

## CLONATGE DE DNA NUCLEOSOMAL.

### REACCIONS DE LES HISTONES AMB EL DNA MONOCADENA.

Xavier Fernández-Busquets i Joan-Ramon Daban  
Departament de Biquímica i Biologia Molecular. Facultat de Ciències.  
Universitat Autònoma de Barcelona.

#### Resum

Es presenta un mètode innovador de separació de les dues cadenes d'un fragment de DNA d'origen nucleosomal i l'ús del material obtingut en l'estudi de la dinàmica de la interacció entre les histones i el DNA monocadena.

#### Introducció

L'estructuració del genoma eucariòtic representa un obstacle per a la interacció del DNA amb proteïnes que intervenen en processos fonamentals com la replicació i la transcripció. Qualsevol d'aquests dos fenòmens implica el desempaquetament de la cromatina i, si més no, un canvi en la ben coneguda estructura del nucleosoma, tant a nivell de l'octàmer d'histones com pel que fa a l'estructura del DNA, la doble hèlix del qual s'ha d'obrir per exposar la cadena que ha de servir de motlle a les RNA i DNA polimerases.

Alguns treballs recents indiquen que les histones de la partícula nucli romanen associades al DNA durant la replicació (1, 2). En el procés transcripcional ha estat descrita una conformació més oberta dels nucleosomes (3) o fins i tot una desestructuració parcial amb pèrdua de H2A, H2B (4). Aquest canvi estructural pot ser degut al desplaçament que sofreix l'octàmer per part de la voluminosa RNA polimerasa, però també



a la torsió generada sobre el DNA pel pas de la maquinària transcripcional (5).

L'important paper que ha de tenir la interacció entre les histones i les regions de DNA monocatenari (curtes però nombroses) en els processos descrits i les poques dades sobre el tema (6-9) ens va dur a estudiar la dinàmica de l'associació de les histones amb el DNA monocadena (ssDNA).

### **Materials i mètodes**

El DNA heterogeni corresponent a una preparació de nucleosomes d'eritròcits de pollastre va ser clonat en M13 i es va triar un dels clons obtinguts (NX1) en base a la seva seqüència de característiques posicionadores de nucleosomes (10). Les dues cadenes complementàries NX1(+) i NX1(-) van ser separades per un mètode que utilitza la precipitació diferencial de DNA amb polietilenglicol (veure detalls a la ref. 11). La interacció entre les histones i ssDNA i la renaturalització del DNA es va estudiar principalment mitjançant electroforesis en gels d'agarosa (1.4%) i de poliacrilamida (6%).

### **Resultats i discussió**

Amb el DNA de NX1 (158 pb) i les cadenes (+) i (-) d'aquest fragment per separat es va estudiar la dinàmica de la interacció de les histones amb una seqüència específica de DNA d'origen nucleosomal. Els resultats van confirmar en part aquells observats amb DNA d'elevat pes molecular (12), especialment pel que fa a l'estequiometria de la interacció histona-ssDNA. Les histones s'uneixen al DNA en funció de la



longitud d'aquest expressada en nucleòtids (ssDNA) o parelles de bases (dsDNA) i no en funció de la massa de DNA. Tanmateix, ha estat observada una afinitat superior de les histones per la cadena (+) enfront de la (-). Aquest fet, en principi, podria indicar una unió preferencial de les histones a certes seqüències de ssDNA.

Per altra banda, experiments de renaturalització fets amb les cadenes (+) i (-) en presència d'histones mostren que aquestes no impedeixen la reassociació de cadenes complementàries de DNA. Aquestes propietats podrien ser útils per les funcions de la cromatina que impliquin un aparellament de bases del DNA.

#### **Bibliografia**

1. Bonne-Andrea, C., Wong, M.C. i Alberts, B.M.  
**Nature** (1990), 343, 719-726.
2. Krude, T. i Knippers, R.  
**Mol. Cell. Biol.** (1991), 11, 6257-6267.
3. Lee, M.-S. i Garrard, W.T.  
**EMBO J.** (1991), 10, 607-615.
4. Jackson, V.  
**Biochemistry** (1990), 29, 719-731.
5. Leonard, M.W. i Patient, R.K.  
**Mol. Cell. Biol.** (1991), 11, 6128-6138.
6. Palter, K.B. i Alberts, B.M.  
**J. Biol. Chem.** (1979), 254, 11160-11169.
7. Palter, K.B., Foe, V.E. i Alberts, B.M.  
**Cell** (1979), 18, 451-467.
8. Caffarelli, E., De Santis, P., Leoni, L., Savino, M. i Trotta, E.  
**Biochim. Biophys. Acta** (1983), 739, 235-243.
9. Caffarelli, E., Leoni, L. i Savino, M.  
**FEBS Lett.** (1985), 181, 69-73.
10. Satchwell, S.C., Drew, H.R. i Travers, A.A.  
**J. Mol. Biol.** (1986), 191, 659-675.
11. Fernández-Busquets, X. i Daban, J.-R.  
**BioTechniques** (1992), en premsa.
12. Fernández-Busquets, X. i Daban, J.-R.  
**VII Jornades de Biologia Molecular**, Cabrera de Mar (1990).

Treball subvencionat per la DGICYT (PB89-0305) i per una beca predoctoral a X.F.-B. del Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya.