

RECERCA DE VARIANTS DE LA HISTONA H1 A L'ESPERMATOGENESI DEL GALL.

Jacint Boix i Cristóbal Mezquita.

Laboratori de Fisiologia del nucli cel.lular.  
Departament de Fisiologia i Bioquímica.  
Facultat de Medicina. (Pedralbes.)  
Universitat de Barcelona.  
Av. Diagonal S/N. 08028 Barcelona.

**Abstract:** Histone H1 is the most distinct of the five histone classes. Its location in the nucleosome, molecular size and composition, and less conservative primary structure in the evolution, make H1 very different from the other histones. H1 shows variability not only among different organisms but among tissues of the same organism and even at successive development stages of the same tissue. These facts suggest an important role of histone H1 in the process of cell differentiation.

Electrophoretic studies of perchloric acid soluble proteins from rooster testis and liver yield different patterns. H1 usually resolves in two main bands in SDS polyacrylamide gels, but a third band is detected in liver. In order to avoid proteolytic artifacts, we have compared the electrophoretic patterns in the presence or absence of the proteolytic inhibitor "Benzamidine". In the presence of the inhibitor the ratios HMG 1&2/H1 and ubiquitin/H1 decrease, and the ratio low molecular weight HMG/H1 increases.

Variants de H1 a diferents models de diferenciació cel.lular.

Dintre de les histones, la H1 presenta diverses peculiaritats. És la histona de major pes molecular, i en la seva composició destaca especialment el ser rica en l'aminoàcid lisina. Però el fet més diferencial és la seva localització en la cromatina, no formant part de l'octàmer, que integren les restants histones. La histona H1 interacciona amb uns 20 pb. de DNA, que és l'anomenat "linker" dintre de l'estructura nucleosomal. Estructuralment presenta un domini central globular i dos dominis terminals, anomenats "braços". Funcionalment s'ha involucrat clàssicament en el control de la superestructura de la cromatina. Paper en el que s'hi implica també la fosforilació i ADP-ribosilació, com a principals modificacions químiques post-traduccionals, que experimenta la H1.

Una característica destacable de la H1 és la seva variabilitat, és a dir el presentar la seqüència d'aminoàcids menys conservada del grup de les histones. En conseqüència és freqüent trobar descripcions de les variants específiques de diversos organismes. Però el que resulta remarcable és la variabilitat trobada entre els teixits d'un mateix organisme, i dintre d'un mateix teixit en el temps, segons el seu estadi de desenvolupament. Aquesta variabilitat sugereix la intervenció de la H1 i de l'estructura de la cromatina, en els processos de desenvolupament i diferenciació cel·lular.

Deixant a part les formes de H1 específiques d'un organisme s'han descrit, amb relació a fenòmens de diferenciació cel·lular, les següents varietats:

- La H5 pròpia dels eritròcits nucleats de les aus, que apareix a mesura que es perd l'activitat nucleal d'aquest tipus cel·lular.
- La H1<sup>0</sup> que es troba en teixits que experimenten una diferenciació terminal, és a dir teixits ben diferenciats amb un índex baix de divisió cel·lular. Així per exemple, es troba en fetge de ratolí. També apareix a l'induir la diferenciació de les cèl·lules eritroleucèmiques de Friend, corroborant el paper que la H1<sup>0</sup> pot tenir en fenòmens de diferenciació cel·lular.

L'aparició de la H1<sup>0</sup> és contradictòria en cèl·lules neoplàsiques, però s'ha demostrat que la seva presència pot ser en molts casos un artefacte proteolític en gels de PA.SDS. És de destacar que en aquests tipus de cèl·lules s'hi detecten intenses activitats proteolítiques. (1)

L'existència de H1<sup>0</sup> en aus era qüestionada, però sembla ser que s'ha detectat en el fetge de pollastre de tres mesos d'edat. (2)

- La H1t, descrita en rates (3) i humans (4), significant la t, testicular. És una variant de H1 amb una composició enriquida amb aminoàcids arginina i metionina.

La seva aparició a l'espermatogènesi és meiótica. Concretament en la fase de paquinema, i es manté fins les últimes etapes de l'espermioogènesi. (5) El paper que pot jugar en els fenòmens de recombinació genètica; que tenen lloc durant el paquinema, on es troben poblacions de cromatina fisiològicament escindides i que s'han descrit com p-DNA i inter-p-DNA cromatina (6); o en els dràstics canvis nucleals observat al llarg de l'espermioogènesi, és quelcom molt interessant d'esbrinar.

Una variant testicular de H1, que esdevé majoritària per substitució de les altres H1, s'ha descrit també en la truita. (7)

-I finalment, en vertebrats superiors (Humans, badella, rates...) s'han identificat 5 subfraccions corresponents a la H1, per cromatografia amb Bio-Rex 70. Aquestes subfraccions s'han anomenat per l'ordre d'elució com: a, b, c, d, e.

La seva mobilitat electroforètica, així com el de totes les variants esmentades fins aquí, ho presentem relacionat en la Taula 1.

Alguns fets interessants en relació a la diferenciació cel·lular són: L'absència de la subfracció b, en testicle de rata. (8)

I també l'increment de la subfracció a en tots aquells teixits amb una activa replicació del DNA, això explica les diferències entre fibroblasts i cèl·lules HeLa en cultiu, en quant a la relació de les dues bandes principals de H1 en PA. SDS., que passa de ser en fibroblasts de 4 a ser en HeLa de 1. (Relació banda menys mòbil a la més mòbil, que conté la H1a.). (9)

TAULA 1.

NOMENCLATURES DE LES BANDES ELECTROFORÈTIQUES DE H1

EN GELS DE PA. SDS.

EN GELS DE PA. ACÈTIC-UREA

Ref.(1 i 2)	Ref.(3,4 i 8)	Ref. (9)	Ref.(10)	Ref.(5)	Ref.(10)	Ref.(3)
H1A	H1 (b,d,e)	H1B	H1(II)	H1(a,t)	H1(II)	H1b H1t H1a H1 <sup>o</sup> <sub>d</sub> H1 <sup>o</sup> H1 <sup>o</sup> <sub>c</sub> H1c (pH4.5)
H1B	{ H1 (a) H1 (c)	H1A	H1(I)	H1(b,c,d,e)	H1(I)	
	H1 <sup>o</sup> H5		Sentit de la migració.	H1 <sup>o</sup>	H1 <sup>o</sup> <sub>a</sub> H1 <sup>o</sup> <sub>b</sub>	
	H1t			H5		
	HMG 1					

En el pollastre on es va descriure per primer cop la H5, i del que utilitzem la línia cel·lular de diferenciació espermatogènica, com model de recerca en el nostre grup, no hi ha res conegut respecte a variants testiculars de H1, ni respecte a les subfraccions i les seves possibles variacions al llarg de l'espermatogènesi.

Els primers abordatges d'aquest tema són l'objectiu del present treball.

### Material i mètodes.

- Fetge (acuradament desagnat per perfusió portal amb ClNa 150 mM + citrat sòdic 15 mM, pH 7.5), i testicle (completament alliberat de l'albugínea testicular), obtinguts de galls de la raça Hubbard White Mountain de 25 a 50 setmanes d'edat.
- A partir del testicle s'efectua per mitjans mecànics en una primera fase i enzimàtica (tripsinització) en una segona, una suspensió cel.lular. Les cel.lules de la suspensió són susceptibles de ser separades en diferents fraccions pel paràmetre físic del seu volum, mitjançant el mètode d'elutriació. (11)
- Les fraccions resultants correlacionen bé a estadis de diferenciació espermatogènica.
- Efectuem extractes amb àcid perclòric (PCA) 0.74 N i precipitem amb TCAA a una concentració final del 18%. Rentem un cop amb acetona acidificada i dos cops més sense acidificar-la. (12)
- Utilitzem com inhibidor de proteolisi Benzamidina a concentració 50 mM. El que permetrà comparar patrons en presència i absència de l'esmentat inhibidor.
- Els extractes obtinguts són estudiats electroforèticament per diversos tipus de gels de poliacrilamida (PA.).

### Resultats i discussió.

- Amb PA. SDS trobem dues bandes corresponents a la H1. No trobem cap banda en la zona propera a les HMG 1&2, on s'hi descriu la variant H1t, en els extractes de testicle.
- Incrementant el recorregut del gel i baixant la concentració de PA. en el gel al 12% aconseguim desdoblant la banda de més mobilitat de les corresponents a la H1. (Fig.1)
- Ja que apareix també en presència de Benzamidina, hem de pensar que aquest desdoblament no es tracta d'un artefacte proteolític. Llavors estem o davant d'una modificació post-traducciona amb entitat suficient per alterar la mobilitat en SDS, o davant la presència d'una variant, o davant la separació de dues fraccions de la H1.
- En el fetge observem tres bandes corresponents a la H1, on la de major mobilitat podria ser la H1<sup>0</sup>. A l'estudiar-ho amb PA. acètic urea, també ens apareix una banda compatible amb la H1<sup>0</sup>. (Fig.3)

A la vegada observem diferents patrons de H1 i HMG 1&2 entre fetge i testicle, amb aquesta classe de gels. -La presència de Benzamidina dona un patró de proteïnes en el que destaca: preservació d'unes bandes compatibles amb les HMG 14 i 17.

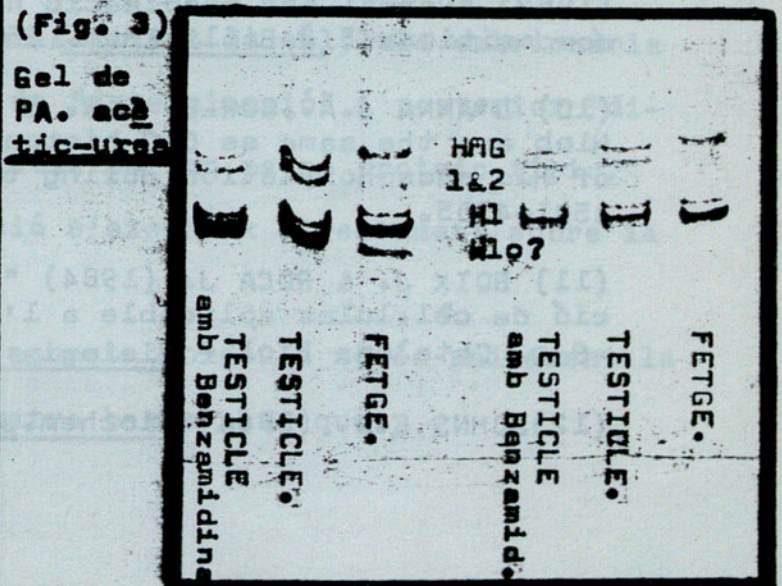
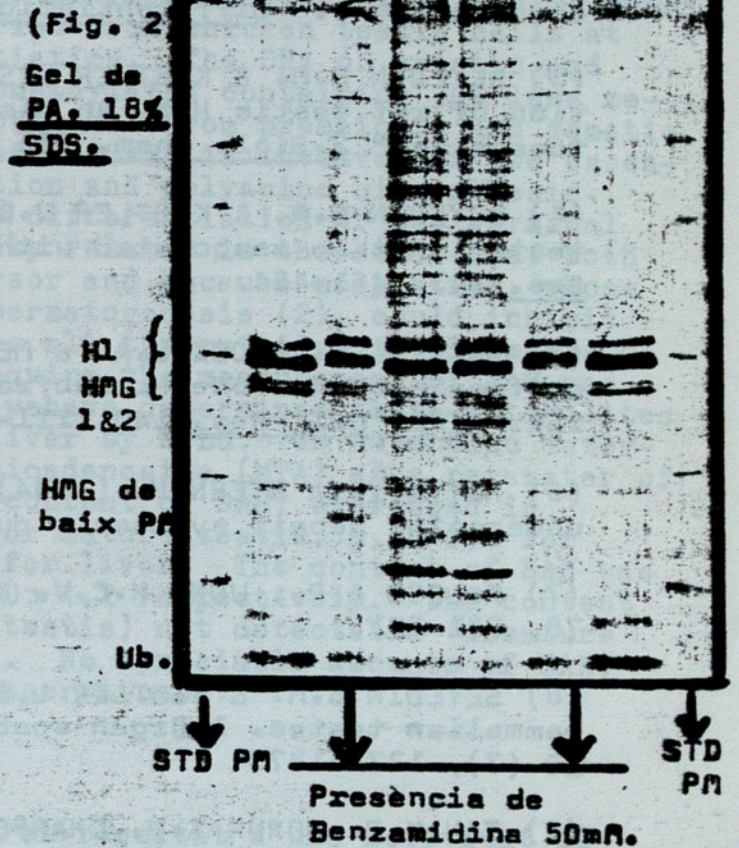
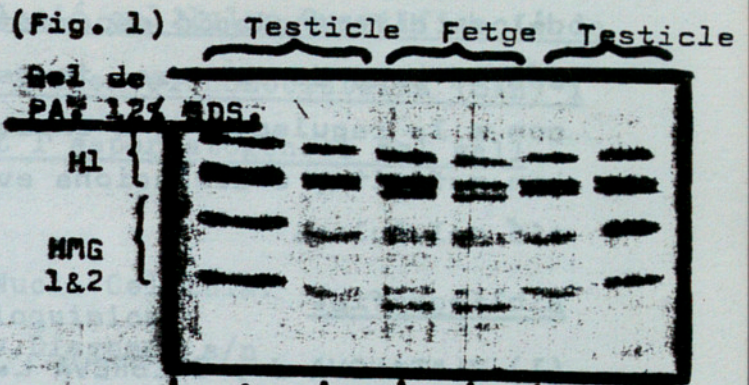
Disminució de les bandes atribuïbles a ubiquitina i HMG 1 & 2 (Fig.2)

L'efecte en les HMG 1&2 es veu corroborat en PA. acètic-urea. (Fig.3)

Les esmentades diferències no han pas de ser contemplades únicament com diferències resultants de la proteolisi, sinó que també hem de considerar les interferències que tant en el procés d'extracció com en la precipitació, la presència de la Benzamidina pot ocasionar.

- També hem observat clarament la variació dels patrons amb la concentració de PA. en els gels. Aquest fet permet, jugant amb la concentració, fer més patents alguns dels fets observats.

-Aquests patrons de proteïnes solubles en PCA, estudiats en els diferents tipus cel.lulars d'aquest mo



del de diferenciació espermatogènica al gall (resultats no esmentats), són la base de properes investigacions referides tant a la meiosi, com a la regulació de l'expressió genètica de la H1. Expressió, que com hem referit, correlaciona evidentment amb els fenòmens de diferenciació cel·lular.

#### Bibliografia.

- (1) ZLATANOVA J., SREBREVA L. & TSANEV R. (1983) "Possible artifacts in the electrophoretic study of histone H1o." Differentiation 24, 79-81.
- (2) SREBREVA L.N., ANDREEVA N.B., GASARYAN K.G., TSANEV R.G. & ZLATANOVA J.S. (1983) "Presence of histone H1o-related fraction in chicken liver." Differentiation 25, 113-120.
- (3) SEYEDIN S.M. & KISTLER W.S. (1980) "Isolation and characterization of rat testis H1t. An histone variant associated with spermatogenesis." J. Biol. Chem. 255 (12), 5949-5954.
- (4) SEYEDIN S.M. & KISTLER W.S. (1983) "H1 histones from mammalian testes. H1t is associated with spermatogenesis in humans." Exp. Cell Res. 143, 451-454.
- (5) BUCCI L.R., BROCK W.A. & MEISTRICH M.L. (1982) "Distribution and synthesis of histone H1 subfractions during spermatogenesis in the rat." Exp. Cell Res. 140, 111-118.
- (6) HOTTA Y. & STERN H. (1984) "The organization of DNA segments undergoing repair synthesis during pachytene." Chromosoma 89, 127-137.
- (7) McLEOD A.P., WONG N.C.V. & DIXON G.H. (1977) Eur. J. Biochem. 78, 281-291.
- (8) SEYEDIN S.M. & KISTLER W.S. (1979) "H1 histone subfractions of mammalian testes. I. Organ specificity in the rat." Biochemistry 18 (7), 1371-1375
- (9) TAN K.B., BORUN T.W., CHARPENTIER R., CRISTOFALO V.J. & CROCE C.M. (1982) "Normal and neoplastic human cells have different histone H1 compositions." J. Biol. Chem. 257 (10), 5337-5338.
- (10) D'ANNA J.A., GURLEY L.R. & BECKER R.R. (1981) "Histones H1oa and H1ob are the same as CHO histones H1(III) and H1(IV): New features of H1o phosphorylation during the cell cycle." Biochemistry 20, 4501-4505.
- (11) BOIX J. & ROCA J. (1984) "L'elutriació com a mètode de separació de cèl·lules aplicable a l'estudi de l'espermatogènesi del gall." -Soc. Catalana Biol.- Biologia del desenvolupament 2, 77-84.
- (12) JOHNS E.W. (1964) Biochem. J. 92, 55.

Metilació de l'ADN i diferenciació cel.lular. Quantificació de la S-Adenosilmetionina (SAM), S-Adenosilhomocisteina (SAH) i Metiltioadenosina (MTA) durant l'espermatogènesi del gall.

N. Rocamora i C. Mezquita

Laboratori de Fisiologia del Nucli Cel.lular  
Departament de Fisiologia i Bioquímica  
Fac. Medicina Univ. Barcelona Av. Diagonal s/n  
08028 Barcelona

To study whether changes in methylation of DNA were related to the structural and functional changes that chromatin undergoes during spermatogenesis we have previously determined the 5-methyl cytosine content of DNA purified from chicken testis cells at different stages of differentiation. The DNA of meiotic and premeiotic cells appears hypomethylated containing 30% less methyl cytosines than the DNA obtained from premeiotic and somatic cells (1). S-Adenosylmethionina (SAM) is involved in two essential processes: transmethylation and polyamine biosynthesis. Both are important during the differentiation of the germinal cell line and could be mutually related in the sense that both reactions use a common precursor and because polyamines, whose synthesis increases during spermatogenesis (2), could inhibit DNA methylase activity. Since all the putative involvements of these enzymatic activities require the measurement of SAM and S-Adenosylhomocysteine (SAH) we have determined these metabolites in rooster testis cells and liver by HPLC. We have also determined the content of Methylthioadenosine (MTA) as a parameter of polyamine biosynthesis. The content of SAM, expressed in nmol/mgDNA, was  $29,15 \pm 0,95$  for mature testis,  $9,3 \pm 0,6$  for immature testis and  $52 \pm 1,73$  for liver. The content of SAH was  $3,57 \pm 0,09$ ,  $2,0 \pm 0,3$  and  $20,0 \pm 1,2$  respectively. The content of MTA was  $1,0 \pm 0,1$ , (mature testis) not detectable (immature testis) and  $0,75 \pm 0,1$  (liver). No appreciable amounts of SAM, SAH and MTA were detected in spermatozoa.

### Introducció

La diferenciació cel.lular és el resultat d'una activitat gènica diferencial que va especialitzant la cèl.lula embrionària "totipotent" cap a un estat de "determinació" i posterior "diferenciació" que es caracteritza per un patró proteic típic.

El control de la diferenciació s'exerceix directament sobre la molècula de l'ADN.

La informació continguda en aquesta molècula no és únicament la seqüència covalent de les quatre bases sino que;

- L'estructura terciària de la molècula és també informativa ja que influeix en l'accessibilitat de determinades seqüències i també pot tenir més o menys afinitat per determinades proteïnes.
- L'existència de seqüències transponibles introdueix també un nou factor de regulació ja que aquestes en funció del lloc a on es troben poden, per exemple activar o no un grup de gens.
- La metilació de l'ADN, además de poder controlar els mecanismes esmentats anteriorment és un altre possible factor de regulació que analitzarem amb més profunditat.

La metilació de l'ADN és una modificació covalent post-replicativa, regulada enzimàticament, que introdueix un grup  $-CH_3$  en el carboni 5 de les citosines, quedant aquest grup exposat en el solc ample de la doble hèlix.

Les  $m^5dC$  es troben en un 90% en el dinucleòtid CpG.

Els patrons de metilació són característics per cada tipus cel.lular i es mantenen a causa de les anomenades metilases "de còpia" que introdueixen un grup metil a la nova cadena recentment sintetitzada de forma simètrica al patró preexistent en la cadena paterna.

Quand s'inicia un patró la metilasa "de novo" necessita un reconeixement de seqüència altament específic per no metilar totes les citosines.

Per altra banda ja que la major part de les cèl.lules sembla que no tenen desmetilases la pèrdua de metilació es donarà per dilució deguda a la manca d'activitat metilasa.

També per a la desmetilació podria ésser important l'especificitat de seqüència per l'unió d'inhibidors a llocs específics, actuant