

# Estudio de la transición nucleohistona-nucleoprotamina "in vivo" e "in vitro". Clonación, secuenciación y expresión del gen de la protamina galina.

Rafael Oliva Virgili

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDIO DE LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA  
IN VIVO E IN VITRO. CLONAJE, SECUENCIACION Y EXPRESION  
DEL GEN DE LA PROTAMINA GALINA.

R. OLIVA

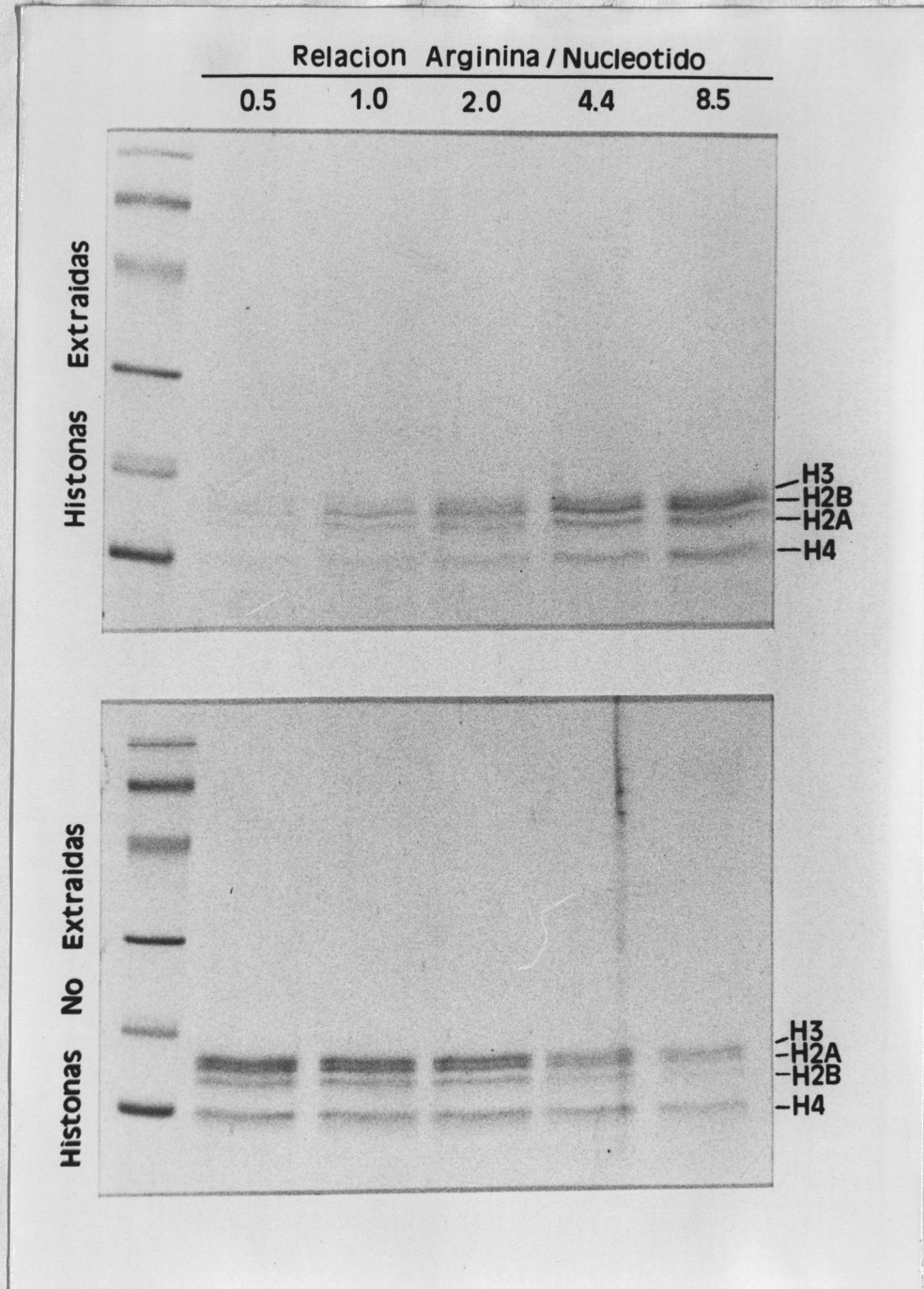


Fig 66.

Extracción de las histonas del octámero por la salmina. Partículas nucleosómicas fueron preparadas (pag 105) a partir de núcleos de testículo de gallo (pag 84-86) y la fracción "S2" purificada mediante electroforesis preparativa (pag. 106 y 193). La fracción de nucleosomas conteniendo un grado más elevado de acetilación, fue tratada mediante concentraciones crecientes de salmina para determinar la capacidad que esta protamina presentaba para desensamblar esta población de nucleosomas (pag. 108). En la parte superior se muestran las histonas extraidas a la relación arginina/nucleótido indicada, y en la parte inferior se muestran las histonas no extraidas analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (pag 98 y 99).

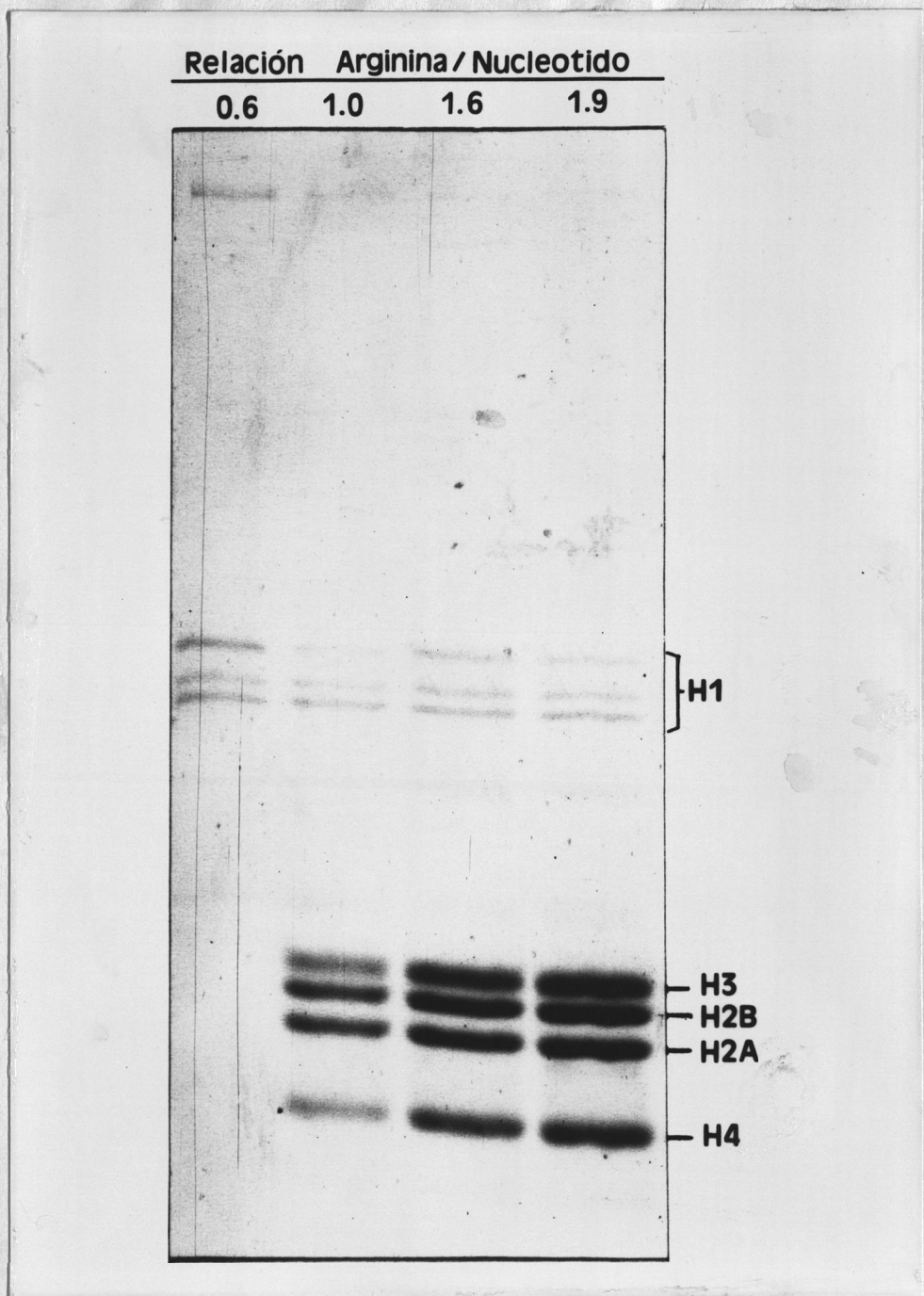


Fig 67.

Extracción de las histonas del octámero por la protamina galina. Partículas nucleosómicas fueron preparadas (pag 105) a partir de núcleos de eritocito de pollo (pag 87) y tratadas por concentraciones crecientes de galina (pag 108).

En el gel se muestran las histonas extraídas por la relación arginina/nucleótido indicada. Nótese que a la relación arginina/nucleotido = 1.0, se aprecia una extracción preferencial de las histonas H2A y H2B.

Histonas nucleosómicas (H3+H4+H2A+H2B)  
 (Histonas ensambladas formando nucleosomas)

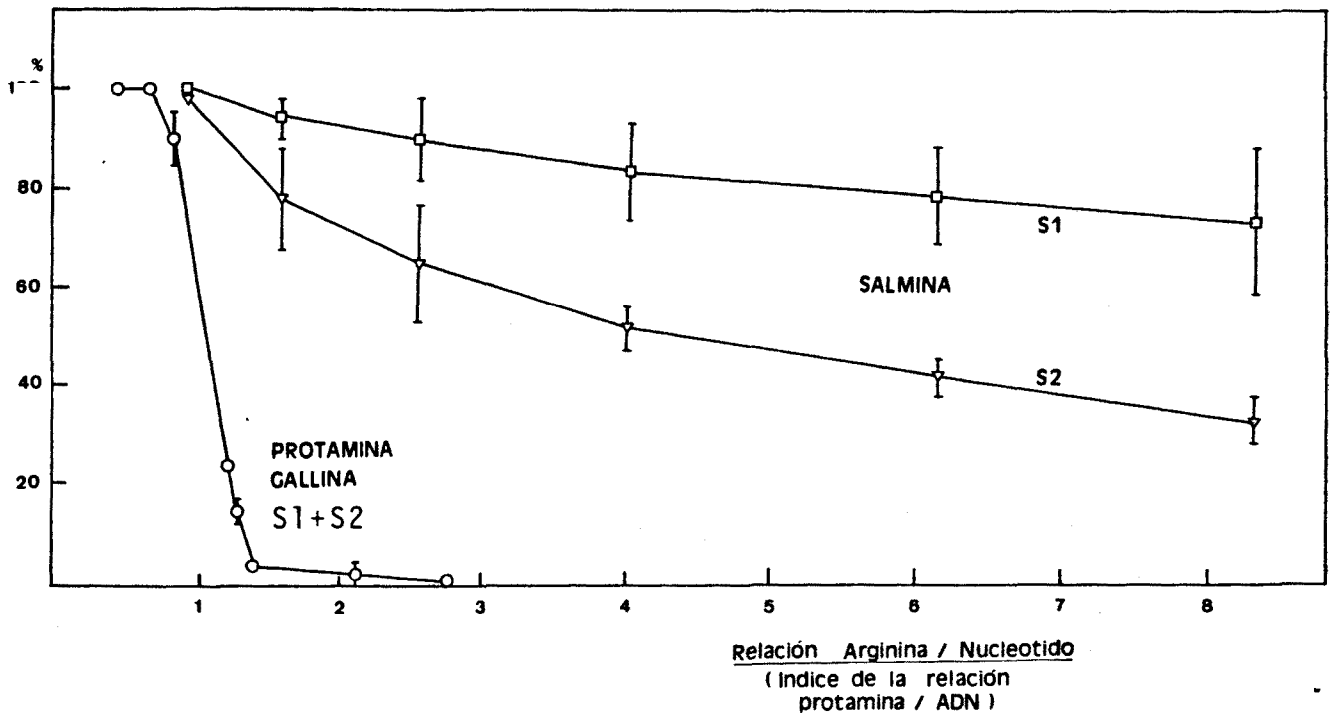


Fig 68.

Desensamblaje de las histonas de nucleosomas por las protaminas galina y salmina. Desplazamiento de histonas de partículas nucleosómicas (S1+S2) por la protamina galina (○—○). Desplazamiento de las histonas de partículas nucleosómicas (S1) por la protamina salmina (□—□). Desplazamiento de las histonas de partículas nucleosómicas (S2) por la protamina salmina (▽—▽). Las partículas nucleosómicas fueron preparadas (pag 105) a partir de núcleos de testículo de gallo (pag 84-86).

### 3.2.3.- Efecto de la acetilación de las histonas en el desensamblaje de nucleosomas por protaminas:

En congruencia con los resultados de Bode et al.(1980), en los que mediante la utilización de nucleosomas hiperacetilados con butirato se consigue un desplazamiento de aproximadamente el 30% de las histonas en un rango arginina/nucleótido = 0.4-4, los resultados obtenidos en los experimentos de desensamblaje "in vitro" por la protamina salmína indican que la acetilación de las histonas favorecería el desensamblaje de los nucleosomas (fig 68, 69 y 70).

La capacidad de desensamblaje por la protamina salmína de la población de partículas mononucleosómicas conteniendo histonas acetiladas "S2", es superior que utilizando la población de partículas mononucleosómicas (S1) conteniendo niveles más bajos de histonas acetiladas (fig 68). La capacidad de las protaminas galina y salmína para desensamblar a las histonas de cromatina de eritrocito de pollo (conteniendo niveles bajos de acetilación) es inferior que su capacidad para desensamblar a las histonas de núcleos de testículo de gallo (conteniendo niveles más elevados de histonas acetiladas) (fig 79).

Las histonas desensambladas y las no desensambladas por concentraciones distintas de la protamina salmína, fueron analizadas mediante electroforesis en gel de PA-tritón-urea y mediante electroforesis bidimensional (pag 102) para detectar posibles diferencias en el contenido de histonas acetiladas. Las histonas desensambladas presentan un "steady state" de acetilación más elevado que el de las histonas no desensambladas (fig 69 y 70). Experimentos similares realizados utilizando partículas nucleosómicas conteniendo histonas marcadas con  $^3\text{H}$ -acetato y analizando las histonas desensambladas mediante electroforesis en geles de PA-SDS, PA-tritón-urea, y electroforesis bidimensional seguidas de fluorografía (pag 95-104) indican también una cierta preferencia en el desplazamiento de las histonas marcadas con  $^3\text{H}$ -acetato.(fig 51). Las diferencias se hallan fundamentalmente en la actividad específica de marcaje entre las histonas desensambladas y las no desensambladas.

La protamina galina mostró esencialmente la misma eficiencia en el desensamblaje de las histonas de las poblaciones de nucleosomas S1 y S2 (fig 68).

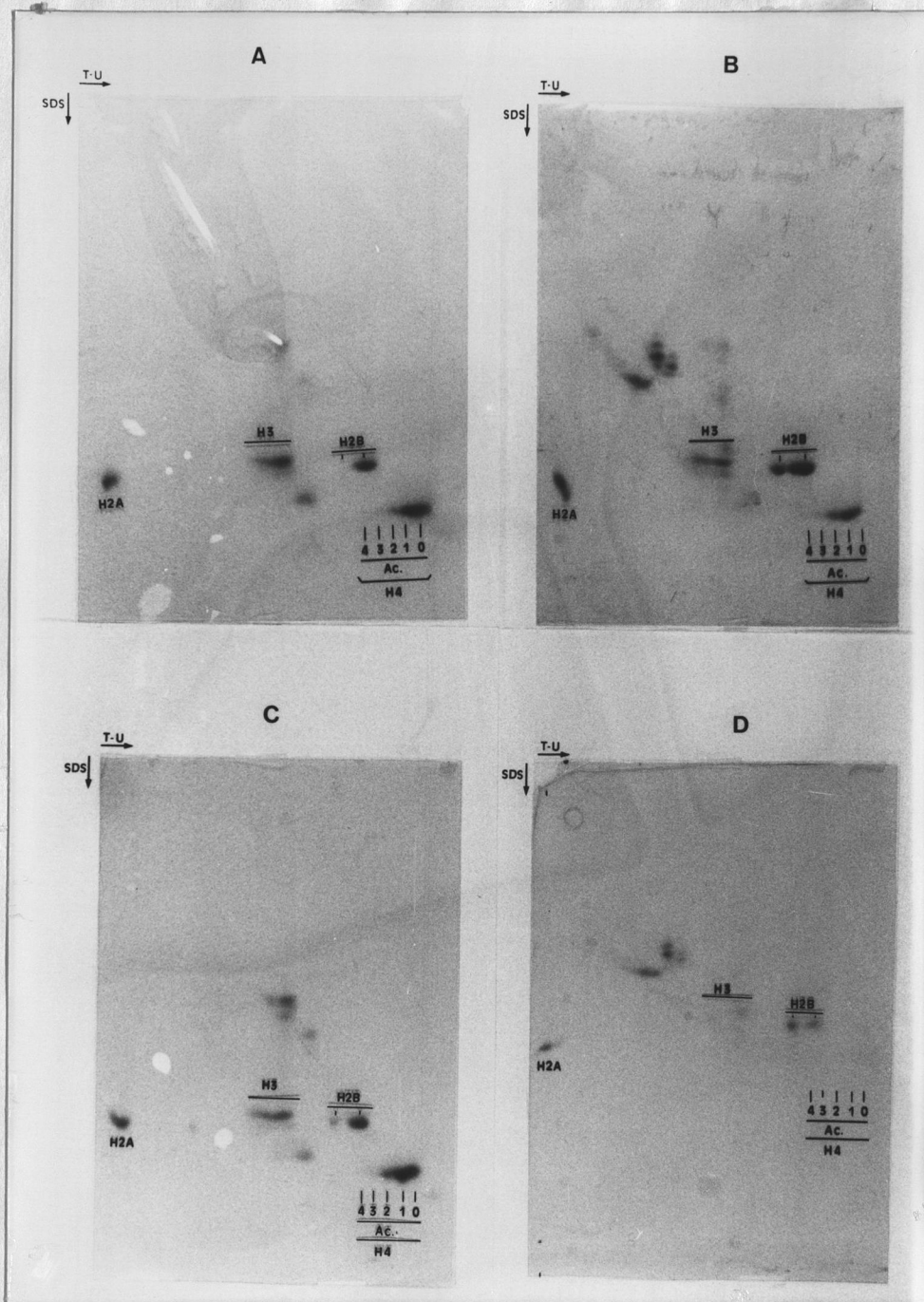


Fig 69.

Análisis mediante electroforesis bidimensional del material extraído y no extraído de partículas nucleosómicas (S2)(pag 105) preparadas a partir de núcleos de testículo de gallo (pag 84-86) por la protamina salmina (pag. 108). Geles "A" y "B": relación arginina/nucleótido= 4.0. Geles "C" y "D" : relación arginina/nucleótido= 2.0. Geles "A" y "C": material no extraído. Geles "B" y "D": material extraído. Aparte de las diferencias en el "steady state" de acetilación obsérvese que el componente proteico de la H2B de menor movilidad electroforética en la dimensión de PA-tritón-urea, resulta preferencialmente extraído.

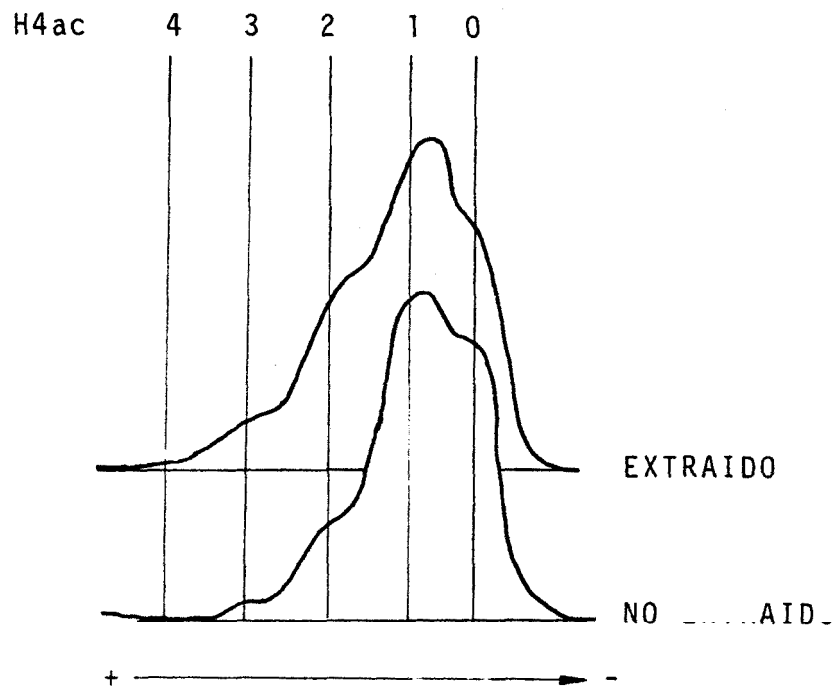


Fig 70.

Scan da la zona de la histona H4 de los geles "A" y "B" de fig 69. Nótese que el "steady state" de acetilación es ligeramente superior en la población de histonas desplazadas que entre los nucleosomas no desensamblados.



#### 3.2.4.- Efecto de concentraciones crecientes de Espermina sobre partículas nucleosómicas "in vitro".

A concentraciones comprendidas entre 0 y 0.25 mM, la espermina actúa precipitando partículas nucleosómicas en solución (fig 71). A concentraciones comprendidas entre 1 y 10 mM espermina, esencialmente todas las partículas nucleosómicas se hallan precipitadas ( fig 71), y a partir de 10 mM espermina, histonas y ADN vuelven a ser detectados en solución (fig 71) en las condiciones utilizadas en estos experimentos.

#### 3.2.5.- Efecto de la espermina sobre el desensamblaje de las histonas de nucleosomas por protaminas.

Aunque no generalizable a todas las condiciones experimentales utilizadas, la espermina mostró favorecer ligeramente el desensamblaje de los nucleosomas (fig 72) "in vitro" por protaminas. De una forma similar la putrescina mostró favorecer el desensamblaje de los nucleosomas en combinación con la espermina, por la protamina salmina (resultados no mostrados).

#### 3.2.6.- Dependencia del tiempo en el desensamblaje de las histonas de nucleosomas "in vitro" por protaminas.

Al añadir protaminas salmina o galina a partículas nucleosómicas a una relación arginina/nucleótido capaz de desplazar a las histonas, la mayor parte de nucleosomas desensamblables a esta concentración resultan desensamblados en los primeros 5 min. El desensamblaje progresa luego lentamente en un proceso que dura horas (Fig 73).

mM. ESPERMINA

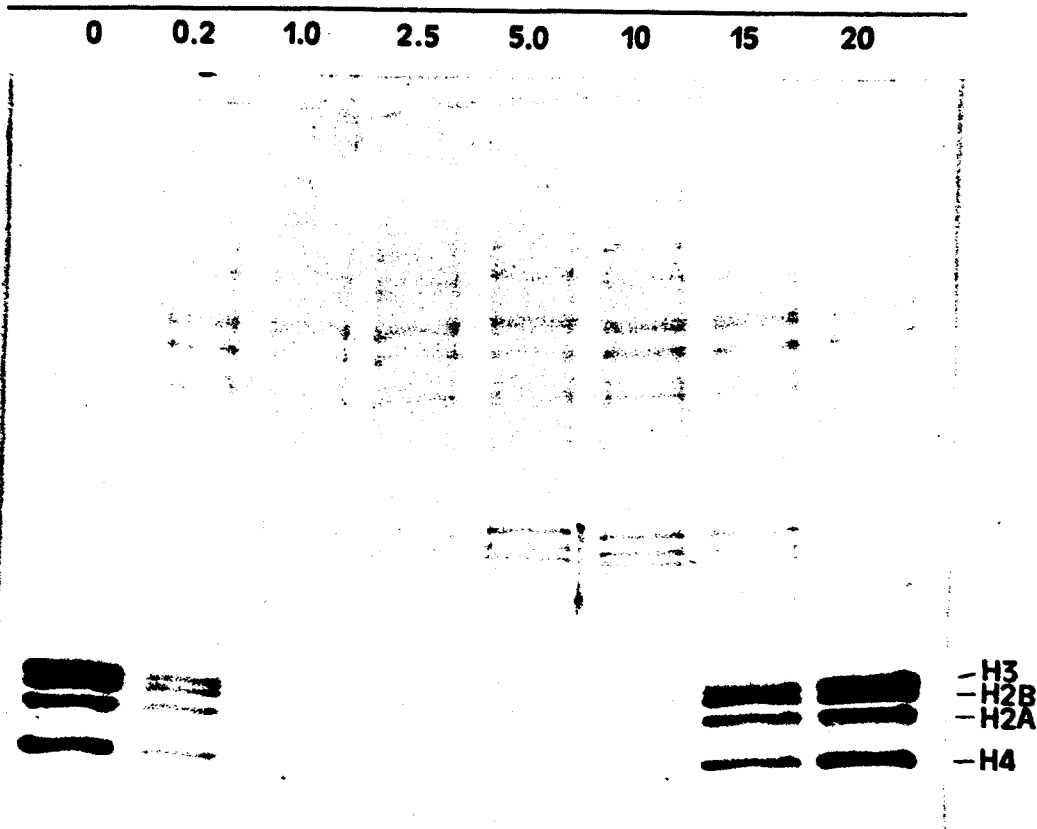


Fig 71.

Efecto de concentraciones crecientes de espermina sobre partículas nucleosómicas "in vitro".

Partículas nucleosómicas fueron preparadas mediante digestión con nucleasa micrococcal tal como está descrito en fig 60 (15 min de digestión) y purificados por gel filtración (BIO-GEL A 5m "100-200 mesh U.S.Std.") en una columna de 2.5 cm de diámetro y 50 cm de altura a 0-4°C. Monitorizando la A<sub>260</sub>, aparecen en el material eluido 4 picos de absorción (flujo de elución= 20 ml/hora). En este experimento se utilizó la región central del primer pico eluido. Las partículas nucleosómicas fueron tratadas por concentraciones crecientes de espermina, incubadas 5 min a 37°C y sedimentadas a 10000 rpm 5 min (rotor J-20 de la Beckman). Se analizó la composición del pellet y del sobrenadante. A la concentración de 0 mM espermina, todas las histonas y el ADN están en el sobrenadante. Entre 0 y 0.25 mM espermina, ambos, el ADN y las histonas se detectan progresivamente en el pellet. Entre 1 y 10 mM espermina, Histonas y ADN son detectados exclusivamente en el pellet. A partir de 10 mM espermina, histonas y ADN van siendo progresivamente detectados en el sobrenadante. En la fotografía se muestra la electroforesis en gel de PA-SDS de las histonas del sobrenadante.

Histonas Nucleosómicas (H4+H3+H2A+H2B)

(Histonas ensambladas formando nucleosomas)

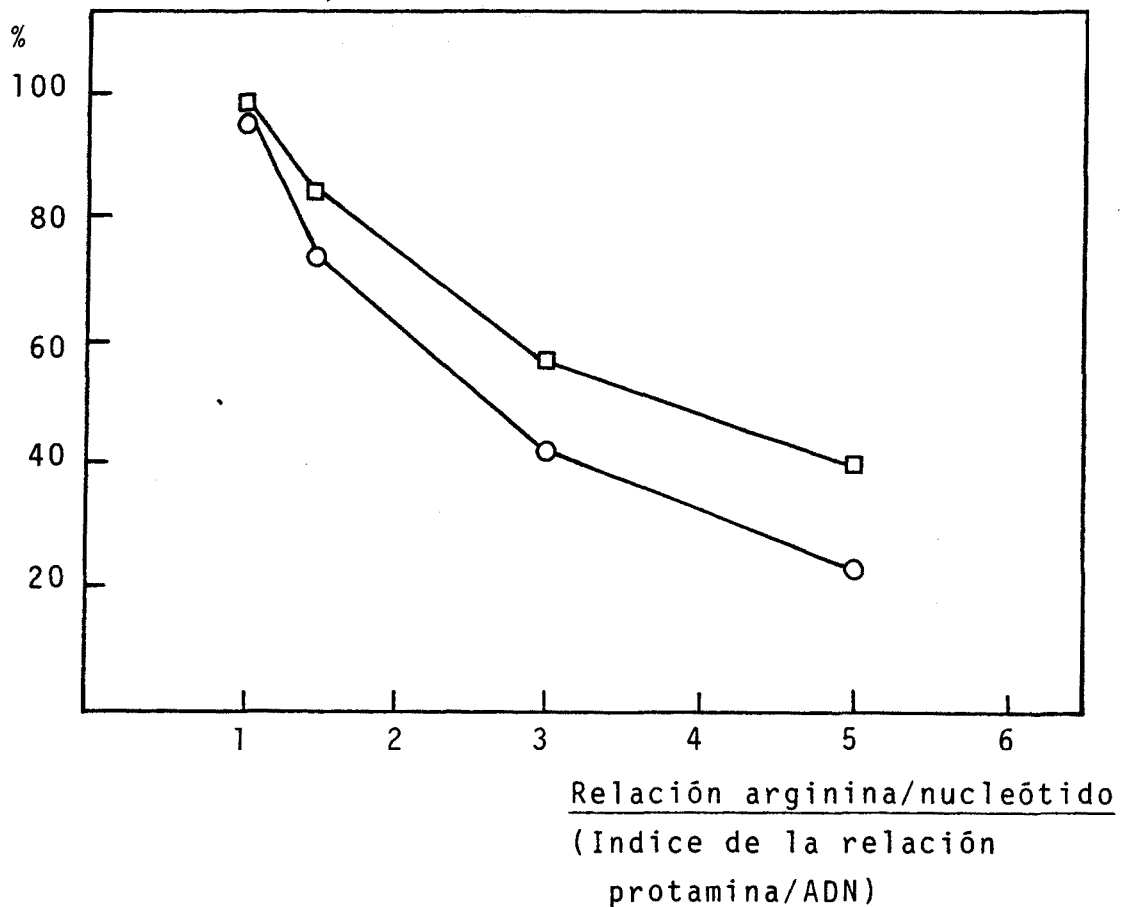


Fig 72.

Efecto de la espermina sobre el desensamblaje de partículas nucleosómicas por la protamina salmina.

Las partículas nucleosómicas fueron preparadas (pag 105) a partir de núcleos de testículo de gallo (pag 84-86) y la fracción S2 purificada mediante electroforesis preparativa de nucleosomas (pag 106 y 193). La fracción de nucleosomas conteniendo un grado más elevado de acetilación fué tratada por concentraciones crecientes de la protamina salmina en presencia y en ausencia de 10 mM espermina (pag 108). Con espermina 10 mM (○—○) y sin espermina 10 mM (□—□).

La presencia de espermina 10 mM favorece ligeramente el desensamblaje de los nucleosomas en estas condiciones experimentales. Comparar con fig 68.

Histonas Nucleosómicas (H3+H4+H2A+H2B)  
(Histonas ensambladas formando nucleosomas)

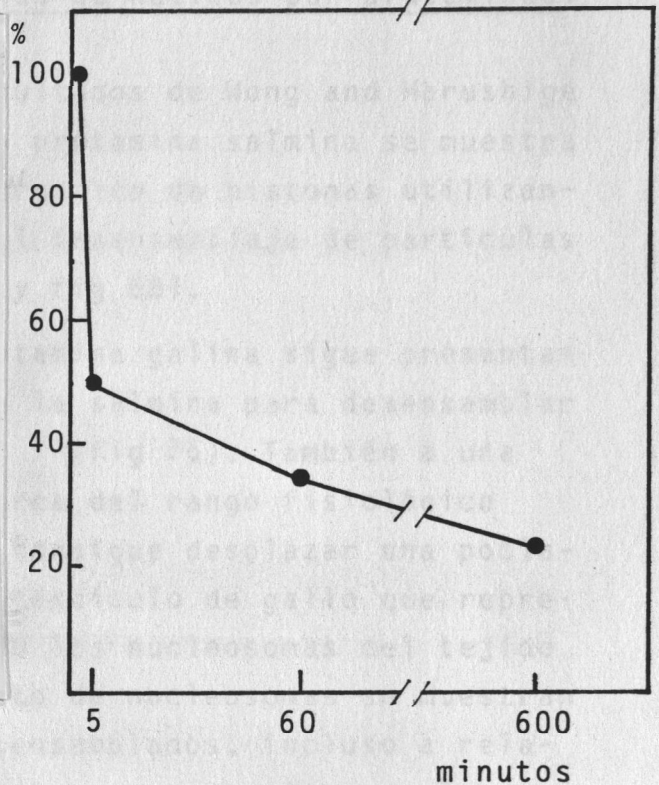
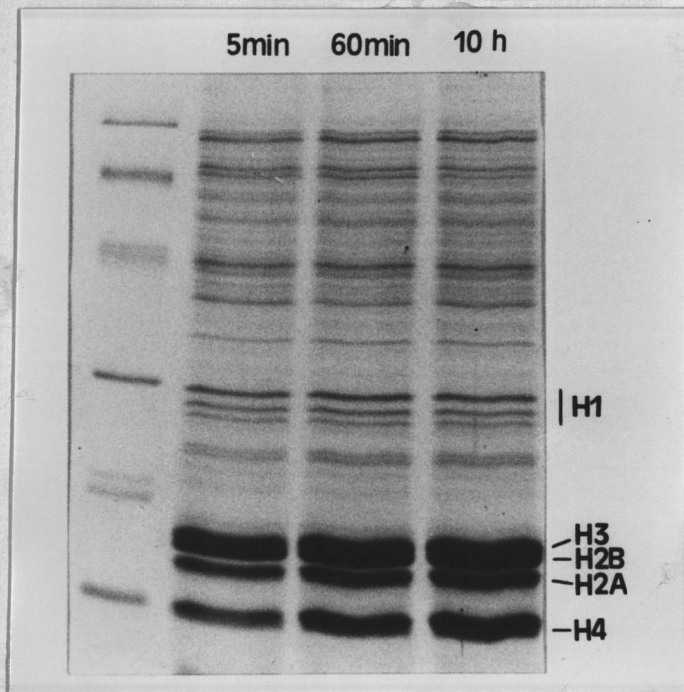


Fig 73.

Efecto del tiempo sobre el desensamblaje de partículas nucleosómicas por la protamina salmina.

Las partículas nucleosómicas fueron preparadas (pag 105) a partir de núcleos de testículo de gallo (pag 84-86) y la fracción S2 tratada por salmina a una concentración arginina/nucleótido= 3.5 en presencia de 10 mM espermina durante distintos tiempos a 0-4°C.

En la foto se muestra la electroforesis en gel de PA-SDS del material extraído en el tiempo indicado. En la gráfica se representa la variación en el % de histonas nucleosómicas respecto al tiempo transcurrido desde la adición de la protamina.

### 3.2.7.- Desensamblaje de histonas de núcleos por protaminas:

En congruencia con los resultados de Wong and Marushige (1975) y Bode et al. (1977), la protamina salmína se muestra mucho menos eficiente en la extracción de histonas utilizando núcleos o cromatina que en el desensamblaje de partículas nucleosómicas (comparar fig 75 y fig 68).

Utilizando núcleos, la protamina galina sigue presentando una capacidad muy superior a la salmína para desensamblar a las histonas del octámero (fig 75). También a una relación arginina/nucleotido cerca del rango fisiológico (0.6-1.9), la protamina galina consigue desplazar una población de histonas de núcleos de testículo de gallo que representan aproximadamente el 50% de los nucleosomas del tejido testicular(fig 74 y 75). El resto de nucleosomas se muestran mucho más resistentes a ser desensamblados, incluso a relaciones arginina/nucleotido varias veces superiores a las fisiológicas (fig 75).

Ambas protaminas ( galina y salmína ), muestran esencialmente la misma eficacia para desplazar a las histonas ricas en lisina (H1 y H5) de núcleos. El desplazamiento de estas se produce en el rango arginina/nucleotido = 0.2-1.2 (fig 76-78). Las histonas H1 y H5 son las únicas en ser completamente desplazadas por la protamina salmína en un rango fisiológico. Utilizando núcleos de eritrocito de pollo, la histona H1 es preferencialmente desplazada sobre la histona H5. Dentro de los subtipos de histona H1, el que en geles de PA-SDS presenta una menor movilidad electroforética, resulta también preferencialmente desplazado sobre el de mayor movilidad electroforética (fig 76 y 78).

Utilizando núcleos genéticamente inactivos de eritrocito de pollo, la histona H1 es la única que resulta desensamblada por las protaminas galina o salmína en un rango fisiológico (fig 76-79). Utilizando cromatina de eritrocito de pollo, ambas protaminas (galina o salmína) se muestran algo más eficientes en el desensamblaje de las histonas nucleosómicas que utilizando núcleos, siendo la protamina galina más eficiente que la salmína (fig 79).

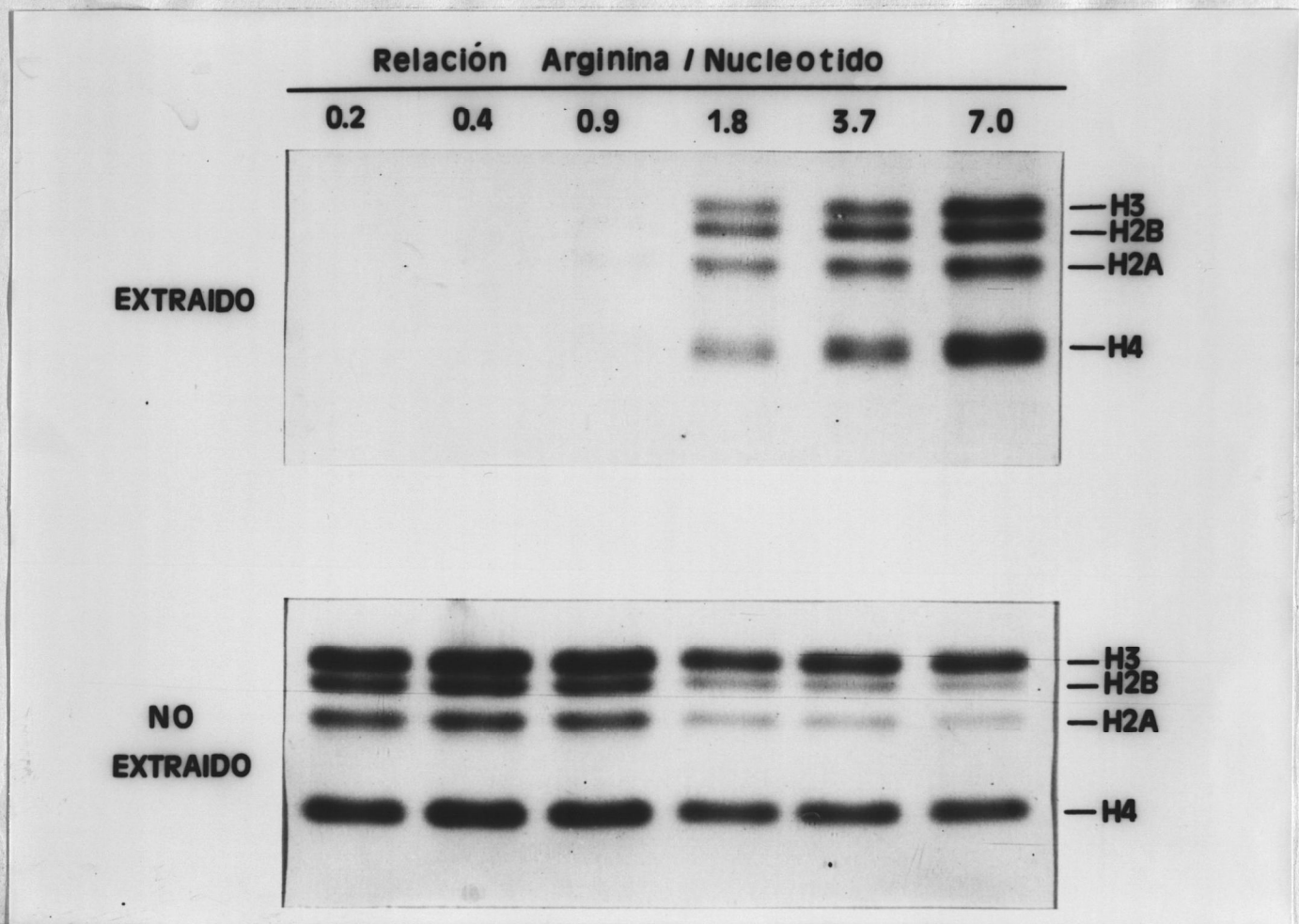


Fig 74.

Desensamblaje de las histonas del octámero utilizando núcleos de testículo de gallo, por la protamina galina.

Núcleos de testículo de gallo (pag 84-86) se lavaron 2 veces en un medio que contenía Sac 0.25 M, Tris HCl 50 mM pH 8.0, butirato 15 mM, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, CaCl<sub>2</sub> y PMSF 0.2 mM. Se resuspendieron en el mismo medio a excepción de 5 mM Tris HCl y 125 mM NaCl a una concentración de 0.2 mg de ADN/ml y fueron tratados por diferentes concentraciones de la protamina galina. Después de 10 horas de incubación a 0-4°C con agitación suave, se centrifugaron a 6000 rpm 10 min (rotor J-20 de la Beckman), y el pellet y el sobrenadante fueron analizados por su composición de ADN y proteínas. La fotografía muestra el análisis electroforético en gel de PA-SDS del material del pellet (no extraído) y del sobrenadante (extraído) a la concentración de protamina galina indicada (expresada como relación arginina/nucleotido).

Histonas Nucleosómicas (H4+H3+H2A+H2B)  
(Histonas ensambladas  
formando nucleosomas)

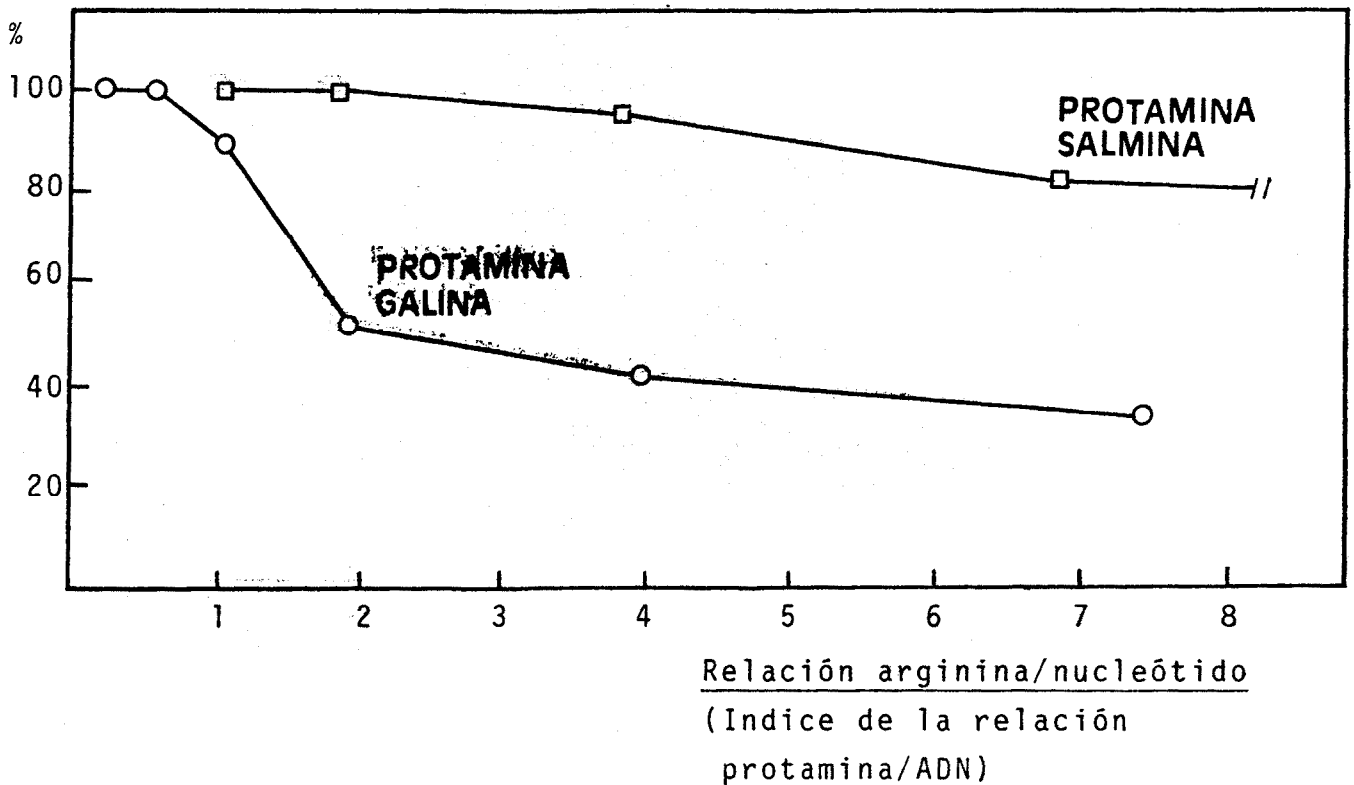


Fig 75.

Desensamblaje de las histonas del octámero utilizando núcleos de testículo de gallo, por las protaminas galina y salmina. La metodología está descrita en fig 74.

A la relación arginina/nucleótido 0.7-2, se produce el desensamblaje de una primera población de nucleosomas por la protamina galina. A partir de la relación arginina/nucleótido = 2, se produce el desensamblaje de una población de nucleosomas muchos más resistentes a ser desensamblados. La protamina salmina es relativamente ineficiente para desensamblar nucleosomas a partir de núcleos enteros, en el rango de concentraciones utilizado.

Relación Arginina / Nucleotido

0.15    0.29    0.58    1.1    2.3    4.7

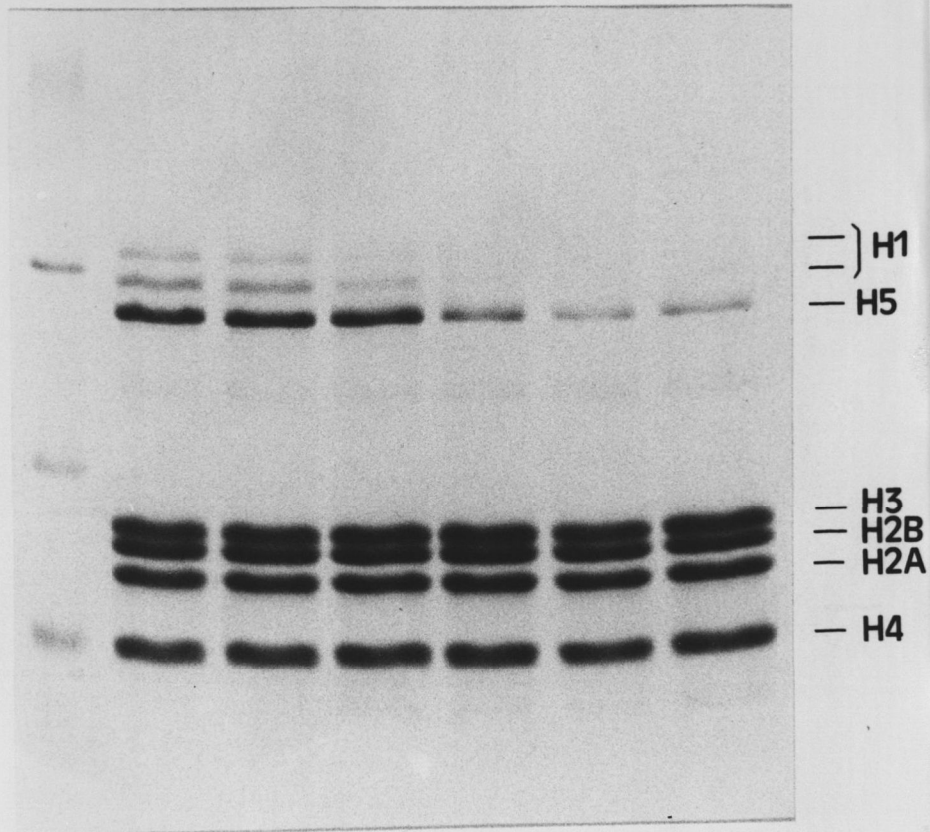


Fig 76.

Extracción de las histonas H1 y H5 de núcleos de eritrocito de pollo por la protamina galina.

Sangre de gallo fue recogida en 0.1 vol de 3.8% citrato sódico y lavada 2 veces en PBS. Se prepararon núcleos con un método muy parecido al de pag 87 mediante lavados repetidos con Tritón X-100 a excepción del medio utilizado en los lavados (Sacarosa 0.25 M, Butirato 10 mM,  $Cl_2Mg$  10 mM, EGTA 1 mM, Tris 10 mM pH 8.0 y PMSF 0.2 mM.) (Dixon and Burkholder, 1985a,b). Los núcleos se suspendieron en NaCl 120 mM, KCl 40 mM,  $MgCl_2$  10 mM,  $CaCl_2$  1 mM, butirato 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4 y PMSF 0.2 mM, se diluyeron hasta 0.1 mg ADN/ml y trataron con distintas cantidades de protamina galina. Después de 10 horas de incubación a 0-4°C con agitación suave, se centrifugaron a 6000 rpm 10 min (rotor J-20 de la Beckman), y el pellet y el sobrenadante analizados por su composición de ADN y proteínas. La fotografía muestra el análisis electroforético en gel de PA-SDS del material del pellet (no extraído) a la concentración de protamina galina indicada.



Histonas H1+H5 nucleares

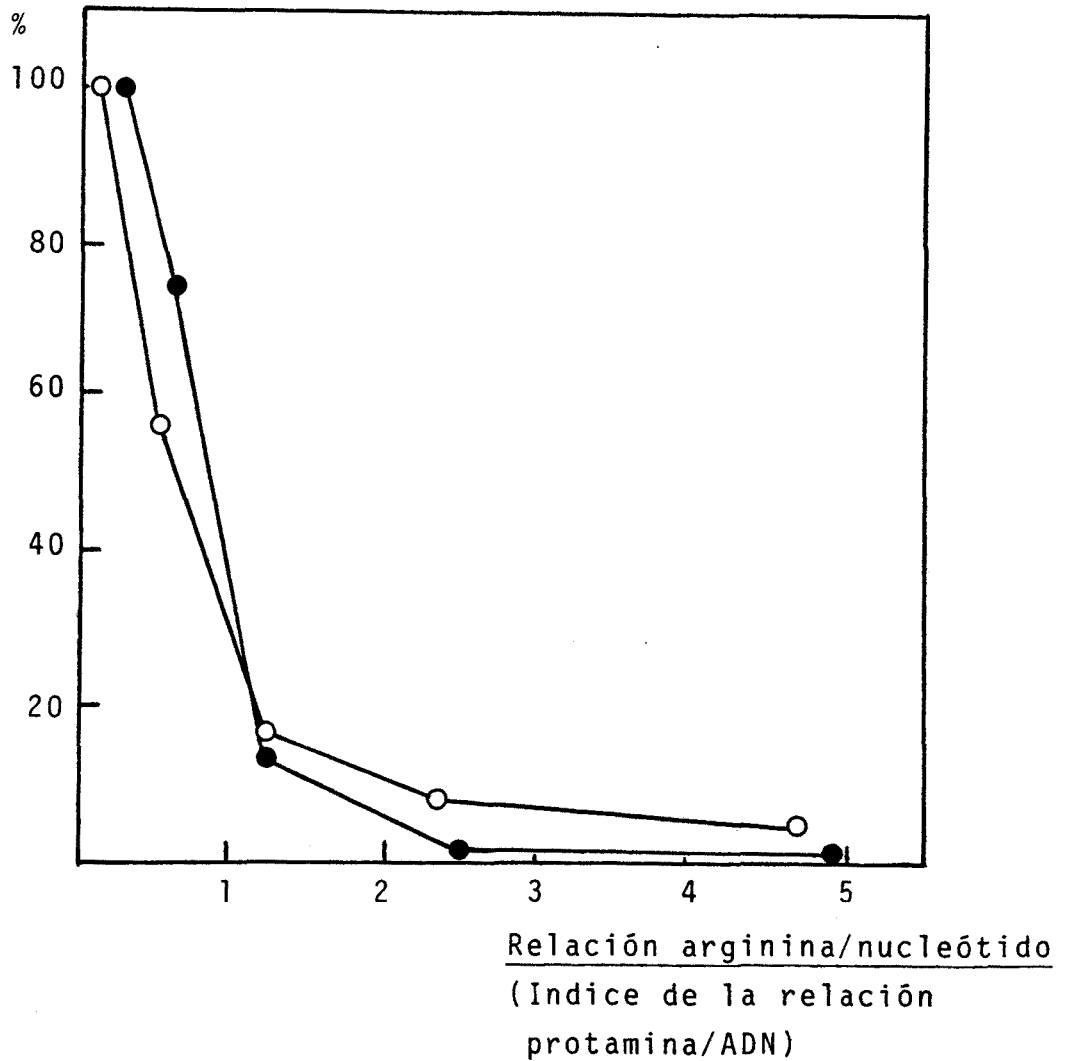


Fig 77.

Desplazamiento de las histonas H1+H5 de núcleos de eritrocito de pollo por las protaminas galina y salmina.

La metodología está descrita en fig 76.

La gráfica representa el contenido de histonas H1+H5 que quedan en el núcleo después del tratamiento con protamina galina (○—○) o con salmina (●—●). La mayor parte de histonas H1+H5 resultan desplazadas en el rango arginina/nucleótido= 0.2-1.2, presentando ambas protaminas esencialmente la misma eficiencia.

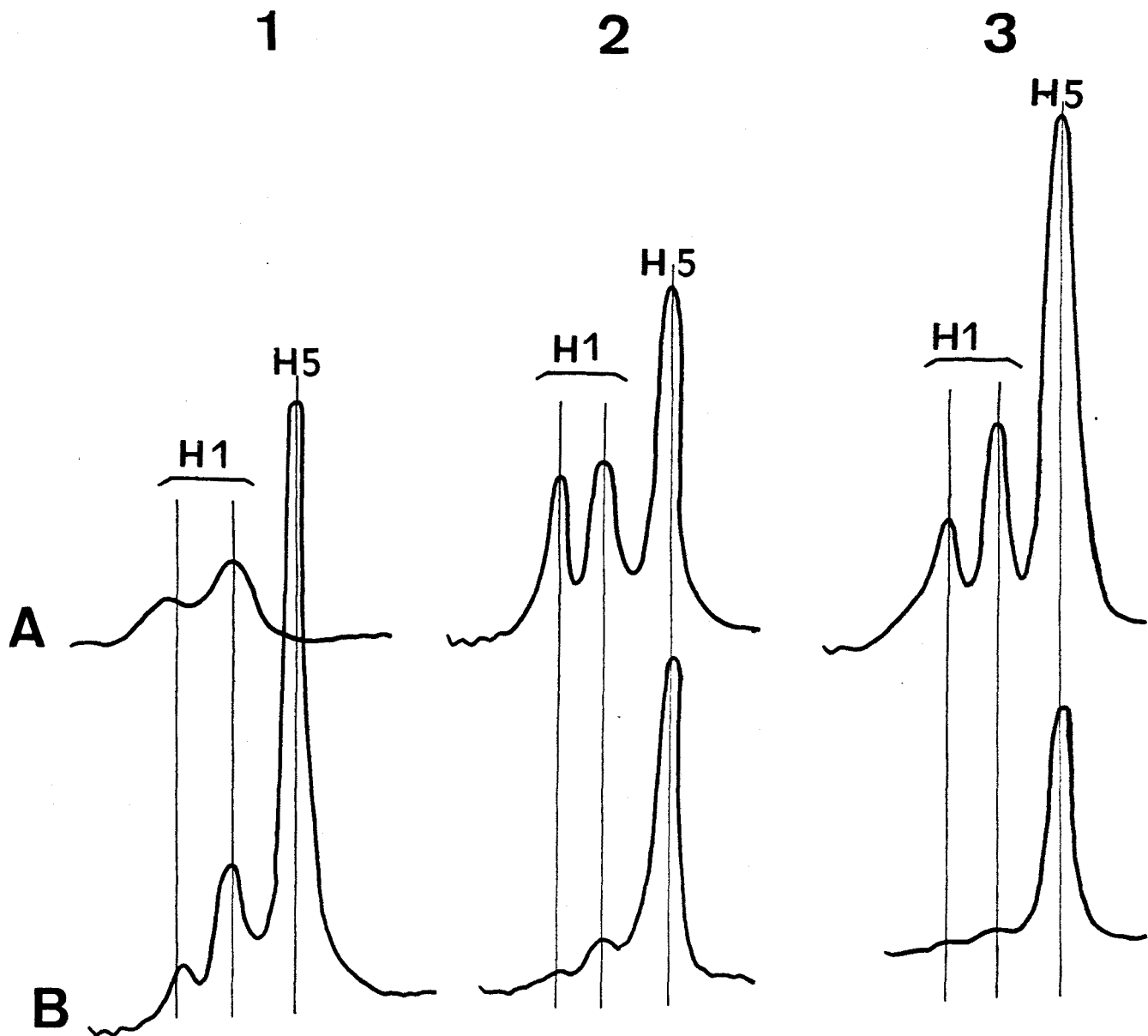


Fig 78.

Desplazamiento de las histonas H1+H5 de cromatina de eritrocito de pollo por las protaminas galina y salmina. Extracción preferente del componente de H1 de menor movilidad electroforética en geles de PA-SDS 18% respecto al de mayor movilidad electroforética, y extracción preferente de la histona H1 respecto a la histona H5. Se representan los scans de la zona de las histonas H1 y H5 analizadas en geles de PA-SDS del material extraído (A) y no extraído (B) por concentraciones de protamina salmina de arginina/nucleótido= 0.77 (1), 1.54 (2) y 3.09 (3). Los scans no están a escala unos respecto a otros. La metodología para la preparación de cromatina se describe en fig 79. Resultados similares se obtienen utilizando núcleos en lugar de cromatina.

## Histonas Nucleosómicas (H3+H4+H2A+H2B)

(Histonas ensambladas formando nucleosomas)

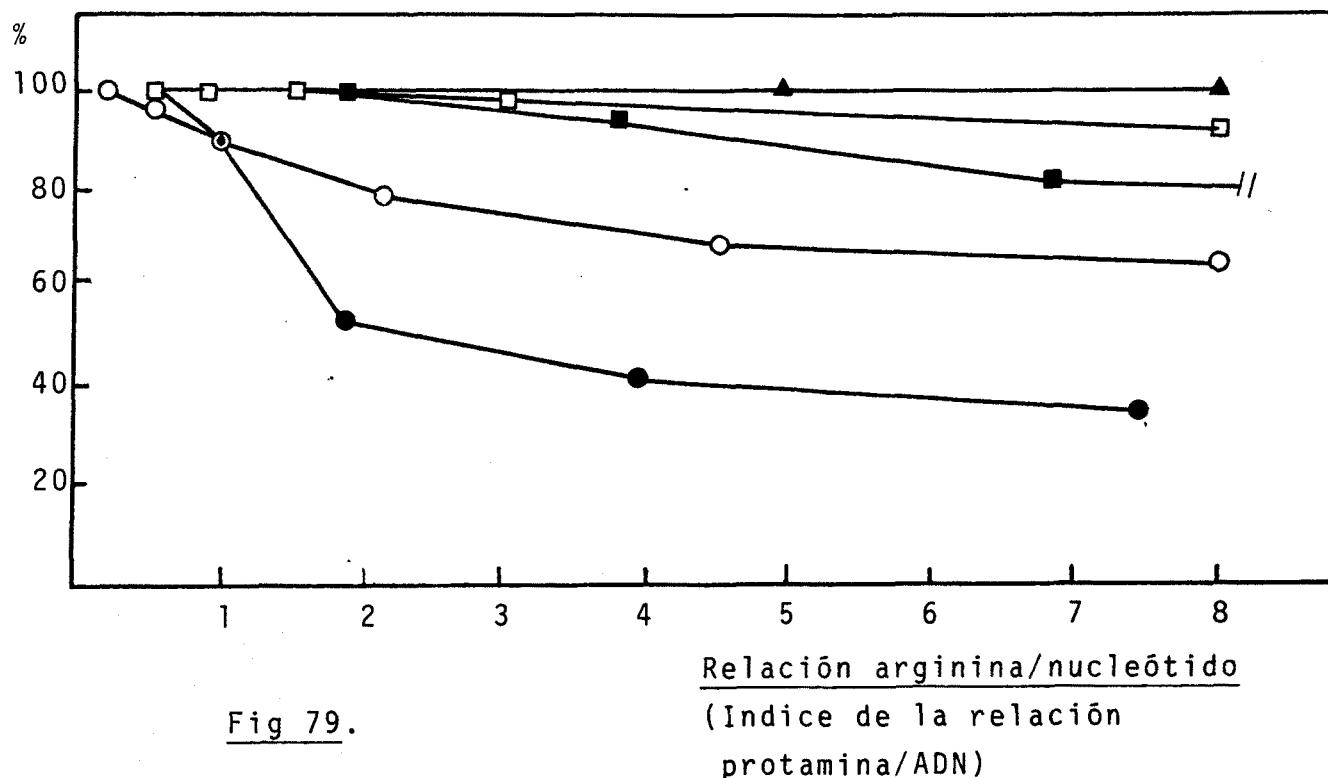


Fig 79.

Desensamblaje de las histonas del octámero utilizando cromatina de eritrocito de pollo por las protaminas galina y salmina.

Núcleos preparados como está descrito en fig 76 se suspendieron en Tris 10 mM pH 8.0, Butirato 10 mM, EDTA 1 mM y PMSF 0.2 mM y la suspensión se centrifugó a 4500 rpm 10 min (rotor J-20 de la Beckman). Este paso se repitió 2 veces más asistiendo la suspensión del pellet mediante homogeneización a 0-4°C (Homogeneizador E-5772 Vidra Foc) 20 pases. Se añadió 1 volumen de H<sub>2</sub>O al pellet para reducir la fuerza iónica a la mitad y homogeneizó 30 pases a 0-4°C. La cromatina se diluyó hasta 0.125 mg de ADN/ml, distribuyó en alícuotas, suplementó con NaCl a la concentración final de 190 mM y se trató con concentraciones crecientes de protaminas salmina y galina. Después de 5 horas de incubación a 0-4°C con agitación suave, se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm 5 min y el pellet y el sobrenadante fueron analizados por su composición de ADN y proteínas. Desensamblaje de las histonas del octámero utilizando cromatina de eritrocito de pollo por las protaminas galina (○—○) y salmina (□—□). Desensamblaje de las histonas del octámero utilizando núcleos de eritrocito de pollo preparados según está descrito en fig 76, por las protaminas galina y salmina (▲—▲). Desensamblaje de las histonas del octámero utilizando núcleos de testículo de gallo (fig 75) por las protaminas galina (●—●) y salmina (■—■).

### 3.2.8.- Extracción preferente de las histonas H2A y H2B:

Con cualquiera de las condiciones experimentales utilizadas (núcleos, cromatina o nucleosomas), las histonas H2A y H2B, resultan preferencialmente extraídas sobre las histonas H3 y H4 (fig 80, 74, 69, 67 y 66) por las protaminas galina o salmina.

### 3.2.9.- Unión de la protamina galina y de la salmina al ADN:

La unión de la protamina salmina al ADN ha sido ampliamente estudiada (Bode et al., 1979; Wong and Marushige, 1975) en contraste con la no estudiada unión de la protamina galina al ADN. Los resultados obtenidos respecto a la protamina galina, indican que esta se uniría progresivamente al ADN de partículas nucleosómicas "in vitro" hasta alcanzar una saturación a la relación arginina/nucleótido = 0.8-1.0 (fig 81) aproximadamente. Coincidiendo con esta saturación, las histonas del octámero resultan desensambladas (fig 81). En las condiciones experimentales utilizadas, la protamina galina detectada junto con el ADN al tras haberse desplazado las histonas del octámero, disminuye ligeramente (fig 81).

En cuanto a la protamina salmina, se ha detectado que el componente minoritario que acompaña a la protamina salmina comercial (fig 65) presenta una eficiencia muy superior hacia el ADN que el componente mayoritario (fig 82).

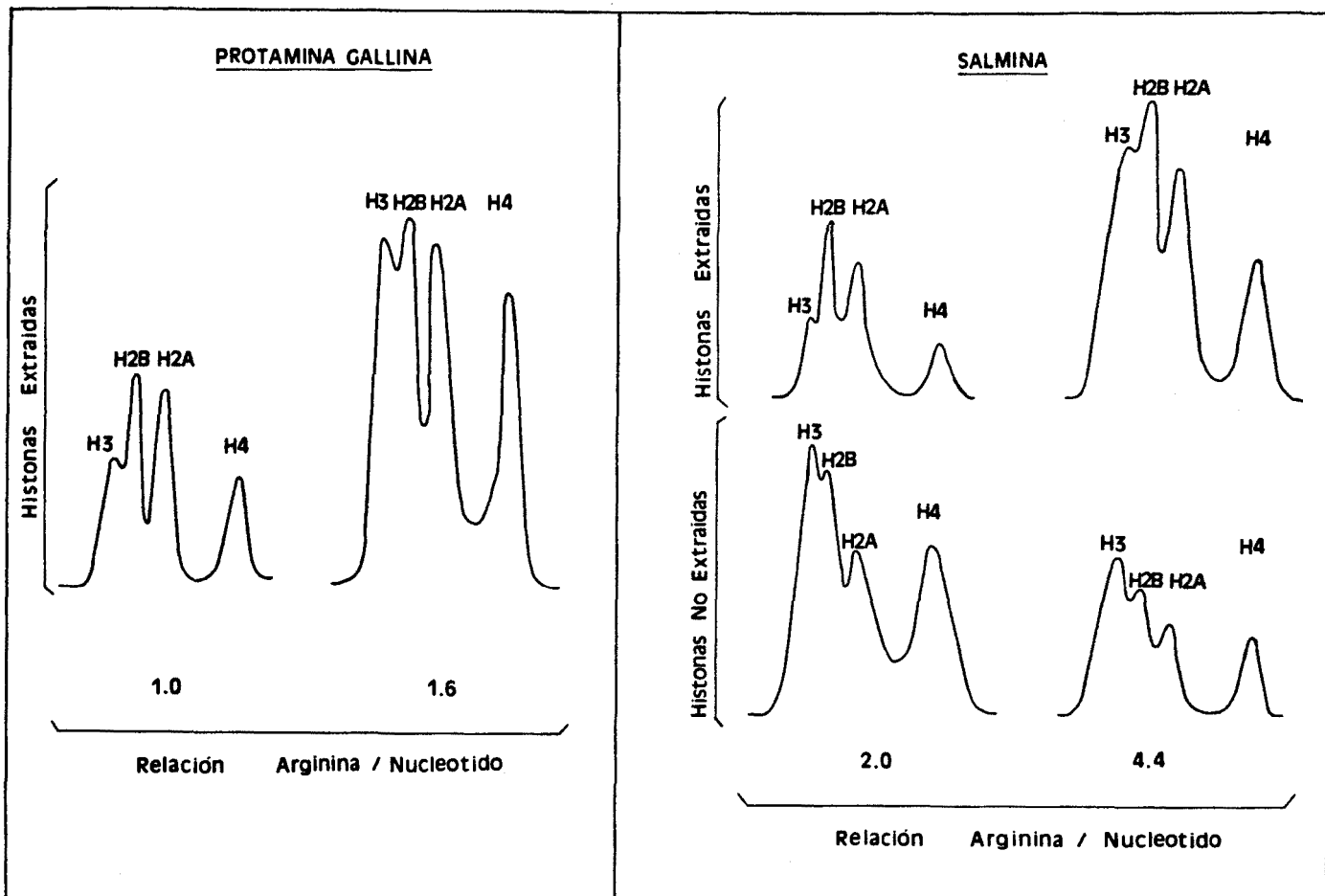


Fig 80.

Extracción preferente de las histonas H2A y H2B de partículas nucleosómicas por las protaminas galina y salmina.

A.- Núcleos de eritrocito de pollo preparados según pag 87, fueron lavados dos veces en el medio "B" de pág 84 y partículas nucleosómicas se prepararon como en pág 105. La fracción de nucleosomas "S2", se trató con distintas concentraciones de protamina galina (pag 108) y las histonas del pellet y del sobrenadante fueron analizadas para determinar su composición proteica y de ADN. En la figura se representa el scan de la zona de las histonas analizadas en un gel de PA-SDS.

B.- Scan de las histonas correspondientes a fig 66.

Esta preferencia en la extracción de las histonas H2A y H2B se da con cualquiera de las condiciones experimentales utilizadas (núcleos, cromatina o nucleosomas).

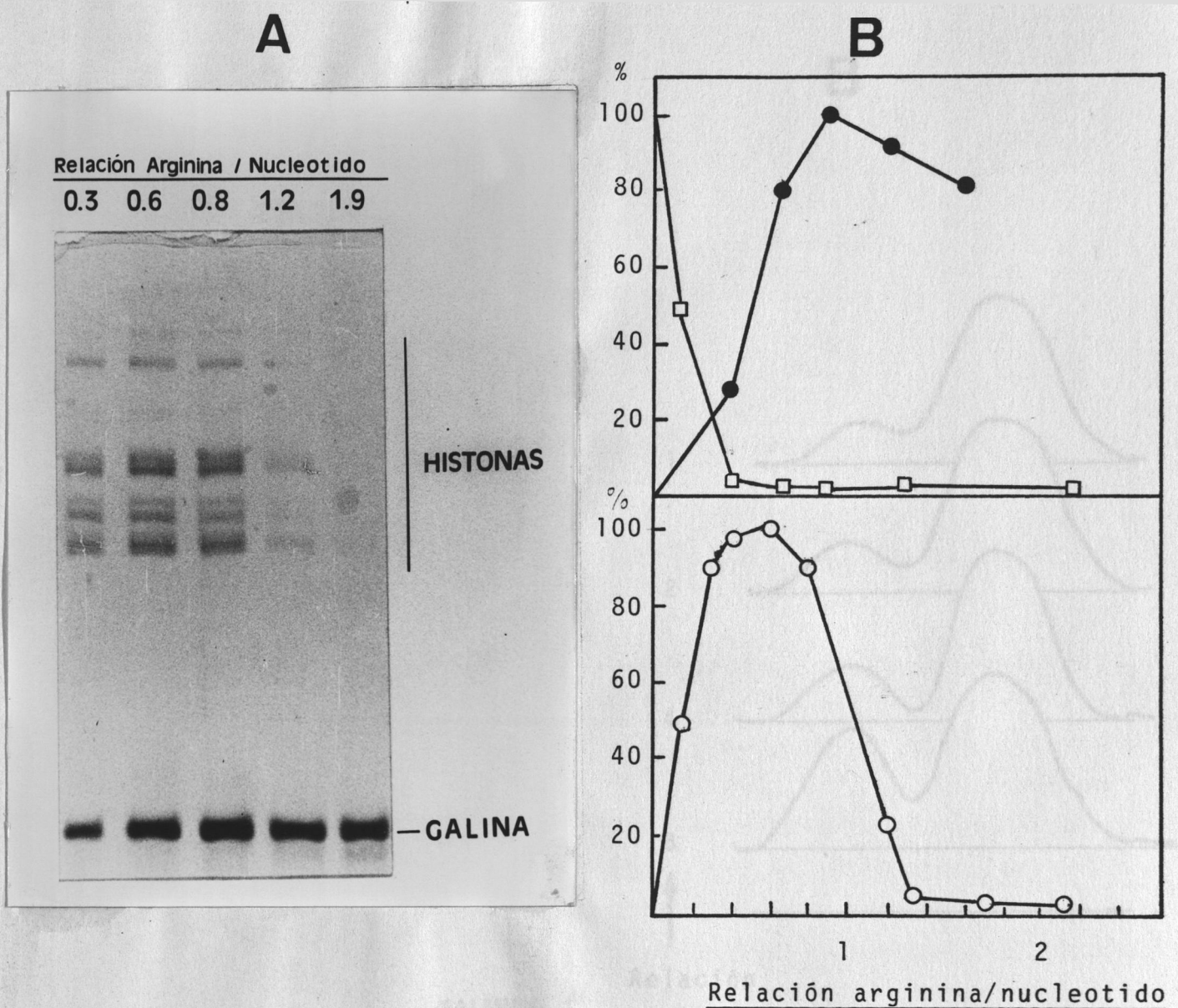


Fig 81.

Unión de la protamina galina al ADN.

Partículas nucleosómicas fueron preparadas (pag 105) a partir de núcleos de testículo de gallo (pag 84-86) y la fracción "S2" purificada mediante electroforesis preparativa (pag 106 y 193). A partir de este punto se utilizó material silicizado para evitar que parte de la protamina a añadir se pegara inespecíficamente a los tubos. Los nucleosomas fueron tratados por cantidades distintas de protamina galina o salmina (pag 108) e incubados a 0-4°C durante 10 horas con agitación suave. Se centrifugó el material a 14.000 rpm 5 min (rotor J-20 de la Beckman) y sobrenadante y pellet fueron analizados en su composición de ADN y de proteínas (a través de electroforesis en geles de PA-SDS y PA-tritón-urea). A.- Electroforesis en gel de PA-tritón-urea de las proteínas del pellet. B.- Protamina unida al ADN (detectada en el pellet junto con el ADN) (●—●), ADN detectado en el sobrenadante (□—□) e histonas detectadas en el pellet (○—○).