



2
2 Ene

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO SOBRE HISTONAS DE
MAIZ

T E S I S

BERTHA AVIÑA LEMUS

Químico Farmacéutico Biólogo

1 9 8 5



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

ABREVIATURAS EMPLEADAS	i
RESUMEN	ii
1.- INTRODUCCION1
2.- ANTECEDENTES4
I. ULTRAESTRUCTURA DE LA CROMATINA5
II. HISTONAS. SU SITUACION EN LA CROMATINA8
III. FUNCION DE LAS HISTONAS10
IV. MODIFICACIONES DE LA CROMATINA14
1.) VARIANTES HISTONICAS14
a. HISTONA H115
b. HISTONAS H2a y H2b19
c. HISTONA H320
d. HISTONA H421
2.) MODIFICACIONES POSTSINTETICAS DE LAS HISTONAS21
a. FOSFORILACION22
b. ACETILACION23
c. UBIQUITINIZACION24
3.- METODOLOGIA26
I. MATERIAL27
II. EXTRACCION DE LAS HISTONAS DEL MAIZ29
III. EXTRACCION DE LAS HISTONAS H132
IV. ELECTROFORESIS EN PLACAS DE GELES DE ACRILAMIDA-SDS33
V. SEPARACION DE LAS HISTONAS POR FAMILIAS, UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR34

VI. PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTIHISTONAS35
VII. PRUEBAS DE INMUNOPRECIPITACION36
VIII. DETERMINACION DE PROTEINAS POR LOWRY37
4.- RESULTADOS38
I. OBTENCION DE LAS HISTONAS39
II. DETERMINACION DE LAS HISTONAS40
III. COMPARACION ENTRE HISTONAS ANIMALES Y VEGETALES40
IV. CROMATOGRAFIA DE HISTONAS ANIMALES Y VEGETALES42
V. PRODUCCION DE ANTICUERPOS44
VI. ANTIGENICIDAD CRUZADA47
VII. PATRONES ELECTROFORETICOS DE LAS HISTONAS DEL MAIZ .	
a. EJE EMBRIONARIO Y ESCUTELO. ESTADO QUIESCENTE Y	
GERMINADO47
b. CALLO52
VIII. FAMILIA H152
IX. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES DE LAS HISTONAS	
DEL MAIZ54
5.- DISCUSION DE RESULTADOS59
6.- CONCLUSIONES67
7.- BIBLIOGRAFIA69

ABREVIATURAS EMPLEADAS

Å	angstroms
d	daltones
D.O.	densidad óptica
EDTA	ácido etilén diamino tetracético, sal sódica
mA	miliamperes
nm	nanómetros
pb	pares de bases
PM	peso molecular
SDS	dodecil sulfato de sodio
SSI	solución salina isotónica
T	tiempo
Tris	tri-(hidroximetil) aminometano
HMG	proteínas no histónicas, del grupo de alta movilidad

RESUMEN

Se extrajeron y purificaron histonas de ejes embrionarios y escutelos de maíz al inicio y al fin de la germinación. Se obtuvieron también histonas de callos de maíz.

Se analizaron los comportamientos cromatográficos y electroforéticos de las histonas del maíz y se compararon con los de histonas provenientes de una fuente animal -timo de ternera-. Se comparó también su similitud por medio de anticuerpos antihistonas producidos contra histonas totales de timo.

Se caracterizaron las histonas de los diferentes tejidos y estados de desarrollo, por medio de electroforesis en geles a diferentes concentraciones de poliacrilamida en presencia de SDS, y se analizaron las diferentes variantes presentes en cada caso, determinando los pesos moleculares correspondientes.

Los resultados mostraron una gran semejanza entre histonas animales y vegetales. Mostraron, también, variaciones características entre los tejidos del maíz durante la germinación, en estados de diferenciación y desarrollo específicos.

Los resultados obtenidos son consistentes con la hipótesis de que las histonas tienen un papel activo en la regulación de la expresión genética. Se demostró, además, la existencia de una variante similar a la H1^o de mamíferos, que podría desempeñar una función específica en la cromatina del escutelo del maíz.

INTRODUCCION

Las histonas son constituyentes básicos de la cromatina, con una función estructural esencial, y probablemente una muy importante función reguladora.

La presencia de variantes histónicas específicas, principalmente de la histona H1, y la ocurrencia de modificaciones postsintéticas, se han asociado con funciones y estados de diferenciación y desarrollo específicos. Esto sugiere que las variantes de las histonas H1 difieren funcionalmente unas de otras, y que pueden estar involucradas en los cambios estructurales de la cromatina que se requieren para la expresión selectiva de los genes.

Una de las variantes que se han encontrado relacionadas de manera más característica con los procesos de diferenciación y de desarrollo de los organismos animales, es la histona H1^o, la cual está presente en tejidos maduros con alto grado de diferenciación y de baja proliferación celular.

La información existente respecto a las histonas vegetales es muy escasa, sin embargo se han reportado algunas semejanzas y diferencias entre las histonas provenientes de animales y plantas. Considerando que los mecanismos que regulan los procesos estructurales y organizativos de la cromatina, son en términos generales, operativos en todos los organismos eucariotes, el presente trabajo plantea la existencia en vegetales de una variante con función análoga a la H1^o.

Investigar la existencia de esta histona H1^o, es tanto más interesante cuanto que una de las características distintivas de los tejidos de mamíferos, es la irreversibilidad del proceso de diferenciación celular, lo cual no parece aplicarse en los tejidos vegetales.

Hipótesis de trabajo :

El patrón de variantes H1 en los tejidos del maíz, debe ser distinto y característico del tipo de tejido. Si esto es así, entonces deberá existir una correlación estrecha entre las variantes H1 presentes en un tejido y su grado de diferenciación y de desarrollo durante la germinación.

Los objetivos que plantea la presente investigación son, analizar los tipos de histonas presentes en diversos tejidos del maíz en diferentes estados de diferenciación y desarrollo, enfatizando la búsqueda de las histonas que posiblemente posean una función en la regulación genética, principalmente la H1^o, así como determinar los pesos moleculares de las histonas del embrión del maíz, de manera que se cuente con una base sólida para su caracterización.

ANTECEDENTES

I. Ultraestructura de la cromatina.

En las células de los eucariotes los cromosomas están constituidos por cromatina, la cual está integrada por ADN - que contiene la información genética -, proteínas - que son el componente más abundante y de entre las cuales las histonas son las que se encuentran en mayor cantidad-, y ARN (16).

En micrografías electrónicas la cromatina aparece a menudo como una "cadena de cuentas", formada por partículas esféricas de 100 \AA unidas por fibras delgadas. Estudios de difracción de rayos X y de digestión enzimática, demostraron que esto se debe a la existencia de una estructura repetitiva en la cromatina, se unidad básica, el nucleosoma (41).

El nucleosoma es un disco aplanado de 110 \AA de diámetro y 57 \AA de espesor, consistente en 146 a 240 pares de bases de ADN dando dos vueltas alrededor de una unidad histónica central o "core" formada por dos moléculas de cada una de las histonas H2a, H2b, H3 y H4 -un octámero-. Una quinta histona, H1, también se encuentra asociada con el nucleosoma, pero en la parte externa sujetando las terminales del ADN (78).

La serie de nucleosomas forma la fibra de 100 \AA que constituye el primer grado de organización de la cromatina.

El siguiente nivel de enrollamiento de la cromatina se puede describir como la formación de una espiral a partir del

filamento de 100 \AA , dando lugar a una estructura superenrollada llamada solenoide, la cual tiene un diámetro de 300 \AA y está constituida de 6 nucleosomas por vuelta de solenoide (53). Este solenoide de 300 \AA , parece ser idéntico a las gruesas fibras de cromatina inactiva que se observan in vivo, en el núcleo de la mayoría de los eucariotes (4).

Para alcanzar el plegamiento de un cromosoma mitótico, a partir de la fibra de 300 \AA se generan dos órdenes de compactación, en los que intervienen además proteínas no histónicas (78).

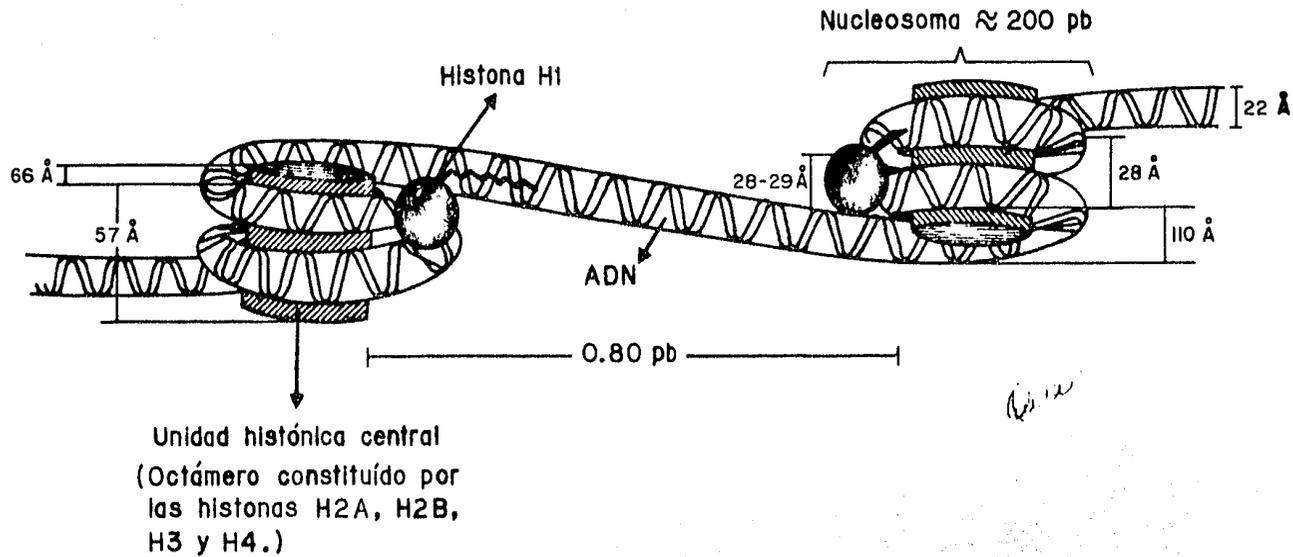


Figura 1. Ultraestructura de la cromatina.

II. Histonas. Su situación en la cromatina.

Existen básicamente cinco tipos de histonas que son denominadas H1, H2a, H2b, H3 y H4.

Las histonas son proteínas muy conservadas a lo largo de la evolución. Hay relativamente poca variación en la secuencia de aminoácidos de las histonas provenientes aún de organismos muy diferentes. De entre ellas las más conservadas son la H3 y la H4 (35); y en la que existe una mayor variación es la H1, la cual presenta diferentes variantes en los tejidos de un mismo organismo (15).

Las histonas son proteínas relativamente pequeñas, de aproximadamente la misma longitud -excepto por la H1 que es - del doble de largo de las demás-, con aproximadamente un 20% de sus aminoácidos cargados positivamente -lisina y arginina- y el resto mayoritariamente aminoácidos neutros (1), lo que las convierte en las proteínas más básicas que hay en la cromatina (16). La carga positiva residual les ayuda a unirse fuertemente al ADN.

A partir de su arreglo espacial se puede deducir el papel estructural de cada una de las histonas en la formación de la cromatina. El tetrámero $(H3)_2(H4)_2$ define la zona central de la vuelta de la superhélice de ADN, mientras que dos dímeros (H2a) (H2b), ubicados uno en cada cara del tetrámero, unen ADN adicional y completan las superhélices (41). En cuanto a la histona H1, también llamada de enlace, se encuen

tra fuera del nucleosoma, uniendo simultáneamente ambos finales del ADN de las dos vueltas que conforman el nucleosoma (2).

Se ha estudiado también la interacción entre la histona H1 y el octámero interno. Su estructura primaria y datos obtenidos de su conformación en solución (5, 25, 39) indican que las moléculas de H1 están compuestas de tres dominios estructurales:

- i) Un extremo que comprende la región amino-terminal, y que abarca los residuos 1 al 39 $[\pm 4]$
- ii) La región globular central, que se extiende del residuo 39 $[\pm 4]$ al 116 $[\pm 4]$, la cual es rica en residuos no polares y contiene la mayoría de los residuos ácidos de la molécula, y
- iii) El extremo que comprende la región carboxilo-terminal compuesta de los restantes 190-225 residuos de aminoácidos.

Solo se conocen estos cinco tipos de histonas, las cuales se encuentran a través de la amplia gama de los organismos eucariotes. Las histonas H5 (75), H1^o (61), H1 (11) -- (2), H1e (9), RTL-3 (37), etc., han sido consideradas como versiones especializadas o variantes de la histona H1.

III. Función de las histonas.

En un principio se creyó que las histonas se encontraban en el surco profundo de la doble hélice formada por el ADN. El hecho de que sólo existan cinco clases de histonas, y de que se encuentren tan conservadas a lo largo de la evolución, hacía pensar a los investigadores que su papel era puramente estructural: "En los cromosomas de los eucariotes, las histonas están implicadas en el superenrollado del ADN, bien sirviendo como elementos estructurales, o bien para cubrir o reprimir a determinados segmentos específicos del ADN..." (45).

Posteriormente se les asignó otra localización, pues la información existente sugería que se encontraban cubriendo al ADN, y que probablemente tenían un papel importante en la formación de partículas nucleosomas (74).

Más adelante, a pesar de tenerse un conocimiento más claro de la localización de las histonas en la cromatina, y de la estructura de la misma, aún se pensaba que desempeñaban una función arquitectónica indispensable para la organización del ADN en la cromatina, lo cual no deja de ser cierto, pero ya se empezaba a sospechar que su función en la cromatina no era solamente estructural.

De esta forma, aún cuando hasta hace pocos años no se les asignaron funciones reguladoras, el estudio de su función en la estructura de la cromatina, fué lo que condujo posteriormen

te a la conclusión de que tenían otras funciones además de las estructurales.

Weintraub y Groudine en 1976 (77) postularon que en las células de los eucariotes, un conocimiento detallado de la estructura de la cromatina podría proveer de conocimientos acerca de cómo se regulan los genes. Para entonces ya había observaciones que demostraban una relación entre la estructura de la cromatina y su actividad biológica. Estos autores realizaron estudios tratando con desoxirribonucleasa I a la cromatina obtenida de los núcleos de varios tejidos, y sus resultados indicaron que la cromatina de los genes activamente transcribibles poseía una estructura diferente a la de las regiones no transcribibles; y que probablemente, los genes activos se encontraran asociados con las histonas, en una conformación en la cual su ADN asociado era particularmente sensible a la digestión por la enzima.

Posteriormente, Kornberg y Klung en 1981 (41) indicaron que las histonas no estaban directamente involucradas en la expresión de la información genética, pero que tal vez faciliten los cambios en la estructura de los cromosomas en la expresión selectiva de los genes, cuando son transformados al estado activo. A pesar de que se conocía poco acerca de esa transformación, desde entonces ya se sabía que la cromatina activa, al igual que la inactiva, se organiza en nucleosomas que mantienen la periodicidad a lo largo de la cadena de ADN.

También se sospechaba, que al ser transformada al estado activo, la estructura de los nucleosomas cambiaba a una forma abierta con propiedades que facilitarían la transcripción, la cual fué posteriormente llamada lexosoma por Prior et al (63), y en la cual interviene de manera importante la histona H3.

En 1982, Weisbrod (78) reporta que la regulación de la expresión genética es un mecanismo fundamental en el desarrollo y supervivencia de los organismos eucariotes, y que la estructura de los cromosomas está directamente relacionada a esta regulación, pues, al menos en la mayor parte de estas estructuras, el ADN en el núcleo se encuentra demasiado compacto como para ser alcanzado por el aparato transcripcional; por lo tanto, la estructura espacial de la cromatina de los genes que se están transcribiendo -aproximadamente 10 a 20% del total-, tiene que ser diferente a la del resto del ADN. Tanto los genes del metabolismo basal - aquellos que se están expresando en todos los tipos celulares de un organismo-, como los genes que distinguen un tipo celular de otro, existen en la conformación activa.

Una forma fundamental en la cual la conformación de la cromatina puede ser modificada, es por medio de cambios en la estructura de las histonas (64), los cuales son básicamente de dos tipos:

-Cambios debidos a variaciones en la secuencia primaria de las histonas. Se han reportado a la fecha variantes de es

te tipo en todas las histonas, excepto en la H4 (47,69), y se han descrito subfracciones específicas de especie, de te jido, y de gen (28). En la mayoría de los casos la partici pación de las variantes en la estructura de la cromatina, y en su función, no está claro, pero la ocurrencia de cambios en los subtipos de histonas durante el desarrollo, en etapas específicas, sugiere que son importantes en el proceso de di ferenciación (33,78).

-Cambios debidos a modificaciones postsintéticas de las histonas.

Como fosforilaciones (39), metilaciones (7), ADP-ribosilacio
nes (32), etc.

IV. Modificaciones de la cromatina.

La estructura de la cromatina y por lo tanto su función, puede ser modulada por modificaciones en selectas regiones del genoma (1), estas sutiles pero biológicamente importantes diferencias en organización de la estructura de la cromatina, pueden ser causadas, tanto por cambios en los aminoácidos que especifican cada variante histónica como por una serie de modificaciones postsintéticas de las mismas (28).

Se ha sugerido que la presencia de las variantes, está intimamente relacionada a la remodelación de la cromatina durante el desarrollo de nuevos tipos celulares, produciendo diferentes configuraciones características del estado en que se encuentra (46). Mientras que las distintas modificaciones postsintéticas que pueden sufrir las diferentes variantes histónicas, contribuyen al establecimiento de estados estructurales transitorios (52).

1.) Variantes histónicas.

Existe una gran cantidad de evidencias que demuestran la existencia de distintas variantes histónicas en los tejidos de algunos organismos, en la mayoría de los casos existen más de dos variantes de cualquier clase de histona -excepto H4-.

Spiker (71) ha propuesto que las variantes histónicas intervienen en el control de la expresión genética, al estar involucradas en la estructuración de la cromatina en sus formas transcribible e inactiva, sus datos sugieren que cambios

en la expresión genética, están correlacionados con cambios en la población de las variantes histónicas presentes en las células. Este autor propuso, también, algunos mecanismos para explicar como estas isohistonas afectan la expresión genética. Una primera posibilidad sugiere que las diferentes variantes puedan interaccionar específicamente con las proteínas no histónicas del grupo de alta movilidad, para dar lugar a estructuras de la cromatina potencialmente transcribibles.

Otra posibilidad es que estas isoformas difieran en la longitud de las interacciones histona-histona en las cuales se encuentran involucradas, lo cual podría afectar la estabilidad del solenoide y su enrollamiento.

Spiker ha sugerido también que la fosforilación puede tener una función importante, lo cual se ve fuertemente apoyado por algunos trabajos (71).

Se ha confirmado la existencia de una síntesis específica de variantes histónicas en los distintos estados del desarrollo temprano del erizo de mar (22). Y en tejidos vegetales, se ha podido ver que la síntesis selectiva y la unión de variantes específicas tienen una función importante en el proceso de diferenciación celular; y que tal vez la proteólisis de algunas histonas específicas muestre también una actividad importante en el sistema (3).

a. Histona H1.

Las histonas H1 son, entre todas las histonas, las de ma-

yor peso molecular, y la distribución de los aminoácidos que la componen es la siguiente: en los extremos se encuentra la mayoría de los aminoácidos básicos, mientras la región central es rica en residuos hidrofóbicos (17).

Al igual que el resto de las histonas, las H1 son proteínas nucleares que no se extraen de la cromatina con NaCl 0.35 M y tienen una movilidad electroforética característica; pero a diferencia de las histonas del centro del nucleosoma, las H1 son solubles en ácido perclórico 0.5 - 0.83 M (46), y se tiñen de manera característica y distinta a las histonas del "core" al ser tratadas con algunos colorantes para electroforesis -- (83, 84).

El grupo de proteínas que integran la clase H1 muestra una gran variación filogenética, son, en cuanto a su estructura, la familia más diversa (50).

Basándose en su estructura primaria se considera que conforman la familia de histonas ricas en lisina.

La primera función de la histona H1 es mantener el superenrollamiento del ADN, uniendo sus puntos de entrada y salida del nucleosoma para formar los solenoides, y por ende la ultraestructura de la cromatina (5).

Esta familia contiene varias especies moleculares o variantes aún dentro del mismo organismo, y cuya combinación varía de acuerdo al estado final de diferenciación, desarrollo e inducción hormonal (60).

Dado que las variantes H1 tienen diferentes estructuras, las

uniones entre nucleosoma y nucleosoma seguramente están constituidas en diferentes formas; se ha propuesto que las histonas H1 tienen la capacidad para adaptar la estructura de la cromatina a diferentes arreglos dependiendo de el estado de desarrollo y de diferenciación por los que va pasando el tejido. Las diferencias en los subtipos H1, así como las modificaciones -fosforilaciones principalmente- que sufren, pueden contribuir a los cambios en la estructura de la cromatina. La proporción de los subtipos H1 presentes en una célula particular, puede por tanto estar relacionada al grado de empacamiento del genoma (31). Actualmente está bien establecido que diferentes células y tejidos animales tienen proporciones diferentes de las variantes H1, las cuales cambian durante el desarrollo (62,76), y que cada variante puede llegar a contener hasta tres fosfatos (18,34,46).

Histona H5.

Una de las variantes H1 más conocida es la histona H5, que se encuentra en eritrocitos nucleados de anfibios, reptiles, peces, y aves -en donde ha sido extensamente estudiada- (19,66).

Durante la eritropoyesis en las aves, la H5 se sintetiza aún en ausencia de síntesis de ADN, y va aumentando gradualmente su concentración hasta llegar a una proporción de 3/1 en los eritrocitos maduros respecto a H1 (54).

Dado que la histona H5 es una variante de la H1, existe

una gran homología en la secuencia de aminoácidos (2). Las mayores diferencias entre ellas son, una delección de 12 aminoácidos en la región amino-terminal de la H5, y una diferencia en composición de aminoácidos en su región carboxilo-terminal (56).

La histona H5 tiene una función muy importante en mantener a la cromatina en un estado altamente reprimido (8), pues parece estar involucrada en la inactivación trascricional. La aparición de la H5 en los núcleos de ave no correlaciona bien con la represión de la síntesis de ARN. Sin embargo, la fracción no fosforilada de esta variante -que se encuentra fosforilada al acabar de sintetizarse-, si presenta una buena correlación con el decremento en la síntesis de ARN, de los eritrocitos en proceso de maduración (19).

Histona H1°.

Esta histona ha sido asociada con la regulación de la proliferación celular en tejidos funcionalmente maduros (12,70).

H1° tiende a aparecer y acumularse en relación directa con la terminación de la maduración celular, en tejidos de mamíferos en los cuales la proliferación ha cesado o es muy lenta, así como durante la regeneración de los tejidos. Se ha demostrado que los niveles celulares de H1° son inversamente proporcionales a la velocidad de síntesis del ADN y de la división celular (60, 61).

La histona H1° muestra una gran importancia en la diferenciación, y en el mantenimiento del estado maduro diferenciado de algunas células, suprimiendo la actividad metabólica y funcional de la cromatina (12,23,60). Los niveles de la H1° están asociados con un cambio funcional en células individuales, por ello se ha considerado que la síntesis de la H1° es un mecanismo que altera la estructura y función de la cromatina (14,23,44).

La presencia de la H1° parece estar además relacionada con la expresión de las funciones diferenciadas de las células. Esta sugerencia se basa en la respuesta de ciertos órganos blanco, cuya función y mantenimiento dependen de los niveles hormonales. En estos tejidos se ha observado que la histona H1° se pierde cuando la hormona disminuye su concentración y aparece nuevamente cuando aumenta (12).

Los órganos en que se ha detectado esta variante son el hígado, el páncreas, el riñón, el cerebro, la retina, los músculos estriados y esqueléticos, el cristalino, el bazo y los eritrocitos nucleados (12,14,23,44,60,70). No hay estudios suficientes que permitan saber si en vegetales existe esta variante.

b. Histonas H2a y H2b.

Las histonas del centro del nucleosoma proporcionan la base sobre la cual se enrolla el ADN, por lo que es muy probable que con el reemplazo de unas variantes por otras, la cromatina pueda adquirir también, configuraciones activas e

inactivas dependiendo del estado fisiológico de la célula (38).

De esas histonas, las H2a y H2b son las menos conservadas y de las que han sido encontradas más variantes y en muy diversos organismos. Sus secuencias primarias contienen muchas lisinas, aunque en menor cantidad que en H1 (35).

La familia H2a consiste de diversas variantes a las que se les ha denominado 1, 2, 3, x, z, t, w, etc. (79,81). De la familia H2b también se han encontrado variantes, 1, 2, 3, específicas de esperma, etc. (21,79). Se ha observado - en levaduras- que los subtipos de H2b varían a lo largo del ciclo celular (71).

c. Histona H3.

La histona H3 es rica en arginina (38). Es, en realidad, una mezcla de 3 componentes o subtipos denominados 1, 2 y 3 (26), cuyas secuencias primarias están tan bien conservadas que solo hay diferencias en 5 aminoácidos entre las H3 del chícharo y las del humano (82). También se ha encontrado un gen que probablemente codifique para una variante H3 que no es ninguna de las anteriores, aunque se asemeje a H3.3 (69).

En el hígado, el cerebro y el riñón del ratón, y los linfocitos T, la histona H3.3 es la variante que domina; mientras que en las células en proliferación, la H3.3 es generalmente el menor componente (82).

La histona H3 posee además un importante papel en la formación de lexosomas. Estos son un tipo especial de subunidades nucleoproteicas, que se localizan en las regiones activas del ADN, y cuyas propiedades facilitan su transcripción. La transición del nucleosoma al lexosoma involucra un rearrreglo espacial de las histonas del "core". Esta estructura extendida mantiene unidos sus extremos por medio de las histonas H3 (63,64).

d) Histona H4.

Respecto a H4 no se han encontrado por electroforesis, variantes que puedan distinguirse (47), sin embargo, se han encontrado diferentes ARN mensajeros que codifican para ella por lo que no se descarta la posibilidad de que también existan variantes de esta proteína (48,69).

2.) Modificaciones Postsintéticas de las histonas.

Algunos cambios importantes en la organización estructural de la cromatina, parecen estar regulados por modificaciones reversibles y temporales de las histonas, tales como fosforilaciones, acetilaciones y "ubiquitinizaciones" (30,52).

Por ejemplo, algunos residuos de lisina en posiciones específicas de la cadena pueden ser acetilados, mientras que otros residuos de serina y treonina son fosforilados. Solo una fracción de cada tipo de histona es covalentemente modificada, de modo que algunos nucleosomas contendrían histonas modificadas mientras otros no (1). Puesto que estas modifica-

ciones suceden en aminoácidos que ha sido especialmente conservados durante la evolución, es muy probable que tengan una función importante en la célula.

Las histonas se encuentran entre las proteínas que más pueden ser modificadas, estos cambios proporcionan un gran potencial de heterogenicidad estructural y funcional entre las diferentes regiones cromosomales (47).

a) Fosforilación.

De entre las modificaciones antes mencionadas, la fosforilación de las histonas, principalmente de las H1, es cuantitativamente la más significativa, y es, a decir de algunos autores, el mejor candidato para ser el factor regulador de la condensación cromosómica (52). Diferentes fosforilaciones de H1 pueden tener diferentes efectos en la estructura de la cromatina a través de los cambios conformacionales que sufre la histona con dichas fosforilaciones (31,50).

Esos efectos se pueden agrupar básicamente en dos tipos:

- Efectos en la actividad genética diferencial :

La fosforilación de las variantes H1 en sitios específicos de sus moléculas produce descondensaciones temporales en ciertos lugares de la cromatina, lo que permite la expresión selectiva de los genes que se localizan en esas regiones. Y puesto que las histonas H1 se fosforilan en sitios distintos, en respuesta a situaciones fisiológicamente distintas -dadas por los estados de diferenciación y de desarrollo por los que atravieza la célula-, se considera que la fosforila-

ción es un factor importante en la regulación de la expresión genética (22,71).

- Efectos en las alteraciones conformacionales de la cromatina durante el ciclo celular :

La cromatina debe sufrir múltiples alteraciones transitorias en su estructura a lo largo del ciclo celular; durante la fase S el ADN debe hacerse accesible a la ADN polimerasa, y más tarde, durante la mitosis, se debe doblar y compactar para formar cromosomas mitóticos. La histona sufre fosforilaciones en varios sitios, relacionadas al ciclo celular, principalmente durante la fase S y la mitosis, de esta manera, la fosforilación de las H1 permite a la célula relajar su cromatina para replicar su material genético, sin necesidad de reemplazar durante cada ciclo celular, histonas que condensan y descondensan alternativamente su ADN (31,46).

Se han detectado también fosforilaciones importantes en histonas H3 y H2a (51,71).

b. Acetilación.

Varias de las modificaciones de las histonas son rápidamente revertidas después de que ocurren, y de entre ellas destaca la acetilación. Constantemente grupos acetilo están siendo unidos a lisinas por la histona acetilasa, y eliminados por la histona desacetilasa; en total, un grupo acetilo permanece en una histona, en promedio, tan solo diez minutos (1). Esto significa que una célula es capaz de cambiar rápidamente el pa

trón de acetilación de sus nucleosomas, en respuesta a señales apropiadas.

Se piensa que esta acetilación de las histonas se encuentra relacionada con la activación transcripcional, viéndose incrementada en los genes activos, pues aparentemente produce un incremento en la síntesis del ARN al proporcionar el acceso de la ARN polimerasa a un gen activo (78).

La acetilación ha sido observada principalmente en las histonas H3 y H4 (80).

c. "Ubiquitinización".

Otra modificación reversible de las histonas, es la que se da por la unión covalente de la proteína de 76 aminoácidos llamada ubiquitina, a 10% a 20% de las moléculas de la histona H2a en una célula. Este complejo ubiquitina-H2a fué llamado A24, aunque actualmente se usa el prefijo U para denotar la ubiquitina unida a la histona: existen por tanto UH2a.1, UH2a.2, UH2a.X, UH2a.Z, etc. (79). La conjugación de estos polipéptidos, se lleva a cabo a través del grupo amino de la lisina 119 de la H2a y del carboxilo de la arginina terminal de la ubiquitina (51).

La ubiquitina es una proteína abundante en, aparentemente, todas las células eucarióticas; su secuencia de aminoácidos es una de las más conservadas, al grado de ser igual en humanos e insectos (20). Se le encuentra en las células tanto en forma libre, como unida a una gran variedad de especies proteicas, principalmente a la histona H2a (1,36,51).

Otro importante papel ha sido propuesto para la ubiquitina, es el de servir como señal para que las proteasas específicas hidrolizen a los conjugados ubiquitina-proteína, pues se ha demostrado que para la degradación de algunas proteínas, su conjugación previa con ubiquitina es un proceso necesario, muy útil durante el recambio de proteínas, tales como las histonas (10,13,30).

METODOLOGIA

I. Material.

Material biológico.

Semillas de maíz (Zea mays L.) variedad H-30, adquiridas en Productora Nacional de Semillas.

Tejidos embrionarios -eje y escutelo- de 24 horas de germinación, obtenidos de embiones de maíz sembrados en medio basal de Murashige y Skoog (55) e incubados a 25°C durante 24 horas, al término de las cuales los tejidos fueron disectados manualmente, e inmediatamente congelados a -50°C.

Callos de maíz de la misma variedad, obtenidos de ejes embrionarios de semillas maduras en medio de Murashige y Skoog, en presencia de MCPP (ácido 2-metil-4-clorofenoxipiónico), y subcultivado en el mismo medio con 2 mg/l de MCPP, 0.01 mg/l de cinetina, 1 mg/l de ácido indolacético, y 200 mg/l de caseína, según método descrito por Sánchez de Jiménez y Albores (67).

Conejos hembras raza Nueva Zelanda, variedad blancos.

Reactivos especiales.

Histonas de timo de ternera, de Sigma Chemical Company.

Estándares de calibración de electroferesis para proteínas de bajo PM, de Pharmacia Fine Chemicals.

Resina Bio-Gel P-60 (100-200 de tamiz), de Bio Rad Laboratories.

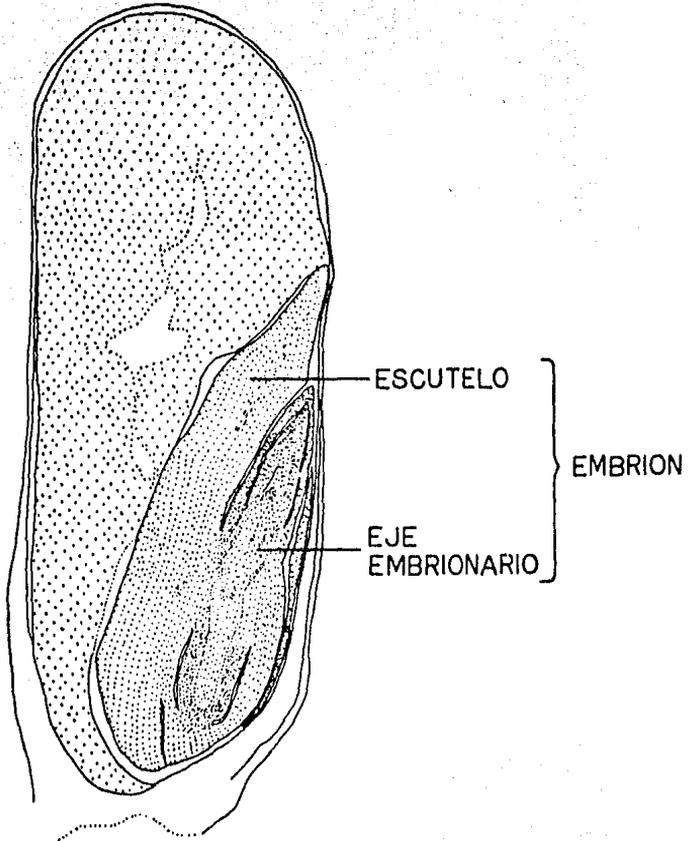


Figura 2. Corte transversal de una semilla de maíz (6).

Adyuvante completo de Freund, de DIFCO laboratories.
Acrilamida para electroforesis discontinua, de Merck.
Azúl de Coomassie R, de Sigma Chemical Company.
Los demás reactivos se usaron grado analítico.

Equipo.

Centrífuga Beckman modelo J2-21. Rotor JA-20.

Ultracentrífuga Beckman modelo L-50. Rotor tipo 40.

Espectrofotómetro UV/Vis Pye Unicam modelo SP6-550.

Homogenizador Politron Kinematica GMBH.

Equipo de electroforesis Bio-Rad modelo 220. Fuente de poder para electroforesis ISCO modelo 490.

Columna cromatográfica Pharmacia Fine Chemicals modelo K9/30. Colector de fracciones LKB modelo 2112 Redirac.

II. Extracción de las histonas del maíz.

Todos los pasos se realizaron a 0-4° C, a menos que se indique otra condición (68).

Los tejidos quiescentes como el eje embrionario - 600 ejes, equivalentes a 2.5 g -, y el escutelo - 2.5 g -, se trituraron en mortero con hielo seco hasta ser transformados en partículas finas. Al finalizar se dejó subir la temperatura hasta 0-4°C para eliminar el exceso de CO₂.

Los tejidos con alto contenido de agua como el callo - 22 callos, equivalentes aproximadamente a 2.5 g en peso seco -, los ejes embrionarios y los escutelos de embriones germinados 24 hr - 600 embriones- ;fueron previamente congelados durante una noche a -70°C , y se pulverizaron en mortero manteniendo el tejido congelado, hasta producir un polvo de partículas finas.

El tejido pulverizado se homogenizó con amortiguador TBT (Tritón X-100 0.5% p/v, Tris-HCl 0.05M, pH 8.1, B-mercaptoetanol 15 mM), en presencia de fluoruro fenil metil sulfónico (PMSF) 0.01 mM, durante 2 min - 8 veces por 15 seg -, en un homogenizador Politrón a máxima velocidad. Se agitó durante 10 min en un agitador Vortex a velocidad intermedia, y se centrifugó a 500 xg durante 5 min.

El sobrenadante se filtró a través de "miracloth", y el residuo o bagazo se presionó dentro de él, a manera de obtener la mayor cantidad de extracto soluble posible. Al filtrado se le agregó gota a gota y con agitación ligera, una solución de sulfato de amonio 3M hasta alcanzar una concentración 0.15M, dejándose posteriormente reposar toda la noche.

La mezcla se centrifugó a 10,000 xg por 10 min y se eliminó el sobrenadante.

La pastilla obtenida se resuspendió en amortiguador TBT, el cual contenía además sulfato de amonio 0.15 M y PMSF 0.01 mM.

Se homogenizó en un homogenizador Potter durante 1 min - 4 veces por 15 seg- a máxima velocidad.

El homogeneizado se centrifugó a 10,000 xg durante 10 min, y se eliminó el sobrenadante. La pastilla así obtenida se lavó 4 veces con amortiguador TBM (Tris-HCl 0.01 M, pH 8.1, B-mercaptoetanol 15 mM, MgCl₂ 2 mM), agitando a velocidad intermedia en un agitador Vortex durante 3 min - 6 veces por 30 seg -, y centrifugando a 10,000 xg durante 10 min por cada lavado. La pastilla final se resuspendió en la menor cantidad posible de amortiguador TBM.

La cromatina resuspendida se agregó gota a gota por las paredes de recipientes que ya contenían un colchón de sacarosa (sacarosa 1.7 M, B-mercaptoetanol 15 mM, Tris-HCl 0.01 M, pH 8.1), en una proporción de 0.25 ml del colchón por cada ml de cromatina que se requiere agregar. Se centrifugó a 60,000 xg durante 2 hr. Una vez terminada la corrida de centrifugación se eliminó por succión el colchón de sacarosa y se obtuvo una pastilla gelatinosa, la cual se lavó dos veces con amortiguador TBM, centrifugando a 15,000 xg durante 10 min por cada lavado; obteniendo la cromatina purificada en la pastilla final.

La cromatina se lavó 3 veces con solución A (NaCl 0.35 M, NaOH 0.1 M, pH 7.0, B-mercaptoetanol 15 mM), mezclando 30 seg a velocidad intermedia en un agitador Vortex, y centrifugando a 2,000 xg durante 15 min por cada lavado. De esta forma se

obtuvo la cromatina libre de algunas proteínas no histónicas.

Esta cromatina se resuspendió en solución B (citrato de sodio 1.5 mM, pH 7.0, NaCl 15 mM, B-mercaptoetanol 15 mM), y se le agregó gota a gota con agitación ligera una solución de ácido sulfúrico 0.5 M hasta alcanzar una concentración final de 0.1 M. Se mantuvo en agitación durante 4 hr, después de las cuales se centrifugó a 10,000 xg durante 10 min y se obtuvo el extracto ácido. Con la pastilla se realizó la extracción de nuevo.

Al extracto ácido se le agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto enfriado a -20°C , y se conservó en reposo a esta temperatura durante 48 hr, precipitando así las histonas presentes en el extracto. La suspensión fue centrifugada a 10,000 xg durante 5 min, eliminándose el sobrenadante. La pastilla formada se lavó 2 veces con etanol 95% frío, el cual se elimina centrifugando y decantando el sobrenadante, para obtener así una pastilla de histonas que se almacena a $0-4^{\circ}\text{C}$.

III. Extracción de las histonas H1.

La obtención selectiva de las H1 se realizó por medio de extracciones con ácido perclórico 0.74 M a partir de las histonas totales, durante una noche a $0-4^{\circ}\text{C}$. Al cabo de este tiempo se centrifugó la muestra a 10,000 xg durante 20 min. El sobrenadante contiene las histonas H1. El ácido perclórico se eliminó neutralizando la solución con Tris-base y se -

dializó contra amortiguador Tris-HCl 0.01 M. El dializado se almacenó a -20°C .

IV. Electroforesis en placas de geles de acrilamida-SDS.

Para la preparación de los geles se utilizaron versiones modificadas de la técnica de Laemmli (42) adaptadas a nuestros sistemas. Se emplearon tanto placas de acrilamida de concentración continua, como en gradientes. Los geles, tanto separadores como concentradores, se prepararon a partir de una solución basal de acrilamida 30% p/v y N, N'-bis-metilenacrilamida 0.8% p/v. Los geles separadores contenían los siguientes reactivos: Tris-HCl 0.75 M, pH 8.8, SDS 0.2%, y se polimerizaron por la adición de N,N,N',N' - tetrametil etilendiamina (TEMED) 0.1% y persulfato de amonio 0.1%.

Antes de añadir el persulfato de amonio, se eliminó el aire de las soluciones, y para evitar que el borde del gel quedara rugoso, se colocó sobre él una capa de agua mientras polimerizaba, misma que fué retirada para agregar el gel concentrador. Dependiendo del tipo de gel que se tratará, se recurrió al uso de un formador de gradientes para lograr la concentración de acrilamida requerida. El gel concentrador de 5% de acrilamida -en todos los casos- contenía: Tris-HCl 0.25 M, pH 6.8, SDS 0.2%, y se polimerizó de la misma manera que los geles separadores.

Las muestras se disolvieron en el amortiguador de muestra

diluido 1:5, constituido por Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8, SDS 1%, B-mercaptoetanol 1%, EDTA 0.02 M y glicerol 10%. Para asegurar una completa disociación de las histonas se agregó B-mercaptoetanol 5% a las muestras y se sumergieron en agua hirviendo durante 1 min. El amortiguador que se utilizó durante las corridas estaba constituido por Tris-HCl 0.025 M, pH 8.3, glicina 0.192 M y SDS 0.1%. La electroforesis se efectuó aplicando una corriente constante de 2 mA por carril, enfriando con un baño de agua corriente, hasta que el indicador del frente de corrida (azúl de bromofenol 0.002% en agua) alcanzó el extremo inferior del gel.

Una vez terminada la corrida, los geles se tiñieron durante 1 hr con azul de Coomassie 0.2% en metanol 50% y ácido acético 7%. El desteñido se realizó con ácido acético al 7% en agua.

V. Separación de las histonas por familias, utilizando cromatografía de exclusión molecular.

Para separar cada una de las familias de histonas a partir de una muestra de histonas totales, se utilizó la cromatografía de exclusión molecular, empleando como matriz inerte el BioGel P-60, 100-200 "mesh" (71). El eluyente utilizado fué HCl 0.01 N saturado con cloroformo. Para el montaje del sistema se recurrió al uso de columnas de vidrio, accesorios, mangueras y recipientes resistentes a la acción de disolventes orgánicos, pues el empleo de un eluyente de este tipo no permitió el uso de otra clase de material.

Preparación de la columna :

El gel se hidrató durante 18 hr a temperatura ambiente; se empacó en una columna de 30 cm de largo y 1.5 cm de diámetro, y se equilibró con el eluyente. La presión soportada por la columna fué 40 cm Hg. El volumen vacío, determinado con azul de dextrán en HCl 0.1 N -disolvente de la muestra- fué de 16 ml.

Para el análisis se aplicaron 4.75 mg de histonas en 0.7 ml del disolvente de la muestra, y se recogieron 120 muestras de 1 ml -22 gotas- mediante un colector de fracciones con flujo de 9 gotas/min. Se determinó la absorbancia a 230 nm de cada una de las fracciones colectadas.

VI. Producción de anticuerpos antihistonas.

Para la producción de suero antihistonas, se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos; y como antígeno, histonas totales de timo de ternera. Se probó el siguiente esquema de inmunización con el objetivo de producir una buena respuesta inmune por parte de los animales.

Inóculo:

Histonas de timo de ternera 2 mg/ml de SSI.....	0.5 ml
Adyuvante completo de Freund.....	0.5 ml

Se mezclan ambas soluciones hasta formar una emulsión homogénea.

Se aplicaron cinco inoculaciones de 1 ml cada una, con una semana de intervalo entre ellas. La primera dosis se administró repartiendo el inóculo en los dos cojinetes plantares posteriores, y las siguientes cuatro en el músculo que recubre el fémur. Se esperó cuatro días después de la última, para hacer una sangría de prueba. Para ella, se extrajeron 5 ml de sangre de la vena de la oreja. Se comprobó la presencia de anticuerpos antihistonas por medio de pruebas inmunológicas (ver Pruebas de Inmunoprecipitación).

Comprobada su presencia se cosechó la máxima cantidad de sangre por medio de punciones cardíacas a los animales. La sangre se dejó coagular y más tarde se centrifugó a 3,000 xg por 10 min, a temperatura ambiente. El suero se decantó y se almacenó a -20°C.

VII. Pruebas de inmunoprecipitación.

El suero obtenido de los conejos inoculados se tituló por medio de pruebas de inmunoprecipitación en tubos capilares, contra las mismas proteínas con que fueron inmunizados - histonas de timo de ternera -. Se usaron diluciones del suero de 1:1 a 1:500, y una solución de histonas de timo de ternera de 1 mg/ml, formando dos capas estratificadas en el tubo capilar. Se incubaron a 37°C durante 2 hr y posteriormente otras 22 hr a temperatura ambiente. Cuando ocurrió reacción, se observó el precipitado en la zona de interfase.

Se utilizó albúmina sérica bovina como control negativo.

VIII. Determinación de proteínas por Lowry.

La determinación colorimétrica se llevó a cabo siguiendo el método reportado por Lowry (49).

RESULTADOS

I. Obtención de las histonas.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha se encuentran, en su mayoría, enfocadas hacia sistemas de origen animal. Por esto, de las metodologías existentes se seleccionó la más conveniente para adaptarla a los tejidos del maíz, con modificaciones a lo largo del método.

Se consideró a las técnicas que involucran la extracción ácida de las histonas, como las más adecuadas, pues no precisan de reactivos, resinas o aparatos inaccesibles; no obstante, requieren de una gran cantidad de pasos de purificación y lavado. De acuerdo a la literatura consultada, se logran con estas técnicas productos con una pureza considerablemente alta, comparable y aún superior a la de los productos obtenidos por otros métodos (68).

Una estructura que no afecta las extracciones a partir de tejidos animales y que si se presenta en los vegetales, es la pared celular, que le proporciona rigidez al tejido lo que dificulta su homogenización, y produce una especie de bagazo que interfiere la manipulación.

El rendimiento logrado por el método empleado en este trabajo fué de 0.82 mg histonas/g tejido seco, el cual puede todavía ser susceptible de aumentar y probablemente de mejorar aún más la calidad y pureza de sus productos.

Para cuantificar las histonas obtenidas se probaron diferentes métodos.

II. Determinación de las histonas.

La determinación de las histonas se efectuó midiendo la absorbancia del enlace peptídico a 230 nm. Las histonas, a diferencia de la mayoría de las proteínas, prácticamente no presentan aminoácidos aromáticos en su secuencia primaria (64). Por ello, la respuesta al método de Lowry fue bastante baja, lo que significa que este método no es adecuado para este tipo de proteínas.

Se obtuvo una curva patrón utilizando las histonas de timo de ternera como estándar. La absorbancia de las soluciones de concentración conocida -en un margen entre 10 y 200 mg de histonas/ml- se determinó a 230 y 280 nm (fig.3). La relación en ambos casos fué lineal. Sin embargo, mientras que a concentraciones de 30 mg/ml la absorbancia a 230 nm superaba 0.1 de D.O.; utilizando 280 nm no fué posible alcanzar este valor, aún a concentraciones de 200 mg por ml.

III. Comparación entre histonas animales y vegetales.

Se comparó el patrón electroforético de las proteínas obtenidas del maíz, y las proteínas homólogas provenientes de una fuente animal, representadas por las histonas del timo de la ternera.

La caracterización de los patrones de las histonas se realizó en geles de acrilamida en presencia de SDS.

Se decidió arbitrariamente usar las histonas del timo de

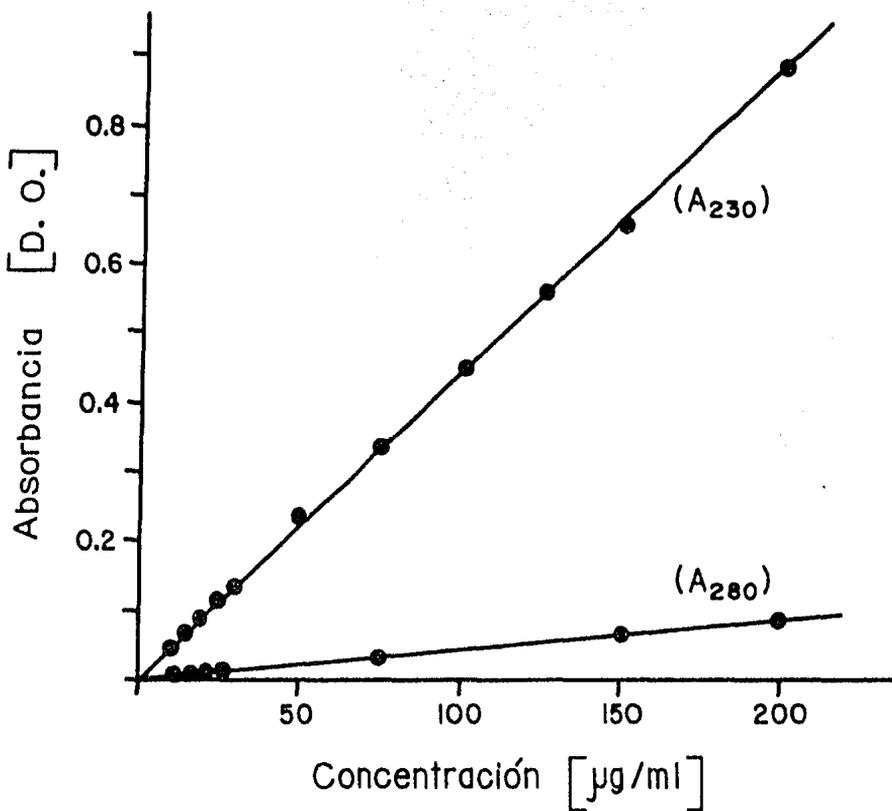


Figura 3. Relación de la absorbancia con diferentes concentraciones de las histonas del timo de ternera, empleando luz de 230 y 280 nm.

la ternera como patrón de referencia, por la gran cantidad de información que existe de ellas.

La figura 4 muestra los patrones electroforéticos de las histonas del timo de la ternera y las del escutelo del maíz obtenidos en un gel de 10 a 18% de acrilamida. Las bandas inferiores del patrón, correspondiente al escutelo, se observa que migran en la zona de las histonas del "core" del timo, y la banda de migración superior en la zona propia de las H1. Puesto que la distancia filogenética que separa a los organismos de los cuales provienen estos tejidos es muy grande, los patrones son distintos, sin embargo el corrimiento electroforético de las proteínas obtenidas del maíz es el correspondiente al comportamiento de proteínas histónicas.

IV. Cromatografía de histonas animales y vegetales.

Otra faceta analizada fué el patrón cromatográfico de las histonas al eluir a través de una columna de exclusión molecular, comparando el comportamiento de las histonas de la ternera y las del maíz.

En la fig. 5 se puede observar que los patrones de ambos tejidos muestran un pico pequeño, seguido de otro de tamaño intermedio al inicio de cada eluato; posteriormente un pico de gran magnitud; y para finalizar, en el caso del timo seguido por otro pico pequeño, y en el del maíz por dos picos.

El pico mayor (fracción III) que presentan las histonas del maíz, parece corresponder de acuerdo a lo observado en la



a b

Figura 4. Patrón electroforético de las histonas del escutelo del maíz (carril a), y de las histonas del timo de la ternera (carril b). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida a una concentración de 10-18% en presencia de SDS.

literatura respecto a otras especies, a las histonas H2a y H2b, muy difíciles de separar y que coemigran en este sistema (71). Los dos picos menores al final de patrón obtenido (fracciones IV y V) corresponderían a las histonas H3 y H4, respectivamente. En el caso de las histonas de ternera, el pico mayor (fracción III), parece incluir además la histona H3; y al final del patrón aparece solamente un pico, que muy probablemente corresponde a la histona H4 (fracción V). En ambos tejidos los primeros picos (fracción I) son los producidos por histonas H1.

El cálculo de la distribución de las proteínas en el patrón eluido, obtenido por medio del área bajo la curva, da los resultados mostrados en la tabla I. Se supuso, para este cálculo que el 100% del área es la suma de toda el área de absorción a 230 nm, y se obtuvieron los valores relativos de cada uno de los picos.

V. Producción de anticuerpos.

Se produjo un suero antihistonas, inmunizando durante cinco semanas por vía intramuscular, conejos con cantidades constantes de las histonas del timo de la ternera.

Las histonas son proteínas pequeñas, de las cuales las mayores poseen un peso molecular de aproximadamente 20,000 d, por lo que son muy poco antigénicas. Por lo anterior, para despertar una respuesta inmune humoral en los animales, se utilizaron los cojinetes plantares como vía de inoculación en la primera

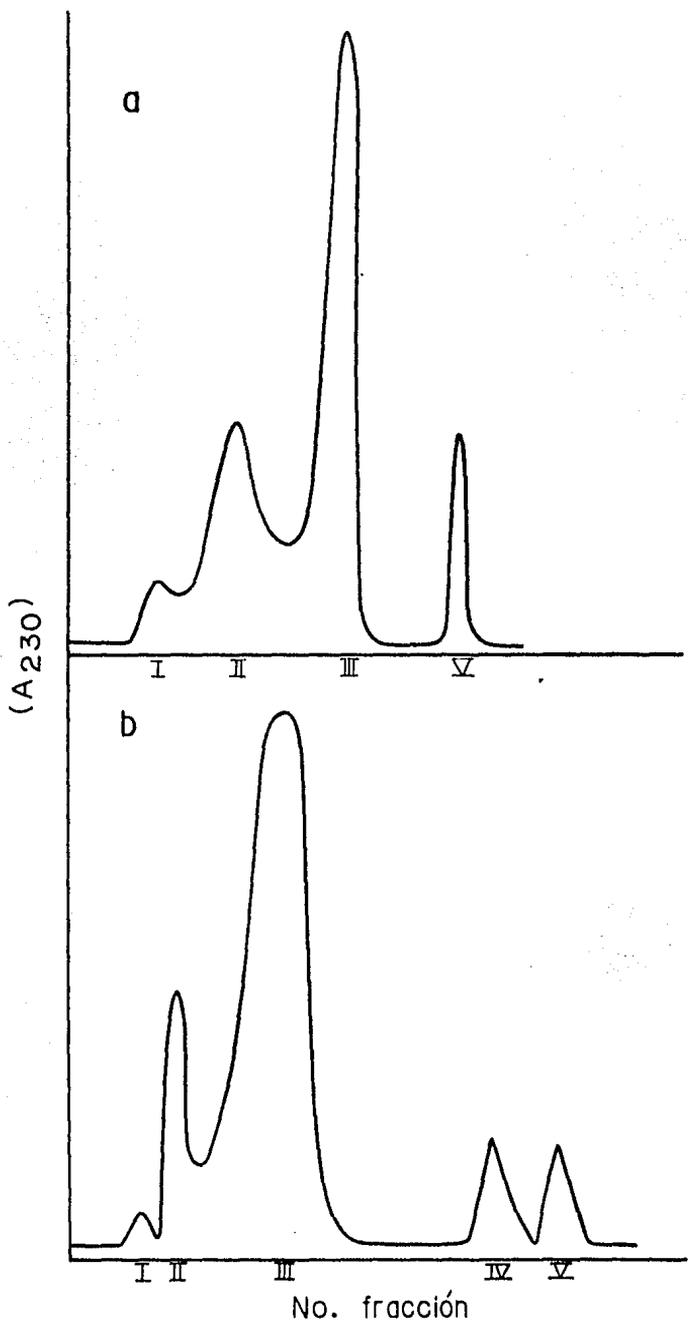


Figura 5. Patrón cromatográfico de las histonas del timo de la ternera (a) y del escutelo del maíz (b), en una columna del BioGel P-60, determinado por absorción a 230 nm.

Tabla I. Distribución relativa de proteínas en el patrón cromatográfico (fig.5) de histonas del timo de la ternera (a) y del escutelo del maíz (b).

	<u>Timo (a)</u>	<u>Escutelo (b)</u>
Total	100.00 %	100.00 %
Fracción I	5.17 %	1.43 %
Fracción II	33.07 %	10.77 %
Fracción III	55.78 %	75.91 %
Fracción IV	—	6.55 %
Fracción V	6.36 %	5.31 %

administración; mientras que en las sucesivas se empleó la vía intramuscular normal.

La determinación de la presencia de los anticuerpos anti-histonas en el suero, así como su cuantificación, se efectuó por medio de pruebas de inmunoprecipitación, registrándose un título de 1:25 para una concentración de 1mg de histonas/ml (tablaII).

La especificidad de los anticuerpos se demostró usando una solución de albúmina como control negativo.

VI. Antigenicidad cruzada.

Se comprobó que las histonas de tejidos embrionarios del maíz comparten determinantes antigénicos con las histonas del timo de la ternera. Se realizaron pruebas de inmunoprecipitación entre el suero que contiene los anticuerpos antihistonas del timo de ternera, y la fracción extraída con ácido sulfúrico de la cromatina purificada del eje embrionario y del escutelo de maíz. La reacción antígeno-anticuerpo tuvo lugar, y con ella la formación de precipitado abundante en ambos casos (tabla III).

VII. Patrones electroforéticos de las histonas del maíz.

a. Eje embrionario y escutelo. Estado quiescente y germinado.

Las partes que constituyen el embrión del maíz son el eje embrionario y el escutelo, son por tanto los tejidos de mayor importancia en la germinación de la semilla. El eje embriona-

Tabla II. Titulación de un suero antihistonas por pruebas de inmunoprecipitación. Las histonas del timo de la ternera contra diluciones de suero.

Dilución del suero	Precipitado formado
1	+++++
1:10	++++
1:25	+++
1:50	+
1: 100	-
1:250	-
1:500	-

Tabla III. Pruebas de inmunidad cruzada entre anticuerpos antihistonas del timo de la ternera e histonas de los tejidos embrionarios del maíz.

Suero antihistonas del timo de la ternera	Fracción ácida de cromatina (Histonas)	Precipitado formado
	Eje embrionario	+++
	Escutelo	+++
(Control)		

rio está formado por los tejidos que van a dar lugar a la planta, el escutelo por tejidos que funcionan como transportadores de nutrientes del endospermo hacia el eje (29). Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo, es discernir si existe alguna relación entre la germinación y el proceso de diferenciación, y el comportamiento de las histonas; fué por lo tanto a estos tejidos a donde se enfocó en primera instancia, el presente trabajo. El eje embrionario y el escutelo son dos tejidos completamente disímboles respecto a su grado de desarrollo y diferenciación. El primero parcialmente diferenciado, que durante la germinación va a sufrir una gran cantidad de divisiones celulares; el segundo, completamente diferenciado, cuyas células ya no entrarán en el proceso de mitosis.

Para este análisis se compararon los patrones del eje y del escutelo a dos estadios importantes y muy distintos del proceso de germinación: obtenidos de semillas secas, totalmente maduras y en estado quiescente ($T=0$); y de semillas después de 24 horas de imbibición ($T=24$), cuando prácticamente la mayoría de las semillas han germinado y las células meristemáticas ya están en división celular (comunicación personal, Baiza, A.M. y Sánchez de Jiménez, E.).

Los patrones observados muestran entre sí diferencias muy importantes (fig. 6). La zona de las histonas que corresponde a las H1, muestra varias bandas -variantes de H1- bien definidas en el eje y muy poco marcadas en el escutelo, y solo una más marcada en el escutelo que en el eje. Se observan además

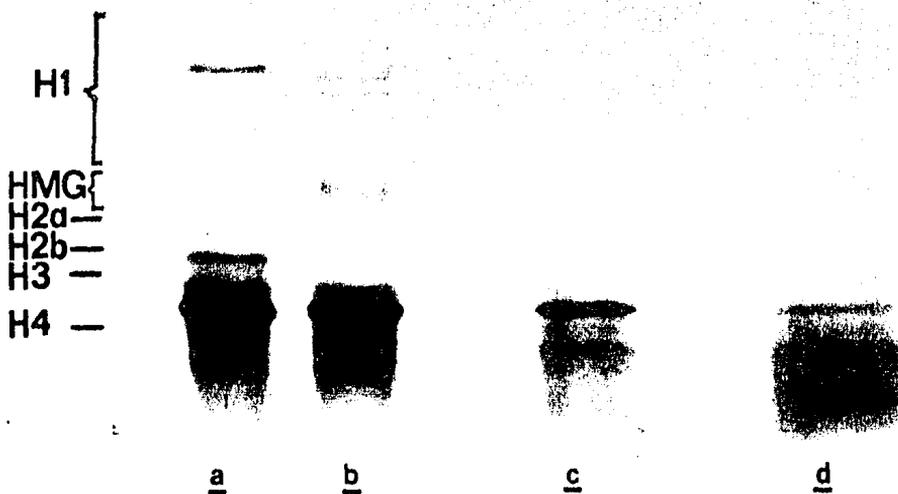


Figura 6. Patrones electroforéticos de las histonas del maíz, en geles de poliacrilamida a una concentración de 10-18 % en presencia de SDS. Eje embrionario proveniente de semillas en estado quiescente T=0 hr (carril a); después de 24 hr de imbibición T=24 hr (carril b); escutelo T=0 hr (carril c); escutelo T=24 hr (carril d).

1 ó 2 bandas entre la zona H1 y la del "core". Por otra parte, los cambios en el patrón de histonas del escutelo en estado quiescente (T=0) y del escutelo de semilla ya germinada (T=24), son muy ligeros tanto para la zona del "core" como para la zona de las H1, más aún si se comparan con los que sufre el patrón de las histonas del eje embrionario. En el eje embrionario, las histonas del "core" no se alteran con la germinación; sin embargo la placa de las histonas H1 sí sufre grandes modificaciones, se observa incluso la aparición de nuevas bandas.

b. Callo.

Se obtuvieron histonas de los callos de maíz por el método establecido, y se analizó también su patrón electroforético para estudiar la función de las histonas en la diferenciación celular. Los callos son acúmulos de células poco diferenciados, no organizados, que provienen del eje embrionario y se mantienen en cultivo in vitro por períodos prolongados en presencia de fitorreguladores de crecimiento (65). En la fig. 7 se observa que en el gel se separan varias bandas extremadamente tenues en la región de las H1, y varias más intensas en la zona del "core".

VIII. Familia H1.

Para definir más claramente cuales son las histonas de la familia H1 y diferenciarlas del resto de las proteínas, en especial de las proteínas nucleares no histónicas de alta movi-

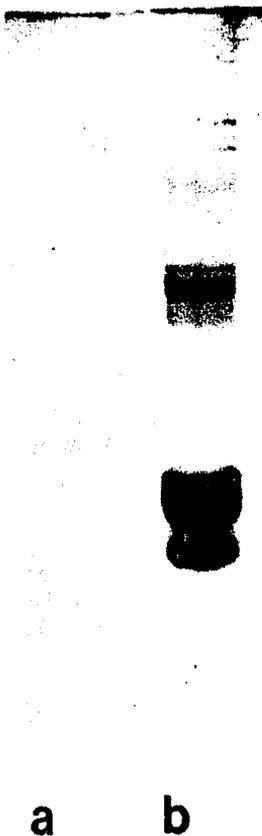


Figura 7. Patrón electroforético de las histonas del callo del maíz (carril a), y del timo de la ternera -- (carril b); en geles de poliacrilamida a una concentración de 18% en presencia de SDS.

lidad electroforética -HMG-, se efectuaron purificaciones se
lectivas con ácido perclórico (APC).

El APC en concentraciones entre 0.5 - 0.83 M, tiene la propiedad de solubilizar las histonas de la familia H1 y precipitar las restantes, incluyendo las HMG (46). Los rendimientos sin embargo fueron sumamente bajos, por lo que las muestras colocadas para electroforesis fueron muy pequeñas y las bandas producidas extremadamente tenues, al grado de no ser registradas con claridad por las fotografías. Por ello se hizo un diagrama del resultado de estas electroforesis.

En la fig. 8 se observa este diagrama que muestra que las histonas extraídas con APC del eje -familia H1-, tienen pesos moleculares mayores que las de escutelo, mayores inclu
so que las de animales. Las histonas H1 del escutelo migran en una zona de bajo peso molecular, al nivel de la banda H1 de timo menos pesada. En ambos casos se observan, sin embar
go, contaminaciones por otras proteínas en la zona del "core".

IX. Determinación de los pesos moleculares de las histonas - del maíz.

Los pesos moleculares de las histonas se calcularon en base a sus movilidades electroforéticas en los geles de acrilamida en presencia de SDS, ya que sus movilidades son funciones lineales del logaritmo de sus pesos moleculares (11).

La fig. 9 muestra la curva patrón de las histonas del ti

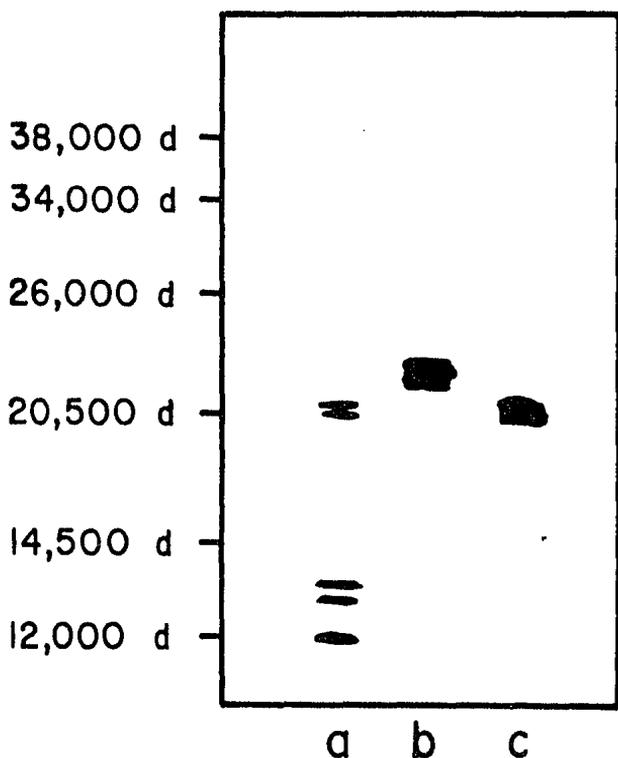


Figura 8. Patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida a una concentración de 10-18 % en presencia de SDS, de las histonas solubles en APC 0.74 M -familia H1-. Histonas H1 del eje embrionario del maíz T=0 hr (carril a); histonas H1 del escutelo del maíz T=24 hr (carril b); Histonas totales del timo de la ternera (carril c).

mo de ternera utilizadas para estos fines, y la curva que producen las proteínas típicas como : la fosforilasa b, la albúmina sérica bovina, la ovalbúmina, la anhidrasa carbónica, el inhibidor de tripsina de soya, y la lactoalbúmina. La diferencia entre ambas curvas indica un comportamiento distinto entre los dos grupos de proteínas, por lo que tratándose de histonas, se utilizó como curva patrón la producida por estas mismas proteínas, provenientes del timo de la ternera. La gráfica se trazó ajustando los puntos obtenidos a una curva de regresión simple mediante el criterio de mínimos cuadrados, el cual reduce la distancia de los puntos a la curva.

En la tabla IV , se muestran los pesos moleculares de las bandas que aparecen en los patrones electroforéticos del eje y del escutelo, en estado quiescente y germinado; así como las familias a las que corresponden las distintas histonas.

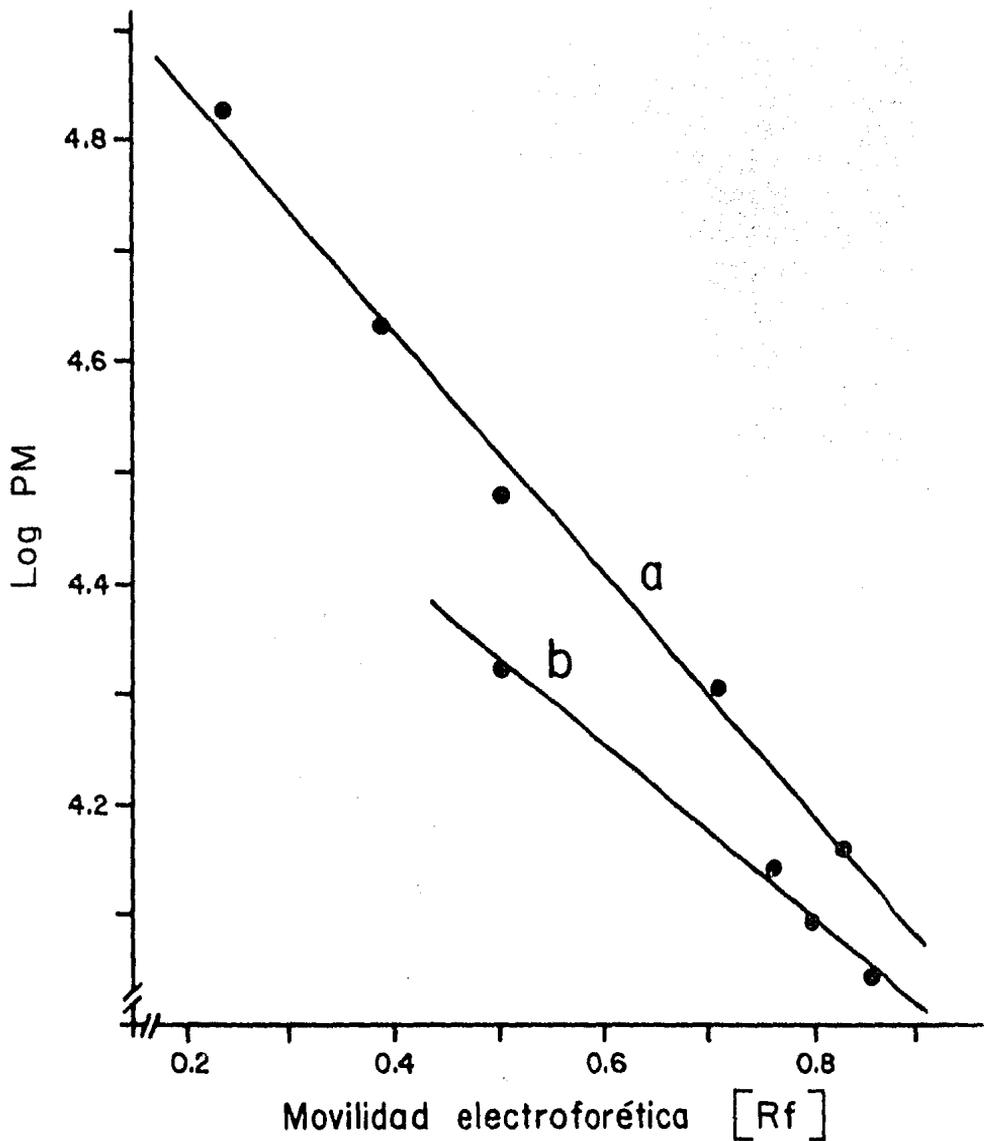
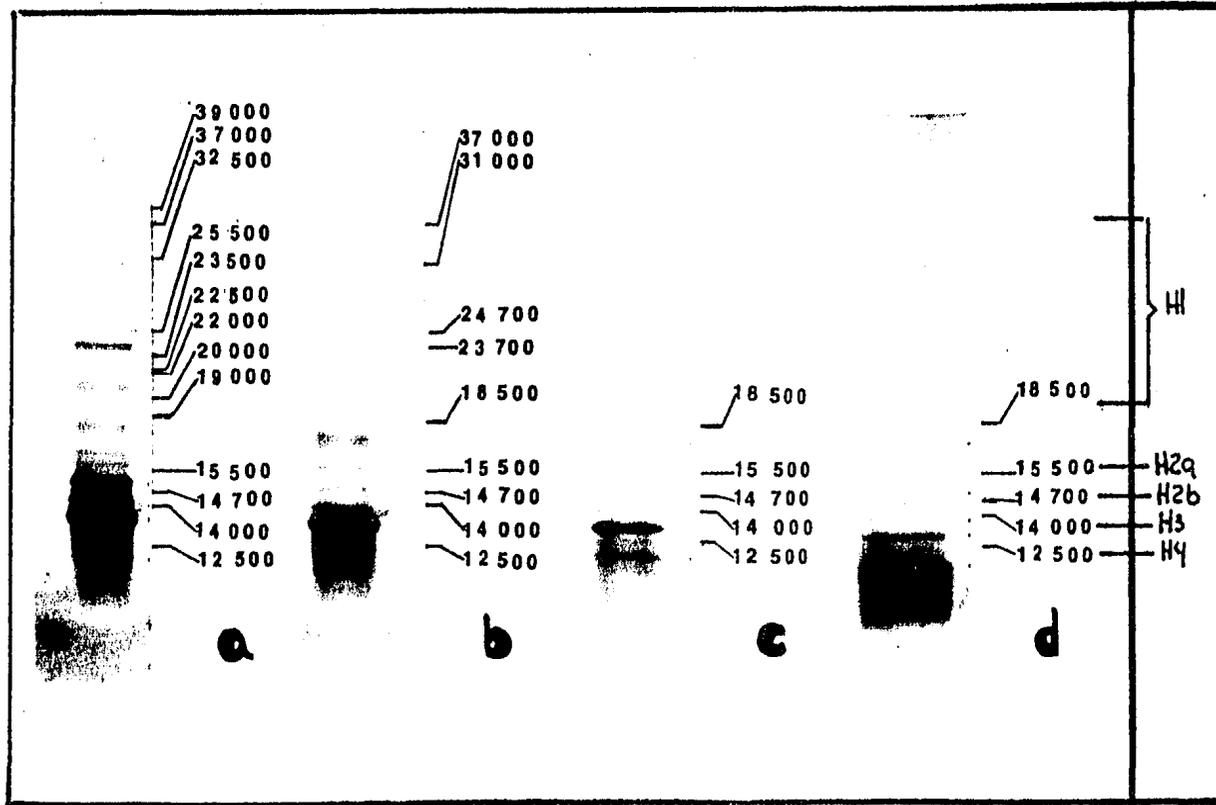


Figura 9. Movilidad electroforética de las proteínas típicas (a), y de las histonas del timo de la ternera (b), en geles de poliacrilamida a una concentración de 10-18 % en presencia de SDS.

Tabla IV. Pesos moleculares de las histonas del eje embrionario T=0 hr (carril a), T=24 hr (carril b); del escutelo T=0 hr (carril c), T=24 hr (carril d).



DISCUSION DE RESULTADOS

Las histonas del maíz y de la ternera estudiadas, muestran grandes similitudes entre sí. Presentan patrones electroforéticos semejantes (fig.4) a pesar de proceder de organismos sumamente alejados filogenéticamente. Es de notarse sin embargo, que la histona H3 del escutelo no se moviliza en posición intermedia con las H2a y H2b, como ocurre en el timo (57).

Los patrones cromatográficos son también semejantes; la H1, las H2a -H2b, la H3, y la H4, es el orden en que eluyen del gel las histonas del escutelo del maíz (fig.5b). Las histonas excluyen en el gel cromatográfico de acuerdo al tamaño que poseen, sin embargo las familias H2a y H2b no se resuelven en este sistema (71). Las histonas del timo de la ternera presentan un comportamiento similar a las del maíz al someterse a las mismas condiciones, no obstante la fracción H3 eluye conjuntamente a la fracción H2a-H2b (fig. 5a). En tejidos animales, las histonas no correlacionan el valor creciente que les ha sido asignado, con su PM; comúnmente la histona H3 posee un PM mayor o intermedio a la H2a y la H2b (38,56).

La prueba que marca de manera fehaciente la enorme relación existente, entre las histonas de un cereal y las de un mamífero, es el hecho de que comparten determinantes antigénicos (tabla III), lo que confirma la gran conservación de estas proteínas a lo largo de la evolución (1). Reportes

previos habían demostrado esta misma relación entre organismos animales muy distantes en la escala evolutiva (58,73).

La producción de anticuerpos por medio de animales de laboratorio es escasa (tabla II). Consecuencia de la baja capacidad antigénica que presentan ante el sistema inmune, unas proteínas de tan pequeña magnitud y escasez de aminoácidos aromáticos en su molécula.

Otros autores también han detectado este problema, y han logrado mejorar la respuesta antigénica agregando ARN a su preparación de antígeno (73).

La determinación de los PM de las histonas del maíz se efectuó analizando su movilidad electroforética en los geles de acrilamida en presencia de SDS (fig.6). La curva patrón se preparó con las histonas del timo de la ternera, utilizando la información reportada por Panyim y Chalkley (59) sobre el PM de estas moléculas, calculado a partir de su secuencia de aminoácidos; ya que las histonas no se comportan como lo hacen las proteínas típicas comunmente utilizadas para estos fines. Dos curvas distintas fueron obtenidas al graficar movilidad contra PM, para las proteínas comunes y para las histonas del timo (fig.9). Este mismo comportamiento fue reportado por Panyim y Chalkley, quienes atribuyeron estas diferencias en corrimiento a la gran carga positiva que poseen las histonas (58). El complejo SDS-histona que se forma en el gel presenta una carga negativa neta mucho menor que la de los complejos con proteínas no básicas, lo que afecta

su movilidad en el gel.

La identificación de las histonas en los patrones electroforéticos de los tejidos del maíz (fig.5), se efectuó básicamente tomando en cuenta los datos ya mencionados reportados en la literatura para las histonas del timo de la ternera (12), y los datos de algunas histonas vegetales (71,43):

Las bandas de los tejidos embrionarios del maíz con PM entre 18,500 y 25,500 d inclusive, corresponden a la familia H1 (tabla IV). Esta familia en el timo de la ternera (59) y en los eritrocitos del pollo (43), presentan un PM alrededor de 21,000 d, sin embargo se han reportado valores superiores a 24,000 d para algunas H1 del tabaco, del trigo y de la cebada (43). Esta identificación de las H1 en maíz, fue además confirmada analizando el comportamiento en el gel de acrilamida-SDS, de la fracción de las histonas que es soluble en APC 0.74 M -histonas H1-, las cuales migran en la zona de 19,000 a 24,000 d aproximadamente (fig.8).

Las familias H2a y H2b presentan en maíz un PM de 15,500 y 14,700 respectivamente (tabla IV). Estas dos histonas muestran en la ternera 14,000 y 12,000 d (59), mientras que Spiker (71) reporta para las H2a y las H2b de trigo valores entre 19,000 y 15,000 d.

La histona H3 posee un PM de 14,000 d en los tejidos del maíz (tabla IV), mismo valor que es reportado para el timo de la ternera.

La banda H4 se identificó tomando en cuenta que es la histona de menor PM, aproximadamente 12,500 d en el maíz (tabla IV).

Los resultados obtenidos coinciden con la idea de que las histonas vegetales en general, son más pesadas que sus contrapartes animales (71) en lo que se refiere a las familias H1, H2a y H2b; pues las histonas H3 y las H4 se conservan menos alteradas en la escala filogenética (16). Y con el hecho de que las H3 tienen en plantas, un menor PM que las H2a y las H2b (43, 72).

En los patrones electroforéticos del eje (fig.6; tabla IV) aparecen además otras dos bandas que migran en la zona de PM inferior a las H1, y superior a las histonas del "core", lo cual sugiere que se trata de proteínas cromosomales no histónicas HMG, que se coextraen de la cromatina junto con las histonas, y que en muchas ocasiones no es posible eliminar con lavados de NaCl 0.35 M (24).

Los patrones histónicos del eje embrionario T=0, T=24, los del escutelo T=0, T=24, y los del callo (figs. 6 y 7), muestran algunas diferencias importantes en la región de las histonas H1. Las bandas de variantes o tipos moleculares que presenta esta familia son distintas en cada caso, lo que es apoyado por reportes previos (46) que indican que incluso los tejidos de un mismo organismo presentan diferente proporción de las variantes de H1, de acuerdo a su estado de desarrollo, de diferenciación y de inducción hormonal.

~~////////~~

El eje embrionario antes de germinar presenta un amplio espectro de variantes H1, con distintos PM y variada intensidad (fig. 6, carril a). Una vez germinado este tejido muestra una nueva serie de variantes (fig. 6, carril b), distinta del esquema anterior. En contraste, el escutelo no muestra en su corrimiento electroforético diferencias apreciables antes y después de la germinación (fig. 6, carriles c y d).

El eje embrionario es un tejido cuya expresión genética varía durante la germinación, de un estado quiescente pasa a una forma activa, para sintetizar las distintas proteínas que requiere en cada paso de su desarrollo (29). Por otra parte el escutelo es un tejido embrionario altamente diferenciado, que no va a crecer ni a mostrar división celular durante la germinación y desarrollo de la plántula (29).

Estos resultados son consistentes con el punto de vista de que los cambios en la expresión genética están correlacionados con cambios en la población de las variantes históricas H1 presentes, las cuales difieren unas de otras funcionalmente.

Entre las variantes H1 presentes en el eje embrionario antes de iniciar la germinación, es la de mayor PM-25,500 d- la predominante; en tanto que la de menor PM-18,500 d- no está presente en él (tabla IV, carril a). A las 24 hr de germinación, el eje embrionario muestra distintas variantes H1, ya no figura entre ellas la histona de 25,500 d; y aparece, entre otras, la de 18,500 d (tabla IV, carril b).

El escutelo, tanto al inicio como al fin de la germinación, muestra un patrón de variantes H1 dominado prácticamente por la variante H1 de menor PM -18,500 d-, salvo por algunas otras bandas sumamente escasas (tabla IV, carriles c y d).

Estos datos apuntan hacia la existencia en los organismos vegetales, de análogos a la histona H1^o de animales, la cual, junto con la H5, constituyen las histonas de menor PM entre las que conforman la familia H1 en animales (12,56). Existen diversos reportes en la literatura (14, 23, 61) que muestran la acumulación de la H1^o asociada a tejidos que han terminado su proliferación celular, funcionalmente maduros, y completamente diferenciados; por ello se ha considerado que esta histona está relacionada con la expresión de funciones diferenciadas de las células. Este sería el caso del tejido escutelar de la semilla.

Los patrones electroforéticos del eje embrionario muestran otras bandas de mayor PM, que rebasan los 30,000 d (tabla IV, carriles a y b). Dado este valor de PM, se puede sugerir que se tratan de dímeros naturales de las histonas H2a o H2b. O bien podrían deber su existencia a la formación de complejos ubiquitina-H1. La unión de la ubiquitina a las proteínas, se ha asociado con el recambio de las mismas, como señal de inicio para su degradación (30). Sin embargo se requeriría mayor experimentación para poder definir la identidad de las proteínas contenidas en esas bandas.

~~#####~~

Las bandas en el patrón electroforético del callo del maíz no aparecen bien definidas; es sobre todo la ausencia tan notable de proteínas en la parte superior, lo que indica una degradación de la muestra (fig. 7). Se sabe que estos tejidos presentan una abundante cantidad de proteasas (65), la cual aparentemente subsiste a pesar de la presencia del inhibidor PMSF, y a los cuidados tenidos durante la manipulación (condiciones de temperatura de 0-4°C y almacenaje a -20°C).

Sin embargo otros autores (40) lograron obtener un patrón electroforético de las histonas de los callos del maíz bastante claro. El cuál, comparado con los patrones de los tejidos del maíz con mayor grado de diferenciación, presenta grandes diferencias, principalmente en la zona de las histonas H1.

~~XXXXXXXXXX~~

CONCLUSIONES

1. Existe una similitud muy grande -en peso molecular y determinantes antigénicos- entre las histonas de animales y las de vegetales, a pesar de encontrarse tan alejadas filogenéticamente.
2. Se observó una correlación entre las variaciones en los patrones electroforéticos de las histonas y los diferentes estados de diferenciación celular de los tejidos embrionarios del maíz, lo cuál sugiere que las histonas tienen una importante función durante la germinación de las semillas.
3. Existe en los tejidos del maíz una variante H1, cuya ocurrencia y características electroforéticas, sugieren que se trata de una histona funcionalmente análoga a la variante H1° que se ha encontrado en los animales.
4. Se determinaron los pesos moleculares de las histonas de los tejidos embrionarios del maíz al inicio y al final de la germinación.

De esta manera se cumplieron los objetivos propuestos al inicio de la presente investigación para demostrar la hipótesis planteada.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1983) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York 386-406.
- 2.- Allan, J., Hartman, P.G., Grane-Robinson, C. y Aviles, X. (1980) The structure of histone H₁ and its location in chromatin. *Nature* 288, 675-679.
- 3.- Allis, C.D. y Wiggins, J.C. (1984) Histone rearrangements -- accompany nuclear differentiation and dedifferentiation in *Tetrahymena*. *Develop. Biol.* 101, 282-294.
- 4.- Ayala, F.J. y Kiger, J.A. (1984) *Modern Genetics*. 2a. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.
- 5.- Boulikas, T., Wiseman, J.M. y Garrard, W.T. (1980) Points of contact between histone H₁ and the histone octamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 127-131.
- 6.- Bracegirdle, B. y Miles, P.H. (1975) *Atlas de estructura vegetal*. Ed. Paraninfo. Madrid. pp 119.
- 7.- Branno, M., De Franciscis, V. y Tosi, L. (1983) In vitro methylation of histones in sea urchin nuclei during early embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 741, 136-142.
- 8.- Brasch, K. (1976) Studies on the role of histones H₁ (f 1) and H₅ (f2c) in chromatin structure. *Exp. Cell. Res.* 101, 396-410.
- 9.- Carozzi, N., Marashi, F., Plumb, M., Zimmerman, S., Zimmerman, A. Coles, L.S., Wells, J.R.E., Stein, G. y Stein, J. (1984) Clustering of human H₁ and core histone genes. *Science* 1115-1117.

- 10.- Ciechanover, A., Finley, D. y Varshavsky, A. (1984) Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts 85. *Cell* 37, 57-66.
- 11.- Cooper, T.G. (1977) *The tools of biochemistry*. John Wiley and Sons. Nueva York. pp 206-208.
- 12.- Chabanas, A., Lawrence, J.J., Humbert, J. y Eisen, H. (1983) Cell cycle regulation of histone H₁⁰ in CHO cells: a flow cytofluorimetric study after double staining of the cells. *The EMBO journal* 2, 833-837.
- 13.- Chin, D.T., Kuehl, L. y Rechsteiner, M. (1982) Conjugation of ubiquitin to denatured hemoglobin is proportional to the rate of hemoglobin degradation in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 5857-5861.
- 14.- D'Anna, J.A., Gurley, L.R., y Tobey, R.A. (1982) Synthesis and modulations in the chromatin contents of histones H₁⁰ and H₁ during G₁ and S phases in chinese hamster cells. *Biochemistry* 21, 3991-4001.
- 15.- De Groot, P., Strickland, W.N., Brandt, W.F. y Von Holt, C. (1983). The identification by sequence homology of stage-specific sea urchin embryo histones H1. *Biochim. Biophys. Acta* 747, 276-283.
- 16.- De Robertis, E.D.P. y De Robertis, E.M.F. (1981) *Biología celular y molecular*. 10a. Ed. El Ateneo. Buenos Aires. pp 321-328.

- 17.- Dingwall, C. y Allan, J. (1984) Accumulation of the isolated carboxy-terminal domain of histone H1 in the Xenopus oocyte nucleus. EMBO Journal 3, 1933-1937.
- 18.- Djondjurov, L.P., Yancheva, N.Y. e Ivanova, E.C. (1983) Histones of terminally differentiated cells undergo continuous turnover. Biochemistry. 22, 4095-4102.
- 19.- Elgin, S.C.R., y Weintraub, H. (1975) Chromosomal proteins and chromatin structure. Ann. Rev. Biochem. 44, 725-774.
- 20.- Finley, D., Ciechanover, A., y Varshavsky, A. (1984) Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from mammalian cell cycle mutants. Cell 37, 43-55.
- 21.- Geraci, G., Lancieri, M., Marchi, P. y Noviello, L. (1979) - The sea urchin (Sphaerechinus granularis) codes different H2B histones to assemble sperm and embryo chromatin. Cell Differentiation 8, 187-194.
- 22.- Giovanni, S., Gianguzza, F., Casano, C., Acierno, P. y Burckhardt, J. (1979). Evidences of two different sets of histone genes active during embryogenesis of the sea urchin Paracentrotus lucidus. Nucl. Acids Res. 6, 545-560.
- 23.- Gjerset, R., Gorke, C., Hasthorpe, S., Lawrence, J.J. y Eisen H. (1982) Developmental and hormonal regulation of protein H₁⁰ in rodents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2333-2337
- 24.- Goodwin, G.H., Sanders, C. y Johns, E.W. (1973) Eur. J. Biochem 38, 14-19.

- 25.- Gorka, C. y Lawrence, J.J. (1979) The distribution of histone H₁ subfractions in chromatin subits. Nucl. Acids - Res. 7, 347-359.
- 26.- Graves, R.A. y Marzluff, W.F. (1984) Rapid reversible - changes in the rate of histone gene transcription and histone mRNA levels in mouse myeloma cells. Mol. Cell. Biol. 4, 351-357.
- 27.- Hancock, R. (1978) Assembly of new nucleosomal histones - and new DNA into chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 75, 2130-2134.
- 28.- Harvey, R.P., Krieg, P.A., Robins, A.J., Coles, L.S. y Wells, J.R.E. (1981) Non-tandem arrangement and divergent transcription of chicken histone genes. Nature 294, 49-53.
- 29.- Hayward, H.E. (1953) Estructura de las plantas útiles. Ed. ACME, S.A. Bueno Aires. pp118-131
- 30.- Hershko, A. (1983) Ubiquitin: Roles in protein modification and breakdown. Cell 34, 11-12.
- 31.- Hohmann, P. (1983) Phosphorylation of H₁ histones. Mol. Cell. Biochem. 57, 81-92.
- 32.- Houg, C.J. y Smulson, M.E. (1984) Association of Poly (adenosine diphosphate ribosylated) nucleosomes with transcriptionally active and inactive regions of chromatin. Biochemistry. 23, 5016-5023.

- 33.- Huang, H.C. y Cole, R.D. (1984) The distribution of H1 histone is nonuniform in chromatin and correlates with different degrees of condensation. J. Biol. Chem. 259 - 14237-14242.
- 34.- Imschenetzky, M., Massone, R., Gambio, S. y Puchi, M. --- (1983) Intracellular distribution of the histones synthesized during the first cleavage cycle of the development of the sea urchin Tetrapygus Niger. Cell Mol. Biol. 29, 79-83.
- 35.- Isenberg, I. (1979) Histones. Ann. Rev. Biochem. 48, - 159-191.
- 36.- Jenson, J.C., Chin-Lin, P., Gerber-Jenson, B. y Litman, G. W. (1980) Structurally unique basic protein coextracted with histones from calf thymus chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1389-1393.
- 37.- Jones, G.M.T., Rall, S.C. y Cole, R.D. (1974) Extension of the amino acid sequence of lysine-rich histone. J. Biol. Chem. 249, 2548-2553.
- 38.- Jordano, J., Montero, F. y Palacian, E. (1984) Contribution of histones H2A and H2B to the folding of nucleosomal DNA. Biochemistry 23, 4285-4289.
- 39.- Kielland, S.L. Mathiaparanam, P., Slotin, L.A. y Williams, R.E. (1979) The synthesis of peptides related to a conserved sequence found in histone H-1 and H-5. Their abi

- lity to act as substrates and inhibitors of exogenous protein kinases. *Can. J. Chem.* 52, 267-273.
- 40.- Koleva, S., Marinova, E., Varadinova, S., Tsikova, E. y Atanassov, A. (1982) Acid-soluble chromosomal proteins in maize root and callus cells and after rhizogenesis - induction in callus tissues. *Biol. Plant.* 24, 388-393.
- 41.- Kornberg, R.D. & Klung, A. (1981) The Nucleosome. *Sci.-Am.* 244, 48-60.
- 42.- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 43.- Langenbuch, J., Philipps, G. y Gigot, C. (1983) Fractionation and characterization of histones from barley (*Hordeum vulgare*) leaves. *Plant. Mol. Biol.* 2, 207-220.
- 44.- Larve, H., Bissonnette, E. y Bélanger, L. (1983). Histone H₁⁰ expression during developmental growth of rat liver. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 1197-1200.
- 45.- Lehninger, A.L. (1977) *Bioquímica*. Segunda edición, Editorial Ediciones Omega 881-883.
- 46.- Lennox, R. W., Oshima, R.G. y Cohen, L.H. (1982) The H₁ - histones and their interphase phosphorylated states in differentiated and undifferentiated cell lines derived from murine teratocarcinomas. *J. Biol. Chem.* 257, 5183-5189.

- 47.- Levinger, L. y Varshavsky, A. (1982) Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the Drosophila genome. Cell 28, 375-385.
- 48.- Lichtler, A.C., Sierra, F., Clark, S., Wells, J.R.E., Stein J.L. y Stein, G.S. (1982) Multiple H4 histone mRNAs of HeLa cells are encoded in different genes. Nature 298, 195-198.
- 49.- Lowry, O.H., Rosebrough, N. Farr, A. y Randall, R. -- (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 50.- Macleod, A.R., Wong, N.C.W., y Dixon, G.H. (1977) The amino-acid sequence of trout-testis histone H₁. Eur. J. -- Biochem. 78, 281-291.
- 51.- Matsui, S., Seon, B.R. y Sandberg, A.A. (1979) Disappearance of structural chromatin protein A24 in mitosis: Implications for molecular basis of chromatin condensation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6386-6390.
- 52.- Matsumoto, Y., Yasuda, H., Mita, S., Marunouchi, T. y Yamada, M. (1980) Evidence for the involvement of H₁ histone phosphorylation in chromosome condensation. Nature 284, 181-183.
- 53.- Mc Ghee, 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.

- 54.- Molgaard, H.V., Perucho, M. y Ruiz-Carrillo, A. (1980). - Histone H₅ messenger RNA is polyadenylated. *Nature* 283, 502-504.
- 55.- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- 56.- Muyltermans, S., Lasters, I., y Wyns, L. (1980) Histone H₁ can be removed selectively from chicken erythrocyte chromatin at near physiological conditions. *Nucl. Acids. Res.* 8, 731-739.
- 57.- Nadeau, P., Pallotta, D. y Lafontaine, J.G. (1974) Electrophoretic study of plant histones: comparison with vertebrate histones.
- 58.- Panyim, S., Bilck, D. y Chalkley, R. (1971) An electrophoretic comparison of vertebrate histones. *J. Biol. Chem.* 246, 4206-4215.
- 59.- Panyim, S. y Chalkley, R. (1971) The molecular weights of vertebrate histones exploiting a modified sodium dodecyl sulfate electrophoretic method. *J. Biol. Chem.* 246, 7577-7560.
- 60.- Pehrson, J. y Cole, R.D. (1980) Histone H₁⁰ accumulates in growth inhibited cultured cells. *Nature* 285, 43-44.
- 61.- Pehrson, J.R. y Cole, R.D. (1982) Histone H₁ subfractions and H₁⁰ turnover at different rates in nondividing cells. *Biochemistry* 21, 456-460.

- 62.- Plumb, M., Marashi, F., Green, L., Zimmerman, A., Zimmerman, S., Stein, J. y Stein, G. (1984). Cell cycle regulation of human histone H₁ mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, - 434-438.
- 63.- Prior, C.P., Cantor, C.R., Johnson, E.M., Littau, J.C. y - - Allfrey V.G. (1983) Reversible changes in nucleosome -- structure and histone H3 accesibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin Cell - 34, 1033-1042.
- 64.- Reeves, R. (1984) Transcriptionally active chromatin. Biochim. Biophys. Acta 782, 343-393.
- 65.- Reinert, J. y Bajaj, J.P.S. (1977) Plant cell, tissue, - and organ culture. Ed. Springer-Verlag. Berlín. pp 144-145, 179-180.
- 66.- Ruiz-Carrillo, A. (1984) The histone H5 gene is flanked by S1 hypersensitive structures. Nucl. Acids. Res. 12, 6473-6492.
- 67.- Sánchez de Jiménez, E. y Albores, M. (1979) Auxinas sin téticas en la inducción de callos de maíz (Zea mays L.). Agrociencia 37, 151-160.
- 68.- Simon, J.H. y Becker, W.M. (1976) A polyethylene glycol/dextran procedure for the isolation of chromatin proteins (histones and nonhistones) from wheat germ. Biochim. Biophys. Acta 454, 154-171.
- 

- 69.- Sittman, D.B., Chiu, I., Pan C., Cohn, R.H., Kedes, L.H. y -- Marzluff, W.F. (1981) Isolation of two clusters of mouse histone genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4078-4082.
- 70.- Smith, B.J., Walker, J.M., y Johns, E.W. (1980) Structural homology between a mammalian H₁⁰ subfraction and avian - erythrocyte-specific histone H5. FEBS Lett. 112, 42-44.
- 71.- Spiker, S. (1982) Histone variants in plants. J. Biol.- Chem. 257, 14250-14255.
- 72.- Spiker, S., Key, J.L. y Wakim, B. (1976) Identification and fractionation of plant histones. Arch. Biochem. Bio phis. 176, 510-518.
- 73.- Subirana, J.A., Palau, J., Cozcolluela, C. y Ruiz Carri llo, A. (1970) Very lysine rich histone of Echinoderms and Molluscs. Na ture 228, 992-993
- 74.- Watson, J.D. (1976) Biología molecular del Gen. Tercera edición, Editorial Fondo Educativo Interamericano 150,- 479-481.
- 75.- Weintraub, H. (1978) The nucleosome repeat length incre asce during erythropoiesis in the chick. Nucl. Acids Res. 5, 1179-1188.
- 76.- Weintraub, H. (1984) Histone-H1-dependent chromatin super structures and the suppression of gene activity. Cell 38, 17-27.

- 77.- Weintraub, H. y Groudine, M. (1976) Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* - 193, 848-856.
- 78.- Weisbrod, S. (1982) Active chromatin. *Nature* 297, 289-295.
- 79.- West, M.H.P., y Bonner, W.M. (1980) Histone 2A a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* 19, 3238-3245.
- 80.- Wilhelm, M.L., Mazon, A. y Wilhelm, F.X. (1977) Comparison of the DNA repeat length in H₁ and H₅ containing chromatin. *FEBS Lett.* 79, 404-408.
- 81.- Wu, R.S. y Bonner, W.M. (1981) Separation of basal histone synthesis from S phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* 27, 321-330
- 82.- Wu, R.S., Tsai, S. y Bonner, W.M. (1983) Changes in histone H3 composition and synthesis pattern during lymphocyte activation. *Biochemistry* 22, 3868-3873.