

T.D. 2/15

B

UNIVERSITAT DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTRUCTURA DE LA CROMATINA
DEL GEN SUC2 DE
Saccharomyces cerevisiae.**

Trabajo presentado por
JOSE ENRIQUE PEREZ ORTIN
para optar al grado de
Doctor en Ciencias
Biológicas.

BIBLIOTECA
FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGQUES
VALENCIA

UMI Number: U607635

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 U607635

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

Ri. 18764186

R. 3156

Don Luis Franco Vera, Doctor en Ciencias Químicas,
Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Ciencias
Biológicas de la Universitat de València.

CERTIFICA: que Don José Enrique Pérez Ortín ha realizado
bajo su dirección en este laboratorio el trabajo que
presenta con el título de "Estructura de la cromatina del
gen SUC2 de Saccharomyces cerevisiae".

Valencia, 23 de Julio de 1986



Fdo: Luis Franco Vera

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Bioquímica de las Facultades de Ciencias Biológicas y Químicas de la Universitat de València, bajo la dirección del Prof. Luis Franco Vera, a quién quiero hacer constar mi agradecimiento por introducirme en un tema de investigación apasionante, así como por sus enseñanzas y dedicación.

También deseo hacer constar mi agradecimiento a mis compañeros de grupo de trabajo: Paco Estruch, Emilia Matallana y Jaime Martínez, cuya ayuda ha sido fundamental en este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a mis padres, amigos y compañeros de departamento su estímulo y ayuda durante la realización de la Tesis Doctoral.

Valencia 24 de Julio de 1986

ABREVIATURAS

ABM:	m-aminobenciloximetilo
Bisacrilamida:	N, N' metilén-bis-acrilamida
BSA:	seroalbúmina bovina
DBM:	diazobenciloximetilo
Dimetil-POPOP	dimetilo de 2, 2'- p-fenilén-bis-(5-feniloxazol)
DNAr:	DNA ribosomal
DNasa I:	desoxirribonucleasa I
D.O.:	densidad óptica
DTT:	ditiotreitól
EDTA:	etilén diamino tetraacético, sal disódica
HMG:	proteínas no histonas de alta movilidad electroforética
hsp:	proteínas del choque térmico
kb:	kilo pares de bases
MNasa:	nucleasa de micrococo
pb:	pares de bases
PMSF:	fluoruro de fenil-metán-sulfonilo
PNH:	proteínas cromosomales no histonas
PPQ:	2, 5-difeniloxazol
p/v:	peso/volumen
PVP:	polivinil pirrolidona
RNAhn:	RNA nuclear heterogéneo

RNasa: ribonucleasa
SDS: dodecil sulfato sódico
TCA: ácido tricloroacético
TEMED: N, N, N', N'-tetrametil etilén
diamina
Tris: Tris (hidroximetil)amino metano
v/v: volumen/volumen

INDICE

INTRODUCCION

I. Cromatina. Generalidades.....	2
I.1. Componentes de la cromatina.....	2
I.2. Organización de la cromatina.....	5
II. Organización de la cromatina de los genes activos...7	
II.1. Características generales.....	7
II.2. Sensibilidad a nucleasas.....	9
III. Organización de la cromatina de levadura.....16	
III.1. Aspectos generales.....	17
III.2. Organización de la cromatina de genes individuales de <i>S. cerevisiae</i>	20
IV. Características del gen <i>SUC2</i> de <i>S. cerevisiae</i>	23
IV.1. Características de la invertasa de levadura....	23
IV.2. Genes codificantes de la invertasa de <i>Saccharomyces</i>	24
IV.3. Estructura del gen <i>SUC2</i>	25
V. Objetivos.....	28

MATERIALES Y METODOS

I. Materiales.....	31
I.1. Productos de especial interés.....	31
I.2. Material biológico: cepas y plásmidos.....	32
II. Protocolo experimental.....	33
II.1. Condiciones de cultivo.....	33
II.2. Obtención de protoplastos de levadura.....	33
II.3. Obtención de núcleos de levadura.....	34
II.4. Digestiones con nucleasas.....	35

III. Técnicas analíticas.....	36
III.1. Aislamiento de DNA. Extracción con fenol y precipitación con alcohol.....	36
III.2. Valoración de DNA y proteínas.....	37
III.3. Electroforesis en agarosa.....	39
III.4. Electroforesis en poliacrilamida.....	40
III.5. Densitometrado y cálculo de tamaño de los fragmentos.....	40
III.6. Aislamiento del DNA a partir de geles.....	41
III.7. Ensayo de actividad invertasa.....	42
IV. Técnicas de DNA recombinante.....	44
IV.1. Aislamiento de plásmidos.....	44
IV.2. Digestión con endonucleasas de restricción.....	47
IV.3. Subclonación de fragmentos de restricción en pBR325.....	49
IV.4. Transformación de células de <i>E. coli</i>	56
IV.5. Marcaje radiactivo de DNA mediante nick-translation.....	57
IV.6. Transferencia de DNA a filtros.....	60
IV.7. Hibridación de DNA sobre filtros con sondas radiactivas.....	62
IV.8. Autorradiografía de los filtros hibridados.....	64

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Actividad del gen <u>SUC2</u> en los estados de represión y desrepresión	67
II. Sensibilidad del gen <u>SUC2</u> a las nucleasas. Variaciones con el estado de actividad	68
II.1. Consideraciones generales sobre la metodología.....	68
II.2. Sensibilidad preferente del gen en estado desreprimido a la DNAasa I	71
II.3. Zonas de sensibilidad a la DNasa I.....	73
II.4. Sensibilidad a la MNasa.....	76
II.5. Sensibilidad a nucleasas de restricción.....	78
III. Localización de zonas hipersensibles a la DNasa I en el gen <u>SUC2</u>	81
III.1. Consideraciones generales sobre el método del marcaje terminal indirecto	81
III.2. Preparación de testigos de DNA desnudo.....	84
III.3. Sitios hipersensibles en el gen <u>SUC2</u>	89
III.4. Estudio con la nucleasa S1.....	100
IV. Organización nucleosomal del gen <u>SUC2</u>	103
IV.1. Consideraciones generales sobre la metodología	103
IV.2. Presencia de nucleosomas en el gen <u>SUC2</u>	105
IV.3. Espaciado nucleosomal en las distintas regiones del gen <u>SUC2</u>	108
V. Posicionamiento de nucleosomas en el gen <u>SUC2</u>	118

V.1. Consideraciones generales sobre la técnica empleada. Técnica del punto de corte desplazado	118
V.2. Localización de nucleosomas a lo largo del gen	124
V.3. Relación de la posición de los nucleosomas y la de los sitios hipersensibles a la DNasa I. Cambios con el estado de actividad del gen	144
CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFIA.....	157

INTRODUCCION

I. CROMATINA. GENERALIDADES.

La información genética de todos los organismos se encuentra codificada en su DNA. Sin embargo la forma en la que este DNA está organizado dentro de la célula es muy diferente entre los organismos procarióticos y eucarióticos. Los eucariontes contienen un núcleo, dentro del cual su DNA se encuentra empaquetado en una estructura, de la que también forman parte proteínas y posiblemente RNA, llamada cromatina. Esta estructura no es algo estático sino que varía en función de diversas situaciones fisiológicas de la célula. Por ello el estudio de estas variaciones es fundamental a la hora de comprender la función del DNA, que es en último término la respuesta a todas las cuestiones biológicas.

I.1. Componentes de la cromatina.

La cromatina se compone fundamentalmente de DNA y proteínas. De entre las proteínas cabe destacar las histonas que son, con mucho, las más abundantes. Las histonas son proteínas muy básicas que se encuentran asociadas al DNA en una relación de cantidad 1:1 (en peso). Por otro lado son las únicas proteínas de la cromatina cuya función está claramente definida, pues constituyen el soporte sobre el que el DNA se enrolla con el fin de reducir su longitud a valores compatibles con el tamaño del núcleo celular. Debe

tenerse en cuenta también que las alteraciones en su asociación con el DNA juegan un papel importante en la función de éste.

Las histonas se han clasificado fundamentalmente por criterios operativos y de composición de aminoácidos. La clasificación actual (Bradbury, 1975) es convencional y trata de unificar las anteriores. En la mayor parte de los eucariontes se distinguen cinco tipos de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4. En eucariontes inferiores esta norma no se sigue tan estrictamente, y así en levadura falta la histona H1 (Franco *et al.*, 1974). En algunos organismos se encuentran pequeñas variaciones sobre esta composición, como la histona H5 de eritrocitos de aves, o la H1^o de algunas células no proliferantes (Smith *et al.*, 1984a). Todas las histonas, y especialmente las histonas H3 y H4, son proteínas altamente conservadas que presentan escasa variación en su secuencia de aminoácidos entre los diversos eucariontes (Isenberg, 1979). Estructuralmente las histonas se pueden clasificar en dos tipos. El primer tipo lo constituyen las histonas internas (H2A, H2B, H3 y H4), que presentan un extremo N-terminal (aproximadamente un tercio de la molécula) rico en aminoácidos básicos, lo que le impide un plegamiento en una estructura secundaria (Delange *et al.*, 1972), y el resto de la molécula con una composición de aminoácidos más equilibrada capaz de adoptar una estructura globular (Sautière *et al.*, 1975). Estas histonas ocupan una posición central dentro del nucleosoma; de ahí el

calificativo de internas. El segundo tipo comprende las histonas H1/H5 y similares, que tienen una zona globular central (Hartman *et al.*, 1977) y dos extremos flexibles de conformación estadística (Johnson *et al.*, 1974). Las histonas se encuentran entre las proteínas con mayor grado de modificación postsintética. Estas modificaciones incluyen la acetilación, fosforilación, metilación, poli(ADP)-ribosilación y ubiquitinación (Isenberg, 1979).

El resto de las proteínas presentes en la cromatina recibe, por exclusión, el nombre de proteínas no histonas (PNH). Por ello es un grupo muy heterogéneo, que comprende enzimas del metabolismo de las histonas y del DNA, proteínas reguladoras y proteínas estructurales. De entre las PNH solo se han caracterizado con cierta precisión las proteínas del grupo de las HMG (del inglés "High Mobility Group") (Johns, 1982). Las HMG tienen una composición de aminoácidos poco corriente, con elevada proporción de residuos ácidos y básicos (Walker, 1982); están ampliamente distribuidas (Spiker *et al.*, 1978; Mayes, 1982) y se ha propuesto su asociación con la cromatina activa (Goodwin y Mathew, 1982).

Finalmente se puede considerar como componente de la cromatina al RNA, aunque probablemente la mayor parte, o todo, el RNA cromatínico pertenece al tipo RNAhn, precursor del RNA mensajero.

I.2. Organización de la cromatina.

La cromatina es una estructura compleja y variable a la que resulta difícil asignarle una organización concreta. Probablemente varía constantemente en función de su actividad y de la zona del genoma considerada. Sin embargo se han encontrado una serie de subestructuras comunes y, hasta cierto punto, constantes para la mayor parte de los tipos celulares estudiados.

Mediante estudios de microscopía electrónica (Olins y Olins, 1974), digestión con nucleasas (Hewish y Burgoyne, 1973) y reticulación de histonas entre sí (Kornberg y Thomas, 1974) se llegó al modelo del nucleosoma (Kornberg, 1974) que representa la subunidad fundamental de la cromatina. El nucleosoma consiste en un núcleo globular compuesto por ocho moléculas de histonas (dos de cada una de las histonas internas) con 146 pares de bases de DNA enrollado 1.75 vueltas alrededor del núcleo proteico. Esta estructura recibe el nombre de "core". La quinta histona, H1, interacciona con 20 pares de bases adicionales de DNA para completar dos vueltas de DNA alrededor del núcleo de histonas, componiendo así la partícula denominada cromatosoma (Simpson, 1978). Los cores o los cromatosomas están unidos entre sí por DNA menos íntimamente asociado a las histonas, llamado "espaciador", lo que da lugar a una estructura en forma de cuentas de rosario conocida como nucleofilamento. Mientras que la estructura del core es

idéntica en todos los eucariontes (Bavykin et al., 1985) la longitud del DNA espaciador varía con el tipo de organismo, con el tipo celular o incluso dentro del mismo núcleo.

El nucleofilamento tiene un diámetro de 11 nm, insuficiente para explicar las fibras más gruesas visibles al microscopio electrónico en condiciones de fuerza iónica fisiológica. Para estas fibras se ha propuesto una estructura tipo solenoide de unos 30 nm de diámetro constituida por arrollamiento sobre sí mismo del nucleofilamento como en un muelle (Finch y Klug, 1976). Cada vuelta de hélice está constituida por 6 a 8 nucleosomas (Subirana et al., 1985; McGhee et al., 1983). La presencia de histona H1 parece imprescindible para el mantenimiento de la superestructura de la cromatina (Renz et al., 1977).

No existen modelos concretos para órdenes superiores de empaquetamiento de la cromatina, salvo para la organización de los cromosomas metafásicos, en los cuales la cromatina está mucho más comprimida. Para este estado de la cromatina se ha propuesto un modelo en el que las hebras de cromatina de diversos grosores están ancladas en un esqueleto proteico (Paulson y Laemli, 1977).

II. ORGANIZACION DE LA CROMATINA DE LOS GENES ACTIVOS.

En una célula eucariótica entre el 10 y el 40% de su DNA se transcribe a RNA. La transcripción del DNA es un proceso relativamente complejo que implica la accesibilidad de las DNA polimerasas y la separación de las dos hebras del DNA. Ambos procesos son incompatibles con una organización de la cromatina como la descrita en el apartado anterior. Necesariamente pues, la estructura de la cromatina de las zonas transcribibles, la cromatina activa, debe ser diferente de la del resto de la cromatina.

II.1. Características generales.

Los genes activos, aparentemente, están organizados en una estructura nucleosomal alterada y están asociados a dominios de cromatina que están menos condensados que los dominios inactivos (Reeves, 1984). Estos dominios se caracterizan por una estructura más accesible a nucleasas, resultado, probablemente, de una mayor accesibilidad a proteínas en general. Las causas de esta estructura más abierta no están claras, pero probablemente surgen de una composición diferencial de este tipo de cromatina. Por ejemplo, se han encontrado diversas PNH asociadas específicamente a cromatina activa (Triadou *et al.*, 1982). La especificidad de estas proteínas es muy variable pues se han descrito proteínas asociadas a genes concretos o

incluso a secuencias reguladoras de estos genes (revisado en Reeves, 1984). Sin embargo otras proteínas no son tan específicas, y su preferencia por la cromatina activa es solamente cuantitativa. Entre éstas cabe destacar a las HMGs, proteínas que tienen probablemente un papel estructural en la cromatina y que se encuentran preferentemente asociadas a zonas activas (Goodwin y Mathew, 1982). Sin embargo no se ha propuesto un papel definido para estas proteínas en la cromatina activa.

La composición diferencial de la cromatina activa se manifiesta también en alteraciones en sus componentes fundamentales: el DNA y las histonas. En muchos eucariontes se ha encontrado que el DNA sufre metilación en la posición 5 de las citosinas; y se ha establecido una relación inversa entre la metilación del DNA y la actividad genética (Doerfler, 1983). La metilación puede afectar a la estructura del DNA favoreciendo estructuras alternativas al DNA-B que alteren la estructura normal de la cromatina ejerciendo un control transcripcional sobre genes próximos (Rich, 1983). También las histonas pueden sufrir alteraciones que afectan a su contribución a la estructura de la cromatina. Especialmente se ha prestado atención a la acetilación de las histonas como modo de reducir su interacción con el DNA y así facilitar la "apertura" de la cromatina al aparato transcripcional (Alfrey, 1977), aunque la acetilación de las histonas puede ser un mecanismo más general de reducir la interacción entre las histonas y el

DNA y no exclusivo de la cromatina activa (Reeves, 1984). En los últimos años se ha cuestionado que haya una relación biunívoca entre acetilación de histonas y actividad transcripcional (Loidl *et al.*, 1983).

II.2. Sensibilidad a nucleasas.

La característica más estudiada de la cromatina activa, en la que se basa el presente trabajo, es su sensibilidad a nucleasas. En muchos casos los dominios de cromatina activa se pueden definir funcionalmente por su mayor sensibilidad a nucleasa en relación con la cromatina total (Igo-Kemenes *et al.*, 1982; Weisbrod, 1982; Reeves, 1984). Para estos estudios se han usado una gran variedad de nucleasas con diferentes especificidades y, a menudo, los resultados han sido contradictorios o de difícil interpretación, debido a posibles artefactos causados por la especificidad de las nucleasas o alteraciones de la estructura de la cromatina durante la digestión.

En general la accesibilidad a nucleasas se interpreta como menor protección del DNA, y así se han utilizado endonucleasas de restricción para determinar la exposición de secuencias específicas del DNA en cromatina (Liberator y Lingrel, 1984; Ferl, 1985). También la DNasa II, que ataca preferentemente zonas activas de la cromatina, se usó para estos fines (Gottesfeld *et al.*, 1974), aunque actualmente se ha reemplazado por otras nucleasas debido a dificultades en

su uso.

Actualmente la mayor parte del trabajo con nucleasas se realiza con dos nucleasas que parecen reconocer aspectos diferentes de la estructura de la cromatina, la DNasa pancreática (DNasa I) y la nucleasa de micrococo (MNasa).

La DNasa I parece reconocer al menos tres aspectos diferentes de la cromatina activa (Reeves, 1984), dando lugar a tres niveles de sensibilidad incrementada con respecto a la cromatina inactiva.

El primer nivel de mayor sensibilidad de la cromatina activa corresponde a grandes dominios de cromatina que contienen genes activos o potencialmente activos. Por ejemplo el gen de la β -globina de pollo es sensible preferentemente a la DNasa I cuando es activo (en células eritroides) pero no lo es cuando no se transcribe (oviducto) (Weintraub y Groudine, 1976). Esta sensibilidad preferencial se mantiene cuando el gen deja de expresarse o es potencialmente activo (Stadler *et al.*, 1980), o incluso cuando está condensado en los cromosomas metafásicos (Kuo *et al.*, 1982). Este tipo de sensibilidad a la DNasa I parece ser el resultado de la existencia de amplios dominios (hasta 100 Kb) sensibles que comprenden al gen y extensas regiones laterales (Lawson *et al.*, 1980), aunque existe una gran variabilidad en la longitud de estas zonas (Flint y Weintraub, 1977). Esta sensibilidad a la DNasa I se ha relacionado con la presencia de proteínas del grupo de las HMG 14/17, que parecen conferir sensibilidad a la DNasa I en

experimentos de reconstitución del gen de la β -globina (Weisbrod y Weintraub, 1979). Sin embargo debe tenerse en cuenta que esta conclusión está basada en evidencias indirectas (Igo-Kemenes *et al.*, 1982) y recientemente ha sido cuestionada (Goodwin *et al.*, 1985). También se ha encontrado relación entre la presencia de histonas acetiladas y la sensibilidad de la cromatina a la DNasa I (Vidali *et al.*, 1978). Sin embargo este hecho también ha sido cuestionado en base a la solubilidad preferencial de la cromatina con histonas acetiladas en medios con Mg^{2+} como los utilizados para las digestiones con DNasa I (Perry y Chalkley, 1981). La superestructura de estos dominios tampoco aparece clara, pues mientras hay autores que postulan que se conserva la estructura tipo solenoide de 30 nm (McGhee *et al.*, 1980), otros proponen para el mismo gen una estructura desplegada y carente de histona H1 (Kimura *et al.*, 1983).

El segundo nivel de sensibilidad a la DNasa I corresponde a las zonas transcribibles de los genes activos, las cuales son algo más sensibles que los flancos del gen. Estos resultados se han obtenido estudiando la desaparición de fragmentos de restricción correspondientes a la zona transcribible del gen y a sus flancos a medida que progresa la digestión con la DNasa I (Stadler *et al.*, 1980).

El tercer nivel de sensibilidad se da en algunas zonas de pocos cientos de pares de bases cuya sensibilidad a la DNasa I es de al menos un orden de magnitud superior. Estos

lugares fueron descubiertos por Wu et al. (1979a) cuando se hacían digestiones muy suaves con DNasa I de los genes del choque térmico de Drosophila. Se les conoce como sitios hipersensibles, y pueden localizarse mediante la técnica del "marcaje terminal indirecto" desarrollada por Wu (1980). Generalmente estos sitios se sitúan preferentemente en la zona anterior al inicio de transcripción del gen y pueden estar relacionados con secuencias promotoras o reguladoras del gen (Wu, 1980; Costlow y Lis, 1984). También pueden encontrarse sitios hipersensibles a la DNasa I en otras localizaciones (revisado en Lowenhaupt et al., 1982 y Elgin, 1981). En muchos casos, pero no en todos, la presencia de estos sitios se relaciona con la actividad o la potencial actividad del gen (Eissenberg et al., 1985). La naturaleza molecular de estos sitios no está clara, pero en algunos casos se ha demostrado que están desprovistos de nucleosomas (McGhee et al., 1981) y asociados a proteínas específicas (Wu, 1984; Emerson y Felsenfeld, 1984), lo cual puede provocar estructuras de DNA alteradas, quizá con DNA monocatenario (Larsen y Weintraub, 1982). Se ha postulado que estos sitios pueden corresponder a secuencias de reconocimiento de la RNA polimerasa II. En cualquier caso parece razonable afirmar que uno o más sitios hipersensibles a la DNasa I situados en la región anterior al inicio de la transcripción son necesarios, pero no suficientes, para la expresión eficiente de los genes transcritos por la RNA polimerasa II (Lowenhaupt et al., 1982).

La MNasa se ha utilizado también para el estudio de la cromatina activa. Inicialmente se utilizó la digestión con MNasa como medio de fraccionamiento de la cromatina activa. Así Bloom y Anderson (1978) encontraron que la cromatina de oviducto de gallina solubilizada mediante digestión con esta enzima estaba enriquecida 5-6 veces en el gen de la ovoalbúmina -activamente transcrito en este tejido- comparado con el DNA nuclear total. Este resultado sugería que el gen, y la cromatina activa en general, era degradado preferentemente por la MNasa. Posteriormente se han desarrollado métodos de fraccionamiento que implican digestiones suaves con MNasa. Por ejemplo Levy-Wilson et al. (1979) observaron la liberación de proteínas del grupo de las HMG debido a la acción de la MNasa. Posteriormente la cromatina digerida se podía fraccionar mediante centrifugación y precipitación con NaCl 0.1M. Las fracciones solubles estaban enriquecidas en secuencias transcribibles (Levy-Wilson y Dixon, 1979).

En cuanto a la sensibilidad de los genes activos a la MNasa los resultados son contradictorios. En general se ha observado un comportamiento similar a las digestiones con DNasa I, pero algunos autores opinan que la MNasa distingue entre genes activos y potencialmente activos, siendo los activos más sensibles (Bloom y Anderson, 1978; Smith et al., 1984b). Incluso puede distinguir entre genes con diferentes tasas de transcripción (Anderson et al., 1983).

Recientemente la MNasa se ha utilizado para estudiar la

organización de la cromatina mediante la obtención de mapas de localización de los nucleosomas. La técnica empleada es similar a la de Wu (1980) y fue puesta a punto por Nedospasov y Georgiev (1980). En esta técnica las bandas vistas en la autorradiografía se interpretan como posiciones de los linkers, por lo que los cores nucleosomales se sitúan en las regiones protegidas entre las bandas. Sin embargo la MNasa tiene el inconveniente de ser una nucleasa con un cierto grado de especificidad de secuencia. Prefiere secuencias CTA o CATA o, en general, secuencias ricas en A/T (Pauli et al., 1982), lo cual puede producir interpretaciones erróneas. Para eliminar estos artefactos debe utilizarse un testigo de DNA desnudo digerido con MNasa. Sin embargo en digestiones prolongadas se puede producir otro artefacto debido a la protección del DNA cada 10 pares de bases a causa de sus contactos con las histonas (McGhee y Felsenfeld, 1983).

En general se acepta que los genes en transcripción contienen nucleosomas (Reeves, 1984; Eissenberg et al., 1985), aunque en genes con elevada tasa de transcripción como los ribosomales (Goltschling et al., 1983) y los hsp (Wu et al., 1979b) puede existir gran cantidad de DNA no nucleosomal que se superpone al esquema de bandas típico. En el caso de existir nucleosomas, éstos presentarían una estructura más abierta que les hace accesibles al aparato transcripcional y las nucleasas (Prior et al., 1983).

En varios genes se ha estudiado la localización de los

nucleosomas y los resultados son contradictorios (revisado en Kornberg, 1981; Reeves, 1984 y Eissenberg *et al.*, 1985). Algunos autores encuentran que los nucleosomas están precisamente posicionados en relación a la secuencia del DNA en todas las células de una línea dada. Este hecho ha sido llamado "fase" de los nucleosomas, aunque el término "fase" debería restringirse a un posicionamiento regular de los nucleosomas relativo a una secuencia repetitiva del DNA (como el DNA satélite, el DNAr o el DNA de los RNA de transferencia). Un término más apropiado es "posicionamiento" que implica posición fija, pero no necesariamente regular, de los nucleosomas sobre DNA no repetitivo.

Ejemplos de fase de nucleosomas se han encontrado en los genes del RNAr 5S de *Xenopus* (Young y Carroll, 1983) y *Tetrahymena* (Gotschling *et al.*, 1983), aunque cuando los genes se activan los nucleosomas pierden sus posiciones fijas; y en DNA satélite de mono (Wu *et al.*, 1983) en el cual parece haber varias fases posibles que se obtienen superpuestas. También se han encontrado ejemplos de posicionamiento fijo de nucleosomas en algunos genes que se transcriben a RNAm, como por ejemplo el complejo de genes de las histonas de *Drosophila* (Worcel *et al.*, 1983), en genes hsp de *Drosophila* (Wu, 1980), o en varias zonas del genoma de levadura (revisado en el apartado siguiente).

La razón de la situación fija de los nucleosomas en relación a la secuencia del DNA no está clara (Igo-Kemenes

et al., 1982), pero existen dos posibles alternativas. La primera es el posicionamiento dirigido por la secuencia del DNA, lo cual implica interacciones específicas entre zonas del DNA y las histonas (Mengeritsky y Trifonov, 1983). La otra posibilidad, no necesariamente alternativa (Linxweiler y Horz, 1985), es la existencia de proteínas específicas de secuencia del DNA que, de forma indirecta, obliguen a los nucleosomas a situarse fuera de ciertas regiones del DNA. Esto produciría un posicionamiento de los nucleosomas irregular en las cercanías de la proteína específica y paulatinamente más aleatorio al alejarse de ella. En algunos casos se han encontrado proteínas de este tipo implicadas en la fase de los nucleosomas (Wu et al., 1983). Este mecanismo parece ser el responsable de los posicionamientos de nucleosomas alrededor de los sitios hipersensibles, que probablemente están ocupados por proteínas como se ha mencionado anteriormente.

III. ORGANIZACION DE LA CROMATINA DE LEVADURA.

La levadura S. cerevisiae es un organismo muy apropiado para investigar las propiedades de la cromatina activa. Por un lado, al menos el 40% de las secuencias de su DNA se transcriben como RNAm a lo largo del ciclo celular (Hereford y Rosbash, 1977) y, en determinadas circunstancias, la tasa de transcripción puede ser muy elevada. Por otro lado, el

buen conocimiento de la genética de *S. cerevisiae* hace posible el estudio de la estructura de la cromatina de genes concretos.

III.1. Aspectos generales.

A pesar de la existencia de núcleos perfectamente definidos, en la levadura no se da una estructura clara en cromosomas durante el ciclo celular (Gordon, 1977), aunque existen 17 grupos de ligamiento genético (Fangman y Zakian, 1981).

Sin embargo la levadura presenta un complemento de histonas internas completo (Tonino y Rozijn, 1966; Franco *et al.*, 1974; Brandt y Von Holt, 1976) y una estructura nucleosomal típica (Lohr y Van Holde, 1975; Thomas y Furber, 1976; Nelson *et al.*, 1977), aunque carece de histona H1 y por lo tanto no contiene partículas tipo cromosoma (Szent-Giorgi y Isenberg, 1983). En algunos casos se ha descrito una proteína con movilidad semejante a la histona H1 de eucariontes superiores (Thomas y Furber, 1976; Franco y López-Braña, 1978; Sommer, 1978), cuyo aislamiento permitió comprobar que su composición en aminoácidos la asemejaba más al grupo de las HMG (Spiker *et al.*, 1978), aunque algunas de sus propiedades son comunes a la histona H1 (Estruch *et al.*, 1986a).

Las histonas internas de levadura poseen una secuencia de aminoácidos (Brandt *et al.*, 1980; Brandt y Von Holt,

1983) y una estructura terciaria similar a la de eucariontes superiores (Mardian y Isenberg, 1978). La levadura presenta nucleosomas de 160-165 pb con un core típico de 145 pb (Nelson *et al.*, 1977) y una estructura idéntica a la de eucariontes superiores (Bavykin *et al.*, 1985). Al microscopio electrónico presenta una organización típica, incluso con fibras de 30 nm, a pesar de carecer de histona H1 (Rattner *et al.*, 1982). Únicamente cabe señalar como características de la cromatina de levadura la irregularidad de la longitud del linker, lo cual había sido previamente descrito en los estudios con MNasa (Lohr *et al.*, 1977), y la presencia de zonas carentes de nucleosomas, que pueden representar un 5-10% del genoma, dato que ha sido posteriormente confirmado mediante digestiones con MNasa (Szent-Giorgi y Isenberg, 1983). En general se puede concluir que la cromatina de levadura presenta una estructura menos compacta que la de otros eucariontes, como lo demuestran los estudios de dicroísmo circular realizados sobre cromatina total (Franco y López-Braña, 1978) o sobre mononucleosomas aislados (Lee *et al.*, 1982). Esta estructura más abierta puede ser la causa de la alta y uniforme sensibilidad de la cromatina de levadura a la DNasa I (Lohr y Hereford, 1979), hecho que también se ha relacionado con su elevada tasa de transcripción, puesto que en células en fase logarítmica de crecimiento (con diez veces más actividad transcripcional) la digestión es más rápida que en células en fase estacionaria (Lohr y Ide, 1979). Todos estos

hechos llevan a considerar a la cromatina de levadura globalmente como un ejemplo de cromatina activa (Lohr, 1981). Sin embargo mediante la MNasa y precipitación salina se puede separar la cromatina de levadura en fracciones con diferente tamaño promedio de DNA y diferente complemento de PNH e histonas acetiladas (Estruch et al., 1986a), lo cual indica probablemente que hay zonas de la cromatina con diferente estructura y la MNasa, quizá debido a su propiedad de diferenciar entre genes activos y potencialmente activos, es capaz de diferenciarlas.

En concordancia con las características generales de la cromatina activa (ver apartado anterior) la cromatina de levadura presenta una elevada tasa de acetilación en sus histonas (Davie et al., 1981; Nelson, 1982; Marian y Wintersberger, 1982; Pérez-Ortín, 1983), y por lo tanto una elevada actividad acetiltransferasa (Travis et al., 1984; López-Rodas et al., 1985), relacionada con la actividad transcripcional (Pérez-Ortín et al., 1983). Se han descrito también proteínas del grupo de las HMG en levadura (Spiker et al., 1978; Weber y Isenberg, 1980; Petersen y Sheridan, 1978) aunque su relación con las HMGs de eucariontes superiores y con la cromatina activa no está clara (Estruch et al., 1986b).



III.2. Organización de la cromatina de genes individuales de S. cerevisiae.

En levadura se ha estudiado la estructura de la cromatina de numerosos tipos de genes y, en general, los resultados concuerdan con los obtenidos para otros eucariontes. Los estudios realizados comprenden genes que se expresan de forma constitutiva (Sledziewsky y Young, 1982; Struhl, 1982), regulables por la concentración de metabolitos (Sledziewsky y Young, 1982; Lohr, 1983a; Lohr, 1984; Struhl, 1984; Proffit, 1985), genes ribosomales (Lohr, 1983b,c), y zonas de la cromatina que no se transcriben (Bloom y Carbon, 1982; Nasmyth, 1982). Asimismo se han estudiado genes y otras zonas del DNA integradas en plásmidos de replicación autónoma en levadura (Livingston, 1982; Thoma et al., 1984).

La DNasa I a concentraciones muy bajas, o la MNasa, digieren con preferencia genes en estado de transcripción sobre los que están reprimidos (Sledziewsky y Young, 1982; Bergman y Kramer, 1984). También se han localizado sitios hipersensibles a la DNasa I en el flanco 5' de los genes de la alcohol deshidrogenasa (Sledziewsky y Young, 1982), fosfataza ácida (Bergman y Kramer, 1984), genes del metabolismo de la galactosa (Lohr, 1984; Proffit, 1985), trp1 (Thoma et al., 1984), his3 (Struhl, 1983), gen del RNAr 35S (Lohr, 1983c), y algunos genes del plásmido 2 μ m (Fragelius y Livingston, 1984). En muchos de estos genes los

sitios hipersensibles están situados en posiciones cercanas a la caja TATA. También se han encontrado sitios hipersensibles en otras localizaciones menos típicas, como el flanco 3' del gen (Proffit, 1985; Nasmyth, 1982), dentro de la zona transcribible (Nasmyth, 1982), o en algunas zonas de la cromatina no génicas, como los orígenes de replicación (Thoma *et al.*, 1984; Fragelius y Livingston, 1984) y los centrómeros (Bloom y Carbon, 1982). En la mayor parte de los casos la presencia de los sitios hipersensibles es independiente del estado de transcripción del gen (salvo en el gen de la fosfatasa ácida), como sucede en general con los genes (potencialmente) activos (Eissenberg *et al.*, 1985). Esto puede deberse a que en la levadura, por ser un organismo unicelular, todos sus genes son, al menos potencialmente, activos. Se ha encontrado, por otra parte, que para la presencia de sitios hipersensibles en el flanco 5' del gen es necesaria la presencia de ciertas secuencias reguladoras (Struhl, 1982).

Se ha demostrado también la presencia de estructura nucleosomal en las zonas transcribibles y en los flancos de estos genes. Solamente en algunos casos se han detectado posicionamientos de nucleosomas (Lohr, 1983c; Bergman y Kramer, 1983, Thoma *et al.*, 1984), mientras que en otros se han encontrado estructuras cromatínicas aberrantes (Lohr, 1983b; Lohr, 1984), posiblemente relacionadas con zonas reguladoras. En varios casos la activación del gen lleva a una alteración en el espaciado nucleosomal, que se detecta

como aparición de fondo uniforme de DNA sobre el espaciado nucleosomal (Lohr, 1983a), o como pérdida de posicionamiento de los nucleosomas (Bergman y Kramer, 1983). Sin embargo en otros casos los cambios de actividad del gen no dan lugar a alteraciones importantes (Thoma et al., 1984; Struhl 1983), quizá debido a que en estos genes las diferencias de actividad transcripcional entre unos estados y otros no son muy grandes.

La estructura de la cromatina se ha estudiado también en plásmidos de replicación autónoma en levadura. Estos plásmidos se organizan en nucleosomas típicos, como se demostró originalmente con el plásmido 2 μ m (Livingston y Hahne, 1979; Nelson y Fangman, 1979), lo que ha permitido el estudio detallado de su organización cromatínica (Livingston, 1982; Fragelius y Livingston, 1984). En un plásmido artificial, el TRPARS1, se han posicionado 7 nucleosomas (Thoma et al., 1984; Long et al., 1985) cuya situación depende probablemente de interacciones específicas histona-DNA (Thoma y Simpson, 1985)

IV. CARACTERISTICAS DEL GEN SUC2 DE *S. CEREVISIAE*.

IV.1. Características de la invertasa de levadura.

La levadura *S. cerevisiae* puede utilizar el disacárido sacarosa como fuente de carbono puesto que posee un enzima con actividad hidrolítica de sacarosa, la β -fructofuranosidasa fructohidrolasa (E.C. 3.2.1.26), comunmente llamado invertasa. Existen dos formas diferentes de la invertasa de *Saccharomyces* (Gascón et al., 1968). La forma mayoritaria es una manoproteína de secreción que tiene un peso molecular de 270000 y está compuesta por un 50% de carbohidratos y dos subunidades idénticas de aproximadamente 60000 de peso molecular (Gascón y Lampen, 1968). La forma minoritaria constituye sólo un pequeño porcentaje del total, tiene un peso molecular de 135000 y está formada por las mismas subunidades de la invertasa de secreción, pero a diferencia de ella contiene poco o ningún carbohidrato (Gascón y Lampen, 1968). Esta última forma del enzima es intracelular y su función no está clara puesto que no se encuentra sacarosa dentro de la célula de levadura (De la Fuente y Sols, 1962).

La formación de invertasa en *Saccharomyces* está regulada en función de la concentración de glucosa. Concentraciones altas de glucosa reprimen la síntesis de la invertasa de secreción, pero no afectan a la síntesis de la

invertasa interna (Gascón y Lampen, 1968).

IV.2. Genes codificantes de la invertasa de Saccharomyces.

Las dos formas de la invertasa de Saccharomyces están codificadas por una familia de genes llamados SUC. Diferentes cepas de levadura llevan alelos SUC en diferentes localizaciones cromosomales. Hasta la fecha se han identificado seis distintos loci: SUC1-5 y SUC7 (Carlson et al., 1980). Cada cepa de levadura puede tener cero, uno o varios alelos SUC. Se han construido mapas genéticos de los seis loci en los siguientes cromosomas: SUC1 en el cromosoma VII, SUC2 en el IX, SUC3 en el II, SUC4 en el XIII, SUC5 en el IV y SUC7 en el VIII (Carlson et al., 1985). Muchas cepas de levadura no llevan alelos SUC en ninguno de los seis loci, y llevan alelos naturales negativos, suc°, en algunos loci. Solo el alelo suc2° corresponde a un gen mutante, mientras que los demás alelos suc° carecen de secuencias de DNA homólogas a los alelos SUC (Carlson y Botstein, 1983). Este hecho, junto con la observación de el alelo SUC2 es el único que nunca coexiste con alguno de los otros alelos, ha llevado a proponer que la familia de genes SUC deriva de un gen SUC2 original que, por reordenaciones cromosómicas, se ha desplazado a otras localizaciones del genoma de la levadura (Carlson et al., 1985).

Todos los genes de la familia SUC son altamente homólogos en la secuencia de bases de la región

transcribible y en las regiones flanqueantes (Carlson *et al.*, 1985), salvo el gen SUC2 cuya homología se limita a las regiones reguladoras y codificantes (Sarokin y Carlson, 1985a; Carlson *et al.* 1985). De todos ellos se conoce el mapa de restricción, aunque solo SUC1, 2, 4 y 7 han sido clonados (Carlson y Botstein, 1982; Carlson *et al.*, 1985) y SUC2 y 7 secuenciados (Taussig y Carlson, 1983, Sarokin y Carlson, 1984; Sarokin y Carlson, 1985a).

IV.3, Estructura del gen SUC2.

El gen SUC2 es el más estudiado de la familia de genes SUC. Se conoce su secuencia completa así como el mecanismo de su regulación por glucosa. En la fig. 1 se muestra un esquema de la organización del gen SUC2.

El gen se puede leer desde dos orígenes distintos dando lugar a dos RNAm alternativos, de 1.8 y 1.9 kb (Carlson y Botstein, 1982). El RNAm de 1.8 kb corresponde a la forma minoritaria, intercelular, de la invertasa, mientras que el de 1.9 kb da lugar a la forma mayoritaria, de secreción, y contiene una región codificante para la secuencia señal (Carlson *et al.*, 1983). Se han localizado dos regiones reguladoras en el flanco 5' del gen (Sarokin y Carlson, 1984). Una de ellas corresponde a la caja TATA, situada entre -124 y -133 pb y resulta imprescindible para la síntesis de la invertasa de secreción, mientras que la otra región está entre aproximadamente -500 y -418 pb, y confiere

capacidad para desreprimir la síntesis de la invertasa de secreción (Sarokin y Carlson, 1984). Ninguna de las dos secuencias afecta a la síntesis del RNAm de 1.8 kb, cuya regulación sería independiente de la del RNAm de 1.9 kb (Perlman *et al.*, 1984). La región reguladora distal confiere la capacidad de ser regulable por la concentración de glucosa cuando se inserta delante de un gen que, de otra forma, no es regulable por glucosa (Sarokin y Carlson, 1985b).

Por otro lado la actividad del gen SUC2 está regulada por, al menos, dos tipos de genes. Los genes SNF1-6 que actúan como reguladores positivos de su expresión (Carlson *et al.*, 1984; Celenza y Carlson, 1984a,b) y son necesarios para la desrepresión de la invertasa en ausencia de glucosa (Neigeborn y Carlson, 1984); y el gen SSN6 que actúa como supresor de snf, y es necesario para la represión del gen SUC2 por altas concentraciones de glucosa (Carlson *et al.*, 1984). Ambos tipos de genes tienen efectos pleiotrópicos, afectando a la síntesis de otros enzimas regulables por glucosa (Neigeborn y Carlson, 1984). La acción de los genes SNF1-6 y SSN6, cualquiera que ésta sea, necesita la presencia de la región reguladora distal y parece realizarse a nivel de transcripción (Sarokin y Carlson, 1985b).

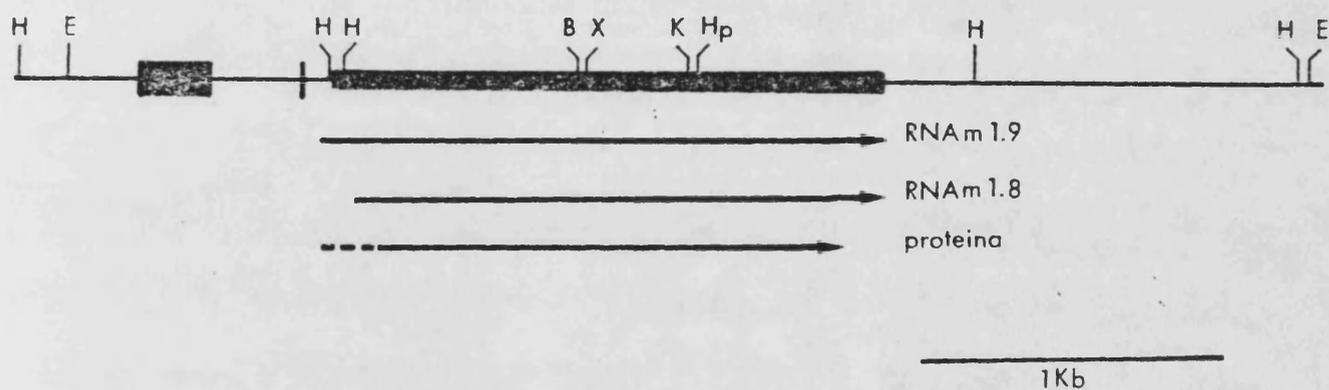


Figura 1.- Mapa esquemático del gen *SUCC2*.

Con una línea delgada se representa esquemáticamente el DNA, cuya dirección de transcripción es de izquierda a derecha. Las dianas de restricción más significativas se representan mediante barras verticales. E, (*EcoRI*); H, (*HindIII*); B, (*BamHI*); X, (*XbaI*); K, (*KpnI*); Hp, (*HpaI*). Las cajas rectangulares representan las secuencias reguladoras y la línea más gruesa representa la zona del gen que se transcribe a RNA. En la parte inferior, las tres líneas representan los dos posibles transcritos y la zona que se traduce a proteína.

V. OBJETIVOS

En el presente trabajo se plantea como objetivo el estudio de la estructura de la cromatina del gen SUC2 de Saccharomyces cerevisiae, como sistema modelo de la organización cromatínica de los genes activos, y especialmente de los cambios que se producen en esta estructura en los procesos de represión y desrepresión de la síntesis del RNAm.

Para este fin se utilizará la digestión con varias nucleasas: DNasa I, MNasa, S1 y HindIII. El planteamiento general se basa en la idea, ampliamente corroborada por otros autores (véase Reeves, 1984), de que la accesibilidad de la cromatina a una nucleasa dada es una buena medida de su compactación o de su accesibilidad a proteínas implicadas en los procesos de activación o regulación génica.

Las digestiones con DNasa I permitirán valorar la sensibilidad global de cada región dentro del gen, así como la posible localización de sitios hipersensibles a esta nucleasa. Las digestiones con nucleasa S1 permitirán investigar la estructura del DNA en los posibles sitios hipersensibles. Las digestiones con HindIII servirán para comparar la accesibilidad a enzimas de restricción de varias zonas del gen SUC2. Finalmente las digestiones con MNasa permitirán un estudio de la sensibilidad del gen y sus zonas a esta nucleasa, así como el estudio de su espaciado nucleosomal y el posible posicionamiento de los

nuclesosomas.

En todos los casos se investigarán los posibles cambios debidos a variaciones en la actividad transcripcional del gen.

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES.

I.1. Productos de especial interés.

Agarosa (tipo I)	Sigma
Agarosa (bajo punto de fusión, ultrapura)	BRL
Bisbenzimidazol (Hoetchs 33258)	Boehringer
BSA	Sigma
BSA (libre de nucleasas)	Boehringer
dATP [α - 32 P] (3000 Ci/mmol)	Amersham
DNA ligasa del fago T4 (1 u/ μ l)	Boehringer
DNA polimerasa I (5 u/ μ l)	Boehringer
DNasa I (DPFF, 2300 u/mg)	Worthington
Endonucleasas de restricción	Boehringer
Filtros de nylon (Hybond-N)	Amersham
Filtros de papel ABM (Transa-Bind)	Schleicher and Schuell
Glucosa oxidasa (grado II, 267 u/mg)	Boehringer
Nucleasa S1	Boehringer
Nucleasa de micrococo (15000 u/mg)	Boehringer
Peroxidasa (grado II, 175 u/mg)	Boehringer
Proteinasa K	Boehringer
Ribonucleasa A	Boehringer
Trifosfatos de desoxirribonucleótidos	Boehringer
β -Glucuronidasa-Arilsulfatasa	Boehringer

I.2. Material Biológico: cepas y plásmidos.

<u>Organismo</u>	<u>Cepa</u>	<u>Características genotípicas de interés</u>	<u>Procedencia</u>
<i>E. coli</i>	HB101	<i>recA</i> ⁻ , <i>F</i> ⁻	S. Ferrer/ D. Ramón
<i>E. coli</i>	C600 <i>otc</i> ⁻	<i>recA</i> ⁺ , <i>F</i> ⁺	"
<i>S. cerevisiae</i>	X2180-1A	<i>MATa</i> , <i>SUC2</i>	R. Santandreu

<u>Plásmido</u>	<u>Cepa hospedadora</u>	<u>Características genotípicas de interés</u>	<u>Procedencia</u>
YRp10	HB101	<i>Amp</i> ^r , <i>ura3</i> , <i>ars1</i>	S. Ferrer/ D. Ramón
pBR322	"	<i>Amp</i> ^r , <i>Tet</i> ^r	"
pBR325	"	<i>Amp</i> ^r , <i>Tet</i> ^r , <i>Cap</i> ^r	"
pRB58	"	<i>Amp</i> ^r , <i>SUC2</i> , <i>ura3</i>	R. Santandreu
pSUC243	"	<i>Amp</i> ^r , <i>SUC2</i>	Esta tesis
pSUC213	C600 <i>otc</i> ⁻	<i>Amp</i> ^r , <i>Cap</i> ^r	"
pSUC207	"	<i>Amp</i> ^r , <i>Cap</i> ^r	"

II. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

II.1. Condiciones de cultivo.

Las células de levadura se cultivaron en medio YEPG: extracto de levadura 1% (p/v), peptona bacteriológica 2% (p/v), y glucosa 2% (p/v), a 28°C con agitación mecánica.

Para la desrepresión de la síntesis de invertasa se siguió el procedimiento de Carlson *et al.* (1981). Las células se cultivaron en este medio hasta una densidad aproximada de $5-10 \times 10^7$ células/ml. Se recogieron en condiciones de esterilidad y se transfirieron a matraces con medio de cultivo nuevo con 0.05% de glucosa (condiciones de desrepresión) o 2% de glucosa (condiciones de represión), donde se cultivaron durante 2.5-3 h adicionales en las mismas condiciones.

La valoración del crecimiento de los cultivos se llevó a cabo mediante la medición de la A_{600} de los cultivos y el uso de una curva patrón previamente construida (Pérez-Ortín, 1983).

II.2. Obtención de protoplastos de levadura.

La obtención de protoplastos a partir de células de levadura en fase exponencial de crecimiento se realizó mediante el empleo del preparado enzimático

β -glucuronidasa-arilsulfatasa, de acuerdo con el método descrito por Pérez-Ortín (1983), con ligeras modificaciones.

Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con H₂O destilada fría y una vez con medio de pretratamiento: Tris-HCl 0.1 M, EDTA 5 mM, β -mercaptoetanol 75 mM, pH 8.0. Posteriormente se resuspendieron en diez volúmenes de este mismo medio y se incubaron 30 min a 4°C. Al cabo de este tiempo las células se recogieron por centrifugación y se lavaron una vez con medio de incubación: sorbitol 1.1 M, fosfato sódico 24 mM, pH 6.5. Una vez lavadas se resuspendieron en este mismo medio a una concentración de 0.2 g de células/ml y se adicionaron 0.4 ml de β -glucuronidasa-arilsulfatasa por gramo de células, incubándose a 37°C durante 1 h con agitación suave. La formación de protoplastos se siguió mediante observación microscópica.

El empleo de otro preparado enzimático, Novozim 234, aunque muy efectivo para la producción de protoplastos no dió buen resultado puesto que se comprobó que contiene proteasas y nucleasas que afectan a la estructura de la cromatina, dando lugar a resultados anómalos.

II.3. Obtención de núcleos de levadura.

Se siguió un procedimiento basado en un método descrito por Wintersberger *et al.* (1973). Los protoplastos de levadura se lavaron dos veces con el medio de incubación y

se resuspendieron con ayuda de homogenizador Potter-Elvehjem en 5 volúmenes de medio de lisis: Ficoll 400 18% (p/v), $MgCl_2$ 0.5 mM, PMSF 0.7 mM, fosfato sódico 20 mM, pH 6.8. Este medio no estabiliza osmóticamente los protoplastos que se lisan. El lisado se centrifugó a 3000xg 5 min y se descartó el sedimento, que contiene las células enteras. El sobrenadante se centrifugó a 30000xg 20 min para sedimentar los núcleos. El sedimento se recogió y se lavó una vez con glicerol 20% (v/v), PVP 5% (p/v), en las mismas condiciones de centrifugación. El sedimento constituye una fracción nuclear cruda, útil para las siguientes experiencias.

II.4. Digestiones con nucleasas.

La fracción nuclear cruda se lavó una vez con medio de digestión: $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 3 mM, NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, para MNasa y DNasa I; $MgCl_2$ 10 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, para HindIII; y NaCl 30 mM, acetato sódico 30 mM, $ZnSO_4$ 3 mM, pH 4.8 para S1 y se resuspendió en el mismo medio a una concentración de 0.1-0.25 mg/ml (en DNA). Las muestras se atemperaron a 37°C y se añadió la nucleasa en cantidades variables, de 0.2 a 100 u/mg de DNA para la DNasa I, de 10 a 2500 u/mg de DNA para la MNasa, de 10 u/mg de DNA para HindIII, y de 0.1 a 0.3 u/mg de DNA para S1, y se incubaron durante los tiempos indicados a 37°C. La reacción se paró añadiendo EDTA hasta 10 mM y sumergiendo las muestras en baño de hielo.

Posteriormente se aisló el DNA de las muestras como se describe en el apartado III.1.

Cada nuevo lote de MNasa o de DNasa I se valoró previamente mediante un ensayo espectrofotométrico basado en el efecto hipercrómico a 260 nm, utilizando como sustrato DNA nativo de esperma de salmón a 50 µg/ml. La MNasa se disolvió en H₂O destilada a 15 u/µl, se dividió en alícuotas y se guardó a -20°C. La DNasa I se guardó en glicerol 50% (a 0.2 u/µl) también a -20°C. En ambos casos antes de ser utilizadas se ensayaron mediante efecto hipercrómico para comprobar el mantenimiento de su actividad original. La nucleasa S1 se guardó disuelta en tampón acetato sódico 0.1 M, ZnSO₄ 0.1 mM, pH 4.5 a 1000 u/µl a 4°C.

Las digestiones de DNA desnudo se realizaron en las mismas condiciones pero con concentraciones menores de nucleasas: de 0.013 a 3.3 u/mg de DNA para la MNasa, de 0.04 a 0.2 u/mg de DNA para la DNasa I, y de 0.2 a 2 u/µg de DNA para la nucleasa S1.

III. TECNICAS ANALITICAS.

III.1. Aislamiento de DNA. Extracción con fenol y precipitación con alcohol.

Las muestras se hicieron 1% (p/v) en SDS, se adicionó proteinasa K hasta 100 µg/ml y se digirieron a temperatura

ambiente durante la noche. Una vez digeridas se extrajeron con 1 volumen de fenol (fenol bidestilado, estabilizado con 8-hidroxiquinoleína al 0.1% (p/v) y saturado en H₂O) varias veces hasta que no se observó material en la interfase, una vez con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v).

Para precipitar con alcohol el DNA, las muestras se hicieron, al menos, 0.1 M en concentración salina (generalmente con NaCl), si no contenían ya suficiente concentración de sales, y se precipitaron con 2 volúmenes de etanol o 0.6 volúmenes de isopropanol, a -20°C, durante al menos dos horas. Los precipitados se recogieron por centrifugación a 12000xg 15 min, se lavaron con etanol 70% (v/v) y se secaron a vacío. Una vez secos se disolvieron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y se digirieron con RNasa A (tratada durante 15 min a 100°C para inactivar las DNasas contaminantes) a 20 µg/ml, durante 1 h a 37°C. El DNA se reprecipitó con alcohol de la forma descrita anteriormente.

III.2. Valoración de DNA y proteínas.

El DNA se valoró en extractos crudos o una vez purificado mediante el método espectrofluorimétrico de Labarca y Paigen (1980). Este método permite la cuantificación del DNA en extractos crudos de levadura (Szent-Giorgi y Isenberg, 1983) sin interferencias debidas

al RNA. A causa de la dependencia de la reacción del bisbenzimidazol con el DNA con el porcentaje de A/T de éste, se debe utilizar DNA de levadura como DNA patrón si se desean obtener valores absolutos de DNA. Sin embargo, cuando lo que se desea es comparar la concentración de DNA de dos muestras, puede utilizarse como patrón DNA heterólogo, como el de salmón. Los valores de concentración de DNA así obtenidos se refieren a concentración equivalente de DNA de salmón.

El ensayo se realizó mezclando 3 ml de tampón (NaCl 2 M, EDTA 2 mM, fosfato sódico 50 mM, pH 7.4) con 15 μ l de una solución 0.2 mg/ml de bisbenzimidazol en H₂O y hasta 20 μ l de muestra. La fluorescencia se midió con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer MPH HHB a una longitud de onda de excitación de 356 nm y una longitud de onda de emisión de 458 nm. Los resultados de fluorescencia obtenidos se corrigieron restando el valor de un blanco sin DNA, y se interpolaron en una curva patrón construida con cantidades variables (entre 1 y 20 μ g/ml) de DNA de salmón. En algunos casos se determinaron cantidades de DNA entre 0.1 y 2 μ g/ml utilizando el mismo ensayo pero con 2 ml de tampón y 1.5 μ l de solución de bisbenzimidazol.

Las proteínas se valoraron con el método de Flores (1978). Los ensayos se realizaron mezclando 0.9 ml de reactivo (azul de bromofenol 0.0075% (p/v), etanol 15% (v/v), ácido acético 2.5% (v/v)), hasta 0.1 ml de muestra y H₂O en cantidad suficiente para completar 1 ml. El color

azul desarrollado por las muestras se leyó a 610 nm, y los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva patrón obtenida con BSA (entre 10 y 100 µg/ml). Los valores de cantidad de proteínas se refieren pues a cantidad equivalente de BSA .

III.3. Electroforesis en agarosa.

Se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa sumergido descrito en Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron geles de 15x10x0.5 cm de diferentes concentraciones de agarosa (entre el 0.8 y el 2% (p/v)) en tampón TBE: Tris 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 2 mM, pH 8.3. Las electroforesis se realizaron en el mismo tampón a 4°C y 5 V/cm. Como disolvente de las muestras se utilizó el mismo tampón suplementado con 5% (v/v) de glicerol, 0.05% (p/v) de azul de bromofenol y 0.05% (p/v) de xilen cianol.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/ml en TBE) durante 30 min y se destiñeron en TBE durante otros 30 min. Una vez desteñidos se fotografiaron utilizando un transiluminador ultravioleta a 360 nm y una cámara Polaroid MP4, cargada con negativos Agfapan 200 profesional de 9x12cm, a través de un filtro ultravioleta convencional y un filtro Kodak Wratten nº 22.

III.4. Electroforesis en poliacrilamida.

Se siguió el método de electroforesis vertical descrito en Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron geles de 12x12x0.1 cm del 8% o del 12% (p/v) de poliacrilamida-acrilamida/bisacrilamida, 29:1- en tampón TBE. El tampón de la cubeta, condiciones de electroforesis, disolvente de muestras, teñido y fotografía de los geles fueron idénticas a las descritas en el apartado anterior salvo que el voltaje aplicado fue de 10 V/cm.

III.5. Densitometrado y cálculo de tamaño de los fragmentos.

Los negativos o las placas de autorradiografía se densitometraron en un densitómetro Laser Ultrosan 2202 (LKB) provisto de un integrador Hewlett-Packard 3390A acoplado para el registro e integración de los picos.

Se utilizaron condiciones de densitometrado e integración apropiadas para maximizar la relación señal/ruido de fondo en cada caso.

El tamaño de los fragmentos, tanto en los geles como en las autorradiografías se calculó mediante el procedimiento descrito en Plikaytis *et al.* (1986), que se basa en la interpolación de los valores de migración de los fragmentos problema en una hipérbola robusta construida mediante un ajuste realizado con un ordenador IBM PC a los datos de tamaño y migración de fragmentos patrón.

III.6. Aislamiento de DNA a partir de geles.

Los fragmentos de DNA de tamaño superior a 600 pb se aislaron a partir de agarosa de bajo punto de fusión según el método descrito por Burns y Beacham (1983). La electroforesis se realizó en las condiciones descritas en el apartado III.3, salvo que se utilizó agarosa de bajo punto de fusión ultrapura al 1%. Las bandas se localizaron mediante tinción con bromuro de etidio, se recortaron y se introdujeron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Los tubos se calentaron a 60°C unos minutos para fundir la agarosa y se les adicionaron 0.5 volúmenes de TE y un volumen de fenol (ver apartado III.1 para la composición del fenol). Las dos fases se mezclaron por agitación en vortex y se separaron por centrifugación. La fase acuosa se extrajo otra vez con un volumen de fenol y una vez con cloroformo y se precipitó con etanol como en el apartado III.1. Los rendimientos obtenidos oscilaron alrededor del 20%.

Los fragmentos de DNA de tamaños entre 100 y 600 pb se aislaron a partir de geles del 8% de poliacrilamida según el método descrito por Maxam y Gilbert (1977). La electroforesis se realizó en las condiciones descritas en el apartado III.3 salvo que se utilizaron geles de 2 mm de espesor y pocillos de 2 cm de ancho. Las bandas se localizaron por tinción con bromuro de etidio, se recortaron y el gel se dividió en pequeños fragmentos. Los fragmentos se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se les añadió

un volumen de acetato amónico 0.5M, EDTA 1mM, pH 8.0. Los tubos se mantuvieron en agitación a 37°C durante la noche. Los sobrenadantes se recuperaron por centrifugación a 10000xg 10 min y los sedimentos se reextrajeron con 0.5 volúmenes del mismo tampón. Se combinaron los dos sobrenadantes y se precipitó el DNA con alcohol. Los rendimientos oscilaron alrededor del 70-80%.

III.7. Ensayo de actividad invertasa.

La obtención de extractos crudos de células se realizó según el método descrito por Carlson *et al.* (1981), con ligeras modificaciones. Las células de levadura en estado de represión o de desrepresión de la síntesis de invertasa, se recogieron en fase logarítmica de crecimiento y se lavaron con tampón fosfato sódico 50 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 0.1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0.7 mM, pH 6.7; y se congelaron en tubos de vidrio de 10x150 mm. Las células se descongelaron con 100 μ l del mismo tampón a 4°C y se añadieron perlas de vidrio de 0.45-0.50 mm de diámetro hasta el menisco. Las células se rompieron por agitación durante cinco periodos de 15 s a 4°C. Las células enteras y restos celulares se eliminaron por centrifugación en estos mismos tubos 5 min a 3000xg.

Los sobrenadantes se utilizaron para ensayar la actividad invertasa según se describe en Goldstein y Lampen (1975), con algunas modificaciones (Celenza y Carlson, 1984a). El ensayo constó de dos partes. En la primera se

llevó a cabo la reacción de hidrólisis de la sacarosa, mezclando 50 μ l de tampón acetato sódico 0.2 M pH 5.1 con 25 μ l de muestra y 25 μ l de sacarosa 0.5 M, e incubando 10 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo 100 μ l de tampón fosfato potásico 0.5 M, pH 7 y calentando a 100°C durante 3 min para inactivar la invertasa. La segunda parte del ensayo consistió en una valoración de la glucosa producida por hidrólisis de la sacarosa. Para ello una vez atemperados los tubos a 37°C se adicionó 1 ml de una solución que contenía 84 μ g/ml de glucosa oxidasa, 10 μ g/ml de peroxidasa, 38% (v/v) de glicerol, 0.3 mg/ml de O-dianisidina, en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7, y se incubaron 20 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo 1.5 ml de HCl 6 N.

En todos los casos se incluyó un blanco con sacarosa pero sin extracto enzimático para poder sustraer el color debido a la hidrólisis no enzimática de la sacarosa. Asimismo se incluyeron 5 tubos con diferentes cantidades de glucosa, entre 0 y 8×10^{-2} μ moles, para construir una curva patrón donde interpolar los valores de las muestras. Se leyó A_{540} utilizando como blanco el tubo sin extracto enzimático.

Otras alícuotas del extracto se usaron para cuantificar proteínas por el método descrito en el apartado III.2.

Como unidad de actividad enzimática se utilizó la definida por Goldstein y Lampen (1975). Una unidad es la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de sacarosa, o produce un μ mol de glucosa, por minuto en las condiciones del ensayo. La actividad específica se expresó en unidades

por mg de proteína.

Este método valora la cantidad total de invertasa, sin discriminar entre la invertasa interna y la externa. Pero dado que el presente trabajo se estudia la actividad total del gen SUC2 resulta conveniente para este fin.

IV. TECNICAS DE DNA RECOMBINANTE.

Todo el material y disoluciones utilizadas en los apartados IV.1 al IV.5 se esterilizaron previamente.

IV.1. Aislamiento de plásmidos.

Se utilizaron dos procedimientos alternativos, el primero para el aislamiento en pequeña escala con fines analíticos, y el segundo para el aislamiento de plásmidos en gran escala con fines preparativos. Ambos están basados en el procedimiento descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979).

Para el aislamiento rápido de plásmidos en pequeña escala se siguió el procedimiento descrito en Silhavy et al. (1984) con ligeras modificaciones (Pérez-Ortín et al., 1986). Se sembraron matraces de 100 ml con 10 ml de medio de cultivo LB (triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v)) suplementado con los antibióticos oportunos, en función de las resistencias que llevara la cepa bacteriana utilizada. Los antibióticos se utilizaron en

las siguientes concentraciones: ampicilina 50 µg/ml, tetraciclina 12.5 µg/ml y cloramfenicol 34 µg/ml. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante la noche. Al día siguiente se recogieron las células por centrifugación a 1500xg 10 min y se resuspendieron en 0.4 ml de disolución de lisozima (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, lisozima 5 mg/ml). La suspensión se pasó a dos tubos eppendorf de 1,5 ml y se incubó sobre hielo durante 5 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 0.4 ml de disolución NaOH-SDS (NaOH 0.2 N, SDS 1% (p/v)) por tubo y se agitaron en un vortex hasta que la disolución quedó translúcida, incubándolos a continuación 5 min en hielo. Posteriormente se adicionaron 0.3 ml de acetato potásico 5 M pH 4.8 por tubo y se mantuvieron 30 min a -20°C. El precipitado resultante se eliminó por centrifugación a 12000xg 10 min. De cada sobrenadante se recogieron 0.75 ml que se pasaron a otro tubo eppendorf de 1.5 ml, donde se precipitó el DNA plasmídico con 0.6 volúmenes de isopropanol por el procedimiento habitual (apartado III.1).

Para el aislamiento preparativo de plásmidos se utilizó un procedimiento ligeramente distinto, similar al descrito en Maniatis et al. (1982). Se realizó un precultivo de la cepa de E. coli apropiada en medio LB (suplementado con los antibióticos oportunos) durante la noche. Al día siguiente se inocularon 2.5 ml de este precultivo en un matraz de 1 l con 500 ml del mismo medio y se incubó a 37°C con agitación

hasta que la D.O. a 600 nm fue de 0.4. En este momento se adicionó cloramfenicol (2.5 ml de una disolución 34 mg/ml en etanol) o espectinomicina (0.5 ml de una suspensión 300 mg/ml en H₂O), dependiendo de si el plásmido contenía, o no, respectivamente, resistencia al cloramfenicol, y se incubó con agitación a 37°C durante 12-16 h. Rutinariamente se comprobó que durante este periodo no se producía un crecimiento del cultivo. Al cabo de este tiempo se recogieron las células por centrifugación a 1500xg 10 min en botes estériles de 250 ml y se resuspendieron en 10 ml de disolución de lisozima. Se incubaron en esta disolución 5 min a temperatura ambiente y se añadieron 20 ml de la disolución de NaOH-SDS. Después de mezclar bien las disoluciones se incubaron 10 min a 0°C. A continuación se añadieron 15 ml de acetato potásico 5M pH 4.8 y se incubó 10 min a 0°C. El precipitado se eliminó por centrifugación a 30000xg 30 min. El sobrenadante se distribuyó en cuatro tubos de vidrio Corex de 30 ml siliconizados y se extrajo 2-3 veces con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). La fase acuosa se precipitó con 2 volúmenes de etanol a -20°C durante 1-2 horas. El precipitado se recogió y lavó como se describe en el apartado III.1. El sedimento seco se disolvió en 5 ml de tampón TE y se digirió con RNasa A (20 µg/ml) durante 30 min a 37°C. Posteriormente se añadió SDS hasta el 1% (p/v) y proteinasa K hasta 100 µg/ml y se incubó otros 30 min a 37°C. Finalmente se extrajo una vez con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), una vez con

cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó con alcohol. El precipitado se recogió, lavó y secó en las condiciones descritas anteriormente y se disolvió en la cantidad apropiada de tampón TE. La cantidad de plásmido obtenido se calculó a partir de su A_{260} .

Los plásmidos obtenidos por ambos métodos se analizaron rutinariamente en electroforesis en agarosa (apartado III.3) y/o por restricción (apartado IV.2).

IV.2. Digestión con endonucleasas de restricción.

Para la digestión de muestras de DNA con endonucleasas de restricción se utilizaron las condiciones descritas en Maniatis *et al.*, (1982). Se utilizaron 3 tampones diferentes de alta, media y baja concentración salina: NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (alta concentración); NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (media); y MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (baja). Para cada endonucleasa de restricción se utilizó el tampón indicado por Maniatis *et al.* (1982).

Las digestiones se realizaron en tubos eppendorf a 37°C durante dos horas. La concentración de DNA en la mezcla final fue inferior a 1 mg/ml. Dado que las muestras de DNA generalmente estaban disueltas en tampón TE que puede inhibir la reacción por su contenido en EDTA, la concentración de este tampón en la mezcla final quedó diluida, al menos, cinco veces. Así mismo la presencia de

glicerol en concentraciones superiores al 5% inhibe parcialmente la actividad de las endonucleasas de restricción (Maniatis *et al.*, 1982) por lo que las endonucleasas, que se sirven en un medio estabilizante con glicerol al 50%, se diluyeron diez veces, al menos, en la mezcla final. Las unidades de endonucleasa de restricción necesarias para digerir completamente una muestra de DNA de tamaño y número de puntos de corte con ese enzima conocidos se calcularon mediante la fórmula (Boehringer-Mannheim, 1985):

$$P_{Bu} \times C_m / P_{Bm} \times C_u = N$$

donde N es el número de unidades necesario para digerir 1 µg de muestra, P_{Bu} es el número de pares de bases del patrón con el cual se definen las unidades de actividad del enzima de restricción (generalmente el fago o pBR322), P_{Bm} es el número de pares de bases de la muestra, C_u es el número de puntos de corte de ese enzima de restricción en el patrón y C_m el número de cortes de ese enzima en la muestra. Como medida de precaución, para asegurar que la reacción de digestión fuera completa, se utilizaron el doble de unidades de actividad enzimática de las necesarias. En las digestiones con DNA genómico, que tiene un tamaño variable y desconocido y un número de cortes con el enzima de restricción también desconocido, se utilizaron entre 3 y 4 unidades de actividad enzimática por µg de DNA.

Para las digestiones dobles se siguió el siguiente procedimiento. Si ambos enzimas se utilizaban con el mismo

tampón se siguió el protocolo descrito anteriormente, conservando las proporciones adecuadas de los distintos agentes que influyen en la digestión. En el caso de que los dos enzimas se utilizaran con diferentes tampones se digirió en primer lugar la muestra con el enzima que requería el tampón de menor concentración salina y al cabo de 1.5 h de incubación se añadió un quinto de volumen del tampón de conversión apropiado y del segundo enzima de restricción y se incubó la muestra durante 1.5 h más. Los tampones de conversión utilizados fueron los siguientes: NaCl 300 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (baja/media); NaCl 350 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 250 mM, pH 7.5 (media/alta); y NaCl 600 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 250 mM, pH 7.5 (baja/alta)

Cuando la restricción se llevó a cabo para el análisis rápido de plásmidos en gel de agarosa, la reacción se paró añadiendo la cantidad apropiada de disolvente de muestras concentrado seis veces. En los demás casos de electroforesis en agarosa y siempre en las electroforesis en poliacrilamida la reacción se paró mediante precipitación con alcohol (apartado III.1) y posteriormente las muestras se disolvieron en la cantidad apropiada de disolvente de muestras de electroforesis.

IV.3. Subclonación de fragmentos de restricción en pBR325.

Se utilizaron dos estrategias de clonación, la

inactivación por inserción en la construcción del plásmido pSUC243 y la clonación direccional en la construcción de los plásmidos pSUC207 y pSUC213.

Para la construcción del plásmido pSUC243, se digirieron 3 µg del plásmido pBR325 con la endonucleasa de restricción EcoRI y se precipitaron con alcohol. Por otro lado se aislaron 2 µg del fragmento de restricción EcoRI/EcoRI de 4.3 kb del plásmido pRB58 (ver fig. 2) que contiene el gen SUC2, a partir de agarosa de bajo punto de fusión, como se describe en el apartado III.6.

Se preparó una mezcla de ligamiento consistente en: 3 µg de pBR325 digerido con EcoRI, 2 µg del fragmento de 4.3 kb del gen SUC2, ATP 1 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, y 5 unidades de DNA ligasa, en un volumen total de 100 µl. La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C y posteriormente durante 18 h a 4°C. El DNA se precipitó con alcohol y se disolvió en 20 µl de tampón TE. Se usaron 10 µl para transformar células competentes de E. coli HB101 por el método descrito en el apartado IV.4. De los transformantes recuperados, 208 se sembraron en placas de medio LB suplementado con cloramfenicol para determinar cuáles de ellos habían perdido la resistencia a este antibiótico, previsiblemente por inserción del fragmento de 4.3 kb en el sitio de restricción EcoRI del pBR325 (ver fig. 2). Se recuperaron 14 colonias (7%) sensibles al cloramfenicol. De todas ellas se aisló plásmido por el método de aislamiento descrito en el apartado IV.1. En todos los casos los

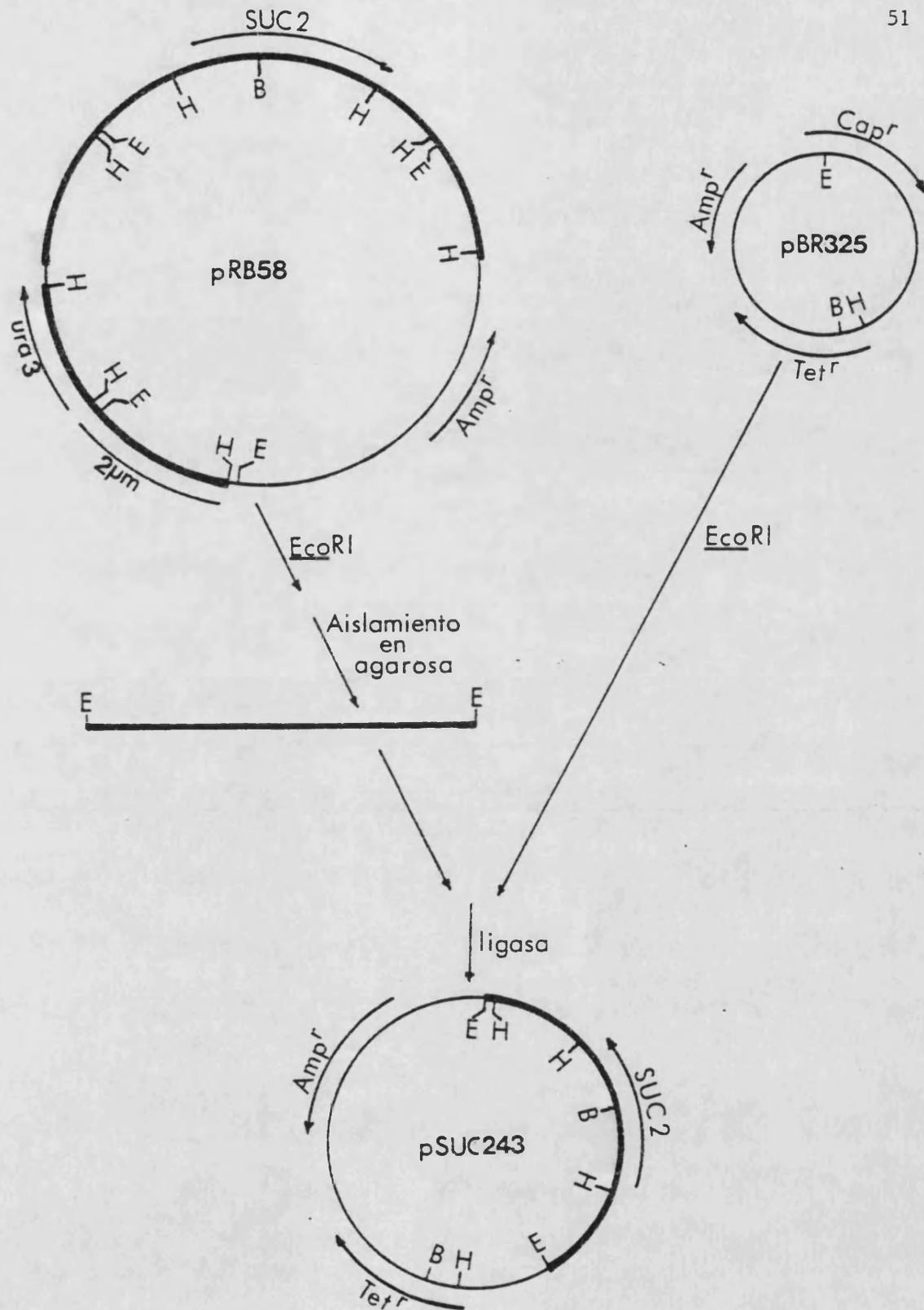


Figura 2.- Construcción del plásmido pSUC243.

De forma esquemática se representa la estrategia de subclonación, mediante inactivación insercional, del fragmento de 4.3 kb con extremos *EcoRI*/*EcoRI* en el sitio *EcoRI* del vector pBR325. Los detalles del procedimiento se explican en el texto. La línea delgada representa DNA bacteriano y la gruesa DNA de levadura. Las flechas interiores indican la dirección de transcripción de los genes. Se han señalado los sitios de restricción más relevantes (ver fig. 1 para clave de símbolos).

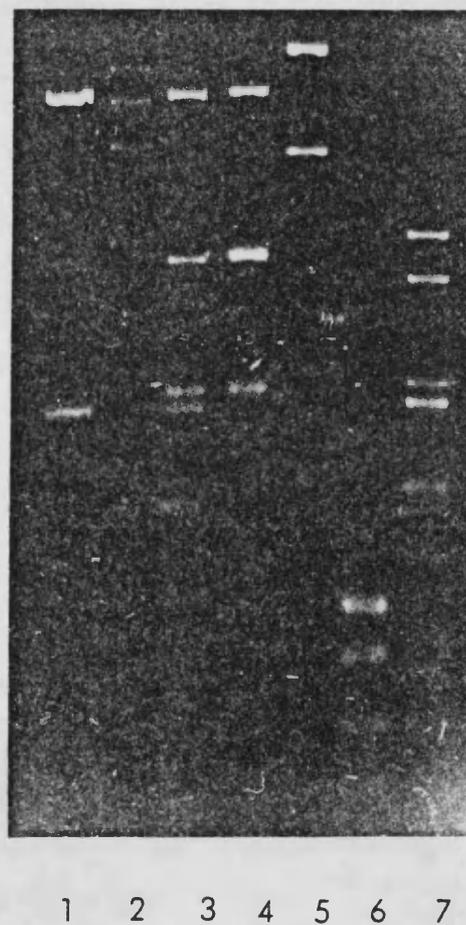


Figura 3.- Digestión del plásmido pSUC243 con diferentes enzimas de restricción.

La figura muestra una electroforesis en agarosa 1.2% de diversas digestiones con enzimas de restricción del plásmido pSUC243. Los tamaños de los fragmentos se calcularon de la forma descrita en el apartado III.5 utilizando como patrones los fragmentos obtenidos con las restricciones de pBR322 con *Hpa*II (carrera 1), de pRB58 con *Hpa*II (carrera 2) y de pBR325 con *Hind*III y *Eco*RI (carrera 7). El mapa de restricción obtenido es el representado en la figura 2. Las digestiones utilizadas fueron las siguientes, pSUC243 digerido con: *Bam*HI (carrera 3), *Hind*III (carrera 4), *Hind*III y *Eco*RI (carrera 5), pRB58 digerido con *Eco*RI (carrera 6).

plásmidos recuperados fueron de tamaño superior al vector y compatible con el tamaño del plásmido deseado. Se eligieron dos colonias, que se digirieron con EcoRI, para comprobar la presencia del inserto. En ambos casos el plásmido obtenido consistía en el vector pBR325 más el inserto de 4.3 kb. La identidad y orientación del fragmento de 4.3 kb se comprobó mediante la construcción de un mapa de restricción del mismo (fig. 3).

Para la construcción de los plásmidos pSUC207 y pSUC213 se digirieron 100 µg del vector pBR325 con las endonucleasas de restricción HindIII y BamHI y se aisló el fragmento de 5.7 kb de este plásmido (ver fig. 4) por electroforesis preparativa en agarosa de bajo punto de fusión, como se describe en el apartado III.6. Por otro lado se aislaron por el mismo procedimiento los fragmentos de 776 pb y 1.25 kb BamHI/HindIII del gen SUC2 a partir del plásmido pSUC243. La reacción de ligamiento se hizo en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero con 2 µg del vector y 4 µg del fragmento a insertar. Las reacciones se pararon mediante precipitación con alcohol y el DNA se disolvió en 20 µl de tampón TE. Se utilizaron 10 µl de cada muestra para transformar células de E. coli C600 otc^- por el método descrito en el apartado IV.4. Se comprobó que todos los transformantes recuperados eran incapaces de crecer en medio con el antibiótico tetraciclina y que contenían plásmidos de tamaño compatible con el previsto. Finalmente mediante restricción con HindIII y BamHI se eligieron dos colonias

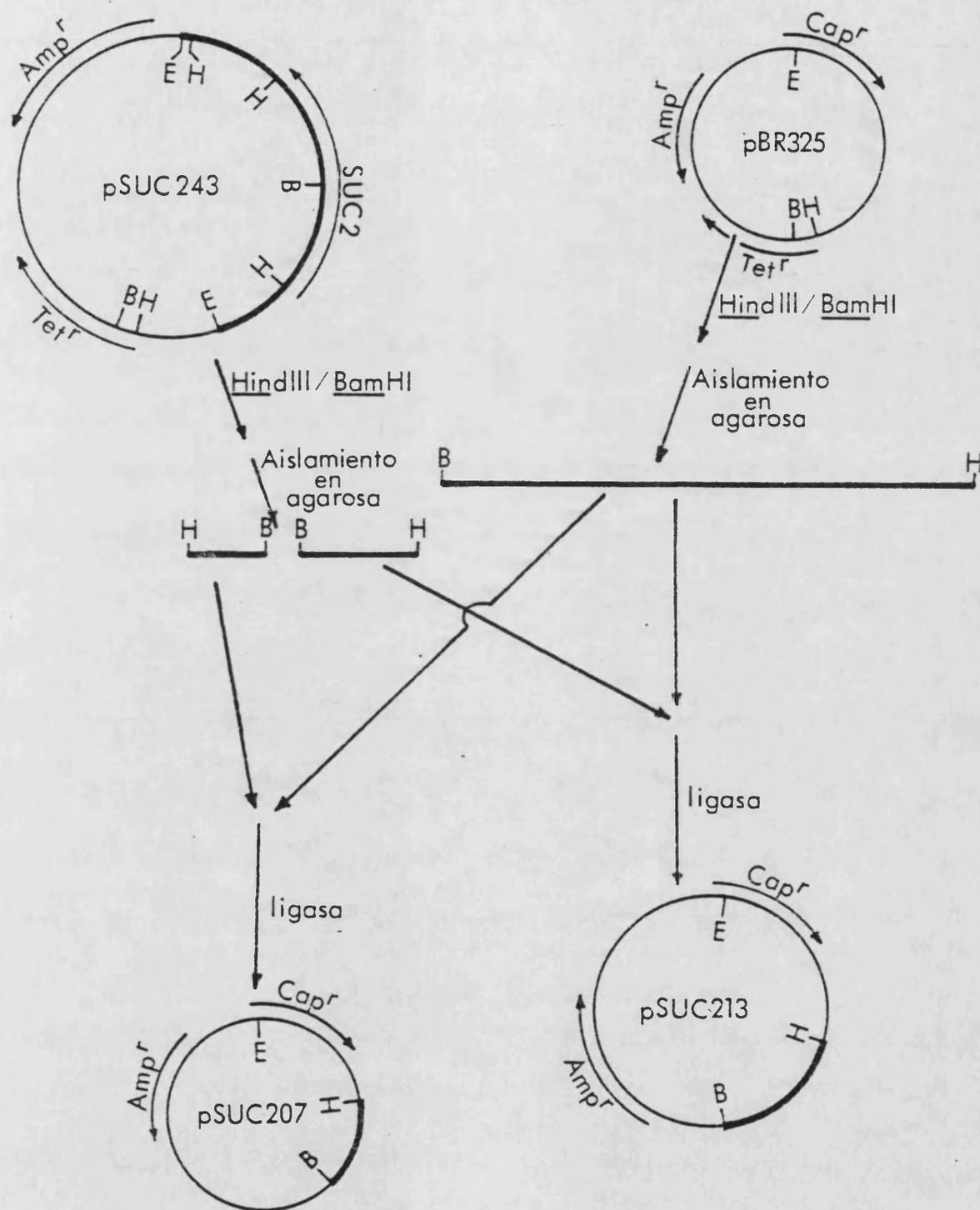


Figura 4.- Construcción de los plásmidos pSUC207 y pSUC213.

De forma esquemática se representan las estrategias de subclonación, mediante clonación direccional, de los fragmentos de 0.78 kb y 1.25 kb con extremos *HindIII*/*BamHI* entre los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBR325. Los detalles del procedimiento se explican en el texto. Los símbolos son los mismos de la figura 2.

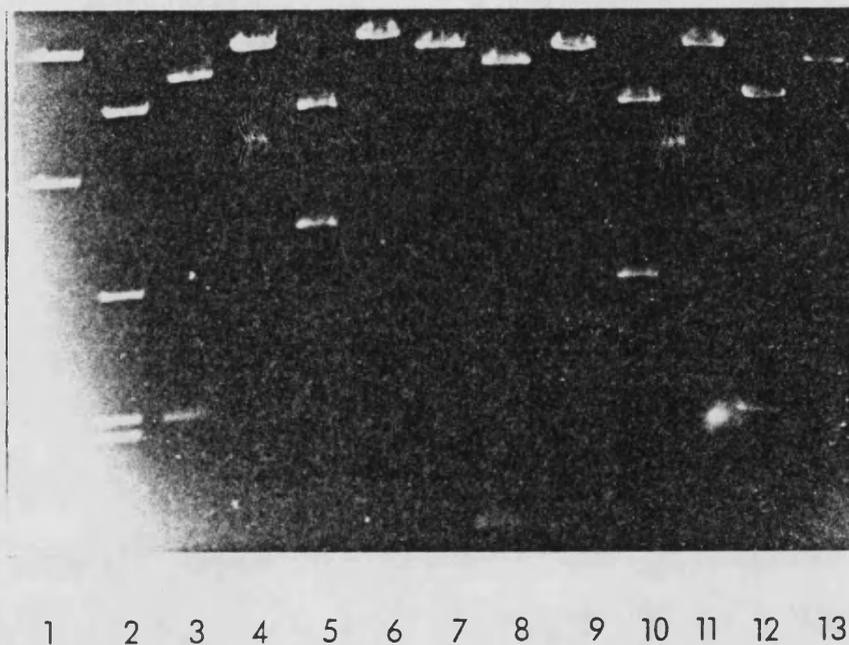


Figura 5.-Digestión de los plásmidos pSUC207 y pSUC213 con diversas enzimas de restricción.

La figura es una electroforesis en agarosa 0.8% de diversas digestiones de los plásmidos pSUC207 y pSUC213. Los tamaños de los fragmentos se calcularon de la forma descrita en el apartado III.5 utilizando, como patrones de tamaño, pBR325 cortado con: *EcoRI* (carrera 1) y *EcoRI/HindIII* (carrera 2), y pSUC243 cortado con *EcoRI/HindIII* (carrera 12) y *BamHI* (carrera 13). Los mapas de restricción obtenidos son los representados en la figura 4. Las digestiones realizadas fueron las siguientes, pSUC207 (carreras 3-7) y pSUC213 (carreras 8-11) digeridos con: *EcoRI* (carreras 3 y 8), *EcoRI/BamHI* (carreras 4 y 9), *HindIII* (carreras 5 y 10), *HindIII/BamHI* (carreras 6 y 11) y *BamHI* (carrera 7).

que contenían plásmidos compuestos por el fragmento 5.7 kb del vector y los fragmentos de 776 pb o 1.25 kb del gen SUC2. La identidad de los fragmentos se comprobó mediante un mapa de restricción de los plásmidos obtenidos (fig. 5).

IV.4. Transformación de células de E. coli.

Se utilizó el procedimiento descrito en Maniatis et al. (1982). Se inoculó 1 ml de un precultivo realizado durante la noche anterior en medio LB con la cepa apropiada de E. coli (HB101 o C600 etc⁻) en 10 ml de medio LB nuevo en un matraz de 100 ml. Se crecieron las células a 37°C con agitación hasta una densidad de 5×10^7 células/ml. En este momento se recogieron por centrifugación en frío, en alícuotas de 3 ml, y se resuspendieron en 1.5 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 50 mM, pH 8.0, esteril y frío, en un tubo eppendorf de 1.5 ml, y se incubaron sobre hielo durante 15 min. Las células se recogieron por centrifugación en frío y se resuspendieron en 200 μ l del mismo tampón. En este estado se incubaron sobre hielo durante 1 h. Las células competentes preparadas de esta forma se transformaron con la cantidad apropiada de DNA (ver apartado IV.3). Para ello, una vez añadido el DNA se incubaron sobre hielo durante 30 min. y posteriormente durante 2 min a 42°C. A continuación se añadió 1 ml de medio LB y se incubaron sin agitación a 37°C durante 1 h. Después de este periodo se sembraron placas con medio LB sólido (con 1% de agar) suplementado con

los antibióticos apropiados (a las concentraciones descritas en el apartado IV.1), mediante un asa de Digralsky (hasta 0.2 ml de medio líquido por placa). Se hicieron los controles oportunos de células viables, sembrando placas de medio LB sin antibióticos, y de revertientes, con células no transformadas, sobre placas con medio LB+antibióticos. En todos los casos el número de viables fue superior a 10^7 células/ml y no se recuperaron revertientes espontáneos.

IV.5. Marcaje radiactivo de DNA mediante "nick-translation".

Se siguió el método de Rigby *et al.* (1977) según se describe en Maniatis *et al.* (1982). La reacción de "nick-translation" se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l en un tubo eppendorf de 0.5 ml. Cuando el DNA era un plásmido la mezcla de reacción consistió en 1-2 μ g de DNA, disuelto en un volumen de TE de hasta 10 μ l, dNTPs no radiactivos (dGTP, dTTP y dCTP) 20 μ M de cada uno, DNasa I 2×10^{-4} mg/ml, $MgSO_4$ 10 mM, DTT 0.1 mM, BSA (libre de nucleasas) 50 μ g/ml, $[\alpha\text{-}^{32}P]dATP$ 50-100 μ Ci, DNA polimerasa I 5 unidades, y Tris-HCl 50 mM, pH 7.2. Esta mezcla se incubó a 16°C durante dos horas. La reacción se paró añadiendo 50 μ l de EDTA 100 mM y enfriando sobre hielo.

Previamente se había determinado la cantidad apropiada de DNasa I a añadir mediante la preparación de cinco ensayos simultáneos en pequeña escala (en 5 μ l totales y con 2 μ Ci de $[\alpha\text{-}^{32}P]dATP$) con cantidades diferentes de DNasa I, entre

0 y 2×10^{-4} mg/ml. La máxima incorporación se obtuvo con DNasa I a 2×10^{-4} mg/ml (fig. 6). Asimismo se comprobó mediante electroforesis que la sonda obtenida tenía un tamaño entre 600 y 2000 pb, apropiado para ser utilizada en hibridaciones (Meinkoth y Wahl, 1984).

Cuando la sonda a marcar consistía en un fragmento de restricción aislado a partir de un gel, de menos de 1 kb de longitud no se añadió DNasa I a la reacción de nick-translation para evitar la producción de fragmentos demasiado pequeños durante la reacción.

Para determinar el porcentaje de incorporación de la radiactividad añadida al DNA marcado se comparó la radiactividad total con la precipitable con TCA al 10% (p/v). Para ello se tomaron dos alícuotas de cada muestra y se depositaron sobre filtros Whatman GF/F de fibra de vidrio de 2.5 cm de diámetro. Una de ellas se dejó secar y se contó directamente, dando la radiactividad total. La otra alícuota (suplementada con 50 μ l de DNA de salmón a 1 mg/ml, para favorecer la precipitación) se precipitó sumergiendo el filtro en TCA al 10%, se lavó con etanol, se secó y se contó. Para contar la radiactividad se utilizó un mezcla de centelleo consistente en PPO al 0.6% (p/v) y dimetil-POPOP al 0.0075 % (p/v) en tolueno, y un contador de centelleo líquido Rackbeta (LKB). Cuando la sonda a marcar fue un plásmido se obtuvieron rutinariamente incorporaciones entre el 40 y el 60%, mientras que en el caso de fragmentos aislados a partir de geles, debido a la presencia de

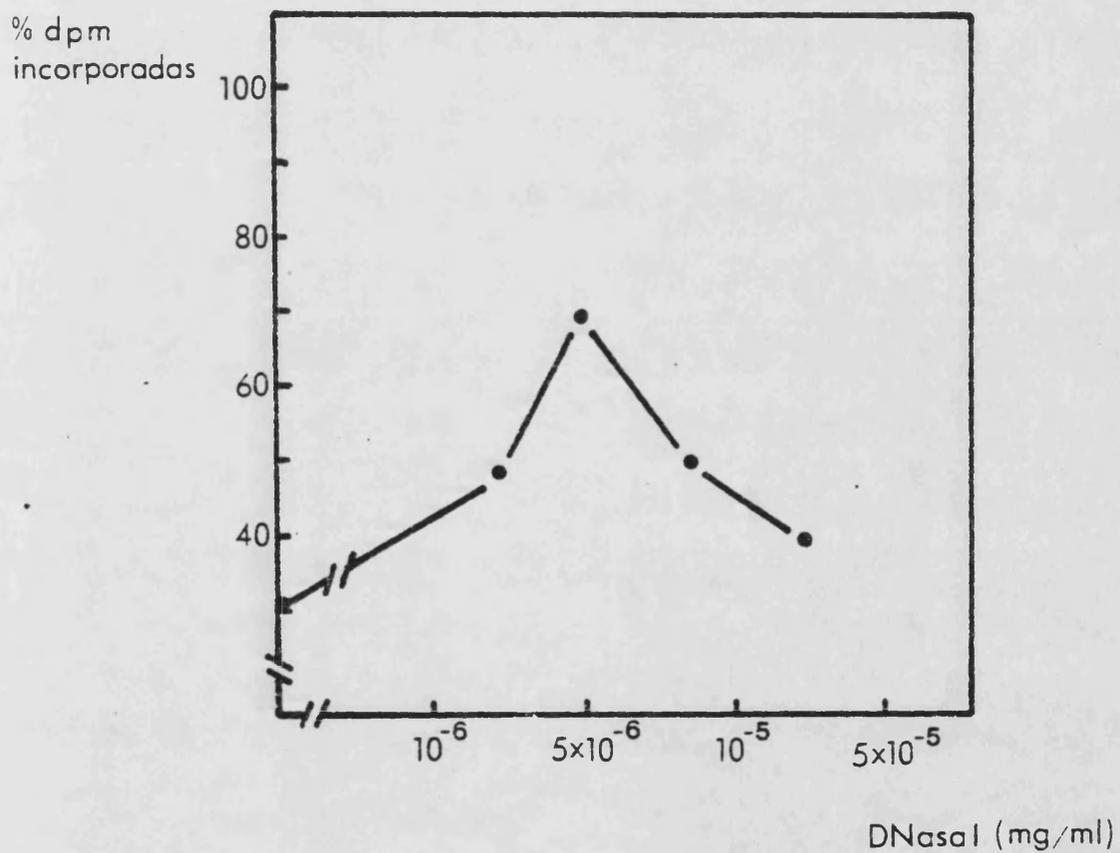


Figura 6.- Determinación de la concentración óptima de DNasa I en los ensayos de nick-translation.

Se representa el porcentaje de incorporación de radiactividad en el DNA marcado frente a la concentración de DNasa I en la mezcla de reacción. El protocolo se detalla en el texto.

sustancias inhibidoras de la DNA polimerasa I (Maniatis et al., 1982), las incorporaciones oscilaron entre el 5 y el 15%. En ambos casos la radiactividad específica de las sondas obtenidas osciló entre 0.5 y 7×10^7 cpm/ μ g de DNA.

Para eliminar los nucleótidos no incorporados se siguió un procedimiento descrito en Maniatis et al. (1982). Las muestras de 100 μ l se pasaron a través de columnas de Sephadex G-50 mediante centrifugación a 1600xg durante 4 min. Las columnas se construyeron en jeringuillas hipodérmicas de 1 ml con Sephadex G-50 previamente autoclavado y equilibrado en tampón STE (tampón TE suplementado con NaCl 0.1 M), que se centrifugaron a 1600xg 4 min y se lavaron 5-6 veces con 100 μ l de tampón STE y una vez con 100 μ l de DNA de salmón 0.2 μ g/ μ l en STE. Las muestras recuperadas de las columnas contenían entre el 80 y el 100% de radiactividad precipitable con TCA 10%. Una cierta cantidad de radiactividad precipitable se perdió durante el paso por la columna de Sephadex G-50 (usualmente entre el 5 y el 30%). Este porcentaje se incrementó en sondas preparadas a partir de fragmentos de pequeño tamaño o si se omitió el lavado final con DNA heterólogo.

IV.6. Transferencia de DNA a filtros.

Se utilizó el método descrito por Southern (1978). Los filtros para la transferencia fueron de dos tipos: papel diazobenciloximetilo (DBM) y nylon. El papel DBM requirió

una preparación previa ya que se suministra en la forma de m-aminobenciloximetilo (ABM) que es inactiva. Para activar la forma ABM a DBM se siguió el procedimiento descrito por Alwine *et al.* (1977). Se sumergió el papel en una solución de HCl 1.2 M y NaNO₂ 10 mg/ml recién preparada y a 0°C (1 ml/cm² de papel) durante 30 min. Posteriormente se lavó el papel dos veces con H₂O destilada fría y dos veces con acetato sódico 0.2M, pH 4. En este punto el papel se volvió color naranja. A partir de este momento el procedimiento fue el mismo, tanto para el papel DBM como para el nylon.

Se siguió el procedimiento recomendado por la casa comercial que suministró el papel de nylon (Amersham, 1985). Una vez teñido y fotografiado el gel de agarosa se incubó 15 min con HCl 0.25 M para fragmentar el DNA de alto peso molecular. Posteriormente se incubó 30 min con una solución de NaOH 0.5M, NaCl 1.5M para desnaturalizar el DNA, y 2x15 min con Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M, EDTA 1 mM, pH 7.2 para neutralizar. Para la transferencia se depositó el gel sobre una hoja de papel Whatman n° 3 de su misma anchura aunque más larga, formando así dos mechas laterales de papel para absorber tampón desde dos cubetas situadas a los lados. Sobre la superficie del gel se depositó una hoja de papel para transferencia de su mismo tamaño, haciendo coincidir el borde superior del papel con los pocillos del gel. Sobre el papel de transferencia se colocó una hoja de papel Whatman n° 3 del mismo tamaño que el gel humedecida en tampón y 10

cm de toallas secas que se comprimieron sobre el gel mediante un peso de 1-1.5 kg. La transferencia se realizó durante 12-16 h a temperatura ambiente. El tampón utilizado fue 6xSSC (1xSSC = NaCl 0.15 M, citrato sódico 15 mM, pH 7). Una vez realizada la transferencia se comprobó la desaparición del DNA del gel mediante tinción con bromuro de etidio. Los filtros de nylon se lavaron con 2xSSC y se secaron entre papeles de filtro. Posteriormente se irradiaron con un transiluminador de luz ultravioleta durante 5 min. Los filtros de papel DBM se lavaron con NaOH 0.5 M para eliminar los grupos reactivos sobrantes y luego con 2xSSC, SDS 0.1% (p/v) como neutralizador y se secaron entre papeles de filtro. Los filtros se guardaron en seco a 4°C hasta su uso.

IV.7. Hibridación de DNA sobre filtros con sondas radiactivas.

Se utilizaron condiciones similares a las descritas en Maniatis *et al.* (1982), Meinkoth y Wahl (1984) y Amersham (1985). Los filtros se incubaron con una solución de prehibridación consistente en 6xSSC, 5x disolución Denhardt (1x disolución Denhardt = BSA 0.02% (p/v), PVP 0.02% (p/v), Ficoll 400 0.02% (p/v)), DNA de salmón sonicado y desnaturalizado 100 µg/ml durante 30-60 min a 42°C. Posteriormente se incubaron con la disolución de hibridación dentro de bolsas de plástico selladas de un tamaño

ligeramente superior al del filtro, durante 16-20 h. La disolución de hibridación se componía de 6xSSC, 1x disolución Denhardt, formamida desionizada 50% (v/v), sulfato de dextrano 10% (p/v) y DNA de salmón sonicado y desnaturalizado 100 µg/ml, además de la sonda radiactiva desnaturalizada. La concentración de la sonda en esta solución osciló entre 50-100 ng/ml y $1-8 \times 10^6$ cpm/ml. Una vez hibridados, los filtros se lavaron dos veces durante 15 min con 2xSSC, una vez durante 30 min con 2xSSC, SDS 0.1% (p/v) y una vez durante 10 min con 0.1xSSC, SDS 0.1% (p/v), en todos los casos a 65°C con agitación. Finalmente los filtros se secaron al aire.

Para eliminar la sonda, con el propósito de reutilizar el filtro, se utilizaron lavados con NaOH 0.5M (2x30 min) a 37°C para el papel DBM y con NaOH 0.4M (2x30 min) a 45°C para el nylon. En ambos casos los filtros se lavaron posteriormente con 0.1xSSC, SDS 0.1% (p/v), Tris-HCl 0.2M, pH 7.5 para neutralizar. La eliminación de la sonda se comprobó con un contador Geiger. Los filtros lavados se rehibridaron en varias ocasiones sin pérdida aparente de capacidad de hibridación. Así mismo las sondas se reutilizaron hasta cinco veces con diferentes filtros. En este caso se guardaron a -20°C entre una hibridación y la siguiente. Se observó una reducción progresiva de la capacidad de hibridación de las sondas por lo que las reutilizaciones se limitaron a 3-5 generalmente.

IV.8. Autorradiografía de los filtros hibridados.

Se utilizó película Kodak X-Omat S y cassettes Kodak X-Omatic, provistos de dos pantallas intensificadoras Kodak X-Omatic regular. Las autorradiografías se desarrollaron a -80°C en la oscuridad durante tiempos variables (entre 2 y 100 h), dependiendo de la radiactividad de los filtros.

Las placas fotográficas se revelaron con revelador Kodak D-19 durante 10 min a 20°C .

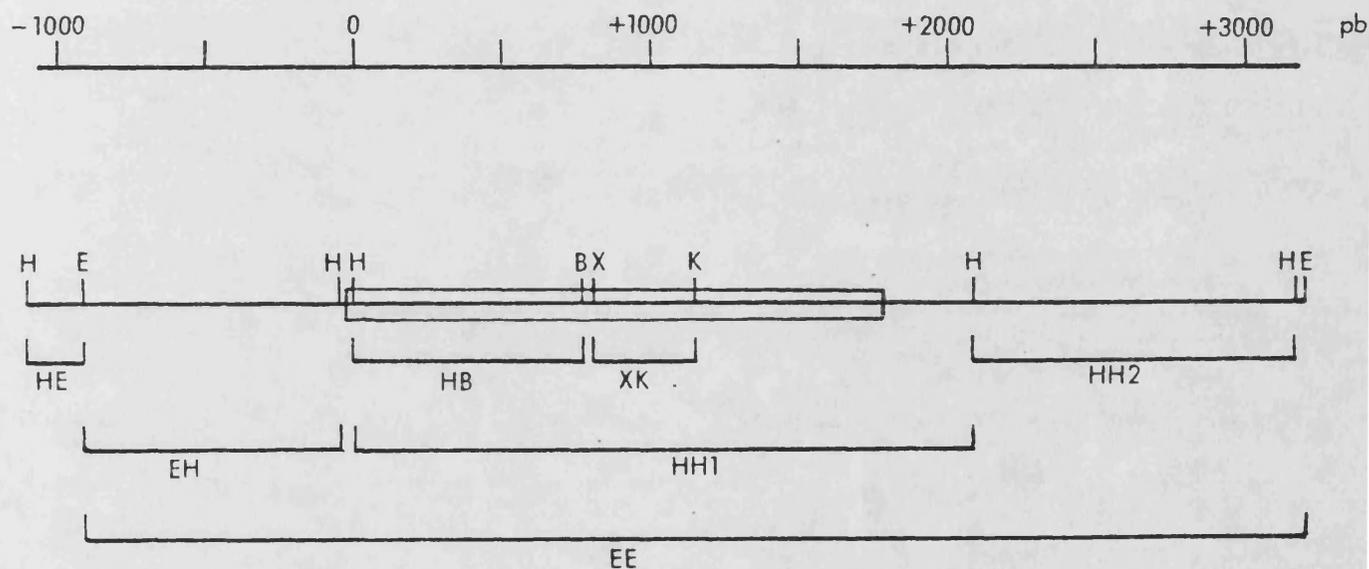


Figura 7.- Esquema de la zona del gen SUC2 mostrando las sondas empleadas en este trabajo.

En la parte superior se muestra una escala indicando las diversas posiciones a lo largo del gen, tomando como 0 el nucleótido anterior al triplete de iniciación.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. ACTIVIDAD DEL GEN SUC2 EN LOS ESTADOS DE REPRESION Y DESREPRESION.

Es un hecho conocido que la actividad invertasa en la levadura S. cerevisiae varía en función de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo (Gascón y Lampen, 1968). A altas concentraciones de glucosa el gen está reprimido, mientras que a concentraciones inferiores al 0.1% de glucosa se desreprime la síntesis de invertasa. En condiciones de represión por glucosa sólo se produce el RNAm de 1.8 kb -que da lugar a la invertasa interna, no reprimible por la glucosa-, mientras que en estado de desrepresión se producen tanto el RNAm de 1.8 como el de 1.9 kb (Carlson y Botstein, 1982). Por este motivo se puede concluir que las variaciones en la actividad invertasa observadas entre los estados de represión y desrepresión se deben a diferentes tasas de transcripción del gen SUC2.

Se han encontrado variaciones en la actividad invertasa de hasta 100 veces en varias cepas SUC2 de levadura, en función de la concentración de glucosa (Gascón y Lampen, 1968). En este trabajo se ha empleado el método descrito por Carlson et al. (1981) para la desrepresión de la síntesis de invertasa y la medida de su actividad, con la cepa X2180-1A de S. cerevisiae, cuyo comportamiento en este sentido no era conocido. Sin embargo esta cepa era útil para este trabajo puesto que ya se había utilizado previamente en estudios

genéticos con el gen SUC2 (Grossmann y Zimmermann, 1979) y en estudios de estructura de cromatina de otras regiones del genoma (Bloom y Carbon, 1982).

Los valores de actividad invertasa obtenidos para esta cepa oscilaron alrededor de 0.2 u/mg de proteína en estado de represión y de 8.0 u/mg de proteína en estado de desrepresión, lo cual supone unas 40 veces más actividad en el estado de desrepresión. Estos valores están dentro del rango de los descritos para otras cepas no mutantes en el gen SUC2 de S. cerevisiae (Abrams et al., 1978).

II. SENSIBILIDAD DEL GEN SUC2 A LAS NUCLEASAS. VARIACIONES CON EL ESTADO DE ACTIVIDAD.

II.1. Consideraciones generales sobre la metodología.

En la figura 7 se representan esquemáticamente las sondas empleadas en este apartado y en los siguientes.

En la figura 8 se presenta un esquema de la metodología empleada para la determinación de la sensibilidad del gen SUC2 a una nucleasa, basada en el método descrito por Bellard et al. (1980). Una vez digerida la cromatina con diferentes concentraciones de nucleasa, generalmente a tasas de digestión muy bajas, se purificó el DNA y se sometió a restricción con un enzima apropiado. En el caso del gen SUC2 se utilizó EcoRI para determinar la sensibilidad global, y

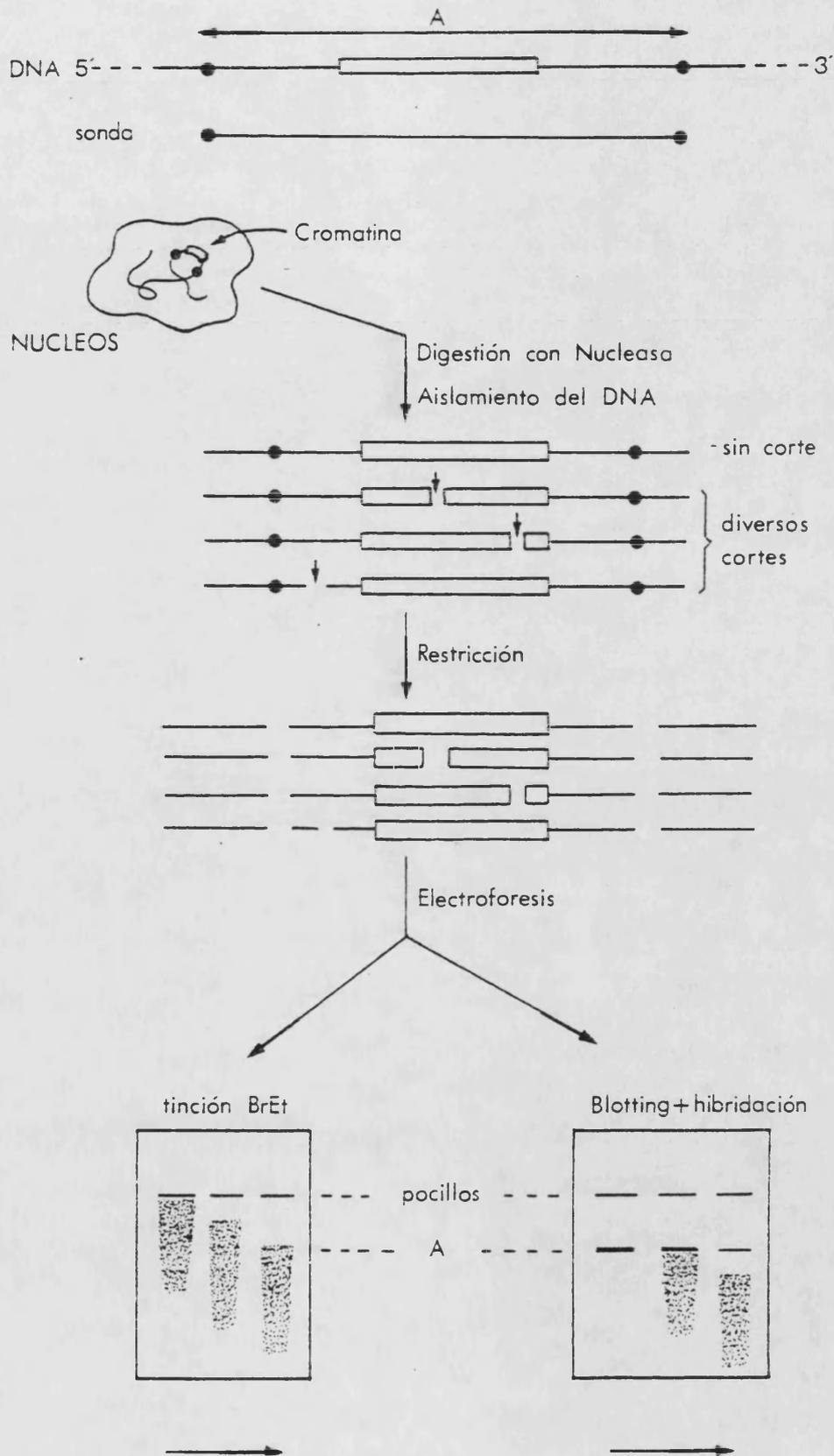


Figura 8.- Método para la determinación de la sensibilidad de un fragmento de DNA en cromatina a una nucleasa.

HindIII para diferenciar la sensibilidad de la zona transcribible y la de los flancos. Las muestras se analizaron en una electroforesis, en la que también se incluyeron patrones de tamaño conocido. Una vez completada la electroforesis el DNA se transfirió a un filtro y se hibridó con la sonda apropiada. Las autorradiografías se expusieron el tiempo necesario para que la absorbancia de las bandas estuviera entre 0.5 y 1.5 (a la longitud de onda del laser utilizado, 633 nm), con un fondo de 0.4-0.5 de A_{633} . Para eliminar los problemas debidos a la no uniformidad de las bandas, se densitometraron las bandas en tres posiciones diferentes y se promediaron los resultados. Como las bandas correspondientes a los diversos fragmentos que se comparan entre sí se obtuvieron por rehibridación del mismo filtro con sondas diferentes no pueden existir problemas debidos a diferencias entre dos transferencias distintas.

Para un análisis fino de la sensibilidad de las distintas regiones del gen, se utilizó un sistema de normalización que evita los errores en la intensidad de las bandas debidos a pequeñas diferencias en las cantidades de DNA total aplicado en cada carrera. Este sistema consistió en dividir la intensidad de la banda por la de la banda producida por la hibridación con la sonda HindIII/HindIII de 1.1 Kb que contiene toda la región transcribible del gen ura3, cuya actividad no varía en función de la concentración de glucosa presente en el medio (Jones y Fink, 1982). De

esta forma los valores obtenidos representan la sensibilidad relativa del fragmento del gen SUC2 frente a un gen cuya actividad permanece constante. Esta forma de normalización había sido empleada anteriormente por Eissenberg y Lucchesi (1983), y Bellard et al. (1980) para otros genes de eucariontes superiores.

II.2. Sensibilidad preferente del gen en estado desreprimido a la DNasa I.

Cuando se utilizó la DNasa I en el procedimiento anteriormente descrito, la sensibilidad promedio del gen más sus flancos, es decir del fragmento EcoRI/EcoRI de 4.3 kb (ver fig. 1), fue mayor cuando el gen estaba activo que cuando estaba reprimido por la presencia de glucosa (fig. 9). Este resultado está en la línea de los encontrados para otros genes con diferentes tasas de actividad. La diferencia de sensibilidad no es muy grande, menor que la encontrada para otros genes de eucariontes superiores. Por ejemplo los genes de la β -globina y de la ovoalbúmina (Weintraub y Groudine, 1976; Garel y Axel, 1976; Bellard et al., 1980). La mayor diferencia de sensibilidad encontrada en eucariontes superiores puede deberse a que en los casos estudiados los genes se comparaban entre dos estados de actividad muy diferente, utilizando un tejido en el que el gen estaba totalmente inactivo, y otro donde su tasa de transcripción era muy elevada. Sin embargo en el caso del

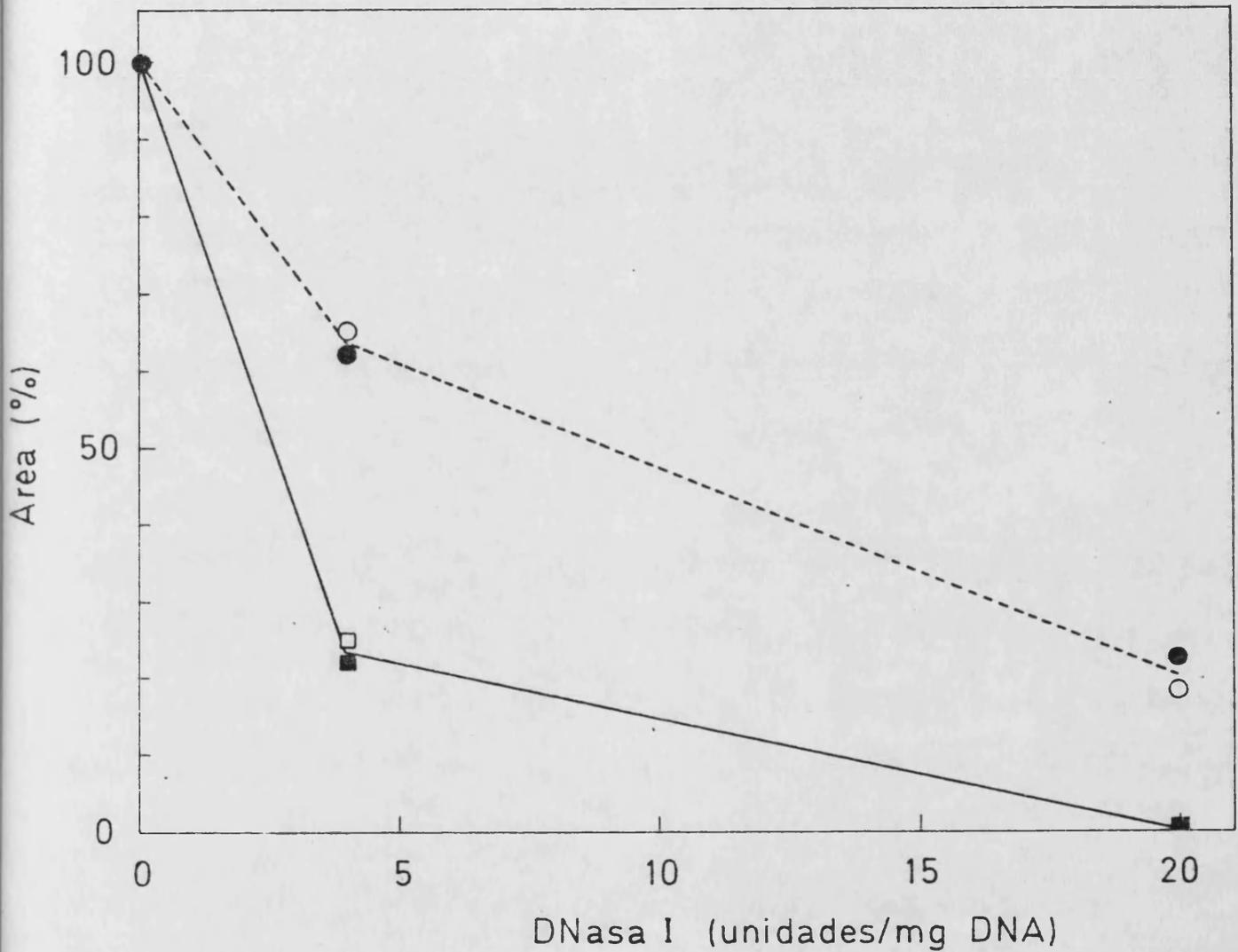


Figura 9.- Sensibilidad del gen SUC2 a la DNasa I.

Se representa la desaparición del fragmento EcoRI/EcoRI en función de las unidades de DNasa I empleadas en la digestión. Círculos y línea a trazos: gen en estado reprimido, cuadrados y línea continua: gen en estado activo. Símbolos llenos: sonda HB, símbolos vacíos: sonda EH.

gen SUC2 de levadura, su actividad sólo varía 40 veces y en el estado reprimido sigue produciendo un nivel basal de RNAm, el RNAm de 1.8 kb no reprimible por glucosa. Esta misma razón puede ser la causa de la diferencia que se observa entre el gen SUC2 y el único gen regulable de levadura que se había estudiado en este aspecto hasta el momento, el gen de la alcohol deshidrogenasa ADRI. En este gen las diferencias de actividad se estiman hasta en 100 veces y no se produce ningún RNAm constitutivo, por lo cual se observa una mayor diferencia de sensibilidad entre los estados activo y reprimido (Sledziewski y Young, 1982).

Hay que tener en cuenta que en todos los casos comentados, y en este experimento con el gen SUC2, se está estudiando la sensibilidad de fragmentos de restricción relativamente grandes, de 4 a 15 kb, que contienen el gen y amplias zonas laterales por lo que este tipo de análisis, que mide la tasa de producción del primer corte doble con la DNasa I dentro del fragmento, no indica si todo el fragmento es sensible a la DNasa I o sólo una parte de él es responsable de su sensibilidad incrementada.

II.3. Zonas de sensibilidad a la DNasa I.

Para determinar si la sensibilidad preferencial del gen SUC2 en estado desreprimido a la DNasa I residía en todo el fragmento EcoRI/EcoRI o se localizaba preferentemente en alguna zona dentro de él, se realizó un experimento idéntico

al anterior pero utilizando la nucleasa de restricción HindIII, la cual divide al fragmento anterior en tres zonas que corresponden aproximadamente a los flancos 5' y 3', y a la zona transcribible del gen SUC2 (ver fig. 1). Por otro lado puesto que este mismo enzima produce un fragmento de 1.1 kb que contiene el gen ura3 (Parent et al., 1985), podía utilizarse el mismo filtro rehibridado para normalizar las intensidades de las bandas de acuerdo con lo expuesto en el apartado II.1.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10. Como puede observarse los flancos 5' y 3' del gen SUC2 no tienen especial sensibilidad a la DNasa I, en relación a la sensibilidad del gen ura3, y esta sensibilidad no varía en absoluto cuando el gen cambia de estado reprimido a desreprimido. Sin embargo el fragmento de 2.1 kb que contiene la zona transcribible del gen SUC2, que en estado reprimido se comporta igual que los flancos, se hace altamente sensible a la DNasa I en el estado desreprimido. Estos resultados demuestran que la sensibilidad aumentada del gen SUC2 durante la desrepresión se debe a un aumento de la sensibilidad de la región transcribible del gen, pero no hay cambio alguno en los flancos de éste.

Resultados similares, indicando que la zona transcribible del gen es más sensible a la DNasa I que sus flancos, se han obtenido para otros genes (Weintraub et al., 1981; Stadler et al., 1980), aunque esta característica no es común a todos los genes estudiados (Bellard et al.,

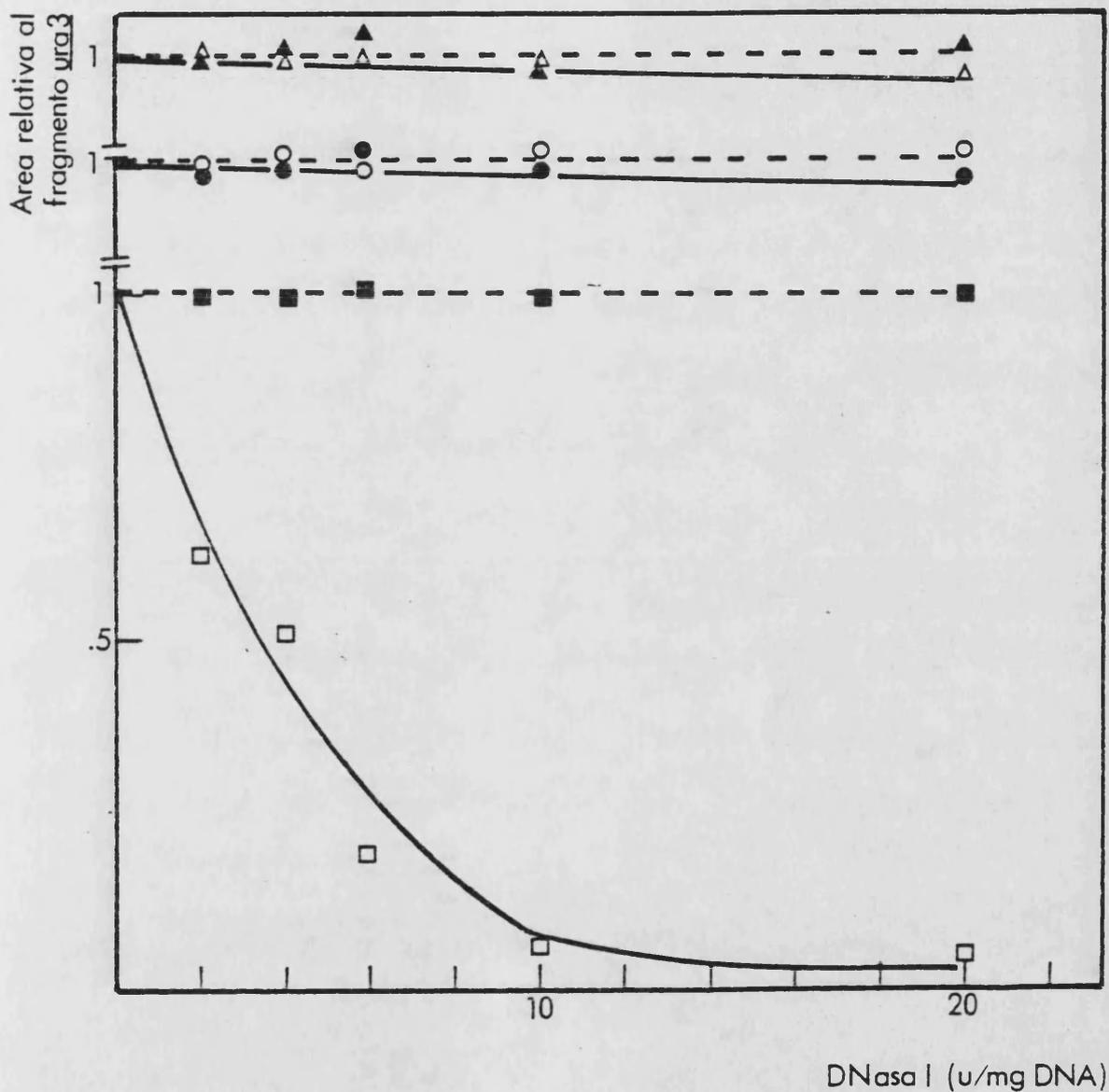


Figura 10.- Sensibilidad de las distintas regiones del gen *SUC2* a la DNasa I.

Se representa la desaparición de cada fragmento de restricción, en relación a la desaparición del fragmento de restricción *EcoRI/EcoRI* del gen *ura3*, en función de las unidades de DNasa I empleadas en la digestión. Círculos: flanco 5' del gen, triángulos: flanco 3' del gen, cuadrados: región transcribible. Símbolos llenos y línea a trazos: gen en estado reprimido, símbolos vacíos y línea continua: gen en estado activo.

1980).

Se puede concluir que la cromatina del gen SUC2 experimenta un cambio estructural durante su transcripción que la hace muy sensible a la DNasa I y que este cambio, que probablemente tiene relación con la lectura del gen por la RNA polimerasa, se limita a la zona del gen que se transcribe.

II.4. Sensibilidad a la MNasa.

Para investigar la sensibilidad del gen y sus flancos a la MNasa se realizó un experimento idéntico al descrito en el apartado II.3 pero sustituyendo la DNasa I por MNasa.

Como puede observarse en la figura 11 se aprecian diferencias en la sensibilidad a la MNasa entre los estados reprimido y desreprimido del gen. En el estado reprimido, tanto el gen como su flanco 5' se digieren con cinéticas similares a la del fragmento ura3 de referencia aunque ligeramente más deprisa. El flanco 3', sin embargo, muestra una cinética diferente a la del fragmento ura3, lo cual da lugar a una curva en la representación gráfica. La interpretación de esta curva no es sencilla pero parece indicar que el flanco 3' del gen es inicialmente más resistente a la acción de la MNasa que el gen ura3 y las otras zonas del gen SUC2. Este hecho podría estar relacionado con la estructura singular de la cromatina de esta zona (veáse apartado V.2).

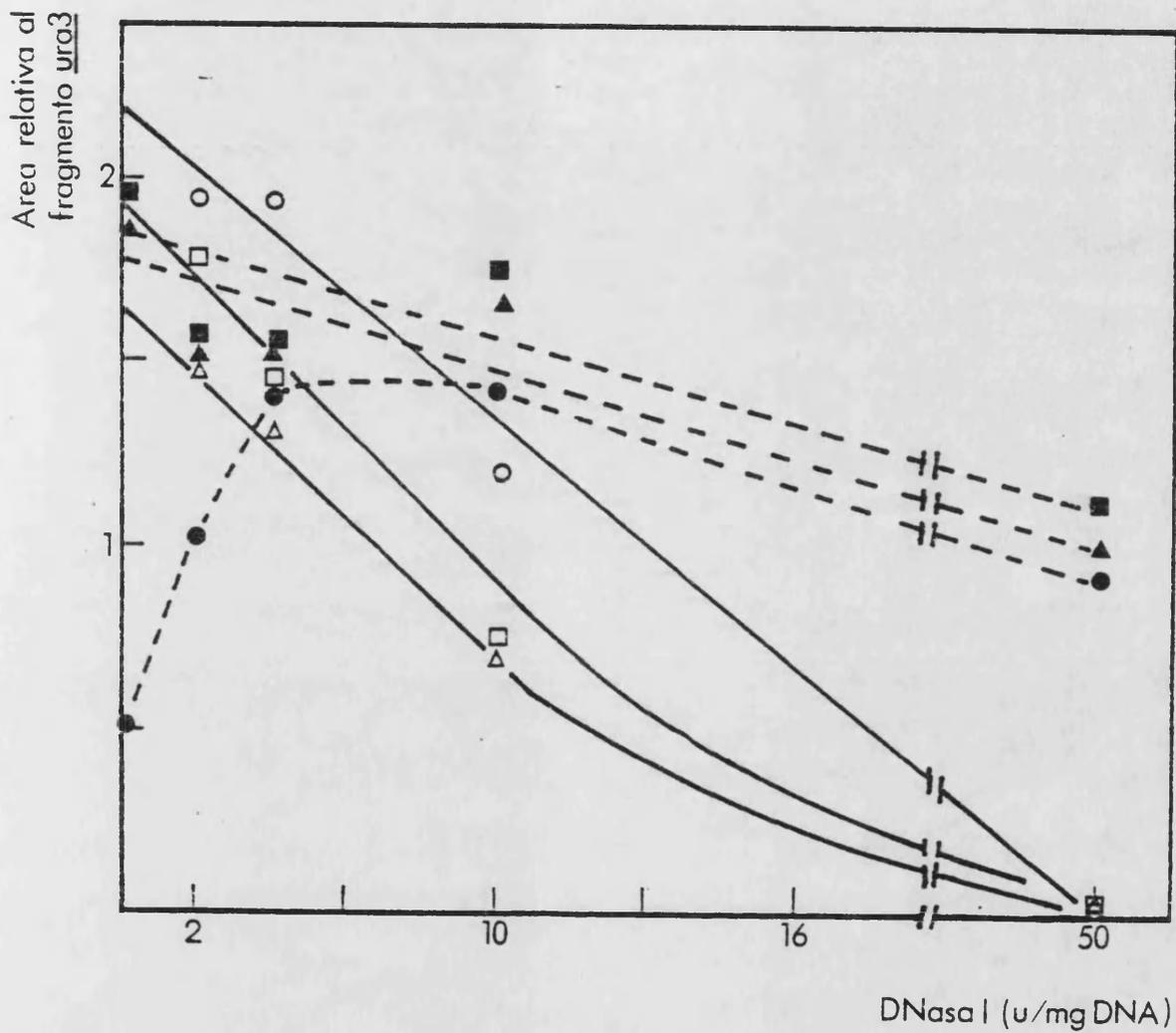


Figura 11.- Sensibilidad de las distintas regiones del gen SUC2 a la MNasa.
Las condiciones y símbolos son los mismos de la figura 10.

En el estado activo todos los fragmentos se digieren más rápidamente que en el estado inactivo, y en este caso las cinéticas de los distintos fragmentos son similares entre sí. Este resultado indica que la activación del gen SUC2 produce algún cambio estructural en la cromatina de este gen que lo hace más sensible a la MNasa. En este caso, a diferencia de la DNasa I, el cambio se extiende a toda la zona del gen y sus flancos y no es tan pronunciado como con la DNasa I.

La sensibilidad del flanco 5' y de la zona transcribible son muy similares, lo cual parece contradictorio con los resultados del apartado IV.3, en el que el flanco 5' resulta más sensible a la MNasa que la región transcribible. Sin embargo hay que tener en cuenta que estas dos experiencias tienen distinto fundamento. En la experiencia del apartado IV.3 se mide el promedio de tamaño de los fragmentos producidos por la MNasa, mientras que en la experiencia de desaparición de la banda se mide la cinética de producción del primer corte doble, por lo tanto ambos parámetros no tienen por qué ser idénticos.

II.5. Sensibilidad a nucleasas de restricción.

Diversos autores han demostrado que el DNA organizado en forma de cromatina es accesible a endonucleasas de restricción (Lipchitz y Axel, 1976; Workman y Langmore, 1985), y en algunos casos se ha demostrado que existe una

correlación directa entre sensibilidad a la nucleasa de restricción y estado transcripcional del gen (Ferl, 1985; Liberator y Lingrel, 1984).

Para comprobar la accesibilidad del gen SUC2 a la digestión con nucleasas de restricción, se digirió cromatina de levadura con un exceso de HindIII durante 10 min. El DNA se purificó y se digirió a su vez con KpnI, se sometió a electroforesis, se transfirió a papel de nylon y se hibridó con la sonda XK. En la posterior autorradiografía aparecieron 3 bandas (fig. 12). Los tamaños de las dos más pequeñas se correspondían con los de las esperables por cortes en los sitios de restricción HindIII a -27/+11 o -1100. La aparición de estas bandas demuestra que la cromatina en estos sitios es accesible a las nucleasas de restricción. La banda de mayor tamaño debe corresponder a un punto de restricción HindIII situado en una zona bastante anterior al gen. El hecho de que aparezcan las tres bandas simultáneamente demuestra que los tres sitios no han sido totalmente digeridos por el enzima de restricción pues en ese caso solo sería visible la banda de menor tamaño. De hecho para tres sitios con la misma tasa de digestión cabe esperar mayor intensidad de la banda cuanto más pequeña sea -más cercano el punto de corte al punto KpnI-. Esto solo ocurre entre la banda de menor tamaño y la de tamaño intermedio. En el otro par comparable la banda de mayor tamaño aparece más intensa que la de tamaño intermedio, lo cual lleva a la conclusión de que el punto HindIII situado a

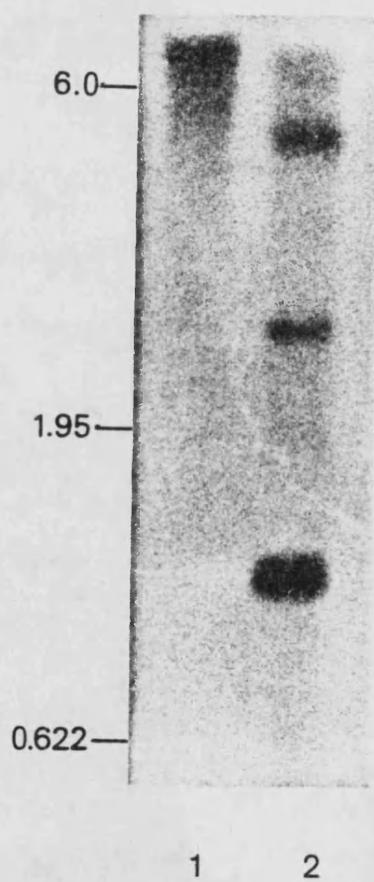


Figura 12.- Sensibilidad de varios puntos de corte a la nucleasa HindIII en cromatina.

1) Testigo no digerido con HindIII, 2) muestra digerida 10 min con 10 u/mg DNA de enzima. En el margen se indican las posiciones de los patrones de tamaño de DNA, en kb.

-1100 es menos accesible que el situado a varias kb del origen de transcripción, probablemente debido a diferencias en la estructura de la cromatina entre ambas zonas. No se puede establecer ninguna relación entre las intensidades relativas de los sitios a -27/+11 y -1100 pues sería necesario en este caso un estudio cinético para poder compararlos.

Este experimento se llevó a cabo tanto en condiciones de represión como de desrepresión del gen SUC2, pero no se observaron diferencias entre ambos estados; por ello en la figura 12 sólo se muestra una de las dos experiencias.

III. LOCALIZACION DE ZONAS HIPERSENSIBLES A LA DNASA I EN EL GEN SUC2.

III.1. Consideraciones generales sobre el método del marcaje terminal indirecto.

En la figura 13 se esquematiza el método del marcaje terminal indirecto (Wu, 1980). El método es similar al descrito en el apartado II.1 pero con la salvedad de que la sonda utilizada es pequeña en relación al fragmento de restricción a estudiar y está situada en un extremo de él, es decir, el punto de corte del enzima de restricción de un extremo de la sonda es el mismo que el de un extremo del fragmento. Utilizando este método se pueden producir dos

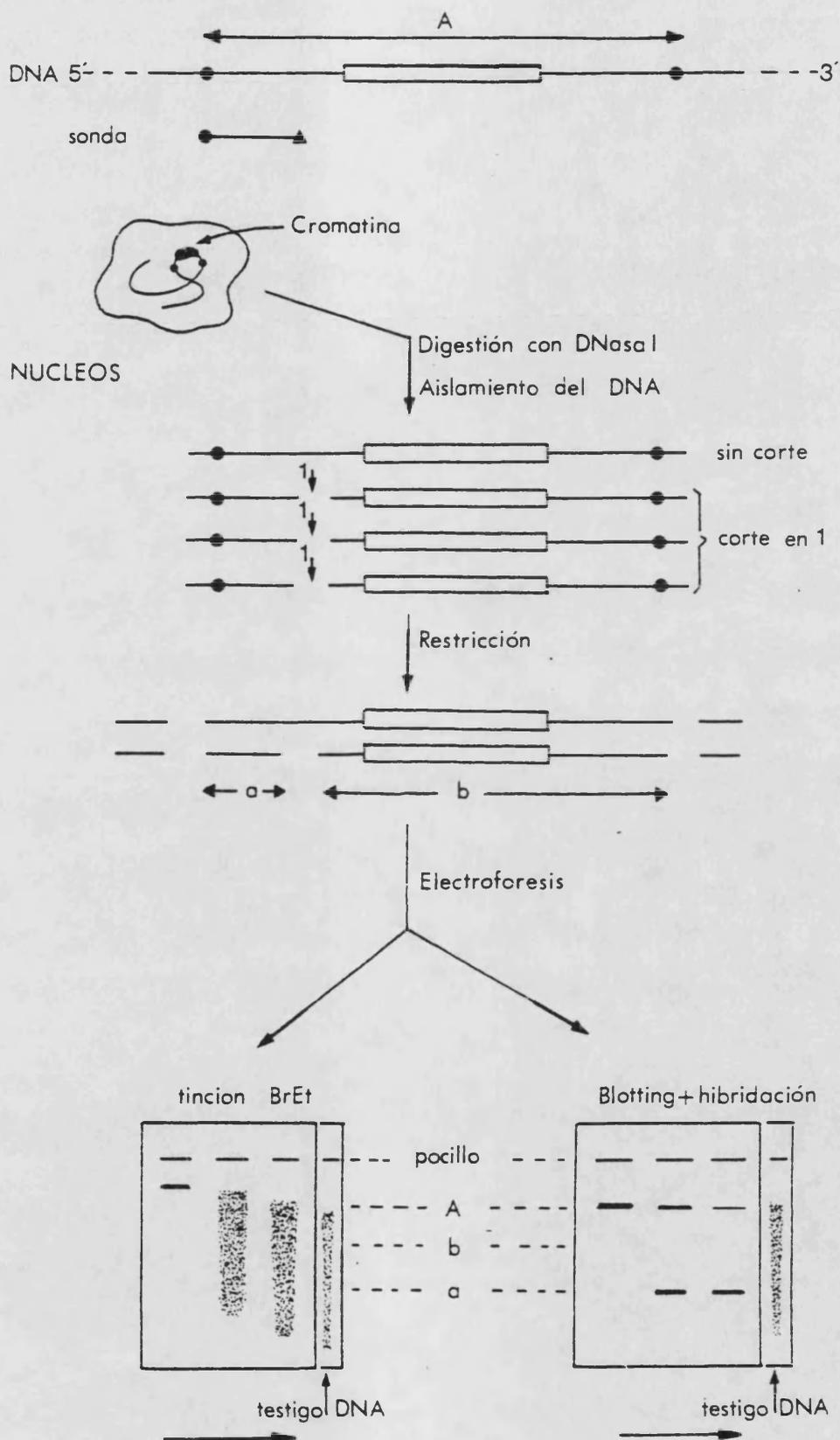


Figura 13- Método del marcaje terminal indirecto para la localización de sitios hipersensibles a la DNasa I.

tipos de resultados. Si el fragmento de restricción es degradado uniformemente por la DNasa I, es decir no existe ningún punto de corte preferente dentro del fragmento, aparecerá una mancha continua desde la banda que corresponde al fragmento hacia abajo. Pero si existe algún punto de corte preferente (sitio o zona hipersensible) aparecerá una banda discreta, de mayor o menor anchura dependiendo de la anchura de la zona hipersensible. Como la sonda sólo es capaz de hibridar con las secuencias situadas en el extremo del fragmento de restricción, de las dos bandas posibles producidas por un corte preferente dentro del fragmento, sólo una, la situada del lado de la sonda, será detectable. El tamaño de esta banda se puede calcular utilizando patrones de tamaño conocido incluidos en el mismo gel. Puesto que conocemos uno de los puntos de corte que han dado lugar a la banda, el producido por el enzima de restricción, y el tamaño del fragmento, podemos calcular la situación del segundo punto de corte, el producido por la DNasa I.

En este método pueden producirse dos tipos de artefactos. El primero se debe a la especificidad de secuencia de la DNasa I. En el caso de que la DNasa I digiriera el DNA en la cromatina en función de su secuencia y no de su accesibilidad en la cromatina, los resultados obtenidos no darían información sobre la estructura de la cromatina. Este primer problema no es muy grave con la DNasa I, pues este enzima apenas tiene especificidad de secuencia (Reeves, 1984). En cualquier caso se puede eliminar este

artefacto utilizando controles de DNA desnudo digerido con DNasa I para descartar aquellas bandas que pudieran deberse a la especificidad de secuencia de la DNasa I.

El segundo artefacto puede aparecer si la digestión es demasiado extensa. En este caso se producen fragmentos por dos puntos de corte simultáneos de la DNasa I. Si uno de estos puntos está situado dentro de la zona que hibrida con la sonda, dará lugar a una banda en la autorradiografía que, por no proceder de un corte con el enzima de restricción, no da información útil sobre la posición de los puntos de corte. Este artefacto puede evitarse utilizando sondas de pocas decenas de pares de bases para que resulte improbable la producción de un corte de la DNasa I dentro de la zona de la sonda, si se hacen digestiones muy suaves para que estadísticamente solo se produzca un punto de corte doble por molécula, o utilizando varias sondas y puntos de corte de restricción para que los resultados obtenidos sean corroborables entre sí. En este trabajo se han tomado las tres precauciones simultáneamente.

III.2. Preparación de testigos de DNA desnudo.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, para discriminar entre las bandas producidas por corte de la DNasa I en zonas especialmente sensibles a esta nucleasa en la cromatina y las producidas por reconocimiento de secuencias específicas del DNA, es necesario utilizar

testigos de DNA desnudo digerido con DNasa I y los mismos enzimas de restricción. Con el objeto de comprobar si podía utilizarse para este fin un plásmido que contuviera el gen SUC2 en lugar de DNA genómico, con lo cual se simplificaba el proceso, se realizó la siguiente experiencia. Se digirió plásmido pSUC243 con diferentes concentraciones de DNasa I. La digestión se paró por el procedimiento habitual y las muestras se extrajeron con fenol para eliminar la DNasa I. El fenol se eliminó mediante extracción con cloroformo y el DNA se precipitó con alcohol. A continuación las muestras se disolvieron en el tampón apropiado y se digirieron con EcoRI. Otra serie de muestras se trataron de forma inversa, es decir, se digirieron con EcoRI, se precipitaron, se redisolviéron, se digirieron con las mismas concentraciones de DNasa I utilizadas anteriormente y se extrajeron con fenol. El propósito de esta doble serie de digestiones era comprobar si el hecho de que el plásmido estuviera en estado nativo, es decir superenrollado, podía afectar a la especificidad de la DNasa I sobre la secuencia del DNA. En caso de que así fuera se observarían diferencias entre las muestras digeridas primero con DNasa I (plásmido superenrollado) y las digeridas primero con EcoRI, que da lugar a fragmentos lineales equivalentes a la estructura del DNA genómico.

Como se observa en la figura 14 en ninguno de los dos casos se detectó especificidad de secuencia de la DNasa I, pues no aparece ninguna banda discreta, sino un fondo

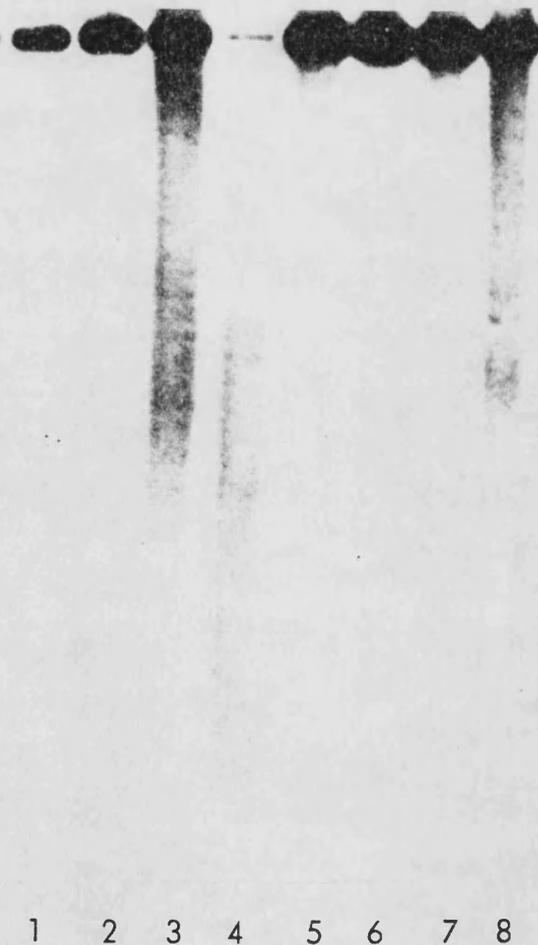


Figura 14- Digestión del plásmido pSUC243 con DNasa I.

Las muestras se digirieron con 0.04 (carreras 1 y 5), 0.07 (carreras 2 y 6), 0.1 (carreras 3 y 7), o 0.2 u/mg DNA (carreras 4 y 8) durante 10 min. La digestión con *EcoRI* fue anterior (carreras 1-4) o posterior (carreras 5-8) a la de la DNasa I. La electroforesis se realizó en agarosa 1%. La sonda utilizada para la hibridación fue la HH2.

continuo, cuya extensión depende de la tasa de digestión. Este resultado demuestra que es posible utilizar un plásmido que contenga el gen SUC2 como testigo de DNA desnudo, pues no aparecen alteraciones de la especificidad de la DNasa I debidas a la estructura terciaria del DNA en el plásmido.

Las variaciones de la tasa de digestión entre las dos experiencias pueden deberse al hecho de que durante las extracciones con fenol se pierde parte de la muestra, por lo que en el caso de la digestión previa con EcoRI la digestión posterior con DNasa I se hace sobre una cantidad de DNA inferior, es decir con una relación DNasa I/DNA superior a la de la experiencia paralela.

Un experimento similar se llevó a cabo con MNasa. En este caso (fig. 15) si que se observó aparición de bandas discretas, producto de la especificidad de secuencia de esta nucleasa. Esta especificidad había sido ya descrita por otros autores (revisado en Reeves, 1984). La MNasa no cambia, sin embargo, su especificidad de secuencia en función de la estructura terciaria del DNA puesto que el mismo esquema de bandas se obtuvo en los dos tipos de digestiones realizadas. Este resultado había sido ya descrito por otros autores (Nedospasov y Georgiev, 1980) y demuestra que se puede usar un plásmido que contenga el gen SUC2 como testigo de DNA desnudo en las digestiones de cromatina con MNasa (apartado V).

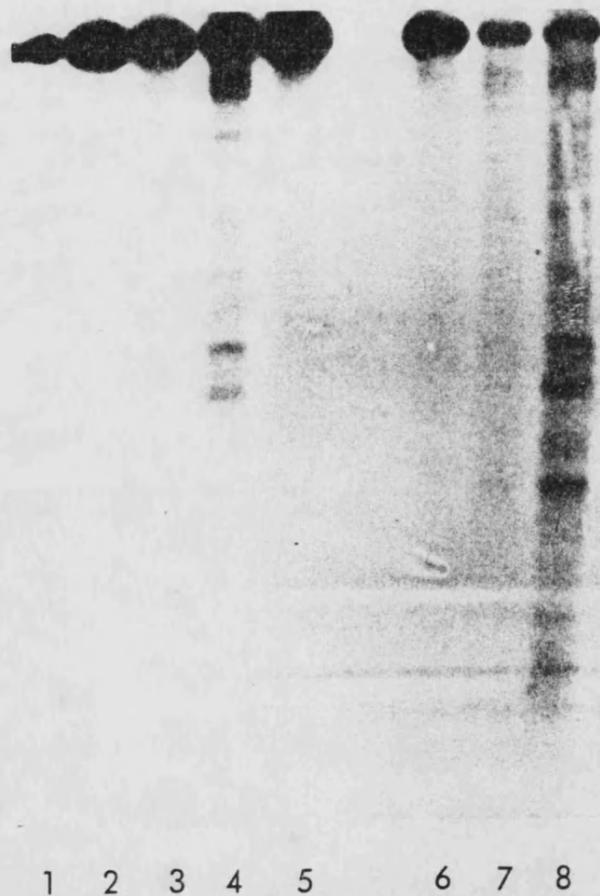


Figura 15.- Digestión del plásmido pSUC243 con MNasa.

Las muestras se digirieron con 0.013 (carreras 1 y 5), 0.067 (carreras 2 y 6), 0.67 (carreras 3 y 7), o 3.3 μ /mg DNA (carreras 4 y 8) durante 10 min. La digestión con *EcoRI* fue anterior (carreras 5-8) o posterior (carreras 1-4) a la de la MNasa. La electroforesis se realizó en agarosa 1%. La sonda utilizada en la hibridación fue la HH2.

III.3. Sitios hipersensibles en el gen SUC2.

La aplicación de la técnica del marcaje terminal indirecto al gen SUC2 ha permitido encontrar 3 zonas hipersensibles a la DNasa I cercanas al gen.

La estrategia de localización de sitios hipersensibles se muestra en la figura 16. Se han utilizado tres sondas diferentes y 4 puntos de restricción distintos con el objeto de cubrir toda la zona del gen SUC2 y sus flancos, y de que cada sitio hipersensible quedara determinado por, al menos, dos estrategias distintas.

En la figura 17 se muestra el análisis realizado con el punto de corte EcoRI y la sonda EH. Aparecen dos bandas de 3.7 y 2.5 kb, aunque la fiabilidad de estos tamaños es limitada debido a la baja resolución de la placa para ese tamaño de fragmento. La banda de 2.5 kb indica, de acuerdo con lo expuesto en el apartado III.1, la presencia de un punto hipersensible a $\approx +1700$ pb, mientras que la banda de 3.7 kb no puede utilizarse para situar un punto hipersensible pues, dado su tamaño, podría corresponder tanto a un punto de corte a 3.7 kb desde el punto de restricción EcoRI a la izquierda del gen (en la posición +2900) como a uno situado a 3.7 kb desde el punto de restricción EcoRI situado a la derecha del gen (en la posición -600).

Para confirmar y, en su caso, mejorar el posicionamiento de los sitios hipersensibles se utilizaron

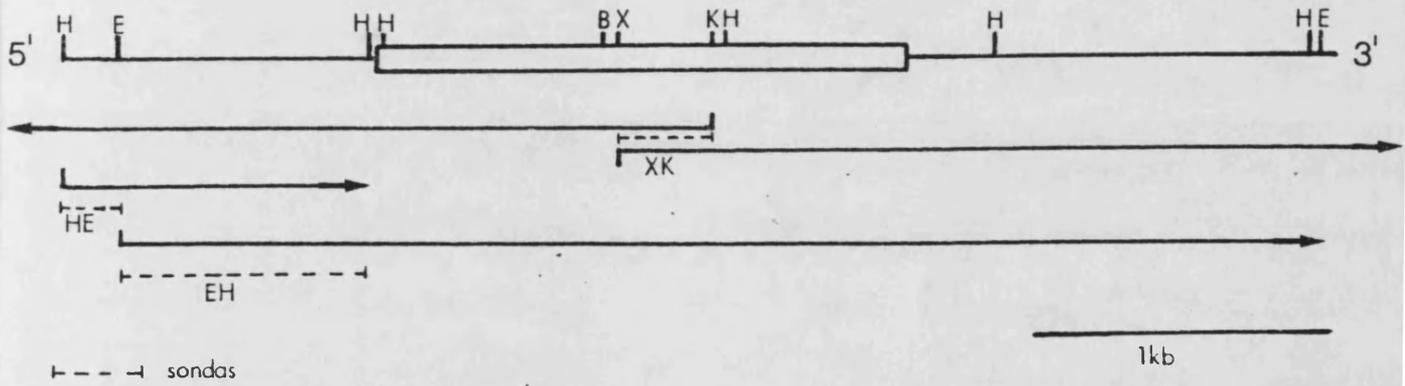


Figura 16.- Estrategia de localización de sitios hipersensibles a la DNasa I, mediante marcaje terminal indirecto, en el gen SUC2.

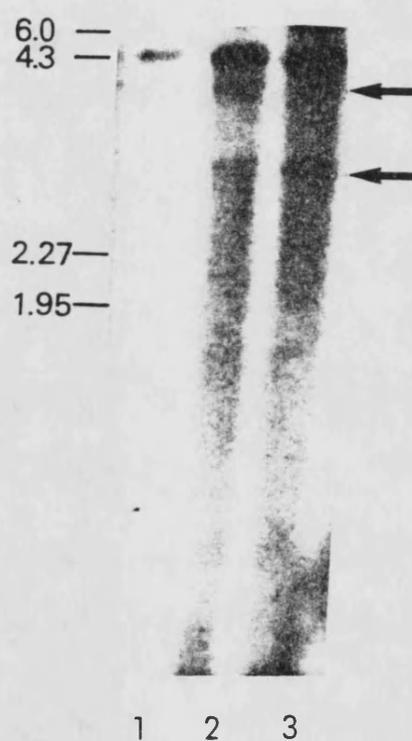


Figura 17.- Marcaje terminal indirecto de sitios hipersensibles a la DNasa I, usando corte de restricción *EcoRI* y la sonda EH.

La digestión se realizó con 2 μ /mg DNA durante 0 (carrera 1) o 10 min (carreras 2 y 3). Las muestras corresponden al estado activo (carreras 1 y 2) o reprimido (carrera 3) del gen. Los tamaños de los patrones de DNA, en kb, y sus movilidades se indican a la izquierda de la foto y corresponden a diversos fragmentos de restricción del plásmido pR58. La electroforesis se realizó en agarosa 1%.

otras tres estrategias de localización, cuya característica común fue la utilización de sondas muy pequeñas, para evitar indeterminaciones en el punto de corte de la DNasa I, y puntos de corte de restricción relativamente cercanos a los sitios que inicialmente aparecían como hipersensibles a la DNasa I.

En la figura 18 se muestra el análisis realizado con restricción HindIII y la sonda HE. Aparece una zona hipersensible bastante ancha, cuyo centro tiene un tamaño de 690 pb, y dos zonas menos intensas y muy difusas con centros de 450 y 320 pb. La situación de estas zonas en el gen es a -450, -690 y -815 respectivamente. El análisis de esta zona se completó con la restricción KpnI y la utilización de la sonda XK (fig. 19). Este análisis dió como resultado cuatro bandas de 3570, 2500, 1570 y 1180 pb, que corresponden a sitios a -2410, -1350, -410 y -25 respectivamente. Los dos más alejados están situados en zonas muy distantes del gen SUC2 y, por lo tanto, pueden corresponder a algún otro gen o zona de la cromatina de función desconocida situada a la izquierda del gen SUC2. Sin embargo no puede descartarse completamente la relación de estos sitios con el gen SUC2 puesto que en otros organismos se han encontrado sitios hipersensibles a varias kb de distancia de un gen (Fritton et al., 1983). Dado el pequeño tamaño del genoma de S. cerevisiae esta hipótesis es poco probable. El sitio a -410 se corresponde, dentro del error experimental, con el situado a -450 del análisis con la sonda HE. Se puede

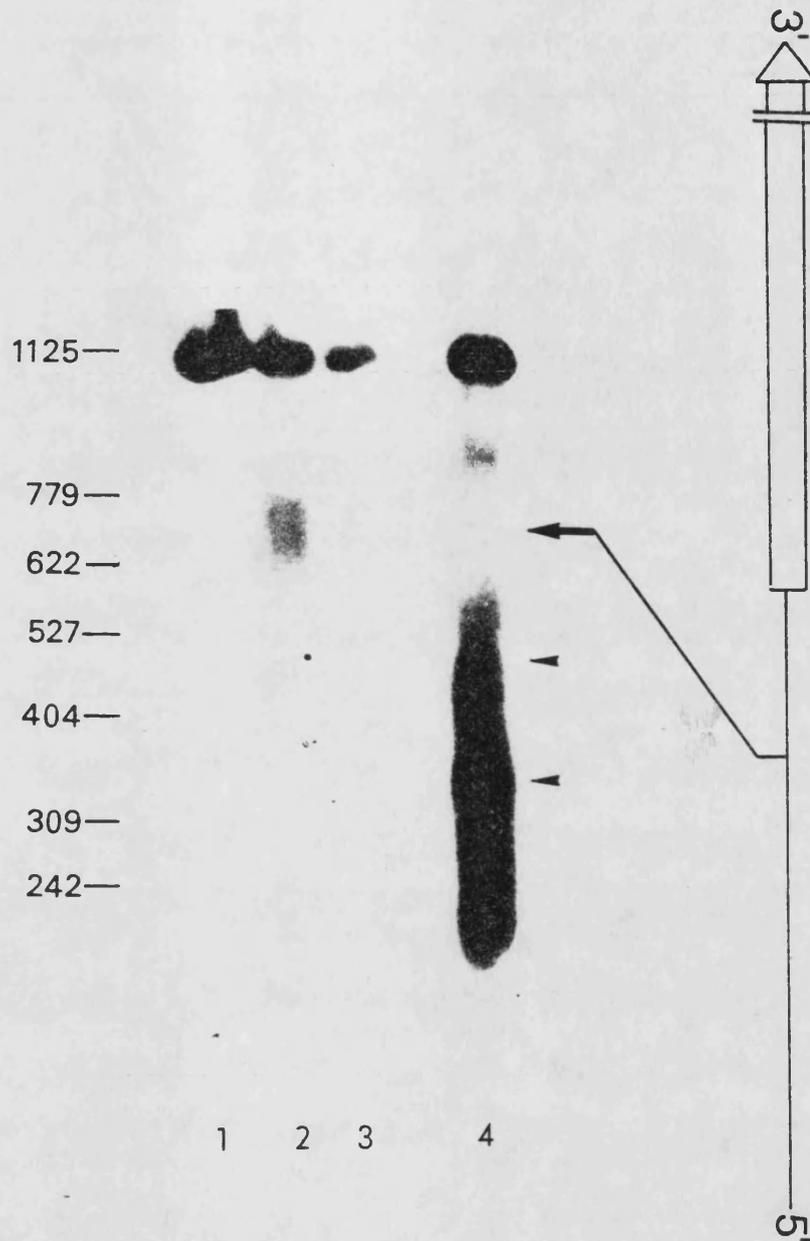


Figura 18.- Marcaje terminal indirecto de los sitios hipersensibles a la DNasa I, usando el corte de restricción *Hind*III y la sonda HE.

Las flechas señalan los sitios hipersensibles detectados. La digestión se realizó con 0 (carrera 1), 2 (carrera 2) o 4 μ g DNA (carrera 3) durante 5 min. La carrera 4 corresponde a un testigo de pRR59 digerido con DNasa I y procesado de la misma forma. Los tamaños de los patrones de DNA, en pb, y sus movilidades se indican a la izquierda de la foto y corresponden a fragmentos de restricción del plásmido pBR322. La electroforesis se realizó en agarosa 1.8%. Se representa el gen *SUC2* esquemáticamente a la derecha de la foto.

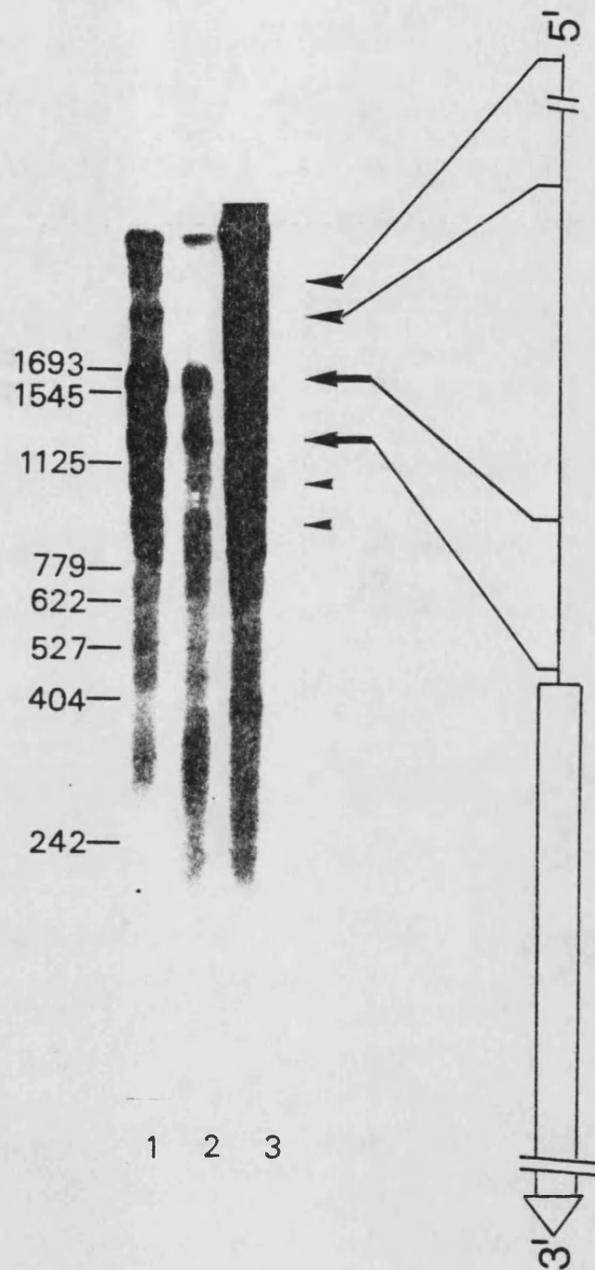


Figura 19.—Marcaje terminal indirecto de sitios hipersensibles a la DNasa I, usando el corte de restricción *Kpn*I y la sonda XK.

Las flechas señalan los sitios hipersensibles detectados. Los dos de menor tamaño e intensidad corresponden a cortes de la DNasa I en los espaciadores de los nucleosomas adyacentes al sitio hipersensible a -410. La digestión se realizó con 2 (carrera 1) o 4 u/mg DNA (carrera 2) durante 5 min. La carrera 3 corresponde a un testigo de pRB58 digerido con DNasa I y procesado de la misma forma. Los patrones de tamaño de DNA, en pb, y sus movilidades se indican a la izquierda de la foto y corresponden a fragmentos de restricción del plásmido pBR322. La electroforesis se realizó en agarosa 1.8%. Se representa esquemáticamente el gen SUC2 a la derecha de la foto.

concluir, pues, que existe un punto hipersensible relativamente ancho situado aproximadamente a -430, lo cual aclara la disyuntiva creada por el uso de la sonda EH sobre si este punto hipersensible estaba situado a la derecha o a la izquierda del gen, mientras que el situado a -25 pb probablemente no fue detectado con la sonda HE por estar situado sobre el punto de corte de restricción HindIII a -27. Las zonas situadas a -690 y -815 no pueden considerarse como sitios hipersensibles a la DNasa I dada su baja intensidad. Probablemente por este motivo no son detectables cuando se utiliza para el análisis un punto de restricción situado más alejado, como el KpnI. Estos sitios posiblemente aparecen por el ataque preferente de la DNasa I en dos DNA espaciadores situados en estas zonas (ver apartado V.2). Una cierta preferencia de la DNasa I por el DNA espaciador había sido ya descrita previamente (Lohr et al., 1977a; Worcel et al., 1983).

Para la localización precisa del sitio hipersensible situado a la derecha del gen se utilizó una estrategia de localización con un corte XbaI y la sonda XK. En este análisis (fig. 20) aparecen dos bandas. Una es muy intensa y ancha, con un tamaño medio de 1100 pb, lo cual corresponde a la posición +1930. Este sitio es bastante más intenso que los localizados en el flanco 5' del gen y se corresponde con el que había sido previamente detectado, aunque no posicionado con exactitud, con la sonda EH. La segunda banda detectada es también muy intensa pero está situada muy

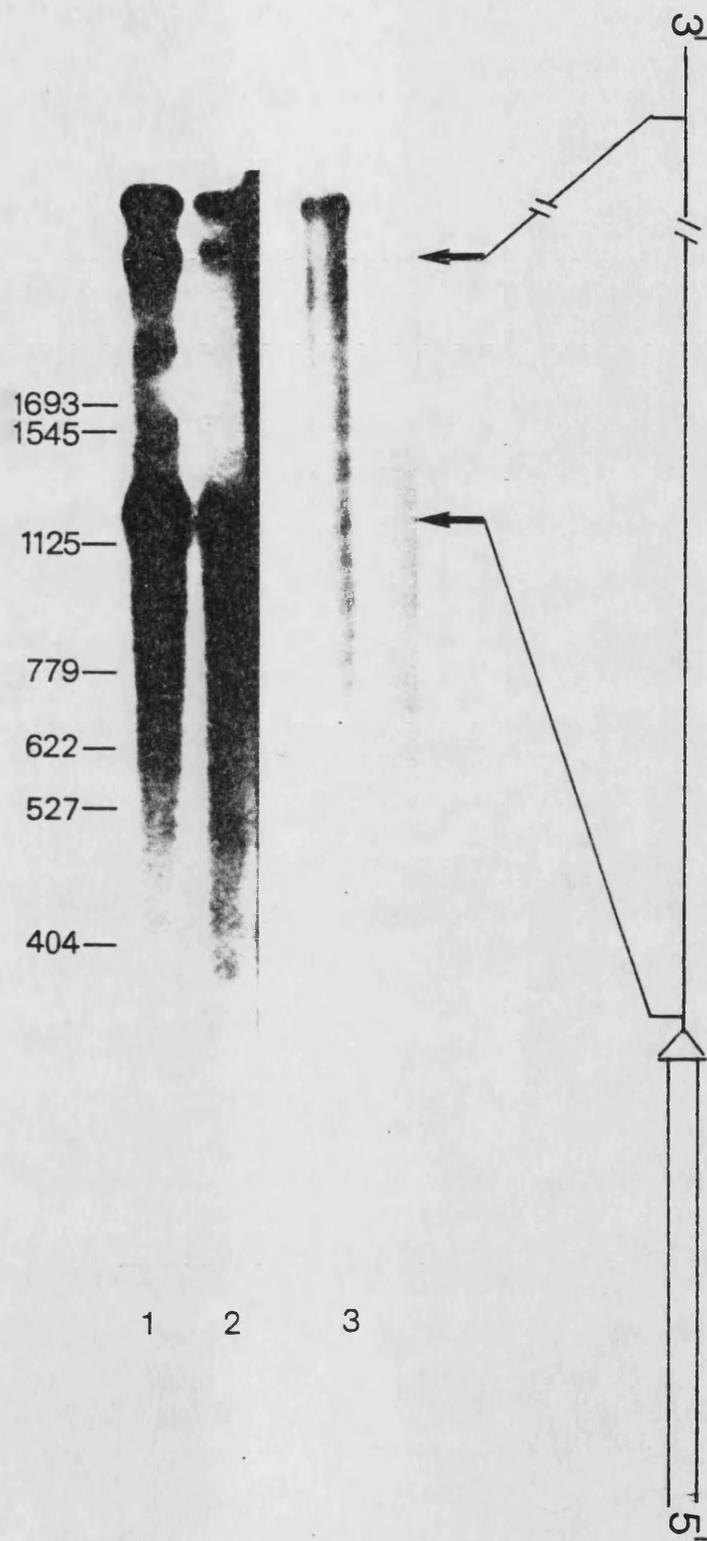


Figura 20.- Marcaje terminal indirecto de sitios hipersensibles a la DNasa I, usando el corte de restricción *Xba*I y la sonda XK.

Todos las condiciones y símbolos son idénticos a los de la figura 19.

alejada del gen, a varias kb de distancia, por lo que podría corresponder a algún otro gen o zona de la cromatina adyacente al gen SUC2.

Los resultados de posicionamiento de sitios hipersensibles en el gen SUC2 se resumen en la tabla I.

Tabla I. Valores promedio obtenidos para el posicionamiento de sitios hipersensibles en el gen SUC2.

Sonda/Sitio rest.	Tamaño de la banda	Posición
HE/ <u>H</u> indIII	685±8 ^a	-453±8
XK/ <u>K</u> pnI	3571±11	-2412±11
	2507±8	-1348±8
	1569±10	-410±10
	1183±4	-24±4
XK/ <u>X</u> baI	>8000	N.D.
	1099±4	+1928±4

^amedia de tres determinaciones, con su error estándar.

N.D., no determinado.

La presencia de sitios hipersensibles a la DNasa I en el flanco 5' del gen SUC2 está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores para genes de levadura u otros

eucariontes (revisado en Lowenhaupt *et al.*, 1982). La posición de los dos sitios hipersensibles de esta zona ha sido fijada en este trabajo con bastante precisión. El sitio hipersensible situado aproximadamente a -430 ha sido localizado con tres experiencias de posicionamiento diferentes y los resultados de las dos más precisas indican que el error en su posición no es mayor de 20 pb. Debe tenerse en cuenta que la banda que corresponde a este sitio es muy ancha, sobre todo cuando se utiliza para localizarlo un sitio de restricción relativamente cercano (HindIII), lo cual indica que en realidad corresponde a una zona hipersensible de unos 100-150 pb de anchura. Este resultado es concordante con los encontrados para otros sitios hipersensibles estudiados con detalle (McGhee *et al.*, 1983). Este sitio hipersensible coincide con la posición de una región de función reguladora y activadora de la síntesis del RNAm de 1.9 kb (Sarokin y Carlson, 1984), lo cual hace suponer que existe una relación entre ambos hechos, pues probablemente esta región es blanco de unión de proteínas reguladoras de la actividad del gen SUC2. alguna de estas proteínas podría ser el producto del gen SNE1, que resulta indispensable para la desrepresión del RNAm de 1.9 kb (Sarokin y Carlson, 1984). La presencia de estas proteínas podría alterar la estructura normal de la cromatina haciendo esta región más sensible al ataque de la DNasa I, como sucede en otros genes estudiados (revisado en Wasylyk, 1985). La presencia de sitios hipersensibles a la DNasa I

coincidentes con regiones reguladoras había sido ya descrita en otros organismos (Scott y Wingmore, 1978) y en el locus gal de levadura (Struhl, 1984; Lohr, 1984; Proffit, 1985).

De forma análoga la presencia de un sitio hipersensible en -25 puede estar relacionada con alguna alteración de la estructura de la cromatina de esta región. Este sitio está cercano a otra región reguladora de la actividad del gen SUC2, la caja TATA situada a -130 (Sarokin y Carlson, 1984). En este caso no hay coincidencia total entre la posición de la región reguladora y la de la zona hipersensible. Ello puede deberse a cierto error en el posicionamiento, puesto que se ha comprobado que en plásmidos de replicación autónoma que contienen el gen SUC2 este sitio hipersensible está algo más cercano a la caja TATA (Estruch, 1986); o bien puede ser debido a que en realidad la estructura alterada de la cromatina no esté situada exactamente sobre la posición de la caja TATA, sino en una región adyacente. En otros casos descritos de sitios hipersensibles relacionados con la caja TATA, el sitio hipersensible no coincide exactamente con ella (Wu, 1980). En levadura se habían descrito sitios hipersensibles a la DNasa I en esta zona en los genes ADR2 y ADH1 (Sledziewski y Young, 1982) aunque su posición se determinó con muy baja resolución por lo que no se pueden relacionar con la presencia de la caja TATA.

El tercer sitio hipersensible encontrado es, con mucho, el más llamativo. Este sitio ha sido detectado por dos estrategias diferentes y su posición se puede fijar

alrededor de +1930. Es, como en el caso del situado a -430 una banda bastante ancha por lo que puede pensarse también que tiene una amplitud de, al menos, 100 pb. Puesto que los dos RNAm producto del gen terminan alrededor de +1800 (Carlson y Botstein, 1982) esta zona hipersensible está situada inmediatamente después del final de la zona transcribible del gen. Cabe pensar por lo tanto que su presencia debe tener relación con la posible existencia de zonas implicadas en la terminación de la transcripción. La presencia de sitios hipersensibles en el flanco 3' de un gen había sido ya descrita en algunos casos (Fritton *et al.*, 1983; Yagi *et al.*, 1986), pero hasta el momento ninguno había sido situado con suficiente precisión para asegurar que tenía relación con el gen anterior a él y no con la posible presencia de otro gen posterior.

La relación de estos sitios hipersensibles con el posicionamiento de nucleosomas se discute en el apartado V.3.

III.4. Estudio con la nucleasa S1.

Algunos autores han descrito que los sitios hipersensibles a la DNasa I lo eran también a la nucleasa S1 (Larsen y Weintraub, 1982). Esta nucleasa reconoce específicamente DNA monocatenario o, por lo menos, con una estructura secundaria alterada. Por ello estos resultados se han interpretado como indicadores de que las zonas de DNA

hipersensibles a la DNasa I tienen una estructura distinta de la habitual forma B del DNA (Larsen y Weintraub, 1982). En otros casos se han encontrado resultados opuestos (McGhee et al., 1983).

Para comprobar si los sitios hipersensibles del gen SUC2 descritos en el apartado anterior eran sensibles a la nucleasa S1, se llevó a cabo una experiencia de localización idéntica a las descritas para la DNasa I (apartado III.1) pero usando en este caso la nucleasa S1.

Como se observa en la figura 21 la nucleasa S1 digiere uniformemente el DNA en la zona izquierda del gen SUC2 sin dar lugar a ninguna banda discreta. Esta experiencia demuestra que los sitios hipersensibles situados en la zona del promotor del gen, no contienen estructuras de DNA especialmente sensibles a la nucleasa S1. En la misma figura se observa estudio realizado en la mitad derecha del gen SUC2. En esta zona el sitio hipersensible a +1930 es muy poco sensible a la sensible a la S1, pero el situado a varias kb de distancia del final del gen, así como algunas otras zonas cercanas a él, sí que resultan sensibles a esta nucleasa. Este resultado demuestra que la estructura de los diversos sitios hipersensibles encontrados, y por lo tanto su posible función, es bastante diferente, y corrobora tanto la existencia de sitios hipersensibles a la DNasa I sensibles a la S1 (Larsen y Weintraub, 1982), como la de otros que no lo son (McGhee et al., 1983).

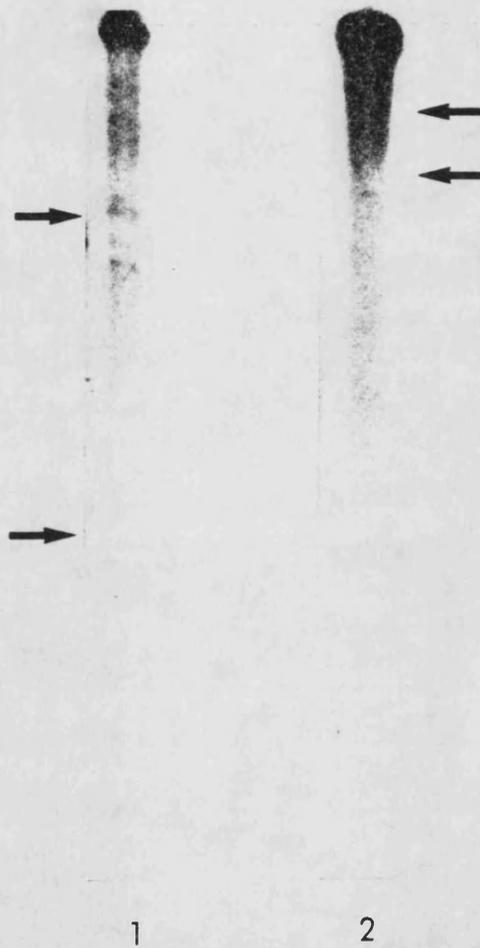


Figura 21.- Marcaje terminal indirecto de sitios hipersensibles a la nucleasa S1, usando restricción con *Kpn*I o *Xba*I y al sonda XK.

Las muestras procedían de células en estado de desrepresión del gen *SUC2* y se digirieron con 1 u/kg DNA durante 5 min. Carrera 1 corte con *Kpn*I, carrera 2 corte con *Xba*I. La electroforesis se realizó en agarosa 1%. Las flechas señalan las posiciones de los sitios hipersensibles a la DNasa I.

IV. ORGANIZACION NUCLEOSOMAL DEL GEN SUC2.

IV.1. Consideraciones generales sobre la metodología.

En la figura 22 se esquematiza el método empleado para el estudio de la organización nucleosomal del gen SUC2. Básicamente este método es equivalente al utilizado para la determinación de la sensibilidad del gen a nucleasas (apartado II.1). La diferencia fundamental radica en que el DNA, una vez aislado, no se ha digerido con una nucleasa de restricción. La selectividad en cuanto a la zona del gen a estudiar la da el uso de una sonda correspondiente a esa zona. En este caso por no haber puntos delimitados por el enzima de restricción existe una cierta interferencia de información procedente de secuencias adyacentes a la zona de estudio. Puesto que el método exige unas tasas de digestión mayores para que se produzcan fragmentos con dos cortes de MNasa, estos fragmentos pueden tener un extremo dentro de la zona de estudio y otro fuera, o los dos dentro. En ambos casos los fragmentos hibridarán con la sonda. Por este motivo el resultado obtenido da información sobre la estructura nucleosomal promediada de la zona correspondiente a la sonda, entrando dentro de este promedio cierta cantidad de información sobre la estructura nucleosomal adyacente a esta zona.

Mediante este método se ha determinado la presencia de

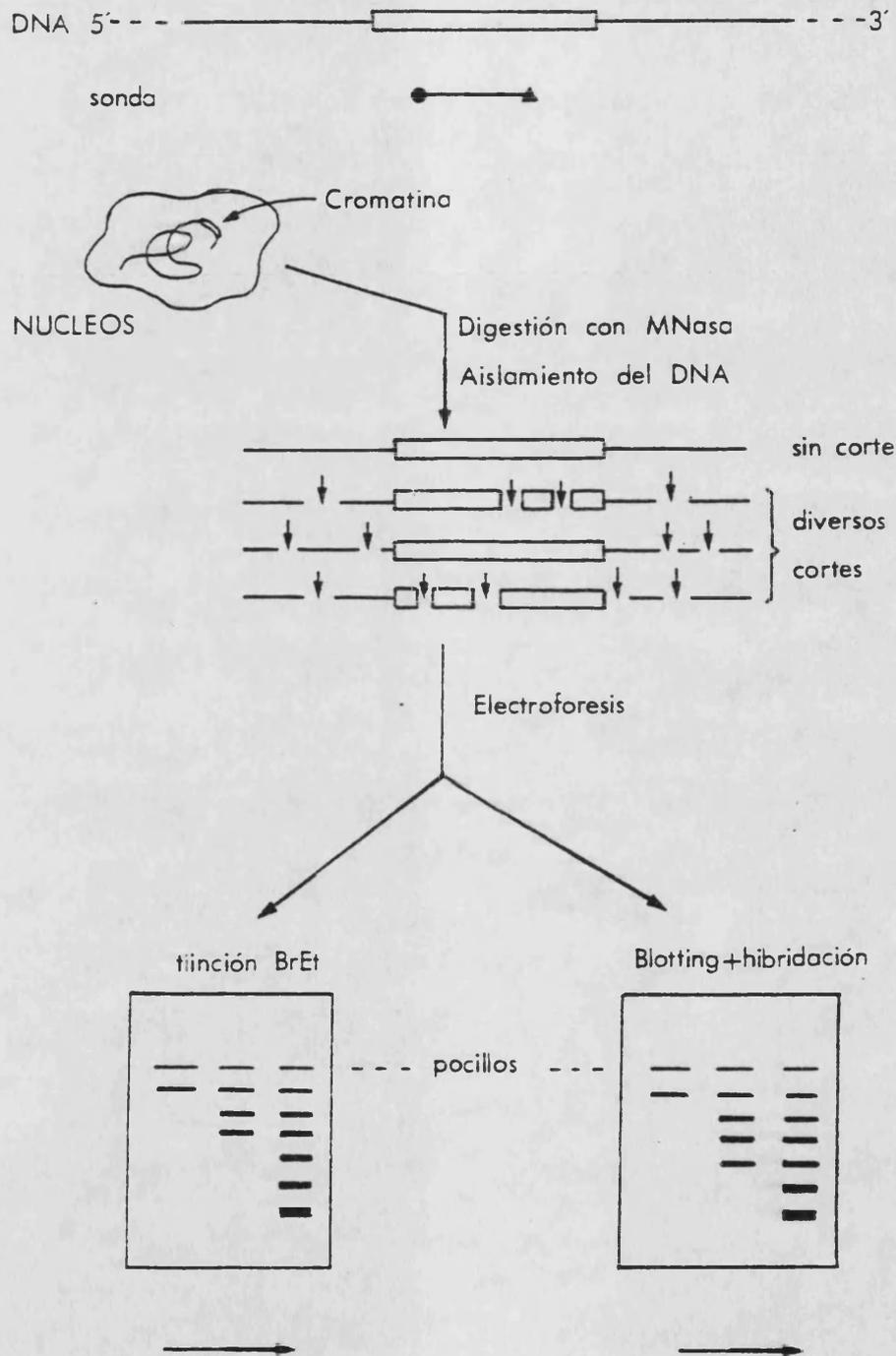


Figura 22.- Método para el análisis del espaciado nucleosomal en distintas regiones del gen.

nucleosomas en el gen SUC2 y el espaciado nucleosomal en cada zona del gen.

IV.2. Presencia de nucleosomas en el gen SUC2.

Para determinar la presencia de nucleosomas y el espaciado nucleosomal en toda la zona del gen se ha realizado una experiencia como la descrita en el apartado anterior utilizando la sonda EE que cubre toda la región del gen.

Como se observa en la figura 23, la cromatina del gen SUC2 se digiere con MNasa de la forma típica, es decir, da lugar a una serie de bandas regularmente espaciadas que corresponden a los diversos oligómeros de nucleosomas. Utilizando patrones de tamaño conocido incluidos en el mismo gel se han calculado los tamaños de estos oligómeros, y se han comparado con los tamaños de los oligómeros correspondientes del DNA total obtenidos a partir del mismo gel teñido con bromuro de etidio.

Para el cálculo del tamaño nucleosomal se han hallado las diferencias entre el tamaño de un oligómero y el siguiente -hasta el hexámero- y se han promediado los valores obtenidos (tabla II). Este método descrito originalmente por Noll (1976) permite el cálculo del espaciado nucleosomal sin utilizar un gran número de tasas de digestión distintas para poder extrapolar a tasa cero. Aunque la fiabilidad del método de Noll es inferior a la de

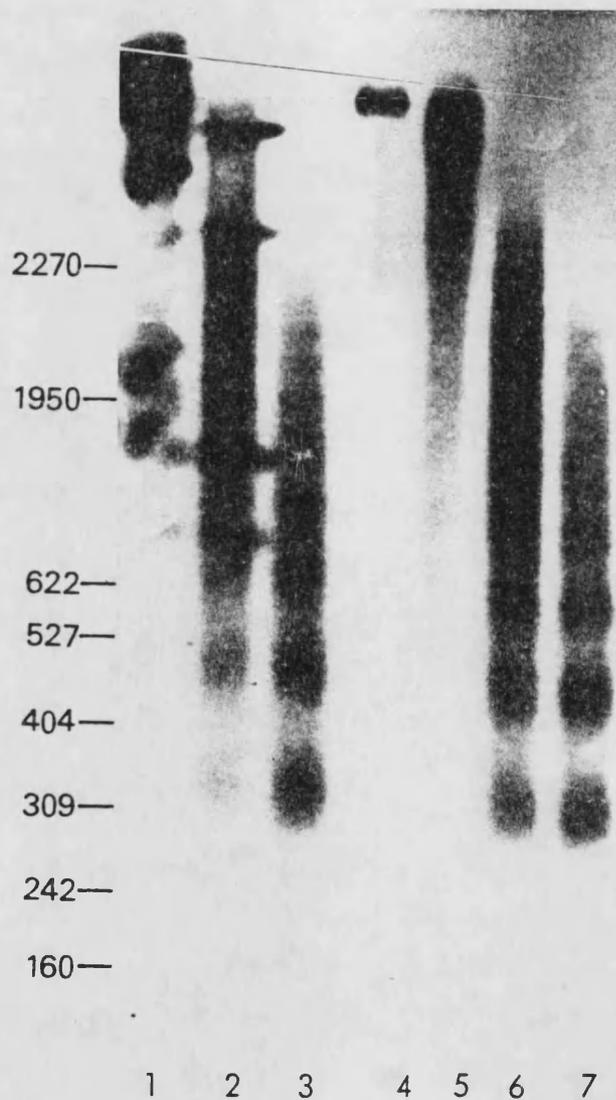


Figura 23.- Espaciado nucleosomal en el gen *SUC2*.

Las muestras de cromatina se digirieron con 300 u de MNasa/mg DNA durante 0 (carrera 4), 5 (carreras 1 y 5), 15 (carreras 2 y 6) o 30 min (carreras 3 y 7). Las muestras proceden de células en estado de desrepresión (carreras 1-3) o de represión (carreras 4-7) del gen *SUC2*. La electroforesis se realizó en agarosa 1.8% y la sonda utilizada para la hibridación fue la EE. Los tamaños, en pb, y las posiciones de los patrones de DNA utilizados se muestran a la izquierda y corresponden a fragmentos de restricción del plásmido pRB58 (fragmentos de 2270 y 1950 pb) y del pBR322 (resto).

los que emplean extrapolación, es suficiente para el propósito de este trabajo puesto que se comparan los resultados obtenidos con las mismas muestras de la misma electroforesis.

Tabla II. Comparación de los tamaños nucleosomales del gen SUC2 y del total de levadura.

	Tamaño nucleosomal (en pb)	
	Activo	Reprimido
<u>SUC2</u>	162±7 ^{ms}	156±2
Total	163±8	158±13

^{ms}promedio de diez valores y error estándar.

Como puede observarse en la tabla II no existen variaciones significativas en el tamaño nucleosomal entre el gen SUC2 y el valor promedio de levadura, o entre los estados activo y reprimido del gen. La coincidencia del valor obtenido para el tamaño promedio en el total de levadura con el previamente descrito por otros autores, de 165 pb (Lohr et al., 1977b; Thomas y Furber, 1976) confirma la validez de los resultados obtenidos. La similitud entre

los tamaños nucleosomales del gen SUC2 y el promedio del genoma puede interpretarse en el sentido de que el gen SUC2 constituye una zona típica del genoma de levadura, puesto que la mayor parte de éste está constituido por genes potencialmente transcribibles. Un resultado equivalente fue obtenido por Struhl (1983) para el gen his3 de S. cerevisiae.

Por otro lado puesto que la zona de estudio comprende la región transcribible del gen y bastante espacio de los flancos, esta experiencia solo sirve para dar un tamaño promedio dentro de esa zona y no detecta las posibles irregularidades que pudieran existir en regiones concretas del gen.

El hecho de que no se hayan encontrado diferencias entre el estado activo y reprimido del gen se contrapone con los resultados obtenidos por otros autores en otros genes de levadura (Bergman y Kramer, 1983) y otros organismos (Wu et al., 1979; Pederson et al., 1984). Sin embargo ha de tenerse en cuenta que el gen SUC2 se transcribe, en forma de RNAm de 1.8 kb, incluso en el estado reprimido, lo cual hace posible que no existan grandes diferencias en la organización global de la cromatina del gen entre estos dos estados.

IV.3. Espaciado nucleosomal en las distintas regiones del gen SUC2.

Para determinar si el valor obtenido para el espaciado

nucleosomal del gen SUC2, 160-165 pb, correspondía a una distribución uniforme a lo largo del fragmento EcoRI/EcoRI de 4.3 kb, o si existían diferencias entre las regiones del gen, se realizó un experimento en el que se digirió el DNA con el enzima de restricción EcoRI y posteriormente se hibridó con dos sondas correspondientes a distintas regiones dentro del fragmento de 4.3 kb. En la figura 24 se muestra este experimento realizado con la sonda EH, que corresponde al flanco 5' del gen, y la sonda HB, que corresponde a la mitad izquierda de la zona transcribible. Para que la comparación fuera más exacta se utilizó un mismo filtro que se hibridó sucesivamente con las dos sondas. Como puede observarse en la figura, mientras la sonda HB da lugar a un esquema de bandas regular, típico, con un espaciado nucleosomal similar al encontrado para el fragmento de 4.3 kb completo. Sin embargo la sonda EH da lugar a un esquema de bandas muy irregular. La irregularidad se debe a una distribución no aleatoria de los cortes de la MNasa en relación a la secuencia del DNA. La razón de esta no aleatoriedad puede ser un posicionamiento específico y no regular de los nucleosomas de los nucleosomas en esta región o la presencia de secuencias del DNA reconocidas preferentemente por la MNasa. Para diferenciar entre estas dos opciones se llevaron a cabo las experiencias de marcaje terminal indirecto descritas en el apartado V.2.

En la figura 24 se puede observar también otra característica distintiva entre los resultados de las dos

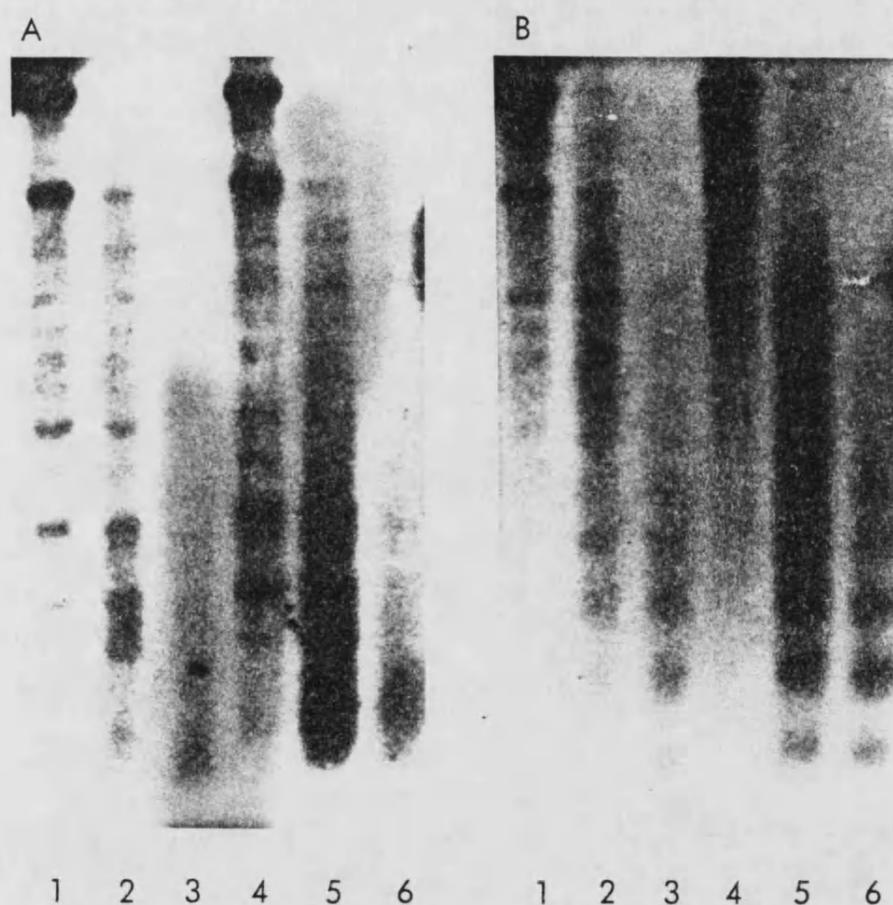


Figura 24.- Comparación del espaciado nucleosomal de dos regiones del gen *SUC2*.

Las muestras son las mismas de la figura 24 pero digeridas con *EcoRI*: 5 (carreras 1 y 4), 15 (carreras 2 y 5) y 30 min (carreras 3 y 6) de digestión con *MNasa*. Gen no reprimido (carreras 1-3) y gen reprimido (carreras 4-6). Panel A: sonda EH, paanel B: sonda HB. La electroforesis se realizó en agarosa 1.8%.

sondas utilizadas. Con la sonda EH se observa que aparecen bandas hasta mucho más abajo en la autorradiografía que en el caso de la sonda HB. Este resultado implica que el flanco 5' del gen se digiere más rápidamente que la zona transcribible, quizá debido a la presencia de puntos de alta sensibilidad a la MNasa en esta zona (ver, sin embargo, apartado II.4). La presencia de puntos de este tipo, ya sean debidos a la secuencia del DNA o a la estructura de la cromatina explicaría tanto este resultado como el anterior de distribución irregular de bandas con esta sonda.

Con el fin de calcular adecuadamente el espaciado nucleosomal promedio en las distintas partes del gen, sin las interferencias debidas a sitios preferentes de corte de la MNasa, se llevó a cabo un experimento como el descrito en el apartado IV.1. En las figuras 25, 26 y 27 se muestra el resultado de hibridar sucesivamente el mismo filtro con las sondas HE (flanco 5'), HH1 (zona transcribible) y HH2 (flanco 3'). Con las sondas EH y HH1 se observa un resultado muy similar. Sin embargo con la sonda HH2 el espaciado es mucho más regular, puesto que incluso se pueden distinguir las bandas de oligonucleosomas hasta el de 13, mientras que en los casos anteriores no se distinguen bandas a partir del oligonucleosoma de nueve unidades. La comparación de los resultados de las tres sondas mediante el densitometrado de una de las carreras se da en la figura 28. En esta figura además de la regularidad ya mencionada se aprecia otra característica poco habitual en la hibridación con la sonda

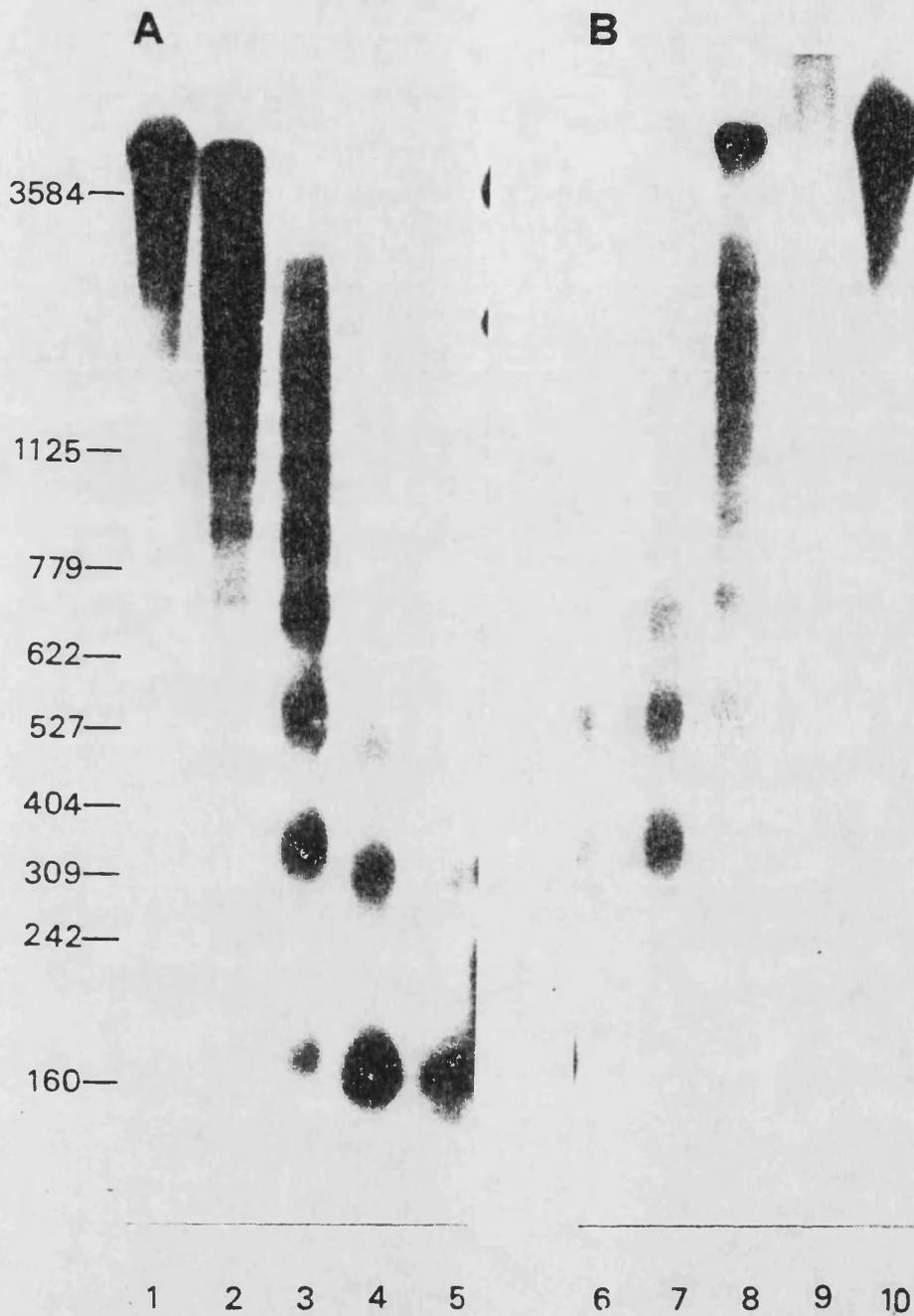


Figura 25.- Espaciado nucleosomal del flanco 5' del gen *SUC2*.

Las muestras se digirieron con MNasa a 20 (carreras 1 y 10), 50 (carreras 2 y 9), 250 (carreras 3 y 8), 1250 (carreras 4 y 7), o 2500 u/mg DNA (carreras 5 y 6) durante 5 min. La electroforesis se realizó en agarosa 1.8% y la sonda utilizada en la hibridación fue la EH. Los tamaños, en pb, y las posiciones de los patrones de DNA utilizados se indican a la izquierda y corresponden a fragmentos de restricción del plásmido pRR322. Panel A: muestras en estado de represión del gen, panel B: muestras en estado de desrepresión del gen.

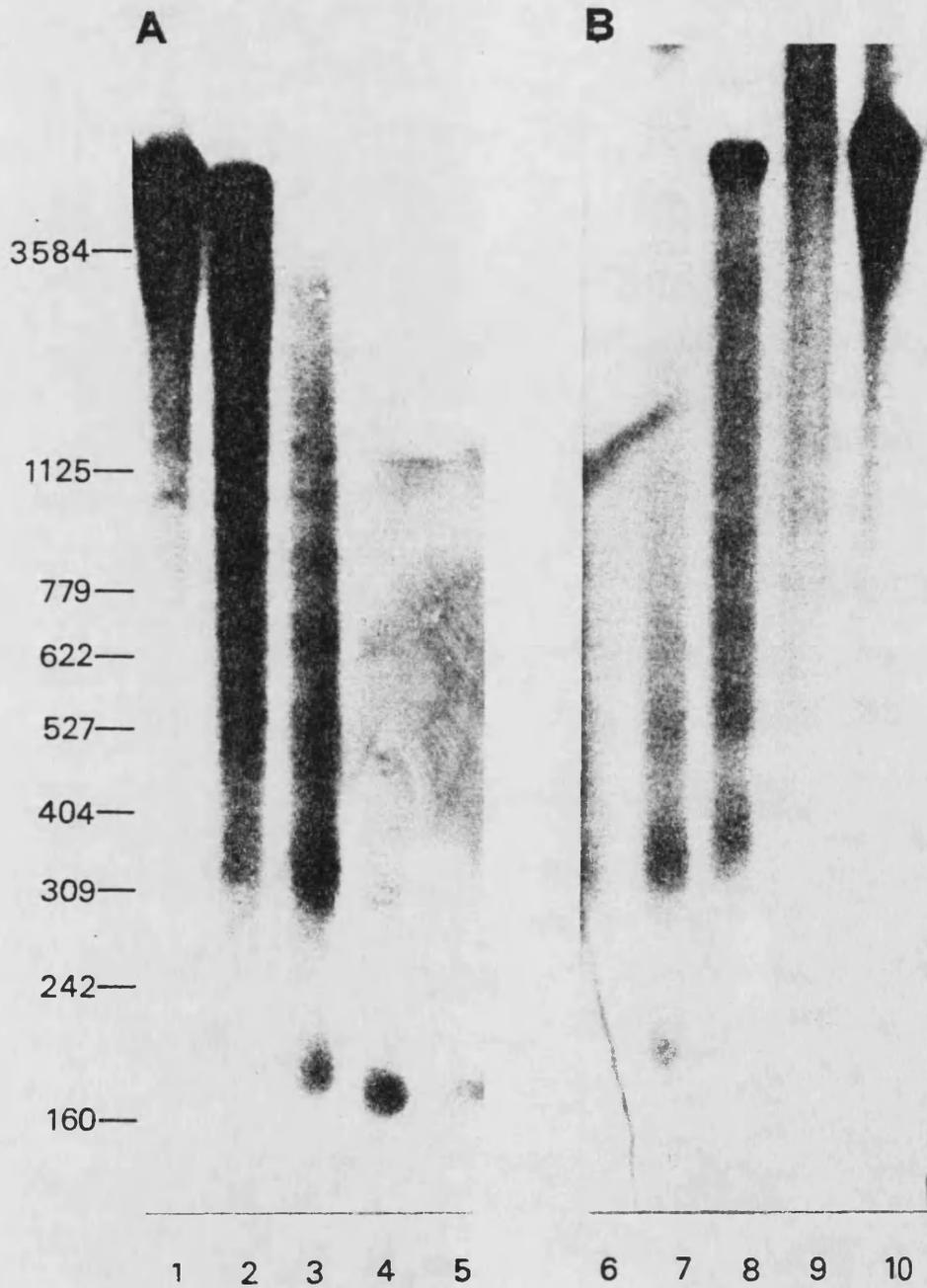


Figura 26.- Espaciado nucleosomal de la región transcribible del gen *SUC2*,

El filtro de la figura 25 se lavó y se rehibridó con la sonda HH1. Los símbolos son idénticos a los de la figura 25.

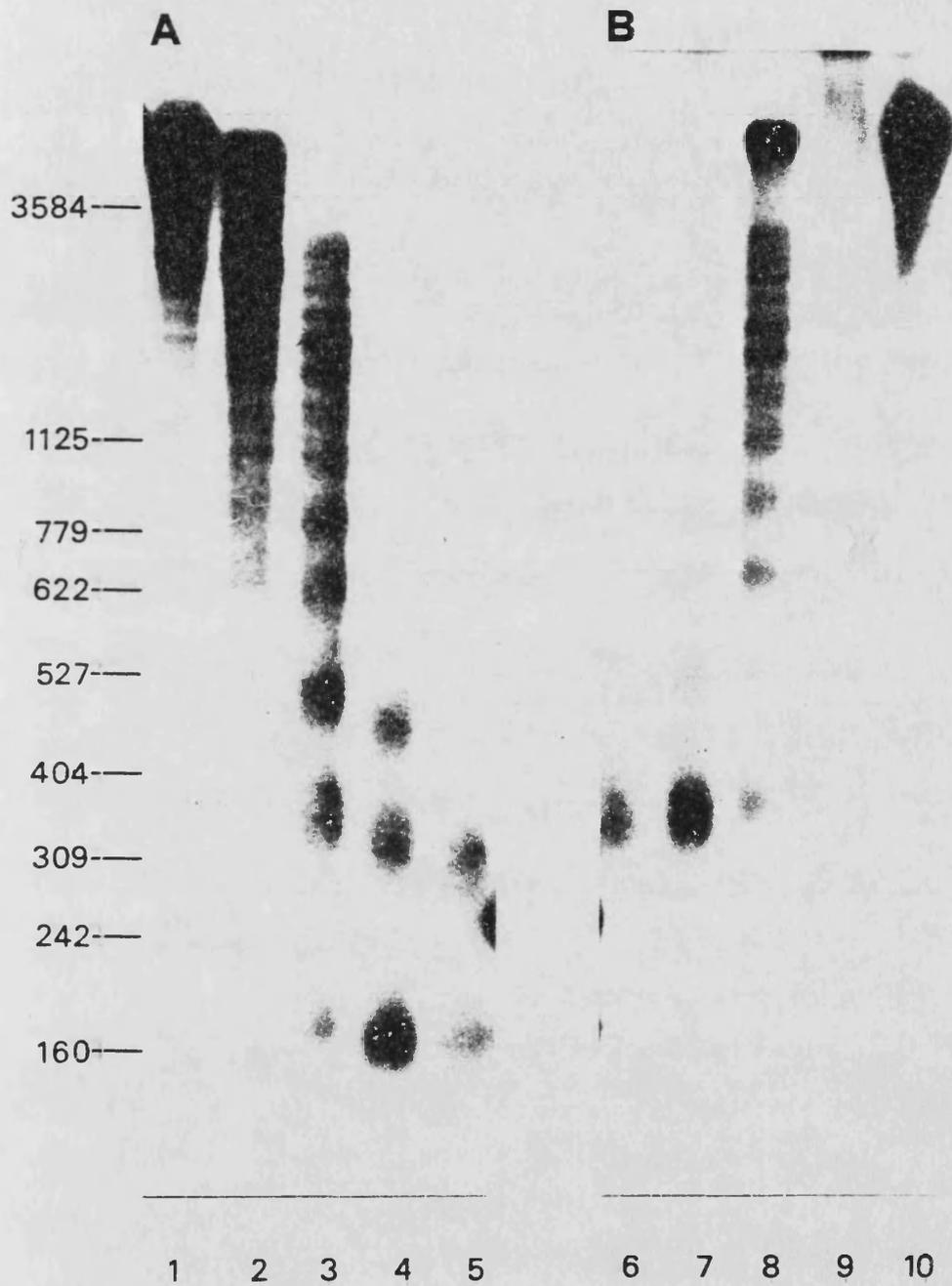


Figura 227.- Espaciado nucleosomal del flanco 3' del gen *SUC2*.

El filtro de las figuras 25 y 26 se lavó y se rehibridó con la sonda HH2. Los símbolos son los mismos de la figura 25.

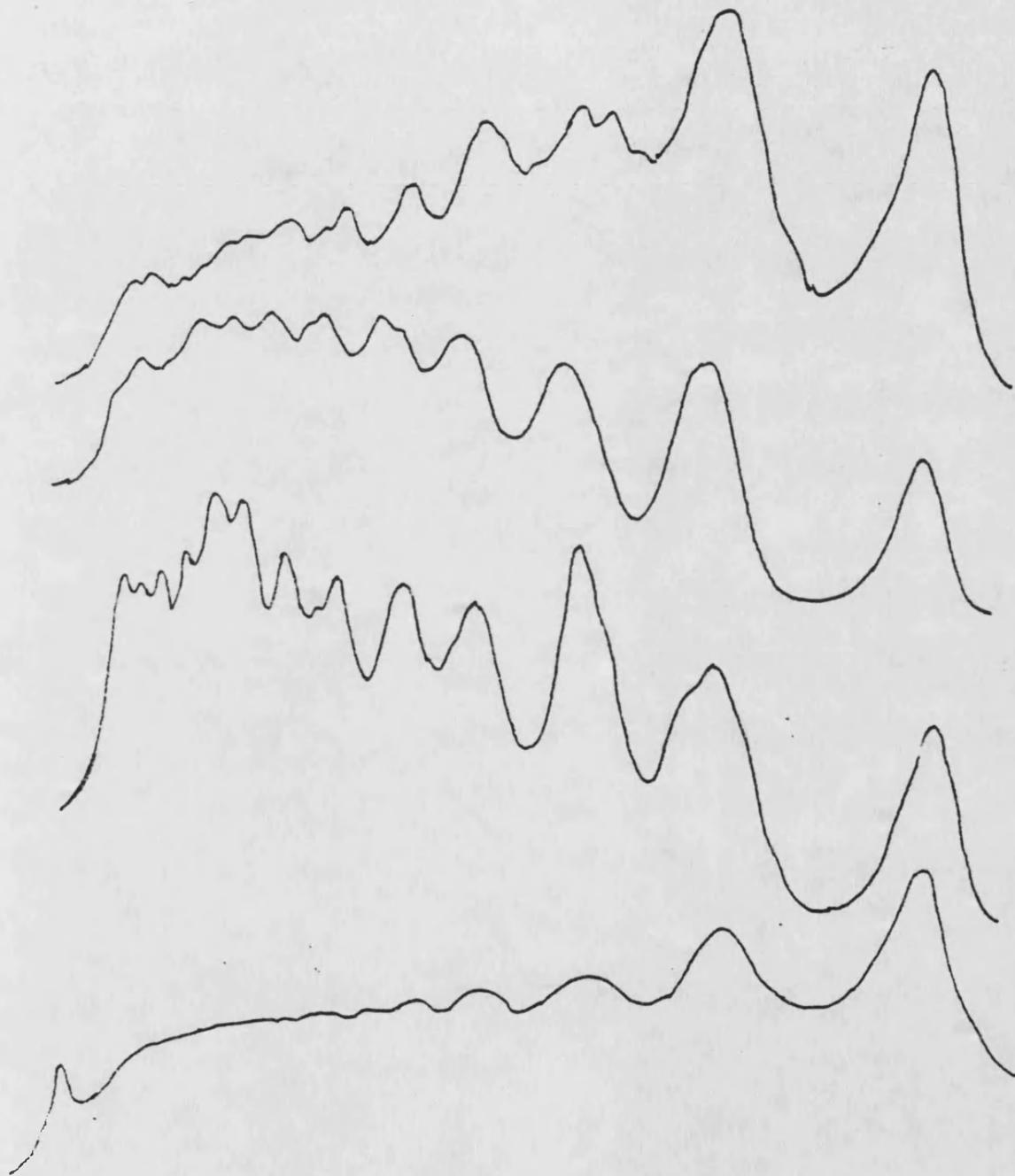


Figura 28.- Densitometrados correspondientes a la muestra n° 4 de las figuras 25, 26 y 27.

A: sonda EH (flanco 5'), B: sonda HH1 (zona transcribible), C: sonda HH2 (flanco 3'), D: densitometrado de la misma muestra teñida con bromuro de etidio.

HH2, la irregularidad en la altura de los picos de los diferentes oligómeros. En una experiencia de digestión MNasa típica se obtiene habitualmente una distribución de altura de picos regularmente creciente o decreciente, dependiendo de la tasa de digestión. Puesto que la altura del pico es proporcional a la cantidad de muestra en la banda correspondiente, este resultado indica que hay una distribución regular de los diversos oligómeros de nucleosomas. Resultados de este tipo se pueden observar en la figura 28 en el densitometrado del DNA teñido con bromuro de etidio, y en los correspondientes a las sondas EH y HH1. Sin embargo el densitometrado correspondiente a la sonda HH2 muestra que hay determinados oligómeros más abundantes que sus dos adyacentes, indicando que se producen con una probabilidad superior a la simple distribución estadística de cortes entre nucleosomas. Especialmente abundantes son los oligómeros de 3, 8 y 9 nucleosomas. La explicación para esta distribución podría ser la existencia de algunos puntos especialmente sensibles a la MNasa situados en espaciadores separados por 3 y 8/9 nucleosomas. Si los fragmentos producidos por estos cortes son especialmente abundantes se solaparán con los producidos estadísticamente dando lugar entonces a una distribución irregular en la intensidad de las bandas.

En cuanto a los resultados de espaciado nucleosomal en las distintas regiones del gen, se han realizado el mismo tipo de cálculos que los realizados en el apartado IV.2. Los

resultados se ofrecen en la tabla III.

Tabla III. Espaciado nucleosomal en las distintas regiones del gen SUC2.

	Tamaño nucleosomal (en pb)	
	Activo	Reprimido
Genoma total	155±11*	162±13
Flanco 5' (sonda EH)	164±9	165±15
Zona transcribible (sonda HH1)	159±6	161±16
Flanco 3' (sonda HH2)	156±12	174±19

*promedio de diez valores y su error estándar.

Como ocurría en el caso del fragmento de 4.3 kb entero no existen diferencias significativas entre el gen activo y el reprimido, ni tampoco en este caso entre las diversas partes del gen. Todos los valores son muy cercanos al considerado típico para levadura, 160-165 pb, que de nuevo es muy similar al obtenido para el genoma total en la tinción con bromuro de etidio del mismo gel, lo que corrobora la fiabilidad de los resultados.

V. POSICIONAMIENTO DE NUCLEOSOMAS EN EL GEN SUC2.

V.1. Consideraciones generales sobre la técnica empleada.

Técnica del punto de corte desplazado.

La técnica utilizada para la localización de los nucleosomas sobre una secuencia dada de DNA es básicamente igual a la descrita en el apartado III.1 para la localización de sitios hipersensibles a la DNasa I. Fue desarrollada inicialmente por Nedospasov y Georgiev (1980). En la figura 29 se representa un esquema de esta técnica.

Los problemas que surgen en la aplicación del marcaje terminal indirecto a la MNasa son los mismos que los comentados para la DNasa I (apartado III.1), pero en este caso están agudizados. Como se ha descrito anteriormente (Introducción, apartado II.2) la MNasa tiene una cierta especificidad de secuencia, lo cual hace más necesario el uso de patrones de DNA desnudo para descartar las bandas producidas por reconocimiento de secuencias específicas en el DNA cromatínico. La obtención de estos patrones ha sido descrita en el apartado III.2. Las bandas que aparecen en DNA desnudo pero no en cromatina probablemente están protegidas debido a la estructura de ésta. Las bandas que aparecen en DNA desnudo y en cromatina pueden ser debidas o no a la estructura de la cromatina, pues puede haber una coincidencia entre los sitios expuestos en cromatina y las

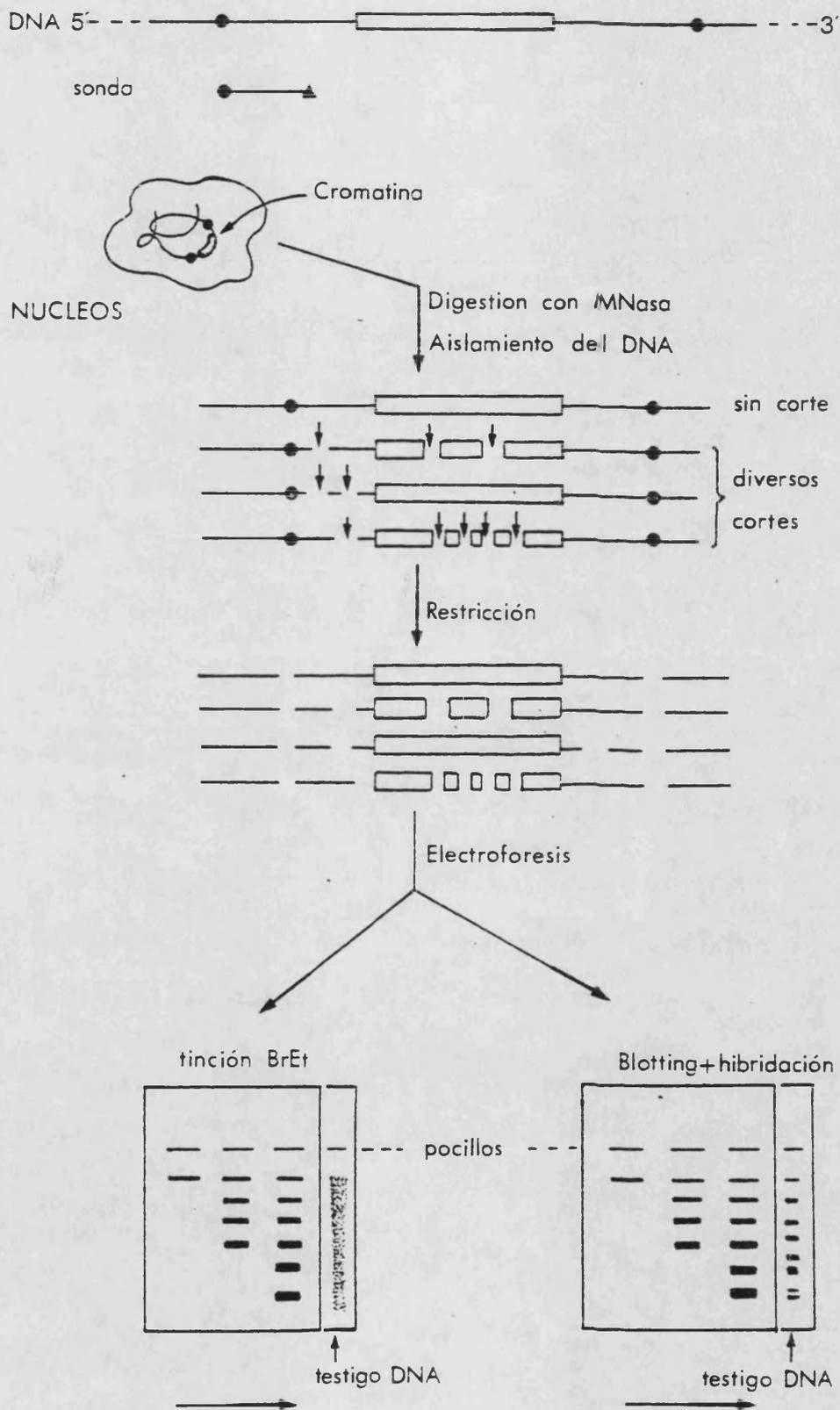


Figura 29.- Método para el posicionamiento de cortes de MNasa mediante marcaje terminal indirecto.

secuencias preferidas por la MNasa en el DNA, o también puede ocurrir que un sitio específico de corte de la MNasa esté expuesto a su ataque aún estando dentro de un nucleosoma. Finalmente las bandas que aparecen en cromatina pero no en DNA desnudo son debidas a la estructura de la cromatina (Thoma et al., 1984).

El segundo problema que puede surgir es la aparición de bandas debidas a doble corte de la MNasa. Este problema es mayor en el caso de la MNasa que en el de la DNasa I, puesto que la MNasa puede producir muchos más cortes discretos en la cromatina, al menos uno por DNA espaciador, y puesto que las tasas de digestión utilizadas en estas experiencias son más altas, sobre todo cuando se desea ver las bandas de menor tamaño. Para evitar este problema, en este trabajo se ha desarrollado una técnica, a la que hemos llamado "técnica del punto de restricción desplazado", que permite identificar las bandas debidas a doble corte con la MNasa y por lo tanto eliminarlas en los cálculos de localización de nucleosomas (fig. 30).

La técnica requiere disponer de un punto de corte de restricción cercano al que limita la zona de estudio por el lado de la sonda, pero situado fuera de ella. Si se hibrida con la misma sonda que se utilizaba en el marcaje terminal indirecto convencional, todas las bandas correspondientes a fragmentos con un extremo debido al corte de restricción pasarán a tener un tamaño ligeramente superior: el que tenían con el enzima de restricción usual más la distancia

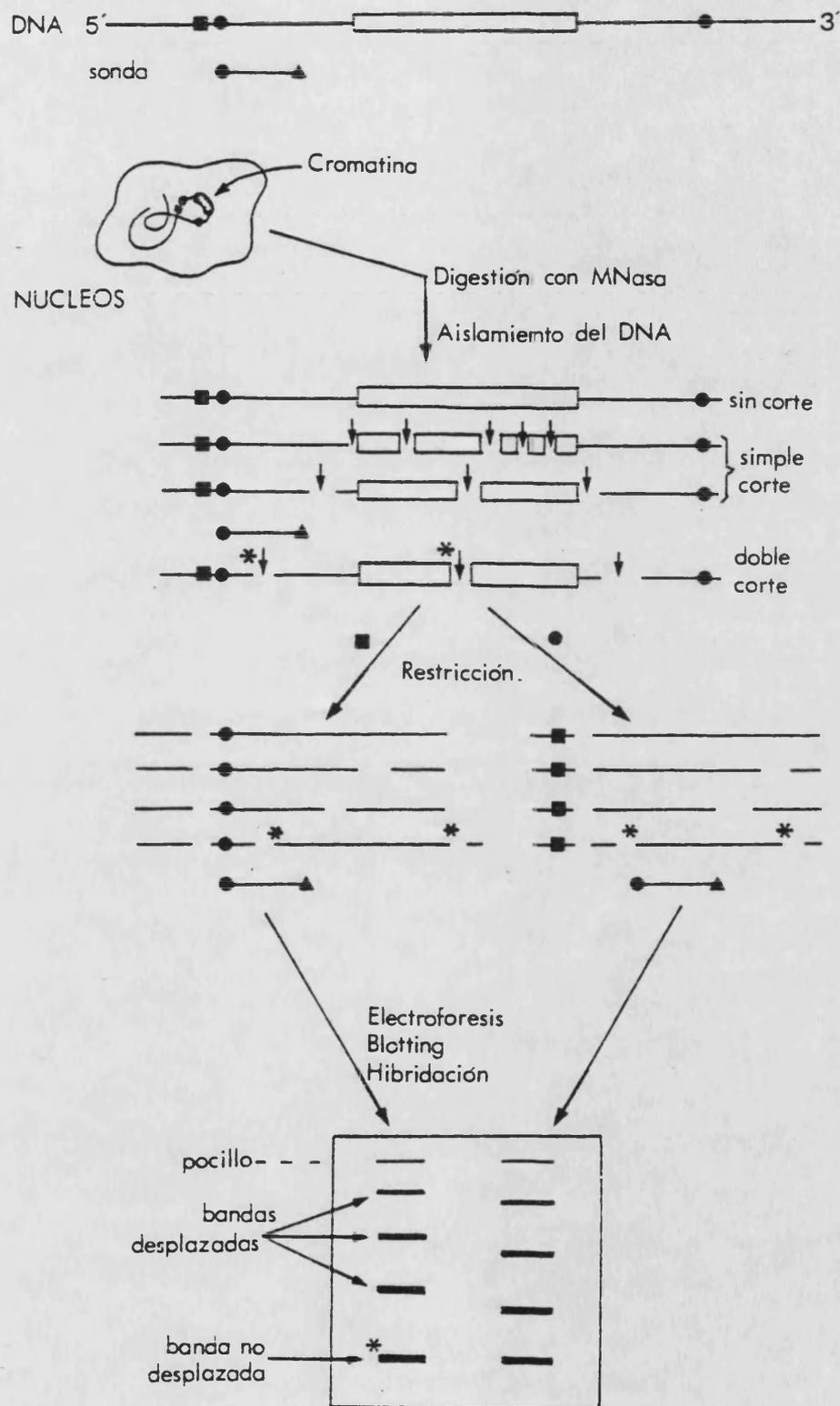


Figura 30.- Método del punto de restricción desplazado.

entre los puntos de corte del enzima usual y el desplazado. Sin embargo aquellas bandas producidas por dos puntos de corte de la MNasa no ven alterado su tamaño pues no les afecta el desplazamiento del punto de restricción. Para apreciar con claridad este efecto, la misma muestra dividida en dos alícuotas idénticas se digirió separadamente con los dos enzimas de restricción y ambas alícuotas se corrieron en carreras contiguas de la misma electroforesis. En la figura 31 se muestra un ejemplo de la aplicación de este procedimiento a la determinación de la posición de los nucleosomas en el gen SUC2. La muestra de la carrera 1 está mucho menos digerida que la muestra de la carrera 2 y por lo tanto, aunque es improbable que tenga bandas producidas por doble corte de la MNasa no es útil para determinar la localización de cortes de la MNasa cercanos al extremo hibridable con la sonda. Sin embargo la alta tasa de digestión en la carrera 2 hace que sea muy probable que varias de las bandas sean producidas por dos cortes de la MNasa, uno dentro de la zona de la sonda y otro fuera de ella. La carrera 3 contiene la misma muestra de la carrera 2 pero digerida con un enzima de restricción que corta 42 pb a la izquierda del inicio de la sonda (sitio BamHI respecto a sitio XbaI, ver fig. 16). Se puede observar que, con excepción de las dos bandas señaladas con un asterisco, todas las bandas están desplazadas hacia arriba, debido a la adición de 42 pb por el desplazamiento del punto de corte del enzima de restricción. Sin embargo las dos bandas

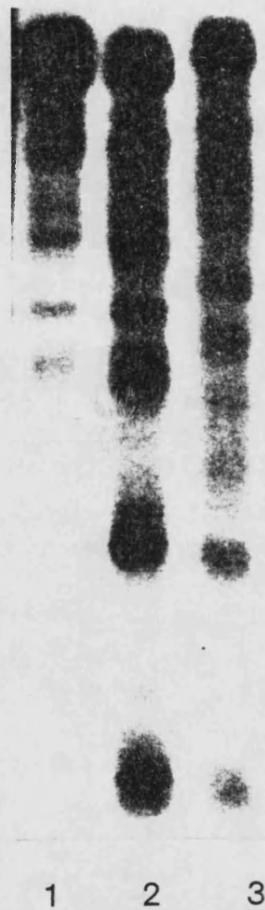


Figura 31.- Aplicación del método del punto de restricción desplazado al posicionamiento de cortes con MNasa en el gen SUC2.

Se representa un detalle ampliado de la figura 36. Las carreras 1, 2 y 3 corresponden, respectivamente, a las carreras 1, 2 y 3 de la mencionada figura. Las flechas señalan las dos bandas que no se desplazan al cambiar la restricción de XbaI (carreras 1 y 2) a BamHI (carrera 3). La tasa de digestión de la carrera 1 no es suficiente para el posicionamiento de los cortes de MNasa cercanos a la zona de la sonda.

señaladas con un asterisco permanecen en la misma posición lo cual indica que su extremo 5' no estaba definido por un corte de restricción, sino por uno de la MNasa.

V.2. Localización de nucleosomas a lo largo del gen.

En la aplicación de la técnica del marcaje terminal indirecto a la determinación de las posibles posiciones de los nucleosomas en el gen SUC2 se ha utilizado la misma estrategia que la utilizada para la localización de sitios hipersensibles a la DNasa I (fig. 16).

Los resultados de la utilización del punto de corte EcoRI y la sonda EH ya han sido comentados en el apartado IV.3 y, debido al tamaño de la sonda, no permiten localizar los puntos de corte de la MNasa.

Para localizar los puntos de corte de la MNasa en la parte izquierda del gen y en su flanco 5' se realizaron dos experiencias complementarias: punto de restricción HindIII y sonda HE, y punto de restricción KpnI y sonda XK. La primera de estas experiencias se muestra en la figura 32. En ella se observa una banda intensa a 1.1 kb que corresponde al fragmento de restricción íntegro.. Por debajo de ella aparecen numerosas bandas de intensidades variables, cuyos tamaños se dan en la tabla IV.

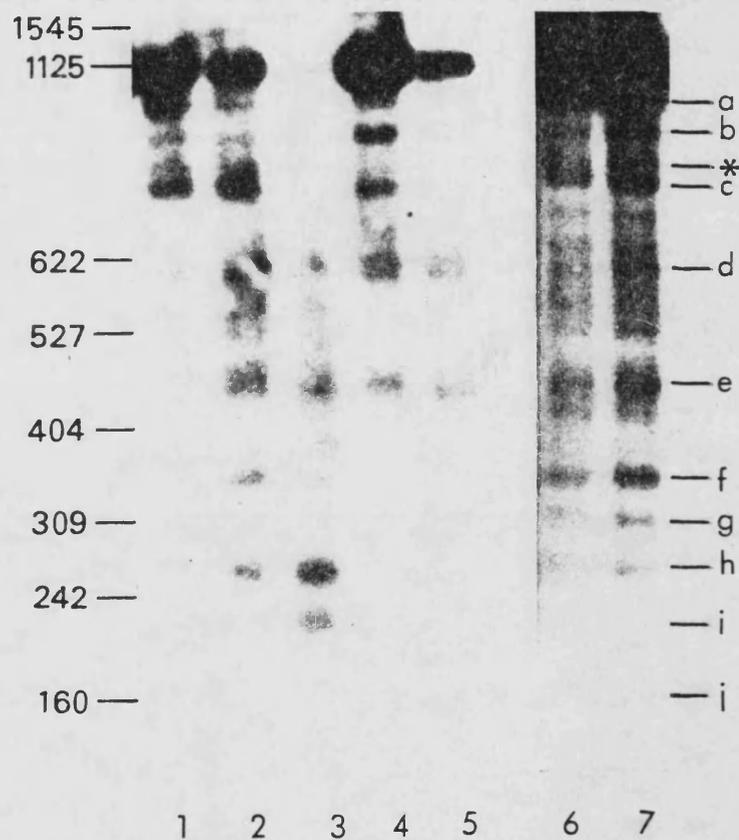


Figura 32.- Localización de puntos de corte de la MNasa mediante restricción con *Hind*III y la sonda HE.

Las muestras corresponden a cromatina digerida con 20 (carreras 1 y 4), 50 (carrera 2), o 250 u/mg DNA (carreras 3 y 5); o a pR322 digerido con 5 (carrera 6) o 20 u/mg DNA (carrera 7) durante 5 min. A la derecha se indican los nombres de las bandas y a la izquierda se indican los tamaños, en pb, y las posiciones de los patrones de DNA empleados que corresponden a fragmentos de restricción del plásmido pR322. La electroforesis se realizó en agarosa 1.8%. 1-3 muestras en estado de desrepresión del gen, 2-4 muestras en estado de represión del gen.

Tabla IV. Tamaños de las bandas producidas y posiciones de corte de la MNasa obtenidos mediante corte con HindIII y la sonda HE.

Banda	Tamaño	Posición
a	N.D.	N.D.
b	923±5 ^a	-215±5
c	802±8	-336±8
d	630±11	-509±11
e	445±10	-692±10
f	331±2	-810±2
g	285±3	-854±3
h	240±5	-899±5
i	201±5	-938±5
j	N.D.	N.D.

^amedia de, al menos, tres valores con su error estándar.

N.D., no determinado.

En el testigo de DNA desnudo aparecen también bastantes bandas, muchas de ellas coincidentes con las que aparecen en la cromatina. En la figura 33 se ofrece un esquema de la posición de las bandas en la zona del gen. De acuerdo con lo expuesto en el apartado V.1 se puede considerar que

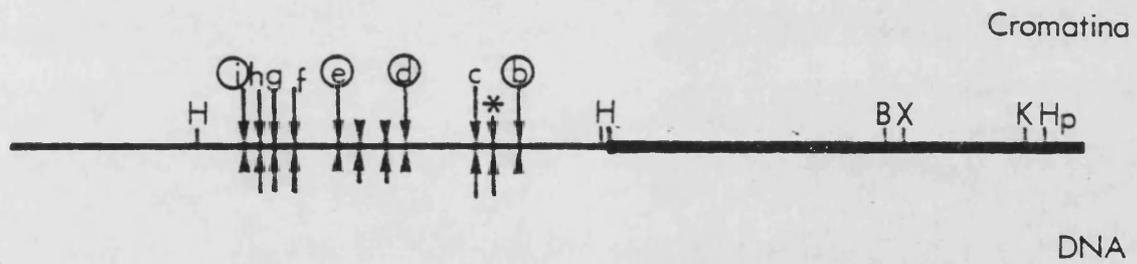


Figura 33.- Posiciones de los puntos de corte de la MNasa en DNA desnudo y en cromatina, localizados mediante la sonda HE.

El tamaño de las flechas indica de forma aproximada la intensidad del punto de corte. Con un asterisco se indica una banda propia del DNA pero que aparece en las muestras de cromatina en estado de desrepresión del gen.

solamente los puntos de corte marcados con un círculo se deben principal o exclusivamente a la estructura de la cromatina. De este tipo son las bandas b, d, e, i, que, aunque presentes en DNA desnudo, son mucho más intensas en cromatina. Existen algunas diferencias entre las muestras procedentes de células en estado de represión y de activación del gen SUC2 que serán comentadas en el apartado V.3.

La localización de puntos de corte de la MNasa en la parte izquierda de la zona transcribible, así como la confirmación de los situados con la sonda HE se realizó con la digestión KpnI y sonda XK. En la figura 34 se ofrece el resultado de este experimento. En este caso se han adicionado muestras digeridas con HpaI para la detección de bandas producidas por doble corte de la MNasa por el método del punto de corte desplazado. Como en el análisis anterior aparece un gran número de bandas, varias de las cuales tienen sus homólogas en el DNA desnudo. El tamaño y posición de las bandas se da en la tabla V.

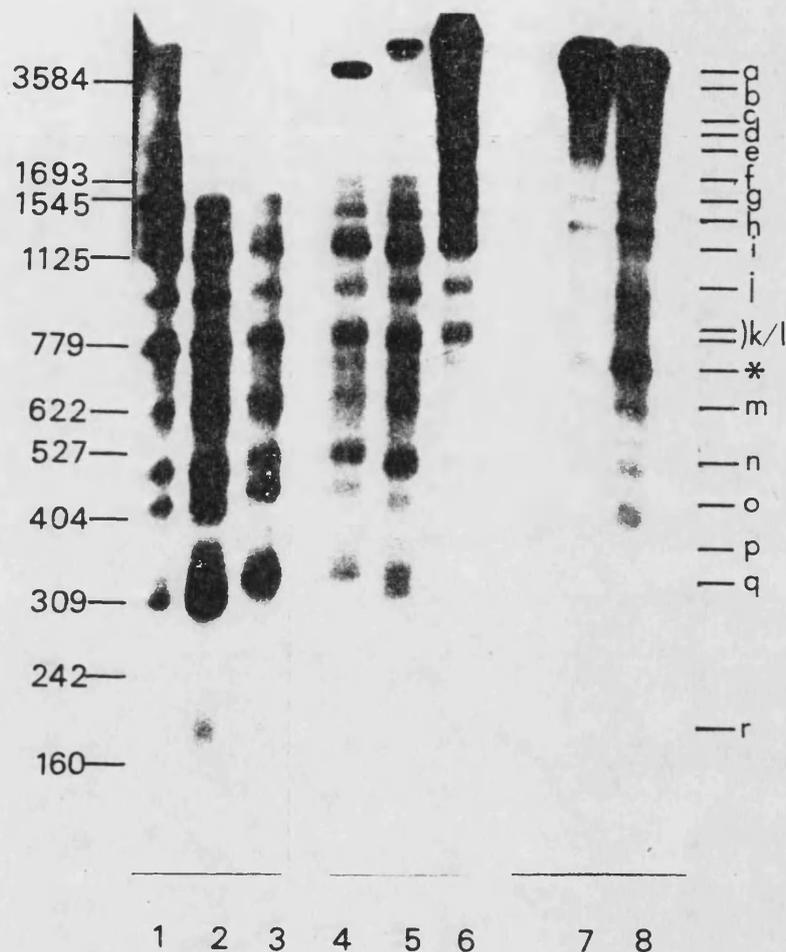


Figura 34.- Localización de los puntos de corte de la MNasa mediante restricción *KpnI* y la sonda XK.

Las muestras corresponden a cromatina digerida con 20 (carrera 6), 50 (carrera 1), o 250 μ /mg DNA (carreras 2-5); o pRB58 digerido con 5 (carrera 7) o 20 μ /mg DNA (carrera 8) durante 5 min. Las carreras 3 y 4 corresponden a las muestras de las carreras 2 y 5, respectivamente, pero digeridas con *HpaI*. A la derecha se indican los nombres de las bandas y a la izquierda los tamaños, en pb, de los patrones de DNA utilizados que corresponden a fragmentos de restricción del plásmido pBR322. La electroforesis se realizó en agarosa 1.8%. 1-3 muestras en estado de desrepresión del gen, 4-6 muestras en estado de represión del gen.

Tabla V. Tamaños de las bandas producidas y posiciones de corte de la MNasa obtenidos mediante corte con KpnI y la sonda XK.

Banda	Tamaño	Posición
a	N.D.	N.D.
b	N.D.	N.D.
c	2566±40*	-1407±40
d	2235±60	-1076±60
e	N.D.	N.D.
f	1688±29	-529±29
g	1523	-364
h	1412±16	-253±16
i	1197±32	-38±32
j	999±24	+160±24
k/l	813±28	+339±28
m	647±16	+512±16
n	514±12	+651±12
o	450±4	+709±4
p/q	334±13	+834±13
r	207±6	+952±6

*promedio de, al menos, tres valores y su error estándar.

Los valores sin error corresponden a una sola medida.

N.D., no determinado.

En la figura 35 se da un esquema de la posición de estas bandas en la secuencia del gen. Las bandas marcadas con un círculo son las que se ha considerado que se deben a la estructura de la cromatina. De ellas c, d, f, h, j, k/l, m, no tienen equivalente en el DNA desnudo; i y p/q son más intensas en cromatina que en DNA y la banda n se puede pensar que corresponde a la coincidencia de un punto sensible en cromatina y en DNA dada su posición intermedia entre las m y p/q. La banda r parece ser la única que no cambia de posición con la técnica del punto de corte desplazado, lo que indica que se debe a dos cortes de la MNasa. De todas formas dado que es muy difusa podría ser el resultado de la superposición de una banda de doble corte de la MNasa con otra de simple corte, por lo que no se puede descartar completamente. Las bandas g y o son claramente debidas a la especificidad de secuencia de la MNasa aunque el hecho de que aparezcan claras en cromatina implica que esas secuencias son muy accesibles en cromatina, a diferencia de otras bandas señaladas con un asterisco que sólo están presentes en DNA, lo cual indica que deben estar protegidas en cromatina, probablemente por estar dentro de la zona ocupada por un core nucleosomal (Thoma et al., 1984). La banda g constituye un caso especial pues es visible en las muestras de células en estado activo del gen SUC2 pero no es muy aparente en las procedentes de células en estado de represión del gen. De hecho ésta es la única diferencia entre ambos tipos de muestras. El posible

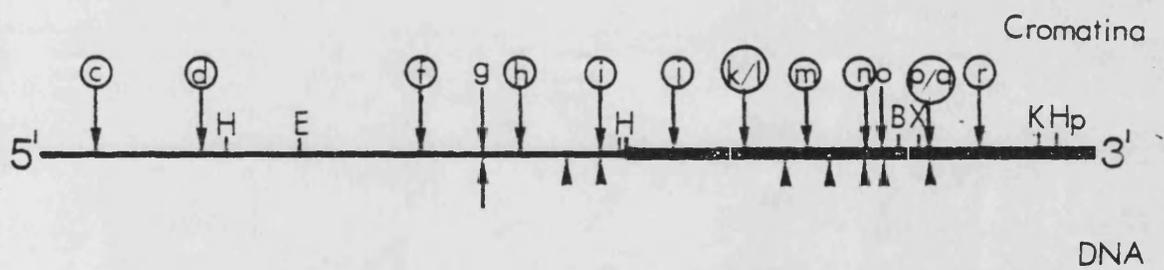


Figura 35.- Posiciones de los puntos de corte de la MNasa en DNA desnudo y cromatina, localizados mediante restricción con *Kpn*I y la sonda XK.

El tamaño de la flecha indica aproximadamente la intensidad del punto de corte.

significado de este hecho se discute en el apartado V.3.

De la comparación de los resultados obtenidos en las figuras 32 y 34 se puede establecer un mapa de sitios accesibles a la MNasa en la mitad izquierda del gen SUC2. La zona comprendida entre los sitios de restricción KpnI y HindIII solo se ha analizado con la sonda XK, en ella aparecen 5, o quizá 6, puntos de corte de la MNasa específicos de cromatina a (+952), +834, +651, +512, +339 y +160. En estas posiciones hay dos que presentan cierta indeterminación, las de +952 y +651, correspondientes a las bandas r y n, que ya han sido comentadas anteriormente. A estos puntos de corte se puede sumar el obtenido a -38 (banda i), que probablemente se corresponda con la banda a de la sonda HE cuyo tamaño no pudo ser determinado por quedar muy cerca del fragmento de restricción. Las distancias entre estos puntos de corte son, respectivamente, (118 pb), 183 pb, 139 pb, 173 pb, 179 pb y 198 pb. Salvo el primero que puede ser erróneo por la imprecisión de la situación del corte a +952, los demás son tamaños muy similares a los esperados si se supone que los cortes de la MNasa se producen en el DNA espaciador, entre cores, y asumiendo un tamaño de 145 pb para el core y de 165 pb para el nucleosoma de levadura. Solamente el espacio de 139 pb entre los cortes m y n es algo más pequeño que el mínimo imprescindible para situar un core entre ambos. Este resultado puede ser debido al hecho de que la banda n puede ser el resultado de un corte sobre una secuencia preferente

en el DNA situada muy cercana al centro del espaciador más próximo, lo cual puede desplazar ligeramente la posición teórica de la banda. La banda o, muy similar a la n, podría estar situada en el otro extremo del mismo espaciador, siguiendo una deducción semejante. Según este resultado la banda p, que no se desplaza, sería, como se ha discutido antes para la banda r, producto de doble corte de la MNasa y no debe ser tenida en consideración.

Las posiciones situadas a la izquierda del sitio de restricción doble HindIII a -27/+11, han sido analizadas con ambas sondas. Las bandas b, c, y d de la sonda HE se corresponden muy bien con las h, g y f, respectivamente, de la sonda XK, pues sus posiciones son : -215/-253 (media -235) para el par b/h, -336/-364 (media -350) para el par c/g, y -509/-529 (media -520) para el par d/f. La concordancia de estos resultados está dentro del límite de error típico de 30 pb de estas determinaciones. Las bandas situadas a la izquierda de la banda d de la sonda HE no son visibles con la sonda XK debido a la baja resolución del gel para esos tamaños de DNA. En esta zona las dos bandas identificadas como sitios específicos de corte de la MNasa en cromatina son las e y, probablemente, la i de la sonda HE. Más allá del punto de corte HindIII a -1100 pb parecen existir varios puntos de corte muy intensos, localizados con la sonda XK. La fiabilidad de estos posicionamientos es baja dada la distancia desde el punto KpnI. Se puede concluir que en esta zona, flanco 5' del gen SUC2, se pueden situar

cortes específicos de la MNasa en cromatina a -235, -520, -692, -938, y (-1076). Existe además una banda a -350 sólo presente en DNA desnudo y en cromatina de células crecidas en ausencia de glucosa. Este hecho se discutirá en el apartado V.3. Las distancias entre estos puntos de corte son, enlazando con el punto situado a -38: 196 pb, 285 pb, 173 pb, 246 pb, y (138 pb). En este caso las distancias son bastante irregulares y pueden ser el resultado de una distribución asimétrica de los nucleosomas en esta zona, que como se vió en el apartado III.3 contiene dos zonas hipersensibles a la DNasa I. Uno de los sitios hipersensibles a la DNasa I está situado a -27 lo cual coincide aproximadamente con la posición de uno de los cortes de la MNasa a -38, y su presencia podría explicar la separación entre los dos nucleosomas situados a ambos lados de este sitio. El segundo sitio hipersensible está situado a -430, dentro de una zona de 285 pb sin cortes de MNasa. Las relaciones entre estos hechos se discuten más ampliamente en el apartado V.3.

Finalmente la mitad derecha del gen se ha analizado con una restricción XbaI y el uso de la sonda XK. En la figura 36 se muestra el resultado de una experiencia de este tipo. Se observa un doblete de bandas muy intensas (f/g) que delimita dos zonas claramente diferenciadas en cuanto a su organización de la cromatina. En la tabla VI se dan los tamaños y las posiciones de las bandas observadas.

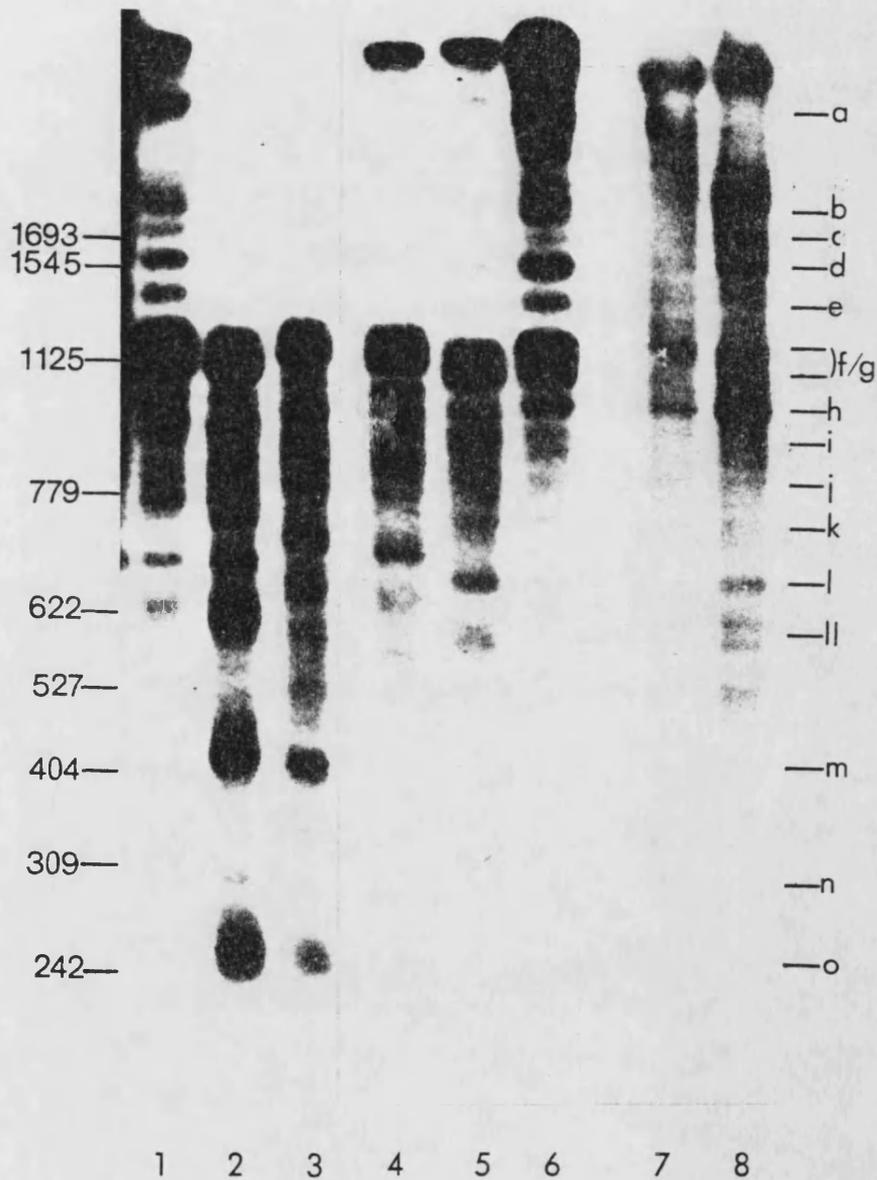


Figura 36.- Localización de los puntos de corte de la MNasa en DNA desnudo o cromatina, localizados mediante restricción con *Xba*I y la sonda XK.

Las muestras son las mismas de la figura 34, salvo en el enzima de restricción utilizado. Las muestras 3 y 4 son idénticas a las 2 y 5, respectivamente, pero digeridas con *Bam*HI. Los símbolos y el resto de las condiciones son idénticas a las de la figura 34.

Tabla VI. Tamaños de las bandas y posiciones de los puntos de corte de la MNasa obtenidos mediante restricción con XbaI y la sonda XK.

Banda	Tamaño (en pb)	Posición
a	>5000	N.D.
b	1961±1 ^{am}	+2700±1
c	1742±8	+2571±8
d	1531	+2360
e	1340±5	+2169±5
f/g	1161±15	+1990±15
h	1021	+1850
i	962±7	+1791±7
j	842±7	+1671±7
k	804	+1633
l	699±4	+1528±4
ll	634±3	+1463±3
m	467±9	+1306±9
n	351±6	+1186±6
o	250±8	+1139±8

^{am}media de tres valores y su error estándar. Los datos sin error corresponden a una sola medida.

N.D., no determinado.

Aparte de la banda más alejada, banda **a**, que puede corresponder con el sitio hipersensible situado en esa zona (ver apartado III.3), se pueden diferenciar dos regiones en la cromatina de esta zona, separadas por el doblete intenso **f/g**. La zona por encima del doblete contiene bandas muy nítidas y separadas regularmente, mientras la zona situada por debajo del doblete presenta muchas bandas más difusas y de espaciado irregular.

En la primera zona las bandas **b**, **c**, **d**, **e**, y **g** no tienen equivalente en el DNA desnudo, y la **f**, aunque lo tiene, es mucho más débil en DNA. Todas estas bandas se deben, pues, a la estructura de la cromatina.

Esta zona ha sido estudiada con más detalle mediante una electroforesis de alta resolución, utilizando un gel de 25 cm de longitud y agarosa del 1% (fig. 37). Se puede observar la separación de las dos bandas del doblete **f/g**, incluso con desdoblamiento de la banda **f** que da lugar a una banda presente en DNA y otra propia de cromatina. La separación entre las bandas **f** y **g** se ha estimado mediante este experimento en 87 pb. Además se observa que el espaciado regular de las bandas de mayor tamaño que el doblete **f/g** se extiende no sólo a cuatro nucleosomas como se deducía de la figura 36, sino que alcanza hasta unos 13-14 nucleosomas, hasta la banda **a**, que también aparece desdoblada en este gel. Las posiciones de las bandas, y por consiguiente de los nucleosomas, en esta zona son muy regulares, de 180-190 pb, lo cual hace de esta zona de la

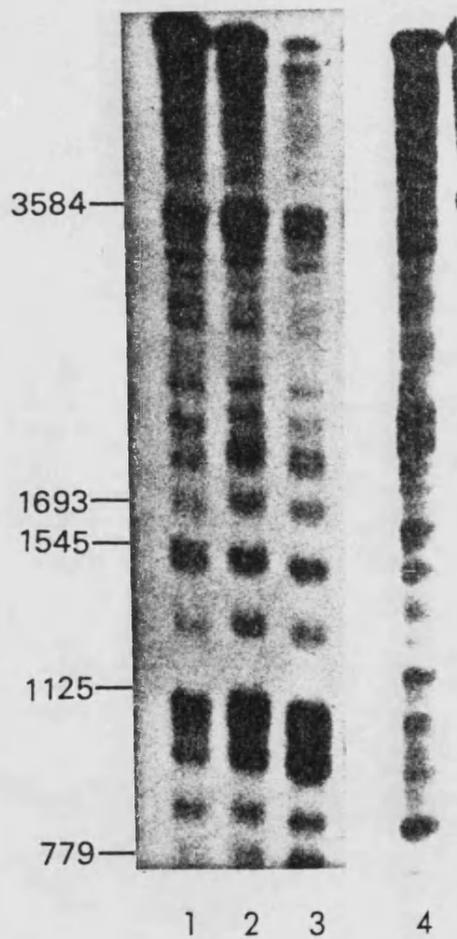


Figura 37.- Análisis detallado de los puntos de corte de la MNasa en el flanco 3' del gen SUC2

Las carreras 1, 2 y 3 contienen las mismas muestras de las carreras 6, 1 y 2, respectivamente, de la figura 36. Carrera 1: gen en estado reprimido, carreras 2 y 3: gen en estado activo. La carrera 4 contiene el mismo patrón de DNA desnudo de la carrera 7 de la figura 36. A la izquierda se indican los tamaños, en pb, y las posiciones de los patrones de DNA utilizados, que corresponden a fragmentos de restricción del plásmido pBR322. A la derecha se representa un mapa esquemático del gen SUC2. La electroforesis se realizó en un gel de 25 cm de agarosa 1%.

cromatina, entre +1990 (banda **f**) y +4390 (banda **a**), un caso excepcional dentro de la cromatina de levadura, comparable a la zona adyacente al centrómero descrita por Bloom y Carbon (1982).

En la segunda zona la única banda clara en cromatina no presente en DNA desnudo es la **i**. Todas las demás son muy similares en cromatina y en DNA, salvo las **m** y **o**. Sin embargo las bandas **m** y **o** son las únicas que no se desplazan en las muestras digeridas con BamHI (carreras 3 y 4, fig. 36) en la técnica del punto de corte desplazado, por lo que se puede concluir que son debidas a doble corte de la MNasa y por lo tanto no deben ser tenidas en cuenta. Sin embargo algunas de las bandas de esta zona presentan una pequeña variación entre el DNA desnudo y la cromatina. La banda **k** es algo más intensa y ancha que su correspondiente en el DNA, y la **ll** es una banda ancha en cromatina mientras en DNA se observa un doblete de bandas separadas.

Tomando estas últimas bandas como posibles bandas debidas a la estructura de la cromatina, las distancias entre los puntos de corte elegidos como característicos de la cromatina en la zona a la izquierda del doblete **f/g** (señalados en la fig. 38 con un círculo), bandas **f/g**, **i**, **k**, y **ll**, son las siguientes: 199 pb, 158 pb, y 170 pb. La explicación más sencilla para la aparición de estas bandas es que se correspondan con cortes en zonas de DNA espaciador. Mientras que, como se ha señalado anteriormente, a la derecha del punto **f/g** aparecen 13-14 nucleosomas de un

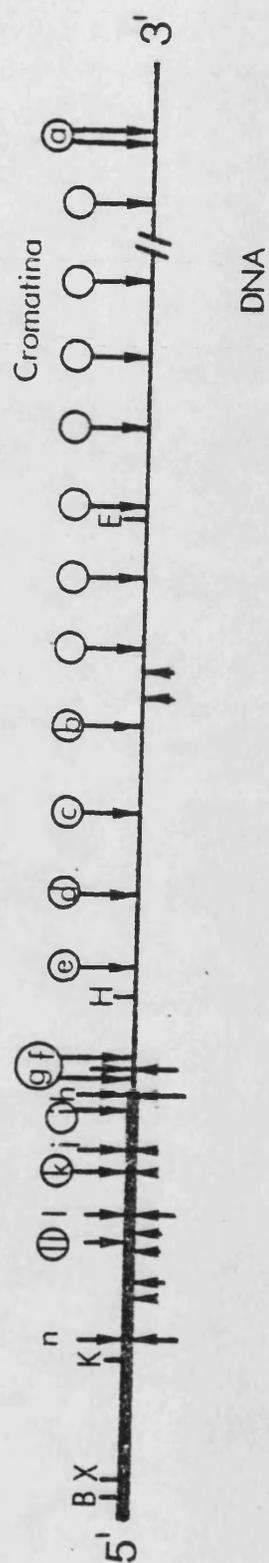


Figura 38.- Posiciones de los puntos de corte de la MNasa en DNA desnudo y cromatina, localizados mediante restricción con *Xba*I y la sonda XK.

El tamaño de la flecha indica aproximadamente la intensidad del punto de corte.

tamaño promedio de 185 pb, relativamente grande para levadura. La gran intensidad de las bandas f/g hace sospechar que en este punto el DNA es más accesible que en cualquier espaciador y por lo tanto debe responder a otro tipo de estructura. Esta suposición se ve confirmada por su coincidencia con el sitio hipersensible a la DNasa I situado a +1928. Este hecho se discute en el apartado V.3.

A diferencia de lo comentado anteriormente la disposición de nucleosomas a la izquierda del punto f/g, a excepción del primero, está mucho menos definida, puesto que las bandas son mucho menos específicas de la cromatina. Existen muchas bandas características del DNA también en cromatina, lo que sugiere una desprotección de esta zona, y el fondo entre bandas es más alto. La explicación más razonable es un posicionamiento "limitado" de los nucleosomas, es decir un mayor variabilidad en su posicionamiento que, sin llegar a una situación al azar, suponga una cierta aleatoriedad en la situación del core nucleosomal. La localización de los puntos de corte a partir del 11 resulta difícil por la superposición de de dos bandas anómalas, las m y o, debidas a doble corte por MNasa. Sin embargo puede realizarse un cálculo aproximado de la posición de los dos primeros nucleosomas a partir del punto XbaI (fig. 39). Si suponemos que estas dos bandas se producen por un corte de la MNasa dentro de la sonda y otro situado fuera de ella a 250 ó 470 pb -tamaños de estas dos bandas-, se pueden localizar los puntos de corte de la MNasa

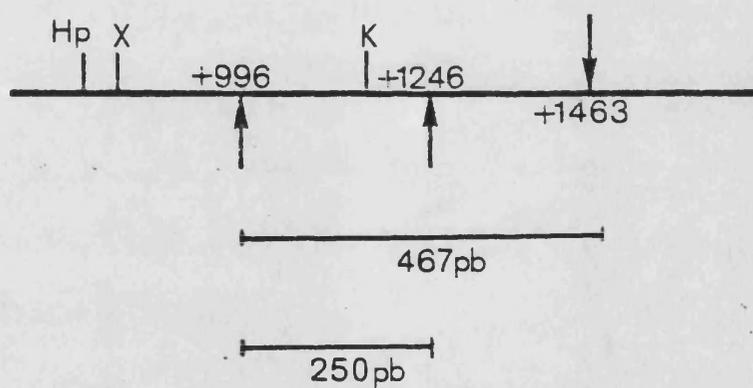


Figura 39.- Posible localización de dos sitios de corte de la MNasa en la zona de la sonda XK.

Las flechas indican los puntos de corte. Las de la parte inferior son los propuestos, la de la superior el ya conocido anteriormente (fig. 38).

tomando como referencia el último punto localizado, el 11 a +1463. Si descontamos 470 pb desde este punto obtenemos +993, posición del punto de corte de la MNasa situado dentro de la zona de la sonda. A este valor se le puede sumar 250 pb, tamaño del primer nucleosoma, para calcular la posición del segundo punto de corte de la MNasa, el primero situado fuera de la zona de la sonda. El valor obtenido para este segundo punto es +1246. Estas serían, pues, las dos posiciones de los puntos de corte de la MNasa en la zona próxima al punto de restricción XbaI. La posición a +996 coincide aproximadamente con la determinada, también de forma aproximada, en el ensayo con la sonda XK y restricción en KpnI, a +952, lo cual corrobora la verosimilitud de este cálculo.

La comparación entre las muestras de levadura en estado de represión o activación del gen SUC2 se describe en el apartado V.3.

V.3. Relación de la posición de los nucleosomas y la de los sitios hipersensibles a la DNasa I. Cambios con el estado de actividad del gen.

Los resultados de localización de sitios hipersensibles a la DNasa I (apartado III.3) y los de posición de nucleosomas (apartado V.2) pueden relacionarse entre sí.

En otros casos estudiados por otros autores se ha encontrado que los sitios hipersensibles carecían de

nucleosomas (Felsenfeld *et al.*, 1982; Wu, 1984a), y en algunos casos se ha demostrado que inducían un posicionamiento fijo de los nucleosomas adyacentes (Bloom y Carbon, 1982). Wu ha propuesto un modelo en el que un sitio hipersensible, carente de nucleosomas, contiene varias zonas de afinidad para proteínas específicas en la caja TATA y en una región reguladora (Wu, 1984a,b). La unión de estas proteínas provocaría un desplazamiento de los nucleosomas fuera de esta región y esta sería la causa de la aparición de un sitio hipersensible. La activación del gen produce un cambio en esta zona provocado por la unión de proteínas reguladoras (Wu, 1984a,b).

En el caso del gen SUC2 se puede proponer un modelo similar para las dos zonas que contienen sitios hipersensibles.

La zona del flanco 5' contiene dos sitios hipersensibles en las posiciones -24 y -380/-480 y una distribución algo irregular de los puntos de corte de la MNasa. Suponiendo que los sitios hipersensibles son lugares de unión de proteínas específicas (Wu, 1984a,b; Emerson y Felsenfeld, 1984; White *et al.*, 1985) y que por lo tanto caen fuera de los cores nucleosomales, y que los cortes de la MNasa se producen preferentemente en el DNA espaciador o, al menos, en DNA no situado en el core, se propone un modelo de la organización de la cromatina en la región del promotor del gen SUC2 (fig. 40). En el estado inactivo dos proteínas, designadas como P1 y P3 reconocerían y se unirían a los dos

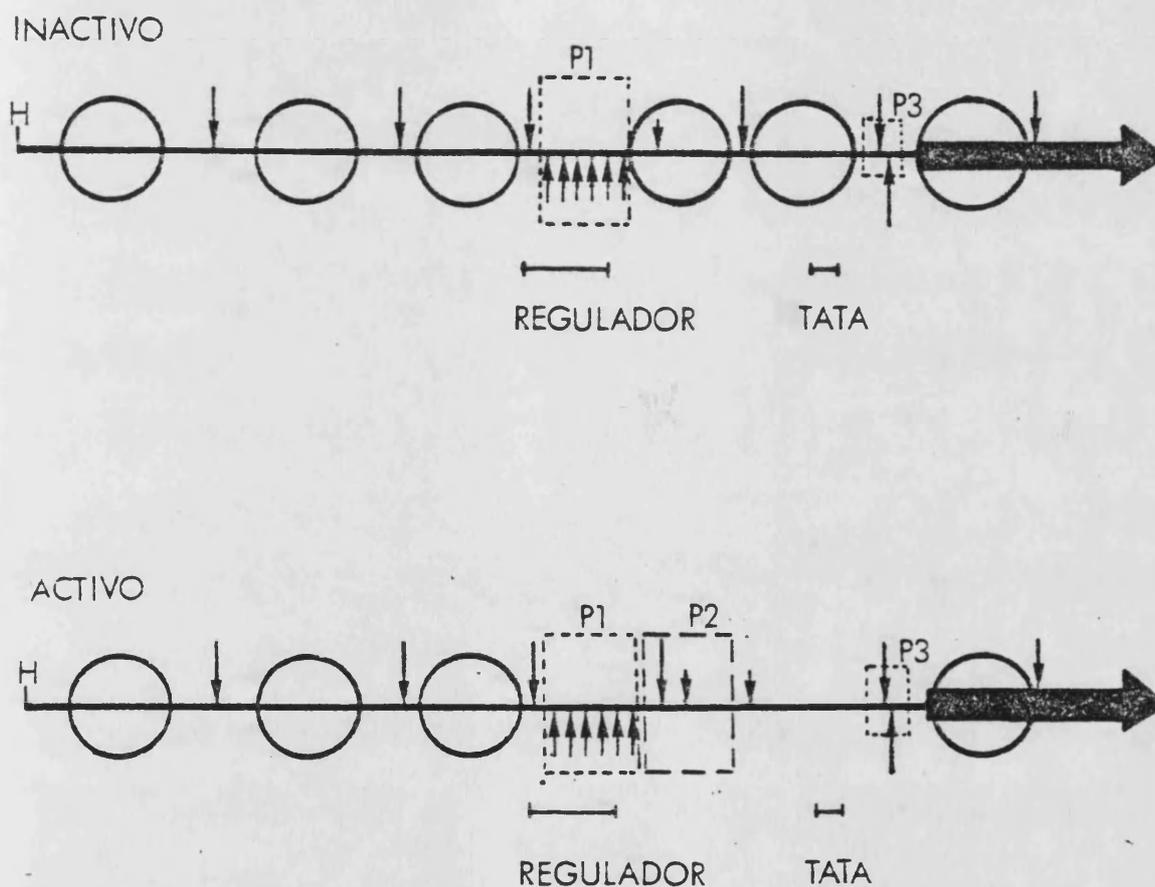


Figura 40.- Modelo de organización del promotor del gen SUC2 en los estados de represión y desrepresión.

Las flechas representan los puntos de corte de la MNasa (parte superior) y de la DNasa I (parte inferior), los círculos las posibles posiciones de los cores nucleosomales y los rectángulos las posibles proteínas reguladoras. La zona transcribible del gen se representa con una flecha.

sitios hipersensibles. Esta hipótesis explicaría el espaciado anormalmente largo de los puntos de corte de la MNasa a -235 y -520 (285 pb), pues parte del espacio no estaría ocupado por un nucleosoma sino por la(s) proteína(s) P1. El sitio hipersensible menor, a -24 pb, resultaría de la unión de la proteína P3, aunque en este caso el número de pb que ocuparía esta proteína sería bastante reducido pues parece clara la existencia de dos nucleosomas situados a ambos lados de este sitio hipersensible.

En el estado desreprimido del gen se intensifica mucho una banda situada a -350, y casi desaparece la banda nucleosomal a -235, e incluso aparece una banda débil entre estas dos bandas que es característica del DNA desnudo (señalada con un * en las fig. 32 y 33). Estos resultados indicarían la pérdida de un nucleosoma, o dos, en esta zona. La presencia de ambos puntos de corte, aún con intensidades muy alteradas, en ambos estados de actividad se puede justificar por el hecho de que lo que se analiza con este tipo de experiencias es una población de moléculas y no una sola. Puesto que el gen SUC2, al contrario que los genes "housekeeping" de eucariontes pluricelulares, tiene un nivel de expresión variable, pero no una regulación del tipo "todo o nada", lo que sucede es que en el estado desreprimido el porcentaje de moléculas del gen en estado activo es superior al que hay en el estado reprimido, pero en este último estado también hay un cierto porcentaje de moléculas en estado activo. Este hecho da lugar a que el promedio

observado (intensidad de la banda) con las experiencias de marcaje terminal indirecto sea superior para una banda o para otra, pero no da necesariamente lugar a la aparición o desaparición de una banda.

En otros estudios sobre el gen SUC2 se han observado cambios en la zona de hipersensibilidad con la activación del gen (Estruch, 1986) lo cual está de acuerdo con la hipótesis propuesta. Los cambios mencionados durante la activación del gen podrían deberse a la entrada de una tercera proteína, la P2, que tendría funciones reguladoras. Esta proteína se puede identificar tentativamente como el producto del gen SNF1, pues se sabe que este gen ejerce su efecto sobre esta zona del promotor del gen SUC2 (Sarokin y Carlson, 1984). El cambio originado por la entrada de la proteína P2 facilitaría la entrada de la RNA polimerasa para iniciar la lectura del gen desde la posición -50, lo cual da lugar a la síntesis del RNAm de 1.9 kb de la invertasa de secreción. La síntesis del RNAm de 1.8 kb, que no necesita desrepresión para su síntesis, no estaría afectada por este proceso.

Aunque los resultados presentados aquí no permiten proponer un modelo para el sitio hipersensible a -24, este sitio podría estar implicado en la lectura del RNAm de 1.8 kb, pues se ha sugerido que esta zona, posterior a la caja TATA podría tener influencia en la síntesis de este segundo tipo de RNAm (Sarokin y Carlson, 1984).

El modelo presentado difiere del propuesto por Struhl

(1982) para la estructura cromatínica del promotor del gen his3. Em aquel caso la región reguladora no es sensible a la MNasa pero su presencia es imprescindible para la aparición de sensibilidad en la zona de la caja TATA. Sin embargo puesto que este autor no ha realizado estudios con DNasa I, no puede descartarse que ambos genes presenten una estructura similar..

La zona posterior a la terminación de la transcripción del gen SUC2 presenta también una estructura cromatínica especial, con un sitio hipersensible a la DNasa I y un posicionamiento muy regular de los nucleosomas. El sitio hipersensible a la DNasa I en la posición +1930 coincide muy aproximadamente con los dos sitios hipersensibles a la MNasa, situados alrededor de +1990. Probablemente representan un solo sitio accesible a nucleasas con pequeñas diferencias debidas a a las distintas características de estas dos nucleasas. La presencia de este otro sitio, cuya anchura se puede estimar en función de la anchura de la banda en unos 100 pb obliga a los nucleosomas laterales a disponerse en posiciones fijas. Resulta significativo, sin embargo, que mientras esta regularidad es muy evidente en, al menos, trece nucleosomas hacia la derecha del sitio hipersensible, por la izquierda de éste sólo hay un nucleosoma precisamente posicionado, y los siguientes tienen un "posicionamiento limitado". La hipótesis más probable es que la causa del posicionamiento regular de los nucleosomas no sea sólo la presencia de proteínas en el sitio

hipersensible que obliguen a los nucleosomas a disponerse externamente a él, pues en este caso la regularidad sucedería por ambos lados del sitio hipersensible, sino que influya también la secuencia de DNA adyacente. Esta influencia puede ser directa o indirecta mediante la acción de proteínas específicas de secuencia. Resultados de este tipo habían sido ya descritos en la región del centrómero de levadura (Bloom y Carbon, 1982).

En esta zona a la derecha del gen se producen también cambios relacionados con la actividad del gen. A la altura del cuarto punto de corte de la MNasa a la derecha del sitio hipersensible, a +2790, se produce un cambio significativo en la intensidad de las bandas. Mientras que en el estado reprimido se observan otras dos bandas más de mayor tamaño, que se corresponden con bandas del DNA desnudo, en el estado activo esta zona aparece difusa (ver fig. 36 y 37). Este resultado implica que en esta zona de la cromatina se produce una alteración relacionada con la actividad del gen SUC2. Quizá esta alteración está relacionada con la presencia cercana de sitios hipersensibles a la DNasa I. Sin embargo el significado regulador de esta región en relación a la actividad del gen SUC2 no está muy claro, puesto que esta región muestra muy poca homología entre varios genes SUC homólogos, a pesar de que su regulación por glucosa es muy similar y de que la zona anterior al +1800 muestra una gran homología de secuencia (Sarokin y Carlson, 1985; Carlson *et al.*, 1985).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1.- La sensibilidad a la DNasa I en el estado inactivo es uniforme a lo largo del gen SUC2 -salvo los sitios hipersensibles que se comentarán más adelante- y similar a la de otro gen de levadura, de expresión constitutiva, el ura3. Sin embargo con la represión de la síntesis del RNAm de 1.9 kb se produce un incremento de la sensibilidad a esta nucleasa. La zona responsable de este incremento de sensibilidad es la que se transcribe a RNAm, no experimentando variación los flancos del gen.

2.- La DNasa I reconoce tres sitios hipersensibles situados en las posiciones -430, -25 y +1930 (ver fig. 41). Los dos primeros están situados en la zona del promotor del gen. El tercer sitio es muy intenso y está situado después del final de la zona transcribible. Su posible relación con la función del gen SUC2 no está clara.

Se han encontrado también otros tres sitios hipersensibles situados a varias kb de distancia del inicio y del final de la zona transcribible, probablemente no relacionados con el gen SUC2.

3.- Los sitios hipersensibles encontrados parecen estar situados en zonas carentes de nucleosomas o, por lo menos, en DNA espaciador y no presentan estructuras de DNA

sensibles a la nucleasa S1, salvo el situado a varias kb a la derecha del final de transcripción. En ningún caso se han observado cambios dependientes del estado de actividad del gen.

4.- La nucleasa de restricción HindIII es capaz de reconocer y cortar sus secuencias diana situadas a la izquierda del inicio de transcripción, aún cuando éstas estén formando parte de la estructura cromatínica. No se han observado cambios con el estado de actividad del gen, aunque sí hay diferencias en la susceptibilidad a esta nucleasa entre los diferentes sitios de corte analizados.

5.- La MNasa digiere el flanco 5' y la zona transcribible del gen en estado de represión de forma similar a la observada para el gen testigo ura3. Sin embargo, una vez producidos los fragmentos de tamaño intermedio, éstos son más rápidamente degradados a oligonucleosomas de pequeño tamaño en la zona del flanco 5'. El flanco 3' tiene una cinética de digestión con MNasa más compleja producto, quizá, de su singular estructura nucleosomal.

En el estado activo del gen, tanto la zona transcribible como sus flancos se digieren más rápidamente con MNasa que el gen testigo ura3, y se mantiene la diferencia antes mencionada entre el flanco 5' y la zona transcribible.

6.- La MNasa ha servido para demostrar la organización nucleosomal del gen SUC2. El conjunto de este gen y sus flancos presenta una organización típica de levadura, con un espaciado promedio de 160-165 pb, sin variaciones debidas al estado de actividad o a la zona del gen considerada.

7.- Los estudios de marcaje terminal indirecto han demostrado que existen considerables diferencias en la disposición de los nucleosomas en las distintas regiones del gen (ver fig. 41). En el flanco 5', y especialmente en la zona transcribible, la disposición de los nucleosomas no es muy regular y no existe un posicionamiento muy fijo, aunque sí se han detectado posiciones preferentes de los nucleosomas. Sin embargo en el flanco 3' los nucleosomas se disponen de forma muy regular, cada 180-190 pb, especialmente a partir del sitio hipersensible en +1930. La gran regularidad del posicionamiento y el espaciado de 20-30 pb superior a lo habitual en levadura hacen de ésta una zona bastante singular en la cromatina de levadura.

8.- Se han observado cambios en las posiciones e intensidades de algunos puntos de corte de la MNAasa en la zona del promotor y dentro de la región posterior al sitio hipersensible en +1930. En base a estos cambios se ha propuesto un modelo de organización de la zona del promotor del gen basado en la presencia de proteínas específicas que interaccionarían con secuencias previamente descritas por

otros autores como implicadas en la expresión y regulación de la actividad del gen.

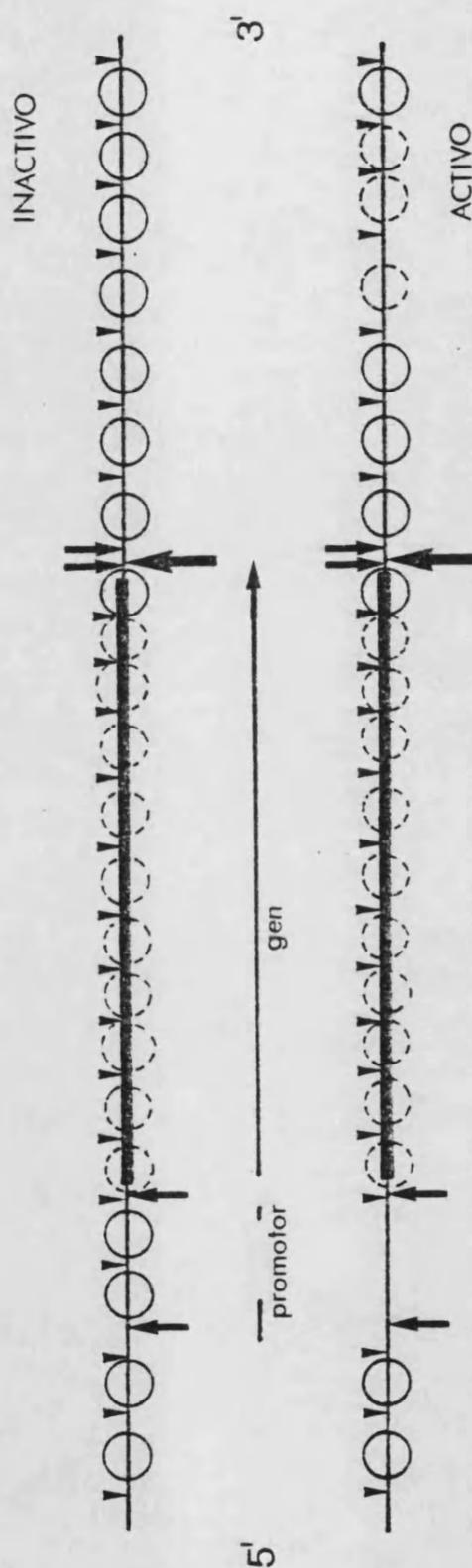


Figura 41.- Esquema resumen de la organización de la cromatina de la zona del gen *SUC2*.

Las flechas de la parte superior representan los puntos de corte de la MNasa específicos de la cromatina. Las flechas de la parte inferior representan los puntos de corte de la DNasa I en cromatina. El tamaño de las flechas es aproximadamente proporcional a la intensidad del punto de corte. Los círculos representan las posiciones propuestas de los cores nucleosomiales. Los círculos de línea discontinua representan las posiciones de los nucleosomas cuya posición no está claramente definida.

BIBLIOGRAFIA

ABRAMS, B.B.; HECKEL, R.; MIZUNAGA, T. y LAMPEN, J.O. (1978)
J. Bacteriol. 135, 809-817

ALLFREY, V.G. (1977)
en "Chromatin and Chromosome Structure" (Li, H.J.; Eckhardt,
R.A.; eds). pp 167-192. Academic Press. New York.

ALWINE, J.C.; KEMP, D.J. y STARK, G.R. (1977)
Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5350-5354

AMERSHAM INTERNATIONAL plc. (1985)
"Membrane transfer and detection protocols".

ANDERSON, J.N.; VANDERBLIT, J.N.; LAWSON, G.M.; TSAI, M. y
O'MALLEY, B.W. (1983)
Biochemistry 22, 21-30

BAVYKIN, S.G.; USACHENKO, S.I.; LISHANSKAYA, A.I.; SHICK,
V.V.; BELYAVSKY, A.V.; UNDRITSOV, I.M.; STROKOV, A.A.;
ZALENSKAYA, I.A. y MIRZABEKOV, A.D. (1985)
Nucleic Acids Res. 13, 3439-3459

BELLARD, M.; KUO, M.T.; DRETZEN, G. y CHAMBON, P. (1980)
Nucleic Acids Res. 8, 2737-2750

BERGMAN, L.W. y KRAMER, R.A. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 7223-7227

BLOOM, K.S.; AMAYA, E.; CARBON, J.; CLARKE, L.; HILL, A. y
YEH, E. (1984)

J. Cell Biol. 99, 1559-1568

BLOOM, K.S. y ANDERSON, J.N. (1978)

Cell 15, 141-150

BLOOM, K.S. y CARBON, J. (1982)

Cell 29, 305-317

BOEHRINGER-MANNHEIM (1985)

Boletin Informativo n° 3/85

BIRNBOIM, H.C. y DOLY, J. (1979)

Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523

BRADBURY, E.M. (1975)

en "The Structure and Function of Chromatin". Ciba
Foundation Symp. 28, 1-4. Elsevier.

BRANDT, W.F.; PATTERSON, K. y VON HOLT, C. (1980)

Eur. J. Biochem. 110, 67-76

BRANDT, W.F. y VON HOLT, C. (1976)

FEBS lett. 65, 386-390

BRANDT, W.F. y VON HOLT, C. (1982)

Eur. J. Biochem., 121, 501-510

BURNS, O.M. y BEACHAM, I.R. (1983)

Anal. Biochem. 135, 48-51

CARLSON, M. y BOTSTEIN, D. (1982)

Cell 28, 145-154

CARLSON, M. y BOTSTEIN, D. (1983)

Mol. Cell. Biol. 3, 351-359

CARLSON, M.; CELENZA, J.L. y ENG, F.J. (1985)

Mol. Cell. Biol. 5, 2894-2902

CARLSON, M.; OSMOND, B.C. y BOTSTEIN, D. (1980)

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XLV, 799-803

CARLSON, M.; OSMOND, B.C. y BOTSTEIN, D. (1981)

Genetics 98, 25-40

CARLSON, M.; OSMOND, B.C.; NEIGEBORN, L. y BOTSTEIN, D.

(1984)

Genetics 107, 19-32

CARLSON, M.; TAUSSIG, R.; KUSTU, S. y BOTSTEIN, D. (1983)

Mol. Cell. Biol. 3, 439-447

CELENZA, J.L. y CARLSON, M. (1984a)

Mol. Cell. Biol. 4, 49-53

CELENZA, J.L. y CARLSON, M. (1984b)

Mol. Cell. Biol. 4, 54-60

COSTLOW, N. y LIS, J.T. (1984)

Mol. Cell. Biol. 4, 1853-1863

DAVIE, J.R.; SAUNDERS, C.A.; WALSH, J.M. y WEBER, S.C.

(1981)

Nucleic Acids Res. 9, 3205-3216

DE LA FUENTE, G. y SOLS, A. (1962)

Biochim. Biophys. Acta 56, 42-62

DELANGE, R.J.; HOOPER, J. y SMITH, E.L. (1972)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 882

DOERFLER, W. (1983)

Annu. Rev. Biochem. 52, 93-124

EISSENBERG, J.C. y LUCCHESI, J.C. (1983)

J. Biol. Chem. 258, 13986-13991

ELGIN, S.C.R. (1981)

Cell 27, 413-415

EMERSON, B.M. y FELSENFELD, G. (1984)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 95-99

ESTRUCH, F. (1986)

Tesis Doctoral. Universitat de València.

ESTRUCH, F.; PEREZ-ORTIN, J.E. y FRANCO, L. (1986a)

Cell. Mol. Biol. 32, 195-199

ESTRUCH, F.; PEREZ-ORTIN, J.E.; JOSE, M.; PUIGDOMENECH, P. y
FRANCO, L. (1986b)

FEBS lett. 197, 179-182

FANGMAN, W.A y ZAKIAN; V.A. (1981)

en "The Molecular Biology of Yeast Saccharomyces". Cold
Spring Harbor Lab. Vol I, pp 27-58

FELSENFELD, G.; MCGHEE, J.; RAU, D.C.; WOOD, W.; NICKOL, J.
y BEHE, M. (1982)

UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. 26, 121-135

FERL, R.J. (1985)

Mol. Gen. Genet. 200, 207-210

FINCH, J.T. y KLUG, A. (1976)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1897-1901

FLINT, S.J. y WEINTRAUB, H.M. (1977)

Cell 12, 783-794

FRAGELIUS, T.J. y LIVINGSTON, D.M. (1984)

J. Mol. Biol. 173, 1-13

FRANCO, L.; JOHNS, E.W. y NAVLET, J.M. (1974)

Eur. J. Biochem. 45, 83-89

FRANCO, L. y LOPEZ-BRAÑA, I. (1978)

Nucleic Acids Res. 5, 3743-3757

FRITTON, H.P.; SIPPEL, A.E. y IGO-KEMENES, T. (1983)

Nucleic Acids Res. 11, 3467

GAREL, A. y AXEL, R. (1976)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3966-3970

GAREL, A.; ZOLAN, M. y AXEL, R. (1977)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4867-4871

GASCON, S. y LAMPEN, J.O. (1968)

J. Biol. Chem. 243, 1567-1572

GASCON, S.; NEUMANN, N.P. y LAMPEN, J.O. (1968)

J. Biol. Chem. 243, 1573-1577

GOLDSTEIN, A. y LAMPEN, J.O. (1975)

Meth. Enzymol. 420, 504-511

GOODWIN, G.H. y MATHEW, C.G.P. (1982)

en "The HMG Chromosomal Proteins". Academic Press, pp
193-221

GOODWIN, G.H.; NICOLAS, R.H.; COCKERILL, P.N.; ZAVOU, S. y
WRIGHT, C.A. (1985)

Nucleic Acids Res. 13, 3560-3579

GORDON, C.N. (1977)

J. Cell. Sci. 24, 81-93

GOTTESFELD, J.M.; GARRAD, W.T.; BAGI, G.; WILSON, R.F. y
BONNER, J. (1974)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2193-2197

GOTTSCHLING, D.E.; PALEN, T.E. y CECH, T.R. (1983)

Nucleic Acids Res. 11, 2093-2109

GROSSMANN, M.K. y ZIMMERMANN, F.K. (1979)

Mol. Gen. Genet. 175, 223-229

HARTMAN, P.G.; CHAPMAN, G.E.; MOSS, T. y BRADBURY, E.M.
(1977)

Eur. J. Biochem. 77, 45-51

HEREFORD, L.M. y ROSBASH, M. (1977)

Cell 10, 453-462

HEWISH, D.R. y BURGOYNE, L.A. (1973)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504-510

IGO-KEMENES, T.; HÖRZ, W. y ZACHAU, H.G. (1982)

Annu. Rev. Biochem. 51, 89-121

ISENBERG, I. (1979)

Annu. Rev. Biochem. 48, 159-191

JOHNS, E.W. (1982)

en "The HMG Chromosomal Proteins". Academic Press, pp 1-7.

JOHNSON, J.D.; DUNVAN, A.S. y BONNER, J. (1974)

Int. Rev. Cytol. S. 4, 273

KIMURA, T.; MILLS, F.; ALLAM, J. y GOULD, H. (1983)

Nature 306, 709-712

KLUG, A.; RHODES, D.; SMITH, J.; FINCH, J.T, y THOMAS, J.O.
(1980)

Nature 287, 509-516

KORNBERG, R.D. (1974)

Science 184, 868-871

KORNBERG, R.D. (1981)

Nature 292, 579-580

KORNBERG, R.D. y THOMAS, J.O. (1974)

Science 184, 865-868

KUO, M.T.; IYER, B. y SCHWARTZ, R.J. (1982)

Nucleic Acids Res. 10, 4565-4579

LABARCA, C. y PAIGEN, K. (1980)

Anal. Biochem. 102, 344-352

LARSEN, A. y WEINTRAUB, H. (1982)

Cell 29, 609-622

LAWSON, G.M.; TSAI, M.J. y O'MALLEY, B. W. (1980)

Biochemistry 19, 4403-4411

LEE, K.P.; BAXTER, H.J.; GUILLEMETE, J.G.; LAWFORD, H.G. y
LEWIS, D.N. (1982)

Can. J. Biochem. 60, 379-388

LEVY-WILSON, B. y DIXON, G.H. (1979)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1682-1686

LEVY-WILSON, B. ; WATSON, D.C. y DIXON G.H. (1979)

Nucleic Acids Res. 6, 259-274

LIBERATOR, P.A. y LINGREL, J.B. (1984)

J. Biol. Chem. 259, 15497-15501

LINXWEILER, W. y HÖRZ, W. (1985)

Cell 42, 281-290

LIPCHITZ, L. y AXEL, R. (1976)

Cell 9, 355-364

LIVINGSTON, D.M. (1982)

J. Mol. Biol. 160, 397-410

LIVINGSTON, D.M. y HAHNE, S. (1979)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3727-3731

LOHR, D. (1981)

Biochemistry 20, 5966-5972

LOHR, D. (1983a)

Nucleic Acids Res. 11, 6755-6773

LOHR, D. (1983b)

Biochemistry 22, 927-934

LOHR, D. (1983c)

Biochemistry 22, 4527-4534

LOHR, D. (1984)

Nucleic Acids Res. 12, 8457-8474

LOHR, D.; CORDEN, J.; TATCHELL, K.; KOVACIC, R.T. y VAN
HOLDE, V.E. (1977)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 79-83

LOHR, D. y HEREFORD, L. (1979)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4285-4288

LOHR, D. y IDE, G. (1979)

Nucleic Acids Res. 6, 1909-1927

LOHR, D. y VAN HOLDE, K.E. (1975)

Science 188, 165-166

- LOIDL, A.; LOIDL, P.; RUSCHENDORF, D. y GRÖBNER, P. (1983)
Nature 305, 446-448
- LONG, G.M.; BRAJKOVICH, M. y SCOTT, J.E. (1985)
Mol. Cell. Biol. 5, 3124-3130
- LOPEZ-RODAS, G.; PEREZ-ORTIN, J.E.; TORDERA, V.; SALVADOR, M.L. y FRANCO, L. (1985)
Arch. Biochem. Biophys. 239, 184-190
- LOWENHAUPT, K.; KEENE, M.A.; CARTWRIGHT, I.L. y ELGIN, S.C.R. (1982)
Stadler Symp. 14, 69-85
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. y SAMBROOCK, J. (1982)
"Molecular Cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Lab.
- MARDIAN, J.K.W. y ISENBERG, I. (1978)
Biochemistry 17, 3825-3833
- MARIAN, B. y WINTERSBERGER, V. (1982)
FEBS lett. 139, 72-76
- MAXAM, A.M. y GILBERT, W. (1977)
Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 64, 560-564

MAYES, E.L.V. (1982)

en "The HMG Chromosomal Proteins". Academic Press, pp 9-40

McGHEE, J.D. y FELSENFELD, G. (1983)

Cell 32, 1205-1215

McGHEE, J.D.; NICKOL, J.M.; FELSENFELD, G. y RAU, D.C.
(1983)

Cell 33, 831-841

McGHEE, J.D.; RAU, D.C.; CHARNEY, E. y FELSENFELD, G. (1980)

Cell 22, 87-96

McGHEE, J.D., WOOD, W.; DOLAN, M.; ENGEL, J.D. y FELSENFELD,
G. (1981)

Cell 27, 45-55

MEINKOTH, J. y WAHL, G (1984)

Anal. Biochem. 138, 267-284

MENGERITSKY, G. y TRIFONOV, E.N. (1983)

Nucleic Acids Res. 11, 3833-3851

NASMYTH, K.A. (1982)

Cell 30, 567-578

NEDOSPASOV, S. y GEORGIEV, G. (1980)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 532-539

NEIGEBORNI, L. y CARLSON, M. (1984)

Genetics 108, 845-848

NELSON, D.A. (1982)

J. Biol. Chem. 257, 1565-1568

NELSON, D.A.; BELTZ, W.R. y RILL, R.L. (1977)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1343-1347

NELSON, R.G. y FANGMAN, W.L. (1979)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 6515-6519

NOLL, M. (1976)

Cell 8, 349-355

OLINS, A.L. y OLINS, A.D. (1974)

Science 183, 330-332

PARDON, J.F.; WILKINS, M.H.F. y RICHARDS, B.M. (1967)

Nature 215, 508-509

PARENT, S.A.; FENIMORE, C.M. y BOSTIAN, K.A. (1985)

Yeast 1, 83-138

PAULI, U.H.; SEEBECK, T. y BRAUN, R. (1982)

Nucleic Acids Res. 10, 4121-4133

PAULSON, J.R. y LAEMLI, U.K. (1977)

Cell 12, 817-828

PEDERSON, D.S.; SHUPT, K. y GOROVSKY, M.A. (1984)

Nucleic Acids Res. 12, 8489-8507

PEREZ-ORTIN, J.E. (1983)

Tesina de Licenciatura. Universidad de Valencia. //

PEREZ-ORTIN, J.E.; LOPEZ-RODAS, G.; TORDERA, V.; SALVADOR, M.L. y FRANCO, L. (1983)

15 FEBS Meeting, p. 236. Bruselas.

PEREZ-ORTIN, J.E.; RAMON, D.; FERRER, S. y TORDERA, V. (1986)

Biochem. Educ. 14, (en prensa).

PERLMAN, D.; RANEY, P. y HALVORSON, H.O. (1984)

Mol. Cell. Biol. 4, 1682-1688

PERRY, M. y CHALKLEY, R. (1981)

J. Biol. Chem. 256, 3313-3318

PETERSEN, J.G.L. y SHERIDAN, W.F. (1978)

Calrsberg Res. Commun. 43, 415-422.

PLIKAYTIS, B.D.; CARBONE, G.M.; EDMONDS, P. y MAYER, L.W.

(1986)

Anal. Biochem. 152, 346-364

PRIOR, C.P.; CANTOR, C.R.; JOHNSON, E.M.; LITAN, V.C. y

ALLFREY, V.G. (1983)

Cell 34, 1033-1042

PROFFIT, J.H. (1985)

Mol. Cell. Biol. 5, 1522-1524

RATTNER, J.B.; SAUNDERS, C.; DAVIE, J.R. y HAMKALO, B.A.

(1982)

J. Cell Biol. 92, 217-222

REEVES, R. (1984)

Biochim. Biophys. Acta 782, 343-393

RENZ, M.; NEHLS, P. y HOZIER, J. (1977)

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 245-252

RICH, A. (1983)

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 1-12

RIGBY, P.W.J.; DIECKMANN, M.; RHODES, C. y BERG, P. (1977)

J. Mol. Biol. 113, 237-251

SAROKIN, L. y CARLSON, M. (1984)

Mol. Cell. Biol. 4, 2750-2757

SAROKIN, L. y CARLSON, M. (1985a)

Nucleic Acids Res. 13, 6089-6103

SAROKIN, L y CARLSON, M. (1985b)

Mol. Cell. Biol. 5, 2521-2526

SAUTIERE, P.; WOUTOURS-TYROU, D. LAYNE, B. y BISERTE, G.
(1975)

en "The Structure and Function of Chromatin". Ciba
Foundation Symp. 28, 77-93. Elsevier.

SCOTT, W.A. y WINGMORE, D.J. (1978)

Cell 15, 1511-1518

SILHAVY, T.J.; BERMAN, M.L. y ENQUIST, L.W. (1984)

"Experiments with gene fusions". Cold Spring Harbor Lab.

SIMPSON, R.T. (1978)

Biochemistry 17, 5524-5531

SLEDZIEWSKI, A. y YOUNG, E.T. (1982)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 253-256

SMITH, B.J.; HARRIS, M.R.; SIGOURNAY, C.M. y BUSTIN, M.
(1984a)

Eur. J. Biochem. 138, 309-317

SMITH, R.D.; YU, J. y SEALE, R.L. (1984b)

Biochemistry 23, 785-790

SOMMER, A. (1978)

Mol. Gen. Genet. 161, 323-331

SOUTHERN, E.M. (1975)

J. Mol. Biol. 98, 503-517

SPIKER, S.; MARDIAN, J.K.W. y ISENBERG, I. (1978)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 129-135

STADLER, J.; GROUDINE, M.; DODGRUNE, J.B.; ENGEL, J.D. Y
WEINTRAUB, H. (1980)

Cell 19, 973-980

STRUHL, K. (1982)

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 901-910

STRUHL, K. (1984)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7865-7869

SUBIRANA, J. A.; MUÑOZ-GUERRA, S.; AGMAMI, J.; RADESMACHER,
M. y FRANK, J. (1985)

Chromosoma 91, 377-390

SZENT-GIORGI, L. y ISENBERG, I. (1983)

Nucleic Acids Res. 11, 3717-3736

TAUSSIG, R. y CARLSON, M. (1983)

Nucleic Acids Res. 11, 1943-1954

THOMA, F.; BERGMAN, L.W. y SIMPSON, R.T. (1984)

J. Mol. Biol. 177, 715-733

THOMA, F. y SIMPSON, R.T. (1985)

Nature 315, 250-252

THOMAS, J.O. y FURBER, V. (1976)

FEBS lett. 66, 274-278

TONINO, G.J.M. y ROZIJN, T.H. (1966)

Biochim. Biophys. Acta 124, 427-431

TRAVIS, G.H.; COLAVITO-SHEPANSKI, M. y GRUNSTEIN, M. (1984)

J. Biol. Chem. 259, 14406-14412

TRIADOU, P.; CREPIN, M.; GROS, F. y LELONG, J.C. (1982)

Biochemistry 24, 6060-6065

VIDALI, G.M.; BOFFA, L.C.; BRADBURY, E.M. y ALLFREY, V.R.

(1978)

Biochemistry 15, 2239-2243

WALKER, J.M. (1982)

en "The HMG Chromosomal Proteins". Academic Press, pp 69-87

WASYLYK, B. (1985)

en "Chromosomal Proteins and Gene Expression", pp 103-119.

Plenum Press. New York.

WEBER, S. y ISENBERG, I. (1980)

Biochemistry 19, 2236-2240

WEINTRAUB, H. y GROUDINE, M. (1976)

Science 193, 848-856

WEINTRAUB, H.; LARSEN, A. y GROUDINE, M. (1981)

Cell 24, 333-344

WEISBROD, S. (1982)

Nature 297, 289-295

WEISBROD, S. y WEINTRAUB, H. (1979)

Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 630-634

WHITE, F.F.; TAYLOR, B.H.; HUFFMAN, G.A.; GORDON, M.P. y
NESTER, E.W. (1985)

J. Bacteriol. 164, 33-44

WINTERSBERGER, V. ; SMITH, P. y LETNARSKY, K. (1973)

Eur. J. Biochem. 33, 123-130

WORCEL, A.; GARGIULO, G.; JESSEE, B.; UDUARDY, A.; LOUIS, C.
y SCHEDL, P. (1983)

Nucleic Acids Res. 11, 421-439

WORKMAN, J.L. y LANGMORE, J.P. (1985)

Biochemistry 24, 7486-7497

WU, C. (1980)

Nature 286, 854-860

WU, C. (1984a)

Nature 309, 229-234

WU, C. (1984b)

Nature 311, 81-84

WU, C.; WONG, Y.C. y ELGIN, S.C.R. (1979a)

Cell 16, 807-814

WU, C.; WONG, Y.C. y ELGIN, S.C.R. (1979b)

Cell 16, 799-806

WU, K.C.; STRAUSS, F. y VARSHARSKY, A. (1983)

J. Mol. Biol. 170, 93-117

YAGI, M.; GELINAS, R.; ELDER, J.T.; PERETZ, M.;
PAPAYANNOPOULOU, T.; STAMATOYANNOPOULOS, G. y GROUDINE, M.
(1986)

Mol. Cell. Biol. 6, 1108-1116

YOUNG, D. y CARROLL, D. (1983)

Mol. Cell. Biol. 3, 720-730



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

D. José Enrique Pérez Ortiz

la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Valencia, a 23 de Septiembre de 1986

El Secretario,

El Presidente

