

T. ID. 315

B

UNIVERSITAT DE VALENCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUIMICA I
BIOLOGIA MOLECULAR

"ACTIVIDADES HISTONA
ACETILTRANSFERASA E HISTONA
DESACETILASA EN Pisum sativum"

Trabajo presentado por
RAMON SENDRA PEREZ
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

BIBLIOTECA
FACULTAT DE C. BIOLÒGIQUES
VALÈNCIA

UMI Number: U607649

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

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

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



UMI U607649

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

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



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

Pi-18799991

R.7760

D^a MARIA LUISA SALVADOR ALCOBER, Doctora en
ciencias Biológicas , profesora titular del Departament de
Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que, D. RAMON SENDRA PEREZ ha realizado bajo
su dirección en este Departamento, el trabajo de investigación que
presenta con el título de "Actividades histona acetiltransferasa e
histona desacetilasa en Pisum sativum"

Valencia 25 de septiembre de 1989.

A handwritten signature in black ink, reading "Ma Luisa Salvador Alcober". The signature is written in a cursive style with a long horizontal flourish at the end.

Fdo. Ma Luisa Salvador Alcober

Deseo expresar mi gratitud más sincera a mi directora, Dra. M^a Luisa Salvador Alcober, por sus consejos y constante apoyo, sin cuya ayuda no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

También quiero agradecer su inestimable colaboración a los compañeros de mi grupo de trabajo: Manuel Mateo Sánchez del Pino, Gerardo López Rodas y Vicente Tordera Donderis. Del mismo modo doy las gracias a todos los miembros del Departamento por su interés y amistad

Agradezco al Dr. José Pertusa y Vicent Rodilla sus enseñanzas con el analizador de imagen.

Finalmente agradezco a mis amigos Manolo Planes y Olga Abril su ayuda durante la escritura de este trabajo.

INDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCION	
1.1 CROMATINA: ESTRUCTURA Y FUNCION	2
1.2 ACETILACION DE HISTONAS	8
1.2.1 ACETILACION <u>IN VIVO</u> E <u>IN VITRO</u> DE LAS HISTONAS	8
1.2.2 EFECTO DE LA ACETILACION SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	10
1.2.3 FUNCION BIOLOGICA DE LA ACETILACION DE HISTONAS	12
1.3 ENZIMAS IMPLICADOS EN LA ACETILACION POSTRADUCCIONAL DE LAS HISTONAS	16
1.3.1 HISTONA ACETILTRANSFERASA	16
1.3.2 HISTONA DESACETILASA	18
1.4 ACETILACION DE HISTONAS EN VEGETALES	20
1.5 OBJETIVO DEL TRABAJO	22
2. MATERIAL Y METODOS	23
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	23
2.2 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION ENZIMATICA	23
2.2.1 EXTRACCION ENZIMATICA POR PRECIPITACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	23
2.2.2 EXTRACCION POR PRECIPITACION CON POLIETILENGLICOL	24
2.2.3 EXTRACCION POR ULTRACENTRIFUGACION EN PRESENCIA DE NH_4Cl 0.5 M	24
2.2.4 EXTRACCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE CROMATINA	25
2.3 PURIFICACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS	25
2.3.1 CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHAROSA	25
2.3.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR EN ULTROGEL Aca34	26
2.3.3 OTROS PROCEDIMIENTOS DE PURIFICACION	27
2.3.3.1 CROMATOGRAFIA EN DNA-CELULOSA	27
2.3.3.2 CROMATOGRAFIA EN HISTONA AGAROSA	27
2.3.3.3 PRECIPITACION FRACCIONADA CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	27
2.4 OBTENCION DE SUSTRATOS DE HISTONA ACETILTRANSFERASA	28
2.4.1 HISTONAS DE ERITROCITO DE POLLO	28
2.4.2 HISTONAS DE GUISANTE	28
2.4.3 OLIGONUCLEOSOMAS DE GUISANTE	29

2.5	OBTENCION DE SUSTRATOS DE HISTONA DESACETILASA	29
2.5.1	MARCAJE DE HISTONAS DE ERITROCITO DE POLLO	31
2.5.1.1	CON [³ H]-ACETATO SODICO	31
2.5.2	ACETILACION QUIMICA DE DIVERSOS SUSTRATOS	32
2.5.2.1	CON [³ H]-ANHIDRIDO ACETICO	32
2.5.2.1	ACETILACION QUIMICA DE HISTONAS Y BSA	32
2.5.2.2	ACETILACION QUIMICA DE POLIAMINAS	32
	Y LISINA	32
2.6	PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO ENZIMATICO	34
2.6.1	ENSAYO HISTONA ACETILTRANSFERASA	34
2.6.2	ENSAYO HISTONA DESACETILASA	37
2.7	METODOS ANALITICOS	39
2.7.1	ELECTROFORESIS DE PROTEINAS	39
2.7.1.1	ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE SDS	39
2.7.1.2	ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE ACIDO	39
	ACETICO-UREA-TRITON	39
2.7.2	PROCEDIMIENTO FLUOROGRAFICO	39
2.7.3	DENSITOMETRIA POR ANALISIS DE IMAGENES	40
2.7.4	VALORACION DE PROTEINAS	40
2.7.5	VALORACION DE DNA	40
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	41
3.1	EXTRACCION DE ACTIVIDADES HAT DE EMBRIONES	41
	DE GUISANTE	41
3.1.1	EXTRACCION POR PRECIPITACION CON (NH ₄) ₂ SO ₄	43
3.1.2	EXTRACCION POR PRECIPITACION CON PEG	47
3.1.3	EXTRACCION POR ULTRACENTRIFUGACION EN	52
	PRESENCIA DE NH ₄ Cl 0.5 M	52
3.2	CARACTERIZACION DE LAS HISTONA ACETILTRANSFERASAS	59
3.2.1	MASA MOLECULAR	59
3.2.2	EFECTO DEL NH ₄ Cl	60
3.2.3	INHIBICION POR COENZIMA A	64
3.2.4	EFECTO DE INHIBIDORES POTENCIALES DE LAS HAT	66
3.2.5	ACTIVIDAD FRENTE A DISTINTOS SUSTRATOS	68
3.2.6	ESPECIFICIDAD FRENTE A LAS DISTINTAS HISTONAS	71
3.3	EXTRACCION, PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION	78
	DE ACTIVIDADES HISTONA DESACETILASA DE GUISANTE	78
3.3.1	MASA MOLECULAR	80
3.3.2	EFECTO DE LA FUERZA IONICA	83

3.3.3 EFECTO DE INHIBIDORES POTENCIALES DE LAS HD	83
3.3.4 ACTIVIDAD SOBRE NUCLEOSOMAS	92
3.3.5 ACTIVIDAD FRENTE A DISTINTOS SUSTRATOS	92
3.3.6 ESPECIFICIDAD FRENTE A LAS DISTINTAS HISTONAS	95
3.4 OTROS PROCEDIMIENTOS DE PURIFICACION DE HAT E HD	98
3.5 ACTIVIDADES HAT E HD ASOCIADAS A CROMATINA	100
3.6 ACTIVIDADES HAT E HD DURANTE LA GERMINACION	114
4. CONCLUSIONES	118
5. BIBLIOGRAFIA	121

ABREVIATURAS

-BSA	seroalbúmina bovina
-DEAE	dietilaminoetilo
-Dimetil-POPOP	dimetilo de 2,2'-p-fenilén-bis-(5 feniloxazol)
-DNasa I	desoxirribonucleasa I
-DOI	densidad óptica integrada
-EDTA	ácido etiléndiamino-tetraácetico
-HAT	histona acetiltransferasa
-HD	histona desacetilasa
-HMG	proteínas cromosomales no histona de alta movilidad electroforética
-MES	ácido 2-(N-morfolín)-etansulfónico
-pb	pares de bases
-PEG	polietilenglicol
-PMB	paramercuribenzoato sódico
-PMSF	fluoruro de fenilmetán-sulfonilo
-p/p	relación peso/peso
-PPO	2,5-difeniloxazol
-PVP	polivinilpirrolidona
-SDS	dodecil sulfato sódico
-TCA	ácido tricloroácetico
-Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
-v/v	relación volumen/volumen

1. INTRODUCCION

1.1 CROMATINA: ESTRUCTURA Y FUNCION

La organización del material genético de la célula eucariota necesariamente supone una estructura dinámica que permita el acceso de las proteínas implicadas en los procesos de transmisión de la información genética. Esta estructura dinámica se encuentra en el núcleo de la célula eucariota y está constituida por el DNA y por las proteínas implicadas en su empaquetamiento y las que intervienen en la expresión de la información contenida en ese DNA.

Las proteínas de la cromatina se han clasificado en dos grupos fundamentales: histonas y proteínas cromosomales no histonas. Las histonas son proteínas básicas, de bajo peso molecular, que se han clasificado en cinco tipos mayoritarios, según criterios de composición en aminoácidos: H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Bradbury, 1975). El estudio de la secuencia ha revelado que las histonas H2A, H2B, H3 y H4 se encuentran entre las proteínas más conservadas durante la evolución, especialmente las histonas H3 y H4 (Isenberg, 1979; Wu et al., 1986) y que son proteínas globulares que presentan una región N-terminal que carece de estructura secundaria debido a la acumulación de residuos básicos (Delange et al., 1972). La histona H1 es más variable y presenta una región central globular, de secuencia conservada, y los extremos C-terminal y N-terminal con acumulación de residuos básicos (Wu et al., 1986).

Todas las histonas, excepto la H4, se han encontrado en más de una variante, diferenciándose los distintos subtipos en la sustitución, inserción o delección de unos pocos aminoácidos en su secuencia (revisado en Wu et al., 1986; Doenecke, 1988; Spiker, 1988b). No está todavía claro si las variantes de histonas tienen una función fisiológica específica. Hay evidencias que indican que las variantes sólo representan una diversidad de secuencia permisible que no afectaría a su función (Koldrubetz et al., 1982; Wallis et al., 1983). Sin embargo, también existen evidencias que sugieren un papel funcional para las variantes de histonas. Así, Simpson (1981) ha encontrado que la diferente composición en variantes de la cromatina tiene consecuencias estructurales y posiblemente, funcionales. En este sentido, en Tetrahymena se ha aislado una

variante minoritaria de H2A que parece estar preferentemente asociada con cromatina transcripcionalmente activa (Allis et al., 1986).

Si bien es cierto que las histonas se encuentran entre las proteínas más conservadas durante la evolución, no es menos cierto que estas proteínas son de las que sufren mayor número de modificaciones reversibles postraduccionales. Las modificaciones postsintéticas que pueden ocurrir en las histonas son: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y ADP-ribosilación (revisado en Isenberg, 1979; Wu et al., 1986; Doenecke, 1988). Estas modificaciones aumentan enormemente la heterogeneidad de las histonas. Este hecho, lo mismo que la presencia de variantes, podría tener importantes implicaciones en la estructura y función de la cromatina. Así, se han observado cambios en las propiedades fisicoquímicas de la cromatina inducidos por modificaciones de las histonas (Bertrand et al., 1984; Kaplan et al., 1984; Bode et al., 1983; Norton et al., 1989). En general, se admite que dichas modificaciones están de algún modo relacionadas con procesos fundamentales como la replicación, transcripción, reparación y condensación, interviniendo en la modulación de la estructura de la cromatina y aunque hay muy buenas correlaciones entre ciertos estados funcionales y alguna de las modificaciones de las histonas, no se conoce, en términos moleculares, la relación entre causa y efecto (Doenecke, 1988).

El otro grupo de proteínas de la cromatina lo constituyen las proteínas cromosomales no histonas (PCNH), que incluye tanto proteínas estructurales como proteínas relacionadas con el metabolismo de la cromatina. Se han identificado y caracterizado PCNH relacionadas con el mantenimiento de estructuras cromosomales específicas, como son las proteínas del andamiaje de los cromosomas ("chromosome scaffold proteins") y proteínas asociadas a centrómeros o a telómeros (revisado en James et al., 1988). También se han determinado PCNH específicamente asociadas con regiones de cromatina activa y en este grupo es donde se encuentran la mayor parte de las actividades enzimáticas, DNA polimerasas y otros enzimas relacionados con la replicación, enzimas que modifican proteínas y enzimas directamente implicados en la transcripción (Cartwright et al., 1982). Particularmente, parecen tener importancia, por ser relativa-

mente abundantes, las PCNH denominadas proteínas HMG ("high mobility group"), de las cuales se han aislado cuatro tipos en distintos tejidos de mamíferos y en eritrocitos de aves (Goodwin et al., 1978) designadas como HMG1, HMG2, HMG14 y HMG17. La función de estas proteínas HMG no está aún clara, aunque las HMG14 y 17 se presentan asociadas preferentemente a genes activos (Weisbrod et al., 1980; Brotherton y Ginder, 1986). Proteínas que por criterios operacionales pueden clasificarse como HMG, se han encontrado también en animales inferiores, plantas y eucariotas inferiores como la levadura (Mayes, 1982; Spiker, 1988a; Estruch et al., 1986).

La unidad básica de organización de la cromatina está constituida por un octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (dos moléculas de cada tipo), una copia de la histona H1 y 200 pares de bases de DNA (Kornberg, 1974 y 1977). Esta estructura básica, denominada nucleosoma, está regularmente repetida a lo largo de la fibra de cromatina y puede visualizarse por microscopía electrónica con apariencia de cuentas de rosario (Olins y Olins, 1974; Oudet et al., 1975). El estudio con endonucleasas ha demostrado que en el nucleosoma no todo el DNA se encuentra igualmente asociado con el octámero de histonas. Así, la digestión con nucleasa de micrococo va reduciendo el tamaño del DNA desde 200 pb hasta estabilizarse en unos 160 pb. La estructura así producida contiene el octámero de histonas y la histona H1 y ha sido denominada cromatosoma (Simpson, 1978a). La digestión más prolongada con esta nucleasa produce una estructura más estable que contiene, aproximadamente, 146 pb asociados al octámero de histonas, pero carece de H1, recibiendo el conjunto el nombre de "core" nucleosomal o partícula "core" (Kornberg, 1977; Felsenfeld, 1978). En la partícula "core" el DNA se enrolla sobre el octámero de histonas en una superhélice, dando 1.75 vueltas, formando el conjunto una estructura discoidal (Richmond et al., 1984). La histona H1 se sitúa externamente al "core" interaccionando con aproximadamente 10 pb del DNA anteriores y posteriores al "core", constituyendo así el cromatosoma (Thoma et al., 1979), en el cual el DNA completaría dos vueltas alrededor de las histonas (revisado en Pederson et al., 1986). El dominio globular central de la histona H1 parece estar implicado directamente en esta inte-

racción (Allan et al., 1980). Los cromosomas están conectados a través de un segmento de DNA denominado DNA espaciador ("linker DNA").

La sucesión de nucleosomas, conectados por el DNA espaciador, forma una estructura en zig-zag, de 10 nm de diámetro, visible por microscopía electrónica a bajas concentraciones salinas o en presencia de agentes quelantes de cationes divalentes (Thoma et al. 1979; Worcel et al., 1981). Sin embargo, a fuerza iónica fisiológica la fibra de 10 nm se compacta formando una fibra de 30 nm con una estructura helicoidal que posee entre 6 y 12 nucleosomas por vuelta. En esta superhélice los nucleosomas están orientados radialmente con sus caras planas ligeramente inclinadas respecto al eje mayor de la fibra (revisiones en Pederson et al., 1986; Felsenfeld y McGhee, 1986). Los detalles de esta estructura, así como las interacciones que la mantienen, no se conocen con claridad, pero se sabe que la histona H1 es imprescindible para su formación y mantenimiento (Finch y Klug, 1976; Thoma et et al., 1979; Allan et al., 1981) aunque se desconoce su localización en la superestructura. También se ha sugerido que las interacciones iónicas entre el DNA y las regiones N-terminales de las histonas de nucleosomas adyacentes podrían estabilizar la fibra de 30 nm (McGhee et al., 1980; Allan et al., 1982; Harbone y Allan, 1983).

Se puede encontrar un tercer nivel de organización de la cromatina en núcleos en interfase y en cromosomas metafásicos. La fibra de 30 nm se pliega formando lazos o dominios estructurales mantenidos por proteínas cromosomales no histonas de la matriz nuclear o del andamiaje cromosómico (Cockerill y Garrard, 1986; Mirkovitch, et al., 1984; Gasser y Laemmli, 1986; revisiones en Gasser, 1988 y en Werner et al., 1988).

En el núcleo de la célula eucariota, la gran mayoría del DNA se encuentra organizado en nucleosomas, incluyendo el pequeño porcentaje de genes que son transcritos. Sin embargo, hay muchas evidencias de que la cromatina activa presenta una estructura diferente de la que presentan las regiones de la cromatina no transcribibles (revisado por Weisbrod, 1982; Reeves, 1984; Eissenberg et al., 1985; Pederson et al., 1986 y Cartwright y Elgin, 1988). Así, Weintraub y Groudine (1976) mostraron que el gen de la globina, en núcleos de eritrocito de pollo (donde es ac-

tivo), es sustancialmente más sensible a la digestión por DNasa I que los genes inactivos en el mismo tipo celular. En tejidos donde el gen de la globina no se expresa, no se observó esta sensibilidad a la DNasa I. La sensibilidad de los genes activos frente a la DNasa I se ha encontrado en todos los casos en los que se ha estudiado y parece ser un fenómeno general relacionado con la estructura de la cromatina de genes activos, potencialmente activos o que han sido activos en algún momento en ese tipo celular (Cartwright y Elgin, 1988). Una sencilla interpretación para esta mayor sensibilidad de los genes activos sería que la cromatina de estas regiones activas se encuentra en una conformación alterada, en general más accesible a la maquinaria transcripcional (y por ello también a la DNasa I).

Los genes activos presentan también un segundo tipo de sensibilidad a la DNasa I. En estos genes, la cromatina en la vecindad de la región que es transcrita posee sitios que son hipersensibles a la digestión por esta nucleasa (Wu et al., 1979; Wu, 1980; recientemente revisado en Gross y Garrard, 1988). Los sitios hipersensibles se encuentran en posición 5' de los genes que se transcriben, ocupando un tramo entre 50 y 200 pb, y en algunos casos se han localizado también en posición 3'. Estos sitios hipersensibles son un orden de magnitud más sensibles que la misma cromatina activa (o potencialmente activa) y dos ordenes de magnitud más sensibles que los genes inactivos. En todos los casos donde se ha estudiado, los sitios hipersensibles están asociados con secuencias del DNA que son esenciales para procesos tales como la transcripción, replicación, recombinación o segregación cromosómica (Gross y Garrard, 1988).

La nucleasa de micrococo, que digiere preferentemente el DNA espaciador, también se ha utilizado para estudiar la estructura de la cromatina activa. Bloom y Anderson (1978) mostraron que los genes activos presentan mayor susceptibilidad a la digestión con nucleasa de micrococo. Sin embargo, esta nucleasa se ha utilizado más para la solubilización de la cromatina y posterior separación de las fracciones de cromatina activa de las inactivas (Goodwin et al., 1979; Levy-Wilson y Dixon, 1979; Levy-Wilson et al., 1979; Kimura et al., 1983; Weintraub, 1984).

La obtención de fracciones ricas en nucleosomas de regiones activas ha permitido estudiar los factores responsables de su estructura alterada. Así, hay muchas evidencias que señalan que la cromatina activa posee un nivel mucho más bajo en histona H1 que el que posee la cromatina total (Cartwright y Elgin, 1988). Este hecho parece indicar que la cromatina activa podría estar organizada sólo como filamento de 10 nm, ya que la H1 es necesaria para la formación de la fibra de 30 nm. También se ha encontrado una correlación inversa entre la actividad transcripcional de un gen y el nivel de metilación de su DNA. Se ha sugerido que la hipometilación del DNA es una condición necesaria (aunque no suficiente) para la transcripción del gen (Weisbrod, 1982; Reeves, 1984)

En fracciones enriquecidas en secuencias transcribibles se ha detectado también proteínas no histonas, variantes de histonas e histonas modificadas. Entre las proteínas no histonas, las que se han detectado más a menudo en nucleosomas activos son las HMG (Weisbrod, 1984; Reeves, 1984). En este sentido Weisbrod y Weintraub (1979) encontraron que el gen de la globina en eritrocitos de pollo pierde su sensibilidad a la DNasa I cuando se eliminan las HMG de la cromatina con NaCl 0.35 M y la recupera cuando se reconstituye la cromatina con las HMG 14 y 17. Sin embargo, la sensibilidad a la DNasa I no es producida sólo por las HMG 14 y 17, pues la reconstitución de cromatina de cerebro de pollo con estas HMG no confiere sensibilidad al gen de la globina (Weisbrod et al., 1980). En otros casos, se ha encontrado variantes de histonas específicas en correlación con cromatina activa. Así, por ejemplo, Tetrahymena posee un subtipo de la H2A (hv1) que sólo está presente en el macronúcleo, que es transcripcionalmente activo, y no en el micronúcleo, transcripcionalmente inerte (Allis et al., 1980 y 1986). Sin embargo, la presencia de variantes de histonas y su papel en la estructura de la cromatina activa no ha sido suficientemente investigado para concluir una relación directa entre variantes y cromatina de genes activos.

Hay un gran número de trabajos de investigación en los que se ha relacionado la actividad de la cromatina con las modificaciones post-sintéticas de las histonas (revisado en Reeves, 1984; Wu et al., 1986). Las modificaciones que más a menudo se han implicado en el control de la

transcripción son la ubiquitinación, la poli-(ADP)-ribosilación, la fosforilación y la acetilación, pero tampoco aquí se han obtenido evidencias claras entre estas modificaciones de las histonas y el estado funcional de la cromatina (Reeves, 1984).

De entre todas las modificaciones postsintéticas de las histonas, la acetilación es la que más ampliamente se ha estudiado, no sólo porque afecta a un mayor número de nucleosomas, sino también porque parece estar implicada en una gran diversidad de procesos metabólicos de la cromatina.

1.2 ACETILACION DE HISTONAS

1.2.1 ACETILACION "IN VIVO" E "IN VITRO" DE LAS HISTONAS

En las histonas pueden diferenciarse dos tipos de acetilación. El primero es la acetilación de los grupos α -amino de los residuos N-terminales de las histonas H1, H2A y H4 (Phillips, 1963). Esta acetilación es un proceso irreversible que ocurre en el citoplasma al mismo tiempo que la proteína está siendo sintetizada (Driessen *et al.*, 1985) y parece ser un mecanismo general implicado en la regulación del procesado y estabilidad de la proteína (Wold, 1984; Driessen *et al.*, 1985).

El segundo tipo de acetilación es un proceso reversible que afecta a los grupos ϵ -amino de lisinas de la región N-terminal de las cuatro histonas del "core" nucleosomal y no tiene lugar sobre la histona H1 (Allfrey, 1977). "In vivo", el nivel de acetilación de las histonas (en adelante nos referiremos sólo a la acetilación reversible sobre ϵ -amino de lisinas) está mantenido por las actividades histona acetiltransferasa (HAT), que utiliza el acetyl-CoA como dador de grupos acetilo, y la histona desacetilasa (HD), que revierte la modificación por rotura del enlace amida para liberar acetato (Allfrey, 1977; Allfrey *et al.*, 1984). Los sitios de acetilación siempre se encuentran entre los 25 aminoácidos de la región N-terminal, habiéndose localizado exactamente su posición (Allfrey, 1977; Doenecke y Galliwtz, 1982; Allfrey *et al.*, 1984). A pesar de que existen pequeñas diferencias en la estructura primaria de las histonas entre organismos como Tetrahymena o levadura y eucariotas superiores, las posicio-

nes de acetilación se encuentran conservadas (Isenberg, 1979; Wu et al., 1986).

Se ha demostrado que la acetilación de diferentes histonas e incluso las posiciones de acetilación en una misma molécula de histona son funcionalmente distintas, modificándose unas u otras, de una manera específica, dependiendo de la actividad que posea la cromatina, o una región de la cromatina, en ese momento (Waterborg y Matthews, 1983; Allis et al., 1985; Chicoine et al., 1986; Pesis y Matthews, 1986; Loidl y Gröbner, 1987b).

Pueden conseguirse histonas hiperacetiladas por incubación de células o núcleos en presencia de concentraciones milimolares de n-butilirato (Riggs et al., 1977). Esta hiperacetilación es debida a la inhibición de la histona desacetilasa por el butirato (Seale y Chalkley, 1978; Candido et al., 1978; Cousens et al., 1979) sin afectar a la actividad histona acetiltransferasa. La posibilidad de obtener cromatina o fracciones de la cromatina en estado hiperacetilado ha permitido el estudio de las implicaciones que tiene esta modificación sobre la estructura del nucleosoma, sobre estructuras de orden superior e incluso sobre el estado funcional de la cromatina (Nelson et al., 1978; Simpson, 1978b; Perry y Chalkley, 1981; Yau et al., 1982; Bertrand et al., 1984; Ausió y Van Holde, 1986; Hirose, 1988; Norton et al., 1989).

"In vitro", las histonas pueden acetilarse por tratamiento de la cromatina con anhídrido acético, que introduce grupos acetilo en residuos inespecíficos de lisina y tirosina de todas las histonas incluida la H1 (Tack y Simpson, 1979). Este método puede servir para determinar los residuos accesibles sobre la superficie de la cromatina (Tack y Simpson, 1979). También pueden acetilarse las histonas químicamente con acetil-CoA. En este caso, se introducen grupos acetilo preferentemente sobre lisinas de las histonas H1, H2A y H2B y en menor medida sobre H3 y H4. Esta acetilación depende del pH, fuerza iónica y del tipo de ión en el tampón de incubación (Paik et al., 1970).

1.2.2 EFECTO DE LA ACETILACION SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

A nivel molecular, la asociación entre la acetilación y su papel biológico normalmente se ha atribuido a un debilitamiento de las interacciones DNA-histonas, como consecuencia de la alteración en el número de cargas producida por esta modificación en la región N-terminal de las histonas (Allfrey, 1977; Doenecke y Gallwitz, 1982). Las consecuencias de este debilitamiento sobre la estructura del nucleosoma y estructuras de orden superior son todavía motivo de controversia. Numerosos autores han observado que la diferencia en los parámetros físicos entre partículas "core" y nucleosomas acetilados, por tratamiento de las células con n-buti-rato, y los controles con histonas hipoacetiladas es muy pequeña (Simpson, 1978b; Yau et al., 1982; Ausió y Van Holde, 1986; Hirose, 1988). Sin embargo, otros autores, mediante estudios por electroforesis en gel (Bode et al., 1980; Bode, 1984) y microscopía electrónica (Bertrand et al., 1984), han sugerido una estructura más abierta o extendida para las partículas "core" cuando sus histonas están hiperacetiladas, aunque los datos obtenidos del coeficiente de sedimentación (Ausió y Van Holde, 1986) y de dispersión de neutrones (Iman et al., 1986) no aportan ninguna evidencia de que la partícula "core" hiperacetilada tenga una estructura más relajada.

La eliminación de las regiones N-terminales de las histonas, mediante el tratamiento con tripsina, no impide la formación de una estructura nucleosomal (Whitlock y Stein, 1978) y por tanto, la eliminación de las cargas positivas de esa región N-terminal por acetilación tampoco debe provocar una desintegración del nucleosoma, ni impedir su formación (Mathis et al., 1978; Doenecke y Gallwitz, 1982). Algunos autores han sugerido que las regiones N-terminales están implicadas en las interacciones internucleosomales (McGhee et al., 1980) y en la estabilización de estructuras de orden superior (Allan et al., 1982), pues la eliminación por tripsina de estas regiones provoca la desorganización de la fibra de 30 nm (Allan et al., 1982). Así, la acetilación de la región N-terminal podría tener su efecto fuera de la misma partícula "core", modulando estructuras de orden superior de la cromatina, como la fibra de 30 nm. No obstante,

La acetilación inducida por tratamiento de células HeLa con butirato tiene un efecto muy pequeño sobre las transiciones desde el filamento de 10 nm a la fibra de 30 nm (McGhee et al., 1983).

En un reciente estudio, Norton et al. (1989), utilizando una molécula de DNA covalentemente cerrada, han determinado el efecto que tiene la acetilación de histonas sobre el índice de enlace por partícula nucleosomal. Estos autores han concluido que cuanto mayor es el nivel de acetilación de las histonas, el incremento en el índice de enlace por nucleosoma disminuye desde -1.04 ± 0.08 para el control hasta -0.82 ± 0.05 para los nucleosomas hiperacetilados. Estos mismos autores han propuesto que la acetilación de las histonas liberaría vueltas de superenrollamiento negativo, que previamente se encuentra sobre el nucleosoma, y la acetilación funcionaría así como una girasa eucariótica.

Aunque no se conocen las consecuencias de los posibles cambios estructurales producidos por la acetilación de histonas sobre el funcionamiento de la cromatina "in vivo", sí que se sabe que la delección de la región N-terminal de las histonas H2A, H2B y H4 causan una relajación de la cromatina "in vivo" (Wallis et al., 1983; Schuster et al., 1986; Kayne et al., 1988). Se ha sugerido que la acetilación de las regiones N-terminales tendría el mismo efecto en la relajación de la cromatina que la delección de dichas regiones, ya que en ambos casos hay una importante disminución en la carga neta de la histona (Kayne et al., 1988).

La utilización de nucleasas también ha ayudado al estudio de los cambios producidos por la acetilación de histonas. En este sentido, la cromatina hiperacetilada, por tratamiento de las células con butirato, es más sensible al ataque por DNasa I que la cromatina de las células control (Vidali et al., 1978; Simpson, 1978b; Nelson et al., 1978; Perry y Chalkley, 1981). Este resultado sugiere un estado más relajado para la cromatina que contiene histonas acetiladas y en parte explica la mayor susceptibilidad de los genes activos frente al ataque por la DNasa I, ya que de hecho, parece que las regiones transcripcionalmente activas de la cromatina poseen histonas acetiladas (Levy-Wilson et al., 1979; Johnson et al., 1987; Hebbes et al., 1988)

La cromatina con histonas hiperacetiladas también se solubiliza preferentemente después de la digestión con nucleasa de micrococo (Levy-Wilson et al., 1979; Sealy y Chalkley, 1978; Perry y Chalkley, 1981; Ferenz y Nelson, 1985). Perry y Chalkley (1981) han propuesto que la acetilación altera las interacciones internucleosomales y ello produciría una conformación de la cromatina más abierta y por tanto más accesible al ataque por nucleasas.

El conjunto de todos estos estudios sugiere que la presencia de histonas acetiladas parece ser una condición necesaria, pero no suficiente, para establecer una conformación activa en la cromatina.

1.2.3 FUNCION BIOLÓGICA DE LA ACETILACION DE HISTONAS

Desde el descubrimiento de la acetilación reversible de las histonas por Allfrey et al. (1964) ha habido innumerables grupos de investigación dedicados al estudio del papel biológico de esta modificación (revisado en Allfrey, 1977; Doenecke y Gallwitz, 1982; Reeves, 1984; Wu et al., 1986; Vidali et al., 1988).

Se han utilizado dos aproximaciones experimentales para elucidar este papel, obteniéndose resultados controvertidos. La primera de ellas ha sido correlacionar temporal o espacialmente la acetilación de histonas con funciones específicas de la cromatina, tales como la replicación, transcripción, etc, a lo largo del ciclo celular o de procesos de diferenciación celular. La segunda aproximación ha sido la acetilación de la cromatina químicamente o por incubación de núcleos o células con n-butirato y comparar las propiedades estructurales y funcionales de la cromatina modificada con las de la nativa.

En general se ha observado que células con una actividad transcripcional elevada poseen histonas con un alto grado de acetilación. Así, por ejemplo, Saccharomyces posee un elevado nivel de transcripción, ya que el 40 % de su DNA genómico es activo, y al mismo tiempo, presenta un elevado grado de acetilación en sus histonas (Davie et al., 1981). Del mismo modo, la inducción hormonal de las células a un estado de mayor actividad génica va precedido por un incremento en la acetila-

ción de las histonas (Libby, 1973; Csordas et al., 1986). Dentro de esta línea, en el protozoo Tetrahymena, se ha determinado un bajo nivel de acetilación en el micronúcleo, que es transcripcionalmente inerte, y un alto grado de acetilación de las histonas en el macronúcleo, responsable de la síntesis de RNA en las células vegetativas (Vavra et al., 1982).

En otro tipo de estudios se ha determinado la presencia de histonas acetiladas en regiones de la cromatina transcripcionalmente activa. Davie y Candido (1978), mediante digestión suave de núcleos de testículo de trucha y posterior fraccionamiento de la cromatina por solubilidad en presencia de iones Mg^{2+} , encontraron histonas altamente acetiladas asociadas a fragmentos de cromatina enriquecidos en secuencias transcribibles. Han sido muchos los autores que por diversos procedimientos han observado formas acetiladas de las histonas en regiones activas de la cromatina (Levy-Wilson et al., 1979; Nelson et al., 1978; Levy-Wilson y Dixon, 1979) y recientemente Hebbes et al. (1988) utilizando anticuerpos específicos frente a histonas acetiladas han demostrado, de una manera directa, la asociación de las histonas así modificadas y la cromatina transcripcionalmente activa. De la misma forma, la hipoacetilación de las histonas se ha relacionado en muchos casos con la cromatina transcripcionalmente inactiva. Así, la cromatina del DNA satélite, obtenida mediante la digestión con endonucleasas de restricción, no posee prácticamente histonas acetiladas (Pasher et al., 1983).

Sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en correlacionar la acetilación de histonas con la actividad transcripcional, ya que en algunos casos se ha observado la misma tasa de acetilación en células genéticamente activas e inactivas (Oliva y Mezquita, 1982; Giacontti et al., 1984; Yukioka et al., 1983). Esta aparente contradicción podría ser consecuencia de que la acetilación de las histonas no es el único factor que provoca la activación génica y del hecho, como se verá más adelante, de que la acetilación está implicada en diversas funciones de la cromatina además de la transcripción.

Algunos autores han descrito un aumento en la capacidad de síntesis de RNA dependiente de DNA "in vitro" en cromatina hiperacetilada, por tratamiento con n-butilato, utilizando RNA polimerasa procariota

o endógena (Doenecke y Gallwitz, 1982), así como en cromatina acetilada químicamente con anhídrido acético (Marushige, 1976; Oberhauser et al., 1978). Sin embargo, Loidl et al. (1984), estudiando el efecto del n-butilato sobre la actividad RNA polimerasa endógena de Physarum no han observado ninguna diferencia en la capacidad de transcripción "in vitro" entre cromatina nativa y cromatina hiperacetilada por butirato. Resultados similares obtuvieron Mathis et al. (1978) con minicromosomas reconstituidos del SV40.

Otra de las funciones biológicas de la acetilación de las histonas está relacionada con la deposición de las mismas y su ensamblaje en nucleosomas durante la replicación del DNA. Sólo las histonas H3 y H4 parece que se acetilan en el citoplasma antes de su ensamblaje en la cromatina (Ruiz-Carrillo et al., 1975; Jackson et al., 1976). Esto se ha estudiado muy bien en el micronúcleo de Tetrahymena que posee una elevada tasa de replicación y una casi nula actividad transcripcional. En este organismo se ha demostrado que la histona H4 se deposita en forma diacetilada (Allis et al., 1985), estando modificada en las posiciones 4 y 11 (Chicoine et al., 1986). La histona H3 lo hace en forma monoacetilada, en la posición 9 ó 14 (Chicoine et al., 1986), mientras que las histonas H2A y H2B se ensamblan en forma no acetilada (Allis et al., 1985). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Chambers y Shaw (1984), que observaron una correlación entre la forma diacetilada de la H4 y la duplicación cromosómica durante el desarrollo embrionario del erizo de mar. Sin embargo, Waterborg y Matthews (1983 y 1984) han observado en Physarum, durante la fase S, un patrón de acetilación distinto. Estos autores sugieren que las cuatro histonas de "core" se acetilan antes de ensamblarse en nucleosomas. La acetilación previa de las histonas debe ser un prerrequisito para su ensamblaje en la cromatina, y en este sentido, se ha observado "in vitro" que las histonas hiperacetiladas se ensamblan en nucleosomas con mayor eficiencia que las histonas sin acetilar (Cotten y Chalkley, 1985). Tras el ensamblaje, la desacetilación de esas posiciones específicas sería necesaria para la maduración de la cromatina recién replicada (Annunziato y Seale, 1983).

También se ha estudiado la acetilación de histonas en procesos de diferenciación celular. Durante la espermatogénesis en trucha (Christensen y Dixon, 1982; Christensen et al., 1984) y en rata (Grimes y Henderson, 1983) se ha observado un incremento importante en el grado de acetilación de las histonas, que se mantiene hasta que éstas son sustituidas por protaminas o proteínas básicas tipo protaminas. Sung y Dixon (1970) propusieron que esta acetilación podría intervenir directamente en el proceso de reemplazamiento de las histonas por protaminas.

Los resultados obtenidos al estudiar la acetilación de histonas a lo largo del ciclo celular tienen particular importancia ya que correlacionan directamente esta modificación con procesos concretos que tienen lugar en la cromatina. El mixomiceto Physarum polycephalum es especialmente adecuado para este tipo de investigaciones ya que posee una perfecta sincronía natural a lo largo de su ciclo celular. Así, Waterborg y Matthews (1983 y 1984), trabajando con este organismo, han confirmado la correlación entre la acetilación de histonas y la transcripción y replicación. También han observado que el patrón de acetilación asociado con cada uno de estos procesos es diferente. Así, encuentran que durante la replicación (fase S) las cuatro histonas de "core" son acetiladas, mientras que en fase G2 el patrón de acetilación asociado con la transcripción afecta sólo a las histonas H3 y H4. Sin embargo, los resultados obtenidos por Loidl y Gröbner (1987 a y b), también en Physarum, son bastante diferentes. Estos autores han estudiado tanto el patrón de síntesis como el de acetilación de las histonas y han encontrado un máximo de acetilación (sobre todas las histonas del "core") en fase S temprana, precediendo a un máximo en la síntesis de histonas en fase S, lo que significa que la acetilación afecta a las histonas preexistentes. Sin embargo, en fase G2 observan incorporación de acetato sólo en H2A y H2B (en G2 sólo observan síntesis de estas dos histonas). En el mismo trabajo, mediante ensayos de competición por protaminas, han mostrado que las histonas de la cromatina en fase S (donde las histonas están altamente acetiladas) se liberan de la cromatina a una concentración de protamina más baja que de la cromatina poco acetilada de la fase G2.

Loidl y Gröbner, con estos resultados, han propuesto un modelo según el cual se atribuye una función general a la acetilación de histonas. Esta modificación estaría implicada en el desplazamiento de las histonas de los nucleosomas y su posterior reemplazamiento por moléculas nuevamente sintetizadas (Loidl y Gröbner, 1987 b; Loidl, 1988). Este mecanismo operaría durante la replicación del DNA (afectando a las cuatro histonas de "core"), durante la transcripción (afectando sólo a H2A y H2B) y también durante otros procesos de reorganización de la cromatina, como la espermatogénesis u otros procesos de diferenciación en los que las histonas fuesen sustituidas por sus variantes u otras proteínas. Este modelo supone que la acetilación es una señal altamente específica que afecta a determinados tipos de histonas, en sitios específicos, dependiendo del proceso en el que intervengan: replicación, transcripción, etc. (Loidl, 1988).

1.3 ENZIMAS IMPLICADOS EN LA ACETILACION POSTRADUCCIONAL DE LAS HISTONAS

1.3.1 HISTONA ACETILTRANSFERASA

La primera actividad enzimática con capacidad para transferir grupos acetilo desde el acetil-CoA a histonas fue aislada de hígado de paloma (Nohara et al., 1966). Posteriormente, esta actividad se ha descrito en otros muchos organismos: mamíferos (Allfrey, 1977; Doenecke y Gallwitz, 1982); insectos como Drosophila melanogaster (Wiegand y Bruntlag, 1981); en testículo de trucha (Candido, 1985); en el crustáceo Artemia salina (Cano y Pestaña, 1976); en el protozoo Tetrahymena (Chicoine et al., 1987; Richman et al., 1988); en eucariotas inferiores como la levadura (Travis et al., 1984; López-Rodas et al., 1985) y en plantas (Salvador et al., 1985).

En la mayoría de estos sistemas biológicos se han diferenciado dos tipos distintos de histona acetiltransferasa (HAT) basándose en criterios de especificidad frente a las histonas y de localización subcelular, designados como HAT A y HAT B (Doenecke y Gallwitz, 1982). La HAT A es un enzima nuclear unido a cromatina, que acetila "in vitro" las cinco histonas libres, incluida la H1 que no se acetila "in vivo", y puede

aceptar como sustrato nucleosomas (Belikoff et al., 1980; Garcea y Alberts, 1980; Kelner y McCarty, 1984). La HAT B es un enzima encontrado fundamentalmente en el citoplasma que acetila específicamente la histona H4 y no es activo frente a histonas formando nucleosomas (Garcea y Alberts, 1980; Wiegand y Brutlag, 1981; Richman et al., 1988). Las formas A y B de la HAT pueden distinguirse también por su comportamiento cromatográfico, masas moleculares y sensibilidad frente a inhibidores (Sures y Gallwitz, 1980; Doenecke y Gallwitz, 1982). Dadas las características de estos dos tipos de HAT se ha sugerido que la HAT A estaría implicada en la acetilación de las histonas relacionada con la transcripción (Garcea y Alberts, 1980; Wiktorowicz y Bonner, 1982), mientras que la HAT B lo estaría en la acetilación previa al ensamblaje de las histonas en nucleosomas (Wiegand y Brutlag, 1981; Garcea y Alberts, 1980; Richman et al., 1988).

Hay evidencias de la existencia de otras formas de HAT, como por ejemplo la actividad denominada por Böhm et al. (1980) HAT DB (del inglés "DNA Binding") encontrada por estos autores en núcleos de linfocitos de bovinos. La HAT DB, a diferencia que la HAT A, tiene capacidad para unirse al DNA y acetila sólo a las cuatro histonas de "core" (no a la H1), tanto libres como formando nucleosomas. En general, parece que los sistemas biológicos poseen una complejidad mayor que la presencia de sólo dos tipos de isoenzimas HAT (A y B, nuclear y citoplasmático). Así, en hígado de rata se han descrito dos actividades nucleares que difieren en comportamiento cromatográfico y especificidad (Libby, 1980). En Artemia salina, por otro lado, se han descrito dos formas HAT citoplasmáticas, una de ellas con actividad exclusiva hacia la H4 y la otra con capacidad para modificar H4, H3 y también H1 (Estepa y Pestaña, 1983). Yukioka et al. (1984) han encontrado en hígado de rata dos HAT nucleares y otras dos citoplasmáticas.

Es de señalar que el proceso de extracción y purificación utilizado puede afectar al número y propiedades de las actividades HAT obtenidas. En este sentido, diversos autores, utilizando procesos de extracción y purificación distintos, han encontrado en un mismo material biológico actividades enzimáticas HAT con propiedades y especificidades diferentes. Estas discrepancias pueden ser debidas a que algunas activi-

dades isoenzimáticas HAT pueden ser inactivadas durante alguna de las etapas de extracción y purificación (Garcea y Alberts, 1980; Wiktorowicz y Bonner, 1982; Wiegand y Brutlag, 1981).

En definitiva, parece que existe un complejo juego de histona acetiltransferasas en la célula eucariótica y esto podría ser consecuencia de que la acetilación de las histonas por determinados isoenzimas podría estar implicada en funciones específicas en la cromatina. En contraposición a esta idea, Chicoine *et al.* (1987) han determinado en el macronúcleo de Tetrahymena una única HAT que cataliza la acetilación de histonas libres previa al ensamblaje y la acetilación de histonas en nucleosomas relacionada con la transcripción. Este enzima, además, acetila en distintas posiciones a la histona H4 según la función que vaya a desempeñar (posiciones 4 y 11 en la acetilación previa al ensamblaje de la cromatina y 7 y 4 en la acetilación relacionada con la transcripción).

1.3.2 HISTONA DESACETILASA

El proceso dinámico de la acetilación de histonas también depende de la histona desacetilasa (HD) la cual cataliza la liberación de los grupos acetilo desde los ϵ -amino de lisinas de las histonas. La HD se detectó por primera vez en timo de ternera (Inoue y Fujimoto, 1969) y desde entonces se ha estudiado en muchos otros tejidos animales (Libby, 1970; Vidali *et al.*, 1972; Hay y Candido, 1983a; Mold y McCarty, 1987), en hongos (Waterborg y Matthews, 1982a; Alonso y Nelson, 1986) y en plantas (Rodrigo, 1987). Desde el principio ya se observó que la HD tiene preferencia por la desacetilación de las histonas acetiladas biológicamente frente a las acetiladas químicamente con anhídrido acético (Inoue y Fujimoto, 1969; 1970), aunque en algunos casos el péptido 1-24 de la histona H4 acetilado químicamente ha resultado ser un buen sustrato (Waterborg y Matthews, 1982b; Mold y McCarty, 1987).

En timo de ternera parecen existir al menos dos desacetilasas distintas, separables por cromatografía de intercambio iónico, aunque no parecen tener propiedades diferenciales muy acusadas (Kikuchi y Fujimoto, 1973; Cousens *et al.*, 1979). En este mismo material biológico, Vidali *et al.* (1972) extrajeron y purificaron una HD con gran afinidad por la

cromatina que desacetila específicamente las histonas H3 y H4. Por otro lado, en Pisum sativum, en nuestro laboratorio, se han obtenido dos HD, también separables por procedimientos cromatográficos, que desacetilan preferentemente a las histonas H2A y H2B y en menor medida a las H3 y H4 (Rodrigo, 1987). En levadura, Alonso y Nelson (1986) han detectado una actividad HD que desacetila a las cuatro histonas de "core" con igual eficacia.

La HD se ha encontrado en el núcleo tanto en forma libre como asociada a cromatina. En células HeLa el enzima parece hallarse asociado a polinucleosomas, formando complejos de elevada masa molecular junto con proteínas no histonas, probablemente constituyendo parte de la matriz nuclear. Este complejo es estable incluso a concentraciones de NaCl 2 M y es activo frente a oligonucleosomas, siendo las histonas libres un mal sustrato (Hay y Candido, 1983a). Este complejo no se disocia del sustrato durante la reacción, lo que sugiere que el enzima puede actuar de un modo procesivo (Hay y Candido, 1983b). También se ha descrito una HD asociada a cromatina en células de ovario de hámster, unida a un tipo concreto de mononucleosomas después de la digestión con nucleasa de micrococo (Mold y McCarty, 1987). Se ha sugerido que esta clase de mononucleosomas debe contener el DNA que sirve como sitio de unión a la matriz (Mold y McCarty, 1987). No se sabe si "in vivo" la desacetilasa se encuentra sólo formando complejos en la cromatina y si estos complejos constituyen el modo general en el que se presentan las histona desacetilasas en los eucariotas, siendo entonces las formas solubles, con capacidad para utilizar histonas libres como sustrato, un artefacto producido por el aislamiento del enzima. Sin embargo, los resultados de Alonso y Nelson (1986) en levadura muestran claramente una forma nativa soluble de la HD. Así, es posible que la HD se encuentre formando complejos en algunos organismo y en forma libre en otros o incluso que existan las dos formas (libre y en complejos) en un mismo organismo.

Reeves y Candido (1980) han sugerido que las proteínas HMG 14 y 17 inhiben a la HD, reforzando con ello la idea de la asociación de estas HMG con cromatina activa y del alto nivel de acetilación de esta cromatina activa. Sin embargo, Mezquita et al. (1982), en un sistema bio-

lógico diferente, no han encontrado inhibición de la HD por HMG 17 y han observado una activación por ubiquitina en ensayos "in vitro", aunque se desconoce sus implicaciones "in vivo".

Particular interés tiene la inhibición ("in vivo" e "in vitro") de la HD por ácidos grasos de cadena corta como el butirato (Sealy y Chalkley, 1978; Candido *et al.*, 1978; Cousens *et al.*, 1979). Esta inhibición, que es de tipo no competitivo (Cousens *et al.*, 1979), no parece ser un fenómeno general que afecte a las desacetilasas de todos los eucariotas. Así, la HD de levadura (Alonso y Nelson, 1986), la HD de *Physarum* (Waterborg y Matthews, 1982b) y las desacetilasas de *Pisum sativum*, "in vitro", (Rodrigo, 1987) se ven muy poco afectadas por este inhibidor.

1.4 ACETILACION DE HISTONAS EN VEGETALES

Las histonas H1, H2A y H2B de plantas difieren de las de animales teniendo incluso una masa molecular mayor. Esto no impide que la estructura básica y de orden superior de la cromatina de plantas sea similar a la de los animales (revisado en Spiker, 1985). Del mismo modo, la cromatina activa de plantas y animales posee una conformación semejante, deducido por la idéntica susceptibilidad de los genes activos a la DNasa I, así como por la presencia también en plantas de sitios hipersensibles en estos genes (revisado en Spiker, 1988a; Kahl *et al.*, 1988). Por tanto, cabe esperar que la cromatina vegetal sufra alteraciones en su estructura, implicadas en la expresión génica, iguales a las que tienen lugar en animales (u otros eucariotas). En este sentido, en plantas también se han descrito proteínas que, al menos por criterios operacionales, pueden clasificarse como HMG (Spiker, 1988a), y variantes de histonas, pudiéndose establecer en algunos casos correlaciones entre éstas y el estado funcional de la cromatina (Spiker, 1988a). En cuanto a las modificaciones de histonas se han estudiado muy poco en las plantas, siendo la acetilación de la que más información existe.

La acetilación de las histonas en vegetales la describió por primera vez Delange *et al.* (1969) al secuenciar la histona H4 de guisante, pero el nivel de acetilación hallado es mucho más bajo que el descrito para

animales, afectando sólo al 6 % de las moléculas mientras que, por ejemplo, en H4 de timo de ternera afecta al 50%.

Recientemente, Waterborg et al. (1987), mediante técnicas electroforéticas, han descrito un elevado nivel de acetilación sobre las histonas H3 y H4 en plantas de alfalfa. Se desconoce la razón de esta hiperacetilación natural en este vegetal.

Arfmann y Haase (1981), en cultivos de Nicotiana tabacum, han descrito que el butirato provoca la acumulación de H4 en forma acetilada, aunque el nivel de acetilación alcanzado es muchísimo más bajo que el inducido en animales por el mismo tratamiento. Por otro lado, las actividades HD descritas en Pisum sativum se inhiben muy poco por butirato en ensayos "in vitro" (Rodrigo, 1987). No se sabe si "in vivo" el efecto del butirato puede ser mayor, explicando con ello la acetilación observada en tabaco. De cualquier modo, el efecto de este inhibidor sobre la acetilación de histonas en vegetales, es diferente al que tiene lugar en animales.

Finalmente, en plántulas de guisante se ha descrito una actividad histona acetiltransferasa con especificidad exclusiva por H4, lo cual ha sugerido que este enzima está implicado en la acetilación previa de la histona H4 relacionada con el ensamblaje de la cromatina (Salvador et al., 1985).

1.5 OBJETIVO DEL TRABAJO

Aunque en los últimos años ha habido un gran avance en el estudio de la acetilación de las histonas y de los procesos en los que esta modificación está implicada, su función biológica y el mecanismo por el que la desempeña no están aún aclarados. La mayor parte de los estudios sobre esta modificación de las histonas se ha llevado a cabo en animales y eucariotas inferiores y se conoce muy poco en especies vegetales.

Muchos autores apuntan que un paso necesario hacia el entendimiento del papel biológico de la acetilación de histonas es el análisis de los enzimas responsables de esta modificación (histona acetiltransferasas e histona desacetilasas). En este trabajo se pretende la puesta a punto de procedimientos de extracción y la purificación y caracterización de las HAT e HD de una especie vegetal, Pisum sativum. Asimismo, se pretende determinar las similitudes y diferencias de estos sistemas enzimáticos con los correspondientes, ya descritos, en otros eucariotas, contribuyendo con ello a un mejor conocimiento de esta modificación y de sus implicaciones en la estructura y función de la cromatina.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Como material biológico se han utilizado embriones o plántulas de guisante (Pisum sativum, L., var. Lincoln), germinados en oscuridad a 28°C. Las semillas se esterilizaron por inmersión en etanol 96% durante 30 segundos y posterior tratamiento con lejía comercial diluída al 12.5% durante 20 minutos. Después de la imbibición de las semillas en agua destilada durante 20-24 horas a 4°C (Ull y Franco, 1986), se sembraron sobre algodón hidrófilo para la obtención de ejes embriónico o sobre vermiculita homogéneamente humedecida para la obtención de plántulas. Los embriones obtenidos, de distintos tiempos de germinación, se utilizaron para la extracción de actividades enzimáticas y las plántulas de 6-8 días se utilizaron para la obtención de histonas. En ambos casos, se separaron los cotiledones manualmente y se desecharon.

2.2 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION ENZIMATICA

En este trabajo se han utilizado y contrastado cuatro procedimientos de extracción de enzimas. Los tres primeros suponen el homogeneizado previo de los embriones en mortero, junto con arena de playa lavada [arena (PANREAC):embriones,1:1] y un tampón de distinta composición según el método. El cuarto consiste en la purificación previa de cromatina y la posterior extracción de los enzimas asociados a esa cromatina.

2.2.1 EXTRACCION ENZIMATICA POR PRECIPITACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Este procedimiento es similar al descrito por Salvador et al. (1985) con algunas modificaciones.

Los embriones se homogeneizaron en tampón A (MgCl_2 1 mM, EDTA 0.25 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, NaHSO_3 50 mM, Tris-HCl 75 mM, pH 7.9), 1 ml/g de embrión. El homogeneizado se filtró a través de dos capas de muselina y la arena y los restos vegetales retenidos se lavaron tres veces con un volumen de tampón A. Los filtrados se reunieron y se sonicaron, en baño de hielo, 4 períodos de 30s a 125 W, en un sonicador Braun Labsonic 2000 y se centrifugaron 10 min a 1200xg. Al sobrenadante se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido para obtener una saturación del 25%, deján-

dose en agitación 30 min a 4°C. Las proteínas se precipitaron añadiendo sulfato amónico hasta alcanzar el 90% de saturación. La mezcla se mantuvo en agitación 2h a 4°C y el precipitado se recogió por centrifugación a 30000xg, 30 min, redisolviéndose en tampón B (EDTA 0.25 mM, NH₄Cl 10 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, glicerol 10%, Tris-HCl 15 mM, pH 7.9). La disolución se dializó tres veces frente a 2 litros de tampón B y el dializado se clarificó por centrifugación (30000xg, 30 min). El sobrenadante constituyó el extracto enzimático crudo.

2.2.2 EXTRACCION POR PRECIPITACION CON POLIETILENGLICOL

El polietilenglicol (PEG) es un agente precipitante de proteínas selectivo y algunos autores lo han utilizado para la obtención de actividades HAT (Belikoff *et al.*, 1980; Garcea y Alberts, 1980). Para la extracción de actividades HAT de guisante, el homogeneizado y filtrado obtenido del mismo modo que en el apartado 2.2.1, se llevó al 20% (p/v) en PEG (masa molecular aproximada 8000, SIGMA) dejándose en agitación magnética 45 min a 4°C. La mezcla se centrifugó a 35000xg, 30 min y el sedimento de proteínas se redisolvió y dializó en tampón B como se ha indicado en el apartado anterior.

2.2.3 EXTRACCION POR ULTRACENTRIFUGACION EN PRESENCIA DE NH₄Cl 0.5 M

La homogeneización y filtración se realizó como se describe en el apartado 2.2.1 utilizando un tampón distinto, tampón B' (NH₄Cl 0.5 M, EDTA 0.25 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, Tris-HCl 30 mM, pH 7.9). Los filtrados se mantuvieron en agitación durante 30 min en hielo y se centrifugaron a 27000xg durante 15 min. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100000xg durante una hora (BECKMAN, L8-55), eliminándose la capa flotante de lípidos por succión a vacío. El sobrenadante se dializó frente a tampón B en las mismas condiciones descritas en el apartado 2.2.1.

2.2.4 EXTRACCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE CROMATINA

El procedimiento de extracción y purificación de la cromatina de embriones de guisante fue esencialmente igual al descrito por Spiker et al. (1983, método II). Los embriones se homogeneizaron con agitador de cuchillas (OSTERIZER, modelo 890-48) a la máxima velocidad durante 1 min en presencia de tampón de homogeneización (sacarosa 0.25 M, MgCl₂ 5 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, PVP 2 g/l, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0), 5 ml de tampón/g de embrión. El homogeneizado se filtró por muselina y filtros de nylon de 200 y 100 µm y el filtrado se centrifugó a 12000xg, 10 min. El sedimento se lavó dos veces con tampón de lavado (tampón de homogeneización, 0.5% en Tritón X-100). El sedimento final se resuspendió en este tampón 1.7 M en sacarosa y se depositó cuidadosamente sobre un volumen igual del mismo medio en tubos adecuados para la centrifugación a 27000xg durante 60 min. El sedimento así obtenido constituyó la cromatina purificada.

Esta cromatina resuspendida en tampón B se utilizó para el ensayo de las actividades HAT e HD directamente. Los enzimas asociados a la cromatina se disociaron por tratamiento con tampón B', ultracentrifugación y diálisis como se describe en el apartado 2.2.3. El dializado final constituyó el extracto enzimático crudo de cromatina.

2.3 PURIFICACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Los métodos de purificación que se detallan a continuación se utilizaron tanto para las actividades HAT como para las HD.

2.3.1 CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHAROSA

Esta cromatografía constituyó el primer paso en la separación y purificación de las actividades enzimáticas.

Los extractos enzimáticos crudos obtenidos como se describe en el apartado 2.2 se aplicaron sobre columnas de DEAE-Sepharosa CL-6B (PHARMACIA) equilibradas en tampón B. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes del mismo tampón y las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente lineal de NH₄Cl, 10-350 mM, en tampón B. Las dimensiones de

las columnas y condiciones de elución fueron variables en función del material de partida. Por ejemplo, para 70 g de embriones de 62h, se utilizó una columna de 17 cm x 3 cm, eluyendo a un flujo de 70 ml/h, con un gradiente de 1200 ml y recogiendo fracciones de 12 ml. De cualquier modo, la mejor resolución se obtuvo con gradientes de tamaño igual a 10 volúmenes de la columna, a un flujo de 0.5 volúmenes de columna por hora.

Las fracciones obtenidas en esta cromatografía se ensayaron para HAT o HD como se describe en el apartado 2.6, después de medir la A_{280} .

2.3.2 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR EN ULTROGEL AcA34

Las fracciones con actividad enzimática obtenidas de la cromatografía de DEAE-Sepharosa se reunieron y las proteínas se concentraron en una célula de ultrafiltración con membrana de 30000 MWCo (Nucleopore Cell, AMICON), a presión de N_2 de 3.5 Kg/cm^2 . Los concentrados se aplicaron a una columna (120 cm x 1.8 cm) de Ultrogel AcA 34 (LKB), equilibrada en tampón B 35 mM en NH_4Cl . La elución se realizó con el mismo tampón a un flujo de 12 ml/h y se recogieron fracciones de 3.7 ml. Se midió la A_{280} de las fracciones y la actividad HAT o HD como se describe en el apartado 2.6.

Para determinar la masa molecular aproximada de las actividades HAT e HD se calibró la columna con los siguientes marcadores: azul dextrano (Mr 2000000); catalasa de hígado de vaca (Mr 240000); aldolasa de músculo de rata (Mr 158000); invertasa de levadura (Mr 120000); ovoalbúmina (Mr 45000); lisozima (Mr 14000) y el colorante rodamina (Mr 600).

Los picos de actividad enzimática obtenidos en la elución de Ultrogel se utilizaron directamente para la caracterización de los enzimas o se sometieron a posterior purificación por alguno de los procedimientos que se describen a continuación.

2.3.3 OTROS PROCEDIMIENTOS DE PURIFICACION

2.3.3.1 CROMATOGRAFIA EN DNA-CELULOSA

Las actividades HAT o HD obtenidas por los procedimientos de purificación anteriores se aplicaron a una columna (6 cm x 1 cm) de DNA-celulosa de doble cadena (SIGMA), equilibrada en tampón B 35 mM NH_4Cl . Después de lavar la columna con 5 volúmenes del mismo tampón, las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente lineal de NH_4Cl 35-500 mM en tampón B (80 ml) y las fracciones (1 ml) se ensayaron como se indica en el apartado 2.6.

2.3.3.2 CROMATOGRAFIA EN HISTONA-AGAROSA

Las fracciones correspondientes a las actividades HAT o HD purificadas previamente como se ha descrito, se dializaron frente a tampón B y se aplicaron directamente en una columna de histona-agarosa (5 ml de gel, SIGMA), equilibrada en tampón B. Después de lavar dicha columna con el mismo tampón, las proteínas se eluyeron con un gradiente de NH_4Cl 0.01-1 M en el mismo medio (80 ml totales). Se recogieron fracciones de 2.5 ml que se dializaron frente a tampón B 100 mM en NH_4Cl antes de ensayarlas para HAT o frente a tampón 200 mM en NH_4Cl para HD (apartado 2.6).

2.3.3.3 PRECIPITACION FRACCIONADA CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Con objeto de obtener un grado mayor de purificación de las actividades enzimáticas y en algunos casos concentrarlas, se utilizó la precipitación fraccionada con sulfato amónico. Para ello, las fracciones con actividad, obtenidas de la cromatografía en Ultrogel, se reunieron y se llevaron al 25% de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Después de 1h a 4°C con agitación magnética, las proteínas precipitadas se recogieron por centrifugación a 30000xg, 30 min. Se repitió la misma operación llevando el sobrenadante sucesivamente al 50, 75 y 100% de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Los precipitados de proteínas se disolvieron en tampón B 100 mM NH_4Cl (actividades HAT) o en el mismo tampón 200 mM (para HD) y se ensayaron como se indica más adelante (apartado 2.6).

2.4 OBTENCION DE SUSTRATOS DE HISTONA ACETILTRANSFERASA

Como sustratos de HAT se han utilizado histonas de eritrocito de pollo e histonas libres y oligonucleosomas de plántula de guisante. En todos los casos la pureza de las preparaciones de histonas fue comprobada mediante electroforesis (apartado 2.7.1.).

2.4.1 HISTONAS DE ERITROCITO DE POLLO

Los núcleos de eritrocito de pollo se obtuvieron como han descrito Weintraub *et al.*, (1975) y las histonas se extrajeron de estos núcleos con HCl 0.25 M. Las histonas se recuperaron de la disolución clarificada por precipitación, al añadir 8 volúmenes de acetona en frío. El precipitado de histonas se lavó tres veces con acetona y se secó finalmente a vacío.

Para la obtención de las histonas de "core", se extrajeron previamente la H1 y H5 con ácido perclórico 5% (v/v). Los núcleos se re-suspendieron en 3 volúmenes de ácido perclórico al 5%, se sometieron a agitación durante 15 min y se centrifugaron a 9000xg, 10 min, quedando las histonas H1 y H5 en el sobrenadante. Las histonas de "core" se extrajeron del sedimento, después de lavarlo una vez más con ácido perclórico 5%, del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

2.4.2 HISTONAS DE GUISANTE

Las histonas de guisante se obtuvieron a partir de núcleos de plántulas obtenidos como han descrito Ull y Franco (1986) mediante extracción con HCl 0.25 M.

Alternativamente se ha obtenido histonas a partir de cromatina de plántulas de guisante, purificada como se ha descrito en el apartado 2.2.4, por extracción con H₂SO₄ 0.2 M. Este segundo procedimiento, además de resultar más rápido y sencillo, produce un mayor rendimiento en la obtención de las histonas, siendo éstas de igual calidad a las extraídas a partir de núcleos, como se comprobó mediante electroforesis.

2.4.3 OLIGONUCLEOSOMAS DE GUISANTE

Para la obtención de oligonucleosomas se digirieron núcleos de plántula como han descrito Ull y Franco (1986). Los núcleos se resuspendieron en tampón de digestión (sacarosa 0.2 M, CaCl₂ 8 mM, NaCl 60 mM, MES 4 mM, pH 7.0) a una concentración de 1·10⁸ núcleos/ml. La digestión se realizó con nucleasa de micrococo a razón de 150 unidades por ml durante 30 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo EDTA 100 mM para llevar la mezcla a una concentración final de 10 mM. Después de 10 min en baño de hielo, los núcleos se lisaron por diálisis frente a EDTA 0.25 mM, pH 7.0 (Simpson, 1978a) y la suspensión se centrifugó a 12000xg, 20 min. El sobrenadante, conteniendo oligonucleosomas nativos en disolución (\approx 1.5 mg DNA/ml, determinado por A₂₆₀), se utilizó directamente como sustrato de HAT. El análisis del DNA se realizó a partir de alícuotas (0.2 ml) de la disolución de oligonucleosomas, como describen Estruch et al. (1986). El resto de la disolución se guardó en alícuotas de 1 ml a -20°C hasta su utilización. La Figura 1 muestra el análisis del DNA de una digestión de núcleos típica para la obtención de oligonucleosomas como sustrato de HAT.

2.5 OBTENCION DE SUSTRATOS DE HISTONA DESACETILASA

Para el ensayo de actividad HD de han utilizado sustratos acetilados biológicamente, las histonas de eritrocito de pollo (libres o formando nucleosomas), y sustratos acetilados químicamente con [³H]-anhídrido acético: histonas de guisante y de eritrocito de pollo, BSA, poliaminas y lisina.

Se intentó también acetilar histonas de guisante por incubación de núcleos o cromatina con acetil-CoA o acetato marcados, pero no se obtuvo marca incorporada a proteínas. Tampoco se obtuvo histonas radiactivas después de la incubación de protoplastos del mesófilo con [³H]-acetato sódico bajo diversas condiciones. Esta imposibilidad de obtener histonas de guisante marcadas biológicamente, seguramente está relacionada con el bajo nivel de acetilación de las histonas "in vivo" y con la dificultad de inhibir específicamente la actividad histona desacetilasa (ver Resultados y Discusión).

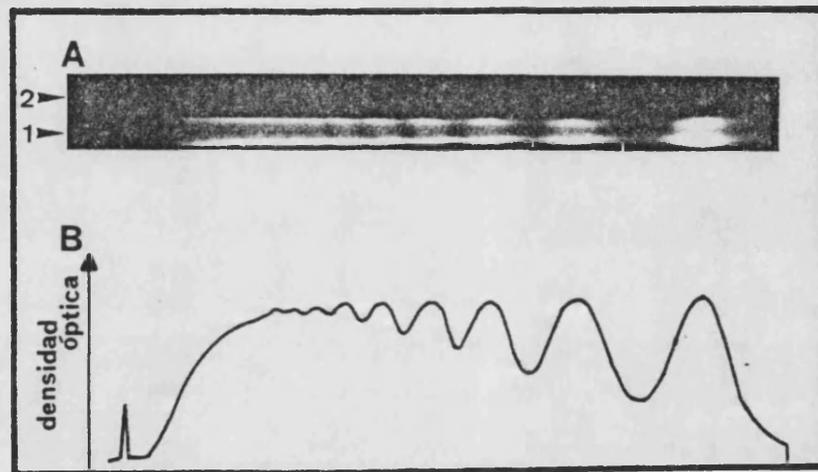


FIGURA 1. Análisis del DNA de los oligonucleosomas utilizados como sustrato de las HAT. A) electroforesis en agarosa 1.8%; carrera 1, DNA extraído de la disolución de oligonucleosomas; carrera 2, patrón de pBR322 digerido con HpaII. B) densitometrado de la carrera 1 donde se puede ver que la mayoría del DNA se encuentra formando parte de oligonucleosomas de tamaño no superior a 8 unidades.

2.5.1 MARCAJE DE HISTONAS DE ERITROCITO DE POLLO CON [³H]-ACETATO SODICO

Para obtener histonas de eritrocito de pollo marcadas biológicamente se utilizaron pollos de la raza Leghorm-White Rock (PAVIMAR, S.A.) a los que se les indujo una anemia por tratamiento con fenilhidrazina según describen Ferenz y Nelson (1985).

Se incubaron preparaciones de células rojas de estos pollos, enriquecidas en reticulocitos, con [³H]-acetato sódico (5 Ci/mmol, AMERSHAM) en presencia de butirato sódico como describen Alonso y Nelson (1986). Las histonas marcadas se extrajeron igual que en el apartado 2.4.1, excepto que todos los tampones contenían butirato sódico 10 mM, para evitar la desacetilación. La actividad específica obtenida en las histonas de eritrocito por este procedimiento fue de 2200 dpm/ μ g y la radiactividad se incorporó exclusivamente en las histonas de "core", como se determinó por electroforesis y fluorografía (ver apartado 3.3 de Resultados y Discusión).

Para obtener oligonucleosomas acetilados radiactivamente, se resuspendieron núcleos de eritrocito marcados en tampón, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, a una concentración de $1.25 \cdot 10^9$ núcleos/ml y se incubaron con 300 unidades/ml de nucleasa de micrococo a 37°C durante 30 min. La reacción se paró llevando la suspensión a 10 mM en EDTA en baño de hielo. Los núcleos digeridos se recogieron por centrifugación (1000xg, 10 min) y se lisaron con EDTA 0.25 mM pH 7.0. El lisado se dializó frente a EDTA 0.25 mM y la disolución resultante, conteniendo oligonucleosomas marcados a una concentración de 3.75 mg/ml en DNA (determinado por A₂₆₀), se utilizó, sin posterior purificación, como sustrato de la HD. Por extracción del DNA y posterior electroforesis y densitometrado, como se indica en el apartado 2.4.3, se determinó que el 75% del DNA formaba parte de oligonucleosomas de tamaño inferior a 6 unidades.

2.5.2 ACETILACION QUIMICA DE DIVERSOS SUSTRATOS CON [³H]-ANHIDRIDO ACETICO

La acetilación química se llevó a cabo con [³H]-anhídrido acético (9.5 Ci/mmol, AMERSHAM) disuelto en dioxano a una concentración de 0.26 μ M.

2.5.2.1 ACETILACION QUIMICA DE HISTONAS Y BSA

Se disolvieron 5 mg de las proteínas en 400 μ l de tampón borato sódico 50 mM, pH 9.0. A esta disolución se añadió 100 μ l (1 mCi) de la disolución de [³H]-anhídrido acético en dioxano para iniciar la acetilación, que tuvo lugar a 0°C durante 150 min. Tras esta incubación, la disolución se llevó a 0.25 M en HCl, con HCl concentrado, precipitándose las histonas con 8 volúmenes de acetona fría y la BSA con 10 volúmenes de etanol al 96%. Después de una noche a -20°C, los precipitados de estas proteínas se recogieron por centrifugación (3000xg, 10 min), se lavaron con acetona (o etanol para la BSA) y se secaron finalmente a vacío. La incorporación de radiactividad en las histonas se comprobó por electroforesis y fluorografía (Figura 2) realizadas como se describe en los apartados 2.7.1 y 2.7.2. En la Figura 2 se puede observar que con anhídrido acético se acetilan todas las histonas, sin preferencia por ninguna de ellas.

2.5.2.2 ACETILACION QUIMICA DE POLIAMINAS Y LISINA

Las poliaminas que se han utilizado son: espermina, espermidina y putrescina. La acetilación se llevó a cabo a 0°C, durante una noche, añadiendo a 10 mg de cada una de estas poliaminas y de lisina, disueltas en 100 μ l de tampón borato 50 mM, pH 9.0, 100 μ l de la disolución de anhídrido acético. Tras la incubación la mezcla se llevó a un volumen de 1 ml con H₂O y se aplicó sobre columnas DOWEX-1 X4 (BIORAD) de 6 cm x 1 cm, equilibradas con H₂O destilada. Las columnas se eluyeron con H₂O, recogiéndose fracciones de 1 ml. Una alícuota (6 μ l) de cada una de las fracciones se ensayó frente a ninhidrina (0.2% en etanol al 96%, en papel Whatman 3 MM). La radiactividad de dichas fracciones se midió al contar alícuotas de 6 μ l con 5 ml de la mezcla de centelleo Normascint-22 (SCHARLAU). La pureza radioquímica de estas preparaciones se comprobó

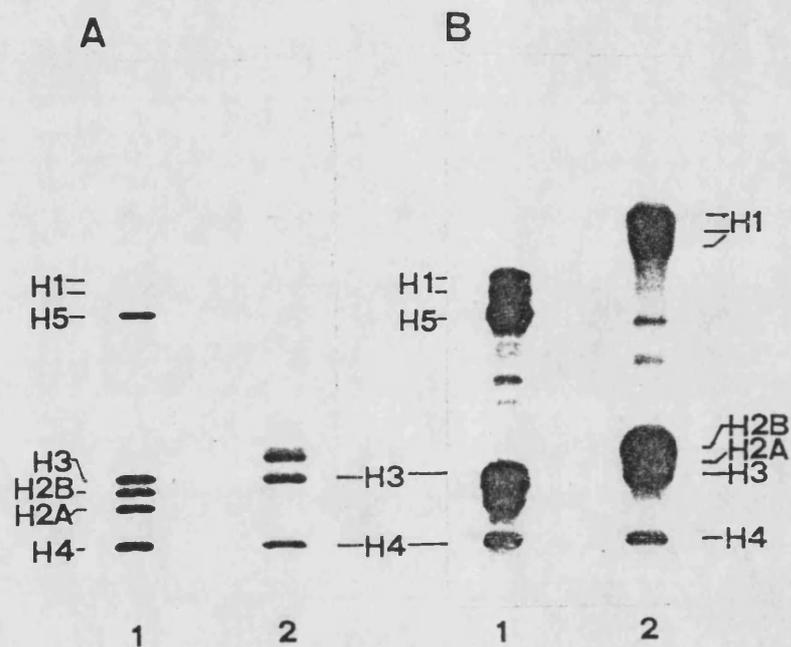


FIGURA 2. Acetilación química de histonas con [^3H]-anhídrido acético. A) electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS teñido con azul Coomassie. B) fluorografía del mismo gel. 1, histonas de eritrocito de pollo; 2, histonas de guisante.

por cromatografía en papel como describen Dubin y Rosenthal (1960) y posterior fluorografía (apartado 2.7.2). Los Rf de las manchas radiactivas obtenidas en la cromatografía coincidieron con los descritos por Dubin y Rosenthal (1960) para las formas monoacetiladas de estas sustancias. La Figura 3 muestra, como ejemplo, los resultados obtenidos en la acetilación de la espermina.

2.6 PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO ENZIMATICO

2.6.1 ENSAYO HISTONA ACETILTRANSFERASA

Se siguió el procedimiento descrito por López-Rodas et al. (1985).

Se incubó a 37°C durante 20 min, 100 µl de las fracciones enzimáticas con 0.01 µCi de [1-¹⁴C]-acetil-CoA (52 mCi/mmol, AMERSHAM) y 126 µg de histonas en un volumen final de 125 µl. Tras este período, se depositaron 110 µl de la mezcla en filtros Whatman GF/F de 2.4 cm de diámetro. Después de 5 min de secado a temperatura ambiente, los filtros se sumergieron en TCA 25% (p/v) durante 20 min a 4°C y posteriormente se lavaron sucesivamente con TCA 25% (2 lavados, 15 min), etanol 96% (10 min), etanol:éter etílico (1:1 v/v, 10 min) y éter etílico (10 min). Finalmente los filtros se secaron a 70°C, 10 min y la radiactividad incorporada se midió en un contador de centelleo líquido LKB Rack Beta 1217, introduciendo los filtros en viales que contenían 10 ml de una mezcla de centelleo compuesta por PPO 0.6% (p/v) y dimetil-POPOP 0.0075% (p/v) en tolueno.

Se ha estudiado la influencia del Coenzima A, PMSF, NaHSO₃, ZnCl₂ y CuCl₂ sobre la actividad HAT, para lo cual se incluyeron en el medio de reacción a la concentración deseada, utilizando para ello una disolución concentrada de estos moduladores en tampón B, pH 7.9.

Para determinar el efecto del DNA, en el ensayo de HAT se utilizó histonas de "core" (apartado 2.4.1) y DNA de esperma de salmón

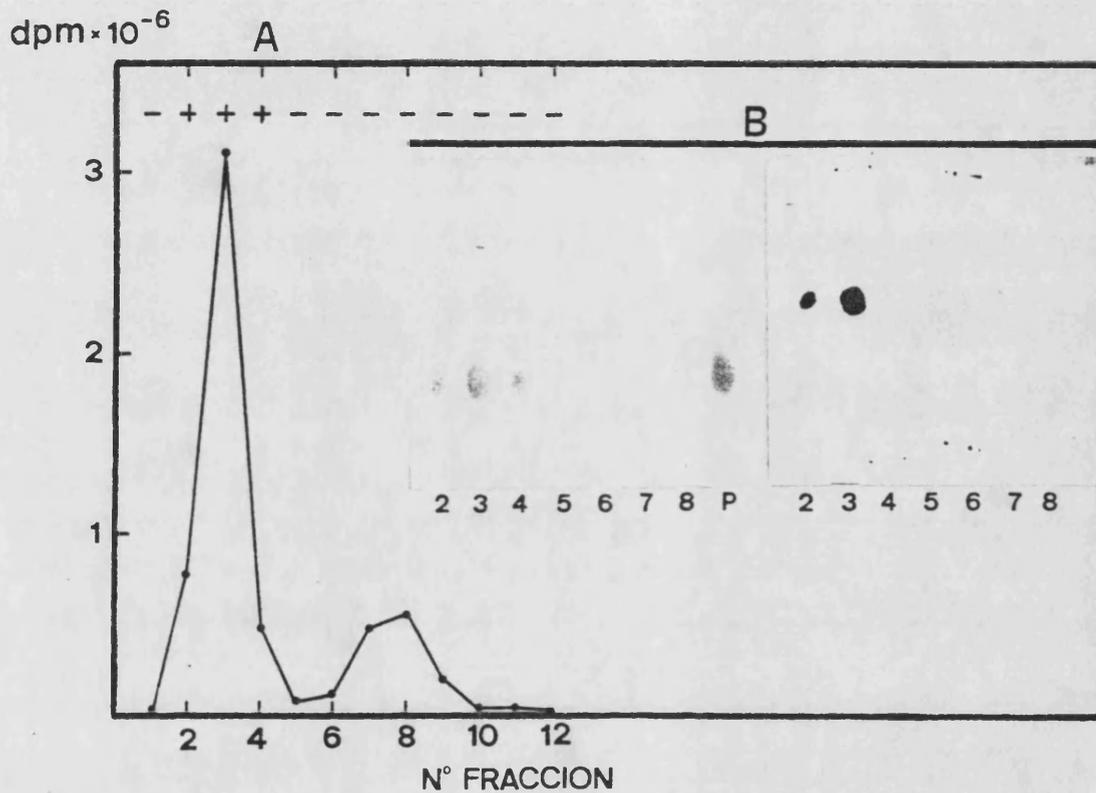


FIGURA 3. Acetilación química de espermina con [^3H]-anhídrido acético. A) perfil de elución de la columna en Dowex-1 X4. Los signos + y - expresan el resultado de la reacción con ninhidrina. B) cromatografía en papel y fluorografía de algunas fracciones del eluido (indicadas por los números correspondientes) y de un patrón (p) de espermina sin acetilar.

(SIGMA) disuelto en una disolución stock a 2 mg/ml y sonificado cuatro períodos de 50s a 50W.

La influencia de la fuerza iónica se determinó incluyendo distintas concentraciones de NH_4Cl en el medio de reacción, utilizando para ello una disolución stock de NH_4Cl 3M en tampón B.

También se ha utilizado sustratos alternativos para la actividad HAT: BSA, sulfato de protamina, el polímero sintético poli-L-lisina (Mr 25000) y las poliaminas espermina y espermidina. En los ensayos frente a poliaminas como sustrato, se siguió el procedimiento descrito por Yukioka *et al.* (1984). Se incubaron a 37°C 80 μl de las fracciones enzimáticas, 80 μg de los sustratos y 0.01 μCi de $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{-acetil-CoA}$, en un volumen final de 100 μl . Después de 20 min se depositaron 80 μl de la mezcla en filtros de fosfocelulosa Whatman P-81 y se secaron a 70°C durante 5 min. Posteriormente, estos filtros se lavaron dos veces en tampón $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 50 mM, pH 9.2 a 40°C durante 30 min y una vez en metanol 20 min a temperatura ambiente. Los filtros se secaron a 70°C durante 20 min y se contaron como ya se ha indicado.

La especificidad frente a las histonas se determinó por electroforesis y fluorografía de las muestras de histonas marcadas por los distintos enzimas. Para ello el ensayo se realizó en las siguientes condiciones. Se incubaron 200 μl de las fracciones enzimáticas con 160 μg de histonas (de eritrocito de pollo y/o de guisante) y 0.04 μCi de $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{-acetil-CoA}$ en un volumen final de 230 μl , durante 20 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo suficiente cantidad de TCA 100% (p/v) frío para llevar la mezcla al 25%. Después de 2 horas a 0°C, las proteínas precipitadas se recogieron por centrifugación a 12000xg, 10 min y se lavaron dos veces con acetona:HCl (70:1, v/v) y dos veces con acetona, secándose finalmente a vacío.

En el ensayo de la actividad HAT utilizando como sustrato oligonucleosomas, la fuerza iónica del medio siempre fue 35 mM en NH_4Cl y se añadió suficiente volumen de la disolución de oligonucleosomas (obtenidos como se indica en el apartado 2.4.3) para conseguir una concentración de histonas de 0.4 mg/ml. Tras la incubación, las muestras se llevaron a

0.25 M de HCl, con HCl concentrado y después de 1 h a 4°C, se centrifugaron a 12000xg 5 min. Una alícuota de 120 µl de los sobrenadantes se depositó sobre los filtros que fueron procesados como se describe anteriormente. Para determinar la especificidad sobre histonas en nucleosomas, se realizó un ensayo similar, excepto que tras la extracción de las histonas con HCl 0.25 M, éstas se precipitaron con TCA 25% y se lavaron del mismo modo que se ha descrito antes para su posterior electroforesis y fluorografía.

En todos los casos se utilizaron como testigos de incorporación no enzimática, las mismas fracciones inactivadas por calor (70°C, 10 min).

2.6.2 ENSAYO HISTONA DESACETILASA

Para ensayar las HD se utilizó el siguiente procedimiento: en tubos eppendorf de 1.5 ml se incubó 100 µl de las fracciones junto con 10 µl de [³H]-histonas de eritrocito de pollo marcadas biológicamente (8 mg/ml) a 37°C durante 60 min. La reacción se paró añadiendo 37 µl de una disolución HCl 1 M, ácido acético 0.4 M, tras lo cual el [³H]-acetato liberado por la reacción de desacetilación se extrajo con 700 µl de acetato de etilo (Inoue y Fujimoto, 1969). Después de la centrifugación a 5000xg, 5 min, se cogió una alícuota de 500 µl de la fase orgánica y después de añadirle 5 ml de mezcla de centelleo Normanscint-22 se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Como en el caso de las HAT se determinó el efecto de la fuerza iónica, incluyendo la sal a la concentración deseada en la mezcla a ensayar, utilizando una disolución de NH₄Cl 3 M en tampón B.

Se ha estudiado el efecto de distintos inhibidores sobre las actividades HD, butirato, propionato y acetato, PMSF, NaHSO₃, CuCl₂, ZnCl₂, colina y eserina. Para ello, se incluyeron estos inhibidores en la mezcla de ensayo partiendo de una disolución concentrada del inhibidor (en tampón B). En los ensayos frente a inhibidores ionizables, la fuerza iónica se mantuvo constante suplementando el medio con las cantidades

apropiadas de NH_4Cl . El efecto del PMB 0.25 mM se llevó a cabo como describen López-Rodas et al. (1985).

Se ha estudiado el efecto de otros moduladores de las actividades HD, espermina, las HMG 1/2 y 14 [obtenidas de eritrocito de pollo según Walker y Johns (1980) que proporcionó el Dr. J.E. Pérez-Ortín] y la ubiquitina [obtenida de eritrocito de pollo, según Nicolas y Goodwin (1982) que fue cedida por la Dra. M.I. Rodrigo] añadiendo a la mezcla a ensayar volúmenes adecuados de disoluciones concentradas de estos efectores en tampón B.

Las HD también se han ensayado frente a oligonucleosomas marcados radiactivamente (apartado 2.5.1), añadiendo la cantidad suficiente de la disolución de oligonucleosomas para conseguir una concentración final de 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de modo que la concentración de histonas fuese similar a la utilizada con histonas libres. Las HD se ensayaron también frente a los distintos sustratos acetilados químicamente con anhídrido acético (apartado 2.5.2).

En el estudio de la especificidad frente a las distintas histonas se realizó el ensayo en las siguientes condiciones. Se incubaron distintos tiempos 160 μg de histonas de eritrocito de pollo marcadas biológicamente con 300 μl de las fracciones purificadas de las HD. A cada tiempo de incubación estudiado, la reacción se paró llevando la mezcla al 25% en TCA. Después de 2h a 0°C , las proteínas precipitadas se recogieron por centrifugación (12000xg, 10 min) y se lavaron y secaron como se ha descrito para las HAT (apartado 2.6.1). Paralelamente, como control de desacetilación no enzimática, se realizó el mismo ensayo con la fracción inactivada por calor e incubada el tiempo más largo. Después de la electroforesis y fluorografía de esas muestras, se analizó la pérdida de radiactividad en las bandas de las histonas mediante densitometría (apartado 2.7.3).

2.7 METODOS ANALITICOS

2.7.1 ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

Tanto para determinar la pureza de las histonas utilizadas como sustrato de las actividades enzimáticas, como para estudiar la especificidad de las HAT e HD, se han utilizado dos sistemas de electroforesis en geles de poliacrilamida.

2.7.1.1 ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE SDS

Se siguió el procedimiento descrito por Laemmli (1970).

Una vez realizada la electroforesis, los geles se tiñeron con azul Coomassie R250 0.1% (p/v) en metanol 46% y ácido acético 8% durante al menos 1 hora. Se destiñeron con varios cambios de una disolución de ácido acético 5% y metanol 20%. Estos geles se fotografiaron con una cámara Polaroid MP4 y negativos Agfapam 100 profesional de 9 x 12 cm.

2.7.1.2 ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE ACIDO ACETICO-UREA-TRITON

Esta electroforesis se realizó como describen Alfageme et al. (1974).

Acabada la electroforesis, los geles se tiñeron, destiñeron y fotografiaron del mismo modo que se ha descrito en el apartado anterior.

2.7.2 PROCEDIMIENTO FLUOROGRAFICO

Los geles desteñidos se sumergieron en Amplify (AMERSHAM) durante 30 min y se secaron sobre papel Whatman 3MM a vacío en un secador de geles Slab Dryer 483 (BIORAD) durante 45 min. Los geles, ya secos, se pusieron en contacto con películas autorradiográficas Hiperfilm MP (AMERSHAM) y se desarrollaron las fluorografías a -80°C durante períodos comprendidos entre 1 y 4 semanas, dependiendo de la radiactividad presente en el gel. Las placas autorradiográficas se revelaron con revelador Kodak D-19 durante 5 min.

2.7.3 DENSITOMETRIA POR ANALISIS DE IMAGEN

La radiactividad asociada a las bandas de histonas se cuantificó mediante análisis densitométrico de los fluorogramas y negativos fotográficos de los geles. Para ello se utilizó un analizador de imagen IBAS 2000 (KONTRON) y se obtuvo la densidad óptica integrada (DOI) de cada banda. En algunos casos, la DOI de las bandas en el fluorograma se normalizó dividiéndola por la DOI de las mismas bandas en el gel teñido con azul Coomassie, lo cual representa una medida de la actividad específica de cada banda en el gel.

En las electroforesis y fluorografías realizadas en este trabajo, todos los valores de DOI de las bandas en el gel teñido (y en la fluorografía) estuvieron en el rango lineal de la representación de DOI frente a la cantidad de proteína (o de radiactividad).

2.7.4 VALORACION DE PROTEINAS

La valoración de proteínas se realizó por el método del azul Coomassie según describe Bradford (1976), utilizando como proteína patrón BSA.

2.7.5 VALORACION DE DNA

La cantidad de DNA presente en los extractos se determinó por el método fluorimétrico de Labarca y Paigen (1980).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 EXTRACCION DE ACTIVIDADES HAT DE EMBRIONES DE GUISANTE

Existe la posibilidad de que determinados procedimientos de extracción afecten al número de isoenzimas y a la actividad total recuperada (Garcea y Alberts, 1980; Wiktorowicz y Bonner, 1982). Por ejemplo, los métodos en los que se someten los extractos enzimáticos HAT a fuerzas iónicas muy elevadas pueden producir la pérdida irreversible de una fracción de dicha actividad (Wiegand y Brutlag, 1980; Wiktorowicz y Bonner, 1982). Con objeto de poner a punto un procedimiento de extracción de actividades HAT de guisante en el que se recupere una mayor actividad enzimática y no se vean afectados los distintos isoenzimas, se han probado varios métodos de extracción de proteínas de embriones de 62 h de germinación, previamente homogeneizados en mortero con arena (Material y Métodos apartado 2.2). Los procedimientos de extracción utilizados han sido: precipitación con sulfato amónico al 90% de saturación, precipitación con PEG al 20% y ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M. Los ensayos de actividad HAT de los extractos crudos, obtenidos por estos distintos procedimientos, no han revelado ninguna actividad HAT (valorada por el procedimiento habitual, apartado 2.6.1, Material y Métodos). La razón de esta imposibilidad de valorar actividades enzimáticas HAT en extractos crudos de embriones de guisante podría ser la existencia de algún inhibidor endógeno. Este efecto inhibidor reversible se ha observado también en otros organismos (Libby, 1978; Belikoff et al., 1980; Wiktorowicz y Bonner, 1982; Cano y Pestaña, 1976; López-Rodas et al., 1985). Se ha sugerido que pequeños fragmentos de ácidos nucleicos endógenos, producidos durante la extracción, podrían ser responsables de esta inhibición reversible (Cano y Pestaña, 1976; Wong, 1980). Por otra parte, se ha observado también una disminución reversible de la actividad HAT en extractos con una elevada concentración proteica (Cano y Pestaña, 1976; Wiktorowicz y Bonner, 1982). Al no poder valorar las actividades HAT en los extractos crudos, no ha sido posible determinar el grado de purificación en términos de incremento de la actividad específica.

Así pues, para poder comparar los resultados obtenidos en los distintos procedimientos de extracción, ha sido necesaria la purificación

parcial previa de las actividades HAT. La cromatografía en DEAE-Sepharosa, en las condiciones descritas en Material y Métodos, ha resultado eficaz para la purificación de los enzimas y para la eliminación de los ácidos nucleicos, que quedan retenidos en la columna (López-Rodas *et al.*, 1985).

La medida de la actividad en los eluidos de la columna de DEAE-Sepharosa se ha realizado utilizando histonas de eritrocito de pollo como sustrato. Como veremos más adelante, las distintas HAT de embriones de guisante no acetilan igual estas histonas que las histonas homólogas. Además, la especificidad frente a las distintas histonas, por algunas HAT, resulta ser ligeramente diferente según se utilicen histonas de guisante o de eritrocito de pollo. A pesar de estas diferencias, las histonas de eritrocito de pollo son reconocidas como sustrato y acetiladas por los enzimas de guisante, a un nivel que permite su utilización en ensayos donde se quiera conocer la actividad enzimática relativa. Esto ha resultado útil para la detección de las actividades HAT de guisante ya que se emplean unas histonas que se obtienen en forma pura más fácilmente y en mayores cantidades que las histonas de guisante.

Es posible que en las condiciones de ensayo utilizadas pueda ocurrir acetilación química de las histonas (transferencia de grupos acetilo desde el acetil-CoA a las histonas en ausencia de enzimas) y autoacetilación (incorporación de acetato a material precipitable por TCA en ausencia de histonas). Como control de la acetilación química se han realizado ensayos de actividad HAT con las fracciones inactivadas previamente por calor (70°C, 10 min), sobre todo con aquellas fracciones eluidas a una concentración en NH₄Cl inferior a 100 mM, pues según han señalado López-Rodas *et al.* (1985) a estos valores de fuerza iónica o inferiores se favorece la acetilación química. Como control de la autoacetilación se realizó el ensayo en ausencia de histonas. Así, en las representaciones gráficas que se mostrarán más adelante, para facilitar su interpretación, figurarán sólo los picos de actividad que hayan resultado ser verdaderamente enzimáticos.

3.1.1 EXTRACCION POR PRECIPITACION CON $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Este procedimiento, básicamente el mismo que el descrito por Salvador *et al.* (1985), produce la disociación de los posibles enzimas con afinidad por la cromatina y la precipitación de las HAT presentes, eliminando al mismo tiempo gran parte del DNA ($\approx 50\%$), que queda en el sobrenadante de sulfato amónico al 90% de saturación. La posterior cromatografía en DEAE-Sepharosa elimina prácticamente los restantes ácidos nucleicos que quedan retenidos en la columna en las condiciones utilizadas, ya descritas en Material y Métodos.

En el lavado de la cromatografía en DEAE-Sepharosa de un extracto proteico de embriones de 62 h, obtenido por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no se ha encontrado ninguna actividad HAT. Sin embargo, al eluir las proteínas retenidas con un gradiente lineal 10-350 mM en NH_4Cl se obtienen dos picos de actividad enzimática denominados A y B (Figura 4). El pico A eluye alrededor de 150 mM en el gradiente de NH_4Cl , mientras que el B eluye a 300 mM. Las fracciones de los picos señaladas con una barra en la Figura 4 se reunieron y las proteínas se concentraron por ultrafiltración y se aplicaron en una columna de Ultrogel AcA34. Ambas HAT eluyen de nuevo como picos únicos y éstos se utilizaron para estudiar la especificidad de las dos actividades enzimáticas frente a las histonas y frente a nucleosomas. La Figura 5 muestra que la HAT B acetila la histona H4, tanto cuando se utilizan histonas de guisante como sustrato como cuando las histonas son de eritrocito de pollo. Este enzima no modifica las histonas cuando éstas se encuentran formando nucleosomas. La Figura 5 también muestra que la HAT A acetila a la histona H3 cuando se utilizan histonas de guisante libres como sustrato, pero, en este caso, la HAT A es menos específica, pues acetila además otros polipéptidos de naturaleza desconocida. Frente a histonas de eritrocito de pollo este enzima modifica H5, H4 y una proteína no conocida. Sin embargo, la actividad HAT A se muestra más específico cuando se utilizan oligonucleosomas como sustrato (Figura 5); acetilando exclusivamente la histona H3. Algunas veces, la digestión de cromatina con nucleasa de micrococo, utilizada para la obtención de los oligonucleosomas, puede producir la liberación de histo-

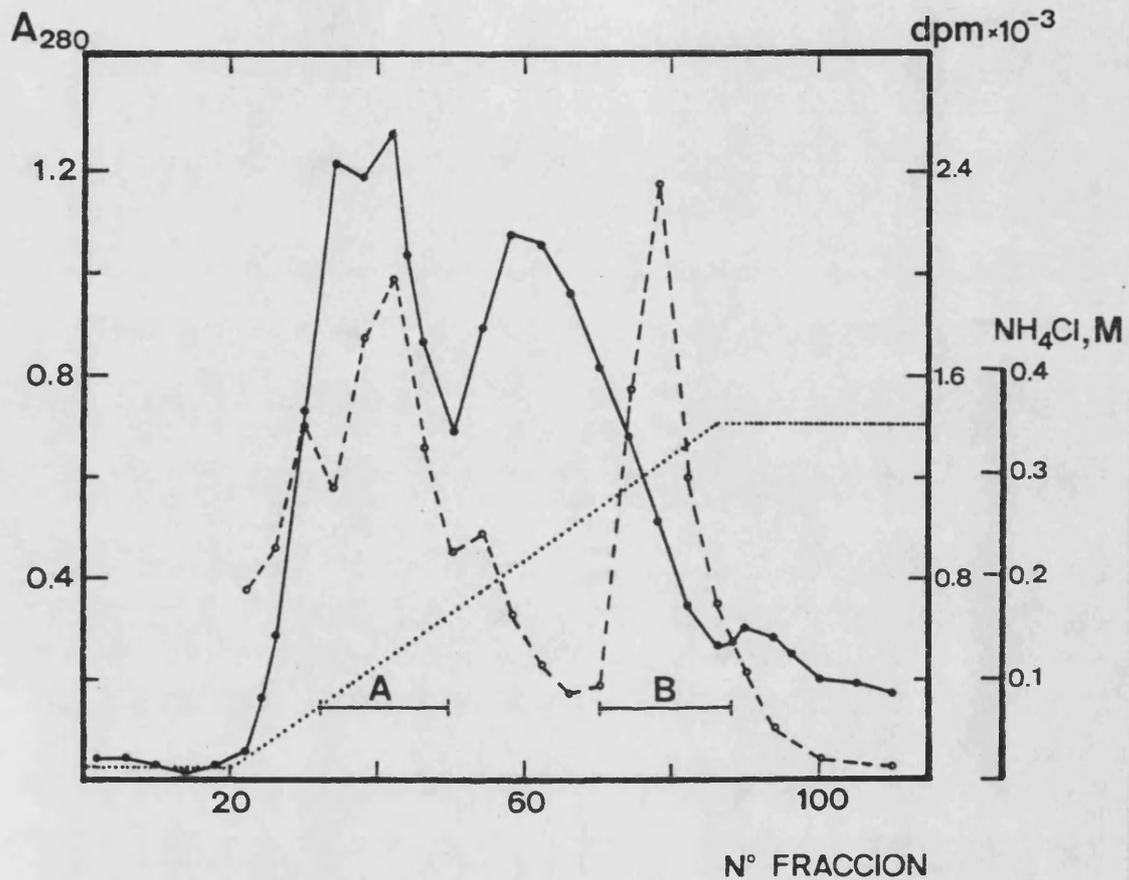


FIGURA 4. Perfil de elución de la cromatografía en DEAE-Sepharosa CL-6B de un extracto de embriones de 62 h (50 g) obtenido por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sólo se representa la región correspondiente al gradiente en NH_4Cl donde se detectó actividad HAT. Después de aplicar el extracto, la columna (12 cm x 2 cm) se lavó con 5 volúmenes de tampón B y se eluyeron las proteínas retenidas con un gradiente lineal 10-350 mM en NH_4Cl (0.5 l) a un flujo de 45 ml/h, recogiendo fracciones de 7 ml. (●—●) A_{280} ; (○--○) actividad HAT; (···) gradiente de NH_4Cl .

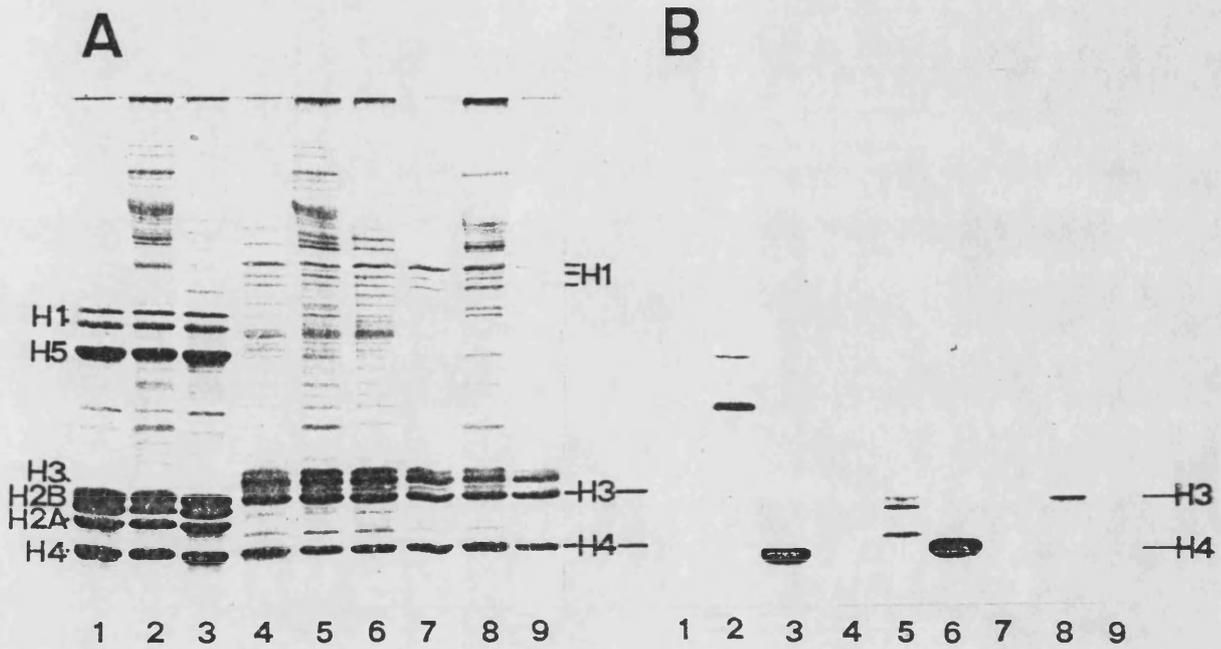


FIGURA 5. Especificidad de los enzimas HAT obtenidos por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Después de la incubación con $[1-^{14}\text{C}]$ -acetil-CoA, las histonas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. A) gel teñido con azul Coomassie. B) fluorograma. Carreras 1-3, histonas de eritrocito de pollo; 4-6, histonas de guisante; 7-9 nucleosomas de guisante. Las carreras 1, 4 y 7 son controles de acetilación no enzimática donde las fracciones se sustituyeron por tampón B. Carreras 2, 5 y 8, HAT A; 3, 6 y 9, HAT B.

nas. Por tanto, la banda radiactiva en la carrera 8 de la Figura 5 podría corresponder a H3 liberada por la digestión y no tratarse de una histona integrada en nucleosomas. Para excluir esta posibilidad se llevó a cabo un experimento en el cual después de la incubación de los oligonucleosomas con acetil-CoA e histona acetiltransferasas, como se describe en Material y Métodos, la mezcla se ultracentrifugó a 240000xg durante 6 h a 4°C. Bajo estas condiciones, los mononucleosomas sedimentan mientras que las histonas libres permanecen en el sobrenadante. Una vez eliminado el exceso de [1-¹⁴C]-acetil-CoA, la radiactividad en este sobrenadante resultó insignificante. Esto demuestra que la histona H3 marcada se encuentra formando parte de nucleosomas.

La HAT B, por su elución en la cromatografía de DEAE-Sepharosa y su preferencia exclusiva por H4, coincide con el enzima descrito en plántulas de guisante (Salvador et al., 1985). Su imposibilidad de acetilar histonas en nucleosomas, así como su especificidad por H4, sugieren que esta actividad corresponde a la forma B o forma citoplasmática de la HAT descrita en otros organismos (Libby, 1978; Sures y Gallwitz, 1980; Garcea y Alberts, 1980; Wiegand y Brutlag, 1981; López-Rodas et al., 1985; Richman et al., 1988).

La otra actividad enzimática obtenida por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que eluye a 150 mM en NH_4Cl de la cromatografía de intercambio aniónico, puede interpretarse como la forma A o forma nuclear de la HAT encontrada en otros muchos eucariotas (Garcea y Alberts, 1980; Sures y Gallwitz, 1980; Belikoff et al. 1980; Travis et al., 1984; López-Rodas et al., 1985). Su elución característica en gradientes de fuerza iónica, y fundamentalmente, su capacidad para aceptar nucleosomas como sustrato, son decisivas para su identificación como forma A de la HAT.

Los resultados obtenidos mediante el procedimiento de extracción de proteínas por precipitación con sulfato amónico al 90% de saturación claramente muestran, claramente, la existencia de al menos dos actividades HAT distintas en embriones de guisante. Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, este procedimiento de extracción tiene el

inconveniente de que la fracción enzimática es sometida a una elevada concentración salina (3.5 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), lo cual puede afectar al grado de actividad enzimática recuperada, así como a otros posibles enzimas HAT que no son por ello detectados. En este sentido, se ha observado que partiendo de igual cantidad de embriones, del mismo tiempo de germinación, se obtienen niveles de actividad HAT variables, especialmente con la HAT A. Wiegand y Brutlag (1981) también han observado en Drosophila melanogaster que la utilización del sulfato amónico en las etapas de purificación de HAT puede producir pérdidas en la actividad recuperada, que además de ser variables suelen ser elevadas.

Un problema adicional que plantea la utilización del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en la extracción de actividades enzimáticas de embriones de guisante es la elevada cantidad de lípidos existentes en el homogeneizado, especialmente cuando los tiempos de germinación son cortos. Cuando el extracto enzimático crudo se lleva al 90% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se centrifuga, tal y como se ha indicado en Material y Métodos, sólo se recupera un pequeño sedimento de proteínas precipitadas, quedando la mayor parte en una capa flotante junto con los lípidos. Esto dificulta la obtención de la fracción proteica y probablemente afecte a las actividades enzimáticas. La utilización de detergentes (Triton X-100) no ha dado buenos resultados, pues eran necesarias concentraciones tan elevadas que producían la pérdida irreversible de las actividades enzimáticas.

3.1.2 EXTRACCION POR PRECIPITACION CON PEG

El polietilenglicol (PEG) se ha utilizado algunas veces para la obtención de actividades HAT (Garcea y Alberts, 1980; Belikoff et al., 1980). A fin de evitar que los extractos enzimáticos estén sometidos a una fuerza iónica muy elevada se ha empleado la precipitación con PEG 20% (p/v) para la obtención de actividades HAT de guisante. Para ello el homogeneizado crudo, filtrado y centrifugado, se llevó al 20% en PEG (Mr 8000) por adición del producto sólido. Tras recoger el precipitado de proteínas y dializarlo se aplicó en una columna de DEAE-Sepharosa, la cual después del lavado se eluyó con un gradiente en NH_4Cl (Figura 6).

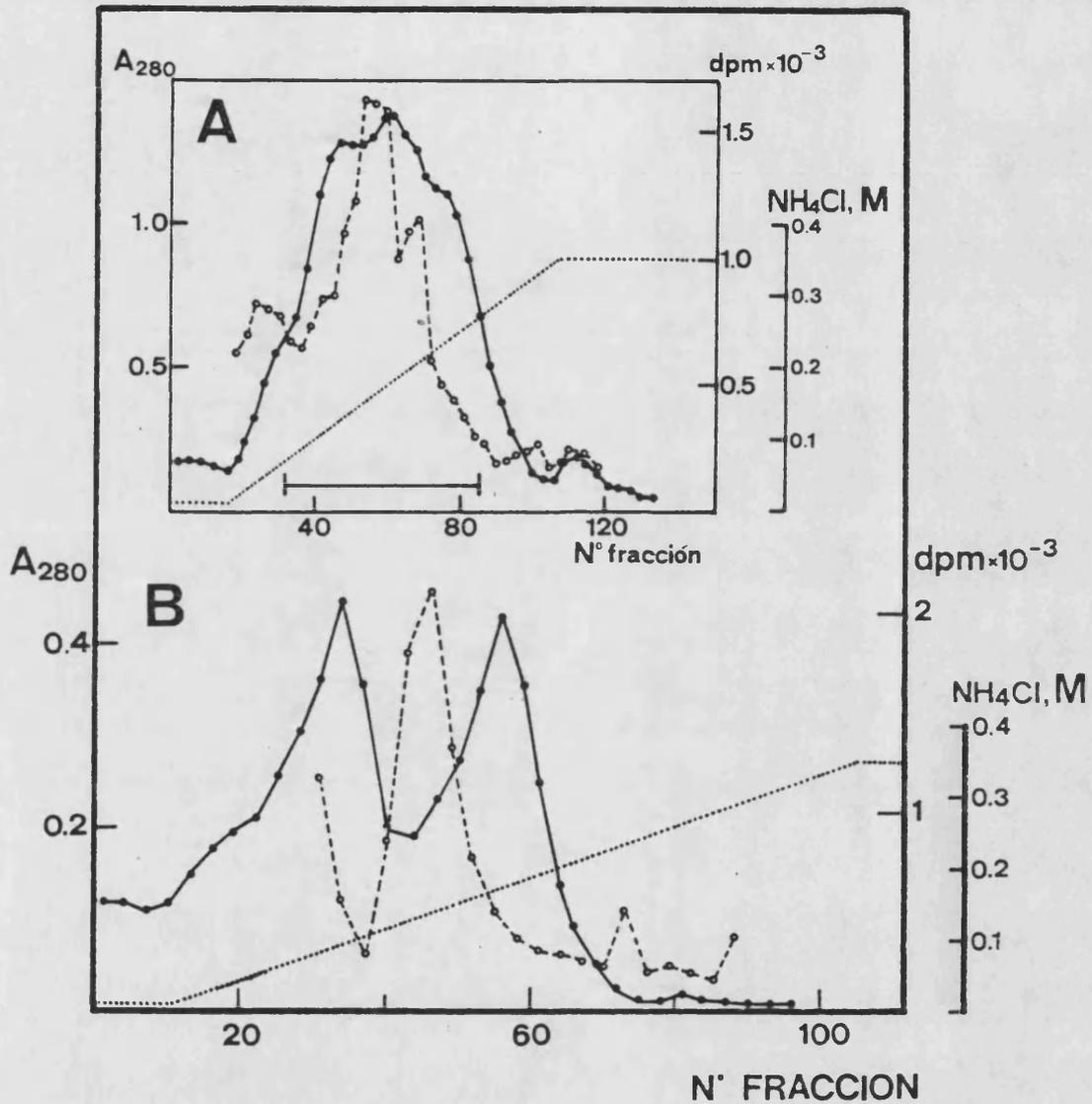


FIGURA 6. Perfil de elución de la cromatografía en DEAE-Sepharosa de la actividad HAT obtenida por precipitación con PEG 20%. A) el extracto proteico crudo se aplicó en una columna (17 cm x 3 cm) de DEAE-Sepharosa CL-6B y se eluyó con un gradiente de 400 ml (10-350 mM NH_4Cl) a un flujo de 40 ml/h (fracciones de 5 ml). Después del ensayo de actividad HAT, las fracciones incluidas en la barra de la Figura A se reunieron y las proteínas se aplicaron de nuevo en una segunda columna de DEAE-Sepharosa (17 cm x 2 cm). B) perfil de elución de la segunda cromatografía (550 ml de gradiente, 25 ml/h, 5 ml/fracción). (●—●) A_{280} , (○--○) actividad HAT; (···) gradiente NH_4Cl .

Dada la baja resolución conseguida con esta primera cromatografía (Figura 6A) el pico de actividad se recogió y se volvió a cromatografiar en una segunda columna de DEAE-Sepharosa (Figura 6B). La Figura muestra un único pico de actividad HAT que eluye aproximadamente a 150 mM en NH_4Cl . El estudio de la especificidad de esta actividad enzimática, después de su purificación por Ultrogel AcA34, muestra que el enzima acetila la histona H3 cuando se ensaya frente a histonas homólogas y acetila H5, H4 y una proteína cuya movilidad se encuentra entre H5 y las histonas de "core" cuando se utilizan histonas de eritrocito de pollo como sustrato (Figura 7). Mediante este procedimiento de precipitación con PEG 20%, en varias extracciones realizadas, siempre se observó un único pico de actividad eluyendo alrededor de 150 mM en NH_4Cl y ninguna otra actividad HAT.

El comportamiento cromatográfico, así como la especificidad frente a las distintas histonas, muestran que el enzima obtenido por precipitación con PEG 20% corresponde a la HAT A obtenida por precipitación con sulfato amónico.

Del precipitado de PEG 20%, sólo se ha obtenido una única actividad HAT, la forma A. Si se aumenta la fuerza iónica en el sobrenadante se consigue precipitar otra actividad HAT. Los mejores resultados se han obtenido con una concentración en NH_4Cl de 0.15 M, y aunque siempre se ha obtenido con un nivel de actividad bajo, puede afirmarse que se trata de la forma B que se obtiene también por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La Figura 8 muestra el perfil de elución de la cromatografía en DEAE-Sepharosa, así como la especificidad del pico de actividad obtenido por esta precipitación con NH_4Cl 0.15M del sobrenadante de PEG al 20%.

Comparando este procedimiento con el de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, puede decirse que ambos proporcionan las mismas actividades HAT (A y B), pero los niveles de actividad recuperados de cada forma del enzima por los dos procedimientos son distintos. Así, la precipitación con PEG 20%, conduce a la obtención de mayor cantidad de HAT

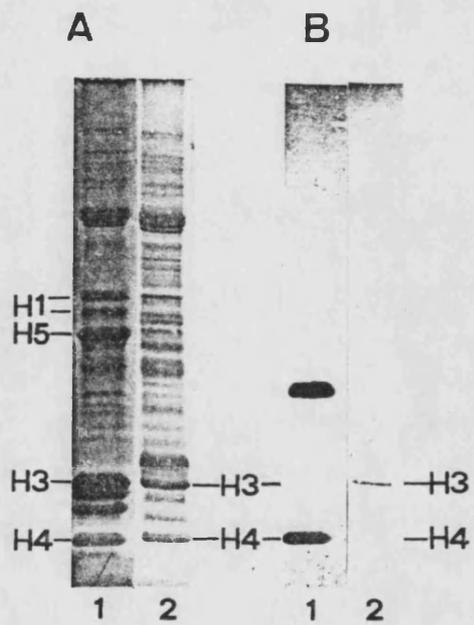


FIGURA 7. Especificidad de la histona acetiltransferasa obtenida por precipitación con PEG 20%. Las histonas marcadas por el enzima se sometieron a electroforesis en gel en presencia de SDS. A) gel teñido con azul Coomassie. B) fluorograma. 1, histonas de eritrocito de pollo. 2, histonas de guisante.

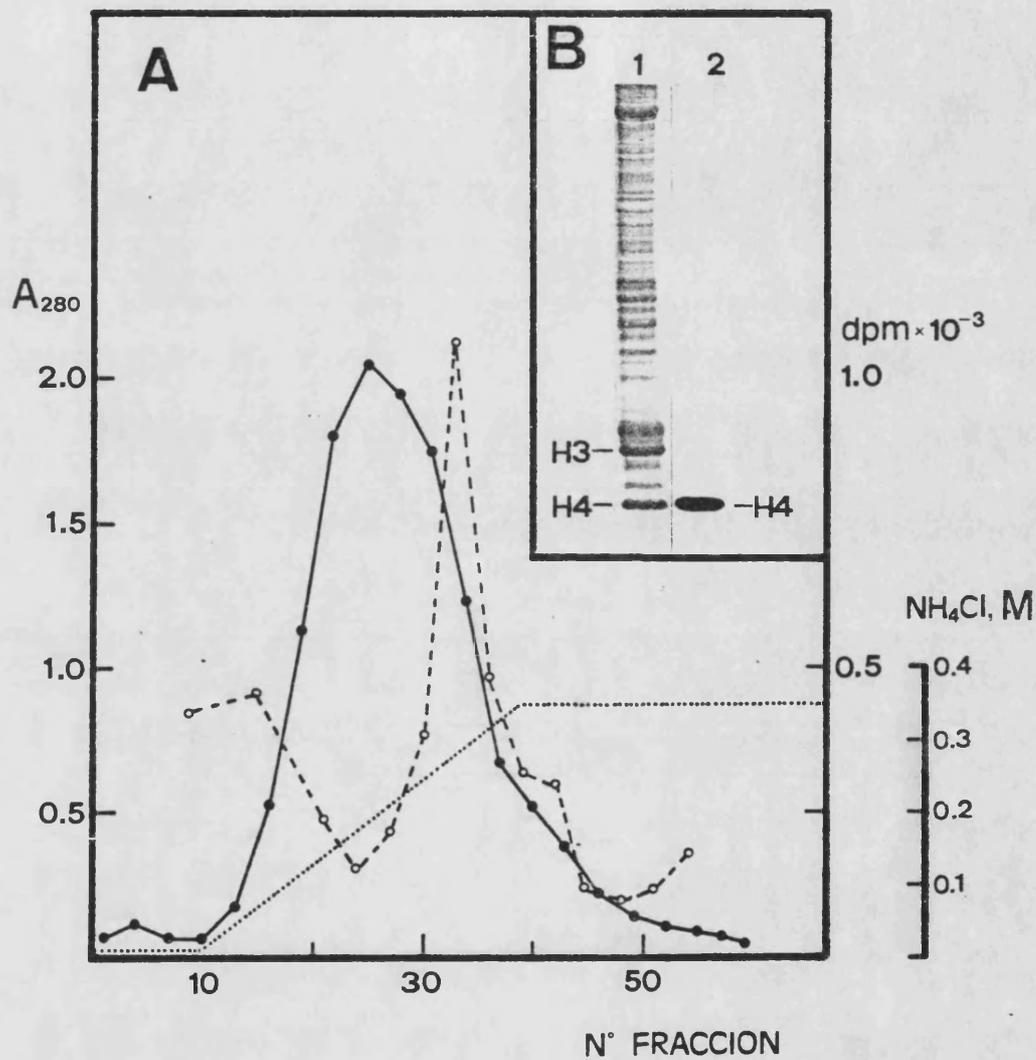


FIGURA 8. Elución en DEAE-Sepharosa y especificidad de la HAT obtenida del sobrenadante de PEG 20% 0.15 M en NH_4Cl . A) perfil de elución. (●—●) A_{280} ; (○--○) actividad HAT; (···) gradiente de NH_4Cl . Se utilizó una columna de 8 cm x 2 cm, eluyendo con 100 ml de gradiente a 30 ml/h. Fracciones de 3.5 ml. B) especificidad frente a histonas de guisante. 1, gel teñido con azul Coomassie. 2, fluorografía.

A activa, mientras que ocurre lo contrario con la forma B, obteniéndose un nivel mayor por la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Por otro lado, ninguno de los dos procedimientos posee ventajas prácticas respecto al otro.

3.1.3 EXTRACCION POR ULTRACENTRIFUGACION EN PRESENCIA DE NH_4Cl 0.5 M

Este procedimiento consiste en realizar la homogeneización utilizando un tampón con una concentración en NH_4Cl 0.5 M. Esta concentración salina favorece la disociación de los posibles enzimas que se encuentren unidos a la cromatina (Libby, 1978; Belikoff *et al.*, 1980; Fukushima *et al.*, 1980; Bohm *et al.*, 1980). A diferencia de los dos procedimientos anteriores, en éste no existe ninguna etapa de precipitación de proteínas que pudiese afectar a las distintas actividades HAT. A nivel práctico, aunque el volumen de extracto enzimático obtenido por este procedimiento suele ser grande, esto no supone ninguna dificultad, ya que el siguiente paso es una cromatografía de intercambio iónico donde las proteínas van a ser concentradas. Por otro lado, el tiempo y el trabajo empleados para la realización de la extracción por ultracentrifugación son mucho menores que los que requieren los otros dos procedimientos descritos.

Se ha comprobado que mediante la etapa de ultracentrifugación se elimina el 43% del DNA presente en el extracto crudo inicial, quedando en el sobrenadante una concentración en ácidos nucleicos todavía elevada y superior a la que se obtiene mediante el procedimiento de precipitación con sulfato amónico. Quizás ello explique, al menos en parte, que tampoco aquí sea posible medir la actividad HAT en el extracto crudo.

Tras aplicar el extracto enzimático en DEAE-Sepharosa, la columna se lavó con 5 volúmenes de tampón B. El ensayo de actividad de las fracciones correspondientes a este lavado, llevadas a 100 mM en NH_4Cl para evitar la acetilación química, no reveló ningún pico de actividad HAT. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron primero con un gradiente lineal en NH_4Cl (10-350 mM) y después con tampón B 1 M en

esta sal. Las fracciones recogidas en este último paso se dializaron frente a tampón B 100 mM en NH_4Cl y su ensayo no mostró ninguna actividad enzimática HAT. Los enzimas HAT presentes en el extracto enzimático inicial son retenidas en DEAE-Sepharosa y eluyen todos ellos en el gradiente 10-350 mM en NH_4Cl .

La Figura 9A muestra el perfil de elución de la columna de DEAE-Sepharosa con el gradiente en NH_4Cl , 10-350 mM. El ensayo de las fracciones, utilizando histonas de eritrocito libres, revela hasta cuatro picos de actividad HAT, designados como A1, A2, A3 y B y que eluyen a 100, 150, 200 y 300 mM en el gradiente de NH_4Cl , respectivamente. Las mismas fracciones se dializaron frente a tampón B 35 mM en NH_4Cl y se ensayaron utilizando como sustrato nucleosomas y una suspensión de cromatina (obtenida según el apartado 2.2.4). La Figura 9B muestra el resultado de este ensayo. Se observa claramente que tan solo el pico de actividad designado como A2 es capaz de acetilar a estos sustratos. La menor actividad sobre la cromatina probablemente sólo refleja el estado poco solubilizado de este sustrato.

El estudio de especificidad de las actividades HAT, utilizando histonas de guisante como sustrato (Figura 10), muestra que los picos A1, A2 y A3 acetilan preferentemente la histona H3, mientras que el pico B acetila exclusivamente H4. Ninguna de las actividades es capaz de modificar, en las condiciones utilizadas, a las histonas H2A o H2B. La HAT A2 es la menos específica, pues acetila además de H3 dos polipéptidos cuya movilidad electroforética está entre H3 y H4, mientras que A1 y A2 muestran especificidad exclusiva por la histona H3. Los distintos enzimas HAT obtenidos de DEAE-Sepharosa se purificaron posteriormente por Ultrogel AcA34 y mostraron, en todos los casos, la misma especificidad que la que se acaba de describir.

La elución en la cromatografía de intercambio iónico, así como su especificidad por la histona H4, indican que el pico B obtenido por ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M corresponde a la HAT B obtenida en los dos procedimientos anteriores. Del mismo modo, el

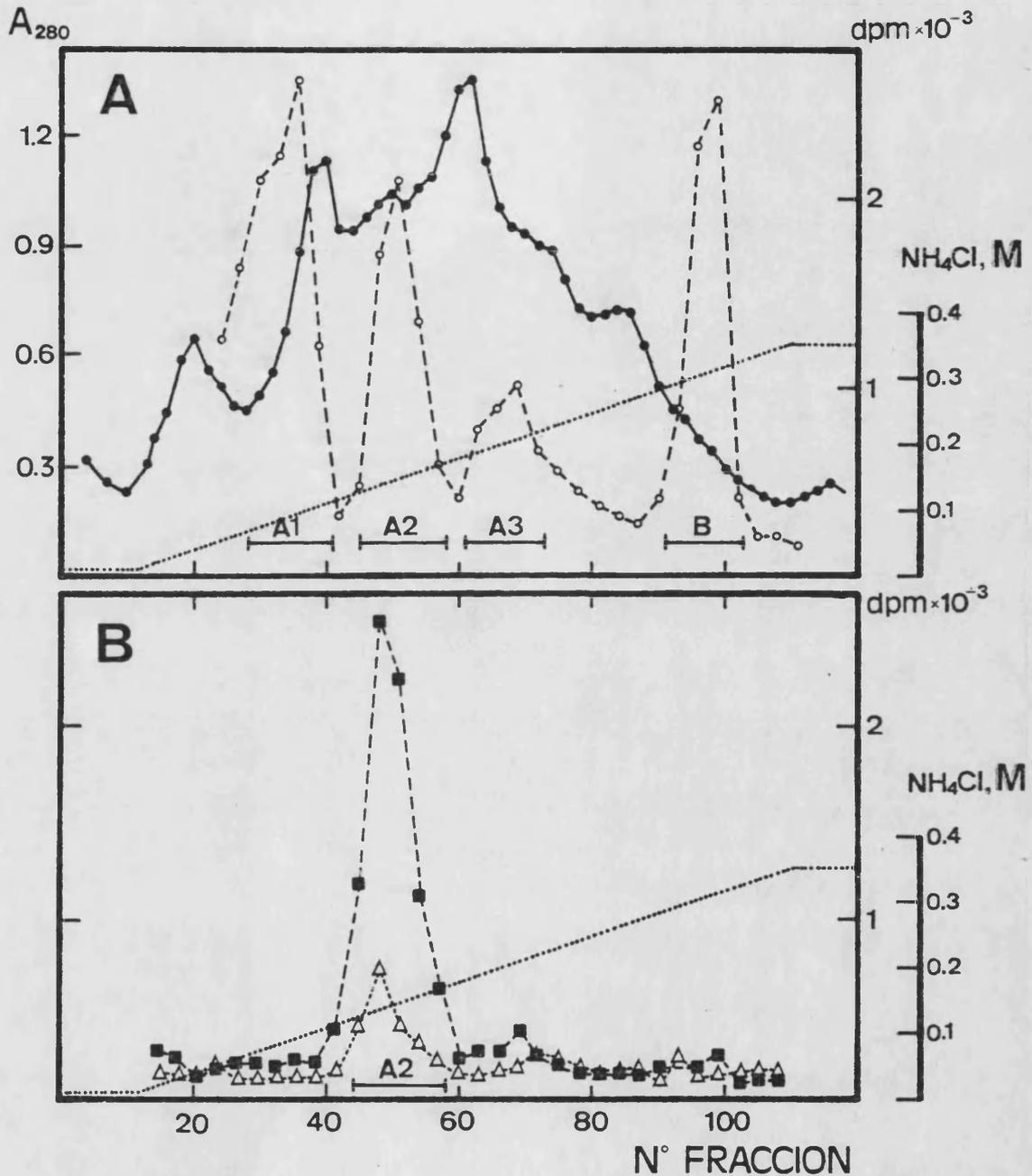


FIGURA 9. Perfil de elución de la cromatografía en DEAE-Sepharosa CL-6B de un extracto obtenido de 50 g de embriones de 62 h por ultracentrifugación en presencia de NH₄Cl 0.5 M. A) perfil de actividad frente a histonas libres. B) Las mismas fracciones se dializaron y se ensayaron frente a oligonucleosomas y cromatina de guisante. (●-●) A₂₈₀; (○-○) actividad HAT frente a histonas libres; (■-■) HAT sobre nucleosomas; (△-△) actividad frente a cromatina; (···) gradiente de NH₄Cl. Columna de 18 cm x 3 cm, 80 ml/h, 1200 ml de gradiente y fracciones de 12 ml.

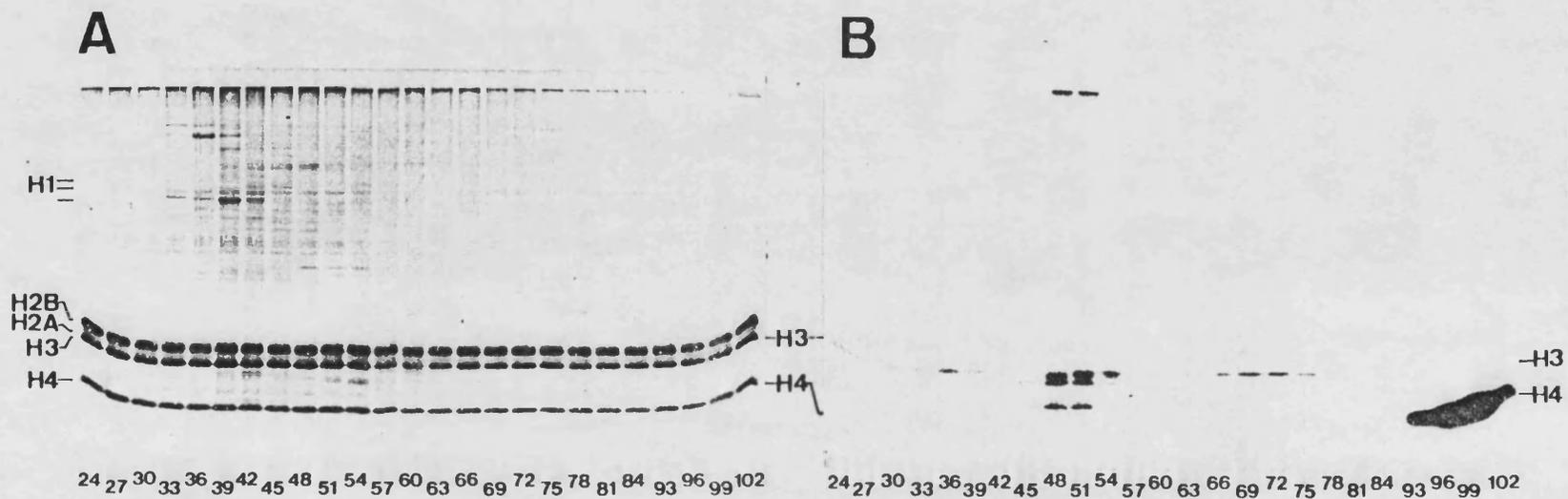


FIGURA 10. Especificidad de las actividades HAT obtenidas de DEAE-Sepharosa de la elución de la Figura 9. Las histonas de guisante incubadas con las distintas fracciones, se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. A) gel teñido con azul Coomassie. B) fluorograma. Los números corresponden a la fracción ensayada.

pico A2 puede identificarse como el enzima A obtenido por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y por precipitación con PEG 20%, dada su elución a 150 mM en NH_4Cl , su capacidad para aceptar nucleosomas como sustrato y su especificidad por H3 y dos polipéptidos de naturaleza desconocida que mueven entre H3 y H4 en la electroforesis en gel en presencia de SDS. Por otro lado, la extracción por ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M proporciona, después de la cromatografía en DEAE-Sepharosa, dos nuevos picos de actividad (A1 y A3) que no se detectan por los otros dos procedimientos. Es posible, por tanto, que la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y con PEG 20% produzcan la pérdida de las actividades HAT A1 y A3, debido quizás a una inactivación irreversible. También se observa que las HAT A2 y B se extraen por el método de ultracentrifugación en un estado mucho más activo que por los dos procedimientos anteriores, que suponen etapas de precipitación de proteínas. Así, por ejemplo, hemos comprobado, en varias extracciones realizadas, que partiendo de igual cantidad de embriones del mismo tiempo de germinación, se obtiene entre 2 y 3 veces más actividad HAT A2 y alrededor de 2 veces más HAT B por ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M que por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación. Esto parece significar que para las actividades HAT, las extracciones que emplean etapas de precipitación de proteínas pueden producir pérdidas en el nivel de actividad enzimática recuperada. Esto mismo también se ha observado para HAT en otros organismos (Wiktorowicz y Bonner, 1982; Wiegand y Brutlag, 1981). Con todo, se puede concluir que de los tres procedimientos de extracción utilizados la obtención de HAT de guisante, el que mejores resultados ha proporcionado es la homogeneización y ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M. Cabe señalar que este método no parece afectar a los niveles de actividad de los distintos enzimas, pues la actividad de los picos enzimáticos recuperados en distintas extracciones, con embriones de igual edad, es la misma.

Con objeto de averiguar si la concentración de NH_4Cl en el tampón de homogeneización y ultracentrifugación puede afectar a la extracción de los distintos enzimas, se realizó la siguiente experiencia. Inicialmente, el homogeneizado se obtuvo con tampón B' en ausencia de

NH_4Cl . Tras la ultracentrifugación, el sedimento, donde se encuentra ahora la mayor parte de la cromatina, se extrajo con el mismo tampón pero 0.5 M en NH_4Cl y se ultracentrifugó nuevamente. Se repitió la misma operación con tampón B' 1 M en NH_4Cl . Tras dializar los sobrenadantes obtenidos, se aplicaron en columnas de DEAE-Sepharosa que se eluyeron como se ha descrito en Material y Métodos. La Figura 11 muestra los resultados de esta experiencia. La extracción en ausencia de NH_4Cl produce fundamentalmente dos picos de actividad que eluyen a 100 y 300 mM en el gradiente de NH_4Cl . Estos picos pueden identificarse como HAT A1 e HAT B. También extracto se obtiene un pequeño pico que eluye entre 140 y 220 mM en NH_4Cl y que podría corresponder a parte de los enzimas A2 y A3 (Figura 11A).

El perfil de actividad obtenido de la reextracción del primer sedimento de la ultracentrifugación con tampón 0.5 M en NH_4Cl , muestra un solo pico de actividad que eluye a 150 mM en el gradiente de concentración salina y por ello puede identificarse como HAT A2 (Figura 11B). La reextracción con tampón 1 M, no manifiesta ninguna actividad enzimática en el eluido de DEAE-Sepharosa (Figura 11C). Por tanto, puede concluirse que la extracción a 0.5 M en NH_4Cl es suficiente para la obtención de las HAT de embriones de guisante, ya que la utilización de una concentración superior (1 M) no conduce a la obtención de una mayor actividad enzimática. Por otro lado, la concentración 0.5 M es necesaria, pues se requiere para la obtener la HAT A2. Probablemente, esta concentración salina provoca la disociación del enzima de la cromatina, la cual sedimenta en gran medida, en la ultracentrifugación. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos en distintos organismos por otros autores quienes han descrito la disociación de la HAT de la cromatina a 0.5 M en NaCl (Böhm *et al.*, 1980; Chicoine *et al.*, 1987), en KCl (Belikoff *et al.*, 1980) o a concentraciones ligeramente superiores, 0.6 M KCl (Fukushima *et al.*, 1980) o inferiores, 0.4 M NaCl (Candido, 1975; Travis *et al.*, 1984). Este comportamiento característico de la HAT A2 de embriones de guisante apoya aún más el supuesto de que se trata de un enzima nuclear o forma A de la HAT, descrita en muchos otros eucariotas (Doenecke y Gallwitz, 1982).

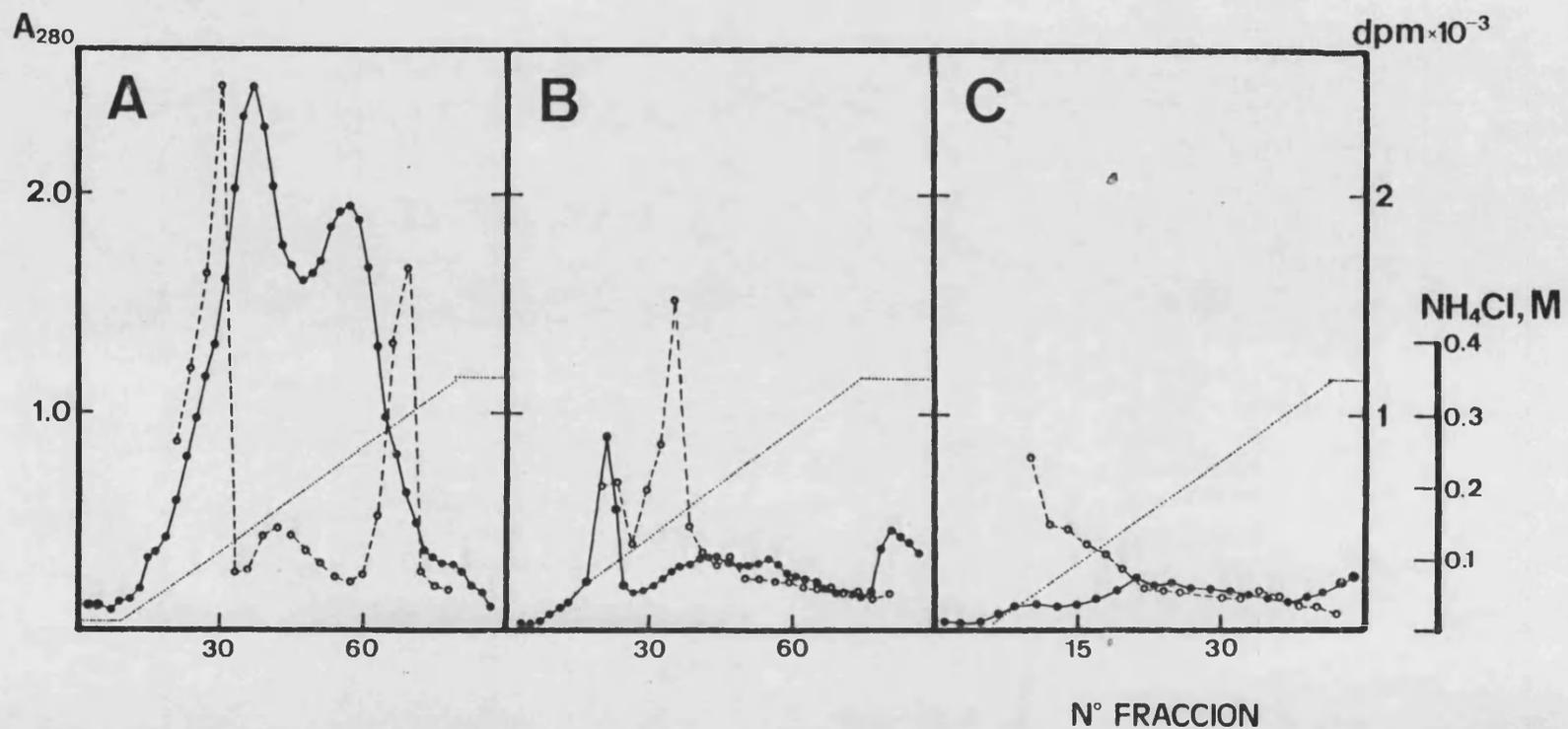


FIGURA 11. Extracción de HAT por ultracentrifugación con distintas concentraciones de NH_4Cl . Perfil de elución de la cromatografía en DEAE-Sepharosa de: A) sobrenadante de la ultracentrifugación en ausencia de NH_4Cl . B) sobrenadante de la ultracentrifugación después de llevar el sedimento anterior a 0.5 M en NH_4Cl . C) sobrenadante de la extracción en tampón B' 1 M en NH_4Cl . En A) se utilizó una columna de 16 cm x 2 cm, en B) de 7 cm x 2 cm y en C) de 3 cm x 2 cm. En A) y B) se eluyó con un gradiente de 350 ml a 30 ml/h (5 ml/fracción). En C) el gradiente fue de 120 ml a 15 ml/h (3.5 ml/fracción). (●—●) A_{280} ; (○--○) actividad HAT; (···) gradiente de NH_4Cl . Las gráficas están representadas a la misma escala.

El hecho de que las actividades A1 y B se obtengan por extracción en ausencia de NH_4Cl , sugiere que se trata de enzimas que en la célula se encuentran en forma libre. Cabía esperar este resultado similar para el pico B, pues como se ha indicado anteriormente, su especificidad por H4 así como su incapacidad para acetilar nucleosomas, sugerían que se trata de la forma B o citoplasmática de la HAT. Dado que el pico A1 tampoco acetila nucleosomas (Figura 9B) y que posee especificidad exclusiva por H3 (Figura 10) podemos suponer que este enzima es también una forma citoplasmática. De hecho las histonas H3 y H4 son acetiladas en el citoplasma antes de ensamblarse en nucleosomas (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Jackson *et al.*, 1976; Allis *et al.*, 1985; Chicoine *et al.*, 1986).

Los resultados obtenidos para la HAT A3 no permiten deducir de un modo claro cual es la concentración en NH_4Cl a la que se extrae, pues por un lado, este enzima siempre se obtiene con mucha menos actividad que las otras HAT (por ejemplo compárese el pico de actividad A3 con los otros picos enzimáticos en la Figura 9A) y por otro lado A3 puede coeluir parcialmente con A2, lo que dificulta que sea detectado.

3.2 CARACTERIZACION DE LAS HISTONA ACETILTRANSFERASAS

Las actividades enzimáticas obtenidas de la cromatografía en DEAE-Sepharosa, principalmente por el procedimiento de ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M, se purificaron por Ultrogel Aca34 y los picos de actividad eluidos se utilizaron para la caracterización de las distintas HAT de embriones de guisante.

3.2.1 MASA MOLECULAR

Mediante la cromatografía de exclusión molecular en Ultrogel Aca34 se consiguió una purificación de entre 3 y 5 veces, determinada como incremento en la actividad enzimática por unidad de masa de proteína. Además, esta cromatografía sirvió para determinar los valores aproximados de la masa molecular relativa de las distintas HAT, después del calibrado de la columna con patrones de masa molecular conocida. La

Figura 12 muestra los perfiles de elución de estas cromatografías. Los enzimas A1, A3 y B eluyeron como picos únicos correspondiéndoles valores de masa molecular relativa aproximada de 90000, 100000 y 160000, respectivamente. La actividad HAT A2 eluye de Ultrogel en dos picos que se corresponden con proteínas de aproximadamente 120000 y 50000 de masa molecular relativa. El estudio de especificidad de estos dos picos de actividad frente a las histonas indica que ambos acetilan a las mismas proteínas (Figura 13). Este resultado permite sugerir que la HAT A2 podría ser una proteína dimérica constituida por dos subunidades que probablemente son idénticas. Las dos formas, dímero y monómero, son catalíticamente activas. Travis *et al.* (1984) en levadura, han obtenido un resultado similar con una HAT nuclear. El enzima de levadura purificado tiene una masa molecular de 110000 Da y mediante electroforesis en gel se observa, invariablemente, una banda, a la que le corresponde una masa molecular de 55000 Da, en las fracciones que presentan actividad HAT. Estos autores han sugerido que el enzima debe estar constituido por dos subunidades idénticas de 55000 Da. La HAT A2 de embriones de guisante, probablemente, se disocia dando lugar a monómeros durante la concentración por ultrafiltración antes de aplicarse en la columna de Ultrogel. Luego, durante el desarrollo de la cromatografía, dímero y monómero se separan por exclusión molecular.

3.2.2 EFECTO DEL NH_4Cl

Dado que las actividades HAT se purifican parcialmente mediante cromatografía en DEAE-Sepharosa eluyéndose con concentraciones crecientes de cloruro amónico, se estudió la influencia de esta sal sobre las actividades enzimáticas, para lo cual, éstas se ensayaron a distintas concentraciones de NH_4Cl , entre 0 y 500 mM (Figura 14). Los valores de actividad enzimática se obtienen restando a la incorporación de radiactividad total, la correspondiente a los controles obtenidos por incubación de las mismas fracciones previamente inactivadas por calor (70°C, 10 min.). Las cuatro HAT se inhiben por el NH_4Cl a concentraciones superiores a 100 mM. Este efecto probablemente sea consecuencia del aumento de la fuerza iónica. En este sentido, las HAT descritas en otros eucariotas tie-

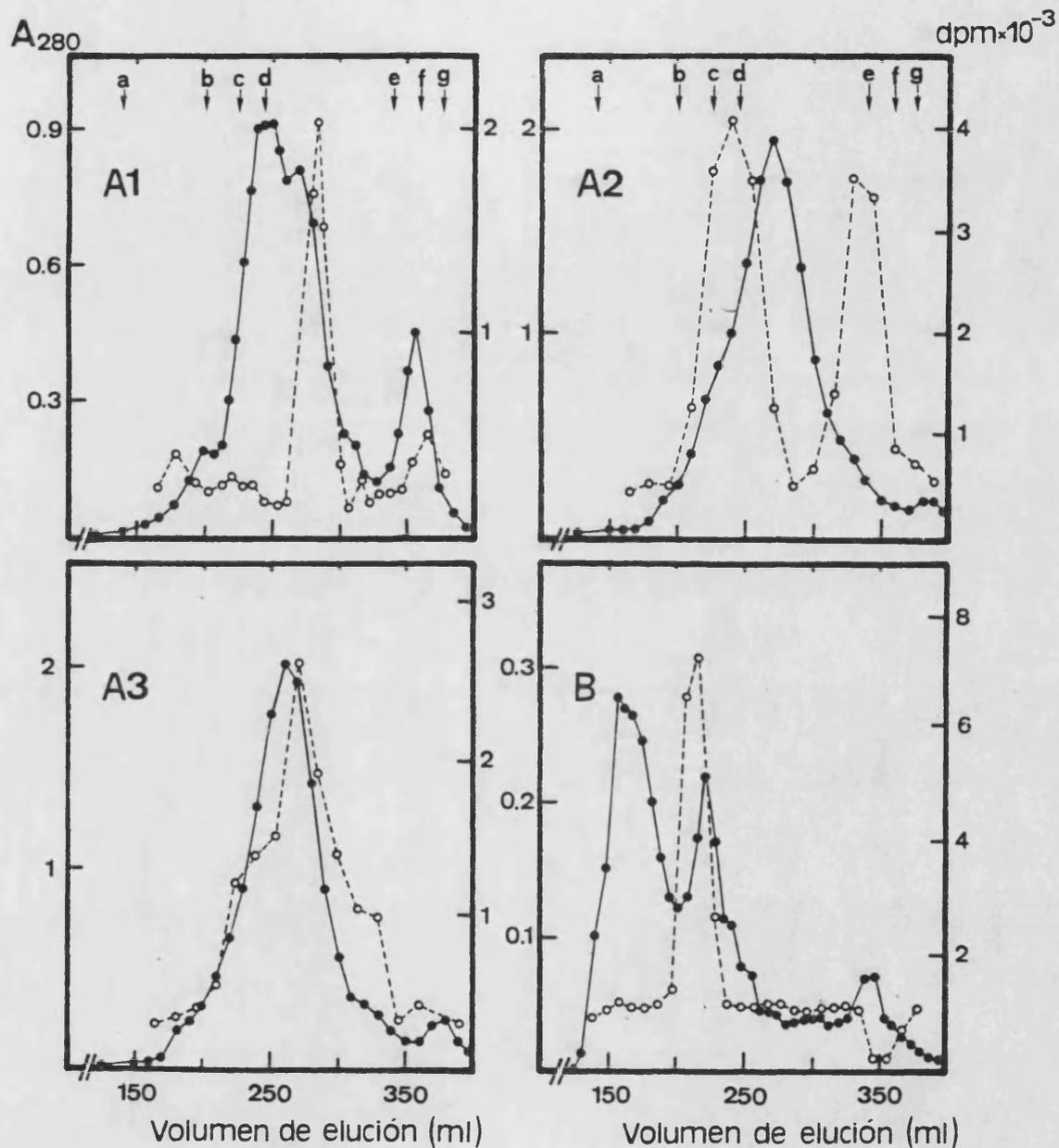


FIGURA 12. Perfiles de elución de las histona acetiltransferasas de guisante en Ultrogel AcA34. La columna (120 cm x 1.8 cm) equilibrada en tampón B 100 mM en NH_4Cl se eluyó a 12 ml/h y las fracciones recogidas se ensayaron directamente. (●—●) A_{280} ; (○--○) actividad HAT. Las flechas indican los volúmenes de elución de los marcadores de masa molecular. a, azul dextrano, Mr 2000000; b, catalasa de hígado de vaca, Mr 240000; c, aldolasa de músculo de conejo, Mr 158000; d, invertasa de levadura, Mr 120000; e, ovoalbúmina, Mr 45000; f, lisozima de huevo, Mr 14000 y g, rodamina, Mr 600.

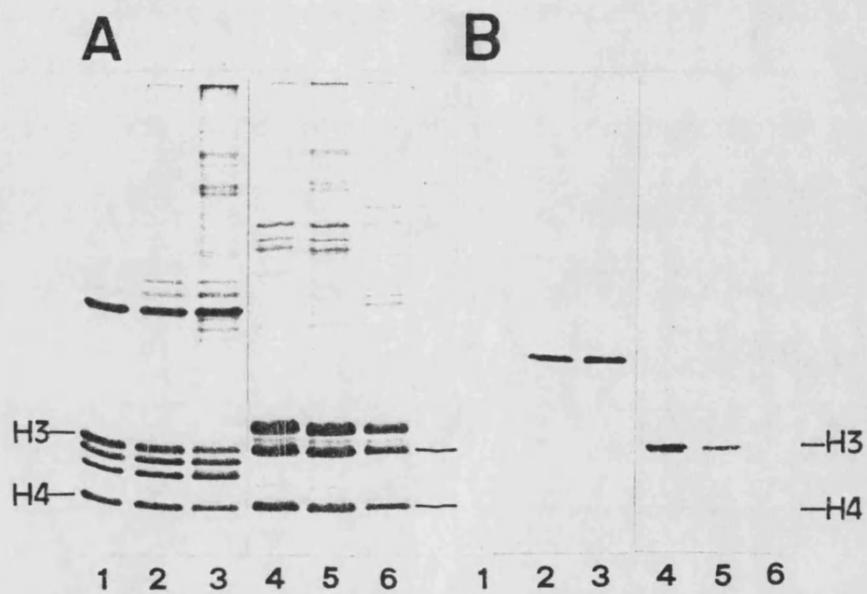


FIGURA 13. Especificidad de los picos de actividad obtenidos por cromatografía en Ultrogel ACA34 de la HAT A2 (Figura 12). Las histonas incubadas con las distintas fracciones se sometieron a electroforesis y posterior fluorografía. A) gel teñido con azul Coomassie. B) Fluorograma. 1 y 6, controles de acetilación no enzimática; 2 y 4, primer pico de la elución; 3 y 5, segundo pico. 1-3 histonas de eritrocito de pollo; 4-6 histonas de guisante.

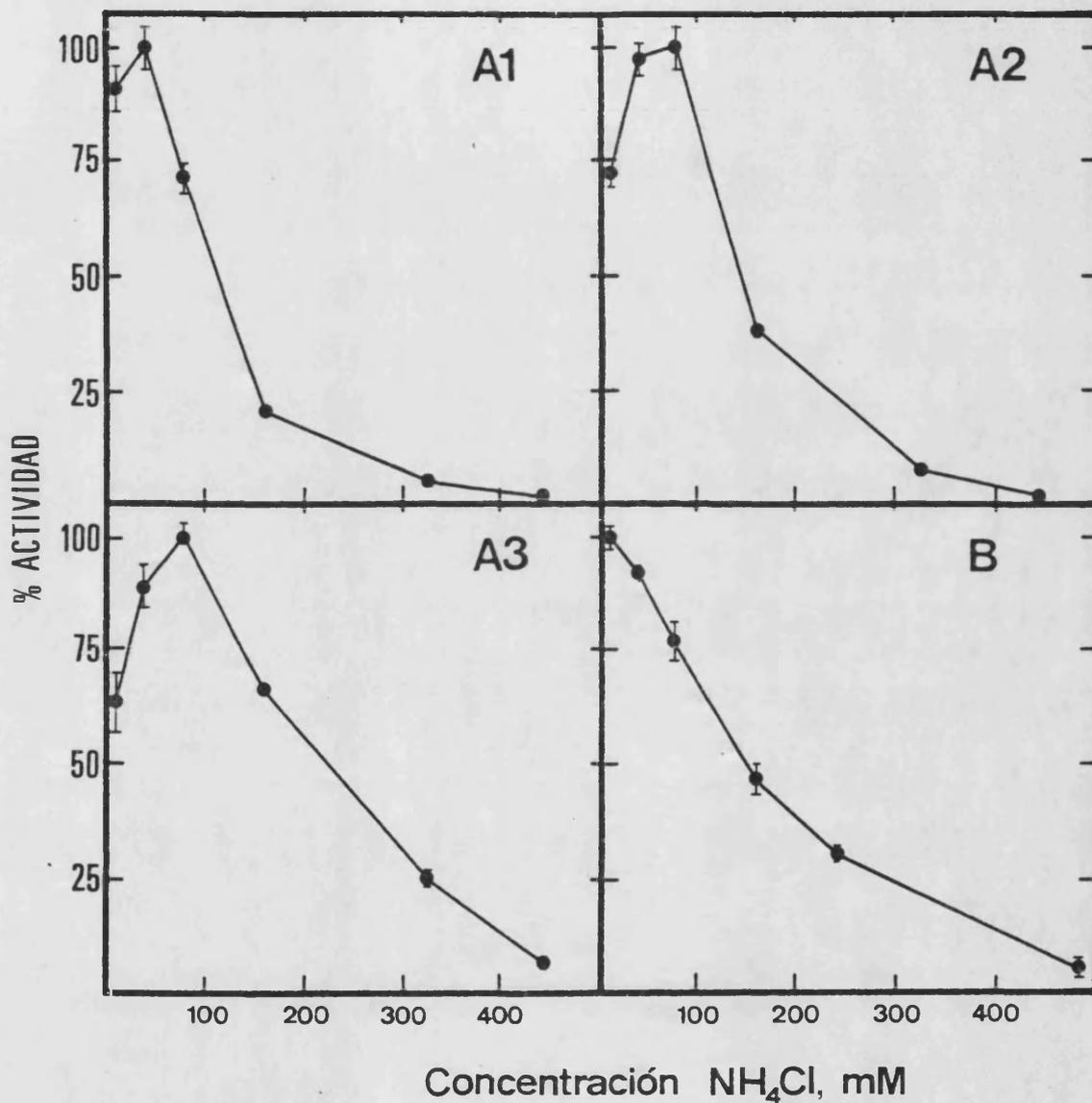


FIGURA 14. Efecto de la concentración de NH_4Cl sobre las actividades HAT de embriones de guisante. Los ensayos se realizaron utilizando histonas de eritrocito de pollo, a 37°C durante 20 min. La actividad está expresada como porcentaje relativo al máximo obtenido para cada enzima. Los puntos representan la media de tres ensayos independientes. Actividades máximas (dpm incorporadas enzimáticamente): A1 100% = 2765 ± 175 ; A2 100% = 3110 ± 324 ; A3 100% = 1100 ± 233 ; B 100% = 3314 ± 297 .

nen un comportamiento similar ya que todas ellas se inhiben por sales monovalentes a concentraciones superiores a 100-150 mM (Wiegand y Brutlag, 1981; Wong y Patton, 1985; Travis et al., 1984; Böhm et al., 1980). Esta inhibición es reversible y se recupera la actividad por diálisis. Esto mismo también ocurre con las HAT de embriones de guisante.

A concentraciones por debajo de 100 mM, el comportamiento de las HAT de guisante es diferente; así, la HAT B se inhibe desde el principio mientras que las HAT A1, A2 y A3 presentan máximos de actividad entre 40 y 80 mM. Esta activación a bajas concentraciones salinas también se ha observado en algunos organismos (Wiegand y Brutlag, 1981; Travis et al., 1984), aunque en otros el comportamiento es similar al que hemos encontrado con la HAT B de guisante, inhibiéndose por sales monovalentes progresivamente con concentraciones crecientes (Böhm et al., 1980; Garcea y Alberts, 1980). Como podemos observar en la Figura 14, la inhibición de las HAT de guisante por el NH_4Cl es más acusada en el caso de los enzimas A1 y A2, que se inhiben al 50% a 100 y 150 mM respectivamente, y no presentan prácticamente actividad a 300 mM. Las formas A3 y B se inhiben al 50% alrededor de 200 mM en NH_4Cl y conservan respectivamente, un 25 y 30% de la actividad a 300 mM.

3.2.3 INHIBICION POR COENZIMA A

El coenzima A es un producto de la reacción de acetilación, por ello se ha estudiado su efecto sobre las HAT. La Figura 15 muestra la inhibición de los enzimas de guisante por este reactivo. El comportamiento de las cuatro HAT frente a distintas concentraciones de coenzima A es diferente. Así, las HAT A1, A3 y B se inhiben al 50% a concentraciones de 25 μM o inferiores, mientras que la forma A2 requiere concentraciones de 250-300 μM . Esta inhibición es reversible con todas las HAT de guisante y ya que el coenzima A es un producto de la reacción, probablemente se trate de una inhibición competitiva. Travis et al. (1984) también han observado inhibición reversible por el coenzima A con una HAT de levadura, aunque en este caso el efecto era mayor, pues se obtenía un 80% de inhibición a una concentración de 20 μM .

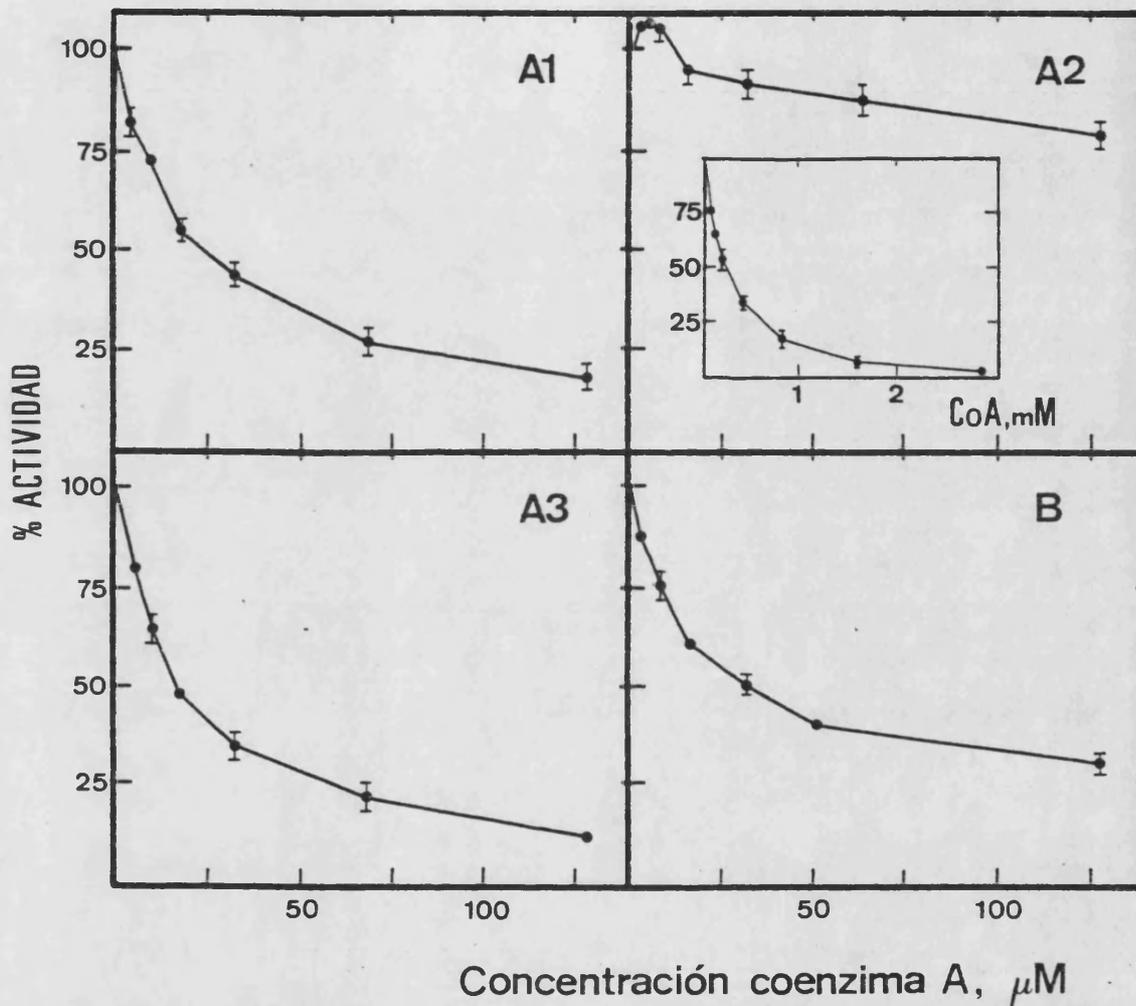


FIGURA 15. Inhibición de las actividades HAT por el Coenzima A. Para cada punto se realizaron los correspondientes controles de acetilación no enzimática, que se restaron a los valores obtenidos de radiactividad total incorporada. Los ensayos se realizaron por triplicado, en tampón B, 100 mM NH_4Cl , pH 7.9 a 37°C durante 20 min. La actividad está expresada como porcentaje respecto de la obtenida en ausencia de Coenzima A. Actividades máximas: A1 100% = 2333 ± 218 ; A2 100% = 3554 ± 203 ; A3 100% = 1501 ± 189 ; B 100% = 2866 ± 248 .

El distinto comportamiento de las HAT de embrión de guisante frente al coenzima A permite su diferenciación y ello constituye una prueba adicional de que se tratan de isoenzimas distintos.

3.2.4 EFECTO DE INHIBIDORES POTENCIALES DE LAS HAT

Con objeto de proteger a los enzimas de la degradación proteolítica, habitualmente muchos autores utilizan, durante la extracción y purificación de las actividades HAT en diversos organismos, inhibidores de proteasas. A fin de estudiar el efecto de algunos de estos inhibidores más frecuentemente utilizados, se ensayaron las distintas actividades HAT de embriones de guisante en presencia de estos inhibidores. Por otro lado, Alonso y Nelson (1986) han observado que los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} tienen un efecto inhibitor sobre la histona desacetilasa de levadura y han propuesto que esta propiedad puede servir para obtener histonas acetiladas al evitar su desacetilación, sobre todo en aquellos organismos donde el n-butilato no inhibe a las desacetilasas. Para la obtención de histonas hiperacetiladas sería además necesario que estos cationes no inhibiesen a las HAT. Por ello, se ha estudiado el efecto del Zn^{2+} y Cu^{2+} sobre las HAT de embriones de guisante. La Tabla I muestra los resultados del efecto de estos compuestos sobre las distintas HAT. Claramente, el $CuCl_2$ y el $ZnCl_2$ tienen un potente efecto inhibitor sobre todas las formas HAT de guisante. Estos cationes, además de inhibir a las actividades HAT, también inhiben a la acetilación química, pues la acetilación observada en los controles (con enzima inactivado) también era menor en presencia de estas sales. La razón de este doble efecto se desconoce.

Los inhibidores de proteasas poseen efectos diferentes, así el bisulfito sódico no afecta en absoluto a las formas A2 y A3 e inhibe sólo un 29% a las formas A1 y B, mientras que el PMSF tiene un efecto inhibitor más acusado afectando a las cuatro formas aunque con distinta extensión.

Podemos concluir que al menos para guisante el Zn^{2+} y el Cu^{2+} no deben utilizarse para provocar hiperacetilación de histonas, pues

TABLA I. Efecto de distintos inhibidores potenciales sobre las histona acetiltransferasas de embriones de guisante.

INHIBIDOR	% ACTIVIDAD			
	HAT A1	HAT A2	HAT A3	HAT B
Sin inhibidor	100	100	100	100
PMSF 5 mM	74	0	25	45
NaHSO ₃ 5 mM	71	100	102	71
CuCl ₂ 5 mM	10	0	0	0
ZnCl ₂ 5 mM	0	0	0	0

Los ensayos se realizaron por triplicado en tampón B 100 mM NH₄Cl, pH 7.9. Para cada punto se realizó el correspondiente control por inactivación por calor (70°C, 10 min). La actividad enzimática se obtuvo después de restar el valor medio obtenido del control. Las actividades máximas en dpm fueron: A1 100% = 3942±249; A2 100% = 1750±93; A3 100% = 592±22; B 100% = 1780±123.

estos cationes constituyen potentes inhibidores de las HAT. En cuanto a los inhibidores de proteasas, el PMSF tampoco debe ser utilizado durante la extracción de estas actividades.

En ocasiones las formas A y B de las HAT en otros organismos se han diferenciado por su distinta inhibición por el DNA (Libby, 1980; López-Rodas et al., 1985). Así López-Rodas et al. (1985), en levadura, han observado una ligera activación de la HAT A a bajas concentraciones de DNA (0-0.5 $\mu\text{g/ml}$) y una posterior inhibición a concentraciones mayores, mientras que la HAT B muestra una disminución continua de la actividad al incrementar la concentración de DNA. Con el fin de averiguar si el DNA afecta también a las HAT de guisante (lo que explicaría en parte la imposibilidad de medir actividad HAT en extractos crudos, como ya se ha comentado) y si el comportamiento de los distintos isoenzimas frente a cantidades variables de DNA es diferente, se realizaron experiencias con la HAT A2, enzima probablemente nuclear y con la HAT B, enzima casi con seguridad citoplasmático. Para estos ensayos se utilizaron histonas de "core" de eritrocito de pollo (sin H1 y H5, para evitar la precipitación de complejos DNA-histona) y DNA de esperma de salmón como se ha indicado en apartado 2.4.1 de Material y Métodos. La Figura 16 muestra los resultados de esta experiencia. Al igual que la HAT A de levadura (López-Rodas et al., 1985), la HAT A2 se activa ligeramente a bajas concentraciones de DNA, disminuyendo progresivamente después, al aumentar la concentración. La HAT B, prácticamente, se inhibe desde el principio al ir aumentando la cantidad de DNA. Así pues, las dos formas HAT de guisante ensayadas se inhiben considerablemente por un exceso de DNA (valores superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$) y pueden diferenciarse por su distinto comportamiento frente a concentraciones crecientes de DNA.

3.2.5 ACTIVIDAD FRENTE A DISTINTOS SUSTRATOS

La Tabla II muestra los resultados de la actividad de las HAT frente a distintos sustratos. Las cuatro HAT de embriones de guisante muestran especificidad hacia las histonas, ya que son éstas los sustratos más acetilados. Ninguna de las HAT acetila a la BSA ni al polí-

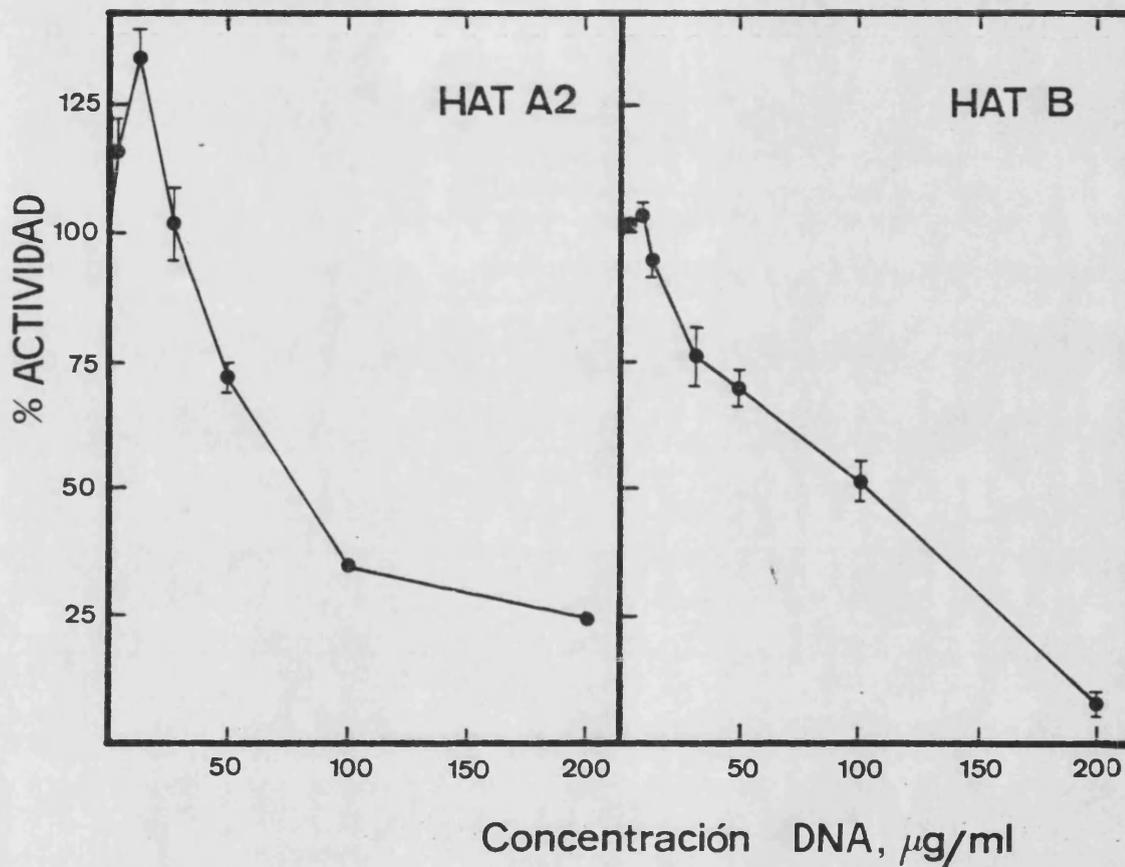


FIGURA 16. Efecto del DNA sobre las actividades HAT A2 y HAT B de embriones de guisante. El ensayo se realizó utilizando histonas de "core" de eritrocito de pollo. Cada punto es la media de 3 ensayos independientes y para cada uno de ellos se realizó el correspondiente control de acetilación no enzimática. La actividad se representa como porcentaje de la radiactividad incorporada enzimáticamente respecto al ensayo en ausencia de DNA. El 100% de actividad de cada enzima, expresado en dpm fue el siguiente: A2 = 1100±31; B = 6330±123.

TABLA II. Actividad de las histona acetiltransferasas de guisante sobre distintos sustratos.

SUSTRATO	% ACTIVIDAD			
	HAT A1	HAT A2	HAT A3	HAT B
Histonas de guisante	100	100	100	100
Histonas de eritrocito de pollo	249	126	159	46
BSA	2	0	3	3
Poli-L-Lisina	0	5	0	0
Sulfato de protamina	10	26	0	0
Espermina	5	0	1	24
Espermidina	0	0	0	13

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Como control de acetilación no enzimática se incubó la misma fracción inactivada por calor (70°C, 10 min) con los distintos sustratos. Los valores representan la actividad enzimática, obtenida después de restar la acetilación de los controles.

mero sintético poli-L-lisina, al menos en una extensión significativa. Tan sólo la HAT B acetila a las poliaminas espermina y espermidina, pero también aquí el grado de acetilación es mucho más pequeño que el obtenido con las histonas. Libby (1980) en núcleos de hígado de rata ha descrito actividades HAT que modifican tanto a las histonas como a la espermidina, pero son dos veces más activas sobre este último sustrato que sobre las propias histonas. Este no parece ser el caso de la HAT B de guisante, pues por un lado la acetilación sobre las poliaminas es mucho menor que sobre las histonas y por otro la HAT B aparentemente no es un enzima nuclear y por ello no es comparable a los resultados obtenidos por Libby (1980).

El sulfato de protamina, una proteína básica de bajo peso molecular rica en residuos de arginina, es acetilada aunque en pequeña extensión por las HAT A1 y A2.

Sólo la HAT B parece poseer mayor actividad sobre las histonas de guisante que sobre las histonas de eritrocito de pollo. Las otras tres formas A1, A2 y A3, acetilan mejor las histonas de eritrocito de pollo que las histonas homólogas, siendo este efecto muy acusado para el caso de la HAT A1. Se desconoce la razón de esta mayor actividad sobre las histonas de eritrocito de pollo.

3.2.6 ESPECIFICIDAD FRENTE A LAS DISTINTAS HISTONAS

La distinta especificidad de las HAT frente a las histonas permitirá por un lado, la identificación de los enzimas en posteriores extracciones y por otro apoyar la idea de que se tratan verdaderamente de isoenzimas distintos.

La Figura 17A muestra la especificidad, frente a histonas libres, de las cuatro HAT de embriones de guisante de 62h de germinación, obtenidas por ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M y purificadas por Ultrogel AcA34. Se puede observar que la HAT A1 acetila exclusivamente la histona H3 cuando se utilizan histonas de guisante como sustrato, como ya se ha comentado en el apartado 3.1.3. Sin embargo,

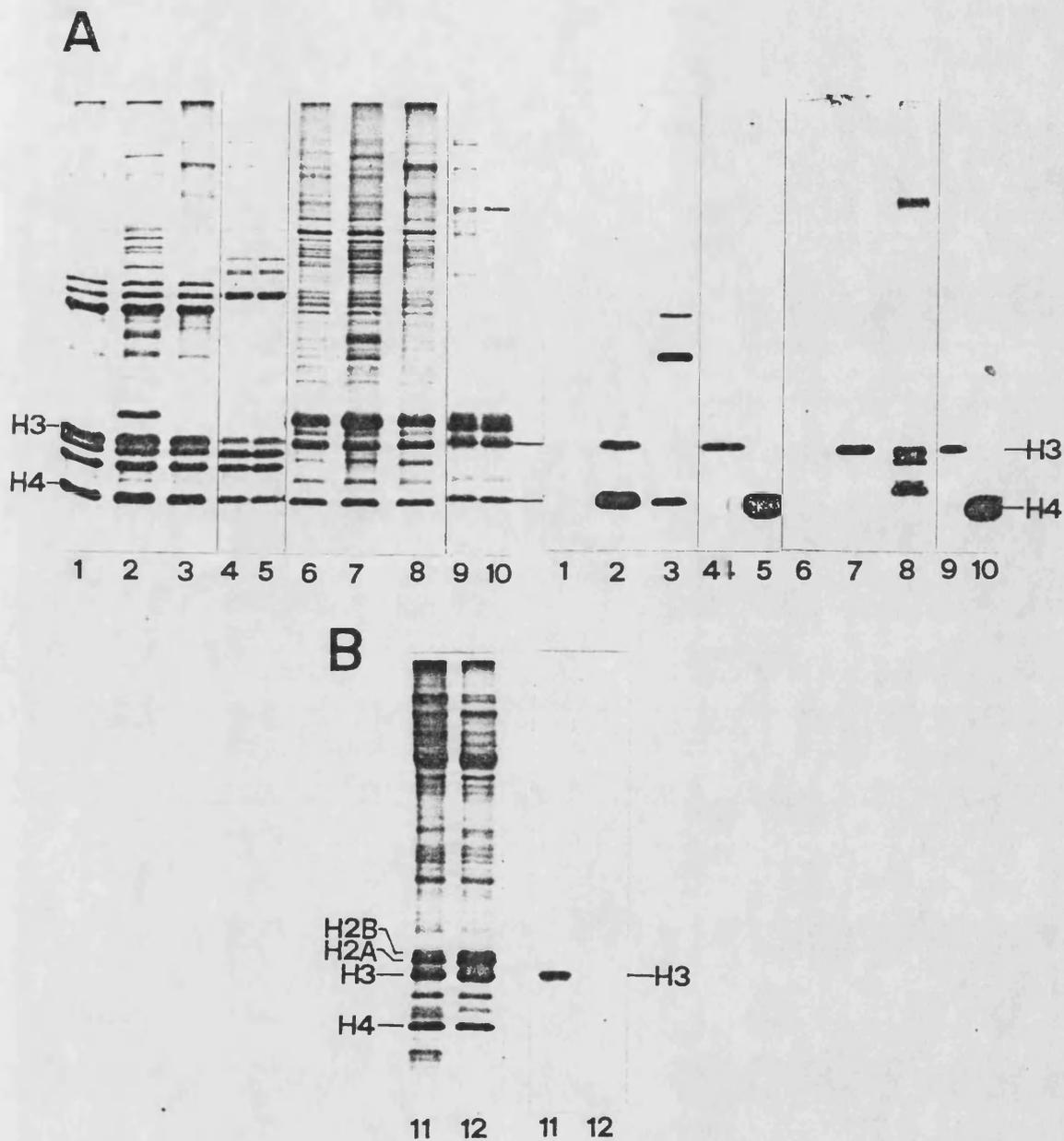


FIGURA 17. Especificidad de las HAT de embriones de guisante frente a las histonas. Después de la incubación las histonas se sometieron a electroforesis en gel de poliácridamida en presencia de SDS y posterior fluorografía. A) acetilación de histonas libres por las cuatro HAT. B) acetilación de histonas en nucleosomas por la HAT A2. Carreras 1-5, histonas de eritrocito de pollo; carreras 6-10, histonas de guisante; carreras 11 y 12, histonas de oligonucleosomas de guisante. 1, 6 y 12 son controles de acetilación no enzimática donde la fracción se sustituyó por tampón B.

cuando el sustrato son histonas de eritrocito de pollo, este enzima modifica H4 y en menor medida H3. Este diferente comportamiento frente a H4 es, en cierto modo, sorprendente pues la secuencia de aminoácidos de las H4 de guisante y de pollo son muy similares.

El enzima denominado HAT A2, acetila H3 y otros polipéptidos de naturaleza desconocida cuando se ensaya frente a histonas libres de guisante. El patrón de acetilación es diferente cuando se utilizan histonas de eritrocito de pollo, pues acetila H4 y otras proteínas de mayor masa molecular que no se han identificado. La HAT A2 es el único enzima de embriones de guisante, de los descritos en este trabajo, capaz de acetilar nucleosomas y cuando se utilizan éstos como sustrato, su especificidad es mucho mayor. Así, el enzima sólo modifica H3 cuando se ensaya frente a oligonucleosomas de guisante (Figura 17B).

La HAT A3 acetila exclusivamente a la histona H3 de guisante, como ya se ha mostrado en la Figura 10, y también presenta especificidad exclusiva por H3 cuando se ensaya frente a histonas de eritrocito de pollo. Del mismo modo, la histona H4 es el único blanco de acetilación de la HAT B, tanto cuando se ensaya con histonas homólogas como cuando las histonas son de eritrocito de pollo.

El comportamiento diferencial de las actividades HAT descritas frente a inhibidores y frente a sustratos no histonas y, fundamentalmente, los resultados de especificidad hacia las distintas histonas, mostrados en este apartado, indican que se tratan de cuatro formas isoenzimáticas HAT diferentes. Sólo en otros dos organismos se han descrito cuatro actividades HAT. Yukioka *et al.* (1984), en hígado de rata, han descrito dos HAT nucleares y otras dos citoplasmáticas, que se diferencian por su especificidad frente a las histonas. En *Saccharomyces cerevisiae*, López-Rodas (1987) encuentra cuatro actividades isoenzimáticas HAT que se diferencian también por su especificidad frente a las histonas. En estos dos trabajos, alguna de las HAT utilizan a las histonas H2A o H2B como sustrato. Sin embargo, en guisante ninguna de las actividades HAT es capaz de acetilar a estas histonas. Como han señalado Garcea y

Alberts (1980), la especificidad de las HAT en ensayos "in vitro" utilizando histonas libres puede ser distinta a la que tiene lugar "in vivo". En este sentido, es posible que alguna de las HAT de guisante descrita en este trabajo "in vivo" pueda acetilar a las histonas H2A y H2B. De hecho, "in vivo" estos dos tipos de histona parece que sólo son acetiladas en cromatina y no en forma libre (Allis et al., 1985; Loidl y Gröbner, 1987b; Loidl, 1988) y así los enzimas sólo reconocerían a estas histonas como sustrato cuando formaran parte de la cromatina.

El hecho de que las histonas de guisante presenten un nivel de acetilación muy bajo (Delange et al., 1969) ha permitido realizar experiencias encaminadas a determinar el número de posiciones modificadas por las HAT. Esto resulta particularmente sencillo con la HAT B, ya que sólo acetila a la histona H4, la cual, además de no presentar variantes, se obtiene más fácilmente en forma pura que el resto de las histonas. Para esta experiencia se purificó H4 de guisante mediante cromatografía en Biogel P-100 como describe Spiker (1982). La H4 purificada se incubó distintos tiempos con el enzima B y acetil-CoA en las condiciones descritas en Material y Métodos. Tras eliminar el exceso de acetil-CoA, la histona H4 con distintos grados de acetilación se sometió a electroforesis en presencia de acético-urea-Triton, que consigue la separación de las distintas formas acetiladas. La Figura 18 muestra los resultados de esta experiencia y de ella se puede concluir que la HAT B modifica hasta 3 posiciones en la histona H4, ya que la forma triacetilada se acumula con el tiempo de incubación. El enzima B, en la mayoría de organismos en los que se ha estudiado, se ha relacionado con la acetilación de la histona H4 previa a su ensamblaje en nucleosomas, aunque sólo en algunos casos se ha determinado el número de posiciones modificadas en esta histona al depositarse en la cromatina. En Tetrahymena (Allis et al., 1985; Richman et al., 1988), la histona H4 se modifica por una HAT tipo B hasta un estado diacetilado, y en esta forma se ensambla en la cromatina. Es posible que en guisante, el estado triacetilado de H4 producido por el enzima B sea la forma en la que la histona H4 se ensambla en nucleosomas, a diferencia de los datos que se poseen de otros eucariotas.

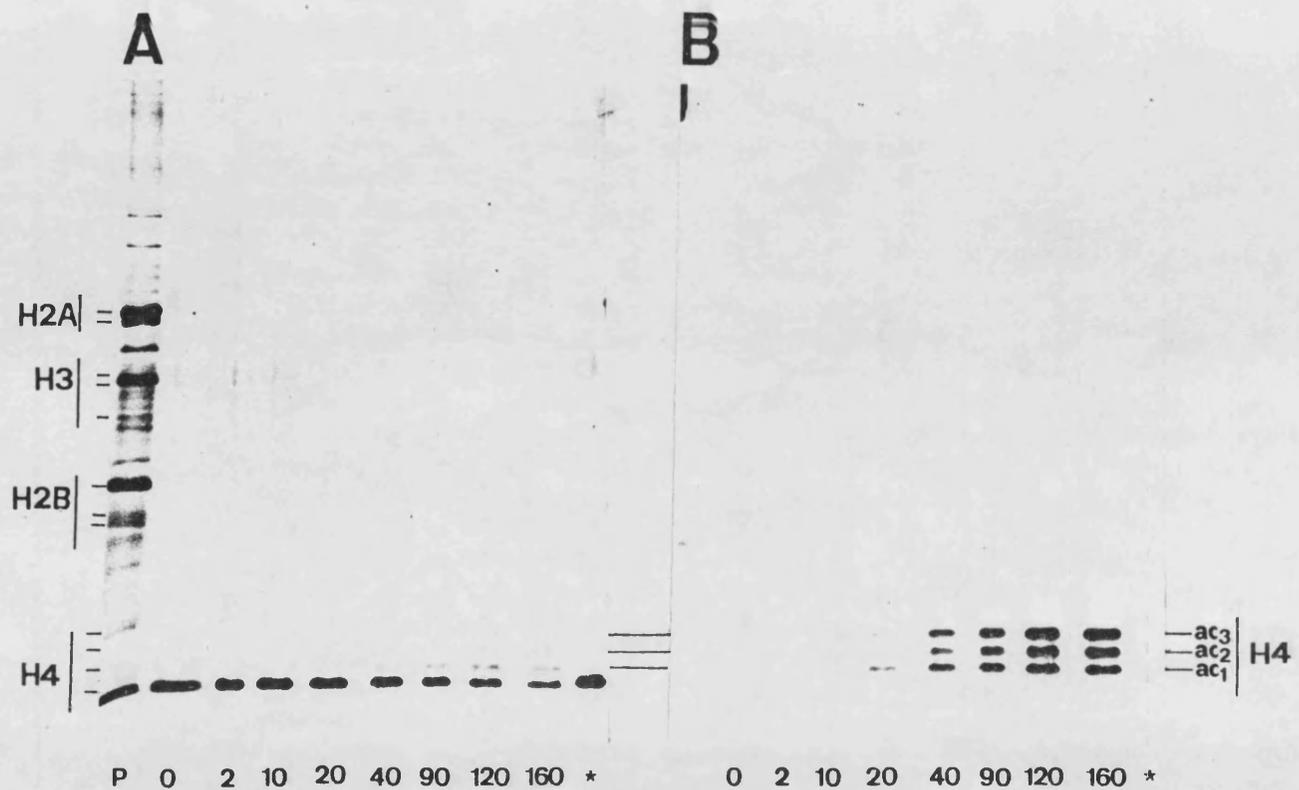


FIGURA 18. Determinación del número de posiciones modificadas sobre la histona H4 por la HAT B. Después de la incubación, la H4 acetilada se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de ácido acético-urea-Triton. A) gel teñido con azul Coomassie. B) fluorograma. Las cifras indican el tiempo de incubación en minutos. * constituye un control de acetilación no enzimática donde la fracción se inactivó por calor (70°C, 10 min) y se incubó el tiempo más largo. P, es un patrón de histonas totales de guisante.

La mayor dificultad en la purificación de la histona H3 de guisante y la menor movilidad electroforética de esta histona en geles de poliacrilamida en presencia de ácido acético-urea-Triton, y por tanto la baja resolución de las formas acetiladas, ha impedido obtener resultados respecto al número de posiciones modificadas por las HAT A, como se ha hecho con la HAT B. Un problema adicional, que no se presenta con la H4, es la existencia de variantes de H3 cuyas movilidades en este sistema electroforético son similares (Rodrigo, M.I. y Franco, L., comunicación personal), lo cual dificulta la identificación e interpretación de las bandas en el gel teñido y en el fluorograma. Así, sólo ha sido posible determinar qué variantes de H3 son acetiladas por la HAT A3, enzima que es altamente específico por esta histona (Figura 17). Esto no se ha conseguido con la HAT A1 debido probablemente a su baja actividad sobre histonas homólogas, ni tampoco con la HAT A2 debido a la acetilación, además de H3, de otros polipéptidos de naturaleza desconocida que impidieron la acumulación de H3 en forma hiperacetilada y la interpretación de los fluorogramas. La Figura 19 muestra la acetilación producida por la HAT A3 sobre las histonas de guisante. En esta experiencia, se incubaron histonas totales con fracciones purificadas de la HAT A3, diferentes tiempos. Después de la separación de las histonas por electroforesis se realizó la correspondiente fluorografía. En la Figura 19 puede verse claramente, cómo las cuatro variantes de la histona H3 descritas (Rodrigo, M.I. y Franco, L.) son acetiladas por la HAT A3. El análisis densitométrico ha mostrado que las cuatro formas de la histona H3 se acetilan por igual, sin preferencia por ninguna de ellas.

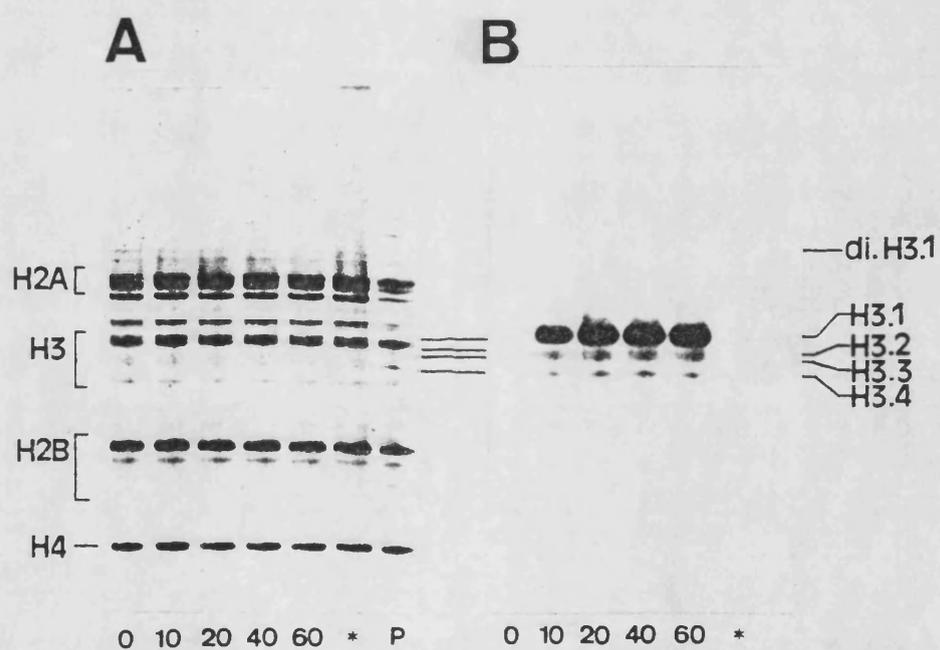


FIGURA 19. Acetilación de las variantes de la histona H3 por la HAT A3. A) gel teñido con azul Coomassie. B) fluorograma. Las cifras indican el tiempo de incubación. * es un control donde el extracto enzimático se inactivó por calor y se incubó con las histonas y acetil-CoA marcado el tiempo más largo. P, es un patrón de histonas de guisante. Las condiciones de electroforesis fueron las mismas que las descritas en la Figura 18.

3.3 EXTRACCION, PURIFICACION PARCIAL Y CARACTERIZACION DE ACTIVIDADES HISTONA DESACETILASA DE GUISANTE

Las actividades HD se han obtenido por ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M, (apartado 2.2.3 de Material y Métodos), que es el que mejores resultados ha proporcionado para las actividades HAT. Como sustrato se han utilizado histonas de eritrocito de pollo marcadas biológicamente, comprobándose que no existe desacetilación no enzimática de estas histonas en las condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica, etc... utilizadas en este trabajo. Como primer paso de purificación de las HD, el extracto crudo dializado se aplicó en una columna de DEAE-Sepharosa y se eluyó en las mismas condiciones que se han descrito para las HAT. A diferencia de lo que ocurre con la actividad HAT, se detecta actividad HD en los extractos crudos, si bien se ha observado que la actividad HD total, después de la cromatografía en DEAE-Sepharosa, es alrededor de 2.5 veces mayor que la encontrada en los extractos antes de este paso de purificación. Esto probablemente sea debido a la presencia de algún factor inhibidor que es eliminado en esta cromatografía. Vidali et al. (1972), en timo de ternera, también han observado una inhibición reversible similar de la HD.

La Figura 20 muestra el perfil de elución de la cromatografía en DEAE-Sepharosa. Al igual que ocurre con las HAT, no se ha detectado actividad HD en el lavado de la columna. Los enzimas HD quedan retenidos en el intercambiador aniónico y eluyen todos ellos en el gradiente 10-350 mM en NH_4Cl . La actividad desacetilasa se resuelve en tres picos designados como HDO, HD1 y HD2, eluyendo respectivamente a 150, 200 y 300 mM en NH_4Cl . Los picos HD1 y HD2 contienen la mayor parte de la actividad enzimática aparente, pero el pico HDO se detectó siempre en todos los experimentos en los que se utilizaron embriones de 62h de germinación.

Las fracciones correspondientes a los tres picos, señalados por una barra en la Figura 20, se reunieron, se concentraron las proteínas por ultrafiltración y se sometieron a una purificación por cromatografía.

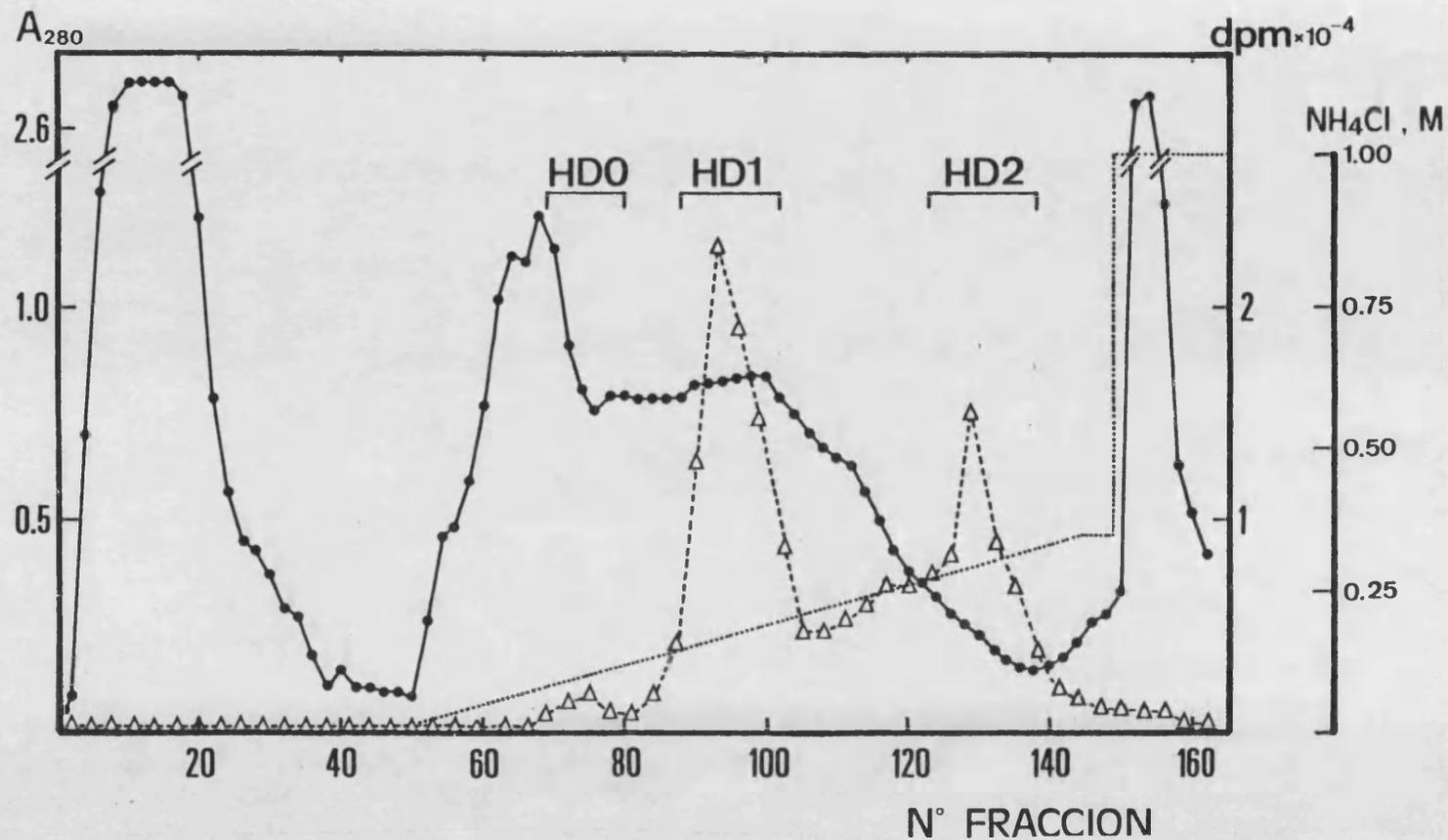


FIGURA 20. Perfil de elución de la actividades HD de guisante de la cromatografía en DEAE-Sepharosa CL-6B. El extracto crudo (60 g de embriones de 62 h) se aplicó en la columna (18 cm x 3 cm) y tras lavar con tampón B, se eluyeron las proteínas retenidas con un gradiente lineal de NH₄Cl (10-350 mM). Después se aplicó tampón B 1 M en NH₄Cl. La elución se llevó a cabo a 70 ml/h, recogiendo fracciones de 12 ml. (●—●) A₂₈₀; (Δ--Δ) actividad HD; (···) gradiente NH₄Cl. Las fracciones eluidas a 1 M en NH₄Cl se dializaron frente a tampón B antes de su ensayo.

fía de exclusión molecular en Ultrogel AcA34. Esta cromatografía consiguió un incremento de 3 veces en la actividad enzimática específica de las HD. Las tres actividades HD eluyeron de Ultrogel como picos únicos (ver más adelante) y las fracciones correspondientes a estos picos enzimáticos se utilizaron para investigar las propiedades de las distintas HD.

Como se ha hecho con las HAT, se ha estudiado también la extracción de actividades HD en presencia de distintas concentraciones de NH_4Cl . La Figura 21 muestra los resultados de esta experiencia, la cual se realizó del mismo modo que se ha descrito para las HAT. Alrededor del 85% de la actividad total se extrae en ausencia de NH_4Cl (Figura 21A), detectándose las tres actividades HD. La reextracción con tampón B' 0.5 M en NH_4Cl produce la obtención de un 10% de la actividad total (Figura 21B), fundamentalmente correspondiente a HD1 y HD2. La reextracción con tampón B' 1 M en NH_4Cl sólo permite obtener un 5% de la actividad total (Fig. 21C). Esto significa que la concentración 0.5 M en NH_4Cl es suficiente para la obtención de la mayor parte de la actividad HD (>95%) presente en embriones de 62h y por tanto ésta fue la concentración que se escogió para la obtención de HD en posteriores extracciones. Por otro lado, los resultados de esta experiencia sugieren que las tres actividades se encuentran, en su mayor parte, no asociadas a la cromatina, pues se extraen a una fuerza iónica baja (Fig. 21A). Sólo una pequeña fracción de la actividad HD1 y HD2 parece estar asociada al sedimento de la primera ultracentrifugación, en el cual se encuentra la mayoría de la cromatina. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Alonso y Nelson (1986) en levadura. La actividad HD descrita por estos autores parece encontrarse, al menos parcialmente, en forma nativa libre.

3.3.1 MASA MOLECULAR

Se ha determinado la masa molecular relativa de las tres actividades HD mediante cromatografía de exclusión molecular en Ultrogel AcA34. La Figura 22 muestra los perfiles de elución de los tres enzimas en este sistema cromatográfico. La actividad HD0 se recuperó a un volumen de elución correspondiente a una masa molecular relativa cercana a

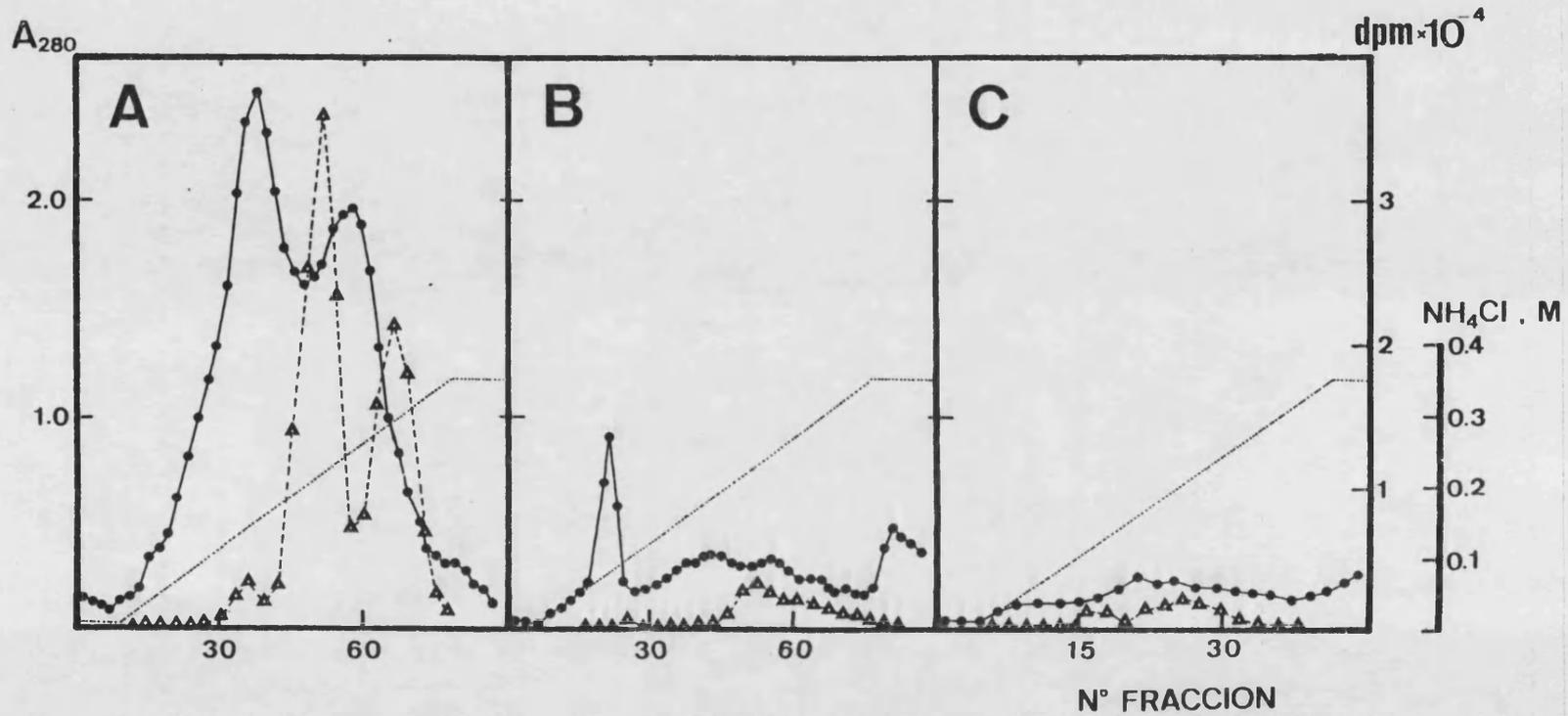


FIGURA 21. Extracción de actividades HD por ultracentrifugación a distintas concentraciones de NH_4Cl . La experiencia se realizó como se indica en el pie de la Figura 11. A) extracción en ausencia de NH_4Cl . B) reextracción con 0.5 M en NH_4Cl . C) reextracción con 1 M. (●---●) A_{280} ; (▲---▲) actividad HD; (···) gradiente de NH_4Cl .

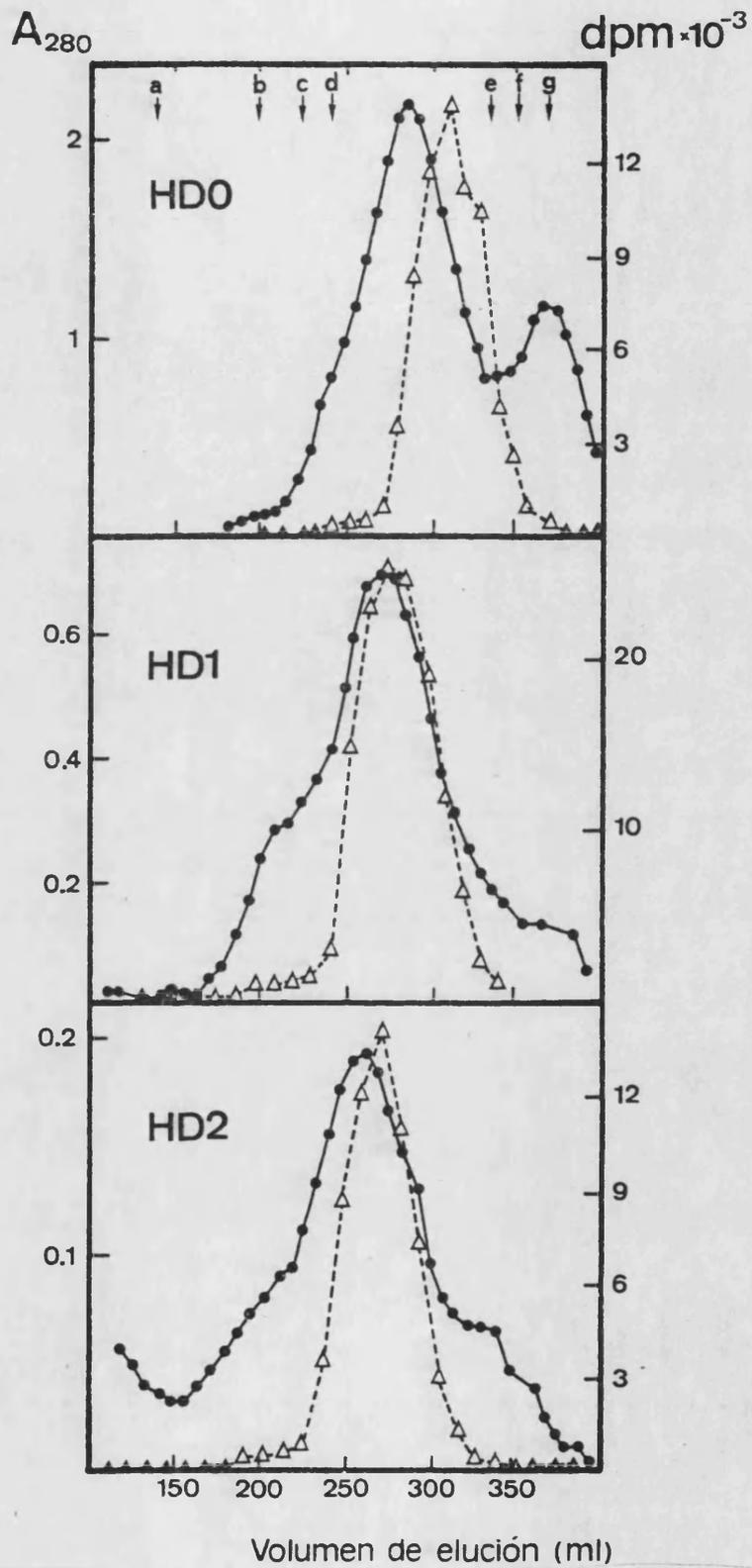


FIGURA 22. Elución de las tres HD de embriones de guisante en Ultrogel Aca34. La cromatografía y el calibrado de la columna se realizó como se indica en la Figura 12. (●—●) A_{280} ; (Δ--Δ) actividad HD.

90000, mientras que las actividades HD1 y HD2 parecen estar asociadas a polipéptidos de Mr alrededor de 100000. Estos valores son ligeramente inferiores al descrito por Vidali et al. (1972) para una HD de timo de ternera (Mr≈150000) y se diferencian mucho de los valores obtenidos por Kikuchi y Fujimoto (1972), también en timo de ternera (Mr 300000-500000) y por Vu et al. (1987) en levadura (Mr≈1000000). Probablemente, estos valores de masa molecular elevados representan a la HD formando parte de complejos con DNA y con proteínas cromosomales no histona (Hay y Candido, 1983a). Las histona desacetilasas de guisante podrían ser formas libres, no asociadas a complejos y de ahí su menor masa molecular.

3.3.2 EFECTO DE LA FUERZA IONICA

La fuerza iónica afecta de modo diferencial a las tres actividades HD (Figura 23). Mientras la HD1 presenta un margen estrecho de concentraciones óptimas, en NH_4Cl , cercano a 200 mM, la HD2 muestra un intervalo mucho mayor, prácticamente desde 100 a 400 mM. El comportamiento del enzima HD0 es muy diferente, su actividad disminuye rápida y continuamente al aumentar la fuerza iónica.

3.3.3 EFECTO DE INHIBIDORES POTENCIALES DE LAS HD

Se sabe que los ácidos grasos de cadena corta, especialmente el n-butirato, son potentes inhibidores de las HD de vertebrados, tanto "in vivo" como en ensayos "in vitro" (Candido et al., 1978; Sealy y Chalkley, 1978; Cousens et al., 1979). Sin embargo, la inhibición por n-butirato no parece ser un fenómeno generalizado a las HD de todos los eucariotas, pues el butirato afecta poco a la actividad HD de Physarum (Waterborg y Matthews, 1982b) y no inhibe, como tampoco lo hace el propionato, a la desacetilasa de levadura (Alonso y Nelson, 1986). Para investigar el efecto de estos ácidos grasos de cadena corta sobre las actividades HD de guisante, se incluyeron estos inhibidores potenciales en los ensayos enzimáticos. Como se ha descrito en Material y Métodos, con objeto de facilitar la interpretación de los resultados, la fuerza iónica en estos ensayos se mantuvo constante, añadiendo las cantidades apropiadas

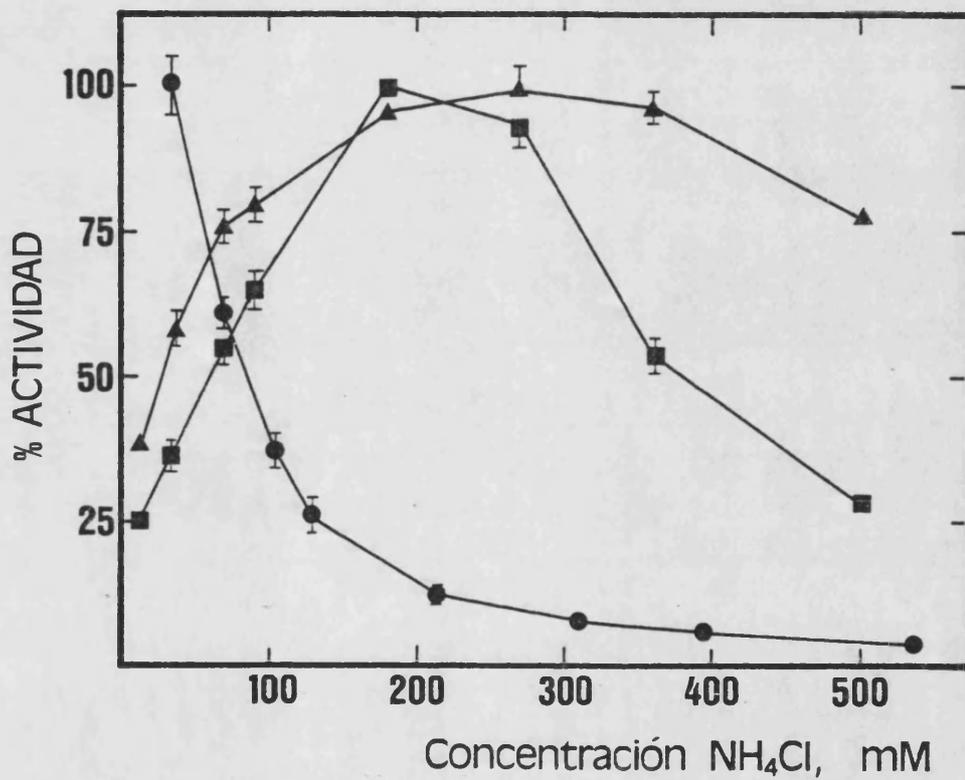


FIGURA 23. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de las desacetilasas de embriones de guisante. (●) HD0; (■) HD1; (▲) HD2. La actividad se expresa como porcentaje relativo al máximo alcanzado por cada enzima en esta experiencia. Los puntos representan la media de 3 ensayos independientes. Actividades máximas expresadas como dpm liberadas: HD0 100% = 31110 ± 215; HD1 100% = 16014 ± 198; HD2 100% = 4307 ± 201.

de NH_4Cl . Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24. El n-butirato no tiene ningún efecto sobre la HD1 y sólo causa una ligera inhibición de la actividad HD0 y de la HD2, pero en ningún caso, el efecto del butirato sobre las desacetilasas de guisante es comparable al que tiene lugar sobre HD de vertebrados. Así, la HD2, el enzima de guisante más sensible al butirato, conserva el 60% de su actividad en presencia de butirato 50 mM, mientras que este inhibidor a una concentración 5 mM causa una disminución del 98% de la actividad histona desacetilasa en animales superiores (Cousens *et al.*, 1979).

El acetato, sin embargo, es un potente inhibidor de las HD de embriones de guisante. En la Figura 24 se puede observar una inhibición del 50% a concentraciones de acetato de 2, 6, y 7.5 mM, para la HD0, HD1 y HD2 respectivamente. Las HD1 y HD2 se comportan de modo similar, siendo la HD0 mucho más sensible al acetato, ya que a una concentración de 16 mM se observa un 90% de inhibición de la actividad enzimática.

Las tres actividades HD de guisante se comportan frente al propionato de forma muy semejante, alcanzándose el 50% de inhibición a una concentración de propionato cercana a 25 mM para los tres enzimas. El efecto de este inhibidor es intermedio entre el que provoca el acetato y el butirato, y esta inhibición podría explicarse en función de la semejanza estructural con el acetato.

Las HD de embriones de guisante se parecen a la desacetilasa de Physarum (Waterborg y Matthews, 1982b) y a la de levadura (Alonso y Nelson, 1986) en que son sólo ligeramente inhibidas por el n-butirato. En este sentido, las histonas desacetilasas de plantas y de hongos difieren considerablemente de las de animales vertebrados. Arfmann y Haase (1981) encontraron un aumento de las formas acetiladas de H4 al incubar cultivos de Nicotiana tabacum en presencia de butirato 5mM. No sabemos si la pequeña inhibición "in vitro", causada por el butirato a una concentración 5 mM sobre la HD0 y sobre la HD2 podría ser responsable de la acumulación de histonas acetiladas. De cualquier modo,

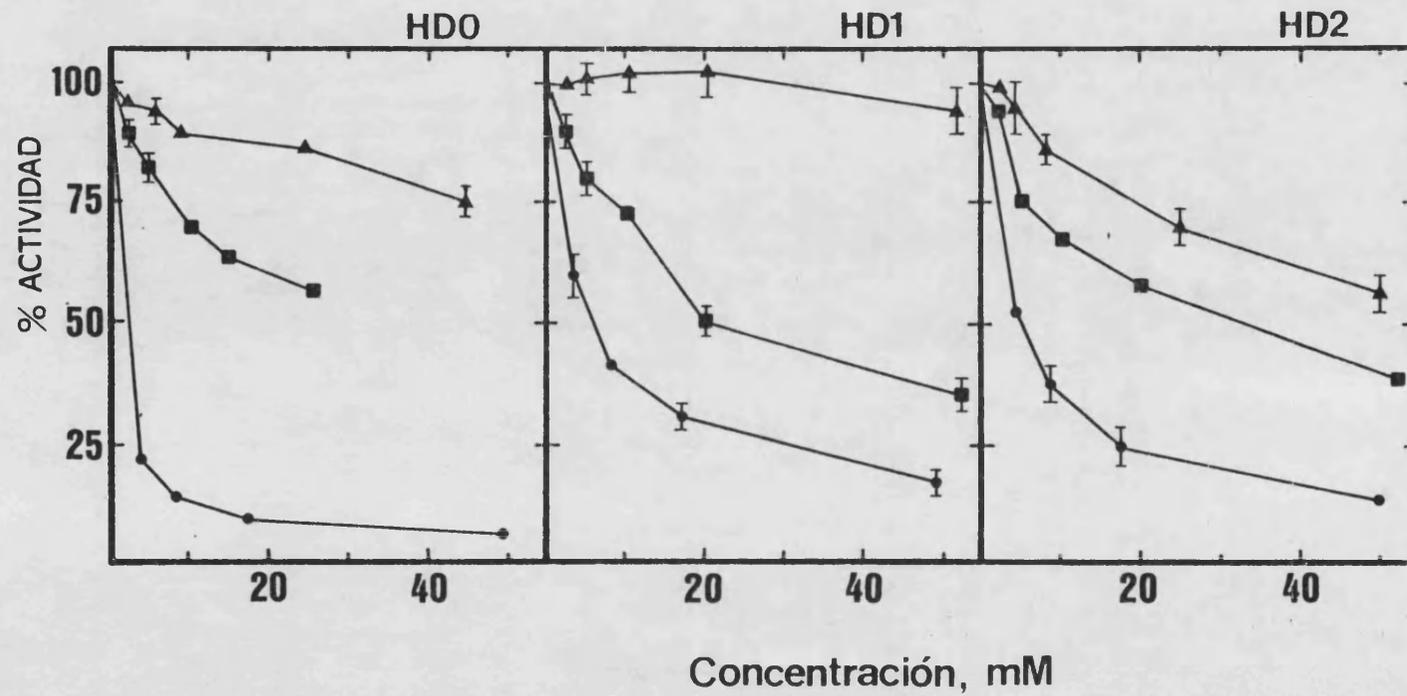


FIGURA 24. Efecto del n-butyrate, propionato y acetato sobre las actividades HD de guisante. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración de inhibidor, a 37°C durante 60 min. (●) acetato; (■) propionato; (▲) butirato.

la situación "in vivo" debe ser bastante diferente de las condiciones "in vitro" utilizadas en este trabajo. Alonso y Nelson (1986), para explicar la insensibilidad "in vitro" de la HD de levadura frente al butirato, han sugerido que este inhibidor podría interaccionar con una subunidad reguladora de la HD que podría perderse durante el aislamiento del enzima. Esta misma explicación puede ser igualmente válida para las actividades HD de guisante. Por otro lado, el acetato inhibe marcadamente a las HD de embriones de guisante y en esto son diferentes a las de otros eucariotas, como la levadura, donde el acetato no tiene ningún efecto (Alonso y Nelson, 1986) o como en algunos vertebrados, donde sólo se observa una ligera inhibición (Cousens et al., 1979; Sealy y Chalkley, 1978).

Las poliaminas espermina y espermidina, también se han descrito como inhibidores de las HD (Libby y Bertram, 1980; Vu et al., 1987). Sin embargo, la espermina sólo es un inhibidor débil de las HD de guisante (Figura 25) cuando se compara con el efecto de esta poliamina sobre la actividad desacetilasa de levadura (Vu et al., 1987). Así, la actividad de la HD de Saccharomyces se inhibe totalmente a una concentración 2 mM en espermina, mientras que la HD de guisante más sensible, la HD0, se inhibe sólo al 50% a una concentración 4.7 mM. Su efecto sobre la HD1 y HD2 es aún menos pronunciado (Figura 25). El efecto de las poliaminas también diferencia a las HD de guisante de las HD de animales superiores, mucho más sensibles a estos compuestos (Libby y Bertram, 1980).

En la Tabla III se muestra el efecto de otros inhibidores potenciales de las actividades HD. Se ha investigado el efecto de inhibidores de proteasas (PMSF, NaHSO₃, quimostatina y leupeptina) para determinar si las actividades desacetilasa están de alguna manera relacionadas con actividades protelíticas. El PMSF es el único que causa una marcada inhibición sobre las tres actividades HD. El bisulfato sódico sólo inhibe parcialmente a la HD0 y HD2 y ni la quimostatina, inhibidor de proteasas tipo quimotripsina, ni la leupeptina, inhibidor de serin- y cisteín-proteasas (Storey y Wagner, 1986) tienen ningún efecto sobre la actividad de las HD de embriones de guisante. Este efecto nulo de los inhibidores es-

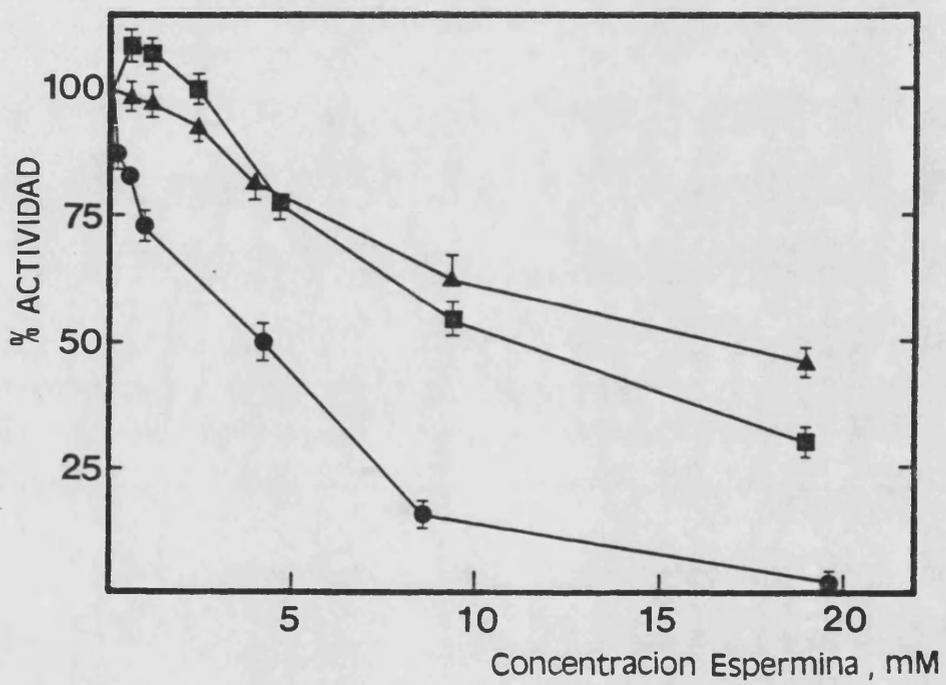


FIGURA 25. Efecto de la espermina sobre la actividad de las HD de guisante. (●) HD0; (■) HD1; (▲) HD2. Los ensayos para cada concentración de espermina se realizaron por triplicado en las condiciones descritas en la Figura anterior.

TABLA III. Efecto de distintos inhibidores potenciales sobre las actividades histona desacetilasas de guisante.

INHIBIDOR	% ACTIVIDAD		
	HD0	HD1	HD2
PMSF 5 mM	15	20	17
NaHSO ₃ 5 mM	42	100	71
Quimostatina 0.1 µg/ml	100	100	99
Leupeptina 10 µM	100	99	101
ZnCl 5 mM	0	0	0
CuCl 5mM	0	0	0
PMB 0.25 mM	10	10	0
Colina 5 mM	100	94	100
Colina 10 mM	nd	92	100
Eserina 5 µM	100	96	98

nd. no determinado. El 100% de actividad corresponde a la actividad de cada HD en un ensayo paralelo en ausencia de inhibidor. Los ensayos se realizaron por triplicado.

pecíficos de proteasas unido a las condiciones de ensayo, que incluyen una extracción con acetato de etilo a pH ácido, que impide la coextracción de péptidos cargados positivamente, permiten eliminar la posibilidad de que la liberación de radiactividad por acción de las HD sea debida a la hidrólisis de enlaces peptídicos más que a la liberación de acetato por rotura de enlaces acetamida. La baja proteólisis detectada en experiencias que incluyen electroforesis de proteínas, (ver más adelante) apoyan aún más esta idea. El $ZnCl_2$ y el $CuCl_2$ inhiben completamente a las tres actividades HD coincidiendo con los resultados obtenidos por Alonso y Nelson (1986) con la HD de levadura. También, los agentes mercuriales como el PMB tienen un potente efecto inhibitor, coincidiendo con los resultados observados por Inoue y Fujimoto (1970) en timo de ternera. Como estos autores sugieren, la inhibición por agentes mercuriales indica que los enzimas poseen grupos tiol esenciales para la actividad.

Se ha estudiado también, el efecto de la colina y eserina sobre las actividades desacetilasa de guisante, pues Allfrey *et al.*, (1984) han sugerido que la acetilcolinesterasa podría actuar desacetilando histonas. Los resultados negativos obtenidos con estos inhibidores descartan esta posibilidad. Las actividades detectadas no son acetilcolinesterasas.

El efecto de las proteínas HMG sobre la actividad histona desacetilasa continua siendo una cuestión controvertida. Reeves y Candido (1980) han mostrado que las HMG 1 y 2 activan y las HMG 14 y 17 inhiben a la HD de timo de ternera en ensayos "in vitro", mientras que Mezquita *et al.* (1982) en testículo de gallo no han encontrado inhibición por HMG 17 observando, sin embargo, activación por ubiquitina. Para determinar el efecto de estas proteínas sobre las HD de guisante, se añadieron a la mezcla a ensayar distintas concentraciones de HMG 1/2, HMG 14 y ubiquitina, obtenidas de eritrocito de pollo. Ni las HMG, ni la ubiquitina tienen ningún efecto sobre las HD0 y HD2 a ninguna de las concentraciones utilizadas (hasta 200 $\mu g/ml$). Sin embargo, la actividad de la HD1 aumenta ligeramente ($\leq 10\%$) en presencia de HMG 14 y ubiquitina, mientras que la HMG 1/2 causa una activación del 50%, a una concentración de 200 $\mu g/ml$ (Figura 26). En general pues, la influencia de las pro-

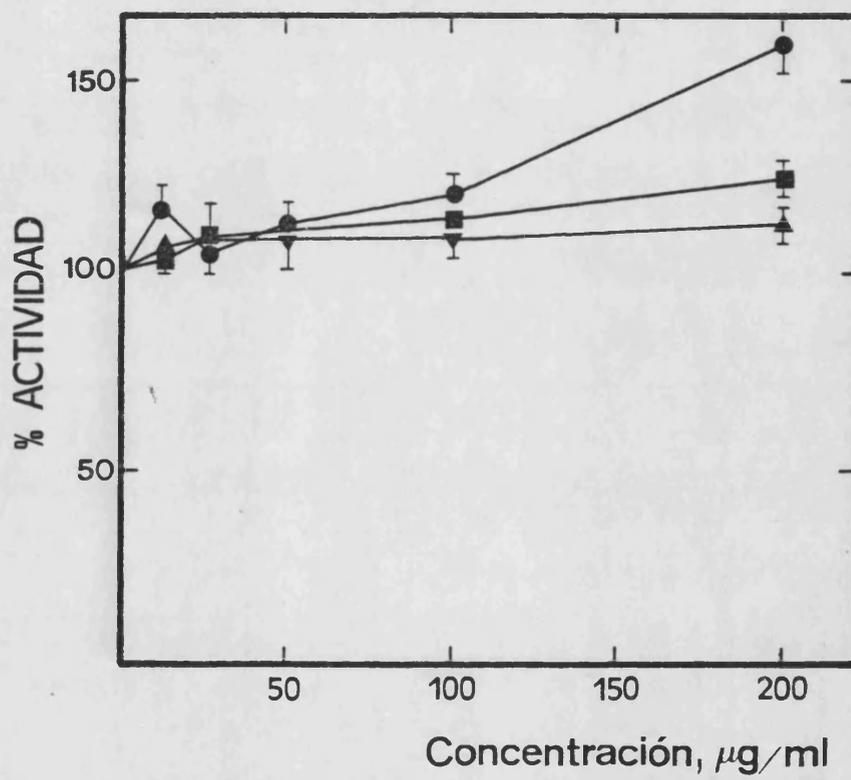


FIGURA 26. Influencia de las proteínas HMG y ubiquitina sobre la actividad HD1. (●) HMG 1/2; (■) HMG 14; (▲) ubiquitina. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración de efector, a 37°C, 200 mM en NH_4Cl , durante 60 min.

teínas HMG y ubiquitina sobre la actividad HD de guisante es pequeña. Las HMG de plantas y animales son diferentes (Spiker y Everett, 1987) y quizás el efecto de HMG homólogas puede ser distinto. Sin embargo, hay reactividad inmunológica cruzada entre la HMGd y las HMG 1/2 de eritrocito de pollo (Spiker y Everett, 1987), lo que sugiere que la activación de la HD1 por HMG 1/2 puede ser específica.

3.3.4 ACTIVIDAD SOBRE NUCLEOSOMAS

Los tres enzimas HD de embriones de guisante son capaces de utilizar nucleosomas como sustrato. Los nucleosomas de eritrocito de pollo, conteniendo histonas marcadas, se prepararon a partir de núcleos obtenidos de reticulocitos preincubados con [^3H]-acetato y se utilizaron en el ensayo enzimático HD como se describe en Material y Métodos. Los resultados de actividad HD sobre oligonucleosomas se muestran en la Tabla IV. Las tres actividades desacetilan histonas en nucleosomas, si bien prefieren a las histonas libres. Esta preferencia por las histonas libres es más marcada con HD0 y HD2. En cierto modo, este resultado es sorprendente ya que las histona desacetilasas "in vivo" se encuentran en el núcleo de la célula y actúan directamente sobre las histonas de nucleosomas. Hay y Candido (1983a) han mostrado en células HeLa, donde la HD se encuentra formando parte de un gran complejo macromolecular junto con DNA y diversas proteínas no histonas, que las histonas libres son peor sustrato que las histonas en polinucleosomas. Quizás, la razón de esta discrepancia sea la utilización de unas condiciones diferentes a las que deben existir "in vivo", ya que los enzimas se han ensayado en forma libre y los nucleosomas utilizados no son homólogos.

3.3.5 ACTIVIDAD FRENTE A DISTINTOS SUSTRATOS

Además de las histonas de eritrocito de pollo marcadas biológicamente, en forma libre o constituyendo nucleosomas, se ha investigado la actividad HD sobre otros sustratos acetilados. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla V. Podemos señalar que ninguno de los tres enzimas presenta actividad significativa frente a sustratos acetilados

TABLA IV. Actividad histona desacetilasa sobre nucleosomas

SUSTRATO	ACTIVIDAD DESACETILASA		
	HD0	HD1	HD2
Histonas libres de eritrocito de pollo	14776±224	8171±250	2380±165
Oligonucleosomas de eritrocito de pollo	2057±53	3839±207	400±108
% Actividad	14	46	17

Las actividades están dadas como dpm liberadas en un ensayo realizado a 40 mM en NH_4Cl . La actividad de las histonas incluidas en el ensayo (libres o en nucleosomas) fue de 90000 dpm. El porcentaje de actividad representa la desacetilación de histonas en nucleosomas con respecto a la obtenida con histonas libres. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

TABLA V. Actividad de las histona desacetilasas de guisante sobre distintos sustratos acetilados.

SUSTRATO	ACTIVIDAD DESACETILASA		
	HD0	HD1	HD2
Histonas de eritrocito de pollo marcadas biológicamente	100	100	100
Histonas de eritrocito de pollo marcadas químicamente	69	44	22
Histonas de guisante marcadas químicamente	30	15	6
Acetil-BSA	0	8	25
Acetil-espermina	0	1	0
Acetil-espermidina	4	0	1
Acetil-putrescina	0	0	0
Acetil-lisina	4	0	0

Ya que la actividad específica de los sustratos es distinta, se calculó primero el porcentaje de acetato liberado respecto de las dpm incluidas en el ensayo. Posteriormente se tomó como 100% de actividad el porcentaje relativo de acetato liberado cuando se utilizaron histonas de eritrocito de pollo marcadas biológicamente. Los ensayos se realizaron por triplicado.

de masa molecular pequeña, como las acetil-poliaminas y la acetil-lisina. Sobre la BSA, sólo la HD1 y la HD2 parecen ser capaces de desacetilar algunos grupos modificados de este sustrato artificial. También es importante señalar que las histonas acetiladas químicamente, por tratamiento con anhídrido acético (ver Material y Métodos), son peor sustrato que las histonas acetiladas biológicamente. Existe una sencilla interpretación para estos resultados, pues como sugirieron Inoue y Fujimoto (1969) en el primer trabajo sobre la desacetilación enzimática de histonas, la acetilación "in vivo", catalizada por acetiltransferasas, afecta a grupos ϵ -amino específicos de las histonas de "core", mientras que la acetilación química, con anhídrido acético, produce la modificación de un número mayor de grupos de las histonas, grupos α -amino de H2B y H3 y grupos ϵ -amino de lisina que nos son acetilados "in vivo", incluyendo a la histona H1. Estos grupos "extra" acetilados, podrían no ser reconocidos por las histona desacetilasas y en consecuencia las preparaciones enzimáticas de guisante que se han descrito pueden considerarse como verdaderas histona desacetilasas, capaces de discriminar entre histonas acetiladas biológicamente e histonas acetiladas químicamente.

3.3.6 ESPECIFICIDAD FRENTE A LAS DISTINTAS HISTONAS

Para determinar si las actividades enzimáticas HD de embriones de guisante reaccionan diferencialmente con las cuatro histonas de "core" acetiladas se han realizado experiencias en las que las histonas marcadas, tras distintos tiempos de incubación con las HD, se sometieron a electroforesis y fluorografía. El análisis desitométrico, mediante un analizador de imagen, de las bandas en el fluorograma y en el gel teñido con azul Coomassie (como se describe en Material y Métodos) proporciona la especificidad de las HD hacia las diferentes histonas de "core", al cuantificar la liberación relativa de grupos acetilo de las histonas a lo largo del tiempo de incubación. La Figura 27 muestra los resultados de estas experiencias. Cada una de las actividades HD de guisante posee una especificidad diferente. La HD0 desacetila las cuatro histonas de "core" con una ligera preferencia por H3. Las HD1 y HD2 actúan preferentemente sobre las histonas H2A y H2B, siendo las histonas ricas en arginina H3 y H4

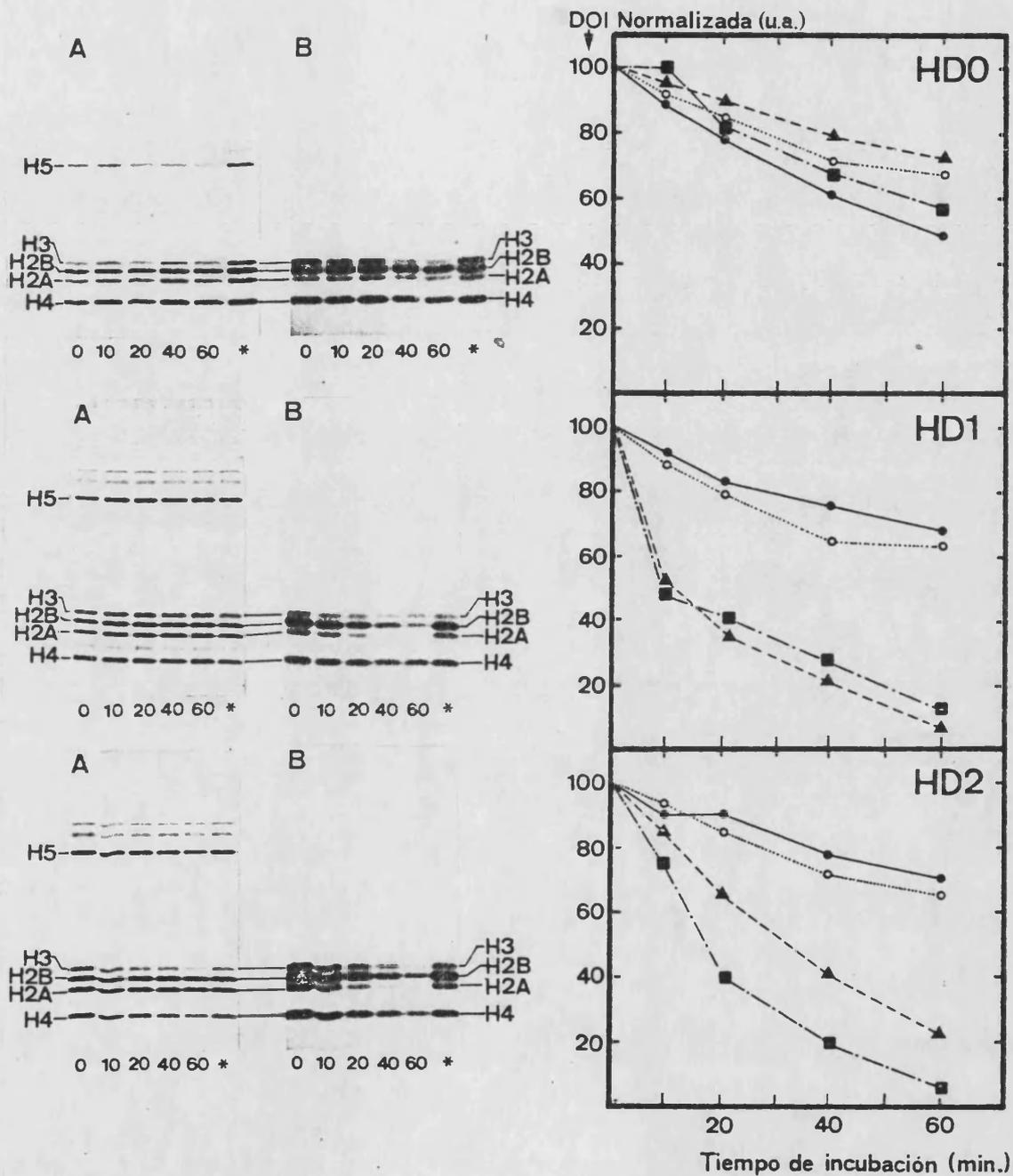


FIGURA 27. Especificidad de las HD sobre las distintas histonas. La densidad óptica integrada (DOI) de cada banda en el fluorograma (B) se dividió por la DOI de las bandas correspondientes en el gel teñido (A), obteniendo la densidad óptica integrada normalizada que representa la medida de radiactividad específica en cada banda de histonas. En A) y B) las cifras indican el tiempo de incubación en minutos. * son controles de desacetilación no enzimática donde el enzima se inactivó previamente y se incubó el tiempo más largo. (●—●) H3; (■—■) H2B; (▲—▲) H2A; (○-○) H4.

desacetiladas más lentamente. HD1 y HD2 se diferencian en que la primera libera más eficientemente los grupos acetilo de H2B que de H2A, mientras que HD2 actúa con preferencia sobre H2A.

En este trabajo se han descrito tres actividades histona desacetilasa de ejes embrionicos de guisante. El hecho de que no actúan sobre sustratos acetilados de bajo peso molecular y que las histonas acetiladas químicamente son peor sustrato que las acetiladas biológicamente (Tabla V) constituye el argumento más importante que apoya la idea de que se trata de verdaderas histona desacetilasas. El comportamiento diferencial frente a la fuerza iónica, concentración de acetato y butirato, actividad con nucleosomas y sustratos acetilados químicamente, así como la especificidad frente a las histonas, constituye la mejor evidencia a favor de que son tres actividades, HD0, HD1 y HD2 que representan especies moleculares distintas y no agregados de una única proteína.

La actuación de las HD1 y HD2 frente al butirato y NH_4Cl y su preferencia por las histonas H2A y H2B coincide con la descrita por Rodrigo (1987) con enzimas extraídos de embriones de guisante de 24 h. En el presente trabajo, se ha descrito una actividad histona desacetilasa, la HD0, claramente distinta, además de estudiar nuevas propiedades de los enzimas HD1 y HD2, que pueden ayudar a la comprensión de su papel funcional.

Aunque por supuesto la especificidad de las HD de guisante puede ser diferente sobre nucleosomas homólogos "in vivo", los resultados obtenidos en los ensayos "in vitro" para las desacetilasas HD1 y HD2, que actúan con preferencia sobre las histonas H2A y H2B, pueden ser significativos y reflejar, de algún modo, un papel funcional de la acetilación de estas histonas diferente del de la acetilación de H3 y H4. En este sentido, Loidl y Gröbner (1987b), en Physarum, han señalado que la acetilación de las histonas H2A y H2B (no de H3 ni H4) está relacionada con la transcripción de la cromatina y quizás las HD1 y HD2 de guisante estén implicadas en la desacetilación posterior a ese proceso.

3.4 OTROS PROCEDIMIENTOS DE PURIFICACION DE HAT E HD

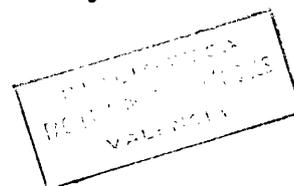
Con el propósito de averiguar nuevas propiedades diferenciales de los enzimas y también con el objeto de aumentar la actividad específica de las histona acetiltransferasas y desacetilasas se han probado otros procedimientos de purificación de proteínas, algunos de los cuales ya han sido utilizado por diversos autores para HAT e HD en diversos organismos eucariotas. Así por ejemplo, Vidali *et al.* (1972) extraían una actividad HD de timo de ternera empleando, como primer paso de purificación, una precipitación con 3 volúmenes de acetona. Se ha utilizado esta precipitación con los enzimas de guisante (tanto HD como HAT) obtenidos de la cromatografía en DEAE-Sepharosa. Sólo la desacetilasa HD1 mantiene su actividad después de la precipitación con acetona, las otras dos HD y todas las HAT pierden totalmente la actividad, probablemente por desnaturalización irreversible. Para la HD1 este sistema es eficaz, ya que se recupera el 75% de la actividad, con un aumento, además, de 3.9 veces en la actividad específica después de la redisolución del precipitado de proteínas. El aumento en la actividad específica es debido a que gran parte de las proteínas no se solubilizan posteriormente a la precipitación con acetona y se eliminan fácilmente por centrifugación.

La precipitación con sulfato amónico es, probablemente, el sistema más utilizado en etapas iniciales de purificación de actividades HAT e HD (Sures y Gallwitz, 1980; López-Rodas *et al.*, 1985; Salvador *et al.*, 1985; Cousens *et al.*, 1979). Con los enzimas de guisante se ha probado la precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como se describe en Material y Métodos (apartado 2.3.3.3). La precipitación con esta sal sólo se ha mostrado adecuada como paso de purificación de la HAT B, ya que este enzima sólo precipita después de llevar la disolución al 100% de saturación y no se detecta actividad en precipitados correspondientes a concentraciones más bajas. El rendimiento de recuperación de la actividad HAT B es alto e implica un aumento de la actividad específica, como consecuencia de la eliminación de proteínas al llevar, previamente, la disolución al 50 y 75% de saturación. Las actividades HAT A1 y A2 precipitan parcialmente al 50 y 75% de saturación y con los dos enzimas se producen

pérdidas importantes de la actividad, especialmente con la HAT A1. Las HD1 e HD2 precipitan mayoritariamente al 75 y 50% de saturación respectivamente, pero también se producen pérdidas de actividad, sin aumento significativo de la actividad específica. La no recuperación de una parte importante de las actividades enzimáticas desaconseja la precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como etapa de purificación, tan sólo puede resultar útil para la HAT B.

Algunos autores (Belikoff et al., 1980; Böhm et al., 1980; Estepa y Pestaña, 1983) han utilizado la cromatografía en DNA-celulosa para la separación y purificación de actividades HAT en diversos organismos eucariotas. Estos autores, además, han sugerido que la retención de estas HAT por el gel, consecuencia de la afinidad de los enzimas por el DNA, refleja y también en parte explica, la asociación de las actividades HAT a la cromatina. Se ha utilizado la cromatografía en DNA-celulosa con enzimas de embriones de guisante en las condiciones descritas en el apartado 2.3.3.1 (Material y Métodos). Esta cromatografía se ha realizado con la HAT A2, enzima con cierta afinidad por la cromatina (ver Figura 11 y apartado siguiente) y con la HD2, enzima que también parece estar asociado a cromatina (ver apartado siguiente). En los dos casos, la actividad se recoge en el lavado de la columna, no siendo retenidos por el DNA. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Travis et al. (1984) con una HAT obtenida de cromatina de levadura, que tampoco queda retenida en este sistema cromatográfico.

También se ha probado la cromatografía de afinidad en histona-agarosa como etapa de purificación de los enzimas. En este sistema cromatográfico existe la posibilidad de que las proteínas queden también retenidas por interacciones electrostáticas con los grupos cargados positivamente de las histonas del gel. Por tanto, sólo puede decirse que tienen verdadera afinidad por las histonas del gel las actividades que eluyen a fuerzas iónicas más elevadas que la mayor parte de las proteínas (máximo de A_{280} en el perfil de elución). Los enzimas de guisante se sometieron a esta cromatografía en histona-agarosa en las condiciones descritas en Material y Métodos y las fracciones obtenidas se ensayaron des-



pués de eliminar el exceso de sal. Solamente la HAT B y la HD2 parece que son retenidas por afinidad, ya que ambas requieren una concentración de 0.8 M en NH_4Cl para su elución. Sin embargo, los otros enzimas HAT e HD eluyeron con el máximo de proteínas (0.2-0.3 M en NH_4Cl) o sólo ligeramente más retrasados, lo que indica que estos últimos enzimas son retenidos por la histona-agarosa, prácticamente sólo, por interacciones electroestáticas. La Figura 28 muestra, como ejemplo, las eluciones en esta cromatografía de la HAT A2, HAT B e HD0 y en ella puede verse el comportamiento diferente de la HAT B respecto a los otros dos, que eluyen junto con la mayor parte de las proteínas. Como conclusión, es de señalar que la cromatografía en histona-agarosa es un buen sistema de purificación para los enzimas HAT B e HD2, pues produce una purificación de alrededor de 20 veces, con un rendimiento cercano al 85% y no lo es para el resto de las actividades HAT e HD.

Finalmente, a nivel práctico, cabe señalar que es posible conservar las actividades enzimáticas de embriones de guisante por congelación a -80°C en tampón B. Bajo estas condiciones no se observa pérdida de actividad de los enzimas, obtenidos de la cromatografía de DEAE-Sepharosa o Ultrogel, durante varios meses.

3.5 ACTIVIDADES HAT E HD ASOCIADAS A CROMATINA

Muchos autores, trabajando con distintos eucariotas, han descrito la obtención de actividades HAT e HD que se encuentran asociadas a la cromatina (Racey y Byoet, 1972; Böhm *et al.*, 1980; Travis *et al.*, 1984; Hay y Candido, 1983a; Mold y McCarty, 1987). En estado asociado estos enzimas son capaces de modificar (acetilando o desacetilando) a las propias histonas de la cromatina a la que se encuentran unidos y se ha sugerido que este sería el modo en el que estos enzimas se encuentran y actúan en el núcleo de la célula eucariota.

En los estudios realizados con actividades HAT se ha conseguido la disociación del enzima de la cromatina por tratamiento con tampónes con una concentración alrededor de 0.5 M en sales monovalentes

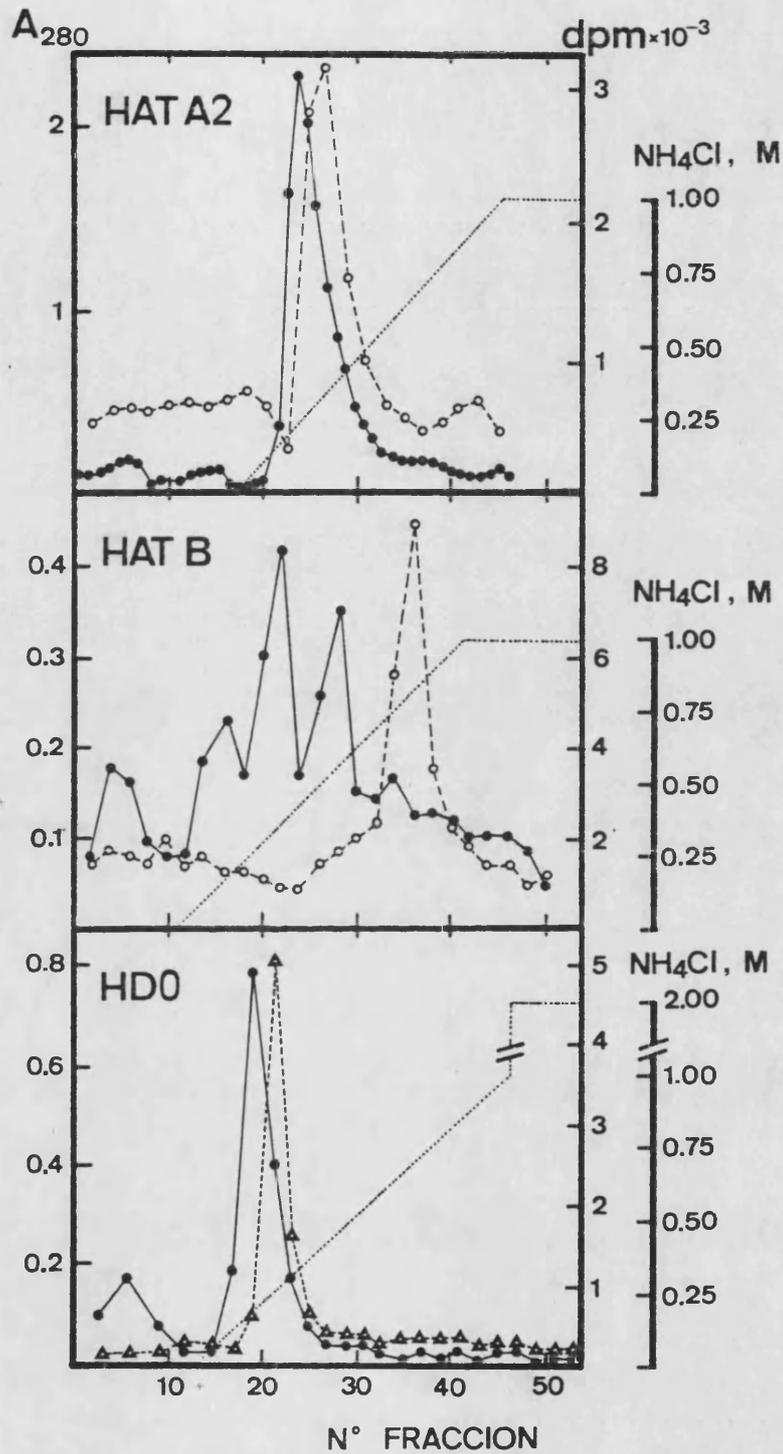


FIGURA 28. Cromatografía en histona-agarosa de las actividades HAT A2; HAT B e HDO. Las columnas (5 ml de gel) se eluyeron a 12 ml/h y se recogieron fracciones de 1.5 ml (HAT A2) o de 2.5 ml (HAT B e HDO) que se ensayaron después de dializarlas frente a tampón B (HDO) o tampón B 100 mM en NH_4Cl (HAT). (\bullet — \bullet) A_{280} ; (\circ — \circ) actividad HAT; (\blacktriangle — \blacktriangle) actividad HD; (\cdots) gradiente de NH_4Cl .

(Böhm *et al.*, 1980; Belikoff *et al.*, 1980; Libby, 1978; Travis *et al.*, 1984; Chicoine *et al.*, 1987). Sin embargo, se han descrito algunas HD asociadas a cromatina, formando complejos, que son estables a concentraciones 1-2 M en NaCl (Hay y Candido, 1983a; Mold y McCarty, 1987), lo que sugiere que el tipo de asociación de las HAT e HD puede ser diferente.

En embriones de guisante, los resultados que se han presentado en la Figura 11 parecen indicar una asociación, al menos parcial, de la HAT A2 a la cromatina. En cuanto a la HD, la Figura 21 muestra la extracción mayoritaria de las tres formas del enzima en ausencia de NH_4Cl , lo que parece revelar que estas desacetilasas no están asociadas a la cromatina. Con objeto de corroborar estos resultados y de determinar de un modo directo si existe alguna asociación entre las actividades HAT e HD y la cromatina se ha estudiado la presencia de estas actividades en cromatina purificada de embriones de guisante de 62h. La cromatina se ha obtenido utilizando un método descrito por Spiker *et al.* (1983) para la extracción de cromatina de trigo. En primer lugar hay que señalar que este procedimiento (método II, Spiker *et al.*, 1983) ha resultado satisfactorio para la purificación de cromatina de guisante, pues la calidad y pureza de las histonas extraídas, así como el patrón de digestión con nucleasa de micrococo, revelan el mantenimiento de la estructura nativa en la cromatina aislada por este procedimiento, con propiedades similares, pues, a las que se obtienen partiendo de núcleos. Esto facilita el estudio de los componentes de la cromatina ya que no requiere la purificación previa de núcleos, lo cuales se obtienen con un bajo rendimiento en largos procedimientos de extracción.

Una vez purificada la cromatina se resuspendió en tampón B y se ensayó directamente para la detección de actividades HAT e HD. Para el ensayo HD se utilizó como sustrato [^3H]-histonas de eritrocito de pollo, que se añadieron exógenamente, y se determinó la actividad por liberación de [^3H]-acetato, mientras que el ensayo HAT se realizó por autincubación, sin añadir histonas exógenas, sólo [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-acetil-CoA, con objeto de observar la acetilación en las histonas de la cromatina. Después

de la incubación a diferentes tiempos, en las condiciones descritas en Material y Métodos, se extrajeron las histonas con HCl y se precipitaron, para posteriormente medir la incorporación de radiactividad o someterlas a electroforesis y fluorografía. De este modo, se ha detectado actividad HAT y actividad HD asociadas a cromatina. La Figura 29 muestra la actividad de los enzimas asociados a cromatina. El nivel de actividad HAT de la cromatina, en ensayos de autoincubación, es bajo observándose acetilación de las cuatro histonas de "core", con preferencia por H3 y H4. Este resultado sorprende en el sentido de que se observa acetilación sobre las histonas H2A y H2B, cuando ninguna de las actividades aisladas y anteriormente descritas (apartado 3.2) modifica a estas histonas. Existen dos razonamientos para intentar explicar esta discrepancia. Primero, puede que alguno de los enzimas descritos, cuando se encuentra asociado a cromatina y actuando sobre histonas en cromatina, sea capaz de modificar a H2A y H2B. En este sentido, Garcea y Alberts (1980) han demostrado el diferente patrón de acetilación producido por una HAT nuclear purificada y el obtenido por la HAT unida a cromatina. Estos autores sugieren que algún factor endógeno debe ser responsable de este comportamiento diferencial. Y segundo, puede existir, asociada a cromatina, alguna otra actividad HAT no detectada anteriormente en los extractos obtenidos de embriones totales, bien por su bajo nivel de actividad, porque se pierda durante el procedimiento de extracción o bien por su imposibilidad de acetilar a las histonas cuando éstas se encuentran en forma libre. De cualquier modo, los resultados de la Figura 29A muestran claramente que en guisante existe también acetilación de las histonas H2A y H2B.

En cuanto a la actividad HD copurificada con cromatina, en la Figura 29B puede verse la mayor eficacia de esta actividad en la desacetilación de H2A y H2B. Quizás la menor acetilación conseguida sobre H2A y H2B, por parte de la HAT de cromatina (Figura 29A), sea debida a la presencia de la HD con actividad preferente por estas histonas. La especificidad de la HD asociada a cromatina sugiere ya su identificación como la HD2.

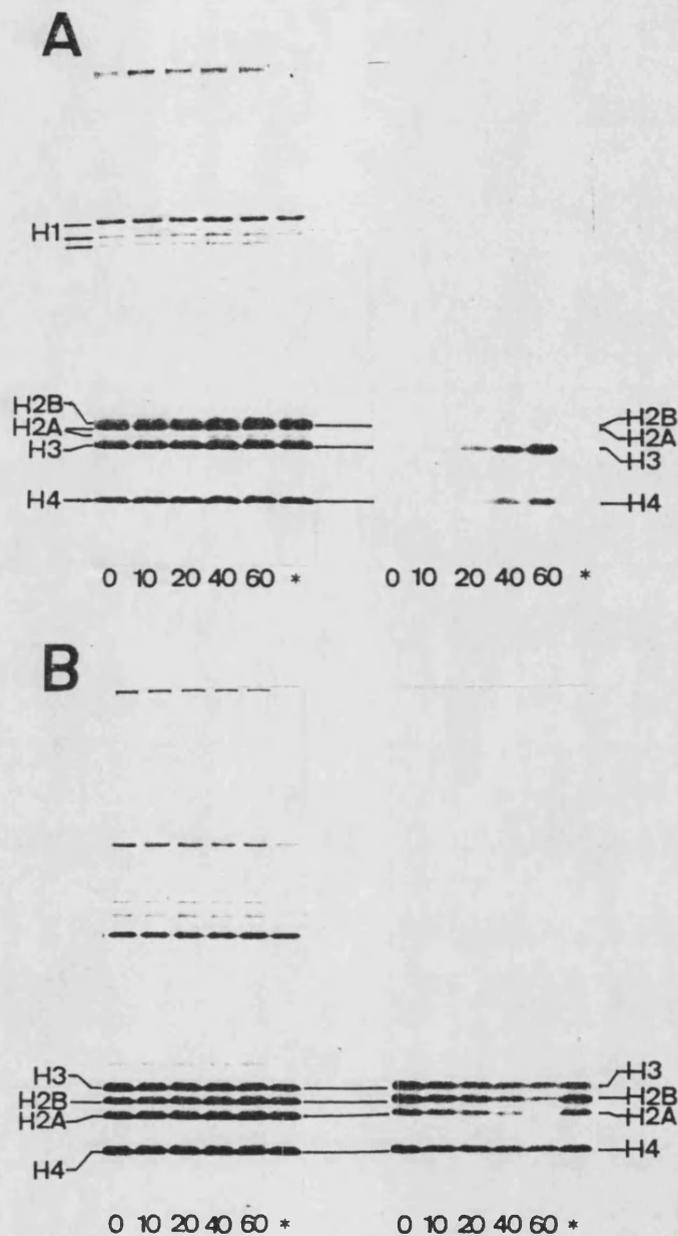


FIGURA 29. Actividades HAT e HD asociadas a cromatina. A) especificidad de la actividad HAT de cromatina en ensayos de autoincubación. B) actividad HD de cromatina frente a las [^3H]-histonas de eritrocito de pollo. Tras la incubación las histonas se extrajeron y se sometieron a electroforesis y fluorografía. g) gel teñido con azul Coomassie, f) fluorograma. En ambos casos se utilizó una suspensión de cromatina como extracto enzimático. Las cifras indican el tiempo de incubación. * significa que el extracto enzimático fue previamente inactivado por tratamiento con PMSF 10 mM, como control de reacción no enzimática.

Si como dicen Garcea y Alberts (1980) la especificidad de los enzimas asociados a cromatina puede ser diferente a la de los enzimas parcialmente purificados, no sería extraño encontrar que frente a inhibidores potenciales, las actividades HAT e HD asociadas a cromatina se comportasen de forma diferente a los enzimas purificados. Por ello se han ensayado las actividades de guisante asociados a cromatina frente a distintos efectores. Los resultados se muestran en la Figura 30. Como se puede ver en la parte superior de la Figura, la HD de cromatina no se ve afectada significativamente por el n-butilato y sí en cambio por el acetato, al igual que las HD purificadas. El comportamiento del enzima frente a la fuerza iónica también es similar al descrito para la HD2. Por otro lado, se ha probado el efecto de las poliaminas, espermina y espermidina, sobre la actividad HD de cromatina, ya que Vu et al. (1987) han observado que estos compuestos, a una concentración de 2-5 mM, inhiben completamente la HD de levadura, sin afectar a la actividad HAT. Estos autores proponen que la inhibición de la HD por poliaminas puede resultar útil para la obtención de histonas acetiladas en organismos como la levadura, en los que el butirato no inhibe a la HD. El efecto de las poliaminas sobre la actividad HD asociada a cromatina en guisante es muy diferente al descrito por Vu et al. (1987). El enzima no sólo no se inhibe sino que se activa considerablemente, duplicándose prácticamente la actividad a una concentración de 5 mM en espermina y 10 mM en espermidina. Estos resultados, junto con los obtenidos con la actividad HAT frente a las poliaminas (Figura 30, parte inferior), invalidan, en guisante, la proposición de Vu et al. (1987) para conseguir aumentar la acetilación de las histonas. En animales superiores (Libby y Bertram, 1980) también se ha descrito una inhibición de la desacetilasa de cromatina por poliaminas, aunque en este caso a bajas concentraciones (1-2 mM) el enzima sufre una potente activación para disminuir rápidamente a medida que aumenta la concentración de poliamina hasta conseguir una inhibición completa a una concentración de 16-20 mM. El comportamiento de la actividad HD de guisante tampoco se parece al de la HD de animales. La actividad HD asociada a cromatina se ha identificado como la HD2 (ver Figura 29B y más adelante) y sin embargo el efecto de la espermina es diferente según se encuentre el enzima

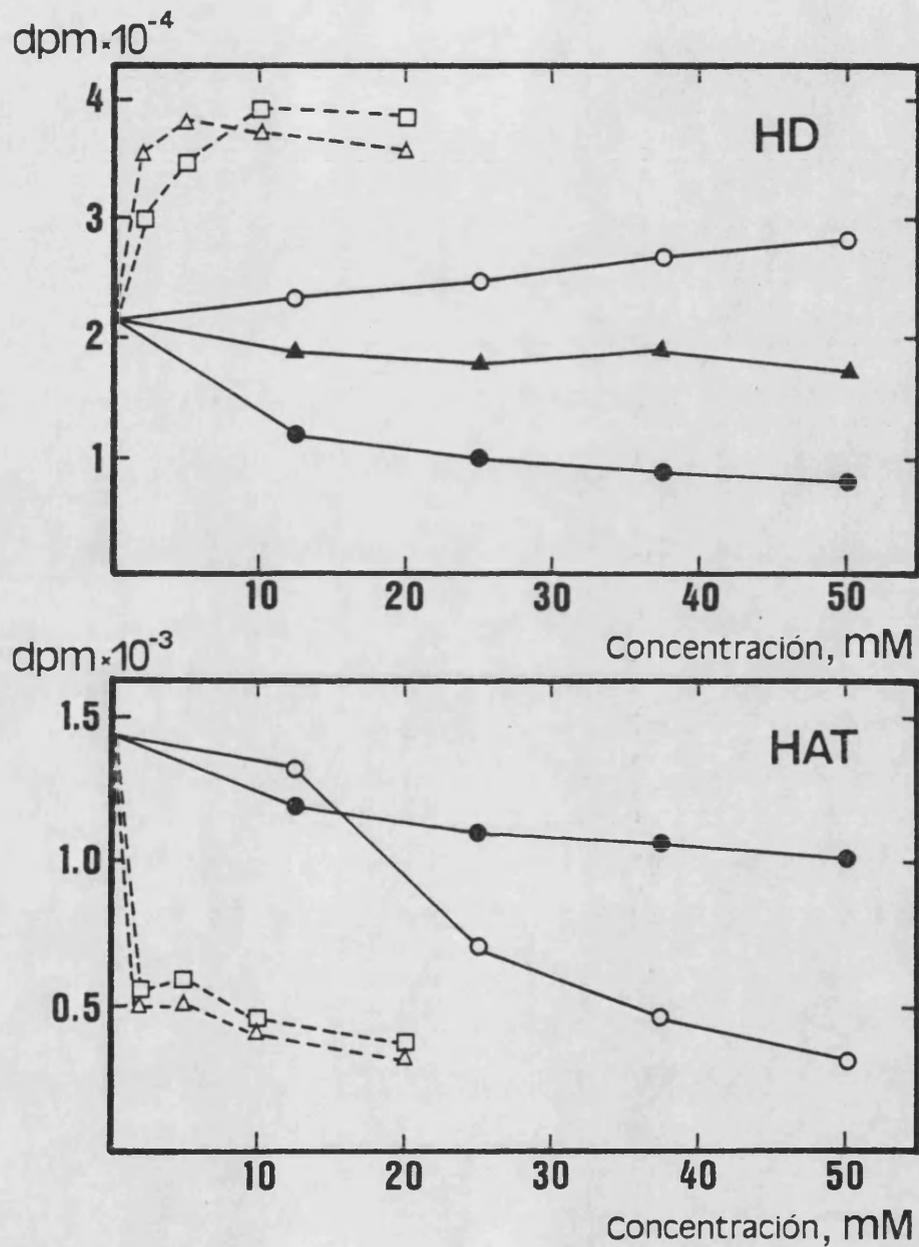


FIGURA 30. Actividad HD (parte superior) e HAT (parte inferior) asociadas a cromatina en presencia de distintos efectores. (●) acetato sódico; (▲) n-butilato sódico; (○) NH₄Cl; (Δ) cloruro de espermina; (□) cloruro de espermidina.

en forma libre (Figura 25) o asociado a cromatina (Figura 30). Se ha comprobado que una vez que el enzima se disocia de la cromatina, el comportamiento frente a la concentración de poliamina es semejante al descrito para la HD2 (Figura 25). Así pues, parece claro que la activación de la HD por poliaminas sólo tiene lugar si el enzima se encuentra asociado a cromatina, quizás a través de algún factor regulador que se pierde durante la extracción del enzima.

Finalmente se ha estudiado el efecto de la fuerza iónica y de la concentración de acetato sobre la actividad HAT asociada a cromatina. El NH_4Cl produce una disminución progresiva de la actividad a partir de tan sólo 20 mM. Ya que el acetato ha mostrado capacidad para inhibir la HD de cromatina, se ha estudiado su efecto sobre la HAT, con objeto de intentar aumentar la acetilación de las histonas. En la Figura 30 (parte inferior) podemos observar que la actividad HAT de cromatina no aumenta en presencia de concentraciones crecientes de acetato, sino más bien disminuye ligeramente (probablemente debido al aumento de la fuerza iónica). Por consiguiente, podríamos concluir que la baja incorporación de radiactividad en las histonas de cromatina se debe a una débil actividad HAT en esa cromatina, más que a la presencia de la HD.

Para la identificación de las actividades enzimáticas de la cromatina éstas se disociaron por tratamiento con tampón B' 0.5 M en NH_4Cl , eliminándose la cromatina por ultracentrifugación, como se describe en Material y Métodos. Los resultados obtenidos parecen indicar que toda la actividad HAT presente en la cromatina se disocia por este tratamiento, pues no se detecta actividad en el sedimento de la ultracentrifugación. La actividad HD también se libera mayoritariamente, sólo se encuentra entre un 5 y un 10% de la actividad en el sedimento. Cuando se ensayó el sobrenadante para determinar la especificidad de la actividad HD, se encontró un patrón de desacetilación similar al observado con la actividad asociada a cromatina, mostrado en la Figura 29. No ocurre lo mismo con la actividad HAT. En contraste con los resultados de la Figura 29, donde todas las histonas de "core" son acetiladas, cuando se ensaya la actividad HAT presente en el sobrenadante de la ultracentrifugación frente a

histonas libres de guisante, sólo se observa acetilación en H3 y ligeramente en H4 (Figura 31). Sin embargo, si el ensayo se realiza frente a una suspensión de cromatina pretratada con PMSF 10 mM (con objeto de inactivar la HAT endógena, eliminando posteriormente el exceso de PMSF mediante diálisis), se obtiene un patrón de acetilación idéntico al obtenido con la actividad asociada (mostrado en la Figura 29). Así pues, en guisante, un mismo extracto enzimático produce acetilación sobre las cuatro histonas de "core" cuando éstas están formando parte de nucleosomas en cromatina y sólo modifica a la histona H3 (y ligeramente H4) cuando el sustrato son histonas libres.

Las actividades enzimáticas, disociadas de la cromatina como se ha descrito, se purificaron mediante cromatografía en DEAE-Sepharosa. La Figura 32A muestra el perfil de elución de esta cromatografía donde se observa un pico de actividad HAT que eluye entre 100 y 150 mM en NH_4Cl designado como I y un segundo pico, de menor actividad, denominado II, que eluye aproximadamente a 200 mM. La actividad HD eluye como un pico único a 300 mM en NH_4Cl . Se han estudiado algunas propiedades de estos pico de actividad enzimática con objeto de identificarlos. Las fracciones con actividad HAT, previa diálisis frente a tampón B 35 mM en NH_4Cl , se ensayaron frente a oligonucleosomas de guisante (Figura 32B). Se observa un único pico de actividad HAT que eluye a 150 mM en el gradiente de NH_4Cl , solapado con el pico I obtenido del ensayo de las mismas fracciones con histonas libres (Fig. 32A). Este resultado sugiere que el pico I de la Figura 32A debe representar dos enzimas que coeluyen muy próximos en el gradiente de NH_4Cl , uno de ellos, el más retrasado, con capacidad para utilizar nucleosomas como sustrato.

Se ha estudiado la especificidad de las fracciones con actividad HAT frente a histonas de guisante y de eritrocito de pollo. Los resultados se recogen en la Figura 33. Podemos observar un máximo de acetilación sobre H4 coincidiendo con el máximo del pico I y un máximo de acetilación sobre H3 coincidiendo con el pico II. También se puede observar una ligera acetilación de H3 coincidiendo con las fracciones con actividad HAT sobre nucleosomas (fracciones 16-19 correspondientes al pico I

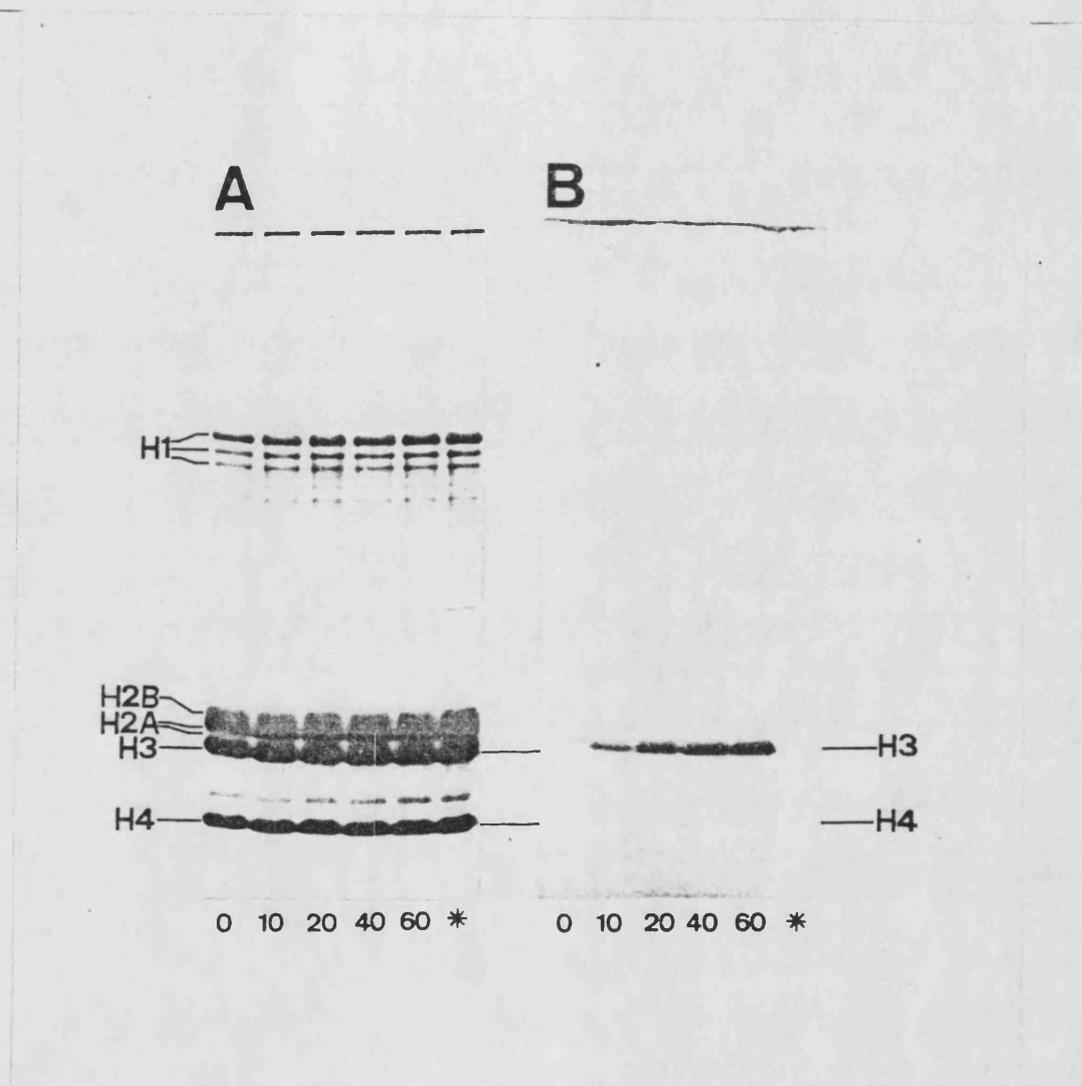


FIGURA 31. Especificidad de la actividad HAT liberada de la cromatina por ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M. El sobrenadante se incubó con histonas de guisante y $[1-^{14}\text{C}]$ -acetil-CoA distintos tiempos, tras lo cual las histonas se sometieron a electroforesis en presencia de SDS y posterior fluorografía. A) gel teñido con azul Coomassie. B) fluorograma. Las cifras indican el tiempo de incubación. * significa que el extracto enzimático fue previamente inactivado por calor e incubado el tiempo más largo.

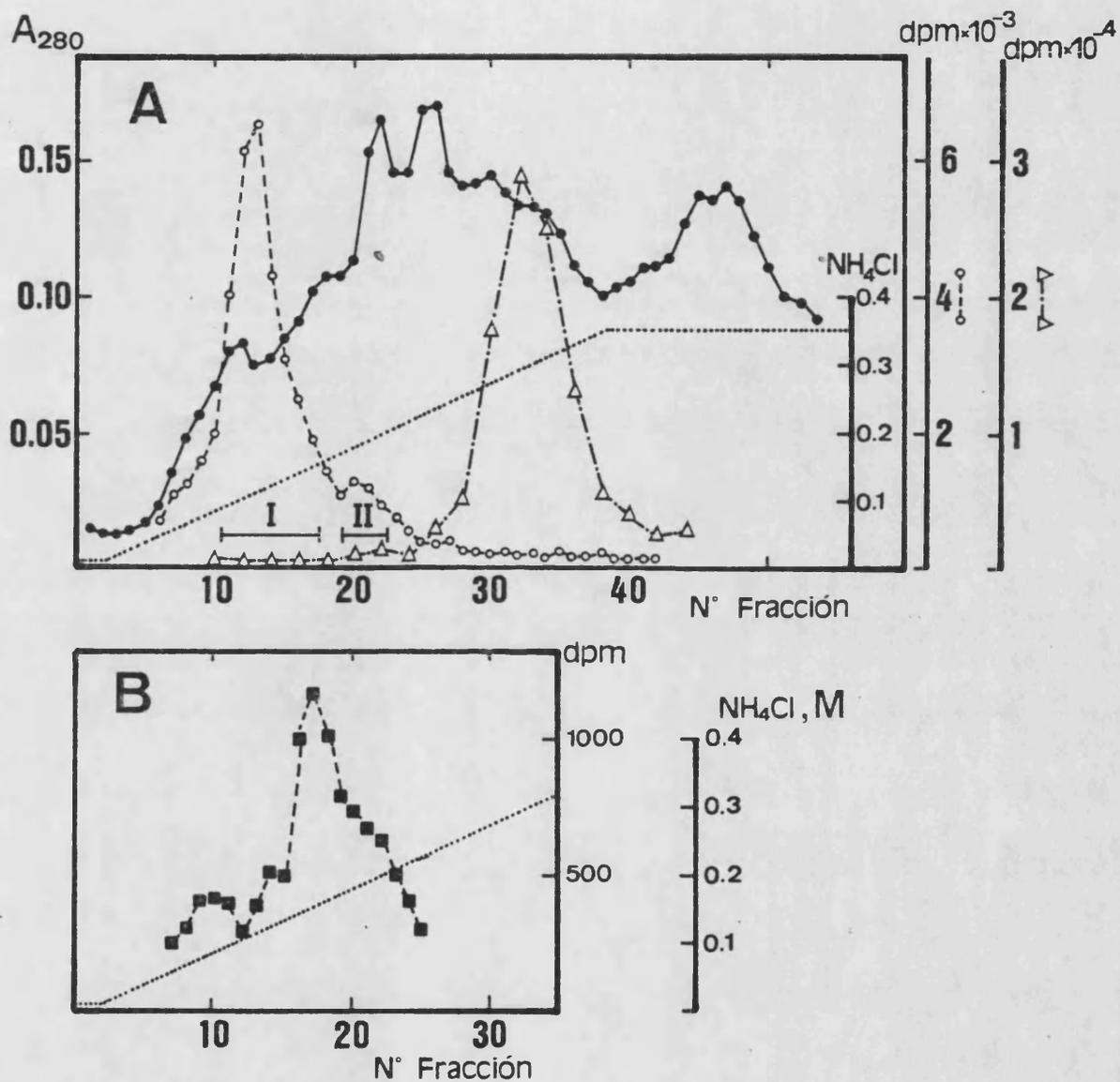


FIGURA 32. Cromatografía en DEAE-Sepharosa CL-6B de las actividades enzimáticas obtenidas de cromatina. A) perfil de actividad frente a histonas libres. Las fracciones con actividad HAT se dializaron frente a tampón B 35 mM en NH_4Cl y se ensayaron frente a oligonucleosomas de guisante obteniéndose el perfil B). Las dimensiones de la columna fueron de 5 cm x 0.8 cm y se eluyó a 10 ml/h con un gradiente de 120 ml, recogiendo fracciones de 3 ml. (●—●) A_{280} ; (○---○) actividad HAT; (Δ--Δ) actividad HD; (■--■) actividad HAT frente a oligonucleosomas; (···) gradiente NH_4Cl .

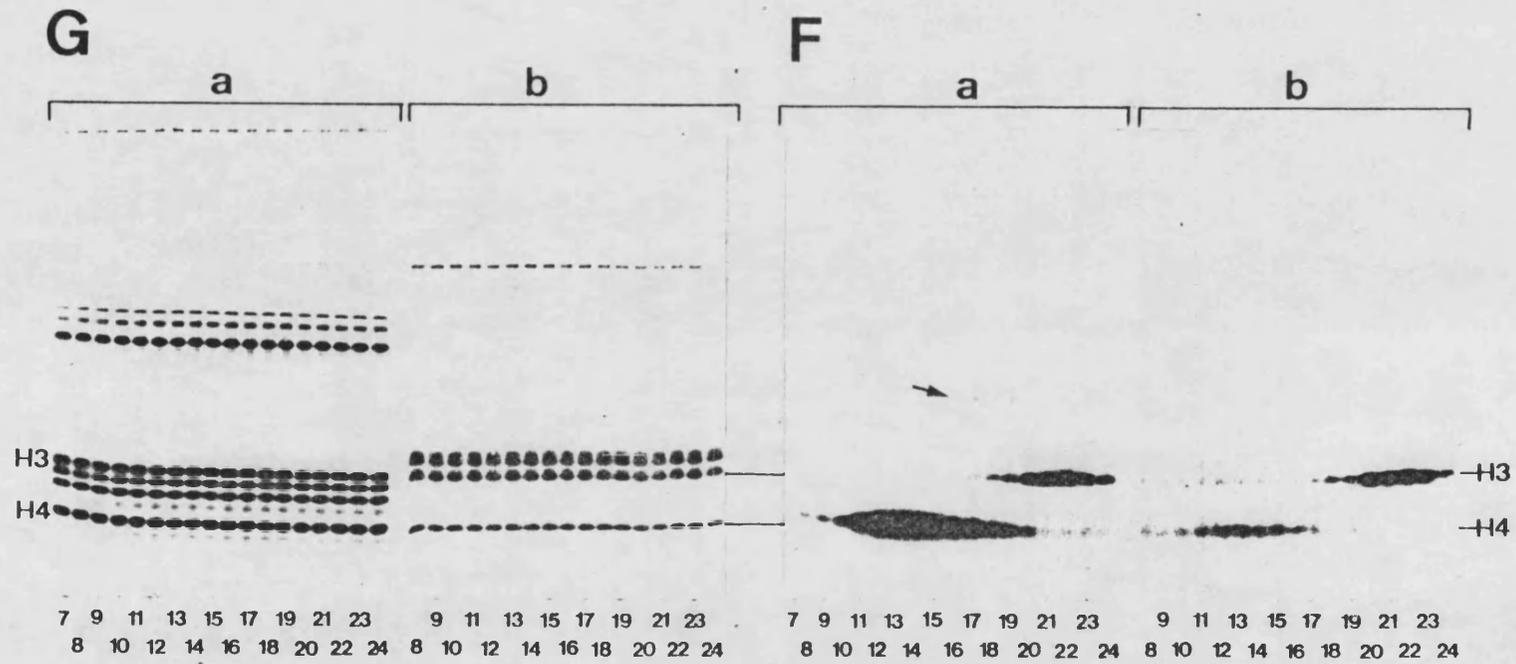


FIGURA 33. Especificidad de las HAT obtenidas de cromatina de guisante. las fracciones señaladas se ensayaron nuevamente tras lo cual las histonas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y posterior fluorografía. a) histonas de eritrocito de pollo; b) histonas de guisante. G) gel teñido con azul Coomassie; F) fluorografía.

de la Fig. 32). Estas mismas fracciones, cuando se utilizan histonas de eritrocito de pollo como sustrato, acetilan un polipéptido desconocido cuya movilidad electroforética es intermedia entre H5 y las histonas de "core" (señalado con una flecha en la fluorografía). Los resultados presentados en las Figuras 32 y 33 parecen indicar la presencia de tres actividades HAT asociadas a cromatina, que pueden identificarse al menos parcialmente. En primer lugar, la elución a 200 mM en el gradiente de NH_4Cl del pico II (Fig. 32A), así como su especificidad exclusiva por la histona H3, tanto con histonas de guisante como con histonas de eritrocito de pollo, sugieren que la actividad presente en este pico II se trata de la HAT A3, descrita y estudiada en el apartado 3.2. Del mismo modo, la elución característica en el gradiente de NH_4Cl del pico de actividad sobre oligonucleosomas, así como la acetilación preferente de H3 cuando se ensaya frente a histonas libres y también la acetilación de una proteína desconocida, que mueve por debajo de la histona H5 en la electroforesis en presencia de SDS, cuando se utilizan histonas de eritrocito de pollo como sustrato (Fig. 33), parecen indicar la presencia de la actividad HAT A2 en el pico I de la Figura 32A. Este resultado es coincidente con el mostrado en la Figura 11 del apartado 3.2, donde se concluye la asociación, al menos parcial, de la HAT A2 (y posiblemente de la HAT A3) a cromatina.

Al mismo tiempo, como muestran los resultados de especificidad de la Figura 33, el pico I parece estar constituido, además, por otro enzima con preferencia exclusiva por la histona H4. Se puede descartar la posibilidad de que esta actividad se trate de la HAT B, que se hubiese asociado inespecíficamente a la cromatina durante su extracción, por varias razones. En primer lugar, el procedimiento de extracción de cromatina utilizado supone el lavado de la cromatina cruda con un tampón conteniendo Triton X-100, que asegura la liberación de moléculas asociadas inespecíficamente a la cromatina. En segundo lugar, la elución entre 100 y 150 mM en NH_4Cl es muy diferente de la elución de la HAT B (300 mM, Fig.9) y finalmente, la HAT B posee mayor actividad sobre las histonas homólogas (Tabla II) que sobre las histonas de eritrocito de pollo, mientras que la HAT obtenida de cromatina, con especificidad por H4, acetila más eficazmente las histonas de eritrocito de pollo que las de guisante

(Figura 33). Por lo tanto, se puede considerar que la actividad HAT obtenida de cromatina y que acetila exclusivamente a la histona H4 corresponde a un isoenzima diferente a los descritos en el apartado 3.2. Se ha denominado a este nuevo isoenzima como HAT C. En cierto modo sorprende que la actividad HAT C no se detecte cuando la extracción enzimática se realiza a partir de embriones totales (Figuras 9 y 10) y sí en cambio cuando el extracto se obtiene de cromatina purificada (Figuras 32 y 33). La razón de estos resultados desacordes no se ha aclarado, pero son varias las consideraciones que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, no se puede descartar la posibilidad de que el enzima HAT C, debido a su sensibilidad, se vea afectado durante la extracción enzimática cuando se parte de embriones totales, produciéndose su pérdida, y no durante la extracción de los enzimas a partir de cromatina purificada. Es posible, también, que en el extracto enzimático obtenido de embriones totales exista algún inhibidor endógeno que afecte especialmente a la HAT C. De hecho, incluso en el extracto obtenido de cromatina, después de la ultracentrifugación, no se detecta prácticamente acetilación sobre la histona H4 (Figura 31) y sin embargo después de la cromatografía en DEAE-Sepharosa, se obtiene un pico importante de actividad correspondiente a la HAT C (Figuras 32 y 33), lo que indica que de algún modo, la HAT C está inhibida en el extracto crudo de cromatina. Finalmente también es posible que parte de la actividad HAT C esté presente en los eluidos obtenidos de extractos de embriones totales, pero su elución en una posición intermedia entre la HAT A1 y la HAT A2 dificultaría su detección. En este sentido, la acetilación observada sobre la histona H4, especialmente cuando se utilizan histonas de eritrocito de pollo, con los enzimas HAT A1 e HAT A2 en la Figura 17, puede ser consecuencia de contaminación de estas dos actividades con la actividad HAT C. De cualquier manera como se verá en el apartado siguiente, la extracción a partir de embriones totales puede conducir a la obtención de la actividad HAT C, a un nivel más fácilmente detectable, siempre que el tiempo de germinación de los embriones empleados no sea superior a 54h.

Los resultados del estudio de especificidad de la actividad HD de cromatina, purificada por DEAE-Sepharosa (Fig. 32) se muestran

en la Figura 34. La especificidad de esta HD coincide claramente con la HD2 descrita en el apartado 3.3. Así pues, se puede concluir que la HD2 está asociada a cromatina. Este resultado está, en cierto sentido, en contradicción con los presentados en la Figura 21, donde se muestra que ninguna de las desacetilasas de guisante parece estar asociada a cromatina. Con objeto de averiguar la razón de esta discrepancia se ha estudiado sistemáticamente la influencia de los componentes de los tampones de extracción de cromatina (apartado 2.2.4 de Material y Métodos) y de extracción enzimática (tampón B'). De este modo, se ha encontrado que lo que provoca la disociación del enzima de la cromatina, en los resultados de la Figura 21, es la ausencia del ión Mg^{2+} , el cual está presente en los tampones de extracción de cromatina. Sanders (1978) ha señalado que la presencia del ión Mg^{2+} mantiene el empaquetado de la cromatina nativa sin alterar su estructura y que la ausencia de cationes divalentes provoca su desestabilización. Así, parece que el mantenimiento de la estructura nativa de la cromatina es necesario para que la HD2 de guisante permanezca asociada. Este requerimiento puede estar reflejando un tipo de interacción, entre la HD2 y la cromatina en guisante, sustancialmente diferente al descrito para la HD en células de animales (Hay y Candido, 1983a; Mold y McCarty, 1987), donde el enzima permanece asociado a cromatina incluso en ausencia de cationes divalentes.

3.6 ACTIVIDADES HAT E HD DURANTE LA GERMINACION

Durante la germinación de las semillas tiene lugar un incremento importante en la síntesis de ácidos nucleicos (Sutcliffe y Bryant, 1971; Robinson y Bryant, 1975) como consecuencia de la transcripción y replicación. Por ello la germinación constituye un buen sistema donde puede relacionarse, de un modo directo, los cambios estructurales de la cromatina con estos procesos.

En este trabajo se ha intentado estudiar la evolución de las actividades HAT e HD a lo largo de la germinación de Pisum sativum. Para ello se hicieron extracciones enzimáticas de embriones de distinto tiempo de germinación (entre 0 y 66 h, cada 3-6 h). El procedimiento de extrac-

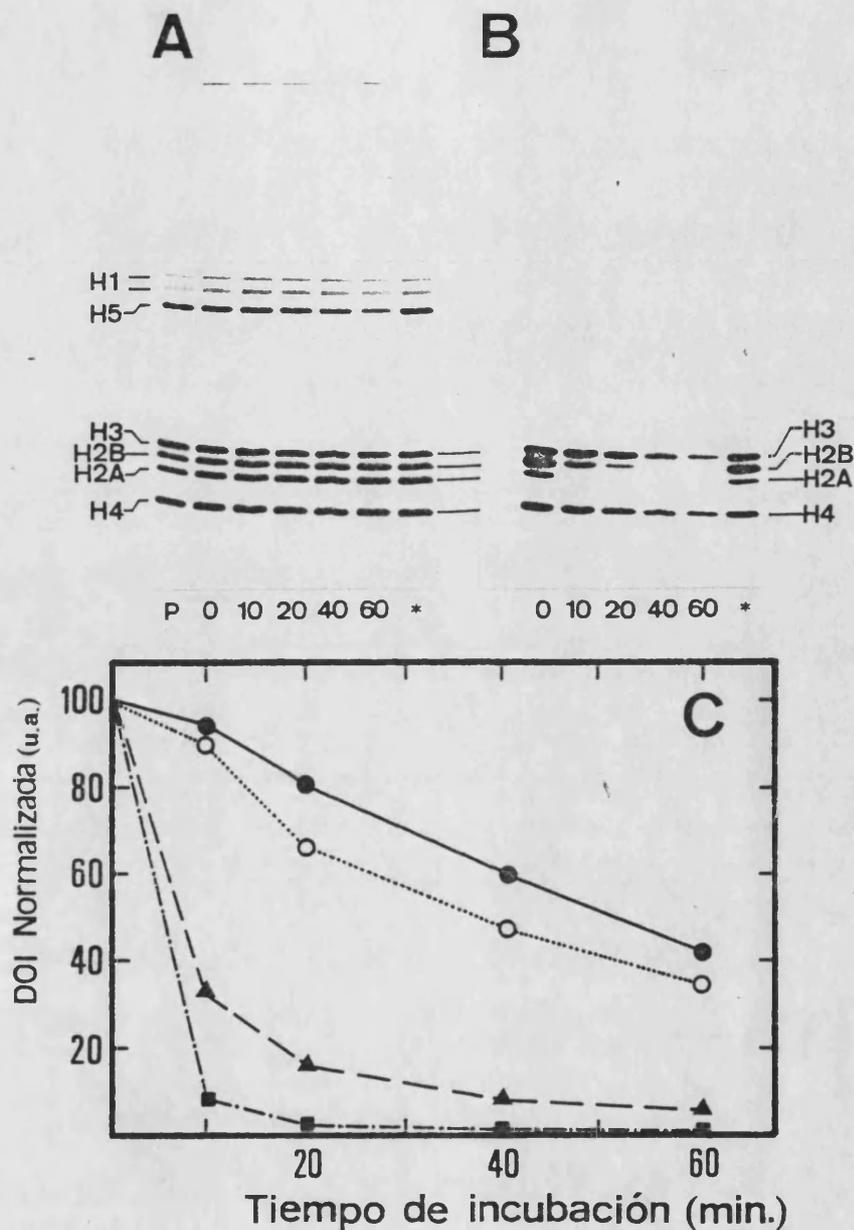


FIGURA 34. Especificidad de la HD obtenida de cromatina. El enzima disociado de la cromatina y purificado por DEAE-Sepharosa (Fig.32) se empleó para este ensayo. Se incubó la fracción enzimática con [3 H]-histonas de eritrocito distintos tiempos después de lo cual las histonas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. A) gel teñido con azul Coomassie; B) fluorograma; C) resultado densitométrico por análisis de imagen. (●—●) H3; (▲--▲) H2B; (■-■) H2A; (○---○) H4. Las cifras indican el tiempo de incubación. En * el extracto se inactivó previamente por calor y se incubó el tiempo más largo. P, es un patrón de histonas no marcadas.

ción fue la ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M. Las actividades enzimáticas se separaron mediante cromatografía en DEAE-Sepharosa y se valoraron midiendo el área de cada pico de actividad (mediante el analizador de imagen IBAS 2000). El valor de actividad de los enzimas se normalizó dividiendo por los miligramos de DNA total determinado en el extracto crudo inicial. La identificación de las diferentes actividades está basada en su especificidad frente a las distintas histonas (de guisante y de eritrocito de pollo). Para ello, las histonas ensayadas con todas las fracciones de los eluidos se sometieron a electroforesis y posterior fluorografía

Los resultados obtenidos en estas experiencias no han permitido precisar, de una manera cuantitativa y continua, la variación de las actividades enzimáticas a lo largo de la germinación, debido, probablemente, a que no todos los embriones obtenidos a un mismo tiempo de germinación están igualmente desarrollados, aunque las semillas se han germinado en idénticas condiciones. Otra posible causa de variabilidad es la debida al proceso de extracción, aunque como se ha mencionado anteriormente (apartado 3.1.3) el procedimiento de extracción utilizado no parece influir de modo importante en el nivel de actividad de los enzimas recuperados, al menos cuando se utilizan embriones de 62 h.

Del estudio realizado a lo largo de la germinación podríamos señalar algunos resultados. En primer lugar se ha detectado la presencia de todas las actividades HAT descritas en todos los tiempos de germinación ensayados (entre 0 y 66 h). Las actividades HAT A2 e HAT C parecen ser más abundantes en embriones de tiempo de germinación cortos (0-21 h), obteniéndose con niveles de actividad más bajos a tiempos de germinación mayores. Este último efecto es especialmente acusado con la HAT C. En embriones de edad superior a 54 h la actividad HAT C observada es muy baja, en relación a los otros enzimas.

La HAT A3 se ha obtenido siempre con un nivel de actividad mucho más bajo que las otras HAT manteniéndose en el mismo nivel a lo largo de toda la germinación. Las actividades HAT A1 e HAT B, tam-

bién presentes en todos los tiempos de germinación ensayados, parecen mantener siempre el mismo nivel de actividad, aunque se observa un ligero aumento en embriones de edad comprendida entre 18 y 24 h.

En cuanto a las actividades histona desacetilasa, la HD1 y la HD2 también están presentes en todos los tiempos de germinación ensayados, sin variación apreciable de actividad. En cambio, la actividad HD0 sólo se detecta cuando se utilizan embriones con un tiempo de germinación de 54 h o superior.

Finalmente podemos resaltar la presencia de actividades HAT e HD (exceptuando la HD0) en embriones de tiempo 0. Dada la posibilidad de que estas enzimas puedan haber sido sintetizadas o de alguna manera activados durante la imbibición de las semillas, se realizó una extracción utilizando embriones que se obtuvieron directamente de la semilla seca. El procedimiento de extracción con estos embriones fue exactamente el mismo que el utilizado anteriormente para embriones de distintos tiempos de germinación. La elución de la cromatografía de DEAE-Sepharosa y la posterior fluorografía revelaron la presencia de todas las actividades HAT e HD (exceptuando la HD0). La presencia de estas actividades en embriones durmientes en la semilla seca, sugiere que son actividades especialmente importantes para la posterior germinación y por ello, probablemente, se mantienen en la semilla seca.

4. CONCLUSIONES

-En este trabajo se ha puesto a punto la extracción y purificación de actividades HAT e HD en una especie vegetal, Pisum sativum. Para ello se han contrastado tres procedimientos de extracción de proteínas, que son: precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90% de saturación, precipitación con PEG 20% y ultracentrifugación en presencia de NH_4Cl 0.5 M. Este último es el que mejores resultados ha proporcionado, ya que además de obtener un mayor nivel de actividad enzimática, se obtienen isoenzimas HAT que no son extraídos en forma activa con los otros dos procedimientos.

-La extracción enzimática de embriones de guisante de 62 h de germinación permite la detección de cuatro actividades HAT, denominadas en este trabajo A1, A2, A3 y B.

La caracterización de estos enzimas ha revelado su identidad como verdaderas HAT al acetilar con mayor eficiencia a las histonas que a otros sustratos.

Del mismo modo, se ha demostrado la distinta naturaleza de los isoenzimas HAT, apoyada en sus diferentes propiedades físico-químicas y de comportamiento frente a inhibidores potenciales y sobre todo en su distinta especificidad hacia tipos concretos de histonas. Las actividades HAT A1, A2 y A3 acetilan preferentemente la histona H3, siendo esta preferencia exclusiva cuando se trata de la HAT A3. La HAT B modifica exclusivamente a la histona H4.

Sólo la HAT A2 se ha mostrado capaz de acetilar a las histonas cuando éstas están formando parte de nucleosomas. En este caso, el enzima acetila únicamente la histona H3.

-La extracción de actividades HAT asociadas a cromatina ha conducido a la obtención de tres picos de actividad. Dos de ellos se han identificado como las HAT A2 y A3 y el tercero, con especificidad exclusiva por H4, es claramente distinto de la HAT B. Este pico de actividad extraído de cromatina se ha denominado HAT C y parece ser un isoenzima diferente, que no se pone de manifiesto en extracciones totales de embriones de 62h.

-Los resultados obtenidos, fundamentalmente de especificidad frente a las histonas y de asociación a la cromatina, permiten sugerir que las HAT A1 y B son enzimas citoplasmáticos encargados de la acetilación de las histonas H3 y H4, repectivamente, relacionada con el ensamblaje de la cromatina. Las otras actividades HAT descritas, A2 y A3 y la HAT C obtenida de cromatina, son enzimas nucleares, asociados a cromatina y por tanto deben poseer, probablemente, algún papel funcional relacionado con la actividad génica de la cromatina.

-En este trabajo se han descrito tres actividades histona desacetilasa denominadas HD0, HD1 y HD2. Su caracterización molecular ha revelado que se tratan de tres formas isoenzimáticas diferentes.

Las tres formas de la HD pueden utilizar histonas formando parte de nucleosomas (de eritrocito de pollo) como sustrato, aunque prefieren a las histonas libres. No desacetilan sustratos de bajo peso molecular como las acetyl-poliaminas o acetyl-lisina. Muestran más actividad sobre las histonas acetiladas biológicamente que sobre las marcadas artificialmente. Todos estos resultados sugieren que las actividades desacetilasa descritas en este trabajo son verdaderas histona desacetilasas.

A diferencia de las HD de animales, las HD de guisante se inhiben por el acetato y muy poco por el n-butirato. La inhibición de las HD de guisante por poliaminas también es menor que la producida en HD de otros eucariotas.

El estudio de especificidad ha mostrado que la HD1 y HD2 desacetilan preferentemente a las histonas H2A y H2B, mientras que la HD0 desacetila a las cuatro histonas de "core" con cierta preferencia por la histona H3.

-De las tres HD, sólo la HD2 parece estar asociada a cromatina. La HD2 se disocia al eliminar el ión Mg^{2+} , lo que sugiere que es necesario el mantenimiento de la estructura de la cromatina para esta asociación.

-Todas las actividades HAT e HD (excepto la HD0) se han detectado en todos los tiempos de germinación ensayados entre 0 y 66 h. La HD0 aparece sólo después de las 54 h de germinación.

-Las mismas actividades enzimáticas HAT e HD se han detectado en embriones durmientes de semillas secas, lo que sugiere que estas actividades deben desempeñar un importante papel en la germinación posterior de la semilla.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alfageme, C.R., Zweidler, A., Mahowald, A. & Cohen, L. (1974) Histones of Drosophila embryos: electrophoretic isolation and structural studies. *J. Biol. Chem.* **249**, 3729-3736.
- Allan, J., Cowling, G.J., Harbone, N., Cattini, P. & Craigie, R. (1981) Regulation of the higher order structure of chromatin by histone H1 and H5. *J. Cell Biol.* **90**, 279-288.
- Allan, J., Harbone, N., Rau, D.C. & Gould, H. (1982) Participation of core histone tails in the stabilization of chromatin solenoid. *J. Cell Biol.* **93**, 285-293.
- Allan, J., Hartmann, P.G., Crane-Robinson, C. & Aviles, F.X. (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* **288**, 675-679.
- Allfrey, V.G. (1977) Post-synthetic modifications of histone structure: A mechanism for the control of chromosome structure by the modulation of histone-DNA interactions. En "Chromatin and chromosome structure" (Li, H.J. & Eckhardt, R.A., eds.) pp. 167-192, Academic Press, New York.
- Allfrey, V.G., Di Paola, E.A. & Sterner, R. (1984) Protein side-chain acetylation. *Methods in Enzymology* **107**, 224-240.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. & Mirsky, A.E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **51**, 786-794.
- Allis, C.D., Chicoine, L.G., Richman, R. & Schulman, I.G. (1985) Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 8048-8052.
- Allis, C.D., Glover, C.V.C., Bowen, J.K. & Gorovsky, M.A. (1980) Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eukaryote Tetrahymena thermophila. **20**, 609-617.
- Allis, C.D., Richman, R., Gorovsky, M.A., Ziegler, Y.S., Touchstone, B., Bradler, W.A. & Cook, R.G. (1986) Hv1 is an evolutionarily conserved H2A variant that is preferentially associated with active genes. *J. Biol. Chem.* **261**, 1941-1948.
- Alonso, W.R. & Nelson, D.A. (1986) A novel yeast histone deacetylase: partial characterization and development of an activity assay. *Biochim. Biophys. Acta* **866**, 161-169.
- Annunziato, A.T. & Seale, R.L. (1983) Histone deacetylation is required for the maturation of newly replication chromatin. *J. Biol. Chem.* **258**, 12675-12684.
- Arfmann, H.-A. & Haase, E. (1981) Effect of sodium butyrate on the modification of histone in cell cultures of Nicotiana tabacum. *Plant. Sci. Lett.* **21**, 317-324.
- Ausió, J. & van Holde, K.E. (1986) Histone hyperacetylation: its effects on nucleosome conformation and stability. *Biochemistry* **25**, 1421-1428.
- Belikoff, E., Wong, L.-J. & Alberts, B.M. (1980) Extensive purification of histone acetylase A, the major histone N-acetyltransferase activity detected in mamalian cell nuclei. *J. Biol. Chem.* **255**, 11448-11453.

- Bertrand, E., Erard, M., Gómez-Lira, M.M. & Bode, J. (1984) Influence of histone hyperacetylation on nucleosomal particles as visualized by electron microscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **229**, 395-398.
- Bloom, K.S. & Anderson, J.N. (1978) Fractionation of hen oviduct chromatin into transcriptionally active and inactive regions after selective micrococcal nuclease digestion. *Cell* **15**, 141-150.
- Bode, J., Gómez-Lira, M.M. & Schröter, H. (1983) Nucleosomal particles open as the histone core becomes hyperacetylated. *Eur. J. Biochem.* **130**, 437-445.
- Bode, J., Henco, K. & Wingender, E. (1980) Modulation of the nucleosome structure by histone acetylation. *Eur. J. Biochem.* **110**, 143-152.
- Bradbury, E.M. (1975) Histone nomenclature. En "The structure and function of chromatin" (Symposium, Ciba Foundation, ed.) pp. 1-4, Associated Scientific Publ., Amsterdam.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brotherton, T.W. & Ginder, G.D. (1986) Preferential in vitro binding of high mobility group proteins 14 and 17 to nucleosomes containing active and DNase I sensitive single-copy genes. *Biochemistry* **25**, 3447-3454.
- Böhm, J., Schlaeger, E.-J. & Knippers, R. (1980) Acetylation of nucleosomal histone in vitro. *Eur. J. Biochem.* **112**, 353-362.
- Candido, E.P.M. (1975) Partial characterization of a histone acetyltransferase from trout testis. *Can. J. Biochem.* **53**, 796-803.
- Candido, E.P.M., Reeves, R. & Davie, J.R. (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation cultured cells. *Cell* **14**, 105-113.
- Cano, A. & Pestaña, A. (1976) Regulation of histone acetyltransferase activity during the development of Artemia salina. Characterization of an inhibitor in Nauplius larvae. *Dev. Biol.* **54**, 276-287.
- Cartwright, I.L. & Elgin, S.C.R. (1988) Chromatin of active and inactive genes. En "Architecture of eukaryotic genes" (Kahl, G., ed.) pp. 283-300, Weinheim, F.R.G.
- Cartwright, I.L., Keene, M.A., Howard, G.C., Abmayr, S.M., Fleischmann, G., Lowenhaupt, K. & Elgin, S.C.R. (1982) Chromatin structure and gene activity: the role of non-histone chromosomal proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **13**, 1-86.
- Chapman, G.E., Hartaman, P.G. & Bradbury, E.M. (1976) Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 in eukaryote chromatin. The isolation of the globular and non-globular regions of the histone H1 molecule. *Eur. J. Biochem.* **61**, 69-75.
- Chicoine, L.G., Richman, R., Cook, R.G., Gorovsky, M.A. & Allis, C.D. (1987) A single histone acetyltransferase from Tetrahymena macronuclei catalyzes deposition-related acetylation of free histones and transcription-related acetylation of nucleosomal histones. *J. Cell Biol.* **105**, 127-135.
- Chicoine, L.G., Schulman, I.G., Richman, R., Cook, R.G. & Allis, C.D. (1986) Nonrandom utilization of acetylation sites in histones isolated from Tetrahymena. *J. Biol. Chem.* **261**, 1071-1076.

- Christensen, M.E. & Dixon, G.H. (1982) Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout. *Dev. Biol.* **93**, 404-415.
- Christensen, M.E., Ratner, J.B. & Dixon, H.G. (1984) Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucleic Acids Res.* **12**, 4575-4592.
- Cockerill, P.N. & Garrard, W.T. (1986) Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhance in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* **44**, 273-282.
- Cotten, M. & Chalkley, R. (1985) Hyperacetylated histones facilitate chromatin assembly in vitro. *Nucleic Acids Res.* **13**, 401-414.
- Cousens, L.S., Gallwitz, D. & Alberts, B.M. (1979) Different accesibilities in chromatin to histone acetylase. *J. Biol. Chem.* **254**, 1716-1723.
- Csordas, A., Puschendorf, B. & Grunicke, H. (1986) Increased acetylation of histones at an early stage of oestradiol-mediated gene activation in the liver of immature chicks. *J. Steroid Biochem.* **24**, 437-442.
- Davie, J.R. & Candido, E.P.M. (1978) Acetylated histone H4 is preferentially associated with template-active chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3574-3577.
- Davie, J.R., Saunders, C.A., Walsh, J.M. & Weber, S.C. (1981) Histone modifications in the yeast S. cerevisiae. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3205-3216.
- DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. & Bonner, J. (1969) Calf and pea histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.* **244**, 5669-5679.
- Delange, R.J., Hooper, J.A. & Smith, E.L. (1972) Complete aminoacid sequence of calf thymus histone III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 882-884.
- Doenecke, D. (1988) Histone, histone variants and postsynthetic histone modification. En "Architecture of eukaryotic genes" (Kahl, G., ed.) pp. 123-141, Weinheim, F.R.G.
- Doenecke, D. & Gallwitz, D. (1982) Acetylation of histones in nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* **44**, 113-128.
- Driessen, H.P.C., DeJong, W.W., Tesser, G.I. & Bloemendal, H. (1985) The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **18**, 281-306.
- Dubin, D.T. & Rosenthal, S.M. (1960) The acetylation of polyamines in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **235**, 776-782.
- Eissenberg, J.C., Cartwright, I.L., Thomas, G.H. & Elgin, S.C.R. (1985) Selected topics in chromatin structure. *Annu. Rev. Genet.* **19**, 485-536.
- Estepa, I. & Pestaña, A. (1983) Isolation and partial characterization of three histone-specific acetyltransferases from Artemia. *Eur. J. Biochem.* **132**, 249-254.

- Estruch, F., Pérez-Ortín, J.E. & Franco, L. (1986a) Fractionation of yeast chromatin by micrococcal nuclease digestion. *Cell Mol. Biol.* **32**, 195-199.
- Estruch, F., Pérez-Ortín, J.E., José, M., Puigdomènech, P. & Franco, L. (1986b) On the presence of HMG proteins in yeast. *FEBS Lett.* **197**, 179-182.
- Felsenfeld, G. (1978) Chromatin. *Nature* **271**, 115-122.
- Felsenfeld, G. & McGhee, J.D. (1986) Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell* **44**, 375-377.
- Ferenz, C.R. & Nelson, D.A. (1985) N-Butyrate incubation of immature chicken erythrocytes preferentially enhances the solubility of β A chromatin. *Nucleic Acids Res.* **13**, 1977-1995.
- Finch, J.T. & Klug, A. (1976) Solenoidal model for superstructure of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 1897-1901.
- Fukushima, M., Ota, K., Fujimoto, D. & Horiuchi, K. (1980) Nucleosome-histone acetyltransferase from rat liver chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1409-1414.
- Garcea, R.L. & Alberts, B.M. (1980) Comparative studies of histone acetylation in nucleosomes, nuclei, and intact cells. Evidence for special factors which modify acetylase action. *J. Biol. Chem.* **255**, 11454-11463.
- Gasser, S.M. (1988) Nuclear scaffold and the higher-order folding of eukaryotic DNA. En "Architecture of eukaryotic genes" (Kahl, G., ed.) pp. 462-471, Weinheim, F.R.G.
- Gasser, S.M. & Laemmli, V.K. (1986) The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* **5**, 511-518.
- Giancotti, V., Russo, E., DeCristini, F., Graziosi, G., Micali, F. & Crane-Robinson, C. (1984) Histone modification in early and late *Drosophila* embryos. *Biochem. J.* **218**, 321-329.
- Goodwin, G.H., Mathew, C.G.P., Wright, C.A., Venkov, C.D. & Johns, E.W. (1970) Analysis of the high mobility group proteins associated with salt-soluble nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1815-1835.
- Goodwin, G.H., Walker, J.M. & Johns, E.W. (1978) The high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins. En "The cell nucleus" (Busch, C., ed.) pp. 181-219, Acad. Press, New York.
- Grimes, S.R. & Henderson, N. (1983) Acetylation of histones during spermatogenesis in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **221**, 108-116.
- Gross, D.S. & Garrard, W.T. (1988) Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 159-197.
- Harborne, N. & Allan, J. (1983) Modulation of the relative trypsin sensitivities of the core histones tails. *FEBS Lett.* **155**, 88-92.
- Hay, C.W. & Candido, E.P.M. (1983a) Histone deacetylase. Association with a nuclease resistant, high molecular weight fraction of HeLa chromatin. *J. Biol. Chem.* **258**, 3726-3734.
- Hay, C.W. & Candido, E.P.M. (1983b) Histone deacetylase from HeLa cells: properties of high molecular weight complex. *Biochemistry* **22**, 6175-6180.

- Hebbes, T.R., Thorne, A.W. & Crane-Robinson, C. (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**, 1395-1402.
- Hirose, M. (1988) Effects of histone acetylation on nucleosome properties as evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis and hydroxylapatite dissociation chromatography. *J. Biochem.* **103**, 31-35.
- Iman, B.S., Yau, P., Baldwin, J.P., Ibel, K., May, R.P. & Bradbury, E.M. (1986) Hyperacetylation of core histone does not cause unfolding of nucleosomes. *J. Biol. Chem.* **261**, 8784-8792.
- Inoue, A. & Fujimoto, D. (1969) Enzymatic deacetylation of histone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 146-150.
- Inoue, A. & Fujimoto, D. (1970) Histone deacetylase from calf thymus. *Biochim. Biophys. Acta* **220**, 307-316.
- Isenberg, I. (1979) Histones. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 159-191.
- Jackson, V., Shires, A., Tamphaichitr, N. & Chalkley, R. (1976) Modification to histones immediately after synthesis. *J. Mol. Biol.* **104**, 471-483.
- James, T.C., Amero, S.A. & Elgin, S.C.R. (1988) Recent progress in the study of non histone chromosomal proteins. En "Architecture of eukaryotic genes" (Kahl, G., ed.) pp. 207-237, Weinheim, F.R.G.
- Johnson, E.M., Sterner, R. & Allfrey, V.G. (1987) Altered nucleosomes of active nucleolar chromatin contain accesible histone H3 in its hyperacetylated forms. *J. Biol. Chem.* **262**, 6943-6946.
- Kahl, G., Görz, A., Weising, K., Schafer, W. & Hirasawa, E. (1988) Chromatin structure of plant genes. En "Architecture of eukaryotic genes" (Kahl, G., ed.) pp. 301-332, Weinheim, F.R.G.
- Kaplan, L.J., Bauer, R., Morrison, E., Langan, T.A. & Fasman, G.D. (1984) The structure of chromatin reconstituted with phosphorylated H1. Cicular dichroism and thermal denaturation studies. *J. Biol. Chem.* **259**, 8777-8786.
- Kayne, P.S., Kim, U.-J., Han, M., Muller, J.R., Yoshizaki, F. & Grunstein, M. (1988) Extremely conserved histone H4 N-terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* **55**, 27-39.
- Kelner, D.N. & McCarty, K.S., Sr (1984) Porcine liver nuclear histone acetyltransferase. Partial purification and basic properties. *J. Biol. Chem.* **259**, 3413-3419.
- Kikuchi, H. & Fujimoto, D. (1973) Multiplicity of histone deacetylase from calf thymus. *FEBS Lett.* **29**, 280-282.
- Kimura, T., Mills, F.C., Allan, J. & Gould, H. (1983) Selective unfolding of erythroid chromatin in the region of the active β -globin gene. *Nature* **306**, 709-712.
- Kolodrubetz, D., Rykowski, M.D. & Grunstein, M. (1982) Histone H2A subtypes associate interchangably *in vivo* with histone H2B subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7814-7818.
- Kornberg, R.D. (1977) Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 931-954.

- Kornberg, R.D. (1984) Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Labarca, C. & Paigen, K. (1980) A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344-352.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Levy-Wilson, B., Connor, W. & Dixon, G. (1979) A subset of trout testis nucleosomes enriched in transcribed DNA sequences contains High Mobility Group proteins as major structural components. *J. Biol. Chem.* 254, 609-620.
- Levy-Wilson, B. & Dixon, G. (1979) Limited action of micrococcal nuclease on trout testis nuclei generates two mononucleosome subsets enriched in transcribed DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1682-1686.
- Levy-Wilson, B., Watson, D.C. & Dixon, G.H. (1979) Multiacetylated forms of H4 are found in a putative transcriptionally competent chromatin fraction from trout testis. *Nucleic Acids Res.* 6, 259-274.
- Libby, P.R. (1970) Activity of histone deacetylase in rat liver and Novikoff hepatoma. *Biochim. Biophys. Acta* 213, 234-236.
- Libby, P.R. (1973) Histone acetylation and hormone action. *Biochem. J.* 134, 907-912.
- Libby, P.R. (1978) Calf liver nuclear N-acetyltransferases. Purification and properties of two enzymes with both spermidine acetyltransferase and histone acetyltransferase activities. *J. Biol. Chem.* 253, 233-237.
- Libby, P.R. (1980) Rat liver nuclear N-acetyltransferases: separation of two enzymes with both histone and spermidine acetyltransferase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 203, 384-389.
- Libby, P.R. & Bertram, J.S. (1980) Biphasic effect of polyamines on chromatin-bound histone deacetylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 359-361.
- Loidl, P. (1988) Towards an understanding of the biological function of histone acetylation. *FEBS Lett.* 227, 91-95.
- Loidl, P. & Gröbner, P. (1987a) Histone synthesis during the cell cycle of Physarum polycephalum. Synthesis of different histones species is not under a common regulatory control. *J. Biol. Chem.* 262, 10195-10199.
- Loidl, P. & Gröbner, P. (1987b) Postsynthetic acetylation of histones during the cell cycle: a general function for the displacement of histones during chromatin rearrangements. *Nucleic Acids Res.* 15, 8351-8366.
- Loidl, P., Loidl, A., Puschendorf, B. & Gröbner, P. (1984) RNA polymerase activity and template activity of chromatin after butyrate induced hyperacetylation of histones in Physarum. *Nucleic Acids Res.* 12, 5405-5417.
- López-Rodas, G. (1987) Sistemas enzimáticos implicados en el grado de acetilación de las histonas en Saccharomyces cerevisiae. Tesis Doctoral. Universitat de València.

- López-Rodas, G., Pérez-Ortín, J.E., Tordera, V., Salvador, M.L. & Franco, L. (1985) Partial purification and properties of two histone acetyltransferases from the yeast Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. Biophys. **239**, 184-190.
- Marushige, K. (1976) Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **73**, 3937-3941.
- Mathis, D.J., Oudet, P., Wasylyk, B. & Chambon, P. (1978) Effect of histone acetylation on structure and in vitro transcription of chromatin. Nucleic Acids Res. **5**, 3523-3547.
- Mayes, E.L.V. (1982) Species and tissue specificity. En "The HMG chromosomal proteins" (Johns, E.W., ed.) pp. 9-40, Acad. Press, London.
- McGhee, J.D., Nickol, J.M., Felsenfeld, G. & Rau, D.C. (1983) Histone hyperacetylation has little effect on the higher order folding of chromatin. Nucleic Acids Res. **11**, 4065-4075.
- McGhee, J.D., Rau, D.C., Charney, E. & Felsenfeld, G. (1980) Orientation of the nucleosome within the higher structure of chromatin. Cell **22**, 87-96.
- Mezquita, J., Chiva, M., Vidal, S. & Mezquita, C. (1982) Effect of high mobility group nonhistone proteins HMG-20 (ubiquitin) and HMG-17 on histone deacetylase activity assayed in vitro. Nucleic Acids Res. **10**, 1781-1797.
- Mirkovitch, J., Mirault, M.E. & Laemmli, U.K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. Cell **39**, 223-232.
- Mold, D.V. & McCarty, K.S. (1987) A chinese hamster ovary cell histone deacetylase that is associated with a unique class of mononucleosomes. Biochemistry **26**, 8257-8262.
- Nelson, D.A., Perry, M., Sealy, L. & Chalkley, R. (1978) DNase I preferentially digests chromatin containing hyperacetylated histones. Biochem. Biophys. Res. Commun. **82**, 1346-1353.
- Nicolas, R.H. & Goodwin, G.H. (1982). En "The HMG chromosomal proteins" (Johns, E.W., ed.) pp. 41-48, Academic Press.
- Nohara, H., Takahashi, T. & Ogata, K. (1966) Acetylation of histones by pigeon liver enzymes. Biochim. Biophys. Acta **127**, 282-284.
- Norton, V.G., Imai, B.S., Yau, P. & Bradbury, E.M. (1989) Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. Cell **57**, 449-457.
- Oberhauser, H., Csordas, A., Puschendorf, B. & Grunicke, H. (1978) Increase in initiation sites for chromatin directed RNA synthesis by acetylation of chromosomal proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. **84**, 110-116.
- Olins, A.L. & Olins, D.E. (1974) Spheroid chromatin units (v-bodies). Science **183**, 330-332.
- Oliva, R. & Mezquita, C. (1982) Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. Nucleic Acids Res. **10**, 8049-8059.

- Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281-300.
- Paik, W.K., Pearson, D., Lee, H.W. & Kim, S. (1970) Nonenzymatic acetylation of histones with acetyl-CoA. *Biochim. Biophys. Acta* 213, 513-522.
- Pashev, I.G., Dimitrov, S.I., Ivanov, I.G. & Markov, G.G. (1983) Histone acetylation in chromatin containing mouse satellite DNA. *Eur. J. Biochem.* 133, 379-382.
- Paulson, J.R. & Laemmli, U.K. (1977) The structure of histone depleted metaphase chromosome. *Cell* 12, 817-828.
- Pederson, D.S., Thoma, F. & Simpson, R.T. (1986) Core particle, fiber and transcriptionally active chromatin structure. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 117-147.
- Perry, M. & Chalkley, R. (1981) The effect of histone hyperacetylation on the nuclease sensitivity and the solubility of chromatin. *J. Biol. Chem.* 256, 3313-3318.
- Pesis, K.H. & Matthews, H.R. (1986) Histone acetylation in replication and transcription: turnover at specific acetylation sites in histone H4 from Physarum polycephalum. *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 665-673.
- Phillips, D.M.P. (1963) The presence of acetyl groups in histones. *Biochem. J.* 87, 258-263.
- Racey, L.A. & Byvoet, P. (1972) Histone acetyltransferase in chromatin. *Exp. Cell Res.* 73, 329-334.
- Reeves, R. (1984) Transcriptionally active chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 782, 343-393.
- Reeves, R. & Candido, E.P.M. (1980) Partial inhibition of histone deacetylase in active chromatin by HMG 14 and HMG 17. *Nucleic Acids Res.* 8, 1947-1963.
- Richman, R., Chicoine, L.G., Collini, M.P., Cook, R.G. & Allis, C.D. (1988) Micronuclei and the cytoplasm of growing Tetrhymena contain a histone acetylase activity which is highly specific for free histone H4. *J. Cell Biol.* 106, 1017-1026.
- Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D. & Klug, A. (1984) Structure of the nucleosome core particle of 7 Å resolution. *Nature* 311, 532-537.
- Riggs, M.G., Whittaker, R.G., Neumann, J. & Ingram, V.M. (1977) n-Butyrate cause histone modifications in HeLa and friend erythroleukemia cells. *Nature* 268, 462-464.
- Robinson, N.E. & Bryant, J.A. (1975) Onset of nucleic acid synthesis during germination of Pisum sativum. *Planta* 127, 63-68.
- Rodrigo, I. (1987) Estudio de la actividad histona desacetilasa en Pisum sativum. Tesina de licenciatura. Universitat de València.
- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J. & Allfrey, V.G. (1975) Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190, 117-128.
- Salvador, M.L., Sendra, R., López-Rodas, G., Tordera, V. & Franco, L. (1985) On the ubiquitous presence of histone acetyltransferase B in eukaryotes. *FEBS Lett.* 191, 55-58.

- Sanders, M.M. (1978) Fractionation of nucleosomes by salt elution from micrococcal nuclease-digested nuclei. *J. Cell Biol.* **79**, 97-109.
- Schuster, T., Hau, M. & Grunstein, M. (1986) Yeast histone H2A and H2B amino termini have interchangeable functions. *Cell* **45**, 445-451.
- Sealy, L. & Chalkley, R. (1978) The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell* **14**, 115-121.
- Simpson, R.T. (1978a) Structure of chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* **17**, 5524-5531.
- Simpson, R.T. (1978b) Structure of chromatin containing extensively acetylated H3 and H4. *Cell* **13**, 691-699.
- Simpson, R.T. (1981) Modulation of nucleosome structure by histone subtypes in sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 6803-6807.
- Spiker, S. (1982) Histone variants in plants. Evidence for primary structure variants differing in molecular weight. *J. Biol. Chem.* **257**, 14250-14255.
- Spiker, S. (1985) Plant chromatin structure. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 235-253.
- Spiker, S. (1988a) Histone variants and high mobility group non-histone chromosomal proteins of higher plants: their potential for forming a chromatin structure that is either poised for transcription or transcriptionally inert. *Physiol. Plant* **74**, 200-213.
- Spiker, S. (1988b) Histones and HMG proteins of higher plants. In "Architecture of eukaryotic genes" (Kahl, G., ed.) pp. 143-162, Weinheim, F.R.G.
- Spiker, S. & Everett, K.M. (1987) Blotting index of dissimilarity: use to study immunological relatedness of plants and animal High Mobility Group (HMG) chromosomal proteins. *Plant Mol. Biol.* **9**, 431-442.
- Spiker, S., Murray, M.G. & Thompson, W.F. (1983) DNase I sensitivity of transcriptionally active genes in intact nuclei and isolated chromatin of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 815-819.
- Stadler, J., Groudine, M., Dodgson, J.B., Engel, J.D. & Weintraub, H. (1980) Hb switching in chickens. *Cell* **19**, 973-980.
- Storey, R.D. & Wagner, F.W. (1986) Plant protease: a need for uniformity. *Phytochemistry* **25**, 2701-2709.
- Sung, M.T. & Dixon, G.H. (1970) Modification of histones during spermiogenesis in trout: a molecular mechanism for altering histone-binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 1616-1623.
- Sures, I. & Gallwitz, D. (1980) Histone-specific acetyltransferases from calf thymus. Isolation, properties and substrate specificity of three different enzymes. *Biochemistry* **19**, 943-951.
- Sutcliffe, J.F. & Bryant, J.A. (1971) Biochemistry of germination. In "The physiology of the garden pea" (Sutcliffe, J.F. & Pate, J.S., eds.) pp. 45-88, Academic Press, London.
- Tack, L.O. & Simpson, R.T. (1979) Location of histone lysyl residues modified by in vitro acetylation of chromatin. *Biochemistry* **18**, 3110-3118.

- Thoma, F., Koller, T. & Klug, A. (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt dependent superstructures of chromatin. *J. Biol. Chem.* **83**, 403-427.
- Travis, G.H., Colavito-Shepanski, M. & Grunstein, M. (1984) Extensive purification and characterization of chromatin-bound histone acetyltransferase from Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **259**, 14406-14412.
- Ull, M.A. & Franco, L. (1986) The nucleosomal repeat length of pea (Pisum sativum) chromatin changes during germination. *Plant Mol. Biol.* **7**, 25-31.
- Vavra, K.J., Allis, C.D. & Gorovsky, M.A. (1982) Regulation of histone acetylation in Tetrahymena macro- and micronuclei. *J. Biol. Chem.* **257**, 2591-2598.
- Vidali, G., Boffa, L.C. & Allfrey, V.G. (1972) Properties of an acidic histone-binding protein fraction from cell nuclei. Selective precipitation and deacetylation of histones f2a1 and f3. *J. Biol. Chem.* **247**, 7365-7373.
- Vidali, G., Boffa, L.C., Bradbury, E.M. & Allfrey, V.G. (1978) Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 2239-2243.
- Vidali, G., Ferrari, N. & Pfeffer, U. (1988) Histone acetylation: a step in gene activation. En "Advances in post-translational modifications of proteins and aging." (Zappia, V., Galletti, P., Porta, R. & Wold, F., eds.) pp. 583-596, Plenum Press, New York and London.
- Vu, Q.A., Zhang, D., Chronos, Z.C. & Nelson, D.A. (1987) Polyamines inhibit the yeast histone deacetylase. *FEBS Lett.* **220**, 79-83.
- Walker, J.M. & Johns, E.W. (1980) The isolation, characterization and partial sequences of chicken erythrocyte non-histone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17. *Biochem. J.* **185**, 383-386.
- Wallis, J.W., Rykowski, M. & Grunstein, M. (1983) Yeast histone H2B containing large amino terminus deletions can function in vivo. *Cell* **35**, 711-719.
- Waterborg, J.H. & Matthews, H.R. (1982a) A more sensitive assay for histone deacetylase. *Anal. Biochem.* **122**, 313-318.
- Waterborg, J.H. & Matthews, H.R. (1982b) Control of histone acetylation. Cell-cycle dependence of deacetylase activity in Physarum nuclei. *Exp. Cell Res.* **138**, 462-466.
- Waterborg, J.H. & Matthews, H.R. (1983) Patterns of histone acetylation in the cycle of Physarum polycephalum. *Biochemistry* **22**, 1489-1496.
- Waterborg, J.H. & Matthews, H.R. (1984) Patterns of histone acetylation in Physarum polycephalum. *Eur. J. Biochem.* **142**, 329-335.
- Waterborg, J.H., Winicov, I. & Harrington, R.E. (1987) Histone variants and acetylated species from alfalfa plant Medicago sativa. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 167-178.
- Weinsbrod, S. (1982) Active chromatin. *Nature* **297**, 289-295.
- Weintraub, H. (1984) Histone-H1-dependent chromatin superstructure and the suppression of gene activity. *Cell* **38**, 17-27.

- Weintraub, H. & Groudine, M. (1976) Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* **193**, 848-856.
- Weintraub, H., Palter, K. & Van Lente, F. (1975) Histones H2A, H2B, H3 and H4 form a tetrameric complex in solution of high salt. *Cell* **6**, 83-88.
- Weisbrod, S., Groudine, M. & Weintraub, H. (1980) Interactions of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes. *Cell* **19**, 289-301.
- Weisbrod, S. & Weintraub, H. (1979) Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible of conferring a DNase I-sensitive structure on globin chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 630-634.
- Werner, D., Rest, R. & Neuer-Nitsche, B. (1988) Nuclear matrix. En "Architecture of eukaryotic genes" (Kahl, G., ed.) pp. 449-459, Weinheim, F.R.G.
- Whitlock, J.P. & Stein, A. (1978) Folding of DNA by histones which lack their NH₂-terminal regions. *J. Biol. Chem.* **253**, 3857-3861.
- Wiegand, R.C. & Brutlag, D.L. (1981) Histone acetyltransferase from Drosophila melanogaster specific for H4. *J. Biol. Chem.* **256**, 4578-4583.
- Wiktorowicz, J.E. & Bonner, J. (1982) Studies on histone acetyltransferase. Partial purification and basic properties. *J. Biol. Chem.* **257**, 12893-12900.
- Wold, F. (1984) Acetylated N-terminals in proteins - a perennial enigma. *Trends Biochem.* **9**, 256-258.
- Wong, L.-J. & Patton, W.F. (1985) Salt inhibition of nuclear histone acetyltransferase from calf thymus. *Int. J. Biochem.* **17**, 123-126.
- Worcel, A., Strogatz, S. & Riley, D. (1981) Structure of chromatin and the linking number of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 1461-1465.
- Wu, C. (1980) The 5'ends of Drosophila heat shock genes in chromatin are hypesensitive to DNase I. *Nature* **286**, 854-860.
- Wu, C., Bingham, P.M., Livak, K.J., Holmgren, R. & Elgin, S.C.R. (1979) The chromatin structure of specific genes. I. Evidence for higher order domains of defined DNA sequence. *Cell* **16**, 797-806.
- Wu, R.S., Panusz, H.T., Hatch, C.L. & Bonner, W.M. (1986) Histones and their modifications. *CRC. Crit. Rev. Biochem.* **20**, 201-263.
- Yau, P., Thorne, A.W., Imai, B.S., Matthews, H.R. & Bradbury, E.M. (1982) Thermal denaturation studies of acetylated nucleosomes and oligonucleosomes. *Eur. J. Biochem.* **129**, 281-288.
- Yukioka, M., Sasaki, S., Henmi, S., Matsud, M., Hatyama, T. & Inoue, A. (1983) Transcribing chromatin is not preferentially enriched with acetylated histones. *FEBS Lett.* **158**, 281-287.
- Yukioka, M., Sasaki, S., Qi, S.-L. & Inoue, A. (1984) Two species of histone acetyltransferase rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* **259**, 8372-8377.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. Ramón Sendra Pérez
la calificación de APTO "CON LAUDE"

Valencia, a 10 de noviembre de 1989

El Secretario,

El Presidente

