

Universitat Autònoma de Barcelona

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIOS SOBRE LA INTERACCIÓN DE  
SUBTIPOS DE LA HISTONA H1 CON EL DNA Y  
LA CROMATINA**

**Mary Orrego Cardozo**

**Bellaterra, Enero de 2004**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIOS SOBRE LA INTERACCIÓN DE  
SUBTIPOS DE LA HISTONA H1 CON EL DNA Y  
LA CROMATINA**

Trabajo realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona por Mary Orrego Cardozo, bajo la dirección de la Dra. Inma Ponte Marull y del Dr. Pere Suau León.

Mary Orrego Cardozo

Inma Ponte Marull

Pere Suau León

**Bellaterra, Enero de 2004**

A Oscar, Lukas y Santiago

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

A Pere Suau León, por darme la oportunidad de continuar mi formación, por el apoyo integral que recibí en todos estos años, por su entrega para que fuera posible este, para mí, gran proyecto; gracias por compartir las alegrías y los momentos difíciles.

A Inma Ponte Marull quiero agradecerle su entrega, su gran dedicación, su incondicional disponibilidad y su constante orientación para que este trabajo se hiciera realidad. Muchas gracias por ser, más que directora de tesis, una amiga, quien fue mi gran apoyo en todos los momentos vividos.

A mis compañeros de laboratorio Roger, Marcus y Alicia, muchas gracias por compartir conmigo sus conocimientos y por dedicarme parte de su tiempo.

A todos los compañeros del Departamento, especialmente a Silvia, Mohamed, Sonia, Zoran, Esther, Susana y Helena.

A Oscar, Lukas y Santiago, porque fueron el motor que me impulsó a emprender y terminar esta gran tarea; quiero agradecerle especialmente a Oscar por el apoyo, por toda la paciencia y por compartir los buenos y malos momentos.

Por último, quiero expresar que la culminación de esta tesis y los momentos vividos durante su realización, han sido una gran experiencia que me ha enriquecido académica y humanamente.

A todos los llevaré siempre en mi corazón.

---

## INDICE

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Organización y función de la cromatina .....	1
1.1.1. El nucleosoma.....	1
1.1.1.1. La estructura del DNA en el nucleosoma .....	2
1.1.1.2. Posicionamiento de los nucleosomas .....	4
1.1.2. La fibra de 30 nm.....	5
1.1.3. La estructura de los cromosomas.....	11
1.1.4. La infraestructura del cromosoma y del núcleo.....	12
1.1.5. La regulación de la transcripción a través de la modificación de la cromatina.....	15
1.2. Las proteínas HMG .....	18
1.3. Las histonas internas .....	19

1.3.1.	La posición de las histonas internas en el nucleosoma.....	21
1.3.2.	Variantes de las histonas internas.....	24
1.3.3.	Modificaciones post-traduccionales de las histonas internas .....	27
1.3.3.1.	Acetilación .....	28
1.3.3.2.	Fosforilación .....	31
1.3.3.3.	Metilación .....	31
1.3.3.4.	ADP-ribosilación .....	31
1.3.3.5.	Ubiquitinización .....	32
1.4.	La histona H1.....	32
1.4.1.	Los subtipos de la H1 .....	32
1.4.2.	Expresión de las histonas H1 .....	34
1.4.3.	La estructura de la histona H1 .....	36
1.4.3.1.	El dominio globular.....	36
1.4.3.2.	Los dominios amino- y carboxi-terminales.....	39
1.4.4.	La posición de la histona H1 en el nucleosoma.....	43
1.4.5.	La histona H1 en la condensación de la cromatina. ....	46
1.4.6.	Proteínas que desplazan la H1 del nucleosoma. ....	49
1.4.7.	Modificaciones post-traduccionales de la histona H1 .....	50
1.4.7.1.	Fosforilación. ....	50
1.4.7.2.	ADP-ribosilación. ....	54
1.4.8.	La histona H1 y las SARs .....	56
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
3.1.	Purificación de los subtipos de la histona H1 .....	63
3.1.1.	Material biológico .....	63
3.1.2.	Purificación de núcleos de cerebro de rata .....	63
3.1.3.	Purificación salina de las histonas H1 por cromatografía de intercambio catiónico. ....	65
3.1.4.	Purificación de la histona H1° por cromatografía de gel filtración. ....	66
3.1.5.	Purificación de las histonas H1a,b,c,d,e por HPLC de fase reversa....	68
3.2.	Purificación de plásmidos.....	69
3.2.1.	Purificación de los plásmidos p1314 y pUC19 .....	69
3.2.2.	Digestión del plásmido p1314 con Kpn I y BamH I. ....	70
3.2.3.	Digestión del plásmido pUC19 con HaeIII .....	71
3.2.4.	Digestión del plásmido pBR322 con Eco RI y Sal I.....	71
3.2.5.	Purificación de la región SAR de 657 pb y del fragmento de 587 pb del pUC19.....	72
3.2.6.	Precipitación del DNA .....	73
3.2.7.	Secuencias de los fragmentos de DNA .....	74

3.2.7.1. Secuencia de la SAR de 657 pb.....	74
3.2.7.2. Secuencia del fragmento del pUC19 de 587 pb .....	74
3.2.7.3. Secuencia del fragmento del pBR322 de 650 pb.....	75
3.3.    Técnicas electroforéticas.....	75
3.3.1. Electroforesis SDS-PAGE .....	75
3.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con urea-acético.....	77
3.3.3. Tinción con azul de coomassie brillante R250 .....	79
3.3.4. Tinción con amidoblack B10.....	80
3.3.5. Tinción con nitrato de plata .....	80
3.3.6. Electroforesis de DNA.....	82
3.4.    Interacción de los subtipos de la histona H1 con el DNA.....	84
3.4.1. Experimentos de competición entre subtipos de la histona H1 por una cantidad limitada de DNA.....	84
3.4.2. Experimentos de desplazamiento.....	85
3.4.3. Ensayos de competición entre el fragmento SAR y el fragmento del pUC19 por una cantidad limitada de un sólo subtipo de la histona H1	85
3.5.    Interacción entre las histonas de la cromatina y un exceso de un subtipo añadido.....	86
3.5.1. Purificación de cromatina de hígado de rata.....	86
3.5.1.1. Purificación de núcleos.....	86
3.5.1.2. Digestión con nucleasa micrococcal. ....	87
3.5.1.3. Gradiente de sacarosa. ....	88
3.5.2. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y un exceso de un subtipo añadido .....	88
3.6.    Estudio por dicroísmo circular de complejos formados entre subtipos de la H1 y el DNA.....	89
3.6.1. Preparación de muestras .....	90
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>91</b>
4.1.    Purificación de los subtipos de la histona H1.....	91
4.1.1. Purificación salina de las histonas H1 por cromatografía de..... intercambio catiónico.....	91
4.1.2. Purificación de la histona H1° por filtración en gel.....	94
4.1.3. Purificación de las histonas H1 a,b,c,d,e por RP-HPLC.....	96

4.2.	Interacción de los subtipos de la histona H1 con el DNA .....	101
4.2.1.	Experimentos de competición entre las histonas (H1a-e y H1°) por una cantidad limitada de DNA.....	101
4.2.2	Determinación afinidades relativas de los subtipos de la H1 por el DNA.....	106
4.2.2.1	Estimación de las afinidades relativas entre los subtipos de la H1 a partir de experimentos por parejas .....	107
4.2.3	Experimentos de desplazamiento entre los subtipos H1a-e y H1°.....	111
4.2.3.1	Desplazamiento de la H1° de los complejos SAR/H1° y pUC19/H1° por los subtipos H1a-e .....	111
4.2.3.2	Desplazamiento de los subtipos H1a-e de los complejos SAR/H1a-e y pUC19/H1a-e por la H1° .....	112
4.3.	Unión preferencial de los subtipos de la H1a a secuencias de DNA SAR .....	118
4.4.	Interacción de los subtipos de la histona H1 con la cromatina .....	120
4.4.1	Purificación de cromatina de hígado de rata.....	120
4.4.2	Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y un exceso de un subtipo añadido .....	123
4.4.2.1	Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y los subtipos H1a-e y H1° purificados.....	126
4.4.3	Determinación de la afinidad relativa de los subtipos de la histona H1 por la cromatina .....	131
4.5.	Estudio por dicroísmo circular de complejos formados entre subtipos de la histona H1 y el DNA. ....	136
4.5.1	Dicroísmo circular de los complejos DNA/PEG .....	137
4.5.2	Dicroísmo circular de los complejos DNA/PEG/Distamicina.....	138
4.5.3	Dicroísmo circular de los complejos histona/DNA .....	140
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>147</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>155</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>161</b>

**ABREVIATURAS**

ADP-ribosilación	Adenosin difosfato-ribosilación
ATP	Adenosintrifosfato
AU-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con urea y ácido acético
CAP	Proteína activadora del catabolito
CBF	Factor de unión a caja CCAAT
CENP	Proteína del centrómero
CM-Sephadex	Carboximetil sephadex
C-terminal	Carboxi-terminal
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
Elip. Mol. $[\theta]$	Elipticidad molar
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier
GH1	Dominio globular de la histona H1
GH5	Dominio globular de la histona H5
HNF	Factor nuclear del hepatocito
INCENP	Proteínas internas del centrómero

LIS	Diyodosalicilato de litio
MAR	Región de unión a la matriz
MMTV	Virus del tumor mamario de ratón
MPF	Quinasa mitótica principal
N-terminal	Amino-terminal
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fenil-metan-sulfonilfluor
proteína HMG	Proteína del grupo de alta movilidad
proteína Sc	Proteína de la matriz celular
proteína SMC	Proteína para la estabilidad y mantenimiento de los cromosomas
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN-2D	Resonancia magnética nuclear de doble dimensión
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta presión de fase reversa
SAR	Región de unión a la matriz celular
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
TAF	Factor asociado a proteína de unión a TATA
TE	Tampón tris- ácido etilendiaminotetra-acético
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	2,2,2,-trifluoretanol
TP	Tampón fosfato
TR	Receptor tiroideo
TRE	Elemento de respuesta tiroidea
UBF	Factor de unión a 5'
UV	Ultravioleta
XCAP	Proteínas asociadas al cromosoma de <i>Xenopus</i>

---

## RESUMEN

---

La histona H1 es necesaria para la condensación de la cromatina y puede estar implicada en la activación y en la inhibición de genes específicos. La histona H1 está codificada por una familia multigénica. En los mamíferos hay seis subtipos somáticos, H1a-e y H1<sup>o</sup>, una variante específica de la línea germinal masculina, H1t, y una variante propia de los oocitos, H1oo.

Con el propósito de estudiar las diferencias funcionales de los subtipos de la histona H1 se estudió la interacción de subtipos purificados con el DNA y con la cromatina y por dicroísmo circular se estudió la interacción de algunos subtipos con el DNA. Los subtipos se purificaron a partir de cerebro de rata y se separaron por cromatografía de filtración en gel y HPLC de fase reversa

Para estimar la afinidades relativas de los subtipos por el DNA se realizaron experimentos de competición entre cantidades iguales (p/p) de dos subtipos diferentes por una cantidad limitada de DNA, a concentración de NaCl fisiológica (0.14 M), en la cual la unión al DNA es cooperativa. Se realizaron dos series de competiciones: en la primera las histonas competían por la SAR del grupo de histonas de *Drosophila* de 657 pb (74 % AT) y en la

segunda competían por un fragmento Hae III / Hae III del pUC19, de 587 pb (60 % AT). Con la SAR se analizaron nueve parejas distintas y ocho con el pUC19. Los complejos fueron preparados por diálisis en gradiente de NaCl y su composición no cambió con incubación adicional. La composición de los subtipos en los complejos fue considerada como de equilibrio o muy cercana al equilibrio. Los complejos se recuperaron por centrifugación.

Las afinidades relativas de los subtipos por la SAR y por el pUC19 se calcularon a partir de las distribuciones de los subtipos entre los complejos y los sobrenadantes, estimadas a su vez a partir de las intensidades de las bandas en geles de PAGE.

Utilizando la ecuación  $k_{SAR}^{i/j} = [iSAR][j] / [jSAR][i]$  se obtuvieron las afinidades relativas de nueve parejas de los subtipos H1a-e y H1° por la SAR y de ocho parejas por el pUC19, A partir de estos valores de afinidad relativa se obtuvieron las afinidades relativas de los seis subtipos por la SAR:

**H1a (1.0) < H1c (3.9) < H1b (5.4) < H1e (14.4) < H1° (19.5) < H1d (20.0),**

y por el pUC19:

**H1a (1.0) < H1c (5.3) < H1b (6.4) < H1e (16.5) < H1° (22.3) < H1d (25.5).**

Para confirmar las afinidades relativas, establecidas en los experimentos de equilibrio, se realizaron experimentos de desplazamiento, en los cuales se formó un complejo inicial entre cada fragmento de DNA y un exceso de uno de los subtipos, antes de añadir una cantidad igual de un segundo subtipo. Se realizaron dos series de desplazamiento: en la primera serie de experimentos, los complejos formados con la H1° se hicieron competir con cada uno de los subtipos H1a-e y en la segunda serie los complejos formados con cada uno de los subtipos H1a-e se hicieron competir con la H1°. Los experimentos de desplazamiento permitieron confirmar el orden de afinidades relativas de los subtipos por el DNA.

Con el propósito de averiguar si los 6 subtipos somáticos de mamífero son proteínas de unión a SAR, se realizaron experimentos de competición entre los fragmentos de SAR y de pUC19, por una cantidad limitada de cada uno de los subtipos. En los experimentos de competición se mezclaron cantidades iguales de los fragmentos, de SAR y de pUC19 con una cantidad limitada de cada uno de los subtipos (relaciones p/p proteína/DNA de 0.18 a 0.62). Los ensayos fueron realizados en condiciones de unión cooperativa (0.14 M NaCl),

en las cuales los complejos formados por el DNA coexisten con moléculas de DNA libre. El análisis del DNA en las fracciones solubles y no solubles mostró que virtualmente toda la H1 se unía a la SAR, mientras que el fragmento del pUC19 permanecía en el sobrenadante. El fragmento del pUC19 se encontró en los precipitados sólo cuando la relación proteína/SAR era más alta que 0.5. Estos resultados muestran que la afinidad aparente de los seis subtipos por la SAR es superior en más de un orden de magnitud que la afinidad por el fragmento del pUC19.

Una vez establecidas las diferencias de afinidad de los subtipos de la H1 por el DNA, se estudio la interacción de los subtipos de la H1 con la cromatina para averiguar si también existían diferencias de afinidad entre los subtipos. Para ello se perturbó el sistema (cromatina) añadiendo H1 exógena para forzar el intercambio entre los subtipos de la histona H1 de la cromatina y la H1 exógena. Se añadió DNA SAR para mantener la estequiometría de la H1 en la cromatina.

En cada reacción de intercambio se mezclaron 10 µg de cromatina con 3.35 µg de DNA SAR y 2.5 µg de cada uno de los subtipos H1a, H1b, H1c, H1d, H1e ó H1° en experimentos independientes; a concentración de sal fisiológica (0.14 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA). La reacción se incubó a 37° C durante 90 minutos; durante este período las histonas H1 de la cromatina se intercambian con la H1 añadida y con la SAR.

Después de la incubación, el precipitado y el sobrenadante se separaron por centrifugación, aprovechando que la histona H1 forma precipitados con la SAR en condiciones de cooperatividad; el sobrenadante contenía la cromatina soluble.

Para obtener la afinidad relativa de los subtipos por la cromatina, se determinó la distribución de cada subtipo entre la cromatina y la SAR por PAGE o PAGE-UA. La afinidad relativa de los subtipos por la cromatina viene dada por la expresión:

$$k_{\text{Crom}}^{i/j} = k_{\text{Crom}}^i / k_{\text{Crom}}^j = k_{\text{SAR}}^{i/j} ( [i\text{Crom}] / [i\text{SAR}] ) / ( [j\text{Crom}] / [j\text{SAR}] )$$

Los valores de afinidad relativa de los seis subtipos de la H1 se obtuvieron a partir de los valores de afinidad relativa de ocho parejas distintas. Los valores de afinidad relativa respecto a la H1a son los siguientes:

**H1a (1.0) < H1b (4.1) < H1c (6.2) < H1e (15.3) < H1° (16.6) < H1d (19.0).**

Los valores de afinidad relativa son semejantes a los obtenidos en la interacción con el DNA. Se pueden distinguir tres grupos de afinidad: la H1a de menor afinidad, la H1b y H1c de afinidad intermedia y la H1e, H1d y H1° de alta afinidad.

Por último, se estudió por dicroísmo circular la interacción de tres fragmentos de DNA con PEG, con PEG/distamicina y con subtipos de la H1, con el propósito de caracterizar la inducción de espectro  $\psi$  en los tres fragmentos de DNA, de similar longitud, pero diferente secuencia, y en distintas condiciones con objeto de analizar la importancia de cada una de las distintas variables en la inducción y en la intensidad del espectro  $\psi$ .

Los fragmentos de DNA utilizados fueron: la secuencia SAR de 657 pb, del grupo de genes de las histonas de *Drosophila* (Izaurre et al. 1979) con un porcentaje de A+T del 74 %; un fragmento de 587 pb obtenido del plásmido pUC19, con un 60% de A+T; y un fragmento de 650 pb obtenido del pBR322 con un contenido de A+T del 47 %.

El espectro conservativo del DNA puede alterarse por la disminución de la polaridad del medio y por la asociación del DNA con algunas proteínas. Esta modificación consiste en la desaparición de los componentes positivos y en la aparición de una intensa banda negativa a 270 nm; este tipo de espectro se conoce como espectro psi ( $\psi$ ). Se considera que el espectro  $\psi$  tiene su origen en la agregación ordenada de las moléculas de DNA. El PEG induce espectro  $\psi$  en los tres fragmentos de DNA; sin embargo, la intensidad del espectro es muy distinta en los tres fragmentos. El DNA que presenta una elipticidad molar más negativa es el pUC19 /PEG, con una  $[\theta_{270}]$  de  $-273.252$ , seguido de SAR /PEG con una  $[\theta_{270}]$  de  $-184.502$  y, por último, el pBR322 con una  $[\theta_{270}]$  de  $-52.133$ .

La distamicina no afecta el espectro  $\psi$  del pUC19 /PEG y del pBR322 /PEG. En cambio, en el caso de la SAR/PEG a medida que aumenta la concentración de distamicina el espectro  $\psi$  se vuelve más negativo hasta alcanzar la intensidad del espectro del pUC19. La baja intensidad del espectro  $\psi$  de la SAR en PEG probablemente se deba a la presencia de curvas estables, que son eliminadas por la distamicina. El pBR322 no presenta curvas estables que puedan ser eliminadas por la distamicina. Las razones del débil espectro  $\psi$  del pBR322 permanecen oscuras.

La histona H1 induce espectro  $\psi$  en condiciones fisiológicas (0.14 M NaCl) por efecto de la neutralización de la carga del DNA. La intensidad del espectro  $\psi$  con los tres fragmentos

estudiados sigue el orden de intensidades observado en PEG. En particular, la intensidad del espectro de los complejos de la H1e con pUC19 es casi dos veces mayor que en los complejos con SAR, a pesar de que la afinidad de la H1e por la SAR es al menos un orden de magnitud mayor que por el pUC19.

Tradicionalmente se ha considerado que la estructura de las formas compactas del DNA depende de la especie inductora de la condensación y/o de las condiciones del medio. Estos resultados muestran que el grado de condensación del DNA depende también en gran medida de algunas características del propio DNA, dependientes de secuencia. Hemos mostrado que la presencia de curvas estables obstaculiza la condensación del DNA; sin embargo, otras características, entre las cuales tal vez se cuente la rigidez molecular, también dificultan la condensación. La diferente susceptibilidad a la condensación de las diferentes secuencias de DNA podría afectar a la superestructura de la cromatina.

---

# 1

## INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. ORGANIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA CROMATINA

En los eucariotas la cromatina esta formada por un complejo de DNA y proteínas que compactan efectivamente grandes cantidades de DNA dentro del pequeño volumen nuclear. Las histonas tienen un papel fundamental en modular la estructura de la cromatina, la cual a su vez afecta la utilización del DNA genómico. La estructura de la cromatina está sujeta a procesos de dinámica estructural que hacen posibles la replicación, la transcripción y la regulación de la expresión génica (Van Holde, 1989; Wolffe, 1992). El conocimiento de la organización de los cromosomas y de la cromatina es mucho más completo en cuanto a sus unidades estructurales más pequeñas y fundamentales: los nucleosomas. Este hecho responde a las limitaciones de las técnicas actuales para estudiar grandes complejos macromoleculares heterogéneos con un grado de detalle suficiente.

#### 1.1.1. El nucleosoma

El estudio de la cromatina viene acompañado de una nomenclatura particular, pero variable según el autor. En este trabajo la nomenclatura es la siguiente: un *nucleosoma* está constituido por un fragmento de DNA unido al octámero de histonas internas y a

una molécula de histona H1. Una *partícula núcleo* consiste en un octámero de histonas internas y de un segmento de DNA que resiste una digestión extensiva por nucleasa micrococcal, es decir, los 145-147 pares de bases de DNA que se encuentran en contacto directo con las histonas internas. El DNA que une dos partículas núcleo, y que es sensible a la digestión por nucleasa micrococcal, se denomina *DNA internucleosomal* (figura 1.1).

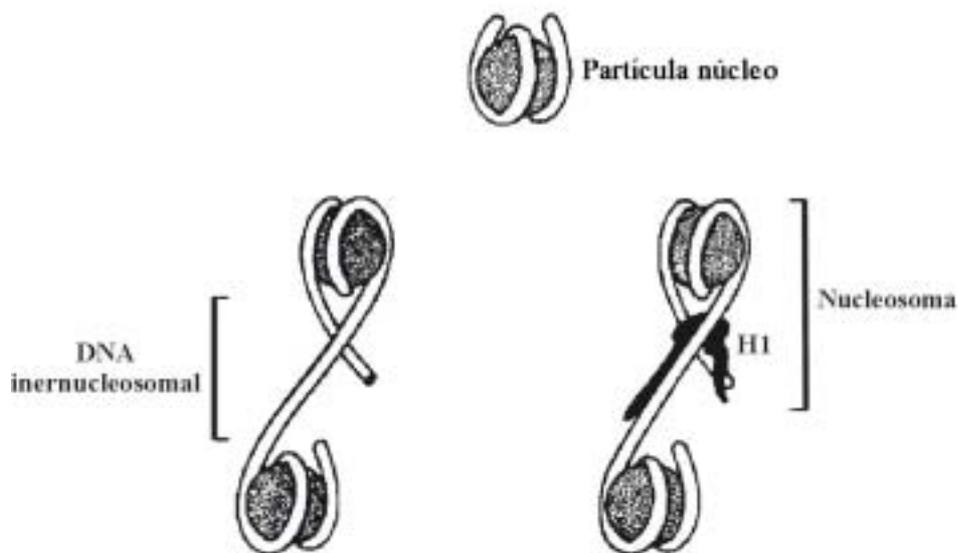


Figura 1.1. Representación de partícula núcleo, DNA internucleosomal y nucleosoma. La posición de la histona H1 es uno de los posibles modelos. (Tomado de Wolffe, 1998).

### 1.1.1.1. La estructura del DNA en el nucleosoma

El análisis de cristales de partículas núcleo a 7 Å de resolución, ha demostrado que el DNA se encuentra en la superficie del nucleosoma y que la partícula núcleo tiene forma de disco, confirmando las predicciones de la microscopía electrónica y los análisis de sedimentación y de dispersión de neutrones. El disco mide 11 nm de diámetro y 5.6 nm de espesor, y el DNA está enrollado 1.75 vueltas en forma de super-hélice levógira alrededor del núcleo de histonas (Finch *et al.*, 1977; Richmond *et al.*, 1984). En la figura 1.2 se muestra la partícula núcleo y la conformación del DNA en ella.

Actualmente el conocimiento de la morfología de la partícula núcleo es profundo y detallado como consecuencia de la cristalización y resolución de su estructura a menos de 3 Å de resolución (Luger *et al.*, 1997) ( figura 1.3).

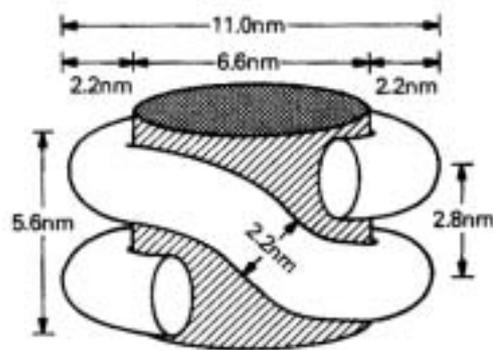


Figura 1.2. Dibujo de la posición que adopta el DNA en la partícula núcleo. (Tomado de Wolffe, 1998).

La curvatura del DNA alrededor del octámero de histonas no es uniforme. Se observan curvaturas bastante pronunciadas localizadas aproximadamente a una y a cuatro vueltas de la doble hélice, contando desde el centro del DNA nucleosomal. La existencia de estas distorsiones del DNA nucleosomal se ha confirmado por estudios de digestión con agentes químicos y enzimas sensibles a la estructura del DNA (Hogan *et al.*, 1987; Pruss *et al.*, 1994). La partícula núcleo es casi simétrica y, por ello el nucleosoma posee un eje de simetría binaria. Se ha de advertir, sin embargo, que, debido a la variación en la secuencia del DNA, la partícula núcleo probablemente no será exactamente simétrica. La curvatura del DNA y las potenciales perturbaciones locales de la pauta de la doble hélice, tienen importantes implicaciones para el posicionamiento de los nucleosomas. Las tres vueltas centrales de la doble hélice de DNA en el nucleosoma tienen un número de bases por vuelta (10.7) diferente del resto del DNA nucleosomal (10.0) y del DNA en disolución (10.5). La zona de transición entre estas dos regiones del DNA con diferente estructura, es el lugar donde se observa una distorsión más severa del DNA en el nucleosoma (Hayes *et al.*, 1990, 1991; Puhl and Behe, 1993). La periodicidad del DNA en la región central se produce debido a que las histonas H3 y H4 forman una superficie en el centro del nucleosoma con argininas expuestas y espaciadas de forma que interaccionan preferentemente con DNA de 10.7 pb/vuelta. En cambio la distancia entre los residuos básicos de la superficie de contacto del octámero con el resto del DNA, favorece una periodicidad helicoidal de 10 pb/vuelta. Estas periodicidades del DNA nucleosomal tienen importantes consecuencias para la asociación de proteínas que se unen al DNA con especificidad de secuencia.



Figura 1.3. Estructura de la partícula núcleo a una resolución de 3 Å. (Tomado de Luger *et al.*, 1997).

### 1.1.1.2. Posicionamiento de los nucleosomas

Las propiedades locales de rigidez y curvatura del DNA afectan la posición translacional y rotacional precisa que la doble hélice adopta respecto al octámero de histonas (Sivolob and Khrapunov, 1995). Este fenómeno, conocido como *posicionamiento de los nucleosomas*, tiene importantes consecuencias funcionales. La posición translacional de un nucleosoma se refiere a dónde comienzan y dónde terminan las histonas internas su asociación con el DNA y la posición rotacional se refiere a qué cara de la doble hélice está en contacto con las histonas internas.

Los nucleosomas posicionados están cerca de las zonas reguladoras de la expresión génica. La posición concreta de los nucleosomas a lo largo de la molécula de DNA está determinada, al menos en parte, por una preferencia por ciertas secuencias de DNA. Es energéticamente favorable incorporar una secuencia de DNA ya intrínsecamente curvada al nucleosoma, porque el DNA se ha de curvar finalmente alrededor del octámero de histonas (Drew and Travers, 1985; Shrader and Crothers, 1989). Los surcos estrechos más estrechos de lo normal miran al interior del nucleosoma, mientras que los surcos estrechos más amplios miran al exterior. Además, se ha observado que las secuencias de trinucleótidos repetidos  $(CTG)_n$  y  $(CCG)_n$ , responsables de algunas

enfermedades genéticas humanas, tienen la capacidad de posicionar los nucleosomas a través de mecanismos desconocidos (Wang *et al.*, 1994; Godde and Wolffe, 1996).

Un hecho muy interesante es que las histonas H1 también pueden influir en la posición translacional exacta del nucleosoma (Meersseman *et al.*, 1991; Chipev and Wolffe, 1992; Ura *et al.*, 1995). Por ejemplo, parece que el posicionamiento de los nucleosomas por parte de la histona H1 es responsable, al menos en parte, de la represión de los genes 5S rRNA de *Xenopus* durante el desarrollo (Bouvet *et al.*, 1994; Kandolf, 1994). En este caso concreto, el octámero de histonas internas es relativamente móvil respecto a la secuencia de DNA, de manera que puede ocupar una serie de posiciones a lo largo del gen 5S rRNA (Meersseman *et al.*, 1991). La adición de histonas H1 restringe la movilidad nucleosomal (Pennings *et al.*, 1994) y determina la posición translacional exacta (Ura *et al.*, 1995). Esta posición favorecida por la histona H1 restringe en gran medida la accesibilidad de la maquinaria transcripcional de la RNA polimerasa III al gen 5S rRNA (Ura *et al.*, 1995). La capacidad del dominio globular de la histona H1 de unirse al DNA nucleosomal con cierta especificidad de secuencia explica el posicionamiento de los nucleosomas en el gen del 5S rRNA de *Xenopus in vivo* (Chipev and Wolffe, 1992; Sera and Wolffe, 1998). Las histonas H1 parece que también contribuyen al posicionamiento de los nucleosomas en el gen de la  $\beta$  globina de pollo (Liu *et al.*, 1993; Davey *et al.*, 1995).

### **1.1.2. La fibra de 30 nm**

La cadena de nucleosomas a lo largo de la molécula de DNA representa solamente el primer nivel de compactación del DNA en el núcleo. El conocimiento del empaquetamiento del DNA en estructuras más complejas que la cadena de nucleótidos es mucho menor que el conocimiento sobre el nucleosoma aislado. Este hecho refleja las limitaciones de las técnicas actuales para aislar y estudiar complejos moleculares grandes y también, probablemente, la heterogeneidad de la estructura que puede adoptar la fibra de cromatina.

Mucha información sobre el plegamiento de la cadena de nucleosomas en estructuras superiores proviene de imágenes de microscopía electrónica de fragmentos de cromatina preparados en muy diversas condiciones (Thoma *et al.*, 1979; Woodcock *et al.*, 1993; Leuba *et al.*, 1994; Bednar *et al.*, 1995). Estas imágenes muestran que a baja fuerza

iónica (0.2 mM EDTA, 1 mM cloruro de trietanolamina) la cromatina parece una fibra de nucleosomas en zig-zag. A una fuerza iónica ligeramente mayor (0.2 mM EDTA, 5 mM cloruro de trietanolamina) se forma una cinta plana de unos 25 nm de ancho.

Finalmente, a una fuerza iónica moderada (100 mM NaCl), cercana a la fuerza iónica fisiológica, la cromatina se condensa para formar estructuras de un diámetro de 30 nm. A parte de estas estructuras, otras imágenes de microscopía electrónica de cromatina nativa a fuerza iónica fisiológica revelan otras conformaciones posibles de la cromatina. Son un ejemplo las denominadas “superbolas” (*superbeads*), que consisten en grupos de nucleosomas con apariencia globular que en ciertas condiciones pueden ser considerablemente uniformes y que contienen entre 8 y 48 nucleosomas (Zentgraf and Franke, 1984). Sin embargo, no se ha encontrado una estructuración de la cromatina en “superbolas” de forma generalizada, hecho que indica que no toda la cromatina adopta esta estructura *in vivo*.

La fibra de 30 nm es similar a las estructuras observadas en núcleos preparados con una gran variedad de técnicas; por esta razón la fibra de cromatina se denomina también fibra de 30 nm. Efectivamente, se cree que la mayoría de la cromatina en los núcleos de los eucariotas superiores se encuentra en esta configuración. Sin embargo, los detalles de la estructura de la fibra de 30 nm todavía permanecen dentro del marco de las hipótesis. Se han propuesto muchos modelos al respecto (van Holde and Zlatanova, 1995, 1996; Zlatanova and van Holde, 1996). Esta variedad de modelos y datos experimentales podría revelar una heterogeneidad subyacente en la estructura de la cromatina y su grado de empaquetamiento (Suau *et al.*, 1979). A continuación se describirán sólo algunos de los modelos que cuentan con un mayor apoyo experimental.

Thoma y colaboradores (1979) examinaron el plegamiento y desplegado de fragmentos largos de cromatina, en función de la fuerza iónica mediante microscopía electrónica, (Thoma *et al.*, 1979). A partir de sus observaciones propusieron un modelo para la estructura de la fibra de 30 nm en el cual la cadena de nucleosomas se compactaría enrollándose en una estructura solenoidal simple. El resultado sería una hélice de nucleosomas con seis nucleosomas por vuelta y un paso de rosca de unos 11 nm (figura 1.4).

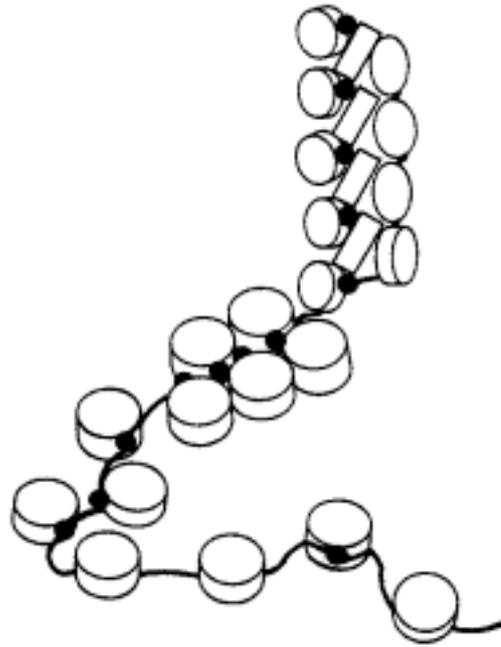


Figura 1.4. Modelo del solenoide de la fibra de cromatina. (Tomado de Thoma *et al.*, 1979).

Una parte implícita e importante de este modelo es que el plegamiento de la cadena de nucleosomas puede ser provocado por la interacción entre las histonas H1 que se encontrarían en el eje de la fibra. Las histonas H1 presentan cooperatividad en la unión al DNA desnudo y puede ser que esta propiedad también se exprese en la cromatina (Renz *et al.*, 1977; Clark and Thomas, 1986; Thomas *et al.*, 1992). También podría ser que el plegamiento de la cadena de nucleosomas estuviera mediado exclusivamente a través de interacciones entre las histonas H1 y el DNA internucleosomal, en un proceso local no cooperativo. Este es un tema sujeto a fuertes controversias. Estudios de dispersión de neutrones indican claramente que la histona H1 se encontraría localizada en el interior de la fibra de cromatina (Graziano *et al.*, 1994). Además, experimentos que miden la accesibilidad de las histonas H1 a anticuerpos y proteasas demuestran una accesibilidad reducida cuando una cadena de nucleosomas se compacta (Losa *et al.*, 1984; Dimitrov *et al.*, 1987). Estudios de entrecruzamiento han demostrado que durante la compactación de la cromatina ocurren cambios significativos en la interacción de la histona H1 con el DNA. Esta interacción modificada de la histona H1 con el DNA en la cromatina difiere de la que se observa con DNA desnudo, lo que implica que interacciones proteína-proteína con la cromatina pueden afectar la estructura y, quizás, el modo de interacción de la histona H1 con DNA (Mirzabekov *et al.*, 1990)

Un modelo alternativo, que ha recibido considerable atención, se basa en la observación de la existencia de cadenas de nucleosomas en zig-zag en disoluciones a baja fuerza iónica y en el hecho que la aparición de estas cadenas depende de la presencia de histonas H1. En el modelo de Worcel, Woodcock y colaboradores (figura 1.5), la cadena en zig-zag formaría una cinta condensada que contendría dos filas paralelas de nucleosomas; plegamiento dirigido por la histona H1, naturalmente. El enrollamiento de esta cinta generaría la fibra de 30 nm (Woodcock *et al.*, 1984).

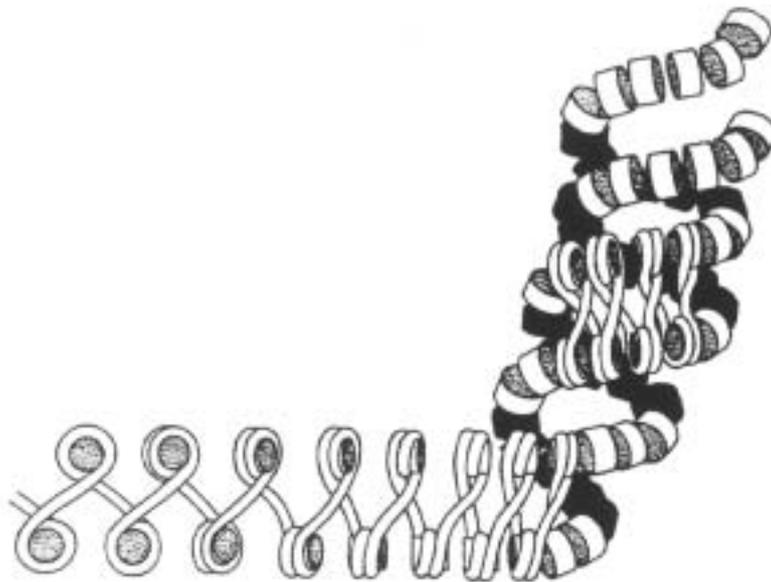


Figura 1.5. Modelo de la cadena de nucleosomas en zig-zag. (Adaptado de Woodcock *et al.*, 1984)

Varios resultados experimentales apuntan hacia la existencia de una cadena asimétrica en zig-zag de nucleosomas y DNA internucleosomal en un primer paso del plegamiento de la cromatina (Woodcock *et al.*, 1993; Leuba *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Bednar *et al.*, 1995). Por ejemplo, mediante la técnica de la crió-microscopía electrónica en secciones de núcleos, se observa la formación de fibras de cromatina que parecen estructuras en zig-zag (Horowitz *et al.*, 1994). Los DNAs internucleosomales estirados son una característica de este modelo que concuerda con resultados de huella fotoquímica (*photofootprinting*) *in vivo* (Pehrson, 1989; Pehrson and Cohen, 1992).

Un modelo de Felsenfeld and McGhee (figura 1.6) representa una modificación del modelo del solenoide en el cual las histonas H1 no formarían el eje de la fibra de 30 nm, sino que se encontrarían dispuestas en forma helicoidal siguiendo la propia cadena de nucleosomas. este modelo se denomina modelo del DNA internucleosomal enrollado (*coiled linker model*) (Felsenfeld and Mc Ghee, 1986).



Figura 1.6. Modelo del DNA internucleosomal enroscado de la fibra de cromatina. Sólo se muestran tres vueltas de un solo costado de la fibra. (Tomado de Wolffe, 1998).

Un modelo mucho más reciente es el denominado modelo del solenoide interdigitado (Daban y Bermúdez, 1998). Este modelo se ha propuesto a partir de datos experimentales de fibras de cromatina altamente compactadas y podría representar un nivel superior de condensación alcanzado a partir de uno de los modelos descritos. El modelo del solenoide interdigitado (figura 1.7) está formado por una hélice primaria con un número no entero, igual ó inferior a 6 nucleosomas por vuelta, que se irían apilando sobre los nucleosomas de la vuelta anterior, formando hélices secundarias visibles externamente.

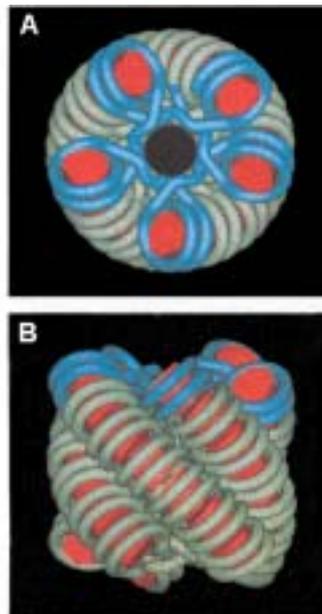


Figura 1.7. Modelo del solenoide interdigitado para la fibra de cromatina. (A) vista axial. (B) vista lateral. (Tomado de Daban y Bermúdez, 1998).

Para algunos de estos modelos la longitud de la repetición nucleosomal, y por tanto del DNA internucleosomal, es muy importante porque la longitud del DNA internucleosomal restringe la orientación que pueda tener un nucleosoma respecto a otro si el DNA internucleosomal es demasiado corto limita la disposición de un nucleosoma respecto al siguiente y si es demasiado largo puede producir problemas estéricos. En todos los organismos y tejidos el tamaño del DNA resistente a digestión con nucleasa micrococcal en un nucleosoma es marcadamente constante y corresponde a 146 pares de bases. Sin embargo, la longitud de la repetición nucleosomal de los diferentes organismos varía considerablemente. En *Saccharomyces cerevisiae* la longitud de la repetición nucleosomal es de 165 pb en promedio, mientras que en la mayoría de líneas celulares de mamíferos es de 180-200 pb y de 260 pb en el esperma de erizo de mar (van Holde, 1988). La variación en la longitud del DNA internucleosomal permite aclarar diferencias experimentales en la eficiencia con la cual diferentes preparaciones cromáticas se compactarían y en las propiedades de la fibra de cromatina resultante. El uso de cromatina con una repetición nucleosomal muy larga, ha permitido demostrar que el diámetro de la fibra de cromatina aumenta con la longitud del DNA internucleosomal (Athey *et al.*, 1990; Williams y Langmore, 1991). Este fenómeno no ha podido ser detectado *in vivo*, observándose siempre el mismo diámetro independientemente de la longitud del DNA internucleosomal (Woodcock, 1994). De otro lado, se ha demostrado que la compactación de la cromatina de *Saccharomyces* es posible a pesar de la corta longitud de su repetición nucleosomal. Cadenas de nucleosomas que contienen DNA internucleosomal de menos de 20 pb son capaces de plegarse en la fibra de 30 nm (Lowary and Widom, 1989). Si se aplican modelos teóricos a la torsión a la cual estaría sometido el DNA en estas circunstancias, resulta evidente que la histona H1 aumenta claramente la flexibilidad de DNA internucleosomal, probablemente a través de la neutralización de cargas negativas de la cadena fosfodiéster. Esta flexibilidad aumentada del DNA internucleosomal permitiría, por ejemplo, la aplicación del modelo del DNA internucleosomal enrollado también en el caso de longitudes de repeticiones nucleosomales cortas.

Se puede concluir este resumen de los modelos principales de la estructura de la fibra de cromatina afirmando que parece que la heterogeneidad es una de las características de la cromatina *in vivo*. Tampoco se puede olvidar que se trata de una estructura dinámica, que se modifica a nivel local y general a lo largo del tiempo para cumplir su función. Es

conveniente distinguir muy bien entre las estructuras que puede adoptar la cromatina *in vitro* y las que adopta realmente *in vivo*.

### 1.1.3. La estructura de los cromosomas

El conocimiento de la organización estructural de los cromosomas se centra básicamente en los cromosomas en metafase, ya que son los más condensados y por lo tanto más visibles (Rattner and Lin, 1985). El plegamiento del DNA en la cadena de nucleosomas da lugar a una compactación en la longitud de 7 veces, el mismo factor que aporta el paso de la cadena de nucleosomas a la fibra de 30 nm. El cromosoma metafásico se encuentra 250 veces compactado en longitud respecto a la fibra de cromatina de la que está formada (Earnshaw, 1988, 1991). Se han propuesto dos modelos principales para la compactación de la cromatina en cromosomas metafásicos. El primero sugiere una organización de la fibra de cromatina en lazos que se dispondrían radialmente a lo largo del eje del cromosoma (Paulson and Laemmli, 1977; Gasser and Laemmli, 1986b; Boy de la Tour and Laemmli, 1988). Ver figura 1.8.

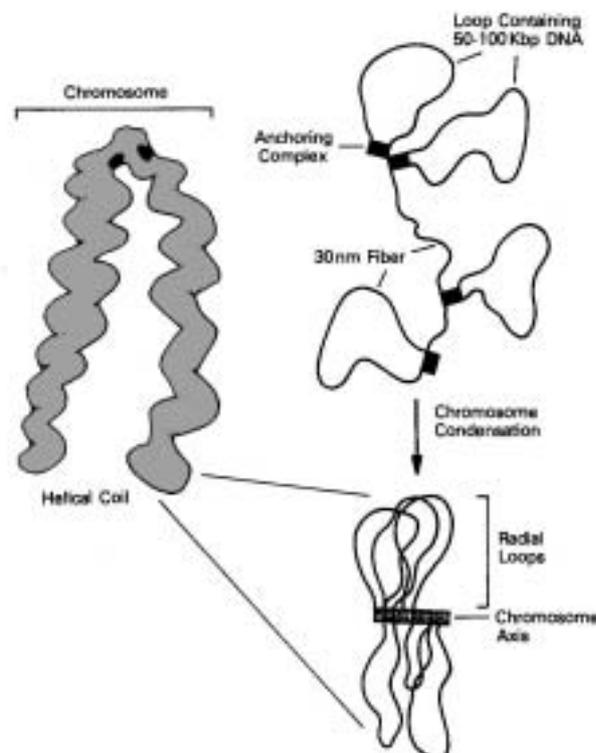


Figura 1.8. Modelo de la estructura del cromosoma en lazos. (Tomado de Wolffe, 1998).

El segundo modelo sugiere un plegamiento helicoidal de la fibra de cromatina, del cual resultaría una fibra de 250 nm, que normalmente se volvería a plegar de forma helicoidal (Sedat and Manuelidis, 1978). Varios resultados experimentales validan el primer modelo, indicando la presencia de lazos situados a lo largo del eje del cromosoma. Concretamente, las digestiones controladas con DNasa I (Benyajati and Worcel, 1976) y la observación directa de núcleos por microscopía electrónica a alta concentración salina, de forma que no haya histonas unidas, (Cook and Brazell, 1975; Paulson and Laemmli, 1977; Jackson *et al.*, 1990) indican la presencia de lazos independientes de la fibra de cromatina de 50 a 100 kb constituirían el elemento básico de la estructura del cromosoma. Además, no parece que los lazos se originen en un eje central continuo. En cambio, resultados de microscopía óptica de alta resolución sugieren que el eje podría estar estructurándose y desestructurándose continuamente. Además, parece que los lazos de la fibra de 30 nm se podrían organizar en estructuras más complejas que formarían el cromosoma. La estructura exacta de los lazos de la fibra cromatina se conoce menos que la de la propia fibra de 30 nm, pero es claro que proteínas no histonas son importantes para su organización.

### **1.1.4. La infraestructura del cromosoma y del núcleo**

Muchos estudios se han centrado en las proteínas no histonas presentes en el núcleo que generan la infraestructura de los cromosomas y del mismo núcleo celular, así como en las secuencias de DNA asociadas a ellas. La matriz (*scaffold*) del cromosoma metafásico se define a nivel morfológico como la estructura compleja en el eje del cromosoma mitótico que se observa después de la extracción de las histonas (Paulson and Laemmli, 1977). La extracción bioquímica mediante sal (2 M NaCl) o mediante diyodosalicilato de litio (LIS), se usa para definir el complejo residual núcleo-proteico de un núcleo interfásico (Paulson and Laemmli, 1977; Mirkovitch *et al.*, 1984). Si la extracción ha sido salina, se habla de matriz nuclear, si se ha utilizado LIS se habla de andamio nuclear. En estos dos casos se observa un grupo de proteínas algo más complejo que en el caso del andamio del cromosoma (Gasser *et al.*, 1989). Algunos de estos métodos fisiológicos han sido criticados porque podrían dar lugar a reorganizaciones en las interacciones proteína-DNA y a agregaciones no específicas (Cook, 1988). Por esta razón se han desarrollado métodos alternativos para aislar y estudiar la infraestructura nuclear que generen un *esqueleto* nuclear que mantenga la capacidad de transcribir y replicar DNA (Jackson *et al.*, 1988). Se ha demostrado, sin

embargo, que la composición y función del esqueleto nuclear así obtenido es muy diferente al de la matriz nuclear. Parece que la matriz y andamio nucleares interactúan con zonas del genoma pobres en genes, mientras que el esqueleto nuclear interactúa con zonas especialmente ricas en genes (Craig *et al.*, 1997).

En las preparaciones de matriz nuclear se han identificado proteínas diferentes, incluyendo las laminas A, B y C, que son proteínas en forma de filamento que constituyen la lámina nuclear; su función es alinear la superficie nucleoplasmática de la envoltura nuclear (McKeon *et al.*, 1986; Franke, 1987). El hecho que las laminas formen parte de la fracción de la matriz hace pensar que la lámina probablemente fija la cromatina de la interfase a la membrana nuclear, influyendo así en la estructura de orden superior del cromosoma. La posible interacción entre la lámina nuclear y la cromatina está apoyada en estudios de microscopía electrónica. Además, se ha observado que las láminas A y C se unen específicamente a la superficie de los cromosomas mitóticos (Glass and Gerace, 1990). Dado que la presencia de histonas H1 en la cromatina no es imprescindible para esta unión (Dasso *et al.*, 1994a), muy probablemente el lugar de interacción de la lámina con la cromatina son las colas de las histonas internas, que sobresalen de los nucleosomas. Efectivamente, se ha demostrado que los dominios terminales de las laminas interactúan con las histonas internas (Taniura *et al.*, 1995). Además, parece que proteínas integrales de membrana presentes en membrana nuclear pueden interactuar tanto con las laminas como con los cromosomas (Foisner and Gerace, 1993; Collas *et al.*, 1996), unión que podría estabilizar la localización de dominios de la cromatina cerca de la envoltura nuclear.

Un segundo grupo de proteínas que se encuentran en la fracción de la matriz incluye las proteínas Sc (*scaffold proteins*) I, II y III (Lewis and Laemmli, 1982). Mientras que la función de Sc III es desconocida, Sc I (170 kDa) se ha identificado como la topoisomerasa II, y Sc II es una proteína heterodimérica con hélices espiraladas (*coiled-coil*) conocida como SMC o XCAP. Resultados de inmunolocalización muestran que la topoisomerasa II se encuentra en un gran número de puntos repartidos a lo largo de la región axial de los cromosomas. Estos puntos presentan un tamaño muy uniforme, sugiriendo que pueden presentar complejos estructurales independientes. Se cree que estos puntos pueden ser los sitios de unión de los lazos de la cromatina. El papel de la topoisomerasa II en estos complejos podría ser deshacer los nudos que inevitablemente

se deben generar en el proceso de replicación. En efecto, si la topoisomerasa II es inactivada *in vivo*, las células mutantes mueren porque no pueden separar sus cromosomas al final de la mitosis (DiNardo *et al.*, 1984). La topoisomerasa II es esencial para la formación de los cromosomas, pero su presencia no es imprescindible para mantener su estructura una vez formada, es un marcador muy útil para los sitios de anclaje de los lazos en la fibra de cromatina (Hirano and Mitchison, 1993). Por lo tanto, parece que tiene un papel fundamental en desenrollar las moléculas de DNA en el cromosoma (Warburton and Earnshaw, 1997), pero no parece que tenga un papel estructural propiamente dicho.

La proteína Sc II tiene un papel mucho más activo en dirigir la condensación del cromosoma mitótico que la topoisomerasa II (Saitoh *et al.*, 1995). Sc II es un miembro de la familia de proteínas SMC (*stability and maintenance of chromosomes*). La función de esta familia de proteínas fue caracterizada inicialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Strunnikov *et al.*, 1993, 1995; Koshland and Strunnikov, 1996). En los vertebrados, estas proteínas son conocidas como XCAP, de *Xenopus chromosome associated proteins*, organismo en el cual fueron descritas inicialmente (Hirano and Mitchison, 1994). El papel concreto de estas proteínas no se conoce con detalle, pero está claro que es fundamental para la formación de los cromosomas.

Se ha identificado un tercer grupo de proteínas propias de la matriz del cromosoma; son las proteínas INCENP (*inner centromere proteins*) y las CENP A, B y C. Todas estas proteínas se asocian con el centrómero de los cromosomas. Las proteínas INCENP (135-150 kDa) unen las cromátidas hermanas en el centrómero y son liberadas del cromosoma al comienzo de la separación de los cromosomas durante la mitosis (anafase), hecho que sugiere que podrían tener un papel en la regulación del apareamiento de las cromátidas (Pluta *et al.*, 1990). A parte de los centrómeros, también los telómeros se co-purifican en la obtención de la matriz nuclear (De Lange, 1992) y, por lo tanto, esta fracción se ve enriquecida en proteínas propias de los telómeros.

Resumiendo, se ve que entre las proteínas involucradas en la infraestructura de los cromosomas y de núcleo celular se han incluido las láminas, la topoisomerasa II y las proteínas SMC, así como componentes de centrómeros y telómeros.

La matriz nuclear contiene secuencias específicas de DNA conocidas como regiones de unión a la matriz (MARs o SARs). La topoisomerasa II y la histona H1 se unen preferentemente a estas regiones de DNA ricas en A+T (Adachi *et al.*, 1989; Izaurralde *et al.*, 1989). También se ha sugerido que proteínas como las HMG I/Y (*high mobility group proteins*) podrían desplazar la histona H1 selectivamente de las regiones SAR, contribuyendo al control local de la actividad transcripcional (Zhao *et al.*, 1993). Así mismo, este tipo de unión preferente de proteínas a las regiones SAR no ha sido aún demostrado *in vivo*. Este es un punto vital para valorar la importancia de estos mecanismos, ya que los resultados de los experimentos realizados *in vitro* pueden ser un efecto de la conocida preferencia de la histona H1 por secuencias ricas en A+T (Leng and Felsenfeld, 1966).

### **1.1.5. La regulación transcripcional a través de la modificación de la cromatina**

La regulación de la transcripción en respuesta a cambios hormonales o a la concentración de nutrientes, por ejemplo, requiere un rápido cambio reversible en la actividad génica, que en la mayoría de los casos estudiados en profundidad implica la modificación de la cromatina. Se ha observado que factores de transcripción específicos de secuencia, como los receptores nucleares de esteroides o de hormonas, Mad/Max, c-Jun/v-Jun, c-Myb/v-Myb, c-Fos, MyoD y CREB utilizan un número limitado de coactivadores y/o co-represores transcripcionales para realizar sus funciones reguladoras. Estos co-activadores y co-represores integran diversas señales reguladoras para determinar la actividad génica y presentan múltiples actividades que conjuntamente contribuyen a su función. Tienen la capacidad de interactuar tanto con los dominios reguladores de factores de transcripción como con la maquinaria de transcripción basal. Además, modifican directamente el entorno cromatínico en el cual la maquinaria transcripcional funciona. En efecto, parece que la maquinaria transcripcional requiere un estado especial de la cromatina para funcionar más eficientemente. Se podría decir que se utiliza la cromatina para amplificar la regulación de la transcripción, en comparación con el efecto en DNA desnudo (Wolffe *et al.*, 1997<sup>a</sup>). Por ejemplo, se ha observado que la curvatura y superenrollamiento del DNA en el nucleosoma puede promover la unión de factores de transcripción y aumentar las interacciones entre diferentes factores (Schild *et al.*, 1993; Truss *et al.*, 1995).

Cada vez es más claro que no se puede separar indiscriminadamente la regulación de la transcripción de la estructura de la cromatina. Los experimentos iniciales establecieron

la existencia de grandes máquinas moleculares que desestructuran la cromatina y facilitan la transcripción (Peterson and Tamkun, 1995). Más recientemente se ha establecido la importancia de la modificación covalente de las histonas internas como un mecanismo para regular la transcripción. Se ha demostrado que múltiples coactivadores poseen actividad acetiltransferasa (Brownell *et al.*, 1996; Mizzen *et al.*, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996) y se han identificado co-represores que se unen a histonas desacetilasas (Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997; Kadosh and Struhl, 1997; Laherty *et al.*, 1997; Edmondson *et al.*, 1996).

A continuación se comentará con cierto detalle un ejemplo de regulación de la transcripción a través de la modificación de la cromatina para ilustrar qué mecanismos se encuentran implicados en estos procesos; los casos conocidos y estudiados con profundidad son bastantes y aumentan rápidamente.

El promotor TR $\beta$ A de *Xenopus* se encuentra bajo el control de la hormona tiroidea y de su receptor, el cual es un heterodímero formado por TR y RXR (Ranjan *et al.*, 1994). El heterodímero receptor de la hormona tiroidea se une de forma constitutiva a un elemento de respuesta tiroidea (TRE) del promotor TR $\beta$ A que se encuentra formando parte de un nucleosoma posicionado. En ausencia de hormona tiroidea, la unión del receptor a TRE provoca la formación de un complejo co-represor, compuesto por NCoR, Sin3 y HD1, el cual provoca la desacetilación de las histonas internas e impide la transcripción. Concretamente, el receptor sin ligando se une al co-represor NCoR (Horlein *et al.*, 1995), y este interacciona con Sin3, el cual a su vez activa la histona desacetilasa HD1 (Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997). La represión producida por el receptor de hormona tiroidea sin ligando en oocitos de *Xenopus* desaparece en presencia de Tricostatina A, un inhibidor de la histona desacetilasa. En cambio, en presencia de hormona tiroidea, la unión del receptor heterodímero a TRE da lugar a la formación de un complejo coactivador, formado por las proteínas p300/CBP, p/CAF i TAF<sub>II</sub>250 (Yang *et al.*, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). Este complejo (fig. 9) produce la acetilación de las histonas internas, desestructura localmente la cromatina y facilita la transcripción (Wong *et al.*, 1995, 1997). Además, inhibe la histona desacetilasa HD1 y recluta algunos componentes de la maquinaria transcripcional, facilitando su ensamblaje y actividad.

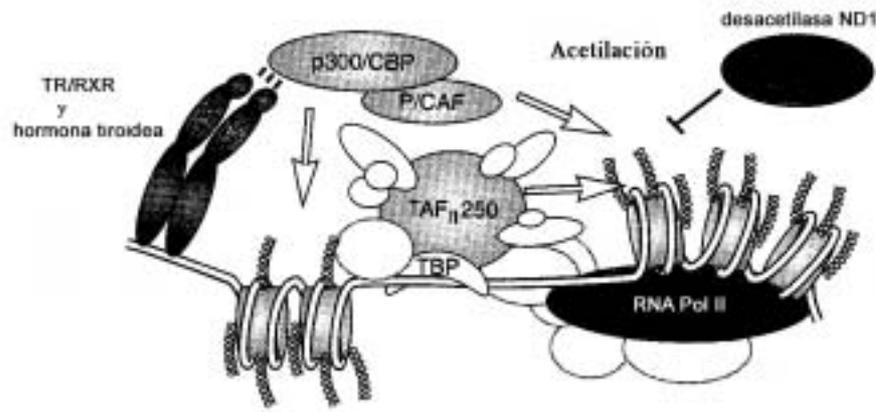


Figura 1.9. Cadena de acontecimientos y factores implicados en la activación transcripcional por el receptor de la hormona tiroidea. (Tomado de Wolffe, 1998).

Las evidencias que se están acumulando en múltiples experimentos llevan a considerar las proteínas estructurales de la cromatina como componentes integrales de la maquinaria de transcripción. Es importante reconocer que la estructura de la cromatina no es necesariamente estática y un impedimento para la transcripción, sino que es un factor que modula la función de una secuencia de DNA. Variaciones en la calidad de las interacciones histona-DNA y en la conformación tridimensional de la doble hélice del DNA pueden influir directamente en la transcripción (Schild *et al.*, 1993; Ura *et al.*, 1997). De manera análoga, se ha establecido que alteraciones en la conformación de la cromatina pueden determinar la actividad transcripcional.

Además de los mecanismos descritos, existen otros factores a tener en cuenta para completar la descripción de la relación entre estructura y función de la cromatina, como por ejemplo la metilación del DNA. La represión transcripcional está fuertemente relacionada con la densidad de metilación del DNA (Boyes and Bird, 1992; Hsieh, 1994). La metilación del DNA tiene una función reguladora esencial en el desarrollo de los mamíferos, ya que sirve para reprimir de forma estable genes no transcritos en células adultas diferenciadas (Campoy *et al.*, 1995). Existen datos recientes que implican algunos represores transcripcionales específicos para DNA metilado en el control general de la actividad génica. Son un ejemplo los represores MeCP1 y MeCP2, los cuales se unen a metil-CpG sin una especificidad de secuencia aparente (Meehan *et al.*, 1989, 1992; Lewis *et al.*, 1992). MeCP2 (fig. 10) es una proteína cromosomal con la capacidad de desplazar la histona H1 del nucleosoma (Nan *et al.*, 1996) y que, además, presenta un dominio de unión a metil-CpG DNA y un dominio represor (Nan *et al.*, 1993, 1997). El ensamblaje de estructuras nucleosomales especializadas en DNA

metilado explicaría la capacidad de los segmentos de DNA de silenciar la transcripción de manera aún más efectiva que la cromatina convencional.

En este sentido, se ha observado que el activador Gal4-VP16 puede penetrar y actuar normalmente en la cromatina plegada, activando la transcripción hasta en presencia de histona H1 formando parte de los nucleosomas (Laybourn and Kadonaga, 1992). Así mismo, este activador no puede acceder a sus lugares de unión y activar la transcripción si la cromatina esta formada por DNA metilado (Siegfried and Cedar, 1997). La metilación del DNA no sólo actúa como un represor permanente de la transcripción sino que se ha demostrado que dominios locales de alta densidad metil-CpG pueden producir la represión transcripcional de promotores *cis* no metilados (Kass *et al.*, 1993). La existencia de nucleosomas especializados podría ser un mecanismo molecular potencial, probablemente actuando de forma conjunta con la acetilación de las histonas internas, para producir la propagación estable del silenciamiento transcripcional dependiente de DNA metilado a través de la división celular.

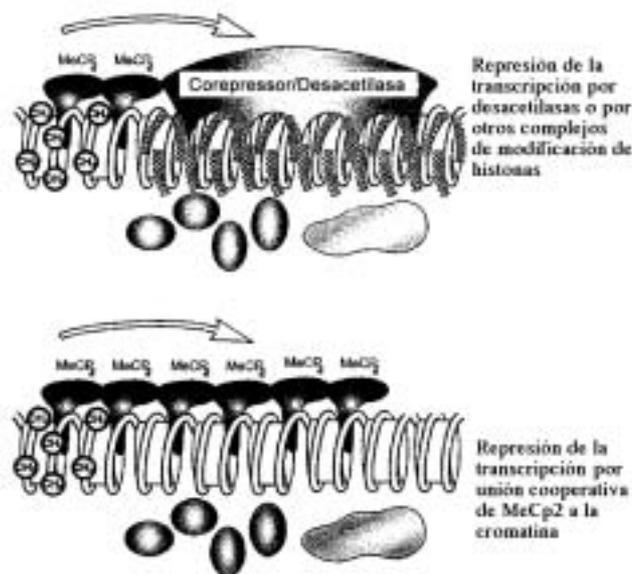


Figura 1.10. Esquema de dos mecanismos teóricos de represión transcripcional en los que estaría implicado el represor MeCP2. (Adaptado de Wolffe, 1998).

### 1.2. Las proteínas HMG

Las proteínas HMG (*high mobility group*) son proteínas no histonas que interaccionan con el DNA y que clásicamente se han asociado a la modificación de la estructura de la cromatina (Mathew *et al.*, 1981). Dentro de las HMG de vertebrado se distinguen cuatro proteínas mayoritarias agrupadas en dos clases: la HMG1 y la HMG2 son dos proteínas

homólogas de aproximadamente 29 kDa de peso molecular, mientras que la HMG14 y la HMG17 tienen un peso molecular entre 10 y 12 kDa. El contenido en HMG14 y 17 de la cromatina puede llegar a un 10% del peso del DNA, similar al de la histona H1. Además, existen algunas proteínas HMG minoritarias, por ejemplo la HMG-I/Y que se une a las secuencias de satélites  $\alpha$  en el centrómero (Bustin and Reeves, 1996).

Las proteínas HMG1 y HMG2 son representantes de una gran familia de proteínas de unión al DNA, algunas de las cuales interactúan con el DNA de forma específica. Todas ellas presentan un dominio de unión al DNA altamente conservado y un dominio rico en residuos ácidos. Parece que las HMG1 y 2 tienen una función estructural en la cromatina y pueden, en ciertas circunstancias, sustituir a las histonas H1 en el nucleosoma. En este sentido parece que HMG1 puede ser capaz de sustituir de forma funcional la histona H1 en la cromatina (Jackson *et al.*, 1979; Nightingale *et al.*, 1996).

Las proteínas HMG14 y 17 presentan una mayor afinidad por DNA nucleosomal que por DNA desnudo y curiosamente se unirían a los nucleosomas como homodímeros (Mardian *et al.*, 1980; Sandeen *et al.*, 1980; Crippa *et al.*, 1992). Aparentemente influyen en el plegamiento de la cromatina e indirectamente incrementarían la accesibilidad de los complejos reguladores a la RNA polimerasa (Crippa *et al.*, 1993; Tremethick and Drew, 1993). Además, parece que la incorporación de HMG14 y 17 en la cromatina facilita la progresión de la RNA polimerasa a través de la cadena de nucleosomas (Ding *et al.*, 1994). También se ha sugerido que HMG14 y 17 pueden ser responsables de la potenciación de la transcripción de genes *in vivo* (Einck and Bustin, 1985).

### 1.3. LAS HISTONAS INTERNAS

Las principales proteínas que provocan y controlan el plegamiento del DNA en cromatina son las histonas. Aparte de la compactación del DNA, las histonas realizan interacciones proteína-proteína entre ellas mismas y con otras proteínas. No todas las células eucarióticas tienen histonas; por ejemplo, los dinoflagelados empaquetan la mayoría de su DNA mediante pequeñas proteínas básicas completamente diferentes de las histonas (Vernet *et al.*, 1990) y en los mamíferos la mayoría del DNA en los espermatozoides es compactado mediante la interacción con proteínas básicas conocidas como protaminas.

Cada nucleosoma contiene un núcleo central proteico alrededor del cual se enrolla el DNA. Este núcleo contiene dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, conocidas como histonas internas. El nucleosoma no está completo sin una quinta histona, la histona H1 (o la histona H5, una variante específica de eritrocitos nucleados de ave), que se une externamente.

Dado que las histonas pueden ser separadas del DNA por concentraciones salinas elevadas, las principales interacciones entre las histonas internas y el DNA parecen ser de naturaleza electrostática. Las histonas H2A y H2B se disocian primero a medida que la concentración de sal aumenta, seguidas de las histonas H3 y H4. Estudios de este tipo, junto con estudios de entrecruzamiento químico, demostraron que las histonas H2A y H2B forman un dímero estable, mientras que las histonas H3 y H4 forman un tetrámero estable en ausencia de DNA (fig. 12), (Kornberg, 1974; Kornberg and Thomas, 1974).

Todas las histonas internas están sumamente conservadas en longitud y en secuencia aminoacídica a lo largo de la evolución. Las histonas H3 y H4 son las más altamente conservadas; por ejemplo, la histona H4 de ternera y de guisante difieren sólo en dos de sus 120 residuos (De Lange *et al.*, 1969<sup>a,b</sup>). Las histonas H3 y H4 tienen un papel central en el nucleosoma y en muchos procesos cromosómicos; estos requerimientos funcionales y estructurales explican la conservación de su secuencia. Las histonas H2A y H2B están algo menos conservadas.

Todas las histonas internas son proteínas pequeñas, de 11 a 16 kDa de peso molecular, que contienen un elevado porcentaje de lisina y arginina (más del 20% de los aminoácidos). Las histonas H2A y H2B contienen más lisina (14 de 129, y 20 de 125 aminoácidos, respectivamente, en ternera), y las histonas H3 y H4 contienen más arginina (18 de 135, y 14 de 102 aminoácidos, respectivamente, en ternera) (van Holde, 1988).

Las cuatro histonas presentan un dominio globular del tipo denominado precisamente “plegamiento de histona” (*histone-fold*) en el extremo carboxi (C-) terminal de la proteína, a través del cual se producen las principales interacciones histona-histona y histona-DNA. Además, presentan una cola amino (N-) terminal que contiene la mayoría de las lisinas (Arents *et al.*, 1991) (figura 1.11).

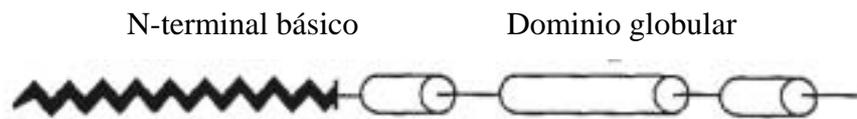


Figura 1.11. Estructura en dominios de las histonas internas. (Tomado de Wolffe, 1998).

El dominio tipo “plegamiento de histona” C-terminal, contiene tres hélices  $\alpha$ . Este dominio está conservado evolutivamente, debido a las restricciones que le confiere su importancia estructural en el nucleosoma; así mismo, la secuencia de la cola N-terminal cargada también se encuentra conservada. Estas colas N-terminales sufren varias modificaciones post-traduccionales, a menudo por parte de proteínas reguladoras de la transcripción, en aminoácidos específicos (Kuo *et al.*, 1996). Esta es una de las explicaciones de la conservación evolutiva de la secuencia de estas colas, junto con su importancia en la interacción con otros componentes estructurales de la cromatina y otras proteínas que no organizan la superestructura (Hecht *et al.*, 1995; Edmondson *et al.*, 1996). Por lo tanto, las colas N-terminales constituyen la diana para las vías de transducción de señales que modifican la estructura de la cromatina. Se ha observado que estos dominios terminales son capaces de estructurarse ligeramente en hélice en presencia de inductores de estructura secundaria como el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). Parece, además, que la acetilación de estos dominios de las histonas internas incrementa el porcentaje de hélice que pueden adquirir (Prevelige and Fasman, 1987; Wang *et al.*, 2000).

### 1.3.1. La posición de las histonas internas en el nucleosoma

Moviéndose hacia los extremos del DNA nucleosomal, las histonas H2A y H2B se unen a la periferia y las histonas H3 y H4 se unen hacia el centro. Interacciones proteína-DNA especialmente fuertes tienen lugar sobre las histonas H3 y H4 que organizan las vueltas centrales del DNA en el nucleosoma. Son justamente estos contactos los que provocan el cambio en la periodicidad de la hélice del DNA en esta región (Arents and Moudrianakis, 1993). La histona H3 presenta interacciones débiles con el DNA donde éste entra y sale de la partícula núcleo; así mismo, los aminoácidos implicados en estos contactos débiles pueden ser modificados con importantes consecuencias.



16 lazos de las histonas internas, que quedan paralelos formando 8 puentes  $\beta$  ( $\beta$ -bridges) paralelos en el momento de la dimerización. Cada uno de estos puentes  $\beta$  presenta al menos dos residuos cargados positivamente que son capaces de interactuar con los fosfatos del DNA en la superficie del octámero de histonas (Arents and Moudrianakis, 1993). También el extremo N-terminal de la primera hélice de las histonas queda apareado en la dimerización y parece que se une al DNA (figura 1.12).

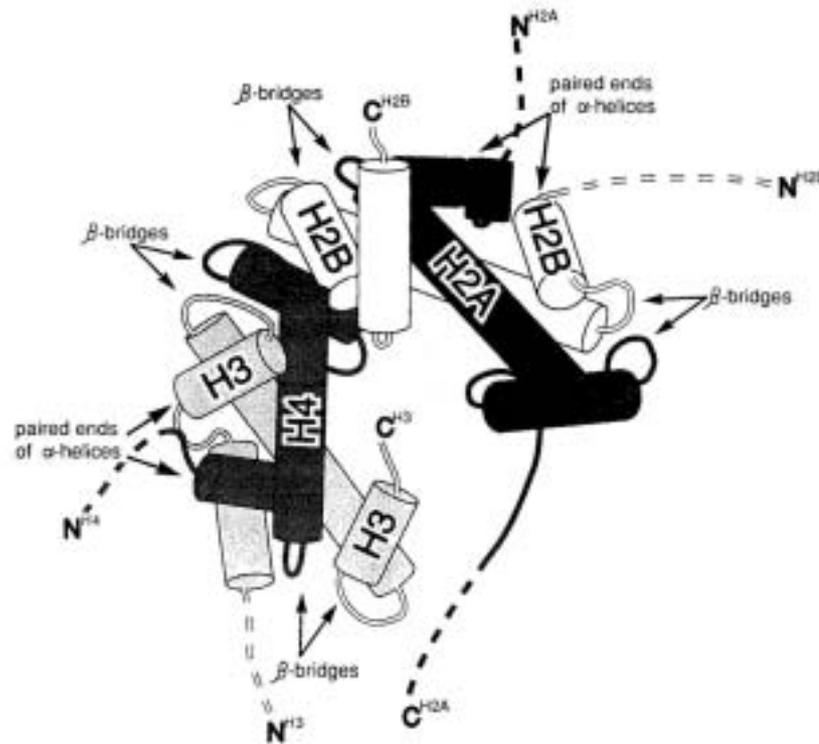


Figura 1.13. Heterodímeros de H2A/H2B y de H3/H4. Los lazos de interacción con el DNA están indicados. (Tomado de Wolffe, 1998).

Varias evidencias indican que las interacciones electrostáticas de los residuos de arginina de las histonas internas con la cadena fosfodiéster del DNA son las más importantes en la organización del DNA en el nucleosoma. Efectivamente, sólo 14 residuos concretos de arginina son suficientes para mantener el DNA enrollado en el nucleosoma. El papel fundamental de las argininas podría venir dado por su capacidad de formar puentes de hidrógeno, además de interacciones electrostáticas con los fosfatos del DNA (Ichimura *et al.*, 1982). Varios estudios indican que las colas N-terminales altamente cargadas de las histonas internas no contribuyen de forma significativa en el enrollamiento inicial del DNA en el nucleosoma (Hayes *et al.*, 1991) y que no tienen un papel esencial en mantener la integridad del nucleosoma (Ausió *et al.*, 1989),

modificaciones post-traduccionales de estas colas pueden alterar aspectos más sutiles de la conformación del nucleosoma y de la calidad de las interacciones histona-DNA. Además, algunos experimentos sugieren que las colas N-terminales de las histonas internas no presentan interacciones estables con el surco mayor del DNA en el nucleosoma (McGhee and Felsenfeld, 1979, 1982; Thomas, 1989). Otros resultados indican entrecruzamiento químico muy específico entre la cola N-terminal de la H2A y el DNA a 40 pb del eje de simetría binario (Lee and Hayes, 1997). Es sorprendente e interesante esta distribución tan localizada de los entrecruzamientos, que sugiere que el dominio N-terminal sólo puede adoptar un número muy limitado de conformaciones. Además de cualquier papel específico en la estructura del nucleosoma, los extremos N-terminales de las histonas internas intervienen en interacciones proteína-proteína fuera del nucleosoma.

### 1.3.2. Variantes de las histonas internas

Los genes de las histonas internas se encuentran invariablemente presentes en múltiples copias idénticas, presentando un nivel de reiteración desde dos copias de cada gen en levaduras hasta varios cientos en el erizo de mar. Además, en algunos organismos existen diferentes subtipos de las histonas internas, que son transcritos en períodos precisos durante el desarrollo (Poccia, 1986). En los eucariota superiores también se conocen algunos casos de variantes de las histonas internas. La histona H2A.vD es un subtipo de la histona H2A conservado evolutivamente (figura 1.15); se ha demostrado que este subtipo es esencial para el desarrollo de *Drosophila* (van Daal and Elgin, 1992). Este subtipo es conocido como H2A.Z en mamíferos, H2A.F/Z en pollos y hv1 en *Tetrahymena* (Harvey *et al.*, 1983; Ernst *et al.*, 1987; van Daal *et al.*, 1988; Hatch and Bonner, 1988). Esta variante particular de H2A se asocia con preferencia a cromatina activamente transcrita en *Tetrahymena* (Stargell *et al.*, 1993). H2A.Z presenta un extremo N-terminal que es similar a la de la histona H4, y que es modificado post-traduccionalmente por acetilación en mayor medida que la H2A normal. Otra variante conservada de H2A es H2A.X, expresada fuera de la fase S del ciclo celular (Mannironi *et al.*, 1989); parece que puede tener un papel en el espaciamiento de los nucleosomas durante la formación de cromatina en DNA desnudo (Kleinschmidt and Steinbeisser, 1991). Esta histona presenta un extremo C-terminal desestructurado en disolución acuosa. La presencia de extremos C-terminales no es un

hecho extraño en variantes de la histona H2A de otros organismos, como en la variante H2A1 del maíz (Lindsey *et al.*, 1991).

Estos subtipos sin embargo son considerados hoy como una pequeña parte de una familia de proteínas que tienen en común la presencia del motivo estructural “plegamiento de histona”. Las otras proteínas de la familia pueden ser incorporadas también en la arquitectura del nucleosoma, pero sus secuencias se alejan mucho de las de las histonas. Parece que las histonas internas han evolucionado a partir de una proteína de unión a DNA que contenía solamente las tres hélices  $\alpha$  del dominio tipo “plegamiento de histona” ( figura 1.14) y no presentaba ningún otro dominio ni extremo (Baxevanis *et al.*, 1995). En este sentido, la proteína arqueobacteriana HMf consiste sólo en el dominio tipo “plegamiento de histona” y enrolla el DNA sobre sí mismo en estructuras semejantes a nucleosomas (Sandman *et al.*, 1990). Las histonas internas de los eucariota han retenido esta propiedad, pero además otorgan a la nucleoproteína resultante la capacidad de interactuar con otras proteínas externas al nucleosoma a través de la adición de dominios en forma de cola (figura 14). Otras proteínas reguladoras hacen uso del dominio tipo “plegamiento de histona” para dar propiedades específicas a nucleosomas individuales, reemplazando las histonas normales de la cromatina (Sullivan *et al.*, 1994; Stoler *et al.*, 1995; Shelby *et al.*, 1997). Forman parte de estas proteínas reguladoras, la proteína CENP-A, que se encuentra en el centrómero, y la proteína Macro H2A de rata. La proteína CENP-A presenta un nivel de identidad significativo con el dominio globular de la histona H3 y es capaz de reemplazarla en el nucleosoma, pero tiene una cola N-terminal muy diferente. CENP-A puede haber evolucionado en respuesta a la necesidad en el centrómero de una estructura nucleosomal especializada, en la cual la cola N-terminal enlace de forma muy selectiva con otros componentes centroméricos, como las grandes proteínas hidrofílicas de unión al DNA, CENP-B y CENP-C. La proteína Macro H2A presenta una cola C-terminal pegada al dominio tipo “plegamiento de histona” que contiene una cremallera de leucinas, un motivo de dimerización que se encuentra a menudo en factores de transcripción (Pehrson and Fried, 1992). No se conoce la función concreta de la proteína Macro H2A.

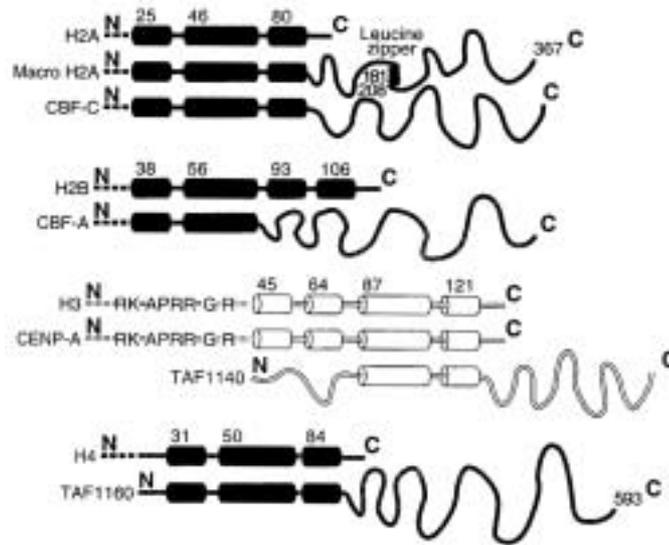


Figura 1.14. Histonas y proteínas reguladoras que contienen el dominio tipo “plegamiento de histona”. (Tomado de Wolffe y Pruss, 1996).

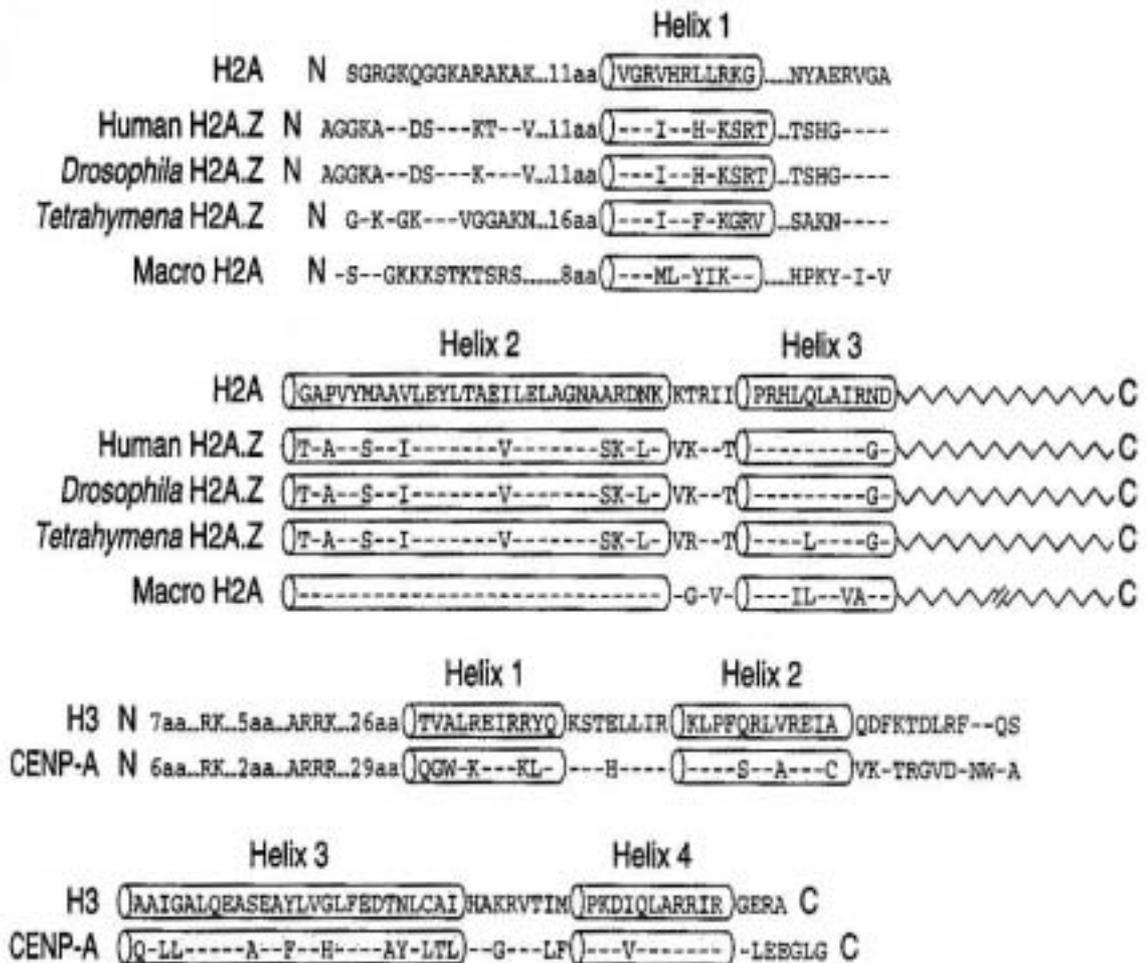


Figura 1.15. Alineamientos de secuencia para los subtipos de las histonas internas y proteínas relacionadas. Las identidades se muestran como una raya y los *gaps* como una línea punteada. (Tomado de Wolffe y Pruss, 1996).

Entre las proteínas de regulación transcripcional con el plegamiento de histonas existen variaciones más extremas de la secuencia normal de las histonas. Estas proteínas mantienen el dominio característico de las histonas y las usan para dirigir interacciones específicas proteína-proteína y para unir DNA (Kokubo *et al.*, 1993; Sinha *et al.*, 1995). Son un ejemplo (TAF)<sub>II</sub>60 y (TAF)<sub>II</sub>40 (*TATA-binding-protein associated factors*) y las proteínas relacionadas CBF (*CCAAT-box-binding factors*), concretamente NF-Y, HAP2, HAP3 i HAP5. La proteína (TAF)<sub>II</sub>60 se parece a la histona H3 y (TAF)<sub>II</sub>40 a la histona H4, mientras que HAP3 y HAP4 presentan una región que se parece al dominio globular de H2B y H2A, respectivamente.

### 1.3.3. Modificaciones post-traduccionales de las histonas internas

Las histonas internas presentan dos tipos principales de modificación post-traduccionales: acetilación y fosforilación, pero también pueden ser metiladas, ADP-ribosiladas y ubiquitinadas. La variación de estas modificaciones a lo largo del ciclo celular se muestra en la figura 16.

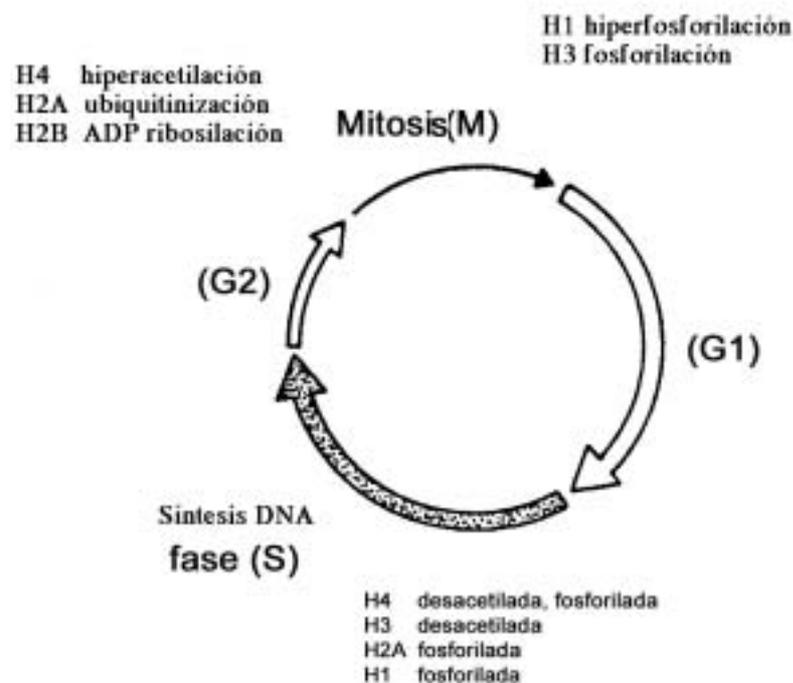


Figura 1.16. Principales modificaciones postraduccionales de la H1 y las histonas internas que tienen lugar a lo largo del ciclo celular. (Adaptado de Wolffe, 1998).

### 1.3.3.1. Acetilación

La acetilación de las histonas internas tiene un papel muy importante en el proceso de la regulación de la transcripción porque algunos activadores transcripcionales presentan actividad histona acetiltransferasa (Brownell *et al.*, 1996) y algunos represores transcripcionales son desacetilasas de histonas (Taunton *et al.*, 1996). Se ha observado acetilación de las cuatro histonas internas en todas las especies de animales y plantas examinadas (Csordas, 1990). Concretamente, se acetilan los residuos lisina de las colas aminotermiales cargadas (ver figura 1.17), de manera que cada grupo acetato incorporado a la histona reduce su carga neta positiva en 1. El número de residuos lisina acetilados en una molécula de histona depende del equilibrio de las actividades acetilasa y desacetilasa. Curiosamente, parece que en un núcleo de una célula en particular existen dos poblaciones de histonas acetiladas. Per ejemplo, en el eritrocito embrionario de pollo, un 30 % de las histonas internas se encuentran acetiladas de manera estable, mientras que el estado de acetilación de un 2% cambia rápidamente.

El patrón de residuos de lisina específicos que se encuentran acetilados en la cola N-terminal varia entre especies. El hecho que no se observe una acetilación al azar de los residuos de lisina hace pensar que las acetilasas y desacetilasas deben presentar una especificidad de secuencia considerable (Turner, 1991).



Figura 1.17. Secuencia de los dominios N-terminales de las histonas internas de ratón con los puntos de acetilación indicados. (Tomado de Wolffe, 1998).

La hiperacetilación de las colas de las histonas internas da lugar a pequeños cambios en la conformación del nucleosoma (Bode *et al.*, 1983; Oliva *et al.*, 1990), pero parece que las consecuencias más importantes de esta modificación son las interacciones proteína-proteína, entre nucleosomas, bien con la histona H1 o con proteínas no histonas. Los extremos N-terminales son accesibles a la tripsina y por lo tanto, parece que se encuentran expuestos al exterior de la partícula núcleo. Tanto la acetilación como la

eliminación de las colas N-terminales de las histonas internas de nucleosomas que contienen lugares de reconocimiento para factores de transcripción, facilitan el acceso de los factores de transcripción a sus dianas (Lee *et al.*, 1993; Vettese-Dadey *et al.*, 1996). Cada vez está más claro que cambios sutiles en la estabilidad de la fibra de cromatina pueden tener grandes efectos en la transcripción.

En un sistema purificado la acetilación de las histonas internas no influye directamente en la asociación de la histona H1 con los nucleosomas (Ura *et al.*, 1994, 1997). De acuerdo con estas observaciones *in vitro*, se ha observado que la hiperacetilación constitutiva de las histonas internas no reduce la asociación de la histona H1 con la cromatina (Dimitrov *et al.*, 1993; Almouzni *et al.*, 1994), pero inhibe la completa condensación de la cromatina en la interfase (Annunziato *et al.*, 1988).

La obtención de anticuerpos específicos contra histonas acetiladas, ha permitido una serie de experimentos que han dado lugar a un conocimiento más preciso de la función de la acetilación de las histonas. Por ejemplo, en *Tetrahymena*, *Xenopus* y humanos se ha demostrado la presencia de histonas acetiladas inmediatamente después de tenido la replicación (Lin *et al.*, 1989). También se ha observado una fuerte correlación entre la acetilación de las histonas y la actividad transcripcional de la cromatina (Allfrey *et al.*, 1964; Gorovsky *et al.*, 1973; Mathis *et al.*, 1978). Las histonas H3 y H4 acabadas de sintetizar son acetiladas (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Chang *et al.*, 1997) y desacetiladas poco después de su incorporación en la cromatina que se está formando inmediatamente después de la replicación (Jackson *et al.*, 1976). Las histonas acetilasas y desacetilasas implicadas en estas modificaciones han sido caracterizadas (Taunton *et al.*, 1996; Parthun *et al.*, 1996). La acetilación y la desacetilación de la histona H4, probablemente la histona más bien estudiada en este aspecto, parece necesaria para la progresión del ciclo celular (Megee *et al.*, 1995). En *S. cerevisiae* la mayoría del genoma es transcripcionalmente activo y contiene histonas internas hiperacetiladas (Clark, D.J. *et al.*, 1993). Así mismo, también existen dominios de la cromatina de levadura transcripcionalmente inactivos. Estas regiones inactivas contienen histona H4 hipoacetilada, excepto en una posición precisa, concretamente la lisina 12 (Braunstein *et al.*, 1993, 1996). En eritrocitos de pollo, se ha observado hiperacetilación de la histona H4 restringida al dominio de la cromatina que contiene el gen de la  $\beta$ -globina, potencialmente activo (Hebbes *et al.*, 1992, 1994). Este resultado indica una especificidad muy alta de la histona acetiltransferasa. Parece que las colas hiperacetiladas mantienen un cierto contacto con el DNA *in vivo* en el gen de la  $\beta$ -

globina (Ebraldise *et al.*, 1993). Experimentos de marcaje por anticuerpos en cromosomas politénicos de *Chironomus* y *Drosophila* también revelan una distribución no al azar de la acetilación de la histona H4, correlacionada con la actividad transcripcional (Turner *et al.*, 1992; Bone *et al.*, 1994). En las hembras de mamífero, el cromosoma X transcripcionalmente inactivo se distingue por una falta de acetilación de la histona H4 (Jeppesen and Turner, 1993).

Toda esta serie de experimentos muestran que los dominios de la cromatina que se transcriben activamente, o que son potencialmente activos, se encuentran enriquecidos en histonas hiperacetiladas, mientras que la cromatina transcripcionalmente inactiva contiene histonas hipoacetiladas. En resumen, parece que los estudios sobre el papel de la acetilación de las histonas tanto en la transcripción como en el mantenimiento de la integridad cromosomal indican una importancia biológica central en la cromatina para esta modificación post-traduccionaI regulable, comparable a la importancia de la fosforilación en las cadenas de transducción de señales.

Además, también se conoce la existencia de una conexión entre la acetilación de las histonas internas y la diferenciación celular. Inhibidores de la desacetilación de las histonas, como el butirato sódico y la tricostatina A, provocan la diferenciación celular (Yoshida *et al.*, 1987) y restringen la transformación de las células (Sugita *et al.*, 1992). Estos inhibidores también son causa de anomalías durante la embriogénesis temprana en vertebrados (Almounzi *et al.*, 1994). Una parte de estos efectos podría darse a través de fenómenos epigenéticos, como el *imprinting* de los cromosomas, ya que se conoce que estos efectos epigenéticos contribuyen al control del crecimiento y la tumorigénesis (Reik and Surani, 1989). El mantenimiento de la acetilación de las histonas podría ser un mecanismo para la propagación de *imprints* cromosomales estables que determinen la actividad génica. En este sentido, la segregación distributiva de los nucleosomas durante la replicación aseguraría que el estado de acetilación de las histonas parentales siga presente en las dos cromátidas resultantes (Perry *et al.*, 1993), teniendo en cuenta que los estados de acetilación cromosómica se mantienen a través de la mitosis (Lavender *et al.*, 1994).

Ya se ha mencionado que la acetilación parece aumentar el porcentaje de hélice que son capaces de adquirir los dominios N-terminales de las histonas internas (Prevelige and Fasman, 1987; Wang *et al.*, 2000). En este sentido, se ha postulado que el espacio entre las lisinas acetilables de las colas de las histonas H3 y H4 marca el paso de rosca de una hélice  $\alpha$  (Sung and Dixon, 1970; Strahl and Allis, 2000).

### **1.3.3.2. Fosforilación**

El segundo tipo de modificación post-traducciona l de las histonas internas que ha sido objeto de intenso estudio experimental es la fosforilación. Parece muy probable que exista una relación aún poco conocida entre las vías de transducción de señales celulares y dianas en la cromatina. La histona H3 es rápidamente fosforilada en residuos serina de su dominio básico aminoterminal, cuando señales extracelulares como factores de crecimiento o ésteres de forbol estimulan células quiescentes a proliferar (Mahadevan *et al.*, 1991). La fosforilación *in vivo* de las histonas H4 y H2A ocurre en el citoplasma poco después de su síntesis (Sung and Dixon, 1970; Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Jackson *et al.*, 1976; Dimitrov *et al.*, 1994). La fosforilación de estas histonas, junto con la acetilación de la histona H4, podría dirigirlas selectivamente hacia las chaperonas moleculares involucradas en la formación del nucleosoma y de la horquilla de replicación (Kaufman and Botchan, 1994; Wade *et al.*, 1997). La eliminación de la fosforilación de las histonas internas mediante fosfatasas no influye en el espaciamiento de los nucleosomas (Dimitrov *et al.*, 1994), y la función de la fosforilación en la constitución de la cromatina continúa sujeta a especulación.

### **1.3.3.3. Metilación**

Las histonas internas también son metiladas en sus residuos de lisina, y sus posibles consecuencias funcionales están aún por definir. Un posible mecanismo de acción de la metilación podría ser que impidiera la acetilación de las lisinas, y de esta manera contribuyera a la represión transcripcional. La mayoría de las metilaciones en los vertebrados tienen lugar en la histona H3 en las lisinas 9 y 27 y en la histona H4 en la lisina 20 (Annunziato *et al.*, 1995). La histona H3 presenta hasta tres grupos metilo en cada lisina, mientras que la lisina 20 de la histona H4 presenta dos grupos metilo como máximo. La metilación de las lisinas comienza después de la formación de los nucleosomas y es máxima durante la mitosis. Durante la interfase, la metilación de las histonas se da con preferencia en las histonas H3 y H4 que hayan sido acetiladas. Es posible que se refleje sólo la mayor accesibilidad de las colas N-terminales acetiladas.

### **1.3.3.4. ADP-ribosilación**

Algunas evidencias sugieren que la ADP-ribosilación de las histonas internas puede dar lugar a la descondesación localizada de la fibra de cromatina. La ADP-ribosilación

puede tener un papel importante en la reparación del DNA (Mathis and Althaus, 1990). La síntesis de largas cadenas de ADP-ribosa cargadas negativamente podría facilitar la disrupción de los nucleosomas, por intercambio de histonas hacia este polianión competidor.

### **1.3.3.5. Ubiquitinización**

La histona H2B y especialmente la H2A pueden ser también modificadas por la adición de la pequeña proteína de 76 residuos ubiquitina (West and Bonner, 1980). Se sabe que la ubiquitina participa en la regulación de la degradación de las proteínas. La ubiquitina se une covalentemente, a través de una reacción dependiente de ATP, a la proteína que debe ser marcada para su proteólisis. Concretamente, se une al extremo C-terminal de las histonas H2A y H2B. Se ha observado que la histona H2A ubiquitinada se incorpora en los nucleosomas sin cambios importantes aparentes en la organización de la partícula núcleo (Levinger and Varshavsky, 1980; Kleinschmidt and Martison, 1981). Parece que el extremo C-terminal de la histona H2A contacta con el DNA nucleosomal en el eje de simetría binario (Guschin *et al.*, 1991; Usachenko *et al.*, 1994). Su ubiquitinización muy probablemente impida la interacción de las histonas H1 con el DNA nucleosomal. También debe impedir, dado el volumen de la ubiquitina, los contactos entre nucleosomas y, por lo tanto, la condensación de la cromatina. La ubiquitinización de la H2A y la H2B no parece, pues, estar relacionada con su degradación.

## **1.4. LA HISTONA H1**

### **1.4.1. Los subtipos de la H1**

Las histonas de la clase H1 están codificadas por una familia multigénica. La variedad de subtipos de la H1 es muy amplia (Ponte *et al.*, 2003). En mamíferos, han sido identificados seis subtipos somáticos (H1a, H1b, H1c, H1d, H1e y H1<sup>o</sup>) que son constitutivos, aunque sus proporciones varíen ampliamente durante el ciclo celular y la ontogénesis (Lennox and Cohen, 1983; Cole, 1984). En el individuo adulto el subtipo mayoritario es la H1e, subtipo que va aumentando su proporción a lo largo de la ontogénesis. Además, algunos subtipos celulares contienen H1<sup>o</sup>, subtipo que fue descrito como una proteína de la clase H1 que se encuentra en tejidos con poca o ninguna proliferación celular (Panyim and Chalkley, 1969). También se ha caracterizado un subtipo propio de la línea germinal masculina, la H1t y un subtipo

específico de los ovocitos, la H1<sub>oo</sub>. Los subtipos difieren en el grado de fosforilación y en el grado de conservación evolutiva (Lennox, 1984). También difieren en las tasas relativas de síntesis y degradación en células en proliferación o quiescentes (Pherson y Cole, 1982; Lennox and Cohen, 1983). Finalmente también se ha visto que algunos subtipos presentan diferente habilidad para condensar el DNA *in vitro* (Welsh and Cole, 1979, 1980; Liao and Cole, 1981). Estas propiedades sugieren que algunos subtipos deben ser funcionalmente diferentes de los demás.

El subtipo H1° de mamífero, también encontrado en *Xenopus laevis*, y las histonas H5 de eritrocitos nucleados de aves, se encuentran evolutivamente relacionados y forman un grupo ligeramente diferenciado del resto de subtipos de la H1. Durante la maduración de los eritrocitos de las aves, la histona H5 substituye a la H1 (Affolter *et al.*, 1987). Las dos histonas parece que tienen, en términos generales, una función similar, pero la H5 se une más fuertemente al nucleosoma, produciendo en consecuencia una mayor estabilidad de la cromatina y una disminución de la expresión génica (Sun *et al.*, 1990).

El gen de la H1° no se encuentra localizado en el bloque de genes de las histonas. Mientras que los genes de las histonas internas y del resto de las H1 se encuentran en múltiples copias en el cromosoma 6 de humanos, la H1° está codificada por un gen de copia única que se encuentra en el cromosoma 22 (Albig *et al.*, 1993). Otra característica especial de la H1° es que su mRNA se encuentra adenilado y presenta unas regiones 3' y 5' muy largas no traducidas, en contraste con el resto de histonas (Kress *et al.*, 1986).

Está bien demostrada la especificidad de la H1° en lo que se refiere a su patrón de expresión. Trabajos previos en neuronas corticales y células germinales han demostrado que la regulación de la expresión de la H1° es diferente a la de otros subtipos. Mientras que los niveles de los subtipos H1a-e varían durante todo el proceso de la diferenciación neuronal, la histona H1° se acumula durante la diferenciación terminal de las neuronas y células gliales (Stambolova *et al.*, 1984; Piña *et al.*, 1984, 1987; Domínguez *et al.*, 1992). Se ha demostrado que la H1° es activada transcripcionalmente en tipos neuronales específicos (Ponte *et al.*, 1994). En ciertos tejidos como corteza adrenal, la tiroides, los testículos, la próstata y el vaso deferente, la pérdida de función producida por privación de la hormona correspondiente está correlacionada con niveles bajos de H1° y no de los otros subtipos de Histona H1 (Gjerset *et al.*, 1982). La cantidad de H1° también decrece en páncreas e hígado en regeneración (Marsh y Fitzgerald, 1973;

Fedoseeva, 1983). Se ha observado que los niveles de H1° en neuronas del núcleo arcuato en condiciones fisiológicas son regulados por hormonas (García-Segura *et al.*, 1993). En estas neuronas, la cantidad de H1° es sexualmente dimórfica y fluctúa durante el ciclo estral. También en neuronas del núcleo supraóptico de rata se ha observado que la expresión de la H1° disminuye al inducirse la transcripción general (Lafarga *et al.*, 1995). Estos resultados muestran la capacidad de la H1° de responder a señales externas, que al parecer no presenta ningún otro subtipo.

### **1.4.2. Expresión de las Histonas H1**

Las diferencias en los patrones de expresión y en las tasas relativas de síntesis y degradación en células en división y en células quiescentes permiten cambios en las proporciones relativas de las H1 durante el desarrollo y la maduración de los tejidos.

Algunas histonas se expresan durante la ovogénesis y la embriogénesis temprana de anfibios; por ejemplo, en *Xenopus laevis* la histona B4 se acumula durante la ovogénesis. Los genes de estas proteínas contienen intrones y sus promotores contienen elementos reguladores específicos de oocito como la caja Y (Smith *et al.* 1988).

La H1t es expresada en células espermatogénicas; la secuencia codificante tiene diferencias significativas con las demás histonas H1. Al comparar la secuencia de aminoácidos de la H1t con las histonas somáticas se observa en el dominio C-terminal el reemplazo de las lisinas por argininas. La H1t puede modular la estructura de la cromatina para facilitar la recombinación y eventos de reparación génica (Wolffe, 1997).

Las Histonas H1° y H5 son expresadas en células diferenciadas terminalmente. Los genes de estas proteínas tienen elementos promotores que varían considerablemente, incorporan secuencias que son normalmente encontradas en los genes de las histonas internas en promotores de tejidos específicos, (Khochbin and Wolfee 1994).

La H5 se encontró y ha sido caracterizada a nivel molecular solamente en eritrocitos de ave. Esta proteína tiene 190 aminoácidos y su secuencia está muy relacionada con la secuencia de la H1°, sin embargo su dominio C-terminal tiene una gran proporción de residuos de arginina. La mayoría de los sitios ocupados por estas argininas en la H5 contienen lisina en la secuencia de la H1°. Se ha encontrado que el nivel de histona H5 aumenta durante la diferenciación de eritrocitos de pollo.

La H1° se acumula en tejidos que tienen poca proliferación celular, ( Piña et al. 1984), en rata y ratón se ha demostrado que la proteína se presenta en células específicas y terminalmente diferenciadas, por ejemplo células de cerebro, retina, músculo estriado, músculo cardíaco e hígado, (Gjerset, et al. 1982). La H1° se encuentra en todos los vertebrados y se acumula en neuronas durante un período restringido que corresponde a su diferenciación terminal.

La H1° es activada transcripcionalmente al comienzo de la diferenciación terminal en tipos neuronales específicos (Ponte, et al 1994). Algunas observaciones muestran que en neuronas del arcuato la cantidad de H1° es sexualmente dimórfica y fluctúa durante el ciclo estral en respuesta a los niveles de estradiol plasmático; en neuronas del supraóptico el nivel de expresión de la H1° es afectado por cambios en la actividad celular (Lafarga et al. 1995). Estos resultados indican que la H1° parece ser el único subtipo capaz de responder a señales externas bajo condiciones fisiológicas (García-Segura et al. 1993).

Las histonas H1a-e se acumulan progresivamente en el núcleo a partir del desarrollo embrionario. Los genes que codifican estos subtipos carecen de intrones y tienen promotores muy similares, contienen la caja típica TATA, la caja CAAT, secuencias ricas en guanina/citosina y una caja 5' AAGAAACACA 3', altamente conservada.

Las proporciones de los subtipos somáticos de la H1 varían según el tejido y su estado de maduración. La H1a sólo se encuentra en tejidos con proliferación rápida, mientras que en los tejidos adultos la H1e se encuentra en mayor cantidad, la histona H1c es muy variable en su contenido y la H1d es la que se encuentra en menor proporción. Durante la maduración del hígado, riñón y pulmón de ratón, se observa disminución de los subtipos H1a,b, y d y un aumento de H1c y la H1° (Lennox and Cohen, 1983).

Las proporciones relativas de los subtipos H1a-e cambian considerablemente durante el desarrollo postnatal de neuronas corticales de rata (Piña et al.1987), la H1e se acumula y llega a ser el subtipo predominante en neuronas maduras (cerca del 70% de H1total), al aumentar la H1e los demás subtipos disminuyen. Los cambios de composición en subtipos de H1, los cuales ocurren cuando las células paran de dividirse, favorece la idea que los subtipos podrían tener papeles funcionales diferenciados en la estructura de la cromatina.

### 1.4.3. La estructura de la histona H1

La histona H1 está constituida por tres dominios estructurales (figura 1.18): una región globular central de unos 80 residuos flanqueada por colas N- y C-terminales hidrofílicas y básicas, de unos 20-30 y 100 residuos, respectivamente (Bradbury *et al.*, 1975; Isenberg, 1979). Se están acumulando múltiples evidencias, tanto para la H1 como para las histonas internas, a favor que los dominios estructurales asuman diferentes funciones estructurales en la cromatina.

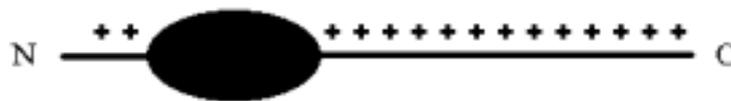


Figura 1.18. Estructura en dominios de la histona H1.

#### 1.4.3.1. El dominio globular

El dominio globular central se une al exterior de cada nucleosoma, más o menos cerca del punto donde entra y sale el DNA, la posición exacta no es clara, pero protege en esta región 20 pb adicionales de DNA de la digestión con nucleasa micrococcal (Allan *et al.*, 1980; Buckle *et al.*, 1992). Este dominio es el más conservado evolutivamente, hasta el punto de ser básicamente idéntico entre algunos subtipos y entre especies diferentes (Ponte *et al.*, 1998). Su estructura se conoce con detalle gracias a estudios de resonancia magnética nuclear de doble dimensión realizados con el dominio globular de la H5 (GH5) de eritrocito nucleado de pollo (Cloure *et al.*, 1987) y con la H1 (GH1), también de pollo (Cerf *et al.*, 1993, 1994), y a estudios de difracción de rayos X del mismo dominio de la H5 con una resolución de 2.5 Å (Ramakrishnan *et al.*, 1993). El dominio globular consta en todos los casos de tres hélices  $\alpha$  y una hoja  $\beta$  antiparalela en el extremo terminal carboxílico, como se representa en la figura 1.19.

Esta estructura parece que le permite unirse al DNA de la misma manera que lo hace la clase de proteínas con motivos hélice-giro-hélice. Es muy notable la gran similitud estructural existente de GH1 y GH5 con los factores de transcripción CAP (*catabolite gene activator protein*) y HNF-3 $\gamma$  (*hepatocyte nuclear factor-3 $\gamma$* ), ambas proteínas con el motivo hélice-giro-hélice. A partir de esta similitud, se ha propuesto, por analogía, que el lugar principal de unión al DNA es la hélice 3, o hélice de reconocimiento, que se

uniría al surco mayor del DNA. El final de la hoja  $\beta$  de la H1 es flexible y se ha propuesto como un lugar secundario de unión al DNA.

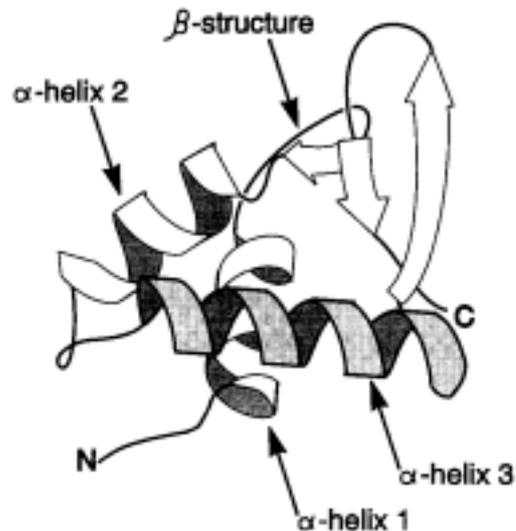


Figura 1.19. Estructura del dominio globular de la histona H5. (Tomado de Wolffe, 1998).

Los dominios globulares GH1 y GH5 presentan una identidad de secuencia de aproximadamente un 40% y muy pocas diferencias estructurales entre ellas. Existen, sin embargo, diferencias sutiles de estructura y de potencial electrostático que principalmente se encuentran localizadas en el lazo entre la segunda y la tercera hélice  $\alpha$  (Cerf *et al.*, 1994), una región que puede ser responsable de la diferente afinidad por el DNA de estos dos subtipos. Efectivamente, el dominio globular de la H5 aislado, se une más fuertemente al nucleosoma que el de la H1 (Thoma *et al.*, 1983).

El probable lugar principal de unión al DNA incluye tres residuos básicos conservados (tres lisinas para GH1 y dos lisinas y una arginina para GH5), que se encuentran situadas y con las cadenas laterales orientadas de la misma manera en los dos subtipos estudiados. Los dos primeros residuos forman parte de la hélice III, que en las proteínas con motivo hélice-giro-hélice es la hélice que reconoce el DNA, hecho que se puede observar en la estructura resuelta del cocristal de HNF-3 $\gamma$  unido a DNA (Clark *et al.*, 1993).

La hoja  $\beta$  parece bastante flexible en los resultados de RMN para GH1 (para GH5 no se determinó esta estructura secundaria, probablemente debido precisamente a su

flexibilidad). Los resultados de difracción de rayos-X para GH5, muestran dos monómeros asimétricos, idénticos en su conformación, excepto en la posición de esta hoja  $\beta$ . No es este el caso en la estructura del cristal HNF-3 $\gamma$  unido a DNA, en el que la hoja  $\beta$  presenta una posición muy definida. Es probable, que esta región del dominio globular de la histona H1 sólo adopte una estructura bien definida en presencia de DNA. La región del lazo entre las hélices II y III es muy diferente entre GH1 y GH5. Precisamente en esta región también existen diferencias importantes en la secuencia aminoacídica. GH5 contiene dos residuos básicos en esta región, mientras GH1 solo presenta uno. La lisina extra de GH5 no ha estado hasta ahora relacionada con la unión al DNA, pero se ha observado que se encuentra ligeramente protegida frente a modificación química en el nucleosoma (Thomas and Wilson, 1986). Por tanto, el lazo en GH5 presenta una carga neta positiva mayor y se encuentra en una conformación diferente que en GH1. Si se realiza un modelado de la interacción con el DNA para ambos dominios, a partir de la estructura del complejo HNF-3 $\gamma$ /DNA, se observa que el lazo GH5 seguiría una de las cadenas de DNA, mientras que el lazo de GH1 quedaría un poco apartado del DNA. De ser cierto este modelaje, esta podría ser la causa de la diferencia en afinidad por el DNA entre GH1 y GH5.

Vale la pena señalar la diferente estabilidad conformacional que presentan GH1 y GH5. GH1 presenta una estabilidad muy limitada, característica que no comparte con GH5. Este hecho se hace patente en que GH1 solo adopta una estructura suficientemente estable en unas condiciones de tampón muy específicas, que incluyen la presencia de iones sulfato (Cerf *et al.*, 1994), mientras que GH5 se puede estudiar en tampón fosfato estándar (Zarbock *et al.*, 1986, Clore *et al.*, 1987). También apuntan en la misma dirección los resultados de NMR de intercambio protón-deuterio: todos los protones amida de GH1 intercambian en menos de media hora, mientras que la mayoría de los protones amida de GH5 tardan más de 24 horas. Las implicaciones biológicas de esta diferencia de estabilidad son desconocidas. La comparación del potencial electrostático del dominio globular de GH1 y GH5 es muy interesante, ya que la unión de la H1 al DNA involucra principalmente interacciones electrostáticas entre residuos cargados positivamente y los grupos fosfato negativos del DNA, como lo demuestra la rápida disociación de la H1 del DNA al aumentar la fuerza iónica del medio (Kumar and Walker, 1980). En los dos dominios se observan tres puntos de máxima concentración de carga positiva, que corresponden a agrupaciones de residuos básicos. Sólo uno de

estos puntos es totalmente equivalente entre los dos subtipos, concretamente la agrupación de tres residuos básicos conservados del lugar principal de unión a DNA.

Las otras dos regiones difieren en su composición aminoacídica y ligeramente en su posición. Además, la diferencia principal de los dos potenciales electrostáticos reside en una región claramente negativa en el lazo entre las hélices II y III de GH1, que no se observa en GH5. En este lazo, GH1 presenta dos residuos ácidos, un aspártico y un glutámico, conservados en la mayoría de las H1 (Crane-Robinson and Ptitsyn, 1989), pero ausente en GH5. Este potencial negativo podría crear una repulsión con el DNA que debilitaría la fuerza de interacción de GH1.

#### **1.4.3.2. Los dominios amino- y carboxi-terminales**

Los dominios terminales contienen un alto porcentaje de residuos básicos, especialmente lisina. El dominio C-terminal presenta alrededor de un 40% de residuos de lisina y también bastantes residuos de alanina y prolina. Por ejemplo, de 97 residuos del C-terminal de la H1<sup>o</sup> de ratón, 40 son lisina, 16 alanina, 12 prolina, 9 valina, 7 serina y 5 treonina. La distribución de los residuos de lisina provoca una densidad de carga uniforme a lo largo de la mayor parte de esta región de la molécula. Los residuos de lisina tienden, efectivamente, a formar dobles y raramente se encuentran tres residuos básicos juntos.

El dominio N-terminal presenta dos regiones claramente diferenciadas, conservadas ambas en la mayoría de subtipos conocidos (Böhm and Mitchell, 1985). La región N-terminal no contiene residuos básicos y tiene un marcado carácter apolar, ya que está formada principalmente por residuos de alanina y prolina. La otra región del dominio N-terminal, adyacente al dominio globular, es similar al dominio C-terminal en composición aminoacídica. Contiene muchos residuos básicos, especialmente lisina.

Tanto el dominio C-terminal como la región básica del dominio N-terminal tienen la capacidad de unirse al DNA. Se cree que la cola C-terminal se une al DNA internucleosomal (Felsenfeld, 1992). Este dominio posiblemente contribuye a la torsión del DNA internucleosomal en el filamento de 30 nm (Butler, 1984; Clark *et al.*, 1988). Además, resultados de estudios de dicroísmo circular demuestran que la condensación del DNA por H1 en condiciones de fuerza iónica fisiológica se debe principalmente al dominio C-terminal (Morán *et al.*, 1985, 1989).

Los dominios terminales de las H1 son altamente repetitivos y, probablemente, en su evolución han tenido lugar un buen número de duplicaciones. Se han encontrado varios motivos que se repiten en los dominios terminales de las diferentes H1 y se ha postulado que algunos de ellos podrían constituir lugares de unión al DNA. Un motivo que se repite con frecuencia en los dominios terminales de las H1, especialmente en algunas de invertebrado, es el motivo (S/T)-P-(K/R)-(K/R), conocido como motivo SPKK (Suzuki, 1989). Este motivo ha sido extensamente estudiado, demostrándose que se trata de un motivo de unión al DNA, concretamente al surco estrecho, con preferencia por regiones ricas en A+T (Churchill and Suzuki, 1989) y DNA tipo SAR (Khadake, 1997b). También se han realizado estudios de RMN-2D que han establecido que presenta una estructura tipos giro  $\beta$  o giro  $\sigma$  (Suzuki, 1993). La estructura de este motivo recuerda el de la netropsina, hecho que ha permitido realizar estudios comparativos para deducir la forma de unión al DNA.

Se considera que los dominios terminales en solución acuosa se encuentran totalmente desestructurados, con la excepción de una región del C-terminal de la H1 de esperma de erizo de mar (*Echinus esculentus*) que se estructura parcialmente en hélice  $\alpha$  (Hill *et al.*, 1989). También, estudios de predicción de estructura secundaria y, sobretodo, estudios de dicroísmo circular, detectan un tanto por ciento de estructura en hélice en el dominio C-terminal, en presencia de inductores de estructura secundaria como el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) y el NaClO<sub>4</sub> (Clark *et al.*, 1988; Hill *et al.*, 1989). Concretamente, se estima que un 29% del dominio C-terminal de la H1 (mezcla de varios subtipos) y un 39% del C-terminal de la H5, se encuentran formando hélice  $\alpha$  en presencia de un 65% de TFE.

Dada la riqueza del dominio C-terminal en residuos de prolina, que desestabiliza la hélice  $\alpha$ , se ha propuesto un modelo de tramos cortos con estructura en hélice  $\alpha$  limitados por prolinas. De esta manera, se especula que la prolina induciría un cambio de dirección de la hélice, que se iría doblando y podría seguir la torsión del DNA, probablemente a lo largo del surco mayor.

Aparte de los estudios de dicroísmo circular con el dominio C-terminal entero se han realizado aproximaciones mediante péptidos, siempre por dicroísmo circular y en algún caso por FTIR (Wellman, 1996; Böhm and Creemers, 1993; Erard *et al.*, 1990; Creemers *et al.*, 1992; Khadake *et al.*, 1997<sup>a</sup>; Verdaguer *et al.*, 1993). En varios de estos péptidos se ha observado inducción de hélice  $\alpha$  por TFE y NaClO<sub>4</sub>, sin embargo, en

otros, esta inducción no se ha podido demostrar de forma clara, por ejemplo en péptidos correspondientes a partes del dominio N-terminal.

Se ha apuntado la posibilidad de que el dominio C-terminal adquiriera estructura en hélice  $\alpha$ , al menos parcialmente, al unirse al DNA. La interacción con el DNA produciría una neutralización de las cadenas laterales cargadas positivamente, evitándose así la repulsión entre ellas. En este sentido, en algunos estudios con péptidos ya comentados, se ha intentado determinar, mediante dicroísmo circular de diferencia, si la unión al DNA induce estructura en hélice  $\alpha$ . En ningún caso se ha observado una inducción clara de esta estructura que fuera comparable a la que produce el TFE. En algunos casos aparece un espectro tipo  $\Psi$ , muy intenso, que se debe a la ordenación suprahelicoidal de las moléculas de DNA, que impide totalmente realizar espectros de diferencia. Esta capacidad de condensar el DNA, que ya se había observado con la H1 entera y con el dominio C-terminal entero (Morán *et al.*, 1985), se mantiene por lo tanto en algunos de estos péptidos. En los casos en que no aparece el espectro  $\Psi$ , sólo se observa una muy ligera variación de los espectros, muy probablemente debida a cambios en la estructura del DNA.

Si existen muchas dudas sobre la estructura y la función del dominio C-terminal, el conocimiento del dominio N-terminal es aún mucho menor. No se sabía si tenía la capacidad de estructurarse, ni de qué manera. Se desconoce la función de su región apolar y no se sabe a qué región del DNA nucleosomal o internucleosomal se une la región básica, ni con qué finalidad. Para resolver algunos de estos interrogantes y contribuir a una mejor comprensión de la función de las histonas H1 en la estructuración de la cromatina, en nuestro laboratorio se realizaron estudios de estructura de algunos péptidos correspondientes a los dominios N y C-terminales de los subtipos H1<sup>o</sup> y H1e utilizando dicroísmo circular y RMN-2D; también se estudiaron mediante FTIR complejos formados entre DNA y péptidos.

Se estudiaron las propiedades conformacionales de un péptido del dominio C-terminal de la histona H1<sup>o</sup> (péptido Ac-EPKRSVAFKKTKEVKKVATPKK (CH-1)) por RMN de alta resolución y dicroísmo circular (Vila, *et al.*, 2000). Se encontró que la región del dominio C-terminal de la histona H1<sup>o</sup> que sigue al dominio globular, se estructura en una hélice (residuos 99 a 117) seguida de un giro  $\beta$  o/y  $\sigma$  tipo I (residuos 118 a 121). La hélice es anfipática, con las cadenas laterales de los 8 residuos básicos situados en una cara de la hélice y los 6 residuos apolares en la otra cara; constituyendo, probablemente,

un motivo de unión al surco mayor del DNA. El giro  $\beta$  o/y  $\sigma$  del dominio C-terminal de la H1° es un motivo del tipo (S/T)-P-(K/R)-(K/R), descrito como un lugar de unión al surco menor del DNA (Suzuki, 1989; Suzuki *et al.*, 1993).

Se estudió la interacción del péptido CH-1 con DNA por espectroscopia IR para identificar estructuras de baja resolución del péptido unido. Se encontró que la región del dominio C-terminal de la histona H1° que sigue al dominio globular se estructura en hélice  $\alpha$ , hélice  $3_{10}$  y giros al unirse al DNA, probablemente en una estructura muy similar a la inducida por el TFE (Vila, *et al.*, 2001a).

Se realizó también por RMN-2D (Vila, *et al.*, 2002) el estudio de las propiedades conformacionales del péptido Ac-EKTPVKKKARKAAGGAKRKTSG-NH<sub>2</sub> (NE-1), que corresponde a la región cargada positivamente del dominio N-terminal de la histona H1e. Se encontró que el dominio N-terminal de la H1e se estructura en dos hélices consecutivas que van del residuo 17 al 27 y del 29 al 34 y probablemente hasta el 35. La segunda hélice del dominio N-terminal de la H1e comprende residuos del dominio globular definido por digestión trípica. A nivel estructural, se propone que los dominios N-terminal y globular de la histona H1e se encuentran separados por el motivo Pro37-Pro38. Las dos hélices del dominio N-terminal de la H1e se encuentran separadas por un doblete de glicinas que actúan como una bisagra, dando una gran libertad en la orientación relativa de las dos hélices. Las hélices del dominio N-terminal de la H1e son anfipáticas, con las cadenas laterales de los residuos básicos situadas en una cara de la hélice y de los residuos apolares en la otra cara, constituyendo, probablemente, un motivo de unión al surco mayor del DNA.

Para estudiar el dominio N-terminal del subtipo H1° en disolución acuosa, con TFE y en complejos con DNA, se utilizó DC, RMN de alta resolución y espectroscopia IR. Para definir sus características estructurales se estudiaron dos péptidos:

el NH-1 (Ac-TENSTSAPAAKPKRAKASKK-NH<sub>2</sub>),

y el NH-2, (Ac-PAAKPKRAKASKKSTDHPKYSDM-NH<sub>2</sub>) (Vila, *et al.*, 2001b), Los péptidos tienen poca estructura en disolución acuosa, pero en TFE adquieren un alto porcentaje de estructura helicoidal, principalmente en la región del grupo básico. Se demostró que la interacción con el DNA induce en los dos péptidos una proporción de estructura  $\alpha$ -helicoidal, semejante a la observada en TFE. El dominio N-terminal de la H1° tiene la capacidad de estructurarse en una hélice que comprende desde el residuo 7 hasta el 23. La hélice del dominio N-terminal de la H1° comprende los residuos 21, 22 y

23, propios del dominio globular. Por lo tanto, el límite entre los dominios N-terminal y globular, definidos tradicionalmente por digestión trípica, no coincide exactamente con los límites estructurales. Se propone que el dominio estructural N-terminal de la H1° comprende del residuo 1 al 23 y que el dominio globular comienza en el residuo 24.

La hélice del dominio N-terminal de la H1° presenta dos agrupaciones de tres cadenas básicas cada una, situadas en caras opuestas de la hélice y que probablemente constituyen lugares de unión a segmentos de DNA no consecutivos. El dominio N-terminal de la H1° unido al DNA se estructura en parte en hélice, muy probablemente en la misma región que se estructura en presencia de TFE.

#### 1.4.4. La posición de la histona H1 en el nucleosoma

La hipótesis, mayormente aceptada, que el dominio globular de la histona H1 se une directamente sobre el DNA en el eje binario de simetría (Simpson, 1978; Allan *et al.*, 1980) presenta problemas de interpretación de los nuevos datos experimentales de los cuales se dispone, hasta el punto que la opinión clásica sobre la posición de la histona H1 en el nucleosoma ha sido seriamente cuestionada (Travers, 1994; Pruss *et al.*, 1995). Por ejemplo, ninguno de los nuevos datos estructurales sugiere una interacción fuerte del dominio globular de la histona H1 con el surco estrecho del DNA (Mirzabekov *et al.*, 1990; Ramakrishnan *et al.*, 1993), interacción que se habría de observar en caso que la hipótesis clásica fuera correcta. Durante algún tiempo existió la hipótesis de que podría tener lugar una interacción simétrica de la histona H1 con el DNA que entra y sale del nucleosoma, pero separada de la vuelta central de DNA en el centro binario de simetría (figura 1.20).

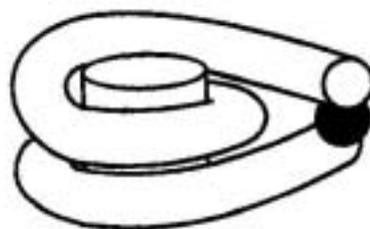


Figura 1.20. Hipótesis de la histona H1 situada simétricamente pero separada del octámero. (Tomado de Wolffe, 1998).

Esta hipótesis simétrica alternativa, sin embargo, choca con resultados que indican una posición de la histona H1 muy próxima a la superficie del octámero central. En este

sentido apuntan los resultados de dispersión de neutrones de cromatosomas (Lambert *et al.*, 1991) y la observación de entrecruzamiento químico proteína-proteína entre partes del dominio globular de la histona H2A y del dominio globular de la histona H1 (Boulikas *et al.*, 1980).

Actualmente existen tres modelos principales para la unión de la H1 al nucleosoma (figura 1.21).

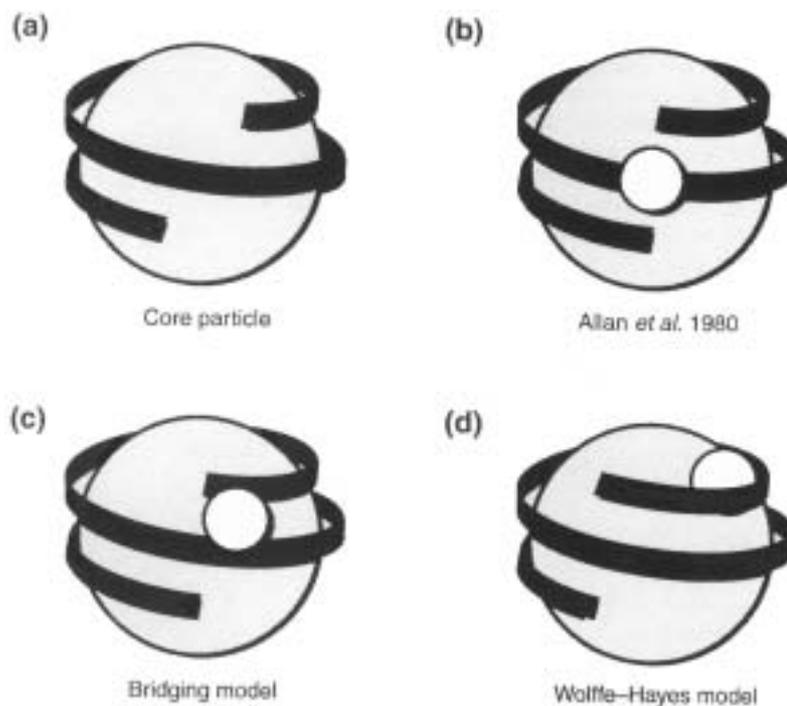


Figura 1.21. Las tres hipótesis principales sobre la posición de la histona H1 en el nucleosoma. (Tomado de Travers, 1999).

El modelo clásico, totalmente simétrico, sitúa el dominio globular sobre el eje de simetría binario del nucleosoma. El modelo denominado “*bridging model*” (Zhou *et al.*, 1998) postula que el dominio globular de la H1 se une entre dos vueltas superhelicoidales del DNA, concretamente entre un extremo del DNA nucleosomal y el centro de simetría. Según los autores, este modelo podría explicar tanto la protección simétrica del DNA nucleosomal como la asimétrica, si bien recurren a explicaciones que implican reordenaciones de las histonas internas. El tercer modelo es claramente asimétrico y propone que el dominio globular se sitúa al interior de una vuelta del DNA, a 65 pb del eje binario (Hayes y Wolffe, 1993).

La crítica principal a este tercer modelo de Hayes y Wolffe es que está basado en resultados obtenidos con nucleosomas que incorporan DNA de secuencias específicas y,

aunque los resultados en estos casos son muy claros, no se pueden generalizar a cualquier secuencia, especialmente si se tiene en cuenta la unión parcialmente selectiva de secuencia de la histona H1 al DNA. Resultados de entrecruzamiento químico entre la histona H5 y el DNA en el nucleosoma del gen 5S de *Xenopus*, revelan un contacto principal entre el dominio globular de H5 y el DNA a aproximadamente 65 pb del eje de simetría binario, junto con una protección asimétrica del DNA frente a la degradación por nucleasa micrococcal (Hayes *et al.*, 1994; Pruss *et al.*, 1996; Hayes, 1996). Además, las evidencias de que se dispone sugieren una posición poco expuesta de la histona, es decir, unida al surco mayor del DNA cuando éste no se encuentra dirigido directamente hacia el disolvente. Estos resultados, descritos para el gen del 5S rRNA de *Xenopus*, se han obtenido también en cinco casos más, todos ellos con secuencias de DNA definidas (An *et al.*, 1998; Guschin *et al.*, 1998; Sera and Wolffe, 1998).

El modelo asimétrico de Hayes y Wolffe sería consistente con las interacciones proteína-proteína entre las histonas H1 y H2A, con los datos de protección frente a nucleasas y con las dimensiones y probable interacción del dominio globular de la H5 con el DNA (Pruss *et al.*, 1995). Presumiblemente, la unión asimétrica vendría dada por preferencias de secuencia que presenta el dominio globular de las histonas H1 (Satchwell and Travers, 1989). Este tipo de asociación asimétrica también explicaría porque dos moléculas de histona H1 se pueden unir simultáneamente a una sola partícula núcleo. (Nelson *et al.*, 1979; Bates y Thomas, 1981). En cambio, el modelo asimétrico no explicaría fácilmente el hecho que la histona H1 proteja 20 pb de DNA internucleosomal, incluyendo regiones de los dos extremos del nucleosoma, o la protección del DNA en el eje de simetría binario frente a la digestión con DNasa I en dinucleosomas (Staynov and Crane-Robinson, 1988).

Experimentos de entrecruzamiento químico proteína-DNA de las histonas internas en nucleosomas con y sin H1 revelan cambios importantes en los contactos de las histonas H3 y H2A con el DNA (Hayes *et al.*, 1994; Lee and Hayes, 1998; Guschin *et al.*, 1998). Este hecho sugiere que la asociación de la histona H1 puede causar cambios alostéricos en el plegamiento del octámero que podrían resultar en la estabilización de las interacciones histona-DNA (Simpson, 1978; Usachenko *et al.*, 1996). Estos cambios podrían venir dados a través de la interacción directa, ya mencionada, entre la histona H1 y la histona H2A. Todos los modelos de la posición de la H1 en el nucleosoma existentes hasta ahora se basan en la estructura de la partícula núcleo, que puede ser ligeramente diferente de la del nucleosoma, debido a la propia unión de la H1.

### 1.4.5. La histona H1 en la condensación de la cromatina

La histona H1 es una molécula clave en la formación de superestructuras a partir de la cadena de nucleosomas. Varios estudios con cromatina “natural” a la que se le ha extraído la histona H1 y con cromatina reconstituida, han demostrado que la cadena de nucleosomas puede ser compactada simplemente variando la concentración de cationes mono y divalentes presentes en la disolución (Hansen *et al.*, 1989; Clark and Kimura, 1990; Hansen and Wolffe, 1992; García-Ramírez *et al.*, 1992). En las condiciones apropiadas es posible condensar la cromatina hasta un nivel aproximado al que se observa *in vivo* (Schwartz and Hansen, 1994). Estos resultados indican que el grado de apantallamiento de las cargas negativas a lo largo de la cadena fosfodiéster del DNA es un factor determinante en la condensación de la cromatina. Además, la condensación de la cromatina *in vivo* implica, con toda probabilidad, más aspectos que una simple neutralización de cargas. Como es de esperar, la condensación de la cromatina inducida por concentración salina es facilitada por la presencia de histonas H1 (García-Ramírez *et al.*, 1992, 1995; Fletcher and Hansen, 1995; Schwartz *et al.*, 1996). Parece que existieran mecanismos que permitieran interacciones entre cadenas de nucleosomas de dos moléculas de DNA diferentes (Fletcher and Hansen, 1996). Además, es probable que los diferentes subtipos de la histona H1 existentes en un mismo organismo presenten especificidades y particularidades aún no bien conocidas.

El dominio globular de la histona H1 muestra una clara preferencia por el DNA nucleosomal con relación al DNA libre. Algunas pistas sobre qué determina esta selectividad las podemos encontrar al estudiar las preferencias que también presenta este dominio por otros tipos de DNA especiales, como por ejemplo por DNA superenrollado en comparación con el DNA relajado (Singer and Singer, 1976). En el DNA superenrollado la doble hélice cruza sobre si misma con una frecuencia mayor que en el DNA relajado y parece que la histona H1 se une preferentemente en estos puntos de cruzamiento. La asociación selectiva de las histonas H1 con el DNA cruciforme (*four-way junction DNA*), en la cual dos dobles hélices se encuentran yuxtapuestas formando un ángulo relativamente agudo, estaría de acuerdo con la preferencia de la H1 por los cruzamientos de DNA (Varga-Weisz *et al.*, 1994). Esta preferencia se puede relacionar con la hipótesis que el dominio globular de la histona H1 presenta por lo menos dos superficies de unión al DNA y que se uniría a los dos extremos del DNA

enrollado alrededor del núcleo del nucleosoma (Goytisolo *et al.*, 1996). Una explicación alternativa de este fenómeno sería que la histona H1 prefiriera unirse al DNA curvado. Efectivamente, el DNA superenrollado y el DNA cruciforme se encuentran claramente más distorsionados que el DNA lineal en forma B. Sería consistente con esta posibilidad el hecho que se mantiene la preferencia de unión de la histona H1 por el DNA nucleosomal aunque sólo un lugar de unión esté presente en el dominio globular (Hayes *et al.*, 1996).

No son estas las únicas propiedades de las histonas H1. El dominio globular central se une al DNA desnudo de forma cooperativa, aproximando dos dobles hélices entre sí y apilando histonas H1 entre ellas (Draves *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1992). Este resultado es consistente con el hecho que el dominio globular de la histona H1 presente dos lugares de unión al DNA, pero no está claro si es una sola molécula de histona H1 o un dímero lo que mantendría próximas las dos moléculas de DNA. En cristales, el dominio globular de la histona H5 dimeriza y expone sus lugares de unión a DNA hacia fuera de la estructura dimérica. El espacio entre estos dominios es compatible con el que se observa entre las dos moléculas de DNA en el complejo con dominios globulares de histona H1 (Ramakrishnan *et al.*, 1993). La posibilidad que las histonas H1 interaccionen con otras histonas H1 de nucleosomas adyacentes, o con su DNA, dio lugar a la hipótesis que las cadenas de nucleosomas se pueden plegar en fibras de cromatina altamente ordenadas con las histonas H1 situadas en el centro de la fibra (Thoma *et al.*, 1979). Efectivamente, estudios de dispersión de neutrones demuestran que la histona H1 se encuentra localizada en el interior de la fibra de cromatina (Graziano *et al.*, 1994). Se ha sugerido que la interacción de la histona H1 con la cromatina también puede presentar cooperatividad (Renz *et al.*, 1977; Clark and Thomas, 1986; Thomas *et al.*, 1992). La cooperatividad observada *in vitro* con el DNA desnudo puede no tener nada que ver con la cooperatividad en la cromatina.

Estudios de entrecruzamiento químico han demostrado que ocurren cambios significativos en la interacción de las histonas H1 con el DNA durante la compactación de las cadenas de nucleosomas en fibras de cromatina. Esta interacción modificada de las histonas H1 con el DNA en la cromatina difiere de la interacción observada con DNA desnudo (Mirzabekov *et al.*, 1990). Este hecho hace pensar que en el proceso de compactación se pueden producir cambios en la posición e interacción de la histona H1 imposibles de estudiar de forma directa con DNA desnudo o nucleosomas aislados en las condiciones habituales.

Muchos estudios *in vitro* usando cromatina purificada han demostrado que las H1 ensamblan la cromatina en estructuras de orden superior. Para comprender mejor cómo funcionan estas proteínas en los procesos de condensación de la cromatina se han realizado investigaciones que estudian el intercambio de las histonas H1 en la cromatina. Caron and Thomas, 1981, estudiaron el intercambio de la H1 entre fragmentos de cromatina de diferente longitud. Ellos encontraron que el intercambio depende de la fuerza iónica utilizada: a baja fuerza iónica (5mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF) hay muy poco intercambio de H1, entre el 5 y el 10 %; a 70 mM de NaCl hay completo equilibrio de la H1 entre los sitios de unión de los dos fragmentos, en un tiempo menor de 1 hora; a 30 mM NaCl el intercambio fue intermedio al presentado entre 0 y 70 mM NaCl. El estudio de estos intercambios son interesantes en relación con la posible localización de los subtipos H1 en regiones particulares en la cromatina.

Más recientemente, se han realizado estudios de intercambio de la H1 *in vivo*. Lever et al. (2000) utilizaron la proteína de fusión H1.1-GFP en células humanas para seguir por fluorescencia el movimiento de la H1 en células vivas. Encontraron que el intercambio de H1 es rápido en cromatina condensada y descondensada, ocurre a través del ciclo celular y no requiere interacciones fibra-fibra; el intercambio de la H1 ocurre a través de una vía que involucra disociación y difusión a través del nucleoplasma y luego reasociación con la cromatina. La H1 se asocia dinámicamente con la cromatina en células vivas y la duración de la unión *in vivo* es modulada por la fosforilación; el tratamiento con drogas que alteran la fosforilación reduce la velocidad de intercambio; ellos concluyen que la fosforilación, pero no necesariamente de la H1, es el modulador primario de la movilidad de la H1.

Misteli et al. (2000) estudiaron la unión dinámica de la H1 en un sistema de cromatina no perturbada en células vivas; usaron también una proteína de fusión, H1-GFP y demostraron que la H1-GFP intercambia continuamente entre las regiones de la cromatina. Una molécula de H1-GFP permanece en la cromatina durante 220 segundos aproximadamente; la molécula entonces se disocia y rápidamente se une a otro sitio de unión. En este estudio se propone que la dinámica de unión es una característica esencial de las histonas H1 en sus funciones reguladoras del remodelamiento de la cromatina y la estructura de la cromatina *in vivo*.

#### 1.4.6. Proteínas que desplazan la histona H1 del nucleosoma

El desplazamiento de la histona H1 por la proteína HNF3 es un caso similar a la sustitución de la histona H3 por la proteína CENP-A en el centrómero. HNF3 es un factor de unión específico a la secuencia potenciadora (*enhancer*) del gen de la albúmina de ratón que presenta una estructura muy similar al dominio globular de la H1 y que podría ser considerada como una variante extrema de la H1.

Cuando la secuencia potenciadora del gen de la albúmina se encuentra en forma activa, se ha detectado una cadena de partículas parecidas a nucleosomas muy precisamente posicionadas (Meersseman *et al.*, 1991). HNF3 forma parte de estas partículas parecidas a nucleosomas y es capaz de dirigir activamente su posicionamiento respecto a la secuencia de DNA. Estas observaciones indican que HNF3 reemplaza la histona H1 en la cromatina que contiene la secuencia potenciadora del gen de la albúmina. Al igual que en el caso del centrómero, una proteína reguladora semejante a una histona y selectiva de secuencia, dirige la formación de un dominio de cromatina diferenciado. Parece que HNF3 sustituiría las histonas H1 en la secuencia potenciadora de la albúmina para prevenir su influencia represiva en la transcripción (Cirillo *et al.*, 1998; Shim *et al.*, 1998).

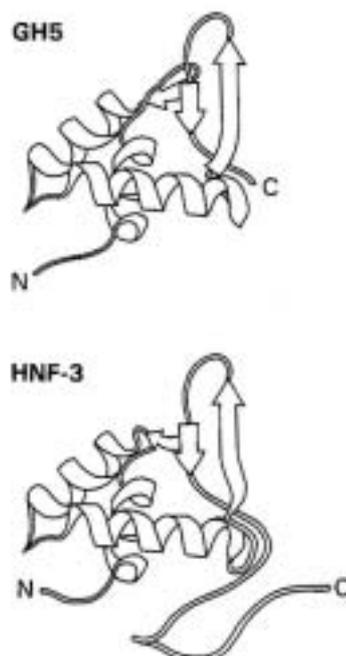


Figura 1.22. Comparación de la estructura del dominio globular de la histona H5 con la estructura de HNF3. (Tomado de Wolffe, 1998).

Aparte de HNF3, se han descrito otros factores proteicos capaces de desplazar la histona H1 del nucleosoma y, en algunos casos, se han descrito consecuencias en la regulación de la transcripción, tanto en forma de activación transcripcional como de inactivación. Por ejemplo, la proteína de unión a metil-CpG MeCP2, puede desplazar a la H1 del DNA metilado reprimiendo la transcripción en el promotor tardío (*late promoter*) del adenovirus (Nan *et al.*, 1997). Lo mismo puede hacer el receptor de glucocorticoides en el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) (Lee y Archer, 1998) y el factor de unión UBF (*upstream binding factor*) en la secuencia potenciadora de rDNA (Kermekchiev *et al.*, 1999), en ambos casos dando lugar a una activación transcripcional. Es muy destacable que el receptor de glucocorticoides sólo sea capaz de desplazar H1 fosforilada.

### **1.4.7. Modificaciones post-traduccionales de la H1**

#### **1.4.7.1. Fosforilación**

La histona H1 es modificada a nivel post-traduccionaI principalmente por fosforilación reversible. Esta modificación varía a lo largo del ciclo celular (Bradbury, 1992). Se han realizado estudios para examinar este hecho con varios organismos y tipos celulares, como *Physarum polycephalum* (Mueller *et al.*, 1985), células de ovario de hámster chino (Gurley *et al.*, 1975, 1978) y también con cultivos celulares de mamífero, que muestran que la fosforilación de la histona H1 es máxima en células que se dividen rápidamente y disminuye en células que no proliferan. Los niveles de fosforilación de la H1 son bajos en la fase G1 del ciclo celular y aumentan durante la fase S y la mitosis. Durante la mitosis la fosforilación de la histona H1 llega a su máximo en la metafase, cuando los cromosomas se encuentran condensados al máximo, con 22-24 fosfatos por molécula de histona H1 en el caso extremo de *Physarum polycephalum* (Mueller *et al.*, 1985), y después disminuye de manera muy acusada (Ajiro *et al.*, 1981) (Ver la figura 1.16).

Experimentos con líneas celulares mutadas que presentan una fosforilación de la histona H1 disminuida, muestran una condensación menor de los cromosomas (Matsumoto *et al.*, 1980; Yasuda *et al.*, 1981). En cambio, la hiperfosforilación de la H1 en otra línea celular da lugar a una condensación prematura de la cromatina (Ajiro *et al.*, 1983). Estos resultados dan lugar a la suposición que existe una relación causal directa entre la fosforilación de la histona H1 y la condensación cromosómica.

Con la finalidad de determinar la importancia de la fosforilación de la histona H1 para la función cromosómica, se han estudiado sistemas en los cuales la mitosis y la compactación cromosómica se encuentran desacopladas (Roth and Allis, 1992). En este sentido, experimentos realizados con *Tetrahymena*, protozoo ciliado que presenta simultáneamente dos núcleos diferentes en estructura, función y comportamiento mitótico, han permitido concluir que la fosforilación de la histona H1 se relaciona inversamente con la condensación de la cromatina (Lin *et al.*, 1991). El macronúcleo somático responsable de mantener el crecimiento celular, es transcripcionalmente activo y se divide amitóticamente sin condensación aparente de cromatina; sin embargo la fosforilación de H1 macronuclear está controlada a través de una kinasa (la cdc 2 o MPF) que es similar a aquella que regula el ciclo celular en células de mamífero normales, no obstante, la actividad de ésta kinasa y la condensación del cromosoma pueden estar desacopladas. El estado de fosforilación de la histona H1 macronuclear es altamente dependiente de las condiciones de crecimiento celular. Si las células se paran, cesa el crecimiento y la histona H1 es moderadamente desfosforilada. Más significativamente, durante la conjugación los macronúcleos llegan a ser completamente inertes, la cromatina se condensa y la histona H1 es completamente desfosforilada (Lin *et al.*, 1991). Así, la fosforilación de la H1 está inversamente relacionada con la condensación de la cromatina. En contraste con los macronúcleos, el micronúcleo germinal, responsable del ciclo sexual está normalmente silencioso transcripcionalmente y sufre un ciclo mitótico normal que incluye la formación de cromosomas mitóticos (Wu *et al.*, 1986).

Variantes especiales de H2A están presentes en el macronúcleo transcripcionalmente activo pero ausentes en el micronúcleo. Las histonas están también más extensivamente acetiladas en el macronúcleo. La asociación de la histona H1 con la cromatina en el macronúcleo también disminuye con la actividad transcripcional. Esta histona H1 macronuclear está altamente fosforilada durante el crecimiento vegetativo. En el micronúcleo, la H1 macronuclear es reemplazada por cuatro polipéptidos de histona *linker* especializados (Allis and Gorovsky, 1981; Roth *et al.*, 1988) Uno de estos péptidos llega a ser fosforilado en la activación transcripcional del micronúcleo durante el ciclo sexual de *Tetrahymena* (Sweet *et al.*, 1996).

Otro sistema en el cual la fosforilación de las histonas H1, en este caso la histona H5, se puede desacoplar de la mitosis es el desarrollo del eritrocito nucleado de pollo. Durante los últimos estadios del desarrollo del eritrocito de pollo, el núcleo se condensa en

heterocromatina inactiva, fenómeno debido en parte a la aparición de la histona H5. La histona H5 recién sintetizada se encuentra altamente fosforilada, pero cuando la cromatina del eritrocito se condensa la histona H5 es cuantitativamente desfosforilada.

En este caso nuevamente la desfosforilación de la histona H1 se correlaciona con la compactación de la cromatina (Aubert *et al.*, 1991). Esta relación entre estos dos procesos se ratifica aún en otro experimento en el que el gen de la histona H5 fue expresado en fibroblastos. Este subtipo de histona H1 especializado no se encuentra normalmente en estas células. La acumulación de la histona H5 en los fibroblastos provoca la condensación de la cromatina e inhibe el crecimiento celular (Sun *et al.*, 1989). En estas circunstancias la histona H5 no estaba fosforilada. La introducción de la proteína en células transformadas, en cambio, daba lugar a la fosforilación de la histona H5. En este caso, la condensación nuclear tiene lugar y las células continúan creciendo y dividiéndose. Por lo tanto, se podría concluir que la fosforilación de las histonas H1 impide el plegamiento de la cromatina. La espermatogénesis de erizo de mar es otro ejemplo que está de acuerdo con estos resultados. En este caso, la desfosforilación de la histona H1 específica de espermatozoos también se correlaciona con la condensación de la cromatina (Green and Poccia, 1985). Después de la fertilización, la histona H1 de espermatozoos se fosforila al mismo tiempo que el pro-núcleo se descondensa. En el caso excepcional de la mitosis, la fosforilación de la histona H1 coincide con la condensación de la cromatina, pero esta condensación podría ser debida realmente a la fosforilación paralela de otras proteínas no histonas que regulen el proceso. Se ha demostrado que la fosforilación de la histona H1 debilita la interacción de sus dominios terminales con el DNA, pero de forma sorprendente estos cambios influyen más en la unión de la histona a la cromatina que al DNA desnudo (Hill *et al.*, 1991). Quizás la fosforilación de la histona H1 en la mitosis sea necesaria para debilitar la interacción con la cromatina y permitir que factores en *trans* puedan acceder al DNA o a la fibra de cromatina y producir cambios en la arquitectura cromosómica. Por ejemplo, algunas de estas proteínas podrían ser las proteínas SMC (*stability and maintenance of chromosomes*), como XCAP-C y XCAP-E, de las que ya se ha hablado en un apartado anterior. De forma más general, se ha propuesto que la fosforilación de la H1 actuaría como un primer paso que provocaría una descondensación temporal de la cromatina, que permitiría el acceso de factores específicos de unión al DNA durante los procesos de activación génica, replicación del DNA o condensación de los cromosomas.

Efectivamente, se ha relacionado también el proceso de la replicación del DNA con la fosforilación de la histona H1. Experimentos *in vivo* con mutantes capaces de fosforilar la H1, muestran una replicación del DNA incompleta (Yasuda *et al.*, 1981). También se han reconstituido mini-cromosomas con histonas H1 con diferentes grados de fosforilación y se ha demostrado un efecto en la estructura de la cromatina y en la replicación (Halmer and Gruss, 1996). Se ha demostrado que la histona H1 se encuentra altamente fosforilada en líneas celulares transformadas con combinaciones de los oncogenes *ras*, *myc* y p53 mutante. La fosforilación de la H1 se correlaciona en este estudio con la transformación celular, pero parece independiente del potencial metastático. (Taylor *et al.*, 1995).

La proteína quinasa principalmente responsable de la fosforilación de la histona H1 durante el ciclo celular en eucariotas es la quinasa mitótica principal (*major mitotic kinase*), también denominada *cdc2*, CDC28 o MPF (Dunphy and Newport, 1988; Langan *et al.*, 1989). Durante la mitosis en eucariotas superiores, la quinasa mitótica principal induce los cambios estructurales requeridos para la división celular, incluyendo la desestructuración de la envoltura nuclear (membrana nuclear y lámina), la condensación de la cromatina y la construcción del huso mitótico. Aunque la histona H1 llega a ser hiperfosforilada en la mitosis, es claro que no es el único sustrato de la quinasa mitótica principal durante el ciclo celular. Se ha demostrado que la vesicularización de la membrana nuclear, la desestructuración de la lámina y la condensación cromosómica son procesos independientes (Ohaviano and Gerace, 1985; Newport and Spann, 1987; Newport *et al.*, 1990). Es muy posible que la fosforilación de las otras proteínas de la fracción de la matriz nuclear, incluyendo Sc I (topoisomerasa II); Sc II (XCAP-C/E) y Sc III, puedan influir en el plegamiento de la cromatina y los cromosomas.

Los residuos serina y treonina son los aceptores de los grupos fosfato en las histonas H1. La fosforilación se da en las colas N- y C-terminales básicas y, más concretamente, en secuencias conservadas del tipo K-(S/T)-P-X-K y K-(S/T)-P-K. Estos motivos son las secuencias consenso de fosforilación para las quinasas de la familia *cdc* (Langan *et al.*, 1989; Churchill and Travers, 1991). En cambio, el dominio estructurado central de la histona H1 no es fosforilado (Langan, 1982). Se supone que la adición de una carga negativa y la consiguiente neutralización de la carga neta positiva de las colas da lugar a un debilitamiento de la interacción de la histona H1 con el DNA internucleosomal.

Algunos resultados indican que los subtipos de histona H1 de mamífero H1<sup>o</sup>, H1a y H1c difieren de H1b, H1d y H1e en su nivel de fosforilación a lo largo del ciclo celular. En la tabla numero 1 se muestra el número de grupos fosfato en los dominios N-terminal y C-terminal de algunos subtipos de la histona H1.

También se han encontrado diferencias en sus niveles de fosforilación máxima entre los mismos subtipos de ratón y rata (Talasz *et al.*, 1996). Es muy interesante el hecho que los niveles máximos de fosforilación para cada subtipo suelen coincidir con el número de motivos (S/T)-P-K-K que presenta.

Número de fosforilaciones en los dominios de la histona H1		
subtipo	N-terminal	C-terminal
H1a	1	4
H1b	1	4
H1c	1	3
H1d	1	3

Tabla 1.1. Tabla con nº de fosforilaciones en los dominios N-terminal y C-terminal de algunos subtipos de la histona H1.

### 1.4.7.2. ADP-ribosilación

Además de fosforilada, la histona H1 también puede ser ADP-ribosilada. La H1 es uno de los mejores sustratos para la poli(ADP-ribosa) polimerasa (Poirier y Savard, 1980), la cual transfiere polímeros de ADP-ribosa a ciertas proteínas de forma covalente y/o no covalente. La unión covalente da lugar a la presencia de cadenas de ADP-ribosa cortas, cadenas de 8 a 10 unidades en el caso de la H1 (D'Erme *et al.*, 1996). En cambio, la unión no covalente resulta en la transferencia de polímeros largos y ramificados (de 100 a 200 unidades) a dominios específicos de la proteína (Panzeter *et al.*, 1992). Las uniones no covalentes son mucho más fuertes que lo que se esperaría de una simple interacción electrostática, ya que son resistentes a una gran variedad de condiciones.

La presencia de polímeros de ADP-ribosa en la histona H1 produce un cambio de la carga total de la proteína y es muy probable que afecte a las uniones H1-DNA y H1-H1. Se ha observado por microscopía electrónica que la ADP-ribosilación de polinucleosomas *in vitro* produce una relajación de la estructura de la cromatina (Poirier *et al.*, 1982). Así mismo, esta modificación post-traduccional no produce la liberación de la histona H1 de las regiones internucleosomales (D'Erme *et al.*, 1996).

Evidencias recientes sugieren que la ADP-ribosilación *in vivo* puede estar implicada en el mantenimiento de los patrones de metilación en el DNA genómico (Zardo *et al.*, 1998; De Capoa *et al.*, 1999), especialmente manteniendo el estado no metilado de las islas CpG de los promotores de genes expresados constitutivamente (Zardo and Caiafa, 1998). El mecanismo molecular que relaciona la ADP ribosilación con la metilación es desconocido. A continuación se presenta un cuadro donde se muestran algunas diferencias entre subtipos de la H1.

Caraterísticas específicas de los subtipos de la histona H1

Subtipo	H1a	H1b	H1c	H1d	H1e	H1°	Referencia
Cromosoma	6	6	6	6	6	22	Albig and Doenecke, 1997
Fosforilación (S/T)PKK	4	5	3	5	4	3	Dong et al. 1994 Draben et al. 1995 Yang et al. 1987 Alonso et al. 1988
Fosforilación fase G1 en ratones y ratas (paréntesis)	1	2 (2)	1 (1)	1 (1)	1 (1)	1	Talasz et al. 1996
Fosforilación fase S en ratones y ratas (paréntesis)	1	3 (3)	1 (1)	2 (2)	2-3 (3)	1	Talasz et al. 1996
Fosforilación en mitosis en ratones y ratas (paréntesis)	4	5 (5)	4 (4)	5 (5-6)	4 (5)	3 (3)	Talasz et al. 1996
Poli-ADP-ribosilación	Alta	Alta	Alta	Baja	Baja		Riquelme et al. 1979
Patrones de síntesis	Comienza en fase S	Comienza en fase S	Comienza en fase G1	Comienza en fase S	Comienza en fase G1		Talasz et al. 1993
Estabilidad evolutiva	Evolución rápida	Evolución moderada	Evolución moderada	Evolución moderada	Evolución lenta		Ponte et al. 1998
Organización génica	Caja TATA Caja: CCAATC A Sitio de unión sp1 Sin caja H1 Sin caja CH1UE	Caja TATA Caja: CCAATC A Sitio de unión sp1 2 cajas H1 Caja: CH1UE	Caja TATA Caja: CCAATC A Sin Sitio de unión sp1 Una caja H1 2 cajas extra H1 Caja CH1UE	Caja TATA Caja: CCAATC A Sitio de unión sp1 Una caja H1 Caja CH1UE	Caja TATA Caja: CCAATC A Sitio de unión sp1 2 cajas H1 Caja CH1UE		Eilers et al.1994 Van Wijnen et al, 1988 Doenecke et al. 1994 Meergans et al.1998

Tabla 1.2: Tabla con algunas características diferenciales de algunos subtipos de la H1. Adaptado de Parseghian and Hamkalo, 2001.

### 1.4.8. La histona H1 y las SARs

Se sabe que la unión de la histona H1 al DNA no es una unión específica y por lo tanto no está limitada a ciertas secuencias. No obstante se ha indicado una preferencia *in vitro* por las secuencias ricas en A+T (Laemmli *et al.*, 1992). Se sabe que las SAR (*scaffold associated regions*) actúan como lugar de unión preferencial para la H1 *in vitro*. Además, dada la elevada cooperatividad que presenta esta histona al unirse al DNA (Rodríguez *et al.*, 1991), la unión preferencial a las SAR provoca la unión de moléculas de histona H1 adicionales al DNA no-SAR próximo (Izaurralde *et al.*, 1989).

Las SARs son definidas como fragmentos de restricción que se unen específicamente al conjunto de proteínas que forman la matriz nuclear o cromosómica. Las SARs son secuencias de varios centenares de pares de bases muy ricas en A+T (>70%), fueron identificadas como secuencias retenidas en preparaciones de matriz nuclear y se identificaron originalmente en *Drosophila* (Mirkovitch *et al.* 1984). Se han caracterizado desde entonces en varios organismos incluyendo humanos y levaduras (Cockerill and Garrard, 1986; Amati and Gasser, 1988). En *Drosophila* se han encontrado varias secuencias SAR: la SAR de 657 pb de los grupos de genes de las histonas; la SAR de 1.9 Kb, asociada con el promotor larval del gen de la alcohol deshidrogenasa, las SAR 5' y 3' del gen de la actina 5c citoplasmática, de 4 Kb y 1.75 Kb respectivamente; la SAR 5' del gen *fushi tarazu* de 1.2 Kb y la SAR asociada con los genes de choque térmico de 1.27 Kb.

Se han descrito algunos motivos característicos de las SAR: la secuencia consenso de corte de la topoisomerasa II *in vitro* (Gasser and Laemmli, 1986<sup>a</sup>; Cockerill and Garrard, 1986), las cajas de A- y T- (Gasser and Laemmli, 1986b) y el motivo ATATTT (Cockerill and Garrard, 1986; Mielke *et al.*, 1990). Estudios con polímeros simples de DNA claramente implican las secuencias oligo(dA).oligo(dT) en la unión preferencial a la histona H1: experimentos de precipitación de diferentes oligonucleótidos con H1 identifican los compuestos poli[dA]<sub>11</sub>-poli[dT]<sub>11</sub> como las mejores SARs artificiales (Izaurralde *et al.*, 1989; Adachi *et al.*, 1989), comparadas con los polímeros alternantes poli(dA-dT). En otros polímeros simples como poli(dG-dC) o polidA-dG no se observan agregados específicos cuando interactúan con la H1. En polímeros poli(dA-

dA) y poli(dA-dC) se observa agregación específica solamente con tamaños superiores a 600 pb. Efectivamente, la histona H1 se une preferentemente a estos tramos, según se desprende de experimentos con secuencias SAR sintéticas y distamicina A. Esta droga inhibe la unión preferencial de la histona H1 al DNA que contiene secuencias SAR, dando lugar a una redistribución no selectiva de la histona H1 entre DNA SAR y no SAR (Kas *et al.*, 1989).

Otros experimentos que demuestran la unión de la histona H1 a las secuencias SARs se realizaron con las SARs identificadas en *Drosophila*. Se encontró que todas estas SARs se unen selectivamente a la histona H1, aunque existen claras diferencias en las afinidades relativas individuales, por ejemplo la SAR larval requiere una relación H1/DNA del 15 % para ser precipitada cuantitativamente, mientras que la SAR 5' del gen de actina, la SAR ftz y shp 70 requieren sólo 2.5 %. La SAR 3'act y la SAR de histona tienen afinidades intermedias, la Sar ADH y Sgs4 muestran las afinidades más bajas (Izaurre et al., 1989)

Las SARs juegan un papel importante en la organización de orden superior de la cromatina en los estados de interfase y metafase (Mirkovitch, et al. 1987; Gasser and Laemmli, 1986a). Las SARs están implicadas en la delimitación estructural de los lazos de cromatina. Estos lazos contienen de 50 a 100 Kb de DNA y pueden ser vistos como subunidades estructurales y dinámicas de los cromosomas. El modo y la densidad de empaquetamiento de los lazos pueden ser alterados durante el ciclo celular y en relación con la función genómica.

La estructura cromosomal es altamente ordenada y esta organización debe permitir movimientos dinámicos de la cromatina durante actividades tales como la formación de los lazos, la recombinación y la condensación del cromosoma; estos procesos biológicos están gobernados presumiblemente por las SARs que son *elementos cis*, distribuidos en intervalos a lo largo del genoma.

El papel de las SARs en la condensación del cromosoma fue investigado usando una proteína artificial MATH-20 (Strick and Laemmli, 1995). MATH-20 es una proteína de unión a SAR (Reeves and Nissen, 1990) formada por 20 motivos peptídicos llamados ganchos AT, derivados de la HMG-I/Y. Los numerosos tramos de A en las secuencias

SARs pueden simultáneamente acomodar los 20 motivos, mientras que otras secuencias no lo logran. En extractos de huevos de *Xenopus* se encontró que bajas dosis de MATH-20 inhiben un estadio tardío de condensación de los cromosomas, las cromátidas se colapsan en esferas individuales formando estructuras aberrantes (Hart and Laemmli, 1998). El posible mecanismo que explica este fenómeno es que las proteínas unidas a la SAR, que son necesarias para la estabilidad estructural de los cromosomas, sean desplazadas por MATH-20 a secuencias no SAR, produciendo una condensación incorrecta y provocando la formación de cromátidas en forma de balón. Aunque estas observaciones sugieren que las SAR son *elementos cis* de los cromosomas dinámicos, el mecanismo por el cual ejercen su papel es especulativo. Las SAR pueden ser el blanco de proteínas de unión que median o facilitan la formación y yuxtaposición de los lazos de la cromatina en metafase.

Los tramos de A de las SARs se unen competitivamente a 2 tipos de proteínas: el primer grupo constituido por la histona H1 y la topoisomerasa II, las cuales se unen cooperativamente a las SARs o a ciertos satélites ricos en AT y permiten la compactación de la fibra de cromatina, la condensación de cromosomas o la formación de heterocromatina. Contrariamente, el segundo grupo de proteínas como HMG-I/Y y la proteína derivada Math-20, se unen no cooperativamente a las SARs y pueden desplazar las proteínas compactantes rompiendo sus interacciones cooperativas, favoreciendo de esta manera la accesibilidad de la cromatina o compactándola incorrectamente. Este modelo está basado en experimentos de competición *in vitro* que muestran que las HMG-I/Y y la distamicina, que se unen selectivamente a los tramos A del surco menor del DNA, específicamente hacen que los DNAs que contienen SARS sean accesibles por desplazamiento de la histona H1 preunida a las SARs (Zhao, Kas, and Laemmli, 1993).

En el modelo que se está perfilando (Laemmli *et al.*, 1992), la histona H1 y las topoisomerasas son las dos candidatas principales que pueden servir como proteínas implicadas en la topología cromosómica y en la estructura en dominios de la cromatina, a pesar de que se están encontrando otras proteínas que se unen a las SAR selectivamente. Estas dos proteínas parece que compiten por unirse al DNA SAR. La hipótesis es que una unión regional y regulada de la H1 podría generar dominios potencialmente activos, “abiertos”, o dominios no activos, “cerrados” (Izaurralde *et al.*,

1989). Se ha propuesto también la existencia de análogos de distamicina en la célula, denominadas proteínas D, que intervendrían en la regulación de la unión H1-DNA SAR. Según este modelo, las SAR que flanqueen un gen inhibirían o estimularían su transcripción, dependiendo de la relación proteína-D/H1. Estudios con *Xenopus laevis* han demostrado que, la transcripción de los genes ribosomales 5S de tipo oocítico se encuentra directamente regulada por la unión de histonas H1 a zonas ricas en A+T que flanquean las múltiples copias de estos genes (Tomaszewski and Jerzmanowski, 1997).

Por otro lado, se ha descrito una baja afinidad de la H1 por secuencias CpG (Käs *et al.*, 1989). En cambio, se ha observado una especial afinidad de la H1 por grupos CpG metilados (Jost and Hofsteenge, 1992). Como ya se ha comentado, estos grupos también son motivos que influyen en la regulación de la expresión génica, y se ve que también en este caso puede estar implicada la histona H1, aunque no está claro de qué manera. Tanto para la H1<sup>o</sup> como para otros subtipos de la H1, se ha observado una distribución no homogénea en el núcleo y en cromosomas metafásicos (Gorka *et al.*, 1993; Breneman *et al.*, 1993; Ponte *et al.*, 1994). En este fenómeno también puede estar involucrada la afinidad diferencial de la H1 por diferentes secuencias de DNA.

La mayoría de experimentos descritos en la bibliografía han sido realizados con la histona H1 total, en ese trabajo pretendemos estudiar la interacción de los subtipos H1a,b,c,d,e y H1<sup>o</sup> con DNA desnudo y con cromatina y buscar posibles diferencias en esta interacción.

---

# 2

## OBJETIVOS

---

Teniendo en cuenta que la histona H1 cumple un papel muy importante en la formación de estructuras de orden superior de la cromatina y por lo tanto participa en los procesos dinámicos de replicación, transcripción y regulación de la expresión génica, el propósito de esta tesis es contribuir al estudio de las diferencias funcionales de subtipos de la histona H1. Para esto nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Purificar los seis subtipos somáticos de la H1 de mamífero usando diferentes métodos cromatográficos.
2. Estudiar las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por el DNA.
3. Determinar si los seis subtipos de la H1 poseen todos el carácter de proteína de unión a las SAR.
4. Estimar las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por la cromatina.
5. Estudiar por DC los complejos de subtipos de la H1 y el DNA e investigar el papel de las distintas secuencias de DNA en la inducción del espectro  $\psi$ .

---

# 3

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1. PURIFICACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE LA HISTONA H1

#### 3.1.1. Material Biológico

Para la purificación de núcleos se emplean ratas albinas de la cepa OFA (Sprague Dawley), criadas en el Estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona. Se realizan purificaciones a partir de ratas de 15 días y otras purificaciones a partir de ratas de 30 días como mínimo.

#### 3.1.2. Purificación de núcleos de cerebro de rata

Los núcleos se purifican a partir de cerebro de rata, siguiendo el método descrito por Thompson (1973) y modificado por Piña *et al.* (1984). Todo el proceso se realiza a 4 °C, de acuerdo con los siguientes pasos:

- Matar las ratas por decapitación, diseccionar y pesar los cerebros. Los cerebros se pueden guardar congelados.
- Lavar los cerebros con Tampón A (sacarosa 1M/CMx1/inhibidores). Dejarlos finalmente en 3ml del mismo tampón por cada gramo de tejido.

Para 250 ml de CMx4:

[final]

Cacodilato sódico	0.21 g	4 mM
Cloruro de potasio	1.864 g	100 mM
Espermina	0.052 g	0.60 mM
Espermidina	0.1273 g	200 mM
EDTA 0.5M	2 ml	4 mM
Tiodiglicol	10 ml	4%
H <sub>2</sub> O hasta	100 ml	

Para 100 ml de tampón A:

Sacarosa 34.23 g

CM x 4 25 ml

H<sub>2</sub>O hasta 100 ml

Inhibidores: se adicionan con agitación justo antes de usar la disolución

[final]

PMSF 100 mM	100 µl	0.1 mM
Aprotinina (1 mg/ml)	100 µl	0.1 mg
Pepstatina (1 mg/ml etanol)	100 µl	0.1 mg
Leupeptina (1 mg/ml)	100 µl	0.1 mg
DTT 1M	100 µl	1.0 mM

- Homogenizar en el tampón A con un homogenizador tipo DOUNCE, durante 30 veces, en hielo.
- Completar el volumen a 20 ml con tampón A
- Adicionar los 20 ml de la disolución anterior sobre un cojín de 10 ml de Tampón B (sacarosa 2M/CMx1/inhibidores)

Para 100 ml de Tampón B:

Sacarosa 68.46 g

CMX4 25 ml

H<sub>2</sub>O hasta 100 ml

Inhibidores: se adicionan con agitación justo antes de usar la disolución

[final]

PMSF 100 mM	100 µl	0.1 mM
-------------	--------	--------

Aprotinina (1 mg/ml)	100 µl	0.1 mg
Pepstatina (1 mg/ml etanol)	100 µl	0.1 mg
Leupeptina (1 mg/ml)	100 µl	0.1 mg
DTT 1M	100 µl	1.0 mM

- Centrifugar a 22.000 r.p.m. con rotor SW28 durante 1 hora.
- Eliminar el sobrenadante (el cojín debe ser transparente).

### 3.1.3. Purificación Salina de Histonas H1 por Cromatografía de Intercambio Catiónico

Para la purificación salina de la H1 total del cerebro de rata se han introducido varias modificaciones en el método descrito por García-Ramírez *et al.* (1990). El protocolo final es el siguiente:

- El sedimento de núcleos obtenido en el paso 7 del protocolo anterior se resuspende en Tampón C (CMx1 con CaCl<sub>2</sub> 2 mM.) Resuspender cada tubo en 2 ml.

100 ml de Tampón C:		[final]
Cacodilato sódico	0.084 g	4 mM
Cloruro de potasio	0.745 g	100 mM
Espermina	0.020 g	0.60 mM
Espermidina	0.05092 g	200 mM
Cloruro de calcio	0.117616 g	8 mM
Tiodiglicol	4 ml	4 %
H <sub>2</sub> O hasta	100 ml	

- Realizar digestión con 5 µl de nucleasa micrococcal (0.5 unidades/µl) durante 10 minutos a 37 °C.
- Comprobar el estado de los núcleos al microscopio.
- Tomar una alícuota de la disolución de núcleos, medir la absorbancia del DNA a 260 nm para calcular su concentración y controlar el rendimiento de la purificación de la proteína.
- Centrifugar durante 10 minutos a 12.000 r.p.m. para recuperar los núcleos.

- Resuspender los núcleos en 2 ml de EDTA 1mM/Tris 10mM/inhibidores / pH 7.4.
- Dializar toda la noche a 4 °C frente a EDTA 1 mM/Tris 10 mM/inhibidores / pH 7.4.
- Recuperar el contenido del saco.
- Ajustar la concentración a 0.35 M de NaCl añadiendo gotas de NaCl 4 M. Las gotas se añaden bajo agitación y con agitación suave.
- Añadir Carboximetil-Sephadex C-25 (CM- S) (24 mg/ml) y realizar agitación suave en hielo durante 2 horas. (Las histonas H1 son selectivamente extraídas de la cromatina y se unen al CM- Sephadex).
- Lavar la suspensión de bolas de CM-Sephadex dos veces con NaCl 0.35 M/Tris/10 mM/PMSF 0.1 mM/pH 8.8.
- Cargar la suspensión en una columna de Sephadex G-25, previamente equilibrada con NaCl 0.35 M/Tris10 mM/pH 8.8.
- Eluir las histonas H1 unidas a la resina de CM-Sephadex con 60 ml de un gradiente lineal de NaCl 0.35 M a 1.2 M/Tris10 mM/pH 8.8.
- Seguir el perfil de elución a 226 nm con un detector Unicord SII de Pharmacia-Biotech y recoger fracciones de 1ml.
- Comprobar la composición de las fracciones en SDS-PAGE.
- Dializar frente a ácido acético al 1% las fracciones correspondientes al pico de la cromatografía.
- Liofilizar.

### **3.1.4. Purificación de la H1° por cromatografía de gel filtración**

Para purificar H1° se utiliza una columna de 160 cm de longitud y un diámetro de 2 cm. Se sigue el método descrito por Böhm *et al.* (1973) con algunas modificaciones.

Preparación del gel y empaquetamiento de la columna:

- Añadir gradualmente 50 g de Biogel P-100 (Poliacrilamida) al tampón (ácido clorhídrico 10 mM) en un vaso de precipitados. Utilizar dos veces el volumen esperado. Nota: Un gramo de Biogel P-100 seco proporciona 12 ml de gel hidratado.
- Hidratar el gel durante 12 horas a 20 °C.
- Después de la hidratación completa decantar la mitad del sobrenadante.
- Transferir la disolución a un frasco de filtración.

- Desgasificar la disolución durante 10 minutos con agitación ocasional del frasco. No usar barra de agitar.
- Adicionar 2 volúmenes de tampón desgasificado y agitar suavemente el gel.
- Dejar sedimentar el gel hasta que el 90-95% de las partículas estén sedimentadas.
- Eliminar el sobrenadante por succión para retirar las partículas finas.
- Eliminar el sobrenadante por lo menos tres veces más.
- Colocar un embudo en la columna, cerrar la salida de la columna y añadir tampón hasta llenar el 20% de la columna (100ml).
- Añadir uniformemente el gel en la columna con un movimiento suave. Nota: Evitar salpicar el gel para asegurar un empaquetamiento uniforme y evitar que queden atrapadas las burbujas que puedan formarse.
- Cuando se ha formado el lecho, dejar fluir el tampón hasta que la columna se empaquete.
- Abrir la llave y pasar 2 volúmenes de tampón (1 litro) a la velocidad de flujo que se va a operar (10 ml/hora) para equilibrar la columna.

Preparación, aplicación de la muestra y cromatografía:

- Disolver la Histona H1 en 2ml urea 4 M/Tris 10 mM
- Cerrar la llave de la columna.
- Eliminar el tampón hasta el nivel del lecho del gel.
- Cargar la muestra suavemente en la superficie del gel y dejarla entrar dentro del lecho.
- Lavar la muestra con tampón adicional.
- Añadir tampón en la superficie del gel.
- Eluir a una velocidad de 10 ml/hora.
- Seguir el perfil de elución a 226 nm con un detector Unicord SII de Pharmacia-Biotech.
- Recoger fracciones de 3.5ml
- Analizar por SDS-PAGE las muestras de los picos registrados.
- Dializar frente a tampón fosfato 10 mM
- Liofilizar las fracciones correspondientes al pico de la H1°

### 3.1.5. Purificación de las Histonas H1a,b,c,d,e por HPLC de Fase Reversa

Para realizar la cromatografía se utiliza un sistema modular Waters. Se usa una columna C18 Vydac de 28 cm de longitud.

Disoluciones:

Tampón A: Ácido trifluoracético al 0.1%

Tampón B: Ácido Trifluoracético al 0.1% y Acetonitrilo al 95%

Nota: las disoluciones se deben preparar con agua MilliQ y desgasificar posteriormente.

Preparación de la muestra:

- Disolver la muestra liofilizada en 1ml de tampón A (TFA al 0.1%).
- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
- Inyectar manualmente la muestra en la columna.
- Eluir durante 165 minutos a un flujo de 0.7 ml/min y con el siguiente gradiente:

Tiempo (minutos)	%A	%B
0	100	0
10	100	0
15	80	20
140	55	45
145	30	70
160	100	0
165	100	0

- Seguir el perfil de elución a 280 nm.
- Analizar las fracciones correspondientes a los diferentes picos registrados por AU-PAGE y por SDS-PAGE.
- Liofilizar las histonas purificadas frente a tampón fosfato 10 mM.
- Liofilizar y almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . las histonas H1a, H1b, H1c H1d y H1e.

## 3.2. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

### 3.2.1. Purificación de los plásmidos p1314, pUC19 y pBR322.

Para realizar la purificación de los plásmidos p1314, pUC19 y pBR322, se utilizaron colonias de *E. coli DH5-α*. Se realizó una mega-purificación utilizando el kit de Qiagen siguiendo el protocolo indicado en el manual:

- Inocular a partir de una colonia aislada o de un stock glicerinado un tubo con 3 ml de LB, el medio debe contener 3 µl de ampicilina (stock 100 µg/ml).
- Incubar toda la noche con agitación (300 rpm) a 37 °C.
- Inocular con los 3 ml del cultivo anterior un litro de LB con ampicilina (100 µg/ml).
- Hacer crecer con agitación a 37 °C hasta una densidad aproximada de  $3-4 \times 10^9$  células /ml de cultivo.
- Recuperar las células bacterianas por centrifugación a 6000 g. durante 15 minutos a 4 °C. Remover todo el sobrenadante. (El sedimento se puede congelar a – 20 °C).
- Resuspender el sedimento en 50 ml de tampón P1 (50 mM Tris HCl, pH 8/10mM EDTA/100 mg/ml Rnase A), las bacterias deben ser resuspendidas completamente vorteadando o pipeteando repetidas veces.
- Añadir 50 ml de tampón P2 (200 mM NaOH/ 1% SDS) y mezclar suavemente por inversión de 4 a 6 veces y luego incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. No permitir que la reacción de lisis suceda más de 5 minutos.
- Añadir 50 ml del tampón P3 frío (3.0 M acetato de potasio/pH 5.5), mezclar inmediatamente pero suavemente por inversión 4 a 6 veces. Incubar en hielo durante 30 minutos.
- Centrifugar a 11500 rpm en un rotor JA-14 durante 30 minutos a 4 °C. Recuperar rápidamente el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico.
- Centrifugar el sobrenadante a 11500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Recoger rápidamente el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico.
- Equilibrar una columna Qiagen 2500 aplicando 35 ml de tampón QBT (750 mM NaCl/ 50 mM MOPS pH 7/ 15 % isopropanol/ 0.15 tritón X-100), y permitir que la columna vacíe por gravedad.

- Cargar el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico en la columna y dejar que entre en la resina por gravedad.
- Lavar la columna con 2 x 100 ml de tampón QC (1.0 M NaCl/ 50 mM MOPS, pH 7/ 15 % isopropanol)
- Eluir el DNA con 35 ml de tampón QF (1.25 M NaCl/ 50 mM Tris HCl, pH 8.5/ 15 % isopropanol).
- Precipitar el DNA añadiendo 24.5 ml (0.7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente al DNA eluido. Mezclar y centrifugar inmediatamente a 9500 rpm durante 30 minutos a 4 °C y después decantar cuidadosamente el sobrenadante.
- Lavar el sedimento de DNA con 7 ml de etanol al 70 % a temperatura ambiente y centrifugar a 9500 rpm durante 10 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenadante sin dañar el pelet.
- Secar el sedimento durante 10 o 20 minutos y disolver el DNA en un volumen sustituible de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 1 mM EDTA).
- Hacer una dilución 10/1000 del plásmido para medir la D.O. Se obtienen 2.15 mg de p1314, 1.15 mg de pUC19 y 0.7 mg de pBR322.

### **3.2.2. Digestión del plásmido p1314 con Kpn I y BamHI:**

Para digerir el plásmido usar el tampón de digestión One-Phor-All Buffer Plus (OPA) de Amersham Pharmacia Biotech, Kpn I digiere a una concentración 1x del tampón, mientras que Bam HI digiere con 2x. Con la digestión se obtendrá el fragmento de la SAR de 657 pb.

- Resuspender el DNA plasmídico en tampón TE, pH 8.0 a una concentración entre 0.1 y 0.3 µg/µl.
- Comprobar el plásmido en gel de agarosa al 1%. (Figura 2a )
- Añadir 1/10 del volumen total de tampón de digestión OPA 10x.
- Digerir con KpnI: a 800 µl de p1314 añadir 100µl de tampón OPA x 10, 80 µl de agua y 20 µl de kpnI.  
(800 µl p1314 + 100 µl OPA x 10 + 80 µl H<sub>2</sub>O + 20 µl Kpn I ).
- Mezclar bien y centrifugar brevemente.
- Incubar durante 2 horas a 37 °C.
- Analizar la reacción de digestión en gel de agarosa al 1%.

- Para digerir con Bam HI añadir nuevamente 1/10 del volumen total de tampón de digestión OPA 10x.
- Añadir 120 µl de tampón opa x 10, 20 µl de BamHI e incubar durante 2 horas a 37 °C.
- Mezclar bien y centrifugar brevemente.
- Incubar a 37 °C durante 2 horas
- Comprobar las digestiones en gel de agarosa al 1 %. (figura 2a)

### 3.2.3. Digestión del plásmido pUC19 con HaeIII:

La digestión del pUC19 se realiza con Hae III para obtener un fragmento de 587 pb, que contiene 56 % de AT. Hae III digiere a una concentración 1x del tampón OPA.

- Resuspender el DNA plasmídico en tampón TE, pH 8.0 a una concentración entre 0.1 y 0.3 µg/µl.
- Comprobar el plásmido en gel de agarosa al 1%. (Figura 2a )
- Añadir 1/10 del volumen total de tampón de digestión OPA 10x.
- Digerir con Hae III: a 800 µl de pUC19 añadir 100µl de tampón opa x 10, 90 µl de agua y 20 µl de Hae III e incubar durante 2 horas a 37 °C.  
(800 µl pUC19 + 100 µl OPA x 10 + 80 µl H<sub>2</sub>O + 20 µl Hae III )
- Comprobar la digestión en gel de agarosa al 1.5% en TAE X 1 (figura 2a)

### 3.2.4. Digestión del plásmido pBR322 con EcoRI y Sal I

La digestión del pBR322 se realiza con Eco RI y Sal I para obtener un fragmento de 650 pb, que contiene 47 % de A+T.

- Resuspender el DNA plasmídico en tampón TE, pH 8.0 a una concentración entre 0.1 y 0.3 µg/µl.
- Comprobar el plásmido en gel de agarosa al 1%. (Figura 3.2 )
- Añadir 1/10 del volumen total de tampón de digestión H 10x.
- Digerir con EcoRI y Sal I: a 860 µl de pBR322 añadir 100µl de tampón H 10x, 20 µl de EcoRI y 20 de Sal I.  
(860 µl p1314 + 100 µl OPA x 10 + 20 µl Eco RI + 20 µl Sal I).
- Mezclar bien y centrifugar brevemente.
- Incubar durante 2 horas a 37 °C.
- Comprobar las digestiones en gel de agarosa al 1 %.

### 3.2.5. Purificación de la región SAR DE 657 pb, del fragmento de 587 pb del pUC19 y del fragmento de 650 pb del pBR322.

Para electroeluir el DNA se usa una cámara “BIOTRAP” de la casa Schleider & Schuell (Gobel *et al.* 1987). El Biotrap consiste en un bloque de poli-carbonato de 1.2 cm de ancho por 10 cm de longitud, con una cámara central que a su vez se puede dividir en otras cámaras mediante el uso de membranas. La membrana BT1 es una membrana inerte con una matriz densa que en un campo eléctrico deja pasar los iones del tampón y todas las moléculas cargadas con peso molecular inferior de 3 a 5 Kda. La membrana BT2 es una membrana microporosa que actúa como prefiltro, impidiendo el paso de agarosa y otras partículas a la cámara de muestra purificada. Las membranas BT1 se colocan en las posiciones A y G (ver figura 3.1) y la membrana BT2 en las posiciones C, D, E, F o G. Las membranas forman así las cámaras de elución (B) y la cámara de concentración (A). El DNA migra de la cámara de elución a la cámara de concentración, donde es retenido. Con este sistema de elución se pueden purificar fragmentos de 14 pb hasta 150000 pb.

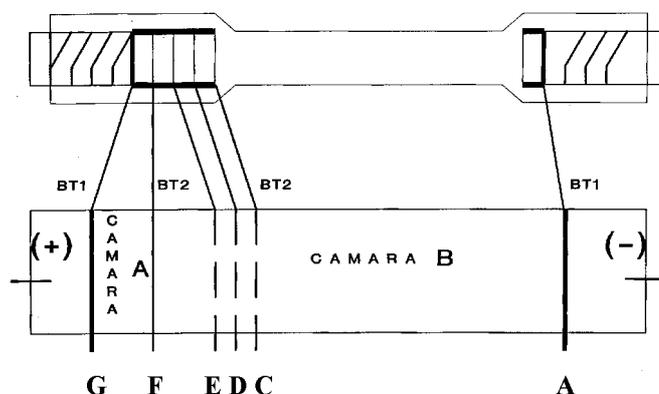


Figura 3.1. Esquema de la cámara de electroelución “BIOTRAP” de la casa Schleider & Schuell.

#### PROCEDIMIENTO:

- Cargar los plásmidos P1314 y pBR322 digeridos en un gel de agarosa al 1% en TAE x 1 y el pUC19 digerido en un gel de agarosa al 1.5 % en TAE x 1.
- Dejar correr el gel durante 3 horas a 90 voltios
- Teñir en bromuro de etidio durante 1 hora
- Desteñir en agua durante 15 minutos.
- Cortar la banda correspondiente a la región SAR (657 pb), al fragmento de 587 pb del pUC19 y al fragmento de 650 pb del pBR322.

- Colocar las membranas de diálisis en el BIOTRAP (figura 3.1), las membranas BT1 en las posiciones A y G, estas membranas son asimétricas y el extremo agudo debe coincidir con el triángulo señalado en el BIOTRAP. La membrana BT2 en la posición F para formar la cámara de concentración.
- Colocar el fragmento del gel en la cámara de elución (B)
- Añadir Tampón TAE x 1 hasta cubrir el gel.
- Añadir TAE x 1 a la cámara de concentración hasta enrasar el nivel del tampón con el de la cámara de elución.
- Colocar el BIOTRAP en una cubeta de electroforesis horizontal y añadir TAE x 1 hasta igualar el nivel del interior de las cámaras de elución y concentración.
- Conectar la fuente durante 3 horas a 150 voltios. Durante la electroelución el DNA pasa libremente por las membranas BT2 y se concentra en la cámara A, ya que no puede atravesar las membranas BT1.
- Comprobar que en el fragmento de agarosa no quede DNA.
- Invertir la polaridad y aplicar una diferencia de potencial de 200 voltios durante 15 segundos para que el DNA adherido a la membrana se libere y quede en disolución.
- Recoger el volumen de la cámara de concentración y pasar la disolución a un tubo eppendorf.

### 3.2.6. Precipitación del DNA

- Añadir cloruro de sodio a una concentración final de 150 mM
- Añadir dos volúmenes y medio de etanol absoluto a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Dejar de 2 a 12 horas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Lavar con 70 % de etanol
- Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos
- Descartar sobrenadante
- Resuspender el DNA en TE
- Comprobar los fragmentos en agarosa de alta resolución (figura 3.2)

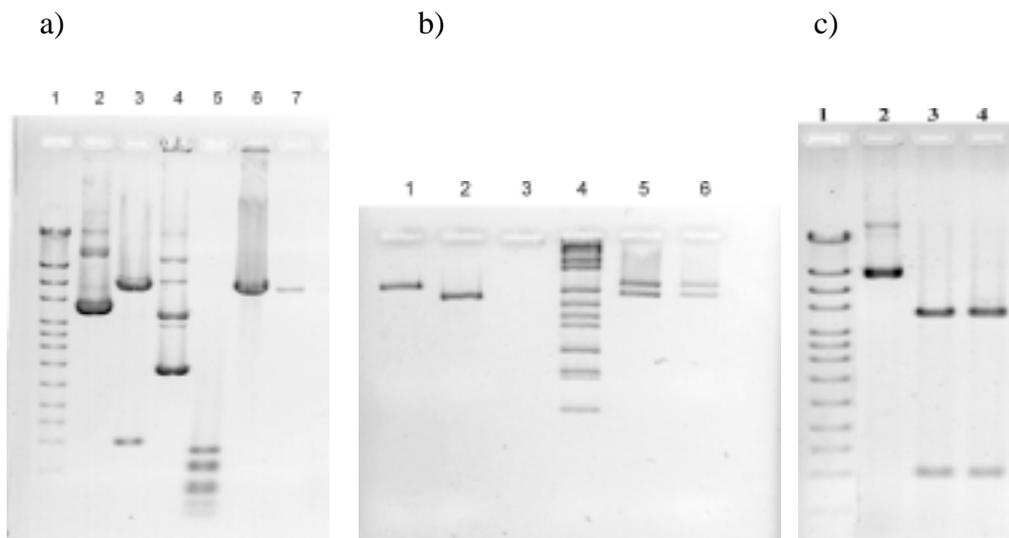


Figura 3.2. a) Electroforesis de agarosa al 1 % para de la purificación y digestiones de los plásmidos p1314 y pUC19. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: p1314; carril 3: p1314 digerido con Kpn I y BamH I; carril 4: pUC19; carril 5: pUC19 digerido con Hae III. b) Electroforesis de agarosa de alta resolución al 3% para comprobar los fragmentos de DNA: carril 1: fragmento SAR de 657 pb; carril 2: fragmento de 587 pb del pUC19; carril 4: marcador de peso molecular; carriles 5 y 6: fragmentos SAR (banda superior) y 587-mer (banda inferior). c) Electroforesis de agarosa al 1 % para comprobar la purificación y digestión del plásmido pBR322. Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: pBR322; carriles 3 y 4: pBR322 digerido con Eco RI y Sal I.

### 3.2.7. Secuencia de nucleótidos de los fragmentos de DNA

#### 3.2.7.1. Secuencia SAR

```
GAATCATGGCAAATATTTCACTAATTCGTAATGTTTATTTAAAATTGAAACGTTTCATCCCCTA
GAAGGGCTTCTGAAAGAAGCGTCTATTATTAATTAAGATACTTTATTACTTGATTAAAGTTC
ACATTGAACTACAGAAAAATTTGCTTTAAAGCAGCATTTCAGAAATAATTTTCGATCGTTAAA
AATACAGATACTTTCTTAAATAACATAATATTAATATAATAAATAATATTTTCTTAAATTATT
AATGTGTTTGCTTGTTATTAATGTGTTTTCATGCATATTTTAAAATAATTTGTTCTGAAATCA
ATCGATTTCCCTCGCCACATATGCATTACCGTCTATGTAGTCAAATAAATAAATCAAATAAAA
AATAAAAAGAAACAATTTTGTATTATCCTTTATTATGTAATATATATTACATTCCGCAACAA
AATTAGCCAATTTCCGTGCTGAATTTACATAGGTTTTATTTTTTACAGACGTTTGAAGGGAC
AGTGTCAATTGTCCCGTACGACCTCTTCAATAATAACACATTCTTCAGTTAACACATGGAAA
AAATATAAAATAGCTAGTTTTATTTTATTATTTTCTGTTATTTTATAAATATTGCCGTCATCA
ATGTAATTTCAATTAATTTCAAACCTGCTTACACAGAATTC
```

#### 3.2.7.2. Secuencia 587-mer del pUC19

```
GGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTC
AGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTC
AAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG
AAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTT
CCTGTTTTTGTCCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC
ACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCG
AGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTAT
TGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGT
ACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGC
TGCCATAACCATGAGTGATAAACAACCTGCGGCC
```

### 3.2.7.3. Secuencia 650-mer del pBR322

```
ATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATT
GCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAATCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACC
GTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGCTTGGTTATGCCGGTACTGCCGGCCTCTTGCGGGA
TATCGTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGA
TGCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCC
TGCTCGCTTCGCTACTTGGAGCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCCTG
TGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCCACAGGTGCGGTTGCTGG
CGCCTATATCGCCGACATACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGC
GCTTGTTCGCGGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTC
CTTGCATGCACCATTCCTTGCGGGCGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCT
TCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGGAGAGCG
```

## 3.3. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

### 3.3.1. Electroforesis SDS-PAGE:

La electroforesis discontinua en presencia de SDS es un método empleado para analizar mezclas complejas. Tiene una gran definición y es muy sensible a las variaciones de carga y estructuración de las proteínas. El SDS desnatura las proteínas casi por completo envolviéndolas en una micela, además la carga del detergente apantalla la carga de las propias proteínas, de tal manera que éstas no tienen casi ninguna influencia en la carga total. La cantidad de SDS unida a las proteínas y por lo tanto la carga total de la micela depende de la masa molecular de las proteínas. En estas condiciones la separación se da únicamente por razón de sus masas moleculares, aunque las proteínas con elevada densidad de carga como las histonas presentan movibilidades electroforéticas diferentes. La electroforesis se realiza siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989):

Preparación del gel separador de poliacrilamida al 12%, con SDS:

- Limpiar los vidrios de electroforesis de 15 cm con acetona.
- Montar los vidrios utilizando espaciadores de 1.5 mm y sujetarlos con pinzas.
- Preparación de la disolución de Poliacrilamida al 12%:

Para 30 ml de gel separador:		[final]
Acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%)	12 ml	12 %
Tris 1.5M pH 8.8	7.5 ml	0.375 M
H <sub>2</sub> O desionizada	9.9 ml	

SDS al 10% (p/v)	0.3 ml	0.1%
Persulfato amónico al 10% (p/v)	0.3 ml	0.1%
TEMED	12 µl	

- Filtrar y cargar con una jeringa la disolución del gel de separación y dejar espacio para el gel de apilamiento.
- Agregar alcohol isopropílico y dejar polimerizar durante 30 minutos.

Preparación del gel apilador de poliacrilamida 5% (30/0.8)

Para 10 ml:		[final]
Acilamida/bisacilamida (30/0.8%)	1.7 ml	5%
Tris 1M pH 6.8	1.25 ml	0.125 M
H <sub>2</sub> O desionizada	6.8 ml	
SDS al 10% (p/v)	100 µl	0.1%
Persulfato de amonio al 10% (p/v)	100 µl	0.1%
TEMED	12 µl	

- Extraer el isopropanol del porta gel, lavar con agua desionizada varias veces y secar con papel filtro.
- Cargar la disolución del gel de apilamiento con una pipeta pasteur.
- Poner el peine y dejar polimerizar durante una hora.

Preparación del tampón de muestras:

Para 5 ml de tampón 6x:		[final tampón 1X]
Tris 1M pH 6.8	1.5 ml	50 mM
Glycerol 87%	3.44 ml	10%
SDS	0.6 g	2%
Azul de bromofenol	0.03 g	0.1%

- Calentar la mezcla de muestra (50 µl) y tampón (10 µl) a 100 °C durante 5 minutos.
- Añadir 10% de mercaptoetanol (6µl)
- Retirar peine y pinzas
- Montar el porta gel en las cubetas
- Llenar las cubetas con tampón de recorrido.

Tampón de recorrido:

Para un litro 5x:		[final]
Tris	15.1g	25 mM
Glicina	94 g	250 mM
SDS al 10% (p/v)	50 ml	0.1%
H <sub>2</sub> O desionizada hasta completar volumen		

- Cargar las muestras después de lavar los pocillos con el mismo tampón.
- Entrada de las muestras en el gel de apilamiento a 150V.
- Electroforesis a 200V durante 4 horas.

Tinción y revelado

- Desmontar los vidrios.
- Teñir con azul de coomassie durante 12 horas

Disolución para teñir:

Para 100 ml:

H <sub>2</sub> O	45 ml
Metanol	45 ml
Ácido acético	10 ml
Azul de coomassie	0.25 g

- Desteñir el gel con una disolución de metanol/agua/acético (45:45:10).

### 3.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con urea-acético:

Para comprobar la separación de las histonas H1a, H1b y H1c por HPLC se emplea el método electroforético AU-PAGE de alta resolución descrito por Piña *et al.* (1987) ligeramente modificado:

Preparación del gel separador:

- Limpiar los vidrios de electroforesis de 28 cm con acetona.
- Montar los vidrios utilizando espaciadores de 1.5 mm y sujetarlos con pinzas.
- Preparación de la disolución de poliacrilamida al 15% 30/0.8:

Para 100 ml de gel separador: [final]

Acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%)	50 ml	15%
Urea	15.015 g	2.5 M
Ácido Acético	5.4 ml	0.9 M
TEMED	350 µl	0.350% (v/v)
Persulfato amónico 10% (p/v)	350 µl	0.035% (p/v)
H <sub>2</sub> O hasta completar volumen		

- Filtrar y desgasificar.
- Dejar polimerizar durante 3 horas.

Preparación de la disolución del gel de apilamiento:

Para 20 ml:		[final]
Acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%)	4.6 ml	7%
Urea	3 g	2.5M
Ácido Acético	1ml	0.9M
TEMED	400 µl	
Persulfato amónico 10% (p/v)	200 µl	0.5%
H <sub>2</sub> O hasta completar 20 ml		

- Llenar el portagel, colocar el peine y dejar polimerizar durante 3 horas.
- Electroforesis AU-PAGE
- Montar el portagel en las cubetas y llenar las cubetas con tampón de recorrido.

Tampón de recorrido:

Para 1 litro:  
 Ácido acético glacial: 54 ml (0.9 M)  
 H<sub>2</sub>O hasta completar volumen

- Sacar el peine y lavar los pozos con tampón de recorrido con una jeringa.
- Realizar pre-electroforesis con refrigeración a 200 v durante 12 horas.
- Cambiar el tampón de recorrido y lavar los pozos con tampón de recorrido.
- Cargar las muestras (50 µl de cada muestra evaporada y disuelta en 10 µl de tampón de muestras).

Tampón de muestras:

Preparación de 5 ml: [final]

Ácido acético	257 $\mu$ l	0.9 M
Glicerol	250 $\mu$ l	5%
Urea	2.402 g	8 M
Pironina	0.5 mg	0.01%

- Entrada de las muestras en el gel a 500 v y electroforesis con refrigeración a 320 v durante 29 horas.

#### Tinción y revelado

- Desmontar los vidrios.
- Sumergir el gel en una disolución de metanol/agua/acético (5:5:1) para fijar las proteínas, durante 30 minutos.
- Realizar la tinción con azul de coomassie brillante R250, con Amidoblack B10 o con nitrato de plata.

#### 3.3.3. Tinción con azul de coomassie brillante R 250

Fijación: sumergir el gel en la disolución fijadora durante 1 hora con agitación constante.

Disolución de fijación:

Para 100 ml:

H <sub>2</sub> O	45 ml
Metanol	45 ml
Ácido acético	10 ml

Tinción: sumergir el gel en por lo menos 5 volúmenes de disolución de tinción y agitar suavemente entre 4 y 12 horas a temperatura ambiente.

Disolución para teñir:

Para 100 ml:

H <sub>2</sub> O	45 ml
Metanol	45 ml
Ácido acético	10 ml
Coomassie brillante R250	0.25 g

Nota: Después de preparar la disolución para teñir, filtrar para eliminar las partículas no disueltas.

- Retirar la disolución de tinción.
- Desteñir en una disolución de metanol: H<sub>2</sub>O: acético (45:45:10) con agitación suave.
- Fotografiar el gel.
- Secar al vacío si se quiere guardar.

#### 3.3.4. Tinción con Amidoblack B10

- Sumergir el gel en por lo menos 5 volúmenes de disolución de tinción y agitar suavemente entre 4 y 12 horas a temperatura ambiente.

Disolución para teñir:

Para 100 ml:

Etanol	20 ml
Ácido acético	7 ml
H <sub>2</sub> O	73 ml
Negro amido B10	0.7 g

Nota: Después de preparar la disolución filtrar para eliminar las partículas no disueltas.

- Retirar la disolución de tinción.
- Desteñir en una disolución de 20% de etanol y 7 % de ácido acético con agitación suave.
- Fotografiar el gel.
- Secar al vacío si se quiere guardar.

#### 3.3.5. Tinción con nitrato de plata

La tinción con plata es un método de 50 a 100 veces más sensible que la tinción con coomassie, y permite comprobar mejor la pureza de la proteína a analizar. El método utilizado se basa en el descrito por Blum *et al.* (1987) con algunas modificaciones. Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente con agitación continua; las disoluciones se preparan al momento con agua desionizada.

**PROCEDIMIENTO:**

Fijación: Sumergir el gel durante 1 hora en 100 ml de la disolución de fijación, el gel se puede mantener en esta disolución .

Disolución de fijación:            50 % Metanol(v/v)  
12 % Ácido acético (v/v)  
0.5 ml Formaldehído 37 %

Esta disolución permite la fijación de las proteínas y la eliminación de sustancias que puedan interferir en la tinción como el SDS, y el Tris.

Deshidratación: mantener el gel durante 10 minutos en 100 ml de etanol al 50 % (v/v).  
Repetir 3 veces

Pretratamiento: mantener el gel durante 1 minuto en una disolución de tiosulfato sódico al 0.02 % (p/v).

Lavado: lavar 3 veces con agua desionizada durante 20 segundos.

Impregnación con nitrato de plata: sumergir el gel en 100 ml de disolución de impregnación de 20 a 60 minutos.

Disolución de impregnación:  
Nitrato de plata 0.1 M            12 ml  
H<sub>2</sub>O desionizada                88 ml  
Formaldehído                      70 µl

Lavado: lavar 3 veces con agua desionizada durante 20 segundos.

Revelado: mantener el gel en 100 ml de disolución reductora

Disolución de revelado:  
Carbonato de sodio                3 %  
Formaldehído 37%                50 µl  
Tíosulfato sódico                 1 cristal

Parada de la reacción de revelado: el proceso de revelado se ha de parar acidificando el medio durante 10 minutos cuando el fondo del gel comienza a oscurecer.

Disolución de parada:

Metanol al 50 %

Ácido acético al 12 %

El gel puede conservarse varias semanas en esta disolución.

Lavado: se lava el gel en 100 ml con una disolución de metanol al 50 % durante 20 minutos

Conservación: Se guarda a 4 °C dentro de una bolsa sellada con disolución de conservación:

Disolución de conservación:

Metanol al 30 %

Glicerol al 3 %

### 3.3.6. Electroforesis de DNA:

La electroforesis de DNA se utilizó para separar, identificar y aislar fragmentos de DNA y para determinar el tamaño de la cromatina. La electroforesis se realizó sobre soporte de agarosa. A pH neutro el DNA presenta una carga negativa neta, por lo tanto migra desde el polo negativo (pocillo situado en el cátodo) hacia el polo positivo (ánodo). La movilidad electroforética de los fragmentos de DNA depende del tamaño y está afectada por la longitud del DNA, por la conformación del DNA, por la corriente aplicada y la porosidad del gel.

#### PROCEDIMIENTO:

- Pesar una cantidad de agarosa en polvo y añadir el volumen correspondiente de tampón de electroforesis para obtener el porcentaje deseado.

Tampón tris acetato 50 x (TAE):

Preparación de 1 litro: [final TAE 1x]

Tris base                    242 g                    40 mM

Ácido Acético            57.1 ml                    20 mM

EDTA 0.5 M pH 8.0    100 ml                    1 mM

Tampón tris borato 5x (TBE):

Preparación de 1 litro: [final TBE 0.5x]

Tris base                    54 g                    45 mM

Ácido bórico	27.5 g	45 mM
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 ml	1 mM

- Dejar enfriar hasta una temperatura de 50 a 55 °C
- Añadir bromuro de etidio hasta una concentración de 0.5 µg/ml a partir de una disolución stock de bromuro de etidio de 10 mg/ml.
- Sellar los extremos de un portagel con cinta adhesiva y vaciar en su interior la disolución de agarosa.
- Colocar el peine a una distancia de 0.5 a 1 cm de uno de los extremos y comprobar que esté separado de la base del soporte entre 0.5 y 1 mm.
- Dejar reposar a temperatura ambiente entre 30 y 60 minutos hasta que gelifique.
- Quitar el peine con cuidado para no dañar los pocillos.
- Colocar el gel en la cubeta de electroforesis y añadir tampón hasta cubrir el gel.
- Añadir a las muestras 1/6 de volumen de tampón de muestras 6x.

Tampón de muestras:

Preparación de 10 ml:		[final]
Azul de bromofenol	0.025 g	0.25 %
Xilene cianol	0.025 g	0.25 %
Sacarosa	4 ml	40 %

H<sub>2</sub>O hasta completar volumen

- Cargar las muestras en el gel.
- Aplicar un voltaje de 1 a 5 V/cm (medida como la distancia entre los electrodos) hasta que el primer colorante, azul de bromofenol, haya recorrido 2/3 partes del gel
- Fotografiar una vez terminado el recorrido del gel.
- Tampón de muestras:

Preparación de 5 ml:		[final]
Ácido acético	257 µl	0.9 M
Glicerol	250 µl	5%
Urea	2.402 g	8 M
Pironina	0.5 mg	0.01%

### 3.4. INTERACCIÓN DE LOS SUBTIPOS DE LA HISTONA H1 CON EL DNA

#### 3.4.1. Experimentos de competición entre subtipos de la histona H1 por una cantidad limitada de DNA

Se realizará la competición de dos subtipos de la histona H1 por una cantidad limitada de DNA, en nuestro caso utilizamos dos fragmentos de DNA: uno es el fragmento SAR de 657 pb del grupo de histonas de *Drosophila melanogaster*, que contiene 74.5 % de AT en abundantes tramos homopoliméricos, y el otro, el fragmento de 587 pb obtenido de digestión con Hae III del pUC19, que contiene 56% de AT. La competición se realiza entre cada uno de los subtipos H1a-e y la H1° por el DNA SAR o por el fragmento del pUC19 de la siguiente manera:

- Mezclar 4.2 µg de dos subtipos de histona H1 (2.1 µg de H1° y 2.1 µg de uno de los subtipos H1a-e) con 0.7 µg de SAR o 0.7 µg del fragmento del pUC19.
- Dializar frente a 1 M NaCl / 0.01 M Tampón fosfato, pH 7/ 5 % glicerol; durante 3 horas.
- Dializar frente a 0.6 M NaCl / 0.01 M Tampón fosfato, pH 7/ 5 % glicerol; durante 3 horas.
- Dializar frente a 0.45 M NaCl / 0.01 M Tampón fosfato, pH 7/ 5 % glicerol; durante 3 horas.
- Dializar frente a 0.3 M NaCl / 0.01 M Tampón fosfato, pH 7/ 5 % glicerol; durante 3 horas.
- Dializar frente a 0.15 M NaCl / 0.01 M Tampón fosfato, pH 7/ 5 % glicerol; durante 3 horas.

Nota: durante el proceso de diálisis se formarán los complejos DNA-histona

Centrifugar a 14000 r.p.m durante 10 minutos para precipitar los complejos DNA-histona.

- Separar precipitado (complejo DNA-histona) y sobrenadante (histonas no unidas al DNA)
- Resuspender el precipitado en 0.14 M NaCl en tampón fosfato 0.1 M pH 7.0.

- Analizar la composición de precipitado, sobrenadante y mezcla inicial de las proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.
- Teñir con negro amido y medir las intensidades de las bandas.
- Determinar la proporción de cada subtipo en el precipitado y en el sobrenadante.

### **3.4.2. Experimentos de desplazamiento:**

En los experimentos de desplazamiento se realizan dos series: primero se mezcla la H1° con el fragmento SAR o el fragmento del pUC19, en una relación (3:1, p/p) y después se añade cada uno de los subtipos H1a-e. En otros experimentos se mezcla cada uno de los subtipos H1a-e con la SAR o con el fragmento del pUC19, en una relación (3:1, p/p) y después se añade la H1°. Las reacciones se realizan en 0.15 M NaCl, 0.01 M Tampón fosfato, pH 7 de la siguiente manera:

- Mezclar 2.1 µg de un subtipo de histona H1 con 0.7 µg del fragmento SAR o 0.7 µg del fragmento del pUC19.
- Incubar durante 1 hora a 37 °C para formar los complejos SAR-H1 y pUC19-H1
- Añadir 2.1 µg del segundo subtipo.
- Incubar una hora a 37 °C.
- Centrifugar la muestra a 14000 rpm durante 10 minutos para separar los complejos formados.
- Separar precipitado y sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en a 0.15 M NaCl / 0.01 M Tampón fosfato, pH 7.
- Analizar la composición de precipitado, sobrenadante y mezcla inicial de las proteínas en geles de poliacrilamida con SDS.
- Teñir con negro amido y medir las intensidades de las bandas.
- Determinar la proporción de cada subtipo en el precipitado y en el sobrenadante
- Obtener las afinidades relativas de los pares de subtipos compitiendo por el DNA de las relaciones de las intensidades de las bandas.

### **3.4.3. Ensayos de competición entre el fragmento SAR y el fragmento del pUC19 por una cantidad limitada de un sólo subtipo de la histona H1**

En estos experimentos se mezclan cantidades iguales de los dos fragmentos de DNA con una cantidad limitada de cada uno de los subtipos de la histona H1,

usando como tampón de unión 0.15 M NaCl, 0.01 M tampón fosfato, pH 7 en un volumen final de 25  $\mu$ l.

- Mezclar 70 ng de SAR y 70 ng del fragmento del pUC19.
- Añadir entre 18 y 87 ng de cada uno de los subtipos de histona H1
- Incubar durante 1 hora a 37 °C para que se formen los complejos DNA-histona.
  
- Centrifugar la muestra a 14000 rpm durante 10 minutos.
- Separar precipitado y sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en tampón E.
- Digerir precipitado y sobrenadante con 0.5  $\mu$ g/  $\mu$ l de proteinasa k.
- Incubar a 37 °C durante 3 horas.
- Analizar precipitado y sobrenadante en geles de agarosa de alta resolución al 3%.
- Determinar las proporciones de los fragmentos SAR y pUC19 en el complejo y en el sobrenadante por cuantificación de las bandas teñidas con bromuro de etidio
- Comprobar en PAGE-SDS que no hay presencia de proteína en los sobrenadantes.
- Teñir con plata.
- Escanear las bandas de proteínas en un Densitometro Imaging Modelo GS-700 (Biorad) y cuantificarlas con el programa Multyanalyst v.1 (Biorad). Cuantificar el DNA con el sistema de cuantificación de gel Gel Doc 1000 (Biorad) y el programa Molecular Analyst (Biorad).

### **3.5. INTERACCIÓN ENTRE LAS HISTONAS H1 DE LA CROMATINA Y UN EXCESO DE UN SUBTIPO AÑADIDO**

#### **3.5.1. Purificación de cromatina de hígado de rata**

##### **3.5.1.1. Purificación de los núcleos:**

- Lavar los hígados con agua destilada y ponerlos en 100 ml de tampón A (sacarosa 1M/CMx1/inhibidores).
- Cambiar el tampón una vez.

- Homogenizar en el tampón A con homogenizador mecánico y luego homogenizar manualmente con un homogenizador tipo Dounce.
- Filtrar el homogenizado.
- Completar el volumen a 20 ml con tampón A.
- Adicionar los 20 ml de la disolución anterior sobre un cojín de 10 ml de tampón B (sacarosa 2M/CMx1/inhibidores).
- Realizar ultracentrifugación a 22.000 r.p.m. en un rotor SW28 durante 90 minutos a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante (el cojín debe ser transparente).
- Lavar los núcleos con tampón C con inhibidores.

Para 100 ml de tampón C x2:

KCl	894.8 mg	120 mM
MgCl <sub>2</sub>	121. 2 mg	6 mM
Tris 1M pH 7.4	1 ml	20 mM
Thiodiglycol	2 ml	2 %
H <sub>2</sub> O	hasta 100 ml	

- Resuspender los núcleos en 10 ml (volumen total) de tampón C con inhibidores
- Comprobar el estado de los núcleos al microscopio.
- Medir la densidad óptica a 260 nm
- Añadir glicerol al 50 %.
- Almacenar los núcleos a – 80 °C.

### 3.5.1.2. Digestión con Nucleasa microccocal

- Descongelar los núcleos en hielo.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos
- Lavar los núcleos en tampón C con inhibidores.
- Resuspender los núcleos en tampón C y ajustar la concentración a 2 mg DNA/ml.
- Añadir CaCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 0.5 mM.
- Añadir 2 µl de nucleasa microccocal ( 15 U/ µl ) por cada mililitro de disolución de núcleos.
- Digerir a 37 °C durante 30 segundos.
- Añadir EDTA a una concentración final de 10 mM.

- Centrifugar a 2500 rpm durante 8 minutos
- Resuspender el pelet nuclear en TE pH 7.8 (con inhibidores) y agitar con pipeta pasteur.
- Incubar durante 30 minutos a 4 °C.
- Añadir NaCl hasta una concentración final de 70 mM.
- Centrifugar dos veces a 4000 rpm durante 10 minutos.
- Medir la densidad óptica a 260 nm.
- Concentrar la muestra (hasta 1.75 ml) en un filtro Centriprep YM-10 por centrifugación a 4500 rpm en un rotor JA-14.

#### **3.5.1.3. Gradiente de sacarosa:**

La separación de los fragmentos de cromatina según su tamaño se realiza en un gradiente lineal de sacarosa del 5 % al 20 % (p/v) en 10 mM de Tris-HCl pH 7.8, 1mM EDTA y 70 mM NaCl. Los gradientes se prepararon con un formador de gradientes Haeakebuchler IIC.

- Los gradientes se forman a partir de la mezcla progresiva de dos disoluciones de sacarosa (20% y 5%) durante 17 minutos. De manera que desde la base del tubo de centrífuga (20% de sacarosa) se establece un incremento continuo del % de sacarosa hasta la superficie del gradiente (5% de sacarosa)
- Al terminar el gradiente añadir a la muestra sacarosa a una concentración final del 3 %.
- Cargar con cuidado la muestra sobre el gradiente.
- Realizar ultracentrifugación a 28.000 r.p.m. con rotor SW28 durante 5 horas a 2 °C.
- Deshacer el gradiente en el Haeakebuchler IIC conectado a un colector de fracciones.
- Recoger fracciones de 0.8 ml y seguir el perfil del gradiente.
- Comprobar los tamaños de la cromatina separada en electroforesis nativa de agarosa y verificar el estado de las histonas en PAGE/SDS.

#### **3.5.2. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y un exceso de un subtipo añadido**

Después de conocer las afinidades relativas de los subtipos de la histona H1 por el DNA, específicamente por la SAR de 657 pb y por el fragmento del pUC19, nos proponemos determinar la afinidad de los subtipos de la histona H1 por la cromatina.

Para ello se diseñaron experimentos en los cuales se mezclan cromatina purificada a partir de hígado de rata, uno de los subtipos de la H1 y DNA SAR, a concentración fisiológica de sal, 0.14 M NaCl en 10 mM de tampón Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA.

Los experimentos de intercambio se realizan siguiendo los siguientes pasos:

- A 10  $\mu\text{g}$  de cromatina purificada a partir de hígado de rata, añadir 3.35  $\mu\text{g}$  de DNA SAR
- Añadir 2.5  $\mu\text{g}$  de un subtipo H1a-e o H1<sup>o</sup>
- Mezclar suavemente
- Incubar a 37 °C durante 90 minutos, en este período las histonas H1 de la cromatina se intercambian con la H1 añadida.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos para separar el precipitado, formado entre las histonas H1 y la SAR, y el sobrenadante que contiene la cromatina soluble.
- Realizar extracción ácida de las histonas con HCl en cada precipitado y sobrenadante.
- Precipitar las histonas con ácido tricloroacético al 12 %.
- Analizar la composición del precipitado y del sobrenadante en geles de poliacrilamida con SDS y en geles de poliacrilamida con urea-acético.
- Teñir con azul de coomassie y medir las intensidades de las bandas.
- Determinar las proporciones las histonas H1 en el precipitado y en el sobrenadante

### **3.6. ESTUDIO POR DICROISMO CIRCULAR DE COMPLEJOS FORMADOS ENTRE SUBTIPOS DE LA HISTONAS H1 Y EL DNA**

Para realizar los espectros de DC se ha utilizado un espectropolarímetro JASCO J-715 con termostatación. El análisis de los espectros se realiza con el programa “Standard analysis” de JASCO, que permite realizar los espectros de diferencia, el cambio de unidades a elipticidad molar  $[\theta](\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol de residuo})$  y la reducción de ruido de fondo si es necesario. S’han analizado mediante esta técnica tanto los subtipos de la histona H1, como muestras de DNA en presencia de polietilenglicol, y también complejos DNA\_proteína.

Los espectros de DC se realizaron con una cubeta de cuarzo rectangular de 0.1cm de paso de luz a 20 °C. Los parámetros seleccionados son:

Rango 260-190 nm

Amplitud de la banda: 2.0 nm

Resolución: 0.5 nm

Acumulación: 4

Sensibilidad: 50 mdeg

Respuesta: 2 s

Velocidad: 50 nm/min

**3.6.1. Preparación de las muestras:** Se preparan tres tipos de muestras para realizar los espectros de dicroísmo circular:

- Muestras que contengan H1c ó H1e y un tipo de DNA (SAR, fragmento del pUC19 o fragmento de 650 pb del pBR322), en relaciones H1/DNA de 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0; en 140 mM de NaCl /10 mM de tampón fosfato/0.01 % de nonidet P40.
- Muestras de DNA-Polietilenglicol, estas muestras se preparan en 0.3 M NaCl/10 mM de tampón fosfato y; el polietilenglicol se añadió a una concentración de 300 mg/ ml.
- Muestras de DNA-polietilenglicol-distamicina en 0.3 M NaCl/10 mM de tampón fosfato.