

SEQUENCIACIÓ DEL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÏNA HÍBRIDA  
UBIQUÍTINA-PROTEÏNA BÀSICA 52, I EXPRESSIÓ DURANT  
L'ESPERMIOGÈNESI DEL GALL.

J. Mezquita, M. PAU i C. Mezquita

Unitat de Fisiologia Humana, Grup de Genètica Molecular.  
Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal  
s/n, 08028 Barcelona.

Abstract

A cDNA encoding a chicken ubiquitin-fusion protein identical to the corresponding human protein is expressed during spermiogenesis.

In eukaryotic cells two types of transcripts of ubiquitin have been identified: mRNA's coding for polyubiquitin molecules and transcripts coding for a ubiquitin molecule extended at its C-terminal end by a basic, putative metal binding, nucleic acid-binding domain. A cDNA clone, prepared from a poly(A)+ mRNA isolated from a chicken testis cell population enriched in spermatids, encodes residues 60-76 of ubiquitin plus a C-terminal extension of 52 amino acids. The amino acid tail is identical to a previously sequenced human ubiquitin-fusion protein (Salvesen *et. al.*, 1987). The observed identity between both molecules further confirms previous observations that ubiquitin-fusion proteins are strongly conserved during evolution. The ubiquitin fusion gene and two polyubiquitin genes are expressed during chicken spermiogenesis, suggesting that this protein may be involved in the marked changes in chromatin structure, protein turnover and cell-cell interactions occurring during spermiogenesis.

Key words: Spermatogenesis, gen expression of ubiquitin-fusion protein, ribosomal protein.



### Introducció.

La ubiquitina (HERSHKO, 1988; SCHLESINGER i HERSHKO, 1988; RESCHSTEINER, 1988) és un polipèptid de 76 aminoàcids que es troba a les cèl.lules eucariòtiques, bé en forma lliure, o en forma de conjugats covalents amb determinades proteïnes.

S'han caracteritzat conjugats in vivo d'ubiquitina amb les següents proteïnes: histones H2A i H2B, actina, "homing receptor" dels limfòcits, receptor del factor de creixement plaquetari, receptor de l'hormona de creixement i inclusions proteiques cel.lulars de diverses malalties neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer, i altres malalties hepàtiques i musculars.

Als conjugats, la ubiquitina s'uneix a la proteïna substrat mitjançant la formació d'un enllaç isopeptídic entre la glicina terminal de la ubiquitina (Gly 76) i el grup  $\epsilon$ -amino d'una lisina de la proteïna substrat. Per conjugar-se, la ubiquitina s'uneix, en primer lloc, a una cisteïna de l'enzim anomenat E1, mitjançant un enllaç tiolester. La ubiquitina és transferida, a continuació, a una cisteïna d'un altre enzim conjugant anomenat E2. Els enzims E2 transfereixen finalment la ubiquitina a les proteïnes substrat directament o mitjançant una tercera proteïna (E3).

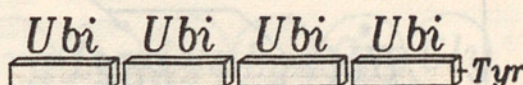
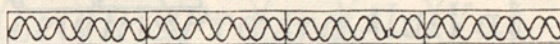
La unió de la ubiquitina a determinades proteïnes les marca per a la seva degradació proteolítica selectiva. Aquesta degradació té lloc quan algunes molècules d'ubiquitina s'uneixen seqüencialment a la proteïna substrat, formant una cadena de poliubiquitina. En la cadena, la glicina terminal d'una molècula d'ubiquitina (Gly 76) s'uneix a la lisina 48 de la ubiquitina adjacent.



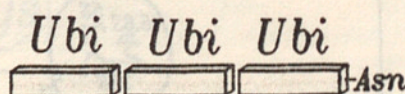
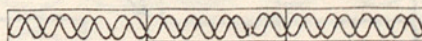
La unió reversible d'una molècula d'ubiquitina a la proteïna substrat no implica necessàriament la degradació d'aquesta proteïna i pot constituir un mecanisme per modular la seva activitat funcional.

## Família dels gens de la ubiquitina

*pUbi(4)*



*pUbi(3)*



*mUbi-P52*

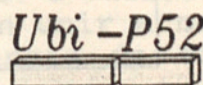
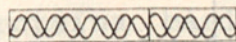


Fig. 1. La ubiquitina està codificada per dos tipus de gens: els gens de poliubiquitina que codifiquen poliproteïnes formades per un nombre variable de molècules d'ubiquitina unides per emllaços Gly-Met (quatre i tres en el pollastre), i els gens que codifiquen molècules híbrides d'ubiquitina unida, en el seu extrem carboxiterminal, a una proteïna bàsica de 52 o 76-80 aminoàcids (52 en la proteïna que hem identificat en el pollastre).

S'han proposat diferents funcions dels conjugats d'ubiquitina: 1) proteolisi de determinades proteïnes, 2) reparació del DNA, 3) progressió a través del cicle



cel.lular, 4) resposta a l'estrés. Totes aquestes funcions resulten alterades en absència de conjugació d'ubiquïtina.

La ubiquïtina està codificada per dos tipus de gens (Fig. 1): els gens de poliubiquïtina que codifiquen poliproteïnes formades per un nombre variable de molècules d'ubiquïtina unides per emllaços Gly-Met, i els gens que codifiquen molècules híbrides d'ubiquïtina unida, en el seu extrem

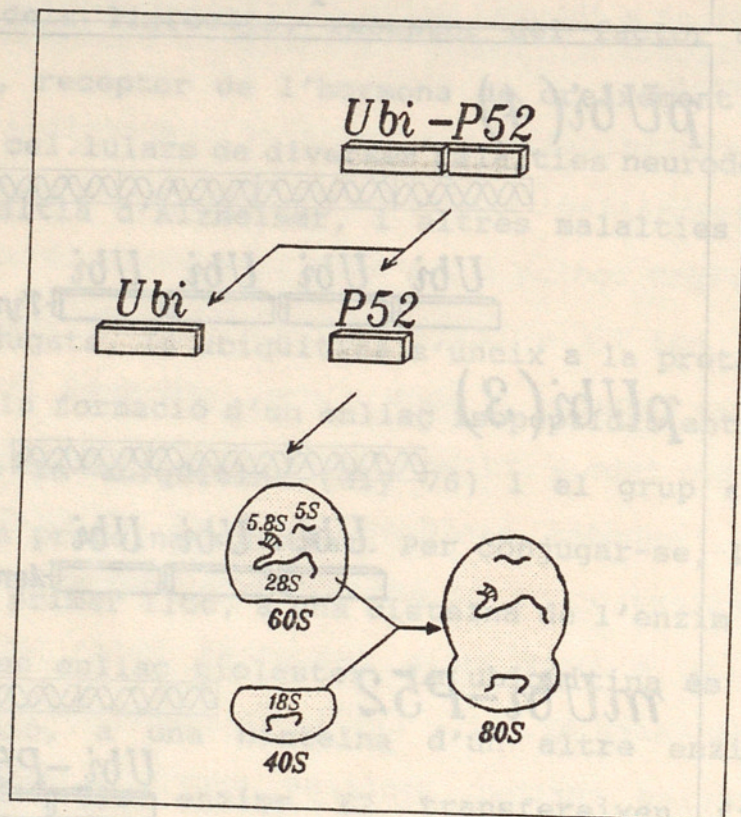


Fig. 2. La proteïna bàsica de 52 aminoàcids de l'híbrid ubiquïtina-P52 s'ha demostrat que és una proteïna que forma part i facilita la biogènesi dels ribosomes.

carboxiterminal, a una proteïna bàsica de 52 o 76-80 aminoàcids. Recentment s'ha demostrat que aquestes proteïnes bàsiques són proteïnes ribosòmiques que formen part de les subunitats 60S i 40S (Fig. 2). La proteïna ribosòmica de 52 aminoàcids resulta totalment essencial per al creixement cel.lular.



En aquesta comunicació presentem la seqüència d'una proteïna bàsica de 52 aminoàcids que és idèntica a la corresponent proteïna humana (SALVESEN *et. al.*, 1987). La identitat de seqüències indica que, al igual que la ubiquitina, aquestes

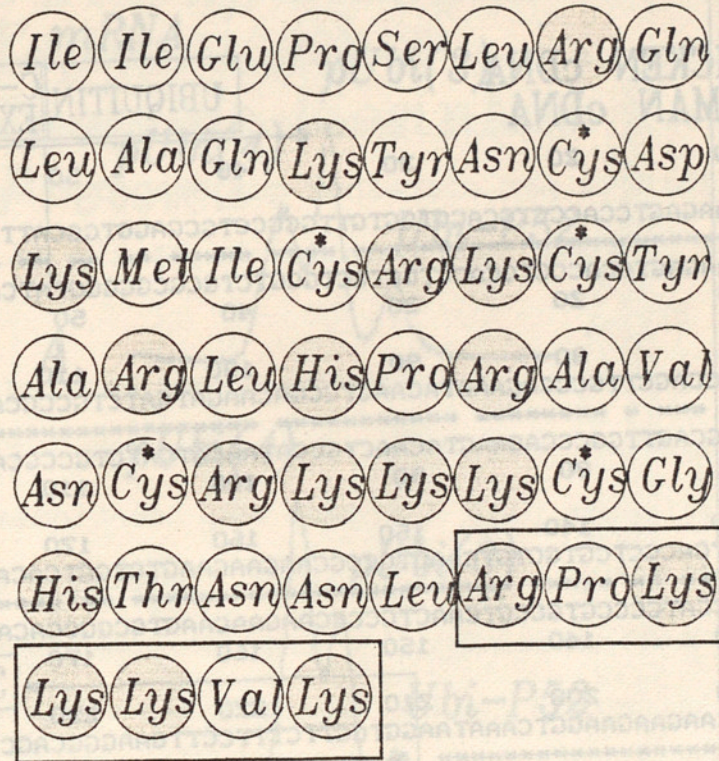


Fig. 3. La proteïna P52 és una proteïna bàsica (residus ombrejats) que posseeix dominis d'unió a àcids nucleics, delimitats per cisteïnes (\*) que es poden unir a metalls ("Zn fingers") i, a més, una possible seqüència de translocació nuclear (emmarcada).

proteïnes s'han conservat extraordinàriament al llarg de l'evolució.

El RNAm de la proteïna híbrida precursora de la proteïna bàsica i de la ubiquitina és present al final de l'espermogènesi, en absència de proliferació cel·lular. Juntament amb el RNAm de la proteïna híbrida, es troben a les espermatides del gall RNA missatgers corresponents als dos gens







es varen homogeneitzar en presència d'isotiocianat de guanidina i centrifugar a través de ClCs (AUSUBEL *et. al.*, 1989). A partir d'una genoteca de cDNA d'espermàtides de gall en M13mp9 (OLIVA *et. al.*, 1988) es va identificar, amb la sonda del gen

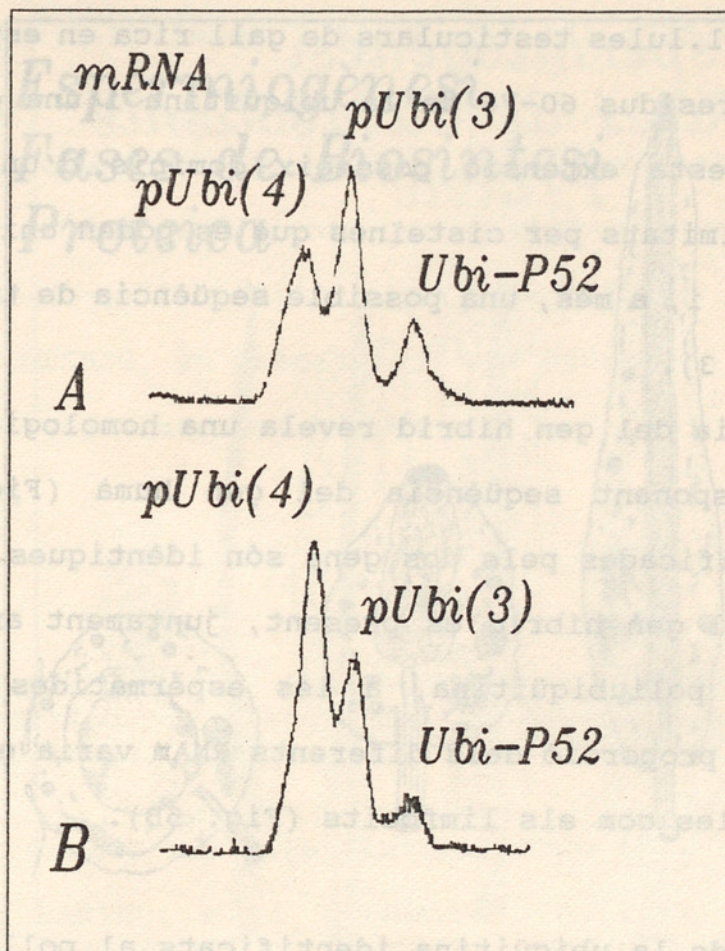


Fig. 5. Densitometria dels Northern. El RNAm del gen híbrid és present, juntament amb els RNAm dels gens de poliubiquitina, a les espermatides allargades (A). La proporció dels diferents RNAm varia en relació a altres cèl.lules com els limfòcits (B).

de la ubiquitina (MEZQUITA *et. al.*, 1987), un clon positiu que contenia part del gen de la ubiquitina més una extensió C-terminal. El DNA d'aquest clon fou seqüenciat utilitzant el mètode dels dideoxis,  $^{35}\text{S}$ -ATP i la T, polimerasa, seguint el protocol recomanat per Pharmacia LKB Biotechnology. Les



seqüències foren analitzades en gels d'acrilamida al 6% (MEZQUITA et. al., 1985).

### Resultats.

Un clon aïllat d'una genoteca de cDNA, obtinguda d'una població de cèl.lules testiculars de gall rica en espermatides, codifica els residus 60-76 de la ubiquïtina i una extensió C-terminal. Aquesta extensió posseeix dominis d'unió a àcids nucleics, delimitats per cisteïnes que es poden unir a metalls ("Zn fingers") i, a més, una possible seqüència de translocació nuclear (Fig. 3).

La seqüència del gen híbrid revela una homologia del 88,5% amb la corresponent seqüència del gen humà (Fig. 4). Les proteïnes codificades pels dos gens són idèntiques.

El RNAm del gen híbrid és present, juntament amb els RNAm dels gens de poliubiquïtina, a les espermatides allargades (Fig. 5A). La proporció dels diferents RNAm varia en relació a altres cèl.lules com els limfòcits (Fig. 5B).

### Discussió.

Tres gens de la ubiquïtina identificats al pollastre (Fig. 1) s'expressen durant l'espermatogènesi i en altres teixits (MEZQUITA et. al., 1987; MEZQUITA et. al., 1988a i MEZQUITA et. al., 1988b). L'expressió del gen híbrid d'ubiquïtina i proteïna bàsica ribosòmica és característica de les fases de proliferació cel.lular en altres models, mentre que els gens de poliubiquïtina s'expressarien en fases no proliferatives (FINLEY et. al., 1987). A les espermatides, durant el procés d'elongació, és molt abundant el reticle endoplasmàtic rugós. Aquest fet pot estar relacionat amb la síntesi molt activa de glicoproteïnes de la membrana plasmàtica, la superfície de la



qual augmenta considerablement durant aquesta fase. La formació de ribosomes per a la biosíntesi d'aquestes o d'altres proteïnes (protamina) requeriria l'expressió del gen híbrid per a la formació de ribosomes. Es desconeix el significat de



Fig. 6. Spermiogènesi del gall (Xia *et. al.*, 1986). Fases d'elongació de les espermatides en les que predomina la biosíntesi proteica.

l'expressió concomitant de la proteïna ribosòmica i de la ubiquitina. S'ha postulat que la ubiquitina podria estabilitzar la proteïna ribosòmica abans de la seva incorporació al ribosoma ((FINLEY *et. al.*, 1989). D'altra banda la proteïna híbrida podria estabilitzar al propi RNAm (REDMAN i RECHSTEINER, 1989). Després de ser alliberada de l'híbrid,



l'ubiquitina es pot conjugar a les glicoproteïnes sintetitzades al ribosoma. Aquest és el cas d'una sèrie de glicoproteïnes de membrana. També és possible que la ubiquitina es conjugui a proteïnes sintetitzades de forma aberrant o en excés.

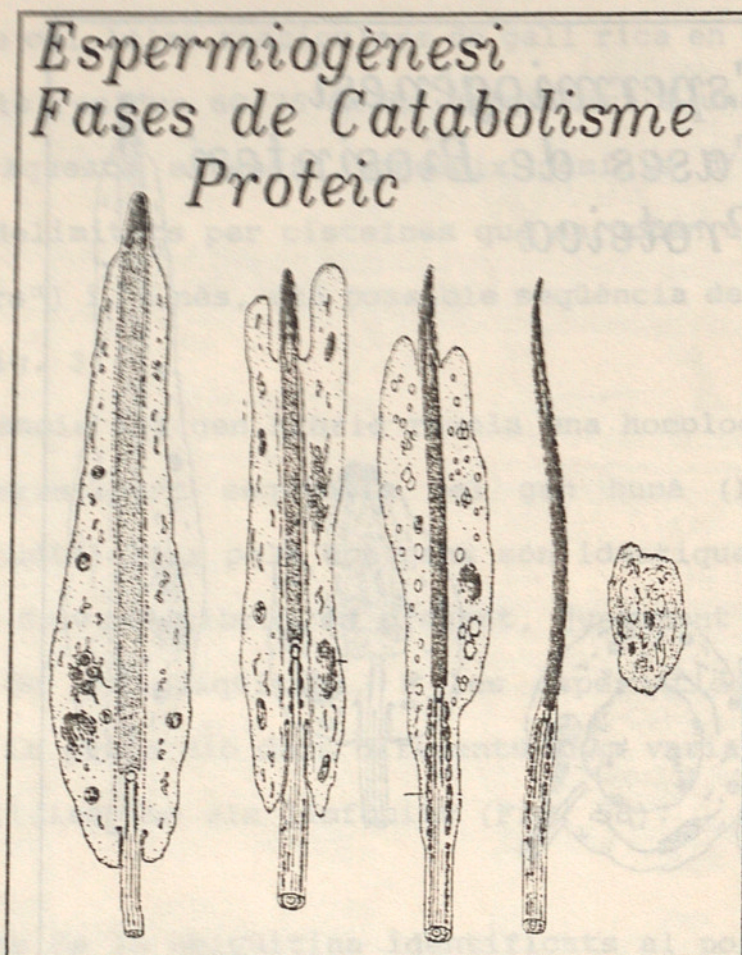


Fig. 7. Spermiogènesi del gall (Xia *et. al.*, 1986). Fases de regressió citoplasmàtica en les que predomina el catabolisme proteic.

A les espermatides la ubiquitina, procedent de l'híbrid o de la expressió dels gens de poliubiquitina, podria participar en mecanismes de degradació selectiva de les proteïnes nuclears durant el reemplaçament de les histones per la procamina (AGELL *et. al.*, 1983; AGELL i MEZQUITA, 1988; SUNG *et. al.*, 1988) i durant els fenòmens de regressió citoplasmàtica (Fig.7 ). També



és possible que la ubiquitina determini canvis estructurals de la cromatina a les espermatides, independents dels processos de degradació proteolítica. L'expressió dels gens de poliubiquitina es considera essencial per al procés d'esperulació del llevat (TREGGER et. al., 1988). Alguns dels processos que tenen lloc a la cromatina i altres estructures cel.lulars poden ser semblants a l'espermatogènesi i a l'esperulació. Els experiments que es porten a terme actualment amb anticossos antiubiquitina per identificar els diferents conjugats (ESTEBAN, en preparació) ens permetran aprofundir en les alternatives abans esmentades.

#### Bibliografia

- AGELL, N. & MEZQUITA, C. (1988) Cellular Content of Ubiquitin and formation of Ubiquitin Conjugates during Chicken Spermatogenesis. Biochem. J. 250, 883-889.
- AUSUBEL F.M. et. al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology. Greene and Wiley Interscience eds.
- FINLEY, D., BARTEL, B. i VARSHAVSKY, A. (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. Nature, 338, 394-401.
- FINLEY, D., OZKAYNAK, E., i VARSHAVSKY, A. (1985) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. Cell, 48, 1035-1046.
- HERSHKO, A. (1988) Ubiquitin-mediated protein degradation. J. Biol. Chem. 263, 15237-15240.
- OLIVA, R. & MEZQUITA, C. (1986) Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. Biochemistry, 25, 6508-6511.
- MEZQUITA, J., OLIVA R. & MEZQUITA, C. (1987) New ubiquitin mRNA expressed during chicken spermiogenesis. Nuc. Acids Res. 15, 9604.



- MEZQUITA, J., CONNOR, W., WINKFEIN, R.J. i DIXON, G.H. (1985) An H1 histone gene from Rainbow Trout (*Salmo gairdnerii*). J. Mol. Evol. 21:209-219.
- MEZQUITA, J. PAU, M. & MEZQUITA, C. (1988) cDNA encoding a chicken ubiquitin-fusion protein identical to the corresponding human protein. Nucl. Acids Res. 16, 11838.
- REDMAN, K.L. i RESCHSTEINER, M. (1989) Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. Nature, 338, 438-440.
- RESCHSTEINER, M. (1988) (ed) Ubiquitin, Plenum Publishing Corp N.Y.
- ROCA, J. i MEZQUITA (1989). Topoisomerase II activity in non-replicating transcriptionally inactive chicken testis late spermatids. EMBO J. In press.
- SALVESEN, G., LLOYD, C. i FARLEY, D. (1987) cDNA encoding a human homolog of yeast ubiquitin 1. Nucleic Acids Res. 15, 5485.
- SCHLESINGER, M.J., i HERSHKO, A. (1988) (ed) The ubiquitin system, Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SUNG, P., PRAKASH, S., i PRAKASH, L. (1988) The RAD 6 protein of *Saccaromyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. Genes & Development, 2, 1476-1485.
- TREGER, J., HEICHMAN, K.A. i MCENTEE (1988) Expression of the yeast UBI4 gene increases in response to DNA-damaging agents and in meiosis. Mol. Cell Biol., 8, 1132-1136.
- XIA, L., CLERMONT, Y., LALLI, M. i BUCKLAND, R.B. (1986) Evolution of the endoplasmic reticulum during spermatogenesis of the rooster: an electron microscopic study. Am. J. Anat. 177, 301-312.