

Estudi de les variants i subtipus de la histona H1 a l'espermatogènesi del gall.

J.Boix i C.Mezquita

Lab. de Fisiologia del nucli cel.lular.
Facultat de Medicina. Univ. de Barcelona.
Av. Diagonal S/N. 08028 Barcelona.

Abstract

Histone H1 variants and subtypes in rooster spermatogenesis.

Histone H1 shows variability not only among different organisms but also among tissues of the same organism and even at successive stages of development. This fact suggests an important role of histone H1 in the process of cell differentiation. Spermatogenesis offers an excellent model to study the role of histones in relation to chromatin structure and function. We have identified by bidimensional PAGE four main H1 bands (H1.1, H1.2, H1.3 and H1.4) in PCA 0.74 N. extracts obtained from sexually mature and immature testes, liver, erythrocytes and cells at different stages of spermatogenesis separated by centrifugal elutriation. H1.3 becomes the major band in liver and the minor one in testis. H1.3 is described as the most abundant band in other tissues undergoing terminal differentiation. The electrophoretic pattern of histone H1 during rooster spermatogenesis shows a prominent H1.2 band related to chicken H1 complement.

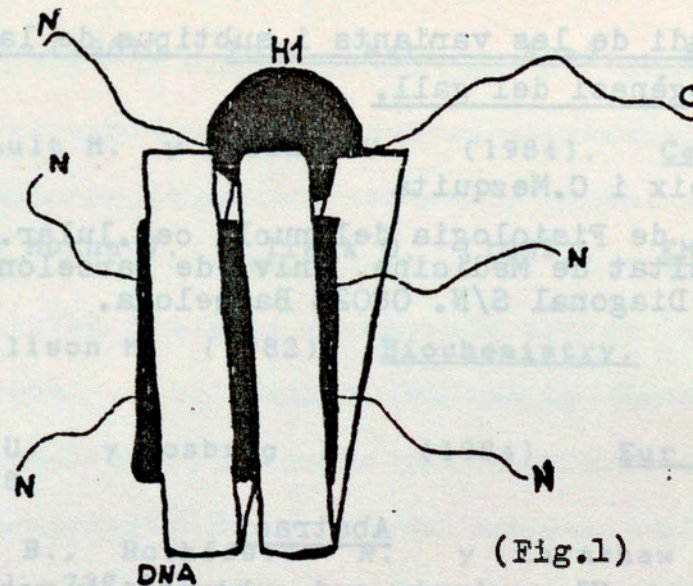
Introducció

La histona H1 es disposa en la subestructura de la cromatina en relació a uns 20 pb. de DNA, segellant les dues voltes que el DNA descriu en torn de l'octàmer d'histones. (Fig.1)

La H1 presenta una conformació característica, amb un centre globular i uns extrems elongats o moduls terminals. És a aquest nivell que experimenta les principals modificacions post-traduccionals, que són la fosforilació i l'ADP-ribosilació. S'ha proposat que la histona H1 estaria implicada en la modulació de la superestructura de la cromatina. (Fig.2)

En l'actualitat no podem pas continuar contemplant a la histona H1 com un tipus únic de proteïna nuclear, i hauriem de considerar-la com un conjunt de proteïnes amb un parentesc de tipus físico-químic i també molt probablement funcional.

Les anomenades variants presenten el tret comú de ser riques amb aminoàcids metionina i arginina a la seva composició. Les variants concretament descrites són les següents:



H5, que s'ha relacionat a la condensació de la cromatina, inactivant els nuclis d'eritròcit, a aquelles espècies que no el perden en el procés de diferenciació. Ha sigut especialment ben estudiada a l'eritròcit del gall.

H1⁰, que apareix a aquells teixits de mamífer que experimenten una diferenciació terminal.

H1t, que es fa present amb la fase meiótica de paquinema a l'espermatogènesi dels mamífers.

A més a més a una gran quantitat d'espècies al llarg de l'escala filogenètica s'ha anat observant una heterogeneïtat de la H1, que ha generat la temàtica dels subtipus.

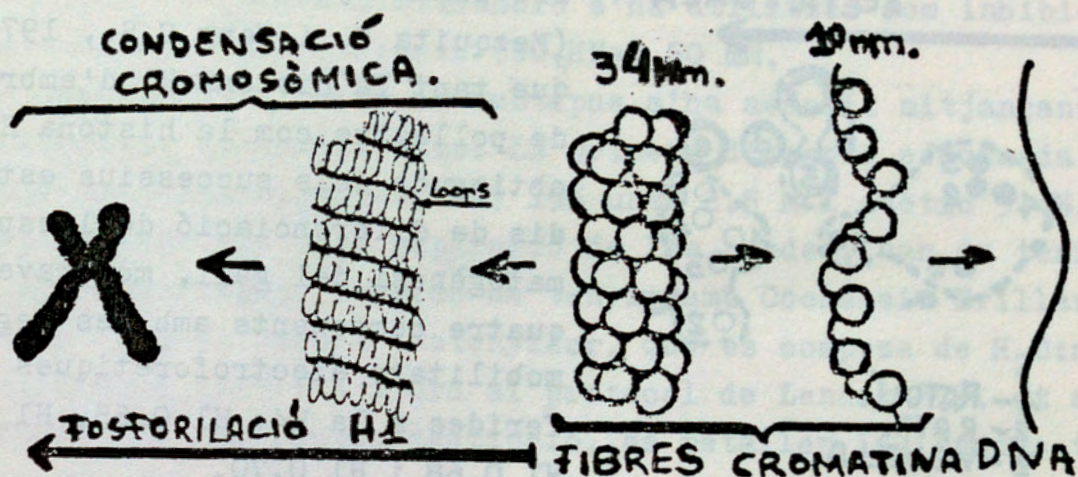
En alguns casos com a *Physarum polycephalum* s'ha demostrat estar generada per la metilació de la H1. (Jerzmanowski A. i Maleszewski M., 1985)

En altres casos com és a mamífers la composició percentual d'aminoàcids de cada subtipus, mostrant lleugeres diferències, reforçaria el conceptuar la heterogeneïtat com deguda a subtipus de seqüència. Aquests subtipus de mamífer són coneguts per H1a, H1b, H1c, H1d i H1e, seguint el criteri del seu ordre d'elució cromatogràfic.

Subtipus i variants són perfectament identificables per electroforesis bidimensionals. (Lennox R.W. et al., 1982)

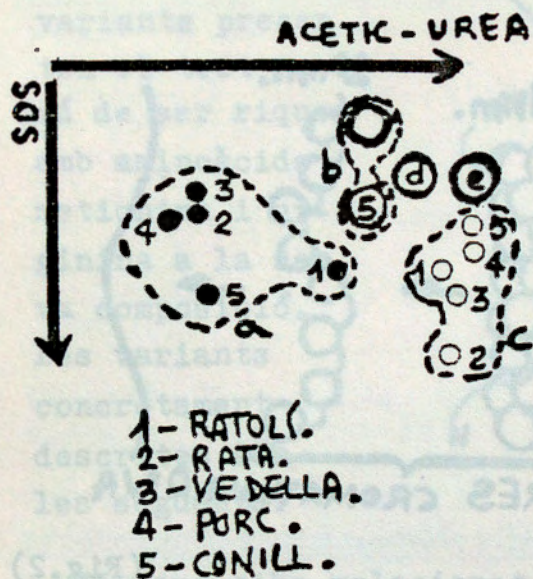
Zweidler A.(1980) proposa classificar tots els subtipus d'histones en dues categories:

- a) Subtipus de replicació, que s'incorporarien a la cromatina de forma coordinada a la síntesi de DNA.
- b) Subtipus de substitució, que s'incorporarien a la cromati



(Fig.2)

na probablement en relació als programes de diferenciació cel.lulars, i independentment de la síntesi de DNA. Així es comporten clarament per exemple, les variants H1^o i H1t. Lennox R.W. i Cohen L.H. (1983) observen canvis en la dotació de H1 de cèl.lules que divideixen al passar a no fer-ho. En concret sembla ser un comportament general a mamífers l'acumulació de H1e amb caiguda de H1a, al finalitzar la cèl.lula fases d'activa replicació. A aquells teixits on a més a més queda reduïda dràsticament la taxa de divisió cel.lular, acompanyat d'una marcada diferenciació, tenim l'aparició de la H1^o en detriment de la H1b. La preponderància a testicle dels subtipus H1a i H1c (Lennox R.W. i Cohen L.H., 1984) on podria interessar una cromatina relaxada, junt amb la menor estabilitat metabòlica i una major variabilitat evolutiva (Fig.3) observada a aquests subtipus, fa hipotitzar a Lennox R.W. (1984) que H1a i H1c presentarien una certa incapacitat per generar estructures d'ordre superior a la cromatina. Els canvis del patró de la H1 induïts per hormones glucocorticoides (Wurtz T., 1985) semblen confirmar algun paper funcional pels subtipus de la H1. La recerca del nostre grup es centra en l'estructura, composició, i funcions de la cromatina a l'espermatogènesi del gall. (Mezquita C., 1985) L'estudi de la H1 en relació a aquest procés de diferenciació ens resulta en conseqüència d'extraordinari interès.



(Fig.3)

Prèviament ja s'havia observat (Mezquita C. i Teng C.S., 1977) que tant la histona H1 d'embrió de pollastre com la histona H1 obtinguda dels successius estadis de diferenciació de l'espermatoogènesi del gall, mostaven quatre components amb les següents mobilitats electroforètiques referides a la H4: H1 0.65, H1 0.67, H1 0.68 i H1 0.70.

Aquestes mobilitats eren constants en el sistema estudiat i es corresponien a les determinades a

diferents teixits de pollastre per Panyim et al. (1971) i a embrió del mateix animal per Teng N.N.H. et al. (1974)

Al llarg de l'espermatoogènesi resultava evident el predomini del component H1 0.67 i la reducció dels altres, especialment del 0.68.

En la present comunicació es demostra utilitzant mètodes addicionals a les electroforesis unidimensionals d'acètic-urea, en que es van basar els anteriors resultats, que els esmentats components són probables subtipus de la histona H1. A més a més es comparen les seves proporcions a diferents teixits.

Material i mètodes

Hem utilitzat fetge, eritròcits, i testicles a diferents edats (sexualment immadurs de 6 setmanes, més madurs de 8 setmanes i adults de 50 setmanes) de galls de la raça Hubbard White Mountain. També s'ha fet servir fetge i testicle de rates i ratolins adults, com a referència.

La separació dels diferents estadis de diferenciació de l'espermatoogènesi s'ha obtingut pel mètode d'elutriació. (Boix J. i Roca J., 1984)

La histona H1 s'ha extret de cèl.lules i teixits seguint el mètode de Johns E.W. (1964), és a dir mitjançant efectuar extraccions amb àcid perclòric (PCA) 5% o 0.74 N. i preci-

pitant amb àcid tricloroacètic (TCAA) a una concentració final del 18-20%. Les proteïnes s'han rentat amb acetona i secat al buit. En el procés d'extracció s'ha utilitzat com inhibidor de proteolisi bisulfit sòdic (SO_3HNa) 50 mM.

La resolució de la H1 en subtipus s'ha assolit mitjançant electroforesis bidimensionals. La primera dimensió efectuada amb gels de poliacrilamida (PA) 15% urea 2.5 M i acètic 5.4%, que per obtenir una bona separació de les bandes, han de tenir un llarg recorregut. Després de tenyir amb Coomassie Brilliant Blue (CBB) 0.1% en liquid destenyidor, que es compon de H_2O :metanol:acètic 16:5:1 d'acord al protocol de Lennox R.W. et al. (1982) i d'una ràpida destinció, es retallen les bandes tenyides que ens interessin, s'equilibren al pH i restants característiques dels gels de la segona dimensió, i s'inclouen en el stacking del gel de segona dimensió. En aquest cas hem utilitzat un gel de PA 15% SDS 0.1%, que en el gall és el que resol més bé els subtipus de la H1.

Un cop conegut el patró de subtipus hem efectuat diferents estudis comparatius i quantitius dels subtipus, que en el nostre cas, ja són identificables en gels de les característiques de la primera dimensió.

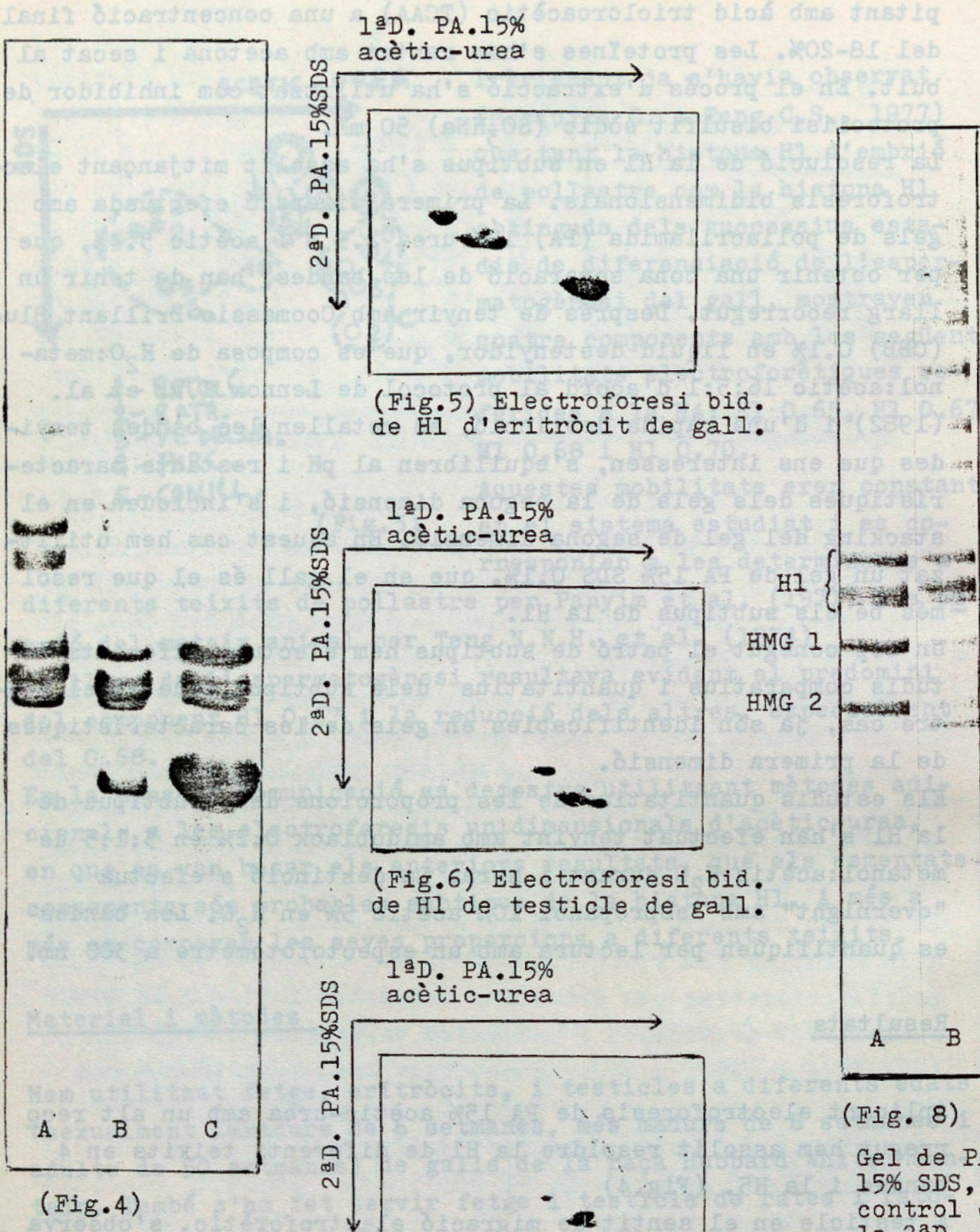
Els estudis quantitius de les proporcions dels subtipus de la H1 s'han efectuat tenyint amb amidoblack 0.2% en 5:1:5 de metanol:acètic: H_2O durant 1 hora. La destinció s'efectua "overnight" amb Isopropanol 10% acètic 5% en H_2O . Les bandes es quantifiquen per lectura amb un espectofotòmetre a 300 nm.

Resultats

Aplicant electroforesis de PA 15% acètic-urea amb un alt recorregut hem assolit resoldre la H1 de diferents teixits en 4 bandes i la H5. (Fig.4)

A testicle en el sentit de migració electroforètic, s'observa la segona banda com a majoritària, i la tercera molt minoritària. Destaca a més a més amb menor mobilitat un parell de bandes molt més patents que als altres teixits comparats, es corresponen a les HMG 1 i 2.

A fetge la banda majoritària resulta ser la que a testicle és minoritària, és dir la tercera. S'hi observen restes de H5,



(Fig.4)

Gel de PA. 15%
acètic-urea de
llarg recorregut,
control de la 1ª
dimensió.
A:Testicle.
B:Fetge.
C:Eritròcits.

(Fig.7) Electroforesi bid.
de H1 de fetge de gall.

(Fig. 8)

Gel de PA.
15% SDS,
control de
la 2ªD.
A:Testicle.
B:Fetge.

que resulten de la sang que conté el fetge i no s'aconsegueix eliminar del tot.

L'eritròcit mostra una majoritària presència de H5, i també quatre bandes, de les que la primera sembla més prominent.

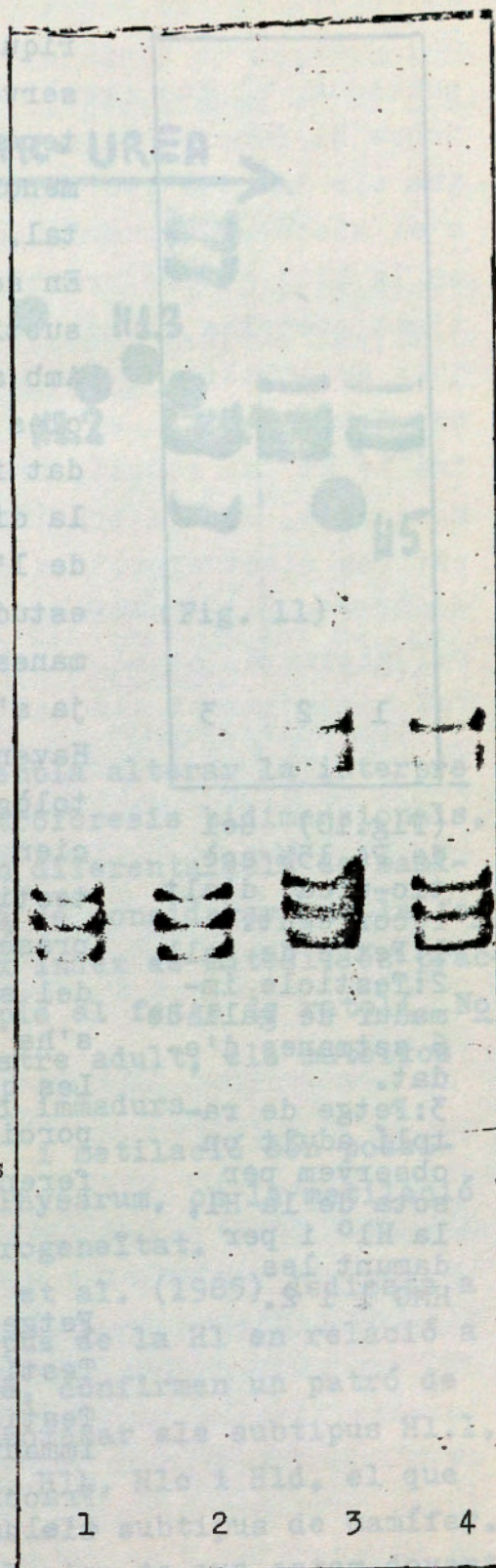
Efectuada la segona dimensió amb gels de PA. 15% SDS (Figs. 5,6, i 7) observem que cada banda dona sols una banda, configurant-se un patró coherent als resultats que teniem d'estudi de la H1 amb gels de SDS. (Fig.8)

En conseqüència passem a considerar aquests components de la H1 com probables subtipus, i per evitar confusions de nomenclatura als subtipus de mamífer dels que difereixen, els anomenem per ordre de menys migració a acètic-urea: H1.1, H1.2, H1.3 i H1.4.

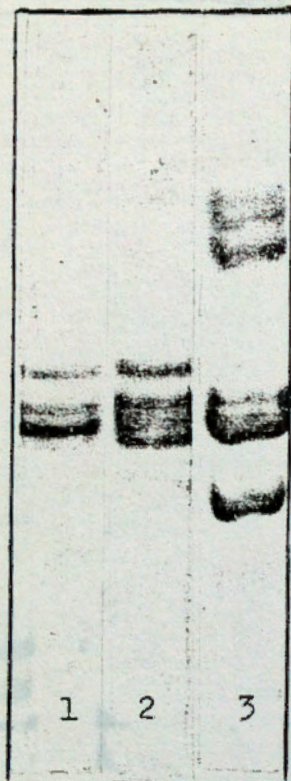
Un cop conegut tot l'esmentat, era obligat el coneixer l'existència de canvis en la proporció dels subtipus durant l'espermatogènesi del gall, amb la finalitat d'establir correlats funcionals, etc...

En primer lloc hem estudiat les fraccions cel.lulars que resulten del mètode de separació d'una suspensió de cèl.lules testiculars per elutriació. (Fig.9)

Sembla bastant evident que entre les fraccions 1 o d'espermàtides allargades, 2 o d'espermàtides rodones, 3 on hi apareixen cèl.lules multinucleades procedents d'espermàtides rodones, junt amb alguna cèl.lula de Sertoli i espermatogònies, i 4 o fracció cel.lular en-



(Fig. 9) Gel de PA. 15% acètic-urea, d'alt recorregut. On hem carregat els extractes amb PCA de les fraccions cel.lulars (1,2,3 i 4) que resulten del procés d'elutriació. El contingut de les fraccions s'especifica al text.



(Fig.10) Gel de PA 15% acètic-urea, d'alt recorregut.
 1:Fetge de gall.
 2:Testicle immadur de gall de 6 setmanes d'edat.
 3:Fetge de ratolí adult on observem per sota de la H1, la H1⁰ i per damunt les HMG 1 i 2.

riquida amb cèl.lules meiòtiques, no s'observen significatives diferències. Ens interessa observar que la H1.3 es troba en menor proporció encara que a testicle total.

En segon lloc hem estudiat si el patró de subtipus canviava a testicles immadurs. Amb aquest propòsit hem utilitzat testicles immadurs de galls de 6 setmanes d'edat i pes inferior a 0.4 gr., on en teoria la diferenciació no ha avançat més enllà de l'estadi d'espermatogònia. També hem estudiat testicles de galls de 8 a 10 setmanes d'edat i pes en torn a 0.8 gr., on ja s'hi poden trobar cèl.lules meiòtiques. Havent-se efectuat controls de tipus histològic, els nostres resultats no evidencien cap diferència entre els dos tipus de testicles immadurs estudiats, i trobem una presència alta respecte a testicle madur del subtipus H1.3, sense arribar al que s'ha observat a fetge. (Fig.10)

Les quantificacions preliminars de les proporcions relatives al total de H1 dels diferents subtipus, resulten com segueix:

	<u>H1.1</u>	<u>H1.2</u>	<u>H1.3</u>	<u>H1.4</u>
Fetge.....	15%	24%	46%	15%
Testicle adult.	23%	37%	17%	23%
Testicle immadur.....	17%	27%	29%	27%
Fraccions d'elutriació...	23%	37%	10%	30%

Finalment considero important destacar que en tots els estudis efectuats amb electroforesis uni o bidimensionals, un cop ja havíem identificat el patró de subtipus, ni s'ha observat a testicle cap banda compatible a una H1t, ni a fetge cap altra sospitosa de ser una H1⁰.

Discussió

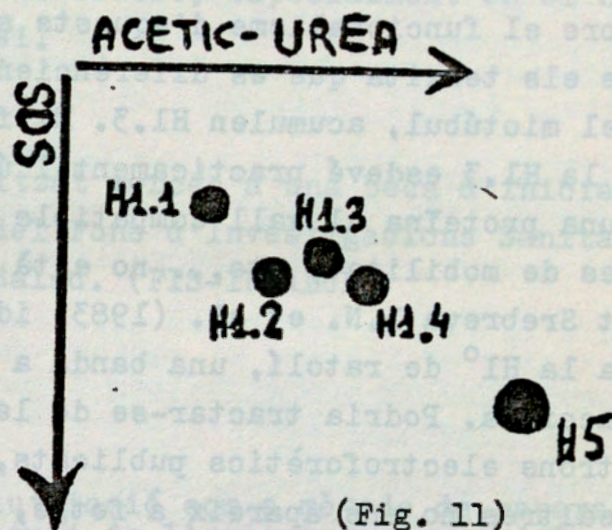
A la cromatina del gall, segons els nostres resultats, hi trobem 4 subtipus d'histona H1, que anomenem H1.1, H1.2, H1.3 i H1.4. i una sola variant a nivell dels eritròcits, que és la coneguda H5. (Fig.11)

La possibilitat de que aquests subtipus definits no ho siguin a nivell de la seqüència d'aminoàcids, és difícil de descartar.

Si bé la fosforilació a mamífers no sembla alterar la interpretació dels subtipus separats per electroforesis bidimensionals, en el cas del gall on els subtipus són diferents dels de mamífer no ho podem assegurar. De fet s'ha de considerar que la fosforilació a teixits adults amb un baix índex de mitosi, és pràcticament inexistent a la H1, per exemple al fetge de ratolí. No saltres hem trobat al fetge del pollastre adult, els mateixos subtipus que a altres teixits madurs i immadurs.

Les modificacions per ADP-ribosilació i metilació són possibles i hauriem de recordar el cas de *Physarum*, on la metilació de la H1, és la causa de la seva heterogeneïtat.

Recientment dos articles de Winter E. et al. (1985) dedicats a l'estudi de les variacions dels subtipus de la H1 en relació a la diferenciació miogènica a pollastre, confirmen un patró de subtipus idèntic al nostre, malgrat anomenar als subtipus H1.1, H1.2, H1.3, i H1.4 respectivament H1a, H1b, H1c i H1d, el que considero introdueix confusionisme amb els subtipus de mamífer. En aquest article aporten fortes evidències de que estem davant de subtipus genètics o de seqüència. En primer lloc els subtipus presenten mapes peptídics diferents en front d'una bateria de diferents proteases assajades, aixó no és pas concluent ja que modificacions post-traduccionals com les abans esmentades podrien variar la susceptibilitat de la H1 a aquestes proteases.



(Fig. 11)

En segon lloc la traducció "in vitro" del m-RNA que conté la H1, dona bandes electroforètiques idèntiques a les dels quatre subtipus, el que resulta molt concluent.

Sobre el funcionalisme d'aquests subtipus al gall sembla ser que els teixits que es diferencien terminalment, com el fetge o el miotúbul, acumulen H1.3. El fet és dramàtic al cristal·lí on la H1.3 esdevé pràcticament l'única forma de H1. L'absència d'una proteïna al gall compatible amb la H1⁰ per característiques de mobilitat, etc... no està pas d'acord al que ha publicat Srebren L.N. et al. (1983) identificant amb anticsos contra la H1⁰ de ratolí, una banda a la H1 del pollastre que hi reacciona. Podria tractar-se de la H1.3, però revisant els seus patrons electroforètics publicats, es tracta d'una banda que a nosaltres no ens apareix a fetge, i que tampoc troben al miotúbul Winter E. et al. on en teoria també s'hi podria trobar H1⁰. Pel comportament als teixits tant paral·lel de la H1.3 a la H1⁰, un treball amb l'anticòs de la H1⁰ damunt d'un patró del subtipus de H1 del gall ben caracteritzats, és molt suggerent.

La presència de H1.3 a testicle immadur i la reducció observada a testicle adult, que s'accentua al preparar suspensions cel·lulars i elutriar, pot interpretar-se de dues formes:

a) Com provinent d'estadis premeiòtics de la línia espermato-gènica.

b) Com contaminació de les cèl·lules somàtiques del testicle, que es diluirien quantitativament per l'abundància de les poblacions cel·lulars germinals a l'adult. Poblacions germinals que d'alguna forma s'enriqueixen pel procés d'elutriació.

La H1.3 es comportaria com les formes que a mamífer s'han considerat condensants de la cromatina, els processos de diferenciació espermatogènics en general semblen requerir cromatines relaxades fins la condensació final a l'espermatozoide, de la que se n'encarregaria la protamina. Llavors ¿quin sentit té una forma condensant de H1?. Aquest plantejament afavoreix la segona interpretació esmentada, però recordem que microscòpicament les espermatogònies presenten importants blocs heterocromàtics. De l'estudi comparatiu d'aquests subtipus als de mamífer per mapeig peptídic, dels estudis de síntesi de la H1 amb aminoàcids marcats a la línia de diferenciació espermatogènica, dels marcatges amb fòsfor i NAD radioactius per estudiar les modificacions post-traduccionals fosforilació i ADP-ribosilació, i

finalment dels estudis de seqüenciació, expressió genètica, i traducció "in vitro", podrem obtenir informació de les funcions de la H1 als processos de diferenciació, especialment en el nostre model de l'espermatogènesi.

Reconeixements

Aquest treball ha estat realitzat mercès a una beca d'iniciació a la investigació a Espanya del Fons d'Investigacions Sanitàries de l'Institut Nacional de la Salut. (FIS-INSALUD)

Bibliografia

BOIX J. i 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.

JERZMANOWSKI A. i MALESZEWSKI M. (1985) Phosphorylation and methylation of Physarum histone H1 during mitotic cycle. Biochemistry USA 24(9), 2360-2367.

JOHNS E.W. (1964) Biochem.J. 92, 55.

LENNOX R.W., OSHIMA R.G. i COHEN L.H. (1982) The H1 histones and their interphase phosphorylated stages in differentiated and undifferentiated cell lines derived from murine teratocarcinomas. J.Biol. Chem. 257, 5183-5189.

LENNOX R.W. i COHEN L.H. (1983) The histone H1 complements of dividing and nondividing cells of the mouse. J.Biol. Chem. 258, 262-268.

LENNOX R.W. (1984) Differences in evolutionary stability among mammalian H1 subtypes. Implication for the roles of H1 subtypes in chromatin. J.Biol. Chem. 259, 669-672.

LENNOX R.W. i COHEN L.H. (1984) The alterations in H1 histone complement during mouse spermatogenesis and their significance for H1 subtype function. Develop. Biol. 103, 80-84.

MEZQUITA C. i 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.

MEZQUITA C. (1985) Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis. (E. Barberá-Guillem Ed.) R.B.C. (5) Servicio Editorial Universidad del País Vasco.

PANYIM S., BILEK D. i CHALKLEY R. (1971) J.Biol. Chem. 246, 4206-4215.

SREBREVA L.N., ANDREEVA N.B., GASARYAN K.G., TSANEV R.G. i ZLATANOVA J.S. (1983) Presence of histone H1⁰-related fraction in chicken liver. Differentiation 25, 113-120.

TENG N.N.H., PIATIGORSKY J., i INGRAM V.M. (1974) Dev. Biol. 41, 72-76.

WINTER E., LEVY D., i GORDON J.S. (1985) Changes in the H1 histone complement during myogenesis. I. Establishment by differential coupling of H1 species synthesis to DNA replication. J.Cell Biol. 101, 167-174.

WINTER E., PALATNIK C.M., WILLIAMS D.L., COLES L.S., WELLS J.R.E., i GORDON J.S. (1985) Changes in the H1 histone complement during myogenesis. II. Regulation by differential coupling of H1 variant mRNA accumulation to DNA replication. J.Cell Biol. 101, 175-181.

WURTZ T. (1985) Events in glucocorticoid hormone action. A correlation of histone H1 variant pattern changes, hormone binding to cell nuclei and induction of mouse mammary tumor virus RNA. Eur. J. Biochem. 152(1), 173-178.

ZWEIDLER A. (1980) Gene families of collagen and other structural proteins. (Prockop D.J. & Champe P.C. Eds.) pp 47-56 Elsevier / North Holland, New York.