 60-100 mM en NaCl (Campbell et al., 1978; Suau et al., 1979; Engel et al., 1980; Ausio et al., 1984), o en presencia de concentraciones milimolares de Mg^{2+} (McGhee et al., 1983). Se han descrito sin embargo, algunos valores superiores, como ocurre por ejemplo en cromatina de eritrocito de pollo a 150 mM de NaCl en la que parece existir un promedio de 11.6 nucleosomas por vuelta (Woodcock et al., 1984) e incluso hasta 12 nucleosomas por vuelta en la cromatina de esperma de holoturia del género Thyone a 60 mM en NaCl (Williams et al., 1986).

Respecto a la disposición que poseen los nucleosomas en la fibra de 30 nm, Suau et al. (1979) han sugerido un modelo en el que los bordes cilíndricos de los nucleosomas estarían en contacto y por lo tanto, sus caras orientadas perpendicularmente al eje del solenoide. Sin embargo en algunas micrografías electrónicas se han observado líneas oblicuas o estrías de unos 11 nm a lo largo de la fibra de 30 nm (Rattner y Hamkalo, 1978 y 1979), lo que se ha atribuido a una disposición en la que los nucleosomas se empaquetarían lateralmente con el diámetro del cilindro nucleosomal paralelo al eje del solenoide (Mc Ghee et al., 1980; Suau et al., 1979; Widom y Klug, 1985).

Los estudios realizados para conocer las fuerzas que estabilizarían el filamento de 30 nm, han puesto de manifiesto que las características físicas y químicas de las regiones N-terminal de las histonas son tales que podrían no encontrarse unidas fuertemente al "core" nucleosomal, sino que poseerían la flexibilidad y libertad de movimientos suficientes como para poder interaccionar con el DNA de una partícula "core" adyacente (revisión de Reeves et al., 1984). McGhee et al. (1980 y 1983), han sugerido que el contacto internucleosomal mediado por interacciones iónicas entre el DNA y las histonas podría estabilizar la fibra solenoidal de 30 nm. Este modelo teórico ha sido sustentado por resultados obtenidos mediante rotura proteolítica de la region N-terminal de las histonas, ya que tras este tratamiento la fibra de 30 nm queda desorganizada, relajándose la estructura de la cromatina (Allen et al., 1982; Harborne y Allen, 1983).

1.3.- Cromatina activa.

En la actualidad se tienen aún pocos conocimientos sobre la exacta estructura de la pequeña fracción de la cromatina que se encuentra en estado transcripcionalmente activo.

Los resultados más interesantes en este campo proceden de la acción de diferentes nucleasas sobre la cromatina. Estos resultados, además de demostrar que la cromatina activa presenta una estructura en general más relajada que la inactiva, han permitido realizar estudios estructurales precisos sobre el posicionamiento de nucleosomas en estas zonas, así como la existencia de lugares especialmente sensibles a nucleasas en su interior.

1.3.1.- Sensibilidad a nucleasas.

Una gran variedad de endonucleasas con mayor o menor especificidad de secuencia, han sido utilizadas para investigar la estructura de la cromatina. En general, las regiones de la cromatina conteniendo genes activos, han sido definidas funcionalmente por su mayor sensibilidad a la digestión con dichos enzimas (McGhee y Felsenfeld, 1980; Igo-Kemenes *et al.*,

1982; Van Holde, 1985). Esta característica parece sugerir que los nucleosomas en los genes activos se encontrarían en una conformación alterada, más abierta, haciéndolos más accesibles a los enzimas que los de genes no activos (Weisbrod, 1982).

La primera de las endonucleasas utilizada en estos estudios fue la DNasa II. Este enzima produce cortes entre nucleosomas adyacentes, preferentemente sobre la cromatina activa (Marushige y Bonner, 1971), lo que ha permitido su fraccionamiento. La digestión suave con DNasa II solubiliza un material que puede ser fraccionado por precipitación con Mg^{2+} . La fracción soluble en Mg^{2+} se corresponde con regiones activas de la cromatina (Funderud y Haugli, 1977) observándose que estas regiones se encuentran organizadas en unidades repetitivas enriquecidas en proteínas cromosomales no histonas. Los nucleosomas liberados presentan además un coeficiente de sedimentación mayor que el de los nucleosomas de cromatina inactiva, lo que se ha atribuido a la presencia de RNA naciente (Gottesfeld y Butler, 1977). En la actualidad la DNasa II está siendo reemplazada en el estudio de la cromatina activa por otros enzimas debido a las dificultades que presenta en su utilización (Weisbrod, 1982; Igo-Kemenes et al., 1982).

Las endonucleasas que más se han utilizado han sido la DNasa I y la nucleasa de micrococo (MNasa). La DNasa I, que reconoce características estructurales internas de los nucleosomas, degrada preferentemente genes activos o potencialmente activos debido, posiblemente, a la presencia de una estructura nucleoprotéica alterada.

La DNasa I parece reconocer al menos tres aspectos, o niveles, diferenciales en la estructura de la cromatina activa. Weintraub y Groudine (1976) mostraron que el gen de la β -globina es preferentemente sensible a la digestión por DNasa I en núcleos de eritrocito de pollo, mientras que el mismo gen es resistente al enzima en núcleos de células de oviducto en donde el gen se encuentra inactivo. Del mismo modo se ha observado que el gen de la ovoalbúmina es sensible a la nucleasa en células de oviducto pero no en eritrocito (Garel y Axel, 1976). Este primer nivel, por tanto, estaría relacionado con la mayor sensibilidad intrínseca que poseen los genes en transcripción frente a este enzima.

Un segundo nivel de sensibilidad a la DNasa I ha sido definido por determinaciones del grado de digestión de los genes activos y de regiones no codificadoras adyacentes a éstos (Bellard *et al.*, 1980). En el caso de la α y β -globina en núcleos de eritrocito de pollo, Stadler *et al.* (1980 a) han observado que estos genes se encuentran en una estructura altamente sensible a la nucleasa, mientras que una región no codificadora adyacente de unos 20-50 Kpb se encuentra organizada en una estructura moderadamente sensible a la DNasa I. Se ha postulado que este efecto podría ser el resultado de cambios en la estructura del filamento de 30 nm de la cromatina, que alcanzarían regiones algo superiores a la que estrictamente codifica el gen (Stadler, 1980 b).

El tercer tipo de sensibilidad de la cromatina activa a la DNasa I fue descubierto por Wu *et al.* (1980) al digerir

suavemente con esta nucleasa núcleos de células de Drosophila melanogaster que habían sido sometidas previamente a un choque térmico. Como resultado de dicho choque, o de otros tipos de estrés, se produce la activación de ciertos genes denominados genes "heat-shock". En la proximidad de estos genes inducidos, en general cerca del extremo 5' de las regiones codificantes, aparecen sitios hipersensibles a la digestión con DNasa I. Estos sitios son un orden de magnitud más sensibles a la nucleasa que las regiones de genes activos o potencialmente activos, y unos dos ordenes de magnitud que las regiones inactivas.

La nucleasa de micrococo, que reconoce preferentemente el DNA espaciador, ha sido ampliamente utilizada para el estudio de la cromatina activa. Los primeros resultados obtenidos parecían indicar que este enzima no distinguía entre la estructura de genes activos e inactivos, cortando a ambos tipos de regiones en fragmentos multiméricos de 200 pb con la misma sensibilidad (Weintraub y Groudine, 1976; Garel y Axel, 1976; Gottesfeld y Melton, 1978). Sin embargo, posteriormente se demostró que la sensibilidad de los genes ribosomales de Xenopus laevis al corte por la MNasa era, al menos parcialmente, función del grado de transcripción (Reeves y Jones, 1976; Reeves, 1976, 1977). Una correlación similar se ha observado en digestiones de genes ribosomales de oocito durante la oogénesis (Reeves, 1978).

En su conjunto, estos resultados demuestran que la cromatina activa es, en general, más accesible que la inactiva, pero nada explican sobre las causas moleculares de esta peculiaridad.

1.3.2.- Posicionamiento de nucleosomas.

Una importante cuestión aún por resolver es si los nucleosomas pueden ocupar posiciones específicas en la cromatina, relativas a la secuencia del DNA (revisiones de Kornberg, 1981; de Igo-Kemenes *et al.*, 1982; y de Simpson, 1985).

Los resultados obtenidos hasta el presente, aunque contradictorios, apuntan en muchos casos, hacia un posicionamiento fijo de los nucleosomas (revisión de Eisenberg y Lucchesi, 1983), e incluso a una alteración de la organización nucleosomal dependiente de la actividad del gen en estudio (Lohr, 1983; Young y Carroll, 1983).

La posición fija de la estructura nucleosomal se ha relacionado, por una parte con las interacciones específicas entre la secuencia del DNA y las histonas (Mengeritoky y Trifonov, 1983), y por otra, con la presencia de proteínas específicas de unión al DNA que condicionarían la organización nucleosomal a partir de ellas y en ambas direcciones (Linxweiler y Hörtz, 1985). Esta segunda hipótesis podría relacionar entre sí la presencia de sitios hipersensibles y el posicionamiento de nucleosomas con la accesibilidad a proteínas o componentes reguladores sobre secuencias concretas del DNA.

1.3.3.- Presencia de proteínas no histonas y de variantes de histonas.

Diversos métodos bioquímicos de fraccionamiento, combinados con otras técnicas analíticas, han sido utilizados para identificar proteínas específicas que se asocian con secuencias de DNA particulares, que puedan estar implicadas en la regulación génica (revisiones de Dynan y Tjian, 1985; y de Pederson et al., 1986). Así por ejemplo, Levinger y Varshavsky (1982 a y b) han demostrado que la proteína no histona denominada D₁ (Mr ≈ 50000) de Drosophila melanogaster es un componente de la heterocromatina del DNA satélite, inactivo transcripcionalmente, que podría estar implicada en la formación de la estructura altamente compacta de esa heterocromatina.

Otro de los tipos de proteínas no histonas descrito por numerosos autores que parece estar asociado a la cromatina activa son las proteínas HMG (Reeves, 1984). La mayor parte de las evidencias experimentales, aunque no todas, sugieren que las HMG están presentes en una proporción superior en genes activos, o potencialmente activos, de la cromatina, pudiendo ser selectivamente liberadas por digestión con nucleasas (Johns, 1982). Weisbrod y Weintraub (1979) han comprobado que la extracción de las HMG de la cromatina de eritrocito de pollo elimina la especial sensibilidad del gen de la globina a la DNasa I. Al reconstituir la cromatina con las HMG extraídas, o

con HMG-14 y HMG-17 purificadas, esta sensibilidad reaparece (Weisbrod et al., 1980). Sin embargo, en el caso de la cromatina de cerebro de pollo, la eliminación y posterior reincorporación de las HMG-14 y 17 no confiere al gen de la globina de esta cromatina sensibilidad a dicha nucleasa (Weisbrod, 1982), lo cual parece indicar que la sensibilidad a la DNasa I no es producida solamente por estas proteínas. Asimismo, mediante estudios de reconstitución de cromatina de células Hela, no se ha encontrado correlación entre el contenido en HMG de los nucleosomas y su actividad transcripcional. Sin embargo, la mayor sensibilidad a la DNasa I de las regiones de la cromatina con proteínas HMG parece ser un fenómeno bastante generalizado, ya que se da también en cromatina de plantas (Spiker, 1983).

Se ha sugerido que estas proteínas pueden afectar a las regiones activas, no por cambios en la estructura nucleosomal, sino participando en un desplazamiento temporal de las histonas durante la transcripción (Labhart y Koller, 1982; Karpov et al., 1984).

La presencia de variantes y formas modificadas de las histonas del "core" puede asimismo ejercer una importante influencia sobre la estructura del nucleosoma y, en general, de la cromatina. Es importante quizás recordar que las histonas son proteínas cuyas secuencias de aminoácidos han sido fuertemente conservadas durante la evolución (revisión Wu et al., 1986). Si pocas han sido las variaciones que la naturaleza ha permitido a estas proteínas, se deduce que su estructura debe estar estrictamente acoplada a su(s) función(es).

En contraposición con este hecho, las histonas son una clase particularmente compleja de proteínas, con una amplia variedad de especies isoprotéicas y con una larga serie de modificaciones postsintéticas (que serán comentadas más adelante). Esta circunstancia podría explicarse por el hecho de que las histonas están implicadas en varios procesos fundamentales para la célula, como transcripción, regulación y replicación, así como porque la alteración de las secuencias de las histonas interactúa "in situ" con la cromatina, ya que el recambio de las histonas asociadas al DNA es extremadamente lento (revisión Wu et al., 1986).

Se han descrito variantes de las histonas H2A, H2B y H3, tanto en animales como en plantas, que se relacionan con sustituciones de determinados aminoácidos (Isemberg, 1979; Spiker, 1983). La proporción de ciertas variantes de histonas cambian en momentos específicos del ciclo celular de células de mamíferos (Wu y Bonner, 1982; Wu et al., 1982, 1983; Hatch et al., 1983), durante la embriogénesis del erizo de mar (Maxson et al., 1983) o durante las etapas del desarrollo de embriones de pollo (Urbam y Zweidler, 1983). Sin embargo la presencia de proporciones variables de las variantes de histonas en la cromatina activa no ha sido aún suficientemente investigada.



2) CROMATINA DE LEVADURA.

La levadura Saccharomyces cerevisiae es un eucariota inferior, con un núcleo perfectamente definido, y cuya cromatina presenta, en general, características estructurales y funcionales semejantes a la cromatina de los eucariotas superiores. La diferencia más notable consiste en que sus cromosomas metafásicos están menos condensados, durante el ciclo celular, que en los eucariotas superiores (Rozyn y Tonino, 1964; Gordon, 1977), lo que ha sido relacionado con la ausencia de la histona H1. Weber y Iseberg (1980) han sugerido que el papel de la histona H1 en la cromatina podría estar desempeñado en la levadura, al menos parcialmente, por una proteína cuya composición en aminoácidos es similar a las HMG, denominada por ello como HMGa.

Las histonas internas de levadura poseen una secuencia de aminoácidos (Brandt et al., 1980; Brandt y Von Holt, 1983) y una estructura terciaria similar a la de otros eucariotes (Mardian y Iseberg, 1978). La cromatina presenta asimismo una estructura nucleosomal típica (Lohr y Van Holde, 1975; Nelson et al., 1977) con un tamaño medio del DNA nucleosomal de unos 160 pb, oscilando entre 150 y 165 pb. Del mismo modo, se ha comprobado la existencia de "cores" nucleosomales de tamaño y estructura parecida a los de eucariotas superiores (Lohr et al., 1977). Mediante estudios de microscopía electrónica se ha mostrado la existencia de dos regiones estructuralmente diferentes (Rattner

et al., 1982). Mientras que el 90-95% de la cromatina presenta estructura nucleosomal, el resto aparece en una organización atípica, con una fibra de 0.3-0.4 nm de diámetro. Se han observado también al microscopio electrónico estructuras con un diámetro de unos 20-30 nm, separadas a veces por zonas carentes de nucleosomas, posiblemente unidas a proteínas (Rattner et al., 1982).

Mediante técnicas de dicroísmo circular (Franco y López-Braña, 1978) se ha podido concluir que, en general, la cromatina de levadura presenta una estructura menos compacta, lo cual estaría relacionado con la alta tasa de transcripción (al menos un 40% del DNA se transcribe a RNA) de este organismo (Hereford y Rosbash, 1977). Esta conformación relajada podría ser la causa de la elevada y uniforme tasa de digestión de esta cromatina por la DNasa I (Hereford y Rosbash, 1977). Se ha observado incluso que la cromatina de células en fase de crecimiento exponencial es digerida más rápidamente que la de células en fase estacionaria (Lohr y Ide, 1979), existiendo además una ligera preferencia de la DNasa I, bajo condiciones muy suaves de digestión, hacia genes que se encuentran transcribiéndose (Sledziewski y Young, 1982).

En la cromatina activa de levadura se dan asimismo las mismas características que en la de otros eucariotas. Se han encontrado, por ejemplo, sitios hipersensibles a la DNasa I localizados sobre secuencias promotoras y reguladoras en los extremos 5' de los genes activos (Sledziewski y Young, 1982; Bergman y Kramer, 1983; Proffit, 1985; Lohr, 1983, 1984; Struhl,

1984; Pérez-Ortín et al., 1986), y en algunos casos en los flancos 3' (Proffit, 1985; Nasmyth, 1982; Pérez-Ortín et al., 1986).

Respecto al posicionamiento de nucleosomas, este tipo de ordenación se ha encontrado en algunos casos en levadura (Bloom y Carbon, 1982; Lohr, 1983; Bergman y Kramer, 1983; Pérez-Ortín et al., 1987), existiendo aparentemente una pérdida del posicionamiento con la actividad de determinados genes (Bergman y Kramer, 1983).

Por distintas técnicas analíticas se ha podido identificar en levadura la existencia de al menos una variante de cada una de las histonas H3 y H4, con una variación de alrededor del 7% de los residuos, y de dos variantes de cada una de las histonas H2A y H2B, variando alrededor del 20% de los residuos (Brandt et al., 1980). Las diferencias entre los aminoácidos de las variantes no parece tener sin embargo ningún efecto en su función, apareciendo un fenotipo normal en la levadura (Rykowski et al., 1981; Kolodrubetz et al., 1982). Reeves (1984) ha sugerido que la función de las variantes de histonas en la cromatina activa sea la de hacer a los nucleosomas estructural y funcionalmente heterogéneos. Las histonas de la cromatina de levadura presentan un amplio conjunto de modificaciones postsintéticas (Wu et al., 1986) entre las cuales es de destacar, la acetilación de los residuos de lisina, puesto que esta cromatina se encuentra entre las más acetiladas de los organismos eucarióticos (Davie et al. 1981).

3) MODIFICACIONES POSTSINTETICAS EN LAS HISTONAS.

Como ya se ha mencionado anteriormente, las histonas son proteínas con secuencias fuertemente conservadas durante la evolución, pero que además de presentar un número importante de variantes, sufren abundantes modificaciones postsintéticas. Dado que las histonas son participes de procesos esenciales para la célula, no es de extrañar que estas modificaciones hayan sido y estén siendo objeto de estudio por parte de una cantidad importante de investigadores, como lo indica el número de revisiones que se han realizado en este tema (Elgin y Weintraub, 1975; Allfrey, 1977; Iseberg, 1979; Doenecke y Gallwitz, 1982; Wu *et al.*, 1986).

Se puede destacar en este tipo de estudios dos características que los hacen especialmente interesantes: 1) La modificación en las histonas no parece ser un hecho trivial ya que ocurre en momentos determinados del ciclo celular y en sitios específicos de las histonas como consecuencia de la actividad de diversas enzimas. No se produce por ejemplo, la modificación del conjunto de las histonas de la misma forma y en el mismo momento, sino que estos procesos pueden afectar, desde tan sólo unas moléculas hasta la práctica totalidad de las mismas. 2) Las modificaciones pueden alterar significativamente la interacción entre el DNA y las histonas, produciendo cambios en la cromatina reconocibles específicamente por proteínas reguladoras o estructurales implicadas en el metabolismo del

DNA.

Se conocen al menos cinco tipos principales de modificaciones en las histonas: acetilación, fosforilación, metilación, poli(ADP)ribosilación y ubiquitinación.

3.1.- Acetilación.

La acetilación de las histonas es uno de los procesos más ampliamente estudiados entre las modificaciones postsintéticas que pueden sufrir las histonas.

Han sido encontrados dos tipos diferentes de acetilación sobre histonas. El primero se produce en el aminoácido N-terminal (Phillips, 1963) y es un proceso irreversible que ocurre en el citoplasma antes del transporte de las histonas al núcleo (Liew *et al.*, 1970; Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975, 1976). Esta modificación se produce a medida que las histonas están siendo sintetizadas, ya que no aparece cuando las células son tratadas con el inhibidor de la síntesis protéica, puromicina (Allfrey, 1977). El aminoácido modificado N-terminal encontrado en la mayoría de los casos es la N-acetil-serina (Phillips, 1963), pero también se ha encontrado acetilada la metionina (Rodríguez *et al.*, 1979), alanina (Mac Lead *et al.*, 1977) e incluso prolina (Struckland *et al.*, 1980). Este tipo de acetilación se produce sobre las histonas H2A, H4 y H1, pero no se ha observado en las histonas H2B y H4 (Allfrey, 1977).

El segundo tipo de acetilación, la modificación de residuos de lisina en la región N-terminal, se produce en todas las histonas del "core" nucleosomal y no en la histona H1 (Allfrey, 1977). Mediante estudios de secuenciación se observó que la acetilación de estos residuos ocurre tan sólo en un reducido número de lisinas localizadas en la región N-terminal de las histonas. Así, en la histona H4, se pueden encontrar acetilaciones sobre los residuos de lisina de posición, 5, 8, 12 y 16 (DeLange et al., 1969 a y b); en la histona H3 se produce en las lisinas 9, 14, 18 y 23 (DeLange et al., 1973; Hooper et al., 1973; Thwaites et al., 1976 a; Waterborg y Matthews, 1983); en H2B sobre las lisinas 5, 35, 39 y 47 (Cándido y Dixon, 1972) y en las H2A en las lisinas 5 y 12 (Cándido y Dixon, 1972; Fusauchi e Iwai, 1984). Además, a pesar de que existen diferencias en las secuencias de aminoácidos de organismos tan alejados evolutivamente como Tetrahymena, levadura o eucariontes superiores, es interesante señalar que las secuencias de los mismos pueden ser ordenadas de modo que los sitios de acetilación se encuentren totalmente conservados en todos ellos (Isemberg, 1979; Wu et al., 1986).

Se han analizado las secuencias próximas a las lisinas modificadas encontrándose que, en unos casos, el residuo acetilado está limitado por aminoácidos neutros (como ocurre en H4, Gly-Lys(Ac)-Gly), y en otros, al menos uno de los aminoácidos es de tipo básico (como en H3, Arg-Lys(Ac)-Ser o en H2B con Ser-Lys(Ac)-Lys), sugiriéndose que los enzimas que acetilan estos residuos podrían reconocer específicamente estas

secuencias, acetilando diferencialmente estas lisinas (Doenecke y Gallwitz, 1982). Recientemente se ha observado que los sitios de acetilación, para una determinada histona, parecen ser incluso funcionalmente distintos, siendo modificados unos u otros dependiendo de la actividad específica que posea la cromatina en ese momento (Chicoine et al., 1986; Pesis y Matthews, 1986; Couppez et al., 1987).

In vitro, las histonas pueden ser acetiladas en ausencia de enzimas. Así, por tratamiento con anhídrido acético se produce la hiperacetilación de las histonas (Simpson, 1971; Marushige et al., 1976; Wallace et al., 1977) sobre residuos inespecíficos de lisina y tirosina, e incluso sobre la histona H1, que no se acetila in vivo (Tack y Simpson, 1979; Doenecke y Gallwitz, 1982). Otro reactivo utilizado para la acetilación química de las histonas es el acetyl CoA, el cual introduce modificaciones preferentemente sobre H1, en H2A y H2B, y en menor medida sobre H3 y H4 (Paik et al., 1970). Este tipo de acetilación se produce sobre residuos de lisina y es dependiente tanto de la fuerza iónica como del pH de incubación (Delpech et al., 1983).

Las funciones biológicas que se atribuyen a este tipo de modificación serán discutidas más adelante.

3.2.- Otras modificaciones.

3.2.1.- Fosforilación.

Se han identificado diversos sitios específicos de fosforilación en todas las histonas, siendo la H1, con mucho, el sustrato más fosforilable (Walker et al., 1982; Wu et al., 1986).

La O-fosforilación se produce sobre residuos de serina y treonina, localizados especialmente en la región N-terminal de las histonas (Wu et al., 1986). En algunos casos se ha observado asimismo la presencia de N-fosforilación tanto en residuos de lisina de la histona H1 como en residuos de histidina de la histona H4, pero en menor extensión que las anteriores (Wu et al., 1986).

Se han identificado y purificado un amplio número de histona kinasas, las cuales han sido clasificadas en función de su especificidad por las histonas, por su localización subcelular, por su dependencia del AMP cíclico o del Ca^{2+} y por las fluctuaciones de su actividad durante el ciclo celular (Iseberg, 1979; Walker et al., 1982; Wu et al., 1986). También se han caracterizado algunas fosfohidrolasas o fosfatasas específicas de las histonas, lo cual estaría de acuerdo con la bien estudiada reversibilidad de la fosforilación (Le Vine et al., 1984; Nahas et al., 1984).

La fosforilación de las histonas se produce durante la fase S del ciclo celular, durante la mitosis o como respuesta a un estímulo hormonal (Iseberg, 1979; Walker et al., 1982). Se ha sugerido, en base a estos datos y a los de la localización preferente en la región N-terminal de las histonas, que la posible función biológica de esta modificación sería la de iniciar y mantener el estado de condensación de la cromatina en los procesos indicados (Wu et al., 1986).

3.2.2.- Metilación.

La presencia de metilaciones de residuos específicos, localizados preferentemente en la región N-terminal, ha sido descrita en las histonas del "core" nucleosomal de diversos organismos (Wu et al., 1986). La metilación se produce en el residuo N-terminal para formar, por ejemplo, N,N,N-trimetilalanina en las histonas de Tetrahymena (Nomoto et al., 1982), así como sobre lisinas internas introduciéndose en ellas entre 1 y 3 grupos metilo (Walker et al., 1982). También se han descrito N-metilaciones sobre residuos de arginina (Gupta et al., 1982), así como O-metilaciones en residuos de ácido aspártico o ácido glutámico (Trivedi et al., 1982), pero estas han sido aún poco estudiadas.

Se conocen diversos enzimas que catalizan la metilación de lisinas y que difieren, tanto en la especificidad frente al tipo

de histonas, como frente al residuo de lisina que metila (Wu et al., 1986).

La hipótesis inicial de que la metilación era un proceso irreversible ha sido finalmente descartada desde que se ha observado la presencia de N-alkil-lisinasas en algunos mamíferos, cuya actividad varía entre un tejido y otro o entre una y otra especie (Paik y Di María, 1984).

La función de la metilación de las histonas en la cromatina activa, es poco clara, ya que en la metilación no se produce una variación de la carga neta del residuo modificado, por lo que posiblemente influiría poco en la interacción entre el DNA y las histonas (Walker et al., 1982).

3.2.3.- Poli-ADP-ribosilación.

Este tipo de modificación de las histonas, detectado por Nishizuka et al. (1968), se produce por la acción de un enzima, la poli-(ADP-ribosa)-sintasa, que se encuentra asociada a cromatina (Mandel et al., 1977; Okayama et al., 1977). El enzima introduce hasta 15 monómeros de ADP-ribosa (Wong et al., 1984) en la histona H2B, sobre el residuo de ácido glutámico de posición 2, y en la histona H1 tanto en los residuos de ácido glutámico de posición 2 y 14 como en el extremo N-terminal de la molécula (Giri et al., 1978). Aunque en menor extensión, las histonas H3 y H2A parecen ser asimismo poli-ADP-ribosiladas, si

bien no se conoce sobre que residuo se produce, no habiendo sido detectada esta modificación sobre H4 (Wu et al., 1986).

Mediante estudios de autoradiografía, centrifugación analítica y microscopía electrónica se ha observado que la cromatina adopta una conformación más relajada como consecuencia de la poli-ADP-ribosilación de las histonas (Poirier et al., 1982; Niedergang et al., 1985; De Murcia et al., 1986). Este efecto de relajación podría estar implicado, según diferentes autores, en los procesos de replicación del DNA (Farzaneh et al., 1982), de reparación del DNA (Durkacz et al., 1980) así como en la diferenciación celular (Farzaneh et al., 1982).

3.2.4. Ubiquitinación.

Se ha observado la presencia de una molécula de ubiquitina unida, mediante enlace isopeptídico, a la histona H2A formando la llamada proteína A24 (Goldknopf y Busch, 1977) así como a la histona H2B (Wu et al., 1981). Esta molécula está enlazada específicamente al residuo de lisina 119 en la histona H2A (Goldknopf y Busch, 1977), no conociéndose sobre que residuo de la región C-terminal se produce en la histona H2B (Wu et al., 1986). Una o, más comúnmente, las dos moléculas de H2A del nucleosoma pueden ser modificadas (Levinger y Varshavsky, 1982 a y b), afectando normalmente al 10-30% de los nucleosomas en la célula (Goldknopf y Busch, 1981).

Levinger y Varshavsky (1982 a) han observado un enriquecimiento en el número de moléculas de H2A ubiquitinadas en genes transcribibles, especialmente en los genes inducibles por choque térmico, en células de Drosophila, no existiendo prácticamente ubiquitinación en la cromatina inactiva del DNA satélite. En base a estos datos se ha sugerido que la presencia de histonas ubiquitinadas en nucleosomas de regiones transcribibles puede prevenir la formación del solenoide de 30 nm en la cromatina por modificación en la estructura nucleosomal y en las interacciones internucleosomales (Barsoum y Varshavsky, 1985). Recientemente, sin embargo, se ha puesto en duda esta hipótesis ya que Huang et al. (1986) han observado que la movilidad electroforética de nucleosomas procedentes del gen activo de la inmunoglobulina K no cambia por el tratamiento de los mismos con isopeptidasas, que eliminan específicamente las moléculas de ubiquitina de las histonas.

De entre todas las modificaciones postsintéticas descritas es, sin duda, la acetilación de los residuos de lisina en su región N-terminal la que más ampliamente se ha estudiado, no solo porque afecta a un mayor número de nucleosomas que el resto de modificaciones, sino porque asimismo parece estar implicada en un número más amplio de funciones biológicas y estructurales en las células de los organismos eucarióticos.

4) CONSECUENCIAS ESTRUCTURALES Y/O FUNCIONALES DE LA ACETILACION DE LAS HISTONAS.

En la actualidad, debido a la diversidad de repercusiones que posee la acetilación de las histonas, es una tendencia general considerar que este tipo de modificación pueda ejercer un papel multifuncional sobre la estructura y actividad biológica de la cromatina. En el presente apartado se pretende exponer los conocimientos actuales sobre estas consecuencias.

4.1.- Efecto de la acetilación en la conformación y estabilidad de los nucleosomas y en la estructura de la cromatina.

A nivel molecular, la conexión entre la acetilación de las histonas y su papel biológico ha sido relacionada normalmente con la pérdida en las interacciones entre el DNA y la región N-terminal de las histonas a consecuencia de la disminución en el balance de carga en esa región producida por la modificación. Estas interacciones podrían ser de dos tipos: en primer lugar, la formación de enlaces iónicos entre los residuos básicos de la región N-terminal y los grupos fosfato del DNA (Allfrey, 1977), y en segundo lugar, el establecimiento de puentes de hidrógeno entre las cadenas carbonadas de los residuos de lisina y de

arginina con el DNA (Cary *et al.*, 1982). La rotura de los primeros enlaces se produciría directamente por la neutralización de las cargas positivas de las lisinas modificadas (Allfrey, 1977), y la de los segundos de forma indirecta como resultado de que la acetilación eliminaría la restricción a adoptar una conformación de α -hélice, impuesta por la presencia de las cargas positivas, de la región N-terminal, aumentando la distancia entre los grupos que formarían los puentes de hidrógeno (Bode *et al.*, 1980). Las consecuencias conformacionales que se producirían, tanto a nivel nucleosomal como a nivel del filamento de 30 nm, debidas a la disminución de esas interacciones, son todavía motivo de controversia.

En el primer nivel, diversos autores han observado una gran similitud en los parámetros físicos que poseen nucleosomas en estado acetilado respecto a los controles de nucleosomas no acetilados (Simpson, 1978; Reczek *et al.*, 1982). Posteriormente, Bode *et al.* (1980, 1983), mediante estudios que relacionan las movilidades electroforéticas de las partículas nucleosomales con el grado de acetilación de las mismas, han concluido que el estado compacto de los nucleosomas se mantiene hasta que se han introducido unos 10 grupos acetilo en cada partícula por término medio, y que a partir de este "nivel crítico" adquieren la libertad de poseer una variedad de conformaciones caracterizadas todas ellas por una reducción en la movilidad electroforética. Según estos autores la existencia de este mínimo nivel de acetilación para relajar los nucleosomas sería posiblemente la causa de que no haya podido ser detectado por otros autores este

efecto, ya que utilizarían en sus estudios nucleosomas menos acetilados.

Sin embargo, resultados posteriores están en desacuerdo con esta interpretación, ya que ha sido aislada de cromatina de genes ribosomales de Physarum una estructura nucleosomal especialmente relajada, el "lexosoma", cuyas histonas no parecen poseer un alto grado de acetilación (Prior et al., 1983). Además Ausio y Van Holde (1986) han obtenido nucleosomas de células HeLa con un estado de acetilación de hasta 17 grupos acetilo/nucleosoma, cuyos coeficientes de sedimentación son similares a la del control no acetilado. Esto sugeriría que la estructura y estabilidad de las partículas nucleosomales permanece esencialmente invariable, independientemente del grado de acetilación de sus histonas. Sin embargo también se ha sugerido (Bode et al., 1984; Bertrand et al., 1984) que la acetilación podría producir unos efectos primarios, como sería la eliminación in situ de las HMG 14 y 17 y que esta pérdida produciría, más que la propia acetilación, la relajación del nucleosoma.

Respecto del segundo nivel, Mc Ghee et al. (1980, 1983) han sugerido que las interacciones iónicas se establecerían entre la región N-terminal de las histonas con el DNA de nucleosomas adyacentes y que estos enlaces internucleosomales podrían estabilizar la fibra de 30 nm de la cromatina. Este modelo estaría apoyado por diversos estudios en los que la eliminación proteolítica de la región N-terminal de las histonas parece producir una desorganización del solenoide de 30 nm (Allen et

al., 1982; Harborne y Allen, 1983).

De nuevo existen autores que discrepan de la existencia de una correlación entre la acetilación de las histonas y la relajación de la estructura de la cromatina. Así, Reczek et al. (1982), mediante técnicas de desnaturalización térmica y dicroísmo circular de cromatina de células HeLa tratada con butirato, (que induce un aumento de la acetilación de las histonas por inhibición de la histona desacetilasa (revisión de Doenecke y Gallwitz, 1982)), han observado sorprendentemente que la hiperacetilación produciría una unión más fuerte al DNA de las histonas, obteniéndose una estructura más compacta que la cromatina no acetilada. Ante estos resultados Reczek et al. (1982) han indicado que la mayor condensación que parece poseer la cromatina acetilada podría ser función de efectos secundarios producidos por el tratamiento con butirato, como sería el aumento en la histona H1^o, la inhibición de la fosforilación de H1, etc... de modo que las consecuencias de este tratamiento serían más complejas que la simple inhibición de la histona desacetilasa. Sin embargo, otros autores, han señalado que la acetilación no parece prevenir la transición desde el nucleofilamento de 10 nm al solenoide de 30 nm inducido por el aumento de la fuerza iónica (Mc Ghee et al., 1983), y que la orientación de los nucleosomas en la fibra de 30 nm así como la condensación de la cromatina es prácticamente indistinguible independientemente del estado de acetilación de sus histonas (Dimitrov et al., 1986).

Por tanto, el efecto que la acetilación de las histonas

produce sobre la estructura de los nucleosomas o, en general, de la cromatina es aún una cuestión abierta que requerirá en el futuro estudios más amplios. En éstos se utilizarán, posiblemente, genes específicos aislados de la cromatina que eviten que la posible relajación de esas regiones concretas no se encuentre diluida frente a la totalidad de la misma.

4.2.- Sensibilidad de las regiones hiperacetiladas a la digestión con nucleasas.

Numerosos grupos de trabajo han sugerido que la estructura nucleosomal de la cromatina que contiene histonas altamente acetiladas estaría alterada de algún modo permitiendo a estos nucleosomas ser digeridos selectivamente por diversas endonucleasas. El cambio detectado por estas enzimas sería una etapa necesaria en la conversión de la cromatina a una forma transcripcionalmente activa.

Algunos autores han mostrado que las regiones asociadas con histonas hiperacetiladas parecen ser selectivamente digeridas por DNasa I, pero no con la MNasa (Vidali *et al.*, 1978; Nelson *et al.*, 1978; Perry y Chalkley, 1981). Esto ha llevado a sugerir que esta diferencia sea reflejo de la distinta zona del DNA en la que estas nucleasas atacan a la cromatina. La DNasa I, al producir cortes en el DNA del "core" nucleosomal (la MNasa los realiza en el DNA linker), podría ser más dependiente del grado

de acetilación de las histonas internas (Perry y Chalkley, 1981). Además, las regiones acetiladas parecen ser más atacadas por la DNasa I a una fuerza iónica moderada (150-200 mM en NaCl), siéndolo mucho menos a fuerzas iónica bajas o bien superiores a 250 mM. Ello parece indicar que el incremento de la fuerza iónica podría producir transiciones estructurales en los nucleosomas, permitiendo que los puntos de corte a las nucleasas estén más expuestos, lo cual podría estar facilitado por la hiperacetilación de las histonas (Perry y Chalkley, 1981).

Otros autores, utilizando genes específicos en la digestión con DNasa I, parecen estar en desacuerdo con esta interpretación. Vavra *et al.* (1982), han descrito que la sensibilidad de los genes ribosomales de macronúcleo de *Tetrahymena* a la DNasa I no es afectada cuando estos núcleos son desacetilados por una desacetilasa endógena, en condiciones en las que se elimina entre el 50 y 85% de los grupos acetilo de las histonas. La mayoría de los grupos acetilo serían por tanto innecesarios para el mantenimiento de la sensibilidad a la DNasa I. Sin embargo, estos grupos residuales podrían estar localizados en una pequeña fracción de las histonas en el gen, siendo esta fracción quizás crítica para la unión a proteínas específicas que facilitasen una exposición preferencial de los genes a la DNasa I (Vavra *et al.*, 1982; Perry y Chalkley, 1981).

Respecto a la MNasa, resultados recientes parecen indicar que el incremento en la acetilación de histonas del gen de la β -globina, producida por la presencia de n-butilato, estaría correlacionado con el aumento de la sensibilidad a la digestión,

a tiempos cortos, del mencionado gen (Ferenz y Nelson, 1985; Nelson *et al.*, 1986).

Estas últimas observaciones son consistentes con los trabajos realizados por Davie y Cándido (1978), demostrando la presencia de formas hiperacetiladas de H4 en la cromatina de testículo de trucha en una fracción enriquecida en secuencias transcribibles, seleccionada específicamente por digestión con DNasa II.

El conjunto de estos estudios sugieren que la presencia de un alto nivel de acetilación en las histonas sería necesario, pero no suficiente, para establecer una "conformación activa" en la cromatina que sea reconocible preferentemente por las nucleasas (Egan y Levy-Wilson, 1981; Vavra *et al.*, 1982), y que un recambio rápido de los grupos acetilo de las histonas modificadas, podría producir "señales" específicas reconocibles por estas enzimas (Nelson *et al.*, 1980).

4.3.- Relación de la actividad transcripcional con la acetilación de histonas.

La función biológica que más ampliamente se ha relacionado con la acetilación ha sido, sin duda, la del aumento de la actividad transcripcional de la cromatina.

Desde distintos enfoques experimentales existen evidencias que sugieren que la conversión de partes de la cromatina, desde

un estado inactivo hasta otro transcripcionalmente activo, se produce, en una primera etapa, mediante la relajación estructural de conjuntos de genes seleccionados, provocando su competencia potencial a la transcripción. Desde la primera sugerencia hecha por Allfrey et al. en 1964, de que la acetilación de las histonas podría tener un importante papel en la transcripción, se han realizado numerosos estudios para confirmar la participación de la acetilación en esta etapa inicial de la activación (revisiones de Allfrey, 1977; Doenecke y Gallwitz, 1982; Reeves, 1984).

Un primer grupo de estudios se han realizado usando sistemas biológicos, o fracciones específicas de la cromatina que se encuentran constitutivamente en un estado transcripcionalmente inactivo. Entre ellos podemos señalar los realizados por Vavra et al. (1982) con micronúcleos de células de Tetrahymena; estos núcleos, a diferencia de los macronúcleos poseen una actividad transcripcionalmente baja así como un nivel de acetilación casi inexistente. Por otra parte, Pashev et al. (1983) han estudiado el grado de acetilación de la cromatina del DNA satélite, transcripcionalmente inactiva, obtenida por digestión con la endonucleasa de restricción Bsp. Las histonas de la fracción de la cromatina resistente a la nucleasa, en la que más del 65% de su DNA es DNA satélite, no se encuentran prácticamente acetiladas. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Halleck y Schlegel (1983) con heterocromatina constitutiva de células de ratón (Peromyscus eremicus). Esta cromatina forma alrededor del 35% del DNA celular, observándose

en la misma una elevada proporción de histonas hipoacetiladas, especialmente H3 y H4.

Un segundo grupo de estudios se han realizado utilizando células que se encuentran en una etapa de diferenciación en la que la actividad transcripcional es muy baja. En estas, la disminución de la transcripción va acompañada de un descenso en el grado de acetilación de las histonas. Así, Brotherton *et al.* (1981), estudiando el grado de incorporación de [³H]acetato en las histonas, han observado una marcaje del 40% con respecto a la que se produce en las células transcripcionalmente activas de hepatocito. Además, casi el 50% de la acetilación localizada sobre la histona H4 se encuentra en forma monoacetilada. En base a estos resultados se ha concluido que las células genéticamente inactivas estarían, en general, con un bajo nivel de acetilación en sus histonas.

Sin embargo, otros autores, estudiando la presencia de esta modificación en distintos organismos eucarióticos (Yukioka *et al.*, (1983) en cromatina de hígado de rata; Giancotti *et al.* (1984) en células embrionarias de *Drosophila*; Oliva y Mezquita (1982) durante la espermatogénesis en el gallo y Covault *et al.* (1981) en células de hepatocito) han descrito una tasa de acetilación similar tanto en células genéticamente activas como inactivas.

La causa molecular del incremento de la transcripción puede ser debida bien a un aumento en la velocidad de elongación de las cadenas de RNA (Marushige, 1976) o bien a un incremento en el número de sitios de unión de la RNA polimerasa en la

cromatina. Algunos autores han sugerido la idea de que la acetilación "in situ" de las histonas podría intervenir a estos niveles (Oberhauser et al., 1978; Reeves y Cserjesi, 1979). Otros autores no coinciden en esta interpretación, así Loidl et al. (1983, 1984) han analizado el efecto del butirato sobre la actividad endógena RNA polimerasa de Physarum policephalum, relacionándolo con la existencia de histonas hiperacetiladas. Sus resultados indican que la presencia de butirato no aumenta la capacidad de síntesis del RNA, sino que más bien se produce una inhibición de la actividad RNA polimerasa en presencia de histonas hiperacetiladas.

Sin embargo, recientes resultados parecen estar de acuerdo con la existencia de la correlación entre el aumento de actividad transcripcional y la acetilación de histonas, anteriormente citada. Así, tras la administración de 17 β -oestradiol, se produce un fuerte incremento en el número de copias RNAm de vitelogenina, tanto en células de hígado de Xenopus como en las de pollo. Simultáneamente al aumento de síntesis se produce un incremento en el grado de acetilación de las histonas (Csordas et al., 1986). La correlación se produciría por un aumento del número de sitios de inicio por parte de la RNA polimerasa B (Csordas et al. 1984, 1986).

Saccharomyces cerevisiae representa en este sentido un caso particular dentro de los organismos eucariotas ya que se transcribe casi el 40% de su DNA genómico (Hereford y Rosbash, 1977), mientras que el grado de acetilación de sus histonas es superior al existente en la cromatina de otros eucariotas

(Nelson y Alonso, 1983; Davie et al., 1981). Sería por tanto este organismo un sistema idóneo para corroborar la existencia o no de relación entre la hiperacetilación de las histonas y la actividad génica.

4.4.- Acetilación de histonas y ensamblaje de la cromatina durante la duplicación del DNA.

Otra de las funciones biológicas que se ha relacionado con la hiperacetilación de las histonas, ha sido la deposición de las mismas y su ensamblaje posterior en forma de nucleosomas durante la replicación del DNA.

El sistema más utilizado en este estudio ha sido el micronúcleo de células de Tetrahymena ya que posee una elevada tasa de división celular y una casi nula transcripción. Allis et al. (1985) han observado que las histonas recién sintetizadas depositadas sobre el micronúcleo se encuentran en estado hiperacetilado. La histona H4 es depositada en forma diacetilada (Allis et al., 1985), estando modificada concretamente en los residuos de lisina en posición 4 y 11 (Chicoine et al., 1986). La histona H3 lo es en forma monoacetilada (Allis et al., 1985), posiblemente modificada en residuo de lisina 9 (Chicoine et al., 1986), mientras que H2A y H2B lo hacen en forma no acetilada (Allis et al., 1985). Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Chalkley y Shires (1985) en células de

hepatocito HTC, que son inducidas a replicarse por la presencia de n-butilato. En este sistema las histonas H2A y H2B no parecen ser modificadas, mientras que en H3 y H4 el grado de acetilación es cuatro veces superior al de las células control.

Waterborg y Matthews (1983, 1984), han observado sin embargo que en fase S del ciclo celular de Physarum, donde existe una tasa de replicación elevada, las histonas H2A y H2B se depositarían realmente en formas mono o diacetiladas.

La acetilación de las histonas estaría asimismo implicada en el ensamblaje de la cromatina tras la deposición de histonas. Cotten y Chalkley (1986) han encontrado en células de hepatocito (HTC) que las histonas hiperacetiladas se ensamblan en nucleosomas con una mayor eficiencia que las histonas hipoacetiladas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Chambers y Shaw (1984) los cuales observan la presencia de formas diacetiladas de H4 en erizo de mar Arbacia punctulata, cuya modificación permanece hasta después de haberse formado los nucleosomas en la cromatina recién sintetizada.

La desacetilación de las histonas tras el ensamblaje sería un mecanismo necesario para la maduración de la cromatina replicada (Annunziato y Seale, 1983). Ello sería consistente con los resultados obtenidos por Threadgill y Arnstein (1985) en células eritroides de médula de ratón y por Harisanova y Ralchev (1986) en células embrionarias de Drosophila hydei, en los cuales encuentran un bajo contenido en histonas acetiladas tras la replicación del DNA en células diferenciadas.

En Saccharomyces cerevisiae se ha observado un mayor grado

de acetilación en la histona H4 en fases G1 y S que en fases G2/mitosis (Marian y Wintersberger, 1982). Esto estaría de acuerdo con los resultados de Waterborg y Matthews (1983 a) en Physarum, ya que en fase S existe además de la replicación del DNA una elevada transcripción en la misma que continúa durante la fase G2.

4.5.- Acetilación de las histonas durante la espermatogénesis.

Desde la primera hipótesis presentadas por Sung y Dixon (1970) de que la acetilación de las histonas en la cromatina de células espermáticas puede jugar un importante papel en el proceso de reemplazamiento de las histonas por protaminas específicas, se han realizado numerosos estudios sobre este tema (revisión de Reeves, 1984).

Durante la espermatogénesis, en células espermáticas de trucha (Christensen y Dixon, 1982), de gallo (Oliva y Mezquita, 1982) o de rata (Grimes y Henderson, 1983, 1984), se ha observado un significativo incremento en el grado de acetilación de las histonas cuyo nivel permanece hasta la sustitución de éstas por protaminas o proteínas tipo protamina, en la cromatina.

El mecanismo de intercambio podría ser debido a un proceso de competición electrostática de las protaminas, en función de

su menor tamaño y mayor basicidad, respecto a las histonas (Wong y Marushige, 1976; Marushige *et al.*, 1976) o a la existencia de un estado relajado intermedio entre las cromatinas condensadas, con el DNA unido a histonas o con el DNA unido a protaminas, provocado por la hiperacetilación de las histonas (Christensen *et al.*, 1984)

La acetilación de histonas es pues un proceso que puede afectar a muy diversas facetas del metabolismo de la cromatina. Su intervención en aspectos bien alejados entre sí no es teóricamente incongruente, ya que debido a la multiplicidad de sitios diferentes de acetilación y en distintas histonas, estas funciones podrían compatibilizarse quizás en algunos casos.

5) ENZIMAS IMPLICADOS EN LA ACETILACION Y DESACETILACION DE LAS HISTONAS.

In vivo, el nivel de acetilación de las histonas está gobernado por la acción de dos actividades enzimáticas opuestas, la histona acetiltransferasa (HAT), que utiliza como dador de grupos acetilo al acetil CoA, y la histona desacetilasa (HD) que hidroliza el enlace amida formado.

La regulación del estado de acetilación parece llevarse a cabo, según algunos autores, por el aumento o disminución de la

actividad HD (Pogo et al., 1968; Boffa et al., 1973; Saunders et al., 1973; Moore et al., 1979). Sin embargo, recientes resultados han asignado el papel regulador a la HAT (Vavra et al., 1982; Harisanova y Ralchev, 1986) o a la relación entre ambas (Chicoine y Allis, 1986).

5.1.- Histona acetiltransferasa.

El enzima, o enzimas, histona acetiltransferasa responsable de la modificación del residuo N-terminal de las cadenas polipeptídicas nacientes, ha sido encontrado asociado con polirribosomas en hígado de rata (Pestaña y Pitot, 1975) y en reticulocitos de conejo (Traugh y Sharp, 1979). Sin embargo, al ser un tipo de acetilación irreversible, a diferencia de la que se produce en la región N-terminal de las histonas, éstos enzimas has sido en general poco estudiados.

La primera actividad histona acetiltransferasa que acetila a los grupos ϵ -amino de las lisinas de la región N-terminal fue descrita por Nohara et al. (1966) en hígado de paloma. Posteriormente ha sido descrita esta actividad en diversos tejidos de mamíferos (revisiones de Allfrey, 1977; y de Doenecke y Gallwitz, 1982), en el insecto Drosophila melanogaster (Wiegand y Brutlag, 1981), en el crustáceo Artemia salina (Cano y Pestaña, 1976), en testículo de trucha (Cándido, 1975), en vegetales (Salvador et al., 1985; Sendra et al., 1986)

y en la levadura Saccharomyces cerevisiae (Travis et al., 1984; López-Rodas et al., 1985).

En la mayor parte de los sistemas biológicos se han diferenciado dos tipos principales de isoenzimas HAT basándose en criterios de localización subcelular, comportamiento cromatográfico y especificidad frente a histonas. La HAT A es un enzima nuclear unido fuertemente a la cromatina ya que se necesita una fuerza iónica elevada para ser extraída de la misma. Este enzima acetila a las cinco histonas libres in vitro con un orden de preferencia, dependiendo de los autores, de H4>H3>H2B>>H2A>H1 (Belikoff et al., 1980; Fukushima et al., 1980; Wiktorowicz y Bonner, 1982; Kelner y Mc Carty, 1984), mientras que si las histonas están formando nucleosomas, la especificidad varía acetilando H4>H2A>H2B>>H3 (Belikoff et al., 1980; Garcea y Alberts, 1980).

Con características similares a la acetiltransferasa A (tabla 1) se han descrito actividades enzimáticas en testículo de trucha (Cándido, 1975), timo de ternera (Belikoff et al., 1980; Sures y Gallwitz, 1980), linfocitos de bovinos (Böhm et al., 1980), hígado de rata (Fukushima et al., 1980; Wiktorowicz y Bonner, 1982) y de cerdo (Kelner y Mc Carty, 1984), en cromatina del virus SV40 (Otto et al., 1980) y en Pisum sativum (Sendra et al., 1986).

La posible función biológica que ha sido atribuida a este tipo de enzimas sería la de regular el grado de acetilación en las histonas durante el aumento de la actividad trascripcional en núcleos (Garcea y Alberts, 1980; Wiktorowicz y

Bonneer, 1982), aunque posiblemente esté también implicado en otras de las funciones descritas en el apartado 4.

La HAT B es un enzima citoplasmático responsable de la acetilación de las histonas, especialmente H4, fuera del núcleo y que no es activo cuando las histonas están en forma de nucleosomas (Böhm *et al.*, 1980; Garcea y Alberts, 1980; Wiegand y Brutlag, 1981; Sendra *et al.*, 1986). Han sido aisladas actividades histona acetiltransferasa similares a la forma B (tabla 1) en linfocitos de bovinos (Böhm *et al.*, 1980), hepatoma de rata (Garcea y Alberts, 1980), en *Drosophila melanogaster* (Wiegand y Brutlag, 1981) y en *Pisum sativum* (Salvador *et al.*, 1985; Sendra *et al.*, 1986). Salvador *et al.* (1986) han sugerido que la HAT B podría ser una actividad enzimática presente en la totalidad de los organismos eucariotas.

En base a los resultados de especificidad, localización subcelular, etc., diversos autores han indicado que este enzima estaría implicado en la acetilación de las histonas recién sintetizadas, especialmente H4, previamente al ensamblaje de éstas en nucleosomas (Garcea y Alberts, 1980; Wiegand y Brutlag, 1981; Salvador *et al.*, 1985; Sendra *et al.*, 1986). Los residuos de lisina que esta enzima acetilaría en las histonas serían posiblemente distintos a los que son modificados por el enzima nuclear (Garcea y Alberts, 1980; Chicoine *et al.*, 1986).

Hay evidencias de una tercera actividad denominada HAT C en timo de ternera que acetila a las histonas H2A>H2B>H3=H4 (Sures y Gallwitz, 1980) y de otra asociada a nucleosomas de linfocitos de bovinos denominada HAT DB ("DNA Binding") que

acetila a las histonas H4>H2B=H3>>H2A (Böhm et al., 1980).

En general en los sistemas biológicos parece existir, sin embargo, una mayor complejidad que la presencia de un isoenzima histona acetiltransferasa de cada uno de los tipos señalados, nuclear y citoplasmático (tabla 1). Así, en los núcleos de hígado de ternera (Libby, 1978) y en los de hígado de rata (Libby, 1980) se ha descrito la presencia de dos actividades nucleares que difieren tanto en especificidad como en comportamiento cromatográfico. En hígado de ternera la HAT "a" es separada de la HAT "b" (diferente del enzima citoplasmático HAT B) mediante cromatografía en hidroxapatito, pero no difieren en cuanto a la fuerza iónica a la que eluyen en una cromatografía en DEAE-celulosa. La especificidad de la forma "a" está dirigida a H4>H2A>H3>H2B>H1 mientras que la forma "b" lo es hacia H4=H3>H2A>H2B>H1. En hígado de rata, los dos isoenzimas nucleares no pueden ser separados por cromatografía en DEAE-celulosa ni en hidroxapatito, pero si lo son en columna de fosfocelulosa, siendo también algo diferentes en cuanto a su especificidad: la HAT "a" acetila H3>H2B=H2A>H4 y la HAT "b" H3>H2A>H2B>H4.

En otros sistemas, por el contrario, no se ha encontrado ningún isoenzima HAT de tipo nuclear, como ocurre por ejemplo en el caso de células de Drosophila melanogaster (Wiegand y Brutlag, 1981).

Entre los enzimas citoplasmáticos también parece existir esta heterogeneidad en cuanto al número de isoenzimas presentes. Así, en Artemia salina se han descrito dos isoenzimas

citoplasmáticos denominados HAT II y HAT III (además de la forma nuclear HAT I), separados por cromatografía en hidroxapatito. La HAT II acetila exclusivamente a la histona H4, mientras que la HAT III modifica tanto a H4 como a las histonas H3 y H1, con una actividad similar (Estepa y Pestaña, 1983). Su función sería la de acetilar a las histonas H3 y H4 previo a su deposición y ensamblaje en nucleosomas, favoreciendo posiblemente ambos procesos (Allis *et al.*, 1985).

Más recientemente Yukioka *et al.* (1984) han descrito en un solo sistema biológico, hígado de rata, hasta cuatro actividades HAT, dos de tipo nuclear denominados como N I y N II, y dos de tipo citoplasmáticas, C I y C II. Las dos primeras han sido separadas por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, siendo sólo la HAT N II retenida por cromatografía en DNA-Sephadex. La N I acetila a las histonas H3>>H4>H2B>H2A>H1, pero no las modifica si éstas están formando nucleosomas, mientras que la N II acetila a H4>H3>H2B>>H2A>H1, así como a las histonas en nucleosomas. Los isoenzimas citoplasmáticos C I y C II, por su parte, son separados entre sí por cromatografía en DEAE-Sephadex. Los resultados de especificidad indican que estos enzimas no son activos con las histonas en forma de nucleosomas, acetilando la forma C I a las histonas libres H4>H3>H2B>>H2A>H1, y la forma C II tan sólo a la histona H4.

Es importante señalar también que en función del sistema de extracción y de purificación empleados, diversos autores han descrito, para un mismo material biológico, un número diferente de isoenzimas presentes y/o características

bioquímicas distintas. Así en hepatoma de rata, Garcea y Alberts (1980) han indicado la presencia de un solo enzima nuclear obtenido por precipitación diferencial con polietilenglicol 8000 a fuerza iónica elevada (2 M NaCl). Este enzima acetila a las histonas libres H4>H3>H2B>H2A, mientras que el comportamiento con nucleosomas es algo distinto, acetilando H4>H2A=H2B>H3. Fukushima et al. (1980) en núcleos de hígado de rata, obtiene mediante extracción a fuerza iónica alta (0.6 M KCl), ultracentrifugación a 105000xg y purificación posterior en hidroxapatito, una actividad HAT que acetilaría en nucleosomas, a diferencia de la descrita por Garcea y Alberts (1980), a las histonas H4>>H3>H2B. Por su parte, Wiktorowicz y Bonner (1982) en este mismo material, por extracción a fuerza iónica alta (0.4 M NH₄Cl) seguida de una extensa purificación mediante cromatografía en fenil-Sepharose, filtración en Sephadex G-200, intercambio iónico en CM-celulosa y de afinidad en N-acetilisina-Sepharose, obtiene un solo enzima con especificidad frente a histonas libres algo diferente a la descrita por Garcea y Alberts (1980), ya que acetila a H3>H4>H2B>H2A>H1. Sin embargo, Yukioka et al. (1984) mediante el mismo procedimiento de extracción descrito por Fukushima et al. (1980) y ulterior purificación en gradiente de sacarosa, tal como se ha indicado más arriba, conduce a la separación de los isoenzimas N I y N II. Por último Libby (1980), igualmente en núcleos de hígado de rata, obtiene los isoenzimas "a" y "b" descritos anteriormente, con especificidad diferentes a los obtenidos por Yukioka et al. (1984). El proceso de purificación

Tabla I.- Actividades histona acetiltransferasa descritas en distintos organismos eucarióticos (n/c: localización nuclear o citoplasmática; N.D.: no determinado; +/-: activa o no activa con nucleosomas).

Sistema biológico	Método de extracción	Actividad HAT (n/c)	Factor de purificación	Mr	Especificidad H.libres/Nucleosomas	Referencias
1 Núcleos de testículo de trucha	Extrac. con 0.4M NaCl y ppción. con 30-60% en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	A (n)	N.D.	N.D.	H3>H4/ N.D.	Cándido (1975)
2 Núcleos de hígado de ternera	Extrac. con 0.4M KCl	a (n)	4.580	150.000	<u>H4>H2A>H3>H2B>H1</u> N.D.	Libby (1978)
		b (n)	5.100	175.000	<u>H4=H3>H2A>H2B>H1</u> N.D.	
3 Cromatina de timo de ternera	Extrac. con 2M NaCl y ppción. diferencial con 10 y 20% PEG	A (n)	5.700	70.000	<u>H4>H3>H2B>>H2A</u> <u>H4>H2A=H2B>>H3</u>	Belikoff et al., (1980)
4 Células de linfocitos de bovinos	Extrac. con 0.5M NaCl y ultracentrifugación a 100.000 xg, 2 h.	A (n)	N.D.	N.D.	<u>H4>H2B=H2A>H3>>H1</u> N.D.	Böhm et al., (1980)
		B (c)	N.D.	N.D.	H4/ -	
		DB(n)	N.D.	N.D.	<u>H4>H2B=H3>>H2A</u> <u>H2B>>H3>>H4>H2A</u>	

Tabla I (cont.).- Actividades histona acetiltransferasa descritas en distintos organismos eucarióticos (n/c: localización nuclear o citoplasmática; N.D.: no determinado; -/+ : activa o no activa con nucleosomas).

Sistema biológico	Método de extracción	Actividad HAT (n/c)	Factor de purificación	Mr	Especificidad H.libres/Nucleosomas	Referencias
5 Cromatina de hígado de rata	Extrac. con 0.6M KCl y ultrac. a 105000 xg 90 min.	A (n)	N.D.	N.D.	$\frac{H4 \gg H3 \gg H2B}{N.D.}$	Fukushima <i>et al.</i> , (1980)
6 Hepatoma de rata	Extrac. con 2M NaCl y ppción. diferencial con 10 y 20% PEG	A (n)	N.D.	N.D.	$\frac{H4 \gg H3 \gg H2B \gg H2A}{H4 \gg H2A = H2B \gg H3}$	Garcea y Alberts, (1980)
		A (n)	N.D.	N.D.	$\frac{H4 \gg H3 \gg H2B \gg H2A}{H4 \gg H2A = H2B \gg H3}$	Garcea y Alberts, (1980)
		B (c)	N.D.	N.D.	H4/ -	
7 Núcleos de hígado de rata	Extrac. con 0.4M KCl y ppción. con 55% de $(NH_4)_2SO_4$	a (n)	277	N.D.	$H3 \gg H2B = H2A \gg H4 / N.D.$	Libby, (1980)
		b (n)	285	N.D.	$H3 \gg H2A \gg H2B \gg H4 / N.D.$	
8 Células de timo de ternera	Sonicación en 1M de $(NH_4)_2SO_4$ y ppción con 3.5M $(NH_4)_2SO_4$	A (n)	22	120.000	$H2A \gg H4 \gg H2B \gg H3 / N.D.$	Sures y Gallwitz, (1980)
		B (c)	239	98.000	$H4 \gg H2A / -$	
		C (n)	---	200.000	$H2A \gg H2B \gg H3 = H4 / N.D.$	

Tabla I (cont.).- Actividades histona acetiltransferasa descritas en distintos organismos eucarióticos (n/c: localización nuclear o citoplasmática; N.D.: no determinado; +/-: activa o no activa con nucleosomas).

Sistema biológico	Método de extracción	Actividad HAT (n/c)	Factor de purificación	Mr	Especificidad H.libres/Nucleosomas	Referencias
9 Células de <i>Drosophila melanogaster</i>	Sobrenadante de la ppción. con 6,9-diamino-2-etoxiacridina	B (c)	1.200	160.000	H4/ -	Wiegand y -- Brutlag, (1981)
10 Núcleos de hígado de rata	Extrac. con 0.4M KCl	A	227	96.000	<u>H3>H4>H2B>H2A>H1</u> N.D.	Wiktorowicz y Bonner, (1982)
11 Células de <i>Artemia salina</i>						
-Núcleos	Extrac. con 0.5M KCl y ultracentrifugación a 105.000 xg, 90 min.	I (n)	N.D.	N.D.	<u>H3>H4>>H1</u> N.D.	Estepa y Pestaña, (1983)
-Sobrenad. citoplasmát.	Sobrenadante ultracentrifugación a 105.000 xg, 2 h.	II(c)	N.D.	N.D.	H4/ N.D.	
		III (c)	N.D.	N.D.	H3>H4>H1/ N.D.	
12 Núcleos de hígado de cerdo	Ppción. diferencial 30-65% en (NH ₄) ₂ SO ₄	A	8.650	94.000	<u>H3>H4>H2B>H2A</u> <u>H4>H2B>H3>H2A</u>	Kelner y Mc Carty, (1984)

Tabla I (cont.).- Actividades histona acetiltransferasa descritas en distintos organismos eucarióticos (n/c: localización nuclear o citoplasmática; N.D.: no determinado; +/-: activa o no activa con nucleosomas).

Sistema biológico	Método de extracción	Actividad HAT (n/c)	Factor de purificación	Mr	Especificidad H.libres/Nucleosomas	Referencias
13 Cromatina <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	Extrac. con 0.4M KCl	A (n)	15.000	110.000	H4>H2B>H3>H2A N.D.	Travis <u>et al.</u> , (1984)
14 Células de hígado de rata						
-Núcleos	Extrac. con 0.5M NaCl y ultracentrifugación a 105.000 xg, 30 min.	NI (n)	N.D.	N.D.	H3>> H4>H2B>H2A>H1/ -	Yukioka <u>et al.</u> , (1984)
		NII(n)	N.D.	N.D.	H4>H3>H2B>> H2A>H1/ +	
-Sobrenad. citoplasmát.	Sobrenadante de ultra centrifugación a 105.000 xg, 2 h.	CI (c)	N.D.	N.D.	H4>H3>H2B>> H2A>H1/ -	
		CII(c)	N.D.	N.D.	H4/ -	
15 Plántula de <u>Pisum sativum</u>	Homogeneizac. y precipitac. con (NH ₄) ₂ SO ₄ 90% saturación.	B (c)	N.D.	160.000	H4/ N.D.	Salvador <u>et al.</u> , (1985)
16 Embrión de <u>Pisum sativum</u>	Homogeneizac. y precipitac. con (NH ₄) ₂ SO ₄ 90% saturación.	A	N.D.	120.000	H3/H3	Sendra <u>et al.</u> , (1986)
		B	N.D.	160.000	H4/ -	

empleado por Libby (1980) se basa en la precipitación de las proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 55% de saturación y purificación mediante cromatografía en DEAE-celulosa, hidroxapatito y fosfocelulosa. Algunos autores (Garcea y Alberts, 1980; Wiktorowicz y Bonner, 1982; Wiegand y Brutlag, 1981) han sugerido que las discrepancias existentes en función del tipo de extracción puedan ser debidas a que alguna actividad isoenzimática pueda ser inactivada irreversiblemente durante las etapas de purificación, especialmente en aquellas en las que someten a los enzimas a fuerzas iónicas, o concentraciones de proteínas elevadas. La mayor o menor inactivación sería función del grado de sensibilidad de los enzimas en cada tipo de organismo (Wiktorowicz y Bonner, 1982).

Por comparación de los comportamientos cromatográficos, especificidad con histonas libres o nucleosomas y localización subcelular de las actividades HAT, Yukioka et al. (1984) han relacionado entre sí los isoenzimas presentes en distintos organismos eucariotas. El enzima nuclear N I sería similar a la acetilasa A descrita por Wiktorowicz y Bonner (1982) en hígado de rata y también a la HAT A de núcleos de linfocitos de bovinos (Böhm et al., 1980). El enzima N II podría compararse con la HAT A localizada en hígado de cerdo (Kelner y Mc Carty, 1984), a la forma nuclear de timo de ternera (Belikoff et al., 1980), a la HAT I de Artemia salina (Estepa y Pestaña, 1983), a la HAT DB de linfocitos de bovinos (Böhm et al., 1980) y a la forma aislada de la cromatina del virus SV40 (Otto et al., 1980).

El enzima citoplasmático C I podría asemejarse a la HAT III de Artemia salina (Estepa y Pestaña, 1983), mientras que la HAT C II se parecería a la acetilasa B descrita en Drosophila melanogaster (Wiegand y Brutlag, 1981), en linfocitos de bovinos (Böhm et al., 1980), en timo de ternera (Belikoff et al., 1980) y la HAT II de Artemia salina (Estepa y Pestaña, 1983), todas ellas específicas para la histona H4.

Travis et al. (1984) han descrito en Saccharomyces cerevisiae la presencia de una única actividad histona acetiltransferasa obtenida a partir de cromatina de levadura prensada y que acetila específicamente a las histonas H4>H2B>H3>H2A. La purificación de la HAT se llevó a cabo mediante extracción del enzima con una fuerza iónica correspondiente a una concentración de 0.4 M en NaCl, y cromatografías posteriores en DEAE-celulosa, Bio-Rex 70, fosfocelulosa y Sephacryl S-300, llegando a un grado de purificación de unas 15000 veces. Las características bioquímicas, especificidad por las histonas y localización subcelular unida a cromatina, parecen indicar que este enzima sería similar a la acetilasa tipo A descrita en eucariotas.

El conjunto de estos estudios demuestra la existencia de diversas histona acetiltransferasas presentes en fracciones nucleares y citoplasmáticas, lo cual puede ser reflejo de la complejidad funcional que la acetilación de las histonas parece poseer en los organismos eucariotas.

5.2.- Histona desacetilasa.

El enzima histona desacetilasa (HD) cataliza la eliminación de los grupos acetilo unidos al ϵ -amino de los residuos de lisina en la región N-terminal de las histonas.

Los primeros procedimientos de extracción de esta actividad consisten en la obtención de preparaciones crudas a partir de tejidos o núcleos que son homogeneizados en tampones de baja fuerza iónica, siendo los sobrenadantes de centrifugaciones posteriores usados como fuente de enzima (Inoue y Fujimoto, 1970; Libby, 1970; Fujimoto, 1972). En trabajos posteriores se describen protocolos con un mayor número de etapas de purificación (Vidali *et al.*, 1972; Kaneta y Fujimoto, 1974). Así, Vidali *et al.* (1972) indicaron la presencia de una actividad desacetilasa, purificada de núcleos de hígado de ternera, que posee afinidad por las histonas acetiladas H3 y H4. Kaneta y Fujimoto (1974) observaron que la actividad HD en timo de ternera contiene dos formas enzimáticas diferentes, una actuaría tanto sobre histonas unidas a cromatina como en forma libre, y la otra tan sólo libera los grupos acetilo de las histonas libres.

La actividad desacetilasa con un mayor grado de purificación ha sido descrita por Cousens *et al.* (1979) usando como material biológico timo de ternera. La actividad enzimática es precipitada primeramente con una concentración 3.5 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y posterior purificación por cromatografías en

DEAE-celulosa y en hidroxapatito. En la cromatografía de intercambio iónico se observa la separación de dos isoenzimas, denominados HD I y HD II, que eluyen de la misma a 250 y 300 mM en NH_4Cl respectivamente.

Resultados obtenidos posteriormente por Hay y Cándido (1983 a y b) indican que la actividad desacetilasa podría encontrarse, como ocurre en la cromatina de células HeLa, asociada a un complejo DNA-proteínas de alto peso molecular. Esta actividad permanece unida al complejo incluso a una fuerza iónica 2 M en NaCl . Los resultados de especificidad indican que las histonas libres son un pobre sustrato para la desacetilasa, mientras que las histonas en forma de mononucleosomas u oligonucleosomas son desacetiladas mucho más eficazmente.

En Saccharomyces cerevisiae se ha descrito recientemente, la presencia de una actividad histona desacetilasa asociada con núcleos de levadura, que puede ser liberada de la cromatina, al menos parcialmente, por extracción con NaCl 0.5 M (Nelson y Alonso, 1986). El enzima desacetila durante la incubación a 37° C de núcleos marcados de levadura, a las cuatro histonas H2A, H2B, H3 y H4 de este organismo, o a las histonas del "core" nucleosomal de núcleos marcados de eritrocito cuando éstos son incubados junto a núcleos de levadura. Estos resultados estarían de acuerdo con los datos de especificidad descritos para la HD de Physarum policephalum por Waterborg y Matthews (1983). Una característica importante de la histona desacetilasa de levadura es que no se encuentra inhibida por la presencia de n-butilato, a pesar de haber sido descrito este

reactivo como un fuerte inhibidor de la histona desacetilasa en otros organismos eucariotas (revisión de Doenecke y Gallwitz, 1982).

6) OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO

La acetilación de las regiones N-terminal de las histonas, a pesar de ser un proceso ampliamente estudiado por diversos autores, no se conoce hasta el momento que función biológica puede desempeñar en las células de los organismos eucariotas. La levadura Saccharomyces cerevisiae constituye un organismo muy apropiado para realizar estudios en ese sentido, ya que las histonas de su cromatina se encuentran entre las más altamente acetiladas de los organismos eucariotas. La regulación del nivel de acetilación de las histonas está desempeñada por la acción opuesta de las actividades enzimáticas histona acetiltransferasa e histona desacetilasa.

El objetivo del presente trabajo es el estudio del sistema enzimático de acetilación y desacetilación de las histonas en la levadura Saccharomyces cerevisiae. Dentro de esta problemática, la investigación pretende determinar el número, tipo y características bioquímicas principales de las actividades HAT y HD presentes en levadura. A fin de eliminar las discrepancias observadas, mediante la utilización de tan sólo un procedimiento

de extracción de estas actividades en otros organismos (tabla I), en este estudio se han utilizado tres métodos diferentes, descritos en la bibliografía, para el aislamiento y purificación de dichos enzimas.

MATERIALES Y METODOS

I) MATERIALES

1) PRODUCTOS QUIMICOS

-[³ H] acetato sódico (activ. especif. 52 mCi/mmol)	Amersham
-[¹⁴ C] acetil CoA (activ. especif. 54 mCi/mmol)	Amersham
-Acrilamida	Merck
-Agar	Oxoid
-Amplify	Amersham
-Azul brillante de cresilo	Merck
-Azul Coomassie R-250	Sigma
-Azul de bromofenol	UCB
-Bisacrilamida	Merck
-Bisbenzimidazol (HOETSCH-33258)	Boehringer
-BSA	Sigma
-Cocktail de centelleo para muestras acuosas	
Normascint 22	Scharlau
-CM-Sephadex G-25	Pharmacia
-CM-Sepharose CL-6B	Pharmacia
-DEAE-Sepharose CL-6B	Pharmacia
-Dimetil-POPOP	Scharlau
-DNA-celulosa, doble cadena	Pharmacia
-DNA de testículo de trucha	Sigma
-Espermidina	Sigma
-Espermina	Sigma

-Extracto de levadura	Oxoid
-Fenilhidrazina	Merck
-Ficoll 400	Pharmacia
-Filtros de fibra de vidrio GF-F	Whatman
-Filtros fosfocelulosa P-81	Whatman
-Hidroxiapatito HTP	Bio-rad
-Medio Swim's S-77	Gibco
-2-mercaptoetilamina	Sigma
-MES	Merck
-Novozym 234	Novo BioLabs
-Nucleasa de micrococo	Boehringer
-Película autoradiográfica Hiperfilm MP	Amersham
-Peptona bacteriológica	Oxoid
-Perlas de vidrio de 0,45-0,50 mm	Sigma
-Pironina	Sigma
-PMSF	Merck
-Polibuffer 96	Pharmacia
-Polielectrolito PBE 94	Pharmacia
-Polietilenglicol 8000	Sigma
-Poli-L-lisina	Sigma
-PPO	Scharlau
-Proteinasa K	Boehringer
-PVP	Merck
-Sephadex G-25	Pharmacia
-Sorbitol	Scharlau
-TEMED	Merck
-Triton X-100	Merck

- Ultrogel AcA34 LKB
- β -glucuronidasa-arilsulfatasa Boehringer

2) APARATOS.

- Analizador de imágenes IBAS 2000 de Kontron
- Cámara Polaroid MP4
- Centrífuga Beckman mod. J2-21
- Contador de centelleo líquido LKB 1217 Rackbeta
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPH 44B
- Espectrofotómetro Beckman mod. 25
- Fuente de electroforesis Pharmacia ECPS 3000/150
- Microfuge Beckman
- Secador de geles LKB mod. 3002
- Ultracentrífuga Beckman mod. LB-55

3) MATERIAL BIOLÓGICO.

- Levadura Saccharomyces cerevisiae cepa CECT-1383
- Levadura comercial prensada marca Hércules (Compañía de industrias agrícolas S.A., Valladolid)
- Pollos de la raza Leghorn-White Rock (Pavimar, S.A.)

II) PROTOCOLO EXPERIMENTAL

1) MEDIOS DE CULTIVO

La cepa CECT 1383 de levadura se cultivó a 28 °C en placas Petri o tubos de cultivo que contenían un medio YEPG (extracto de levadura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v) y glucosa 2% (p/v)) suplementado con agar al 1% (p/v).

El cultivo líquido de levadura en YEPG se realizó inoculando el volumen necesario de una suspensión de células crecidas en medio sólido para obtener una concentración celular de 10 mg por litro e incubando el medio en agitación a 28 °C. En algunos casos, el inóculo consistía en la aplicación, a 2 l de medio, de 10 g de células obtenidas de un cultivo previo en medio líquido mantenido en fase estacionaria de crecimiento durante 65 horas. El estado de crecimiento del cultivo se determinó por medida de la turbidez a 600 nm. Las células se recogieron en el estado de crecimiento deseado por centrifugación a 3000xg durante 5 min y se lavaron dos veces en agua destilada, centrifugándose en las mismas condiciones.

2) PROCEDIMIENTOS DE LISIS CELULAR PARA LA OBTENCION DE LA FRACCION PROTEICA

2.1.- Agitación en tampón hipotónico con perlas de vidrio.

Un primer método para la lisis de las células de levadura se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Franco y López-Braña (1978). Tras recogerse las células de levadura por centrifugación, éstas se resuspendieron en 2 volúmenes de un medio hipotónico constituido por fosfato sódico 5 mM, $MgSO_4$ 1 mM y PMSF 0,7 mM a pH 6.8 y se introdujeron en una botella que contenía perlas de vidrio de 0,45 a 0,50 mm de diámetro, en una proporción de 4 a 1 en peso respecto al de levadura. La mezcla se agitó verticalmente durante 6 min a 4 °C, siendo la amplitud de las oscilaciones de aproximadamente 50 cm. El contenido de la botella se filtró después a través de una gasa de 200 μ de poro a fin de eliminar las perlas de vidrio. Dichas perlas fueron posteriormente lavadas tres veces con el mismo medio y el filtrado se homogeneizó con ayuda de homogeneizador Potter-Elvehjem. Finalmente el homogeneizado fue sonicado a 125 W durante cuatro periodos de 30 s cada uno, en un baño de hielo, constituyendo el Extracto I.

2.2.- Obtención de protoplastos con Novozym.

Un segundo procedimiento para lisar las células de levadura utilizado fue el descrito por Lohr y Ide (1979) con algunas modificaciones. En este método, las paredes celulares de la levadura se eliminaron por digestión con Novozym 234.

Esta reacción de digestión se ve favorecida preincubando las células con un agente reductor como el 2-mercaptoetanol. Para ello, las células se preincubaron durante 30 min en tris-HCl 0.1 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 75 mM, pH 8.0 en un baño de hielo. Tras este tratamiento, las células se recogieron por centrifugación a 3000xg durante 5 min y se lavaron con el medio de digestión sorbitol 1.1 M, fosfato sódico 24 mM pH 6.5. Las células lavadas se resuspendieron en la misma solución a razón de 0.5 g de células por ml de medio y se añadió Novozym hasta una concentración de 10 mg de enzima por g de células. La mezcla se incubó con agitación suave a 37 °C siguiéndose la formación de los protoplastos en el microscopio óptico, observándose su sección de tipo circular fácilmente distinguible de la sección irregular de las células con pared celular. En todos los casos la incubación fue inferior a los 15 min. Transcurrido el tiempo de incubación necesario, los protoplastos se recogieron por centrifugación a 4000xg, 10 min, y se lavaron dos veces con el medio de digestión en ausencia de enzima a fin de eliminar los restos de éste en el sedimento.

Los protoplastos se lisaron en un tampón hipotónico

conteniendo tris-HCl 75 mM, EDTA 0.25 mM, MgCl₂ 1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0.7 mM a pH 7.9 (tampón A) con ayuda de un homogeneizador Potter-Elvehjem. Finalmente, el homogeneizado fue sonicado en las condiciones descritas en el apartado anterior, constituyendo el Extracto II.

2.3.- Obtención de núcleos.

Los protoplastos usados para la obtención de núcleos se produjeron utilizando como enzima para la digestión de la pared celular, β -glucuronidasa-arilsulfatasa. Estos núcleos poseen una mayor estabilidad que los que se obtienen tras el tratamiento con Novozym.

Las células, recogidas en fase estacionaria, son incubadas con medio de pretratamiento (tris-HCl 0.1 M, EDTA 5 mM, 2-mercaptoetanol 75 mM, pH 8.0) durante 30 min a 32 °C. Sin embargo, si las células se recogieron en fase exponencial, la temperatura de incubación fue de 0 °C ya que si estas células son tratadas también a 32 °C su conversión posterior en protoplastos es excesivamente rápida, produciéndose una lisis considerable de los mismos (Lohr y Ide, 1979).

Posteriormente, las células lavadas con medio de digestión (sorbitol 1.1 M, fosfato sódico 24 mM, pH 6.5), se resuspendieron en la misma solución a razón de 0.2 g de células por ml de medio y se añadieron 0.4 ml de

β -glucuronidasa-arilsulfatasa por g de células (este extracto enzimático se sirve comercialmente en forma líquida). La suspensión fue incubada a 37 °C con una suave agitación, siguiéndose la formación de protoplastos con el microscopio óptico, siendo el tiempo de incubación en todos los casos inferior a 1 h. Tras la incubación, los protoplastos fueron recogidos por centrifugación a 4000xg durante 5 min y lavados dos veces con el medio de digestión.

Los protoplastos se lisaron, para la obtención de núcleos, según el procedimiento descrito por Lohr et al. (1977), basado en el de Wintersberger et al. (1973). Para ello, los protoplastos fueron resuspendidos en medio de lisis constituido por ficoll 18%, fosfato sódico 20 mM, MgCl₂ 0.5 mM, pH 6.8 y fueron homogeneizados suavemente con un homogeneizador Potter-Elvehjem. En este medio los protoplastos se lisan por no estar estabilizados osmóticamente y los núcleos obtenidos se aislaron por centrifugación diferencial. Los protoplastos no lisados y las células intactas fueron separados de los núcleos por centrifugación a 4000xg durante 5 min. Posteriormente, los núcleos se recogieron por centrifugación a 30000xg durante 30 min. Los núcleos sedimentados fueron resuspendidos en un medio sorbitol 1 M, glicerol 20%, PVP 5% y bisulfito sódico 10 mM, y fueron depositados sobre un gradiente discontinuo de sorbitol 2.6-3.2 M en el mismo medio, centrifugándose a 13000xg, 20 min. De esta forma los núcleos quedan flotando en la interfase, separándose de las pocas células presentes, que van al fondo del gradiente, y de lípidos, restos de membrana, etc., que quedan en

la parte superior. Los núcleos recogidos de la interfase se lavaron 2 veces con glicerol 20%, centrifugándose en cada lavado a 8000xg, 20 min. Por último, fueron resuspendidos en tampón hipotónico (tris-HCl 75 mM, Mg Cl₂ 1 mM, EDTA 0.25 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, PMSF 0.7 mM a pH 7.9) y sonicados en las condiciones descritas en el apartado 2.1.

Este método condujo al aislamiento de núcleos con un rendimiento relativamente bajo por lo que, para lisar los protoplastos, se utilizó también un segundo método que fue descrito por Alonso y Nelson (1986). Los protoplastos fueron resuspendidos en medio de lisis (0.25 M sacarosa, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 15 mM MES, 0.1 mM PMSF, 0.8% (v/v) triton X-100, pH 6.6) manteniéndose en hielo durante 30 min y observándose la desaparición de protoplastos con el microscopio óptico. Los núcleos fueron centrifugados a 5000xg durante 10 min y lavados posteriormente 2 veces con el medio anterior. Finalmente, los núcleos se lisaron en el tampón hipotónico A (pág. 62) y fueron sonicados en las condiciones descritas en el apartado 2.1. Los lisados nucleares constituyen los Extractos III.



3) OBTENCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS CRUDAS HAT.

Con objeto de obtener a partir de levaduras extractos crudos proteicos con posible actividad HAT, se utilizaron los

procedimientos que vienen descritos a continuación:

3.1.- Precipitación con acetona.

Este procedimiento fue descrito por Vidali et al. (1972) para la obtención de actividad histona desacetilasa a partir de timo de ternera. Los extractos obtenidos en los apartados anteriores, fueron precipitados con 3 volúmenes de acetona y fueron mantenidos a -20°C durante una noche. Tras este período, la suspensión se centrifugó a $27000\times g$ durante 15 min, y el sedimento fue secado extensamente a vacío. Se añadió posteriormente 1 volumen de tampón B (tris-HCl 15 mM, NH_4Cl 10 mM, EDTA 0.25 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, glicerol 10% pH 7.9) y se sonicó a 50 W durante 2 ó 3 períodos de 15 s cada uno hasta su total redisolución.

3.2.- Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y fraccionamiento con diferentes % de saturación.

A los extractos sonicados, obtenidos como se describe en el apartado 2, se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta un 25% de saturación, con objeto de disociar la cromatina, manteniéndose en agitación suave durante 30 min a 4°C . La fracción proteica

se precipitó posteriormente mediante la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta el 90% de saturación, manteniéndose en agitación a 4 °C durante 1 noche.

El precipitado proteico fue recogido por centrifugación a 30000xg durante 20 min, resuspendido en tampón B (pág. 65) y dializado frente al mismo tampón. Finalmente, el dializado se centrifugó a 30000xg durante 15 min, y el sobrenadante fue utilizado en posteriores etapas de purificación.

En algunos casos, se realizó un fraccionamiento de las proteínas con distintos % de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a fin de cuantificar la actividad HAT presente en cada una de las fracciones. Para ello, la suspensión proteica con el 25% de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se dividió en 4 partes precipitándose las proteínas por adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un % de saturación final del 30, 50, 70 y 90% respectivamente y tratándose posteriormente las 4 fracciones de forma independiente, como se describe más arriba.

3.3.- Precipitación diferencial con el 10 y 20% de polietilén glicol 8000.

Otro de los agentes precipitantes utilizados para la obtención de actividades HAT de levadura fue el polietilén glicol 8000, siguiendo el procedimiento descrito por Belikoff *et al.* (1980) para la obtención de HAT de timo de ternera con algunas

diferencias.

Para ello, los extractos sonicados obtenidos como se describe en el apartado 2, se llevaron a una concentración 2 M en NaCl mediante la adición del sólido y se dejaron posteriormente en agitación suave durante 30 min a 4 °C. Tras este período, se adicionó una solución del 40% (p/v) de PEG-8000, disuelto en tampón A (pág. 62) hasta llevar la suspensión a un 10% de concentración final y manteniéndose posteriormente en agitación durante 10 min. Después de 5 min de reposo, la mezcla fue centrifugada a 20000xg durante 15 min, quedando la mayor parte del DNA en el sedimento. Este sedimento fue resuspendido en tampón B (pág. 65), dializado frente al mismo tampón y centrifugado a 20000xg durante 10 min.

All sobrenadante obtenido tras la adición del PEG 10%, se le adicionó 1 volumen de tampón A, a fin de reducir la concentración de NaCl hasta 1M, y se le añadió PEG sólido hasta un 20% de concentración final. Tras mantener la suspensión en agitación durante 30 min, se dejó 5 min en reposo y se centrifugó a 20000xg durante 15 min. Finalmente, el sedimento fue resuspendido en tampón B y, tras ser dializado, fue centrifugado a 20000xg durante 10 min. Este sobrenadante, junto con el del 10%, fueron usados en posteriores purificaciones.

3.4.- Ultracentrifugación en presencia de NaCl 0.5 M.

Los extractos obtenidos por lisis de protoplastos o núcleos en tampón hipotónico, tal como se describe en el apartado 2, y que no fueron sonicados para evitar el fraccionamiento de la cromatina, se llevaron a una concentración en NaCl de 0.5 M mediante la adición del sólido. Tras mantener la suspensión en agitación suave durante 15 min, se centrifugó a 105000xg, 1 h, quedando la cromatina en la fracción sedimentada. El sobrenadante fue recogido y dializado frente a tampón B, y se centrifugó posteriormente a 20000xg, durante 10 min; el sobrenadante obtenido fue usado en posteriores etapas de purificación como se describirá más adelante.

4) PURIFICACION DE ACTIVIDADES HAT.

Los métodos cromatográficos empleados durante los procesos de purificación de las distintas actividades enzimáticas fueron los siguientes:

4.1.- Cromatografía de adsorción en hidroxiapatito.

Las fracciones obtenidas según los métodos descritos en el apartado anterior, se dializaron frente a tampón C (fosfato sódico 10 mM, EDTA 0.25 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, glicerol 10% pH 6.8) y se aplicaron en una columna de hidroxiapatito (3 x 25 cm), equilibrada en tampón C. Tras lavar dicha columna, con el mismo tampón hasta tener una A_{280} inferior a 0.1, las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente continuo de fosfato sódico 0.01-0.60 M en tampón C, a un flujo de 20 ml/h. La temperatura de elución fue de 12 °C para evitar la precipitación del fosfato sódico 0.6 M en el interior de la columna.

4.2.- Cromatografías de intercambio iónico.

Se han utilizado dos tipos de cromatografías de intercambio iónico para la purificación de actividades HAT y HD: CM-Sepharose CL-6B y DEAE-Sepharose CL-6B.

4.2.1.- Cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sepharose.

Las fracciones enzimáticas crudas, obtenidas como se describe en el apartado 3, fueron dializadas frente a tampón B

(pag. 65) pH 7.0 y aplicadas sobre una columna de CM-Sepharose (3 x 18 cm) a un flujo de 42 ml/h. Dicha columna fue posteriormente lavada con el mismo tampón hasta que la A_{280} fue inferior a 0.1 y las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente de pH 7.0-9.5 en tampón B. Finalmente, las fracciones con actividad enzimática recogidas fueron cromatografiadas en columna de Sephadex G-25 (1.6 x 5.5 cm) estabilizadas en tampón B a pH 7.9, ensayándose las actividades HAT y HD según los procedimientos descritos en el apartado 5.

4.2.2.- Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose.

En esta cromatografía las fracciones proteicas crudas se aplicaron a un flujo de 42 ml/h en una columna de DEAE-Sepharose de 3 x 18 cm, lavándose posteriormente la misma con tampón B. Las proteínas retenidas se eluyeron, en la mayoría de los casos, con un gradiente continuo de NH_4Cl 0.01-0.35 M en tampón B, aunque en otros fueron eluidas con una fuerza iónica de 0.35 M en NH_4Cl . Los ensayos enzimáticos fueron realizados tal como se describe en el apartado 5.

4.3.- Cromatografía de afinidad en DNA-celulosa.

Las fracciones con actividad enzimática HAT o HD, purificadas en las anteriores cromatografías, fueron aplicadas en una columna de DNA-celulosa de doble cadena de 1 x 8 cm, a un flujo de 15 ml/h, equilibrada previamente en tampón B (pág. 65). Tras lavar dicha columna, las proteínas unidas al DNA se eluyeron con un gradiente continuo 0.01-0.50 de NH_4Cl en tampón B, ensayándose las fracciones como se describe en el apartado 5.

4.4.- Cromatografía de exclusión molecular en Ultrogel AcA34.

Las fracciones separadas en cromatografías anteriores con actividad enzimática HAT o HD, fueron recogidas y concentradas en una célula de ultrafiltración con membrana de 30000 MWCo, a una presión de 4.5 kg/cm^2 . Los concentrados se aplicaron en columna de Ultrogel AcA34 de 1.8 x 120 cm equilibrada previamente en tampón B 110 mM en NH_4Cl y realizándose posteriormente la elución en el mismo tampón a un flujo de 12 ml/h. Finalmente las actividades HAT y HD fueron cuantificadas según el procedimiento descrito en el apartado 5.

4.5.- Cromatofoco.

Las fracciones proteicas crudas o purificadas previamente en anteriores cromatografías se concentraron por ultrafiltración a través de una membrana de 30000 MWCo, y al concentrado se le adicionó 1 volumen de polibuffer 96. La columna de polielectrolito (0.7 x 18 cm) se equilibró con tampón etanolamina-HCl 25 mM pH 9.4 y fueron depositados sobre ella 4 ml de polibuffer 96 a pH 6.0. Posteriormente se aplicó la fracción enzimática concentrada a un flujo de 10 ml/h. Las proteínas fueron eluidas con el mismo tampón y las fracciones se ensayaron, como se describe en el apartado 5, tras ser equilibradas en tampón B (pág. 65) mediante columna de Sephadex G-25 de 1.8 x 5.5 cm.

5) ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMATICA HAT.

5.1.- Procedimiento del ensayo enzimático.

El ensayo de histona acetiltransferasa se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Sures y Gallwitz (1980) con algunas modificaciones.

El ensayo se realizó incubando durante 20 min a 37 °C, 100

μ l de las fracciones enzimáticas con 128 μ g de histonas y 0.01 μ Ci de [1- 14 C] acetil CoA en un volumen final de 125 μ l. Tras este periodo se depositaron alicuotas de 110 μ l sobre filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 2.4 cm de diámetro, dejando que se secaran a temperatura ambiente durante 5 min, sumergiéndose después en TCA al 25%, 20 min a 4 °C. Los filtros se lavaron dos veces con TCA 25% durante 15 min y se sumergieron en alcohol etílico 96%, posteriormente en una mezcla de alcohol etílico-éter etílico (1:1 p/v) y finalmente en eter etílico, manteniéndose 10 min en cada una de dichas soluciones. Los filtros fueron secados en estufa a 70 °C por espacio de 10 min y se introdujeron en 10 ml de una mezcla de centelleo compuesta por PPD 0.6% (p/v), dimetil POPDP 0.0075% (p/v) en tolueno. La radiactividad incorporada a histonas se cuantificó en un contador de centelleo líquido LKB 1217 Rackbeta, usando como testigo el ensayo correspondiente a la fracción enzimática inactivada previamente a 70 °C durante 10 min.

En los ensayos de especificidad enzimática se utilizaron como sustrato en lugar de las histonas, otras proteínas: BSA, sulfato de protamina, HMG de levadura, HMG de eritrocito o el polímero sintético de poli-L-lisina.

Para cuantificar la actividad enzimática acetiltransferasa de las fracciones obtenidas con los sustratos espermidina y espermina, se siguió, con algunas modificaciones el procedimiento descrito por Yukioka *et al.* (1984) basado a su vez en el de Horiuchi y Fujimoto (1972).

Los ensayos se realizaron en las condiciones descritas

anteriormente, con 100 μ l de las fracciones enzimáticas, 128 μ g de los sustratos y 0.01 μ Ci de [1- 14 C] acetil CoA. Tras la incubación a 37 $^{\circ}$ C durante 20 min, fueron depositados 80 μ l de la mezcla de incubación en filtros de fosfocelulosa Whatman P-81, de 2.4 cm de diámetro, secándose a continuación en estufa a 70 $^{\circ}$ C durante 5 min. Los filtros se sumergieron posteriormente en tampón $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 50 mM pH 9.2, manteniéndose en agitación suave a 42 $^{\circ}$ C durante 30 min. Después de lavar los filtros 1 vez en el mismo medio y condiciones, se introdujeron en alcohol metílico 20 min a temperatura ambiente y se secaron en estufa a 70 $^{\circ}$ C durante 1 h. La radiactividad incorporada a los policlones se cuantificó como se describe más arriba.

5.2.- Determinación de las condiciones de ensayo.

Para la determinación del pH óptimo de incubación de la actividad enzimática se realizaron ensayos, como se describe en el apartado 5.1, variando el pH del medio en el que se realizó la incubación. El medio utilizado fue tampón B (tris-HCl 15 mM, NH_4Cl 10 mM, EDTA 0.25 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM y glicerol 10%) a los valores de pH comprendidos entre 7.0 y 9.1. Para estabilizar el extracto enzimático en los diferentes pH del tampón, se aplicaron alícuotas del mismo en columnas de Sephadex G-25 (1.6 x 5.5 cm) equilibradas previamente en dichos tampones y ensayándose los eluidos.

La cuantificación de la actividad enzimática frente al tiempo de incubación de los ensayos se realizó como se describe en el apartado anterior, incubando la mezcla durante 5, 10, 20, 30, 45, 60 ó 75 min, respectivamente.

La determinación de la temperatura óptima se realizó variando, respecto al procedimiento descrito anteriormente, la temperatura de incubación con valores comprendidos entre 28 y 45 °C.

Finalmente la influencia de la fuerza iónica en la actividad enzimática fue determinada realizando los ensayos en presencia de concentraciones crecientes de NH_4Cl entre 0 y 600 mM.

5.3.- Inhibición de la actividad enzimática por DNA.

Para estudiar el efecto inhibitor del DNA sobre la actividad histona acetiltransferasa, se realizó el ensayo enzimático descrito en el apartado 5.1, en presencia de concentraciones de DNA de testículo de salmón de 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, midiéndose posteriormente la radiactividad incorporada a las histonas.

6) PRODUCCION DE RETICULOCITOS MEDIANTE TRATAMIENTO CON FENILHIDRAZINA.

Para la obtención de eritrocitos inmaduros se siguió básicamente el procedimiento descrito por Ferenz y Nelson (1985).

Así, pollos de la raza Leghorm-White Rock se mantuvieron en ausencia de comida durante 48 h y, tras este período se les inyectaron diariamente, por vía subcutánea, 1 ml de una solución formada por fenilhidrazina 1.5% (v/v), NaCl 0.14 M, fosfato sódico 10 mM, alcohol etílico 10% a pH 7.2. El estado de inmadurez de los eritrocitos fue determinado mediante tinción de frotis de sangre extraída diariamente con azul brillante de cresilo 1% (p/v), en alcohol etílico 70%. A los diez días de tratamiento con fenilhidrazina la proporción de reticulocitos en sangre fue de alrededor del 70-80%. En ese momento los pollos se sacrificaron, recogándose la sangre sobre tampón SSC (citrato sódico 25 mM, tris-HCl 10 mM, NaCl 0.14 M pH 7.1) en un baño de hielo.

7) EXTRACCION DE HISTONAS MARCADAS RADIATIVAMENTE CON [³H] ACETATO SODICO.

La sangre de los pollos tratados con fenilhidrazina

(obtenida como se describe en el apartado anterior) fue centrifugada a 500xg durante 10 min, lavándose 2 veces con el mismo tampón. El segmento celular se resuspendió en medio Swim's S-77 a pH 7.2 a una concentración aproximada de 3×10^8 células/ml, se incubó con 20 mCi de [3 H] acetato sódico, manteniéndose en agitación suave durante 30 min a 37 °C. Tras este periodo, las células recogidas por centrifugación a 500xg, 10 min, se resuspendieron en medio Swim's suplementado con butirato sódico 10 mM, a una concentración de 1×10^8 células/ml, manteniéndose en agitación suave durante 1 h a 37 °C. Las histonas marcadas se obtuvieron según el procedimiento descrito en el apartado B.1, suplementándose todos los medios con 10 mM de butirato sódico a fin de evitar la desacetilación de las mismas. La actividad específica de las histonas fue de 3×10^6 dpm/mg, observándose incorporación de radiactividad exclusivamente sobre las histonas del "core" nucleosomal (fig. 1).

8) OBTENCION DE HISTONAS.

Se han obtenido en el presente trabajo histonas de eritrocito totales (en cuya mezcla existe H1 y H5) o del "core" nucleosomal, así como histonas de levadura según los procedimientos que se describen a continuación.

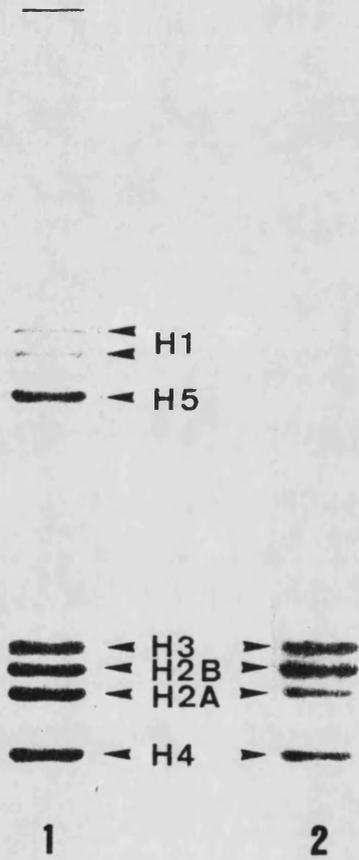


Figura 1.- Electroforesis de 25 µg de histonas de eritrocito de pollo, marcadas *in vivo* con [³H]acetato sódico, en gel de poliacrilamida-SDS. A) Tinción del gel con azul Coomassie; B) Fluorografía del mismo gel.

8.1.- Extracción de histonas de eritrocito.

Las histonas de eritrocito se obtuvieron según el método descrito por Weintraub *et al.* (1975). Para ello, sangre de pollos recién sacrificados se recogió sobre un volumen igual de tampón isotónico SSC (citrato sódico 15 mM, NaCl 0.14 M, tris-HCl 10 mM pH 7.1) en baño de hielo.

Las células fueron separadas del plasma por centrifugación a 500xg durante 10 min, lavándose éstas posteriormente 2 veces con el mismo medio. El sedimento final se resuspendió en 4 volúmenes de tampón de lisis celular formado por NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, tris-HCl 10 mM y triton X-100 0.5% (v/v) a pH 7.4, manteniéndose en agitación suave durante 90 min a 4 °C.

Los núcleos liberados por la lisis de la membrana celular fueron recogidos por centrifugación a 1000xg durante 10 min. El sedimento nuclear fue lavado sucesivas veces en el mismo medio hasta obtener un sobrenadante claro. Los núcleos sedimentados se resuspendieron en 4 volúmenes de HCl 0.25 M, manteniéndose en agitación durante 1 noche a 4 °C, centrifugándose después a 20000xg durante 15 min. El sobrenadante se recogió y el sedimento se resuspendió de nuevo en HCl 0.25 M, manteniéndose en agitación durante 4 h. Tras centrifugar en las condiciones anteriormente descritas, los dos sobrenadantes se reunieron y se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F.

Las histonas en el filtrado se precipitaron con 8 volúmenes

de acetona a -20°C , toda una noche, se recuperaron por centrifugación a $3000\times g$ durante 10 min y, tras lavar el sedimento 3 veces con acetona, fueron secadas finalmente a vacío.

Para la obtención de las histonas del "core" nucleosomal, se extrajeron previamente las histonas H1 y H5 con ácido perclórico. Para ello, los núcleos obtenidos tras el lisado celular, se resuspendieron en 3 volúmenes de ácido perclórico 0.74 M, y después de agitar vigorosamente durante 15 min, la suspensión se centrifugó a $9000\times g$ por espacio de 10 min. Las histonas H1 y H5 se extrajeron de la cromatina quedando en la fracción del sobrenadante, mientras que en el sedimento permanecieron las histonas del "core" nucleosomal. Finalmente, tras lavar el sedimento con el mismo medio, las histonas fueron obtenidas mediante extracción con HCl 0.25 M y posterior precipitación con acetona tal como se ha descrito anteriormente.

B.2.- Extracción de histonas de levadura.

La obtención de histonas de levadura se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Sommer (1978).

Para ello, la levadura prensada de la marca Hércules se lavó dos veces en un tampón hipotónico formado por tris-HCl 25 mM, MgSO_4 10 mM, EDTA 0.5 mM, Na HSO_3 40 mM, PMSF 1 mM pH 7.4, recogiendo las células en cada lavado por centrifugación a

3000xg durante 5 min. El sedimento final se resuspendió posteriormente en el mismo medio a razón de 1.2 g de células /ml de medio, y se introdujo en una botella que contenía perlas de vidrio de 0.45-0.60 mm de diámetro, en una proporción de 10 a 1 respecto al peso de levadura. La mezcla se agitó verticalmente durante 2 min a 4 °C, siendo la amplitud de cada oscilación de aproximadamente 50 cm, y el contenido de la botella se filtró a través de una gasa de 200 μ de tamaño de poro a fin de separar las perlas de vidrio. El filtrado se centrifugó a 12000xg 20 min, apareciendo en el sedimento dos capas, de las cuales la inferior, de color blanquecino, estaba formada fundamentalmente por membranas y células sin romper, y la superior, de color más oscuro, contenía la mayor parte de la cromatina. Esta última capa se recogió con ayuda de una espátula, se lavó dos veces con el mismo tampón y posteriormente se volvió a lavar otras dos veces más con un medio que contenía sacarosa 0.3 M y triton X-100 0.5% disueltos en el tampón hipotónico. Tras centrifugar esta suspensión a 27000xg 30 min, la cromatina se resuspendió en el mismo tampón y se depositó sobre 3 volúmenes de una solución de sacarosa 1.7 M en tampón hipotónico, centrifugándose finalmente a 30000xg durante 30 min. El sedimento, así obtenido, se lavó dos veces con tampón hipotónico y otras dos veces con una mezcla de alcohol etílico 88% y HCl 10 mM, recogándose la cromatina purificada en estos lavados a 12000xg, 15 min.

Las histonas se obtuvieron mediante extracción ácida de la cromatina tal y como se describe en el apartado 8.1.

El grado de pureza de las histonas se determinó mediante

electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, en las condiciones descritas en el apartado 14.1

9) OBTENCION DE HMG's.

9.1.- HMG de eritrocito.

Las HMG de eritrocito se obtuvieron a partir de núcleos de eritrocito por extracción con ácido perclórico, según el método descrito por Nicolas y Goodwin (1982). La suspensión de núcleos obtenida como se detalla en el apartado 8.1, se llevó a 0.74 M en ácido perclórico y se centrifugó a 9000xg durante 10 min. El sobrenadante se recogió, guardándose en frío, y el sedimento se extrajo de nuevo con dicho ácido. A los dos sobrenadantes reunidos se les añadió TCA hasta el 2% de concentración final y se agitaron vigorosamente para permitir la precipitación completa de las LMG (Low Mobility Group). La suspensión se centrifugó a 9000xg durante 10 min y el sobrenadante se llevó a una concentración 10 mM en 2-mercaptoetanol. Posteriormente se añadieron 0.5 ml de NH_4OH al 25% (v/v) para llevar la solución a un pH aproximado de 10, y seguidamente 3 volúmenes de acetona fría. Las HMG precipitadas se recogieron por centrifugación a 9000xg por espacio de 10 min, se lavaron dos veces con acetona acidificada (6 volúmenes de acetona para 1 volumen de HCl 0.1

M), tres veces más con acetona y fueron finalmente secadas a vacío. Las HMG fueron fraccionadas posteriormente mediante cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sephadex G-25. Para ello la fracción de HMG obtenida se disolvió en tampón borato sódico 75 mM, NaCl 0.1 M pH 8.8 y se aplicó en una columna de 2.4 x 70 cm de CM-Sephadex equilibrada previamente en el mismo tampón. Tras lavar la columna con 300 ml de tampón, las proteínas se eluyeron con 2 l de un gradiente continuo de NaCl 0.1-0.75 M en tampón borato sódico a un flujo de 45 ml/h. Las fracciones recogidas se dializaron frente a alcohol etílico 60% (v/v), HCl 10 mM y se precipitaron con 6 volúmenes de acetona. Los precipitados se lavaron posteriormente dos veces con acetona acidificada, tres veces con acetona y se secaron finalmente a vacío.

9.2.- HMG de levadura.

La extracción de HMG de levadura se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Weber e Iseberg (1980). La cromatina, obtenida según se describe en el apartado 8.2, se resuspendió en 3 volúmenes de tampón tris-HCl 1 mM, NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, PMSF 0.7 mM pH 7.5 y se centrifugó a 9000xg durante 10 min. Esta operación se repitió una vez más y el sedimento final se resuspendió, con ayuda de un homogeneizador Potter-Elvehjem, en 2 volúmenes de tampón tris-HCl 1 mM, NaCl

0.35 M, PMSF 0.7 mM, pH 7.0. La suspensión se mantuvo en agitación suave 1 h, centrifugándose a continuación a 9000xg durante 10 min. El sobrenadante se recogió y el sedimento se resuspendió de nuevo en 1 volúmen del mismo tampón, manteniéndose en agitación durante 30 min, y centrifugándose posteriormente. Los dos sobrenadantes se reunieron, añadiéndose TCA hasta el 2% y se procedió del mismo modo a como se describe en el apartado anterior.

10) ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMATICA HD.

La cuantificación de la actividad histona desacetilasa se llevó a cabo mediante extracción de los grupos acetilo liberados por la acción del enzima con acetato de etilo, según el procedimiento descrito por Cousens *et al.* (1979).

La incubación se realizó con 100 μ l de las fracciones enzimáticas en presencia de 80 μ g de histonas marcadas radiactivamente (120000 dpm totales) obtenidas como se describe en el apartado 7, en un volúmen final de 110 μ l, siendo el tiempo y la temperatura de incubación de 1 h y 32 °C respectivamente. Las condiciones óptimas del ensayo en cuanto a pH, fuerza iónica y concentración de sustrato fueron las descritas previamente por Sánchez del Pino (1987). Tras el período de incubación la reacción se paró llevando la mezcla a una concentración final de HCL 0.25 M y ácido acético 0.1 M

mediante la adición de una solución concentrada. Posteriormente se añadió a la mezcla 700 μ l de acetato de etilo, agitándose vigorosamente en un vortex, dejándose en reposo 10 min. Después de centrifugar a 3000xg durante 5 min, se recogieron 500 μ l de la fase orgánica superior y se introdujeron en viales conteniendo 10 ml de cocktail de centelleo líquido Normascint 22.

11) OBTENCION DE MONONUCLEOSOMAS Y OLIGONUCLEOSOMAS POR DIGESTION CON NUCLEASA DE MICROCOCO.

Los mononucleosomas y oligonucleosomas fueron obtenidos a partir de núcleos de eritrocito según el método descrito por Simpson (1978) basado a su vez en el de Whitlock y Simpson (1976), con algunas modificaciones.

Los núcleos de eritrocito marcados radiactivamente o no, obtenidos como se describe en el apartado 8.1, fueron resuspendidos en tampón de digestión formado por sacarosa 0.25 M, tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 1 mM pH 8.0 a razón de 1.25×10^7 núcleos/ml y adicionándose posteriormente 300 unidades de nucleasa de micrococo por ml de medio. La suspensión se incubó a 37 °C en agitación suave durante 30 min, para la obtención posterior de mononucleosomas, o durante 10 min si se deseaban obtener oligonucleosomas. Tras el período de incubación correspondiente la reacción se paró, adicionando a la mezcla

EDTA hasta una concentración final de 20 mM. Los núcleos digeridos se recogieron por centrifugación a 3000xg durante 15 min, lisándose con EDTA 0.25 mM pH 7.0, y se dializaron frente a esta solución durante una noche. La suspensión fue posteriormente centrifugada a 10000xg durante 10 min. El sobrenadante fue aplicado en las condiciones descritas en el apartado 4.4 en una columna de ultrogel AcA34, equilibrada en tampón B (pág. 65), 35 mM en NH_4Cl , a fin de separar los mononucleosomas y oligonucleosomas de las posibles histonas y oligonucleótidos liberados durante la digestión con nucleasa de micrococo.

Las fracciones que contenían los nucleosomas se recogieron y concentraron en una célula de ultrafiltración a través de membrana de 30000 MWCo, utilizándose de este modo como sustrato de los enzimas HAT o HD.

A fin de determinar la integridad de los nucleosomas tras la incubación con los enzimas, se depositó la mezcla de reacción con HAT o HD (apartados 5 y 9 respectivamente) sobre un gradiente de sacarosa del 5 al 30% (p/v) disuelto en tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM pH 8.0, centrifugándose a 25000 rpm durante 15 horas en un rotor basculante Beckman SW 55.2 Ti. El tamaño del DNA de las fracciones del gradiente se determinó según el procedimiento descrito en los siguientes apartados.

12) EXTRACCION DE DNA.

Las muestras digeridas con nucleasa de micrococo u obtenidas por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (apartado 11), fueron llevadas a concentraciones finales de SDS 1% (p/v) y EDTA 10 mM, digiriéndose con proteinasa K (100 µg/ml) durante 1 noche a temperatura ambiente. Tras este período las muestras se desproteinizaron por adición de 1 volumen de fenol, seguido de agitación vigorosa y centrifugación a 12000xg durante 10 min. Posteriormente se recogió la fase acuosa, en la que se encuentra el DNA y se repitió este tratamiento hasta que no apareció ningún material en la interfase. La fase acuosa final fue extraída con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y finalmente con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v).

Tras la extracción, la muestra fue llevada hasta una concentración final de 100 mM en NaCl y se precipitó el DNA con 2 volúmenes de alcohol etílico absoluto o 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico manteniéndose a -20 °C durante al menos 2 h. El DNA precipitado fue recogido por centrifugación a 12000xg por espacio de 15 min, se lavó con alcohol etílico 70% (v/v) secándose finalmente a vacío.

13) ELECTROFORESIS EN AGAROSA.

A fin de determinar el tamaño de DNA de los mononucleosomas y oligonucleosomas obtenidos en el apartado 11, fueron realizadas electroforesis en agarosa según el método descrito por Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron para ello geles de agarosa de 1.8% (p/v) en tampón TBE (tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8.3) y de dimensiones 15 x 10 x 0.5 cm. Las electroforesis se realizaron con el gel sumergido en el mismo tampón a 4 °C y 100 V durante 3-4 h.

Las muestras de DNA obtenidas como se describe en el apartado anterior, se disolvieron en tampón TBE suplementado con glicerol 5% (v/v), azul de bromofenol 0.05% (p/v) y xilencianol 0.05% (p/v) usando como patrón de pesos moleculares una muestra del plásmido pBR 322 digerida con el enzima de restricción HpaII (fragmentos de 622, 527, 404, 309, 242 y 160 pb).

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio a 1 µg/ml disuelto en TBE durante 30 min, destiñéndose posteriormente en TBE durante otros 30 min más. Para fotografiar los geles se utilizó un transiluminador ultravioleta a 300 nm y una cámara Polaroid MP4 cargada con negativos Agfapan 200 profesional de 9 x 12 cm a través de un filtro ultravioleta convencional y un filtro Kodak Wratten núm. 22.

14) ELECTROFORESIS Y TRATAMIENTO FLUOROGRAFICO DE LAS HISTONAS.

El estudio de las histonas marcadas por las HAT con [1-¹⁴C] acetil CoA o de las [³H] acetilhistonas desacetiladas por las HD, se realizó mediante separación de las proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Lammly, 1970) o en presencia de tritón X-100-ácido acético-urea (Alfageme *et al.* 1975) y posterior análisis fluorográfico de los geles (Laskey y Mills, 1975).

El marcaje de las histonas con los enzimas HAT se realizó en presencia de 0.1 μ Ci de [1-¹⁴C] acetil CoA e incubando la mezcla durante 15 min a 37 °C, mientras que las [³H] acetilhistonas se incubaron con la HD a 32 °C durante 1 h. Tras el periodo de incubación correspondiente las proteínas fueron precipitadas por adición de TCA hasta una concentración del 25%.

En el caso de la incubación con mononucleosomas u oligonucleosomas, previamente a la precipitación con TCA las histonas fueron extraídas con HCl 0.25 M, dejándose la suspensión en frío una noche, y centrifugándose finalmente a 12000xg 15 min. Al sobrenadante así obtenido se le adicionó TCA hasta la mencionada concentración.

Las histonas precipitadas fueron lavadas dos veces con TCA 25%, dos veces con acetona-HCl (70:1, v/v), dos veces más con acetona, secándose finalmente a vacío.

14.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

En este método el gel consta de dos capas de composición diferente; el gel inferior o separador, formado por acrilamida al 15% (p/v), bisacrilamida 0.4% (p/v), tris-HCl 0.4 M, SDS 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.1% (p/v) y TEMED 0.2% (v/v), pH 8.8, y el gel superior o concentrador compuesto por acrilamida 5% (p/v), bisacrilamida 0.2% (p/v), tris-HCl 0.125 M, SDS 0.1% (p/v), persulfato amónico 0.1% (p/v) y TEMED 0.2% (v/v) a pH 6.8.

Las muestras se disolvieron en tampón tris-HCl 60 mM, SDS 3% (p/v) y glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 4% (v/v) y azul de bromofenol 0.01% (p/v) pH 6.8, realizándose la electroforesis en una solución de tris 25 mM, SDS 0.1% (p/v) y glicina 0.2 M a 32 mA, durante 7 h para geles de 15 x 15 cm y 1 mm de espesor.

La tinción de los geles se llevó a cabo con azul Coomassie R-250 0.1% (p/v) en metanol 46% (v/v) y ácido acético 8% (v/v) durante 4 h, y fueron desteñidas posteriormente con una mezcla de ácido acético 5% (v/v) y metanol 20% (v/v).

14.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-TAU.

En este tipo de electroforesis el gel inferior está formado por acrilamida 12% (p/v), bisacrilamida 0.08% (p/v), persulfato amónico 0.1% (p/v), TEMED 0.5% (v/v), ácido acético 5% (v/v), triton X-100 0.45% (v/v) y urea 8 M, mientras que la composición del gel superior es acrilamida 7.5% (p/v), bisacrilamida 0.05% (p/v), persulfato amónico 0.25% (p/v), TEMED 0.5% (v/v), ácido acético 5% (v/v), triton X-100 0.45% (v/v) y urea 8 M. El tamaño del gel fue de 25 x 15 cm y de 1 mm de espesor.

El gel de poliacrilamida se sometió a preelectroforesis en ácido acético 5% (v/v) para eliminar el exceso de TEMED y persulfato amónico a 200 V hasta que no se observó variación en el miliamperaje que atraviesa el gel. Posteriormente se aplicaron 200 µl de 2-mercaptoetilamina 1 M a cada pocillo y se realizó una segunda preelectroforesis durante 45 min a 140 V para eliminar la presencia de radicales libres.

Las muestras se disolvieron en ácido acético 5% (v/v), urea 4 M, 2-mercaptoetanol 4% (v/v) y pironina 0.01% (p/v), realizándose la electroforesis a 230 V durante 20 h. Los geles se tiñeron con azul Coomassie y se destiñeron posteriormente en las condiciones descritas en el apartado anterior.

Más tarde los geles fueron fotografiados usando un transiluminador y una cámara Polaroid MP4 cargada con negativos Agffapam 200 profesional de 9 x 12 cm.

14.3.- Tratamiento fluorográfico de las histonas marcadas.

Los geles desteñidos como se detalla en el apartado anterior se sumergieron durante 30 min en Amplify, secándose a continuación sobre papel Whatman núm. 3 a vacío en un secador de geles LKB por espacio de 45 min. Los geles ya secos se pusieron en contacto con películas autorradiográficas Hiperfilm MP y se desarrollaron las fluorografías a -80°C en oscuridad durante periodos comprendidos entre 1 y 4 semanas, dependiendo de la radiactividad presente en los geles. Finalmente las placas fotográficas se revelaron con revelador Kodak D-19 durante 15 min a 20°C .

La marca incorporada a las histonas se cuantificó mediante análisis de la película por un analizador de imágenes IBAS 2000 de Kontron, determinándose la densidad óptica integrada (D.O.I.) de las mismas, uniformándose este valor respecto a la cantidad presente de cada histona en el gel teñido con azul Coomassie.

15) TECNICAS ANALITICAS.

15.1.- Valoración de DNA.

Para la valoración del DNA se utilizó el procedimiento espectrofluorimétrico descrito para levadura por Szent-Giorgi e Iseberg (1983) basado a su vez en el de Labarca y Paigen (1980). Este método no posee interferencias debidas a la presencia de RNA en los extractos.

El ensayo fue realizado mezclando 3 ml de tampón NaCl 2 M, EDTA 2 mM, fosfato sódico 50 mM, pH 7.4, con 15 μ l de una disolución de bisbenzimidazol 0.2 mg/ml en agua y añadiendo 40 μ l de las muestras a valorar. La fluorescencia producida se midió a 458 nm con rendija de 4 nm en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPH 44B, excitando la muestra a 356 nm y con rendija de excitación de 10 nm. La curva patrón en la que se interpolan los valores de fluorescencia de las muestras se realizó con DNA de testículo de salmón entre 1 y 25 μ g/ml.

15.2.- Valoración de proteínas.

La valoración de proteínas se realizó utilizando el reactivo azul de bromofenol según el método descrito por Flores

(1978).

La disolución de azul de bromofenol se preparó disolviendo 75 mg de azul de bromofenol en 25 ml de ácido acético glacial y añadiendo 150 ml de alcohol etílico 95%, completándose con agua destilada hasta 1 l. Dicha solución permanece estable durante al menos 1 semana, conservada en oscuridad.

El ensayo se realizó adicionando a 300 μ l de las muestras a valorar, 2.7 ml del reactivo azul de bromofenol, agitándose vigorosamente de inmediato y midiéndose la absorbancia a 610 nm. La coloración obtenida permanece estable durante al menos 8 h. Para obtener una curva patrón se utilizó BSA al 0.1%, ajustada espectrofotométricamente considerando, según Bradford (1976), un valor de $\epsilon_{0.1\%}^{610 \text{ nm}}$ de 0.66. En el intervalo de medida de 0 a 80 μ g se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras de proteínas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para poder conocer que función o funciones se pueden atribuir realmente a la acetilación de las histonas en los organismos eucarióticos es recomendable realizar previamente un estudio, que hasta el momento es fragmentario y confuso, sobre la totalidad de los enzimas responsables de la acetilación y desacetilación de las histonas *in vivo*. La purificación parcial de estos enzimas permitirá, además, disponer de unas herramientas eficaces para poder resolver objetivos posteriores.

1) PROCEDIMIENTOS DE LISIS CELULAR.

Como paso inicial para intentar determinar la presencia de los diferentes isoenzimas HAT en *Saccharomyces cerevisiae* es preciso determinar el procedimiento de lisis celular que rinda una actividad enzimática total máxima, procurando además emplear métodos que permitan confiar en la recuperación de la totalidad de los enzimas HAT y HD presentes en levadura.

Se han utilizado para este fin, tal como se describe en el apartado 2 de materiales y métodos, tres procedimientos de lisis celular: la rotura mediante agitación con perlas de vidrio de las células de levadura, la lisis en tampón hipotónico de protoplastos obtenidos por digestión de la pared celular con Novozym y la rotura de los núcleos obtenidos a partir de protoplastos formados por digestión con β -glucuronidasa-arilsulfatasa, determinándose en cada caso la

Tabla II.- Actividad enzimática total por g de levadura, obtenida por diferentes procedimientos de lisis celular. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	DPM TOTAL ($\times 10^3$) /g células	DPM BLANCO ($\times 10^3$) /g células	DPM ENZIMATICO ($\times 10^3$) /g células	%ACTIVIDAD OBTENIDA RESPECTO A LA MAXIMA
EXTRACTO I :				
AGITACION CON PERLAS DE VIDRIO	(2.98 \pm 0.13)	(1.86 \pm 0.11)	(1.12 \pm 0.24)	3.2
EXTRACTO II :				
PROTOPLASTOS				
II.1.- SIN SONICACION	(27.78 \pm 0.90)	(6.44 \pm 0.45)	(21.34 \pm 1.35)	61.3
II.2.- SONICACION A 125 W, 4x30 s	(40.38 \pm 0.24)	(5.57 \pm 0.19)	(34.81 \pm 0.43)	100.0
EXTRACTO III :				
NUCLEOS				
III.1.- CON FICOLL 18%	(1.43 \pm 0.23)	(0.84 \pm 0.14)	(0.59 \pm 0.37)	1.7
III.2.- CON TAMPON NB	(3.65 \pm 0.19)	(1.11 \pm 0.15)	(2.54 \pm 0.33)	7.3

actividad enzimática total obtenida por gramo de levadura. También se ha estudiado el efecto de la sonicación de los protoplastos lisados sobre el rendimiento enzimático (tabla II).

Para la obtención de núcleos a partir de protoplastos se ha utilizado β -glucuronidasa-arilsulfatasa, ya que por este procedimiento los núcleos obtenidos poseen una mayor estabilidad que los que se obtienen por tratamiento con Novozym. En la purificación de los núcleos se han utilizado dos procedimientos alternativos: el descrito por Lohr y Ide (1977), utilizando Ficoll 18% para la lisis de los protoplastos, y el descrito por Nelson y Alonso (1986), que utilizan triton X-100 al 0.8% para solubilizar la membrana plasmática (tampón NB). Este último procedimiento es el que conduce a un rendimiento nuclear superior.

El procedimiento por el que se obtuvo una mayor actividad enzimática total fue el de lisis de los protoplastos en tampón hipotónico (tabla II). De los extractos obtenidos de esta forma (II-1 y II-2), el que fue posteriormente sonicado posee casi un 40% más de actividad respecto al extracto no sonicado. En los casos en los que se realiza una purificación previa de los núcleos, el rendimiento enzimático es sensiblemente menor, de un 7.33% mediante lisis de los protoplastos en tampón NB, e inferior, sólo un 1.7%, empleando en ésta el Ficoll al 18%.

El método más apropiado por tanto para la obtención de la actividad enzimática total sería la lisis de los protoplastos con posterior sonicación en el que, además, a diferencia de los procedimientos con purificación previa de los núcleos, no se

excluye del extracto los posibles enzimas citoplasmáticos, pudiendo estar por tanto presentes todos los isoenzimas de levadura.

2) OBTENCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS CRUDAS HAT.

Han sido descritos distintos procedimientos para la obtención de actividades HAT en distintos organismos eucarióticos. Algunos autores han sugerido, sin embargo, que determinados métodos, especialmente aquellos en los que los extractos enzimáticos se someten a fuerzas iónicas o concentraciones proteicas elevadas, producen la pérdida de una importante fracción de dicha actividad (Wiegand y Brutlag, 1981; Wiktorowicz y Bonner, 1982; Travis *et al.*, 1984). Por ello, en el presente trabajo se han probado diversos procedimientos para determinar en cual de ellos se obtiene una mayor actividad total HAT. Pese a esto, se han utilizado en posteriores etapas de purificación aquellas fracciones obtenidas por los distintos métodos en los que existe actividad enzimática, eludiendo de este modo la posibilidad de que en el procedimiento con mayor rendimiento no sea extraído, o sea desnaturalizado irreversiblemente, alguno(s) de los isoenzimas HAT presentes en levadura.

2.1.- Precipitación con acetona.

El procedimiento de precipitación con acetona a -20°C , fue descrito por Vidali et al. (1972), para la obtención de la actividad histona desacetilasa (HD) de timo de ternera. En nuestro estudio, los resultados de la precipitación de la actividad de HAT de levadura indican que este procedimiento conduce a la desnaturalización irreversible de las histona acetiltransferasas, por lo que se ha descartado su utilización como agente precipitante de estas enzimas en levadura.

2.2.- Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y fraccionamiento con distintos porcentajes de saturación.

Los resultados de precipitación de la actividad enzimática HAT con el 90% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y de cuantificación de la cantidad de DNA, mediante determinación espectrofluorimétrica con bisbenzimidazol, y de RNA, determinado por espectrofotometría a 260 nm, se resume en la tabla III. En dicha tabla podemos observar que la precipitación con sulfato amónico conduce a un aumento importante de la actividad total HAT respecto a la del extracto inicial. Ello sería debido posiblemente a la eliminación de algún inhibidor endógeno de los enzimas durante esta etapa de purificación. Diversos autores han

Tabla III.- Precipitación de la actividad histona acetiltransferasa con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL (dpm ($\times 10^3$))/g células)	[DNA] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	[RNA] (mg/ml)	mg DNA TOTAL /g células	mg RNA TOTAL /g células
EXTRACTO CRUDO	(14.62 \pm 1.19)	371	7.19	1.64	31.79
PRECIPITACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(68.46 \pm 0.97)	181	3.55	0.53	10.37

sugerido que este inhibidor podría ser fragmentos pequeños de DNA, los cuales, mediante interacciones con las histonas, harían a éstas inaccesibles a las acetiltransferasas (Cano y Pestaña, 1976; Wong, 1980; Kelner y Mc Carty, 1984). En nuestro caso la cuantificación de DNA y RNA indica una importante reducción, casi un 70% respecto al inicial, lo cual podría estar de acuerdo con el incremento observado en la actividad HAT total.

Por otro lado, a fin de determinar con qué porcentaje de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se recoge una máxima actividad HAT, se han precipitado fracciones de protoplastos sonicados con 30, 50, 70 y 90% de saturación en esta sal (tabla IV). Los resultados presentados indican que con un 50% en sulfato amónico ya se recupera casi el 80% de la actividad obtenida con el 90% de saturación, aunque aumenta en este segundo caso en un 110% la cantidad de DNA existente respecto al primero. Sin embargo, es importante señalar que el valor de actividad HAT con el 90% de saturación estaría posiblemente infravalorado respecto a los demás puesto que en éste existe una proporción mayor de DNA y RNA. Por esta razón, y ya que nuestro objetivo es intentar detectar todas las posibles actividades HAT presentes en levadura, hemos preferido optar por el 90% de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, lo que nos garantiza una precipitación casi cuantitativa de las proteínas, incluyendo por tanto a todos los isoenzimas HAT presentes en el extracto.

Tabla IV.- Fraccionamiento de la actividad histona acetiltransferasa con diferentes porcentajes de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL (dpm ($\times 10^3$)/g células)	[DNA] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	[RNA] (mg/ml)	mg DNA TOTAL /g células	mg RNA TOTAL /g células
EXTRACTO CRUDO	(8.92 \pm 1.03)	513	3.92	9.60	73.32
PRECIPITACION CON 30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(8.87 \pm 0.89)	64	1.22	0.21	3.84
PRECIPITACION CON 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(77.50 \pm 7.52)	358	8.93	1.43	35.70
PRECIPITACION CON 70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(90.95 \pm 3.57)	559	7.53	2.82	38.05
PRECIPITACION CON 90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(99.66 \pm 1.59)	581	8.07	3.02	41.96

2.3.- Precipitación diferencial con el 10 y 20% de

PEG.

Belikoff et al. (1980) y Garcea y Alberts (1980) han utilizado la precipitación con polietilenglicol (PEG) de extractos crudos, con objeto de obtener actividades HAT en timo de ternera y hepatoma de rata respectivamente. Concretamente, precipitan con un 10% de PEG en presencia de NaCl 2 M, desechando el precipitado que contiene mayoritariamente los ácidos nucleicos. Posteriormente adicionan al sobrenadante PEG hasta el 20%, para recoger en el sedimento final la actividad HAT.

En levadura, nuestros resultados indican que la actividad enzimática se encuentra principalmente en el precipitado con el 10% (tabla V), quizás debido a que en esta fracción se halla casi el 80% del DNA del extracto crudo y que las HAT presentan posiblemente afinidad por estos ácidos nucleicos. En el precipitado del 20%, de cualquier modo, existe también una apreciable actividad acetiltransferasa, lo cual nos conducirá posteriormente al estudio de los isoenzimas presentes en ambos extractos.

Tabla V.- Precipitación diferencial de la actividad histona acetiltransferasa con el 10 y 20% de polietilenglicol. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TOTAL (dpm ($\times 10^3$)/g células)	[DNA] ($\mu\text{g/ml}$)	[RNA] (mg/ml)	mg DNA TOTAL /g células)	mg RNA TOTAL /g células
EXTRACTO CRUDO	(39.86 \pm 4.61)	662	14.92	3.87	86.87
10% DE PEG	(211.76 \pm 7.98)	1217	2.04	3.01	5.04
20% DE PEG	(15.88 \pm 5.92)	170	1.17	0.58	3.96

2.4.- Ultracentrifugación en presencia de NaCl.

Algunos autores han observado que en aquellos procesos en los que los enzimas se aíslan usando tampones de fuerza iónica elevada, el rendimiento de extracción es en general muy bajo (Wiktorowicz y Bonner, 1982; Wiegand y Brutlag, 1981).

Con objeto de determinar en levadura la mínima concentración salina necesaria para extraer una máxima actividad enzimática total, evitando de este modo, en lo posible, la exposición de la actividad HAT a fuerzas iónicas elevadas, se ha utilizado en dicha extracción concentraciones de NaCl de 0.5, 0.75, 1 y 2 M sobre una fracción de protoplastos no sonicados. La actividad HAT de los sobrenadantes obtenidos tras ultracentrifugar estas fracciones a 105000xg, 1 h, se incluyen en la tabla VI. En esta tabla podemos observar que a una concentración de 0.5 M de NaCl ya se obtiene prácticamente el máximo de actividad enzimática. Además, tanto en la extracción con 0.5 M como en la de 0.75 M de NaCl, se obtienen concentraciones de DNA muy bajas. Por tanto no se estaría infravalorando la actividad enzimática HAT extraída con 0.75 M de NaCl, respecto a la obtenida con 0.5 M debida a una distinta inhibición por el DNA. Así pues no se utilizaran concentraciones de NaCl superiores a 0.5 M para la extracción de las actividades HAT. Por otra parte, a fuerzas iónicas superiores, 1 y 2 M en NaCl, la actividad total disminuye respecto a la que existe a 0.5 M. Esto podría indicar que a esas concentraciones de sal se

Tabla VI.- Actividad histona acetiltransferasa en el sobrenadante de las ultracentrifugaciones a 105000xg, 1 h en presencia de concentraciones de NaCl variables. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL (dpm ($\times 10^3$)/g células)	[DNA] (μ g/ml)	[RNA] (mg/ml)	mg DNA TOTAL /g células	mg RNA TOTAL /g células
EXTRACTO CRUDO	(78.13 \pm 11.02)	225	68.0	15.00	453.33
0.50 M en NaCl	(320.06 \pm 16.13)	18	37.1	0.13	265.88
0.75 M en NaCl	(329.17 \pm 22.58)	32	45.2	0.23	323.93
1.00 M en NaCl	(314.83 \pm 12.90)	36	44.7	0.26	320.35
2.00 M en NaCl	(177.66 \pm 15.68)	50	23.8	0.36	170.57

estaría produciendo parcialmente la inactivación irreversible de dichos enzimas.

De los procedimientos de extracción utilizados en este apartado, en los que se obtiene una actividad enzimática apreciable, y que posteriormente serán estudiados con objeto de determinar los isoenzimas presentes, son: la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación, la precipitación diferencial con 10 y 20% PEG y la ultracentrifugación en presencia de NaCl 0.5 M. De entre ellos, éste último es el que posee un mayor rendimiento, si bien se debe tener en cuenta que es posible que los tres procedimientos conduzcan a la obtención de distintas HAT. Este efecto se produce, por ejemplo, en el caso de hígado de rata en el que usan estos procedimientos de extracción y en los que se observa la existencia de actividades HAT distintas entre sí (ver tabla I). Por tanto, puesto que nuestro objetivo es intentar determinar las actividades HAT presentes en levadura, utilizaremos, en posteriores etapas de purificación, los cuatro extractos obtenidos anteriormente.

Es importante señalar por otro lado, que en estos procedimientos se observa una mayor actividad enzimática total respecto a la medida en el extracto crudo inicial. Por ello, será necesario eliminar el inhibidor, posiblemente DNA y RNA, para poder así cuantificar la actividad HAT real, no inhibida por los ácidos nucleicos del extracto.

3) PURIFICACION DE HAT MEDIANTE CROMATOGRAFIAS DE ADSORCION, INTERCAMBIO IONICO Y AFINIDAD.

A fin, esencialmente, de eliminar los ácidos nucleicos de los extractos enzimáticos, se han probado diversos tipos de cromatografías en las condiciones descritas en el apartado 4 de materiales y métodos.

En este estudio se ha utilizado una fracción enzimática obtenida por precipitación con sulfato amónico, que constituye un procedimiento de extracción usado por diversos autores para aislar las acetiltransferasas en distintos organismos eucariotas. Además, esta fracción posee una proporción elevada de ácidos nucleicos que podrán ser cuantificados tras las cromatografías.

3.1.- Cromatografía de adsorción en hidroxapatito.

El uso de este tipo de cromatografía se basa en que los ácidos nucleicos son, en general, más fuertemente retenidos en la columna de hidroxapatito que las proteínas, por lo que se podría separar los enzimas HAT del DNA presente en el extracto.

En levadura, a pesar de que la actividad enzimática es retenida en la columna, la elución de las proteínas con un gradiente continuo de fosfato sódico 0-0.6 M se realiza junto a

una elevada proporción de ácidos nucleicos. Esto se debería probablemente a que en levadura existe una elevada proporción de RNA, como se muestra por ejemplo en la tabla IV. A esta desventaja se suma el hecho de que la cromatografía debe realizarse a unos 12 °C para evitar la precipitación del fosfato en el interior de la columna. Durante la cromatografía esta temperatura favorece en gran medida la acción de las proteasas presentes en los extractos crudos, que en levadura son especialmente abundantes, lo cual reduce sensiblemente el rendimiento de obtención de los enzimas HAT.

Estos dos inconvenientes desaconsejan utilizar la cromatografía en hidroxapatito para el estudio de las actividades histona acetiltransferasa en levadura.

3.2.- Cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sepharose CL-6B.

Este tipo de cromatografía ha sido utilizado con objeto de que al poseer cargas negativas, el DNA y RNA presentes, no quedarían retenidos en la columna, mientras que los enzimas podrían serlo si poseyesen dominios de carga neta positiva, separando de este modo ambas especies. En nuestro caso la aplicación se realizó a pH 7.0, eluyéndose las proteínas retenidas con un gradiente de pH 7.0-9.5, tal como se describe en el apartado 4.2.1 de materiales y métodos. Tras ajustar el pH

de las fracciones recogidas, se cuantificó la actividad HAT de las mismas, observándose que, en las condiciones descritas, la actividad acetiltransferasa de levadura no queda retenida en dicha columna. Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por Travis *et al.* (1984), ya que la actividad obtenida por estos autores en levadura si es retenida en columnas de Bio-Rex 70, eluyendo a pH 9.0 a una fuerza iónica de 260 mM en NaCl. Esta diferencia podría ser debida a que estos autores utilizan una fracción enzimática previamente purificada, mientras que en nuestros ensayos se aplican extractos más o menos crudos. Posiblemente la actividad acetiltransferasa pueda no quedar retenida, por coeluir con la fracción de ácidos nucleicos debido a su afinidad por éstos.

3.3.- Cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sepharose.

En este tipo de cromatografías, los ácidos nucleicos quedan retenidos más fuertemente, por las cargas positivas del gel, que las proteínas. Mediante un fraccionamiento se podría pues separar la actividad HAT del DNA y RNA existentes. Para ello, se aplicó una fracción precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación, en una columna 3x18 cm de DEAE-Sepharose, en las condiciones descritas en el apartado 4.2.2 de materiales y métodos. Los resultados de la elución de la columna con una

Tabla VII.- Actividad histona acetiltransferasa en la fracción enzimática cromatografiada en columna de DEAE-Sepharose (1.8 x 15 cm) eluida con NH₄Cl 0.35 M en tampón B. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	ACTIVIDAD ENZIMATICA TOTAL (dpm (x10 ³)/g células)	[DNA] (μg/ml)	[RNA] (mg/ml)	mg DNA TOTAL /g células	mg RNA TOTAL /g células
EXTRACTO CRUDO	(17.27 ± 2.15)	465	8.95	2.43	46.78
PRECIPITACION CON (NH ₄) ₂ SO ₄ AL 90%	(80.91 ± 1.12)	227	4.47	0.79	17.68
ELUCION CON 0.35 M DE NH ₄ Cl EN DEAE-SEPHAROSE	(201.36 ± 3.27)	18	0.32	0.14	2.43

fuertza iónica 0.35 M en NH_4Cl (tabla VII), ponen de manifiesto que en esta cromatografía se puede eliminar el 92% del DNA y el 82% del RNA presentes en el extracto. En el lavado existe también una incorporación de radiactividad importante, aunque, como posteriormente se comprobará, se trata de una actividad acetiltransferasa no específica para histonas.

La actividad HAT en el eluido es casi 2.5 veces superior a la del precipitado con sulfato amónico, y más de 11 veces mayor que la del extracto crudo. Ya que en ambas etapas de purificación se reduce drásticamente la cantidad de DNA y RNA, estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis del posible efecto inhibitor de los ácidos nucleicos sobre la actividad HAT.

3.4.- Cromatografía de afinidad en DNA-celulosa.

Algunos autores (Belikoff *et al.*, 1980; Böhm *et al.*, 1980; Estrepa y Pestaña, 1983) han utilizado cromatografías en DNA-celulosa para la separación y purificación de actividades HAT de diversos organismos eucarióticos. El DNA y RNA no son retenidos en esta cromatografía, eluyendo en la fracción del lavado.

Para determinar si este efecto se produce también en levadura, se aplicó una fracción proteica (obtenida por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) en una columna 1x8 cm de

DNA-celulosa de doble cadena (materiales y métodos, apartado 4.3). Los resultados indican que la actividad HAT no parece tener, en las condiciones descritas, afinidad por el DNA puesto que es recuperada junto con los ácidos nucleicos en el lavado de la columna. Estos resultados son similares a los descritos por Travis et al. (1984), en los que la actividad enzimática aislada de cromatina de levadura tampoco es retenida en este tipo de cromatografía.

De este apartado se puede concluir que, de todos los tipos de cromatografías estudiados, la realizada en DEAE-Sepharose es en la que mejores resultados se obtienen, tanto en la eliminación de los ácidos nucleicos presentes, como en la retención de la actividad histona acetiltransferasa. Por todo ello se utilizará fundamentalmente esta cromatografía para el análisis de las actividades isoenzimáticas HAT presentes en Saccharomyces cerevisiae.

4) DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE ENSAYO Y DE OBTENCION DEL MAXIMO DE ACTIVIDAD HAT EN LA CURVA DE CRECIMIENTO.

Se han realizado estudios para conocer el pH, temperatura y tiempo más apropiados para los ensayos enzimáticos, así como la influencia de la concentración salina en el tampón de incubación



sobre la actividad histona acetiltransferasa. Se ha utilizado, en estos estudios, una fracción enzimática obtenida por elución con NH_4Cl 0.35 M de una columna de DEAE-Sepharose a la que se había aplicado una fracción proteica precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Asimismo se ha estudiado la influencia que ejercen el pH y la fuerza iónica sobre la acetilación química, con el fin de establecer las condiciones más apropiadas para eliminar la incidencia de ésta en los ensayos de actividad enzimática.

Finalmente, se ha determinado el tiempo de cultivo de la levadura al cual se obtiene un máximo de actividad total histona acetiltransferasa.

4.1.- Determinación de las condiciones de ensayo.

4.1.1.- Variación de la actividad HAT con el pH.

Para determinar el pH óptimo de incubación se estabilizaron alícuotas de la fracción enzimática, mediante cromatografía en Sephadex G-25, a pH comprendidos entre 7.0 y 9.1. La figura 2 muestra los resultados de los ensayos de actividad HAT de los eluidos de estas columnas. En dicha figura se puede observar un pH óptimo de incubación entre 7.3 y 7.6, cuando se realizan los ensayos a 37 °C. Hay que indicar, sin embargo, que el pH del tampón tris-HCl posee una acusada dependencia con la

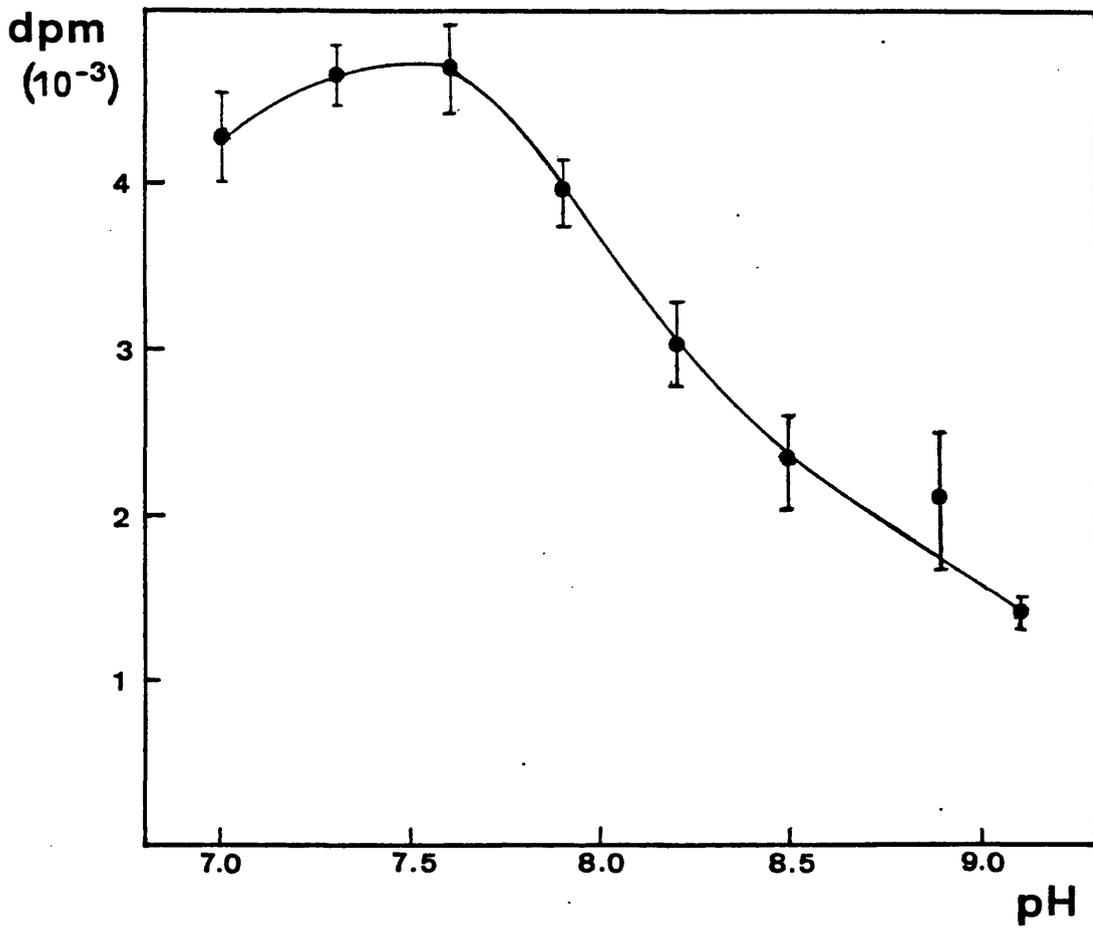


Figura 2.- Variación de la actividad histona acetiltransferasa de levadura en función del pH. Los valores representan la media de tres ensayos independientes realizados a 37 °C, durante 20 min.

temperatura, y que el valor obtenido a 37 °C se corresponde con un pH entre 7.8 y 8.0 a 4 °C. Por tanto, el pH a que se eluyeron las columnas de DEAE-Sepharose correspondientes, para obtener los enzimas en las condiciones óptimas de ensayos, será de 7.9 (ver apartado 5.2 de materiales y métodos).

Un pH óptimo cercano al neutro, como el indicado para la actividad HAT de levadura, concuerda con lo observado por Wong y Patton (1985) para la acetiltransferasa nuclear de timo de ternera, a la que parece inhibir tanto la presencia de cationes como de aniones. Según estos autores, esto podría sugerir que los sitios de interacción del centro activo con los sustratos deben poseer cargas positivas y cargas negativas, lo cual responde, seguramente, al carácter básico de las histonas y a la presencia en el acetil CoA de tres cargas negativas a pH neutro.

El valor de pH óptimo en levadura es similar al descrito para la actividad HAT obtenida en hígado de cerdo (Kelner y McCarty, 1984) y en hígado de rata (Wiktorowicz y Bonner, 1982), siendo superior el encontrado para esta actividad en Artemia salina (Cano y Pestaña, 1979) y en Drosophila melanogaster (Wiegand y Brutlag, 1981), ambos con valores alrededor de 8.5.

4.1.2.- Variación de la actividad enzimática con la temperatura de incubación.

En la figura 3 se representan los resultados obtenidos de

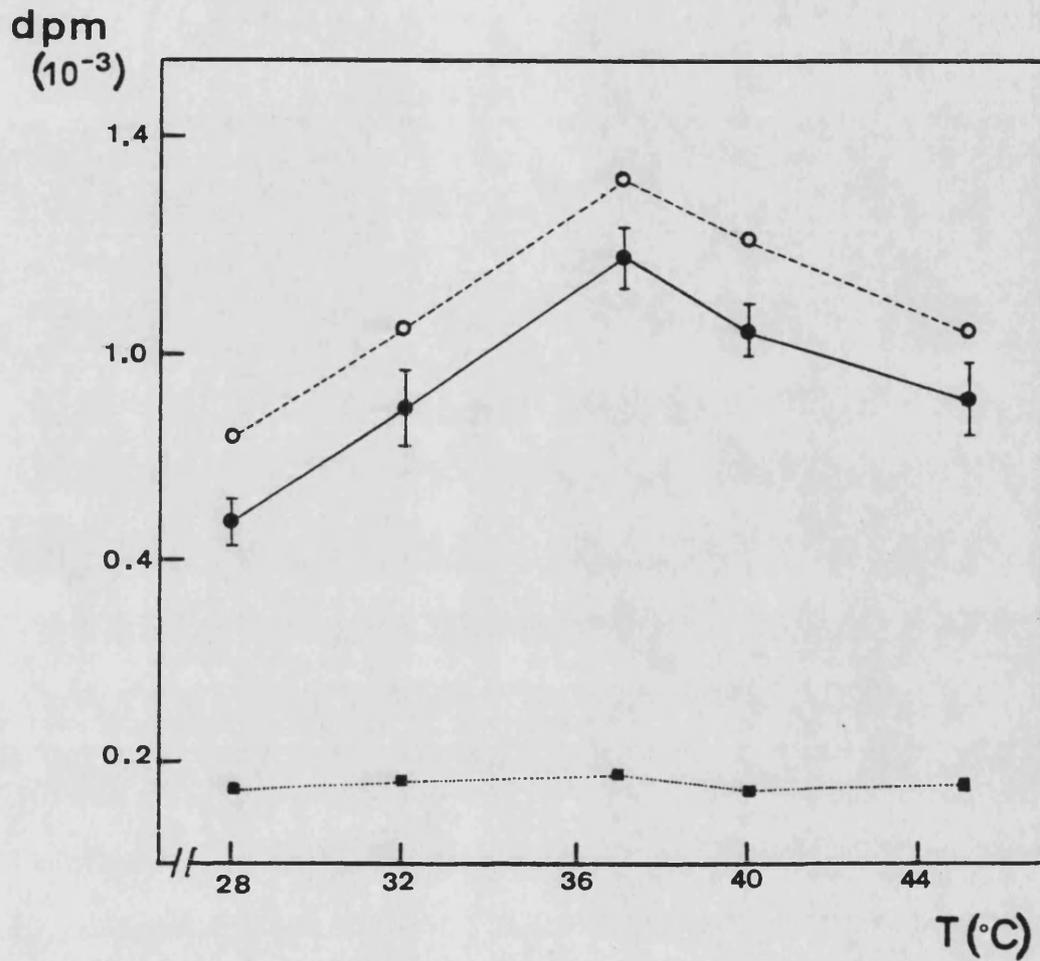


Figura 3.- Efecto de la temperatura de incubación sobre la actividad histona acetiltransferasa de levadura. (o-----o) actividad total; (●—●) actividad enzimática; (■.....■) controles (fracciones enzimáticas calentadas a 70 °C durante 10 min). Cada valor representa la media de tres ensayos independientes incubados a pH 7.9, durante 20 min.

actividad HAT en función de la temperatura a la que se realiza el ensayo. Asimismo en dicha figura se ha representado la incorporación de radiactividad en los controles, en los que la actividad enzimática es inactivada a 70 °C durante 10 min, en función de la temperatura. De esta gráfica se desprende que la temperatura óptima para los ensayos de actividad es de alrededor de 37 °C. Este valor es sensiblemente superior al observado por Travis et al. (1984), que describen una temperatura óptima de 25 °C para la HAT obtenida a partir de cromatina de levadura comercial prensada.

4.1.3.- Tiempo de incubación.

La cuantificación de la actividad enzimática frente al tiempo de incubación de los ensayos se realizó como se describe en el apartado 5.1 de materiales y métodos, incubando la mezcla durante 5, 10, 20, 30, 45, 60 y 75 min respectivamente (fig. 4). En base a los resultados representados en esta gráfica, el tiempo elegido como el más apropiado para la incubación es de 20 min, puesto que a tiempos superiores la incorporación de radiactividad no excede del 10% de la incorporación durante este tiempo.

Por tanto, los ensayos de actividad HAT que se describen más adelante, se llevan a cabo según el procedimiento indicado en el apartado 5.1 de materiales y métodos, a un pH de 7.9

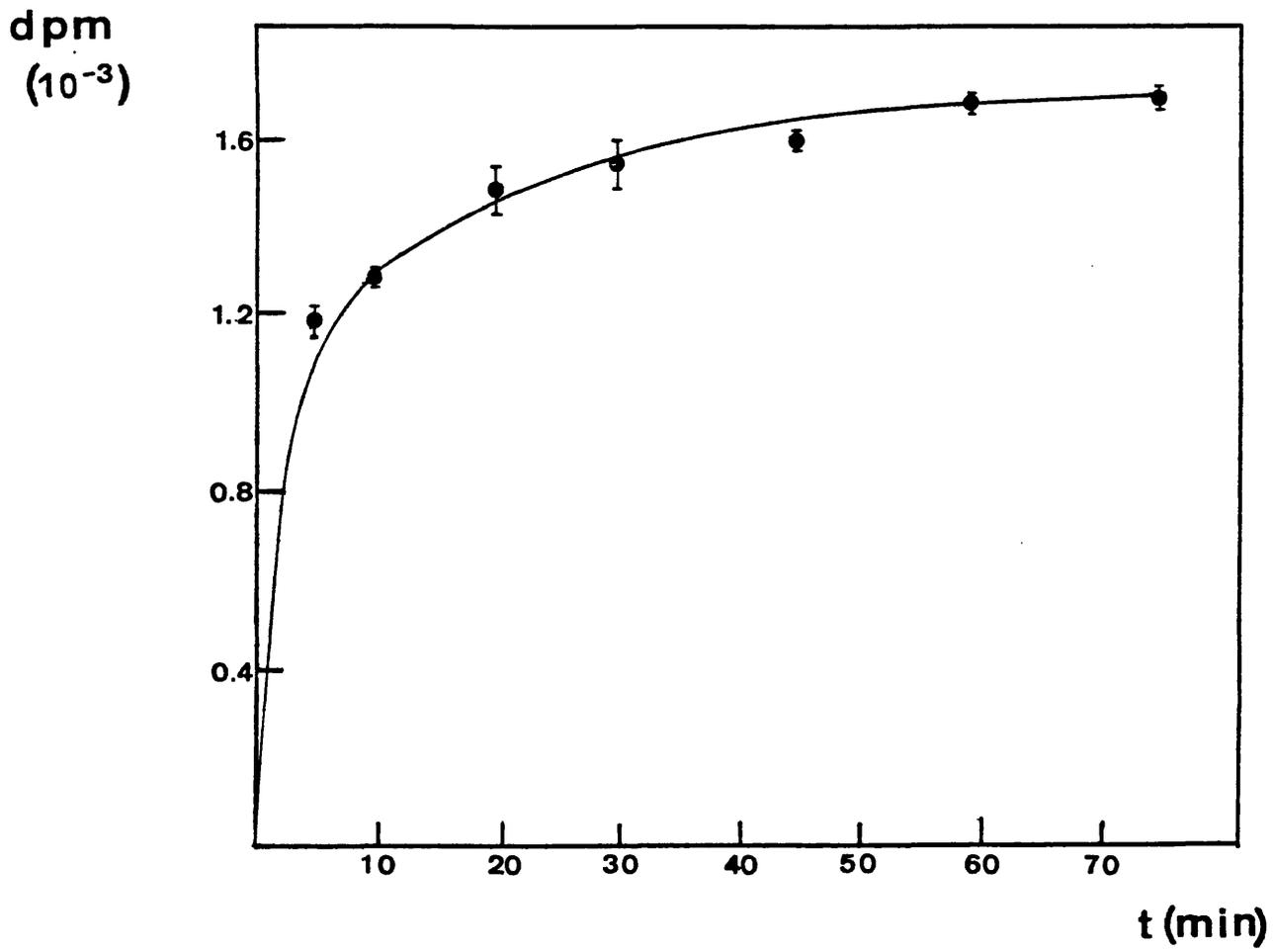


Figura 4.- Variación de la actividad histona acetiltransferasa de levadura con el tiempo de incubación. Cada valor representa la media de tres ensayos independientes medidos a 37 °C y pH 7.9.

(medido a 4 °C) y a 37 °C durante 20 min.

4.1.4.- Concentración de NH_4Cl en el medio de incubación.

La actividad HAT se purifica, parcialmente, mediante cromatografía en DEAE-Sepharose, eluyéndose de la misma con distintas concentraciones de cloruro amónico (apartado 4.2.2 de materiales y métodos). Para conocer la posible influencia de esta sal sobre la actividad acetiltransferasa, se ha llevado una fracción enzimática a concentraciones de NH_4Cl variables, entre 0 y 600 mM, midiéndose posteriormente la actividad HAT (figura 5). Los valores de actividad enzimática se obtienen restando a la incorporación radiactiva total, la correspondiente a los controles previamente calentados a 70 °C durante 10 min. La actividad enzimática permanece prácticamente constante hasta una concentración de 300 mM, si bien parece existir un ligero máximo a una concentración de NH_4Cl de 100 mM. A concentraciones de sal superiores a 300 mM la actividad enzimática disminuye rápidamente. Estos resultados concuerdan con los descritos en Drosophila melanogaster (Wiegand y Brutlag, 1981) y en hepatoma de rata (Garcea y Alberts, 1980), en los que se obtiene un máximo de actividad a una concentración de 100 mM en KCl.

De todos estos resultados podemos concluir que la fuerza iónica del medio de incubación no debe superar una concentración

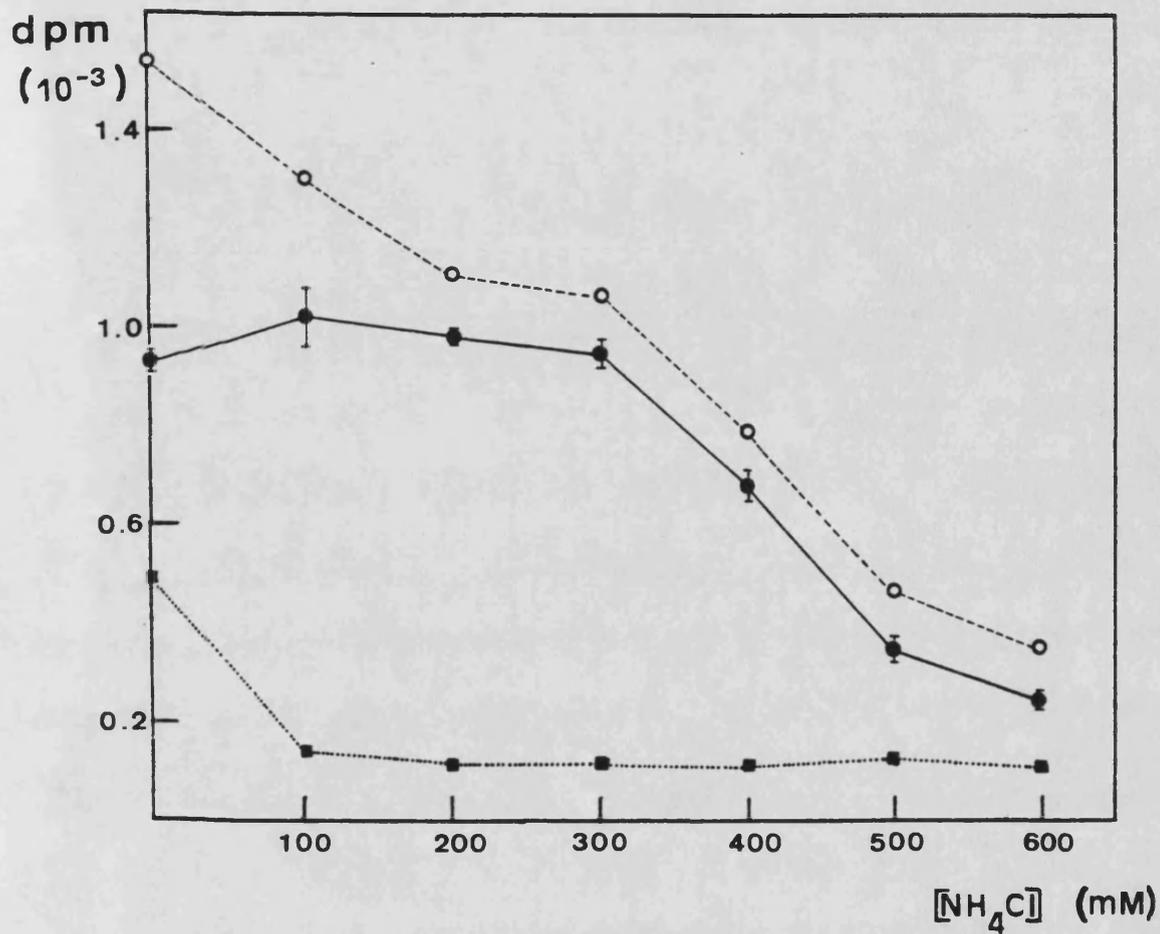


Figura 5.- Influencia de la concentración de NH_4Cl sobre la actividad histona acetiltransferasa de levadura. (o-----o) actividad total; (●—●) actividad enzimática; (■.....■) controles (fracciones enzimáticas calentadas a 70 °C, durante 10 min). Cada valor representa la media de tres ensayos independientes.

de 300 mM en NH_4Cl .

4.2.- Acetilación química de histonas.

En los ensayos realizados en el apartado 4.1 se ha podido comprobar (como se observa en la fig. 5) que la incorporación de radiactividad en los controles, en los que las fracciones enzimáticas se inactivan a 70 °C durante 10 min, aumenta considerablemente a fuerzas iónicas bajas. Algunos autores (Paik *et al.*, 1970; Delpech *et al.*, 1983) han sugerido que esta incorporación sería el resultado de una acetilación química de las histonas por el acetyl CoA, usado como sustrato en los ensayos de actividad. A fin de atenuar, en los ensayos enzimáticos, la incorporación de radiactividad debida a la acetilación química, se han realizado estudios para determinar los parámetros que inciden sobre esta incorporación.

4.2.1.- Influencia de la concentración de NH_4Cl .

Uno de los parámetros que más parecen influir en la acetilación química de las histonas es la fuerza iónica. En la figura 6 se observa que esta incorporación disminuye rápidamente al aumentar la concentración de NH_4Cl del medio, siendo, a

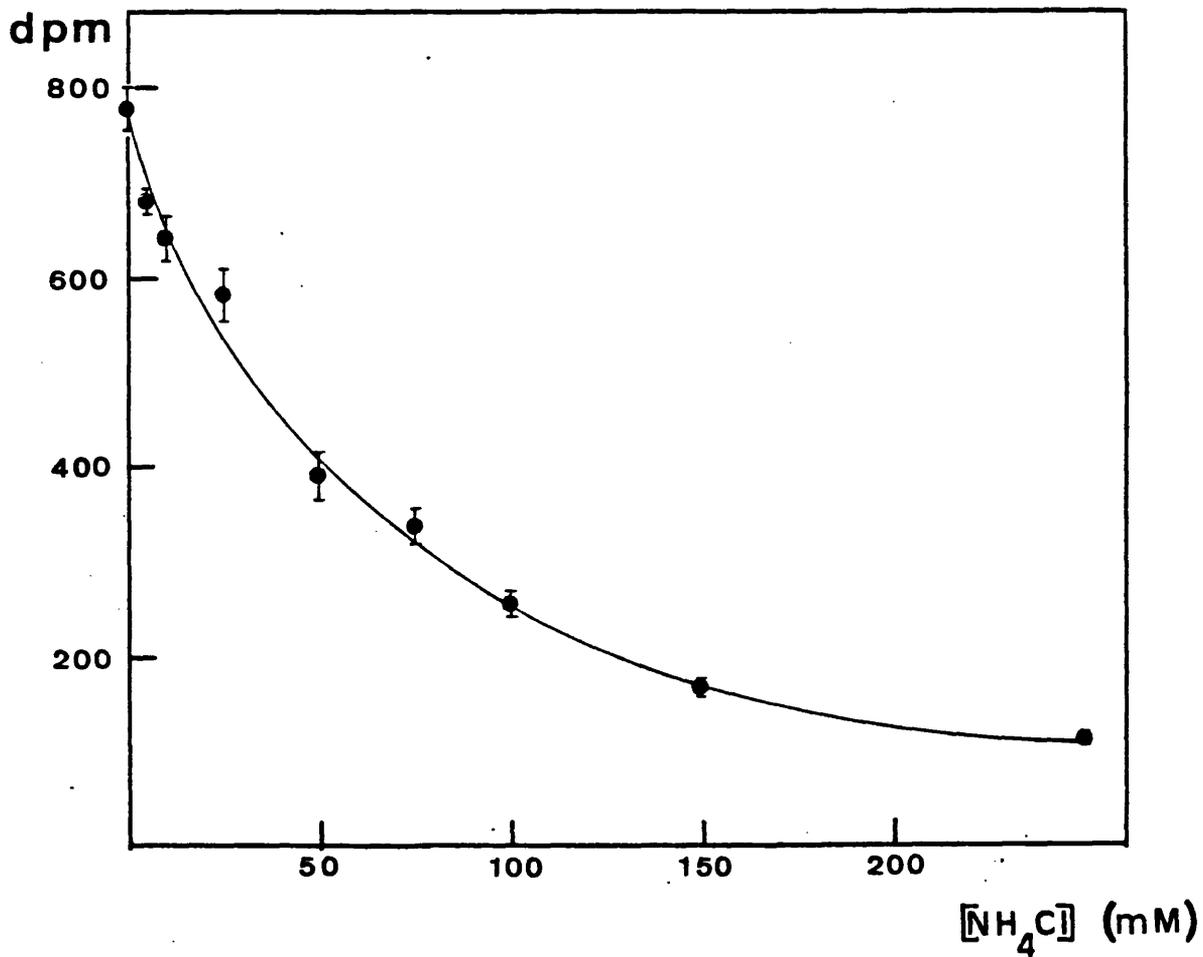


Figura 6.- Influencia de la concentración de NH_4Cl sobre la acetilación química de las histonas. Los valores representan la media de tres resultados independientes.

valores superiores a 100 mM, inferior a un 25% de la producida en ausencia de sal. Este comportamiento se ha observado igualmente si en lugar de utilizar NH_4Cl se emplean otras sales como NaCl o KNO_3 .

Podemos concluir en base a estos resultados que, independientemente del tipo de sal, a fuerzas iónicas superiores a 100 mM la acetilación química se reduce de forma considerable.

Basándonos en los resultados obtenidos en el apartado 4.1.4 y en el presente, podemos deducir que la fuerza iónica más apropiada para los ensayos de actividad enzimática es de alrededor de 100 mM en NH_4Cl . A esta concentración la actividad HAT parece poseer un máximo valor (fig. 5) y la acetilación química (fig. 6) lo que constituye menos del 12% de la incorporación total de radiactividad sobre las histonas (fig.5).

4.2.2.- Influencia del pH.

La acetilación química también parece depender considerablemente del pH al que se realiza la incubación de las histonas con el $[1-^{14}\text{C}]$ acetil CoA. En la figura 7 se puede determinar que el pH en el que existe un máximo de incorporación, tanto en presencia de 50 mM de NH_4Cl como en su ausencia, se sitúa en valores entre 8.1 y 8.4. Paik et al. (1970), usando un tampón glicina-NaOH, observaron que el máximo

dpm

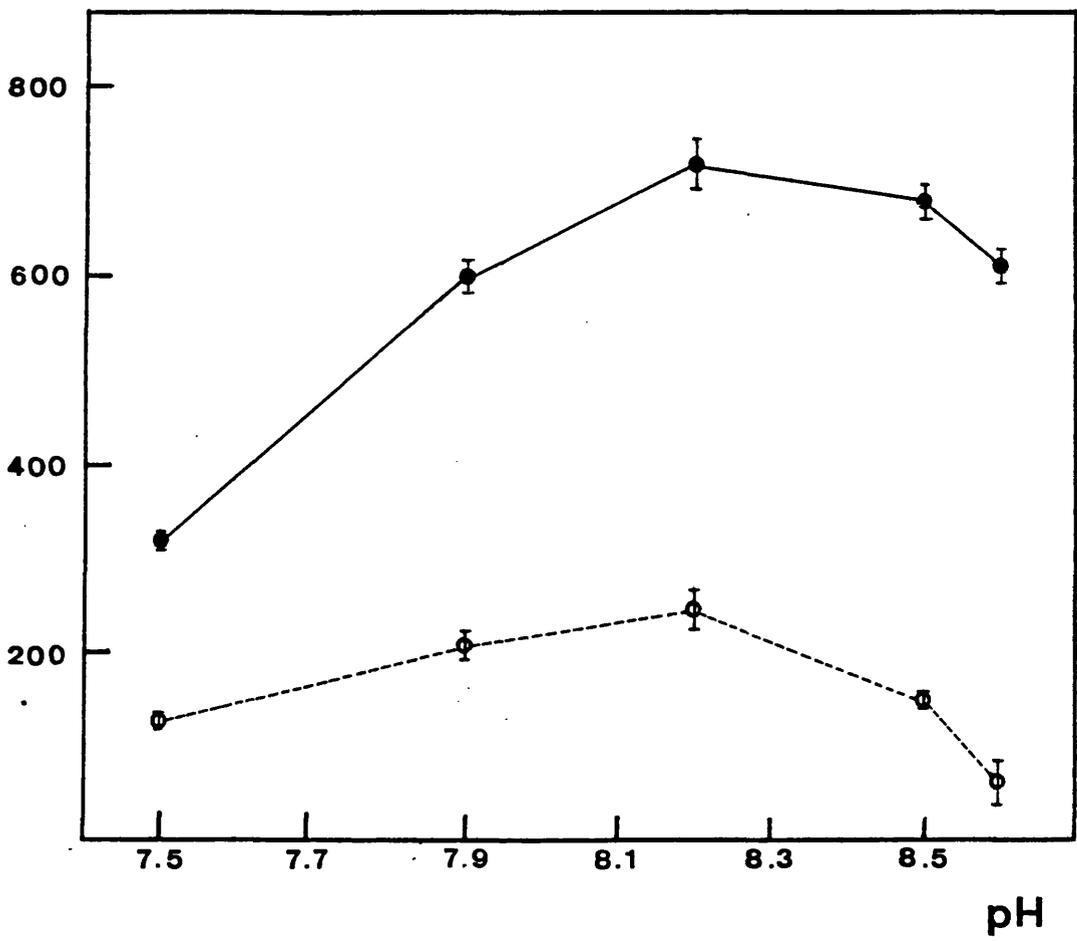


Figura 7.- Influencia del pH sobre la acetilación química de las histonas. Los ensayos se realizaron por triplicado en presencia de 50 mM de NH₄Cl (o-----o) o en ausencia del mismo (●-----●).

de acetilación química se realiza a un pH de alrededor de 10. Sin embargo, estos mismos autores han señalado que la glicina parece interferir en sus resultados, puesto que compite con las histonas por el acetil CoA.

4.3.- Determinación del máximo de actividad HAT en la curva de crecimiento de levadura.

Con objeto de determinar en que momento de la curva de cultivo de levadura se obtiene una actividad HAT máxima, se aplicaron a 2 l de medio líquido, 10 g de células de un cultivo previo mantenido en fase estacionaria de crecimiento durante 65 h. Posteriormente se fueron sacando alícuotas a diferentes tiempos, midiéndose en cada una de ellas la actividad enzimática total tras cromatografiar los extractos precipitados con sulfato amónico en columnas (1.8x15 cm) de DEAE-Sepharose. Asimismo se cuantificó espectrofluorimétricamente la cantidad de DNA en los extractos crudos, con objeto de hacer comparativos los resultados de actividad enzimática total (fig. 8).

En dicha figura se observa que en fase exponencial temprana de cultivo la actividad HAT va aumentando respecto a la del inóculo inicial, siendo casi dos veces superior a la actividad de éste, hacia los 60 min de cultivo. Durante el resto de la fase exponencial la actividad continúa aumentando hasta alcanzar un valor máximo, unas tres veces superior a la del inóculo, en

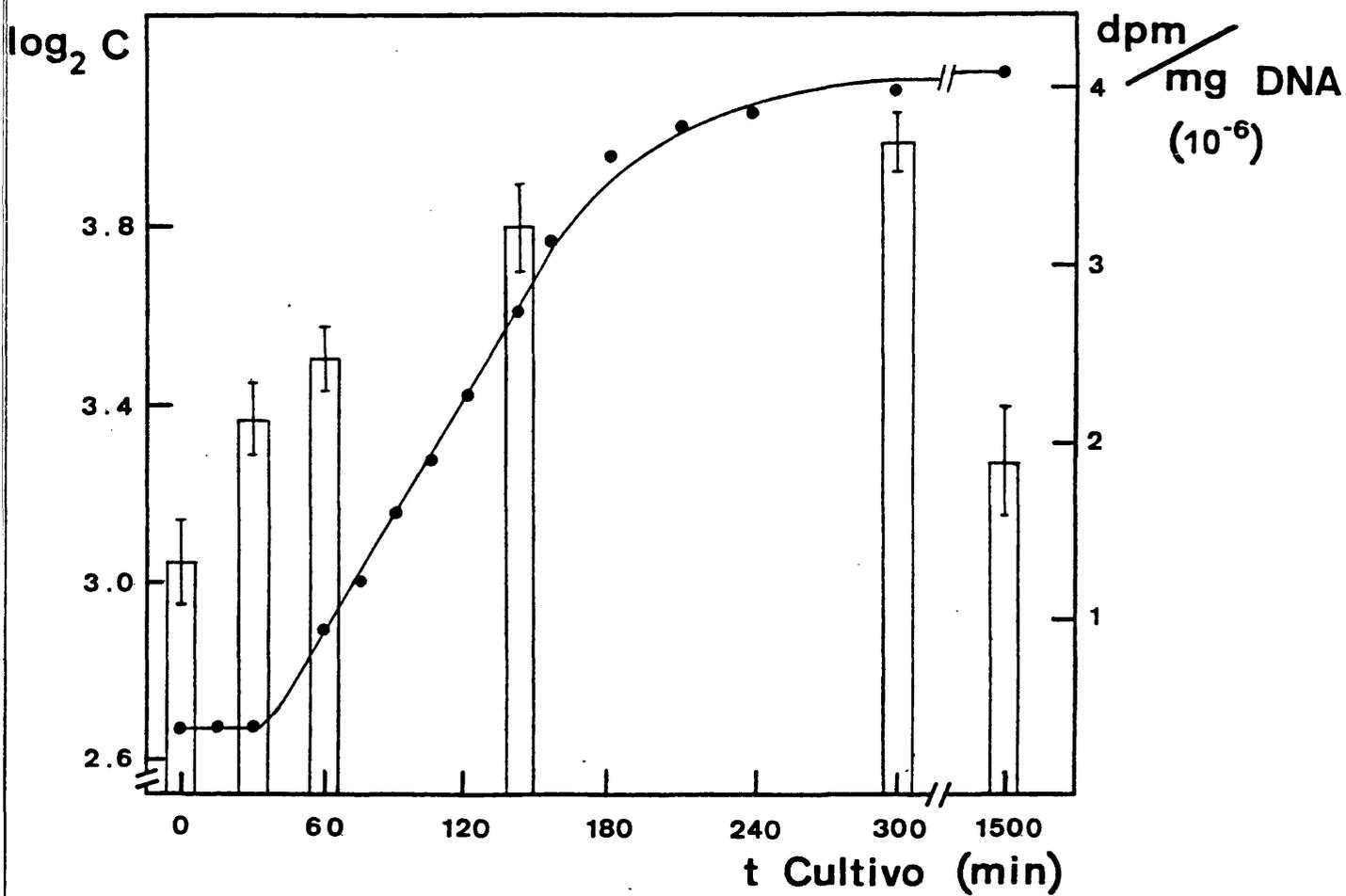


Figura 8.- Actividad total histona acetiltransferasa en función del tiempo de cultivo de levadura. Histograma: actividad histona acetiltransferasa; (●—●) concentración de levadura.

fase estacionaria temprana, hacia los 300 min de cultivo. Posteriormente, dicha actividad va decayendo durante la fase estacionaria, alcanzando un 50% del valor máximo a los 1500 min de cultivo.

Es interesante señalar que la elevada actividad HAT observada durante la fase exponencial, respecto a la fase estacionaria, estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Nelson (1981), en los que las histonas en esta fase parecen encontrarse en un estado altamente acetilado. Esto podría a su vez estar relacionado con la elevada tasa de transcripción que existe en levadura durante esta fase (Lohr y Ide, 1979).

De todos estos resultados podemos concluir que el máximo de actividad enzimática histona acetiltransferasa se encuentra entre el final de fase exponencial y principio de fase estacionaria, que en un experimento como el descrito se sitúa alrededor de los 300 min del cultivo de levadura.

5) SEPARACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS HAT DE UN EXTRACTO PROTEICO PRECIPITADO CON SULFATO AMONICO.

Con objeto de observar la presencia de posibles isoenzimas en un extracto proteico de levadura, obtenido por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación, se ha utilizado una cromatografía en DEAE-Sepharose, eluida con un gradiente continuo de fuerza iónica 0.01-0.35 M en NH_4Cl (fig. 9). En esta

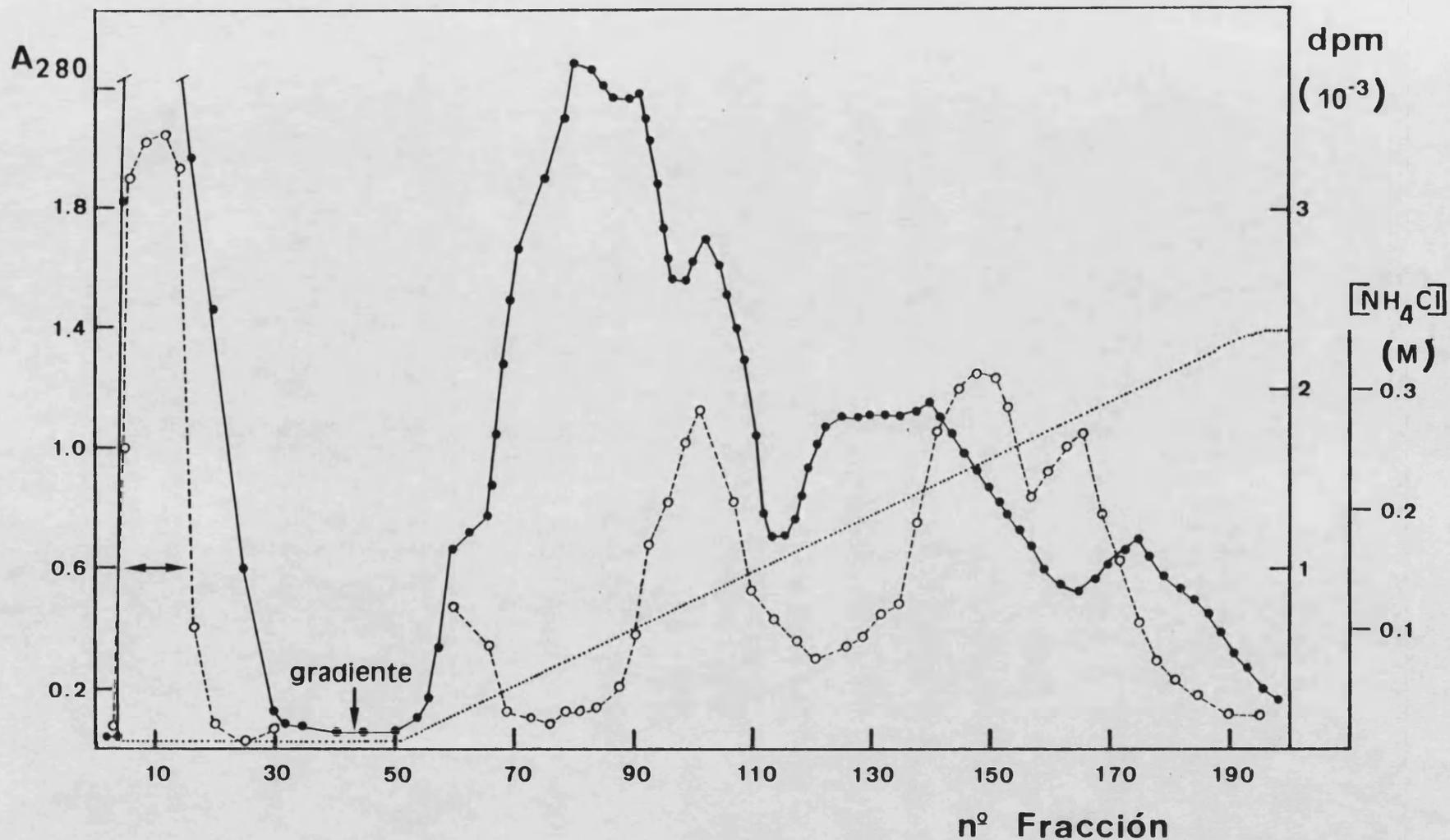


Figura 9.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (3 x 18 cm), del extracto proteico precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación. La figura muestra el resultado de un experimento con 32 g de células. El lavado de la columna se realizó con 400 ml de tampón B, recojiéndose fracciones de 10 ml y una elución posterior con un gradiente de NH_4Cl 0.01-0.35 M de 1200 ml en tampón B, conteniendo 8 ml por fracción. El flujo fue de 60 ml/h. (●—●) A_{280} ; (○-----○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH_4Cl .

gráfica se puede observar, ordenados por su elución de la columna, en primer lugar, la existencia de una importante actividad acetiltransferasa que es recogida en las fracciones del lavado de la columna (fracciones 5 a 15). En el gradiente de NH_4Cl aparecen hasta tres picos de actividad enzimática a los que se ha denominado como HAT A, HAT BI y HAT BII. El primer pico eluye de la columna a una fuerza iónica correspondiente a una concentración aproximada de 0.12 M en NH_4Cl , mientras que los otros dos, no totalmente separados entre sí, eluyen a fuerzas iónicas de alrededor de 0.2 y 0.25 M en la sal, respectivamente.

En el presente apartado se realizará un estudio de cada uno de los picos de actividad observados en la cromatografía, incluido el pico de la fracción que no es retenida en la misma.

5.1.- Actividad acetiltransferasa no retenida en DEAE-Sepharose.

Como se puede observar en la figura 9, existe una importante actividad acetiltransferasa que eluye en el lavado de la cromatografía en DEAE-Sepharose. Una posible explicación para la aparición de esta actividad sería que la capacidad de retención de la columna pudiera encontrarse saturada por la elevada cantidad de proteínas existente en el extracto, coeluyendo por esa razón parte de la actividad HAT con el

lavado. Para comprobar este extremo se recogieron las fracciones con actividad enzimática señaladas en la figura 9, se recromatografiaron en otra columna de DEAE-Sepharose y se eluyeron las proteínas retenidas con una fuerza iónica 0.35 M en NH_4Cl . Los resultados obtenidos indican que la actividad acetiltransferasa se recupera de nuevo en el lavado, no existiendo prácticamente actividad enzimática retenida en la columna. Por tanto, podemos concluir que la capacidad de la columna parece ser suficiente para retener la totalidad de la actividad HAT presente en el extracto.

A fin de determinar si esta actividad acetiltransferasa posee carga neta positiva a pH 7.9, siendo esta la causa de que no sea retenida en la columna de DEAE-Sepharose, las fracciones enzimáticas recogidas en el lavado se dializaron frente a tampón B, a pH 7.0 y se aplicaron en una columna de CM-Sepharose en las condiciones descritas en el apartado 6.2.1 de materiales y métodos. Los resultados de la elución de la columna indican que la actividad acetiltransferasa tampoco es retenida en este tipo de cromatografía, recogiéndose por tanto en la fracción del lavado. Una posible explicación de que esta actividad no sea retenida en ninguna de las dos cromatografías podría ser que ambas fracciones del lavado contengan material no totalmente solubilizado, posiblemente cromatínico, lo cual vendría apoyado por el hecho de que estas fracciones presenten un aspecto turbio. Esta circunstancia podría explicar, a su vez, la capacidad que posee la actividad no retenida de incorporar más radiactividad ácido-insoluble en ausencia de histonas exógenas

que en su presencia, ya que lo que se estaría produciendo sería la autoacetilación del material cromatinico no retenido en las columnas. Efectivamente, si estas fracciones se ultracentrifugan a 105000xg durante 1 h, en presencia de NaCl 0.5 M, la actividad acetiltransferasa se recupera en el sobrenadante, como se muestra en la tabla VIII. Con objeto de determinar la naturaleza del sustrato utilizado por esta actividad enzimática purificada, se realizó un estudio fluorográfico de las proteínas marcadas por dicha actividad en presencia y ausencia de histonas exógenas. Los resultados indican que esta actividad enzimática no acetila específicamente a ninguna histona, es decir, no se trataría realmente de una actividad HAT, sino de una acetiltransferasa con especificidad sobre proteínas no histonas, de peso molecular más elevado que el de las histonas, presentes en el extracto.

En base a estos resultados podemos concluir que la cromatografía en DEAE-Sepharose retiene a la totalidad de los isoenzimas HAT presentes en el extracto precipitado con sulfato amónico al 90% de saturación.

5.2.- Actividad enzimática HAT A de DEAE-Sepharose.

Con objeto de poder estudiar la actividad HAT A independientemente de las HAT BI y HAT BII (ver figura 9), se aplicó en una columna de DEAE-Sepharose un extracto total

Tabla VIII.- Actividad acetiltransferasa no retenida en la cromatografía en DEAE-Sepharose tras ultracentrifugación en presencia de NaCl 0.5 M. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	ACTIVIDAD ENZIMATICA (dpm)	% DE ACTIVIDAD
1.- ANTES ULTRACENTRIFUGACION A 105000xg, durante 1 h	(1877 ± 54)	100
BLANCO INACTIVADO A 70 °C durante 10 min	(215 ± 38)	12
BLANCO SIN HISTONAS	(3155 ± 30)	168
2.- SOBRENADANTE TRAS LA ULTRA- CENTRIFUGACION	(2394 ± 148)	100
BLANCO INACTIVADO A 70 °C durante 10 min	(550 ± 13)	23
BLANCO SIN HISTONAS	(4250 ± 136)	178

obtenido por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, eluyéndose las proteínas retenidas con un gradiente continuo de NH_4Cl 0.01-0.15 M. En el panel A de la figura 10 se observa la existencia de un solo pico de actividad enzimática, que eluye a una fuerza iónica aproximada de 0.12 M en NH_4Cl . Para determinar la especificidad frente a las histonas de eritrocito (fig. 10 B) y las de levadura (fig. 10 C) se realizaron barridos mediante fluorografías a lo largo de todo el perfil de actividades enzimáticas. La marca incorporada a las histonas se cuantificó mediante análisis de la película fluorográfica con un analizador de imágenes IBAS 2000 de Kontron, determinándose en ellas la densidad óptica integrada (D.O.I.), uniformándose ésta respecto a la cantidad de histonas presente en el gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul Coomassie.

Tal como se observa en la figura 10 C la acetilación que se produce en la histona H2B de levadura parece preceder a la que se realiza sobre la histona H3. Así, el máximo de incorporación radiactiva sobre la histona H2B se encuentra en la carrera electroforética número 4, mientras que el máximo sobre la histona H3 se produce posteriormente en la carrera 5. En dicha carrera la acetilación sobre la histona H2B se ha reducido en un 40% respecto a la que se observa para la misma histona en la carrera número 4. En relación a la histona H4 de levadura (fig. 10 C) podemos indicar que la radiactividad incorporada sobre ésta parece seguir un comportamiento similar al que se produce en la histona H2B, puesto que aumenta su incorporación desde la carrera 3 a la 4, disminuyendo posteriormente, de forma paralela

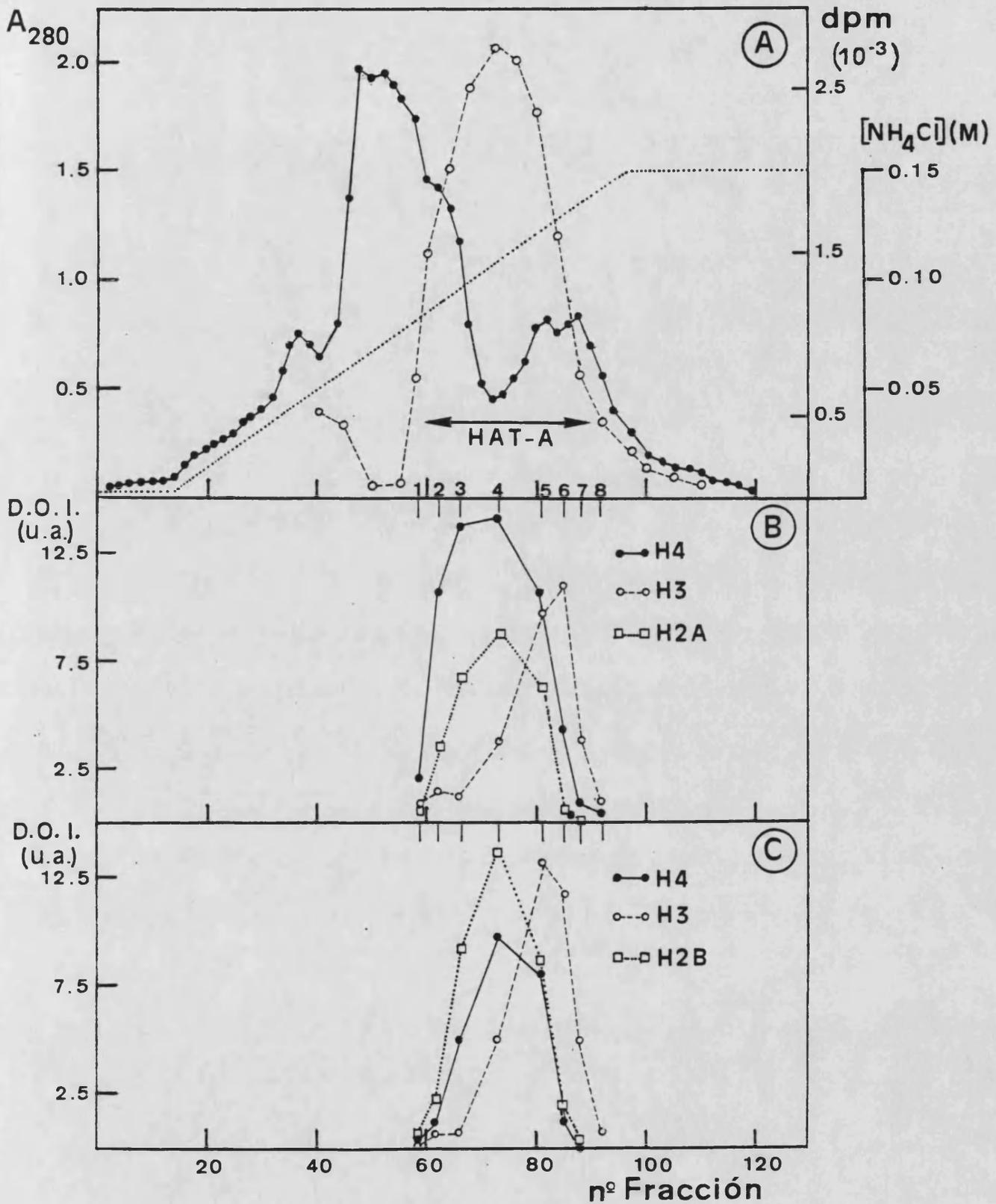


Figura 10.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (3 x 18 cm) del extracto proteico precipitado con $(NH_4)_2SO_4$ (30 g de células). La elución se realizó con gradiente de NH_4Cl 0.01-0.15 M de 800 ml en tampón B con un flujo de 50 ml/h, conteniendo 10 ml/fracción. A) Elución proteica: (●—●) A_{280} ; (○-----○) actividad enzimática; (.....) gradiente NH_4Cl . B) y C) Densidades ópticas integradas (D.O.I.) con histonas de eritrocito (panel B) y con histonas de levadura (panel C).

a H2B, en la carrera número 5.

Por tanto, este primer pico HAT A parece estar formado realmente por al menos dos actividades enzimáticas: la primera, a la que denominaremos HAT (sa)AI, acetilaría a la histona H2B en levadura y secundariamente a H4, mientras que la segunda, denominada HAT (sa)AII, acetilaría exclusivamente a H3.

Por otro lado también se ha determinado la especificidad de estos enzimas por las histonas de eritrocito ya que se han utilizado estas histonas, más fáciles de obtener en estado puro que las de levadura, para localizar los picos de actividad HAT en los gradientes de NH_4Cl . La especificidad de los enzimas (sa)AI y (sa)AII con histonas de eritrocito (fig. 10 B) presenta dos diferencias notables con respecto a la que poseen con histonas de levadura. En primer lugar, un aumento considerable de la actividad frente a H4, aunque siguiendo el mismo perfil que en levadura y, en segundo lugar, sorprendentemente, la histona H2A de eritrocito, es marcada en lugar de la histona H2B como ocurre con histonas de levadura. En este caso, también el perfil de la acetilación sobre H2A de eritrocito coincide con el de H2B de levadura. Por tanto el enzima denominado (sa)AI acetilaría a las histonas H2B>H4 de levadura y las histonas H4>H2A de eritrocito. La razón molecular de que el enzima HAT (sa)AI acetile a H2B con histonas homólogas y a H2A con histonas de eritrocito no es conocida, aunque un intento de explicación sería indicar que la secuencia de la región N-terminal de la histona H2B de levadura es bastante diferente (tan sólo un 40% de homología) de la de los eucariotas superiores (Wu *et al.*,

1986), por lo que el enzima podría reconocer preferentemente la secuencia de H2A de eritrocito respecto a la de H2B, aunque con menor eficiencia que a la histona H2B de levadura.

Pese a las diferencias descritas de especificidad de los enzimas frente a histonas de eritrocito y de levadura, existen suficientes características comunes como para poder utilizar las histonas de eritrocito en los ensayos de actividad enzimática durante las etapas de aislamiento de los enzimas HAT.

Se han utilizado diversos procedimientos para intentar separar las actividades HAT (sa)AI y HAT (sa)AII. Una de las técnicas con mayores posibilidades para la separación de los enzimas, es el cromatoenfoco. En este caso se recogió 1 ml de cada una de las fracciones con actividad enzimática señaladas en la figura 10 A, concentrándose por ultracentrifugación y aplicándose en una columna 1x30 cm de polielectrolito PBE 94, en las condiciones descritas en el apartado 4.5 de materiales y métodos. Los resultados de la elución con polibuffer 96, presentados en la figura 11, muestran que la actividad enzimática permanece aún retenida en la columna a pH inferiores a 6.5. Travis et al. (1984), describen que la actividad enzimática aislada de cromatina de levadura, es desnaturalizada irreversiblemente a pH inferiores a 6 o superiores a 10. Por tanto, y puesto que el punto isoeléctrico de estos enzimas parece ser inferior a 6.5, esta cromatografía no puede ser utilizada apropiadamente para separar las actividades HAT (sa)AI y HAT (sa)AII.

Otro de los procedimientos utilizados para intentar separar

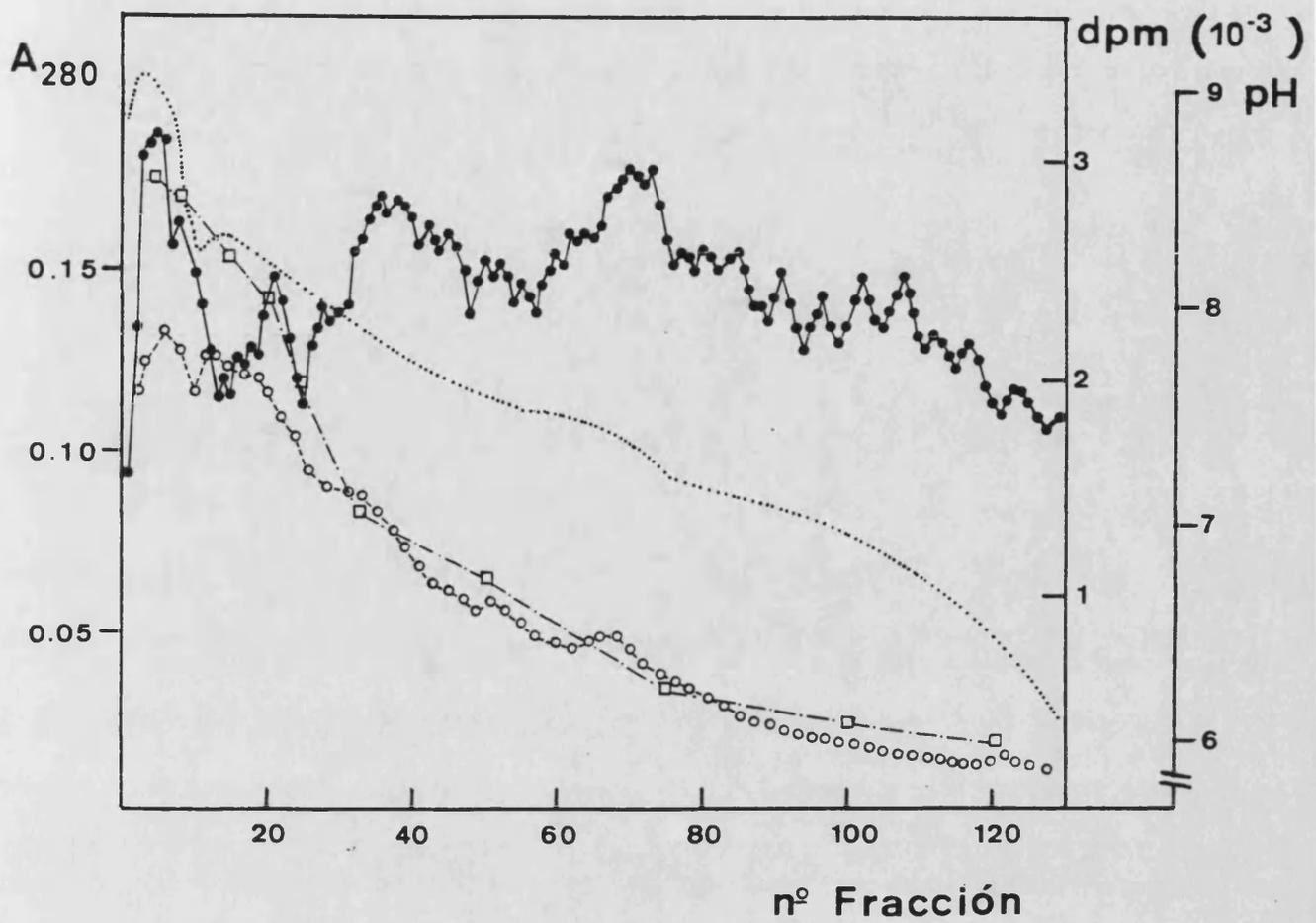


Figura 11.- Cromatofoco de la actividad histona acetiltransferasa A de levadura de la fig. 10 en columna de polielectrolito PBE (1 x 30 cm), eluida con tampón polibuffer 96 (pH 6.0) a 10 ml/h, conteniendo 2.5 ml/. (●—●) A₂₈₀; (○---○) actividad enzimática; (□-.-□) blancos inactivados a 70 °C durante 10 min; (.....) gradiente de pH.

estos enzimas, ha sido la cromatografía de exclusión molecular en Ultrogel AcA34. Para ello, se recogieron las fracciones con actividad enzimática indicadas en la figura 10 A, se concentraron por ultrafiltración y se aplicaron en una columna 1.8x120 cm de Ultrogel AcA34. La elución proteica y los resultados de actividad de las fracciones se presentan en la figura 12 A. En esta cromatografía, la actividad HAT A eluye también en forma de un pico único, a un volumen de elución correspondiente a proteínas con una masa molecular de unos 160000 ± 20000 , indicando que las masas moleculares de ambos enzimas son bastante similares.

En la figura 12 B se muestra el resultado de la incubación de las fracciones con actividad enzimática, obtenidas en esta cromatografía, frente a histonas de levadura y realizando la correspondiente fluorografía. Como cabe esperar, las histonas acetiladas son H2B>H3>>H4, resultante por tanto de la acción simultánea de las actividades enzimáticas con especificidad por H2B>H4 y por H3, respectivamente. Se puede concluir pues que, ambos enzimas poseen características fisico-químicas muy similares, lo que conduce a que su separación presente serias dificultades. No siendo el objetivo de nuestro trabajo el aislamiento de los enzimas HAT presentes en levadura, sino el determinar cuales de ellos se encuentran en dicho organismo, así como estudiar sus especificidades, la coelución de ambas actividades HAT (sa)AI y HAT (sa)AII en diferentes sistemas cromatográficos, no representa un problema grave. No obstante, hay que señalar que el empleo de otros sistemas de separación de

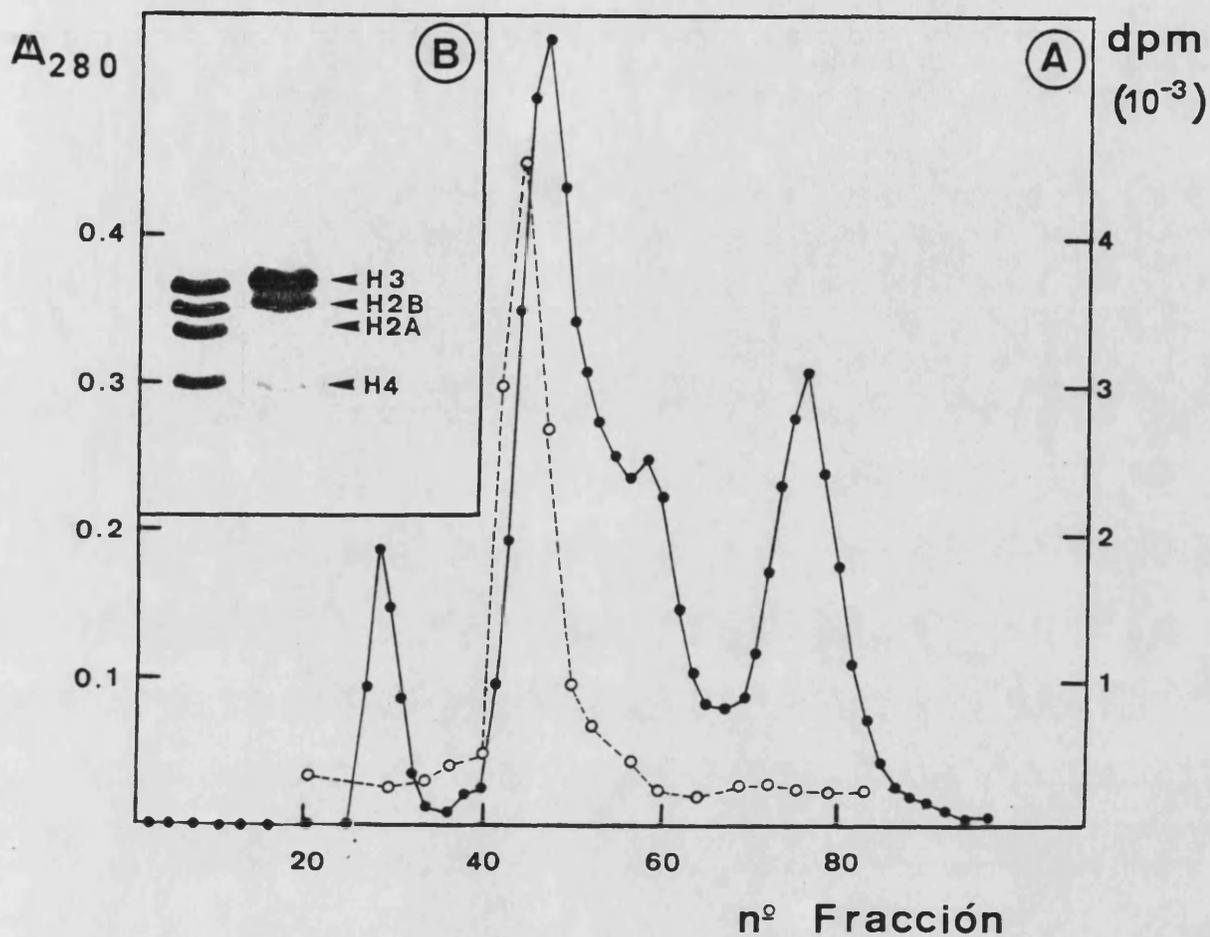


Figura 12.- Cromatografía en columna de Ultrogel ACA34 (1.8 x 120 cm) de la actividad histona acetiltransferasa A obtenida en la fig. 10. A) Elución proteica con tampón B, 35 mM en NH₄Cl a un flujo de 16 ml/h. (●—●) A₂₈₀; (○-----○) actividad enzimática. B) Electroforesis en poliacrilamida-SDS de histonas de levadura marcadas radiactivamente con la actividad MAT de la cromatografía. 1) Tinción del gel con azul Coomassie; 2) Fluorografía del mismo gel.

actividades HAT, utilizados por diversos autores, tales como CM-Sepharose, DNA-celulosa e hidroxapatito, no han resultado efectivos en el caso que nos ocupa.

Cabe señalar que esta gran similitud entre diferentes isoenzimas HAT, sólo diferenciables por una pequeña, pero apreciable, variación en su elución en la cromatografía sobre DEAE-Sepharose, podría quizás extenderse a otros organismos estudiados, en los que es habitual encontrar que los picos de actividad HAT actúan sobre las cuatro histonas del "core", aunque con diferentes intensidades (ver tabla I).

5.3.- Actividades HAT BI y HAT BII.

Como se ha indicado anteriormente, en la figura 9 se observa la presencia de dos picos de actividad enzimática, no totalmente separados entre sí, que eluyen a fuerzas iónicas superiores a la de HAT A. Para poder confirmar la existencia de estas dos actividades, a la vez que lograr una resolución superior, se aplicó en una columna de DEAE-Sepharose, un extracto proteico precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se lavó extensivamente la misma con un tampón de fuerza iónica 0.15 M en NH_4Cl , con objeto de separar de la columna la actividad HAT A, eluyéndose posteriormente las proteínas retenidas con un gradiente continuo de NH_4Cl 0.15-0.35 M (fig. 13 A). En la gráfica se observa la presencia de dos actividades enzimáticas,

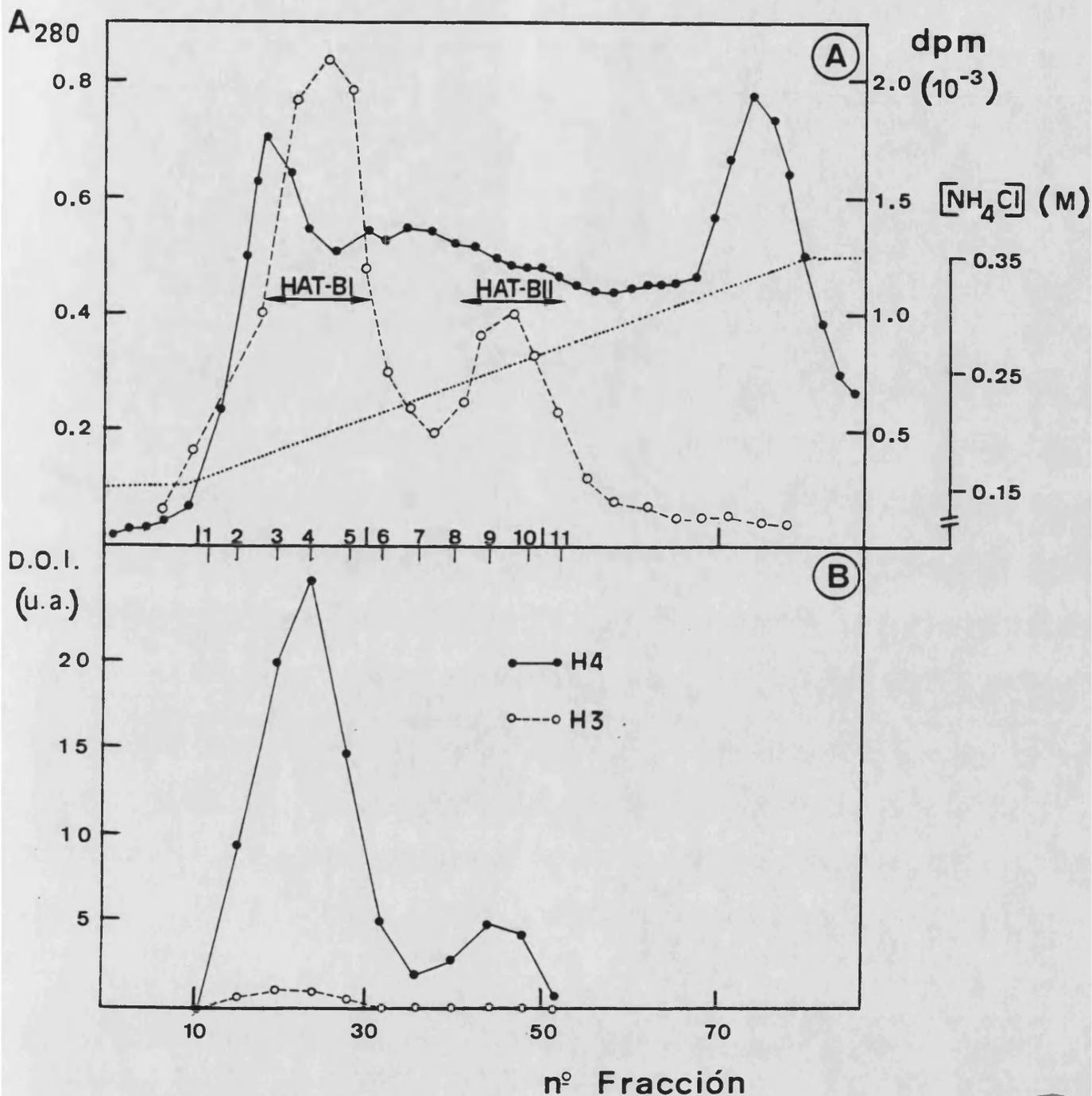


Figura 13.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (3 x 18 cm) del extracto proteico precipitado con (NH₄)₂SO₄ al 90% de saturación. La figura muestra el resultado de un experimento con 25 g de células. La columna se lavó con tampón B, 0.15 M en NH₄Cl y se eluyeron las proteínas con 1300 ml de gradiente 0.15-0.35 M de NH₄Cl en tampón B a un flujo de 50 ml/h, conteniendo 18 ml cada fracción. A) Elución proteica: (●—●) A₂₈₀; (○- - -○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH₄Cl. B) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de levadura por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.



denominadas como HAT BI y HAT BII, que eluyen a unas concentraciones aproximadas de NH_4Cl de 0.20 y 0.25 M, respectivamente. Por otro lado, los resultados de especificidad de las fracciones señaladas en el perfil de actividad, nos muestran la existencia de dos máximos de incorporación radiactiva en la histona H4, que coinciden con los dos picos de actividad HAT de la figura 13 A. El primer máximo es el más intenso y se encuentra centrado sobre la carrera electroforética número 3, mientras que el segundo máximo se localiza sobre la número 8 (fig. 13 B). Podemos observar además que el primer pico de actividad, acetila también parcialmente a la histona H3, aunque con menor intensidad (alrededor del 5%), que la marca radiactiva incorporada en la histona H4. Por tanto, los datos de intensidad óptica integrada indican que el enzima HAT (sa)BI acetila preferentemente a la histona H4, y en menor medida a H3, mientras que la HAT (sa)BII acetila exclusivamente a H4. La especificidad de los enzimas por las histonas de eritrocito es similar a la descrita para levadura, por lo que no se ha incluido la gráfica correspondiente de densidades ópticas. Debemos indicar que no puede descartarse totalmente la idea de que la acetilación sobre la histona H3 pudiera deberse a una contaminación minoritaria del enzima HAT (sa)AII, el cual, como se observó en la figura 10 acetila específicamente a esta histona. Sin embargo podemos señalar que la fuerza iónica del tampón de lavado, 0.15 M en NH_4Cl , parece ser suficiente para poder eliminar, de la columna de DEAE-Sepharose, un enzima que eluye normalmente a una concentración de cloruro amónico de

0.12 M.

Se ha considerado también la posibilidad de que las dos actividades, HAT BI y HAT BII, sean realmente un solo enzima, y que aparezcan separados por la presencia de una actividad histona desacetilasa que eluiría en la cromatografía a una fuerza iónica intermedia entre 0.20 y 0.25 M en NH_4Cl . Sin embargo, hemos observado que la fuerza iónica a la que eluye la HD de levadura, en columnas de DEAE-Sepharose, es de alrededor 0.20 M en NH_4Cl (Sánchez del Pino, 1987), similar a la que eluye la HAT BI, no ocurriendo por tanto en la zona del valle entre las dos actividades HAT. Además, podemos señalar que la capacidad de la HD para desacetilar las histonas, parecer ser insuficiente para producir la separación de un solo enzima HAT en dos picos de actividad enzimática. En los ensayos enzimáticos con la histona desacetilasa, en la zona donde existe el máximo de actividad de la misma, se produce una desacetilación del sustrato de histonas, marcadas radiactivamente, que en todos los casos es inferior al 6% del total y por tanto, sensiblemente inferior a la caída de actividad HAT que se observa en la figura 13 A (de más del 70% desde el máximo del enzima HAT (sa)BI y el valle entre este enzima y el HAT (sa)BII).

Con objeto de purificar las actividades HAT (sa)BI y HAT (sa)BII, para utilizarlas en estudios posteriores, se recogieron las fracciones con actividad enzimática señaladas en la figura 13 A, se concentraron por ultrafiltración y se aplicaron en columnas 1.8x120 cm de Ultrogel AcA34 (fig. 14 y 15). Las dos actividades se recogen en forma de picos únicos, simétricos, con

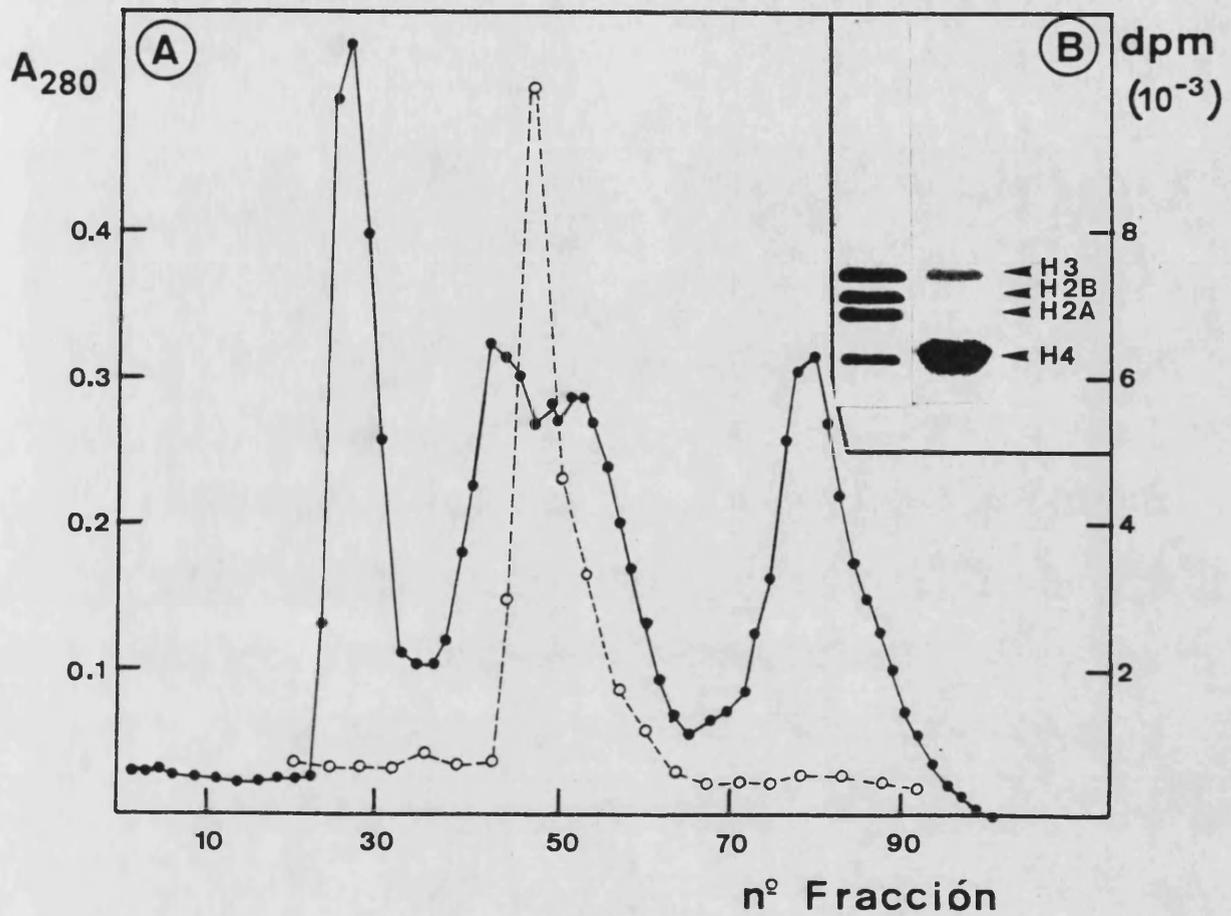


Figura 14.- Cromatografía en columna de Ultrogel AcA34 (1.8 x 120 cm) de la actividad HAT BI obtenida en la cromatografía en DEAE-Sepharose de la fig. 13. A) Elución proteica con tampón B, 35 mM en NH₄Cl a un flujo de 16 ml/h. (●—●) A₂₈₀; (○----○) actividad enzimática. B) Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las histonas de levadura marcadas radiactivamente con la actividad HAT BI de la cromatografía. 1) Tinción del gel con azul Coomassie; 2) Fluorografía del mismo gel.

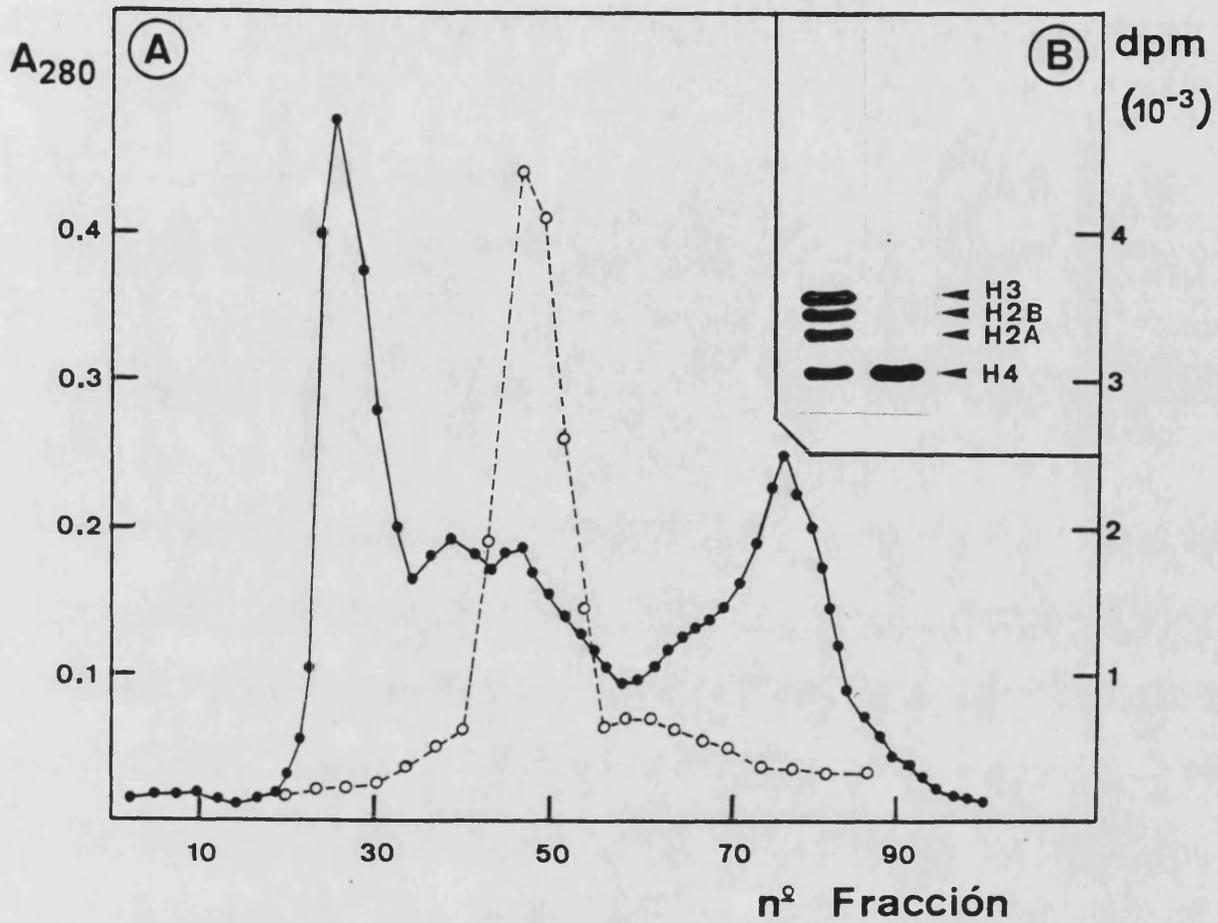


Figura 15.- Cromatografía en columna de Ultrogel AcA34 (1.8 x 120 cm) de la actividad HAT BII obtenida en la cromatografía en DEAE-Sepharose de la fig. 14. A) Elución proteica con tampón B, 35 mM en NH₄Cl a un flujo de 16 ml/h. (●—●) A₂₈₀; (○- - -○) actividad enzimática. B) Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las histonas de levadura marcadas radiactivamente con la actividad HAT BII de la cromatografía. 1) Tinción del gel con azul Coomassie. 2) Fluorografía del mismo gel.

volúmenes de elución similares, que corresponden con el de proteínas de masa molecular aproximada de 130000 ± 20000 . En el panel B de las figuras 14 y 15 se muestra la especificidad de cada actividad enzimática con histonas de levadura. Tal como se presentaba en la figura 13, las actividades HAT (sa)BI y HAT (sa)BII parecen acetilar respectivamente a las histonas H4 >> H3 y a H4. Debemos señalar que la incorporación de grupos acetilo sobre H3 del enzima (sa)BI, no parece pues ser una contaminación del (sa)AII, ya que este último posee una masa molecular algo mayor y no coeluiría con la HAT (sa)BI, al menos en las fracciones del Ultrogel con máxima actividad para este enzima, con las que se han realizado las fluorografías.

5.4.- Especificidad frente a nucleosomas.

Con objeto de conocer si las actividades HAT A (formada por (sa)AI y (sa)AII), HAT BI y HAT BII, acetilan a las histonas cuando éstas están en forma de nucleosomas, se han incubado nucleosomas de eritrocito con estas actividades enzimáticas purificadas por cromatografía en Ultrogel AcA34 (ver fig. 12, 14 y 15). Los resultados obtenidos a partir de las fluorografías correspondientes (tabla IX) indican que la HAT A posee especificidad por las histonas, en nucleosomas, H2A(69%) >> H3(18%) > H4(8%) > H2B(4%), siendo básicamente similar a la especificidad que existe con histonas libres (ver fig. 10 B).

Tabla IX.- Especificidad de las actividades HAT A, HAT BI y HAT BII, obtenidas por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y separadas por cromatografía en DEAE-Sepharose (fig. 10 y 13) con nucleosomas.

	HAT A ((sa) AI + (sa) AII)		HAT BI ((sa) BI)		HAT BII ((sa) BII)	
	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD
TOTAL EN NUCLEOSOMAS	34.7	86	5.4	13	0.4	1
H3	9.7	28	0.3	6	---	-
H2B	4.9	14	---	-	---	-
H2A	18.4	53	---	-	---	-
H4	2.0	6	5.1	94	0.4	100

La HAT BI acetila a las histonas H4(95.5%)>>H3(4.5%) en nucleosomas y la HAT BII acetila también a la histona H4, aunque de forma muy minoritaria, alrededor del 15% de la radiactividad incorporada a esta histona por BI. Podemos señalar que si bien el tipo de histona que acetila cada enzima respecto a histonas libres no varía (fig. 13), si lo hace la intensidad de la incorporación. Esto ocurre especialmente en caso del enzima BII, en el que la densidad óptica integrada de la histona H4 en nucleosomas es inferior al 5% de la que se realiza con la histona libre. No se puede descartar que la incorporación de radiactividad a los nucleosomas por la enzima BII sea contaminación del enzima BI en esta actividad. Los resultados de especificidad con nucleosomas del enzima HAT BII, indican que el mismo podría ser similar al enzima citoplasmático B descrito por diversos autores, específico para la histona H4, y que no es activo con nucleosomas (Garcea y Alberts, 1980; Wiegand y Brutlag, 1981; Yukioka *et al.*, 1984).

Puesto que las HAT parecen acetilar, tanto en forma libre como en forma de nucleosomas, a los mismos tipos de histonas, se han realizado estudios para descartar la posibilidad de que la acetilación se esté produciendo sobre histonas que hubiesen sido liberadas de los nucleosomas por degradación de los mismos durante la incubación. Para ello se depositaron muestras de nucleosomas incubados con las actividades enzimáticas HAT A, HAT BI o HAT BII, sobre gradientes de sacarosa 5-30% (p/v), ultracentrifugándose posteriormente a 100000xg durante 15 h. En

la figura 16 se presenta como ejemplo los resultados de la incorporación de radiactividad de las fracciones del gradiente, así como la absorbancia a 260 nm de las mismas. Como se observa en la gráfica, el pico de radiactividad coincide con el máximo de A_{260} , y por tanto con el pico de nucleosomas (fig. 16 B). Podemos asimismo señalar que las fluorografías de los nucleosomas, recogidos del pico de absorbancia en este experimento, muestran una incorporación de radiactividad sobre el mismo tipo de histonas que en los nucleosomas antes de la centrifugación. De este modo podemos concluir que los nucleosomas no parecen ser degradados durante la incubación con los enzimas, al menos en las condiciones de ensayo descritas.

De todo este apartado se puede sacar en conclusión que en la cromatografía en DEAE-Sepharose, del precipitado proteico con sulfato amónico, se observa la existencia de al menos cuatro actividades enzimáticas HAT con diferente especificidad frente a las histonas, de las cuales tres de ellas [HAT (sa)AI, HAT (sa)AII y HAT (sa)BI] son activos con nucleosomas, mientras que el cuarto (HAT (sa)BII) no sería prácticamente activo con ellos, siendo posiblemente similar al enzima citoplasmático HAT B descrito en otros eucariotas. Por otra parte, en esta cromatografía en DEAE-Sepharose se retienen la totalidad de los enzimas HAT presentes en el extracto proteico precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación.

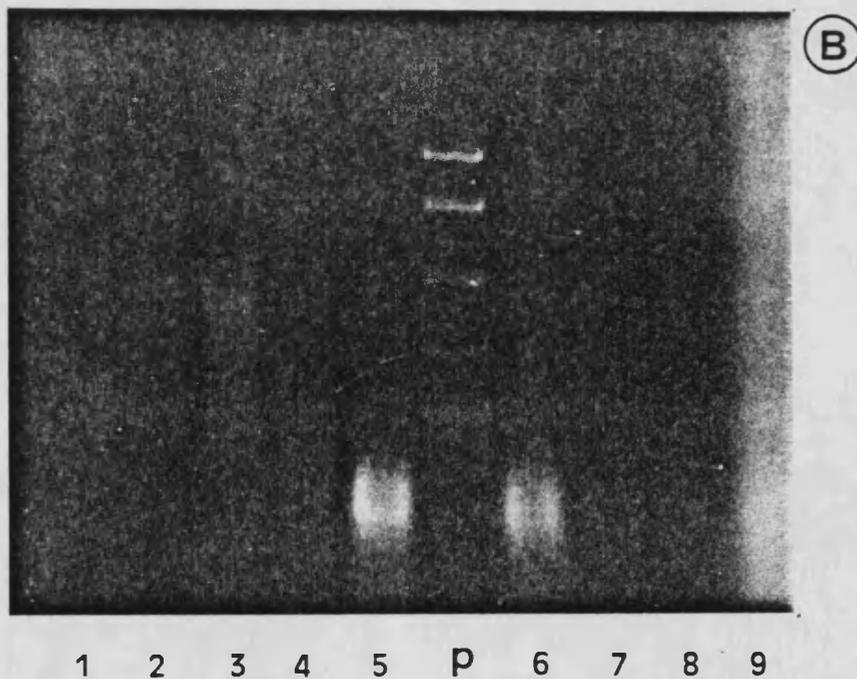
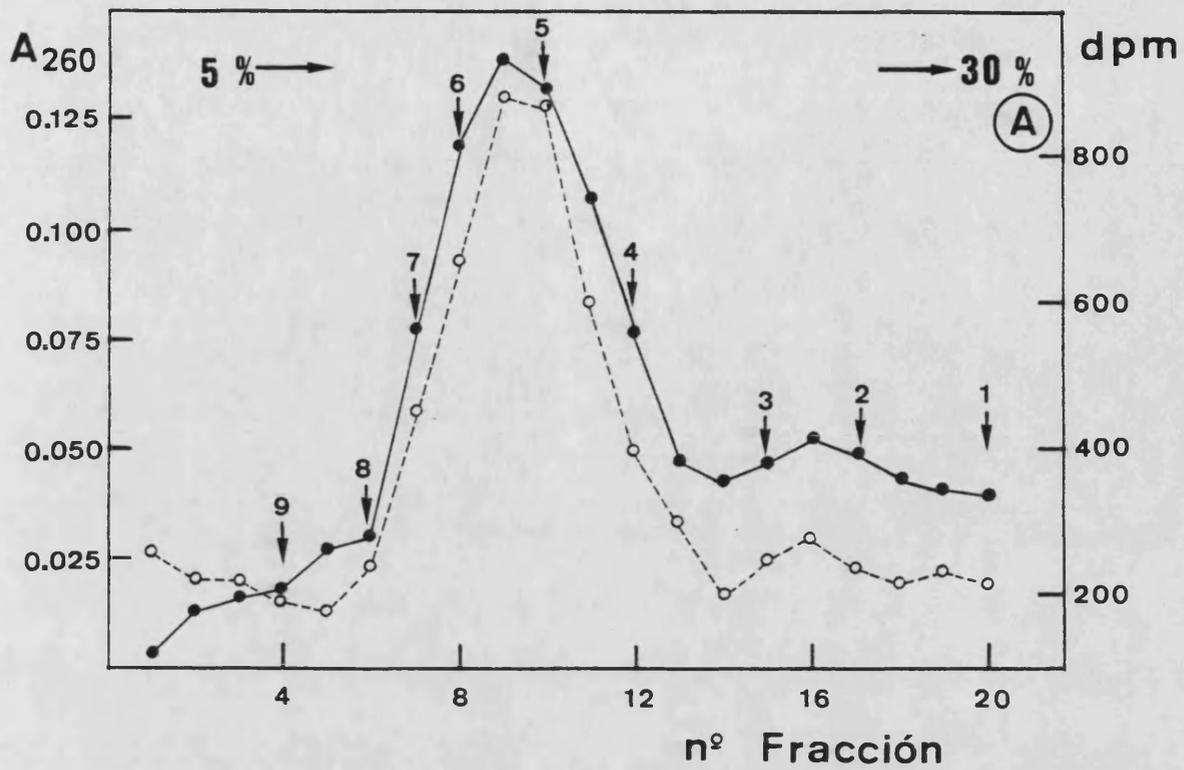


Figura 16.- Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa 5-30% a 100000xg, durante 15 h, de nucleosomas de eritrocito marcados radiativamente por la HAT A obtenida en la cromatografía de la fig. 12. A) Fraccionamiento del gradiente de sacarosa. (●—●) A₂₆₀ de las fracciones con dilución 1/20; (○—○) incorporación radiativa en las fracciones. B) Electroforesis de agarosa 1.8% del DNA obtenido de las fracciones señaladas. En la carrera p, se ha aplicado un patrón de fragmentos de DNA de peso molecular conocido (obtenido por digestión del fago pBR322 con el enzima de restricción HpaII).

6) ELUCION EN DEAE-SEPHAROSE DE LOS PRECIPITADOS CON 10 Y 20% DE PEG.

Otro de los procedimientos por el que se obtiene una importante actividad HAT en levadura, es la precipitación con el 10%, y posteriormente con el 20%, de polietilenglicol (ver tabla V).

Algunos autores (Garcea y Alberts, 1980; Wiegand y Brutlag, 1981; Wiktorowicz y Bonner, 1982), han observado que la utilización de tampones con alta fuerza iónica puede producir una disminución importante en la actividad de alguno de los isoenzimas histona acetiltransferasa presentes en los extractos. En el caso del sulfato amónico, descrito anteriormente, las actividades HAT de levadura se precipitan con un 90% de saturación (concentración 3.5 M aproximadamente), que corresponde a una fuerza iónica superior a 10, mientras que en la precipitación con PEG, la actividad enzimática no se encuentra sometida, en ningún caso, a una fuerza iónica mayor de 3. Por ello, el estudio de los diferentes isoenzimas presentes en los precipitados con PEG y su comparación con los que se obtienen con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, permitiría conocer si la distinta fuerza iónica o el tipo de precipitación produce efectivamente la desnaturalización irreversible de alguno de ellos, lo que permitiría a su vez, interpretar las discrepancias encontradas por distintos autores para un mismo sistema biológico (para un ejemplo ver tabla I con hígado de rata), en función del

procedimiento de extracción.

6.1.- Precipitación con el 10% de PEG.

Los diferentes autores que utilizan el polietilenglicol para el estudio de las actividades HAT (Garcea y Alberts, 1980; Belikoff et al., 1980), precipitan sus extractos crudos con un 10% de PEG con objeto de eliminar los ácidos nucleicos, usando sólo como fuente de enzimas el precipitado proteico con el 20% de PEG. Sin embargo, en levadura se ha podido determinar la existencia de una gran actividad HAT en la fracción precipitada con el 10% de polietilenglicol (tabla V). Para analizar los enzimas HAT responsables de la actividad se ha cromatografiado, este extracto, en una columna de DEAE-Sepharose, en las condiciones descritas en el apartado 3.3 de materiales y métodos.

Los resultados de actividad enzimática de las fracciones del gradiente de NH_4Cl , se presentan en la figura 17 A. En esta figura podemos observar que aparecen hasta tres picos de actividad, que eluyen a fuerzas iónicas de alrededor de 0.12, 0.20 y 0.25 M en NH_4Cl , respectivamente. A estos picos los hemos denominado, al igual que con sulfato amónico, como HAT A, HAT BI y HAT BII. Respecto a la especificidad con histonas de levadura (fig. 17 C), en el pico de actividad HAT A, los máximos de incorporación de radiactividad se localizan en las carreras

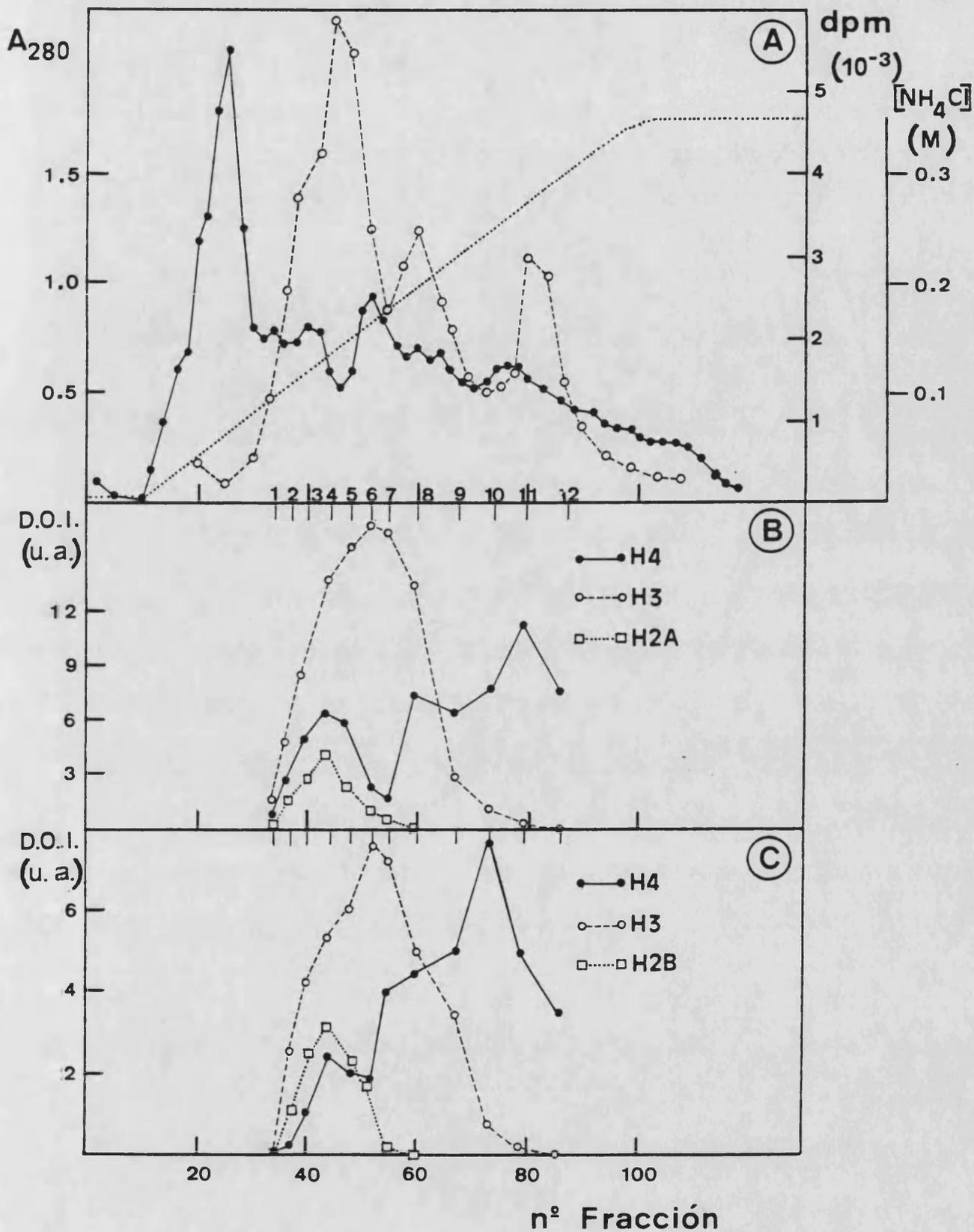


Figura 17.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1.8 x 15 cm) del extracto proteico 10% en PEG. La figura muestra el resultado de un experimento con 36 g de células. A) Elución proteica con 750 ml de un gradiente de NH₄Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 48 ml/h, recogiéndose fracciones de 7.5 ml. (●—●) A₂₈₀; (○—○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH₄Cl. B) y C) Densidad óptica integrada (D.O.I) de la incorporación radiactiva a las histonas de eritrocito (panel B) y a las de levadura (panel C) por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

electroforéticas 4 para las histonas H2B/H4 y 6 para H3. La acetilación que se incorpora sobre la histona H4 en este primer pico sigue un comportamiento paralelo a la que se produce sobre H2B, al igual como ocurre en los extractos precipitados con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fig. 10 C). Por tanto, en este pico de actividad HAT A parecen existir, del mismo modo, dos isoenzimas HAT, el primero en eluir [HAT (p-10)AI] acetila a las histonas H2B>H4 y, posteriormente un segundo enzima [HAT (p-10)AII] que acetila exclusivamente a la histona H3. Sin embargo, en el pico de actividad HAT BI la especificidad no parece estar tan bien determinada como en el pico anterior, ya que la elevada actividad del segundo enzima del pico A [HAT (p-10)AII] por la histona H3, solapa con la de este pico de actividad HAT BI, aunque aparentemente la acetilación se produce tanto en H4 como en H3. Se puede observar que la incorporación de radiactividad sobre H4 permanece prácticamente constante durante las carreras electroforéticas 7, 8 y 9, es decir, a lo largo de todo este pico HAT BI. Finalmente, la actividad HAT BII parece tener especificidad exclusiva por la histona H4.

Por otra parte, y en relación con la especificidad por las histonas de eritrocito, podemos señalar que los enzimas acetilan a los mismos tipos de histonas que con levadura, con la excepción hecha del cambio de H2A de eritrocito por la H2B de levadura (fig. 17 B) del mismo modo a lo que se observa con la precipitación con sulfato amónico (fig. 10 B).

Los enzimas precipitados con PEG 10%, serían por tanto similares a los descritos anteriormente con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, aunque la

proporción que se obtienen de los enzimas parecen ser distinta en los dos procedimientos. Esto ocurre especialmente en el caso del enzima HAT AII, específico para la histona H3, que con el 10% de PEG se extrae preferentemente (fig. 10 B).

6.2.- Precipitación con 20% de PEG.

En la figura 18 A se representa la elución de la columna de DEAE-Sepharose en la que se ha aplicado un extracto proteico obtenido por precipitación con el 20% de PEG. En el perfil de actividad aparecen tres picos enzimáticos, que eluyen de la columna a unas fuerzas iónicas similares a las indicadas para el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el PEG 10%, es decir, alrededor de 0.12, 0.20 y 0.25 M en NH_4Cl , respectivamente. A estas actividades las denominaremos de modo similar a las obtenidas en estos dos casos como HAT A, HAT BI y HAT BII. Se puede señalar que la relación de actividades entre los picos, es diferente en los tres extractos proteicos (ver fig. 9 y 17). Respecto a la especificidad de las actividades enzimáticas por las histonas (fig. 18 B y C) podemos indicar que el primer pico HAT A parece acetilar exclusivamente a la histona H2B de levadura (H2A en caso de histonas de eritrocito), o en todo caso en forma minoritaria también a H4. Posteriormente, tanto el pico HAT BI como el BII, parecen acetilar exclusivamente a la histona H4. Comparando con las actividades obtenidas por precipitación con

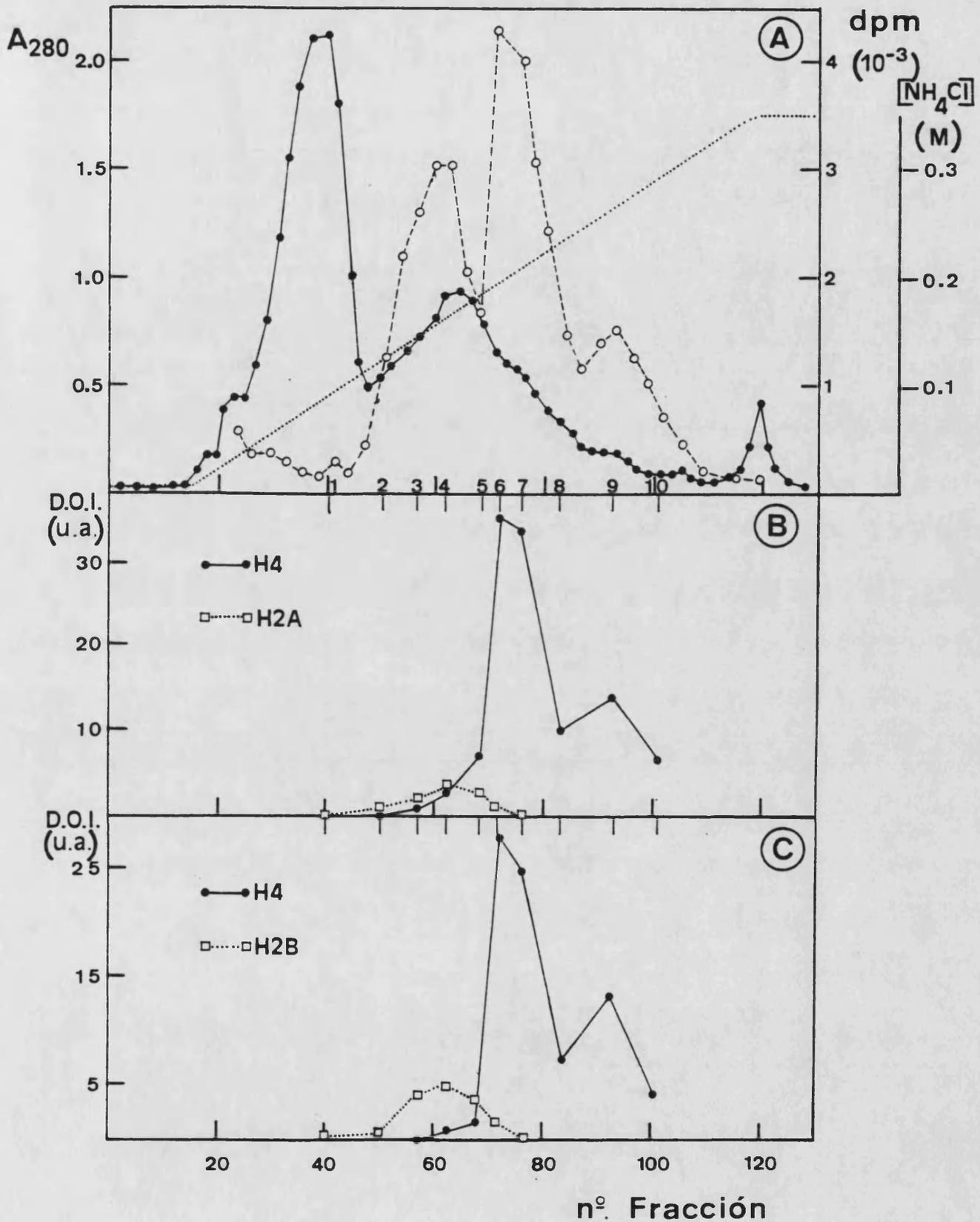


Figura 18.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1.8 x 15 cm) del extracto proteico 20% en PEG. La figura muestra el resultado de un experimento con 72 g de células. A) Elución proteica con 1000 ml de un gradiente de NH₄Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 48 ml/h, recogiéndose fracciones de 8.5 ml. (●—●) A₂₈₀; (○---○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH₄Cl. B) y C) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de eritrocito (panel B) y a las de levadura (panel C) por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

sulfato amónico, estos picos se corresponderían aparentemente con las actividades HAT (sa)AI, HAT (sa)BI y HAT (sa)BII, aunque el enzima HAT (p-20)BI no parece acetilar a la histona H3 como ocurre con el (sa)BI (fig. 13 C). Este efecto podría ser debido a dos causas: o bien a que, pese a las razones apuntadas en el apartado 5.3, la acetilación de H3 por parte del enzima HAT (sa)BI fuese efectivamente una contaminación de la HAT (sa)AII, (específica para esta histona), o a que por el contrario la actividad enzimática HAT (p-20)BI acetilase también a H3, pero que debido a la gran actividad sobre H4, el tiempo de exposición de la placa fotográfica fuera insuficiente para la detección de la marca sobre H3. Los resultados obtenidos por precipitación con sulfato amónico y polietilenglicol 10%, así como los observados en caso de ultracentrifugación en presencia de NaCl 0.5 M (apartado 7), parecen sustentar más esta segunda afirmación.

6.3.- Especificidad frente a nucleosomas.

En las figuras 17 y 18 se puede observar que, en lo que respecta al pico HAT A, las precipitaciones con PEG al 10 y 20%, conducen a una recuperación preferente de los enzimas AII y AI, respectivamente. Esta circunstancia permite el estudio, de forma casi independiente, de la especificidad de estos dos enzimas sobre las histonas en forma de nucleosomas. Así, en las tablas

XI y XII se recogen los resultados obtenidos tras incubar las actividades enzimáticas correspondientes a los tres picos presentes en las eluciones de los extractos de PEG 10 y 20%, con nucleosomas de eritrocito. En la tabla X se puede observar que el pico HAT A, correspondiente en este caso mayoritariamente al enzima AII, acetila a las cuatro histonas, incluida la H2B, que no es marcada por este enzima cuando las histonas de eritrocito están en forma libre. Por su parte, en la tabla XI, el primer pico de actividad, correspondiente casi exclusivamente al enzima AI, acetila a las histonas H2A y también a H2B, no siendo ésta última marcada por este enzima cuando las histonas están libres.

Ya que en el pico HAT A, obtenido con PEG 10% (fig. 17) existe una pequeña proporción de enzima AI, cabe atribuir a este enzima la marca encontrada en las histonas H2A y H2B, por lo que se puede concluir que el enzima AI acetila, probablemente, a las histonas H3<H4 (cuando éstas están en forma de nucleosomas), y que por su parte, el enzima AII lo hace sobre H2A>H2B.

Estas diferencias en la acetilación de las histonas, en forma de nucleosomas o en forma libre, no es sorprendente, ya que diversos autores (ver tabla I) han observado diferencias similares en los enzimas HAT de otros organismos eucarióticos.

Por otro lado, el enzima BI, presente en ambas eluciones, al ser incubado con nucleosomas de eritrocito acetila, aunque débilmente, las histonas H4>H3, en el caso del polietilenglicol 10%, o a H4 en el caso del PEG 20%. Al igual como ocurre con las histonas libres, resulta difícil determinar si la ausencia de marcas radiactivas sobre H3, en este último caso, obedece a que



Tabla I.- Especificidad de las actividades HAT A, HAT BI y HAT BII, obtenidas por precipitación con 10% de polietilén glicol y separadas por cromatografía en DEAE-Sepharose (fig. 17) con nucleosomas.

	HAT A ((p-10) AI + (p-10) AII)		HAT BI ((p-10) BI)		HAT BII ((p-10) BII)	
	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD
TOTAL EN NUCLEOSOMAS	179.2	95.1	9.2	4.9	---	---
H3	67.3	37.6	2.2	23.9	---	---
H2B	7.5	4.2	---	---	---	---
H2A	28.0	15.6	---	---	---	---
H4	76.4	42.6	7.0	76.1	---	---

Tabla XI.- Especificidad de las actividades HAT A, HAT BI y HAT BII, obtenidas por precipitación con 20% de polietilenglicol y separadas por cromatografía en DEAE-Sephrose (fig. 18) con nucleosomas.

	HAT A ((p-20) AI + (p-20) AII)		HAT BI ((p-20) BI)		HAT BII ((p-20) BII)	
	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD
TOTAL EN NUCLEOSOMAS	86.8	95.8	3.8	4.2	---	---
H3	----	----	---	---	---	---
H2B	15.0	17.3	---	---	---	---
H2A	71.8	82.7	---	---	---	---
H4	----	----	3.8	100	---	---

el tiempo de exposición resulta insuficiente para su detección o, más bien, a que la acetilación de H3 por parte del pico BI, obtenido por precipitación con PEG al 10%, pueda ser un efecto residual del enzima que le precede en la elución, el AII. Como ya se ha mencionado anteriormente, los resultados obtenidos con otros métodos de extracción parecen ser más acordes con la primera hipótesis.

Finalmente, el enzima HAT BII no acetila a ninguna histona en los nucleosomas, coincidiendo estos resultados con los obtenidos con sulfato amónico (apartado 5.4)

Por tanto, en el precipitado con el 10% de PEG están presentes los cuatro enzimas descritos en el apartado 5 (HAT AI, HAT AII, HAT BI y HAT BII), si bien el AII es el que parece encontrarse en una proporción mayor. En la cromatografía del 20% de polietilenglicol existen tan sólo tres enzimas, que en función de sus especificidades, serían posiblemente los descritos como HAT AI, HAT BI y HAT BII, en dicho apartado 5. Así pues se estaría extrayendo de forma selectiva los enzimas AI y AII con el 10 y el 20% de PEG, respectivamente. Por otra parte, estos resultados constituyen una prueba de la existencia independiente de los enzimas específicos para la histona H2B y la H3. Es importante señalar que hasta el momento nunca habían sido descritas actividades enzimáticas HAT que acetilasen exclusivamente a H2B. En el caso de la HAT específica para H3, sólo ha sido descrita recientemente otra actividad similar, que únicamente actúa sobre nucleosomas, en embriones de Pisum

sativum (Sendra et al., 1986).

En caso de confirmarse en otros organismos la presencia de enzimas HAT específicos para cada tipo de histonas, se podría sugerir que las distintas funciones atribuidas a la acetilación de las histonas tuviera su base molecular, no sólo en los sitios de acetilación de las mismas (Chicoine et al., 1986), sino también en el tipo de histona acetilada, pudiendo estar reguladas, por tanto, estas funciones, mediante el control de los enzimas correspondientes.

7.- ULTRACENTRIFUGACION EN PRESENCIA DE NaCl 0.5 M.

7.1.- Actividades enzimáticas eluidas de la columna de DEAE-Sepharose.

Como se ha indicado anteriormente, ha sido relacionada con frecuencia la contradicción existente respecto al número de HAT observadas en un mismo organismo (tabla I), con la utilización de procedimientos en los que la extracción se realiza con tampones de fuerza iónica elevada. Estos procedimientos pueden producir una desnaturalización irreversible de alguna de las actividades enzimáticas HAT (Wiegand y Brutlag, 1981; Wiktorowicz y Bonner, 1982). Asimismo, Wiktorowicz y Bonner (1982) han observado que cuando los enzimas HAT de hígado de

rata se someten a concentraciones proteicas elevadas por precipitación o por ultrafiltración, se produce una inactivación apreciable de los mismos.

En el apartado 2.4 se ha determinado que el método por el que se obtiene una mayor actividad HAT es, sin duda, la ultracentrifugación de protoplastos lisados en presencia de NaCl 0.5 M. Por otra parte, tal como se describe en el apartado 2.4 de materiales y métodos, este procedimiento evita el paso de la precipitación de las proteínas, por lo que, por un lado puede completar el estudio realizado con el polietilenglicol sobre el efecto de la distinta fuerza iónica en las actividades enzimáticas y, por otro determinar si la precipitación proteica afecta de modo diferencial a las actividades HAT. A fin de estudiar los isoenzimas obtenidos por este método, se aplicó en una columna de DEAE-Sepharose el sobrenadante de la ultracentrifugación a 105000xg durante 1 h, eluyéndose las proteínas retenidas con un gradiente 0.01-0.35 M en NH_4Cl (fig. 19 A). Al igual como ocurre en los casos anteriores en esta cromatografía aparecen tres picos de actividad, a los que hemos denominado del mismo modo, HAT A, HAT BI y HAT BII, puesto que eluyen de la columna a fuerzas iónicas similares, es decir, alrededor de 0.12, 0.20 y 0.25 M en NH_4Cl respectivamente. Sin embargo, a diferencia de los procedimientos mencionados la actividad del pico HAT A es bastante superior a la del BI o BII. Esto podría sugerir que esta actividad enzimática sea más sensible a tampones de fuerza iónica elevada, alrededor de 3.5 M en el caso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o de 2 M en NaCl con PEG, o a la

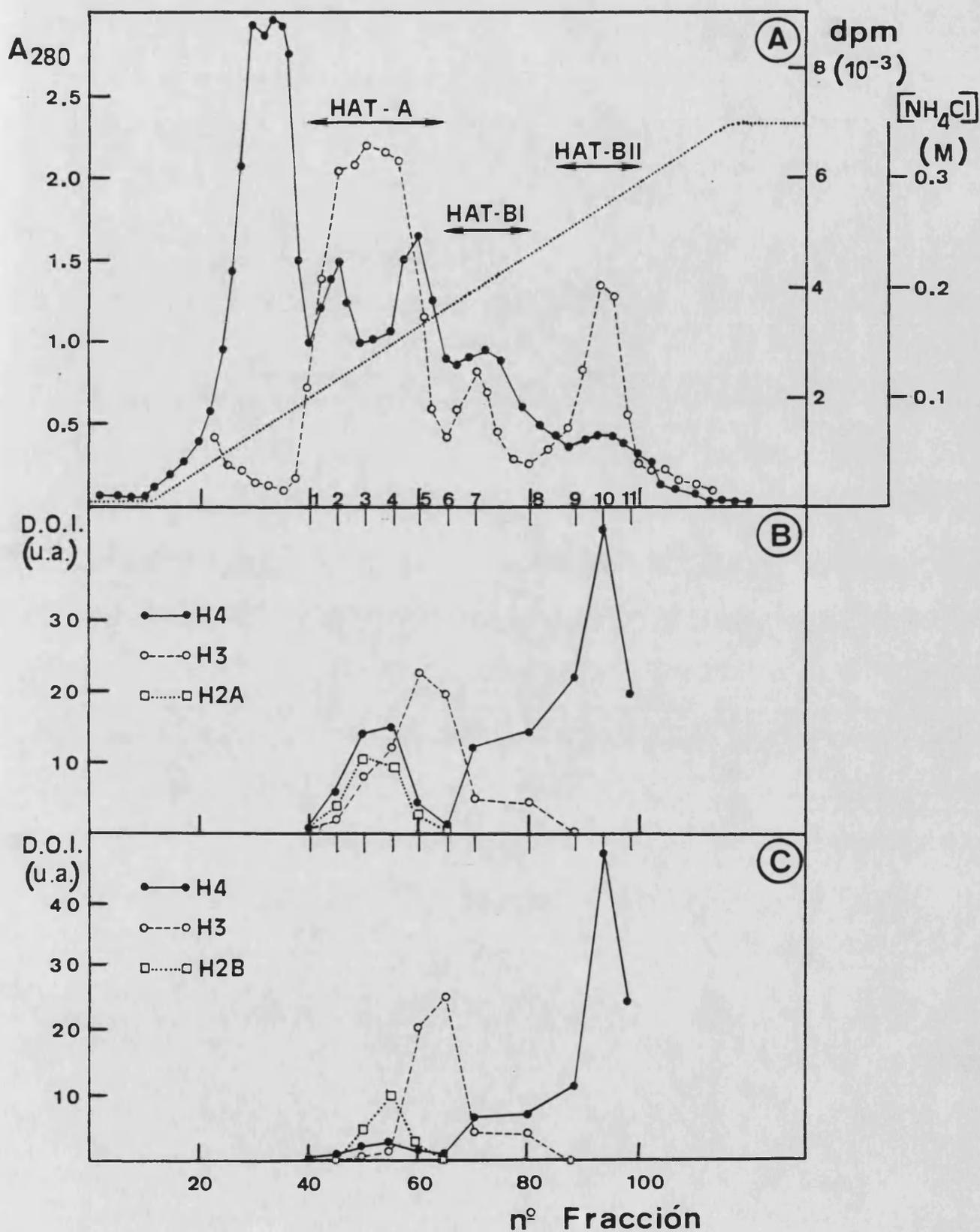


Figura 19.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1.8 x 15 cm) del extracto proteico ultracentrifugado a 105000xg, 1h. La figura muestra el resultado de un experimento con 36 g de células. A) Elución proteica con 1200 ml de un gradiente de NH_4Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 48 ml/h, recogiendo fracciones de 12 ml. (●—●) A_{280} ; (○—○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH_4Cl . B) y C) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de eritrocito (panel B) y a las de levadura (panel C) por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

precipitación proteica.

En las figuras 19 B y C se muestran los resultados de densidad óptica integrada de las fluorografías señaladas en el perfil de actividad con histonas de eritrocito e histonas de levadura, respectivamente. En las primeras carreras electroforéticas del pico de actividad HAT A, se observa la incorporación paralela de radiactividad sobre las histonas H4>H2A en eritrocito (fig. 19 B) y sobre H2B>>H4 en levadura (fig. 19 C), con un máximo de acetilación localizado en la carrera número 4. Posteriormente, aparece una incorporación sobre la histona H3 al final del pico HAT A, tanto en histonas de eritrocito como de levadura, con un máximo centrado en la carrera electroforética 5 con eritrocito o en la 6 con levadura. Por tanto, al igual como ocurre con los precipitados de sulfato amónico (fig. 10) o polietilenglicol 10% (fig. 17), la actividad HAT A parece estar formada por dos enzimas acetiltransferasa, el primero [HAT (u)AI] acetila a las histonas H2B>>H4 en levadura y H4>H2A en eritrocito y, posteriormente, un segundo enzima [HAT (u)AII] específico en ambos casos para la histona H3.

En la región del perfil de actividad correspondiente al pico HAT BI se observa un aumento de la marca fluorográfica sobre la histona H4, al pasar desde la carrera electroforética número 6 a la 7, manteniendo un valor prácticamente constante de la misma en la carrera 8. Por otro lado, la incorporación sobre la histona H3 disminuye al final del pico BI (carrera 6), en donde se localiza la HAT con especificidad exclusiva para esta histona, manteniéndose constante durante las carreras 7 y 8 y

disminuyendo posteriormente en la 9. Este comportamiento es similar tanto en la gráfica con histonas de eritrocito (fig. 19 B) como en la de histonas de levadura (fig. 19 C). Por tanto, la actividad denominada BI parece tratarse de un solo isoenzima HAT ((u))BI con especificidad para H4>H3 tanto con histonas homólogas como con las de eritrocito. Finalmente en las carreras electroforéticas correspondientes a la actividad HAT BII (de la 9 a la 11) aparece incorporación de grupos acetato exclusivamente sobre la histona H4 de eritrocito (fig. 19 B) o de levadura (fig. 19 C).

Estos enzimas serían por tanto equivalentes a los denominados como HAT (sa)AI, (sa)AII, (sa)BI y (sa)BII, en la cromatografía del precipitado con sulfato amónico (apartado 5). Asimismo, cabe señalar que las masas moleculares obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Ultrogel AcA34 de estos enzimas, coinciden con las descritas para las actividades enzimáticas resultantes de la precipitación con sulfato amónico (apartados 5.2 y 5.3).

7.1.1.- Actividad histona desacetilasa.

En el procedimiento de ultracentrifugación en presencia de NaCl se ha estudiado también la actividad HD, con objeto de determinar la posible influencia que pudiera tener sobre las actividades HAT. Podemos señalar por otro lado que la actividad

HD ha sido también observada en los precipitados proteicos de sulfato amónico y de polietilenglicol al 10 y 20%, cromatografiados en DEAE-Sepharose (Sánchez del Pino, 1987).

La actividad histona desacetilasa eluye en esta cromatografía en forma de un pico único, simétrico, a una fuerza iónica aproximada de 0.21 M en NH_4Cl (fig. 20). El valor de fuerza iónica, como se muestra en dicha figura, es bastante similar al observado para la HAT BI, lo que podría descartar la posibilidad de que las HAT BI y BII pudieran ser en realidad un solo enzima separado en dos actividades por la presencia, en esa zona del gradiente de NH_4Cl , de la HD. Además, tal como se indica en el apartado 5.3, la actividad HD parece ser insuficiente para producir el descenso de más del 50% de la incorporación de radiactividad entre el máximo del pico BI, y el valle entre este enzima y el BII, ya que desacetila menos del 5% del sustrato de histonas marcadas usado en los ensayos de histona desacetilasa correspondientes. Incluso se puede añadir que los ensayos de actividad HAT se realizan a 37 °C, y a esa temperatura la HD sería un 40% menos activa que los valores representados en la figura 20.

Considerando que el pico de HD eluye en el gradiente de NH_4Cl , en la zona a la que lo hace la HAT, que acetila a la histona H3, resulta de interés estudiar la especificidad que posee la HD, ya que, en caso de desacetilar preferentemente a esta histona, la pequeña actividad histona desacetilasa observada podría afectar, tal vez seriamente, el perfil de actividades HAT de las figuras 19 y 20.

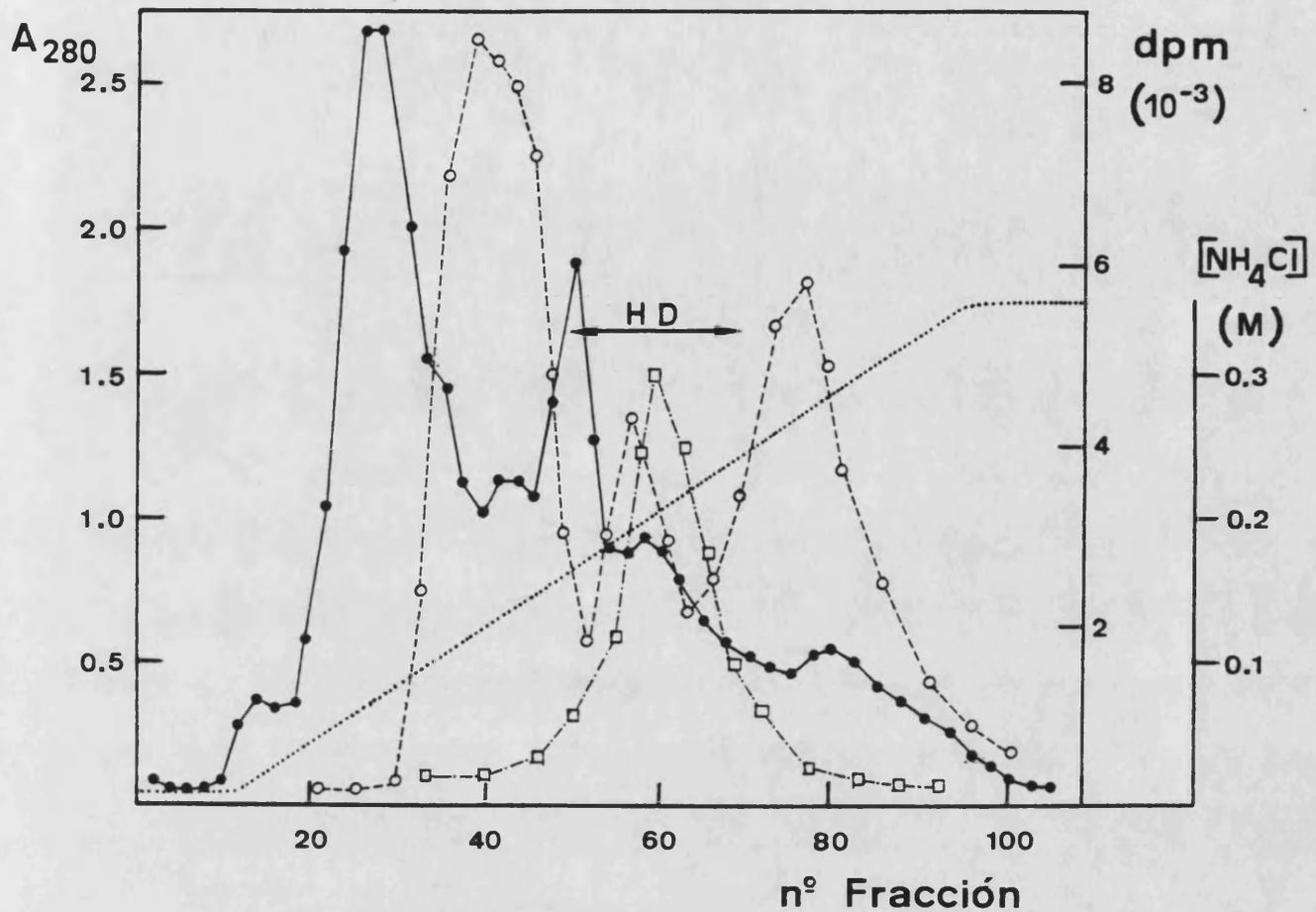


Figura 20.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose (1.8 x 15 cm) del extracto proteico ultracentrifugado a 105000xg, 1h. La figura muestra el resultado de un experimento con 30 g de células. A) Elución proteica con 800 ml de un gradiente de NH₄Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 48 ml/h, recojiéndose fracciones de 8 ml. (●—●) A₂₈₀; (○-----○) actividad histona acetiltransferasa; (◻-.-.-◻) actividad histona desacetilasa; (.....) gradiente de NH₄Cl. B) y C) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de eritrocito (panel B) y a las de levadura (panel C) por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Para ello, se ha incubado una fracción enzimática HD, purificada parcialmente por cromatografía en Ultrogel AcA34, con histonas de eritrocito marcadas radiactivamente, como se describe en el apartado 7 de materiales y métodos. En la figura 21 se muestra la fluorografía de las histonas desacetiladas enzimáticamente, y separadas mediante electroforesis en poliacrilamida con triton-ac. acético-urea. Este procedimiento permite conocer mejor la especificidad de la HD por las histonas, puesto que las fluorografías de las electroforesis en SDS no poseen la suficiente resolución como para poder apreciar las pequeñas variaciones existentes en las fracciones desacetiladas por la HD y sus blancos correspondientes. En dicha figura se incluye también la densidad óptica integrada de cada una de las histonas en relación con la cantidad de las mismas en cada banda. Los resultados indican que la HD de levadura desacetila a las cuatro histonas del "core", aunque parece tener una ligera preferencia por H2A y H2B. Estos datos son coincidentes con los obtenidos por Alonso y Nelson (1986), en los que una actividad desacetilasa, asociada a núcleos de levadura, desacetila a las cuatro histonas tanto de eritrocito como de levadura.

Se ha determinado asimismo la actividad enzimática de la HD con nucleosomas y oligonucleosomas marcados radiactivamente, y obtenidos tal como se describe en el apartado 11 de materiales y métodos. En la tabla XII se presentan los resultados de actividad correspondientes a la incubación de 100 μ l de la fracción enzimática con 50 μ g (unas 120000 dpm) de histonas,

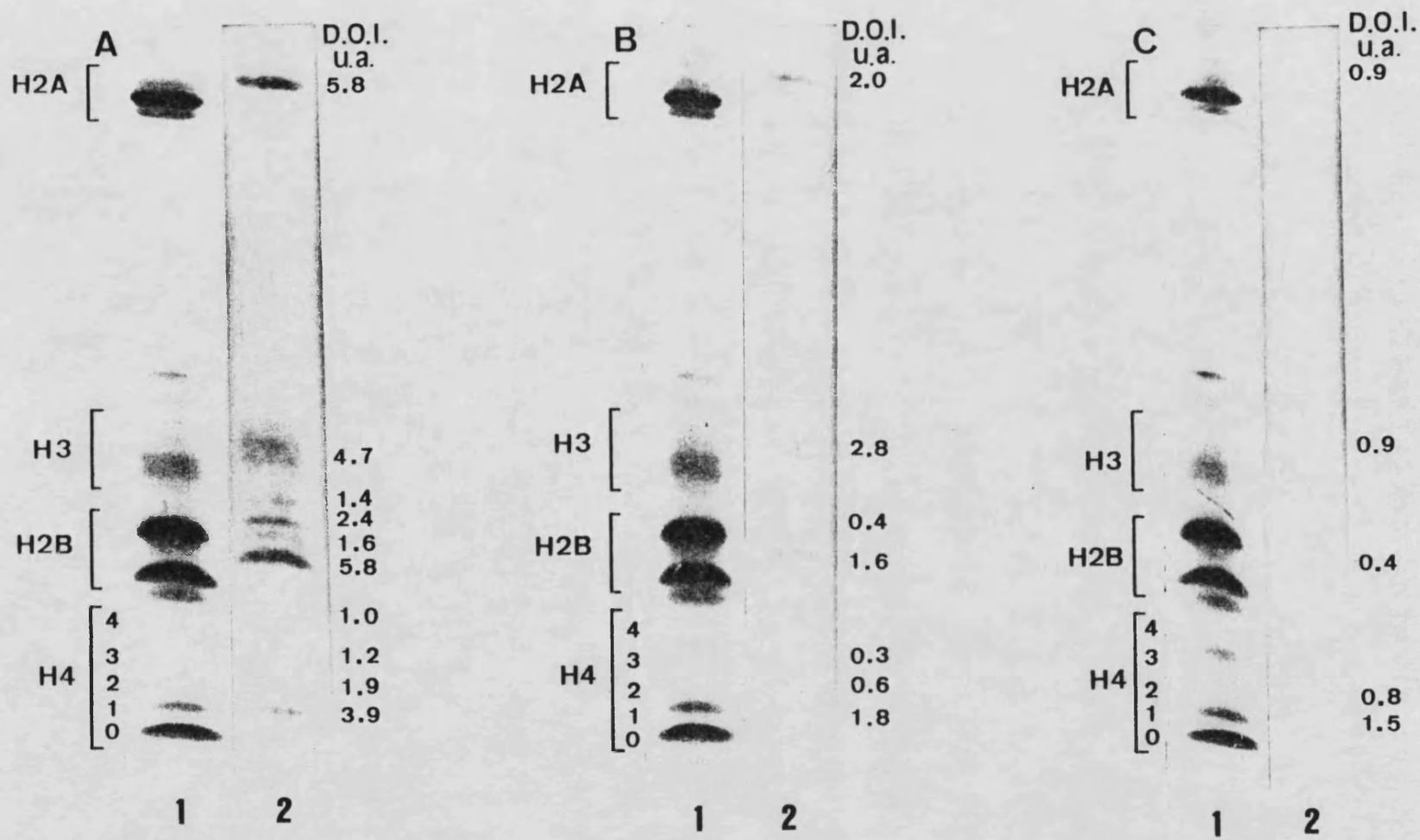


Figura 21.- Especificidad de la actividad histona desacetilasa de levadura frente a histonas marcadas de eritrocito. Las histonas fueron separadas por electroforesis en gel de poliácridamida en presencia de Tritón-ácido acético-urea. En la presente figura se incluyen los valores de Densidad óptica integrada (D.O.I.) de las bandas correspondientes. A) Control de histonas (fracción enzimática calentadas a 70 °C durante 10 min), incubadas a 32 °C, 2 h. B) Incubación de las histonas con la actividad HD a 32 °C durante 1 h. C) Incubación durante 2 h.

Tabla XII.- Actividad histona desacetilasa de levadura con histonas libres, nucleosomas y oligonucleosomas, obtenidos como se describe en materiales y métodos. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

SUSTRATOS	ACTIVIDAD ENZIMATICA (dpm)	% ACTIVIDAD
HISTONAS LIBRES	(4868 ± 169)	100
NUCLEOSOMAS	(2395 ± 50)	49
OLIGONUCLEOSOMAS	(2014 ± 75)	41

nucleosomas u oligonucleosomas. Como podemos observar, la actividad frente a los nucleosomas y oligonucleosomas es bastante inferior a la obtenida con histonas libres, tan sólo el 49 y 41% de actividad, respectivamente. Estos resultados son contrarios a los observados por Hay y Candido (1983 a y b), en los que una histona desacetilasa obtenida de células HeLa libera grupos acetilo de las histonas libres con mayor eficiencia que con nucleosomas. Sin embargo, estos autores utilizan como fuente de la actividad HD un complejo de alto peso molecular, que podría contener, además del enzima, otros factores que puedan modificar en este sentido la especificidad de desacetilación con nucleosomas.

7.2- Localización subcelular de las actividades HAT.

Para determinar la localización subcelular de las actividades histona acetiltransferasa, se obtuvieron núcleos a partir de protoplastos de levadura según el procedimiento descrito en el apartado 2.3 de materiales y métodos. Asimismo se ha obtenido también una fracción enriquecida en citoplasma celular, recogida como sobrenadante en la centrifugación para la sedimentación de los núcleos.

Tras su obtención, los núcleos son lisados en tampón hipotónico en presencia de NaCl 0.5 M y el sobrenadante de la ultracentrifugación correspondiente se aplicó en una columna de

DEAE-Sepharose. Tras el lavado de la columna, las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente 0.01-0.35 M en NH_4Cl , mostrándose en la figura 22 A el perfil de elución obtenido. En esta gráfica aparece un pico, parcialmente dividido en dos, en el principio del gradiente, y un pico minoritario posterior a una fuerza iónica de 0.25 M en NH_4Cl .

En los resultados de especificidad de las HAT con histonas de eritrocito (fig. 22 B) y de levadura (fig. 22 C), se observa la presencia, al principio del primer pico (carreras electroforéticas 1 a 6), de una importante incorporación de radiactividad sobre la histona H2A de eritrocito (panel B) y sobre la H2B en levadura (panel C). En estas carreras también se observa la acetilación de la histona H4, la cual es algo superior en el caso de eritrocito que en levadura. Por tanto, en esa región del gradiente de NH_4Cl eluye el enzima HAT AI específico para H2B>>H4 con histonas homólogas y para H4>H2A con las de eritrocito. Posteriormente se encuentra una elevada incorporación de radiactividad sobre la histona H3, cuyo máximo se localiza en la carrera número 5, tanto en eritrocito (panel B) como en levadura (panel C). Esta acetilación sobre H3 estaría producida por la actividad del enzima HAT AII. Más tarde, en las carreras electroforéticas 9 a 11, existe una incorporación de grupos acetilo sobre la histona H4 principalmente, aunque también minoritariamente sobre la H3, la cual es menor con histonas de levadura que con las de eritrocito. La incorporación que se realiza sobre esta histona induciría a pensar que esta actividad corresponde al enzima HAT BI, que acetila tanto a H4

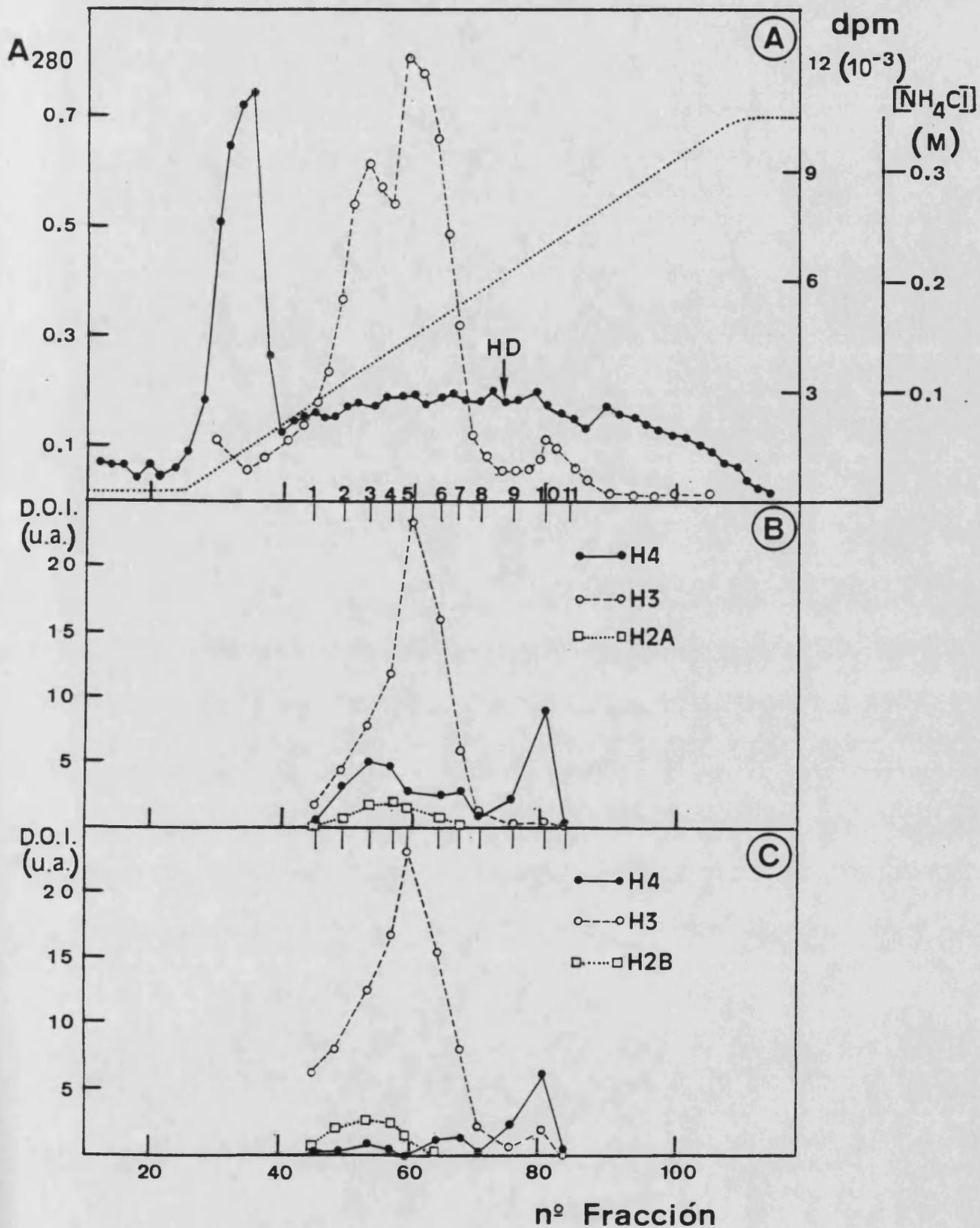


Figura 22.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1.8 x 15 cm) del extracto proteico nuclear. La figura representa el resultado de un experimento con 62 g de células. A) Elución proteica con 400 ml de un gradiente de NH_4Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 30 ml/h, recojiéndose fracciones de 4 ml. (●—●) A_{280} ; (○---○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH_4Cl . B) y C) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de eritrocito (panel B) y a las de levadura (panel C) por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. La flecha indica la fracción a la que eluye la actividad histona desacetilasa.

como a H3 (fig. 19). Sin embargo, la fuerza iónica a la que eluye esta actividad, alrededor de 0.25 M en NH_4Cl , y la posición relativa a la que eluye la HD (señalada con una flecha en la figura 22 A), parecen indicar que se trataría más bien de la actividad HAT BII, específica para la histona H4. La acetilación que se observa sobre H3 podría deberse a que la actividad del enzima AII, que es muy elevada en la cromatografía del extracto nuclear respecto a la del extracto total de protoplastos (fig. 19), se extendiese hasta las fracciones de esta región del gradiente de NH_4Cl . Podemos señalar que en las carreras número 6 y 7 de la figura 22, se produce un aumento significativo en la incorporación de radiactividad sobre H4, que es más elevada en el caso de las histonas de eritrocito (panel B) que en las de levadura (panel C). Esta actividad podría deberse a la existencia del enzima HAT BI que eluye a esa fuerza iónica, alrededor de 0.20 M en NH_4Cl , entre las acetiltransferasas específicas para H3 y H4 respectivamente (fig. 19).

Por otra parte, la fracción enriquecida en citoplasma se ultracentrifugó a 105000xg durante 1 h, y el sobrenadante obtenido se aplicó, al igual que con los núcleos, en una columna de DEAE-Sepharose. En la figura 23 A se presenta el perfil de actividad HAT de la elución proteica en gradiente de NH_4Cl 0.01-0.35 M. La gráfica muestra un comportamiento contrario al que ocurre en la cromatografía de la fracción nuclear, es decir, existe un pico minoritario al principio del gradiente y otro de mayor actividad al final del mismo (alrededor de 0.25 M en

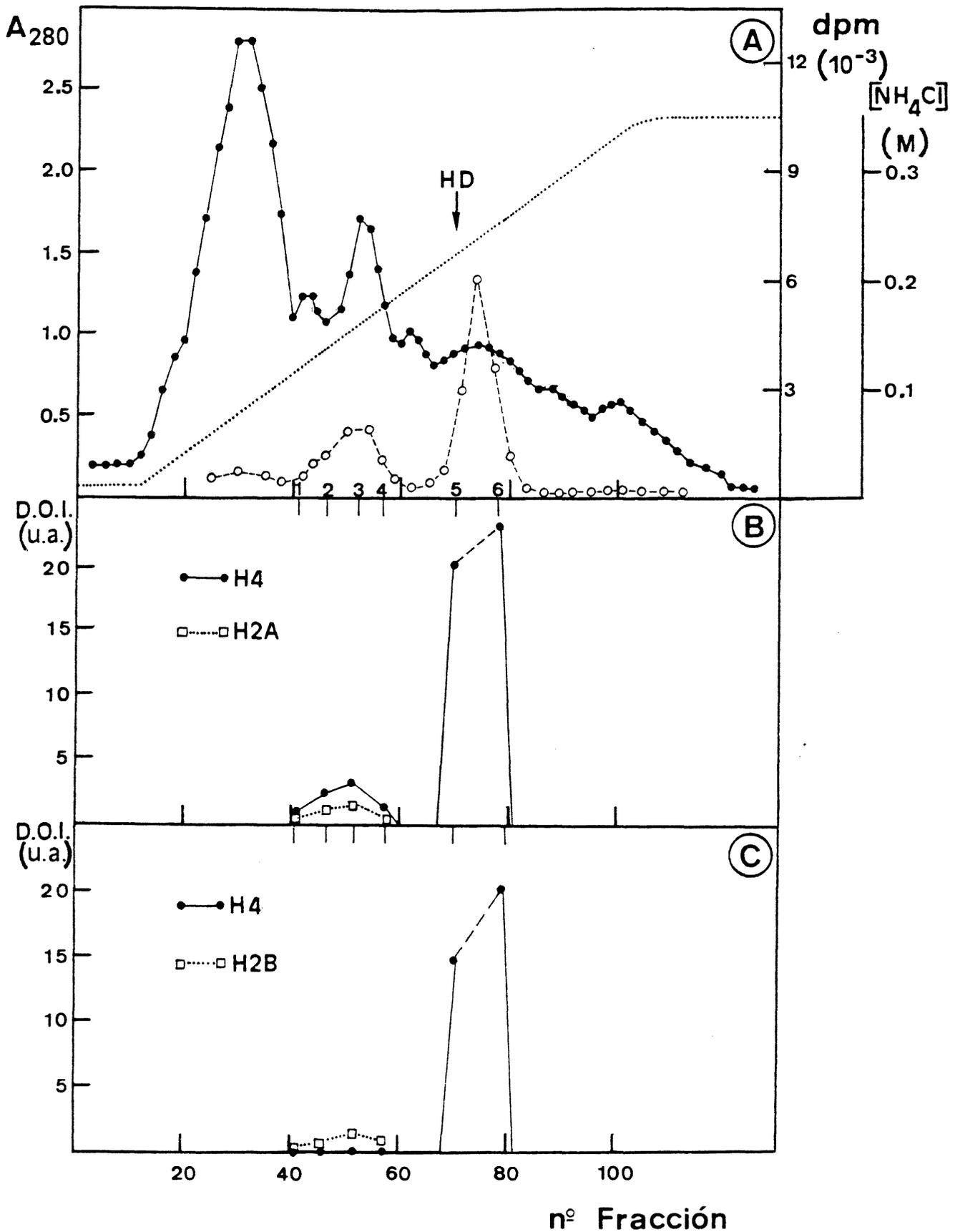


Figura 23.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1.8 x 15 cm) del extracto proteico citoplasmático. La figura representa el resultado de un experimento con 62 g de células. A) Elución proteica con 1200 ml de un gradiente de NH_4Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 50 ml/h, recogiendo fracciones de 6 ml. (●—●) A_{280} ; (○—○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH_4Cl . B) y C) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de eritrocito (panel B) y a las de levadura (panel C) por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. La flecha indica la fracción a la que eluye la actividad histona desacetilasa.

NH_4Cl). En el primer pico de actividad se encontraría el enzima HAT AI, puesto que se produce la acetilación de la histona H2B en levadura (carreras 2 y 3 de la fig. 23 C), y sobre H4>H2A con histonas de eritrocito (fig. 23 B). Este resultado es una prueba más de la existencia de este enzima de forma independiente a la de HAT AII, ya que no se observa, en absoluto, marca sobre la histona H3. Por otra parte, en el pico mayoritario sólo se produce incorporación de radiactividad sobre la histona H4 (carreras electroforéticas 5 y 6) de eritrocito (panel B), o de levadura (panel C), siendo aparentemente por tanto el enzima HAT BII.

En base a estos resultados podemos concluir que en los núcleos de levadura se localizarían las actividades enzimáticas HAT AI, HAT AII y HAT BI. Cabe señalar que han sido obtenidos resultados similares en cuanto a la localización subcelular de estos enzimas mediante precipitación, y posterior cromatografía, de un extracto nuclear con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación. La actividad HAT BI que aparece en la cromatografía de la fracción nuclear (carreras 6 y 7 de la fig. 22), es sensiblemente inferior a la que se observa en la cromatografía del extracto total de protoplastos lisados (fig. 19). Sin embargo, esta actividad no se encuentra en la fracción citoplasmática (fig. 23), ya que no existe incorporación de radiactividad sobre la histona H3 en ninguna de las carreras electroforéticas. La razón de esta diferencia permanece aún por resolver, aunque una interpretación sería que la acetilación de H3, debida a la elevada actividad del enzima HAT AII en núcleos, estaría

sobrevalorada, por lo que la marca que se produciría sobre las otras histonas, se encontraría disminuida relativamente en el tiempo en el que la placa fluorográfica permanece impresionándose a -80°C (apartado 14.3 de materiales y métodos). Por otra parte la actividad del enzima HAT AI que se observa en la fracción citoplasmática (fig. 23), sería debida probablemente a la inevitable contaminación que representa una parte de los núcleos lisados durante el proceso de extracción. Si esta interpretación es correcta, cabría preguntarse porque no se encuentra del mismo modo una contaminación citoplasmática del enzima HAT AII nuclear. La razón sería posiblemente, tal como se muestra en el apartado 8.3, que este enzima posee una alta afinidad por la cromatina procedente de la fracción nuclear lisada, que es recogida junto a éstos en el proceso de extracción.

Por su parte, el enzima específico para la histona H4 (HAT BII), parece encontrarse en la fracción citoplasmática (fig. 23), lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento, que sugieren que este enzima sería similar a la actividad citoplasmática HAT B específica para esa histona, descrita en otros eucariotas (ver tabla I). La actividad minoritaria de HAT BII, que aparece en la fracción nuclear (carreras 9 a 11 de la fig. 22), se debería posiblemente a la existencia de una pequeña proporción de protoplastos (observables al microscopio óptico) que permanecen intactos en la fracción nuclear y que son lisados posteriormente junto a estos en el tampón hipotónico A (materiales y métodos, apartado

2.2)..

7.3.- Extracción de actividades HAT de la cromatina en ausencia o en presencia de 0.5 M de NH_4Cl .

Algunos autores han sugerido que las actividades HAT podrían estar asociadas fuertemente a la cromatina, ya que se requieren fuerzas iónicas elevadas para la extracción de las mismas (revisión de Doenecke y Gallwitz, 1982). Para comprobar si en levadura alguno de los enzimas HAT pueden estar efectivamente unidos a la cromatina, se han analizado las distintas actividades enzimáticas obtenidas de un extracto total de protoplastos, en ausencia de fuerza iónica significativa, reextrayendo posteriormente el sedimento de la ultracentrifugación correspondiente, con NaCl 0.5 M.

El sobrenadante de la ultracentrifugación en ausencia de NaCl 0.5 M se aplicó en una columna de DEAE-Sepharose y se eluyeron las proteínas retenidas tras el lavado, con un gradiente 0.01-0.35 M de NH_4Cl , como se muestra en la figura 24 A. En el perfil de actividad aparecen tres picos que eluyen a unas fuerzas iónicas similares a las indicadas para HAT AI, HAT BI y HAT BII (fig. 19 A), si bien la actividad total del pico A es bastante inferior en este caso. Los valores de densidad óptica integrada con histonas de levadura (fig. 24 B), ponen de manifiesto que la fracción extraída en ausencia de NaCl contiene



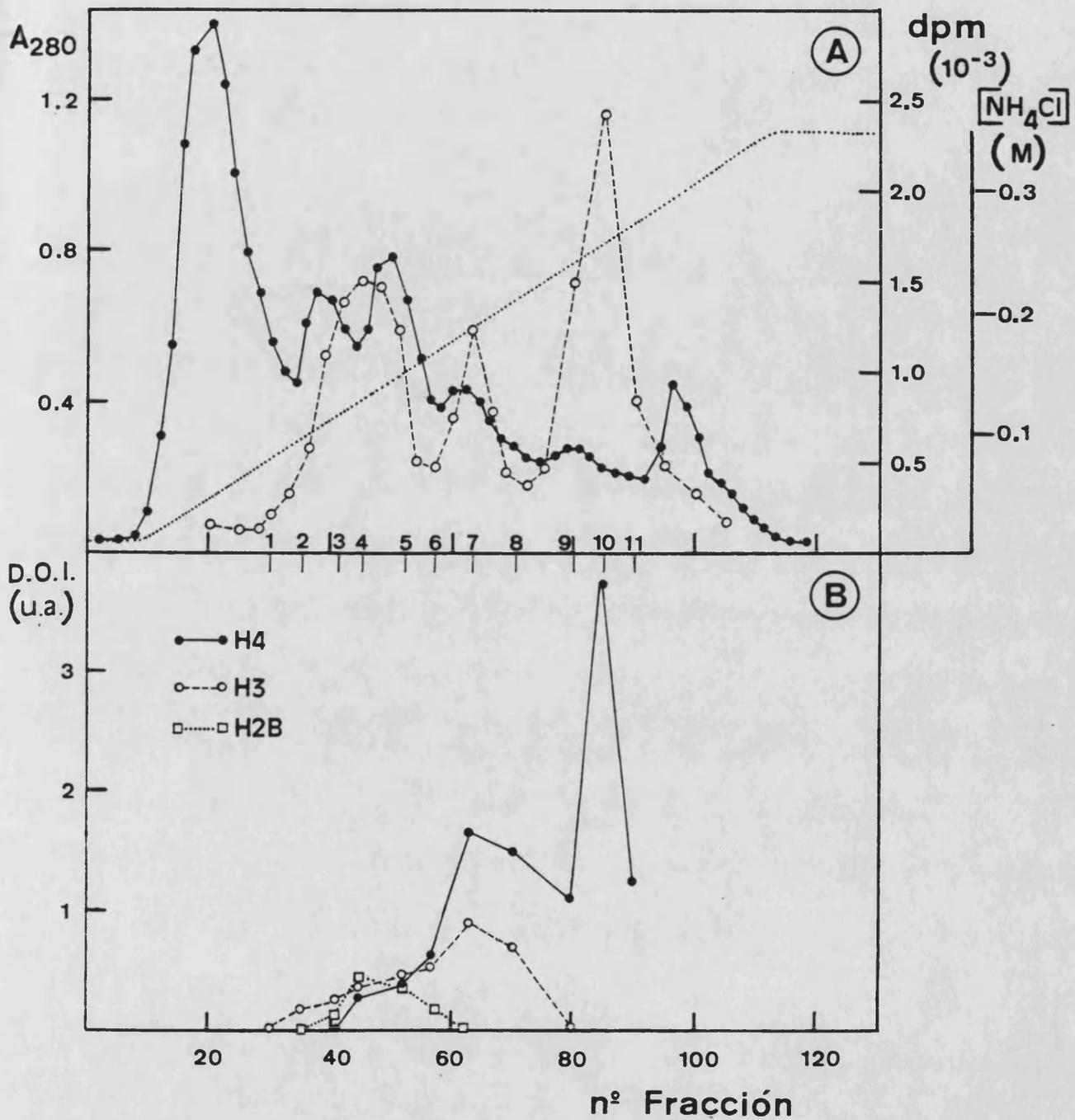


Figura 24.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1.8 x 15 cm) del extracto ultracentrifugado a 105000xg, 1 h en ausencia de NaCl. En la figura se representa el resultado de un experimento con 25 g de células. A) Elución proteica con 500 ml de un gradiente de NH₄Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 30 ml/h, recogiendo fracciones de 6 ml. (●—●) A₂₈₀; (○-----○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH₄Cl. B) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de levadura por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

claramente la enzima HAT AI, ya que existe incorporación de radiactividad sobre las histonas H2B>H4 en las carreras electroforéticas 2 a 7, encontrándose también el enzima HAT BI puesto que se produce la acetilación de H4>H3 en las carreras 5 a 9 y, por último se extrae asimismo el enzima HAT BII ya que se realiza incorporación de grupos acetilo sobre la histona H4 exclusivamente en las carreras 9 a 11. No aparece en esta extracción el enzima que acetila exclusivamente a la histona H3, es decir, la HAT AII.

Por otra parte, el sedimento de la centrifugación reextraído con NaCl 0.5 M, se ultracentrifugó en las condiciones anteriormente descritas. El sobrenadante fue aplicado en columna de DEAE-Sepharose, eluyéndose las proteínas con un gradiente de NH₄Cl 0.01-0.35 M, tal como se muestra en la figura 25 A. En el perfil de actividad HAT podemos observar la existencia de un pico mayoritario y otro de magnitud inferior, que eluyen a fuerzas iónicas similares a los picos de actividad enzimática HAT A y HAT BI, respectivamente. No aparece en el mismo, la actividad correspondiente al pico HAT BII. En la figura 25 B se muestran las densidades ópticas integradas de las histonas marcadas enzimáticamente, de la que se puede concluir que en la fracción extraída con 0.5 M de NaCl se encuentra el enzima que acetila a la histona H2B (HAT AI), tal como se observa en las carreras electroforéticas de la 2 a la 6, claramente diferenciado del que modifica a H3 (HAT AII), cuya incorporación aparece en las carreras de la 5 a la 8, y finalmente el que actúa sobre H4>H3 (HAT BI), como lo indican las carreras 8 a 11.

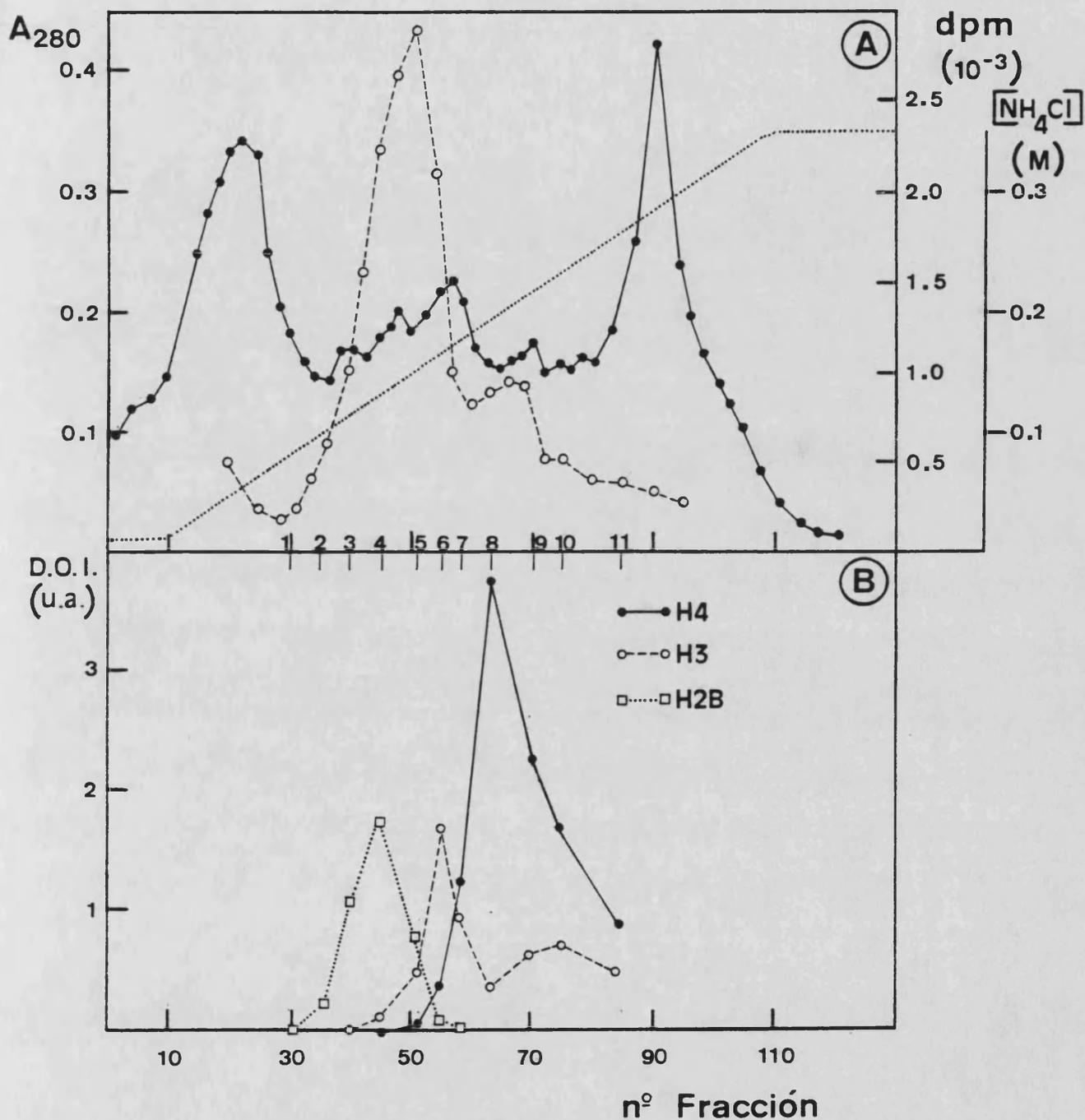


Figura 25.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1.8 x 15 cm) de la fracción proteica reextraída de la ultracentrifugación de la fig. 24 con NaCl 0.5 M. La figura representa el resultado de un experimento con 25 g de células. A) Elución proteica con 500 ml de un gradiente de NH₄Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 30 ml/h, recogiendo fracciones de 6 ml. (●—●) A₂₈₀; (○-----○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH₄Cl. B) Densidad óptica integrada (D.O.I.), de la incorporación radiactiva a las histonas de levadura por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Aparentemente no existe el HAT BII puesto que no aparecen fracciones que acetilen exclusivamente a H4.

En base a estos resultados podemos establecer un orden de afinidad de las HAT por la cromatina, en el que el enzima AI es el que se uniría más fuertemente a la misma, puesto que no aparece actividad de este tipo en la fracción extraída a baja fuerza iónica. Por otro lado, el enzima BII (específico para H4) no parece unirse a la cromatina, ya que se extrae tan sólo en la fracción obtenida en ausencia de NaCl, lo cual estaría de acuerdo con la localización citoplasmática del mismo (fig. 23) y con su inactividad con histonas en forma de nucleosomas. Con una afinidad intermedia se encontrarían los enzimas que acetilan a H2B>H4 y a H4>H3 (HAT AII y HAT BI), ambos unidos preferentemente a la cromatina ya que en el extracto con NaCl 0.5 M existe una mayor actividad que en el obtenido en ausencia de dicha sal. Por tanto, estos enzimas se encontrarían en núcleos de levadura, tal como se muestra en la figura 22, pero no totalmente asociados a la cromatina.

Algunos autores han estudiado la afinidad que presentan enzimas por la cromatina mediante procedimientos cromatográficos de filtración sobre gel. Así por ejemplo, Cano y Pestaña (1979) han señalado que al menos el 50% de la actividad HAT de Artemia salina se encontraría unida a la cromatina, usando en este estudio criterios cromatográficos de filtración en Bio-Gel A50 de un lisado de núcleos y observando que la actividad enzimática se recupera en las fracciones que contienen la cromatina.

Por su parte, Hay y Cándido (1983 a), han observado que la

HD coeluye con la cromatina, formando complejos de elevado peso molecular, en el volumen de exclusión de una columna de Bio-Gel A50m.

Con objeto de intentar determinar si las actividades HAT presentes en levadura forman a su vez estos complejos de alto peso molecular, se aplicó en una columna de Sephadex G-200 el sobrenadante de la ultracentrifugación de un extracto total de protoplastos lisados en presencia de NaCl 0.5 M. Conviene señalar que este sobrenadante contiene abundantes fragmentos de cromatina de tamaño variable.

La gráfica de la elución de la columna y los valores de actividad enzimática se representan en la figura 26. En la misma se observa un pico de elevada actividad que eluye en el volumen de exclusión, y por tanto posee una masa molecular elevada. En las fracciones de este pico la relación A_{260}/A_{280} es de alrededor de 1.45, lo cual indica que posee una proporción elevada de ácidos nucleicos (cuantificándose valores de unos 12 μ g de DNA, medidos por espectrofluorimetría, por ml de volumen y gramo de células), tratándose probablemente de los fragmentos de cromatina excluidos de la columna. Posteriormente aparece un pico de actividad minoritario a un volumen de elución correspondiente a proteínas de masa molecular similar a las descritas anteriormente para las HAT purificadas por DEAE-Sepharose.

Para determinar que enzimas HAT están presentes en esos complejos, se recogieron las fracciones con actividad enzimática señaladas en la figura 26 y se aplicaron en una columna de

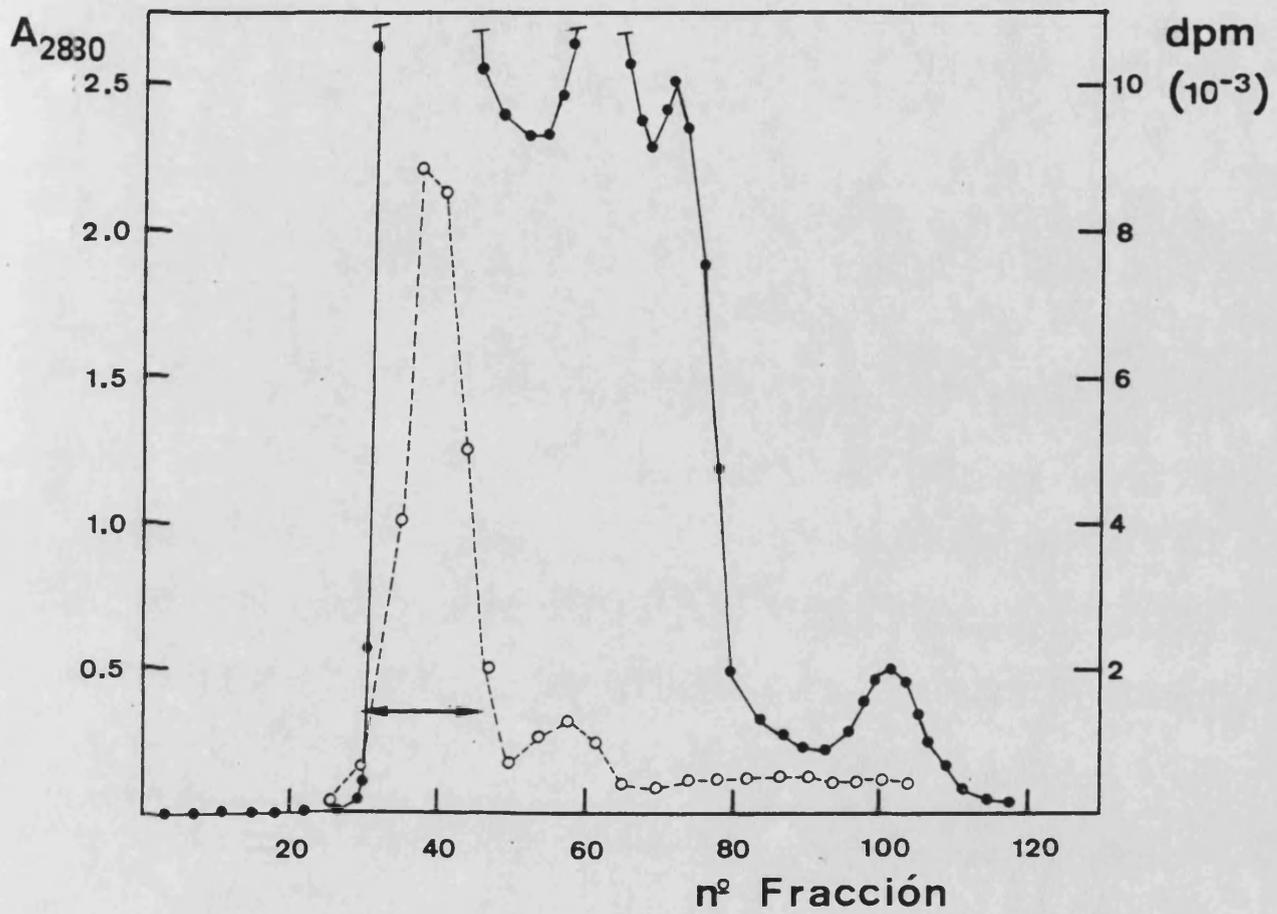


Figura 26.- Cromatografía en columna de Sephadex 6-200 (3 x 120 cm) del extracto proteico ultracentrifugado a 105000xg, 1 h. En la figura se representa el resultado de un experimento con 27 g de células. La elución se realizó en tampón E a un flujo de 20 ml/h. (●—●) A₂₈₃₀; (○-----○) actividad enzimática.

DEAE-Sepharose. La elución de las proteínas con un gradiente de NH_4Cl 0.01-0.35 M, así como el perfil de actividad HAT se muestra en la figura 27 A. En esta gráfica se observa un solo pico de actividad enzimática con un pequeño hombro en la parte derecha del mismo. Las figuras 27 B y C representan los valores de densidad óptica integrada de las histonas de eritrocito y levadura, incubadas con las fracciones señaladas en el perfil de actividad. Podemos observar la presencia en estos eluidos del enzima que acetila en levadura a las histonas H2B>H4 (como lo muestra la incorporación sobre estas histonas, presente en las carreras 1 a 5), así como la del enzima que acetila exclusivamente a H3 (con el máximo de incorporación localizada en la carrera 4), es decir, las HAT AI y HAT AII. También parece estar presente el enzima que acetila a H4>H3 (HAT BI), aunque posiblemente en una baja proporción.

Por tanto, estos complejos de masa molecular elevada, probablemente unidos a fragmentos de cromatina, incluyen fundamentalmente al enzima HAT AII, y en menor medida al AI. Por su parte el BI parece estar presente sólo en una pequeña proporción, mientras que el BII no se encontraría asociado en absoluto.

Es interesante señalar que el enzima BII y la fracción del BI que no se encuentran en el volumen de exclusión, eluyen de la columna en función de su masa molecular formando, posiblemente, el pico minoritario que aparece en la figura 26. En efecto, la especificidad de este pico de actividad minoritario frente a las histonas, muestra una incorporación de radiactividad sobre

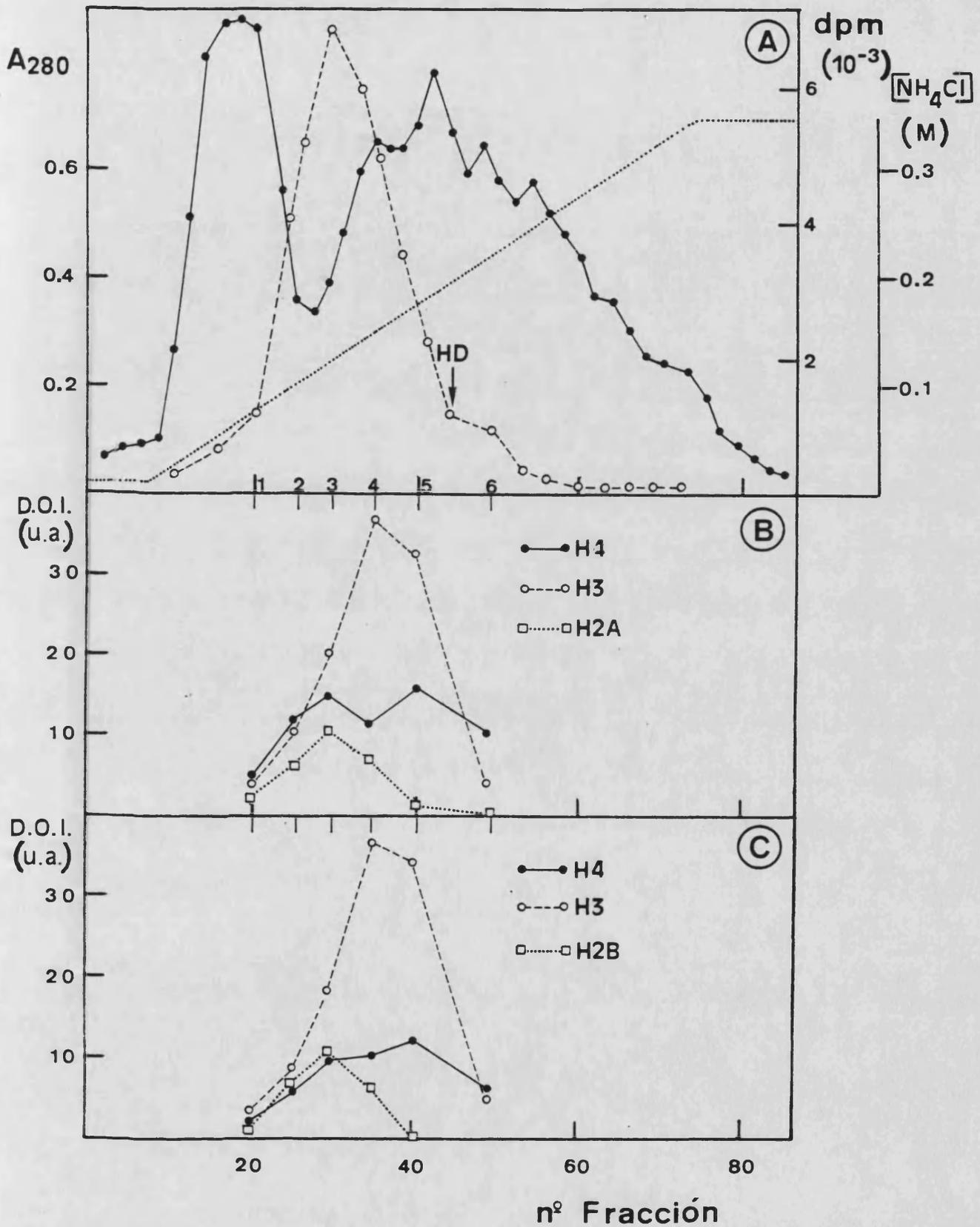


Figura 27.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (1.8 x 15 cm) de las fracciones señaladas en la fig. 26. A) La elución se realizó con 450 ml de un gradiente de NH₄Cl (0.01-0.35 M) en tampón B a un flujo de 30 ml/h, recogiendo 7 ml por fracción. (●—●) A₂₈₀; (○—○) actividad enzimática; (.....) gradiente de NH₄Cl. B) y C) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de eritrocito (panel B) y a las de levadura (panel C) por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. La flecha indica la fracción a la que eluye la actividad histona desacetilasa.

H4>>H3, lo cual corrobora lo antes mencionado. Estos resultados, además de apoyar los obtenidos mediante extracción fraccionada de las HAT de la cromatina con 0.0 y 0.5 M de NaCl (fig. 24 y 25), sugieren que el enzima HAT AII podría ser similar a la HAT DB de linfocitos de bovinos, ya que ésta se encuentra asociada fuertemente a nucleosomas, e incluso su especificidad es similar, ya que ambas actividades acetilan preferentemente a la histona H3, aunque la HAT DB también actúe en menor grado sobre las otras histonas del "core" (Böhm et al., 1980).

Finalmente podemos también señalar, que de nuevo el enzima BII tendría características similares al enzima citoplasmático HAT B, específico para la histona H4 de otros eucariotas (revisión de Doenecke y Gallwitz, 1980).

7.4.- Especificidad frente a nucleosomas.

Con objeto de conocer la especificidad de las actividades HAT obtenidas por ultracentrifugación con nucleosomas, se han incubado las fracciones enzimáticas separadas en el perfil de actividad de la fig. 19 con nucleosomas de eritrocito, en las condiciones descritas en el apartado 14 de materiales y métodos. En la tabla XIII se presentan los resultados obtenidos en la incubación con los nucleosomas, y la cuantificación posterior de la densidad óptica integrada correspondiente a cada histona en la fluorografía. En el pico de actividad HAT A (formado por los

Tabla XIII.- Especificidad de las actividades HAT A, HAT BI y HAT BII, obtenidas por ultracentrifugación a 105000xg, 1 h y separadas por cromatografía en DEAE-Sepharose (fig. 19) con nucleosomas.

	HAT A ((u) AI + (u) AII)		HAT BI ((u) BI)		HAT BII ((u) BII)	
	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD	D.O.I. (u.a.)	%ACTIVIDAD
TOTAL EN NUCLEOSOMAS	81.0	83	16.6	17	---	---
H3	8.7	11	15.5	93	---	---
H2B	17.8	22	----	--	---	---
H2A	53.2	65	----	--	---	---
H4	1.3	2	1.1	7	---	---

enzimas AI y AII) existe incorporación de radiactividad sobre la totalidad de las histonas del "core", según el orden de especificidad H2A>H2B>H3>H4. Estos resultados son similares a los descritos para la HAT A de levadura, obtenidos en el fraccionamiento con PEG o en la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, si bien la proporción relativa de incorporación de radiactividad sobre cada tipo de histonas es algo distinta (ver apartados 5 y 7). En el pico de actividad HAT BI se observa la incorporación de grupos acetilo, en las histonas H3>H4, en nucleosomas. La incorporación de radiactividad sobre estas histonas difiere de los datos obtenidos con PEG (apartado 5) y con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (apartado 7), ya que en el caso del polietilenglicol, la acetilación de H4 es superior a la de H3, mientras que con sulfato amónico parece no encontrarse acetilada la histona H3. La razón de estas diferencias permanece confusa, aunque puede ser debido a que en los distintos procedimientos de extracción se estén aislando factores de naturaleza molecular no conocida, que puedan estar regulando, de algún modo, la acetilación de las histonas en los nucleosomas.

Finalmente, en el pico de actividad HAT BII no aparece incorporación de radiactividad en ninguna de las histonas. Estos resultados junto con los obtenidos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y PEG, así como la localización subcelular del enzima HAT BII, indican que esta actividad sería muy probablemente el enzima citoplasmático específico para H4, e inactivo con nucleosomas, descrito en otros organismos eucariotas (ver tabla I).

Por último, cabe señalar que cuando se utilizan

oligonucleosomas de eritrocito (según se describe en el apartado 11. de materiales y métodos) como sustrato para las HAT, se obtienen resultados de especificidad similares a los encontrados con mononucleosomas, aunque la actividad obtenida con estos últimos es alrededor de un 30% mayor que con oligonucleosomas. Esta diferencia puede reflejar, posiblemente, la menor accesibilidad de las HAT por estos oligonucleosomas, debido a la conformación más plegada y seguramente más compleja que adoptarían.

7.5.- Especificidad de las HAT frente a sustratos no histonas.

Se han realizado estudios encaminados a conocer la especificidad de las acetiltransferasas con diferentes sustratos no histonas. Con este objetivo se recogieron las actividades HAT A, BI y BII separadas por cromatografía en DEAE-Sepharose (fig. 19), se concentraron por ultrafiltración y fueron posteriormente purificadas mediante cromatografía de exclusión molecular en Ultrogel AcA34.

En la tabla XIV se muestran los resultados obtenidos tras incubar los enzimas con los sustratos BSA, sulfato de protamina y poli-L-lisina. Los sustratos se han elegido para comparar la especificidad por el sustrato de histonas, frente a otros sustratos que poseen asimismo una densidad de carga positiva

Tabla XIV.- Especificidad de las actividades histona acetiltransferasa frente a sustratos no histonas. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	HAT A		HAT BI		HAT BII	
	DPM	%ACTIVIDAD	DPM	%ACTIVIDAD	DPM	%ACTIVIDAD
HISTONAS DE LEVADURA	(3012 ± 210)	100	(1369 ± 161)	100	(1579 ± 180)	100
HISTONAS DE ERITROCITO	(1953 ± 72)	65	(1643 ± 148)	120	(1550 ± 83)	98
BSA	(20 ± 104)	1	(205 ± 53)	15	(0 ± 60)	0
POLI-L-LISINA	(0 ± 35)	0	(0 ± 66)	0	(74 ± 91)	5
SULFATO DE PROTAMINA	(253 ± 53)	8	(55 ± 25)	4	(182 ± 64)	12

(sulfato de protamina y poli-L-lisina) y un elevado número de residuos de lisina, donde las HAT podrían introducir grupos acetilo (poli-L-lisina). La BSA es una proteína con una proporción de cargas positivas y negativas más habitual que las histonas. En los resultados de la tabla XIV se observan algunas diferencias apreciables entre las tres actividades HAT, aunque en general todas ellas sean bastante específicas para las histonas, lo cual reflejaría la necesidad del reconocimiento de la zona globular de las mismas.

Por otro lado, Kelner y Mc Carty (1984) han observado que una actividad HAT extraída de núcleos de hígado de cerdo, es capaz de acetilar a las HMG 14 y 17 de eritrocito de pollo. La marca introducida sobre estas proteínas es de alrededor del 2% de la que se incorpora sobre la histona H2B, que es la más acetilada por este enzima. Las HMG son proteínas básicas, en general de bajo peso molecular, que parecen tener un importante papel en la estructura de la cromatina activa o potencialmente activa. Las HMG 14 y 17 han sido bien caracterizadas, conociéndose su secuencia de aminoácidos y la existencia en las mismas de modificaciones postsintéticas, incluida la acetilación. Sin embargo, la estructura de estas proteínas cuando están unidas a la cromatina, y su función *in vivo*, son hasta el presente desconocidas. Las HMG 1 y 2 están menos estudiadas, pero se sabe que están unidas, al igual que las HMG 14 y 17, a los nucleosomas, aunque aparentemente a lugares diferentes en los mismos.

Con objeto de determinar si las HAT presentes en levadura

son capaces de modificar a las HMG de eritrocito o a las HMG de levadura, se han incubado estas proteínas con las HAT A, BI y BII (obtenidas de la forma descrita anteriormente). Los resultados obtenidos indican que estas fracciones HMG son acetiladas, en grado variable, alcanzando en algunos casos hasta el 30%, con respecto a la acetilación de histonas. Sin embargo, cuando se realizaron fluorografías de las HMG, incubadas con los enzimas y separadas mediante electroforesis en poliacrilamida-ac. acético-urea, se observó incorporación de radiactividad sobre polipeptidos de masa molecular pequeña, inferiores a la de las histonas, que no corresponden a las HMG ni en levadura ni en eritrocito. Ello podría ser debido a que en el proceso de extracción de las HMG se arrastran generalmente fragmentos de histonas degradadas por proteasas, que podrían ser acetiladas inespecíficamente por las acetiltransferasas.

Por otra parte, la acetilación de las histonas parece estar implicada en el proceso de relajación de la cromatina, que está acompañado con la aparición en la misma de proteínas tipo protaminas, durante las etapas tardías de espermatogénesis de algunos organismos eucarióticos. En este sentido Libby (1978 y 1980) ha descrito que las HAT "a" y "b" obtenidas de núcleos de hígado de ternera y de rata, poseen actividad enzimática frente al sustrato espermidina. Para comprobar si en levadura puede ocurrir un efecto similar, se han incubado las actividades enzimáticas A, BI y BII con espermina y espermidina, y se ha cuantificado la radiactividad incorporada a estos sustratos (tabla XV). Se puede observar que en todos los casos la

Tabla XV.- Actividad de las histonas acetiltransferasas con poliaminas. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	HAT A		HAT BI		HAT BII	
	DPM	%ACTIVIDAD	DPM	%ACTIVIDAD	DPM	%ACTIVIDAD
HISTONAS DE LEVADURA	(2793 ± 104)	100	(1327 ± 188)	100	(1524 ± 84)	100
ESPERMINA	(251 ± 68)	9	(130 ± 79)	10	(9 ± 15)	< 1
ESPERMIDINA	(284 ± 16)	10	(172 ± 48)	13	(46 ± 4)	3

actividad con las poliaminas es baja, inferior al 15%, en las condiciones estudiadas, lo cual no parece estar de acuerdo con los resultados obtenidos por este autor, cuyos enzimas son casi dos veces más activos con espermidina que con histonas (Libby, 1980).

7.6.- Inhibición de las HAT por el DNA.

Libby (1980) ha observado que las histona acetiltransferasa "a" y "b", aisladas de los núcleos de hígado de rata poseen una inhibición diferencial por el DNA. Con objeto de conocer como afecta la presencia de DNA a las HAT de levadura, se han incubado histonas de levadura con las actividades enzimáticas A, BI y BII, adicionando a la mezcla de reacción, DNA de testículo de salmón hasta concentraciones de 25 y 50 µg/ml. Como se muestra en la tabla XVI, las HAT de levadura parecen ser poco sensibles a la presencia de bajas concentraciones de DNA en el medio, ya que a estas concentraciones, las HAT "a" y "b" de hígado de rata se encuentran inhibidas hasta un 60% y un 30% de su actividad, respectivamente (Libby, 1980). Por otra parte, Cano y Pestaña (1976) han observado en Artemia salina que el DNA interaccionaría preferentemente con las histonas H3 y H4 haciendo a éstas inaccesibles a la HAT de este organismo. En el caso de levadura, esta preferencia determinaría que la HAT AI (específica para la histona H2B de levadura) podría estar menos

Tabla XVI.- Inhibición de las actividades histona acetiltransferasas por DNA. Los valores representan la media de tres ensayos independientes.

	HAT A		HAT BI		HAT BII	
	DPM	%ACTIVIDAD	DPM	%ACTIVIDAD	DPM	%ACTIVIDAD
SIN DNA	(4673 ± 93)	100	(1224 ± 182)	100	(1837 ± 138)	100
25 µg/ml DNA	(3950 ± 376)	85	(1004 ± 235)	82	(1359 ± 58)	74
50 µg/ml DNA	(3752 ± 109)	80	(958 ± 46)	78	(1175 ± 46)	64

inhibida que el resto de los enzimas que acetilan en mayor o menor medida a las histonas H3 y/o H4. Sin embargo, debido a que este enzima coeluye con la HAT AII (específica para H3), este efecto sería menos evidente dando lugar, como se muestra en la tabla, a una inhibición sólo algo menor que el enzima HAT BI (que acetila a H4 y H3) o que el HAT BII (específico para H4). A pesar de todo, el enzima que más se inhibe por el DNA es el BII, lo cual podría estar relacionado con su localización citoplasmática y su inactividad con histonas en nucleosomas.

Por otra parte, también se ha observado que las HAT de levadura parecen encontrarse más inhibidas por el DNA cuando los enzimas se incuban con histonas de eritrocito del "core" nucleosomal. En relación a esta diferencia se puede indicar que la fracción de histonas del "core" puede contener cantidades minoritarias de H1 y H5 que podrían estar induciendo la precipitación de las histonas, disminuyendo de este modo la cantidad de sustrato accesible al(a los) enzima(s), apareciendo como más inhibido que con histonas de levadura.

En base a los resultados obtenidos con los distintos procedimientos de extracción, precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fraccionamiento proteico con el 10 y 20% de PEG y ultracentrifugación en presencia de NaCl 0.5 M, se puede concluir que en levadura parecen existir al menos cuatro actividades histona acetiltransferasa, denominadas como AI, AII, BI y BII. La HAT AI es un enzima nuclear, activo con nucleosomas, que acetila específicamente a la histona H2B de levadura (H2A en el caso de eritrocito) y en mucha menor

proporción a H4. La HAT AII sería asimismo un enzima nuclear, activo con las histonas en nucleosomas, que acetila, tanto con histomas de levadura como de eritrocito, exclusivamente a H3. El otro enzima nuclear, HAT BI, es activo también con nucleosomas y acetilla a H4>>H3, tanto con histonas homólogas como con las de eritrocito. Por último, la actividad HAT BII sería de naturaleza citoplasmática, inactiva frente a nucleosomas, que acetila exclusivamente a la histona H4 y cuya función sería la de acetilar a las histonas, especialmente a la H4, en el citoplasma, cuando las mismas están siendo sintetizadas previo al ensamblaje en nucleosomas. No parece existir sin embargo, en las condiciones de extracción descritas, ninguna HAT que acetile a la histona H2A en levadura. El que no se observe ninguna actividad HAT específica para esta histona sería razonable si, como se ha señalado anteriormente, en las histonas H2B, H3 y H4 pueden ser introducidos in vivo hasta cuatro grupos acetilo, mientras que en H2A tan sólo se introduce un grupo (o de forma más improbable, hasta dos grupos acetilo), lo que podría conducir a que la marca enzimática sobre esta histona fuese muy débil, no siendo detectable mediante el análisis fluorográfico. De cualquier modo, es importante señalar que estos resultados son compatibles con los obtenidos por Nelson (1982), en los que mediante incubación de protoplastos de levadura con [³H]acetato, se produce la incorporación de radiactividad sobre las histonas H2B>H3>H4 y no sobre H2A, aunque este mismo autor indica que existen trazas de radiactividad asociadas a la histona H2A de levadura.

Por otra parte cabe señalar que la existencia de al menos dos actividades HAT que acetilan a la histona H4, una de tipo nuclear (HAT BI) y otra citoplasmática (HAT BII), estaría sustentada por estudios de acetilación *in vivo* de histonas de levadura, en presencia de cicloheximida (Nelson, 1982). En estos estudios se observa que la acetilación que se produce en la histona H4, se reduce más fuertemente (no llegando a ser nula) que la incorporación sobre H2B y H3 en los protoplastos incubados con [³H]acetato en presencia de cicloheximida respecto al control de los protoplastos incubados en ausencia del inhibidor. Esto parece indicar que se estaría produciendo la inhibición de algún enzima, probablemente la HAT BII, que acetilaría a las histonas cuando están siendo sintetizadas.

Por otro lado nuestros resultados parecen indicar que, al menos en levadura, el nivel de acetilación en las histonas estaría regulado por el conjunto de actividades HAT descritas, más que por una única HD capaz de desacetilar a las cuatro histonas del "core" (apartado 8.1.2).

8) VARIACION DE LAS ACTIVIDADES HAT Y HD EN LA CURVA DE CRECIMIENTO DE LEVADURA.

Se han realizado estudios para conocer la variación de la actividad total de las HAT (AI, AII, BI y BII), así como de la HD, a lo largo de la curva de multiplicación celular del cultivo

de *Saccharomyces cerevisiae*. Con este objeto se aplicaron a 2 l de medio líquido, 10 g de células de un cultivo previo de levadura mantenido en fase estacionaria durante 65 h. Las células se recogieron a distintos tiempos de cultivo (1, 2.5, 5, 8, 24 y 65 h, respectivamente desde el inicio del cultivo), reuniéndose las fracciones correspondientes a las HAT A, BI y BII separadas en las cromatografías en DEAE-Sepharose (en las condiciones descritas en el apartado 4.2.2 de materiales y métodos) y cuantificándose la actividad enzimática total mediante análisis fluorográfico de la incorporación de radiactividad sobre las histonas por las HAT. A cada uno de los tiempos de cultivo estudiados se determinó espectrofluorimétricamente, la cantidad de DNA en los extractos, con objeto de poder comparar entre sí los resultados de actividad enzimática total obtenidos para cada HAT.

En las figuras 28 A y B se presentan los resultados de densidades ópticas integradas correspondientes a la acetilación enzimática de las histonas. Las actividades que corresponden a HAT AI y HAT AII se cuantificaron midiendo la incorporación que se produce, respectivamente sobre H2B y H3, de las histonas incubadas con la actividad HAT A (ver fig. 22). En la figura 28 A se puede observar que en la actividad correspondiente al enzima HAT AII se produce un incremento importante de la misma durante los primeros momentos de la curva de crecimiento (fase exponencial), disminuyendo después sensiblemente durante la fase estacionaria. Por otra parte, en la curva correspondiente a la HAT AI también existe un aumento de la actividad enzimática

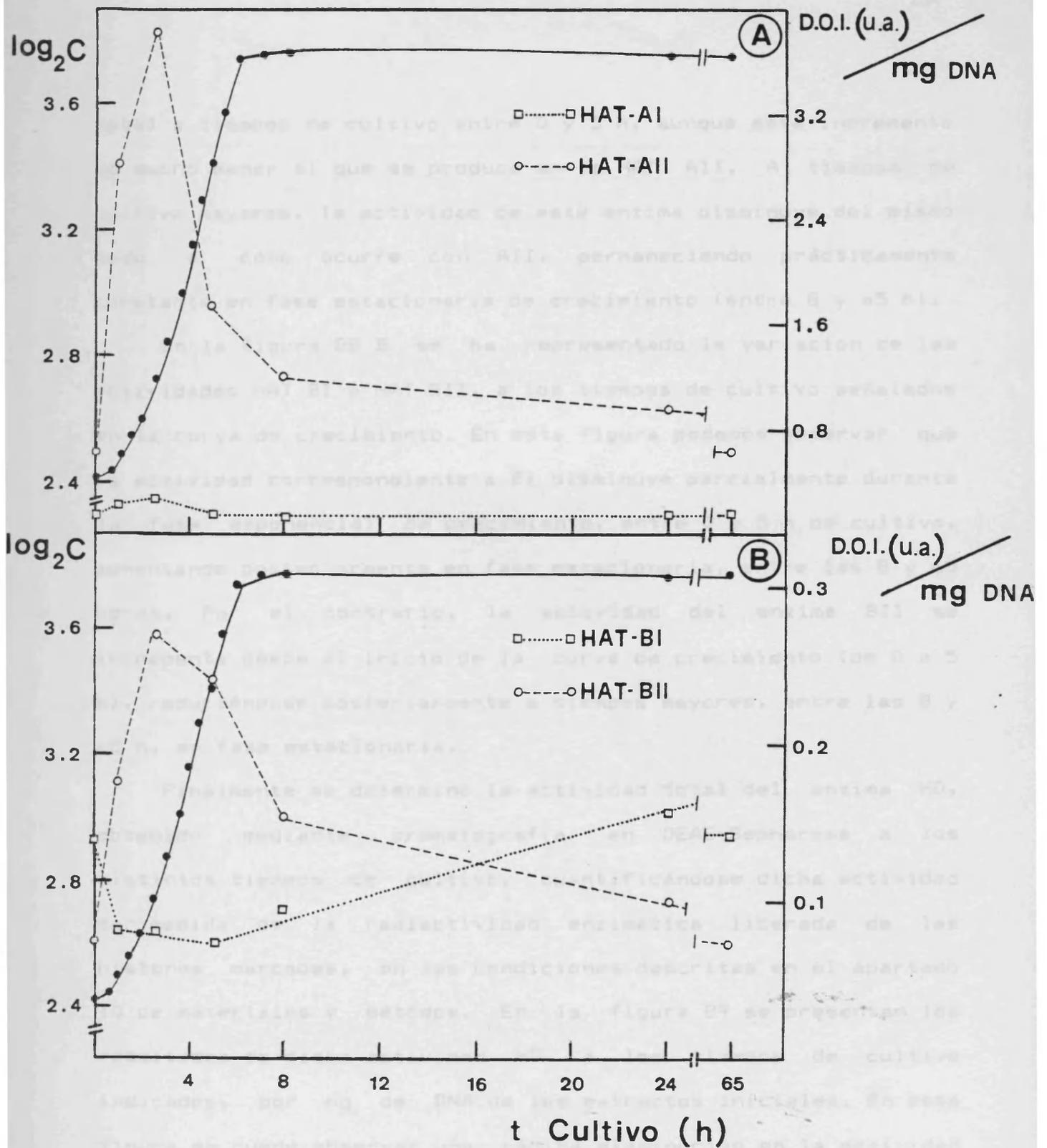


Figura 28.- Actividades totales histona acetiltransferasa en función del tiempo de cultivo de la levadura. A) Densidad óptica integrada (D.O.I.) por μg de DNA del extracto inicial, de las actividades HAT AI y HAT AII a diversos tiempo de cultivo, (●—●) concentración de levadura. B) Densidad óptica integrada (D.O.I.) por μg de DNA del extracto inicial, de las actividades HAT BI y HAT BII a diversos tiempos de cultivo, (●—●) concentración de levadura.

total a tiempos de cultivo entre 0 y 5 h, aunque este incremento es mucho menor al que se produce en la HAT AII. A tiempos de cultivo mayores, la actividad de este enzima disminuye del mismo modo a como ocurre con AII, permaneciendo prácticamente constante en fase estacionaria de crecimiento (entre 8 y 65 h).

En la figura 28 B se ha representado la variación de las actividades HAT BI y HAT BII, a los tiempos de cultivo señalados en la curva de crecimiento. En esta figura podemos observar que la actividad correspondiente a BI disminuye parcialmente durante la fase exponencial de crecimiento, entre 0 y 5 h de cultivo, aumentando posteriormente en fase estacionaria, entre las 8 y 65 horas. Por el contrario, la actividad del enzima BII se incrementa desde el inicio de la curva de crecimiento (de 0 a 5 h), reduciéndose posteriormente a tiempos mayores, entre las 8 y 65 h, en fase estacionaria.

Finalmente se determinó la actividad total del enzima HD, obtenido mediante cromatografía en DEAE-Sepharose a los distintos tiempos de cultivo, cuantificándose dicha actividad por medida de la radiactividad enzimática liberada de las histonas marcadas, en las condiciones descritas en el apartado 10 de materiales y métodos. En la figura 29 se presentan los resultados de dicha actividad HD, a los tiempos de cultivo indicados, por mg de DNA de los extractos iniciales. En esta figura se puede observar una rápida disminución en la actividad HD total durante la fase exponencial de crecimiento (entre las 0 y 5 h del inicio del cultivo), incrementándose posteriormente de forma lenta durante la fase estacionaria, entre las 8 y 65 h de

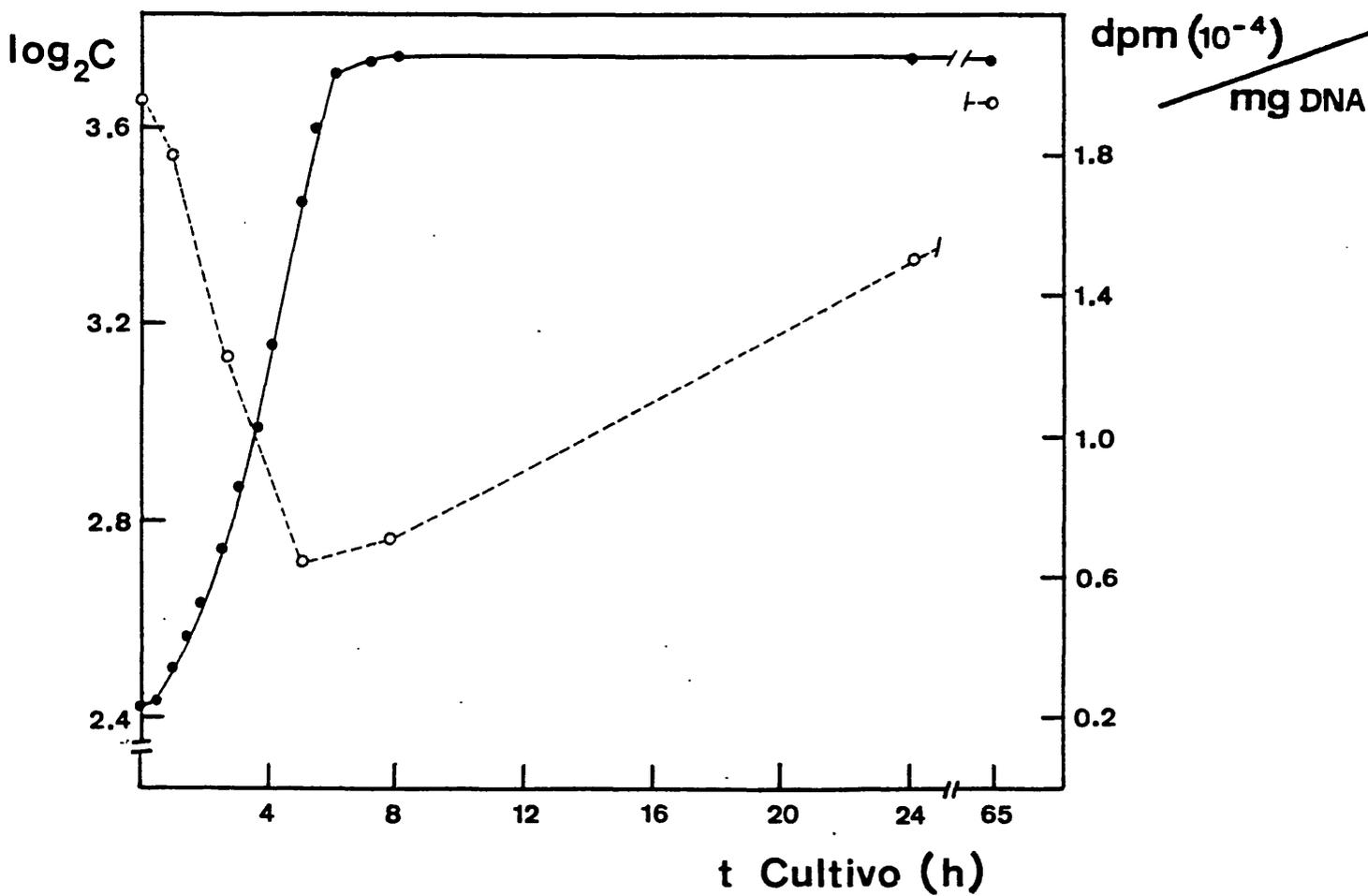


Figura 29.- Actividad total histona desacetilasa en función del tiempo de cultivo de la levadura. (●—●) concentración de levadura; (○-----○) actividad enzimática por mg de DNA del extracto inicial.

cultivo.

De los resultados obtenidos en este apartado es importante señalar que el incremento que se produce en la actividad HAT AII (acetila a H3 y H4 en nucleosomas), es considerablemente superior (unas 50 veces mayor) que el que ocurre en la HAT AI (acetila a H2B y H2A en nucleosomas), al pasar de fase estacionaria (inicio del cultivo) a fase exponencial. Esto podría sugerir que aunque las dos actividades pudieran estar implicadas (ambas aumentan en fase exponencial) en los procesos biológicos (replicación y transcripción del DNA, síntesis de histonas, etc.) que se producen en fase exponencial, sería posiblemente la HAT AII la que podría estar incidiendo más en los mismos. Estos resultados serían compatibles con los observados en levadura (Marian y Wintersberger, 1982) o en *Physarum polyccephalum* (Waterborg y Matthews, 1983 y 1984), que indican una diferencia funcional importante entre la acetilación-desacetilación de las histonas H3 y H4, respecto a la de H2A y H2B. Waterborg y Matthews (1983) postulan además, que la región N-terminal no acetilada de H3 y H4, estabilizaría la estructura de 34 nm de la cromatina inactiva y que la acetilación de las mismas estaría implicada específicamente en la síntesis de RNA. Sin embargo, la región N-terminal de H2A y H2B podría estar estabilizando la estructura de la cromatina activa cuando las interacciones de H3 y H4 están liberadas por la acetilación. La modificación de esta región estaría relacionada con otras posibles funciones biológicas.

También se puede observar, por otro lado, un comportamiento

diferencial de la actividad HAT BI y HAT BII a lo largo de la curva de crecimiento. Esto indicaría que, aunque ambas actividades acetilen preferentemente a la histona H4, serían posiblemente dos enzimas diferentes, que tendrían funciones biológicas distintas. Por otra parte, como hemos indicado más arriba, la actividad HAT BII aumenta durante fase exponencial, en donde la multiplicación celular es muy activa, disminuyendo posteriormente en fase estacionaria. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis postulada por distintos autores, que sugieren que la actividad HAT B específica para la histona H4 en eucariotas, acetilaría en el citoplasma a las histonas recién sintetizadas (Garcea y Alberts, 1980; Wiegand y Brutlag, 1981), estando esta modificación relacionada con el proceso de la deposición de las histonas, y en el ensamblaje posterior de las mismas en nucleosomas, durante la replicación del DNA (Waterborg y Matthews, 1983; Allis *et al.*, 1985; Chicoine *et al.*, 1986).

También cabe señalar que el notable aumento de la actividad HAT AII, durante fase exponencial, podría ser el principal responsable del incremento en la acetilación enzimática total observado durante esta fase, en los extractos eluidos con una fuerza iónica de 0.35 M, en las cromatografías en DEAE-Sepharose mostradas en el apartado 4.2.

Finalmente cabe reseñar que si, como sugieren Hay y Cándido (1983), la acetilación de las histonas está implicada con los procesos en los que se requiere una accesibilidad a los nucleosomas alterada (transcripción, replicación del DNA, recambio de histonas, etc.), sería razonable pensar que el nivel

de acetilación: aumente durante la fase exponencial, para lo cual sería lógico que, al menos, la actividad total HD no aumentase durante ésta. Nuestros resultados indican que esta actividad parece disminuir durante fase exponencial, lo que estaría aparentemente de acuerdo con la hipótesis anterior.



DISCUSSION GENERAL

de acetilación aumente durante la fase exponencial, para lo cual sería lógico que, al menos, la actividad total HD no aumentase durante ésta. Nuestros resultados indican que esta actividad parece disminuir durante fase exponencial, lo que estaría aparentemente de acuerdo con la hipótesis anterior.



DISCUSSION GENERAL

El estudio de las actividades histona acetiltransferasa de Saccharomyces cerevisiae, en el presente trabajo, se ha llevado a cabo utilizando procedimientos de extracción descritos por diversos autores para la obtención de HAT de distintos organismos eucarióticos. Estos procedimientos han sido, en concreto, la precipitación proteica con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el fraccionamiento de las proteínas con el 10 y 20% de polietilenglicol (PEG) y la ultracentrifugación en presencia de 0.5 M de NaCl.

Aunque las gráficas de actividad HAT obtenidas por los distintos métodos de extracción y mostradas en este trabajo, son el resultado de experimentos concretos, han sido realizadas en todos los casos varias extracciones, obteniéndose resultados semejantes en todos ellos.

En el presente trabajo de investigación se ha introducido un nuevo método de análisis de los picos de actividad HAT presentes en los eluidos cromatográficos. En efecto, el análisis de las manchas fluorográficas correspondientes a la acetilación enzimática de las histonas, convenientemente corregido con el analizador de imágenes IBAS 2000, realizado a lo largo de todo el perfil de actividades, medidas convencionalmente, constituye en cierto sentido, una originalidad metodológica. Este seguimiento de la evolución de la acetilación de cada histona, aunque pueda parecer en principio una complicación innecesaria, ha demostrado ser de gran utilidad en la detección de actividades enzimáticas con especificidad diferente, que de otra manera, hubieran sido difícilmente observables.

Con objeto de comprobar la bondad del método de análisis se ha realizado; como ejemplo, la medida de una cromatografía en DEAE-Sepharmose de un extracto proteico precipitado con sulfato amónico. En este caso, la cuantificación de las bandas fluorográficas, así como la cantidad de histonas en el gel teñido con azul Coomassie, se ha repetido hasta 10 veces. En la figura 330 se presentan los resultados de incorporación de radiactividad sobre las histonas, referida a la cantidad de cada una de ellas presentes en el gel de poliacrilamida, así como la desviación estandar de los valores, representada por las barras de error. Como se puede observar, el análisis fluorográfico del perfil de actividad, mediante barridos de los picos enzimáticos, permite obtener resultados fiables respecto a la presencia de actividades HAT en estas cromatografías, ya que las desviaciones son en general muy pequeñas.

Este procedimiento de análisis posee una ventaja adicional importante, que surge del hecho de que en algunas cromatografías se observa la presencia de proteólisis, especialmente en la zona del gradiente de NH_4Cl , donde eluye el pico de actividad HAT A. Este inconveniente puede ser evitado mediante el análisis fluorográfico, ya que, en cada caso, la incorporación está referida a la cantidad de histona presente, lo cual evita la infravaloración de alguna de las actividades enzimáticas.

Por otra parte, se ha observado que mediante esta metodología se podrían diferenciar isoenzimas muy parecidos entre sí, o con puntos isoeléctricos similares, como ocurre sobretodo en el caso de las HAT AI y HAT AII, que eluyen en el

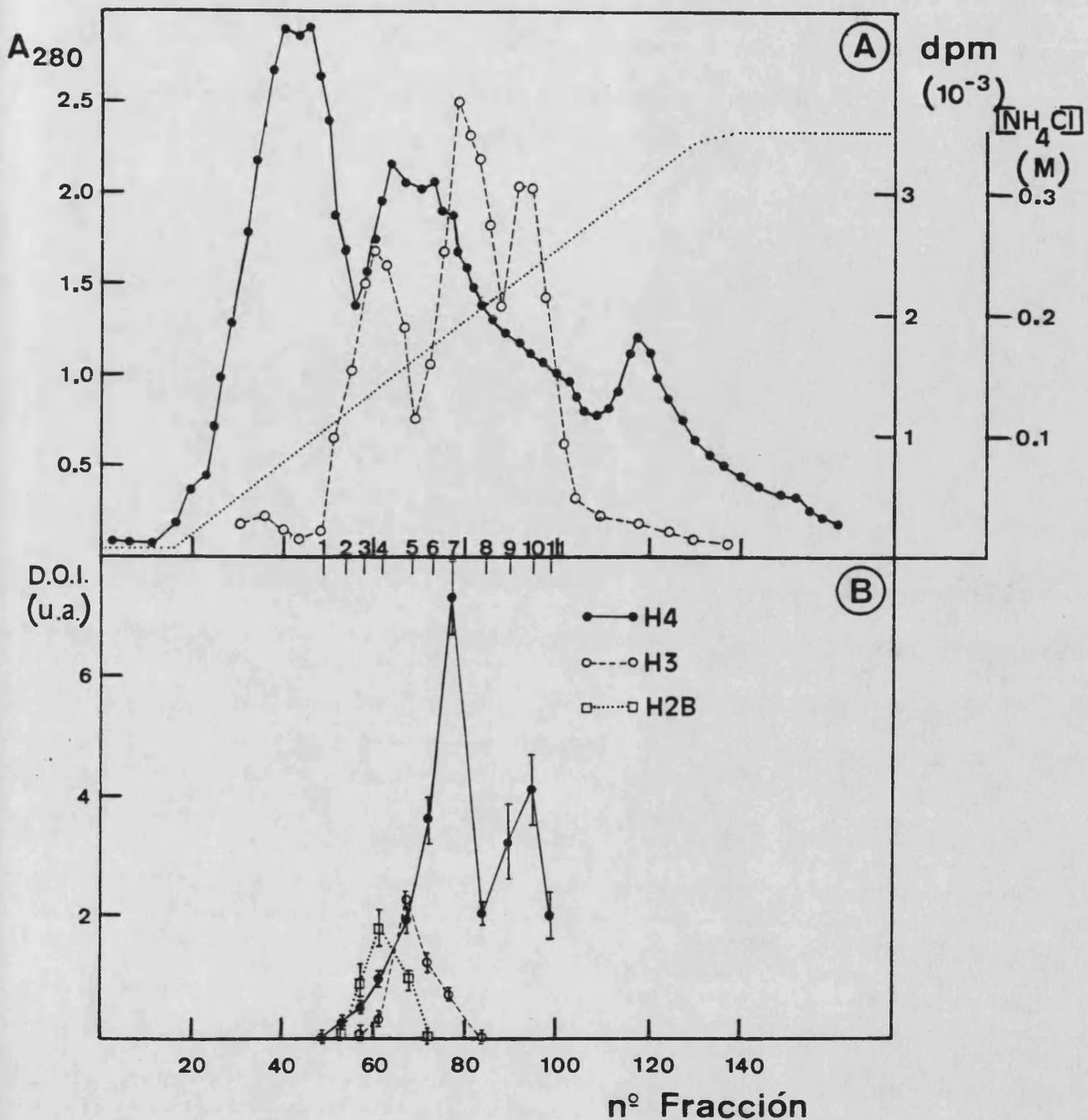


Figura 30.- Cromatografía en columna de DEAE-Sepharose CL-6B (3 x 18 cm) del extracto proteico precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación. A) Elución proteica con 1800 ml de un gradiente de NH_4Cl (0.01-0.35 M) en tampón B, a un flujo de 60 ml/h, recogiendo fracciones de 14.5 ml. B) Densidad óptica integrada (D.O.I.) de la incorporación radiactiva a las histonas de levadura por las fracciones señaladas y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. El análisis de la imagen fluorográfica, así como de la cantidad de histona presente en el gel teñido con azul Coomassie, se repitió 10 veces. Las barras de error representan las desviaciones estándar de estas medidas.

gradiente de fuerza iónica en forma de un pico de actividad único. Es importante señalar que, en levadura, cada actividad HAT parece tener una especificidad casi exclusiva para un tipo de histona. En concreto, la HAT AI acetilaría con histonas libres a H2B, las HAT AII y BII modificarían tan sólo a las histonas H3 y H4, respectivamente y, por último, la HAT BI acetilaría a H4 aunque quizás también y minoritariamente a H3. Así, en la figura 31, se muestran cuatro fluorografías correspondientes a carreras electroforéticas de incubaciones seleccionadas de enzimas HAT AI, AII, BI y BII, con histonas de levadura, pudiéndose observar esta especificidad casi exclusiva por una sola histona. No ha sido observada ninguna actividad HAT que acetile a la histona H2A en levadura. Esto podría ser debido, como se ha apuntado anteriormente, a que en esta histona el número de grupos acetilo que puede ser incorporado *in vivo* es solamente uno (o más improbablemente dos), mientras que en el resto de las histonas pueden ser incorporados hasta cuatro grupos acetilo. Además, la acetilación que se produciría en esa posición sería de muy baja intensidad, de acuerdo con los resultados de Nelson (1982) mediante incubación de protoplastos de levadura con [³H]acetato. Posiblemente, el enzima que acetilase a H2A de levadura sería la HAT AI, puesto que con nucleosomas de eritrocito acetila tanto a la histona H2A como H2B, mientras que con histonas libres acetila tan sólo a la H2A de eritrocito.

La detección de enzimas HAT con especificidad casi exclusiva por una única histona, contrasta con la mayor parte de

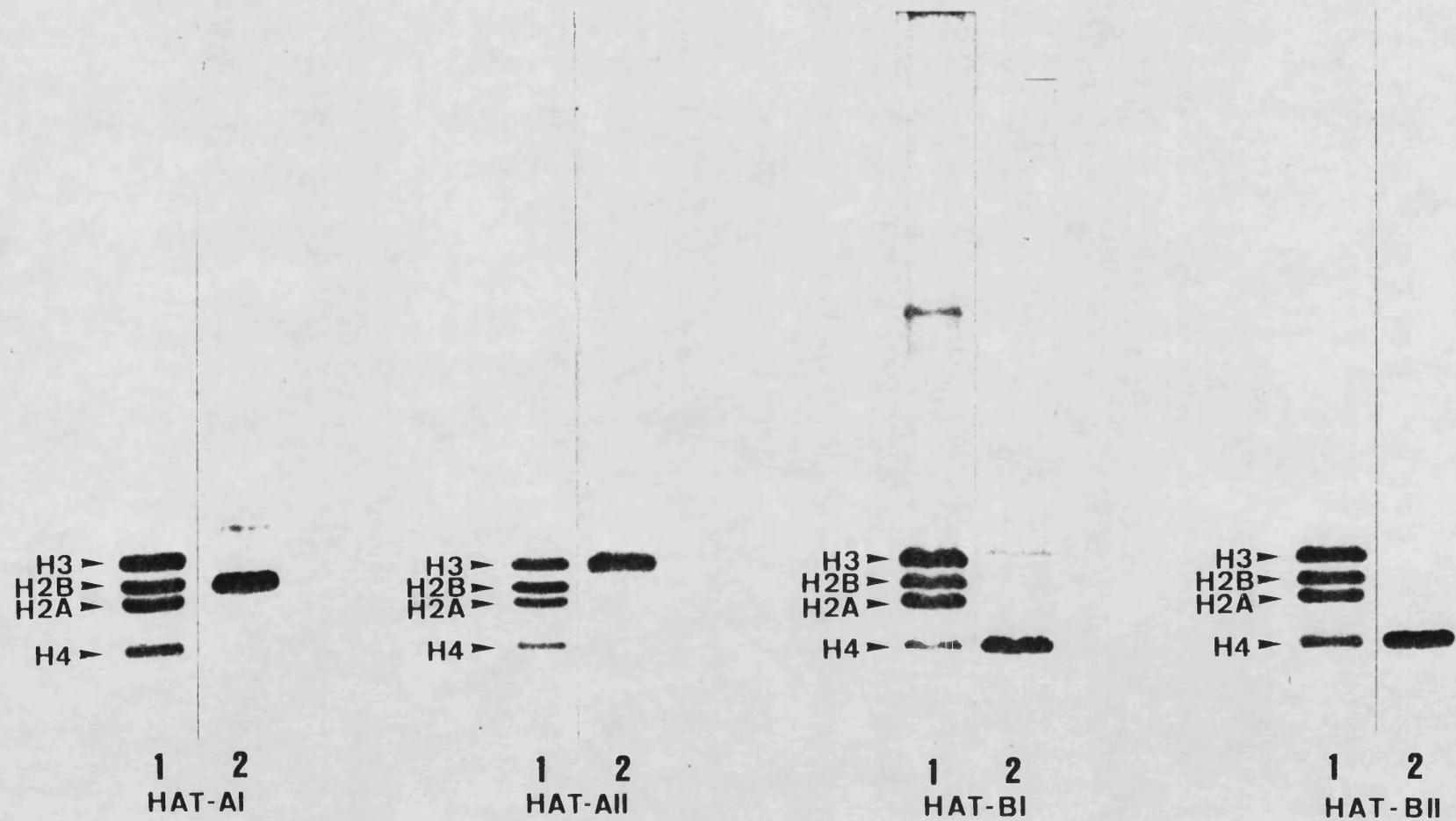


Figura 31.- Selección de carreras electroforéticas de las actividades histona acetiltransferasa de levadura. A) Tinción de los geles con azul Coomassie. B) Flurografia de los mismos geles.

los resultados obtenidos por otros autores, sobre histona acetiltransferasas de diferentes organismos eucarióticos. En concreto, la existencia de una HAT específica para la histona H2B no había sido nunca descrita hasta el momento. Asimismo, una HAT específica para la histona H3 sólo había sido descrita para el caso de un organismo vegetal (Sendra *et al.*, 1986). La situación más generalizada se corresponde, por el contrario, con la obtención de enzimas HAT con capacidad de acetilar varias o todas las histonas (tabla I). No se puede descartar, sin embargo, la posibilidad de que, al igual que el pico HAT A obtenido en los extractos de levadura, alguno de los enzimas descritos, sean en realidad, combinaciones de isoenzimas muy semejantes entre sí. De cualquier modo, resulta imposible predecir si nuestros resultados pueden ser extrapolados a otros organismos eucarióticos, fundamentalmente debido a que la levadura podría constituir quizás un caso especial en este grupo, ya que las histonas de su cromatina se encuentran entre las más altamente acetiladas. Por tanto, el sistema enzimático de acetilación-desacetilación de las histonas podría ser algo distinto en este organismo en relación a otros organismos eucarióticos.

En base a nuestros resultados, se puede deducir que en los sistemas biológicos parece existir una mayor complejidad que la reflejada en una buena parte de trabajos realizados, en los que tan sólo se describe la presencia de un isoenzima HAT de cada uno de los tipos que existen, nuclear y citoplasmático. Sin embargo, más recientemente, esta complejidad se está poniendo de

manifiesto como lo demuestra la descripción en hígado de rata de hasta cuatro isoenzimas HAT (Yukioka *et al.*, 1984) o de al menos tres isoenzimas en *Artemia salina* (Estepa y Pestaña, 1983).

Esta complejidad se ve aumentada además, por el hecho de que en función del sistema de extracción y purificación empleados, diversos autores han descrito para un mismo sistema biológico un número diferente de isoenzimas presentes y/o con características bioquímicas distintas. Así, por ejemplo, en hepatoma de rata, Garcea y Alberts (1980), mediante precipitación con polietilenglicol, han señalado la presencia de un solo enzima nuclear, que acetila a $H4 \gg H3 \gg H2B \gg H2A$ con histonas libres y a $H4 \gg H2A \approx H2B \gg H3$ con nucleosomas. Fukushima *et al.* (1980), en núcleos de hígado de rata obtienen asimismo, mediante ultracentrifugación en presencia de KCl 0.6 M, un solo enzima que acetila, con nucleosomas, a las histonas $H4 \gg H3 \approx H2B$. Por otra parte, Wiktorowicz y Bonner (1982), en este mismo material biológico, mediante extracción con NH_4Cl 0.4 M y una extensa purificación posterior, obtienen un enzima con especificidad frente a histonas libres algo distinta a la descrita por Garcea y Alberts (1980), puesto que acetila a $H3 \gg H4 \gg H2B \gg H2A \gg H1$. Sin embargo, Yukioka *et al.* (1984), mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, han descrito la presencia de al menos dos enzimas en los núcleos de hígado de rata, denominados como NI y NII. Finalmente, Libby (1980), en este mismo sistema biológico, obtiene también dos isoenzimas, mediante precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ al 55% de saturación, pero con diferente especificidad por las histonas que las descritas

por Yulkioka et al. (1984) (ver tabla I).

En levadura, en los extractos obtenidos por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ultracentrifugación y precipitación con el 10% de PEG, se obtienen cuatro isoenzimas HAT (AI, AII, BI y BII), aunque la proporción de los mismos es distinta en los tres procedimientos. Concretamente, la actividad HAT BI parece encontrarse en una baja proporción en la fracción de la ultracentrifugación si se le compara, por ejemplo, con la actividad en el precipitado con sulfato amónico. Un caso especial lo constituye el extracto precipitado con PEG al 20%, en el que no se observa la existencia del enzima específico para H3 (HAT AII). Por tanto, sería aconsejable el uso de distintos procedimientos de extracción, eliminando así los inconvenientes observados al utilizar tan sólo uno de ellos, para conocer el número y tipo de isoenzimas HAT presentes en un organismo eucariótico determinado.

La complejidad mostrada en el sistema enzimático de acetilación-desacetilación de las histonas en levadura, quizás presente también en los demás eucariotas, podría estar de acuerdo con la hipótesis de que esta modificación estaría relacionada con diversas funciones biológicas. Hay y Cándido (1983 a y b) sugieren que la acetilación de las histonas podría no estar implicada en una función biológica concreta, sino que facilitaría todos aquellos procesos en los que se requiera una accesibilidad alterada de los nucleosomas en la cromatina.

Entre los procesos con los que la acetilación ha sido relacionada, cabe destacar, por la abundante bibliografía

acumulada, la de la síntesis de RNA durante la transcripción, la deposición de las histonas y el ensamblaje de las mismas en nucleosomas, la maduración y reorganización de la cromatina y la sustitución de histonas por proteínas específicas (como ocurre por ejemplo con las protaminas durante la espermatogénesis de ciertos eucariotas). En los organismos eucarióticos, y posiblemente también en levadura, el que se produzca uno u otro proceso biológico, podría quizás estar regulado por la acetilación de histonas específicas producida por distintas actividades HAT. Así, por ejemplo, Waterborg y Matthews (1983 y 1984) han sugerido que la modificación de las histonas H3 y H4 podría estar implicada directamente con la transcripción del DNA, mientras que la que se produce en H2A y H2B estaría relacionada con una función distinta, tal vez con la replicación del DNA. Estos autores han indicado diferencias apreciables en el recambio de grupos acetilo, en estas histonas, durante las fases S y G2 del ciclo celular de Physarum polycephalum. En nuestro estudio se ha podido observar una variación diferencial en las actividades HAT, durante la curva de crecimiento de la levadura. La actividad enzimática HAT AII (que acetila a H3 y H4 en nucleosomas) aumenta sensiblemente respecto a la HAT AI (que acetila a H2B y H2A en nucleosomas), al pasar de fase estacionaria a fase exponencial. En esta última fase la actividad metabólica es muy superior a la de la fase estacionaria, especialmente los procesos de replicación y transcripción del DNA. Del mismo modo, la actividad HAT BII parece aumentar durante la fase exponencial, coincidiendo con el

incremento en la división celular. Este aumento estaría posiblemente de acuerdo con la función atribuida a este enzima, de acetilar a las histonas en el citoplasma cuando éstas son sintetizadas, facilitando la deposición de las histonas y el ensamblaje de las mismas en nucleosomas durante la replicación del DNA.

Recientemente se ha sugerido que no sólo el tipo de histona acetilada, sino incluso la posición del residuo modificado, podría estar relacionada con funciones biológicas concretas. Así por ejemplo, se ha descrito que el residuo 5 de lisina en *Physarum policephalum* (Pesis y Matthews, 1986) o el residuo 11 en *Tetrahymena thermophila* (Chicoine et al., 1986) de la histona H4, son preferentemente acetilados durante la deposición de las histonas y el ensamblaje nucleosomal. Por el contrario, el residuo 7 de H4 en *Tetrahymena* parece estar acetilado preferentemente durante la transcripción del DNA (Chicoine et al., 1986). Finalmente, los residuos 5 y 12 de la histona H4 en testículo de *Sepia officinalis*, se encontrarían acetilados en el proceso de sustitución de las histonas por protaminas, durante la espermatogénesis de este organismo (Couppez et al., 1987). Es sugerente pensar que la acetilación diferencial de estos residuos de lisina de la histona H4, podría ser llevada a cabo por distintas acetiltransferasas, y que la mayor o menor actividad de estos enzimas podría estar regulando de algún modo los distintos procesos biológicos. No sería entonces sorprendente encontrar, como ocurre en levadura, más de una actividad HAT específica para un tipo determinado de histona, en

la cromatina.

Podemos por último indicar que, aunque no se conoce si la acetilación de las histonas es causa o efecto de la mayor relajación de la cromatina, el hecho de que se haya llegado evolutivamente a una situación tan compleja (en la que estaría implicada tanto la(s) actividad(es) HAT como la(s) actividad(es) HD) y a la vez tan exquisitamente definida, en cuanto a su especificidad, permite augurar importantes funciones para esta modificación reversible de las histonas.

RESUMEN

La(s) función(es) biológicas de la acetilación de las histonas en los organismos eucarióticos no se conocen totalmente hasta el momento. Un conocimiento más intenso en la regulación del nivel de acetilación podría ayudar a comprender el papel biológico de esta modificación covalente en las histonas.

Este proceso está gobernado por la acción opuesta de las actividades histona acetiltransferasa e histona desacetilasa. En el presente trabajo se ha estudiado la actividad HAT, completándose asimismo el realizado con la HD (Sánchez del Pino, 1987), en la levadura Saccharomyces cerevisiae. Para la obtención de las actividades HAT y HD se han empleado tres procedimientos: precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación, precipitación diferencial con el 10 y 20% de PEG y ultracentrifugación en presencia de NaCl 0.5 M, de extractos proteicos obtenidos a partir de protoplastos de levadura lisados en tampón hipotónico. En el procedimiento de ultracentrifugación se obtiene un rendimiento enzimático superior ya que se evita la utilización de tampones de alta fuerza iónica o concentraciones proteicas elevadas.

Para la determinación de los isoenzimas HAT se ha utilizado la cromatografía en DEAE-Sepharose, la cual permite eliminar la mayor parte de los ácidos nucleicos presentes en los extractos, a la vez que retiene la totalidad de los enzimas HAT presentes en levadura.

Los ensayos de actividad enzimática se han realizado a un pH de 7.9 y 37 °C de temperatura, durante 20 min y a una concentración de NH_4Cl en el medio de incubación entre 100 y 300

mM. Estas condiciones permiten obtener un máximo en la actividad enzimática, así como atenuar en los ensayos la incorporación de radiactividad debida a la acetilación química de las histonas por el acetil CoA.

Mediante cromatografía en columna de DEAE-Sepharose de los cuatro tipos de extractos proteicos y el análisis de las manchas fluorográficas correspondientes a la acetilación enzimática de las histonas, convenientemente corregido mediante el analizador de imágenes y realizado a lo largo del perfil de actividades enzimáticas, se puede concluir que en la levadura Saccharomyces cerevisiae existen, al menos, cuatro actividades histona acetiltransferasa, a las que hemos denominado HAT AI, HAT AII, HAT BI y HAT BII, con diferente especificidad por las histonas. La HAT AI acetila específicamente a la histona H2B en levadura (H2A en el caso de eritrocito) y en mucha menor proporción a H4. La HAT AII modifica exclusivamente a la histona H3 tanto con histonas de levadura como de eritrocito. Los enzimas HAT BI y HAT BII acetilan ambos específicamente a H4, con histonas homólogas o histonas de eritrocito, aunque la BI parece acetilar también con baja intensidad a H3.

Los estudios de especificidad con nucleosomas de eritrocito indican que los enzimas AI, AII y BI son activos con las histonas de nucleosomas, acetilando a H2A>>H2B, H3>H4 y a H3 y H4 respectivamente. Por el contrario, la actividad HAT BII no es activa con los nucleosomas.

En los núcleos de levadura se localizan las actividades HAT AI, HAT AII y HAT BI, mientras que el enzima HAT BII es de

naturaleza citoplasmática. La localización subcelular de este enzima, su especificidad por la histona H4 y su inactividad con nucleosomas sugieren que este enzima es similar al enzima citoplasmático B descrito en otros eucariotas.

La extracción fraccionada de las actividades HAT de la cromatina, con 0.0 y 0.5 M en NaCl, indican que el enzima HAT AII, y en menor medida AI y BI, se encuentran unidos a cromatina, formando posiblemente con ésta complejos de masa molecular elevada, mientras que el isoenzima BII se encontraría en forma libre, lo cual está de acuerdo con la localización citoplasmática del mismo.

Las actividades HAT de levadura son bastante específicas para las histonas, ya que prácticamente no acetilan a otros sustratos: BSA, sulfato de protamina, HMG, poli-l-Lys o poliaminas. Estas actividades son asimismo poco sensibles a la presencia en el medio de incubación de bajas concentraciones de DNA.

Por otra parte, la actividad histona desacetilasa eluye en las cromatografías en DEAE-Sepharose en forma de un pico único a una fuerza iónica similar a la que lo hace la HAT BI. Frente a histonas libres marcadas del "core" de eritrocito de pollo, libera los grupos acetilo de todas ellas con una mayor eficiencia que con histonas en forma de nucleosomas u oligonucleosomas.

Las actividades HAT AI y AII aumentan durante la fase exponencial de la curva de crecimiento de levadura, disminuyendo posteriormente en fase estacionaria. Sin embargo, el incremento

que se produce en la HAT AII es considerablemente superior (unas 50 veces mayor) al que ocurre en la HAT AI, lo cual sugeriría que ambas actividades podrían estar implicadas en funciones biológicas diferentes. También existe un comportamiento diferencial de las actividades HAT BI y HAT BII a lo largo de la curva de crecimiento, lo que indicaría que, aunque ambas enzimas acetilen preferentemente a la histona H4, serían dos enzimas distintos relacionados posiblemente con distintos procesos biológicos. La actividad HAT BII aumenta durante la fase exponencial, en donde la multiplicación celular es muy activa, disminuyendo en fase estacionaria. Ello estaría de acuerdo con la función atribuida a este enzima de acetilar a las histonas en el citoplasma antes de su ensamblaje en nucleosomas. Por otro lado, la actividad HD parece disminuir durante fase exponencial y aumentar en fase estacionaria.

Por tanto, en los sistemas biológicos la regulación del nivel de acetilación de las histonas parece tener una mayor complejidad que la observada hasta el momento. En Saccharomyces cerevisiae este nivel estaría posiblemente regulado por el conjunto de actividades HAT más que por una única actividad HD capaz de desacetilar a las cuatro histonas del "core" nucleosomal.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ALFAGEME, C.R., ZWEIDLER, A., MAHOWALD, A. y COHEN, L.H. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 3729-3736.
- ALLEN, J., HARBORNE, N., RAN, D.C. y GOULD, H. (1982)
J. Cell Biol. 93, 285-297.
- ALLFREY, V.G. (1977)
en "Chromatin and Chromosome Structure", (Li, H.J. y R.A. Eckhardt eds.) pp. 167-192, Academic Press, New York.
- ALLFREY, V.G., FALKNER, R.M. y MIRSKY, A.E. (1964)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 51, 786-794.
- ALLIS, C.D., CHICOINE, L.G., RICHMAN, R. y SCHULMAN, I.G. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 8048-8052.
- ALONSO, W.R. y NELSON, D.A. (1986)
Biochim. Biophys. Acta 866, 161-169.
- ANNUNZIATO, A.T. y SEALE, R.L. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 12675-12684.
- AUSIO, J., BOROCHOV, N., SEGEL, D. y EISENBERG, H. (1984)
J. Mol. Biol. 177, 373-398.
- AUSIO, J. y VAN HOLDE, K.E. (1986)
Biochemistry 25, 1421-1428.
- BARSOUM, J. y VARSHAVSKY, A. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 7688-7697.
- BELIKOFF, E., WONG, L-J. y ALBERTS, B.M. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 11448-11453.
- BELLARD, M., KUO, M.T., DRETZEN, G. y CHEMBON, P. (1980)
Nucleic Acids Res. 8, 2737-2750.
- BERGMAN, L.W. y KRAMER, R.A. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 7223-7227.
- BERTRAND, E., ERARD, M., GOMEZ-LIRA, M. y BODE, J. (1984)
Arch. Biochem. Biophys. 229, 395-398.
- BLOOM, K.S. y CARBON, J. (1982)
Cell 29, 305-317.
- BODE, J. (1984)
Arch. Biochem. Biophys. 228, 364-372.

- BODE, J., HENCO, K. y WINGWUNDER, E.E. (1980)
Eur. J. Biochem. 110, 143-152.
- BODE, J., GOMEZ-LIRA, M.M. y SCHROFER, H. (1983)
Eur. J. Biochem. 130, 437-445.
- BOFFA, L.C., GERSHEY, E.L. y VIDALI, G. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 254, 135-143.
- BOHM, J., SCHLAEGER, E.J. y KNIPPERS, R. (1980)
Eur. J. Biochem. 122, 353-362.
- BRADBURY, E.M. (1975)
en "The structure and function of chromatin". Ciba
Foundation Symp. 28, 1-4. Elsevier.
- BRADFORD, M. (1976)
Anal. Biochem. 72, 248-254.
- BRANDT, W.E., PATTERSON, K. y VON HOLT, C. (1980)
Eur. J. Biochem. 110, 67-76.
- BRANDT, W.I. y VON HOLT, C. (1982)
Eur. J. Biochem. 121, 501-510.
- BROTHERTON, T.W., COVAULT, J., SHIRES, A. y CHALKLEY, R.
(1981)
Nucleic Acids Res. 9, 5061-5073.
- BRYAN, P.N., WRIGHT, E.B. y OLINS, D.E. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 1449
- BUTLER, D.J.G. y THOMAS, J.O. (1980)
J. Mol. Biol. 140, 505
- CAMPBELL, A.M., COTTER, R.I. y PARDON, J.F. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 1571-1580.
- CANDIDO, E.P.M. (1975)
Can. J. Biochem. 53, 796-804.
- CANDIDO, E.P.M. y DIXON, G.H. (1972a)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1975-1979.
- CANDIDO, E.P.M. y DIXON, G.H. (1972b)
J. Biol. Chem. 247, 3868-3873.
- CANO, A. y PESTAÑA, A. (1976)
Dev. Biol. 54, 276-287.
- CANO, A. y PESTAÑA, A. (1979)
Eur. J. Biochem. 97, 65-72.

- CARPENTER, B.G., BALDWIN, J.P., BRADBURY, E.M. e IBEL, K. (1976)
Nucleic Acids Res. 3, 1739-1746.
- CARY, P.D., CRANE-ROBINSON, C., BRADBURY, E.M. y DIXON, G.H. (1982)
Eur. J. Biochem. 127, 137-143.
- CARY, P.D., TURNER, C.H., MAYES, E. y CRANE-ROBINSON, C. (1983)
Eur. J. Biochem. 131, 1367.
- CHALKLEY, R. y SHIRES, A. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 7698-7704.
- CHAMBERS, S.A.M. y SHAW, B.R. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 13458-13463.
- CHAPMAN, G.E., HARTMAN, P.G. y BRADBURY, E.M. (1976)
Eur. J. Biochem. 61, 69-75.
- CHICOINE, L.G. y ALLIS, C.D. (1986)
Dev. Biol. 116, 477-485.
- CHICOINE, L.G., SCHULMAN, I.G., RICHMAN, R., COOR, R.G. y ALLIS, C.D. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 1071-1077.
- CHRISTENSEN, M.E. y DIXON, G.H. (1982)
Dev. Biol. 93, 404-415.
- CHRISTENSEN, M.E., RATTNER, J.B. y DIXON, G.H. (1984)
Nucleic Acids Res. 12, 4575-4592.
- COLE, R.D. (1977)
en "The molecular biology of the mammalian genetic apparatus" Ed. P.O.P. Ts'ao. Vol. I, p. 93. North Holland. Amsterdam.
- COTTEN, M. y CHALKLEY, R. (1985)
Nucl. Acids Res. 13, 401.
- COUPPEZ, M., MARTIN-PONTHIEU, A. y SAUTIERE, P. (1987)
J. Biol. Chem. 262, 2854-2860.
- COUSENS, L.S., GALLWITZ, D. y ALBERTS, B.M. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 1716-1723.
- CSORDAS, A., MULTHAUP, I y GRONICKE, H. (1984)
Biosci. Rep. 4, 155-163.
- CSORDAS, A., PUSCHENDORF, B. y GRUNICKE (1986)
J. Steroid Biochem. 24, 437-442.

- DAVIE, J.R. y CANDIDO, E.P.M. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3574-3577.
- DAVIE, J.R., SAUNDERS, C.A., WALSH, J.M. y WEBER, S.C.
(1981)
Nucl. Acids Res. 9, 3205-3217.
- DELANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L. y BONNER, J.
(1969a)
J. Biol. Chem. 244, 319-334.
- DELANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L. y BONNER, J.
(1969b)
J. Biol. Chem. 244, 5667-5679.
- DELANGE, R.J., HOOPER, J. y SMITH, E.L. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 882.
- DELANGE, R.J., HOOPER, J. y SMITH, E.L. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 3261-3274.
- DELANGE, R.J. y SMITH, E.L. (1971)
Annu. Rev. Biochem. 40, 279-314.
- DELPECH, M., LEVY-FAVATIER, F. y KRUIH, J. (1983)
Biochimie 65, 291-294.
- DE MURCIA, G., HULETSKY, A., LAMARRE, D., GAUDREAM, A.,
POVYET, J., DAUNE, M. y POIRIER, G.G. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 7011-7018.
- DIMITROV, S.I., MAKAROV, V.L., APOSTOLOVA, T.N. y PASHEV,
I.G. (1986)
FEBS Lett. 197, 217-220.
- DOENECKE, D. y GALLWITZ, D. (1982)
mol. Cell Biochem. 44, 113-128.
- DURKACZ, B.W., OMIDIJI, O., GRAY, D. y SHALL, S. (1980)
Nature 283, 593-596.
- DYNAN, W.S. y TJIAN, R. (1985)
Nature 316, 774-778.
- EGAN, P.A. y LEVY-WILSON, B. (1981)
Biochemistry 20, 3695-3702.
- EINCK, L. y BUSTIN, M. (1985)
Exp. Cell Res. 156, 295-310.
- EISSEMBERG, J.C. y LUCCHESI, J.C. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 13986-13991.

- ELGIN, S.C.R. y WEINTRAUB, H. (1975)
Ann. Rev. Biochem. 44, 725-774.
- ENGEL, A., SUPTERLIN, S. y KOLLER, T. (1980)
en "Proc. VII Eur. Congr. Electron Microsc." (Brederoo y
Priester Ed.) Vol. 2, pp. 548-549. The Hague.
- ESTEPA, I. y PESTAÑA, A. (1983)
Eur. J. Biochem. 132, 249-254.
- ESTRUCH, F., PEREZ-ORTIN, J.E. y FRANCO, L. (1986 a)
Cell. Mol. Biol. 32, 195-199.
- ESTRUCH, F. PEREZ-ORTIN, J.E., JOSE, M., PUIGDOMENECH, P. y
FRANCO, L. (1986 b)
FEBS Lett. 197, 179-182.
- FARZANEH, F., ZALIN, F., BRILL, D. y SHALL, S. (1982)
Nature 300, 362-366.
- FELSENFELD, G. (1978)
Nature 211, 115-121.
- FERENZ, C.R. y NELSON, D.A. (1985)
Nucl. Acids Res. 13, 1977-1995.
- FINCH, J.T. y KLUG, A. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1897-1901.
- FINCH, J.T., LUTTER, L.C., RHODES, D., BROWN, R.S., RUSHTON,
B. LEVITT, M. y KLUG, A. (1977)
Nature 269, 29-36.
- FLORES, R. (1978)
Anal. Biochem. 88, 605-611.
- FRANCO, L., JOHNS, E.W. y NAVLET, J.M. (1974)
Eur. J. Biochem. 45, 83-89.
- FRANCO, L. y LOPEZ-BRAÑA, I. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 3743-3757.
- FUJIMOTO, D. (1972)
J. Biochem. 72, 1269-1271.
- FUKUSHIMA, M., OTA, D., FUJIMOTO, D. y HURIUCHI, K. (1980)
Biochem. Biophys. Res. Commu. 92, 1409-1414.
- FUNDERUD, S. y HAUGLI, F. (1977)
Nucleic Acids Res. 4, 405.
- FUSAUCHI, Y. y IWAI, K. (1984)
J. Biochem. Tokyo 95, 147-154.

- GARCEA, R.L. y ALBERTS, B.M. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 11454-11463.
- GAREL, A. y AXEL, R. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3966-3970.
- GIANCOTTI, V., RUSSO, E., CRISTINI, F., GRAZIOSI, G.,
MICALI, F. y CRANE-ROBINSON, C. (1984)
Biochem. J. 218, 321-329.
- GIRI, C.P., WEST, M., RAMIREZ, M. y SMULSON, M. (1978)
Biochemistry 17, 3501-3504.
- GOLDKNOPF, I.L. y BUSCH, H. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 864.
- GOLDKNOPF, I.L. y BUSCH, H. (1981)
Mol. Cell Biochem. 40, 173-187.
- GOODWIN, G.H. y MATHEW, C.G.P. (1982)
en "The HMG chromosomal proteins" Acc. Pres. pp. 193-221.
- GOODWIN, G.H., NICOLAS, R.H. y JOHNS, E.W. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 405, 280-291.
- GOODWIN, G.H., SANDERS, C. y JOHNS, E.W. (1973)
Eur. J. Biochem. 38, 14-19.
- GOODWIN, G.H., WALKER, J.M. y JOHNS, E.W. (1978)
Biochim. Biophys. Acta 519, 233-242.
- GORDON, C.N. (1977)
J. Cell Sci. 24, 81.
- GOTTESFELD, J.M. y BUTLER, D.J.G. (1977)
Nucleic Acids Res. 9, 953-962.
- GOTTESFELD, J.M. y MELTON, D.A. (1978)
Nature 273, 317-319.
- GRIMES, S.R. y HENDERSON, N. (1983)
Arch. Biochem. Biophys. 221, 108-116.
- GRIMES, S.R. y HENDERSON, N. (1984)
Exp. Cell Res. 152, 91-97.
- GRYGORIEV, S.A. y KRASHENINIKOV, I.A. (1982)
Eur. J. Biochem. 129, 119.
- GUPTA, A., JENSEN, D., KIM, S. y PAIK, W.K. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 9677.
- HALLECK, M.S. y SCHLEGEL, R.A. (1983)
Exp. Cell Research 147, 269-279.

- HARBORNE, N. y ALLEN, J. (1983)
FEBS Lett. 155, 88-92.
- HARISANOVA, N.T. y RALCHEV, K.H. (1986)
Cell Differentiation 2, 115-124.
- HARTMAN, P.G., CHAPMAN, G.E., MOSS, T. y BRADBURY, E.M.
(1977)
Eur. J. Biochem. 77, 45.
- HATCH, C.L., BONNER, W.M. y MANDRIANAKIS, E.M. (1983)
Science 211, 468-469.
- HAY, C.W. y CANDIDO, E.P.M. (1983 a)
J. Biol. Chem. 258, 3726-3734.
- HAY, C.W. y CANDIDO, E.P.M. (1983 b)
Biochemistry 22, 6175-6180.
- HEREFORD, L.M. y ROSBASH, M. (1977)
Cell 10, 453-462.
- HEWISH, D.R. y BURGOYNE, L.A. (1973)
Nucleic Acids Res. 3, 69-78.
- HOOOPER, J., SMITH, E.L., SOMMER, K.R. y CHALKLEY, R. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 3275-3279.
- HORIUCHI, K. y FUJIMOTO, D. (1972)
J. Biochem. Tokyo 72, 433-438.
- HUANG, S-Y., BARNARD, M.B., XU, M. MATSUI, S-I y ROSE, S.M.
(1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 3738-3742.
- INOUE, A. y FUJIMOTO, D. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 220, 307-316.
- IGO-KEMENES, T., HORZ, W. y ZACHAV, H.G. (1982)
Annu. Rev. Biochem. 51, 89-121.
- ISENBERG, I. (1979)
Ann. Rev. Biochem. 48, 159-191.
- JOHNS, E.W. (1982)
en "The HMG chromosomal proteins". Acc. Press. pp. 1-7.
- JOHNSON, J.D., DOURAS, A.S. y BONNER, J. (1974)
Int. Rev. Cytol. Suppl. 4, 273.
- KANETA, H. y FUJIMOTO, D. (1974)
J. Biochem. 76, 905-907.

KARPOV, V.L., PREOBRAZHENSKAYA, O.V. y MIRAZABEKOV, A.D. (1984)
Cell 36, 423-431.

KELNER, D.N. y Mc CARTY, K.S. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 3413-3419.

KOLODRUBETZ, D., RYBOWSKI, M.C. y GRUNSTEIN, M. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7814-7818.

KORNBERG, R.D. (1974)
Science, 184, 868-871.

KORNBERG, R.D. (1977)
Ann. Rev. Biochem. 46, 931-954.

KORNBERG, R.D. (1981)
Nature 292, 579-580.

LABARCA, C. y PAIGEN, K. (1980)
Anal. Biochem. 102, 344-352.

LABHART, P. y KOLLER, T. (1982)
Cell 28, 279.

LAEMMLY, U.K. (1970)
Nature 227, 680-685.

LASKEY, R.A. y MILLS, A.D. (1975)
Eur. J. Biochem. 56, 335-341.

LE VINE, H., SAHYOUN, N., Mc CONELL, R., BRONSON, D. y CUATRECASAS, P. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 278.

LEVINGER, L. y VARSHAVSKY, A. (1982 a)
Cell 28, 375-385.

LEVINGER, L. y VARSHAVSKY, A. (1982 b)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 7152-7156.

LIBBY, P.R. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 213, 234-236.

LIBBY, P.R. (1978)
Arch. Biochem. Biophys. 188, 360-363.

LIBBY, P.R. (1980)
Arch. Biochem. Biophys. 203, 384-389.

LIEW, C.C., HASLETT, G.W. y ALLFREY, V.G. (1970)
Nature 226, 414-417.

- LILLEY, D.M.J. y PARDON, J.F. (1979)
Ann. Rev. Genet. 13, 197-233.
- LILLEY, D.M.J. y TATCHELL, K. (1977)
Nucleic Acids Res. 4, 2039-2055.
- LINXWEILER, W. y HORZ, W. (1985)
Cell 42, 281-290.
- LOHR, D. (1983)
Biochemistry 22, 4527-4534.
- LOHR, D. (1984)
Nucleic Acids Res. 12, 8457-8474.
- LOHR, D., CORDEN, J., TATCHELL, K., KOVACIC, R.T. y VAN
HOLDE, V.E. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 79-83.
- LOHR, D. y IDE, G. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 1909-1927.
- LOHR, D. y VAN HOLDE, K.E. (1975)
Science, 188, 165.
- LOIDL, P., LOIDL, A., PUSCHENDORF, B. y GRÖBNER, P. (1983)
Nature 305, 446-447.
- LOIDL, P., LOIDL, A., PUSCHENDORF, B. y GROBNER, P. (1984)
Nucleic Acids Res. 12, 5405-5417.
- LOPEZ-RODAS, G., PEREZ-ORTIN, J.E., TORDERA, V., SALVADOR,
M.L. y FRANCO, L. (1985)
Arch. Biochem. Biophys. 239, 184-190.
- LOSA, R., THOMA, F. y KOLLER, T. (1984)
J. Mol. Biol. 175, 529-551.
- LUTTER, L.C. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 41-56.
- MANDEL, P., OKAZAKI, M. y NIEDERGAN, C. (1977)
FEBS Lett. 84, 331-336.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. y SAMBROOCK, J. (1982)
"Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor
Lab.
- MARDIAN, J.K.W. y ISENBERG, I. (1978)
Biochemistry 17, 3825-3833.
- MARIAN, B. y WINTERSBERGER, U. (1982)
FEBS Lett. 139, 72-76.

- MARUSHIGE, K. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3937-3941.
- MARUSHIGE, K. y BONNER, J. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2941-2946.
- MARUSHIGE, K., MARUSHIGE, Y. y WONG, T.K. (1976)
Biochemistry 15, 2047-2053.
- MAXSON, R., MOHUN, T., GORMENZANA, G., CHILDS, G. y KEDES, L. (1983)
Nature 301, 120-125.
- MAYES, E.L.V. (1982)
en "The HMG chromosomal proteins" Acc. Pres. pp. 9-40.
- Mc GHEE, J.D. y FELSENFELD, G. (1980)
Ann. Rev. Biochem. 49, 1115-1156.
- Mc GHEE, J.D., NICKOL, J.M., FELSENFELD, G. y RAN, D.C. (1983)
Cell 33, 831.
- Mc GHEE, J.D., RAY, D.C., CHARNEY, E. y FELSENFELD, G. (1980)
Cell 22, 87-96.
- Mc LEOD, A.R., WONG, N.C.W. y DIXON, G.H. (1977)
Eur. J. Biochem. 78, 281.
- MENGERITSKY, G. y TRIFONOV, E.N. (1983)
Nucleic Acids Res. 11, 3833-3851.
- MOORE, M., JACKSON, V., SEALY, L. y CHALKLEY, R. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 561, 248-260.
- NAMAS, N., JUHL, H. y ESMANN, V. (1984)
Moll. Cell Biochem. 58, 147.
- NASMYTH, K.A. (1982)
Cell 30, 567-578.
- NEELIN, J.M., CALHAM, P., CAMB, D.C. y MURRAY, K. (1964)
Can. J. Biochem. Physiol. 42, 1743.
- NELSON, D.A. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 1565-1568.
- NELSON, D.A. y ALONSO, W.R. (1983)
Biochim. Biophys Acta 741, 269-271.
- NELSON, D.A., BELTZ, W.R. y RILL, R.L. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1343-1347.

- NELSON, D., COVAULT, J. y CHALKLEY, R. (1980)
Nucleic Acids Res. 8, 1745-1763.
- NELSON, D.A., FERRIS, R.C., ZHANG, D-E. y FERENZ, C.R.
(1986)
Nucl. Acids Res. 14, 1667-1682.
- NELSON, D.A., PERRY, M., SEALY, L. y CHALKLEY, R. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 1346-1353.
- NICOLAS, R.T. y GOODWIN, G.H.
en "The HMG Chromosomal Proteins". Acc. Press. pp 41-68.
- NIEDERGAN, C., DE MURCIA, G., ITTEL, M.E., POUYET, J. y
MANDEL, P. (1985)
Eur. J. Biochem. 146, 185-191.
- NISHIZUKA, Y., UEDA, K., HONJO, T. y HAYAISHI, O. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 3765-3767.
- NOHARA, H., TAKAMASHI, T. y OGATA, K. (1966)
Biochim. Biophys. Acta 127, 282-284.
- NOLL, M. (1974)
Nature 251, 249-251.
- NOMOTO, M., KYOGOKU, Y. y IWAI, K. (1982)
J. Biochem. 92, 1675.
- OBERHAUSER, H., CSORDAS, A., PUSCHENDORF, B. y GRUNICKE, H.
(1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 110-116.
- OKAYAMA, H., FUKUSHIMA, M., UEDA, K. y HAYAISHI, O. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 7000.
- OLINS, D.E., BRYAN, P.N., HARRINGTON, R.E., HILL, W.E. y
OLINS, A.L. (1977)
Nucleic Acids Res. 4, 1911-1931.
- OLINS, A.L. y OLINS, D.E. (1974)
Science 183, 330-332.
- OLIVA, R. y MEZQUITA, C. (1982)
Nucl. Acids Res. 24, 8049-8059.
- OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. y CHAMBON, P. (1975)
Cell 4, 281-300.
- OTTO, B., BÖHM, J. y KNIPPERS, R. (1980)
Eur. J. Biochem. 112, 363-366.

- PAIK, W.K. y Di MARIA, P. (1984)
en "Methods in enzymology. Posttranslational modifications".
Vol. 106 A, pp. 274. Acc. Press.
- PAIK, W.K., PEARSON, D., LEE, H.W. y KIM, S. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 213, 513-522.
- PARDON, J.F., WORCESTER, D.L., WOOLEY, J.C., COTTER, R.I.,
LILLEY, D.M.J. y RICHARDS, B.M. (1977)
Nucleic Acids Res. 4, 3199-3214.
- PASHEV, I.G., DIMITROV, S.I., IVANOV, I.G. y MARKOV, G.G.
(1983)
Eur. J. Biochem. 133, 379-382.
- PEDERSON, D.S., THOMA, F. y SIMPSIM, R.T. (1986)
Ann. Rev. Cell Biol. 2, 117-147.
- PEREZ-ORTIN, J. E., ESTRUCH, F., MATA LLANA, E. y FRANCO, L.
(1986)
Mol. Gen. Genet. 205, 422-427.
- PEREZ-ORTIN, J.E., ESTRUCH, F., MATA LLANA, E. y FRANCO, L.
(1987)
Nucleic Acids Res. (en prensa).
- PERRY, M. y CHALKLEY, R. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 3313-3318.
- PESIS, K.H. y MATTHEWS, H.R. (1986)
Arch. Biochem. Biophys. 251, 665-673.
- PESTAÑA, A. y PITOT, H.C. (1975)
Biochemistry 14, 1404-1412.
- PHILLIPS, D.M.P. (1963)
Biochem. J. 87, 258-263.
- POGO, B.G.T., POGO, A.O., ALLFREY, V.G. y MIRSKY, A.E.
(1968)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59, 1337-1344.
- POIRIER, G.G., DE MURCIA, G., JONGSTRABILEN, J., NIEDERGANG,
C. y MANDEL, P. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3423-3427.
- POOLEY, A.S., PARDON, J.F. y RICHARDS, B.M. (1974)
J. Mol. Biol. 85, 533-549.
- PRIOR, C.P., CANTOR, C.R., JOHNSON, E.M., LITTAU, V.C. y
ALLFREY, V.G. (1983)
Cell 34, 1033-1042.

- PROFFIT, J.H. (1985)
Mol. Cell Biol. 5, 1522-1524.
- PRUNELL, A., KORNBERG, R.D., LUTTER, L.C., KLUG, A., LEWITT, M. y CRICK, F.M.C. (1979)
Science 204, 855.
- PUIGDOMENECH, P., CABRE, O., PALAU, J., BRADBURY, E.M. y CRANE-ROBINSON, C. (1975)
Eur. J. Biochem. 59, 237-243.
- RATTNER, J.B. y HAMKALO, B.A. (1978)
Chromosoma 69, 363.
- RATTNER, J.B. y HAMKALO, B.A. (1978)
J. Cell Biol. 81, 453.
- RATTNER, J.B., SAUNDERS, C., DAVIE, J.R. y HANKALO, B.A. (1982)
J. Cell Biol. 93, 217.
- RECZEK, P.R., WEISSMAN, D., HÜVÖS, P.E. y FASMAN, G.D. (1982)
Biochemistry 21, 993-1002.
- REEVES, R. (1976)
Science 194, 529-532.
- REEVES, R. (1977)
Eur. J. Biochem. 75, 545-560.
- REEVES, R. (1978)
Biochemistry 17, 4908-4916.
- REEVES, R. (1984)
Biochim. Biophys. Acta 782, 343-393.
- REEVES, R. y CSERJESI, P. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 4283-4290.
- REEVES, R. y JONES, A. (1976)
Nature 260, 495-500.
- RICHARDS, B.M., PARDON, J.F., LILLEY, D.M., COTTER, R.L., WOOLEY, J.C. y WORCESTER, D.L. (1977)
Cell Biol. Int. Rep. 1, 107-116.
- RICHMOND, T.J., FINCH, J.T., RUSHTON, B., RHODES, D. y KLUG, A. (1984)
Nature 311, 532-537.
- RODRIGUES, J.A., BRANDT, W.F. y VON HOLT, C. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 578, 196.

- ROZIJN, T.H. y TONINO, G.J.H. (1964)
Biochim. Biophys. Acta 91, 105.
- RUIZ-CARRILLO, A., WANG, L.J. y ALLFREY, V.G. (1975)
Science 190, 117-128.
- RUIZ-CARRILLO, A., WANG, L.J. y ALLFREY, V.G. (1976)
Arch. Biochem. Biophys. 174, 272-290.
- RYBOWSKI, M., WALLIS, J., CHOE, J. y GRUNSTEIN, M. (1981)
Cell 25, 477-487.
- SALVADOR, M.L., SENDRA, R., LOPEZ-RODAS, G., TORDERA, V. y FRANCO, L. (1985)
FEBS Lett. 191, 55-58.
- SANCHEZ DEL PINO, M.M. (1987)
Tesina de Licenciatura. Universidad de Valencia.
- SANDERS, L.A., SCHECHTER, N.M. y McCARTY, K.S. (1973)
Biochemistry 12, 783-791.
- SAUTIERE, P., WOUTORS-TYROU, D., LAYNE, B. y BISERTE, G. (1975)
en "The Structure and Function of Chromatin" Ciba Foundation Symp. 28, 78. Elsevier eds.
- SENDRA, R., SALVADOR, M.L., LOPEZ-RODAS, G., TORDERA, V. y FRANCO, L. (1986)
Plant Science 46, 189-194.
- SHAW, B., HERMAN, T., KOVACIC, R.T., BEAUDREAU, G.S. y VAN HOLDE, K.E. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 505.
- SHOOTER, K.V., GOODWIN, G.M. y JOHNS, E.W. (1974)
Eur. J. Biochem. 47, 263.
- SIMPSON, R.T. (1971)
Biochemistry 10, 4466-4470.
- SIMPSON, R.T. (1978)
Biochemistry 17, 5524-5531.
- SIMPSON, R.T. (1986)
Bio-Essays 4, 172-176.
- SIMPSON, R.T. y KUNZLER, P. (1979)
Nucleic Acids Res. 6, 1387.
- SLEDZIEWSKI, A. y YOUNG, E.T. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 253-256.

SMITH, R.D., HARRIS, M.R., SIGOURNAY, C.M. y BUSTIN, M.
(1984)
Eur. J. Biochem. 138, 309-317.

SOMMER, A. (1978)
Mol. Gen. Genetic. 161, 323-331.

SPERLING, L. y TARDIEU, A. (1976)
FEBS Lett. 64, 89-91.

SPIKER, S. (1983)
J. Biol. Chem. 257, 4250-4255.

SPIKER, S., MARDIAN, J.K.W. e ISENBERG, I. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 129-135

STADLER, J., GROUDINE, M., DODGSON, J.B., ENGER, J.D. y
WEINTRAUB, H. (1980 a)
Cell 19, 973-980.

STADLER, J., LARSEN, A., ENGERL, J.D., DOLAN, M., GROUDINE,
M. y WEINTRAUB, H. (1980 b)
Cell 20, 451-460.

STRICKLAND, W.N., STRICKLAND, M., DE GROOT, P.C., VON HOLT,
C. y WITTMANN-LIEBOLD, B. (1980)
Eur. J. Biochem. 104, 449.

STRUHL, K. (1982)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 901-910.

SUAU, P., BRADBURY, E.M. y BALDWIN, J.P. (1979)
Eur. J. Biochem. 97, 593-602.

SUNG, M.T. y DIXON, G.H. (1970)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1616-1623.

SURES, I. y GALLWITZ, D. (1980)
Biochemistry 19, 943-951.

SZENT-GIORGI, L. y ISEMBERG, I. (1983)
Nucleic Acids Res. 11, 3717-3736.

TACK, L.O. y SIMPSON, R.T. (1979)
Biochemistry 18, 3110-3118.

THOMA, F., KOLLER, T. y KLUG, A. (1979)
J. Cell Biol. 83, 403-407.

THREADGILL, G.J. y ARNSTEIN, H.R.V. (1985)
Biochim. Biophys. Acta 847, 228-234.

THWAITS, B.H., BRANDT, W.F. y VON HOLT, C. (1976a)
FEBS Lett. 71, 193-196.

- THWAITTS, B.H., BRANDT, W.F. y VON HOLT, C. (1976b)
FEBS Lett. 71, 197-199.
- TRAUGH, J.A. y SHARP, S.B. (1979)
Methods Enzymol. 60, 534-541.
- TRAVIS, G.H., COLAVITO-SHEPANSKI, M. y GRUNSTEIN, M. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 14406-14412.
- TRIVELDI, L., GUPTA, A., PAIK, W.K., y KIM, S. (1982)
Eur. J. Biochem. 128, 349.
- URBAN, M.K. y ZWEIDLER, A. (1983)
Dev. Biol. 95, 421-428.
- VAN HOLDE, (1985)
en "Chromatin". Springer Verlag Ed. Heidelberg.
- VAVRA, K.J., COLAVITO, -SHEPANSKI, M. y GOROVSKY, M.A. (1982)
Biochemistry 21, 1772-1781.
- VIDALI, G., BOFFA, L.C. y ALLFREY, V.G. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 7365-7373.
- VIDALI, G., BOFFA, L.C., BRADBURY, E.M. y ALLFREY, V.G.
(1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 2239-2243.
- WALKER, J.M. (1982)
en "The HMG chromosomal proteins". Acc. Press. pp. 69-87.
- WALKER, J.M., GOODERHAM, R., HASTINGS, J.R.B., MAYES, E. y
JOHNS, E.W. (1980)
FEBS Lett. 122, 264.
- WALKER, J.M., GOODWIN, G.H. y JOHNS, E.W. (1979 a)
FEBS Lett. 100, 394.
- WALKER, J.M., GOODERHAM, K. y JOHNS, E.W. (1979 b)
Biochem. J. 179, 253.
- WALKER, J.M., GOODWIN, G.H., SMITH, B.J. y JOHNS, E.W.
(1982)
en "The Chromosomal Proteins. Protein Metabolism."
Comprehensive Biochemistry 19, cap 6, pp. 507-573. Elsevier
eds.
- WALLACE, R.B., SARGENT, T.D., MURPHY, R.F. y BONNER, J.
(1977)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3244-3248.
- WATERBORG, J.M. y MATTHEWS, H.R. (1983 a)
Biochemistry-USA. 22, 1489-1496.

- WATERBORG, J.M. y MATTHEWS, H.R. (1983 b)
FEBS Lett. 162, 416-419.
- WATERBORG, J.M. y MATTHEWS, H.R. (1984)
Eur. J. Biochem. 142, 329-335.
- WEBER, S. e ISENBERG, I. (1980)
Biochemistry 19, 2236-2240.
- WEINTRAUB, H. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1212.
- WEINTRAUB, H. y GROUDINE, M. (1976)
Science 193, 848-856.
- WEINTRAUB, H., PALTER, K. y VAN LENTE, F. (1975)
Cell 6, 83-88.
- WEINTRAUB, H. y VAN LENTE, F. (1974)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4249.
- WEISBROD, S. (1982)
Nature 297, 289-295.
- WEISBROD, S., GROUDINE, M. y WEINTRAUB, H. (1980)
Cell 19, 289-301.
- WEISBROD, S. y WEINTRAUB, H. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 630-634.
- WHITLOCK, J.P. y SIMPSON, R.T.
Biochemistry 15, 3307-3314.
- WIDOM, J. y KLUG, A. (1985)
Cell 43, 207-213.
- WIEGAND, R.C. y BRUTLAG, D.L. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 4578-4583.
- WIKTOROWICZ, J.E. y BONNER, J. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 12893-12900.
- WILLIAMS, S.P., ATHEY, B.D., MUGLIA, L.J., SCHAPPE, R.S. y
GOUGH, A.H. (1986)
Biophys. J. 49, 233-248.
- WINTERSBERGER, V., SMITH, P. y LETNANSKY, K. (1973)
Eur. J. Biochem. 33, 123-130.
- WONG, L.J.C. (1980)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1362-1369.

- WONG, L.J.C. y PATTON, W.F. (1985)
Int. J. Biochem. 17, 123-126.
- WONG, M., ALLAN, J. y SMULSON, M. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 7963-7969.
- WONG, T.K. y MARUSHIGE, K. (1986)
Biochemistry 15, 2041-2046.
- WOODCOCK, C.L.F. (1973)
J. Cell Biol. 59, 368.
- WOODCOCK, C.L.F., FRADO, L. y RATTNER, J.B. (1984)
J. Cell Biol. 99, 42-52.
- WOODCOCK, C.L.F., SAFER, J.P. y SATCH-FIELD, J.E. (1976)
Exp. Cell Res. 97, 101-110.
- WORCEL, A., GARGIULO, G., JESSEE, B., UDUARDY, A., LOUIS, C.
y SCHEDL, P. (1983)
Nucleic Acids Res. 11, 421-439.
- WORCEL, A., STROGATZ, S. y RILEY, D. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1461-1465.
- WU, C. (1980)
Nature 286, 854-860.
- WU, K.C., STRAUSS, F. y VARSHARSKY, A. (1983)
J. Mol. Biol. 170, 93-117.
- WU, R.S. y BONNER, W.M. (1981)
Cell 27, 321-330.
- WU, R.S., PANUSZ, H.T., HATCH, C.L. y BONNER, W.M. (1986)
Critical Reviews in Biochemistry 20, 201-263.
- WU, R.S., TSAI, S. y BONNER, W.M. (1982)
Cell 31, 367-374.
- WU, R.S., TSAI, S. y BONNER, W.M. (1983)
Biochemistry 22, 3868-3873.
- YUKIOKA, M., SASAKI, S., HENMI, S., MATSUDO, M., HATYAMA, T.
e INOUE, A. (1983)
FEBS Lett. 158, 281.
- YUKIOKA, M., SASAKI, S., QI, S-L. e INOUE, A. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 8372-8377
- YOUNG, D. y CARROLL, D. (1983)
Mol. Cell Biol. 3, 720-730.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Gerardo Lopez Rodas
la calificación de Opto cum laude

Valencia, a 1 de Noviembre de 1987

El Secretario,

Rosa Le Fruto

