

Ubiquitina i diferenciació cel.lular. Contingut cel.lular durant l'espermatogènesi del gall i determinació de la proporció d'aquest polipèptid potencialment actiu en la formació de conjugats.

N.Agell 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.

Ubiquitin is a 76 residue protein abundant in all eucaryotic cells. Ubiquitin occurs in cells either free or covalently coupled to intracellular proteins, the most abundant of which is histone H2A. We have previously show that the ubiquitin H2A conjugate (uH2A) increases markedly during spermiogenesis (Agell et al. 1983, FEBS Lett. 155, 209-212). Increasing amounts of uH2A in late spermatids may contribute to the relaxation of chromatin that occurs during the nucleohistone nucleoprotamine transition in chicken spermatids. Ubiquitin may be involved in a ATP-dependent proteolytic system and in modulation of certain enzymatic activities as has been shown for histone deacetylase *in vitro* (Mezquita et al. 1982, Nucleic Acids Res. 10, 1781-1797). In order to shed light on the role of ubiquitin during spermatogenesis we have determined the content of this protein in rooster testis cells. The ratios ubiquitin/DNA were 0.047 ± 0.023 in chicken liver cells, 0.040 ± 0.005 in immature chicken testis, 0.105 ± 0.008 in mature testis. In contrast with the results obtained in mammalian testis (Loir et al. 1984, FEBS Lett. 169, 199-204) and in agreement with those reported for trout spermatogenesis approximately 50% of intact form of ubiquitin (Gly-Gly-COOH) is detected in rooster testis.

Introducció.

La ubiquitina és un polipèptid de pes molecular 8565. La seva forma biològicament activa té 76 aa. va ésser purificada inicialment per el grup Golstein (1) com un dels polipèptids de timus de vedella que indueixen la diferenciació de limfòcits T. *in vitro*. La seva activitat com hormona (2) és encara qüestionable. L'interés per aquest polipèptid va ésser fortament

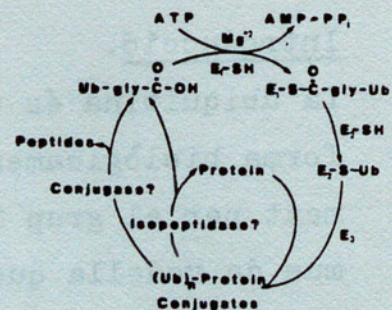
estimulat al veure's que podia trobarse tan lliure com unit covalentment a proteïnes. El primer conjugat covalent de la ubiquïtina descrit va ser el que amb la histona H2A (uH2A o A24) (3).

S'ha estudiat el paper que pot tenir la formació d'aquests conjugats nuclears de la ubiquïtina en diferents models de diferenciació: En nucleol de fetge de rata o de fetge en regeneració els nivells de uH2A baixen (4); durant la maduració d'eritròcit de pollastre tan el conjugat uH2A com la ubiquïtina lliure en el nucli desapareixen (5); al llarg de l'espermatogènesi del gall la quantitat de uH2A respecte les histones del octamer augmenta (6). La presència i disminució d'aquest conjugat es relaciona tan amb canvis d'activitat gènica com amb canvis en l'estructura de la cromatina.

Un dels aspectes més estudiats de la ubiquïtinització de proteïnes ha estat el del sistema proteolític del reticulòcit (7).

Al contrari que les cèl.lules vermelles que presenten poca proteòlisi, hi ha una marcada destrucció de proteïnes cel.lulars en els reticulòcits en maduració. Aquesta proteòlisi és depenen de energia. Segons Müller et al. (8), la major part d'aquest sistema proteolític està dirigit in vivo cap a la degradació de les mitocòndries i és dependent d'ATP, d'ubiquïtina (9).

El grup de Hershko principalment va resoldre els components bioquímics d'aquest sistema proteolític de l'eritròcit que actuaven in vitro sobre proteïnes anormals o desnaturalitzades, i proposen el següent model (10):



S'han descrit dues formes d'ubiquitina, una amb 74 aa. i extrem Carboxiterminal Arg-COOH i un'altra amb 76 aa. i extrem Carboxiterminal Gly-Gly-COOH. Andersen et al. (11) van trobar que tan sols la ubiquitina amb extrem Gly-Gly-COOH era capaç de formar conjugats. El grup de Wilkinson (12) va demostrar que també la única forma d'ubiquitina capaç d'activar el sistema proteolític del reticulòcit era la de 76 aa. La ubiquitina purificada de timus de vedella té 74aa (1); la purificada a partir de testicle de truita (13) té un 50% de cada forma i l'obtinguda per Loir et al. (14) a partir de testicle de diferents mamífers no presenta Glicina en l'extrem COOH terminal. De totes maneres, ja que la ubiquitina de 74 aa. es pot obtenir fàcilment per proteòlisi de l'altra pot ésser que en els casos que trobem la forma de 74 aa. sigui un artefacte de l'obtenció i purificació.

En el model que nosaltres estudiem, l'espermatogènesi del gall, és interessant estudiar la presència d'ubiquitina i dels seus conjugats, doncs durant aquest procés de diferenciació s'han de perdre gran quantitat de proteïnes tan nuclears (per exemple les propies histones que han de ésser substituïdes per la protamina) com citoplasmàtiques, i podria ésser que actués un mecanisme semblant al de eritròcit.

En aquest treball es presenta la purificació de la ubiquitina a partir del testicle de gall i la determinació de quina proporció d'aquest polipèptid té Gly-Gly en l'extrem carboxiterminal quan ha estat obtingut en condicions de inhibició de la proteòlisi; així com els nivells cel·lulars d'ubiquitina al testicle i als diferents estadis de l'espermatogènesi.

Metodologia.

La ubiquitina ha estat obtinguda a partir de testicle madur de gall mitjançant dues extraccions amb PCA 0.74N (Benzamidina 25mM) i posterior precipitació amb TCA 25%. La purificació a partir d'aquest precipitat s'ha realitzat seguint una adaptació del mètode de Walker et al. (15) que consisteix en redissoldre el precipitat en HCl 0.1N, precipitar les HMGs 1,2,14,17 i la H1 amb 12.5 vol. Etanol/HCl (99/1), i del sobrenadant precipitar la ubiquitina amb 6vol. d'acetona. Per últim es fa una purificació per gelfiltració (Sephadex G-75).

La quantificació del polipèptid lliure en la cèl.lula s'ha realitzat per electroforèsi en gels del 10% Acrilamida/Acètic/Urea 4.5M dels extractes de PCA 0.74N dels diferents teixits i tipus cel.lulars. Els inhibidors utilitzats han estat PMSF 5mM o Benzamidina 25mM i N'etilmaleimida 5mM.

La quantificació de la ubiquitina total (lliure més conjugada) s'ha fet de la mateixa manera però després de digerir el teixit o les cèl.lules amb tripsina (la ubiquitina és resistent a la tripsina mentre que l'altra part proteica dels conjugats es degrada).

La determinació de la quantitat d'ubiquitina amb extrem Gly-Gly-COOH s'ha fet mitjançant digestió d'aquest polipèptid purificat amb tripsina (11) i anàlisi per analitzador d'aminoàcids de la quantitat de dipèptid Gly-Gly que s'obté.

Resultats.

En la figura 1 es poden veure les diferents etapes de la purificació de la ubiquitina: A) proteïnes extretes amb PCA 0.74N i precipitades amb TCA 25% B) proteïnes precipitades amb 12.5 vol. Etanol/HCl (99/1) C) proteïnes que precipiten amb 6 vol. Acetona.

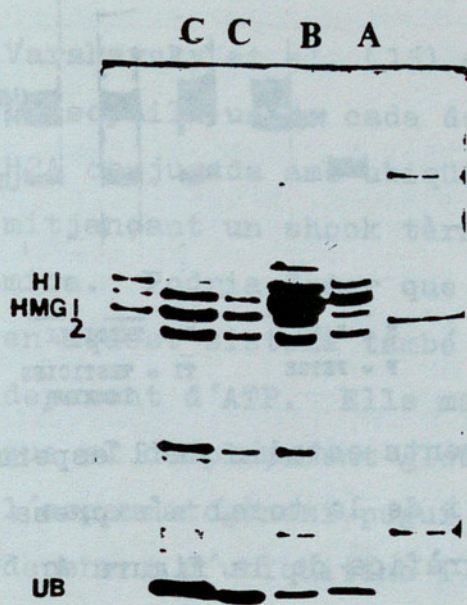


Fig. 1.- Electroforèsi 15 % Acrilamida/ SDS.

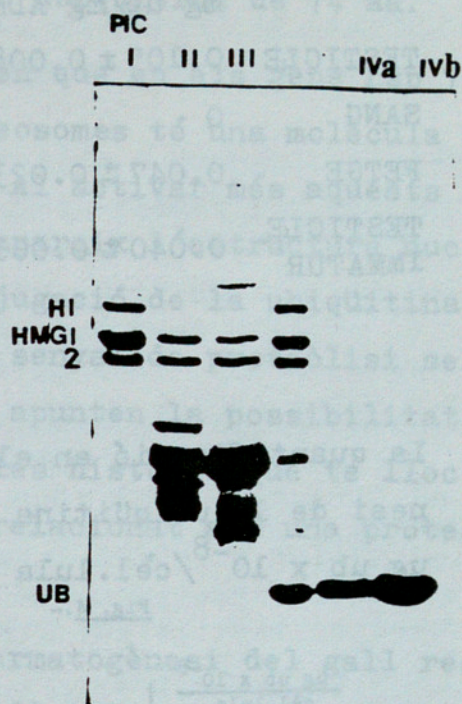


Fig. 2.- Electroforèsi 15 % Acrilamida/ SDS.

Aquestes últimes (fracció enriquida amb ubiquitina) es passen per la columna de gelfiltació. En la figura 2 s'observen les proteïnes que surten a cada pic. La ubiquitina purificada es troba en el pic IV. La seva pureza es determina per electroforèsi bidimensional i anàlisi d'aminoàcids.

Quan l'inhibidor utilitzat durant l'obtenció ha estat el PMSF, la proporció d'ubiquitina amb extrem carboxiterminal Arg-Gly-Gly-COOH, determinada mitjançant digestió amb tripsina com s'indica en la metodologia, ha estat del 53%.

La quantitat d'ubiquitina determinada electroforèticament expressada en mg ub/mg ADN en els diferents teixits estudiats es presenta en la taula I i en la figura 3.

Resultats preliminars indiquen que al testicle madur la ubiquitina lliure representa aproximadament la meitat de la total.

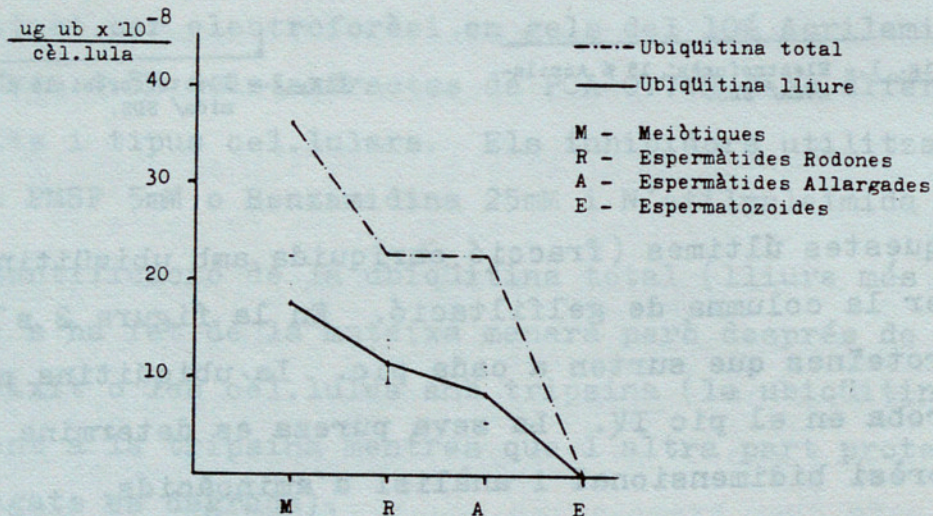
Taula I

	mg ub/mg ADN
TESTICLE	0.105 ± 0.008
SANG	0
FETGE	0.047 ± 0.023
TESTICLE IMMATUR	0.040 ± 0.006



La quantificació en els diferents estadis de l'espermatogènesi de la ubiquitina lliure i de la total s'expressa en $\mu\text{g ub} \times 10^{-8} / \text{cèl.lula}$ en la gràfica de la figura 4

Fig. 4.-



Discussió.

La presència d'aproximadament un 50% d'ubiquitina amb extrem carboxiterminal Gly-Gly-COOH està d'acord amb els resultats presentats per Watson et al(13) en testicle de truita i contradiu la falta d'aquest polipèptid amb 76 aa en testicle de mamífer (14). El que no podem saber és si el 50% d'ubiquitina amb 74 aa. es troba ja així in vivo o és un artefacte proteolític durant l'obtenció.

Ja que havíem observat un augment del conjugat uH2A durant l'espermatogènesi del gall (6), era d'esperar trobar ubiquitina amb les dos glicines, ja que és la única forma capaç de

formar conjugats a no ser, que hi hagués un sistema enzimàtic capaç d'afegir el dipèptid a la ubiquitina de 74 aa. Var Varshavsky et al. (15) demostren que en els gens hsp 70 de *Drosophila* un de cada dos nucleosomes té una molècula de H2A conjugada amb ubiquitina. Al activar més aquests gens mitjançant un shock tèrmic desapareix l'estructura nucleosòmica. Podria ésser que la conjugació de la ubiquitina actués en aquest sistema també com un senyal de proteòlisi selectiva dependent d'ATP. Ells mateixos apunten la possibilitat de que el desplaçament global de les histones que té lloc durant l'espermatogènesi pugui estar relacionat amb una proteòlisi dependent d'ubiquitina i ATP.

Els nostres resultats en l'espermatogènesi del gall respecte a l'augment del conjugat uH2A (5) i la presència de gran quantitat d'ubiquitina de la que al menys un 50% pot actuar d'activador de la proteòlisi selectiva recolzen de moment aquesta hipòtesi. La ubiquitina pot intervenir també en la pèrdua de proteïnes citoplasmàtiques durant l'espermioogènesi. L'augment d'ubiquitina que detectem al tractar les cèl.lules amb tripsina pot venir de la degradació dels conjugats o també del trencament d'un possible precursor del polipèptid format per varies ubiquitines unides que s'ha detectat de moment en llevat (17).

Bibliografia.-

- 1.-R.S.BASCH & G.GOLDSTEIN, (1974). Induction of T-Cell differentiation In Vitro by Thymin, a purified polypeptide hormone of the thymus. Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 71, 1474-1478.
- 2.-T.L.K.LOW, G.B.THURMAN, M.McADOO, J.McCLURE, J.L.ROSSIO, P.H.NAYLOR & A.L.GOLDSTEIN, (1979). The chemistry and biology of thymosin. J.Biol. Chem., 254, 981-986.
- 3.-L.R.ORRICK, M.O.J.OLSON & H.BUSCH, (1973). Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Proc.Nat. Acad.Sci. USA, 70, 1316-1320.

- 4.-I.L.GOLDKNOPF,M.F.FRENCH,Y.DASKAL & H.BUSCH,(1978). A reciprocal relationship between of free ubiquitin and protein A24, its conjugate with histone 2A, in chromatin fractions obtained by the DNase II, Mg procedure. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*,84, 786-793.
- 5.-I.L.GOLDKNOPF,G.WILSON,N.R.BALLAL & H.BUSCH,(1980). Chromatin conjugate protein A24 is cleaved and ubiquitin is lost during chicken erythropoiesis. *J.Biol.Chem.*,255, 10555-10558.
- 6.-N.AGELL,M.CHIVA & c.MEZQUITA,(1983). Changes in nuclear content of protein conjugate histone H2A-ubiquitin during rooster spermatogenesis. *FEBS Lett.*,155, 209-212.
- 7.-A.HERSHKO,A.CIECHANOVER & I.A.ROSE, (1981). Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of breakdown. *J.Biol.Chem.*,256,1525-1528.
- 8.-M.MULLER,W.DUBIEL,J.RATHMANN & S.RAPOPORT,(1980). Determination and characteristics of energy-dependent proteolysis in rabbit reticulocytes. *Eur.J.Biochem.*,109, 405-410.
- 9.-S.RAPOPORT,W.DUBIEL & M.MULLER,(1985). Proteolysis of mitochondria in reticulocytes during maturation is ubiquitin-dependent and is accompanied by a high rate of ATP hydrolysis.*FEBS Lett.* 180, 249-252.
- 10.-A.HERSHKO,(1983). Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell*,34, 11-12.
- 11.-M.W.ANDERSEN,I.L.GOLDKNOPF & H.BUSCH,(1981). Protein A24 lyase is an isopeptidase. *FEBS Lett.*,132, 210-214.
- 12.-K.D.WILKINSON & T.K.AUDHYA,(1981). Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires ubiquitin with the COOH-terminal sequence Arg-Gly-Gly. *J.Biol.Chem.*,256, 9235-9241.
- 13.-D.C.WATSON,B.LEVY W. & G.H.DIXON,(1978). Free ubiquitin is a non histone protein of trout testis chromatin. *Nature*,276, 196-198.
- 14.-M.LOIR,A.CARATY,M.LANNEAU,Y.MENEZO,J.P.MUH & P.SAUTIERE,(1984). Purification and characterization of ubiquitin from mammalian testis. *FEBS Lett.*,169, 199-204.
- 15.-J.M.WALKER,G.H.GOODWIN & E.W.JOHNS,(1978). *FEBS Lett.*,90,327-
- 16.-L.LEVINGER & A.VARSHAVSKY,(1982). Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell*,28, 375-385.
- 17.-E.OZKAYNAK,D.FINLEY & A.VARSHAVSKY,(1984). The yeast ubiquitin gene:head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature*,312, 663-666.