

Canvis de composició i estructura de la cromatina durant la diferenciació terminal de les espermatides del gall

M. Chiva

Departament de Fisiologia, Grup de "Fisiologia nuclear i diferenciació"  
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova, 143, B. 36

Introducció

L'espermatogènesi és el procés que condueix una cèl.lula somàtica (espermatogònia) a una cèl.lula diferenciada (espermatozou) la funció més important de la qual és transmetre informació genètica. En la primera part de l'espermatogènesi la cèl.lula mare ( $2n$ ) produeix espermàtides amb la meitat de la dotació cromosòmica ( $n$ ) que tenen el material nuclear disposat igual que les cèl.lules somàtiques (nuclihistona). A la segona part de l'espermatogènesi o espermiogènesi es produeix la diferenciació terminal de les espermatides en espermatozous que presenten un material genètic propi (nucliprotamina).

Els canvis del nucli en aquest últim procés són doncs notables a tots els nivells: el contingut en proteïnes bàsiques varia totalment, mentre que la seva funcionalitat desapareix. Al mateix temps, el canvi de l'organització de les interaccions entre proteïnes i ADN produeix una condensació del nucli que adquireix un tamany molt menor.

Hem estudiat la naturalesa d'aquests canvis de la cromatina a l'espermiogènesi del gall a partir d'una fracció d'espermàtides que representa un estadi molt avançat en la transició nuclihistona-nucliprotamina; El contingut proteic d'aquesta fracció és diferent del de les espermatides joves i de l'espermatozou; el seu comportament en front la nucleasa micrococcal s'aproxima al del espermatozou però es diferencia d'aquest en l'organització de les interaccions ADN-proteïnes.

Material i Mètodes

Material biològic: Gallus domesticus.

Les obtencions i separacions de nuclis les hem fet segons

Mezquita i Teng (1977) i la preparació de la fracció d'espermàtides de transició segons Loir i Lanneau (1978). Per extreure i precipitar les HMGs hem utilitzat els mètodes descrits per Goodwin et al (1977)(1980). Per la purificació de proteïnes hem aplicat els mètodes d'electroforèsi preparativa segons Bernabeu et al (1980). Les digestions amb nucleasa micrococcal d'Staphylococcus aureus les hem efectuat seguint les tècniques de Noll et al (1975). Les tècniques de microscopia electrònica, difracció de ratjos X i anàlisi d'aminoàcids s'han fet segons les pautes habituals.

### Resultats

Caracterització morfològica de les espermàtides de transició. Aquesta població d'espermàtides conté nuclis allargats que si bé es comporten per microscopia electrònica amb una densitat elevada, encara no presenten l'opacitat típica de l'espermatozou de gall. La cromatina està organitzada en grànuls densos de 400-500 Å que comencen a apareixer a la perifèria per omplir finalment tot el nucli; aquests grànuls no augmenten de tamany. El següent estadi ja es mostra opac al microscòpi electrònic.

### Contingut en proteïnes bàsiques.

A la figura 1 es mostra una electroforèsi en gel d'acètic/urea de les proteïnes bàsiques solubles en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,4N i insolubles en PCA al 5% de les espermàtides de transició comparada amb les

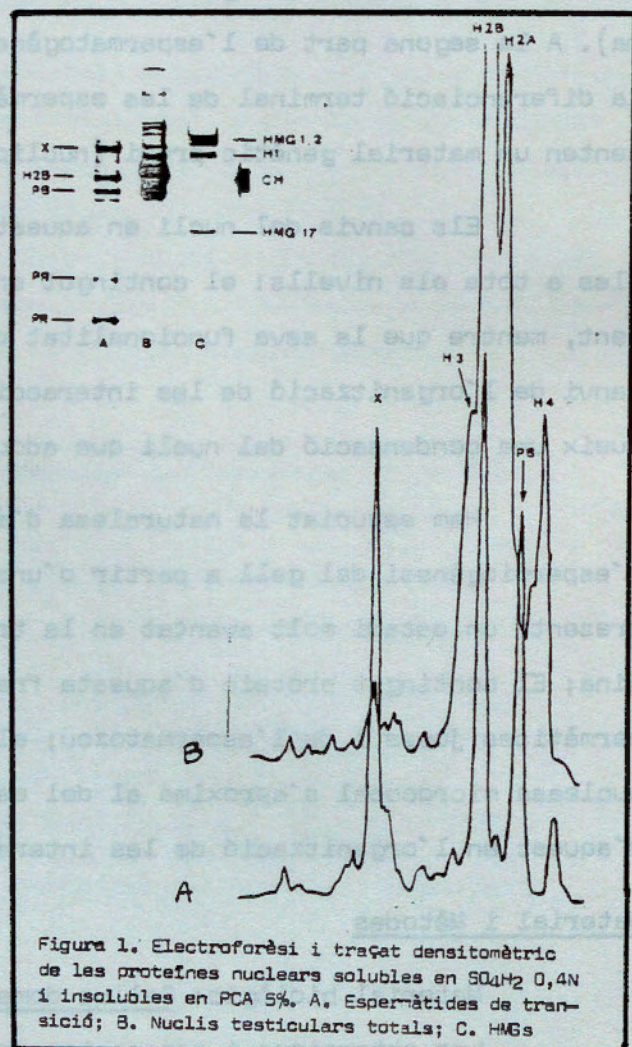


Figura 1. Electroforèsi i traçat densitomètric de les proteïnes nuclears solubles en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,4N i insolubles en PCA 5%. A. Espermàtides de transició; B. Nuclis testiculars totals; C. HMGs

mateixes proteïnes de la resta de nuclis testiculars. Observem que a les espermatides de transició les principals proteïnes bàsiques són la protamina (PR), una proteïna exclusiva d'aquest estadi (PB), la histona H2b i un conjunt de 2

proteïnes (X). La proteïna PB o proteïna de transició, ofereix una composició en aminoàcids particular (taula I): és diferent de les histones i de la protamina en el sentit que un 20% del seu contingut està format per aminoàcids àcids (Glu, Asp). En gels de poli-acrilamida/SDS es comporta segons un pes molecular de  $2 \times 10^4$ . L'extracció amb PCA 5% de la fracció dels nuclis d'espermatides de transició demostra que a més de la histona H1 existeixen 2 proteïnes en una proporció molt més elevada que a la resta del nucli. Aquestes proteïnes les hem identificat per les seves propietats de solubilització, comportament electroforètic (figura 2) i composició en aminoàcids (taula I) com les HMGs d'alt pes molecular: HMG 1 i HMG 2. Aquest tipus de proteïnes apareixen en tot el món eucariota i la seva funció encara està en discussió.

La proteïna més interessant d'aquest estadi es la protamina.

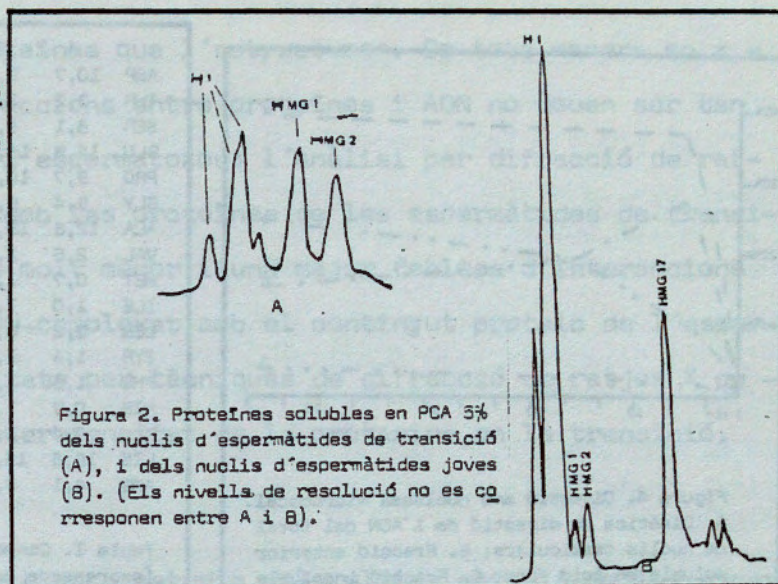


Figura 2. Proteïnes solubles en PCA 5% dels nuclis d'espermatides de transició (A), i dels nuclis d'espermatides joves (B). (Els nivells de resolució no es corresponen entre A i B).

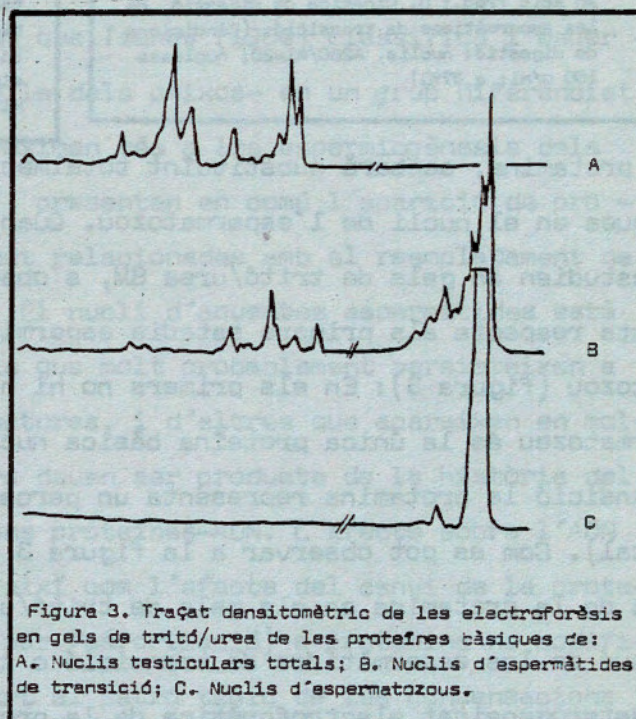


Figura 3. Traçat densitomètric de les electroforèsis en gels de trítid/urea de les proteïnes bàsiques de: A. Nuclis testiculars totals; B. Nuclis d'espermatides de transició; C. Nuclis d'espermatozous.

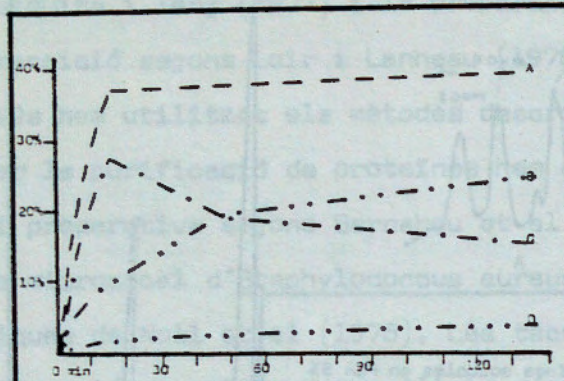


Figura 4. Digestió amb nucleasa micrococcal. A. Cinètica de digestió de l'ADN del total de nuclis testiculars; B. Fracció anterior soluble en àcid fred; C. Fracció insoluble en àcid fred.; D. Cinètica de digestió de les espermàtides de transició. (Condicions de digestió: nuclis, A260/ml=20; nucleasa 100 u/ml; a 37°C)

	A	B	C	D	E
ASP	10,7	9,9	7,6	0,0	2,5
THR	3,2	1,9	4,9	0,0	5,6
SER	5,1	3,2	9,2	16,9	5,6
GLU	14,8	13,7	12,4	0,0	3,7
PRO	9,7	10,3	7,0	3,0	9,2
GLY	9,4	9,3	11,9	9,0	7,2
ALA	12,8	13,2	8,5	3,0	24,3
VAL	2,6	2,5	3,2	1,5	5,4
MET	0,7	1,2	2,2	0,0	0,0
ILE	1,0	1,5	2,2	0,0	1,5
LEU	2,2	2,7	6,5	0,0	4,5
TYR	1,4	1,2	1,6	7,5	0,9
PHE	1,6	1,3	2,2	0,0	0,9
HIS	0,9	1,0	2,2	0,0	0,0
X	0,4	0,3	-	-	-
LIS	18,5	13,7	9,2	0,0	26,8
ARG	4,1	4,3	9,2	58,5	1,8

Taula I. Composició en aminoàcids (expressada en %) de: A. HMG 1 de testicle de gall; B. HMG 2 de testicle de gall; C. Proteïna exclusiva de les espermàtides de transició.; D. Protamina de gall; E. H1 de lletó de vedella.

La protamina, acabarà substituint totalment a les altres proteïnes bàsiques en el nucli de l'espermatozou. Quan les proteïnes total bàsiques s'estudien en gels de tritó/urea 8M, s'observen diferències molt importants respecte als primers estadis espermiogènics i respecte a l'espermatozou (figura 3): En els primers no hi ha protamina mentre que a l'espermatozou és la única proteïna bàsica nucleal. A les espermàtides de transició la protamina representa un percentatge important (70-90% del total). Com es pot observar a la figura 3 el comportament electroforètic de la protamina en els gels de tritó/urea 8M és molt diferent si prové de les espermàtides de transició o si prové de l'espermatozou. L'heterogeneïtat electroforètica de la protamina de la transició pot ser deguda a una modificació postranscripcional de la protamina ja que aquest tipus d'electroforèsi resol formes de proteïna que difereixen en una sola càrrega.

Organització de la cromatina. L'ADN de les espermàtides de transició és resistent a la digestió per la nucleasa micrococcal. A la figura 4 es mostra el nivell de digestió d'aquests nuclis comparada amb la cinètica de digestió del conjunt de nuclis testiculars. El comportament insensible de l'ADN d'aquestes espermàtides demostra una disposició fortament

protetgida per les proteïnes que l'estructuren. De tota manera en aquest estadi les interaccions entre proteïnes i ADN no deuen ser tan intenses com ho són a l'espermatozou: l'anàlisi per difracció de rajos X de fibres d'ADN amb les proteïnes de les espermàtides de transició presenten un ordre molt menor i una major feblesa d'interaccions que les fibres de l'ADN complexat amb el contingut proteic de l'espermatozou. Aquests resultats per tècniques de difracció de rajos X poden ser reflex de l'heterogeneïtat de la protamina en la transició.

### Discussió

S'han fet molt pocs estudis dels últims estadis de les espermiogènesis de les aus. Malgrat que Tsanev (1980) classifica l'espermiogènesi de les aus -junt amb la dels peixos- en un grup diferenciat, els resultats exposats les aproximen més a les espermiogènesis dels grups més superiors (mamífers): presenten en comú l'aparició de proteïnes de transició probablement relacionades amb el reemplaçament de les histones per la protamina. El nucli d'aquestes espermàtides està estructurat en forma de grànuls que molt probablement persisteixen a l'espermatozou. Aquestes estructures, i d'altres que apareixen en moltes espermiogènesis de mamífers deuen ser producte de la història del canvi global de les interaccions proteïnes-ADN. L'efecte sobre l'ADN de les proteïnes de transició així com l'efecte del canvi de la protamina modificada (probablement per fosforilació) a protamina no modificada poden explicar en bona part el patró típic de les condensacions dels nuclis durant la transició cap l'espermatozou.

Bibliografia

- BERNABEU, C. SANCHEZMADRID, F. and AMILS, R. (1980) "Recovery of pure ribosomal protein from stained gels" *Eur. J. Biochem.* 109, 285-290
- GOODWIN, G.H. and JOHNS, E.W. (1978) in *Methods in Cell Biology: "Isolation and purification of the High Mobility Group (HMG) Nonhistone Chromosomal Proteins"* vol XVI, 257-267
- GOODWIN, G.H., BROWN, E., WALKER, J.M. and JOHNS, E.W. (1980) "The isolation of three new High Mobility Group nuclear proteins" *Biochim. Biophys. Acta* 623, 32B-338
- LOIR, M. and LANNEAU, M. (1978) "Partial characterization of Ram Spermatal basic nuclear proteins" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 257-267
- MEZQUITA, C. and TENG, C.S. (1977) "Changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis" *Biochem. J.* 164, 99-111
- NOLL, M., THOMAS, J.O. and KORNBERG, R.D. (1975) "Subunit structure of chromatin" *Science* 187, 187-190
- TSANEV, R. (1980) in *Eukaryotic Gene Regulation: "Role of histones in Cell Differentiation"* vol II 57-112 Kolodny G.M ed. Florida.