

B

1.V. 3/4

UNIVERSITAT DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTRUCTURA DE LA  
CROMATINA DE LAS REGIONES  
REGULADORAS DEL GEN  
SUC2 DE  
Saccharomyces cerevisiae.

Trabajo presentado por

EMILIA MATALLANA REDONDO

para optar al grado de

Doctor en Ciencias

Biológicas.

BIBLIOTECA  
FACULTAT DE C. BIOLÒGQUES  
VALÈNCIA

UMI Number: U607663

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 U607663

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

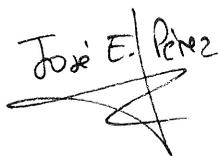
Ri. 1180004x

R. 7759

Don José Enrique Pérez Ortín, Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de Valencia.

CERTIFICA: que Doña Emilia Matallana Redondo ha realizado bajo su dirección en este laboratorio el trabajo con el título de "Estructura de la cromatina de las regiones reguladoras del gen SUC2 de Saccharomyces cerevisiae".

Valencia, 11 de Septiembre de 1989

A handwritten signature in black ink, reading "José E. Pérez". The signature is stylized, with a large, sweeping flourish at the bottom that extends to the left and then loops back up towards the right.

Fdo: José Enrique Pérez Ortín

Al finalizar este trabajo deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que, de una forma u otra, han colaborado a la realización del mismo.

A José Enrique, por la dedicación, la ayuda y, también, la amistad que siempre me ha ofrecido.

A Luis Franco, por su confianza y sus consejos siempre que los he necesitado.

A Paco Estruch, por la ayuda que siempre será todo lo que de él he aprendido.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por el grato ambiente de trabajo y por su amistad. En especial a los que son o han sido mis compañeros de laboratorio: Marce, Juan Carlos, Rosa, Merxe, Ricardo, Jaime y Carlos así como a José Antonio Darós y a Ester Galbis por su desinteresada y seria ayuda. También a José Luis Rodríguez, por la elaboración de programas de ordenador, y a Pino, por su amabilidad y su paciencia durante la escritura de este trabajo.

A José Hernandez y a Concha Gonzalez por la amabilidad y la eficacia con que, día a día, realizan su trabajo.

A los Departamentos de Microbiología y de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de Valencia, por la buena disposición con que siempre me han prestado su ayuda y, especialmente, a Sergio Ferrer, a Carmina Tortajada, Ramón Gonzalez, Nuria Paricio y Manuel Pérez.

A Daniel Ramón por haber dedicado mucho tiempo a orientarme, aconsejarme y enseñarme cosas tan importantes como el valor de una buena amistad.

A mi familia y a mis amigos, especialmente a Toni por su apoyo, su confianza y su inmensa paciencia, todos ellos esenciales para mí.

Este trabajo ha sido posible gracias al disfrute de una Beca del Plan de Formación de Personal Investigador del M.E.C.

## ABREVIATURAS

-Bisacrilamida:	N, N' metilen-bis-acrilamida.
-BSA:	Seroalbúmina bovina.
-DEPC:	Dietil pirocarbonato.
-Dimetil-POPOP:	Dimetilo de 2,2'-p-fenilén-bis-(5-feniloxazol).
-DNasaI:	Desoxirribonucleasa I.
-D.O.:	Densidad óptica.
-DTT:	Ditiotreitol.
-EDTA:	Etilén diamino tetraacético, sal sódica.
-IPTG:	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido.
-kb:	Kilo pares de bases.
-MNasa:	Nucleasa de micrococo.
-mRNA:	RNA mensajero.
-pb:	Pares de bases.
-PMSF:	Fluoruro de fenil-metan-sulfonilo.
-PPO:	2, 5-difeniloxazol.
-p/v:	Peso/volumen.
-PVP:	Polivinilpirrolidona.
-RNA:	Acido ribonucleíco.
-RNasa:	Ribonucleasa.
-SDS:	Dodecil sulfato sódico.
-TCA:	Acido tricloroacético.
-TEMED:	N, N',N'-tetrametil etilén diamino.
-Tris:	Tris(hidroximetil)amino metano.
-v/v:	Volumen/volumen.
-X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.

## **INDICE**

## INTRODUCCION

1. Consideraciones generales	1
2. Cromatina activa	2
3. El gen <u>SUC2</u> de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	6

OBJETIVOS	14
-----------	----

## MATERIALES Y METODOS

1. Materiales	16
1.1. Productos de especial interés	16
1.2. Medios de cultivo	17
1.3. Cepas y plásmidos	19
2. Preparación del material biológico	20
2.1. Construcción de plásmidos	20
2.1.1. Defosforilación de extremos 5'P	20
2.1.2. Rellenado de extremos por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I	21
2.1.3. Reacción de ligamiento	22
2.2. Transformación de <u>E. coli</u>	22
2.3. Aislamiento de plásmidos	23
2.4. Transformación de levaduras	26
2.5. Obtención de protoplastos de levadura	27
2.6. Obtención de núcleos de levadura	28
2.7. Digestiones con nucleasas y extracción del DNA de las muestras	28
2.8. Extracción de RNA total de levadura	30
3. Técnicas analíticas	31
3.1. Valoración de DNA y de proteínas	31
3.2. Valoración de la actividad invertasa	32

3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	34
3.4. Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes	35
3.5. Electroforesis en poliacrilamida	36
3.6. Densitometrado y cálculo de tamaño de los fragmentos	36
4. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	37
4.1. Digestiones con endonucleasas de restricción	37
4.2. Aislamiento de DNA a partir de geles	39
4.3. Marcaje radiactivo de DNA mediante "nick-translation"	40
4.4. Transferencia de DNA y de RNA a filtros	42
4.5. Hibridación de DNA y de RNA sobre filtros con sondas radiactivas	44
4.6. Autorradiografía de los filtros hidridados	46
4.7. Predicción teórica del posicionamiento nucleosomal	46
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
1. Consideraciones generales sobre la metodología	47
2. Análisis fino de la estructura de la cromatina del promotor del gen <u>SUC2</u>	50
3. Estructura de la cromatina del promotor del gen <u>SUC2</u> en cepas mutantes en su regulación	59
4. Estructura de la cromatina del flanco 3' del gen <u>SUC2</u>	72
4.1. Consideraciones teóricas	72

4.2. Efecto de los sitios hipersensibles a la DNasa I sobre el posicionamiento de los nucleosomas en el flanco 3' del gen <u>SUC2</u>	81
4.3. Estructura de la cromatina del flanco 3' del gen <u>SUC2</u> en cepas mutantes en su regulación	87
4.4. Estudio del efecto de deleciones del flanco 3' del gen <u>SUC2</u> sobre su expresión	92
4.5. Dependencia de los cambios estructurales del flanco 3' del gen <u>SUC2</u> respecto al proceso de transcripción	96
CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFIA	104

## **INTRODUCCION**

## 1. Consideraciones generales.

La comprensión de los mecanismos que gobiernan la regulación de la expresión génica en organismos eucarióticos es uno de los grandes objetivos actuales de la investigación en Biología Molecular. El desarrollo de las técnicas de DNA recombinante ha contribuido enormemente a la ampliación de nuestros conocimientos sobre los elementos génicos implicados no sólo en la codificación de la información genética sino también en la regulación de su expresión de acuerdo con las necesidades fisiológicas a lo largo de la vida de las células. Dichos elementos forman parte de lo que se conoce como "promotor" de los genes, una región del DNA localizada normalmente delante de la región codificante que contiene las secuencias de reconocimiento necesarias para que la RNA polimerasa inicie correctamente la transcripción del mRNA así como las secuencias reguladoras a las que se unen los factores activadores o represores responsables de la expresión regulada del gen.

En organismos eucarióticos, el material genético, el DNA, se encuentra confinado en el núcleo celular gracias a su empaquetamiento en una compleja estructura, denominada cromatina, de la que también forman parte proteínas, fundamentalmente histonas, y probablemente RNA (Igo-Kemenes et al., 1982; Kornberg, 1977). La cromatina permite una enorme reducción de la longitud del DNA debido al alto grado de compactación que se consigue en los sucesivos niveles de organización que conducen a la estructura de los cromosomas (Kornberg, 1974, 1977; Finch y Klug, 1976; McGhee et al., 1983; Paulson y Laemmli, 1977). Sin embargo, esta estructura parece incompatible con la necesidad de accesibilidad del DNA en procesos como su replicación o su transcripción, lo que sugiere que la

cromatina debe ser una estructura dinámica lo suficientemente versátil como para poder cumplir todas sus funciones. Esta versatilidad es un hecho plenamente demostrado que ha llevado a distinguir entre cromatina activa (o potencialmente activa) y cromatina inactiva en función de una serie de características distintivas que se refieren fundamentalmente a su estructura pero que también parecen afectar a su composición (Reeves, 1984).

## 2. Cromatina activa.

El estudio de los rasgos estructurales característicos de la cromatina activa se ha abordado principalmente mediante digestión con nucleasas a la que es claramente más sensible que la cromatina inactiva (Igo-Kemenes et al., 1982; Weisbrod, 1982; Reeves, 1984). El uso de diferentes nucleasas ha permitido detectar diferentes propiedades de la cromatina de manera que actualmente existe una serie de rasgos a los que se presta especial atención (Eissenberg et al., 1985). Un hecho ampliamente difundido es la existencia de pequeños tramos de cromatina (50-400 pb) con una especial sensibilidad a la DNasa I y normalmente asociados a elementos reguladores, por lo que se han denominado sitios hipersensibles y se han relacionado con mecanismos de regulación transcripcional (Eissenberg et al., 1985; Elgin, 1988). Fueron inicialmente descubiertos por Wu en núcleos de células de Drosophila sometidas a choque térmico, asociados a los promotores de los denominados genes "heat-shock" (Wu, 1980) pero hoy se conoce su existencia en prácticamente todos los genes eucarióticos estudiados, tanto en células animales como en vegetales y hongos (Eissenberg et al., 1985) y no sólo en promotores sino también en otras

localizaciones (Groudine y Weintraub, 1981; Khory y Gruss, 1983; Gluzman y Shenk, 1983; Nedospasov y Georgiev, 1980).

Respecto a la naturaleza molecular de los sitios hipersensibles, se piensa que son tramos de DNA desprovistos de nucleosomas (McGhee et al., 1981) en los que en algunos casos se ha demostrado la unión de proteínas específicas (Wu, 1984; Emerson y Felsenfeld, 1984). Por su amplia distribución y por su asociación con zonas implicadas en la regulación génica se les ha otorgado un papel importante en el reconocimiento por la maquinaria transcripcional y por las proteínas reguladoras aunque es posible que intervengan en otros procesos relacionados con el funcionamiento general del material genético puesto que también se han encontrado en zonas no génicas como orígenes de replicación (Fagrelis y Livingston, 1984) y centrómeros (Bloom y Carbon, 1982).

Otra de las características importantes de la cromatina, descubierta mediante el uso de nucleasas, es la existencia de un posicionamiento de los nucleosomas, entendiendo por posicionamiento la localización precisa con respecto a la secuencia de los nucleosomas sobre un DNA no repetitivo (Van Holde, 1985). Su importancia reside en la posibilidad de determinar la accesibilidad de regiones reguladoras debido a un posicionamiento estricto de los nucleosomas en zonas adyacentes. El estudio de las posiciones de los nucleosomas se aborda mediante digestión de la cromatina con nucleasa de micrococo, que corta preferentemente en el DNA espaciador entre nucleosomas, y utilizando la técnica del marcaje terminal indirecto, puesta a punto por Wu (1980) para la localización de sitios hipersensibles a la DNasa I y adaptada por Nedospasov y Georgiev

(1980) para la localización de puntos de corte de la nucleasa de micrococo.

Se han encontrado nucleosomas posicionados en muchos casos (Worcel et al., 1983; Wu, 1980; Szent-Györgyi et al., 1987; Almer et al., 1986) y también variaciones en el posicionamiento dependientes del estado de actividad del gen (Young y Carroll, 1983; Almer et al., 1986).

Respecto a las causas moleculares del posicionamiento de los nucleosomas se han planteado varias hipótesis (Simpson, 1986). En algunos casos se ha encontrado una localización de los nucleosomas dependiente de la secuencia de DNA (Drew y Calladine, 1981; Mengeritsky y Trifonov, 1983) mientras que en otros, y de forma no excluyente, resulta de la existencia de proteínas específicas que, de forma indirecta, obligan a los nucleosomas a situarse fuera de ciertas regiones del DNA por un mecanismo estocástico (Kornberg y Stryer, 1988). Más recientemente se ha postulado un tercer mecanismo dependiente de la formación de estructuras de orden superior en ciertas regiones de la cromatina y no excluyente con los dos anteriores (Thoma y Zatchej, 1988).

Es fácil imaginar la importancia que la estructura de la cromatina debe tener en zonas del genoma donde existe un continuo recambio de factores proteicos unidos al DNA, como es el caso de los promotores. La unión de estas proteínas no sólo depende de la estructura de la cromatina, como determinante de la accesibilidad del DNA, sino que además influye en dicha estructura. Esto conduce a una relación entre la estructura y la función en la cromatina que ha sido y es ampliamente estudiada gracias a la posibilidad de investigar dicha relación en genes concretos. Este tipo de estudios requiere la disponibilidad de sondas de esos ge-

nes, un buen conocimiento de los mismos y la elección de un sistema de trabajo fácilmente manipulable. Desde este punto de vista, la levadura Saccharomyces cerevisiae constituye, sin lugar a dudas, un organismo idóneo debido al buen conocimiento de su genética y a la facilidad de transformación con DNAs exógenos (Pérez-Ortín et al., 1989). Además, presenta una elevada tasa de transcripción y su genoma se organiza en una cromatina típica, con nucleosomas de 160-165 pb de tamaño promedio (Nelson et al., 1977), a pesar de estar, en general, menos condensada que la de eucariotas superiores (Franco y López-Braña, 1978; Lee et al., 1982). Este hecho se ha relacionado con su elevada tasa de transcripción (Lohr y Ide, 1979) y también con la carencia de histona H1 y, por tanto, de partículas tipo cromatosoma (Szent-Györgyi y Isenberg, 1983). Los rasgos estructurales de la cromatina antes mencionados son también característicos de la cromatina de levadura que además presenta otras características típicas de eucariotas a pesar de su lejanía evolutiva con eucariotas superiores. En este sentido es especialmente llamativa la similitud en los mecanismos de regulación de la transcripción que se refleja en una casi completa equivalencia de los elementos característicos de los promotores de levadura (Struhl, 1987) con los de eucariotas superiores (Stanway et al., 1987; Guarente, 1988).

Una buena prueba de las ventajas que ofrece la levadura como modelo de organismo eucariótico para el estudio de la relación estructura/función en la cromatina es la enorme cantidad de datos obtenidos a partir de trabajos realizados con muchos de sus genes. De especial interés son los realizados con genes de actividad transcripcional regulable según las características del medio de cultivo, debido a la facilidad de control del estado funcional y de correlación con la estructura cromatínica

encontrada. Trabajos de este tipo han puesto de manifiesto que también en la mayoría de los genes de levadura existen sitios hipersensibles a la DNasa I asociados a las regiones de los promotores responsables de la regulación transcripcional. Estos sitios hipersensibles localizados en el promotor de los genes suelen sufrir cambios estructurales durante el proceso de activación (Lohr y Hopper, 1985; Almer et al., 1986; Pérez-Ortín et al., 1986a) que normalmente van acompañados de una alteración en el posicionamiento de los nucleosomas adyacentes que pueden incluso desaparecer, como se ha demostrado en los genes PHO5 (Almer et al., 1986) y TDH3 (Paulovic y Hörz, 1988).

### 3. El gen SUC2 de Saccharomyces cerevisiae.

El gen SUC2 de S. cerevisiae es un ejemplo de éste tipo de genes. Pertenece a una familia de genes, denominados genes SUC, que codifican la  $\beta$ -fructofuranosidasa o invertasa, enzima cuya actividad hidrolítica sobre la sacarosa permite a las levaduras utilizar dicho disacárido como fuente de carbono. Existen, en Saccharomyces, dos formas de invertasa. Una de ellas, mayoritaria, es una manoproteína de secreción cuya producción está regulada por la concentración de glucosa de manera que a altas concentraciones se reprime su síntesis (Gascón y Lampen, 1968). La otra forma de la invertasa, minoritaria e intracelular, no está controlada por la concentración de glucosa (Gascón y Lampen, 1968) y su función es desconocida puesto que no existe sacarosa en el interior de las células de levadura (De la Fuente y Sols, 1962).

Ambas formas de la invertasa son codificadas por todos los genes de la familia SUC de la que se han descrito 6 loci distintos: SUC1-5 y SUC7 (Carlson et al., 1980). Diferentes cepas de levadura pueden poseer

cero, uno o varios alelos SUC<sup>+</sup>. Las cepas que no poseen alelos SUC<sup>+</sup> en ninguno de los 6 loci son denominadas suc<sup>o</sup> (Carlson *et al.*, 1985). Sólo el alelo suc2<sup>o</sup> corresponde a un gen mutante mientras que los demás alelos suc<sup>o</sup> carecen de secuencias de DNA homólogas a los alelos SUC (Carlson y Botstein, 1983). Esto último, junto con el hecho de que el gen 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 (Carlson *et al.*, 1985).

Todos los genes SUC presentan alta homología de secuencia en la región codificante y en sus flancos aunque en el gen SUC2 se limita a las regiones codificante y reguladoras (Sarokin y Carlson, 1985; Carlson *et al.*, 1985; Hohmann y Gozalbo, 1988). A pesar de esta homología, los niveles transcripcionales de los 6 genes SUC muestran una clara variación siendo SUC1 el que presenta mayor grado de desrepresión de la síntesis de invertasa a bajas concentraciones de glucosa (Del Castillo y Zimmermann, 1987).

El gen SUC2 es el más estudiado de la familia SUC. Como se muestra en la Figura 1, posee dos inicios de transcripción alternativos que permiten la transcripción de dos mRNAs de 1.8 y 1.9 kb (Carlson y Botstein, 1982). El mRNA de 1.8 kb codifica la invertasa intracelular y el de 1.9 kb la invertasa de secreción ya que posee una secuencia codificante para el péptido señal (Carlson *et al.*, 1983). Se han identificado los elementos componentes del promotor. La caja TATA se localiza entre -124 y -133 y existe una región reguladora, situada entre -500 y -418, responsable de la capacidad de desrepresión de la síntesis de invertasa a

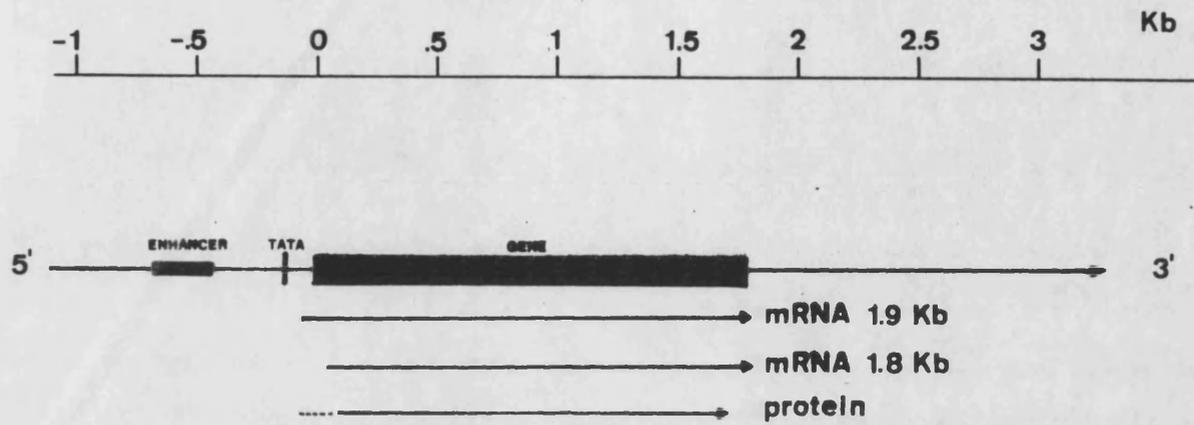


Figura 1. Mapa esquemático del gen *SUC2*.

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*; X: *XbaI*; K: *KpnI*. 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 3 líneas representan los 2 posibles transcritos y la zona que se traduce a proteína.

bajas concentraciones de glucosa (Sarokin y Carlson, 1984). Ambos elementos son imprescindibles para la síntesis regulada de la invertasa de secreción pero ninguno afecta a la síntesis del mRNA de 1.8 kb cuya regulación sería independiente de la del mRNA de 1.9 kb (Perlman et al., 1984).

La síntesis de la invertasa de secreción está sujeta a una regulación compleja que resulta de la superposición del mecanismo general de represión por glucosa y un mecanismo específico de desrepresión a bajas concentraciones de glucosa (Entian, 1986; Neigeborn y Carlson, 1987). Se han identificado mutantes constitutivos para la síntesis de invertasa que parecen estar implicados en el primero de estos mecanismos (Entian y Zimmermann, 1980). Mutaciones en los genes HEX1 (también denominado HXK2, GIR1), HEX2 (REG1) y CAT80 impiden la represión por glucosa y se ha sugerido que podrían tener una función informadora de los niveles de glucosa para otros genes implicados en mecanismos específicos de regulación (Neigeborn y Carlson, 1987).

Respecto a la desrepresión específica, se conocen dos familias de genes implicadas en la regulación del gen SUC2. Los genes SNF son necesarios para la desrepresión del gen SUC2 en ausencia de glucosa (Neigeborn y Carlson, 1984). Se han identificado los productos génicos de varios de ellos y se ha encontrado que el gen SNF1 (CAT1, CCR1) codifica una proteín-quinasa (Celenza y Carlson, 1986) cuya expresión no está regulada por glucosa (Celenza y Carlson, 1984) mientras que SNF3 interviene en procesos de transporte de alta afinidad de la glucosa (Bisson et al., 1987) y está regulado por la concentración de glucosa (Neigeborn et al., 1986). Los genes SNF2 y SNF5 parecen ser factores

generales de transcripción puesto que también son necesarios para la expresión de otros genes no sujetos a regulación por glucosa (Abrams et al., 1986).

Los genes SSN están implicados en la regulación negativa de la expresión del gen SUC2 puesto que mutaciones en dichos genes suprimen los efectos de mutaciones snf (Carlson et al., 1984). Aunque se conocen varios miembros de la familia no se sabe con certeza cuál es su papel en la regulación. Se ha postulado que el producto del gen SSN6 podría ser la diana de la protein-quinasa SNF1 o bien ser una fosfatasa de acción antagónica (Schultz y Carlson, 1987). Las mutaciones en el gen SSN20 suprimen los efectos de mutaciones snf2, snf5 y snf6 así como de deleciones en la región reguladora presente en el promotor del gen SUC2 por lo que se ha propuesto que debe codificar alguna proteína de papel general en procesos de transcripción (Neigeborn et al., 1987).

También se conoce la estructura cromatínica del gen SUC2 y de sus flancos determinada mediante digestiones con DNasa I y MNasa (Pérez-Ortín et al., 1986a, 1987). El gen posee varios sitios hipersensibles a la DNasa I localizados en la región del promotor. Una zona hipersensible, compuesta de 3 sitios, se localiza sobre la región reguladora localizada entre -418 y -500 y existen dos sitios hipersensibles flanqueando a la caja TATA. Además hay un sitio hipersensible en el flanco 3', justo al final de la zona transcribible, y otro más lejano a aproximadamente 4390 pb desde el inicio de la transcripción (Pérez-Ortín et al., 1986a).

Respecto a la localización de los nucleosomas se han encontrado diferentes grados de posicionamiento en las diferentes zonas del gen. En el flanco 3', sobre una zona de aproximadamente 2 kb comprendida entre los

dos sitios hipersensibles a la DNasa I antes mencionados, se han encontrado nucleosomas perfectamente posicionados. También en el promotor existen 4 nucleosomas en posiciones fijas mientras que en la región codificante los 11 nucleosomas que la ocupan presentan unas posiciones preferentes aunque no totalmente estrictas (Pérez-Ortín et al., 1987).

La estructura cromatínica descrita sufre cambios, en algunos casos muy significativos, cuando el gen se desreprime. La región codificante adopta una conformación más abierta que se traduce en una mayor sensibilidad a la DNasa I (Pérez-Ortín et al., 1986a) y en una deslocalización de los nucleosomas (Pérez-Ortín et al., 1987). En el promotor es donde los cambios son más importantes observándose una redistribución de la hipersensibilidad a la DNasa I y una posible pérdida de nucleosomas adyacentes. Estos cambios en el promotor deben ser consecuencia de variaciones en la interacción de las proteínas reguladoras (Pérez-Ortín et al., 1987).

También se observan cambios importantes en el flanco 3' del gen que afectan a una pequeña zona central en el largo tramo de nucleosomas posicionados. Estos cambios consisten en variaciones en el patrón de protección del DNA frente al ataque por la MNasa que produce cortes con un espaciado incompatible con el tamaño nucleosomal. La relación de esta zona de la cromatina con la actividad del gen no está clara pero se ha postulado su posible implicación en procesos de regulación por mecanismos relacionados con la superestructura adoptada por la cromatina en la región del gen SUC2 (Pérez-Ortín et al., 1987).

La Figura 2 muestra un modelo de la organización cromatínica del gen SUC2 y de los cambios dependientes del estado transcripcional que

ha servido de base al presente trabajo por lo que la nomenclatura empleada se mantendrá a lo largo del mismo.

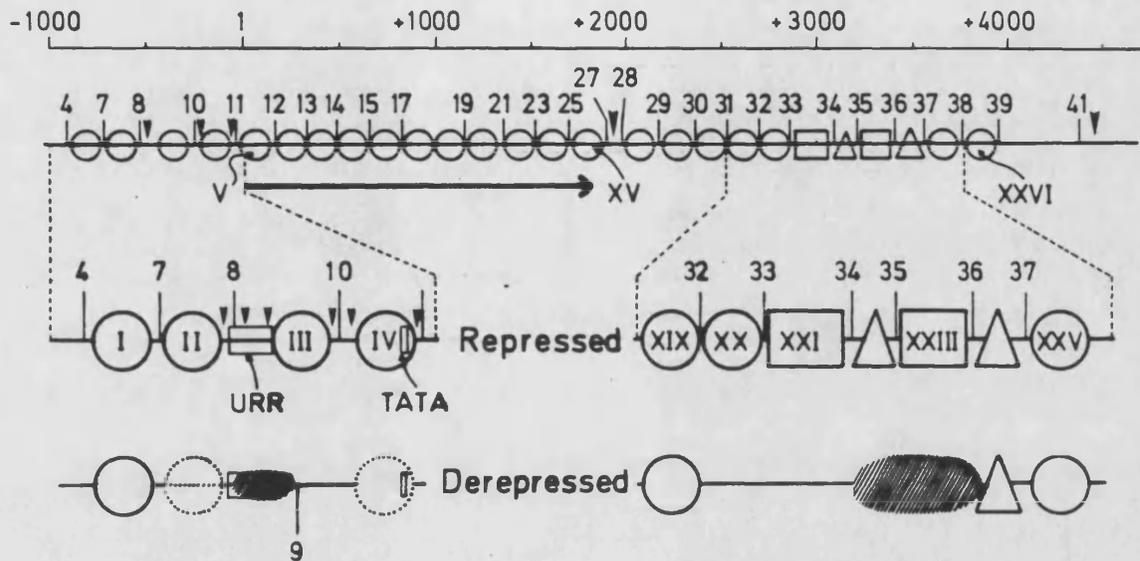


Figura 2. Modelo de la organización cromatínica del gen *SUC2* y sus flancos.

Debajo de la escala (+1 indica el inicio de transcripción) se muestra el modelo propuesto para la organización del gen reprimido. Los números arábigos indican puntos de corte de la MNasa en DNAs espaciadores y los números romanos designan nucleosomas posicionados. Las puntas de flecha indican sitios hipersensibles a la DNasa I y la línea gruesa horizontal indica el mRNA. Los círculos representan nucleosomas posicionados. Los círculos dibujados a trazos indican que no se dispone de datos suficientes para asegurar la presencia o ausencia de ese nucleosoma en el estado activo. Los triángulos y los rectángulos representan nucleosomas alterados o factores no nucleosomales que conducen a la protección del DNA. Las áreas rayadas indican regiones especialmente protegidas en el estados activo. (Tomado de Pérez-Ortín et al., 1987).

## OBJETIVOS

El punto de partida del presente trabajo es un modelo de la organización cromatínica del gen SUC2 de S. cerevisiae obtenido a partir de una serie de estudios previos mediante digestiones con nucleasas (Pérez-Ortín et al., 1987). Se plantea, como objetivo general, mejorar dicho modelo profundizando en el estudio de sus regiones reguladoras y de las causas determinantes de las estructuras encontradas en relación con la actividad transcripcional del gen.

Para cumplir estos objetivos se llevará a cabo un análisis de alta resolución de la estructura de la cromatina del promotor del gen SUC2 utilizando una cepa de S. cerevisiae portadora del gen SUC2 clonado en un plásmido de alto número de copias.

A continuación se estudiará la estructura de la cromatina del promotor y del flanco 3' en diferentes cepas de levadura con mutaciones en genes reguladores del gen SUC2 lo que permitirá una mejor correlación entre las estructuras encontradas y la actividad transcripcional.

El significado de los cambios estructurales que ocurren en el flanco 3' del gen SUC2 se analizará mediante el estudio del efecto de deleciones. Para ello se contruirán plásmidos con deleciones en la región promotora o en el flanco 3' del gen SUC2 y se analizará, en cada uno de ellos, la síntesis de mRNA y la estructura cromatínica del resto del gen. La comparación de ambos resultados permitirá establecer si existe relación entre la transcripción del gen y los cambios estructurales de la cromatina del flanco 3'. Dichas deleciones permitirán, además, investigar las causas

de la peculiar estructura nucleosomal que presenta esa zona del genoma de levadura.

**MATERIALES**  
**Y**  
**METODOS**

## 1. Materiales.

### 1.1. Productos de especial interés.

Agarosa (Tipo I)	Sigma
Agarosa (bajo punto fusión)	BRL
Ampicilina	Boehringer
Bisbenzimidazol	Boehringer
BSA Tipo V	Sigma
BSA (libre de nucleasas)	Boehringer
Cloramfenicol	Boehringer
dATP ( $\alpha$ - $^{32}$ P) (3000Ci/mmol)	Amersham
DEPC	Sigma
DNA Ligasa del Fago T4 (1 u/ $\mu$ l)	Boehringer
DNA polimerasa I (5 u/ $\mu$ l)	Amersham
DNasa I (DPFF 2300 u/mg)	Worthington
Endonucleasas de restricción	Boehringer
Filtros de nylon (Hybond-N)	Amersham
Fosfatasa alcalina de timo de ternera (especial Biología Molecular, 1 u/ $\mu$ l)	Boehringer
Glucosa oxidasa (grado II, 267 u/mg)	Boehringer
IPTG	Boehringer
Lisozima	Boehringer
MNasa (15000 u/mg)	Boehringer
Peroxidasa (grado II, 175 u/mg)	Boehringer
Proteinasa K	Boehringer
RNasa A	Boehringer

Trifosfatos de deoxirribonucleosidos	Boehringer
X-Gal	Boehringer
Zimoliasa 100T	Miles
$\beta$ -Glucuronidasa-Arilsulfatasa	Boehringer

### 1.2. Medios de cultivo.

#### - Medios de cultivo para E. coli.

LB: Medio de Luria-Bertani (Maniatis et al., 1982)

Triptona 1% (p/v)

NaCl 1% (p/v)

Extracto de levadura 0.5% (p/v)

pH 7.5

#### - Medios de cultivo para S. cerevisiae.

YPG: Medio completo (Sherman et al., 1979)

Extracto de levadura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glucosa 2% (p/v)

YPG-LGM: Medio completo con baja concentración de glucosa

(Carlson et al., 1981)

Extracto de levadura 1% (p/v)

Peptona 2% (p/v)

Glucosa 0.05% (p/v)

YMM: Medio mínimo (Sherman et al., 1979)

Yeast Nitrogen Base w/o aa 0.67% (p/v)

Glucosa 2% (p/v)

Los medios sólidos se prepararon adicionando agar hasta el 1% (p/v) excepto en el caso de YMM donde la concentración fue del 2% (p/v).

Los antibióticos se añadieron a las siguientes concentraciones: ampicilina 50 µg/ml, cloramfenicol 170 µg/ml y tetraciclina 15 µg/ml.

Los requerimientos para el cultivo de levaduras en medio mínimo se añadieron a una concentración de 80 µg/ml.

La temperatura de cultivo fue de 28°C para levaduras y de 37°C para E. coli y en ambos casos se utilizó agitación orbital.

Para la desrepresión de la síntesis de invertasa en levaduras se siguió el procedimiento de Carlson et al. (1981). Las células en fase exponencial, crecidas en YPG o YMM según la cepa, se recogieron en condiciones de esterilidad y se transfirieron a YPG (condiciones de represión)

o YPG-LGM (condiciones de desrepresión) y se mantuvieron a 28°C, con agitación orbital, durante 2.5 horas.

### 1.3. Cepas y plásmidos.

<u>Cepa</u>	<u>Características genotípicas</u>	<u>Procedencia</u>
<u>E. coli</u> FB1009	<u>rec A<sup>-</sup></u> , <u>F'</u> , <u>Tn 10</u> (Tet <sup>R</sup> )	D. Ramón
<u>E. coli</u> JM83	<u>lac-proAB</u> , <u>lacZ</u> M15	J.M. Pardo
<u>E. coli</u> DH1	<u>recA<sup>-</sup></u> , <u>hsdr<sup>-</sup></u> , <u>F<sup>-</sup></u>	D. Ramón
<u>E. coli</u> XL1-Blue	<u>recA<sup>-</sup></u> , <u>hsdr<sup>-</sup></u> , <u>F'</u> , <u>Tn 10</u> (Tet <sup>R</sup> ), <u>lacIqZ</u> M15	Stratagene
<u>S. cerevisiae</u> SEY2101	<u>a</u> , <u>ura3-52</u> , <u>leu2-3,112</u> , <u>ade2-101</u> , <u>suc2-Δ9</u>	S. Emr
<u>S. cerevisiae</u> X2180-1A	<u>a</u> , <u>SUC2</u> , <u>mal0</u>	R. Sentandreu
<u>S. cerevisiae</u> MCY1484	<u>α</u> , <u>lys2-801am</u> , <u>ade2-101oc</u> , <u>snf1-13</u> , <u>SUC2</u>	M. Carlson
<u>S. cerevisiae</u> MCY1250	<u>α</u> , <u>lys2-801</u> , <u>ura3-52</u> , <u>snf2::HIS3</u>	M. Carlson
<u>S. cerevisiae</u> MCY1371	<u>a</u> , <u>his4-539am</u> , <u>ade2-101oc</u> , <u>ssn6-1</u> , <u>SUC2</u>	M. Carlson
<u>S. cerevisiae</u> MCY1324	<u>a</u> , <u>lys2-801am</u> , <u>ssn6::URA3</u> , <u>snf1-28</u>	M. Carlson

<u>Plásmido</u>	<u>Marcadores</u>	<u>Orí. Replicación</u>	<u>Procedencia</u>
pBR322	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	pBR322	D. Ramón
pUC18	Ap <sup>R</sup>	pBR322	Pharmacia
pRB58	Ap <sup>R</sup> , <u>URA3</u> , <u>SUC2</u>	pBR322, 2μm	R. Sentandreu
pSEY304	Ap <sup>R</sup> , <u>URA3</u> , <u>SUC2</u>	pBR322, 2μm	S. Emr
pSUC243	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , <u>SUC2</u>	pBR322	J. E. Pérez
pSUC213	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	pBR322	J. E. Pérez
pSUC207	Ap <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	pBR322	J. E. Pérez
pSUC330	Ap <sup>R</sup>	pBR322	Este trabajo
pSUC180	Ap <sup>R</sup>	pBR322	Este trabajo
pSUCΔ325	Ap <sup>R</sup> , <u>URA3</u> , <u>SUC2</u>	pBR322, 2μm	Este trabajo
pSUCΔ327	Ap <sup>R</sup> , <u>URA3</u> , <u>SUC2</u>	pBR322, 2μm	Este trabajo
pSUCΔ521	Ap <sup>R</sup> , <u>URA3</u> , <u>SUC2</u>	pBR322, 2μm	Este trabajo

## 2. Preparación del material biológico.

### 2.1. Construcción de plásmidos.

#### 2.1.1. Defosforilación de extremos 5'P.

La defosforilación de los extremos del vector de clonación se realizó, cuando fue necesario, mediante tratamiento con fosfatasa alcalina según se describe en Maniatis *et al.* (1982). La mezcla de reacción contenía MgCl<sub>2</sub> 100 mM, ZnCl<sub>2</sub> 10 mM, espermidina 100 mM, Tris-HCl 50 mM pH 9.0, el DNA a defosforilar y 0.01 unidades de fosfatasa alcalina por pmol de extremos 5'P, en un volumen total de 50 μl. Se incubó a 37°C durante 30 min y, transcurrido ese tiempo, se añadió nuevamente enzima en igual cantidad y se incubó durante 30 min más. La reacción se detuvo añadiendo 40 μl de H<sub>2</sub>O bidestilada esteril, 5 μl de SDS al 10% (p/v) y 10 μl

de tampón STE 10x (STE= NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0) y calentando a 68°C durante 10 min. Para eliminar la fosfatasa alcalina se extrajo dos veces con un volumen de fenol (fenol bidestilado estabilizado con 8-hidroxiquinoleína al 0.1% (p/v) y saturado en Tris-HCl 10 mM pH 7.5), una vez con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y una vez con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v). Se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol a -20°C durante, al menos, 2 horas. El precipitado se recogió por centrifugación a 12000xg durante 15 min, se lavó con etanol 70% (v/v) y se secó a vacío.

#### 2.1.2. Rellenado de extremos por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I.

La transformación de extremos cohesivos generados por corte con enzimas de restricción en extremos romos se llevó a cabo por relleno con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I según se describe en Maniatis et al. (1982).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl en tampón NTB (Tris-HCl 50 mM pH 7.2, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, DTT 0.1 mM, BSA (libre de nucleasas) 50 µg/ml) utilizando como precursores trifosfatos de deoxirribonucleósidos a una concentración 20 µM para cada uno de ellos y 1 unidad del enzima por µg de DNA.

La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 30 min y se detuvo añadiendo 5 µl de EDTA 100 mM. Para eliminar el enzima se extrajo una vez con un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol a -

20°C durante, al menos, 2 horas. El precipitado se recogió, se lavó y se secó como se describe en el apartado anterior.

### 2.1.3. Reacción de ligamiento.

Las mezclas de ligamiento se prepararon con cantidades de los DNAs a ligar dependientes de las características concretas de los mismos y en presencia de  $MgCl_2$  10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.5. El volumen total de reacción fue, como máximo, de 20  $\mu$ l y se usaron 1 unidad de DNA ligasa del fago T4 para ligamiento de extremos cohesivos y 5 unidades para ligamiento de extremos romos. La reacción se llevó a cabo durante 2-4 horas a temperatura ambiente y se guardó a 4°C hasta el momento de su utilización.

### 2.2. Transformación de E. coli.

Se utilizó el método descrito por Hanahan (1983). Se inocularon 5 ml de un precultivo de la cepa seleccionada en medio LB realizado durante la noche anterior en 100 ml de LB fresco.

Se cultivaron las células a 37°C hasta que la D.O. a 550 nm del medio de cultivo fue de aproximadamente 0.5. Se enfrió el matraz sobre hielo, se pasó el medio a tubos estériles y se centrifugó en frío a 2500 rpm durante 5 min. Las células se resuspendieron en 30 ml de tampón TfbI ( $RbCl$  100 mM,  $MnCl_2$  50 mM, acetato potásico 30 mM,  $CaCl_2$  10 mM, glicerol 15% (v/v) pH 5.8 ajustado con ácido acético 0.2 M). Se mantuvieron las células en dicho tampón a 4°C durante tiempos óptimos previamente determinados para cada cepa y se volvieron a recoger en las condiciones antes indicadas. Las células se resuspendieron en 4 ml de tampón TfbII (MOPS 10 mM,  $RbCl$  10 mM,  $CaCl_2$  75 mM, glicerol 15%

(v/v) pH 7.0 ajustado con NaOH) y se separaron 20 alícuotas de 200  $\mu$ l. Las células se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  (en ese estado pueden conservarse durante meses sin que pierdan su estado de competencia).

En el momento de realizar una transformación, se descongeló una de esas alícuotas a  $4^{\circ}\text{C}$  y se mantuvo sobre hielo durante 10 min. Se añadió el DNA plasmídico (normalmente una mezcla de ligamiento) y se volvió a incubar en hielo durante 20 min. Se provocó entonces un choque térmico incubando a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 90 s y pasando nuevamente a hielo durante 2 min. Se añadieron 0.8 ml de medio LB y se incubó 1h a  $37^{\circ}\text{C}$  sin agitación.

A continuación se sembraron placas de LB sólido, suplementado con los antibióticos adecuados para la selección, con 200  $\mu$ l del medio líquido mediante un asa de Digralsky. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una noche y se seleccionaron algunas colonias transformantes al azar para la verificación de la transformación. Paralelamente se llevaron a cabo controles de viabilidad y de reversión. Para conocer el número de viables se sembraron placas de LB sólido sin antibióticos y para conocer el número de revertientes se sembraron placas de LB sólido mas antibióticos con células no transformadas. Ambos controles fueron habitualmente satisfactorios obteniendose una viabilidad del orden de  $10^9$  células/ml y ausencia de revertientes.

### 2.3. 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 suplementado con los antibióticos oportunos, en función de las resistencias que llevara la cepa bacteriana utilizada. 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 10 min sobre hielo. 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 .

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 H<sub>2</sub>O), 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 5 M 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 ha descrito anteriormente. El sedimento seco se disolvió en 5 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) 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<sub>260</sub>.

Los plásmidos obtenidos por ambos métodos se analizaron rutinariamente en electroforesis en agarosa (apartado 3.3) y/o por restricción (apartado 4.1).

#### 2.4. Transformación de levaduras.

Para la transformación de *S. cerevisiae* se siguió el método descrito por Ito et al. (1983).

Un matraz de 500 ml con 200 ml de YPG se inoculó con 1 ml de un precultivo en fase estacionaria de crecimiento de la cepa a transformar y se incubó a 28°C, con agitación hasta una D.O. a 600 nm de aproximadamente 1 (1-2 x 10<sup>7</sup> células/ml). Se recogieron las células de 10 ml del cultivo centrifugando a 2500 rpm 5 min en un tubo estéril y se lavaron una vez con 20 ml de agua destilada estéril y una vez con 20 ml de tampón TE-LiOAc (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, acetato de litio 0.1 M). Tras los lavados las células se resuspendieron en 0.1 ml del mismo tampón y se mantuvieron durante 1 h a 30°C con agitación. A continuación se añadieron 50 µg de DNA de esperma de salmón y el DNA plasmídico disuelto en 10 µl de tampón TE y se dejó en reposo a 30°C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se añadieron 0.7 ml de tampón TE-LiOAc+PEG 4000 40% (p/v) y se incubó 1h más a 30°C. Se provocó entonces un choque térmico, pasando las células a un baño a 42°C durante 5 min, tras el cual se recogieron a 2500 rpm 5 min. Finalmente se resuspendieron en 0.8 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril y se sembraron alícuotas de 0.2 ml mediante un asa Digralsky sobre placas de YMM sólido con los requerimientos adecuados según la cepa y el plásmido utilizados en cada caso.

Las placas se incubaron a 28°C durante 3 a 5 días hasta la aparición de transformantes. Se hicieron controles de viabilidad y de reversión con una muestra paralela de células no transformadas y ambos fueron, habitualmente, satisfactorios.

De forma indistinta se utilizó, en las primeras fases del trabajo, el procedimiento descrito por Hinnen et al. (1978) para la transformación de protoplastos de levadura pero la sencillez del método previamente descrito llevó a su utilización en etapas posteriores.

#### 2.5. 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 Zimoliasa 100T. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con H<sub>2</sub>O 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 0.5 mg de Zimoliasa 100T por gramo de células, incubándose a 37°C durante 30-60 min con agitación suave. La formación de protoplastos se siguió mediante observación microscópica y por el descenso de A<sub>600</sub> en SDS 1% (p/v).

## 2.6. 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.

## 2.7. Digestiones con nucleasas y extracción del DNA de las muestras.

Las digestiones con MNasa y con DNasa I se realizaron habitualmente sobre protoplastos obtenidos como se indica en el apartado 2.5 aunque en determinados casos fue necesario recurrir a la purificación de núcleos para obtener unas muestras de calidad adecuada. Tanto si se partía de protoplastos como si se partía de núcleos, la muestra se resuspendió en medio de digestión RSB:  $CaCl_2$  1 mM,  $MgCl_2$  3 mM, NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, 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 y de 10 a 2500 u/mg de DNA para la MNasa 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 describirá a continuación.

La MNasa se disolvió en H<sub>2</sub>O destilada a 15 u/ $\mu$ l, se dividió en alícuotas y se guardó a -20°C. La DNasa I se guardó en glicerol 50% (a 0.2 u/ $\mu$ l) también a -20°C. En ambos casos antes de ser utilizadas se ensayaron mediante efecto hipercrómico para comprobar el mantenimiento de su actividad original.

Las digestiones de DNA desnudo se realizaron en las mismas condiciones pero con concentraciones menores de nucleasas: de 0.5 a 20 u/mg de DNA para la MNasa y de 0.001 a 2 u/mg de DNA para la DNasa I.

Tras la digestión, las muestras de cromatina se hicieron 1% (p/v) en SDS, se adicionó proteinasa K hasta 100  $\mu$ g/ml y se digirieron a temperatura ambiente durante la noche. Una vez digeridas se extrajeron con 1 volumen de fenol 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, 0.3 M en acetato sódico, 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 y se digirieron con RNasa A (tratada durante 15 min a 100°C para inactivar las DNasas contaminantes) a 20  $\mu$ g/ml, durante 1 h a

37°C. El DNA se reprecipitó con alcohol de la forma descrita anteriormente.

## 2.8. Extracción de RNA total de levadura.

Para la extracción de RNA total de levadura se siguió el procedimiento descrito por Sherman et al. (1986). Todo el material de vidrio y plástico utilizado para la extracción y almacenamiento del RNA se esterilizó en autoclave a 130°C durante 1 h. El H<sub>2</sub>O bidestilada y todas las disoluciones se trataron con DEPC al 0.1% y se esterilizaron en las mismas condiciones.

Un matraz de 500 ml con 200 ml del medio de cultivo adecuado se inoculó con 1 ml de un precultivo estacionario de la cepa escogida y se incubó a 28°C con agitación hasta una densidad de  $2-4 \times 10^7$  células/ml. El cultivo se pasó a botes de centrifuga previamente enfriados sobre hielo y se centrifugó a 5000 rpm 5 min para recoger las células. Se resuspendieron en 2.5 ml de tampón LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 10 mM, SDS 0.2% (p/v), Tris-HCl 10 mM pH 7.4) frío y se pasaron a un tubo Corex de 30 ml que contenía 11 g de perlas de vidrio de 0.4 mm de diametro y 3 ml de fenol saturado en tampón LETS. Para romper las células, se agitó durante 6 periodos de 30 s alternados con periodos de 30 s en hielo y posteriormente se centrifugó a 8000 rpm 5 min para separar las fases. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo Corex de 30 ml y se extrajo dos veces con 5 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y una vez con 5 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, v/v). Finalmente, la fase acuosa se precipitó con 1 volumen de LiCl 5 M durante, al menos, 3 h a -20°C.

El RNA se recogió centrifugando a 12000 rpm 15 min, se lavó con etanol 70% (v/v) y se secó a vacío. Se resuspendió en un volumen adecuado de H<sub>2</sub>O estéril y se valoró espectrofotométricamente. El RNA se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol a -20°C y se guardó precipitado.

### 3. Técnicas analíticas.

#### 3.1. Valoración de DNA y de 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-Györgyi 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 µl de una solución 0.2 mg/ml de bisbenzimidazol en H<sub>2</sub>O y hasta 20 µl 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

construída con cantidades variables (entre 1 y 20  $\mu\text{g/ml}$ ) de DNA de salmón. en algunos casos se determinaron cantidades de DNA entre 0.1 y 2  $\mu\text{g/ml}$  utilizando el mismo ensayo pero con 2 ml de tampón y 1.5  $\mu\text{l}$  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  $\text{H}_2\text{O}$  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  $\mu\text{g/ml}$ ). Los valores de cantidad de proteínas se refieren pues a cantidad equivalente de BSA .

### 3.2. Valoración de la actividad invertasa.

Se han empleado dos formas de valoración de la actividad invertasa en células de levadura: una a partir de extractos celulares crudos y otra a partir de células enteras.

Cuando se siguió el primer procedimiento, 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  $\mu\text{l}$  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, 1984). El ensayo constó de dos partes. En la primera se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de la sacarosa, mezclando 50 µl de tampón acetato sódico 0.2 M pH 5.1 con 25 µl de muestra y 25 µl de sacarosa 0.5 M, e incubando 10 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo 100 µl 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 µg/ml de glucosa oxidasa, 10 µg/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. Así mismo se incluyeron 5 tubos con diferentes cantidades de glucosa, entre 0 y  $8 \times 10^{-2}$  µmoles, 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 3.1.

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

Para el ensayo sobre células enteras se siguió el procedimiento descrito por Celenza y Carlson (1984). Tras recoger las células de los cultivos por centrifugación se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se lavaron 2 veces con un volumen abundante de azida sódica 10 mM fría y se resuspendieron en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml. A partir de este punto el ensayo de actividad enzimática se realizó de la misma manera que con extractos crudos y la actividad se expresó, en este caso, en  $\mu\text{moles}$  de sacarosa hidrolizada por min y por 100 mg de células.

El empleo de los dos métodos descritos se debió a la necesidad de datos comparables con la bibliografía en la que se pueden encontrar ambos tipos de determinación de actividad invertasa para diferentes cepas de levadura.

### 3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa sumergido descrito en Maniatis et al. (1982). Se utilizaron geles 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  $4^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{g/ml}$  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 9x12 cm, a través de un filtro ultravioleta convencional y un filtro Kodak Wratten n° 22.

#### 3.4. Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes.

Las electroforesis de RNA se realizaron en geles de agarosa con formaldehido según se describe en Maniatis *et al.* (1982). La agarosa se fundió en  $\text{H}_2\text{O}$  con DEPC al 0.1% (v/v) y se esterilizó en autoclave. Una vez fundida y esterilizada se añadieron los volúmenes adecuados de tampón de electroforesis 5x (MOPS 0.2 M pH 7.0, acetato sódico 50 mM, EDTA 5 mM pH 8.0) y de formaldehido para lograr concentraciones 1x y 2.2 M, respectivamente.

Las muestras se prepararon mezclando el RNA disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$  estéril (hasta 20  $\mu\text{g}$  de RNA en un volumen de 4.5  $\mu\text{l}$ ) con 2  $\mu\text{l}$  del tampón de electroforesis 5x, 3.5  $\mu\text{l}$  de formaldehido y 10  $\mu\text{l}$  de formamida desionizada. Se incubaron a 55°C durante 15 min y se añadieron 2  $\mu\text{l}$  de disolventes de muestras estéril (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.4% (p/v), xilen cianol 0.4% (p/v)). La preparación de las muestras se realizó siempre inmediatamente antes de la electroforesis, que se desarrolló en tampón de electroforesis 1x, a 4°C y a 5 V/cm durante 6-8 h.

Tras la electroforesis, los geles se tifieron con BrEt 1  $\mu\text{g/ml}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y se destifieron con  $\text{H}_2\text{O}$ , con agitación y durante, al menos, 1 h.

### 3.5. Electroforesis en poliacrilamida.

Se siguió el método de electroforesis vertical descrito en Maniatis et al. (1982). Se utilizaron geles de  $12 \times 12 \times 0.1$  cm de concentraciones variables entre el 5% y 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.

### 3.6. 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 construída mediante un ajuste realizado con un ordenador IBM PC a los datos de tamaño y migración de fragmentos patrón.

#### 4. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.

##### 4.1. Digestión con endonucleasas de restricción.

Para la digestión de muestras de DNA con endonucleasas de restricción se utilizaron las condiciones recomendadas por el suministrador (Boehringer-Mannheim). Se utilizaron 5 tampones diferentes de alta, media y baja concentración salina: NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (alta concentración); NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (media); y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (baja), y otros dos tampones con composición intermedia que permiten la restricción simultanea con enzimas menos estrictos en sus requerimientos: Tris-acetato 33 mM pH 7.9, acetato magnésico 10 mM, acetato potásico 66 mM, DTT 0.5 mM (tampón A) y Tris-HCl 10 mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM (tampón B). Para cada endonucleasa de restricción se utilizó el tampón indicado por el suministrador.

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<sub>Bu</sub> 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<sub>Bm</sub> es el número de pares de bases de la muestra, C<sub>u</sub> es el número de puntos de corte de ese enzima de restricción en el patrón y C<sub>m</sub> 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 resticción y se incubó la muestra durante 1.5 h más. Los tampones de conversión utilizados fueron los siguientes: NaCl 300 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (baja/media); NaCl 350 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT

1 mM, Tris-HCl 250 mM, pH 7.5 (media/alta); y NaCl 600 mM, MgCl<sub>2</sub> 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 y posteriormente las muestras se disolvieron en la cantidad apropiada de disolvente de muestras de electroforesis.

#### 4.2. 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 3.3, 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 2.1.1 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. 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% ó del 12% de poliacrilamida según el método des-

crito por Maxam y Gilbert (1977). La electroforesis se realizó en las condiciones descritas en el apartado 3.5 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 0.5 M, 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%.

De forma alternativa a estos dos protocolos se utilizó el método de electroelución para el aislamiento de cualquier fragmento de DNA a partir de geles tanto de agarosa como de poliacrilamida. Se utilizó una cubeta de electroelución basada en el modelo diseñado por Bio Rad y un tampón de alta fuerza iónica (Acetato amónico 3 M, glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.05%, TBE1x) para la retención del DNA. La electroelución se llevó a cabo a 100 V durante tiempos comprendidos entre 15 y 30 min dependiendo del tamaño del fragmento a electroeluir. Una vez finalizada, se recogió el tampón de retención con una microjeringa y se precipitó el DNA de la forma habitual.

#### 4.3. 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 µl en un tubo eppendorf de 0.5 ml. Cuando el DNA era un plásmido la mezcla de reacción consistió en 1-2 µg de DNA,

disuelto en un volumen de TE de hasta 10  $\mu$ l, dNTPs no radiactivos (dGTP, dTTP y dCTP) 20  $\mu$ M de cada uno, DNasa I  $2 \times 10^{-7}$  mg/ml,  $MgSO_4$  10 mM, DTT 0.1 mM, BSA (libre de nucleasas) 50  $\mu$ g/ml, [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]dATP 50-100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l totales y con 2  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]dATP) con cantidades diferentes de DNasa I, entre 0 y  $2 \times 10^{-5}$  mg/ml. La máxima incorporación se obtuvo con DNasa I a  $2 \times 10^{-7}$  mg/ml. 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 se añadió DNasa I  $2 \times 10^{-9}$  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  $\mu$ 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 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  $7 \times 10^7$  cpm/ $\mu$ g de DNA.

Para eliminar los nucleótidos no incorporados se siguió un procedimiento descrito en Maniatis et al. (1982). Las muestras de 100  $\mu$ 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  $\mu$ l de tampón STE y una vez con 100  $\mu$ l de DNA de salmón 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ 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.

#### 4.4. Transferencia de DNA y de RNA a filtros.

Se utilizó el método descrito por Southern (1978) para la transferencia de DNA a partir de geles de agarosa. Se utilizaron filtros de nylon para la transferencia. 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 desnaturar 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 y se guardaron en bolsas de plástico selladas y a 4°C hasta el momento de su uso.

La transferencia de RNA se realizó del mismo modo pero sin necesidad de tratamientos previos de los geles que fueron directamente transferidos a nylon tras finalizar la electroforesis debido a las condiciones desnaturizantes de las mismas (ver apartado 3.4). La fijación y conservación de los filtros se realizó de la misma forma que para filtros de DNA.

Respecto a la transferencia de DNA a partir de geles de poliacrilamida, se utilizó una célula de electrotransferencia Bio Rad y se siguieron las instrucciones recomendadas para el empleo del aparato. Tras la electroforesis (ver apartado 3.5) los geles se desnaturalizaron durante 30 min en 500 ml de NaOH 0.2 M, NaCl 0.5 M y a continuación se neutralizaron con dos lavados de 10 min en 500 ml de tampón TAE 4x (TAE 1x= Tris 10 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 7.8 ajustado con ácido acético concentrado) y uno de 10 min en 500 ml de tampón TAE 1x. La transferencia se montó colocando sobre el lado negativo del soporte una esponja y dos trozos de papel Whatman nº 3 empapados en tampón TAE 1x y, sobre ellos, el gel. A continuación, se extendió sobre el gel un trozo de nylon de su mismo tamaño, sobre éste otras dos piezas de papel Whatman nº 3 y otra esponja y se cerró con el lado positivo del soporte. El montaje se introdujo en la cubeta de electrotransferencia y se llenó esta con tampón TAE 1x. La transferencia se realizó a 4°C y a 30 V durante un mínimo de 12 h. Una vez terminada la transferencia, se lavó el filtro de nylon con TAE 1x, se dejó secar al aire entre pareles de filtro, se fijó con luz UV y se guardó a 4°C, como en los casos anteriores.

#### 4.5. Hibridación de DNA y de RNA 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 tubos de vidrio y en una es-

tufa de hibridación Bachofer durante 16-20 h. La disolución de hibridación se componía de 6xSSC, 1xdisolución 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  $1-8 \times 10^8$  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.

Las condiciones de hibridación para filtros de RNA fueron las mismas pero se hicieron prehibridaciones más largas (un mínimo de 3h) y los lavados posteriores a la hibridación fueron diferentes: dos lavados de 15 min con 6xSSC a 65°C, un lavado de 30 min con 6xSSC, SDS 0.1% (p/v) a 65°C, un lavado de 15 min con 1xSSC a 55°C y un lavado de 15 min con 0.1xSSC a temperatura ambiente.

También fueron diferentes las condiciones de eliminación de sondas para posterior rehibridación de los filtros debido a la lisis del RNA que puede producirse en presencia de NaOH. Dicho lavado se realizó sumergiendo los filtros en SDS al 0.1% (p/v) y llevando a ebullición durante 30-60 min. A continuación se dejaron secar y se comprobó la eliminación de la radiactividad.

#### 4.6. 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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 5 min a  $20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.7. Predicción teórica de posicionamiento nucleosomal.

Para la predicción teórica de posicionamiento de nucleosomas sobre zonas concretas de la cromatina, se elaboró un programa de ordenador basado en un algoritmo propuesto por Kornberg y Stryer (1988) para la determinación de mecanismos estocásticos de posicionamiento dependiente de posicionadores. El programa utiliza, como variables, el tamaño del "core" nucleosomal (D), el tamaño del DNA espaciador (L), el tamaño del fragmento sobre el que se localizan los nucleosomas (Z) y el número de posicionadores que afectan a la zona a analizar (uno o dos). Se utilizó un ordenador personal IBM PC.

**RESULTADOS**

**Y**

**DISCUSION**

## 1. Consideraciones generales sobre la metodología.

En el presente trabajo se ha abordado un estudio de la estructura de la cromatina del gen SUC2 basado en el empleo de digestiones con nucleasa de micrococo para la determinación de las posiciones de los nucleosomas. La técnica empleada es una adaptación del marcaje terminal indirecto, inicialmente descrito por Wu (1980) para la detección de sitios hipersensibles a la DNasa I, y adaptada por Nedospasov y Georgiev (1980) para la detección de puntos de corte de la MNasa. Un esquema general de dicha técnica se muestra en la Fig. 3.

Es necesario disponer del mapa de restricción de la zona a analizar para poder seleccionar la sonda y el punto de referencia que permitirán determinar las posiciones de los puntos de corte de la nucleasa. La técnica consiste en digerir la cromatina, a varias tasas, con la nucleasa elegida (Mnasa en nuestro caso). El DNA se purifica y se digiere con el enzima de restricción adecuado, que debe cortar en un extremo de la zona a analizar y coincidir con un extremo de la sonda. Las muestras se someten a electroforesis, se transfieren a un filtro y éste se hibrida con la sonda marcada radioactivamente. Las bandas que se ven en la autorradiografía corresponden a fragmentos con un extremo común, el generado por el corte con el enzima de restricción, y un extremo generado por el corte de la nucleasa sobre la cromatina.

La inclusión en la electroforesis de un patrón adecuado permite calcular el tamaño de los diferentes fragmentos y, a partir de él, puede conocerse la posición del punto de corte de la nucleasa que estará a una distancia del punto de restricción igual al tamaño del fragmento.

Figura 3. Método para la determinación de las posiciones de los puntos de corte de la MNasa mediante marcaje terminal indirecto.

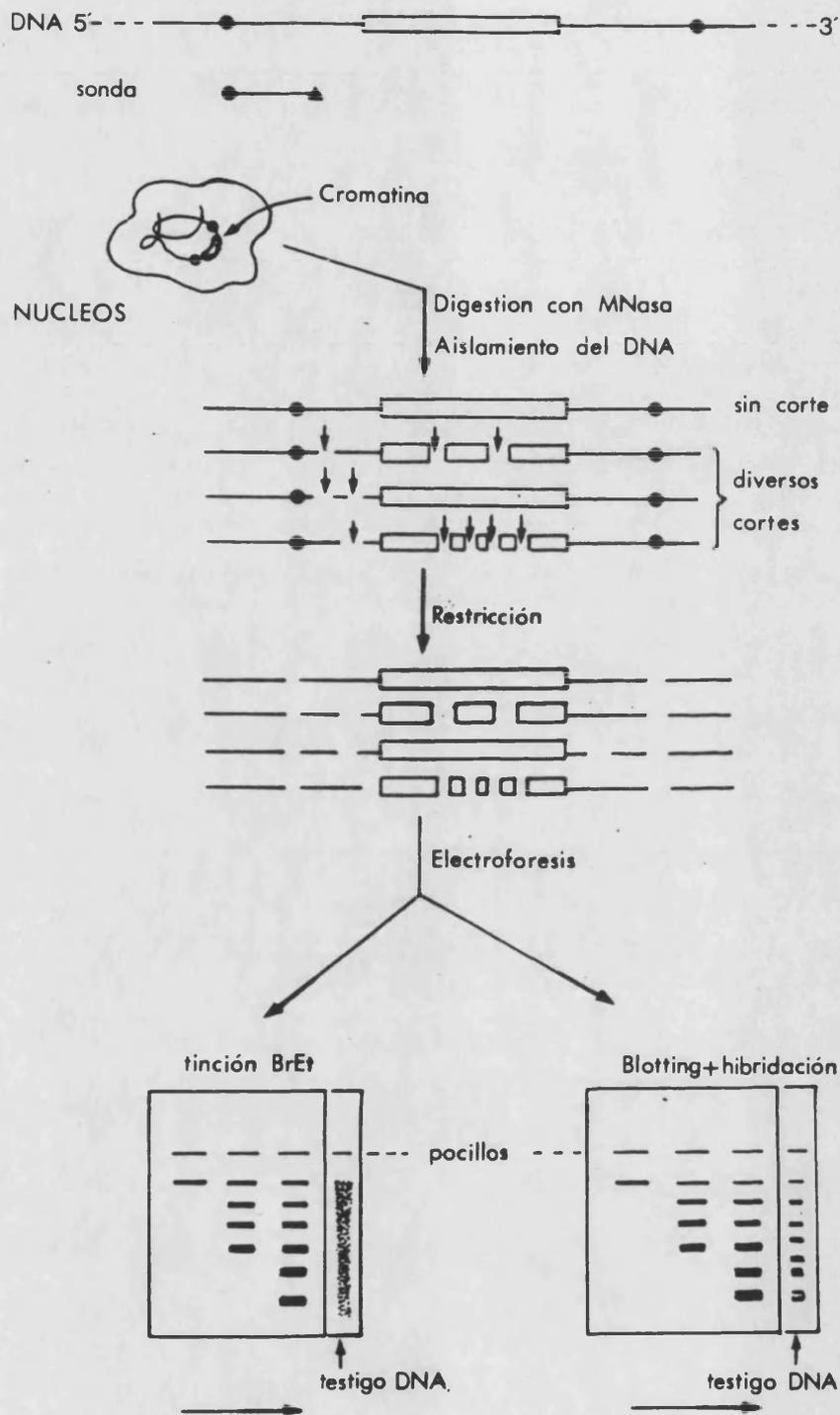


Figura 3. Método para la determinación de las posiciones de puntos de corte de la MNasa mediante marcaje terminal indirecto.

Un primer requerimiento de esta técnica es la necesidad de utilizar sondas pequeñas para minimizar la probabilidad de corte de la nucleasa en la zona de apareamiento con la misma ya que esto ocasionaría la aparición de dos fragmentos en la autorradiografía, uno de los cuales no tendría el extremo coincidente con el punto de restricción. Para obviar este potencial problema se usan tasas de digestión bajas de forma que haya, en promedio, un punto de corte de la MNasa por molécula, o bien la técnica puesta a punto en éste laboratorio y denominada "punto de corte desplazado" (Pérez-Ortín et al, 1986b).

Otra precaución que debe tomarse en este tipo de estudios es la inclusión de testigos de DNA desnudo digerido con la nucleasa con el fin de detectar puntos de corte debidos a la especificidad de secuencia que pueden presentar estos enzimas y no a la estructura de la cromatina. Este problema debe ser tenido especialmente en cuenta cuando se digiere la cromatina con MNasa (Hörz y Altenburger, 1981; Dingwall et al., 1981).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se ha establecido una serie de criterios para la interpretación de los resultados de un experimento de marcaje terminal indirecto con MNasa:

- las bandas presentes en las muestras de cromatina pero no en las de DNA desnudo son consecuencia de la estructura de la cromatina. Dada la preferencia de la MNasa por el DNA espaciador, estas bandas deben de corresponder a cortes en el DNA espaciador o a zonas desprovistas de nucleosomas.

- las bandas presentes en las muestras de DNA desnudo pero no en las de cromatina corresponden a cortes en secuencias reconocidas específicamente por la MNasa que quedan protegidas por la estructura de la cromatina, generalmente por "cores" nucleosomales.

- las bandas más difíciles de interpretar son las que aparecen tanto en muestras de cromatina como en muestras de DNA desnudo ya que pueden deberse a especificidad de secuencia pero quedar en un tramo de DNA espaciador en la cromatina. En estos casos se atiende a la intensidad relativa de las bandas y a que su disposición sea compatible con el tamaño nucleosomal.

## 2. Análisis fino de la estructura de la cromatina del promotor del gen SUC2.

Trabajos previos sobre estructura de la cromatina del gen SUC2 mostraron una completa equivalencia de dicha estructura para la copia genómica del gen y para copias insertadas en plásmidos de replicación autónoma de S. cerevisiae, tanto de bajo como de alto número de copias (Pérez-Ortín et al., 1987). Por este motivo se utilizó, para este estudio, la cepa de S. cerevisiae SEY2101, portadora de una delección completa del gen SUC2, transformada con el plásmido de alto número de copias pRB58 (Carlson y Botstein, 1982). Como se muestra en la Fig. 4, el plásmido pRB58 posee, además del origen de replicación del plásmido  $2\mu\text{m}$  y el gen URA3 como marcador, un fragmento del genoma de levadura que incluye al gen SUC2 y sus flancos. La presencia de un alto número de copias por célula del gen SUC2 supone un importante aumento de sensibilidad en la detección mediante sondas radioactivas.

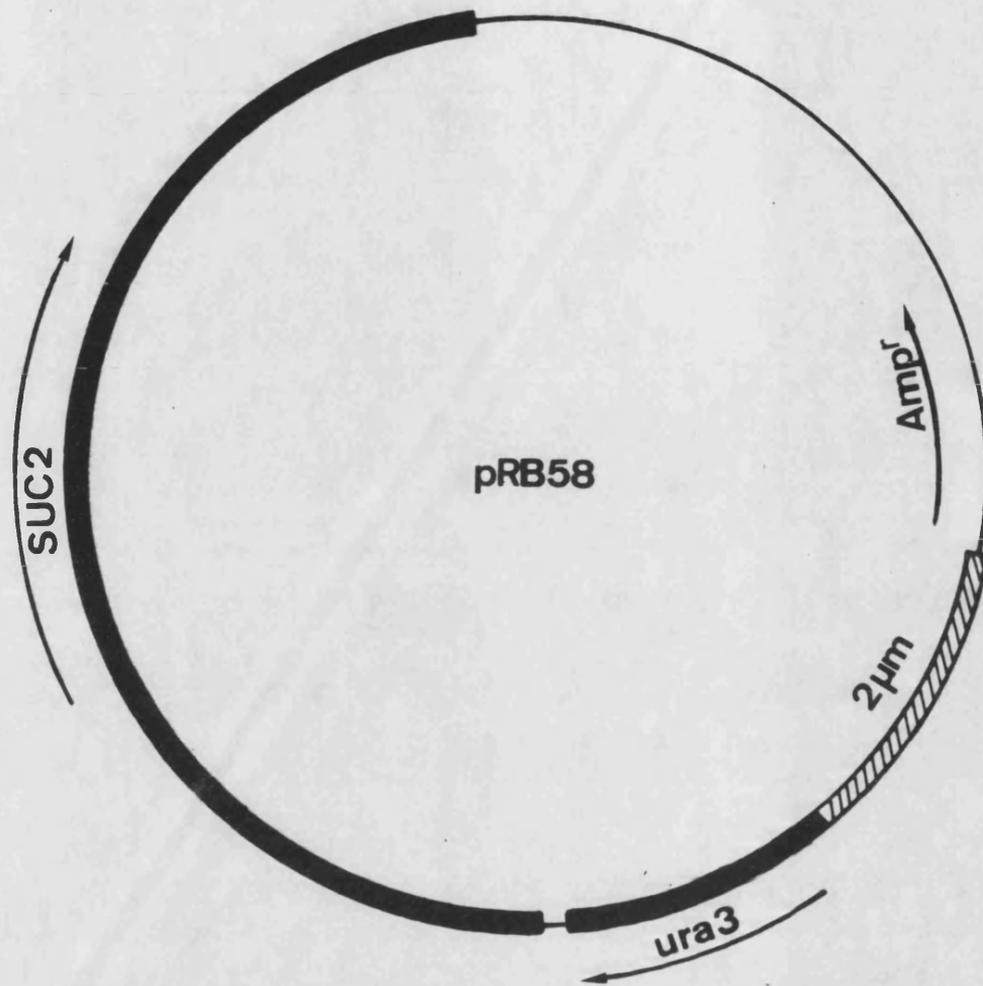


Figura 4. Representación esquemática del plásmido pRB58.  
La línea delgada representa el DNA bacteriano y la gruesa el  
DNA de levadura. Las flechas indican la dirección de  
transcripción de los genes.

Para estudiar con mayor detalle los cambios estructurales en el promotor del gen SUC2 como consecuencia de la desrepresión, se realizaron digestiones con MNasa de cromatina de células procedentes de cultivos en alta y en baja concentración de glucosa. Se aplicó la técnica del marcaje terminal indirecto, previamente descrita, y se utilizaron dos estrategias que permitieron analizar el promotor desde ambos extremos como se muestra en la Fig. 5.

A efectos de comparación con resultados anteriores de este laboratorio (Pérez-Ortín et al, 1987), la Fig. 6 muestra el resultado de un análisis típico en agarosa 1.8% utilizando restricción HindIII y la sonda HE. La numeración de las bandas coincide con la empleada en el modelo mostrado en la Introducción que se ha deducido de un análisis idéntico a éste.

Es interesante observar las diferencias existentes entre las muestras de cromatina procedentes de los dos estados transcripcionales del gen. La primera diferencia a destacar es el importante incremento de intensidad relativa de la banda 9 en el estado de desrepresión. Esta banda está presente también en el testigo de DNA desnudo lo que sugiere que estaría parcialmente protegida en estado de represión pero desprotegida en estado de desrepresión.

El proceso contrario puede observarse en la región comprendida entre las bandas 8 y 9. Esa zona resulta especialmente atacada en el estado reprimido originando una mancha continua que se extiende desde la banda 8 hacia la banda 9. En el estado desreprimido, la extensión de la zona atacada se reduce y aparece una zona protegida centrada entre dichas bandas. A esta reducción de la zona sensible se le suma una

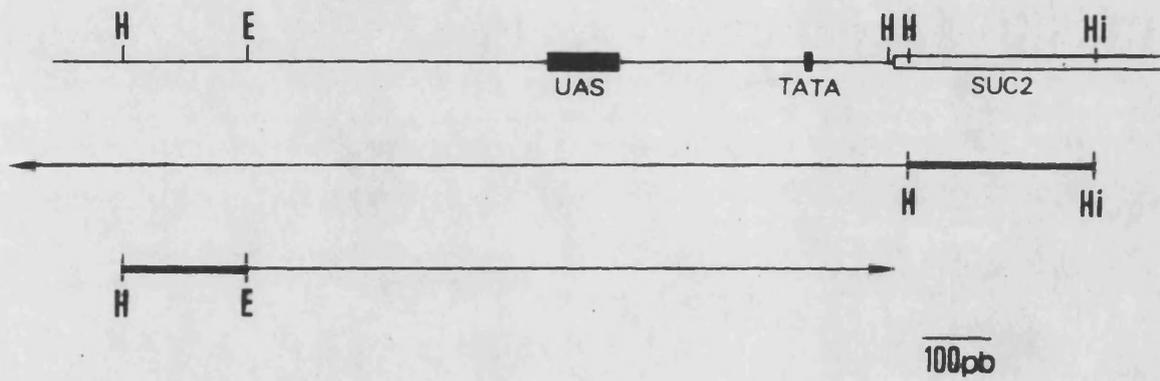


Figura 5. Sondas y estrategias utilizadas para la localización de puntos de corte de la MNasa en el flanco 5' del gen *SUC2*.  
H: *Hind*III; E: *Eco*RI; H: *Hinf*I

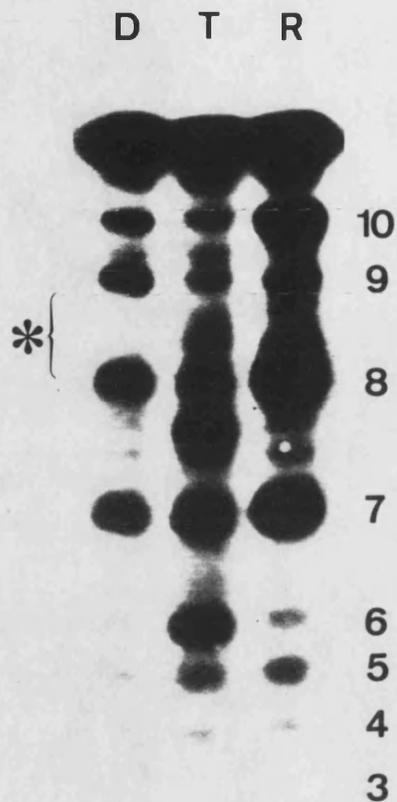


Figura 6. Localización de puntos de corte de la MNasa en el flanco 5' del gen *SUC2*.

Se utilizó restricción con *Hind*III y la sonda HE. La electroforesis se realizó en agarosa 1.8% con muestras procedentes de los estados reprimido (R) y desreprimido (D) y con un testigo de DNA desnudo digerido con MNasa (T). El asterisco indica la zona donde se producen los cambios más significativos. Los números designan las bandas de acuerdo con el modelo mostrado en la Fig. 2.

disminución de la intensidad relativa de la banda 8 y un aumento de intensidad de las dos bandas menores que se observan entre 8 y 7 en el estado desreprimido.

Estos cambios permitieron elaborar el modelo del promotor del gen SUC2 que ha servido de base al presente trabajo. Para mejorar y confirmar dicho modelo se han llevado a cabo análisis de las muestras en geles de poliacrilamida 5% con el fin de aumentar la resolución.

En primer lugar se siguió la misma estrategia del experimento anterior (restricción HindIII y sonda HE) y se obtuvieron los resultados mostrados en la Fig. 7. La mayor resolución proporcionada por éste tipo de electroforesis queda patente por el desdoblamiento en varias bandas que se observa para casi todas las bandas localizadas en las electroforesis en agarosa. Tanto la banda 7 como la banda 8 resultan ser bandas multiples. En ambas se observa que no todas las bandas observadas en acrilamida están presentes en el testigo de DNA desnudo lo que confirma su característica de típicas de cromatina como se había deducido previamente.

Este experimento aporta una serie de detalles importantes sobre la estructura de la cromatina del promotor del gen SUC2. La primera banda por debajo del fragmento de restricción es la banda 10 que es claramente más intensa en cromatina que en DNA y no sufre cambios dependientes del estado transcripcional. Por debajo de ella se observa, en estado reprimido, una zona de sensibilidad más o menos uniforme mientras que se ven dos bandas claras en el estado desreprimido. Respecto a la banda 9, existen ligeras diferencias entre ambos estados observándose, en el estado desreprimido, una extensión hacia la banda 10 que hace que la

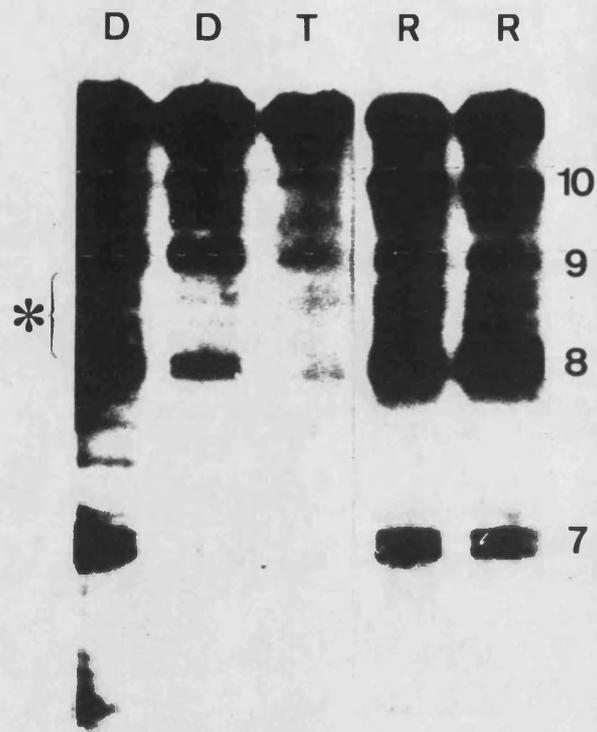


Figura 7. Localización de puntos de corte de la MNasa en el flanco 5' del gen *SUC2*. Se utilizó restricción con *Hind*III y la sonda HE. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida 5%. Otros símbolos como en la Fig. 6.

migración no coincida exactamente con la de banda 9 del estado reprimido. Esta circunstancia de doble banda justificaría el incremento de intensidad que se observaba en los análisis en agarosa.

Los cambios que se producen desde la banda 9 hasta la 8 son quizás los más significativos. La región entre ambas bandas muestra una zona muy atacada en estado reprimido que pasa a estar muy protegida en estado desreprimido. El aspecto de las muestras de represión es muy parecido al del DNA desnudo lo que sugiere que no deben existir nucleosomas en esa zona y que la protección en estado desreprimido se debe a la unión de proteínas reguladoras. Esa región coincide aproximadamente con la región reguladora descrita por Sarokin y Carlson (1984).

La banda 8 resulta estar formada por tres bandas en estado reprimido y sólo por dos en estado desreprimido. La banda que desaparece es, además, típica de cromatina puesto que no está presente en el testigo de DNA desnudo lo que hace pensar que sería la correspondiente al DNA espaciador del nucleosoma situado entre las bandas 7 y 8. Su desaparición en el estado desreprimido podría indicar la pérdida de dicho nucleosoma como consecuencia del proceso de activación transcripcional.

Los resultados de éste análisis se comprobaron mediante un experimento complementario de marcaje terminal indirecto con restricción HinfI y sonda HHi (ver Fig. 5). En la Fig. 8 se muestra el resultado que es completamente coincidente con el anterior a pesar de la menor resolución obtenida en esta electroforesis. Cabe destacar la claridad con la que se observa en el estado desreprimido la desprotección de la zona

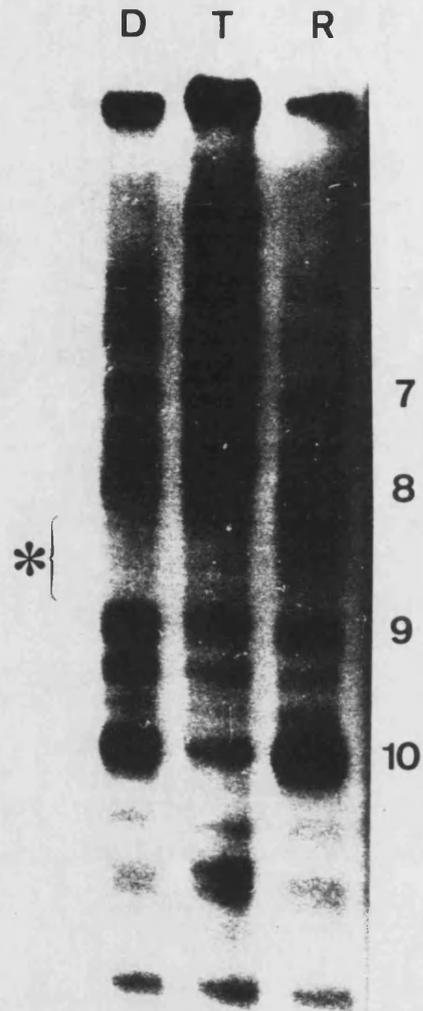


Figura 8. Localización de puntos de corte de la MNasa en el flanco 5' del gen *SUC2*. Se utilizó restricción con *HinfI* y la sonda HHi. La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida 5%. Otros símbolos como en la Fig. 6.

entre las bandas 7 y 8, la protección entre 8 y 9 y la mayor intensidad de la banda 9 así como de las existentes entre 9 y 10. Además se observa el incremento de intensidad de la banda 10 respecto al DNA desnudo y la ausencia de cambios entre las bandas 10 y 11 lo que podría indicar que el nucleosoma que ocupa la caja TATA no se pierde en desrepresión.

A partir de estos detalles se puede reafirmar la existencia de un posicionamiento de los nucleosomas en el promotor del gen SUC2 en estado reprimido que permite la accesibilidad de las regiones reguladoras, así como la pérdida de algunos de ellos, concretamente los localizados entre las bandas 7 y 8 y entre 9 y 10, debido al proceso de desrepresión.

### 3. Estructura de la cromatina del promotor del gen SUC2 en cepas mutantes en su regulación.

La organización cromatínica de los promotores de genes de expresión regulable experimenta cambios importantes que reflejan el estado funcional del gen como se ha demostrado en éste y en otros trabajos. En general, se admite que esos cambios estructurales son consecuencia de la interacción de diferentes proteínas reguladoras con sus secuencias de reconocimiento en dichos promotores pero sólo en algún caso de regulación especialmente bien conocida, como la de los genes GAL de levadura (Johnston, 1987), se ha podido demostrar una perfecta correlación entre la unión de proteínas reguladoras y la adquisición de una estructura cromatínica determinada (Lohr, 1984; Lohr y Hopper, 1985; Fedor y Kornberg, 1989).

En el caso del gen SUC2 se conocen, como ya se ha comentado en la Introducción, dos familias de genes implicados en la desrepresión de su transcripción: los genes SNF (Neugeborn y Carlson, 1984) y SSN (Carlson *et al.*, 1984). Sin embargo, y a pesar de haber sido identificados los productos génicos de varios de ellos, no se sabe cuáles son los mecanismos moleculares que desencadenan la transcripción del gen SUC2 a bajas concentraciones de glucosa ni, por tanto, cuáles son los factores proteicos que interaccionan con el promotor aunque se piensa que el mecanismo de regulación debe de ser bastante complejo debido, además, a la superposición con el mecanismo general de represión por glucosa.

Con el fin de determinar la posible implicación de los productos de varios genes reguladores del gen SUC2 en los mecanismos moleculares a nivel de su promotor, se abordó un estudio de la estructura de la cromatina del promotor en cepas mutantes para dichos genes reguladores. El estudio se llevó a cabo con cuatro cepas diferentes:

- la cepa MCY1484 posee una mutación snf1 que la hace incapaz de desreprimir la síntesis de invertasa a baja concentración de glucosa.
- la cepa MCY1250 posee una mutación snf2 que le impide desreprimir totalmente la síntesis de invertasa dando bajos niveles de actividad a baja concentración de glucosa.
- la cepa MCY1371 posee una mutación ssn6 que la hace incapaz de reprimir la síntesis de invertasa dando altos niveles de actividad tanto en baja como en alta concentración de glucosa.

- la cepa MCY1324 posee una doble mutación snf1 ssn6 que la hace fenotípicamente idéntica a la cepa MCY1371.

Para el análisis del promotor del gen SUC2 en estas cuatro cepas se utilizó restricción con HindIII y la sonda HE según la estrategia mostrada en la Fig. 5. En todos los casos, las muestras control del gen SUC2 normalmente regulado proceden de la cepa SEY2101 transformada con el plásmido pRB58 con la que se habían realizado todos los estudios previos.

Los resultados del análisis de la cepa MCY1484 (snf1) se muestran en la Fig. 9. La primera característica importante que se observa en la autorradiografía es la ausencia de cambios apreciables en la cromatina del promotor dependientes de las condiciones de concentración de glucosa. Este resultado es coherente con la incapacidad de ésta cepa para desreprimir la síntesis de invertasa puesto que además la invariable estructura que presenta coincide con la del gen reprimido en una cepa salvaje. En las muestras de la cepa MCY1484 es todavía más evidente la debilidad, casi ausencia, de la banda 9 cuya intensificación, como se ha comentado en el apartado anterior, es típica del estado desreprimido. Tampoco se observa la reducción de la zona fuertemente atacada por encima de la banda 8, de manera que el promotor del gen SUC2 en la cepa mutante snf1 presenta un aspecto general de represión, si cabe más acentuado.

A pesar de la buena correlación entre las características fenotípicas de la cepa MCY1484 y la estructura cromatínica encontrada, no resulta fácil interpretar las causas moleculares de la misma. Como ya se ha comentado, el gen SNF1 codifica una proteín-quinasa cuyas dianas no han

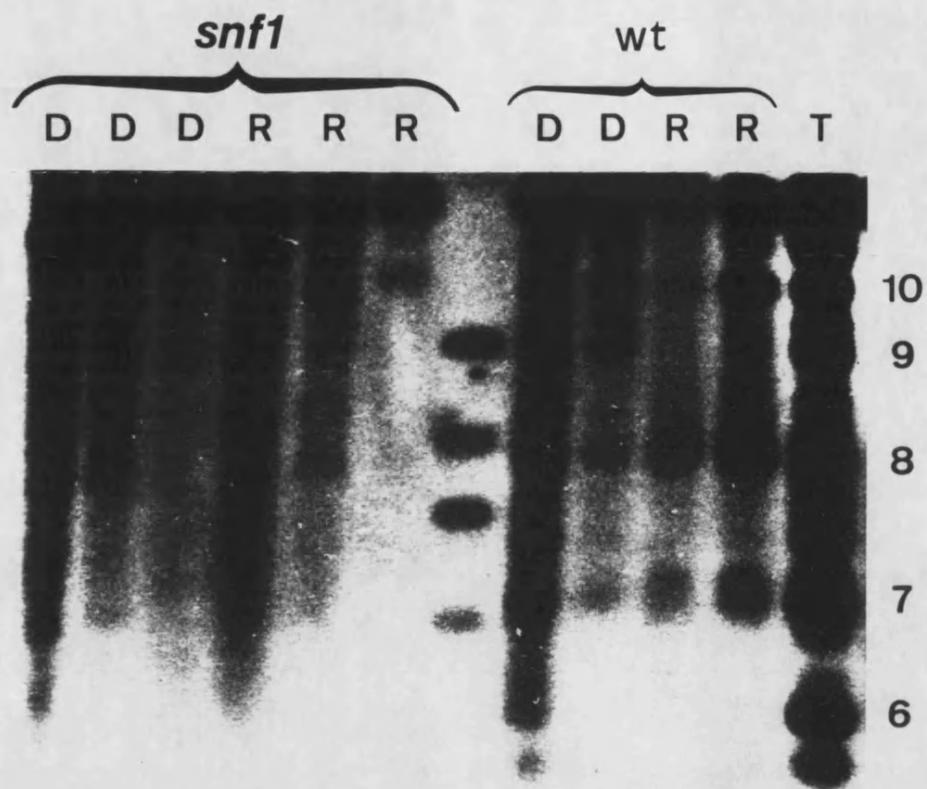


Figura 9. Análisis del promotor del gen *SUC2* en una cepa mutante *snf1*.

Las muestras señaladas como *wt* corresponden a una cepa salvaje (SEY2101/pRB58). Estrategia de mapeo y otros símbolos como en la Fig. 6.

sido identificadas (Celenza y Carlson, 1986). Es probable que la fosforilación de alguna o algunas proteínas sea un paso inicial en el funcionamiento de las mismas como reguladores, positivos o negativos. Si esto es así, la ausencia de esa proteín-quinasa funcional bloquearía, desde el principio, el mecanismo de inducción de la transcripción en ausencia de glucosa. Parece lógico pensar que en ausencia de esa señal inicial los procesos siguientes estén impedidos y el promotor del gen SUC2 presente una estructura absolutamente reprimida.

La Fig. 10 muestra los resultados del análisis del promotor del gen SUC2 en la cepa MCY1250 (snf2). Puede observarse como, en este caso, el cambio de condiciones de represión a condiciones de desrepresión sí va acompañado por cambios en la estructura de la cromatina aunque no tan evidentes como en la cepa salvaje. La banda 9 se intensifica en el estado desreprimido pero no llega a superar en intensidad a las bandas 8 y 10 como ocurre en las muestras control de la cepa salvaje. Por otra parte, no se produce la reducción de la zona sensible por encima de la banda 8 ni aparece la zona fuertemente protegida. Estos datos sugieren que la mutación snf2 impide la adquisición de una estructura totalmente desreprimida y son coherentes con las características fenotípicas de la cepa que es capaz de desreprimir sólo parcialmente la síntesis de invertasa, dando niveles más bajos de los normales en condiciones de desrepresión (Abrams et al., 1986).

La información disponible sobre el producto del gen SNF2 sugiere que actuaría como un factor general de transcripción puesto que también parece afectar a la expresión de otros genes no regulados por glucosa (Abrams et al., 1986). Se ha sugerido que el producto génico de SNF2

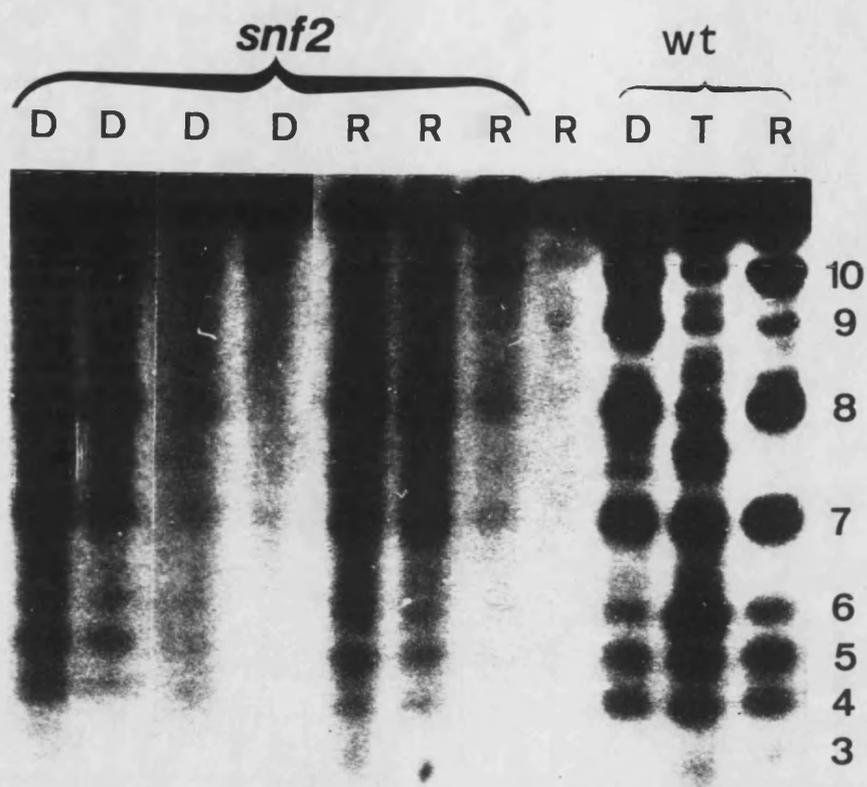


Figura 10. Análisis del promotor del gen *SUC2* en una cepa mutante *snf2*.  
Estrategia de mapeo y otros símbolos como en las Fig. 6 y 9.

podría favorecer la formación de un complejo de transcripción estable, potenciando un alto nivel de transcripción. Si fuera esa su función, su ausencia afectaría tanto a la regulación correcta del gen como a la adquisición de una estructura cromatínica típica de desrepresión. Sin embargo no tendría por qué impedir la unión a las secuencias del promotor de otros factores proteicos reguladores, posibles responsables de los cambios estructurales que sufre el promotor del gen SUC2 en la cepa snf2.

Los resultados del análisis del promotor del gen SUC2 en la cepa MCY1373 (ssn6) se muestran en la Fig. 11. Como ocurría en el caso de la cepa mutante snf1, el rasgo más importante de la cromatina del promotor es la ausencia de cambios estructurales dependientes de la concentración de glucosa. La estructura observada en la cepa ssn6 es, además, coincidente con la mostrada por la cepa salvaje en condiciones de desrepresión del gen SUC2, siendo aún más evidentes los rasgos característicos del estado transcripcionalmente activo. Estos resultados son totalmente equivalentes a los obtenidos en el análisis de la cepa MCY1324 (snf1 ssn6) como puede verse en la Fig. 12.

En ambas cepas, la mutación ssn6 ocasiona una síntesis constitutiva elevada de invertasa y esto se refleja en una estructura cromatínica del promotor del gen SUC2 típica del estado desreprimido. Como ya se ha comentado en la Introducción, el producto del gen SSN6 no ha sido identificado pero la relación epistática de las mutaciones ssn6 sobre las snf1 (Neigeborn y Carlson, 1987) ha hecho que se le considere como probable regulador negativo directo de la transcripción del gen SUC2 (Schultz y Carlson, 1987). El hecho de que un doble mutante snf1 ssn6



Figura 11. Análisis del promotor del gen *SUC2* en una cepa mutante *ssn6*.

Estrategia de mapeo y otros símbolos como en las Fig. 6 y 9.



Figura 12. Análisis del promotor del gen *SUC2* en una cepa mutante *snf1 ssn6*.

Estrategia de mapeo y otros símbolos como en las Fig. 6 y 9.

se comporte igual que un mutante ssn6 SNF1 indica que, en ausencia del producto génico funcional del gen SSN6, no es necesaria la intervención de la proteín-quinasa SNF1 para que se produzca la desrepresión de la síntesis de invertasa. Quizás, la proteín-quinasa SNF1 conduzca a la inactivación del represor SSN6 via fosforilación directa o indirecta a través de alguna proteína intermediaria. Si esto fuera así, en ausencia del producto SSN6 funcional se produciría un estado desreprimido constitutivo como el observado tanto en la cepa MCY1371 como en la cepa MCY1324.

Dada la complejidad de los mecanismos de regulación del gen SUC2 (Neigeborn y Carlson, 1987; Entian, 1986) resulta difícil establecer relaciones directas entre las características estructurales de la cromatina de su promotor en las cepas mutantes analizadas y el producto génico afuncional que estas poseen. Sin embargo resulta clara, a partir de éste estudio, la perfecta correlación entre las características fenotípicas de síntesis de invertasa y la estructura de la cromatina detectada en el promotor del gen SUC2 para los diferentes mutantes. Los rasgos característicos de los estados reprimido y desreprimido se observan con mayor claridad en los mutantes que en la cepa salvaje en dichos estados debido, probablemente, a que en ellos la represión y la desrepresión son absolutas debido a su constitutividad. Sin embargo en una cepa salvaje, el estado reprimido no supone una ausencia total de transcripción, puesto que el gen SUC2 es transcrito constitutivamente para producir el mRNA de 1.8 kb, y esto significa que un porcentaje más o menos representativo de las moléculas esta siendo transcrito. De igual forma, el estado desreprimido supone un incremento de la tasa de transcripción pero nunca estarán siendo transcritas a la vez todas las moléculas. Esta

circunstancia impide observar claramente un estado totalmente reprimido o totalmente desreprimido en una cepa salvaje mientras que en las cepas mutantes el porcentaje de moléculas en el mismo estado es, probablemente del 100%.

Reuniendo los datos obtenidos en el apartado anterior y los obtenidos en el estudio de los mutantes, se puede elaborar un esquema, ahora confirmado y detallado, de los cambios estructurales que sufre el promotor del gen SUC2 como consecuencia de la desrepresión transcripcional se muestra en la Fig. 13. En el modelo se reflejan los puntos de hipersensibilidad a la DNasa I, previamente determinadas (Pérez-Ortín et al., 1986a) y señaladas con puntas de flecha, los puntos de corte de la MNasa señalados con flechas enteras, y el posicionamiento de los nucleosomas deducido a partir de éstos. Los tres sitios hipersensibles localizados sobre la región reguladora localizada aproximadamente a -500 coinciden con la zona fuertemente atacada por la MNasa entre las bandas 8 y 9, en estado de represión. Esta zona queda protegida en el estado desreprimido, probablemente por la interacción con proteínas reguladoras.

La pérdida del nucleosoma II viene apoyada por la mayor intensidad de las bandas entre 7 y 8, como se observa claramente en el análisis desde HinfI, y por la desaparición de una de las tres bandas que componen la banda 8, probablemente la característica de cromatina, como se observa en el análisis desde HindIII.

Respecto al nucleosoma III, es evidente la aparición en estado desreprimido de bandas típicas de DNA entre 9 y 10 en todos los análisis

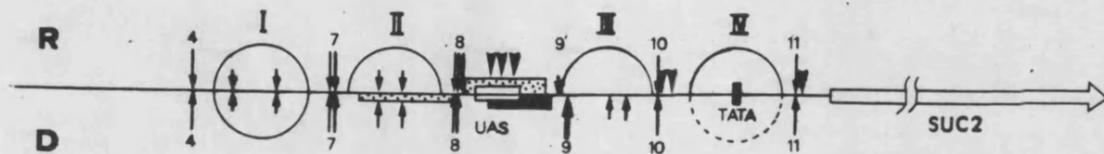


Figura 13. Modelo de la estructura de la cromatina del promotor del gen *SUC2*.

Sobre la línea delgada, que representa el DNA, se han señalado con círculos los nucleosomas posicionados (I, II, III, IV). Las puntas de flecha indican sitios hipersensibles a la DNasa I. Las flechas indican puntos de corte de la MNasa y su longitud la intensidad relativa de dichos cortes. Las cajas punteadas indican zonas especialmente sensibles a la MNasa y la caja rayada una zona especialmente protegida en el estado desreprimido. La mitad superior de la figura se refiere al estado reprimido (R) y la inferior al desreprimido (D).

realizados, lo que indica que esa zona deja de estar protegida por la presencia de un nucleosoma.

No disponemos de datos que apoyen la desaparición del nucleosoma IV, localizado sobre la caja TATA y situado entre las bandas 10 y 11. El espaciado entre esas dos bandas es compatible con el tamaño nucleosomal pero, dada la región del gel donde migran esas bandas, tampoco resulta fácil observar cambios entre ambos estados. El mantenimiento de este nucleosoma está en discrepancia con los resultados de Lorch *et al.* (1987) según los cuales la RNA polimerasa no puede iniciar la transcripción en un nucleosoma. Sin embargo, también en otros trabajos se presentan dudas acerca de la conservación de los nucleosomas que ocupan la caja TATA, como en el realizado por Almer *et al.* (1986) para el promotor del gen PHO5. Además, existe la posibilidad de que se produzca un reconocimiento de secuencias ensambladas en un nucleosoma, como ha sido revisado recientemente (Elgin, 1988).

Las características encontradas en el promotor del gen SUC2 presentan una completa correspondencia con las encontradas para los promotores de otros genes de levadura como el gen PHO5 (Almer *et al.*, 1986) y el gen TDH3 (Paulovic y Hörz, 1988). También en estos genes se ha encontrado una organización cromatínica en el promotor definida por la existencia de sitios hipersensibles a la DNasa I y de nucleosomas posicionados. El posicionamiento de los nucleosomas permite, en todos ellos, la accesibilidad de las zonas reguladoras y se ha detectado la pérdida de nucleosomas en asociación con el proceso de transcripción. Esta similitud de resultados sugiere que los procesos de activación transcripcional en S. cerevisiae, como en otros eucariotas, muestran una clara relación con

la organización cromatínica de los promotores. Dicha relación se refiere no sólo a los cambios estructurales que la activación puede originar, sino también a la importancia que puede tener la existencia de una organización previa concreta que permita el acceso de proteínas reguladoras como ya se ha comentado en la Introducción. También la pérdida de nucleosomas en el promotor es un hecho bastante generalizado y parece asociado a la activación transcripcional como han demostrado Han y Grunstein (1988).

#### 4. Estructura de la cromatina del flanco 3' del gen SUC2.

##### 4.1. Consideraciones teóricas.

A partir de los trabajos previos sobre estructura de la cromatina del gen SUC2 en estados reprimido y desreprimido (Pérez-Ortín *et al.*, 1987), el planteamiento general del presente trabajo fue un estudio más completo de las regiones implicadas en la regulación transcripcional del gen. Evidentemente, éste estudio debía centrarse sobre su promotor pero sin olvidar otra región cuyas características estructurales merecen, también, especial atención. Ya se ha comentado en la Introducción la existencia, en el flanco 3' del gen SUC2, de una amplia zona, de aproximadamente 2.3 kb, con una organización cromatínica muy característica. Dicha región está delimitada por dos sitios hipersensibles a nucleasas localizados a aproximadamente +1950 y +4350. Entre ellos aparece una sucesión de 13 nucleosomas perfectamente posicionados y con unos espaciados, en general, más grandes de los 165 pb típicos del genoma de levadura. Dentro de la regularidad de ésta región de la cromatina existe un tramo central donde alternan espaciados de cortes de la MNasa grandes con otros pequeños, lo que sugirió que esa zona podría

no estar ocupada por nucleosomas o, al menos, estarlo por nucleosomas alterados. Esta idea se vió apoyada por la comprobación de que esa zona central del flanco 3' experimentaba claros cambios estructurales asociados al proceso de represión/desrepresión tal como se muestra en la Fig. 2 (ver Introducción).

La estructura cromatínica del flanco 3' del gen presenta por sí misma un considerable interés puesto que no se trata de un caso aislado. Una estructura totalmente equivalente ha sido detectada por Szent-Györgyi *et al.* (1987) en los flancos 5' y 3' lejanos del gen HSP82 de levadura. La extraordinaria similitud de estas dos regiones del genoma de levadura sugiere que tal organización debe tener un significado, quizás estructural, en el funcionamiento de la cromatina (Pérez-Ortín *et al.*, 1989).

Desde el punto de vista del planteamiento general de éste trabajo, la existencia además de cambios estructurales asociados a la desrepresión en ésta región nos llevó a plantearnos un estudio de los posibles mecanismos que determinan la adquisición de tal estructura y del significado que pueden tener sus cambios en relación con la expresión del gen SUC2.

Respecto a los mecanismos determinantes del posicionamiento de los nucleosomas en el flanco 3' del gen SUC2, cabe plantearse varias posibilidades. Un primer mecanismo podría ser, como se comentó en la Introducción, la dependencia de la secuencia de nucleótidos de DNA en esa región (Drew y Travers, 1985; Mengeritsky y Trifonov, 1987). No se conocen las secuencias de nucleótidos de esas zonas del genoma de levadura (cercanas a los genes HSP82 y SUC2) pero no parece probable que

zonas alejadas y no relacionadas del mismo pueda poseer determinantes de secuencia idénticos.

Dado que, en ambos casos, tal estructura está delimitada por dos sitios hipersensibles a nucleasas podría ocurrir que los nucleosomas ocuparan posiciones estrictas debido al efecto posicionador de dichos sitios hipersensibles. Tal mecanismo ha sido demostrado, mediante construcciones especialmente diseñadas para ese tipo de estudios, por Thoma (1986) y por Fedor *et al.* (1988).

Para analizar la posible actuación como posicionadores de los sitios hipersensibles a nucleasas del flanco 3' del gen SUC2 se elaboró un programa de ordenador basado en un algoritmo propuesto por Kornberg y Stryer (1988) para predecir mecanismos estocásticos de posicionamiento de los nucleosomas. Las variables utilizadas por el programa son: el tamaño del "core" nucleosomal (D), el tamaño del DNA espaciador (L) y la longitud, en pb, del fragmento de DNA sobre el que se localizan los nucleosomas (Z). A partir de estos datos, el programa elabora un gráfico, como el mostrado en la Fig. 14, donde los máximos representan máxima probabilidad de corte de la nucleasa, es decir, corresponden a posiciones de DNA espaciadores, y los mínimos representan las posiciones sobre las que se centran los nucleosomas. Los valores de D y de L, para la predicción de la Fig. 14, corresponden a las típicas del genoma de levadura (D=146, L=20) y se ha considerado la existencia de dos posicionadores separados por 2300 pb, como corresponde al caso del flanco 3' del gen SUC2. Los números indican las posiciones teóricas de los puntos de corte de la MNasa y los números entre paréntesis los valores experimentales. Debe tenerse en cuenta una serie de factores que

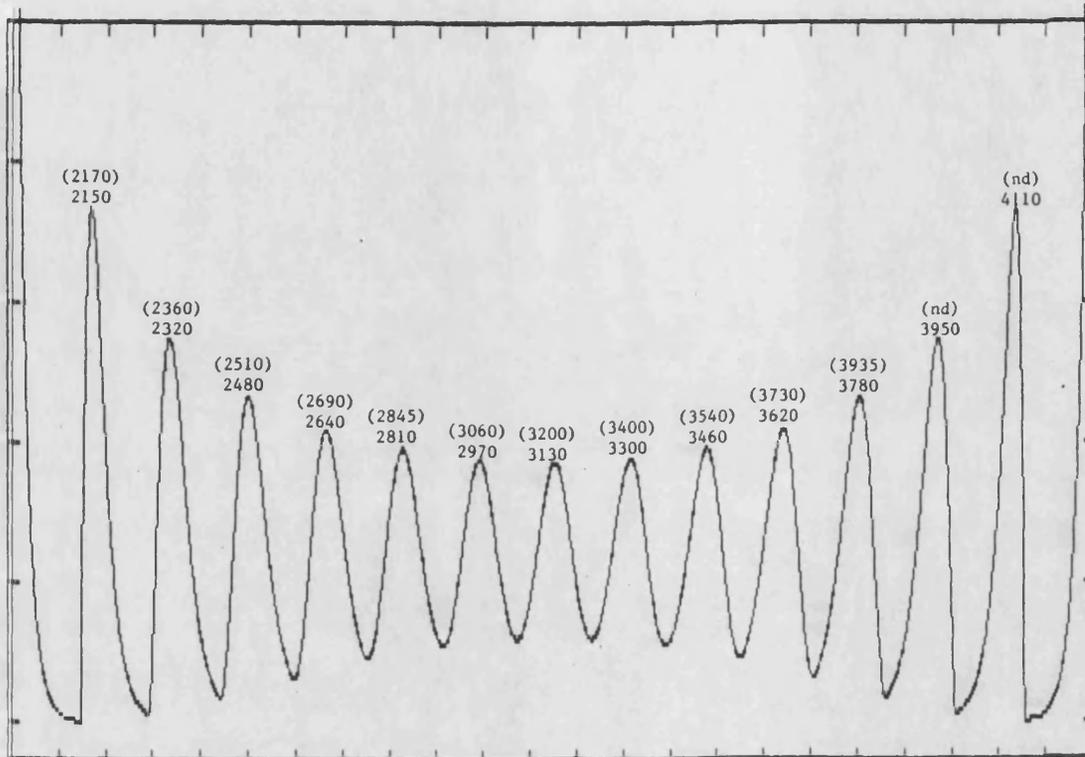


Figura 14. Predicción teórica de posicionamiento estocástico de los nucleosomas en el flanco 3' del gen *SUC2* dependiente de dos posicionadores.

$D=146$ ;  $L=20$ ;  $Z=2300$ . Los números indican las posiciones teóricas de los DNAs espaciadores y los números entre paréntesis las posiciones experimentales.

pueden contribuir a aumentar la discrepancia entre los valores teóricos y los experimentales:

- no se conoce exactamente la distancia entre los dos sitios hipersensibles, con lo que el valor  $Z=2300$  es sólo aproximado.

- los datos experimentales proceden de un experimento de marcaje terminal indirecto desde un punto de restricción XbaI localizado en la región codificante del gen SUC2, a aproximadamente 1100 pb del sitio hipersensible en +1950. Esto hace que la determinación de los tamaños de las bandas y, por lo tanto, de las posiciones de los puntos de corte de la MNasa no sea igualmente fiable a lo largo de todo el tramo analizado de manera que la determinación es menos exacta a medida que nos alejamos en dirección 3'.

- existen datos que sugieren que los nucleosomas centrales en ésta región podrían estar alterados ya que en esa zona no existe una regularidad completa en el espaciado de los cortes de la MNasa.

A pesar de estos factores, la predicción teórica presenta una buena correlación con los datos experimentales, salvo en el número de nucleosomas que sitúa entre los dos posicionadores. La predicción indica 14 nucleosomas mientras que experimentalmente se encuentran sólo 13. Las posiciones de los espaciadores correspondientes a los tres primeros nucleosomas son las que presentan una mejor correlación y una mayor probabilidad y son éstos los nucleosomas más estrictamente posicionados.

Las discrepancias aumentan a medida que nos alejamos en dirección 3' hasta llegar a incluir un nucleosoma más. Un detalle a considerar es que, como ya se ha comentado, el tamaño promedio de los nucleosomas en

esta región es algo mayor del típico de levadura, aproximadamente 180 pb de media. Puesto que el tamaño del "core" es constante, ese mayor tamaño tiene que deberse a una mayor longitud del DNA espaciador. Por este motivo se realizó una nueva predicción teórica considerando un valor de  $L=35$  y se obtuvieron los resultados mostrados en la Fig. 15. Puede observarse como, en este caso, se predicen 13 nucleosomas y, además, la discrepancia entre los valores teóricos y los experimentales es considerablemente menor que en la Fig. 14.

La buena correlación existente entre las predicciones teóricas (sobre todo la realizada para un valor de  $L=35$ ) y los datos experimentales sugiere que la adquisición de la estructura cromatínica del flanco 3' del gen SUC2 obedece, principalmente, a un mecanismo estocástico de posicionamiento de nucleosomas dependiente de dos posicionadores separados, aproximadamente, 2300 pb.

Para completar el estudio se realizó una predicción teórica de posicionamiento dependiente de un sólo posicionador considerando los dos tamaños de DNA espaciador utilizados para las predicciones anteriores. Los resultados de la predicción se muestran en las Fig. 16 y 17 donde puede observarse que si las posiciones de los nucleosomas en el flanco 3' del gen SUC2 dependieran únicamente del sitio hipersensible localizado al final de la transcripción, el posicionamiento se perdería a partir del cuarto o quinto nucleosoma y no se extendería a los largo de 2.3 kb como ocurre realmente. Esto confirma la conclusión anterior acerca de la existencia de dos posicionadores. Además se observa una clara diferencia entre las predicciones obtenidas para los diferentes valores de  $L$ , como ocurría en las predicciones para dos posicionadores. El valor de  $L=35$

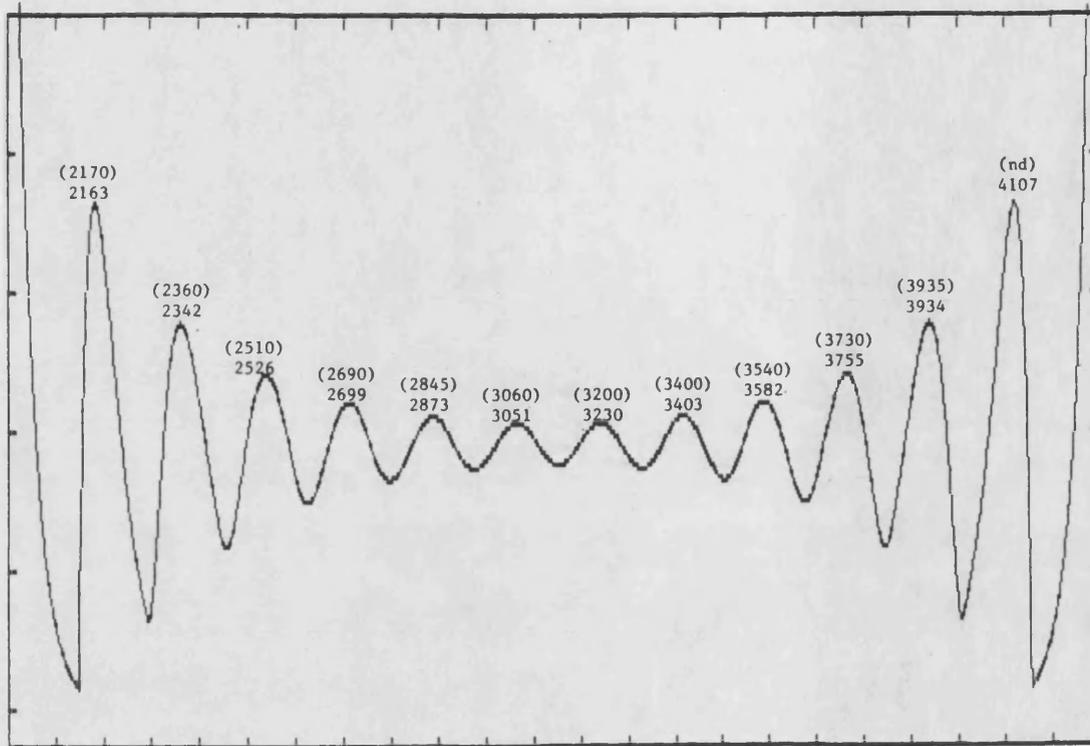


Figura 15. Predicción teórica de posicionamiento estocástico de los nucleosomas en el flanco 3' del gen *SUC2* dependiente de dos posicionadores.  
D=146; L=35; Z=2300. Símbolos como en la Fig. 14.

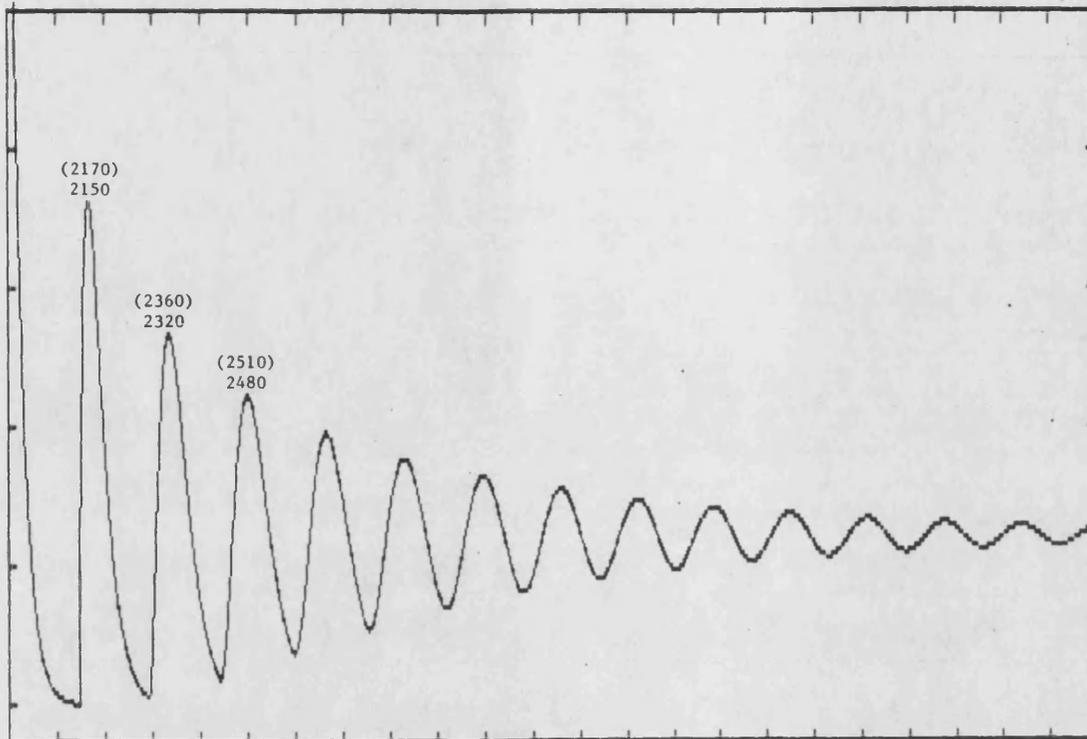


Figura 16. Predicción teórica de posicionamiento estocástico de los nucleosomas en el flanco 3' del gen *SUC2* dependiente de un posicionador.

$D=146$ ;  $L=20$ ;  $Z=2300$ . Símbolos como en la Fig. 14.



predice un menor número de nucleosomas posicionados que, como se verá en el siguiente apartado muestra una mejor correlación con los resultados experimentales.

#### 4.2. Efecto de los sitios hipersensibles a la DNasa I sobre el posicionamiento de los nucleosomas en el flanco 3' del gen SUC2.

Con el objeto de comprobar experimentalmente los resultados de la predicción teórica sobre el posicionamiento de los nucleosomas se construyeron dos plásmidos, derivados del pRB58, portadores de deleciones del flanco 3' del gen SUC2. Las Fig. 18 y 19 muestran esquemas de los procesos de construcción de ambos plásmidos que se denominaron pSUC $\Delta$ 325 y pSUC $\Delta$ 327.

Tal como se ha comentado en el apartado anterior, la estructura de la cromatina del flanco 3' podría depender de la existencia de dos sitios hipersensibles delimitantes que actuarían como posicionadores de los nucleosomas localizados entre ellos. Los plásmidos pSUC $\Delta$ 325 y pSUC $\Delta$ 327 permiten comprobar esta hipótesis.

El plásmido pSUC $\Delta$ 325 posee una deleción que empieza en un sitio HindIII (aproximadamente en +2100), justo después del sitio hipersensible localizado al final de la transcripción. Este plásmido ha perdido el sitio hipersensible lejano pero conserva el primero de ellos. Las secuencias de DNA adyacentes al sitio hipersensible han resultado sustituidas con DNA de pBR322 respecto a las originales, con lo que se puede estudiar si el posicionamiento de los nucleosomas adyacentes a ese sitio hipersensible dependen de él o de la secuencia de DNA.

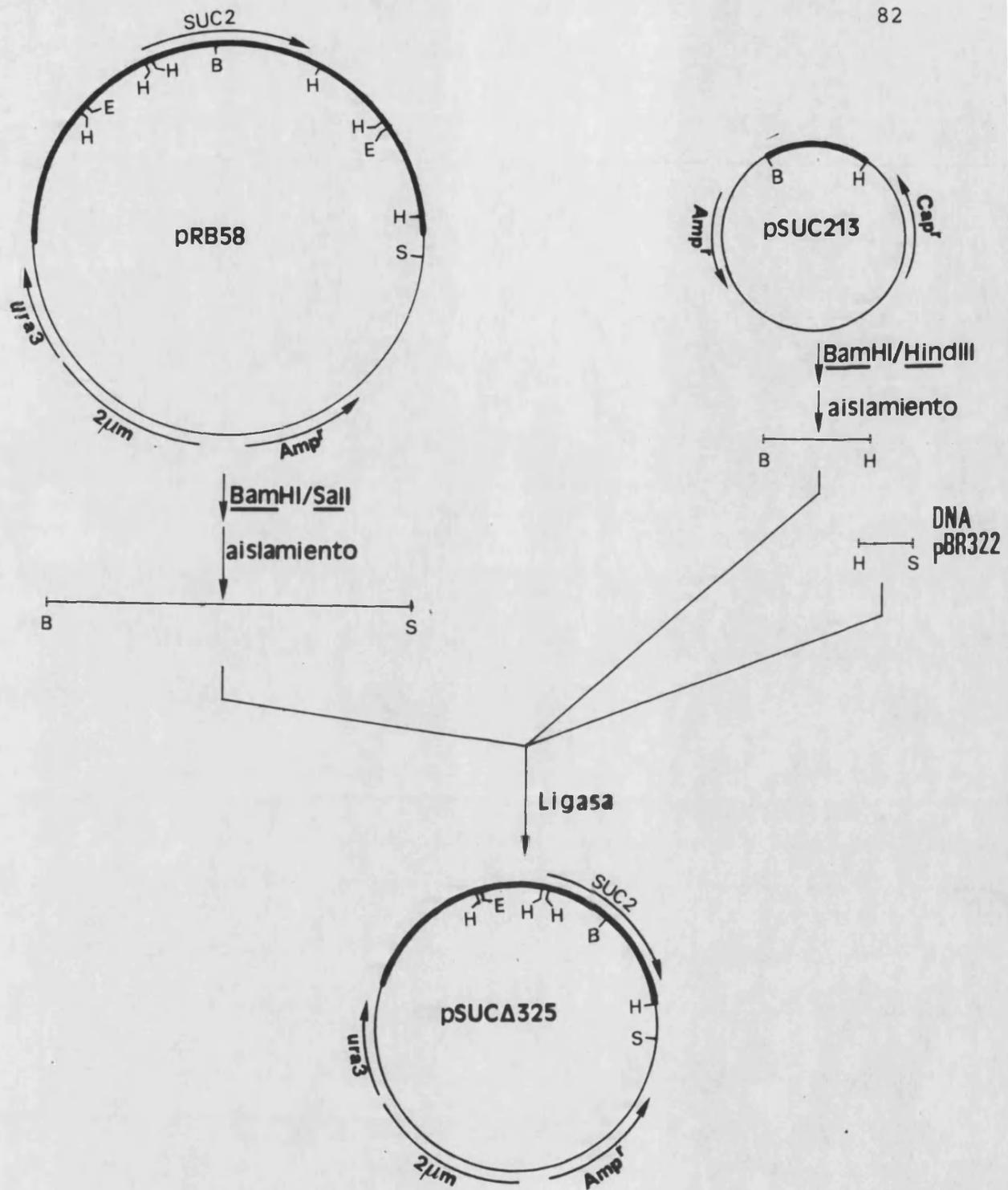


Figura 18. Esquema del proceso de construcción del plasmido pSUC $\Delta$ 325.

B: BamHI; H: HindIII; E: EcoRI; S: SalI

La línea gruesa representa el fragmento de DNA de levadura que contiene al gen SUC2 o parte de él.

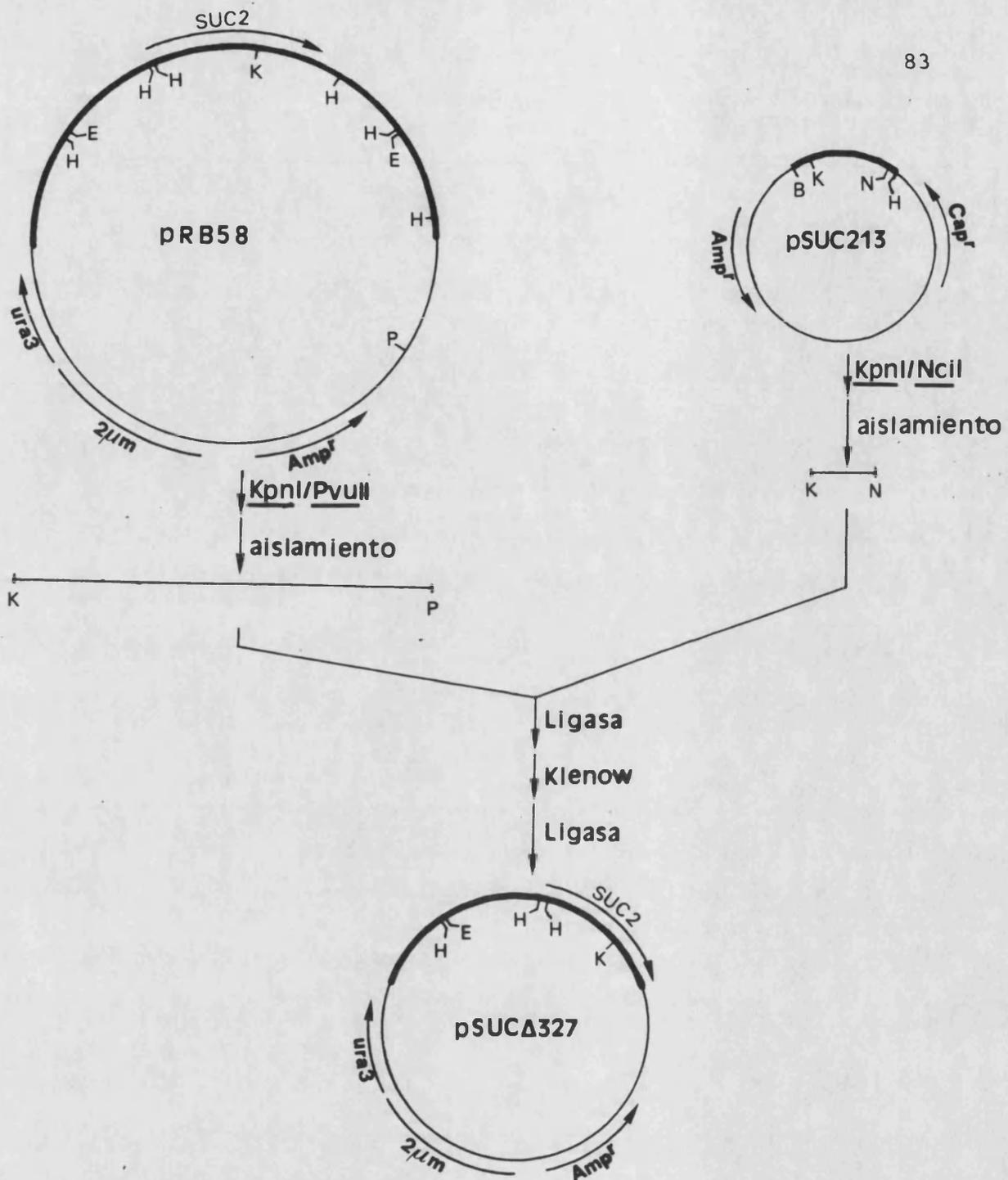


Figura 19. Esquema del proceso de construcción del plásmido pSUCΔ327.

B: *Bam*HI; H: *Hind*III; E: *Eco*RI; P: *Pvu*II; N: *Nci*I.

La línea gruesa representa el fragmento de DNA de levadura que contiene al gen *SUC2* o parte de él.

El plásmido pSUCΔ327 posee una deleción que empieza en un sitio NciI (+1930), justo dentro del sitio hipersensible localizado al final de la transcripción. En este plásmido se han perdido ambos sitios hipersensibles.

Se transformó con ambos plásmidos la cepa de S. cerevisiae SEY2101 según se describe en Materiales y Métodos. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en placas de MM carente de uracilo y se comprobaron mediante un análisis del plásmido que portaban (Pérez-Ortín y Estruch, 1988).

El análisis de la estructura de la cromatina del flanco 3' del gen SUC2 en las cepas portadoras de los plásmidos pSUCΔ325 y pSUCΔ327 se realizó mediante restricción con XbaI y la sonda XK según la estrategia mostrada en la Fig. 20. Las muestras se analizaron en geles de agarosa 1% de 24 cm de longitud con el fin de obtener una buena resolución en la zona de interés, que empieza a 1100 pb del punto XbaI.

La Fig. 21 muestra los resultados del análisis de las dos cepas mencionadas. Puede observarse como en el plásmido pSUCΔ325, a pesar de haber una secuencia de DNA diferente después del sitio hipersensible, se mantienen las posiciones de las tres primeras bandas lo que indica que los tres primeros nucleosomas ocupan las mismas posiciones que en el flanco 3' natural del gen. En el plásmido pSUCΔ327, el sitio hipersensible ha desaparecido y el patrón de puntos de corte de la MNasa es totalmente diferente desde el punto de inicio de la deleción.

Estos resultados confirman la hipótesis previa sobre las causas determinantes de la estructura cromatínica del flanco 3' del gen SUC2 y

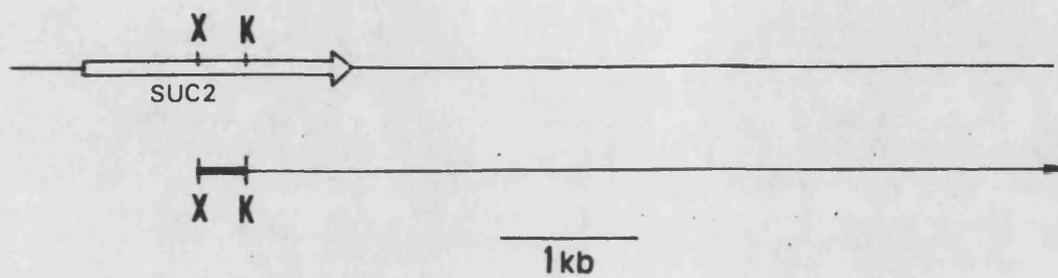


Figura 20. Sonda y estrategia utilizada para la localización de puntos de corte de la MNasa en la mitad derecha y flanco 3' del gen *SUC2*.  
X: *Xba*I; K: *Kpn*I.

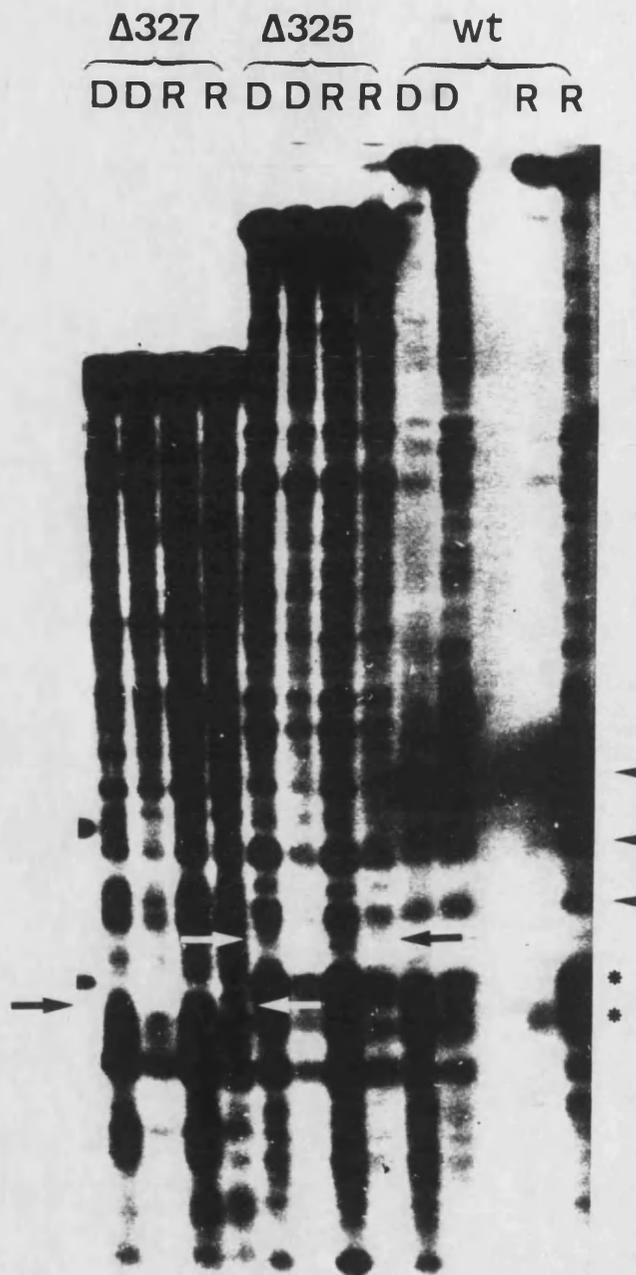


Figura 21. Análisis del flanco 3' del gen *SUC2* en mutantes de delección.

Se utilizó restricción con *Xba*I y la sonda XK. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa 1% de 24 cm de longitud. Los asteriscos indican las dos bandas constituyentes del sitio hipersensible localizado al final de la transcripción. Las puntas de flecha indican las 3 bandas que mantienen sus posiciones en la delección  $\Delta 325$ . Las flechas indican el punto de inicio de cada una de las delecciones. Otros símbolos como en las Fig. 6 y 9.

son totalmente compatibles con resultados obtenidos por otros autores sobre posicionamiento de nucleosomas dependientes de posicionadores (Fedor et al., 1988). Debe existir algún componente de secuencia en el mecanismo de posicionamiento en esta región, puesto que la predicción teórica indica 5-6 nucleosomas posicionados y experimentalmente se observan sólo 3, pero éste no debe ser muy acusado puesto que los nucleosomas adyacentes al sitio hipersensible mantienen sus posiciones aunque se cambie la secuencia sobre la que se forman.

Como ya se mencionaba en el apartado anterior, la predicción realizada para un valor de  $L=35$  se aproxima más a los datos experimentales que la realizada con un valor de  $L=20$ , dando un menor número de nucleosomas posicionados y unas posiciones para los espaciadores menos discrepantes con las experimentales.

#### 4.3. Estructura de la cromatina del flanco 3' del gen SUC2 en cepas mutantes en su regulación.

Como ya se ha comentado, los cambios estructurales asociados a la desrepresión del gen SUC2 no se limitan a su promotor sino que también afectan a una región de su flanco 3', cuya relación con la regulación no resulta obvia (Pérez-Ortín et al., 1987). Dicha región se extiende entre las posiciones +2700 y +3400, aproximadamente, y se caracteriza por presentar, en el estado reprimido, espaciados de corte de la MNasa grandes y pequeños alternados. Además se producen cambios en el grado de accesibilidad de los puntos de corte cuando el gen se desreprime de manera que aumenta considerablemente la accesibilidad de las bandas entre +2700 y +3000 y resulta fuertemente protegida la zona entre +3000 y +3400. Estos cambios dependientes de la concentración de glucosa

sugieren una posible relación del flanco 3' del gen con su regulación, a pesar de la localización no habitual de esta región con respecto al gen.

Por estos motivos se decidió abordar un estudio de los cambios estructurales del flanco 3' del gen SUC2 en las cepas mutantes en su regulación que habían servido para el análisis del promotor, con el fin de estudiar la relación de dicha zona con los cambios de actividad transcripcional.

Para el análisis del flanco 3' se utilizó restricción con XbaI y la sonda XK según la estrategia mostrada en la Fig. 20. Los resultados del análisis en las cuatro cepas mutantes se muestran en las Fig. 22 y 23, donde se ha señalado la zona de interés sobre las muestras control de la cepa salvaje.

La cepa MCY1484 (snf1, no desreprimible) presenta una estructura cromatínica en su flanco 3' independiente de la concentración de glucosa e idéntica a la del gen SUC2 reprimido en la cepa salvaje.

La cepa MCY1371 (ssn6, no reprimible) también presenta una estructura independiente de la concentración de glucosa pero, en este caso, idéntica a la del gen desreprimido. El mismo resultado puede observarse para la cepa MCY1324 (snf1 ssn6, no reprimible).

Son menos claros los resultados obtenidos para la cepa MCY1250 (snf2, parcialmente desreprimible) en la que no se producen los cambios típicos de la cepa salvaje pero tampoco parece que la estructura sea totalmente independiente de la concentración de glucosa, observándose ligeros diferencias entre los dos estados.

$\overbrace{\text{ssn6}}$        $\overbrace{\text{snf1}}$        $\overbrace{\text{wt}}$   
 DDR R      DDR R DDTR R

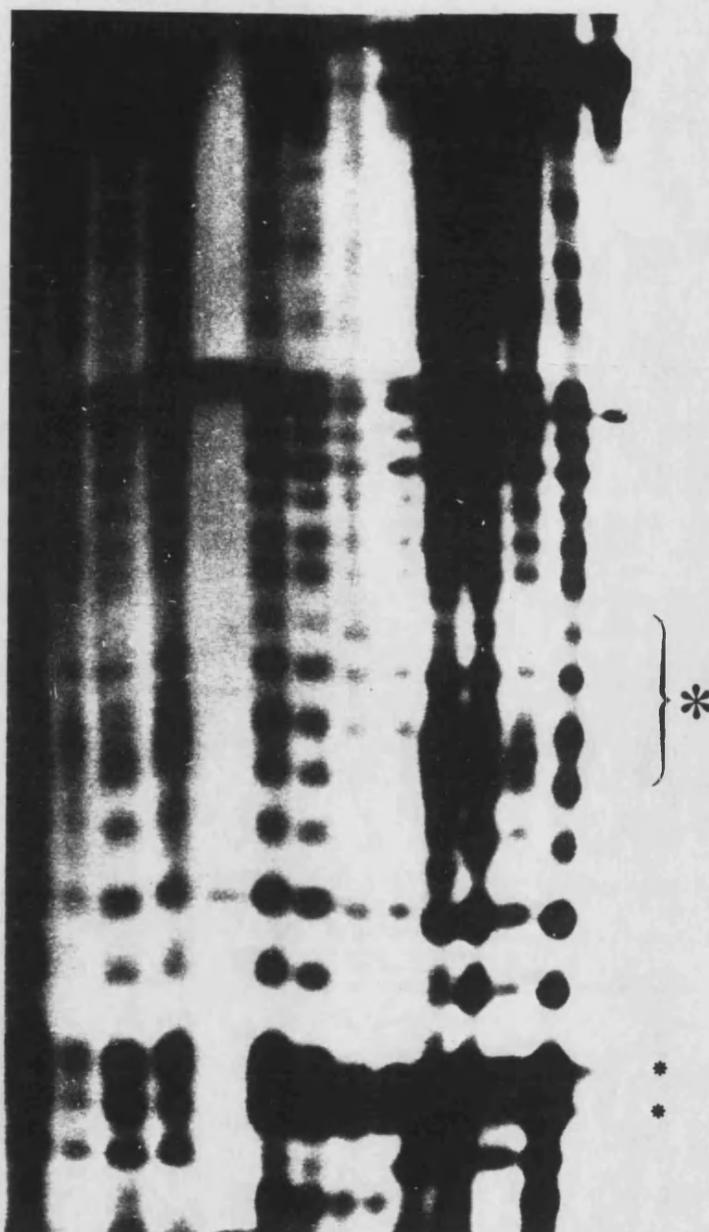


Figura 22. Análisis del flanco 3' del gen *SUC2* en las cepas mutantes *snf1* y *ssn6*.

Se utilizó restricción con *XbaI* y la sonda XK. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa 1% de 24 cm de longitud. Los asteriscos pequeños indican las dos bandas constituyentes del sitio hipersensible localizado al final de la transcripción. El asterisco grande indica la zona donde se producen los cambios estructurales dependientes de glucosa. Otros símbolos como en las Fig. 6, 9 y 21.

*snf2*      *wt*      *snf1ssn6*  
 D R      R D      D R

9)



Figura 23. Análisis del flanco 3' del gen *SUC2* en las cepas mutantes *snf2* y *snf1 ssn6*.

Se utilizó restricción con *XbaI* y la sonda XK. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa 1% de 24 cm de longitud. Otros símbolos como en las Fig. 6, 9 y 22.

En las cuatro cepas, el flanco 3' del gen SUC2 presenta características coincidentes con las de su promotor, es decir, una estructura cromatínica típica del estado activo o del estado inactivo de forma coherente con sus características fenotípicas en cuanto a producción de invertasa. Esta correlación entre los cambios estructurales del promotor y los del flanco 3' parece apoyar la hipótesis de una relación del flanco 3' con los procesos de transcripción del gen SUC2.

Respecto a la naturaleza de esa relación cabe plantearse dos posibilidades. En primer lugar el flanco 3' del gen podría estar implicado en los procesos de regulación transcripcional a través de algún mecanismo de acción a distancia (Wang y Giaever, 1988) que relacionara esa región con el promotor mediante la formación de superestructuras de la cromatina. Una segunda posibilidad es que los cambios que sufre el flanco 3' del gen SUC2 asociados a su desrepresión sean simplemente una consecuencia, y no una causa, del proceso de transcripción de su región codificante.

Una tercera hipótesis sobre el significado funcional de los cambios estructurales del flanco 3' es que dicha región no esté relacionada con el gen SUC2 sino que sea el promotor de otro gen, localizado en posición 3' respecto del gen SUC2. En este caso, ese supuesto gen estaría también regulado por glucosa y por un mecanismo relacionado con el que opera para el gen SUC2 puesto que la estructura de la cromatina de su supuesto promotor sufre cambios dependientes de la concentración de glucosa y se vé afectada por las mutaciones snf y ssn.

Con el fin de discernir entre estas tres posibilidades, se abordó un estudio del efecto de las deleciones del flanco 3' del gen SUC2 sobre su expresión cuyos resultados se describen en el siguiente apartado.

#### 4.4. Estudio del efecto de deleciones del flanco 3' del gen SUC2 sobre su expresión.

El objetivo de este apartado del trabajo era comprobar una de las tres hipótesis planteadas en el apartado anterior sobre el significado funcional de los cambios estructurales que experimenta el flanco 3' del gen SUC2 en función de la concentración de glucosa.

Según dicha hipótesis, el flanco 3' del gen podría estar implicado en la regulación del gen. Si esto fuera así, la eliminación del flanco 3' del gen afectaría a la producción normal de invertasa. Además, como se ha demostrado en éste y en otros trabajos, la actividad transcripcional de un gen es un estado funcional que queda reflejado estructuralmente en la organización cromatínica de su promotor por lo que la eliminación del flanco 3' podría reflejarse, en ese caso, en alteraciones de la organización cromatínica característica del promotor en los estados reprimido y desreprimido.

Para comprobar esta hipótesis se utilizaron las cepas SEY2101/pSUC $\Delta$ 325 y SEY2101/pSUC $\Delta$ 327 ya descritas en el apartado 4.2. En ambos plásmidos ha sido totalmente eliminado el flanco 3' del gen y, por tanto, la zona que sufre los cambios, pero ambos conservan intactas las regiones codificante y promotora.

En ambas cepas se llevaron a cabo tres tipos de estudios: determinación de la actividad invertasa, análisis de mRNAs y análisis de

la estructura de la cromatina del promotor, en los tres casos en condiciones de represión y de desrepresión del gen SUC2.

Respecto a la valoración de actividad invertasa se obtuvieron niveles de actividad enzimática dentro del rango normal para cepas con alto número de copias por célula del gen SUC2: del orden de 15-20 veces más actividad invertasa que una cepa con la copia genómica del gen y un incremento de 20-50 veces de actividad al pasar de condiciones de represión a condiciones de desrepresión del gen.

El análisis de mRNA dió unos resultados totalmente coincidentes con los niveles de actividad invertasa encontrados. Como puede observarse en la Fig. 24, ambas cepas producen el mRNA del gen SUC2 en cantidad considerablemente mayor en condiciones de desrepresión que en condiciones de represión del gen. Estos datos confirman, junto con la determinación de actividad invertasa, la regulación normal de la transcripción del gen SUC2 en las cepas portadoras del gen carente de su flanco 3'.

El análisis de la estructura cromatínica del promotor del gen SUC2 en ambas cepas se llevó a cabo mediante restricción con HindIII y la sonda HE según la estrategia mostrada en la Fig. 5. Las muestras control de la cepa salvaje corresponden a la cepa SEY2101/pRB58, como en experimentos anteriores. Los resultados de este estudio se muestran en la Fig. 25, donde puede verse que, en ambas cepas, el promotor del gen SUC2 presenta una organización cromatínica idéntica a la observada en la cepa salvaje. Además, los cambios estructurales asociados al proceso de desrepresión se producen exactamente igual que en las muestras control, lo que indica que el promotor resulta normalmente afectado por el

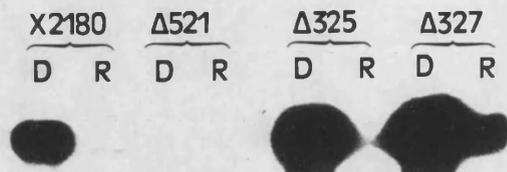


Figura 24. Detección del mRNA del gen *SUC2* en los mutantes de delección.

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa 1.5% y en presencia de formaldehído con muestras de RNA total de las cepas X2180-1A, SEY2101/pSUC 325, SEY2101/pSUC 327 y SEY2101/pSUC 521. Se utilizó la sonda XK.

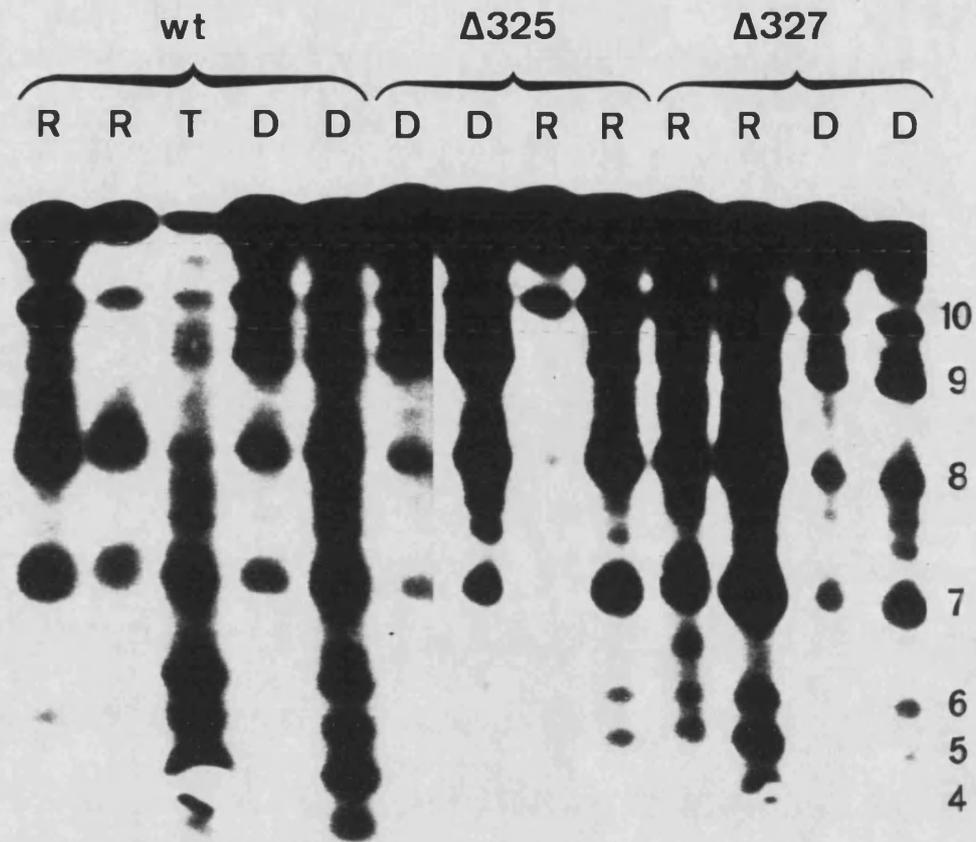


Figura 25. Análisis del promotor del gen *SUC2* en los mutantes de delección.

Δ325: muestras de la cepa SEY2101/pSUC 325

Δ327: muestras de la cepa SEY2101/pSUC 327

Estrategia y otros símbolos como en las Fig. 6 y 9.

descenso de concentración de glucosa y sugiere una independencia de su organización respecto del flanco 3' del gen.

Los resultados de los tres estudios realizados son coherentes entre sí y permiten descartar la hipótesis sobre la implicación del flanco 3' en los mecanismos de regulación transcripcional del gen SUC2. Desde todos los enfoques, el proceso de desrepresión se produce con normalidad y, como consecuencia, a bajas concentraciones de glucosa, el gen SUC2 se transcribe para dar el mRNA de 1.9 kb, los niveles de actividad invertasa aumentan y la organización cromatínica del gen refleja el estado transcripcionalmente activo del mismo.

#### 4.5. Dependencia de los cambios estructurales del flanco 3' del gen SUC2 respecto al proceso de transcripción.

Una vez descartada la hipótesis sobre la implicación del flanco 3' del gen SUC2 en los procesos de regulación transcripcional, se abordó un estudio encaminado a comprobar la dependencia de los cambios estructurales de dicha región con el proceso de transcripción. Dicha relación parece obvia a partir de los experimentos del apartado 4.3. en los que se observa una buena correlación entre los niveles de expresión del gen SUC2 y la organización cromatínica de su flanco 3', tanto en una cepa salvaje como en los distintos mutantes reguladores.

Con el objeto de comprobar si los cambios estructurales del flanco 3' del gen SUC2 son o no una consecuencia de la transcripción del mismo, se construyó un plásmido portador del gen SUC2 al que se le había eliminado la región promotora. El plásmido se construyó según el proceso mostrado en la Fig. 26 y se denominó pSUC $\Delta$ 521. Con dicho

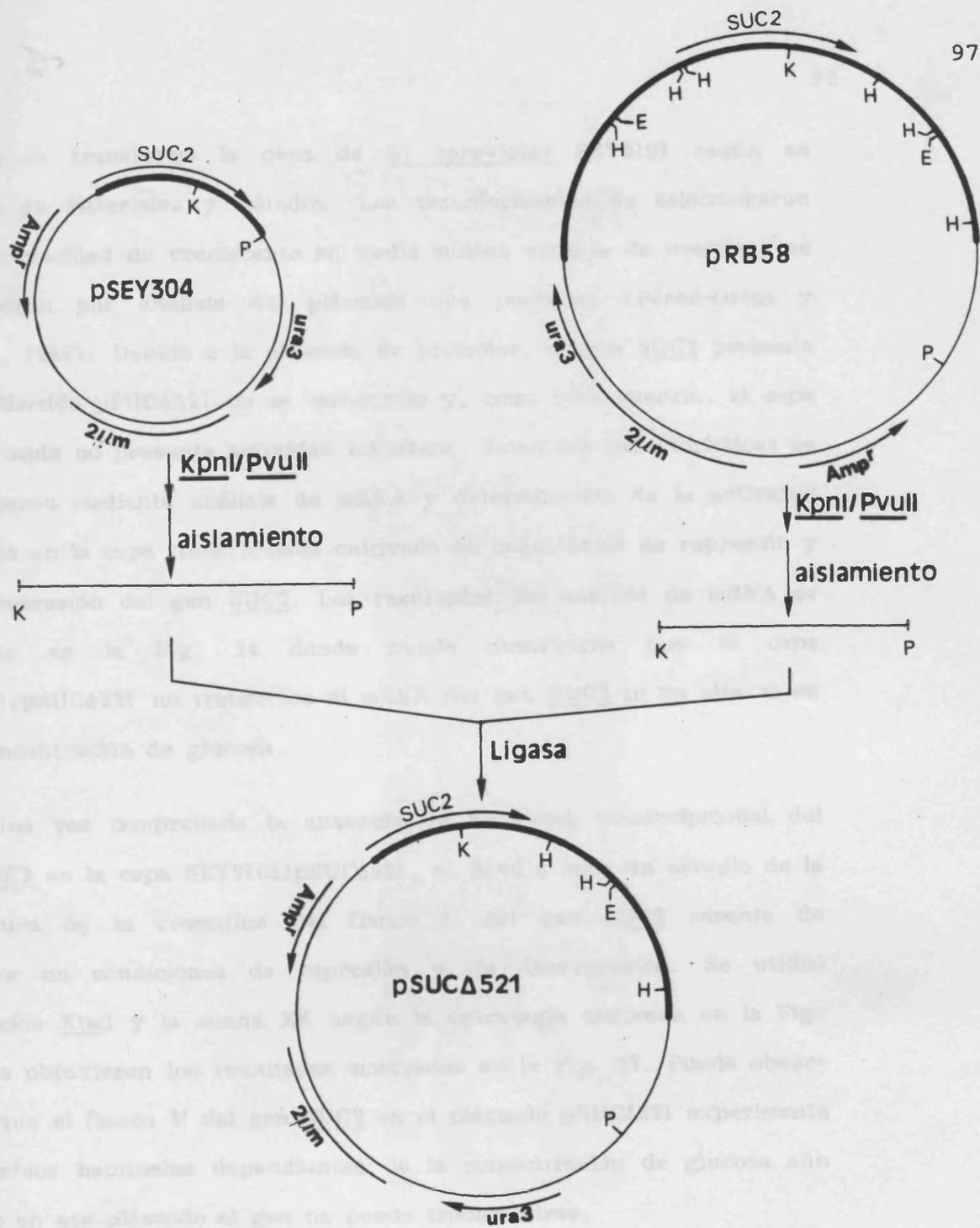


Figura 26. Esquema del proceso de construcción del plásmido pSUC $\Delta$ 521.

H: *HindIII*; E: *EcoRI*; K: *KpnI*; P: *PvuII*.

La línea gruesa representa el fragmento de DNA de levadura que contiene al gen *SUC2* o parte de él.

plásmido se transformó la cepa de S. cerevisiae SEY2101 según se describe en Materiales y Métodos. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en medio mínimo carente de uracilo y se comprobaron por análisis del plásmido que portaban (Pérez-Ortín y Estruch, 1988). Debido a la carencia de promotor, el gen SUC2 presente en el plásmido pSUCΔ521 no se transcribe y, como consecuencia, la cepa transformada no presenta actividad invertasa. Estas dos características se comprobaron mediante análisis de mRNA y determinación de la actividad invertasa en la cepa transformada cultivada en condiciones de represión y de desrepresión del gen SUC2. Los resultados del análisis de mRNA se muestran en la Fig. 24 donde puede observarse que la cepa SEY2101/pSUCΔ521 no transcribe el mRNA del gen SUC2 ni en alta ni en baja concentración de glucosa.

Una vez comprobada la ausencia de actividad transcripcional del gen SUC2 en la cepa SEY2101/pSUCΔ521, se llevó a cabo un estudio de la estructura de la cromatina del flanco 3' del gen SUC2 carente de promotor en condiciones de represión y de desrepresión. Se utilizó restricción XbaI y la sonda XK según la estrategia mostrada en la Fig. 20 y se obtuvieron los resultados mostrados en la Fig. 27. Puede observarse que el flanco 3' del gen SUC2 en el plásmido pSUCΔ521 experimenta los cambios habituales dependientes de la concentración de glucosa aún cuando en ese plásmido el gen no puede transcribirse.

Estos resultados descartan la posibilidad de que los cambios que sufre la región 3' del gen SUC2 sean consecuencia del proceso de transcripción puesto que ocurren también cuando el gen no puede transcribirse por carecer de promotor.

$\Delta 521$       wt  
D R      D T R

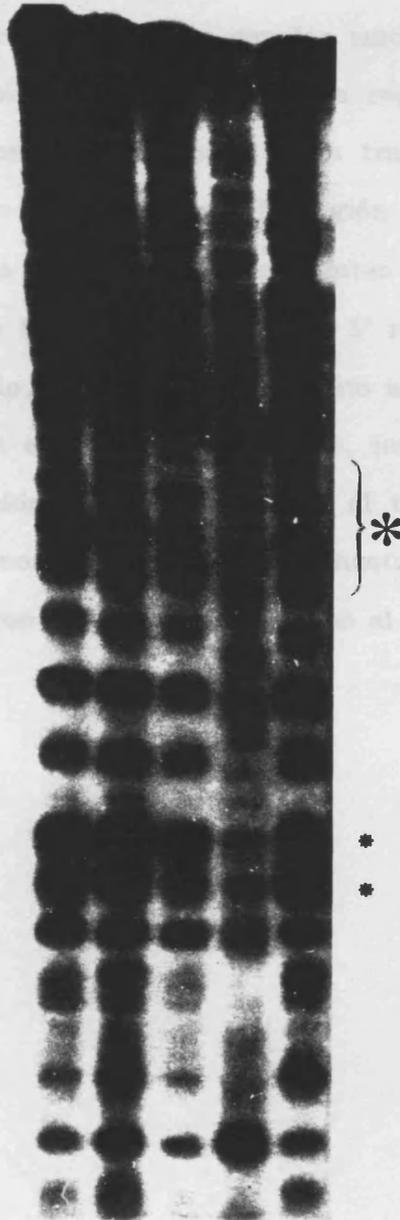


Figura 27. Análisis del flanco 3' del gen *SUC2* carente de promotor.  
 $\Delta 521$ : muestras de la cepa SEY2101/pSUC $\Delta 521$ .  
Estrategia y símbolos como en la Fig. 22.

Sin embargo, los cambios estructurales del flanco 3' dependen de la concentración de glucosa y muestran una relación con las mutaciones snf y ssn. Descartadas las dos hipótesis que relacionan dicha región con el gen SUC2, ya sea como causa o como consecuencia de su transcripción, cabe plantearse la tercera hipótesis según la cual, la región central del flanco 3' del gen donde se localizan los cambios dependientes de glucosa podría ser el promotor de otro gen localizado en posición 3' respecto del gen SUC2. Como ya se ha comentado, ese gen estaría sujeto a regulación por glucosa por algún mecanismo en el que, probablemente, intervendrían los genes SNF y SSN. Su localización sería muy próxima al telómero del cromosoma IX, región en la que no ha sido descrito, hasta la fecha, ningún gen siendo considerado el gen SUC2 el más próximo al extremo de dicho cromosoma.

CONCLUSIONES



El estudio de la estructura de la cromatina del promotor del gen SUC2 a diferentes niveles de resolución y en cepas con mutaciones en genes reguladores del mismo ha permitido mejorar el modelo previo sobre la organización cromatínica de dicha región. Los nucleosomas ocupan, en el estado reprimido, unas posiciones fijas que permiten la accesibilidad a las regiones reguladoras. El proceso de desrepresión transcripcional supone importantes cambios en el patrón de protección del DNA que se interpretan como consecuencia de los cambios en la unión de diferentes factores reguladores. Esos cambios en la unión de proteínas reguladoras van acompañados de la pérdida de nucleosomas adyacentes, lo cual está de acuerdo con las teorías actuales sobre el proceso de transcripción de genes eucarióticos.

En las cepas mutantes en genes reguladores del gen SUC2 se observa una buena correlación entre las características fenotípicas (relativas a la producción de invertasa) y la organización cromatínica del promotor del gen SUC2. Así, el promotor del gen SUC2 en la cepa snf1 (no desreprimible) presenta una estructura similar a la del gen SUC2 reprimido en una cepa salvaje aunque con características más acentuadas.

En la cepa snf2 (parcialmente desreprimible), el promotor presenta una estructura dependiente de glucosa pero los cambios no son tan evidentes como en una cepa salvaje.

En las cepas ssn6 y snf1 ssn6 (no reprimibles), el promotor presenta los rasgos característicos del gen SUC2 desreprimido más acentuados que en una cepa salvaje en dicho estado.

Estos resultados corroboran la relación entre los mecanismos de activación transcripcional y la organización cromatínica del promotor del gen SUC2.

Los estudios teóricos realizados sobre la organización cromatínica del flanco 3' del gen SUC2 permiten postular que una localización estocástica de los nucleosomas dependiente de dos posicionadores es la causa principal del posicionamiento de nucleosomas en dicha región. Este mecanismo ha resultado confirmado mediante la construcción de deleciones de dicha zona que demuestran la influencia de los dos sitios hipersensibles a nucleasas que la flanquean sobre el posicionamiento de los nucleosomas localizados entre ellos. La eliminación del sitio hipersensible lejano conduce a una estructura muy similar a la obtenida con la predicción teórica para un sólo posicionador, manteniéndose el posicionamiento de los nucleosomas adyacentes a él. La eliminación de ambos sitios hipersensibles conduce a la pérdida completa del posicionamiento.

Respecto a los cambios estructurales que ocurren en el flanco 3' del gen SUC2, se ha comprobado, mediante el estudio de los mutantes reguladores, su dependencia no sólo de la concentración de glucosa sino también de los genes SNF y SSN.

La estructura de la cromatina del flanco 3' del gen SUC2 en el mutante snf1 coincide con la del gen SUC2 en estado reprimido, en los mutantes ssn6 y snf1 ssn6 coincide con la del gen desreprimido y en el mutante snf2 muestra cambios no tan evidentes como en una cepa salvaje.

La posible relación de la zona 3' del gen SUC2 con la transcripción del mismo sugerida por los resultados anteriores, ha sido descartada mediante el análisis del efecto de deleciones. La eliminación del flanco 3' del gen SUC2 no tiene efecto ni sobre la expresión del mismo ni sobre la organización cromatínica de su promotor lo que descarta su implicación en los procesos de regulación transcripcional.

La eliminación del promotor del gen SUC2 impide su transcripción pero no impide que el flanco 3' del gen sufra los cambios estructurales habituales dependiendo de la concentración de glucosa. Este resultado descarta que los cambios estructurales en el flanco 3' sean consecuencia de la transcripción del gen SUC2.

Descartada la relación de los cambios estructurales del flanco 3' del gen SUC2 con su proceso de transcripción se plantea, como hipótesis, que dicha región del flanco 3' constituya el promotor de un gen no descrito, localizado en posición 3' respecto al gen SUC2, y regulado por glucosa mediante algún mecanismo en el que probablemente intervendrían los genes SNF y SSN.

- ALBRECHT, J., WEIGERSON, L., y CARLSON, M. (1987). Molecular analysis of *SUC2* and *SUC3* genes required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 5, 2642-2651.

- ALMER, A. y HÖRZ, W. (1986). Nucleosome hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark the gene boundaries of the *PHO5/PHO3* locus in yeast. EMBO J. 5, 2981-2987.

- ALMER, A., KUDOLTH, H., HINNEN, A. y HÖRZ, W. (1988). Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction reveals additional upstream activating DNA elements. EMBO J. 7, 2095-2098.

- ANEXSHAM INTERNATIONAL INC (1985). Membrane transfer and detection protocols.

- BIRNBOIM, H. C. y DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1522.

- BISSON, L., WEIGERSON, L., CARLSON, M. y FRAENKEL, D. G. (1987). The *SUC2* gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Eucaryot. 15, 1000-1002.

## BIBLIOGRAFIA

- BLOOM, K. S. y CARSON, J. (1981). The *SUC2* gene in a unique and highly ordered structure in chromosomal and small circular DNA molecules. Cell 25, 305-315.

- BOEHRINGER-MANNHEIM

- BOEHRINGER-MANNHEIM (1985). Bolting information 2/85.

- BURNE, D. M. y BRACHAM, L. R. (1983). A method for the ligation of DNA following ligation time low melting temperature agarose. Anal. Biochem. 131, 39-51.

- CARLSON, M. y BOTSTEIN, D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. Cell 27, 103-109.

- CARLSON, M. y BOTSTEIN, D. (1983). Organization of the *SUC* gene family in *Saccharomyces*. Mol. Cell. Biol. 3, 351-359.

- CARLSON, M., CHENYA, J. L. y BOW, S. J. (1984). Evolution of the dispersed *SUC* gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. Mol. Cell. Biol. 3, 1855-1863.

- CARLSON, M., OSWOND, B. C. y BOTSTEIN, D. (1980). *SUC* genes of yeast: a dispersed gene family. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XLV, 183-193.

- CARLSON, M., OSWOND, B. C. y BOTSTEIN, D. (1981). Genetic evidence for a silent *SUC* gene in yeast. Genetics 85, 25-40.

- ABRAMS, E.; NEIGEBORN, L. y CARLSON, M. (1986). Molecular analysis of SNF2 and SNF5, genes required for expression of glucose-repressible genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 6, 3643-3651.
- ALMER, A. y HÖRZ, W. (1986). Nuclease hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark the gene boundaries of the PHO5/PHO3 locus in yeast. EMBO J. 5, 2681-2687.
- ALMER, A.; RUDOLPH, H.; HINNEN, A. y HÖRZ, W. (1986). Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. EMBO J. 5, 2689-2696.
- AMERSHAM INTERNATIONAL plc (1985). Membrane transfer and detection protocols.
- BIRNBOIM, H. C. y DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- BISSON, L.; NEIGEBORN, L.; CARLSON, M. y FRAENKEL, D. G. (1987). The SNF3 gene is required for high-affinity glucose transport in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 169, 1656-1662.
- BLOOM, K. S. y CARBON, J. (1982). Yeast centromere DNA is in a unique and highly ordered structure in chromosomal and small circular minichromosomes. Cell 29, 305-317.
- BOEHRINGER-MANNHEIM.
- BOEHRINGER-MANNHEIM (1985). Boletín informativo nº 3/85.
- BURNS, D. M. y BEACHAM, I. R. (1983). A method for the ligation of DNA following isolation from low melting temperature agarose. Anal. Biochem. 135, 48-51.
- CARLSON, M. y BOTSTEIN, D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. Cell 28, 145-154.
- CARLSON, M. y BOTSTEIN, D. (1983). Organization of the SUC gene family in Saccharomyces. Mol. Cell. Biol. 3, 351-359.
- CARLSON, M.; CELENZA, J. L. y ENG, F. J. (1985). Evolution of the dispersed SUC gene family of Saccharomyces by rearrangements of chromosome telomeres. Mol. Cell. Biol. 5, 2894-2902.
- CARLSON, M.; OSMOND, B. C. y BOTSTEIN, D. (1980). SUC genes of yeast: a dispersed gene family. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. XLV, 799-803.
- CARLSON, M.; OSMOND, B. C. y BOTSTEIN, D. (1981). Genetic evidence for a silent SUC gene in yeast. Genetics 98, 25-40.

- CARLSON, M.; OSMOND, B. C.; NEIGEBORN, L. y BOTSTEIN, D. (1984). A suppressor of snf1 mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. Genetics 107, 19-32.
- CARLSON, M.; TAUSSIG, R.; KUSTU, S. y BOTSTEIN, D. (1983). The secreted form of invertase in Saccharomyces cerevisiae is synthesized from mRNAs encoding a signal sequence. Mol. Cell. Biol. 3, 439-447.
- CELENZA, J. y CARLSON, M. (1984). Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 4, 49-53.
- CELENZA, J. y CARLSON, M. (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. Science 233, 1175-1180.
- DE LA FUENTE, G. y SOLS, A. (1962). Transport of sugars in yeast. II. Mechanisms of utilization of disaccharides and related glycosides. Biochim. Biophys. Acta 56, 49-62.
- DEL CASTILLO-AGUDO, L. y ZIMMERMANN, F. K. (1987). Novel genetic components controlling invertase production in Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 133, 1583-1588.
- DINGWALL, C.; LOMONOSSOFF, P. y LASKEY, R. A. (1981). High sequence specificity of micrococcal nuclease. Nucleic Acids Res. 9, 2659-2673.
- DREW, H. R. y CALLADINE, C. R. (1987). Sequence-specific positioning of core histones on an 860 base-pairs DNA. Experiment and theory. Appendix: Details of the interpretation of nuclease digestion patterns of chromatin. J. Mol. Biol. 195, 143-173.
- EISSENBERG, J. D.; CARTWRIGHT, I. L.; THOMAS, G. H. y ELGIN, S. C. R. (1985). Selected topics in chromatin structure. Annu. Rev. Genet. 19, 485-536.
- ELGIN, S. C. R. (1988). The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. J. Biol. Chem. 263 19259-19262.
- EMERSON, B. M. y FELSENFELD, G. (1984). Specific factors conferring nuclease hypersensitivity at the 5' end of the chicken adult  $\beta$ -globin gene. Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 95-99.
- ENTIAN, K. D. (1986). Glucose repression: a complex regulatory system in yeast. Microbiol. Sci. 3, 366-371.
- ENTIAN, K. D. y ZIMMERMANN, F. K. (1980). Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 177, 345-350.

- FAGRELIUS, T. J. y LIVINGSTON, D. M. (1984). Location of DNase I sensitive cleavage sites in the yeast 2 $\mu$ m plasmid DNA chromosome. *J. Mol. Biol.* 173, 1-13.
- FEDOR, M. J. y KORNBERG, R.D. (1989). Upstream activation sequence-dependent alteration of chromatin structure and transcription activation of the yeast GAL1-GAL10 genes. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1721-1732.
- FEDOR, M. J.; LUE, N. F. Y KORNBERG, R. D. (1988). Statistical positioning of nucleosomes by specific protein-binding to an upstream activating sequence in yeast. *J. Mol. Biol.* 204, 109-127.
- FINCH, J. T. y KLUG, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1897-1901.
- FLORES, R. (1978). A rapid and reproducible assay for quantitative estimation of protein using bromophenol blue. *Anal. Biochem.* 88, 605-611.
- FRANCO, L. y LOPEZ-BRAÑA, I. (1978). Large-scale isolation of a native deoxyribonucleohistone complex from baker's yeast. *Nucleic Acids Res.* 5, 3743-3757.
- GASCON, S. y LAMPEN, J. O. (1968). Purification of the internal invertase of yeast. *J. Biol. Chem.* 243, 1567-1572.
- GLUZMAN, Y. y SHENK, T. (1983). Enhancers and eukariotic gene expression. *Current communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- GOLDSTEIN, A. y LAMPEN, J. O. (1975).  $\beta$ -D-fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Meth. Enzymol.* 42, 504-511.
- GROUDINE, M. y WEINTRAUB, H. (1981). Activation of globin genes during chicken development. *Cell* 24, 393-401.
- GUARENTE, L. (1988). UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell* 52, 303-305.
- HAN, M. y GRUNSTEIN, M. (1988). Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55, 1137-1145.
- HANAHAH, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- HINNEN, A.; HICKS, J. B. y FINK, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1929-1933.
- HOHMANN, S. y GOZALBO, D. (1988). Structural analysis of the 5' regions of yeast SUC genes revealed analogous palindromes in SUC, MAL and GAL. *Mol. Gen. Genet.* 211, 446-454.
- HÖRZ, W. y ALTENBURGER, W. (1981). Sequence specific cleavage of DNA by micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res.* 9, 2645-2658.

- IGO-KEMENES, T.; HÖRZ, W. y ZACHAU, H. G. (1982). Chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 89-121.
- ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K. y KIMURA, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- JOHNSTON, M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51, 458-476.
- KHOURY, G. y GRUSS, P. (1983). Enhancer elements. *Cell* 33, 313-314.
- KORNBERG, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- KORNBERG, R. D. (1977). Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931-954.
- KORNBERG, R. D. y STRYER, L. (1988). Statistical distributions of nucleosomes: nonrandom locations by a stochastic mechanism. *Nucleic Acids Res.* 16, 6677-6690.
- LABARCA, C. y PAIGEN, K. (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344-352.
- LEE, K. P.; BAXTER, H. J.; GUILLEMETE, J. G.; LAWFORD, H. G. y LEWIS, D. N. (1982). Structural studies on yeast nucleosomes. *Can. J. Biochem.* 60, 379-388.
- LOHR, D. (1984). Organization of the GAL1-GAL10 intergenic control region chromatin. *Nucleic Acids Res.* 12, 8457-8474.
- LOHR, D. y HOPPER, J. (1985). The relationship of regulatory proteins and DNase I hypersensitive sites in the yeast GAL1-10 genes. *Nucleic Acids Res.* 13, 8409-8423.
- LOHR, D. y IDE, G. (1979). Comparison of the structure and transcriptional capability of growing phase and stationary yeast chromatin: a model for reversible gene activation. *Nucleic Acids Res.* 6, 1909-1927.
- LORCH, Y.; LAPOINTE, J. W. y KORNBERG, R. D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203-210.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. y SAMBROOCK, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- MAXAM, A. M. y GILBERT, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64, 560-564.

- MCGHEE, J. D.; NICKOL, J. M.; FELSENFELD, G. y RAU, D. C. (1983). Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length. *Cell* 33, 831-841.
- MCGHEE, J. D.; WOOD, W.; DOLAN, M.; ENGEL, J. D. y FELSENFELD, G. (1981). A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult  $\beta$ -globin gene is accesible to nuclease digestion. *Cell* 27, 45-55.
- MEINKOTH, J. y WAHL, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138, 267-284.
- MENGERITSKY, G. y TRIFONOV, E. N. (1983). Nucleotide sequence-directed mapping of nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 11, 3833-3851.
- NEDOSPASOV, S. y GEORGIEV, G. (1980). Non-random cleavage of SV40 DNA in the compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 532-539.
- NEIGEBORN, L. y CARLSON, M. (1984). Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 108 845-848.
- NEIGEBORN, L. y CARLSON, M. (1987). Mutations causing constitutive invertase synthesis in yeast: genetic interactions with snf mutations. *Genetics* 115, 247-253.
- NEIGEBORN, L.; CELENZA, J. y CARLSON, M. (1987). SSN20 is an essential gene with mutant alleles that suppress defects in SUC2 transcription in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 7, 672-678.
- NEIGEBORN, L.; RUBIN, K. y CARLSON, M. (1986). Suppressors of snf2 mutation restore invertase derepression and cause temperature-sensitive lethality in yeast. *Genetics* 112, 741-753.
- NELSON, D. A.; BELTZ, W. R. y RILL, R. L. (1977). Chromatin subunits from baker's yeast: isolation and partial characterization. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1343-1347.
- PAULOVIC, B. y HÖRZ, W. (1988). The chromatin structure at the promoter of a glyceraldehyde phosphate dehydrogenase gene from Saccharomyces cerevisiae reflects its functional state. *Mol. Cell. Biol.* 8, 5513-5520.
- PAULSON, J. R. y LAEMMLI, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-828.
- PEREZ-ORTIN, J. E. y ESTRUCH, F. (1988). A rapid method for screening of plasmid transformed yeast strains. *Curr. Microbiol.* 17, 19-22.
- PEREZ-ORTIN, J. E.; ESTRUCH, F.; MATAALLANA, E. y FRANCO, L. (1986a). DNase I sensitivity of the chromatin of the yeast SUC2 gene for invertase. *Mol. Gen. Genet.* 205, 422-427.

- PEREZ-ORTIN, J. E.; ESTRUCH, F.; MATALLANA, E. y FRANCO, L. (1986b). Sliding-end-labelling. A method to avoid artifacts in nucleosome positioning. *FEBS Lett.* 208, 31-33.
- PEREZ-ORTIN, J. E.; ESTRUCH, F.; MATALLANA, E. y FRANCO, L. (1987). Fine analysis of the chromatin structure of the yeast SUC2 gene and its changes upon derepression. Comparison between the chromosomal and plasmid-inserted copies. *Nucleic Acids Res.* 15, 6937-6956.
- PEREZ-ORTIN, J. E.; MATALLANA, E. y FRANCO, L. (1989). Chromatin structure of yeast genes. *Yeast* 5, 219-238.
- PEREZ-ORTIN, J. E.; RAMON, D.; FERRER, S. y TORDERA, V. (1986). Rapid plasmid isolation. A laboratory experiment for intermediate and advanced students. *Biochem. Educ.* 14, 142-144.
- PERLMAN, D.; RANEY, P. y HARLVORSON, H. O. (1984). Cytoplasmic and secreted Saccharomyces cerevisiae invertase mRNAs encoded by one gene can be differentially or coordinately regulated. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1682-1688.
- PLIKAYTIS, B. D.; CARBONE, G. M.; EDMONDS, P. y MAYER, L. W. (1986). Robust estimation of standard curves for protein molecular weight and linear duplex DNA base-pair number after gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 152, 346-364.
- REEVES, R. (1984). Transcriptionally active chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 782, 343-393.
- RIGBY, P. W. J.; DIECKMANN, M.; RHODES, C. y BERG, P. (1977). Labelling DNA to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
- SAROKIN, L. y CARLSON, M. (1984). Upstream region required for regulated expression of the glucose-repressible SUC2 gene of Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2750-2757.
- SAROKIN, L. y CARLSON, M. (1985). Comparison of two yeast invertase genes: conservation of the upstream regulatory regions. *Nucleic Acids Res.* 13, 6089-6103.
- SCHULTZ, J. y CARLSON, M. (1987). Molecular analysis of SSN6, a gene functionally related to the SNF1 protein kinase of Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3637-3645.
- SHERMAN, F.; FINK, G. R. y HICKS, J. B. (1979). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- SHERMAN, F.; FINK, G. R. y HICKS, J. B. (1986). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Lab. New York.
- SILHAVY, T. J.; BERMAN, M. L. y ENQUIST, L. W. (1984). *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Lab. New York.

- SIMPSON, R. T. (1986). Nucleosome positioning "in vivo" and "in vitro". *BioEssays* 4, 172-176.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- STANWAY, C.; KINGSMAN, A. J. y KINGSMAN, S. M. (1987). The control of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioEssays* 7, 62-67.
- STRUHL, K. (1987). Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* 49, 295-297.
- SZENT-GYÖRGYI, C.; FINKELSTEIN, D. B. y GARRAD, W. T. (1987). Sharp boundaries demarcate the chromatin structure of a yeast heat-shock gene. *J. Mol. Biol.* 193, 71-80.
- SZENT-GYÖRGYI, C y ISENBERG, I. (1983). The organization of oligonucleosomes in yeast. *Nucleic Acids Res.* 11, 3717-3736.
- THOMA, F. (1986). Protein-DNA interactions and nuclease-sensitive regions determine nucleosome positions on yeast plasmid chromatin. *J. Mol. Biol.* 190, 177-190.
- THOMA, F.; BERGMAN, L. W. y SIMPSON, R. T. (1984). Nuclease digestions of circular TRP1ARS1 chromatin reveals positioned nucleosomes separated by nuclease-sensitive regions. *J. Mol. Biol.* 177, 715-733
- THOMA, F. y ZATCHEJ, M. (1988). Chromatin folding modulates nucleosome positioning in yeast minichromosomes. *Cell* 55, 945-953.
- VAN HOLDE, K. (1985). *Chromatin*. Springer Verlag. Heidelberg.
- WANG, J.C. y GIAEVER, G.N. (1988). Action at a distance along a DNA. *Science* 240, 300-304.
- WEISBROD, S. (1982). Active chromatin. *Nature* 297, 289-295.
- WINTERSBERGER, V.; SMITH, P. y LETNARSKY, K. (1973). Yeast chromatin. Preparation from isolated nuclei. Histone composition and transcription capacity. *Eur. J. Biochem.* 33, 123-130.
- WORCEL, A.; GARGIULO, G.; JESSEE, B.; UDUARDY, A.; LOUIS, C. y SCHEDL, P. (1983). Chromatin fine structure of the histone gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 11, 421-439.
- WU, C. (1980). The 5' ends of *Drosophila* heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* 286, 854-860.
- WU, C. (1984). Activating protein factors bind "in vitro" to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature* 311, 81-84.
- YOUNG, D. Y CARROLL, D. (1983). Regular arrangement of nucleosomes on 5S rRNA in *Xenopus laevis*. *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. EMILIA MATA ICAÑA REDONDO

la calificación de Apto "cum laude"

Valencia, a 20 de octubre de 1980

El Secretario,

Rosa le Truito

El Presidente

BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
VALENCIA