

Acetilación de las histonas durante la espermatogénesis del gallo.

C. Mezquita, R. Oliva y J. Mezquita.

Departamento de Fisiología, grupo de "Fisiología nuclear y diferenciación", Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Casanova 143, Barcelona-36.

Introducción

La función precisa de la acetilación de las histonas del octámero es actualmente desconocida. Existen numerosos datos que avalan la existencia de una correlación entre la acetilación de las histonas y la transcripción. No obstante, algunos datos son discordantes. Por ejemplo, la acetilación afecta a un 40 % de las histonas H3 y H4, mientras que el ADN activo en la transcripción sólo representa alrededor de un 10 % del genoma. Se ha observado una mejor correlación entre la hiperacetilación de la histona H4 y la transcripción. También existe una mejor correspondencia entre el porcentaje de histonas acetiladas con un recambio rápido de sus grupos acetilo y la fracción de cromatina activa en la transcripción.

Nuestro objetivo consistió en determinar el grado de acetilación de las histonas y el recambio de sus grupos acetilo en células germinales de testículo de pollo activas en la transcripción, y en células germinales genéticamente inactivas. Con ello pretendíamos demostrar si la hiperacetilación y el recambio rápido de los grupos acetilo de las histonas están unívocamente relacionados con la transcripción. Los experimentos realizados han demostrado la existencia de hiperacetilación de la histona H4 y de recambio rápido de los grupos acetilo, tanto en células genéticamente activas como en células genéticamente inactivas.

Otro aspecto investigado ha sido el control de la actividad enzimática que desacetila las histonas. Se ha postulado que las HMG 14 y 17 inhiben dicha actividad enzimática y podrían ser responsables de la hiperacetilación de las histonas en los genes activos. Los experimentos realizados no permiti-

tieron confirmar el papel inhibidor de la HMG 17 y demostraron la existencia de un factor activador termoestable que fue identificado como la proteína ubiquitina.

Materiales y Métodos

Gallos "Hubbard White Mountain" de 25-30 semanas de edad, o animales sexualmente inmaduros (8-10 semanas) fueron utilizados en estas investigaciones. Una suspensión de células testiculares (250 ml) fue incubada durante 1 hora a 37°C en un medio que contenía 5 mCi de H³-acetato (Amersham, 300 mCi/mmol) en presencia de cicloheximida. La suspensión celular fue enfriada y se añadió butirato sódico a una concentración 50 mM. Los métodos para determinar el recambio de grupos acetilo, la actividad desacetilasa de las histonas y el aislamiento y separación de los núcleos de células testiculares de gallo, han sido previamente descritos (Oliva et al., 1982, Mezquita et al., 1982, Mezquita y Teng, 1977).

Las histonas fueron extraídas con SO₄H₂ 0.2M y precipitadas con 5 volúmenes de etanol. La separación electroforética se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-SDS (gradiente exponencial 10 %- 16 %) o en geles de poliacrilamida acético/urea conteniendo triton X-100. La cuantificación de la radioactividad se realizó por fluorografía a -70°C durante 15 días utilizando films Fuji de rayos-X presensibilizados. La preparación del activador de la desacetilasa de histonas y los métodos de purificación de la HMG 17 y ubiquitina han sido previamente descritos (Mezquita et al., 1982).

Resultados

Los análisis electroforéticos de las histonas extraídas de testículo inmaduro y de testículo maduro pusieron de manifiesto que, en éste último, la histona predominantemente acetilada es la H4, y que en ella abundan las formas tri y tetraacetiladas (Fig.1 A y B).

Separando los diferentes tipos de núcleos de células testiculares por el método de velocidad de sedimentación a fuerza de gravedad unidad, se puso de manifiesto que la acetila-

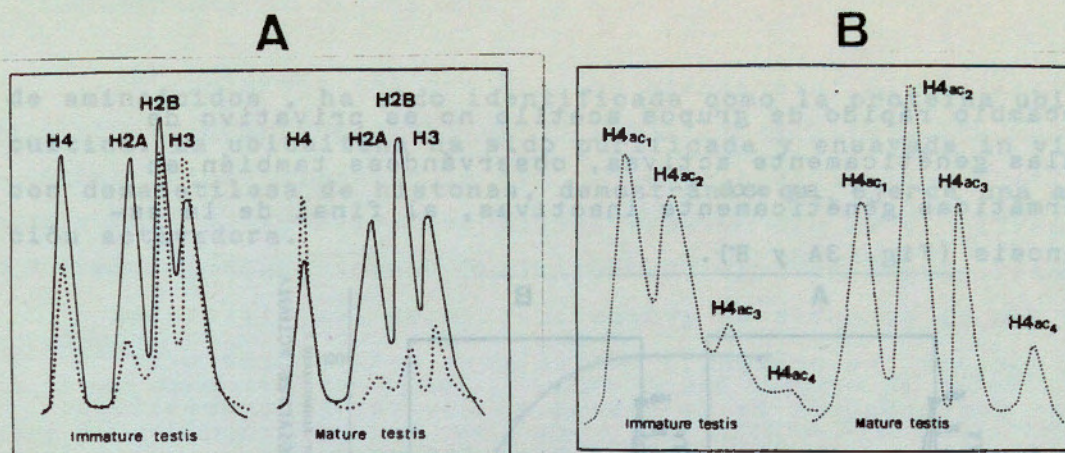


Fig.1 : Acetilación de las histonas extraídas de testículo inmaduro y testículo maduro. A : (—) Densitometría de geles de SDS-poliacrilamida teñidos en Amido black. (---) Densitometría del fluorograma. B : Dentometría de fluorograma correspondiente a la histona H4.

ción máxima de la histona H4 se alcanza al final de la espermiogénesis, siendo también máxima en esta fase la cantidad de histona H4 tetraacetilada. La forma diacetilada predomina, sin embargo, en las células activas en la replicación (Fig. 2 A y B).

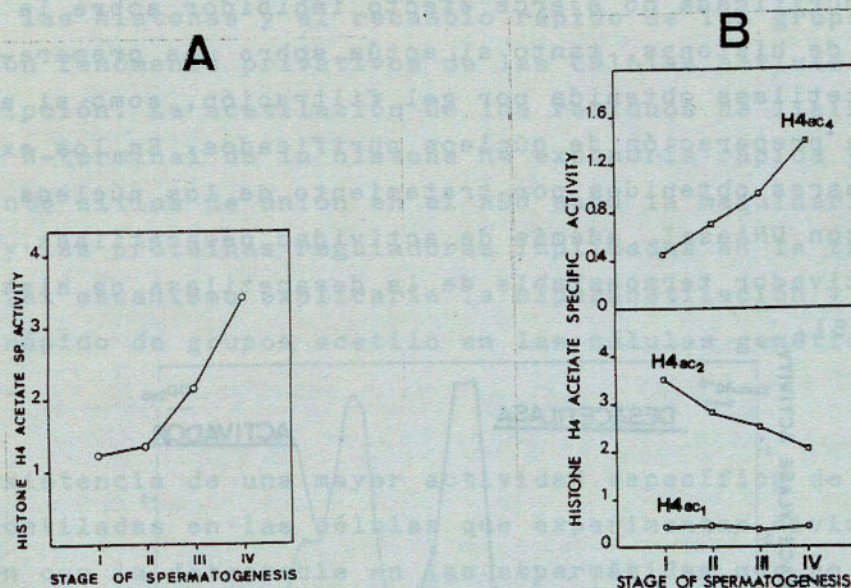


Fig.2 : A.- Actividad específica del ^3H -acetato incorporado a la histona H4 a lo largo de la espermatogénesis. B.- Incorporación de ^3H -acetato en las distintas subespecies de H4 acetilada. I y II : Núcleos meióticos y premeióticos. III : Espermátidas primitivas. IV : Espermátidas en los últimos estadios de diferenciación.

El recambio rápido de grupos acetilo no es privativo de las células genéticamente activas, observándose también en las espermatidas genéticamente inactivas, al final de la espermiogénesis (Fig. 3A y B).

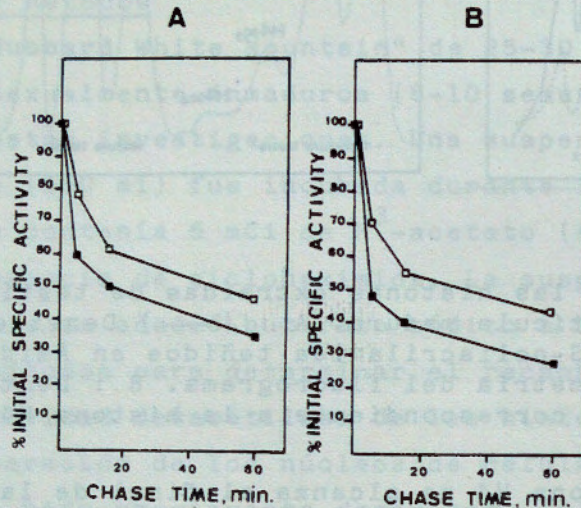


Fig. 3 : Recambio de grupos acetilo en histonas totales (A) y en la histona H4 (B), en células activas de la transcripción (□—□—□) y en células inactivas (■—■—■).

La HMG17 purificada no ejerce efecto inhibitor sobre la desacetilasa de histonas, tanto si actúa sobre una preparación de desacetilasa obtenida por gel filtración, como si actúa sobre una preparación de núcleos purificados. En los extractos nucleares obtenidos por tratamiento de los núcleos purificados con DNAasaI, además de actividad desacetilasa, existe un activador termoestable de la desacetilasa de histonas (Figs. 4 y 5).

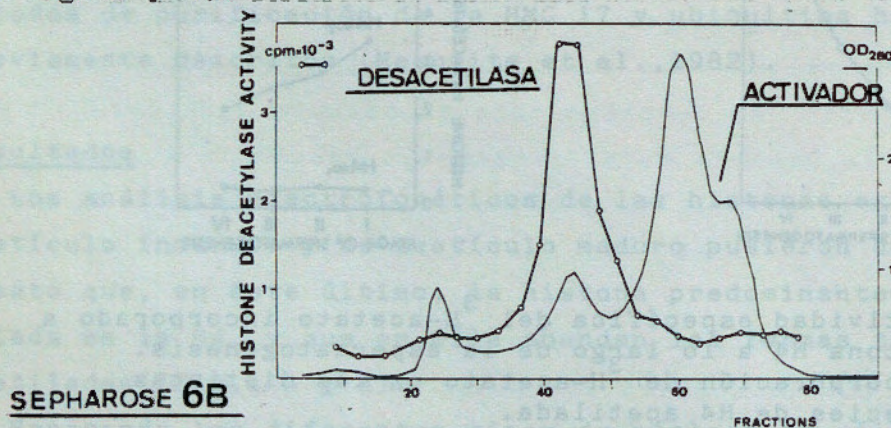


Figura 4 El activador es una proteína de peso molecular 9000 (determinada por gel filtración y movilidad electroforética) que, por su termoestabilidad, resistencia a las proteasas, y análisis

de aminoácidos, ha sido identificada como la proteína ubiquitina. La ubiquitina ha sido purificada y ensayada in vitro con desacetilasa de histonas, demostrándose que ejerce una acción activadora.

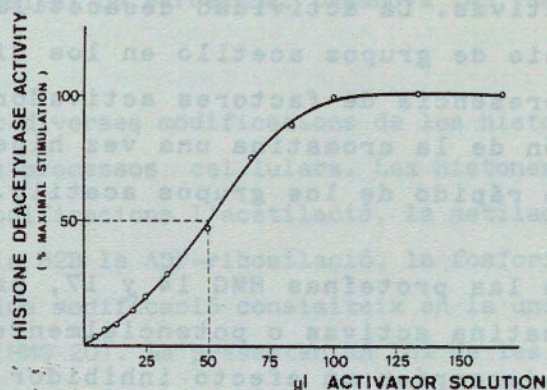


Fig.5 : Efecto del activador termoestable sobre la desacetilasa de histonas.

Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que la hiperacetilación de las histonas y el recambio rápido de los grupos acetilo no son fenómenos privativos de las células activas en la transcripción. La acetilación de los residuos de lisina en el dominio N-terminal de la histona H4 expondría rápida y reversiblemente sitios de unión en el ADN para la maquinaria enzimática y las proteínas reguladoras implicadas en la transcripción. Tal mecanismo explicaría la hiperacetilación y el recambio rápido de grupos acetilo en las células genéticamente activas.

La existencia de una mayor actividad específica de las formas diacetiladas en las células que experimentan división, en relación con la detectable en las espermátidas que no se dividen, concuerda con observaciones realizadas en otros sistemas. El máximo de H4 diacetilada corresponde a la fase S de *Physarum polycephalum* y células HTC. La hiperacetilación de la histona H4 en las espermátidas, podría desempeñar una función semejante a la mencionada anteriormente, salvo que, en este caso, la exposición de sitios de unión en el ADN tendría por

objeto facilitar la interacción del ADN con las proteínas nucleares básicas sintetizadas al final de la espermiogénesis. Los resultados obtenidos demuestran que el recambio rápido de grupos acetilo no es una característica exclusiva de las células genéticamente activas. La actividad desacetilasa guarda relación con el recambio de grupos acetilo en los diferentes tipos de núcleos. La presencia de factores activadores o la particular conformación de la cromatina una vez hiperacetilada explicaría el recambio rápido de los grupos acetilo.

Se ha postulado que las proteínas HMG 14 y 17, presentes en regiones de la cromatina activas o potencialmente activas en la transcripción, ejercerían un efecto inhibitor sobre la desacetilasa de histonas. Si este mecanismo operara realmente, las regiones de la cromatina activas en la transcripción se caracterizarían por hiperacetilación y recambio lento del grupo acetilo. Nuestras investigaciones no han confirmado el efecto inhibitor de la proteína HMG17 sobre la desacetilasa de histonas.

La ubiquitina, que ha sido localizada en regiones de la cromatina activas en la transcripción, podría actuar en sentido opuesto al postulado para la HMG17, es decir, activando el recambio de grupos acetilo. Durante la condensación de los cromosomas metafásicos, el complejo ubiquitina-histona H2A es disociado enzimáticamente en sus dos componentes y concomitantemente se ha observado un incremento de actividad desacetilasa. Este es el único fenómeno observado "in vivo" y no existe evidencia de que ambos hechos guarden relación.

Bibliografía

Mezquita, C. & Teng, C.S. (1977) Changea in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis. *Biochem.J.* 164, 99-111.

Mezquita, J., Chiva, M., Vidal, S. y Mezquita C. (1982) Effect of high mobility group nonhistone proteins HMG 20 (ubiquitin) and HMG 17 on histone deacetylase assayed in vitro. *Nucleic Acids Res* 10, 1781-1797.

Oliva, R. y Mezquita, C. (1982). Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acid Res* 10, 8049-8059.