

Caracterització dels subtipus de la histona H1 del pollastre.

J. Boix i C. Mezquita.
 Grup de Genètica Molecular.
 Fisiologia. Facultat de Medicina.
 Departament de Ciències Fisiològiques
 Humanes i de la Nutrició.
 Divisió Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona
 Avd. Diagonal S/N. 08028 Barcelona.

Abstract

Characterization of chicken histone H1 subtypes.

Histone H1 is probably composed by different protein species closely related. Histone H1 has been usually involved in higher order structures of chromatin. The H1 subtypes may play specific roles in chromatin structure. We have identified four possible subtypes (H1.1, H1.2, H1.3, and H1.4) in chicken tissues by electrophoretic procedures. The relative amount of H1.3 changes markedly in different chicken tissues: it is the major subtype present in chicken liver and it is not detectable in chicken spermatids. Both types of cells are inactive in DNA replication but present marked differences in chromatin structure. Hepatocyte nuclei show large heterochromatic blocks, while heterochromatin is not present in the nucleohistone of spermatids undergoing differentiation to spermatozoa. In order to study if H1.3 and the mammalian H1o may be functionally equivalent in liver we have assayed the cross-reactivity of H1.3 to rat H1o antibody by Western blotting analysis. We have also compared the V8 protease peptide maps of rat H1o and chicken H1 components. No relationship between these two proteins can be established by the methods used.

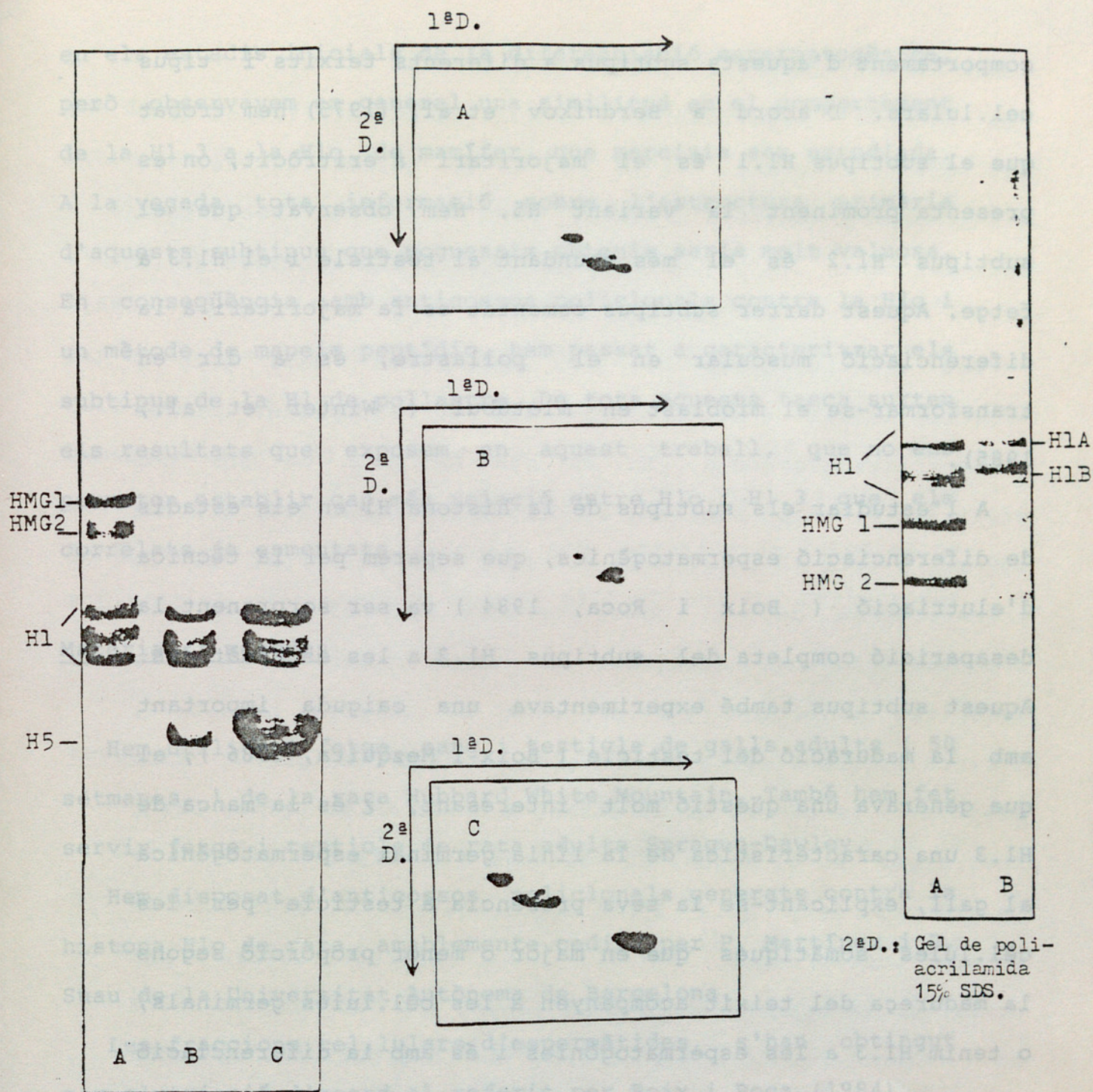
Introducció

La histona "molt rica en lisina" o H1 és coneguda per la seva ubicació en la subestructura de la cromatina segellant les dues voltes que el DNA descriu en torn de l'octàmer integrat per les restants histones. La histona H1 s'ha involucrat tradicionalment en la producció d'estructures

d'ordre superior a la cromatina. La histona H1 s'ens manifesta heterogènia a la majoria d'espècies fins el present estudiades. Aquesta heterogeneïtat varia segons el teixit investigat a una mateixa espècie. Per tot l'esmentat s'ha suggerit l'existència de subtipus i variants de la histona H1, és a dir entitats moleculars diferents amb probables repercussions funcionals també diferents a la cromatina. Per ara però, sols les variants de la H1 (és a dir aquells subtipus més allunyats com la H5 de l'eritròcit d'aus, la H1o i la H1t de mamífers) s'han identificat a nivell genòmic (Doenecke i Tönjes, 1986; Cole et al., 1986). Els restants subtipus que integren la H1 presenten evidències ben contradictòries de la seva existència a aquest nivell (Jerzmanowski i Maleszewski, 1985; Mezquita et al., 1985; Dupressoir i Sautiere, 1984; Bustin i Cole, 1968).

L'espermatogènesi és un model de diferenciació molt interesant per estudiar els canvis estructurals i funcionals de la cromatina. Des de fa temps venim investigant diversos aspectes d'aquest model en el gall (Mezquita, 1985).

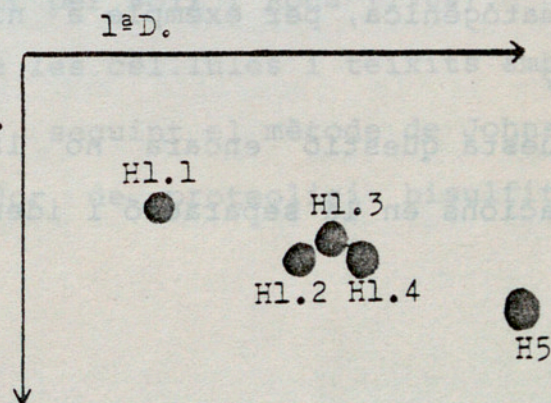
Hem identificat 4 probables subtipus de la histona H1 al pollastre mitjançant electroforesis bidimensionals d'acord al descrit per Lennox et al. (1982), que s'efectuen amb una primera dimensió d'acètic-urea de llarg recorregut i una segona de SDS (Fig. 1). També hem caracteritzat el



1ª D.: Gel de poliacrila-
mida 15% acètic
urea.

2ª D.: Gel de poli-
acrilamida
15% SDS.

Figura 1: Patró uni i bidimen-
sional dels subtipus de la H1
del pollastre a diferents
teixits: A- Testicle.
B- Fetge.
C- Sang.



comportament d'aquests subtipus a diferents teixits i tipus cel·lulars. D'acord a Berdnikov et al. (1975) hem trobat que el subtipus H1.1 és el majoritari a eritròcit, on es presenta prominent la variant H5. Hem observat que el subtipus H1.2 és el més abundant al testicle i el H1.3 a fetge. Aquest darrer subtipus esmentat es fa majoritari a la diferenciació muscular en el pollastre, és a dir en transformar-se el mioblast en miotúbul (Winter et al., 1985).

A l'estudiar els subtipus de la histona H1 en els estadis de diferenciació espermatogènics, que separem per la tècnica d'elutriació (Boix i Roca, 1984) va ser sorprenent la desaparició completa del subtipus H1.3 a les espermatides. Aquest subtipus també experimentava una caiguda important amb la maduració del testicle (Boix i Mezquita, 1986), el que generava una qüestió molt interessant, ¿ és la manca de H1.3 una característica de la línia germinal espermatogènica al gall, explicant-se la seva presència a testicle per les cèl·lules somàtiques que en major o menor proporció segons la madureça del teixit acompanyen a les cèl·lules germinals, o tenim H1.3 a les espermatogònies i és amb la diferenciació espermatogènica, per exemple a nivell de la meiosi, que es perd ?

Aquesta qüestió encara no la tenim resolta per les limitacions en la separació i identificació de les cèl·lules

en els estadis inicials de la diferenciació espermatogènica, però observavem en general una similitud en el comportament de la H1.3 a la H1o de mamífer, que mereixia ser estudiada. A la vegada tota informació sobre l'estructura primària d'aquests subtipus que poguessim obtenir seria molt valuosa. En conseqüència amb anticossos policlonals contra la H1o i un mètode de mapeig peptídic, hem passat a caracteritzar els subtipus de la H1 de pollastre. De tota aquesta tasca surten els resultats que exposem en aquest treball, que no ens permeten establir cap més relació entre H1o i H1.3 que els correlats ja esmentats.

Material i mètodes

Hem utilitzat fetge, sang i testicle de galls adults (50 setmanes) de la raça Hubbard White Mountain. També hem fet servir fetge i testicle de rata adulta Sprague-Dawley.

Hem disposat d'anticossos policlonals generats contra la histona H1o de rata, amablement cedits per P. Martínez i P. Suau de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Les fraccions cel.lulars d'espermàtides, s'han obtingut per elutriació d'acord al referit per Boix i Roca (1984).

La histona H1 s'ha extret de les cèl.lules i teixits amb àcid perclòric (P.C.A.) 0.74 N. seguint el mètode de Johns (1964). Hem utilitzat l'inhibidor de proteolisi bisulfit

sòdic 50 mM., disolt en l'àcid esmentat.

Hem efectuat electroforesis en gels de poliacrilamida (PA) 15% SDS (Laemmli, 1970) i de poliacrilamida 15% acètic-urea (Panyim i Chalkley, 1969) amb un recorregut suficientment llarg per assolir separar els subtipus de la H1.

Les transferències de les proteïnes dels gels a nitrocel.lulosa s'ha efectuat amb un equipament BIORAD d'electrotransferència. En el cas de gels de SDS hem utilitzat el tampó habitual de cubeta (metanol 20%, glicina 150 mM. i Tris 20 mM./ClH pH 8.2) i la polaritat de la transferència cap al polo positiu. En el cas de gels d'acètic-urea hem utilitzat un tampó d'acètic 1% i la polaritat invertida (la proteïna té càrrega positiva, llavors és transferida cap al polo negatiu). El procés s'ha efectuat a la cambra freda durant 4 hores en el primer cas i "overnight" en el segon. El voltatge s'ha fixat a 40 V.

La tinció dels gels l'hem efectuada amb C.B.Blue 0.1% en metanol/acètic/aigua 5/1/16. La nitrocel.lulosa per controlar la transferència s'ha tenyit amb amidoblack 0.1% en metanol/acètic/aigua 5/1/5. La nitrocel.lulosa s'ha bloquejat indiferentment tant amb albúmina com amb gelatina. Després de la incubació amb l'anticòs de la H1o a una dilució 1/500 hem detectat la fixació tant per reacció directa amb un antianticòs complexat a la peroxidasa (cas

de la fig.3) com per reacció indirecta (cas de la fig. 2) amb dos anticossos, seguint el mètode de la peroxidasa antiperoxidasa (P.A.P.).

Els mapes peptídics amb la proteasa estafilocòcica V8 s'han efectuat d'acord al mètode descrit per Rizzo et al. (1985), en concret s'han utilitzat 30 micrograms de proteasa per banda electroforètica sotmesa a mapeig. Els mapes en gels de PA 18% SDS s'han visualitzat a cops amb la tinció ja esmentada abans de C.B.Blue i a cops amb tinció argèntica seguint el descrit per Giancotti i Goodwin (1986). Les densitometries s'han efectuat amb negatius de fotografies POLAROID en un espectrofotòmetre GILFORD i un registrador LKB.

Resultats

Per estudiar la reactivitat dels probables subtipus de la H1 amb l'anticòs de la H1o hem escollit el fetge de gall on la H1.3 és prominent i a més a més hi podriem esperar trobar una H1o, per analogia als mamífers.

Com control positiu hem agafat:

- a) Per supost el fetge de rata, ja que la seva H1 conté la H1o amb la que s'ha obtingut l'anticòs.
- b) L'eritròcit de gall, ja que presenta tots els subtipus de la H1, que hem descrit, i la variant H5, que presenta

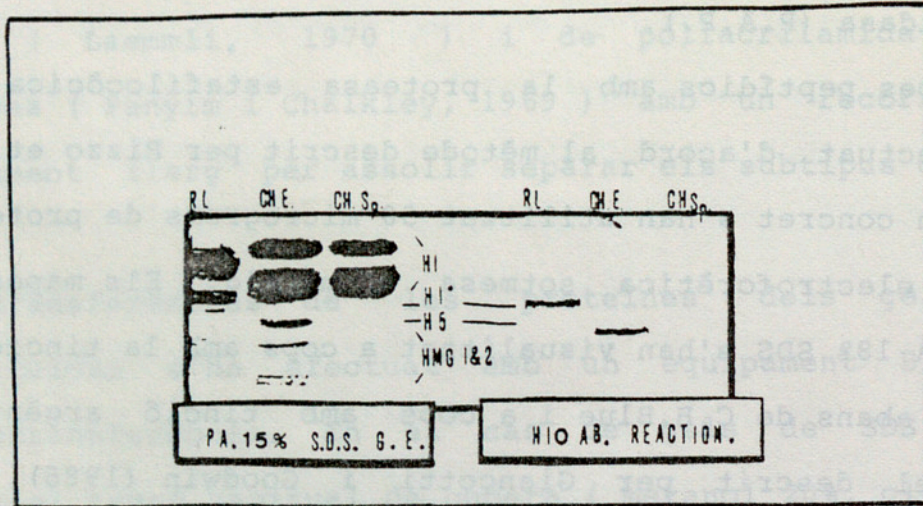


Figura 2: A l'esquerra gel de PA 15% SDS tenyit amb C.B.Blue, on s'observa el patró de proteïnes solubles al PCA 0.74 N de diferents teixits, en torn d'un pes molecular aparent 30000.

A la dreta la transferència a nitrocel.lulosa de les esmentades proteïnes i la seva reactivitat amb un anticòs policlonal contra la H10 de rata.

Abreviacions: R(rata) Ch(gall)
 L(fetge) Sp(espermàtides) E(sang-eritròcits)
 T(testicle)

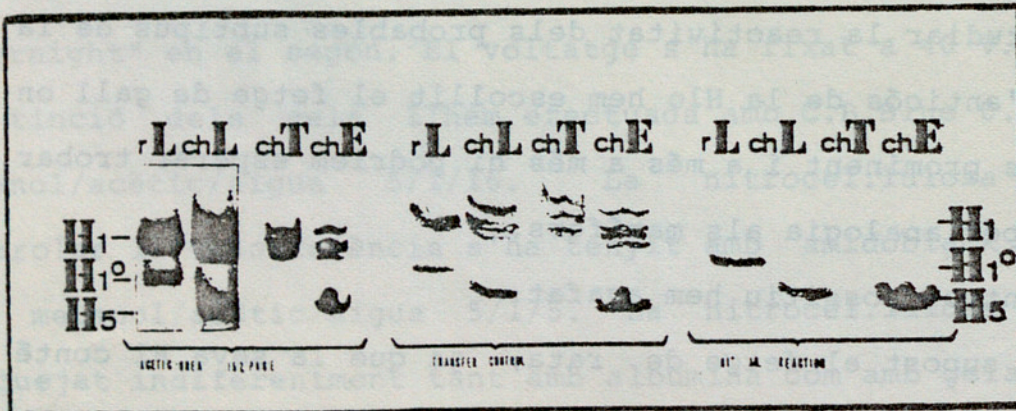


Figura 3: A l'esquerra gel de PA 15% acètic-urea tenyit amb C.B.Blue, on el patró de la histona H1 es resol bé en els seus subtipus. El centre és el control de la transferència a la nitrocel.lulosa tenyit amb amidoblack.

A la dreta la reacció de les proteïnes transferides a l'anticòs policlonal esmentat contra la H10 de rata.

alta homologia de seqüència i immunològica amb la H1o (Doenecke i Tönjes, 1986).

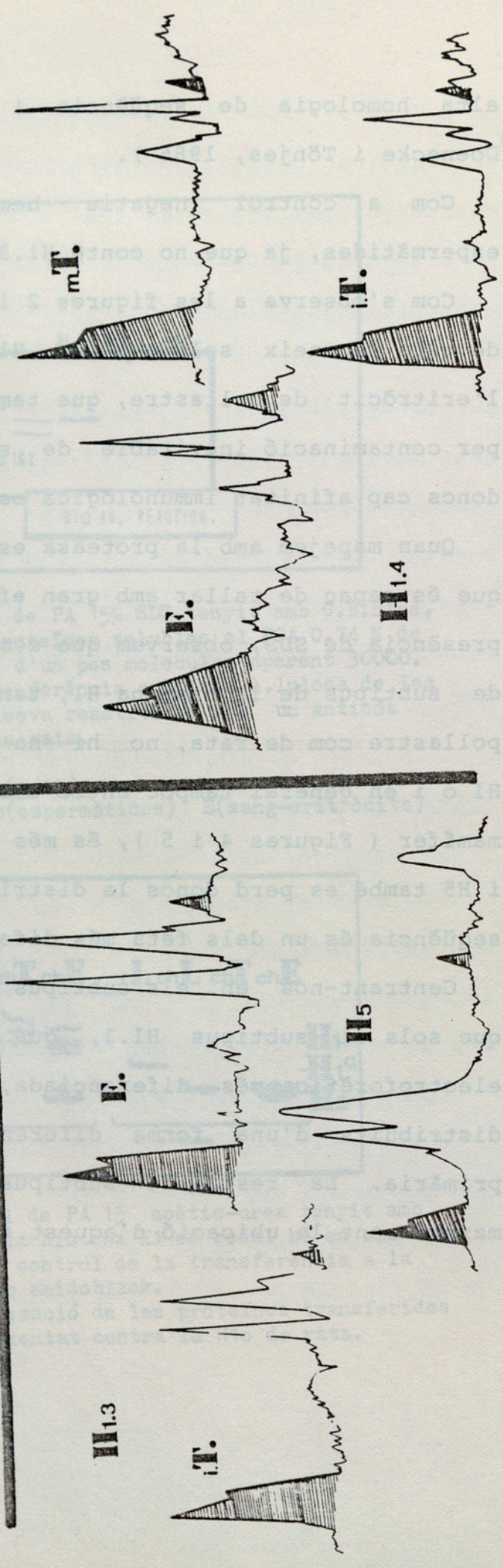
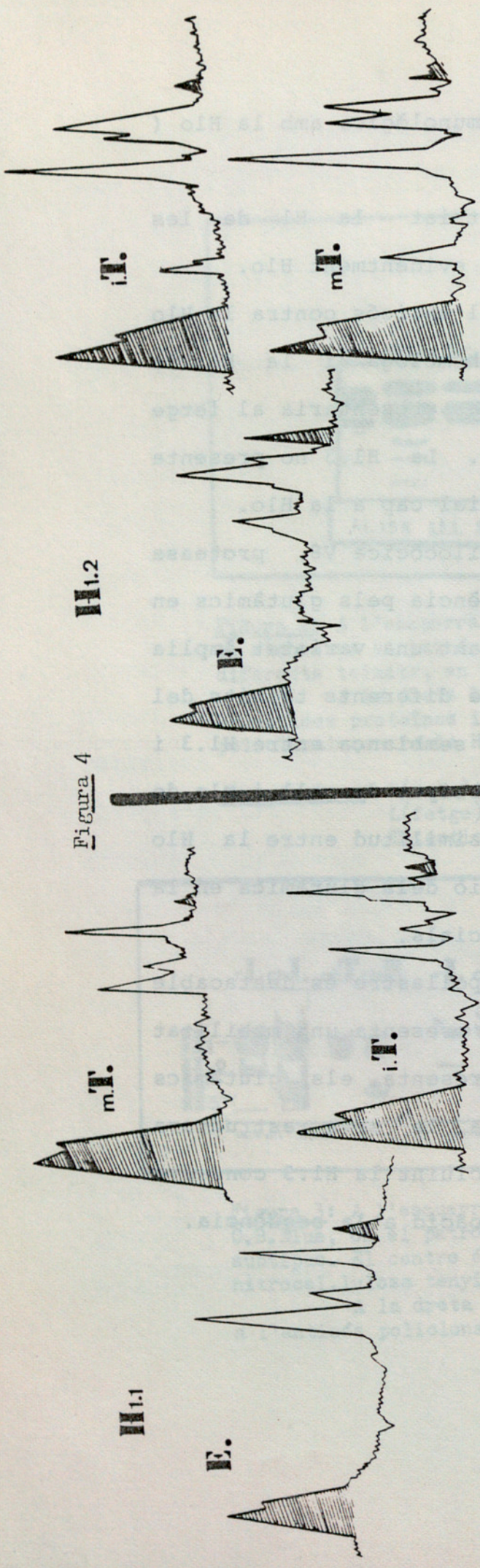
Com a control negatiu hem triat la H1 de les espermatides, ja que no conté H1.3 ni evidentment H1o.

Com s'observa a les figures 2 i 3 l'anticòs contra la H1o de rata reconeix solament la H1o homòloga i la H5 de l'eritròcit de pollastre, que també es presentaria al fetge per contaminació inevitable de sang. La H1.3 no presenta doncs cap afinitat immunològica especial cap a la H1o.

Quan mapejem amb la proteasa estafilocòcica V8, proteasa que és capaç de tallar amb gran eficiència pels glutàmics en presència de SDS, observem que comparant una varietat àmplia de subtipus de la histona H1, tant de diferents teixits del pollastre com de rata, no hi ha cap semblança entre H1.3 i H1 o i en general tampoc entre els subtipus de gall i els de mamífer (Figures 4 i 5), és més la similitud entre la H1o i H5 també es perd doncs la distribució dels glutàmics en la seqüència és un dels fets més diferencials.

Centrant-nos en els subtipus de pollastre és destacable que sols el subtipus H1.1, que ja presenta una mobilitat electroforètica més diferenciada, presenta els glutàmics distribuïts d'una forma diferent a la seva estructura primària. La resta de subtipus incluint la H1.3 conserva marcadament la ubicació d'aquest aminoàcid a la seqüència.

Figura 4



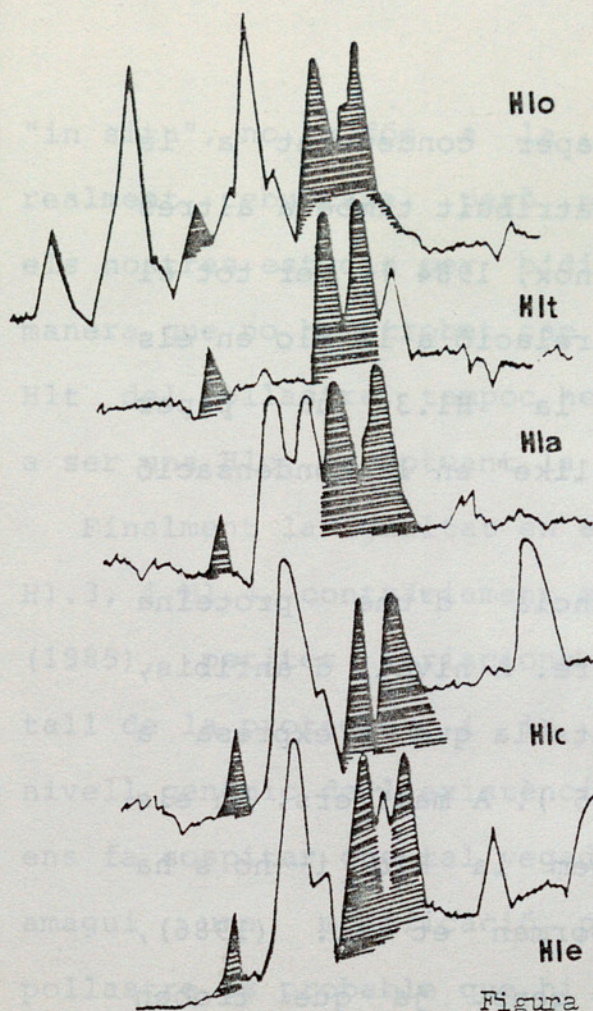


Figura 4: Densitometries dels mapes peptídics obtinguts per la proteasa estafilocòcica V8 en gels de PA 18% SDS dels diferents subtipus i variants de H1 del gall. Visualitzat per tinció amb C.B. Blue.

Els pics ratllats són els característics de la proteasa. Un de superior i prominent que es mou amb un pes molecular aparent superior a 30000, i un d'inferior més discret, que ho fa a 14400.

Abreviacions: mT (testicle matur)
iT (testicle immatur)
E (eritròcits)

Figura 5: Densitometries dels mapes peptídics obtinguts per la proteasa estafilocòcica V8 en gels de PA 18% SDS de diversos subtipus i variants de H1 de rata. Visualitzat per tinció argèntica.

Els pics ratllats són propis de la proteasa, donant sota tinció argèntica un pic doble prominent en torn de 20000 i el més distal de 14400.

Figura 5

Discussió

Ni immunològicament ni a nivell d'estructura primària sembla haver-hi relació entre la H1.3 i la H1o malgrat un comportament idèntic de distribució a la majoria de teixits. La H1o apareix en tots aquells tipus cel·lulars que en termes generals entren en una relativa quiescència i marcada diferenciació, i que presenten en molts casos importants blocs heterocromàtics. Per la seva similitud a la H5, que sembla clar pot tenir un paper en la condensació de la cromatina dels eritròcits nucleats d'aus, anfibis, etc...,

també podriem atribuir a la H10 un paper condensant a la cromatina. Paper que a mamífers s'ha atribuït també a altres subtipus com el subtipus H1e (Lennox, 1984). Per tot el que hem observat i malgrat la nula relació a la H10 en els estudis efectuats, hipotitzem per la H1.3 un paper "H10-like" o tal vegada millor "H1e-like" en la condensació de la cromatina.

També és discutible l'existència d'una proteïna "H10-like" a la cromatina de pollastre. A nivell d'anfibis, etc... sembla ser la H5 dels eritròcits la que s'expressa a alguns teixits (Moorman et al., 1985). A mamífers, on els eritròcits perden els nuclis, trobem la H10 i no s'ha descrit mai cap H5. Al pollastre Moorman et al. (1986), proposen l'existència dels dos gens, ja que troben anticossos monoclonals que reconeixen la H5 i la H10 a la vegada i altres altament específics de la H5, demostrant que a nucli de fetge hi ha una proteïna reconeguda per l'anticòs reactiu a la H10-H5 i no reconeguda per l'anticòs de la H5 tant en hibridacions "in situ" com en "Western blottings" de gels de SDS, on tindria una mobilitat per sota immediatament de la H5. La possibilitat de que l'epítot que reconeix el monoclonal específic anti H5 no es presenti en un fragment de proteolisi de la H5, que seria la banda observada per "Western blotting" i de que a la vegada aquest epítot, que és accessible a la cromatina d'eritròcit en una hibridació

"in situ", no ho fós a la cromatina de l'hepatòcit, és realment rebuscada, però no pas descartable. Nosaltres en els nostres estudis per bidimensionals, etc... de la mateixa manera que no hem trobat cap proteïna candidata a ser una H1t del pollastre, tampoc hem trobat cap proteïna candidata a ser una H1o, exceptuant la pròpia H5.

Finalment la igualtat en els mapes peptídics de la H1.2, H1.3, i H1.4, contràriament al publicat per Winter et al. (1985), petites variacions observades en l'eficiència de tall de la proteasa, i la manca d'evidències esmentades a nivell genòmic de l'existència de multiplicitat de subtipus, ens fa sospitar que tal vegada sota aquests subtipus s'hi amagui una modificació post-traduccionals. En resum a pollastre és probable que hi hagi solament tres variants de seqüència, és a dir tres gens, el de la H5, la H1.1 i el de la H1, que generaria els restants subtipus per modificacions post-traduccionals.

Bibliografia

BERDNIKOV V.A., GOREL F.L., ARGUTINSKAYA S.V., CHEREPANOVA V.A., i KILEVA E.V. (1975) Study of the relationship between the subfraction composition of histone F1 and the type of tissue in birds. Mol. Biol. (mosc.) 10, 887-896.

BOIX J. i MEZQUITA C. (1986) Estudi de les variants i subtipus de la histona H1 a l'espermatogènesi del gall. Biologia Desenvolupament (S.C.B.) 4, 47-58.

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. Biologia Desenvolupament (S.C.B.) 2, 77-84.

BUSTIN M. i COLE R.D. (1968) Species and organ specificity in very lysine-rich histones. J. Biol. Chem. 243, 4500-4505.

COLE K.D., KANDALA J.C., i KISTLER W.S. (1986) Isolation of the gene for the testis-specific H1 histone variant H1t. J. Biol. Chem. 261, 7178-7183.

DOENECKE D. i T-NJES R. (1986) Differential distribution of lysine and arginine residues in the closely related histones H1o and H5. Analysis of a human H1o gene. J. Mol. Biol. 187, 461-464.

DUPRESSOIR T. i SAUTIERE P. (1984) Isolation and characterization of five subfractions of chicken erythrocyte histone H1. Biochem. Biophys. Res. Comm. 122, 1136-1145.

GIANCOTTI V. i GOODWIN G.H. (1986) A method for silver staining HMG chromosomal proteins in polyacrylamide electrophoretic gels. J. Biochem. Biophys Meth. 12, 265-270.

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

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

LAEMMLI U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

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

MEZQUITA C. (1985) Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis. Revisión de Biología Celular 5 (Servicio Editorial Universidad del País vasco.).

MEZQUITA J., CONNOR W., WINKFEIN R.J. i DIXON G.H. (1985) An H1 histone gene from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). J. Mol. Evolut. 21, 209-219.

MOORMAN A.F.M. i DE BOER P.A.J. (1985) Immunohistochemical distribution of the histone H1 α /H5 variant in various tissues of adult *Xenopus Laevis*. Cell Differ. 16, 109-117.

MOORMAN A.F.M., DE BOER P.A.J., SMIT-VIS J.H., LAMERS W.H. i CHARLES R. (1986) Immunological evidence for an H1 α type of histone protein in chicken liver. Differentiation 32, 44-48.

PANYIM S. i CHALKLEY R. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 130, 337-346.

RIZZO P.J., BRADLEY W. i MORRIS R.L. (1985) Histones of the unicellular alga *Olithodiscus luteus*. Biochemistry USA 24, 1727-1732.

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 m-RNA accumulation to DNA replication. J. Cell Biol. 101, 175-181.