

DESENVOLUPAMENT D'UN SISTEMA PER A ESTUDIS DE
TRANSCRIPCIÓ IN VITRO DE CROMATINA

Francesca Gallego i Joan-Ramon Daban
Dept. de Bioquímica i de Biologia Molecular, Fac. de Ciències,
Universitat Autònoma de Barcelona

Existeixen moltes evidències experimentals que assignen a les interaccions inespecífiques histona-DNA un paper fonamental en els processos d'expressió gènica en organismes eucariotes. Tanmateix, els resultats de les aportacions realitzades fins el moment per comprendre la viabilitat de la transcripció en presència de cromatina són absolutament contradictoris (1-8).

L'objectiu del present treball és el d'establir els mecanismes moleculars que possibiliten la participació dels complexos histona-DNA en el procés d'elongació de la transcripció, mitjançant un model experimental que permeti el control acurat del sistema i de les condicions de treball.

En primer lloc, s'ha procedit al clonatge del fragment de DNA NX1 (9) d'origen nucleosomal en el plasmidi pBluescript II SK(+). Per restricció del vector es va obtenir un fragment de 236 pb que contenia el promotor de la T7 RNA polimerasa en posició *upstream* respecte de la seqüència NX1 clonada. Per disposar del fragment de 236 pb en quantitat i puresa elevades, es va realitzar un fraccionament diferencial amb polietilenglicol, seguit d'una purificació per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC).

Per tal de determinar l'efecte de la presència de nucleosomes durant la transcripció, s'ha estudiat l'activitat de la T7 RNA polimerasa sota condicions iòniques d'interès per estudis amb cromatina. El motlle cromatínic emprat procedeix de la reconstitució per addició directa, diàlisi esglaonada o bé contínua, del fragment de 236 pb amb histones de la partícula nucli. L'anàlisi electroforètica dels reconstituïts en gels de poliacrilamida no-desnaturalitzants mostra un patró definit de complexos nucleosomal. L'obtenció d'aquest patró confirma les característiques posicionadores de nucleosoma que previament es van derivar de l'estudi de la seqüència del fragment NX1 (9). Els gels no-desnaturalitzants emprats permeten analitzar simultàniament i de manera senzilla l'estat de la cromatina motlle i el producte de la transcripció.

Els primers resultats obtinguts demostren que el sistema desenvolupat ens permetrà contribuir a la clarificació dels mecanismes implicats en la participació dels nucleosomes en la transcripció.

Referències

1. Lorch, Y. et al. *Cell* (1987) 49, 203-210.
 2. Losa, R. & Brown, D.D. *Cell* (1987) 50, 801-808.
 3. Morse, R.H. *EMBO J.* (1989) 8, 2343-2351.
 4. Lee, M-S. & Garrard, W.T. *EMBO J.* (1991) 10, 607-615.
 5. Thoma, F. *Trends Genet.* (1991) 7, 175-177.
 6. Clark, D.J. & Felsenfeld, G. *Cell* (1992) 71, 11-22.
 7. Kirov, N. et al. *EMBO J.* (1992) 11, 1941-1947.
 8. O'Neill, T.E. et al. *J. Mol. Biol.* (1992) 223, 67-78.
 9. Fernández-Busquets, X. & Daban, J.R. (1993) enviat a *Nucl. Acids Res.*
- Treball subvencionat en part per la DGICYT (PB89-0305)