

Clonaje, secuencia parcial y expresión de un ARN mensajero que codifica para la protamina galina.

R.Oliva, C.Mezquita, G.H.Dixon y J.Mezquita

Departamentos de Fisiología y Bioquímica, División de las Ciencias de la Salud, Universidad de Barcelona y Dpto. de Bioquímica Médica, Universidad de Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

Abstract:

Cloning, partial sequence and expression of a mRNA encoding Chicken protamine galine.

Protamines are basic proteins able to displace histones from nucleosomes and to condense the DNA in the form of a highly compact nucleoprotamine complex. The protamine galline has a greater ability to disassemble nucleosomal core histones than fish protamines (C.Mezquita and R.Oliva, 1985). To investigate the gene expression of the protamine galline and to find out the nucleotide sequence of this protamine, RNA was prepared from a population of cells enriched in round and elongated spermatids using the guanidine isothiocyanate method (Chirgwin et al., 1979). Poly A+ mRNA was selected by oligo-dT cellulose chromatography. cDNA was prepared and (Okayama and Berg, 1982), cloned in M13 mp9 and the DNA of 332 clones was purified and randomly sequenced by the method of Sanger et al. (1980). A few clones containing protamine sequences were detected. Some of them were completely unreadable, probably due to superstructure produced in a sequence rich in CGC arginine codons. A partial sequence, obtained from small inserts, shows the last 120 bases of the C-terminal coding and 3' untranslated region of the gene containing the polyadenylation signal. The predicted amino acid sequence of this C-terminal region, corresponds to the sequence previously described at the protein level for the chicken protamine. Overlapping the termination codon, a sequence is present, that if translated will provide the protamine with an additional arginine block (Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Tyr-(End)) increasing to eight the number of arginine clusters found in galline. To study the gene expression of the chicken protamine gene, RNA was prepared from testis at different stages of development, electrophoresed on agarose-formaldehyde gels, transferred to Pall-Biodyne and hybridized with an anti-sense probe of the rooster protamine cDNA. The Northern Blot shows that the expression of this gene occurs in post-meiotic cells and also two populations of mRNA of sizes ranging between 400 and 500 bases.

Introducción:

Las protaminas son proteínas básicas capaces de desplazar a las histonas de nucleosomas y de condensar al ADN en la forma

de un compacto complejo nucleoprotamina. La protamina galina presenta una eficiencia superior para desensamblar a las histonas de nucleosomas que las protaminas de peces (Oliva and Mezquita, 1985, Mezquita and Oliva, 1985). Para estudiar la expresión génica y encontrar la secuencia del gen de esta protamina, hasta el presente única en su capacidad de desensamblar a las histonas de nucleosomas, se preparó ARN mensajero, se clonó en M13mp9 y varios clones fueron secuenciados al azar por el método de Sanger.

Los resultados muestran la región 3' no codificante del gen de la protamina galina y una parte de la región codificante C-terminal. El análisis de "Northern blots" de ARN procedente de testículos en distintas fases de desarrollo indica que la expresión del gen de la protamina es postmeiótica y que existen dos poblaciones de ARN mensajero.

Métodos:

El ARN fué aislado a partir de una suspensión enriquecida en espermátidas alargadas (Oliva et al., 1982) y a partir de testículos en distintas fases de desarrollo mediante el método de Chirgwin et al. (1979).

El cDNA se preparó por el método de Okayama and Berg (1982), insertó en M13mp9 y clonó en E.Coli TGI (Hanahan, 1983). 114 clones fueron secuenciados por el método de Sanger et al. (1980).

Para el estudio de la expresión del gen de la protamina galina, se analizó ARN en geles de formaldehído-agarosa, se transfirió a papel de "Pall Biodyne" y se hibridó con una sonda preparada a partir de uno de los clones de cDNA del gen de la protamina galina.

Resultados y discusión:

De los 114 clones secuenciados, 3 correspondieron a secuencias de la región C-terminal codificante y 3' no codificante de gen de la protamina galina (fig 1). A partir del clon N°59 se preparó una sonda y se hibridó con un filtro que contenía "dots" correspondientes a 332 de los clones preparados. Se detectaron 2 clones cuya secuencia era complementaria a la del clon N°59 (fig 2 y 1).

A partir del clon N° 24 se preparó una segunda sonda y de nuevo se hibridó con los 332 clones. El resultado fue la obtención

10
 Ala Arg Tyr Arg Ser Arg Gly Arg Ser Arg Ser Arg Arg Thr Arg Arg Arg Arg Ser Pro
 20
 30
 Arg Ser Gly Arg Arg Arg Ser Pro Arg Arg Arg Ser Arg Arg Arg Arg Tyr Gly
 40
 50
 Ser Ala Arg Arg Ser Arg Arg Ser Gly Gly Val Arg Arg Arg Arg Tyr Gly Ser Arg Arg Arg Arg Arg Tyr

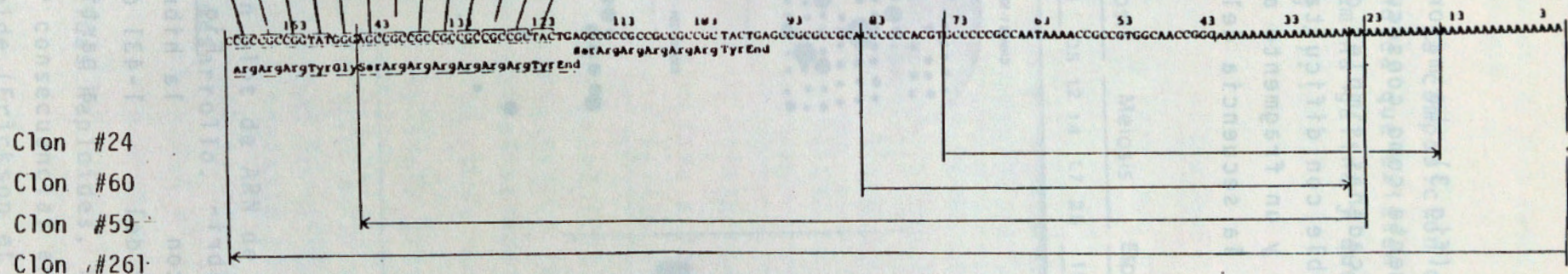


Fig 1.- Secuencias correspondientes al cDNA del gen de la protamina galina obtenidas mediante el método de Sanger.

de varios clones positivos (fig 3). La mayoría de ellos resultaron ilegibles, probablemente como consecuencia de la adopción de superestructuras en las cadenas simples de un gen rico en "CG". Un clon (Nº 261) legible con dificultad, mostró una cola de poli-A un poco más larga y un fragmento adicional de la región codificante, respecto a la secuencia del clon Nº59.

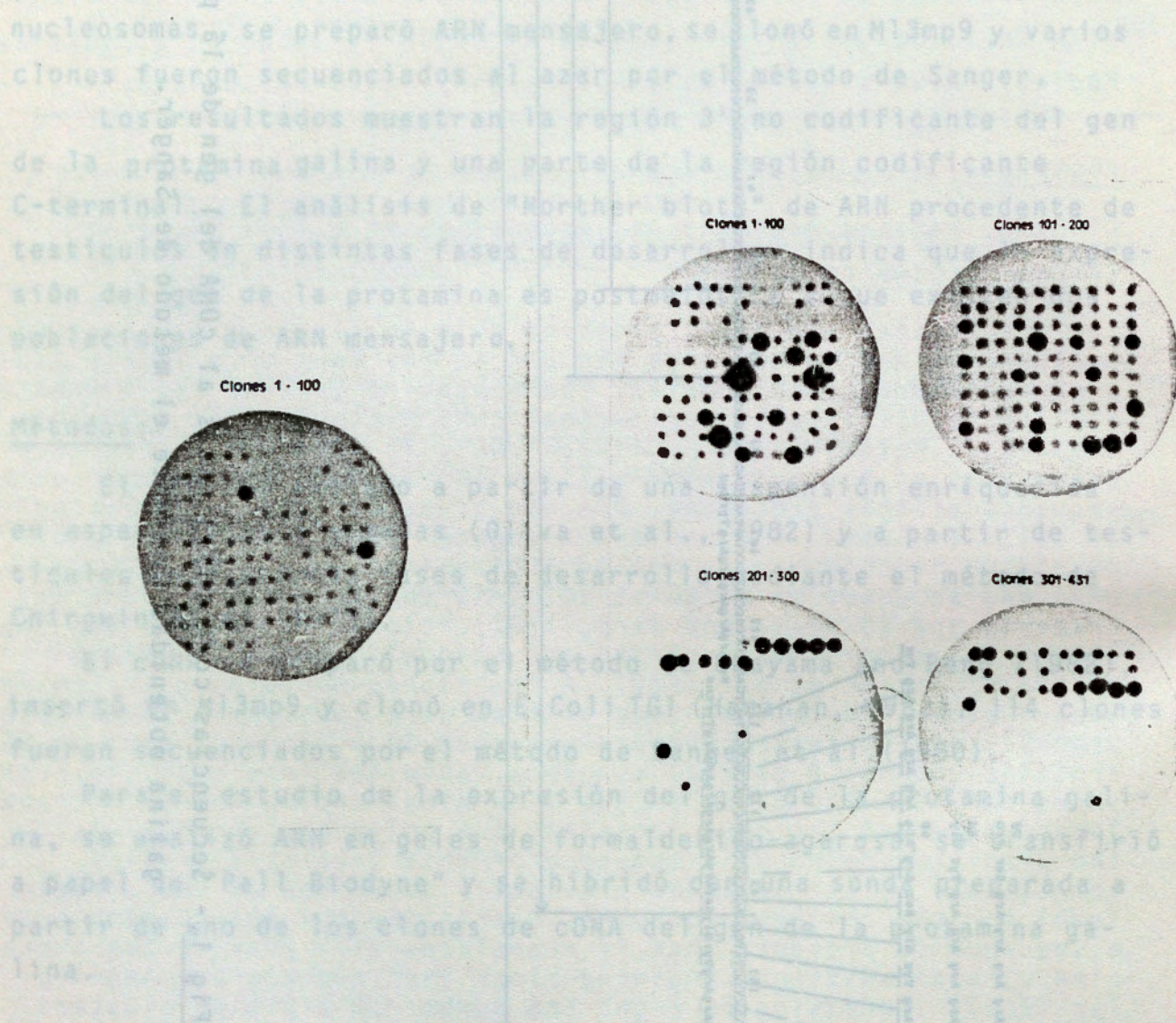


Fig 2.-Resultado de la hibridación de los clones 1-100 con una sonda preparada a partir del clon Nº59.

Fig 3.- Resultado de la hibridación de los clones 1-431 con una sonda preparada a partir del clon Nº24.

Para el estudio de la expresión del gen de la protamina galina, se preparó ARN a partir de testículos en distinta fase de desarrollo. Los testículos fueron controlados histológica-

mente para determinar su composición celular exacta. El resultado del "Northern blot" indica que existen dos poblaciones de ARN mensajero de la protamina galina y que la expresión de este gen es post-meioótica (fig 4).

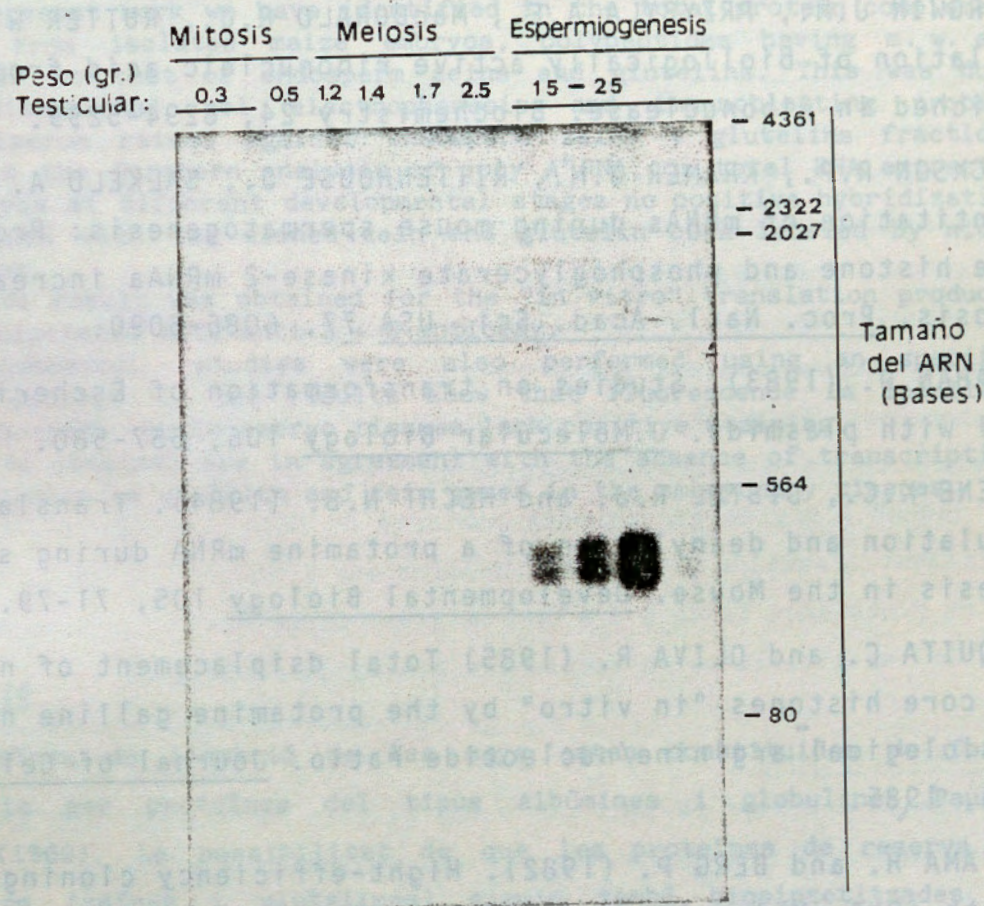


Fig 4.- Northern blot de ARN de testículos de gallo en diferente estado de desarrollo.

En las espermatidas haploides, la expresión de alelos recesivos podría tener consecuencias en la diferenciación evolutiva del espermatozoide (Erickson et al., 1981; Bennet, 1985).

La existencia de un componente proteico minoritario que migra cerca de la protamina galina en geles ácidos y que presenta la misma insolubilidad al SDS que la protamina galina, podría interpretarse como una variante todavía no descrita de la

protamina, codificada por una de estas dos poblaciones de ARN mensajero. No obstante, parece más probable que estas dos poblaciones de ARN mensajero correspondan a moléculas de ARN-políA en diferente estado de procesamiento (Sinclair and Dixon, 1982; Kleene et al., 1984).

Bibliografía:

- CHIRGWIN J.M., PRZYBYLA A.E., MacDONALD R.J., RUTTER W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 24, 5294-5299.
- ERICKSON R.P., KRAMER J.M., RITTENHOUSE J., SALKELD A. (1980). Quantitation of mRNAs during mouse spermatogenesis: Protamine-like histone and phosphoglycerate kinase-2 mRNAs increase after meiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6086-6090.
- HANAHAN D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J.Molecular Biology 106, 557-580.
- KLEENE K.C., DISTEL R.J. and HECHT N.B. (1984). Translational regulation and deacylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the Mouse. Developmental Biology 105, 71-79.
- MEZQUITA C. and OLIVA R. (1985) Total displacement of nucleosomal core histones "in vitro" by the protamine galline near the physiological arginine/nucleotide ratio. Journal of Cell Biology a, 1985.
- OKAYAMA H. and BERG P. (1982). High-efficiency cloning of full-length cDNA. Molecular and Cellular Biology 2, 161-170.
- OLIVA R. and MEZQUITA C. (1985). La transició nuclihistona-nucliprotamina com a model de diferenciació cel·lular i com model per l'estudi del desensamblatge del nucleosoma. Biologia del desenvolupament 3, 125-136.
- SANGER F., NICKLEN S. and COULSON A.R. (1977). Sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.
- SINCLAIR G.D. and DIXON G.H. (1982). Purification and characterization of cytoplasmic protamine messenger ribonucleoprotein particles from rainbow trout testis cells. Biochemistry 21, 1869-1877.