

# ESTUDI SOBRE L'ORGANITZACIÓ DE LA CROMATINA I ANÀLISI DEL COMPLEMENT PROTEIC NUCLEAR DURANT LA DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR

per E. ROCHA, L. MENGOD i LL. CORNUDELLA

Departament de Química Macromolecular del C.S.I.C.  
Universitat Politècnica de Barcelona

## INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules eucariotes contenen ADN, una gran part del qual es troba localitzat en el nucli cel·lular protegit per membranes que el diferencien de la resta de fraccions i cossos cel·lulars. El nucli conté, a més, una gran quantitat de proteïnes que es troben involucrades amb grau distint de participació en els mecanismes de síntesi, procés i elaboració de molècules d'ARN. La molècula dúplex d'ADN resulta directament associada amb un sol grup específic de proteïnes nuclears —les histones— constituint complexos de naturalesa nucleoproteica. El conjunt d'aquests complexos configura el material genètic pròpiament dit, el qual esdevé empaquetat en l'interior del nucli i rep el nom de cromatina tot definint els caràcters de la cèl·lula i constituint el genoma distintiu cel·lular. Una característica específica dels organismes superiors és que solament una petita part del genoma expressa el seu potencial genètic, mentre que la resta es manté inactiu al llarg del cicle vital de la cèl·lula. Aquest darrer fet és clarament indicatiu de l'elevat nivell de complexitat en l'organització estructural de la cromatina, els components de la qual es disposen de manera que donen lloc a una estructura repetitiva, regularment espaiada que s'anomena nucleosoma (LEWIN, 1975) l'existència del qual ha estat evidenciada al microscopi electrònic (OLINS i OLINS, 1974) i reconeguda bioquímicament per mitjà de l'acció de diversos enzims nucleolítics que el fragmenten d'una forma regular (HEWISH i BURGOYNE, 1974; CLARK i FELSENFELD, 1974).

Donada l'estreta vinculació entre l'organització estructural i l'activitat genètica i el tenir en compte que aquesta darrera adquireix singular

intensitat durant el fenomen de la diferenciació cel·lular, l'estudi bioquímic d'aquesta interdependència al llarg del desenvolupament cel·lular esdevé de cabdal importància. L'objecte, doncs, del nostre treball ha consistit en l'estudi de l'organització de la cromatina de cèl·lules eucariotes en procés de diferenciació i ensems llur íntima relació amb el control de l'activitat i l'expressió genètiques. Com a sistema biològic s'han emprat cèl·lules germinals, principalment d'equinoderms, durant el procés diferenciatiu (espermatogènesi).

#### CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES I RESULTATS

L'objectiu que acabem d'esmentar ha predeterminat el següent plantejament experimental: (a) examen de l'acció de nucleases i llur cinètica en cromatina nadiua de cèl·lules espermatogèniques en diferents fases del cicle reproductiu; (b) aïllament i caracterització de les sub-unitats nucleoproteiques resultants de la digestió enzimàtica; (c) aïllament i anàlisi dels components de les partícules unitàries (ADN i complement proteic).

Per assolir aquestes fites, espècies mascles de *Holothuria tubulosa* van ésser recollides en etapes diverses al llarg del seu desenvolupament (CORNUDELLA, 1977). Un cop extirpat el teixit espermatogènic es procedí al fraccionament cel·lular i a la preparació de cromatina que es digeriria amb nucleasa micrococcal, separant-ne els productes de la digestió per centrifugació en gradients de sacarosa (ROCHA i CORNUDELLA, 1976). Paral·lelament, una alíquota de la cromatina nadiua era tractada en medi àcid per a extreure-li el complement proteic d'histones, que posteriorment eren caracteritzades electroforèticament en gels de poliacrilamida.

D'antuvi cal assenyalar la peculiar resistència mecànica del nucli cel·lular a la penetració enzimàtica, i és indispensable la preparació de suspensions de cromatina nuclear per tal que l'enzim pogués iniciar la solubilització de l'ADN per bé que amb una lentitud molt marcada.

D'altra banda, els diagrames de sedimentació dels digerits (fig. 1) obtinguts de gònades immadures palesen la presència d'unitats monomèriques o nucleosomes juntament amb agrupacions d'embalum superior. El més notable, però, és l'aparició d'un material que sedimenta lentament, una mena de subnucleosomes, la proporció del qual depèn de la concentració d'enzim. Aquest pic de material lleuger decreix de manera progressiva a mesura que el cicle espermatogènic avança fins a desaparèixer totalment de la cromatina pertanyent a esperma madur (fig. 2). És poc plausible que aquest material procedeixi de la degradació del nucleosoma donat que en condicions més enèrgiques de digestió les espècies multimèriques

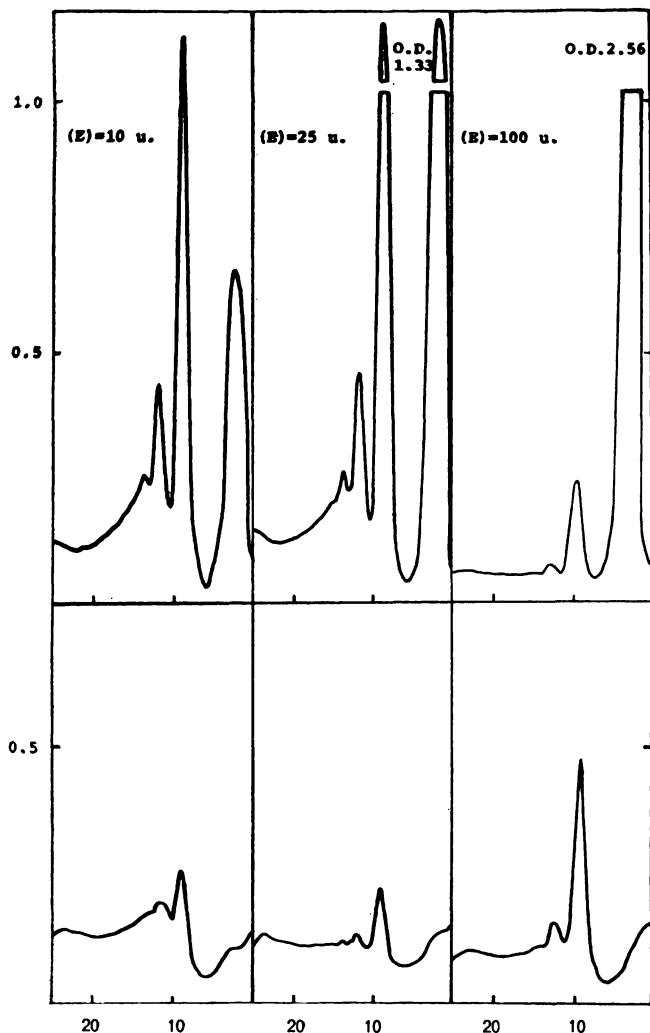


FIG. 1. — Anàlisi en gradients de sacarosa de cromatina nadiua de gònada immadura digerida amb 30 min. concentracions creixents de nucleasa micrococcal. *Diagrames superiors*: 10, 25 i 100 unitats òptiques d'enzim. *Diagrames inferiors*: Material soluble recuperat al rentar els sediments de cromatina no-digerida després del tractament amb les concentracions enzimàtiques esmentades

Absorbància a 254 nm  
Fracció n.º

donen lloc a monòmers sense que s'apreciï cap variació quantitativa del pic de sedimentació lenta en els gradients de sacarosa.

La conversió de formes multimèriques en nucleosomes és coherent amb la relació precursor-producte postulada. Ara bé, l'accessibilitat variable detectada de la nucleasa a la cromatina concomitant amb el procés de maduració germinal, així com la presència inicialment de subnucleosomes i llur posterior absència en les darreres fases de la espermatogènesi són demostratives de la generació de canvis importants en l'organització estruc-

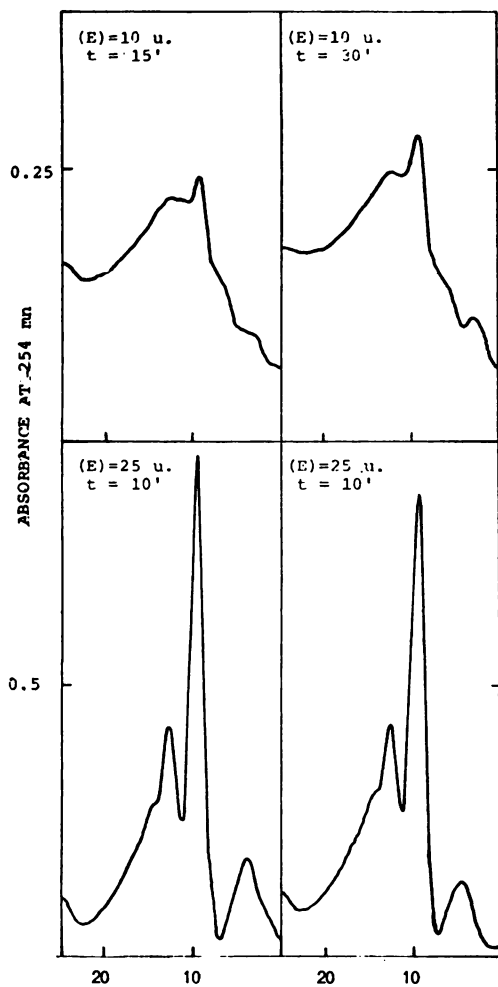


FIG. 2. — Anàlisi de sedimentació de cromatina digerida en etapes finals de la maduració. Després del tractament de preparacions de cromatina nadiua (diagrames superiors), el material insoluble es re-digerí amb el mateix enzim (diagrames inferiors). Les condicions d'hidròlisi enzimàtica es corresponen amb les indicades en la figura 1  
Absorbància a 254 mμ  
Fracció n.º

tural de la cromatina durant el desenvolupament a ben segur reflectint estats funcionals desiguals. En addició, l'anàlisi electrofòrica de la dotació proteica nuclear (fig. 3) mostra com a tret que més ressalta l'aparició sobtada d'una petita proteïna, anomenada  $\phi$  (ROCHA i CORNUDELLA, 1976), en les etapes mitjanes del cicle, la proporció de la qual augmenta molt sensiblement en l'espermatozoide.

És indubtable que existeix una estreta correlació entre la generació d'aquesta proteïna i els canvis descrits del grau d'accessibilitat de l'enzim, en particular amb la desaparició de material subnucleosòmic a les darreries del procés germinatiu.

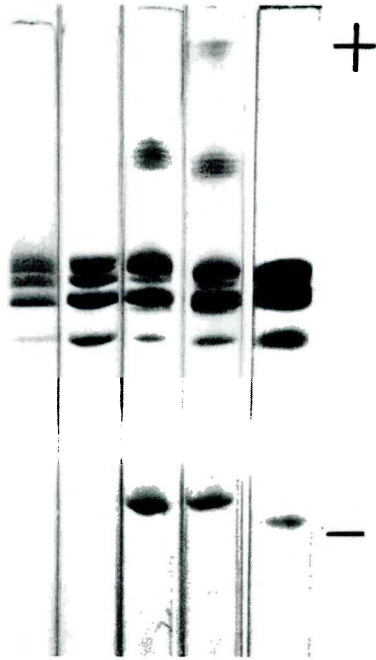


FIG. 3. — Anàlisi electroforètica en gels d'acrilamida d'histones totals extretes de gònades masculines en diversos períodes de desenvolupament germinal. Els electroferogrames corresponen d'esquerra a dreta als estats de: Activació de la gònada; creixement, maduració. Cal notar l'absència del component de ràpida mobilitat (proteïna  $\Phi_0$ ) en els estadis inicials de desenvolupament i la seva presència al llarg de l'espermiogènesi