

Fenómenos de remodelación nuclear y expresión genética durante la espermiogénesis.

C. Mezquita.

Grup de Genètica Molecular.

Fisiologia. Facultat de Medicina.

Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició.

Divisió de Ciències de la Salut.

Universitat de Barcelona.

En la bibliografía recogida en los últimos meses llama particularmente la atención, por sus implicaciones teóricas y metodológicas, los trabajos publicados en Cell (Newport, 1987; Newport y Spann, 1987 y Fisher, 1987) sobre el desensamblaje y reensamblaje del núcleo celular "in vitro", así como una serie de trabajos sobre expresión genética durante la espermiogénesis, cuyas referencias bibliográficas se mencionan más adelante. A continuación se describen algunas de las observaciones recogidas en dichos trabajos y se establecen posibles relaciones con nuestro modelo experimental.

I. Proteínas nucleares, desensamblaje y reconstitución del núcleo celular "in vitro".

Durante la mitosis y la meiosis el núcleo celular experimenta sucesivamente los fenómenos de desensamblaje y reensamblaje. Dichos procesos son controlados por un grupo de proteínas existente en el citoplasma de las células meióticas y mitóticas. Recientemente ha sido posible reproducir "in vitro" el ensamblaje y el desensamblaje nuclear a partir de extractos de citoplasma de huevos de Xenopus. Un extracto citosólico de huevos de Xenopus no fertilizados que contenga elevadas concentraciones de beta-glicerofosfato (un inhibidor de las fosfatasas), el agente quelante del calcio EGTA y además un sistema que mantenga concentraciones de ATP por encima de 1 mM posee todos los factores necesarios para que el núcleo interfásico experimente la transformación hacia la conformación mitótica. Dicha transformación

supone tres procesos sucesivos (Fig. 1): a) la vesiculización de la membrana nuclear, b) la despolimerización de la lámina, y c) la condensación del DNA.

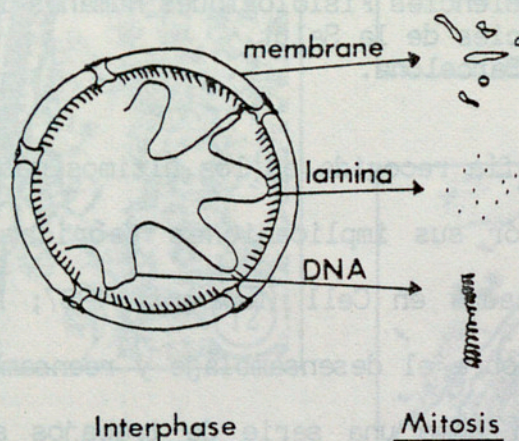


Figura 1. Desensamblaje del núcleo durante la mitosis.

Vesiculización de la membrana.

Siguiendo la cinética de descomposición de la membrana se ha podido comprobar que existe un factor titulable en el extracto de cuya unión estequiométrica con los componentes de la membrana dependería la vesiculización de la membrana, de forma similar a la acción de la clatrina en la membrana plasmática.

Despolimerización de la lámina nuclear.

Las láminas resultan fosforiladas "in vitro" y experimentan, como consecuencia de la fosforilación, una solubilización progresiva. La solubilización se incrementa con el número de núcleos añadidos al extracto hasta llegar a la saturación de la actividad de una supuesta quinasa. Es probable que la solubilización de la lámina sea una condición necesaria para la vesiculización de la membrana, aunque no sería una condición suficiente.

Condensación nuclear .

Los extractos mitóticos son capaces de fosforilar a la histona H1 y a la histona H3, fenómenos que se han relacionado con la condensación mitótica. La fosforilación ocurre en la primera hora de adición de los núcleos al extracto y acaba antes de que la condensación resulte visible. Ello indicaría que si la fosforilación es crítica para la condensación lo es en una etapa muy inicial. Probablemente se trata de la condensación local de la fibra de 30 nm y no implica fenómenos de reorganización de las asas de DNA en el carioesqueleto.

Incrementando el número de núcleos en el extracto, puede comprobarse que la disponibilidad de un factor condensante en el extracto es limitada. Si el extracto se preincuba con DNA de bacteriófago lambda, pierde la capacidad condensante progresivamente en relación con la concentración de DNA añadido. No se conoce el factor responsable de la condensación; la cantidad de topoisomerasa II no parece ser el factor limitante, podría tratarse de la proteína ScII o de otra molécula no identificada. La inhibición de la condensación no interfiere en absoluto con la despolimerización de la membrana; se trata, pues, de fenómenos independientes.

Implicación de la topoisomerasa II en la condensación nuclear.

Los inhibidores de la topoisomerasa II bloquean la condensación del DNA. Cuando los extractos citoplasmáticos contienen Novobiocina y sobre todo el inhibidor VM-26, la condensación del DNA no se produce y, sin embargo, el resto de procesos no experimentan alteraciones. Se desconoce el mecanismo molecular a través del cual la topoisomerasa II interviene en la condensación. La inhibición de la topoisomerasa II no supone cambios en la fosforilación de las histonas H1 y H3.

La adición al extracto del "factor promotor de la diferenciación" (MPF) treinta veces purificado activa el desensamblaje nuclear en todos sus

aspectos: vesiculización de la membrana, despolimerización de la lámina y condensación del DNA. Este factor actuaría como un activador de las quinasas de la lámina y las histonas, del factor inductor de vesiculización y del factor inductor de condensación y, todo ello, posiblemente a través de una cascada de fosforilaciones.

Reconstitución del núcleo celular "in vitro".

Un extracto de huevos de *Xenopus* es capaz de reconstituir el núcleo celular a partir de DNA desnudo. Añadiendo DNA del fago lambda al extracto, se forma una estructura indistinguible de un núcleo eucariótico normal: con una doble membrana provista de poros y la lámina subyacente. El proceso tiene lugar en etapas sucesivas que suponen el ensamblaje de los nucleosomas, seguido por el ensamblaje del carioesqueleto, formación de la membrana nuclear y formación de la lámina. Terminada la reconstitución con la formación de la envoltura nuclear, se inicia la replicación (Fig. 2).

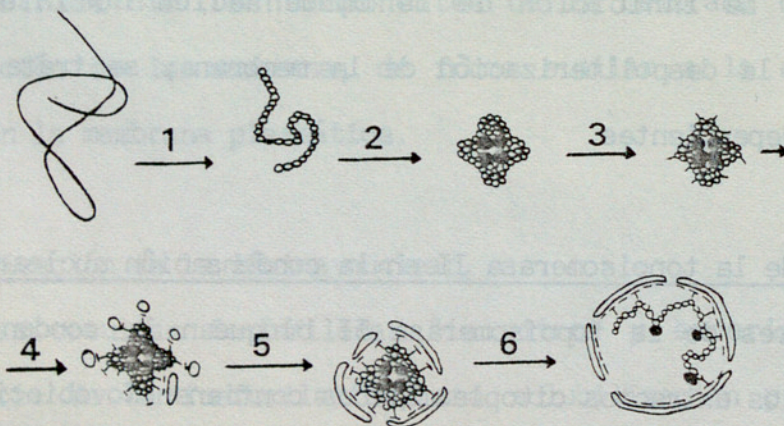


Figura 2. Etrapas de la reconstitución nuclear a partir del DNA in vitro

Durante la oogénesis de *Xenopus* son sintetizadas un conjunto de moléculas necesarias para la formación del núcleo celular: histonas, topoisomerasa II, componentes de la membrana nuclear, componentes de los poros, RNA nuclear de pequeño tamaño, enzimas necesarios para la replicación del DNA etc. Cuando se inyecta DNA del bacteriófago lambda

a los huevos de *Xenopus*, a partir del mismo se reconstituye un núcleo celular morfológicamente indistinguible del núcleo normal, que responde normalmente a las señales del ciclo celular. El mismo resultado se ha conseguido "in vitro" con extractos celulares.

Condensación y descondensación del DNA.

Para conseguir la reconstitución nuclear, a un extracto citosólico de huevos de *Xenopus*, que contiene mitocondrias y elementos vesiculares, se añade un sistema de regeneración de ATP y se incuba en presencia de DNA de bacteriófago lambda. Progresivamente el DNA experimenta una serie de cambios que siguen el orden siguiente: Al principio, inmediatamente después de la adición, el DNA se encuentra en forma de fibras descondensadas. Al cabo de 20-30 minutos la condensación aumenta unas 20-50 veces y el DNA aparece en forma de barras. La condensación coincide con la unión de las histonas que ya se hallan presentes al cabo de 30 minutos. A los 30-40 minutos se ha unido también la histona H1. Una vez formados los núcleosomas, la condensación continúa durante los 40 minutos siguientes formándose esferas muy compactas comparables en cuanto a condensación con la heterocromatina o los cromosomas metafásicos. Las esferas no están rodeadas por la lámina ni por las membranas nucleares.

Una vez se ha alcanzado el grado máximo de condensación el DNA inicia un proceso de descondensación y al mismo tiempo queda rodeado por la envoltura nuclear (membranas nucleares, poros, lámina). El volumen alcanzado durante el proceso de descondensación es de 10 a 30 veces superior al de las esferas compactas. El proceso dura de 60 a 120 minutos. El ensamblaje de los núcleos ocurre, pues, en las tres etapas siguientes: 1) Ensamblaje de los núcleosomas (0-40 min); 2) Condensación del DNA (40-80 min); 3) Descondensación del DNA y formación de la envoltura nuclear (80-180 min).

Si a medida que evoluciona la formación del núcleo celular, se realizan, en tiempos distintos, tratamientos con Tritón X-100 al 1% y ClNa 2M se observan los cambios siguientes: 1) Antes de la compactación del DNA (40 min) éste se dispersa por completo; 2) Cuando la condensación se inicia (40-60 min), el DNA permanece después del tratamiento agregado en forma laxa. 3) Cuando la condensación ha terminado (60-80 min), el DNA permanece esencialmente unido a un núcleo central del que sobresale un halo periférico. Las proteínas responsables de la organización residual del DNA serían resistentes al tratamiento.

Implicaciones de la topoisomerasa II en los fenómenos de condensación y descondensación del DNA durante la reconstitución del núcleo celular.

La adición de los inhibidores de la topoisomerasa II mencionados anteriormente, altera el proceso de reconstitución nuclear "in vitro" en los siguientes aspectos: 1) La condensación inicial atribuible a la formación de núcleosomas no resulta alterada; 2) Los inhibidores bloquean completamente la condensación ulterior; 3) Si los inhibidores se añaden cuando ya ha tenido lugar la condensación, se bloquea el proceso de descondensación que resulta esencial para la ulterior formación de la envoltura nuclear. El hecho de que la inhibición de la topoisomerasa II suponga la formación de un complejo covalente entre el enzima y el DNA escindido, no permite concluir con seguridad si es la falta de actividad enzimática o el complejo formado, el responsable de las citadas interferencias en el proceso de reconstitución. El requerimiento de ATP para la reconstitución nuclear puede deberse, en parte, a la actividad DNA topoisomerasa.

Formación de la envoltura nuclear y actividad replicativa.

Es particularmente interesante el hecho de que, si no se produce descondensación del DNA, la formación de la envoltura nuclear y su unión a la cromatina resultan totalmente interferidas. Ello puede deberse a que no queden expuestos los sitios de la cromatina susceptibles de interacción con las proteínas de la lámina o las vesículas de la membrana. Los sitios estarían enmascarados en la cromatina condensada. Se desconoce a través de qué mecanismo se establece la interacción entre la cromatina y la envoltura nuclear. Ello podría deberse a una modificación química de la cromatina o a la unión de un receptor capaz de interactuar con sitios de la cromatina y sitios de la envoltura. Los núcleos reconstituídos "in vitro" son activos en la replicación del DNA. La capacidad replicativa se adquiere a los 60 minutos, coincidiendo con la descondensación nuclear y, probablemente, con el establecimiento de las interacciones entre el DNA y la envoltura nuclear. En la figura 2 se han representado esquemáticamente las sucesivas etapas del proceso de reconstitución nuclear.

Fenómenos de desensamblaje y reensamblaje nuclear durante la espermatogénesis.

En la espermatogénesis tienen lugar fenómenos de desensamblaje y reensamblaje nuclear durante las divisiones mitóticas de las espermatogonias y las divisiones meióticas de los espermatocitos. Ulteriormente, durante la espermiogénesis vuelven a ocurrir fenómenos de desensamblaje y reensamblaje parciales en los núcleos de las espermátidas. Finalmente, después del proceso de fecundación, tendrán lugar de nuevo procesos de desensamblaje y reensamblaje que conducen a la formación de los pronúcleos del cigoto. La posibilidad de utilizar la metodología "in vitro" descrita en los artículos comentados abre

perspectivas muy interesantes para interpretar algunos de los mecanismos implicados en los procesos de metamorfosis nuclear durante la espermatogénesis.

En nuestro laboratorio hemos investigado los mecanismos de desensamblaje de los núcleosomas en las espermátidas y la formación del complejo núcleoprotamina. Los resultados más recientes relativos al desensamblaje de los núcleosomas en la espermiogénesis del gallo son los siguientes (Oliva et al., 1987):

- La hiperacetilación de las histonas constituiría un paso necesario para el desensamblaje de los núcleosomas. Los núcleosomas hiperacetilados por la acción del butirato analizados por microscopía electrónica presentan una elongación característica (relación axial $>1,4$) en lugar de la forma esférica compacta de los núcleosomas que no contienen histonas hiperacetiladas (relación axial=1,0).

- Las histonas desplazadas de los núcleosomas por la acción de la protamina, "in vitro", muestran un grado de hiperacetilación notablemente superior al de las histonas residuales.

- La protamina muestra una mayor eficiencia en el desensamblaje de los núcleosomas hiperacetilados que en el desensamblaje de los no acetilados.

- Las protaminas de pequeño peso molecular (32-33 aminoácidos), tales como la salmina y la iridina, resultan ineficientes para el desensamblaje de los núcleosomas, en comparación con las protaminas de mayor tamaño, tales como las del gallo, el calamar y la sepia (65-70 residuos) que son capaces de desplazar las histonas de la cromatina a concentraciones muy inferiores, próximas al rango fisiológico.

- El crosslinking de dos moléculas de salmina forma un dímero con la misma capacidad de desplazamiento que las protaminas del mismo tamaño. El dímero artificial se une al DNA con una mayor afinidad que el monómero. Estas observaciones sugieren que el tamaño de la protamina

puede resultar crítico para la eficiencia del desplazamiento y para el grado de condensación.

El fenómeno de desensamblaje de la cromatina de las espermátidas puede comportar además de los cambios de acetilación y unión de la protamina otros cambios en las histonas, tales como modificaciones en el patrón de la histona H1 que hagan posible determinados cambios de superestructura de la cromatina (J.Boix y C.Mezquita, en este volumen), la intervención de proteínas no identificadas de las espermátidas (V.Ustrell y C.Mezquita en este volumen) y la participación de la topoisomerasa II (J.Roca y C.Mezquita, en este volumen).

II. Expresión genética durante la espermiogénesis.

Durante la espermiogénesis tiene lugar una síntesis proteica muy activa, patente en el desarrollo que alcanzan las estructuras subcelulares relacionadas con la misma (Fig. 3). Dicha síntesis no se acompaña siempre de una transcripción concomitante y se realiza a partir de RNA mensajeros estabilizados. Entre los trabajos recientemente publicados sobre la expresión genética durante la espermiogénesis se comentan a continuación los relativos a la expresión del gen MH3, que contiene una secuencia homeobox, la expresión de enzimas glicolíticos específicos de las espermátidas, particularmente el gen procesado desprovisto de intrones de la fosfogliceratoquinasa, la expresión del gen de la pro-encefalina, y la expresión del gen de la histona H1t. Por otra parte se discuten los argumentos experimentales sobre la existencia de una pre-programación genética de la embriogénesis en el genoma de los gametos.

SPERMIOGENESIS OF THE ROOSTER

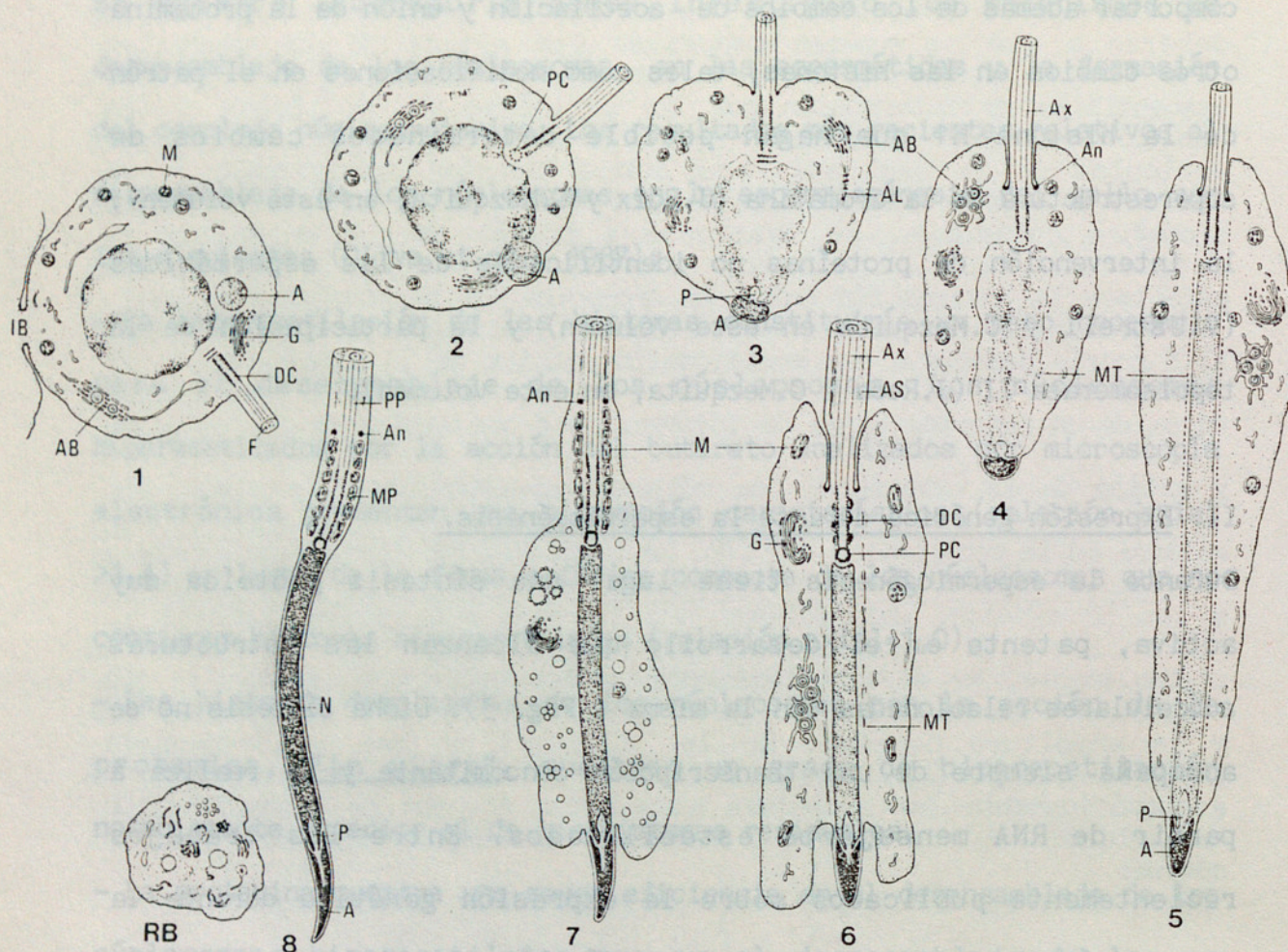


Figura 3. Fases sucesivas de la espermiogénesis del gallo mostrando signos de notable actividad de biosíntesis protéica. Xia, L., Clermont, Y, Lalli, M. y Buckland, R.B. (1986). Evolution of the endoplasmic reticulum during spermiogenesis of the rooster: an electron microscopic study. *Amer. J. Anat.*, 177: 301-312.

Expresión durante la embriogénesis del ratón del gen MH-3 que contiene una secuencia homeobox (Rubin et al., 1986).

Las secuencias del DNA denominadas homeobox codifican proteínas cuyos dominios carboxiterminales muestran homología con proteínas con afinidad por el DNA. La función de las proteínas codificadas por genes con secuencias homeobox podría consistir en el control, a través de un mecanismo trans, de baterías de genes implicados en la diferenciación celular. Para averiguar si el testículo adulto del ratón expresa genes con secuencias homeobox se ha analizado una genoteca cDNA, preparada a partir del testículo, mediante diferentes sondas homeobox. El gen denominado MH-3 presenta una secuencia homeobox con una homología del 79% y del 66% respecto a las secuencias homeobox Dfd y Antp. Las correspondientes secuencias traducidas muestran homologías del 83% y el 75% respectivamente.

A fin de investigar si el gen MH-3 era expresado de forma específica en el testículo se prepararon "Northern blots" que contenían RNA total o poliadenilado extraído de testículo maduro, cerebro, colon, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo, páncreas y ovario. Se detectó un RNA de 1,5 Kb presente en grandes cantidades en el testículo que no estaba presente en ningún otro de los tejidos estudiados.

Para deslindar si la expresión tenía lugar en células germinales o en células somáticas testiculares se utilizó un ratón mutante (Sl/Sl^d), cuyos testículos poseen células somáticas normalmente desarrolladas, pero carecen de la práctica totalidad de células germinales. Pudo comprobarse que el gen no se expresaba en el testículo de los ratones mutantes y que, por lo tanto, su expresión no era propia de las células testiculares somáticas.

Por la técnica de hibridación "in situ" pudo demostrarse también que ésta resultaba positiva en los espermatocitos en fase de paquinema y en las espermátidas redondas y no en las espermatogonias. Una densidad

inferior de granos fue demostrada en las espermatidas que experimentan condensación nuclear y en la luz de los túbulos, lo que indica que el ARNm está presente hasta el final de la espermiogénesis.

Para corroborar los resultados anteriores se estudió la expresión en testículos en diferentes estadios de maduración, entre los días 8 y 18 después del nacimiento. El producto de transcripción se detecta por primera vez el día 14 y aumenta alcanzando niveles progresivamente crecientes en los días siguientes hasta el día 18. Puesto que las células de Sertoli, las espermatogonias y los espermatocitos constituyen el porcentaje mayor de células entre los días 8 y 13, puede concluirse, de acuerdo con los resultados comentados anteriormente, que la activación del gen tendría lugar durante el paquinema.

¿Qué función puede desempeñar el gen MH-3 durante la espermatogénesis?

La expresión del gen tiene lugar en un momento en el que la célula germinal ya ha entrado en la meiosis, por lo que no guardaría relación con los mecanismos que determinan que la célula experimente dicho proceso. La función de la proteína podría guardar relación con fenómenos tardíos de la profase meiótica, tales como la condensación cromosómica o la represión genética. Otra posibilidad es que la proteína esté implicada en los mecanismos de diferenciación de la espermiogénesis, bien induciendo la expresión de la batería de genes responsables de la misma, o interviniendo en las transiciones estructurales que experimenta la cromatina durante la espermiogénesis. Si la proteína está presente en los espermatozoides podría ejercer algún control durante la embriogénesis. La expresión de este gen se ha detectado en el embrión en el día 11,5 post coitum.

Respecto a la expresión de este gen se plantean una serie de cuestiones que no han sido todavía resueltas: ¿En qué fase de la espermatogénesis tiene lugar la traducción?; ¿La proteína codificada por el gen MH-3 es una proteína nuclear?; ¿Se trata de una proteína abundante?. ¿Se

encuentra en el espermatozoide?; ¿Dónde se encontraría localizada en esta célula?; ¿Este mismo gen o un gen homólogo se encuentra en la espermatogénesis de especies diferentes al ratón?; En este último caso ¿guarda su presencia relación con el tipo de espermiogénesis, particularmente con la transición núcleohistona núcleoprotamina?.

Expresión del gen de la fosfogliceratoquinasa 2, un gen reinsertado en el genoma (McCarrey & Thomas, 1987).

La fosfogliceratoquinasa es una enzima de la glicolisis que en el genoma humano está codificada por dos genes, el gen de la PGK-1, ligado al cromosoma X está constituido por 11 exones y 10 intrones y se extiende en una región de unas 23 kb. El gen PGK-2 es un gen autosómico que se expresa únicamente en las fases meióticas y postmeióticas de la espermatogénesis. Este último gen carece de intrones y posee una serie de características que demuestran que se originó a partir del correspondiente RNAm por un mecanismo de transcripción inversa. El gen carece de intrones y posee, adyacente al extremo 3' de la señal de poliadenilación, una secuencia de 165 bases en las que el 52% son adeninas; se observa, además, la presencia de la secuencia 5'-TATGTTT-3' situada en el extremo 3' adyacente a la cola poli-A y en el extremo 5' entre las posiciones -945 y -939 respecto al triplete de iniciación AUG. Estas secuencias se añaden a los extremos del producto de transcripción procesado para favorecer su reinsertión.

Normalmente, los genes que presentan características semejantes a las descritas, son pseudogenes que no son transcritos. Para investigar la transcripción del gen PGK-2 durante la espermatogénesis del ratón, se preparó RNA de testículo de ratón adulto, de testículo inmaduro, de espermátidas redondas y de espermátidas alargadas. Como sondas se utilizaron las secuencias del extremo 3' de ambos genes que no presentan homología. El gen PGK-1 se expresa en las células

premeióticas y en las células somáticas del testículo mientras que el gen PGK-2 se expresa en las células meióticas y postmeióticas.

La razón que obligaría a la inserción del gen resultante de la transcripción inversa del producto de transcripción del gen original podría ser el hecho de que el gen PGK-1 esté ubicado en el cromosoma X y este cromosoma experimenta inactivación previa a la meiosis, lo que obligaría a elegir un nuevo emplazamiento para que el gen pueda ser expresado en etapas posteriores de la espermatogénesis, en las que dicha actividad enzimática resulta esencial. Este mismo fenómeno puede haber ocurrido en otros genes ligados al cromosoma X.

Expresión específica del gen de la lactatodeshidrogenasa C durante la espermiogénesis del ratón (Sakai et al. 1987).

Otra enzima de la glicolisis que sólo se expresa durante la espermiogénesis, es la lactatodeshidrogenasa C del ratón. Las isoenzimas de la lactatodeshidrogenasa A y B se expresan, en cambio, preferentemente en músculo esquelético y corazón respectivamente. El gen que se expresa en el testículo ha sido secuenciado. No se conocen las razones que conducen a su expresión específica durante la espermatogénesis.

La glicolisis de las espermátidas y los espermatozoides constituye un modelo muy adecuado para investigar la expresión específica de las enzimas glicolíticas. Aparte de las razones aducidas en el caso anterior, que requieren la existencia de un gen adicional de PGK, el hecho de que la transcripción cese durante la espermiogénesis, obligaría a sintetizar RNA mensajeros particularmente estables y en cantidades adecuadas. También es posible que las proteínas codificadas por estos genes tengan una estabilidad aumentada. En todo caso, el modelo ofrece la posibilidad de investigar entre estas diferentes alternativas.

La posibilidad de que en la población de mensajeros de las espermátidas estén ámpliamente representados los correspondientes a las isoenzimas glicolíticas, aumenta las posibilidades de detectar tales genes en las genotecas de cDNA de espermátidas. En este sentido cabe indicar que algunos de los clones secuenciados de la genoteca de espermátidas de gallo en nuestro laboratorio presentan una cierta homología con la enzima triosafosfatoisomerasa que incluye los aminoácidos del centro activo.

El estudio de la expresión de las enzimas glicolíticas presenta el interés adicional de que estas proteínas, además de su función enzimática en la glicolisis, pueden ejercer otras funciones a través de su interacción con el DNA. Esta interacción se ha demostrado en el caso de la lactato deshidrogenasa y de la fosfoglicerato deshidrogenasa.

Expresión del gen de la proencefalina en células meióticas y postmeióticas del ratón (Kilpatrick & Millette, 1987).

Durante la espermatogénesis se expresan los genes que codifican la pro-opiomelanocortina, la proencefalina y la prodinorfina. La función de las correspondientes proteínas durante la espermatogénesis es desconocida. Durante la espermatogénesis del ratón, el gen de la proencefalina se expresa en los espermátocitos en fase de paquinema y en las espermátidas redondas, donde alcanza concentraciones 2-3 veces superiores a las del testículo total. La presencia de RNAm correspondiente al gen de la proencefalina en las células citadas no es debida a contaminación por células de Sertoli o por células intersticiales. Los espermatozoides no contienen el mensajero de la proencefalina. La existencia de los precursores de los péptidos opiáceos indica que deben expresarse también las proteasas responsables de su procesamiento. Al igual que sucede en el caso de otros mensajeros presentes en las espermátidas, la mayoría del mensajero de la

proencefalina es estable. Se desconocen los mecanismos responsables de dicha estabilidad.

Secuenciación de un gen que codifica en el ratón una variante meiótica y postmeiótica de la histona H1 (Cole et al. (1986).

En muchas especies, el patrón de las histonas de las células testiculares presenta características diferenciales respecto a otros tejidos. En los espermatoцитos y en las espermátidas de los mamíferos existe una variante de la histona H1, denominada H1t, que constituye entre el 65% y el 85% de todas las histonas H1 presentes. La función de esta proteína es desconocida, asumiéndose que estaría relacionada con la remodelación estructural de la cromatina en las células meióticas o durante la transición núcleo-histona núcleo-protamina. El gen secuenciado presenta secuencias comunes a otros genes H1 de diferentes especies. No resulta obvio por la secuencia, en qué radica la especificidad de expresión en determinados estadios de la espermatogénesis.

¿Es el genoma del espermatozoide una tabula rasa? (Surani et al. 1986).

El genoma de ambos gametos podría ser una tabula rasa sometida a reprogramación al comienzo de la embriogénesis o, por el contrario, a pesar la aparente simplicidad del genoma del espermatozoide, aparentemente un simple cristal de nucleoprotamina, ambos gametos podrían transmitir escrito en su genoma determinados programas de expresión genética que se expresarían en diferentes momentos de la embriogénesis. Los experimentos de trasplante nuclear realizado en embriones de ratón apoyan la segunda interpretación. Cada gameto posee en su genoma la información específica para programas de diferenciación que se desarrollan durante la embriogénesis y que son absolutamente necesarios para el desarrollo del embrión a término. Los programas

existentes en cada uno de los dos gametos del ratón son diferentes y complementarios.

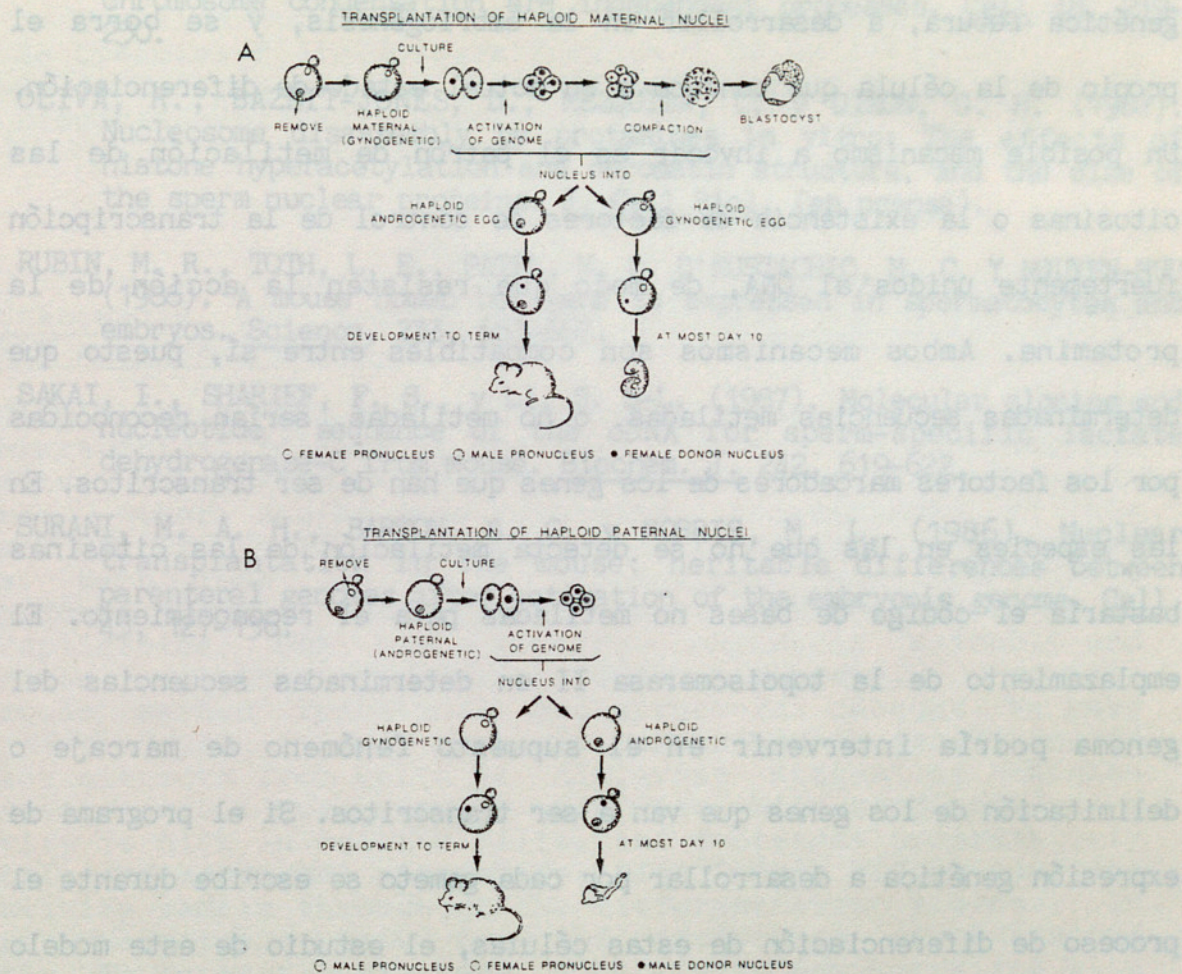


Figura 4. Transplante de nucleos haploides materno y paterno.

La transferencia de un núcleo paterno o materno de un embrión haploide en la fase de preimplantación a huevos fertilizados de los que se ha eliminado un pronúcleo (Fig. 4), sólo conduce a un desarrollo a término en el caso de que después de la transferencia del núcleo queden reunidos un genoma paterno y un genoma materno. No se consigue el desarrollo si ambos núcleos contienen el mismo genoma. Esta observación indica, tal como se ha comentado anteriormente, que ambos genomas están preprogramados, que los programas son diferentes y complementarios y que no se borran con la supuesta reprogramación de la embriogénesis inicial.

Una cuestión muy importante para el control de la expresión genética que no está resuelta en la actualidad consiste en el mecanismo a través del cual se graba en el genoma del gameto el programa de expresión genética futura, a desarrollar en la embriogénesis, y se borra el propio de la célula que conduce a su actual estado de diferenciación. Un posible mecanismo a invocar es el patrón de metilación de las citosinas o la existencia de factores de control de la transcripción fuertemente unidos al DNA, de modo que resisten la acción de la protamina. Ambos mecanismos son compatibles entre sí, puesto que determinadas secuencias metiladas, o no metiladas, serían reconocidas por los factores marcadores de los genes que han de ser transcritos. En las especies en las que no se detecta metilación de las citosinas bastaría el código de bases no metiladas para el reconocimiento. El emplazamiento de la topoisomerasa II en determinadas secuencias del genoma podría intervenir en el supuesto fenómeno de marcaje o delimitación de los genes que van a ser transcritos. Si el programa de expresión genética a desarrollar por cada gameto se escribe durante el proceso de diferenciación de estas células, el estudio de este modelo puede tener el interés adicional de investigar los mecanismos que controlan el desarrollo embriológico.

Bibliografía

- COLE, K. D., KANDALA, J. C. y KISTLER, W. S. (1986). Isolation of the gene for testis-specific H1 histone variant H1t. J. Biol. Chem. 261, 7178-7183.
- FISHER, P. A. (1987). Disassembly and Reassembly of Nuclei in Cell-Free Systems. Cell, 48, 175-176.
- KILPATRICK, D. L. y MILLETTE, C. F. (1986). Expression of proenkephalin messenger RNA by mouse spermatogenic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5015-5018.
- MCCARREY, J. R. y THOMAS, K. (1987). Human testis specific PGK gene lacks introns and possesses characteristics of a processed gene. Nature 326, 501-505.

NEWPORT, J. (1987). Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA. Cell 48, 205-217.

NEWPORT, J. y SPANN, T. (1987). Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly and chromosome condensation are independent processes. Cell 48, 219-230.

OLIVA, R., BAZETT-JONES, D., MEZQUITA, C. y DIXON, G. H. (1987). Nucleosome disassembly by protamines in vitro: The effects of histone hyperacetylation and chromatin structure, and the size of the sperm nuclear proteins. J. Cell Biol. (en prensa).

RUBIN, M. R., TOTH, L. E., PATEL, M. D. D'EUSTACHIO, M. C. Y NGUYEN-HUU (1986). A mouse homeo box gene is expressed in spermatocytes and embryos. Science, 233, 663-667.

SAKAI, I., SHARIEF, F. S., y LI, S. S-L. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA for sperm-specific lactate dehydrogenase-C from mouse. Biochem. J. 242, 619-622.

SURANI, M. A. H., BARTON, S. C. y NORRIS, M. L. (1986). Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parenteral genomes after activation of the embryonic genome. Cell, 45, 127-136.

Introducció

L'organització i compactació del DNA a l'interior del nucli cel·lular s'associa amb el plegament jerarquitzat de la doble hèlix del DNA mitjançant la seva interacció amb les proteïnes de la cromatina. Les histones pleguen el DNA donant lloc a la subunitat bàsica de la cromatina; el nucleosoma. Els