

Variacions de la proteïna uH2A (A24) al llarg de l'espermatogènesi del gall

N. Agell

Departament de Fisiologia, grup de "Fisiologia nuclear i diferenciació", Fac. de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barna-36.

Introducció

S'han observat diverses modificacions de les histones del octàmer al llarg dels diversos processos cel·lulars. Les histones H4 i H3 presenten com a principals modificacions l'acetilació, la metilació i la fosforilació; en canvi la H2A i la H2B la ADP-ribosilació, la fosforilació i la ubiquitinació. Aquesta última modificació consisteix en la unió covalent del polipeptid ubiquitina (HMG 20). La presenten un 10% de les H2A al fetge de rata normal donant lloc al conjugat covalent anomenat uH2A o A24 (Goldknopf, Busch, 1978). També s'ha descrit la unió covalent de dos ubiquitines a una sola molècula de H2A. La ubiquitinació de la H2B (uH2B), no es tan important quantitativament.

S'han detectat variacions en els nivells nuclears de uH2A que s'han relacionat tant amb canvis estructurals de la cromatina com amb canvis d'activitat gènica: la proporció de uH2A baixa al nucleol de fetge de rata hipertrofic (Ballal, Busch 1973), durant la mitosi (Matsui et al 1979), durant la maduració dels eritròcits de pollastre (Goldknopf et al 1980)...

S'ha comprovat que la ubiquitinació de una o de les dos H2A d'un nucleosoma té poca influència en l'estructura de la cromatina a nivell del nucleosoma a nivell individual (Kleinschmidt, Martinson, 1981). Si bé si que pot prevenir la formació d'estructures cromosòmiques d'ordre superior al modificar les interaccions entre els nucleosomes (Matsui et al 1979; Levinger, Varshausky, 1982).

S'ha vist també que als eritròcits, la unió de la ubiquitina a certes proteïnes citoplasmàtiques és un senyal per a la degradació d'aquestes proteïnes i es podria pensar que la unió d'aquell polipèptid a la histona H2A tingués un paper semblant en el moment de desferse el nucleosoma (Hershko et al 1980). En *Drosophila*, un de cada dos nucleosomes de gens altament transcritstenen la H2A modificada com uH2A, en canvi, després d'un shock tèrmic que fa que els gens es transcribeixin extremadament desapareix tant la ubiquitinació de la H2A com l'organització nucleosòmica (Levinger, Varshausky 1982).

L'espermatogènesi és un model adequat per a estudiar una possible funció de la proteïna uH2A a causa dels importants canvis estructurals i funcionals que tenen lloc a la cromatina al llarg del procés de diferenciació (Mez-

quita, Teng 1977): 1) els espermatòcits primaris són cèl.lules tetraploïdes amb cromosomes meiòtics transcripcionalment actius. 2) Les cèl.lules meiòtiques i premeiòtiques com les espermatogonies i espermatides rodones tenen la cromatina interfàsica, també activa transcripcionalment. 3) La cromatina de les espermatides que es diferencien cap a espermatozous (espermiogènesi), es desempaqueta (major exposició del ADN) abans d'arribar a la fase final on s'han reemplaçat les histones per la protamina (proteïna molt bàsica), donant lloc a un bloqueig total del ADN al nucli dels espermatozous.

Materials i mètodes

S'han utilitzat galls de la raça Hubbard White Mountain. Els nuclis s'han aïllat a partir de teixit testicular fresc i s'han separat per sedimentació a gravetat unitat, segons el procediment descrit previament (Mezquita, Teng 1977). El tampó utilitzat ha estat però: 10mM Tris-HCl pH 8.0, $MgCl_2$ 10mM, KCl 25mM, espermidina 0.14mM. S'ha utilitzat com a inhibidor $NaHSO_3$ 50mM.

Els nuclis d'espermàtides resistent al EDTA s'han preparat a partir de nuclis purificats mitjançant tractament amb EDTA 0.02M, seguit de suspensió en solucions de força iònica decreixent (10mM i 2mM Tris-HCl pH 7.5) i homogeneïtzació a velocitat màxima durant 5 min en un homogeneïtzador Sorvall.

Les proteïnes solubles en H_2SO_4 0.4N s'han analitzat electroforèticament en gels de poliacrilamida/àcid acètic/urea segons Panyim i Chalkley (1969); en gels de SDS en gradient de poliacrilamida (10%-16%) segons O'Farrell (1977); o en gels bidimensionals (1ª dimensió àc. acètic/urea i 2ª dimensió SDS). El conjugat uH2A es va obtenir per electroforesi preparativa en gels de poliacrilamida SDS (Bernabeu et al 1980).

Resultats

1. Obtenció i identificació de la proteïna uH2A .

Al fer una electroforesi en gels de poliacrilamida/àc. acètic/urea de les proteïnes solubles en H_2SO_4 0.4N i insolubles en PCA 5%, de nuclis d'espermàtides avançades s'observa una banda majoritària a part de les histones del octàmer H4, H3, H2A i H2B. Aquesta banda es descomposa en dues al fer un segon recorregut electroforètic en gels d'acrilamida SDS. La majoritària de les dues té una mobilitat, i per tant un pes molecular determinat en gels d'acrilamida/SDS, igual al descrit

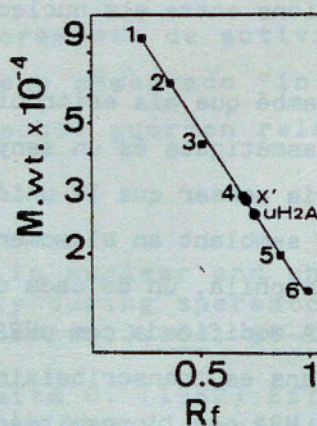


Figura 1. Determinació del pes molecular de la proteïna uH2A en gels de poliacrilamida/SDS

per la proteïna uH2A (GoldKnopf, Busch 1978). Fig 1 i 2.

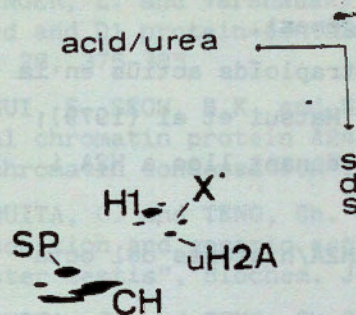


Figura 2. Electroforesi bidimensional de les proteïnes solubles en SO_4H_2 0,4N de nuclis d'espermàtides avançades.

L'anàlisi d'aminoàcids d'aquesta proteïna obtinguda per electroforesi preparativa en gels d'acrilamida SDS concorda amb el de la uH2A de lletó de vedella (Goldknopf, Busch 1978) i amb el corresponent a H2A+ubiquitina. Taula I.

La proteïna uH2A no es detecta als nuclis tetraploïds dels espermatoïts primaris (estadi I), es detecta molt lleugerament a la fracció que conté els nuclis d'espermatoïts secundaris i espermatoïtes (estadi II), representa un 1.7% del

total de les histones del octàmer als nuclis d'espermàtides rodones (estadi III) i arriba al valor de 3.5% de les histones del octàmer als nuclis de les espermàtides allargades (estadi IV). Fig 3.

Als nuclis d'espermàtides resistents al EDTA, que són espermàtides molt avançades en les que les histones del octàmer estan ja pràcticament reemplaçades per la protamina, el percentatge de proteïna uH2A en relació a les histones del octàmer que queden és del ordre del 10%-12%. No es detecta uH2A als nuclis d'espermatozous quan tota la nucleohistona ha sigut reemplaçada per nucleoprotamina (Mezquita, Teng 1977).

	A	B	C
TRP	0,0	0,0	0,0
LIS	9,4	11,3	10,3
HIS	2,1	2,4	2,4
ARG	6,4	7,4	7,9
ASX	8,3	7,3	7,3
THR	5,0	6,5	5,9
SER	8,0	4,5	3,4
GLX	14,6	12,3	11,8
PRO	5,4	5,6	3,9
GLI	9,4	9,2	8,9
ALA	8,4	9,6	9,4
VAL	5,9	4,9	5,9
MET	2,5	0,3	0,5
ILEU	3,6	5,8	6,4
LEU	6,5	10,9	12,3
TYR	1,8	1,3	2,0
PHE	2,4	0,9	1,5

Taula I. Anàlisi d'aminoàcids (% mol) de la proteïna uH2A de testicle de gall (A); de la proteïna uH2A de lletó de vedella (B) i del complexe H2A i ubiquitina (C).

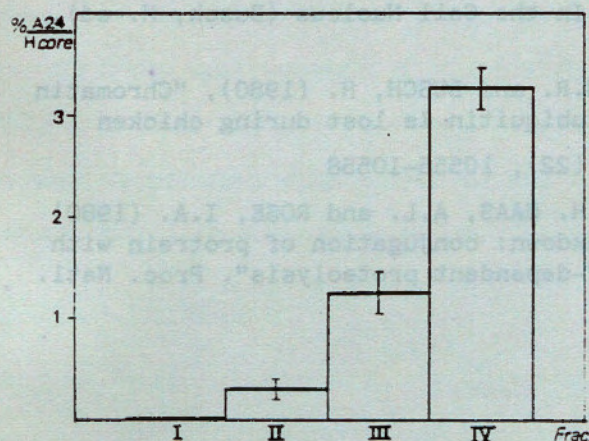


Fig. 3. Canvis en el contingut nuclear de la proteïna uH2A durant l'espermatoïtes del gall.

Discussió

Hem observat un augment important en la quantitat de proteïna uH2A respecta les histones del octàmer al llarg de l'espermatogènesi.

La manca d uH2A en els espermatòcits primaris tetraploïds actius en la transcripció, concorda amb els resultats obtinguts per Matsui et al (1979), de que a les cèl.lules en metafase l'A24 es desconjuga donant lloc a H2A i ubiquitina.

A les espermatides rodones trobem uns valors de uH2A/histones del octàmer normals per cèl.lules interfàsiques.

Els valors més elevats per aquesta relació que s'obtenen a les espermatides allargades van acompanyats d'un grau elevat d'exposició del ADN (Mezquita, Teng 1977a i b), de hiperacetilació de la H4 amb un ràpid recanvi dels grups acetil (Oliva, Mezquita 1982), i d'un augment de les HMGs 1 i 2. Aquests resultats recolzarien la hipòtesi de que la ubiquitinació de la H2A és un mecanisme per afavorir la relaxació de la cromatina permeten així la sortida de les histones i l'entrada de la protamina als últims estadis de l'espermatogènesi.

La falta doncs de uH2A en els cromosomes meiòtics actius en la transcripció i l'alt contingut a les espermatides allargades amb la cromatina relaxada però inactiva transcripcionalment sugereix que la uH2A té un paper estructural no relacionat únicament amb l'activitat gènica.

No s'ha de descartar però que la ubiquitinació de la H2A representi un mecanisme controlat de proteolisi d'aquesta histona al moment de perdre la organització del nucleosoma als últims estadis de l'espermiogènesi.

Bibliografia

- BALLAL, N.R. and BUSCH, H. (1973), "Two-dimensional gel electrophoresis of acid soluble nucleolar proteins of Walker 256 carcinosarcoma, regeneratin liver", *Cancer Resaerch* **33**, 2732-2743
- BERNABEU, C. , SANCHEZ-MADRID, F. and AMILS, R. (1980), "Recovery of pure ribosomal proteins from stained gels", *Eur. J. Biochem.* **109**, 285-290
- GOLDKNOPF, I.L. and BUSCH, H. (1978) In the Cell Nucleus (Busch, H. ed), part C, 148-180. Academic Press, N.Y.
- GOLDKNOPF, I.L. WILSON, G., BALLAL, N.R. and BUSCH, H. (1980), "Chromatin conjugate protein A24 is cleaved and ubiquitin is lost during chicken erythropoyesis", *J. Biol. Chem.* **255**, (22), 10555-10558
- HERSHKO, A., CIECHANOVER, A. HELLER, H. HAAS, A.L. and ROSE, I.A. (1980) "Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protrein with mulyple chains of polypeptide of ATP-dependent proteolysis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**,(4), 1783-1786

- KLEINSHMIDT, A.M. and MARTINSON, H.G. (1981), "Structure of nucleosome core particles containing uH2A (A24)", Nucl. Acid. Res. 9,(11), 2423-2431
- LEVINGER, L. and Varshausky, L. (1982), "Selective Arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the Drosophila genome", Cell 28, 375-385
- MATSUI, S. SEON, B.K. and 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 (12), 6386-6390
- MEZQUITA, C. and TENG, Ch. S. (1977a) "Changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis", Biochem. J. 164, 99-111.
- MEZQUITA, C. and TENG, Ch.S. (1977b) "Changes in chromatin structure during spermatogenesis in maturing rooster testis as demonstrated by the initiation pattern of ribonucleic acid synthesis in vitro", Biochem.J. 170, 203-210
- O'FARREL, P.H. and O'FARRELL, P.Z. (1977), "Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic fractionation". Methods in Cell Biology. Ed by Stein, G. Stein, J. and Kleinsmith, L.S. Acad. Press. N.Y. vol XVI, 407
- OLIVA, R. and MEZQUITA, C. (1982), "Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids", Nucl. Acid. Res. 10(24), 8049-8059
- PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969), Arch. Biochem. Biophys. 130-337