

La transició nuclihistona-nucliprotamina com a model de
diferenciació cel.lular i com model per l'estudi del
desenssamblatge del nucleosoma.

R. Oliva i C. Mezquita

Departament de Fisiologia i Bioquímica, Laboratori de
Fisiologia del nucli cel.lular i diferenciació, Facultat
de Medicina, Universitat de Barcelona, Annex Fac. Farmàcia,
Av. Diagonal S/N., 08028 Barcelona.

Abstract:

The nucleohistone-nucleoprotamine transition as a model of
cell differentiation and as a model of nucleosome disassembly.

Nucleosomes are disassembled at the end of rooster spermiogenesis and the DNA is organized in a highly compact nucleoprotamine complex. The replacement of histones by the protamine galline takes place with hyperacetylation of histones in an ambience of high polyamine concentration. Until present the mechanism by which nucleosomes are disassembled were poorly understood, and attempts to mimic "in vitro" the nucleohistone-nucleoprotamine transition had failed. In this paper we show that using protamine galline it is possible to completely displace all the histones from nucleosomes "in vitro" near the physiological protamine/DNA ratio. Salmine has a lower efficiency for extracting histones than the galline protamine. Using salmine we show that extraction is preferential for nucleosomes containing hyperacetylated histones. Spermine increases the efficiency of extraction specially of H3 and H4. The extraction of the histones by the protamine is time dependent.

Introducció:

L'espermiogènesi del gall és aquell procés pel qual l'espermàtida rodona experimenta una metamorfosi per donar lloc al espermatozoide. L'espermàtida rodona és una cèl.lula que té totes les característiques d'una cèl.lula somàtica típica (citoplasma, nucli rodó, ADN en estructura nucleo-

sòmica i dominis heterocroàtics i eucromàtics a la cromatina), mentre que l'espermatozoide és una cèl.lula altament hidrodinàmica que gairabé ha perdut tot el citoplasma, ha reduït el volum nuclear 75 vegades, que ha perdut totes les histones i on l'ADN es manté compacte per la protamina gallina, proteïna amb un 58% de residus positius.

¿Quins són doncs els mecanismes pels quals es produeixen aquests canvis tan marcats en la composició i l'estructura de la cromatina al llarg d'aquest procés de diferenciació cel.lular?. Per tal de que la protamina pugui formar un compacte complex amb l'ADN, primer s'ha de perdre la superestructura de la cromatina i segon els nucleosomas es tenen que dessenssamblar. Aquest procés de desenpaquetament té lloc en presència d'exposició de llocs a nivell de l'ADN tal com s'ha demostrat per la unió de l'actinomicina D i el patró d'iniciació d'ARN "in vitro" (Mezquita and Teng, 1977). El desplaçament de les histones de l'ADN planteja un problema termodinàmic de l'estabilitat de la macromolècula, així que tercer: han d'haver-hi mecanismes que actuïn estabilitzant aquest ADN exposat. Per altra banda resulta essencial la protecció de l'ADN en front de nucleases i agents físics i químics que puguin alterar el missatge genètic vehiculitzat per aquesta cèl.lula. Cuart: La protamina ha d'unir-se a l'ADN d'una forma ordenada i acabar finalment compactant i protegint a l'ADN.

1er) Pèrdua de la superestructura de la cromatina:

Entre els mecanismes que poden actuar relaxant la superestructura de la cromatina, es pot destacar la neutralització de residus positius de les histones mitjançant l'acetilació dels extrems N-terminals. Al llarg de l'espermioogènesi del gall esdevé una hiperacetilació de les histones coincidint amb la transició nuclihistona-nucliprotamina (Oliva and Mezquita, 1982; Mezquita et al., 1983; Oliva, 1984). Aquesta

hiperacetilació de les histones també ha sigut descrita en altres espècies que reemplacen histones per protamines: en la truita (Christensen and Dixon, 1982) i en les rates (Grimes and Henderson 1983, 1984). En les espècies que retenen les histones en el nucli de l'espermatozoide la acetilació de les histones no és detectable (Ruiz Carrillo 1973).

Cal també destacar l'influència que la superhelixitat de l'ADN pot tenir sobre l'organització de dominis de la cromatina. Per l'actuació de les topoisomerases resultan essencials les poliamines (Baldi et al., 1980). Doncs bé durant aquest procés de diferenciació esdevé un increment en la síntesi i nivells de poliamines (Oliva et al., 1982; Oliva, 1983; Oliva, 1984) que d'alguna forma podrien intervenir en els canvis de superhelixitat que potencialment han de donar-se al llarg de l'espermioogènesi (Roca i Mezquita, 1985).

2^{on}) Desenssamblatge del nucleosoma:

Encara que l'espermioogènesi és un model excel·lent amb el que investigar els canvis en la composició nuclear i els estats estructurals i funcionals de la cromatina, fins el present el mecanisme pel qual els nucleosomes eren desenssemblats i les histones completament desplaçades no havia estat comprés. Fent servir nuclis de lletó de badella no és possible desplaçar a les histones per la protamina a les relacions fisiològiques protamina/DNA, i al augmentar la concentració de protamina, tant sols les histones riques en lisina poden ser completament desplaçades (Wong and Marushige, 1975).

J. Bode et al. (1977) varen mostrar que fent servir cromatina, els contactes específics entre les histones dels nucleosomes vehins prevenien el seu desplaçament per la protamina.

Fent servir partícules nucleosòmiques sense superestruc-

tura J. Bode et al. (1980) varen mostrar que tant sols és possible desplaçá el 30% de totes les histones del core a relacions fisiològiques protamina/DNA, si les partícules nucleosòmiques derivaren de cèl.lules hiperacetilades per tractament amb butirat.

S'ha descrit que l'acetilació de les histones a uns nivells mitjos de 12 grups acetat per partícula nucleosòmica, relaxa l'estat compacte d'aquesta i resulta en una reducció de la mobilitat electroforética (J. Bode et al., 1983). Per microscopia electrònica (Bertrand et al., 1984) s'ha mostrat que amb la hiperacetilació de les histones s'indueixen canvis conformacionals que condueixen al desensamblatge del nucleosoma. Així doncs l'acetilació de les histones no tan sols pot tenir un paper en la pèrdua de la superestructura de la cromatina, si nó també en la pèrdua de la subestructura.

En aquest treball mostrem que és possible un desplaçament total de les histones a les relacions protamina/DNA pròximes a les fisiològiques: a) Fent servir la protamina de salmó (Salmina) hem trobat que l'extracció és preferencial per poblacions de nucleosomes contenint histones hiperacetilades, i que les histones hiperacetilades són preferencialment extretes. La primera histona en ser extreta és l'H1, després és la H2A i la H2B, i finalment la H3 i la H4. L'espermina incrementa l'eficiència d'extracció de les histones especialment de la H3 i la H4.

b) Fent servir la protamina homòloga (protamina gallina) hem trobat que presenta una eficiència molt més elevada per desensamblar el nucleosoma que la salmina. En aquest treball mostrem que relacions protamina gallina/DNA pròximes a les fisiològiques provoquen un desplaçament total de les histones.

3^{er}) Estabilització i protecció de l'ADN exposat en la transició nuclihistona-nucliprotamina:

En certs virus s'ha descrit que les poliamines actuen facilitant la condensació de l'ADN (Gosule and Schellman, 1976). L'adició de poliamines exògenas a línies cel.lulars ha mostrat que aquestes actuen provocant una condensació de la cromatina i una reducció del volum nuclear (Nagl et al., 1984). De forma similar l'aument en els nivells de poliamines detectats durant l'espermioogènesi podrien jugar un paper important a l'hora d'actuar estabilitzant les diverses cadenes d'ADN exposades i prevenint la seva tendència entròpica a la expansió i repulsió electrostàtica.

S'han descrit també propietats antimutagèniques per les poliamines en certs sistemes procariòtocs i eucariòtics (Clarke and Shankel, 1975) i per altra banda prevènen l'actuació de les nucleases (Pingoud et al., 1984).

Un altre possible mecanisme de participació de les poliamines en els processos de condensació de l'ADN ve donat pel fet de que les poliamines s'uneixen preferencialment a les regions enriquides en d(C-G) (Igarishi et al., 1982) i estabilitzen el Z-DNA (Behe and Felsenfeld, 1981). El Z-DNA té una tendència a auto-agregar-se (Rich et al., 1984), i les poliamines son els compostos que més fàcilment condensen l'ADN (Base et al., 1984, Thomas and Bloomfield, 1984). La transició B-DNA a Z-DNA pot ser facilitada si el ADN esta superenrotllat negativament. ADN amb superhelixitat negativa ha d'estar present en les espermàtides allargades com una conseqüència de la pèrdua dels nucleosomes (Mezquita, 1985).

4^{er}) Unió de la protamina d'una forma ordenada per un mecanisme termodinàmicament favorable:

Per tal de que la unió de la protamina a l'ADN esdevingui d'una forma ordenada, és necessari que hi hagi algún mecanisme que condueixi la opertura d'aquelles regions de la cromatina

on s'hagi d'unir la protamina. Amb anterioritat varem proposar que a través d'un elevat recanvi de grups acetat, associat a la hiperacetilació de l'H4 que té lloc en les espermàtides allargades (Oliva and Mezquita, 1982), llocs en l'ADN poden ser ràpidament i reversiblement exposats facilitant la unió de proteïnes cromosòmiques a l'ADN.

En les espermàtides de la truita, s'han aïllat dominis de la cromatina enriquits en histones H4 hiperacetilades, (Christensen and Dixon, 1984), fet que apoia la idea de que la hiperacetilació pot tenir la funció de conduir d'una forma ordenada la unió de la protamina.

Tot i que la protamina s'uniria amb preferència a aquelles regions de la cromatina amb histones hiperacetilades, hi ha el perill de que si l'afinitat que presenta per l'ADN és massa elevada, s'unís també a altres regions de la cromatina provocant una prematura compactació i una desorganització en el fenomen de reemplaçament de les histones per protamina.

Una forma d'aconseguir que la protamina presenti una afinitat moderada per l'ADN consisteix en la fosforilació de les seves serines. En aquest treball mostrem que quan la protamina s'està unint a l'ADN en les espermàtides allargades, es troba en un cert grau de fosforilació. El grau de fosforilació de la protamina decreix a les fases finals de l'espermioogènesi i és pràcticament indetectable en els espermatozoides.

Mètodes:

La preparació de suspensions cel·lulars, marcatge amb ^3H -acetat i separació de les cel·lules testiculars s'ha fet com s'ha descrit prèviament (Oliva et al., 1982; Oliva and Mezquita, 1982).

La preparació de nuclis s'ha fet fent servir Bisulfit 50 mM., Citric 10 mM. (pH 2,4) i PMSF 1 mM. per tal d'assegurar un bloqueig total de la proteolisi en un tampó que contenia cations divalents (10 mM. CaCl_2 i 10 mM. MgCl_2), 15 mM. Butirat (per prevenir desacetilació de les histones) i sacarosa 0,1 M. Aquest medi té a més l'aventatge de que evita la pèrdua de les histones en comparació amb altres mètodes (Krause, 1978).

Preparació de nucleosomes: Dues poblacions de nucleosomes varen ser preparades per digestió amb nucleasa micrococcal tal com s'ha descrit (Bode et al. 1983). Les dues poblacions diferien en el contingut de proteïnes no histones i d'histones acetilades.

Electroforesis preparativa de nucleosomes: Hem fet servir el mètode electroforètic en gel no desnaturalitzant descrit per Bode et al. (1983) per aconseguir separar cada població de nucleosomes en subpoblacions que difereixen en el grau d'acetilació i presència de no histonas. Hem introduït les millores de que aquest mètode sigui preparatiu (es poden carregar fins a 20 ml. de mostre) i de que es puguin obtenir directament els nucleosomes quan surten del gel mitjançant una càmera d'elució acoplada a la base del gel.

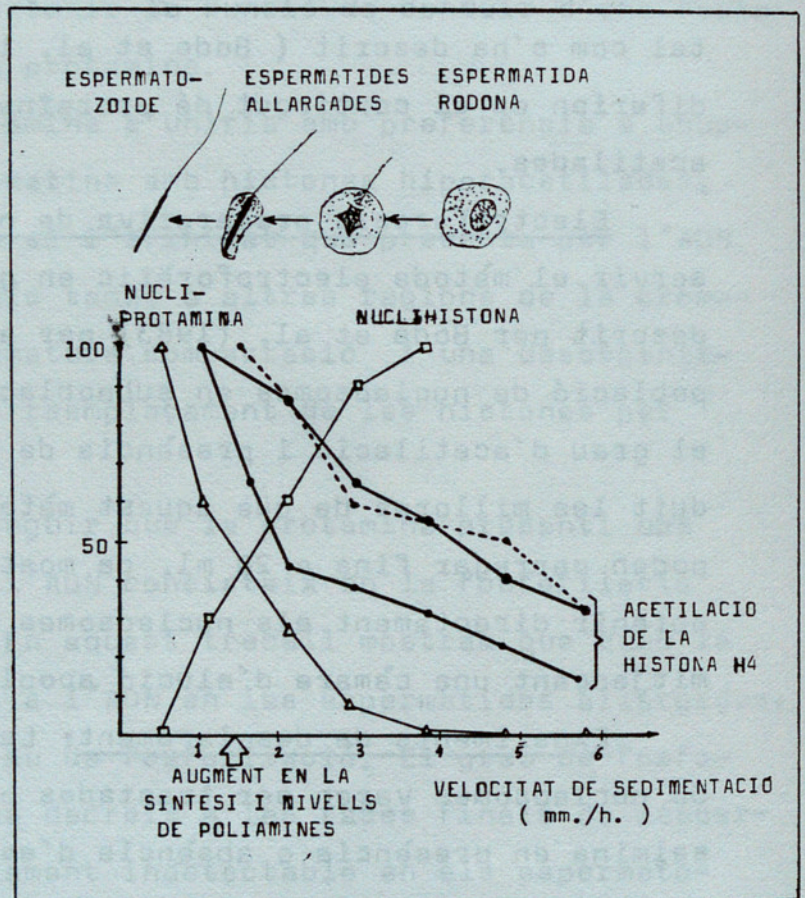
Experiments de desplaçament: Les diverses poblacions de nucleosomes varen ser tractades per protamina gallina o salmina en presència o absència d'espermina per diversos temps i centrifugades a 24.000 g. 10 min.. Relacions en pes protamina gallina/ ADN de 0,5 son suficients per fer que tot l'ADN sigui precipitable. Les histones extreteres del sobrenadant i les histones no extreteres del sediment varen ser analitzades tant en gels de SDS-acrilamida 18% com en gels de acrilamida-acètic-trito-urea.

Resultats i discussió:

La determinació de la cronologia dels canvis proteics nucleals i d'acetilació durant l'espermiogènesi mostra que esdevé una hiperacetilació de les histones coincidint amb el desencaquetament de la cromatina i el desenssamblatge del nucleosoma (Fig. 1 i 2). Aquesta transició nuclihistona-nucliprotamina té també lloc en presència de nivells elevats de poliaminas (fig.1).

Figura 1.:

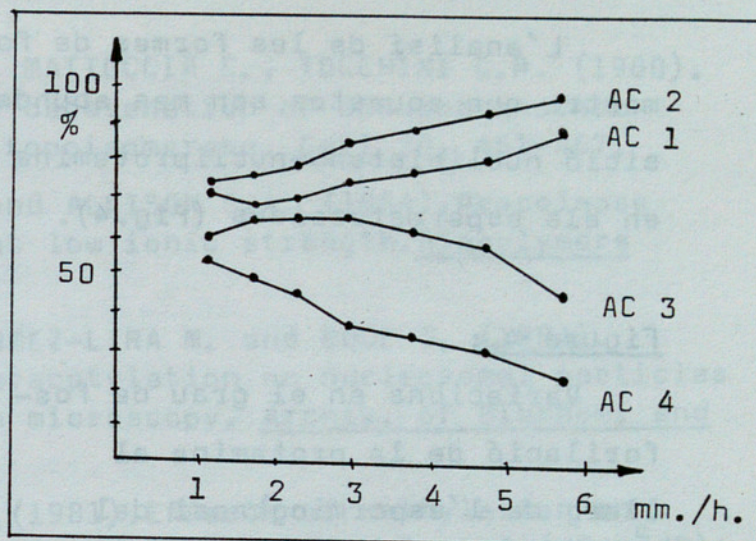
Canvis de composició proteica en el nucli cel.lular al llarg de l'espermiogènesi del gall.



Dels experiments "in vitro" en els que es mimetitzaven algunes de les condicions del desplaçament "in vivo" de les histones per la protamina mostraren que l'acetilació de les histones i la presència d'espermina són factors que faciliten el desenssamblatge del nucleosoma.

Figura 2.:

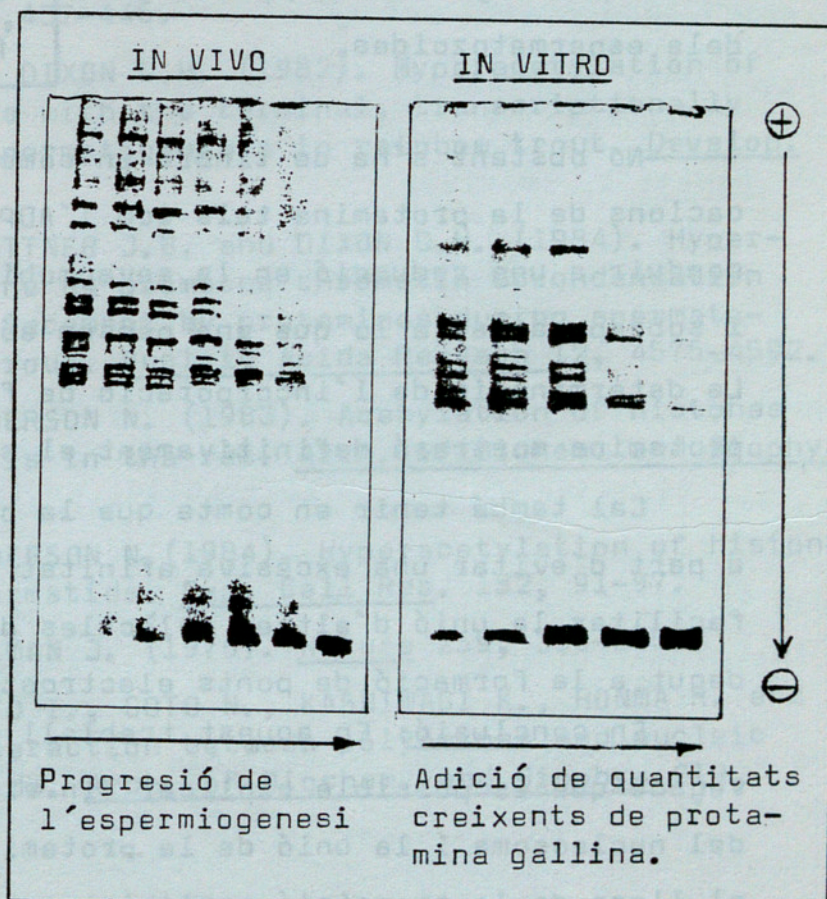
Variacions en l'incorporació de ^3H -acetat a la histona H4 al llarg de l'espermiogènesi del gall.



Fent servir protamina gallina hem trobat que l'eficiència amb la que extrau les histones és molt superior a la capacitat d'extracció de la salmina. Relacions pròximes a les fisiològiques de protamina gallina són suficients per produir un desplaçament total de les histones (fig.3), fet que fins el present no s'havia aconseguit.

Figura 3.:

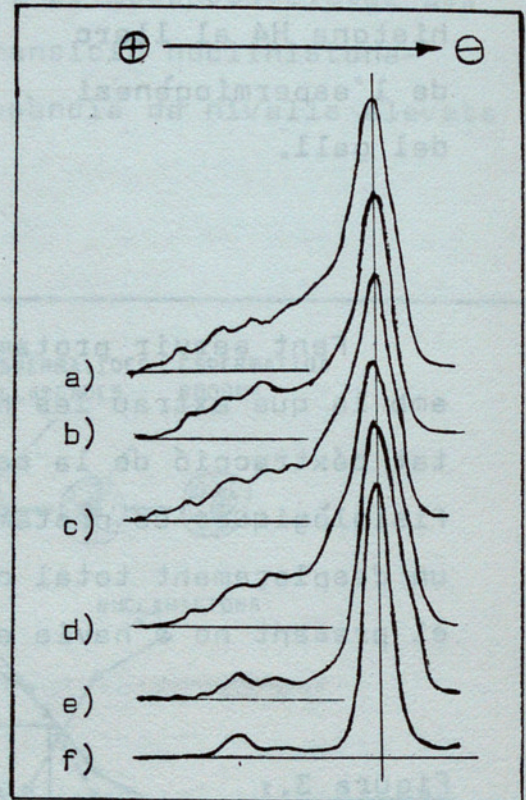
Disminució de les histones i augment de la protamina "in vivo", comparat amb l'extracció de les histones i unió de la protamina gallina "in vitro".



L'anàlisi de les formes de fosforilació de la protamina mostra que aquestes son mes abundants al principi de la transició nuclihistona-nucliprotamina i son casi indetectables en els espermatozoides (Fig.4).

Figura 4.:

Variacions en el grau de fosforilació de la protamina al llarg de l'espermioogènesi del gall. El pic principal correspon a la protamina, mentre que les bandes amb mobilitat electroforètica reduïda corresponen a les hipotètiques formes de fosforilació de la protamina. (a-e) diversos estadis de la progresió de l'espermioogènesi. (f) protamina dels espermatozoides.



No obstant s'ha de tindre en compte que d'altres modificacions de la protamina tals com l'ADP ribosilació poden també conduir a una reducció en la seva mobilitat electroforètica i sobreposar-se a lo que ens pensem són bandes de fosforilació. La determinació de l'incorporació de fòsfat radioactiu a la protamina mostrarà definitivament el seu grau de fosforilació.

Cal també tenir en compte que la protamina fosforilada, a part d'evitar una excesiva afinitat per l'ADN, pot també facilitar la unió d'altres molècules de protamina vehines degut a la formació de ponts electrostàtics fòsfat-arginina.

En conclusió: En aquest treball es mostra per primera vegada que és possible explicar "in vitro" el sesenssamblatge del nucleosoma i la unió de la protamina que esdevé "in vivo" al llarg de la transició nuclihistona-nucliprotamina.

Bibliografia:

- BALDI N.I., BENEDETTI P., MATTOCCIA E., TOCCHINI G.P. (1980). "In vitro" catenation and decatenation of DNA and another eucariotic ATP-dependent topoisomerase. Cell 20, 461-467.
- BAASE W.A., STASKUS P.W. and ALLISON S.A. (1984). Precolapse of T7 DNA by spermidine at low ionic strength. Biopolymers 23, 2835-2851.
- BERTRAND E., ERARD M., GOMEZ-LIRA M. and BODE J. (1984). Influence of histone hyperacetylation on nucleosomal particles as visualized by electron microscopy. Archiv. of Biochem. and Biophys. 229, 395-398.
- BEHE M. and FELSENFELD G. (1981). Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: The B-Z transition in poly(dG-m⁵dC)·poly(dG-m⁵dC). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1619-1623.
- BODE J., WILLMITZER L. and OPATZ K. (1977). On the competition between protamines and histones: Studies directed towards the understanding of spermiogenesis. Eur. J. Biochem. 72, 393-403.
- BODE J., HENCO K. and WINGENDER E. (1980). Modulation of the nucleosome structure by histone acetylation. Eur. J. Biochem. 110, 143-152.
- BODE J., GOMEZ-LIRA M. and SCHROTER H. (1983). Nucleosomal particles open as the histone core becomes hyperacetylated. Eur. J. Biochem. 130, 437-445.
- CHRISTENSEN M.E. and DIXON G.H. (1982). Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout. Develop. Biol. 93, 404-415.
- CHRISTENSEN M.E., RATTNER J.B. and DIXON G.H. (1984). Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. Nucleic Acids Reseach 12, 4575-4592.
- GRIMES S.R. and HENDERSON N. (1983). Acetylation of histones during spermatogenesis in the rat. Arch. of Biochem. and Biophys. 221, 108-116.
- GRIMES S.R. and HENDERSON N. (1984). Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. Exp. Cell Res. 152, 91-97.
- GOSULE L. and SCHELLMAN J. (1976). Nature 259, 333-335.
- IGARASHI K., SAKAMOTO I., GOTO N., KASHIWAGI K., HONMA R. and HIROSE S. (1982). Interaction between polyamines and nucleic acids or phospholipids. Arch. of Biochem. and Biophys. 219, 438-443.

- KRAUSE M.O. (1978). Methods for isolation of nuclei from cultured mammalian cells; Conditions for preferential retention of selected histones. Methods in Cell Biology, Vol. XVII, 51-58 (Edited by Stein, G., and Stein, J., Academic Press, New York).
- MEZQUITA C. and TENG C.S. (1977). 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, 203-220.
- MEZQUITA C., OLIVA R. and MEZQUITA J. (1983). Acetilación de las histomas durante la espermatogénesis del gallo. Biología del Desarrollo 1, 77-82.
- MEZQUITA C. (1985). Chromatin composition and chromatin structure in spermatogenesis. (in press).
- NAGL W., RIBICKI R. MERTLER H.O., HEZEL U., JACOBI R. and BACHMANN E. (1984). The fluorophenylalanine sensitive and resistant tobacco cell lines, TX1 and TX4. 1.-DNA contents, chromosome numbers, nuclear ultrastructures, and effects of spermidine. Protoplasma 122, 138-144.
- OLIVA R. and MEZQUITA C. (1982). Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. Nucleic Acids Research 10, 8049-8059.
- OLIVA R., VIDAL S. and MEZQUITA C. (1982). Cellular content and biosynthesis of polyamines during rooster spermatogenesis. Biochem. J. 208, 269-273.
- OLIVA R. (1983). Contenido celular y biosíntesis de poliaminas durante la espermatogénesis del gallo. Biología del Desarrollo 1, 101-105.
- OLIVA R. (1984). Funció de les poliamines en la transició nucleohistona-nucleoprotamina, en relació amb l'acetilació de les histones i el seu desplaçament. Biologia del desenvolupament 2, 65-70.
- PINGOJD A., URBANKE C., ALVES J., EHBRECHT H.J., ZABEAU M. and GUALERZI C. (1984). Effect of polyamines and basic proteins on cleavage of DNA by restriction endonucleases. Biochemistry 23, 5697-5703.
- ROCA J. i MEZQUITA C. (1985). En aquest volum.
- RICH A., NORDHEIM A. and WANG A.H.J. (1984). The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. Ann. Rev. Biochem. 53, 791-846.
- RUIZ-CARRILLO A. and PALAU J. (1973). Histones from embryos of the sea urchin Arbacia lixula. Dev. Biol. 35, 115-123.
- THOMAS T.J. and BLOOMFIELD V.A. (1984). Biopolymers 23, 1295-1306
- WONG T.K. and MARUSHIGE K. (1975). Modification of histone binding in calf thymus chromatin by protamine. Biochemistry 14, 122