

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología

Complejos proteicos elipsoidales NP:Octámero y su relación en el ensamblaje de nucleosomas

Autor:

Aitor Franco Budia

Director/a:

Adelina Prado Ruiz

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	1
1.2. HISTONAS	1
1.2.1. Histonas “core”	1
1.2.2. Histonas linker	2
1.3. CHAPERONAS DE HISTONAS	2
1.4. NUCLEOPLASMINA	3
1.4.1. Caracterización bioquímica de la nucleoplasmina	3
1.4.2. Remodelado de la cromatina espermática	4
1.4.3. Interacción de la nucleoplasmina con histonas	5
1.4.4. Ensamblaje de nucleosomas	6
1.5. OBJETIVOS	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	7
2.1. PURIFICACIÓN DE PROTEINAS	7
2.1.1. Cuantificación de proteínas	8
2.1.2. Electroforesis desnaturante (SDS-PAGE)	8
2.1.3. Entrecruzamiento del octámero de histonas	9
2.2. PURIFICACIÓN DE DNA	10
2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	11
2.2.2. Electroforesis de DNA	11
2.3. ELECTROFORESIS NATIVA (NATIVE-PAGE)	11
2.4. ENSAYOS DE RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE DNA (EMSA)	12
3. RESULTADOS	13
3.1. LAS PTMs DE LA NP REGULAN SU AFINIDAD POR EL OCTÁMERO DE HISTONAS	13
3.2. <i>In vitro</i> NP DEPOSITA OCTÁMEROS DE HISTONAS EN EL DNA PARA ENSAMBLAR NUCLEOSOMAS	16
3.3. EL COMPLEJO eNP:OCTÁMERO SE FORMA INDEPENDIENTE DEL ORDEN DE ADICIÓN DE LAS HISTONAS “CORE”	19
4. DISCUSIÓN	20
5. CONCLUSIONES	23
6. BIBLIOGRAFIA	23

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ORGANIZACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

El contenido genético de células eucariotas se compone de millones de pares de bases de ácido desoxirribonucleico (DNA) que interaccionan con proteínas formando una estructura compacta y dinámica llamada cromatina. La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma, en el que un fragmento de 147 pares de bases (pb) de DNA se enrolla alrededor de un octámero de histonas, constituido por dos copias de cada una de las histonas “core”: H2A, H2B, H3 y H4 (Luger et al. 1997).

Los nucleosomas se conectan entre sí a través de segmentos cortos de DNA llamados DNA “linker”, de aproximadamente 60 pb y típicamente asociados a histonas “linker” como H1. Esta es la estructura primaria de la cromatina, de 10 nm de ancho y llamada “collar de perlas”. El siguiente grado de empaquetamiento de la cromatina da lugar a su estructura secundaria, que se debe al plegamiento y compactación de los nucleosomas, generando una fibra definida de 30 nm de diámetro. La organización de la cromatina en estructuras de orden superior origina los cromosomas metafásicos, altamente compactados y visibles por microscopía óptica (Li & Zhu 2015).

Los distintos niveles de organización de la cromatina ponen de manifiesto sus propiedades dinámicas, importantes en procesos como la expresión génica y la replicación y reparación del DNA. El cambio entre niveles de organización lo regulan diferentes proteínas y complejos multiproteicos como: las chaperonas de histonas, de las que hablaremos en próximos apartados; los factores remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para regular la accesibilidad de la cromatina y la localización de los nucleosomas; y ACPs (Architectural Chromatin Proteins), que intervienen en el estado de compactación de la cromatina (Workman & Abmayr 2014).

1.2. HISTONAS

1.2.1. Histonas “core”

Las histonas “core” forman parte del nucleosoma y se dividen en cuatro tipos: H2A, H2B, H3 y H4. *In vitro* y en condiciones fisiológicas de fuerza iónica y pH, las histonas

H2A/H2B y H3/H4 forman heterodímeros y además, H3/H4 puede formar tetrámeros, existiendo un equilibrio dinámico entre la forma dimérica y tetramérica (Banks & Gloss 2003). Dos copias de cada uno de los heterodímeros interaccionan para ensamblar un octámero, formado por un tetrámero central (H3/H4)₂ que une a cada lado dos dímeros H2A/H2B.

Este grupo de proteínas es uno de los más conservadas evolutivamente, hecho que refleja la importancia y universalidad de su función. Son proteínas muy básicas y pequeñas (entre 11 y 16 kilodaltons (kDa)) que comparten un dominio globular con una misma estructura conocido como “Histone Fold Domain” (HFD) y unas colas N- y C-terminales desestructuradas (Arents & Moudrianakis 1995). En estas colas pueden darse modificaciones post-traduccionales (PTMs) con distintos grupos químicos (fosfatos, metilo, acetilo) lo que, junto con las variantes de histonas codificadas por distintos genes, es determinante en la regulación de la estructura y función de la cromatina.

1.2.2. Histonas linker

Las histonas “linker” son aquellas que se unen al DNA “linker”, con una estequiometría de una histona por nucleosoma, aumentando el grado de compactación de la cromatina. Se trata de una familia heterogénea y menos conservada evolutivamente que las histonas “core”. Dentro de este grupo se incluyen a distintas isoformas de H1 y variantes específicas de tejidos como la histona H5 de eritrocitos nucleados de aves y peces y las proteínas básicas nucleares del espermatozoide de *Xenopus* (SNBPs) (Ausió 1999). Centrándonos en las SNBPs, se ha visto que los núcleos de espermatozoides de *Xenopus laevis* contienen histonas H3/H4 pero carecen de histonas H2A/H2B y H1. En su defecto, contienen varias SNBPs que se asocian a la cromatina compactando el DNA (Philpott & Leno 1992).

1.3. CHAPERONAS DE HISTONAS

La atracción entre las cargas negativas del DNA y las cargas positivas de las histonas es fundamental en la formación del nucleosoma. Sin embargo, la mezcla de DNA e histonas *in vitro* a concentraciones fisiológicas de sal, tiene como resultado agregados insolubles. Para que la interacción entre ambos componentes ocurra de manera

ordenada y controlada, es necesaria alta concentración de sal, polímeros cargados negativamente como poliglutámicos o las denominadas chaperonas nucleares o de histonas (Workman & Abmayr 2014).

Las chaperonas de histonas se definen como un grupo de proteínas que unen histonas y participan en el ensamblaje del nucleosoma sin participar en el producto final (Elsässer & D'Arcy 2012). Existen distintos tipos de chaperonas de histonas que se diferencian en su estructura, el tipo de histona que unen, el mecanismo de unión y/o la función que desempeñan. Entre las funciones que se les reconocen están: transportar histonas recién sintetizadas del citoplasma al núcleo, presentar histonas a enzimas que llevan a cabo PTMs, almacenar histonas no unidas al DNA y depositar/retirar histonas del DNA durante procesos como la replicación, transcripción y reparación del DNA (Workman & Abmayr 2014). En definitiva, las chaperonas de histonas contribuyen a la dinámica y homeostasis de cromatina, coordinando su actividad con la de otras proteínas como los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP.

Una de las familias de chaperonas de histonas más estudiada es la de nucleoplasmina/nucleofosmina (NPM), presente en todo el reino animal. Dentro de esta familia podemos encontrar cuatro grupos basados en sus secuencias proteicas: NPM1 (nucleofosmina), NPM2 (nucleoplasmina), NPM3 y las proteínas NPM de invertebrados (NLP). Este trabajo se va a centrar en la nucleoplasmina de *Xenopus laevis*.

1.4. NUCLEOPLASMINA

1.4.1. Caracterización bioquímica de la nucleoplasmina

La nucleoplasmina (NP) es una chaperona de histonas aislada por primera vez a partir de oocitos y huevos de *Xenopus laevis*, que se describió como una proteína ácida y termoestable, capaz de ensamblar nucleosomas *in vitro* en presencia de histonas y DNA purificados (Laskey et al. 1978).

Esta proteína contiene 200 aminoácidos (aa) y adopta una estructura homopentamérica en disolución, plegándose cada monómero en dos dominios. Los 120 primeros aa forman un dominio N-terminal llamado “core”, muy conservado y resistente a proteasas, que le confiere a la NP una gran termoestabilidad. Se han obtenido la

estructura de rayos X del dominio “core” pentamérico de la NP recombinante de *Xenopus* (Dutta et al. 2001) indicando que los monómeros de NP se pliegan en una estructura barril β de 8 hojas β , con una topología “jelly-roll” en el pentámero. Los 80 aa restantes de la NP forman un dominio C-terminal llamado cola, con gran flexibilidad, sensible a proteasas y que no tiene una estructura secundaria canónica (estructura desordenada). Este dominio cola contiene la señal de localización nuclear (NLS) y dos secuencias ricas en residuos ácidos: el segmento poliglutámico A2 y otro segmento más corto denominado A3 (Dingwall et al. 1987).

Distintos estudios han puesto de manifiesto la naturaleza heterogénea de la NP aislada de oocitos (oNP) y huevos (eNP) de *Xenopus* (Cotten et al. 1986; Hierro et al. 2001). eNP es más ácida que oNP, siendo sus puntos isoeléctricos (pI) de 4,25 y 4,7, respectivamente. Además, eNP presenta un peso molecular aparente mayor en geles de poliacrilamida. Estas diferencias se deben a PTMs que se dan durante la maduración de oocito a huevo en las regiones N- y C- terminales, como la hiperfosforilación y las recientemente descritas, metilación de arginina y glutamilación (Onikubo et al. 2015). En estos estudios, se ha visto que las PTMs tienen un papel importante tanto en la conformación de la NP como en su función como chaperona de histonas.

1.4.2. Remodelado de la cromatina espermática

Una de las funciones más conocidas de la nucleoplasmina es su capacidad remodeladora de la cromatina de espermatozoides durante la fecundación. Existe un modelo que propone que la función de la NP en oocitos es la de almacenaje de histonas H2A/H2B. Cuando se da la fecundación, la NP hiperfosforilada y cargada con dímeros H2A/H2B, entra en contacto con la cromatina espermática altamente compactada y disocia las SNBPs del DNA, depositando posteriormente los dímeros en una reacción energéticamente favorecida (Philpott & Leno 1992).

Se ha visto que eNP descondensa la cromatina de espermatozoides de un modo más eficiente que oNP, y que la nucleoplasmina recombinante (rNP) es incapaz de llevar a cabo esta función (Hierro et al. 2001). Diferentes estudios en los que se han empleado mutantes de delección del dominio cola (Hierro et al. 2002), dominios “core” obtenidos por tratamiento con pepsina de las proteínas nativas (Bañuelos et al. 2003) y mutantes que imitan la hiperfosforilación (Bañuelos et al. 2007), demostraron que

para llevar a cabo una descondensación eficiente de la cromatina espermática, es necesaria: la fosforilación del dominio cola y de los 15 residuos iniciales de la región N-terminal, el tramo ácido A1 y la exposición del segmento A2. Datos obtenidos por distintos grupos indican que estas regiones estarían distribuidas en la misma zona estructural, la cara distal del pentámero de NP, ofreciendo así una región donde se concentra la mayor parte de la carga negativa y que es responsable de la unión de ligandos básicos (Bañuelos et al. 2007; Ramos et al. 2010; Onikubo et al. 2015).

1.4.3. Interacción de la nucleoplasmina con histonas

La reconstitución tridimensional (3D) de la NP aislada de huevos de *Xenopus* por microscopía electrónica (ME), reveló una estructura en forma de copa formada por el “core” y cinco brazos, mostrando por primera vez la presencia del dominio flexible C-terminal (**Figura 1 A**). Por otra parte, la reconstitución 3D por ME del complejo eNP:H2A/H2B saturado a relación molar 1:5 (**Figura 1 B**), demuestra que el pentámero de eNP interacciona a través de la cara distal con los dímeros H2A/H2B y que cada monómero de eNP tiene un sitio de unión para un dímero (Ramos et al. 2010). A través de esta misma región, la NP también interaccionaría con las histonas linker H5 y H1 y las proteínas básicas de espermatozoide de *X. laevis*, llevando a cabo un papel esencial en la descondensación de la cromatina (Ramos et al. 2005).

Nuestro grupo ha demostrado que la NP también es capaz de interaccionar con histonas H3/H4 y con el octámero de histonas a través de la cara distal (Ramos et al. 2014). Cuando NP interacciona con un mutante de H3/H4 que no es capaz de tetramerizar, se genera un complejo de bajo peso molecular, cuya estequiometría de saturación es de una NP y dos dímeros de H3H4. En el caso de que NP interaccione con la forma tetramérica de H3/H4 o el octámero de histonas, el complejo que se genera tiene forma elipsoidal y un peso molecular aparente de 440 kDa (**Figura 1 C y 1 D**). Los datos sobre la masa molecular, estequiometría e imágenes de ME de los complejos elipsoidales indican que dos pentámeros de chaperona se enfrentan entre sí por sus caras distales y atrapan el ligando de histona en el centro (dos tetrámeros de H3/H4 o un octámero). Por co-inmunoprecipitación se demostró la presencia de complejos NP y ambos tipos de histonas “core” (H2A/H2B y H3H4) en extractos de huevo y oocito de *Xenopus*, sugiriendo la presencia *in vivo* de complejos NP:Octámero.

Todo esto nos ha llevado a proponer que la cara distal intrínsecamente desordenada de la NP le confiere la capacidad de unir diferentes tipos de histonas, lo que podría favorecer el intercambio de estos ligandos, un proceso esencial para la dinámica del nucleosoma y la transferencia de histonas al DNA.

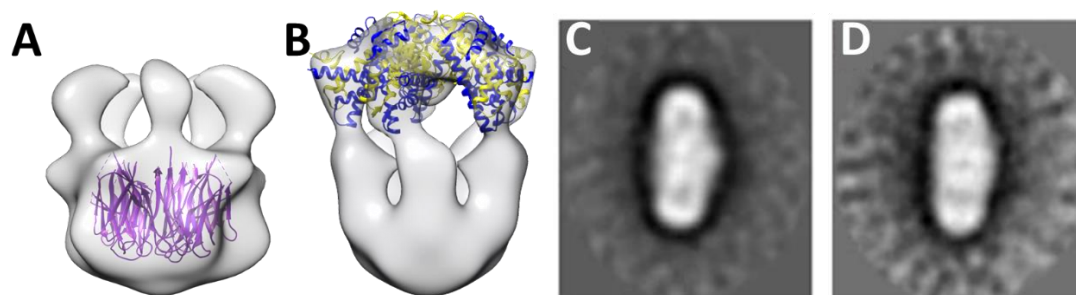


Figura 1. La nucleoplasmina es capaz de unir distintas histonas a través de su cara distal. Reconstitución tridimensional de eNP (A) y complejo eNP:H2A/H2B (1:5) (B) a partir de imágenes de microscopía electrónica (EMD-1778 y EMD-1777, respectivamente). Estos modelos se han ajustado a las reconstituciones de las estructuras atómicas del “core” de NP y del dímero H2A/H2B, códigos de Protein Data Bank 1K5J y 2XQL. También se presentan los complejos elipsoidales eNP:H3H4 (C) y eNP:Octámero (D) vistos a microscopía electrónica. En morado, amarillo y azul se resaltan el “core” de NP, H2A y H2B, respectivamente.

Por otra parte, hemos medido la afinidad de las variantes de NP, nativas y recombinantes, por los distintos ligandos, siendo todas ellas del orden de nanomolar (Fernandez-Rivero 2014). Los resultados demuestran que la fosforilación y la accesibilidad del segmento A2 son factores importantes en la regulación de la interacción de NP con los dímeros H2A/H2B, histonas “linker” y H3/H4 a través de su cara distal, así como en su papel en el remodelado de la cromatina. La determinación de afinidades de la NP por el octámero de histonas resulta difícil por limitaciones de la técnica de fluorimetría, por lo que se necesitan otras técnicas que permitan la observación del complejo de alto peso molecular.

1.4.4. Ensamblaje de nucleosomas

La estabilidad del nucleosoma depende de las interacciones de las histonas “core” entre sí y de las interacciones de las histonas con el DNA (Luger et al. 1997). Su proceso de ensamblaje *in vitro* se explica mediante un modelo que establece que primeramente H3/H4 (en forma de dos dímeros o un tetrámero) se une al DNA para formar un tetrasoma y que posteriormente, se añaden dos dímeros H2A/H2B (Akey & Luger

2003). Cómo se produce el ensamblaje *in vivo* es todavía una pregunta sin contestar (Elsässer & D'Arcy 2012). Se piensa que podría darse por chaperonas de histonas que unen ambos tipos de dímeros por separado, como Nap1 (Nucleosome assembly protein 1) o Vps75 (Vacuolar protein sorting 75), o por la cooperación de distintas chaperonas específicas de H3/H4, como NASP (Nuclear Autoantigenic Protein 1), o de H2A/H2B, como NP.

Los complejos NP:H3H4 y NP:Octámero plantean la posibilidad de que existan vías alternativas para el ensamblaje de tetrasomas y nucleosomas mediado por NP. Centrándonos en los complejos NP:Octámero, estos podrían intervenir en situaciones de estrés replicativo o alta actividad transcripcional (Selth et al. 2010), tomando y cediendo el octámero de histonas al completo del DNA, produciendo así la descondensación y condensación de la cromatina, respectivamente.

1.5. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es caracterizar los complejos elipsoidales NP:Octámero y determinar si presentan alguna función biológica relacionada con el ensamblaje de nucleosomas. Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar, mediante titulación en geles nativos, la formación de los complejos NP:Octámero empleando distintas variantes de nucleoplasmina, que nos permiten ver el efecto de las PTMs y del dominio cola en la interacción de la chaperona con el octámero.
- Comprobar si los complejos NP:Octámero pueden ensamblar nucleosomas *in vitro*, viendo las diferencias entre las distintas variantes de nucleoplasmina.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PURIFICACIÓN DE PROTEINAS

En este trabajo se ha empleado la chaperona nuclear nucleoplasmina de huevos de *X. laevis* (eNP) y su variante recombinante de secuencia completa (rNP), que carece de PTMs y no expone el segmento A2, ya que este establece puentes salinos intracatenarios con la cola C-terminal (Hierro et al. 2002). Además, se ha empleado un mutante de delección (Δ C50NP), que carece de los últimos 50 aa del dominio C-

terminal y por tanto, no posee la secuencia NLS ni el tramo ácido A3, pero sí el segmento ácido A2, que queda expuesto. Por otra parte, también hemos trabajado con las histonas “core” de eritrocitos de pollo (dímeros H2A/H2B, dímeros y tetrámeros H3/H4 y el octámero de histonas). Todas estas proteínas (**Tabla 1**) se han purificado en el laboratorio utilizando protocolos ya publicados (Ausio et al. 1989; Hierro et al. 2001).

Tabla 1. Proteínas empleadas en este trabajo.

Proteína	Masa molecular (Da)	Fuente/Plásmido	Tipo de cromatografía
eNP	110 00	Huevos <i>X. laevis</i>	Interacción hidrofóbica, intercambio aniónico y tamizado molecular
rNP	110 00	pET11b-rNP	Hidroxiapatito, intercambio aniónico y tamizado molecular
Δ C50NP	82 715	pET11b- Δ C50NP	Interacción hidrofóbica y tamizado molecular
H2A/H2B	28 000	Eritrocitos de <i>G. gallus</i>	Hidroxiapatito
H3/H4	26 500	Eritrocitos de <i>G. gallus</i>	Hidroxiapatito
Octámero histonas	109 000	Eritrocitos de <i>G. gallus</i>	Hidroxiapatito

2.1.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las variantes de NP se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos). Como proteína patrón se utilizó la seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) a distintas cantidades de proteína (0 – 16 μ g). Las muestras y el reactivo se agitaron y se incubaron 30 min a 37 °C, siguiendo las instrucciones del fabricante, antes de medir la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro *Jenway 6300* (Jenway, Staffordshire, Reino Unido).

Las histonas aisladas de núcleos de eritrocitos de pollo se cuantificaron por medida de la absorbancia a 230 nm en un espectrofotómetro *Cary 3 Bio*. Los coeficientes de extinción molar son: 4,2 $\text{cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ para el octámero de histonas, 4,35 $\text{cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ para el dímero H2A/H2B y 4,1 $\text{cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ para H3/H4 (Ramos et al. 2014).

2.1.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)

El análisis de proteínas purificadas se llevó a cabo mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida. Las muestras se prepararon añadiéndoles

tampón de carga (Tris – HCl 50mM pH 6,8, glicerol 4 % (p/v), SDS 4 % (p/v), azul de bromofenol 0,02 % (p/v), β – mercaptoetanol 100 mM) y se hirvieron a 100 °C durante 10 minutos antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se corrió en tampón glicina 200 mM, Tris – HCl 25 mM pH 8,3, SDS 1 % (p/v) y en sistemas de electroforesis *mini – PROTEAN 3* (Bio – Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos) a un voltaje constante de 80 V. Finalmente, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R – 250 0,1 % (p/v), metanol 40 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v)) durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente, y se destiñeron en esta misma disolución sin azul Coomassie.

2.1.3. Entrecruzamiento del octámero de histonas

El octámero de histonas mantiene su estado oligomérico *in vitro* a altas concentraciones de sal. Para realizar experimentos de formación de complejos con NP y reconstitución de nucleosomas a concentraciones fisiológicas de sal, entrecruzamos el octámero con dimetil suberimidato (DMS) (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, Estados Unidos). Este agente químico entrecruzante o “crosslinker” (XL) contiene grupos imidoéster, a los lados de un brazo espaciador de 8 Å, que reacciona con grupos amino. Así, podemos obtener complejos de histonas con propiedades similares a las que encontramos en octámeros nativos (Stein et al. 1977).

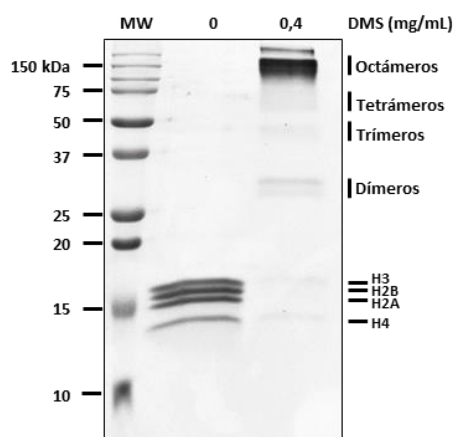


Figura 2. Entrecruzamiento del octámero de histonas mediante DMS. Se entrecruzó el octámero de histonas con el agente entrecruzante dimetil suberimidato. La muestra obtenida se analizó en un gel desnaturante al 18% de acrilamida, utilizando como control el octámero de histonas sin entrecruzar. Se muestra el patrón de pesos moleculares (MW).

El método utilizado es el descrito por Hsieh et al. 2013. El octámero de histonas se incubó a una concentración de 1,5 mg/mL con DMS a 0,4 mg/mL en tampón 0,1 M sodio borato pH 10, 2 M NaCl y 0,2 mM EDTA durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo 0,25 M Tris-HCl pH 7,6 llegando a una concentración final de 50 mM. La muestra se dializó durante 90 minutos a 4 °C en tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA y 1 mM DTT. El octámero entrecruzado se analizó mediante SDS-PAGE (**Figura 2**) y se cuantificó la banda de octámero por densitometría utilizando el programa *Quantity One v 4.5.0* (Bio – Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). El rendimiento del entrecruzamiento fue de un 75%. El 25% restante son histonas entrecruzadas formando dímeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros con un peso molecular mayor al del octámero de histonas, que generan complejos con NP y el DNA.

2.2. PURIFICACIÓN DE DNA

El DNA de 207 pb del gen 5S RNA ribosómico de *Lytechinus variegatus* se ha empleado para el ensamblaje *in vitro* de nucleosomas (Simpson et al. 1985). Para purificarlo, se transformaron por electroporación células de *Escherichia coli* DH5 α con el plásmido p5S207-12, que contiene 12 repeticiones en tándem del fragmento de 207 pb. El aislamiento del DNA plasmídico se realizó mediante el kit comercial *ATP™ Plasmid Midi Kit* (ATP Biotech Inc., Banciao, Taipei, Taiwan).

Los oligonucleótidos conteniendo las 12 repeticiones en tándem del fragmento de 207 pb se obtuvieron por digestión del plásmido p5S207 – 12 con el enzima HhaI (New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido). La mezcla de digestión (1,4 mg/mL p5S207-12, 0,6 U/ μ L HhaI, 0,1 mg/mL BSA) se incubó 90 minutos a 37 °C en agitación y se corrió en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE a 80 V. El constructo 207 – 12 de 2400 pb resultante fue extraído de banda usando el kit comercial *ATP™ Gel/PCR Extraction Kit* (ATP Biotech Inc., Banciao, Taipei, Taiwan).

Los monómeros de 207 pb se obtuvieron por digestión del constructo 207 – 12 con la endonucleasa de restricción RsaI (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). La mezcla de digestión (0,15 mg/mL 207-12, 0,3 U/ μ L RsaI) se incubó 1 hora a 37 °C en agitación. El fragmento de 207 pb se purificó como en el caso anterior.

2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para obtener una mayor cantidad del fragmento de 207 pb y eliminar extremos cohesivos, utilizamos la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en un termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Hauppauge, Nueva York, Estados Unidos), usando como molde el fragmento de 207 pb a una concentración final de 0,1 µg/mL. Además, se añadió a la mezcla de reacción 0,05 U/µL de Taq polimerasa (New England Biolabs, Hertfordshire, Reino Unido), 0,4 mM de dNTPs (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) y 2 µM de cebadores específicos de la secuencia. El DNA se purificó como se explica en el apartado anterior y se cuantificó en un espectrofotómetro de espectro total (*NanoDrop*[®]) a 260 nm.

2.2.2. Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE (EDTA 1 mM, ácido acético glacial 1,1 % (v/v), Tris – HCl 40 mM pH 8,0). Antes de que el gel polimerizase, se añadió el agente de tinción *SYBR – Safe* (Life Technologies, Eugene, Oregon, Estados Unidos) a una concentración final de 1:10 000 (v/v). Una vez preparadas las muestras, se mezclaron con tampón de carga (azul de bromofenol 0,25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)) y se cargaron en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V en tampón TAE durante el tiempo necesario. Finalmente, los fragmentos de DNA se visualizaron en el transiluminador ultravioleta *VISION Gel Documentation System* (Scie – Plas Ltd., Cambridge, Reino Unido).

2.3. ELECTROFORESIS NATIVA (NATIVE-PAGE)

Los complejos NP:Histona se analizaron en electroforesis nativa utilizando el sistema comercial *NativePAGE*[™] *Bis-Tris Gel System* (Life Technologies, Carlsbad, California, Estados Unidos). En estas condiciones no desnaturalizantes, las proteínas migran a través de un campo eléctrico y su movimiento en el gel depende de la carga intrínseca, el tamaño y la forma de la proteína. Diferentes estudios han empleado esta técnica para calcular afinidades entre proteínas (McBryant et al. 2003; Liu et al. 2012)

En el ensayo mezclamos la NP, a una concentración de 2 µM, con las distintas histonas a diferentes relaciones molares (según el ensayo) en un volumen final de 15 µl. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón Tris – HCl 25 mM

pH 7,6, con NaCl 150 mM. Se añadió a las muestras tampón de carga (Bis – Tris 50 mM pH 7,2, HCl 6 N, NaCl 50 mM, glicerol 10 % p/v, Ponceau S 0,001 %) y se cargaron en un gel nativo que contiene un gradiente lineal de poliacrilamida (4 % – 16 % acrilamida, bisacrilamida 2,6 %, Bis – Tris pH 7,5, TEMED, APS). La electroforesis se llevó a cabo en tampón Bis – Tris 50 mM, Tricina 50 mM pH 6,8, a 4 °C y un voltaje constante de 150 V durante 1 hora y 250 V durante 45 min. Los gels se tiñeron con azul de Coomassie y se escanearon en un densitómetro *GS – 800 Calibrated* (Bio – Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). La cuantificación de la cantidad de proteína se estimó como se explica en el apartado 2.1.3. En los experimentos correspondientes se calculó la fracción unida de NP como la banda del complejo de alto peso molecular entre la de NP libre. Esta forma de establecer la fracción unida no tiene en cuenta la contribución de las histonas en la intensidad de la banda de los complejos, por ello el eje Y supera la unidad, pero nos permite comparar los complejos de alto peso molecular formados por rNP y por eNP y $\Delta C50NP$, puesto que no son equivalentes en estequiometría.

2.4. ENSAYOS DE RETARDO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE DNA (EMSA)

El análisis de DNA mediante la técnica EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) permite observar la formación de nucleosomas mediada por NP. Se trata de una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes que permite observar los complejos proteína:DNA, ya que la migración de los fragmentos de DNA asociados a proteína es menor que la correspondiente al DNA libre. Esta técnica se ha utilizado en otros trabajos para determinar la afinidad de distintas proteínas por el DNA (Fauth et al. 2010; Nishibuchi et al. 2014).

En primer lugar, el octámero de histonas se mezcló con concentraciones crecientes de chaperona. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se añadió el DNA de 207 pb, siendo la concentración final de histona y DNA 0,4 μ M para ambos. Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en un volumen final de 15 μ l de tampón NaCl 150 mM, Tris – HCl 20 mM pH 7,6, EDTA 0,2 mM, DTT 1 mM, glicerol 10 %, BSA 0,2 mg/ml. A continuación, se calentaron a 42 °C durante 30 minutos para eliminar uniones inespecíficas entre el DNA y las histonas (Osakabe et al. 2010). Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida del 6% preparado en

tampón TAE. La electroforesis se realizó en tampón TAE utilizando un sistema *mini* – *PROTEAN 3* a un voltaje constante de 40 V durante 5 horas a 4 °C. Los geles se tiñeron durante 10 minutos a temperatura ambiente con *SYBR® Green EMSA* (1:10 000 (v/v)) (Life Technologies, Eugene, Oregon, Estados Unidos) para detectar las bandas de DNA, que se fotografiaron en el transiluminador ultravioleta *Vision Compact Imaging System* (Scie – Plas, Cambridge, Reino Unido) y se cuantificaron (como se ha descrito en el apartado 2.1.3.). La eficiencia de ensamblaje de nucleosomas se calculó dividiendo la intensidad de cada banda de nucleosoma entre el control de DNA:Octámero sin chaperona.

La identificación de las bandas de nucleosomas se ha hecho en experimentos anteriores en el grupo por comparación con la migración de nucleosomas reconstituidos por dilución de la concentración de sal (Fernandez-Rivero 2014) y la utilización de anticuerpos anti-H2B y anti-H3 (Jiménez Ecenarro 2014).

3. RESULTADOS

3.1. LAS PTMs DE LA NP REGULAN SU AFINIDAD POR EL OCTÁMERO DE HISTONAS

Para caracterizar la interacción de las distintas variantes de NP con el octámero, realizamos titulaciones en geles nativos, manteniendo la concentración de NP constante y aumentando la concentración de octámero progresivamente. Las distintas variantes de NP empleadas son la variante natural de huevos de *Xenopus* (eNP) y las recombinantes rNP y Δ C50NP. Estas tres variantes de NP nos permiten ver el efecto de las PTMs y del dominio cola en la interacción de la chaperona con el octámero.

Tras las titulaciones, se vio que la eNP se une a las histonas formando un complejo de masa molecular aparente de 440 kDa (**Figura 3 A**), previamente caracterizado y del que se sabe su estequiometría (dos NP uniendo un octámero de histonas), siendo su masa molecular real de 350 kDa (Ramos et al. 2014). Por el contrario, en la variante rNP la cantidad de este complejo es mucho menor, estando siempre presentes otros complejos de menor peso molecular correspondientes a la unión de la chaperona con dímeros de histonas (**Figura 3 C**), lo que nos da una idea de su inestabilidad. Estos resultados sugieren que las PTMs en la NP son fundamentales para estabilizar la unión con el octámero de histonas. Por otra parte, Δ C50NP forma un complejo comparable

en cuanto a tamaño y estabilidad al formado por eNP (**Figura 3 E**), lo que refleja la importancia de las interacciones del segmento A2 con las histonas en la estabilización del complejo. A diferencia de rNP, en $\Delta C50NP$ este segmento ácido estaría expuesto al disolvente (Hierro et al. 2002).

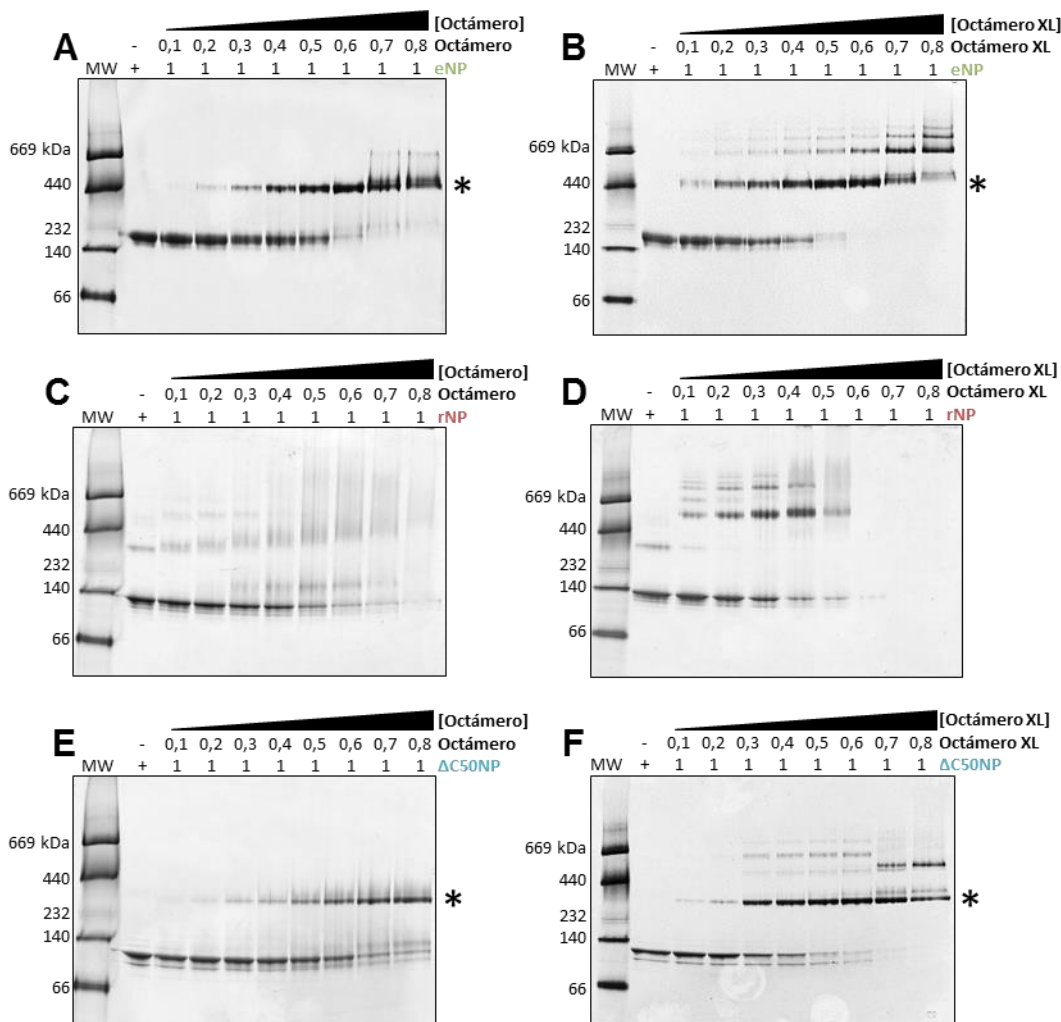


Figura 3. Análisis de los complejos NP:Octámero por geles nativos. Se titularon las variantes de nucleoplasmina eNP (A, B), rNP (C, D) y $\Delta C50NP$ (E, F) frente al octámero de histonas sin entrecruzar (A, C, E) y entrecruzado (B, D, F) y se observó por electroforesis nativa (4-16%). La aparición de una banda de alto peso molecular en las muestras correspondientes a rNP sin histonas sugiere que una pequeña proporción de la chaperona podría asociarse consigo misma. Se muestra la posición de los marcadores de peso molecular (MW) y del complejo de alto peso molecular con un asterisco (*).

En todos los casos, a partir de cierta relación molar, los complejos de alto peso molecular desaparecen, debido a que la unión de más histonas genera partículas de mayor peso molecular y menor carga que no entran en el gel. Esto provoca una caída

de las curvas de fracción de NP unida a histona (**Figura 4 A**). El análisis de estas curvas permite ver que la unión del octámero a $\Delta C50NP$ está desplazada a la derecha con respecto a la eNP, necesitando más concentración de octámero para que toda la chaperona esté en forma del complejo de alto peso molecular, lo que sugiere una menor afinidad por el octámero.

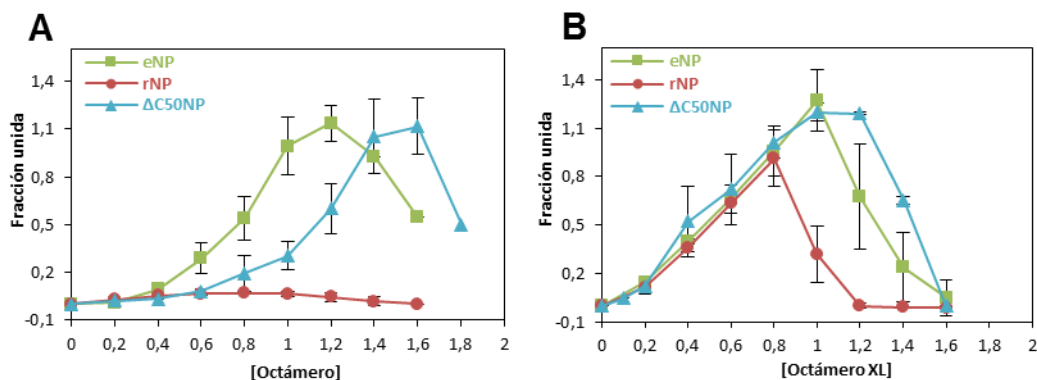


Figura 4. Curvas de unión del octámero a la NP para formar un complejo de alto peso molecular. Los gels presentados en la Figura 3 se cuantificaron por densitometría y se calculó la fracción unida de NP como se explica en materiales y métodos, representándola frente a la concentración de octámero no entrecruzado (A) y entrecruzado con DMS (B). Se representan los valores promedio y desviaciones estándar de un mínimo de dos experimentos por variante de NP.

Puesto que los experimentos de titulación se realizan a 150 mM NaCl y el estado octamérico de las histonas *in vitro* depende de una fuerza iónica alta, decidimos entrecruzar el octámero de histonas con DMS, lo que nos permite seguir la unión del octámero completo a la NP. En este caso, la eNP une el octámero XL formando el mismo tipo de complejos que cuando el octámero está en forma nativa (**Figura 3 B**), habiendo un mínimo desplazamiento en su curva de unión (**Figura 4 B**). Es importante decir que también se forman complejos superiores minoritarios, con masa molecular aparente superior a 500 kDa, que asociamos a la interacción de la NP con histonas entrecruzadas en formas superiores al octámero como se explica en materiales y métodos. rNP también une el octámero XL, desapareciendo los complejos de bajo peso molecular (**Figura 3 D**). Sin embargo, esta variante forma un complejo de masa molecular aparente mayor cuya estequiometría desconocemos. La masa molecular sugiere que en este complejo se unen más de dos NP por octámero, posiblemente debido a que para la estabilización del complejo se necesite más chaperona para amortiguar las cargas del octámero. En cuanto a $\Delta C50NP$, la estabilidad del complejo que forma con el octámero entrecruzado es mayor que con el no entrecruzado (**Figura**

3 F), teniendo una curva de unión casi exacta a la eNP (**Figura 4 B**). Estos resultados sugieren que, además del tramo ácido A2, los últimos 50 aa C-terminales (donde hallamos el NLS y el segmento A3) y las PTMs en esta región y en la cola N-terminal, participan en la estabilización del octámero de histonas sin entrecruzar.

3.2. *In vitro* NP DEPOSITA OCTÁMEROS DE HISTONAS EN EL DNA PARA ENSAMBLAR NUCLEOSOMAS

Para comprobar la capacidad de las distintas variantes de NP de ceder el octámero de histonas al DNA y ensamblar nucleosomas, realizamos ensayos de retardo en gel, que permiten analizar los complejos DNA:Histona formados en presencia de chaperonas de histonas. La incubación del octámero con el DNA lineal origina dos bandas mayoritarias. La de menor tamaño corresponde al DNA libre, mientras que la de mayor tamaño se corresponde con la incorporación del octámero de histonas al DNA originando nucleosomas (NS).

Los resultados obtenidos indican que a concentraciones crecientes de NP, independientemente de la variante, aumenta la eficiencia en la incorporación del octámero, puesto que la intensidad de la banda de NS va aumentando (**Figura 5 A, C, E**). Aun así, la eNP tiene una eficiencia de ensamblaje mayor, seguida de $\Delta C50NP$ y rNP (**Figura 6 A**), lo que nos indica que las PTMs y la exposición del segmento ácido A2 también son importantes a la hora de ensamblar el nucleosoma. Además, por encima de la banda de NS aparecen bandas de agregados entre las histonas y el DNA, que se van reduciendo a medida que se aumenta la concentración de eNP, lo que no ocurre con las variantes recombinantes.

Utilizando el octámero nativo no podemos establecer si la cesión de histonas al DNA se realiza de manera secuencial a través de tetrámeros $(H3H4)_2$ y dímeros H2A/H2B o si es el octámero al completo lo que se transfiere. Por ello, decidimos hacer el ensamblaje utilizando el octámero entrecruzado con DMS. En estas condiciones, seguimos obteniendo la banda de NS, cuya intensidad aumenta con la concentración de chaperona (**Figura 5 B, D, F**). Esto nos indica que la NP es capaz *in vitro*, de transferir el octámero de histonas ensamblado al DNA. La diferencia entre las distintas variantes se mantiene (**Figura 6 B**), siendo eNP la que presenta mayor capacidad de ensamblaje de NS. Aunque la formación de los complejos NP:Octámero XL con eNP

y $\Delta C50$ son muy parecidos, a la hora de ceder el ligando básico, es más eficiente la primera, lo que sugiere que tanto las PTMs como todo el dominio C-terminal participan en el ensamblaje de nucleosomas *in vitro*.

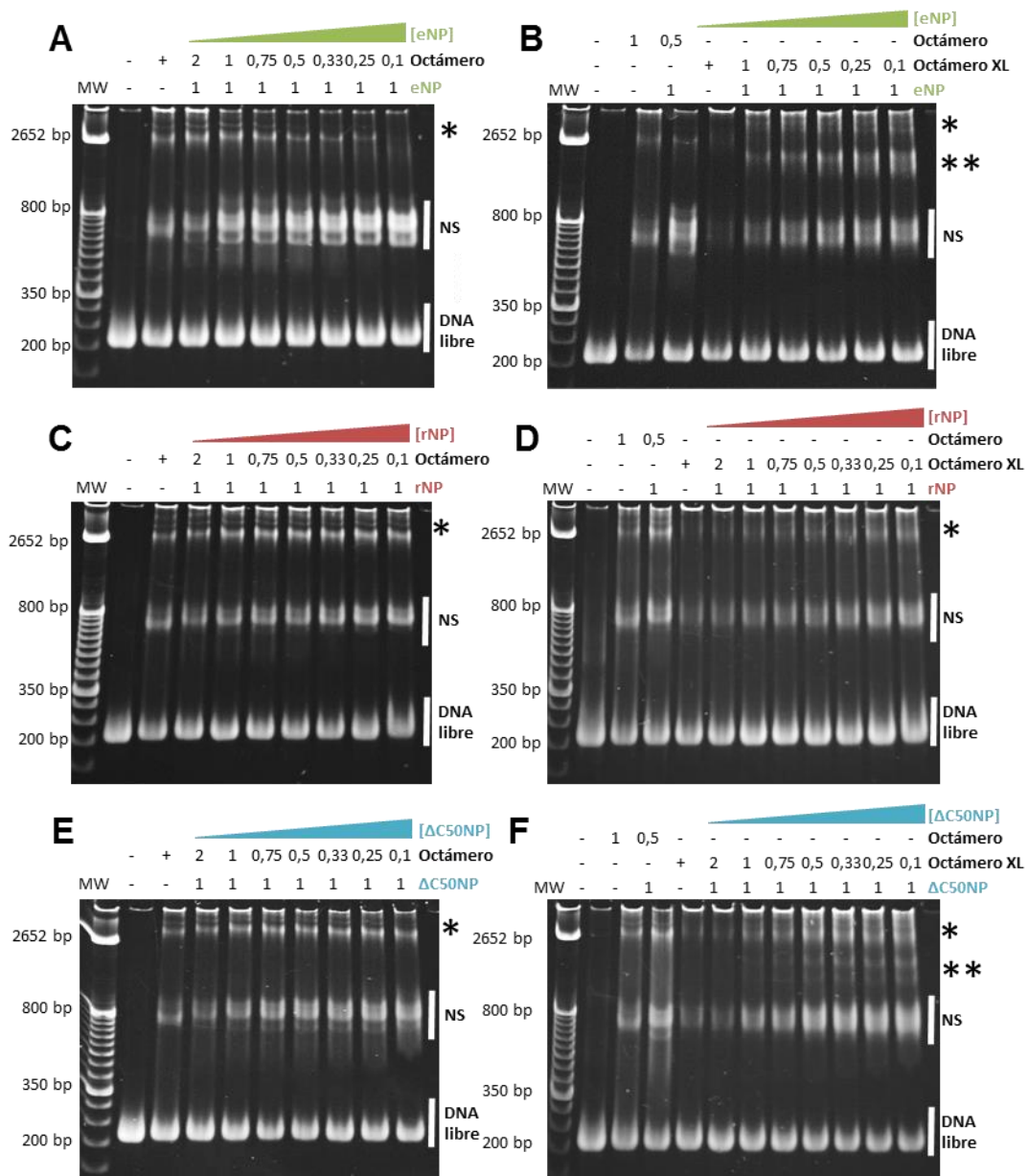


Figura 5. La NP favorece la cesión de octámeros al DNA para formar nucleosomas. Se incubaron las variantes de nucleoplasmina eNP (A, B), rNP (C, D) y $\Delta C50NP$ (E, F) con octámero de histonas sin entrecruzar (A, C, E) y entrecruzado (B, D, F) y se añadió DNA de 207 pb. Las muestras se analizaron por electroforesis nativa al 6% de acrilamida. Se muestran los controles de DNA libre y la mezcla de DNA:Octámero obtenida en ausencia de chaperona y el marcador de pares de bases de DNA (MW). La banda de nucleosomas se señala como NS, los agregados entre DNA e histonas con un asterisco (*) y la banda superior al NS, debida a la cesión al DNA de oligómeros grandes de histonas entrecruzados por parte de la NP, con dos asteriscos (**).

Es importante puntualizar que al igual que antes, tenemos parte de las histonas que quedan entrecruzadas en formas oligoméricas superiores al octámero y que pueden unirse a NP y cederse al DNA, pero sin ensamblar nucleosomas, generando bandas que marcamos en la **Figura 5** con dos asteriscos (**). Por otra parte, la cuantificación de eficiencia de ensamblaje de NS en la **Figura 6** se hace con respecto al control en el que se mezcla DNA y octámero sin chaperona. Así, cuando el octámero está entrecruzado la formación espontánea de NS sin chaperona es menor, lo que determina que lo que nosotros llamamos eficiencia de ensamblaje tome valores mayores a cuando se usa el octámero sin XL. Una posibilidad por el cual el ensamblaje autónomo sea menor con el octámero XL es que este proceso este favorecido mediante un ensamblaje secuencial, que no se puede dar en estas condiciones y termina generando más agregados.

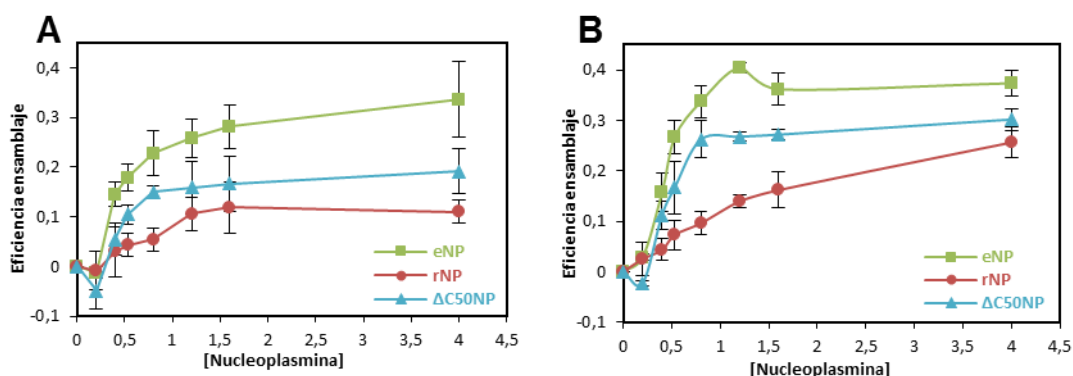


Figura 6. Eficiencia del ensamblaje de nucleosomas por las distintas variantes de NP. Los geles que se muestran en la Figura 5 se cuantificaron por densitometría y se estimó la eficiencia de ensamblaje de nucleosomas, como se explica en materiales y métodos, de NP a partir de octámero nativo (A) y entrecruzado (B). Estos datos se representaron frente a la concentración de chaperona. Se representan los valores promedio y desviaciones estándar de un mínimo de dos experimentos por variante de NP.

Para resaltar el papel del complejo de alto peso molecular en el ensamblaje del NS, se representaron los datos de formación de complejos y eficiencia de ensamblaje de NS en una misma grafica para cada variante de NP (**Figura 7**). Esta representación nos indica que la eficiencia máxima en el ensamblaje de NS se da a partir de la relación molar NP:Octámero en que el complejo de 440 kDa es mayoritario, y que esta cesión disminuye cuando estamos a relaciones molares en las que la unión de más histonas al complejo forma partículas con una masa molecular aparente mayor.

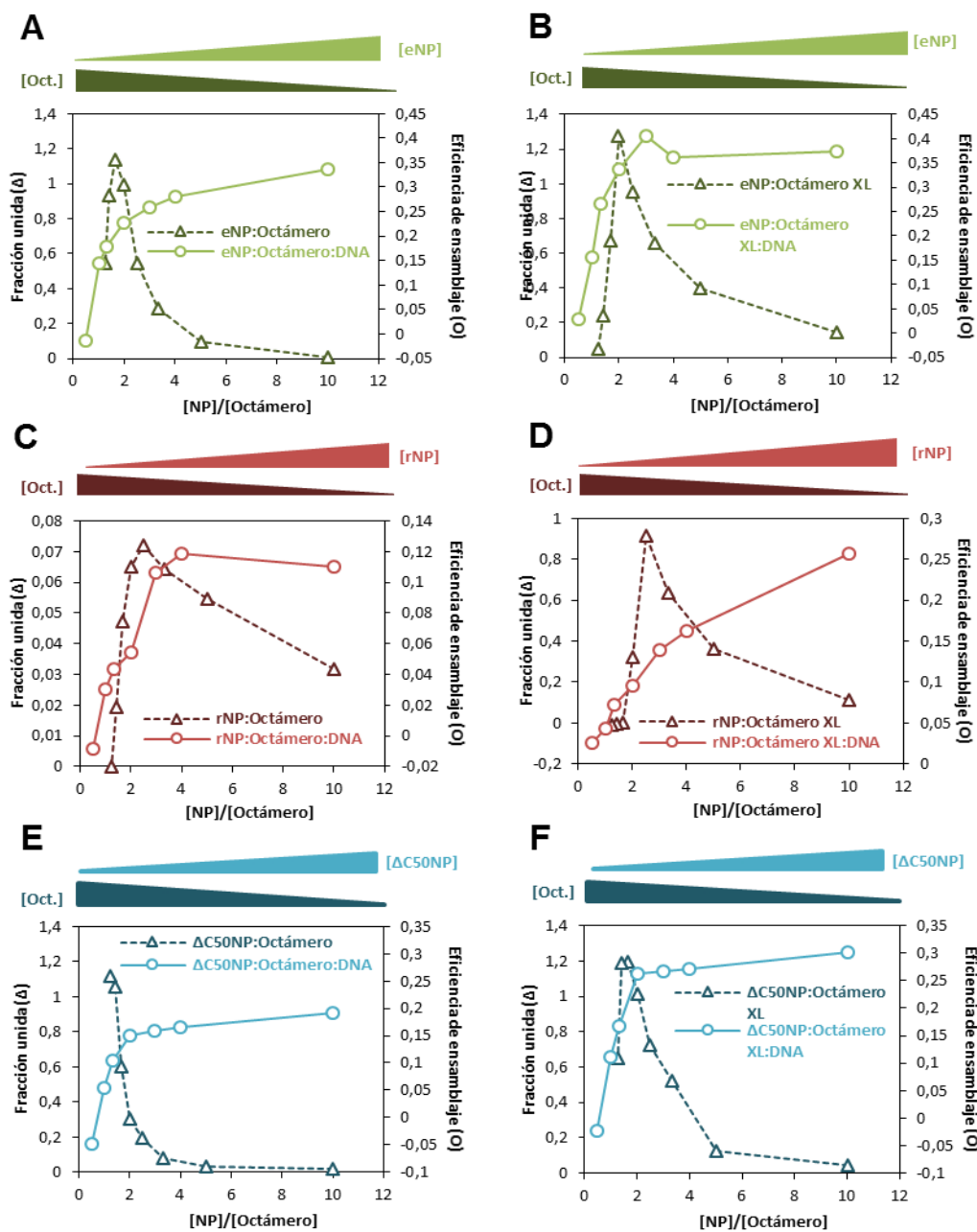


Figura 7. Relación entre la formación del complejo NP/Octámero de 440 kDa y el ensamblaje de nucleosomas. Se presentan los datos anteriormente expuestos para comparar la formación del complejo de alto peso molecular y el ensamblaje de NS frente a la relación de concentración NP/Octámero para las de NP, con octámero sin entrecruzar y entrecruzado respectivamente, eNP (A y B), rNP (C y D) y Δ C50NP (F y G).

3.3. EL COMPLEJO eNP:OCTÁMERO SE FORMA INDEPENDIENTE DEL ORDEN DE ADICIÓN DE LAS HISTONAS “CORE”

Los datos de ME del complejo eNP:Octámero (1:0,5) sugieren que cada NP pentamérica une un dímero H2A/H2B y un dímero H3/H4 (Ramos et al. 2014). Así, decidimos ver si los complejos eNP:H2A/H2B y eNP:H3/H4, a estequiometrías en la

que una eNP une dos dímeros, podían originar el complejo de alto peso molecular por la adición del dímero contrario. Para ello, primeramente incubamos eNP con H2A/H2B o H3H4 durante 1 hora y posteriormente titulamos con H3H4 o H2A/H2B, respectivamente, dejando incubarse otra hora. Los resultados muestran que el orden de adición de las histonas “core” no parece afectar al proceso de formación del complejo de 440 kDa y que este complejo es el que se forma mayoritariamente cuando tenemos ambos tipos de histonas nucleosomales (**Figura 8**).

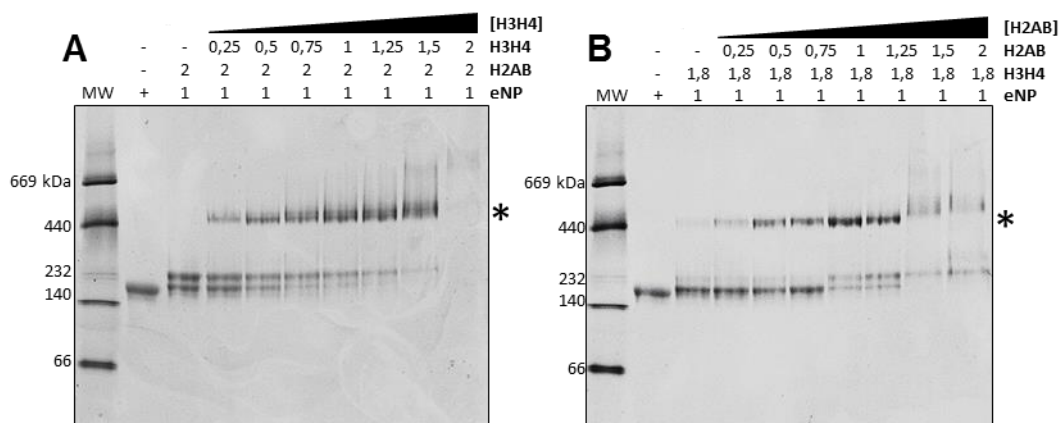


Figura 8. Formación del complejo de alto peso molecular a partir de dímeros/tetrámeros de histonas. (A) Se incubó eNP durante 1 hora con dímeros H2A/H2B a relación 1:2 y dímeros/tetrámeros H3H4 a relación 1:1,8 y posteriormente se tituló con H3H4 y H2A/H2B, respectivamente, a diferentes relaciones molares, dejando incubarse otra hora. Las muestras se observaron por electroforesis nativa (4-16%). Se muestra la posición de los marcadores de peso molecular (MW) y del complejo de alto peso molecular con un asterisco.

4. DISCUSIÓN

Las chaperonas de histonas presentan una gran diversidad estructural y funcional. Independientemente de sus diferencias todas son capaces de ensamblar nucleosomas *in vitro*. Esta capacidad se ha relacionado con la demostrada habilidad de algunas chaperonas de histonas de eliminar interacciones no productivas entre el DNA y las histonas, evitando la formación de agregados. En este sentido, NP interacciona con los dímeros H2A/H2B y H3/H4 con alta afinidad, neutralizando las cargas positivas de las histonas y favoreciendo conformaciones similares a las que adoptan los dímeros H2A/H2B y el tetrámero (H3/H4)₂ en el octámero de histonas (Ramos et al. 2014), lo cual según algunos modelos, favorecería la cesión de estos componentes al DNA y el ensamblaje de nucleosomas (Elsässer & D’Arcy 2012).

La NP es la única chaperona descrita capaz de unir simultáneamente y formar complejo con todos los componentes del octámero de histonas *in vitro* (Ramos et al. 2014). El modelo secuencial de ensamblaje del nucleosoma que implica que el tetrámero (H3/H4)₂ tiene que unirse primero al DNA para formar un tetrasoma estable al que se unirían dos dímeros de H2A/H2B para formar el nucleosoma (Akey & Luger 2003), plantea dudas sobre el posible papel del complejo NP/Octámero en el ensamblaje del nucleosoma. Por lo cual, decidimos caracterizar estos complejos empleando distintas variantes de NP, que nos permitirían además estudiar el papel de las modificaciones post-traduccionales y de los dominios proteicos en su formación y estabilización y su papel en el ensamblaje del nucleosoma *in vitro*.

Los resultados de este trabajo indican que las PTMs y la accesibilidad del segmento A2 en NP son importantes en la estabilización del complejo de nucleoplasmina con el octámero de histonas. La rNP no es capaz de estabilizar el octámero de histonas, lo que coincide con estudios anteriores en los que se estableció que en esta variante recombinante, existe una interacción entre el dominio C-terminal y el A2, dificultando la interacción con histonas (Hierro et al. 2002; Onikubo et al. 2015). Cuando se eliminan los últimos 50 aa C-terminales (Δ C50NP), se deja expuesto el segmento A2, favoreciendo la interacción con las histonas. En eNP, la exposición de este tramo ácido se da por PTMs, principalmente fosforilaciones en el dominio C-terminal. Siendo esto así, la afinidad de Δ C50NP y eNP por las histonas debería ser muy similar. Datos de nuestro grupo indican que para los dímeros de histonas H2A/H2B y H3/H4, la afinidad de ambas variantes es muy parecida (Fernandez-Rivero 2014). Sin embargo, los resultados aquí expuestos indican que Δ C50NP tiene menos afinidad por el octámero que eNP. Cuando empleamos el octámero entrecruzado, la afinidad entre ambas variantes por el octámero se iguala. Así, es razonable proponer que tanto las fosforilaciones en el extremo N-terminal como los 50 aa C-terminales y sus fosforilaciones, metilaciones y glutamilaciones (Onikubo et al. 2015), participan en la estabilización de la complejo NP/Octámero.

El hecho de que la eNP pueda unir dímeros H2A/H2B y H3H4 para formar el complejo de peso molecular aparente de 440 kDa, independientemente del orden de adición de las histonas, corrobora los datos antes obtenidos por nuestro grupo (Ramos 2006; Fernandez-Rivero 2014), los cuales demuestran que la NP es capaz de ensamblar el

octámero de histonas a partir de sus componentes, los dímeros H2A-H2B y dímeros y tetrameros H3-H4. Además, se ha visto que la estructura del octámero de histonas cuando forma complejo con NP es similar a la estructura que adopta en el nucleosoma (Ramos et al. 2014), y por tanto, la capacidad de la NP de estabilizar esta conformación, favorecería su transferencia al DNA para ensamblar nucleosomas, ya que es esperable que su afinidad por el DNA sea mayor que el resto de las conformaciones que puede adoptar en disolución. Nuestros resultados confirman esta hipótesis ya que, cuando entrecruzamos el octámero, eliminando la posibilidad de disociación en dímeros/tetrameros y por tanto el ensamblaje secuencial del nucleosoma, se produce cesión del “core” de histonas al DNA, ensamblando nucleosomas. Además, este ensamblaje es mayor en las relaciones en las que el complejo NP/Octámero es mayoritario. Estos resultados contestan (en el caso de la NP) la pregunta de si las histonas se transfieren al DNA por una unión transitoria a las chaperonas o si es necesario la formación de un complejo estable entre ambas (Elsässer & D’Arcy 2012)

La variante más activa en la cesión del octámero al DNA es eNP, independientemente de que el octámero esté o no entrecruzado, mostrando la función de las PTMs en el ensamblaje de nucleosomas. Estos resultados contradicen los publicados recientemente (Onikubo et al. 2015), en los que se establece que eNP sería incapaz de ceder histonas al DNA. La comparación de ambos resultados resulta complicada puesto que mientras nosotros vemos transferencia directa de histonas a DNA lineal, ellos realizan un ensayo con chaperonas de histonas y remodeladores de cromatina y analizan la capacidad de ensamblar y disponer a distancias repetitivas nucleosomas en un DNA circular.

En definitiva, el ensamblaje de nucleosomas mediado por complejos NP:Octámero podría ser una alternativa al proceso secuencial de ensamblaje del nucleosoma y tendría sentido en situaciones en las que se necesite una retirada o deposición rápida del octámero de histonas, como en condiciones de estrés replicativo (en etapas iniciales del desarrollo embrionario) o en la transcripción de genes muy activos (Selth et al. 2010). Aún así, es importante recordar que la función de las chaperonas de histonas de ensamblaje y desensamblaje de nucleosomas está íntimamente ligada a complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (Elsässer & D’Arcy 2012).

5. CONCLUSIONES

- Las PTMs de la NP, aumentan la afinidad de la chaperona por el octámero de histonas. La estabilización de estos complejos depende de la interacción del segmento ácido A2 y de los últimos 50 aa del dominio C-terminal con los ligando básicos.
- La nucleoplasmina cede las histonas al DNA formando previamente un complejo estable con el octámero de histonas. La eficiencia en el ensamblaje de los nucleosomas es mayor en las condiciones de concentración de chaperona en las que el complejo elipsoidal NP/Octámero es la especie más abundante.
- La capacidad de la NP de ceder el octámero de histonas al DNA *in vitro* implica la posibilidad de que *in vivo*, este tipo de complejos tengan una función biológica en la retirada y deposición del “core” de histonas.

6. BIBLIOGRAFIA

- Akey, C.W. & Luger, K., 2003. Histone chaperones and nucleosome assembly. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(1), pp.6–14.
- Arents, G. & Moudrianakis, E.N., 1995. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), pp.11170–11174.
- Ausió, J., 1999. Histone H1 and evolution of sperm nuclear basic proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(44), pp.31115–31118.
- Ausio, J., Dong, F. & van Holde, K., 1989. Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone “tails” in the stabilization of the nucleosome. *Journal of Molecular Biology*, 206(3), pp.451–463.
- Banks, D.D. & Gloss, L.M., 2003. Equilibrium folding of the core histones: The H3-H4 tetramer is less stable than the H2A-H2B dimer. *Biochemistry*, 42(22), pp.6827–6839.
- Bañuelos, S. et al., 2003. Activation mechanism of the nuclear chaperone nucleoplasmin: Role of the core domain. *Journal of Molecular Biology*, 334(3), pp.585–593.
- Bañuelos, S. et al., 2007. Phosphorylation of both nucleoplasmin domains is required for activation of its chromatin decondensation activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), pp.21213–21221.
- Cotten, M., Sealy, L. & Chalkley, R., 1986. Massive phosphorylation distinguishes *Xenopus laevis* nucleoplasmin isolated from oocytes or unfertilized eggs. *Biochemistry*, 18, pp.5063–5069.

Dingwall, C. et al., 1987. Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals. *The EMBO journal*, 6(1), pp.69–74.

Dutta, S. et al., 2001. The Crystal Structure of Nucleoplasmin-Core. *Molecular Cell*, 8(4), pp.841–853.

Elsässer, S.J. & D'Arcy, S., 2012. Towards a mechanism for histone chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(3-4), pp.211–221.

Fauth, T. et al., 2010. The DNA binding CXC domain of MSL2 is required for faithful targeting the dosage compensation complex to the X chromosome. *Nucleic Acids Research*, 38(10), pp.3209–3221.

Fernandez-Rivero, N., 2014. *Caracterización de los complejos Nucleoplasmina: Histona y su papel en el remodelado de la cromatina*. Tesis doctoral-Universidad del País Vasco.

Hierro, A. et al., 2002. Electrostatic interactions at the C-terminal domain of nucleoplasmin modulate its chromatin decondensation activity. *Biochemistry*, 41(20), pp.6408–6413.

Hierro, A. et al., 2001. Structural and functional properties of Escherichia coli-derived nucleoplasmin: A comparative study of recombinant and natural proteins. *European Journal of Biochemistry*, 268(6), pp.1739–1748.

Hsieh, F.-K. et al., 2013. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), pp.7654–9.

Jiménez Ecenarro, J., 2014. *Complejos proteicos implicados en el remodelado del nucleosoma mediado por nucleoplasmina*. Trabajo de fin de grado-Universidad del País Vasco.

Laskey, R. et al., 1978. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275(416-420).

Li, G. & Zhu, P., 2015. Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS Letters*.

Liu, W.H. et al., 2012. CAF-1-induced oligomerization of histones H3/H4 and mutually exclusive interactions with Asf1 guide H3/H4 transitions among histone chaperones and DNA. *Nucleic Acids Research*, 40(22), pp.11229–11239.

Luger, K. et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), pp.251–260.

McBryant, S.J. et al., 2003. Preferential Binding of the Histone (H3-H4)₂ Tetramer by NAP1 Is Mediated by the Amino-terminal Histone Tails. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), pp.44574–44583.

Nishibuchi, G. et al., 2014. N-terminal phosphorylation of HP1 increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic Acids Research*, 42(20), pp.12498–12511.

Onikubo, T. et al., 2015. Developmentally Regulated Post-translational Modification of Nucleoplasmin Controls Histone Sequestration and Deposition. *Cell Reports*, 10(10), pp.1735–1748.

Osakabe, A. et al., 2010. Nucleosome formation activity of human somatic Nuclear Autoantigenic Sperm Protein (sNASP). *Journal of Biological Chemistry*, 285(16), pp.11913–11921.

Philpott, A. & Leno, G., 1992. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell*, 69, pp.759–767.

Ramos, I., 2006. *Interacción Nucleoplasmina/ Proteínas Básicas: Función Biológica de la NP*. Tesis doctoral-Universidad del País Vasco.

Ramos, I. et al., 2010. Nucleoplasmin binds histone H2A-H2B dimers through its distal face. *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), pp.33771–33778.

Ramos, I. et al., 2005. Nucleoplasmin-mediated unfolding of chromatin involves the displacement of linker-associated chromatin proteins. *Biochemistry*, 44(23), pp.8274–8281.

Ramos, I. et al., 2014. The intrinsically disordered distal face of nucleoplasmin recognizes distinct oligomerization states of histones. *Nucleic Acids Research*, 42(2), pp.1311–1325.

Selth, L. a, Sigurdsson, S. & Svejstrup, J.Q., 2010. Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annual review of biochemistry*, 79, pp.271–293.

Simpson, R.T., Thoma, F. & Brubaker, J.M., 1985. Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones: a model system for study of higher order structure. *Cell*, 42(3), pp.799–808.

Stein, a, Bina-Stein, M. & Simpson, R.T., 1977. Crosslinked histone octamer as a model of the nucleosome core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(7), pp.2780–2784.

Workman, J.L. & Abmayr, S.M. eds., 2014. *Fundamentals of Chromatin* First Ed., New York: Springer.