

# 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

## **RESULTADOS**

### 3.1.- LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA "IN VIVO"

#### 3.1.1.- Separación de células testiculares y cronología del incremento de protamina y disminución de las histonas durante la espermatogénesis:

##### SEPARACION DE CELULAS TESTICULARES A GRAVEDAD UNITARIA:

La disociación triptica controlada (pag. 74-75) del tejido testicular, permite la obtención de una suspensión de células testiculares individualizadas (fig. 25). La separación de esta suspensión de células testiculares a gravedad unidad permite la obtención de diversas poblaciones testiculares correspondientes a diversos estadios de la espermatogénesis (pag. 76-82) (fig. 26-29):

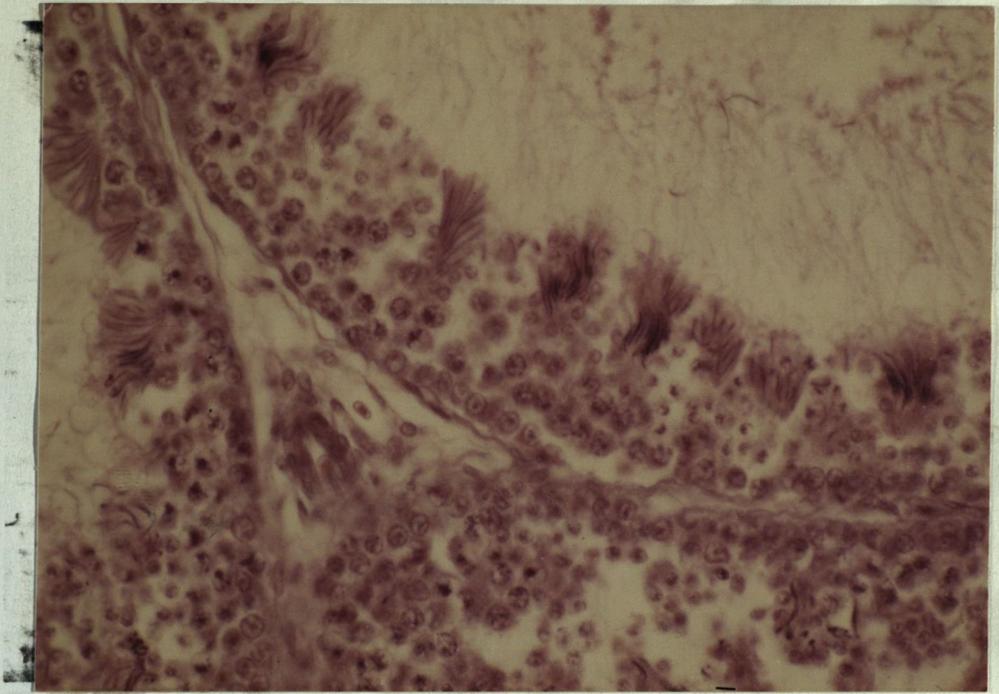
-La zona superior del gradiente (velocidad de sedimentación de 0-0.5 mm/h) contiene fragmentos citoplasmáticos y cuerpos residuales.

-Las fracciones con una velocidad de sedimentación comprendida entre 0.5 y 1 mm/h contienen espermátidas avanzadas y espermatozoides testiculares cotaminados por partículas citoplasmáticas residuales (fig. 27, a). Espermatozoides obtenidos del conducto deferente sedimentan en la misma región (fig. 26).

-Las espermátidas alargadas muestran velocidades de sedimentación comprendidas entre 1 y 2 mm/h (fig. 27, b y c; fig. 29) . Cuando una suspensión de células testiculares se centrifuga a 300xg 5 min (ò a 750xg 1 min), en el sobrenadante queda una suspensión de células enriquecida en espermátidas alargadas. Esta suspensión enriquecida en espermátidas alargadas sedimenta en la región 1-2 mm/h (fig. 26).

-Las espermátidas redondas y otras células esféricas meióticas y premeióticas sedimentan atendiendo a sus diferencias de tamaño (fig. 26, 27 y 28).

A



B

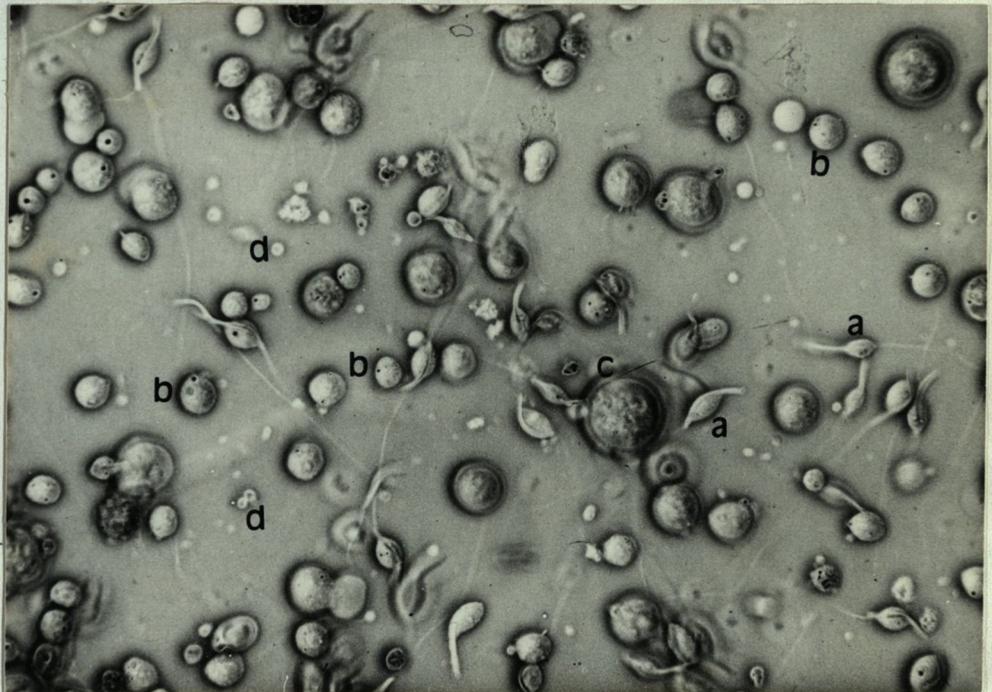


Fig 25.

A.- Corte de testículo de gallo adulto. Foto obtenida por prof.D.Ribas, Depto.Histología, Fac. Medicina, Univ.Barcelona.

B.- Suspensión celular obtenida por disociación trípica controlada del tejido. (a)Espermátida alargada, (b) espermátida redonda, (c) célula de Sertoli, (d) cuerpos residuales. Fotografía obtenida con un microscopio de contraste de fase Zeiss ST-143.

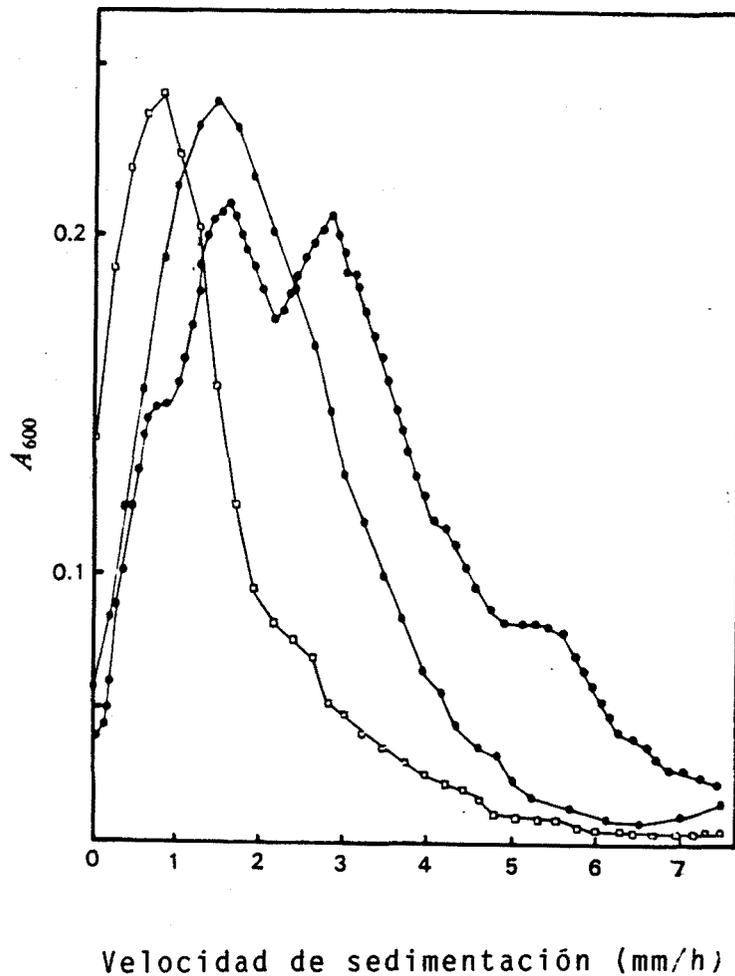


Fig 26.

Distribución de células testiculares de gallo y de espermatozoides del deferente en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unitaria. Las células testiculares o los espermatozoides del deferente fueron separados en un gradiente continuo de glicerol (3%, 6%, 12%). La distribución de las células se monitorizó controlando la absorción a 600 nm. (□) Espermatozoides del defente. (○) Suspensión enriquecida en espermátidas alargadas. (●) Suspensión de células preparadas de testículo maduro.

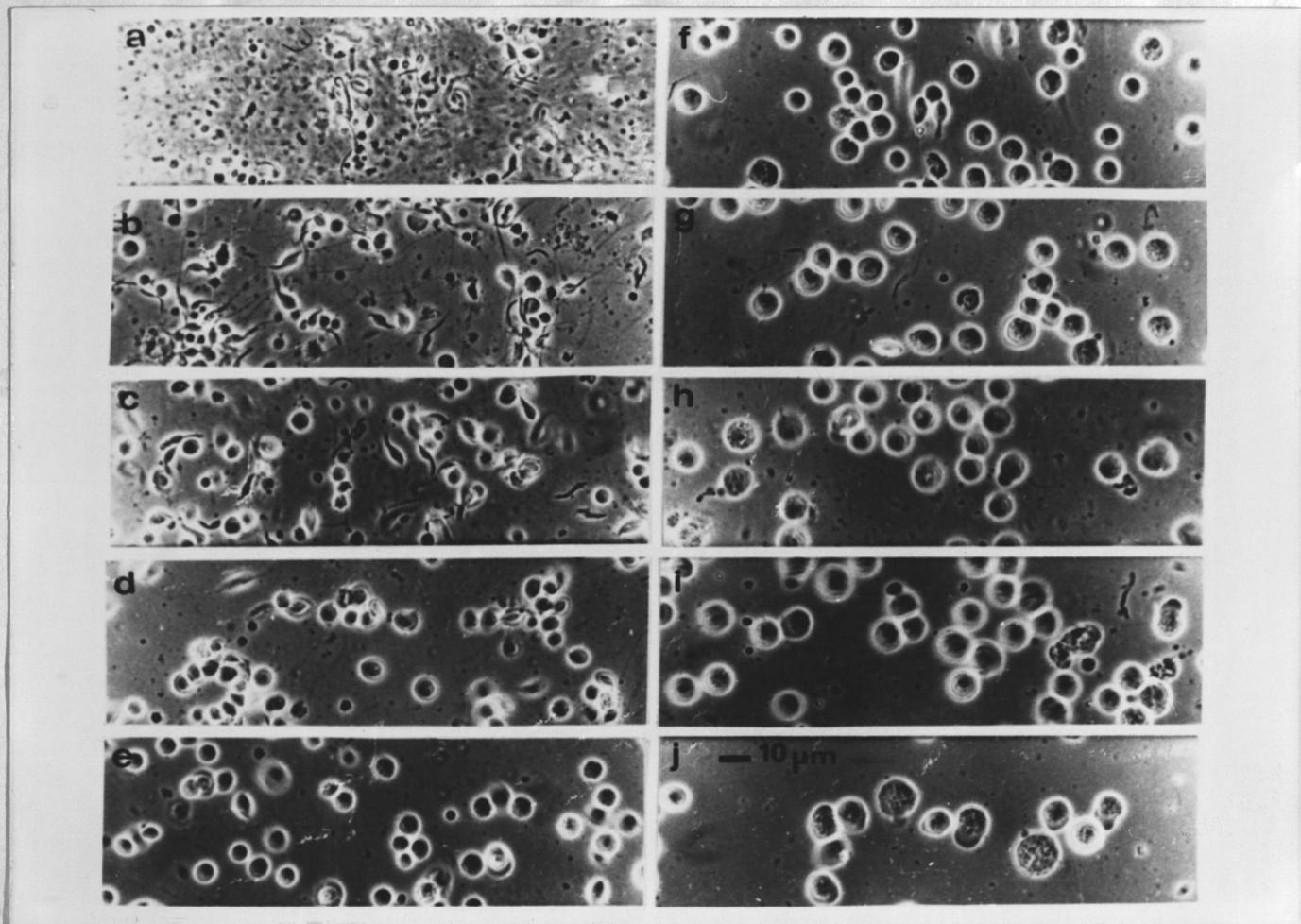


Fig 27.

Fotografía de contraste de fases de distintas poblaciones de células testiculares de gallo obtenidas por sedimentación a gravedad unitaria. La suspensión celular se separó en un gradiente continuo de glicerol (3%/6%/12%). Las células se observaron con un microscopio de contraste de fase Zeiss ST-143. Las fracciones estaban enriquecidas en (a) espermátidas avanzadas y espermatozoides testiculares, (b y c) espermátidas alargadas y (d-j) espermátidas redondas y células meióticas y premeióticas.

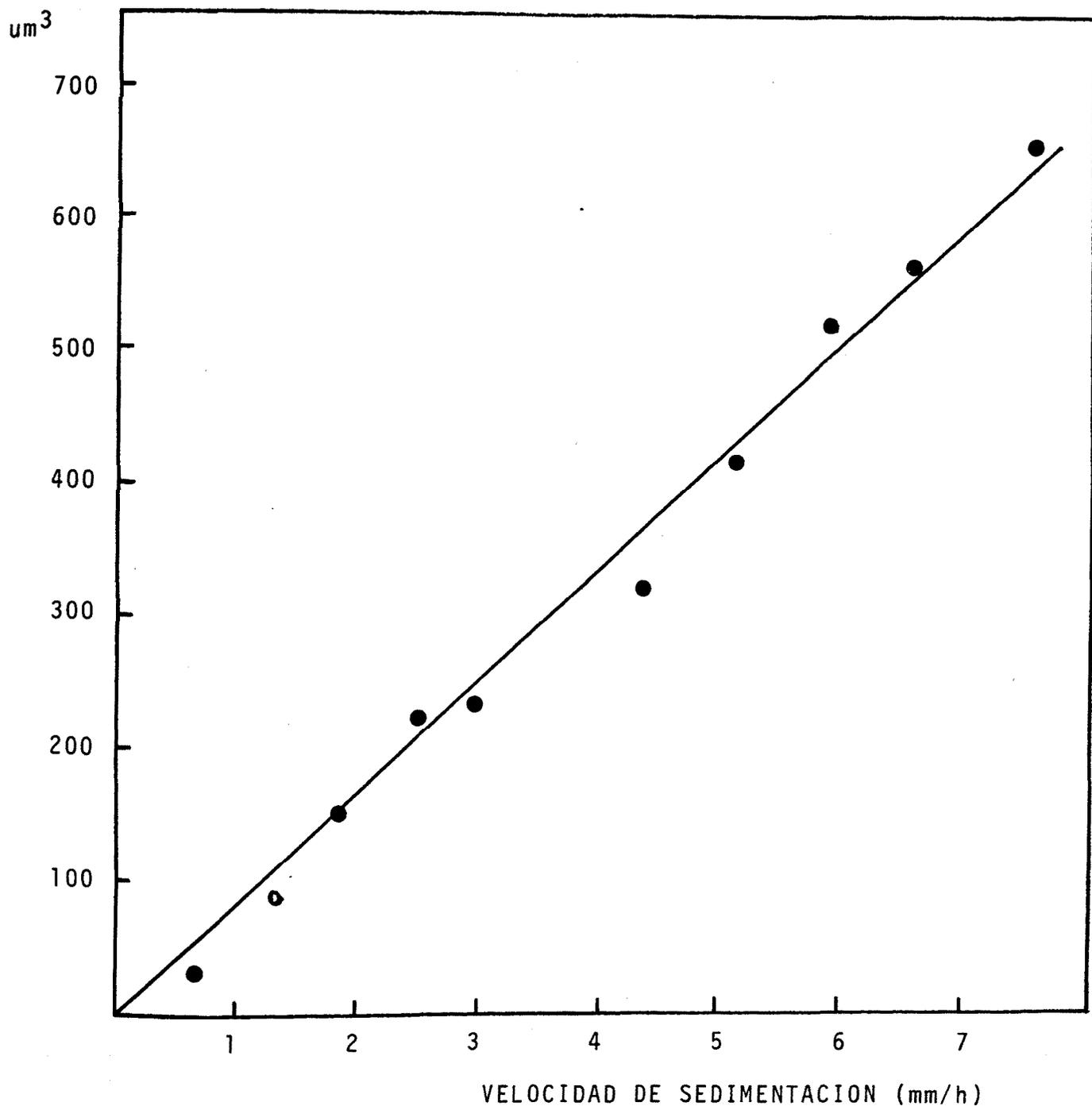


Fig 28.

Velocidad de sedimentación de las células testiculares de gallo separadas en un gradiente continuo de glicerol (3%/6%/12%) en función de su volumen celular.

El volumen celular fue estimado a partir de fotografías de contraste de fase de las distintas fracciones celulares obtenidas con un microscopio de contraste de fases Zeiss ST-143.

A



B



Fig 29.

Fotografías de las poblaciones celulares (teñidas con orceina acética) con velocidades de sedimentación de 1.0-1.5 (A) y 1.5-2.0 (B).

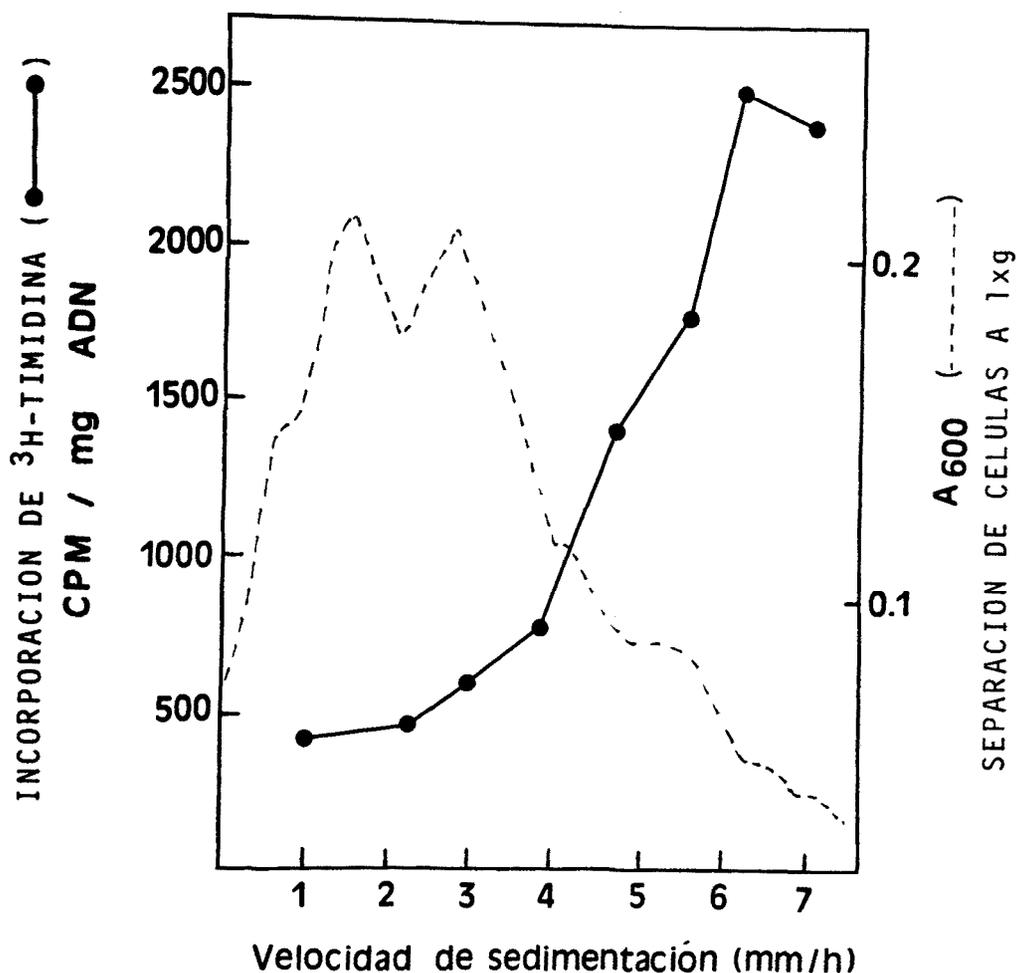


Fig 30.

Incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en las distintas poblaciones de células testiculares obtenidas por sedimentación a gravedad unitaria.

6 gr de testículo de gallo adulto fueron finamente troceados e incubados durante 2 horas en presencia de 320 uCi de  $^3\text{H}$ -timidina a  $37^\circ\text{C}$ , preparándose a continuación una suspensión celular tal como se ha descrito en pag.74-75. Las células fueron separadas por el método de sedimentación a gravedad unitaria (pag. 76-82) y las distintas fracciones celulares se precipitaron con 20% a. tricloroacético, lavaron con etanol y éter y resuspendieron en 20% a. tricloroacético. La radioactividad retenida en filtros de fibra de vidrio fué leída con un contador de centelleo.

Las espermátidas redondas y alargadas (velocidades de sedimentación 2-3 y 1-2 respectivamente), células que ya no replican, presentan una incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina muy baja.

## CRONOLOGIA DEL INCREMENTO DE PROTAMINA Y DISMINUCION DE LAS HISTONAS EN LA ESPERMIOGENESIS:

El análisis electroforético de las variaciones que las proteínas básicas nucleares experimentan durante la espermatogénesis, indica que a lo largo de este proceso de diferenciación celular la nucleohistona resulta sustituida por la nucleoprotamina (fig 31, 32 y 33).

Las células meióticas y premeióticas ( $1/SV=0.17-0.19$ ) presentan una relación histonas/ADN (w/w) ligeramente inferior que las espermátidas redondas ( $1/SV=0.21$ )(fig. 32 y 33). La relación Histona/ADN (w/w) determinada en espermátidas alargadas en estadios sucesivos de la espermiogénesis ( $1/SV=0.22-0.9$ ) disminuye progresivamente hasta ser indetectable en los espermatozoides del conducto deferente ( $1/SV=1.3$ )(fig. 31, 32 y 33).

Paralelamente a la disminución del contenido nuclear de histonas, se da un incremento progresivo en la protamina. La protamina galina es indetectable en las espermátidas redondas ( $1/SV=0.21$ )(Fig. 31 y 32), y se detecta por primera vez en las espermátidas alargadas que presentan  $1/SV=0.27$ . La relación protamina/ADN aumenta progresivamente en los sucesivos estadios de la espermatogénesis, y es la única proteína nuclear mayoritaria detectable en el núcleo del espermatozoide (Fig. 31 y 32).

Entre las modificaciones químicas cuantitativamente más destacables que experimentan las proteínas nucleares en la transición nucleohistona-nucleoprotamina, cabe citar la acetilación de las histonas y la fosforilación de la protamina. La acetilación de las histonas se tratará extensamente en el punto 3.1.3. (pag. 166). La fosforilación de la protamina reduce su movilidad electroforética en geles ácidos (Louie and Dixon, 1973), si bien otras modificaciones químicas (ADP-ribosilación) pueden también contribuir a este hecho. El análisis de la protamina galina en las distintas fases de la espermiogénesis, muestra que tales formas con movilidad reducida son mayoritarias coincidiendo con la entrada de la protamina al núcleo y unión al ADN, y son casi inexistentes en los espermatozoides del deferente (Fig. 31 y 34).

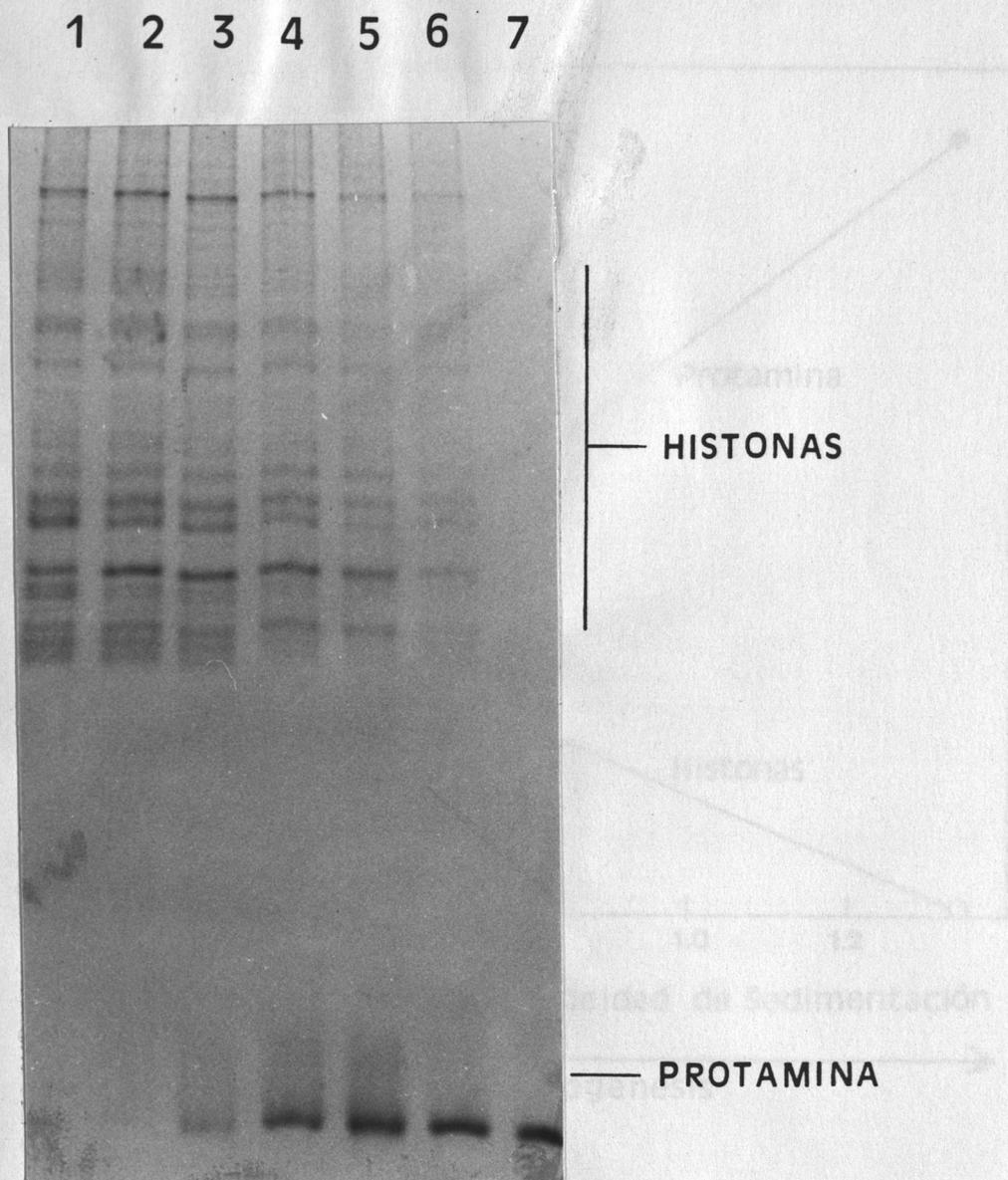


Fig 31.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea (pag. 100-101) de las proteínas nucleares de células testiculares de gallo separadas por el método de sedimentación a gravedad unitaria (pag. 74-82). Los núcleos fueron preparados a partir de las distintas fracciones celulares mediante el método del ácido cítrico en presencia de cationes divalentes, bisulfito y PMSF a un pH de 2.4 (pag. 88). Las proteínas nucleares fueron extraídas con HCl 0.3 M, precipitadas con 20% TCA y lavadas con acetona acidificada y acetona (pag. 93-94).

Fracción enriquecida en espermátidas redondas (1), espermátidas alargadas en distintos estadios de la espermiogénesis (2-6) y espermatozoides del conducto deferente (7).

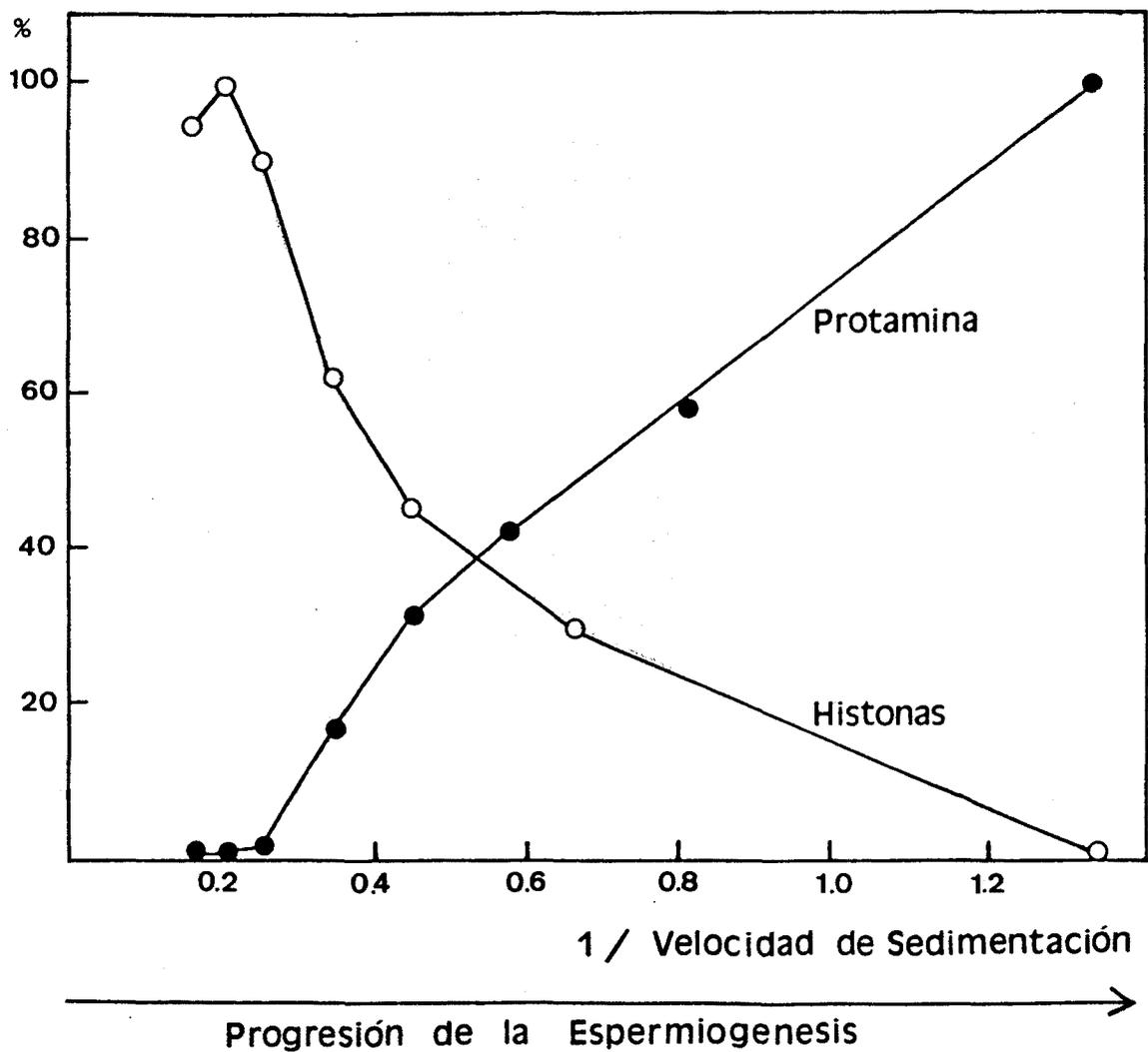


Fig 32.

Cambios en el contenido de proteínas básicas nucleares en estadios sucesivos de la espermatogénesis. Contenido nuclear de histonas (○—○) y de protamina (●—●). La relación histonas/DNA=1 (w/w), determinada en las células meióticas y premeióticas se refiere a 100% nucleohistona. La relación arginina/nucleótido=0.8, determinada en espermatozoides del conducto deferente, se refiere a 100% nucleoprotamina. Cada punto de la gráfica muestra la media de 3 determinaciones independientes.

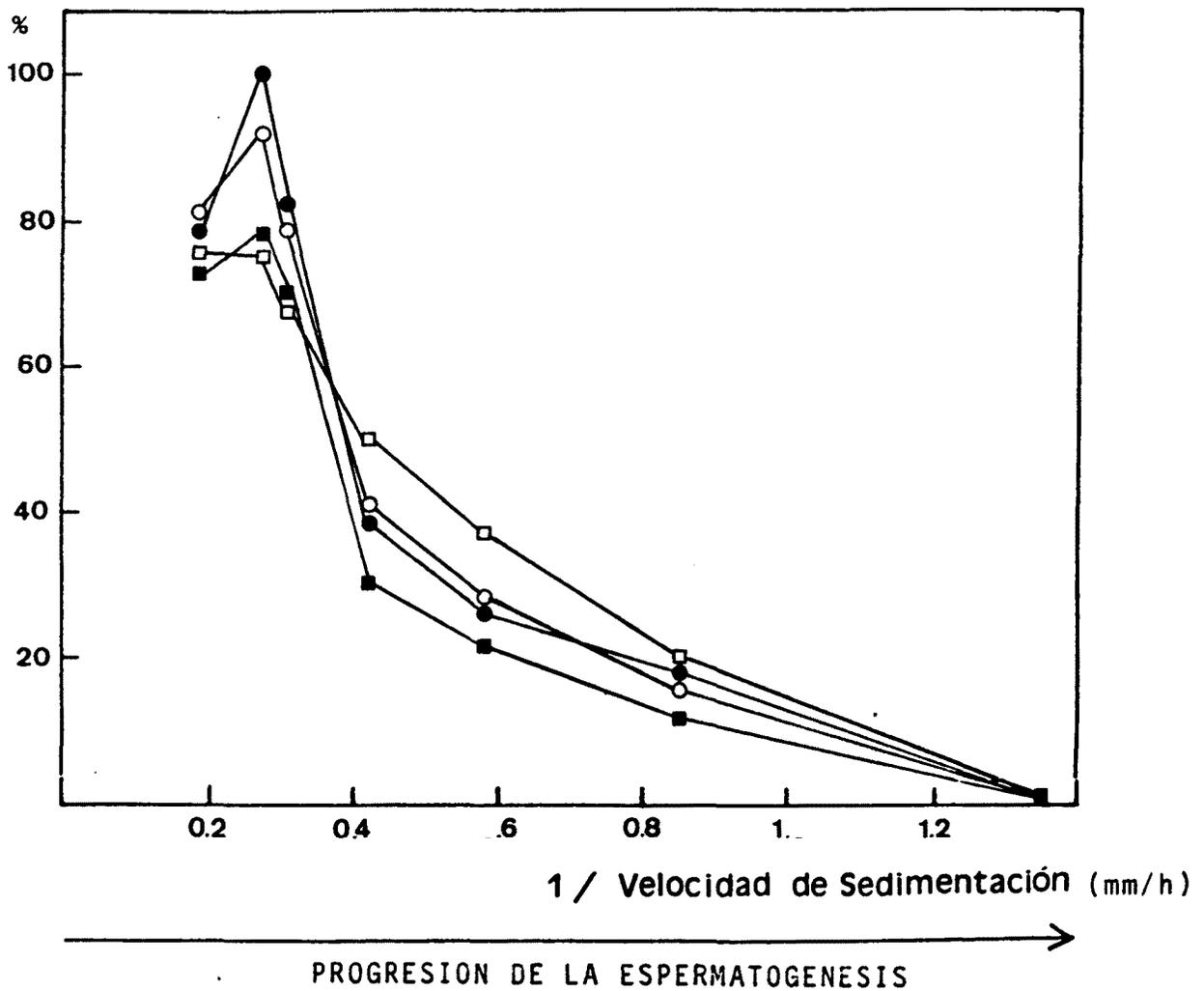


Fig 33.

Variación de las histonas del octámero a lo largo de la espermatogénesis. H4 (●—●), H3 (■—■), H2A (○—○) y H2B (□—□). A partir de células separadas a  $1 \times g$  (pag. 74-82) se prepararon núcleos por el método del ácido cítrico en presencia de cationes divalentes, bisulfito y PMSF a un pH de 2.4 (pag. 88). Las proteínas nucleares fueron extraídas con  $0.4 \text{ N SO}_4\text{H}_2$ , precipitadas con acetona y analizadas en geles de poliácridamida-SDS con gradiente ( pag. 99) y teñidas con Amido Black 0.1% (pag. 103). El área resultante de la integración de los picos de las distintas histonas, fue corregida aplicando el coeficiente de afinidad que el Amido Black presenta hacia las distintas proteínas (Hardison and Chalkley, 1978).

La gráfica representa las variaciones de la relación Histona/ADN (w/w) en función del inverso de la velocidad de sedimentación (mm/h) de las distintas poblaciones de células testiculares. 100% corresponde al valor máximo histona/ADN (w/w).

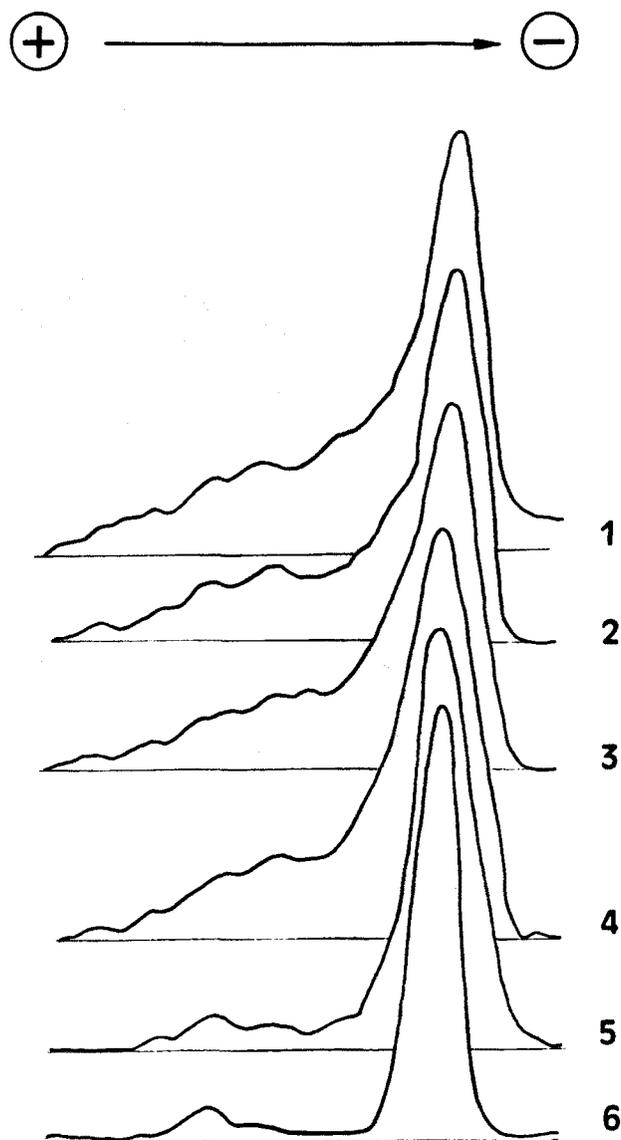


Fig 34.

Scan de la zona de la protamina gallina analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea. Pueden observarse formas de migración más lentas que el pico principal de protamina. Probablemente estas formas de inferior movilidad electroforética, correspondan a moléculas de protamina modificadas químicamente por fosforilación, aunque podrían ser también debidas a otras modificaciones químicas tales como la ADP-ribosilación.

Protamina de espermátidas alargadas en sucesivos estadios de la espermiogénesis (1-5). Protamina de espermatozoides del conducto deferente (6).

### 3.1.2.- Contenido celular y biosíntesis de poliaminas durante la espermatogénesis.

#### CONTENIDO CELULAR DE POLIAMINAS:

El análisis por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice de los derivados dansilados de las aminas extraídas de distintas fracciones de células testiculares de gallo separadas por sedimentación a gravedad unitaria, indica que coincidiendo con la espermiogénesis se dan niveles elevados de poliaminas (Fig 35).

Los niveles de espermina son elevados en las fases tempranas de la espermatogénesis, experimentan una ligera caída en las espermátidas redondas y vuelven a aumentar en las espermátidas alargadas. Los niveles de putrescina experimentan un incremento progresivo a lo largo de la espermatogénesis para alcanzar el máximo en las espermátidas alargadas (Fig. 35 y 36). Los niveles de espermidina permanecen relativamente bajos a lo largo de la espermatogénesis, y sus variaciones paralelan a las de la espermina (Fig. 36). Todas ellas (espermina, espermidina y putrescina) decaen en los espermatozoides (Fig. 35 y 36).

Probablemente si se expresaran los niveles de poliaminas en molaridad, su incremento a lo largo de la espermiogénesis resultaría mucho más evidente; La relación poliaminas/ADN aumenta o permanece constante, mientras que el volumen celular experimenta una reducción progresiva (Fig. 1 y fig 36). Este incremento en la concentración de poliaminas tiene lugar coincidiendo con los cambios estructurales que tienen lugar a nivel de la cromatina en la transición nucleohistona-nucleoprotamina (Fig. 31 y 32).

Al analizar por cromatografía en capa fina los derivados dansilados de las aminas extraídas de células testiculares de gallo, se pueden observar además de las poliaminas, otras aminas que experimentan variaciones cuantitativas importantes a lo largo de la espermatogénesis (Fig 35). La confirmación de que las manchas observadas en las cromatografías corresponden efectivamente a las poliaminas señaladas (Fig 35), se realizó mediante cromatografía en capa fina bidimensional de poliaminas (1ª dimensión: ciclohexano/dietileter 1:9, 2ª dimensión: cloroformo/trietilamina 10:1).

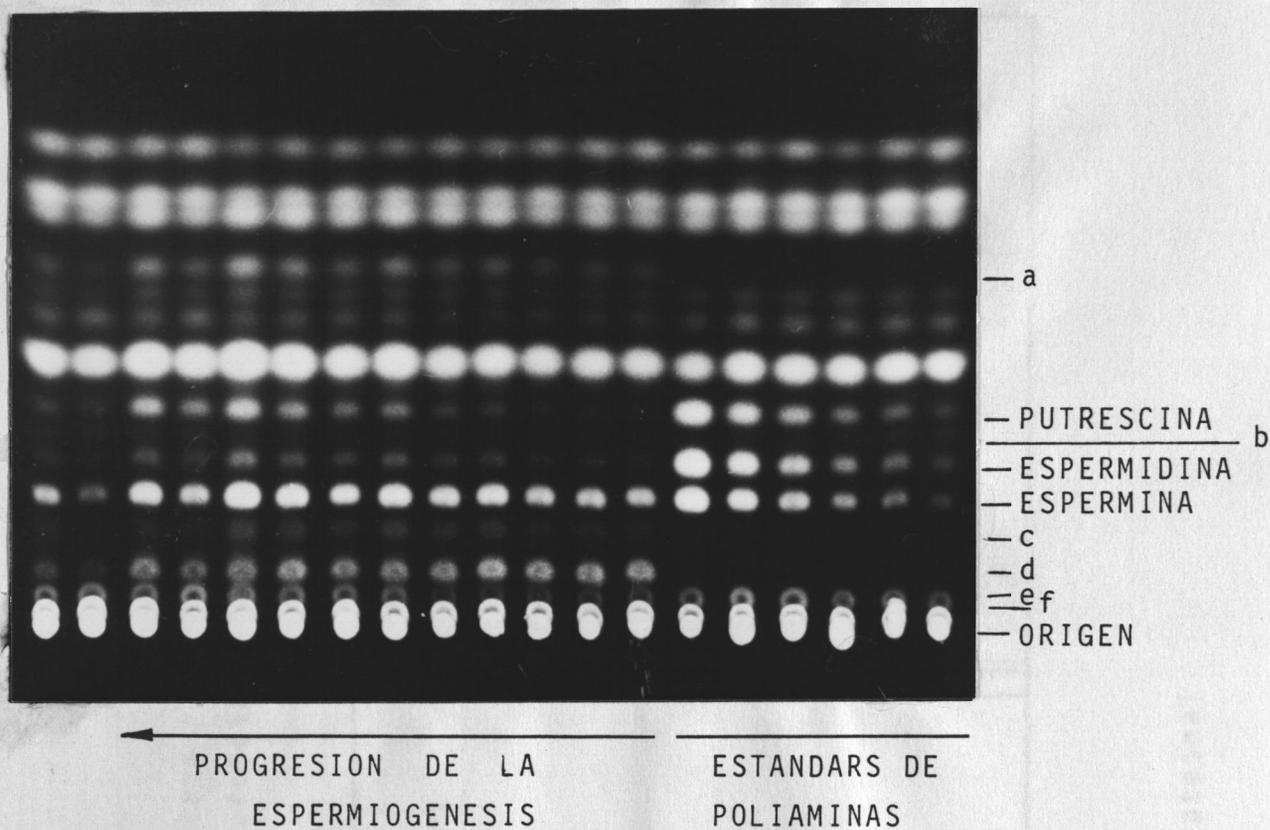


Fig 35.

Cromatografía en capa fina de poliaminas. Se separaron células por el método de sedimentación a gravedad unitaria (pag. 75-82) y las poliaminas de cada fracción celular fueron extraídas con ácido perclórico 6% (w/v) (pag. 109). Los derivados dansilados de las aminas se analizaron por cromatografía en capa fina en gel de sílice junto con una gama de estándares de poliaminas (pag. 109).

A la derecha de la foto se observan cantidades decrecientes de una disolución estándar de poliaminas. A la izquierda de la foto diferentes muestras procedentes de células testiculares de gallo. Las bandas "a", "b", "c", "d", "e" y "f" corresponden a derivados dansilados de aminas todavía no identificados.

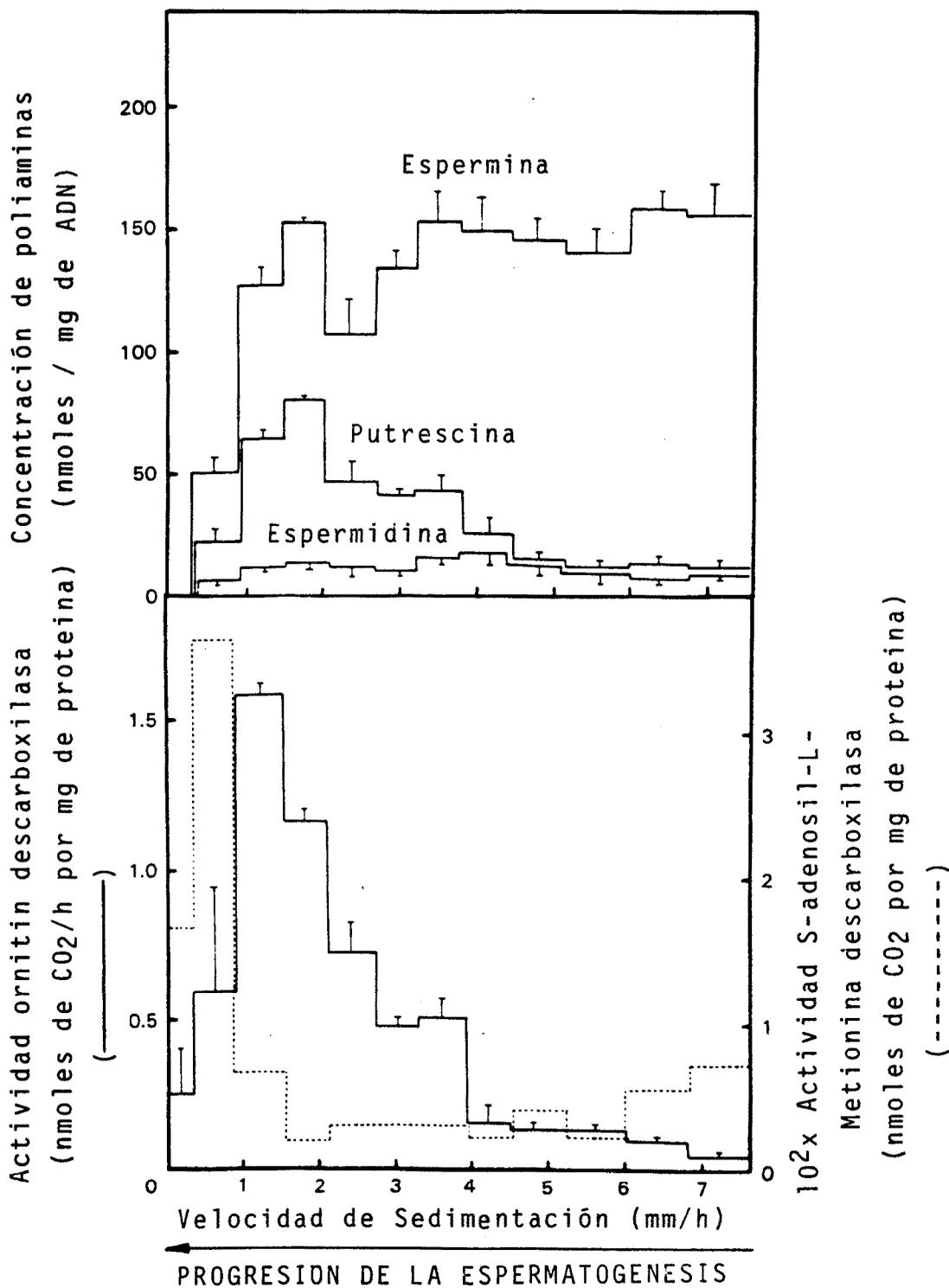


Fig 36.

Contenido celular de poliaminas y actividades ornitín descarboxilasa y S-adenosil-L-metionina descarboxilasa de células testiculares de gallo separadas en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unidad.

## BIOSINTESIS DE POLIAMINAS:

### Actividad ornitin descarboxilasa:

La actividad ornitin descarboxilasa determinada en extractos de distintas fracciones de células testiculares de gallo separadas a gravedad unitaria, indica que a medida que progresa la espermatogénesis se da un incremento en la actividad de esta enzima, limitante en la biosíntesis de poliaminas (Fig. 36). La actividad ornitin descarboxilasa es máxima en las espermátidas alargadas y decae en los espermatozoides. Las variaciones de esta actividad enzimática son paralelas a las variaciones en los niveles de su producto: la putrescina (Fig. 36).

Experimentos mediante el tratamiento de los extractos de la ornitin descarboxilasa con fosfatasas y inhibidores de las fosfatasas, sugieren que mecanismos de fosforilación defosforilación pueden estar implicados en el control de esta enzima (Fig. 39).

### Actividad S-adenosil-L-metionina descarboxilasa:

La actividad S-adenosil-L-metionina descarboxilasa determinada en extractos de distintas fracciones de células testiculares de gallo separadas a gravedad unitaria, indica que a medida que progresa la espermatogénesis, se da un incremento en la actividad de esta enzima, limitante en la biosíntesis de espermidina y espermina. Esta actividad es máxima al final de la espermiogénesis, en la fracción de células con una velocidad de sedimentación comprendida entre 0 y 1 mm/h (Fig. 36).

## LA ESPERMINA ESTIMULA LA ADP-RIBOSILACION DE PROTEINAS NUCLEARES:

En presencia de 1mM MgCl<sub>2</sub>, la espermina estimula la ADP-ribosilación de proteínas nucleares de una forma notable en el rango 0-500 uM., y alcanza el máximo de estimulación a la concentración de 5 mM. (Fig 40).

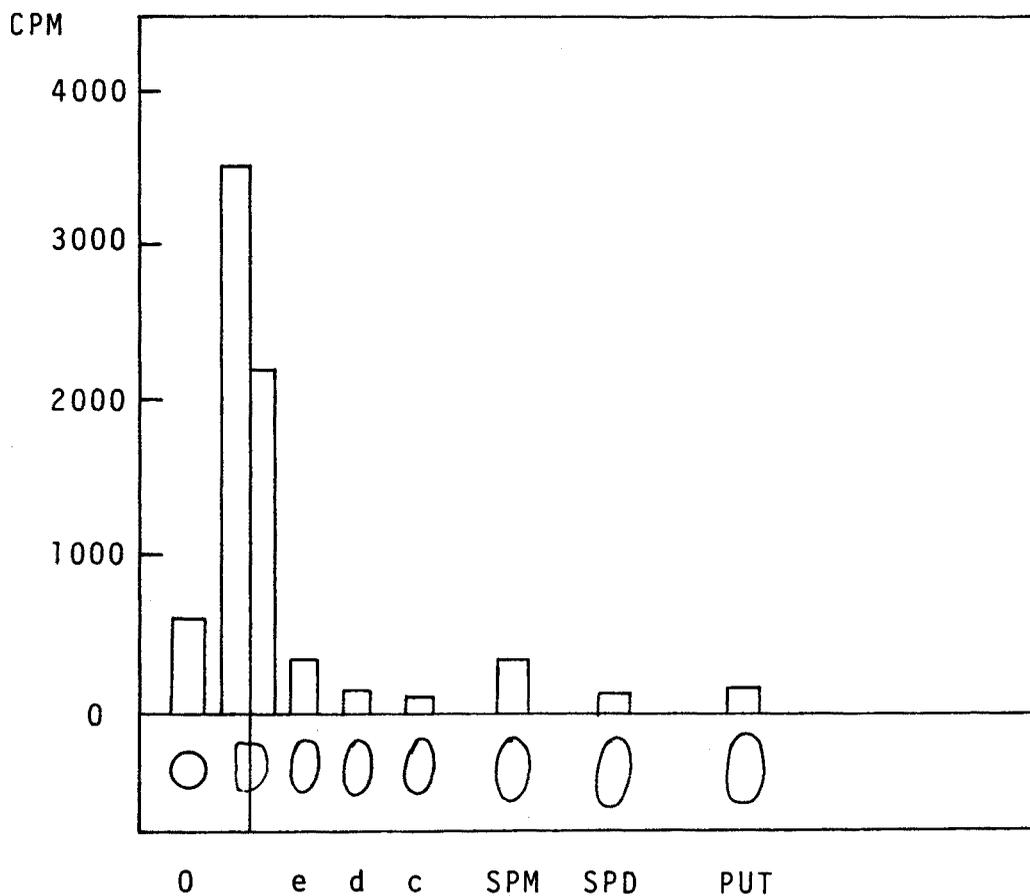


Fig 37.

Distribución del  $^{14}\text{C}$  entre los derivados dansilados de las aminas procedentes de células testiculares de gallo incubadas en presencia de  $^{14}\text{C}$ -Putrescina.

30 g de tejido testicular fueron finamente troceados e incubados en presencia de 150 ml de MEM conteniendo 50 uCi de (1,4- $^{14}\text{C}$ )Putrescina durante 60 min a  $37^\circ\text{C}$ . Seguidamente se prepararon células y separaron a fuerza de gravedad unidad (pag 75-82). Los derivados dansilados de las aminas de cada fracción celular se analizaron por cromatografía en capa fina de poliaminas (pag. 109). La radioactividad incorporada a cada derivado dansilado se determinó pulverizando el gel de sílice de cada "mancha" y leyendo en supersolve con un contador de centelleo. Debajo del eje de abcisas se esquematiza la distribución de los derivados dansilados separados por etilacetato-ciclohexano (2:3)(ver fig. 35).

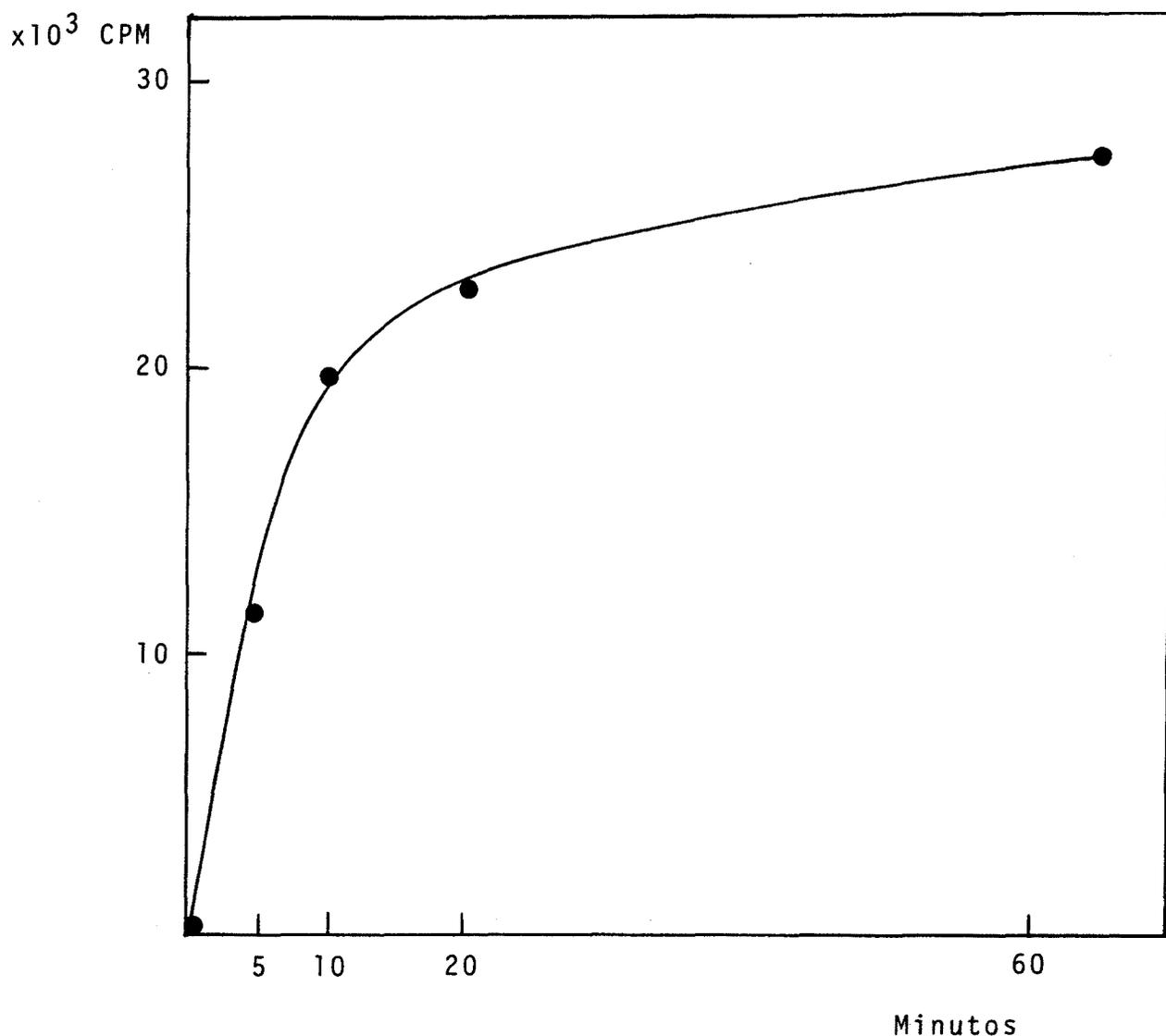


Fig 38.

Cinética de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -Ornitina por extractos en TED de células testiculares de gallo.

Extractos de células testiculares de gallo en TED se obtuvieron como está descrito en pag 110 e incubaron en presencia de  $^{14}\text{C}$ -Ornitina durante diversos tiempos. La radioactividad liberada se recogió en 200  $\mu\text{l}$  de NCS y fué leída en 10 ml de supersolve.

A los 60 min, la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  ya esta prácticamente completa.

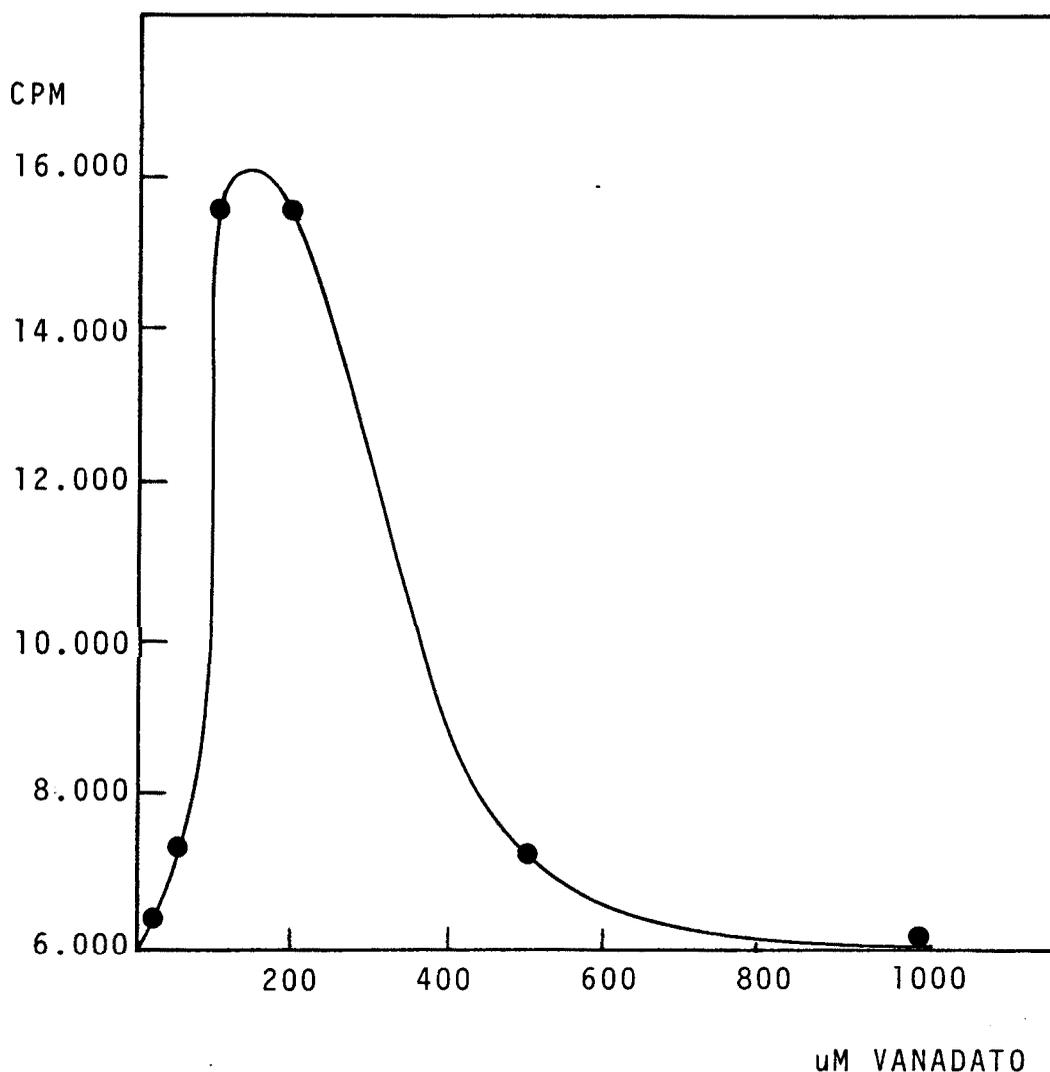


Fig 39.

Efecto del Vanadato sobre la actividad ornitín descarboxilasa.

Alicuotas de un extracto de células testiculares en TED se incubaron en presencia de  $^{14}\text{C}$ -ornitina (pag. 110) y concentraciones distintas de ortovanadato durante 60 min. La radioactividad liberada se recogió en 200  $\mu\text{l}$  de NCS y fué leída en 10 ml de supersolve.

El ortovanadato muestra un potente efecto estimulador (3x) en el rango 0-100  $\mu\text{M}$ ., mientras que revierte el efecto estimulador a concentraciones superiores a 200  $\mu\text{M}$ ..

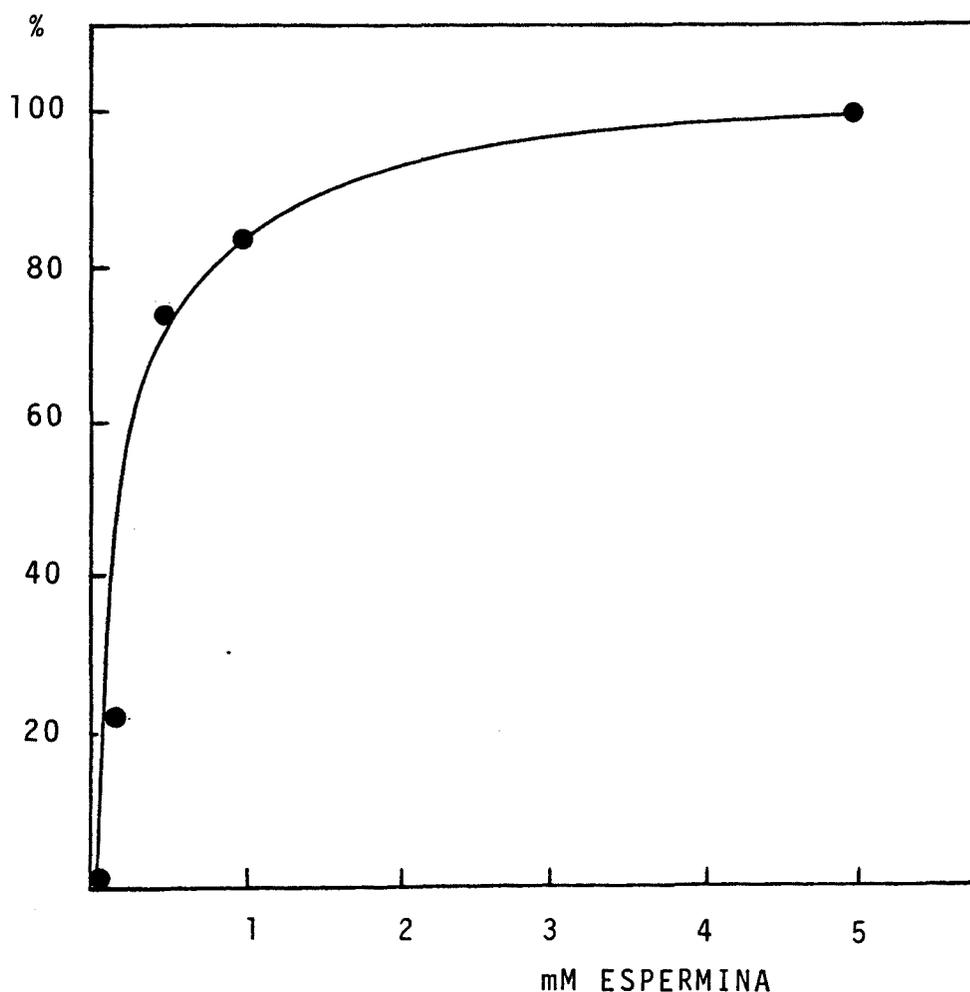


Fig 40.

Efecto estimulador de la espermina sobre la ADP-ribosilación.

Nucleos preparados según pag 83, se lavaron en 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mM 2-mercaptoetanol. Los nucleos así preparados se suspendieron en un volumen final de 200 ul del medio de lavado conteniendo 4 ul de Nicotinamida (U-<sup>14</sup>C)Adenina dinucleotido (286 mCi/mmol, 50 uCi/2 ml). y concentraciones crecientes de espermina. Tras incubar 3 min a 37°C, se paró la reacción añadiendo 5 ml de ácido tricloroacético 20% (w/v) a 0°C. Las proteínas nucleares se precipitaron 30 min a 0°C. La radioactividad retenida por filtros de fibra de vidrio se fué leída en 10 ml de super-solve. (El 100% de la gráfica corresponde al 100% de estimulación en la actividad de ADP-ribosilación detectada a 0 mM espermina).

### 3.1.3.- Acetilación de las histonas durante la espermatogénesis.

#### 3.1.3.1.- "Steady state" de acetilación:

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida-tritón-urea permite la separación de las distintas formas de acetilación de las histonas (pag. 100-101). Puede no obstante presentar el inconveniente de que otras proteínas que se solapen con las formas de acetilación de la H4, interfieran con la cuantificación del grado de acetilación. Por tal razón en algunos casos se ha recurrido a la electroforesis bidimensional (1ª dimensión PA-tritón-urea y 2ª dimensión PA-SDS) en donde la probabilidad de solapamiento de proteínas es muy inferior.

La observación del gel de la figura 41 muestra como a medida que progresa la espermiogénesis, la proporción de formas no y monoacetiladas decae, mientras que la de formas tri y tetraacetiladas aumenta (para la identificación de las fracciones nucleares ver pag. 6). Se observa también un incremento de una proteína (SP) que interfiere con la cuantificación de los niveles de triacetilación de la H4.

Utilizando células separadas en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unidad, se observa también un incremento de las formas de hiperacetilación de la histona H4 y una disminución de las formas no y monoacetiladas (fig. 42 y 43). Con la metodología empleada, además de la proteína que migra a nivel de las formas di-triacetiladas de la H4, se observan también la presencia de bandas adicionales a nivel de la forma tetraacetilada de la histona H4 (fig. 42). Para identificar estas proteínas que con esta metodología migran a nivel de las formas de acetilación de la histona H4 y para cuantificar con mayor precisión el "steady state" de acetilación, se efectuaron electroforesis bidimensionales de las proteínas nucleares correspondientes a distintas fases de la espermatogénesis (fig 44 y 45). La proteína "SP" (fig 31, 41, 42 y 54), migra por encima de la histona H3 en la segunda dimensión (poliacrilamida-SDS).

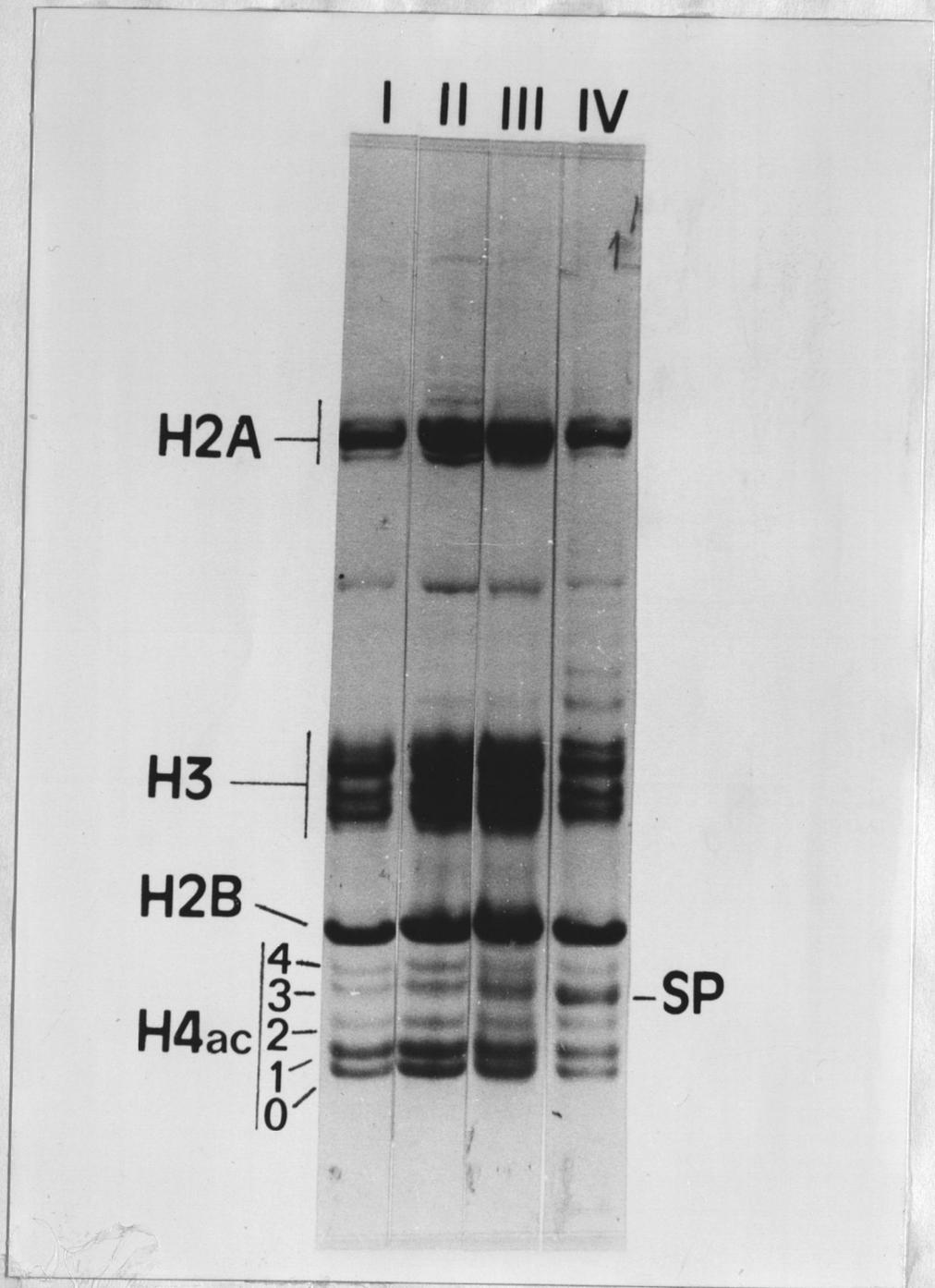


Fig 41.

"Steady state" de acetilación de las histonas determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea de las histonas extraídas a partir de núcleos separados por sedimentación a gravedad unidad (pag. 83-88). La banda de mayor movilidad electroforética corresponde a la forma No acetilada de la histona H4. La siguiente banda a la mono-acetilada, y así sucesivamente hasta la forma tetra-acetilada de la histona H4. Este método de determinar el "steady state" de acetilación, tiene el inconveniente de que otras proteínas ("SP") que se solapan con estas bandas de acetilación interfieren con su cuantificación.

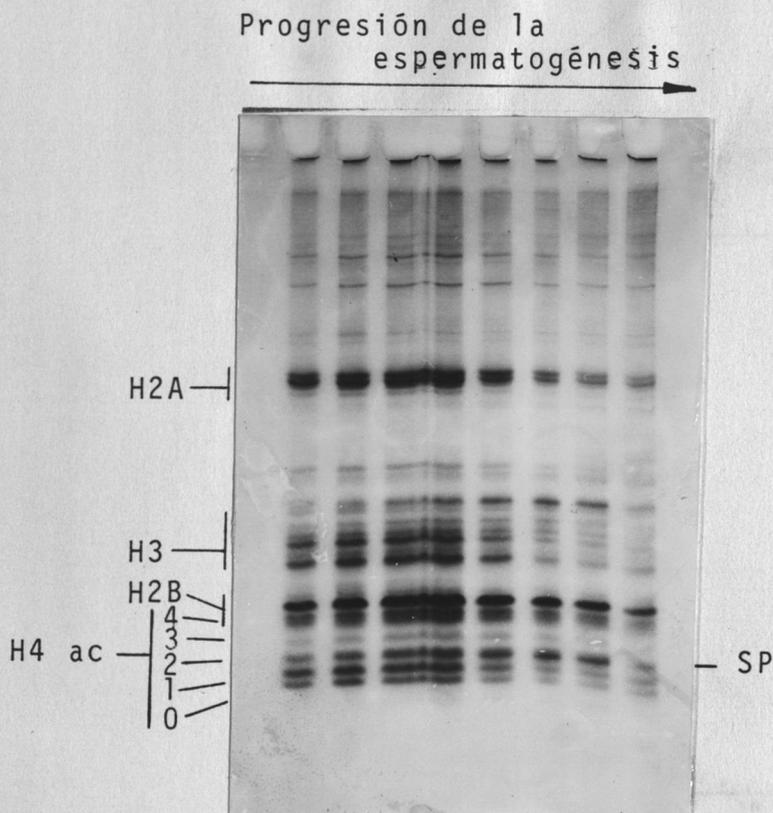


Fig 42.

"Steady state" de acetilación de las histonas determinado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea de las histonas extraídas a partir de núcleos purificados de células separadas por sedimentación a gravedad unidad (pag. 74-82). Los núcleos fueron purificados mediante el método del ácido cítrico en presencia de cationes divalentes, bisulfito y PMSF a un pH de 2.4 (pag. 88). Las histonas fueron extraídas con 0.3 M HCl y los extractos precipitados con 20% TCA y lavados con acetona acidificada y acetona (pag. 93-94).

Al igual que en la fig 41, aquí existe también el inconveniente de que otras proteínas que se solapan con las bandas de acetilación de la H4, interfieren con la cuantificación del "steady state" de acetilación de ésta.

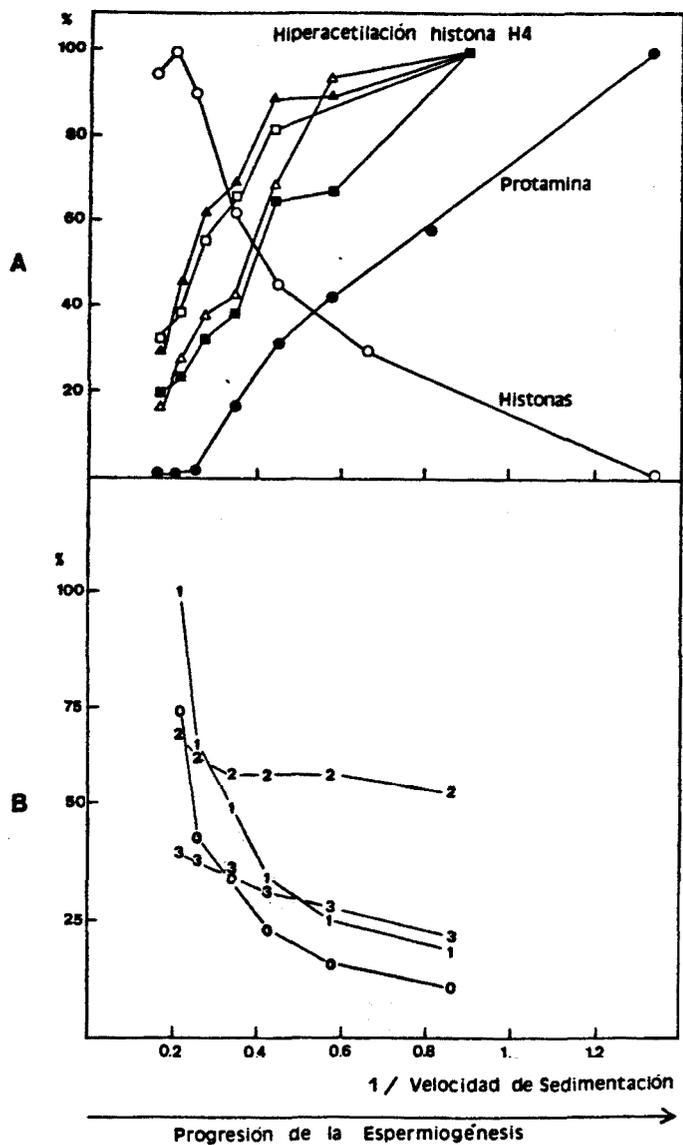


Fig 43.

"Steady state" de acetilación de la histona H4 a lo largo de la espermatogénesis.

A.- Las variaciones de protamina y de histonas se han representado para facilitar su correlación con la acetilación. Relación diacetilada / monoacetilada ( $\Delta$ — $\Delta$ ), triacetilada / monoacetilada ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ), triacetilada / no acetilada ( $\square$ — $\square$ ) y diacetilada / no acetilada ( $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ).

B.-Relación no acetilada / ADN (0—0), monoacetilada / ADN (1—1), diacetilada / ADN (2—2) y triacetilada / ADN (3—3). El 100% representa el valor máximo. Al principio de la espermatogénesis, las formas mayoritarias, corresponden a las bandas monoacetiladas y no acetiladas. Al final de la espermatogénesis, coincidiendo con la transición nucleohistona- nucleoprotamina, las formas diacetiladas y triacetiladas son mayoritarias. La relación Tetraacetilada / ADN no pudo ser determinada dado que se esta banda de acetilación se solapa con otra proteína que en geles de poliacrilamida-SDS migra igual que la H2B (pag. 171).

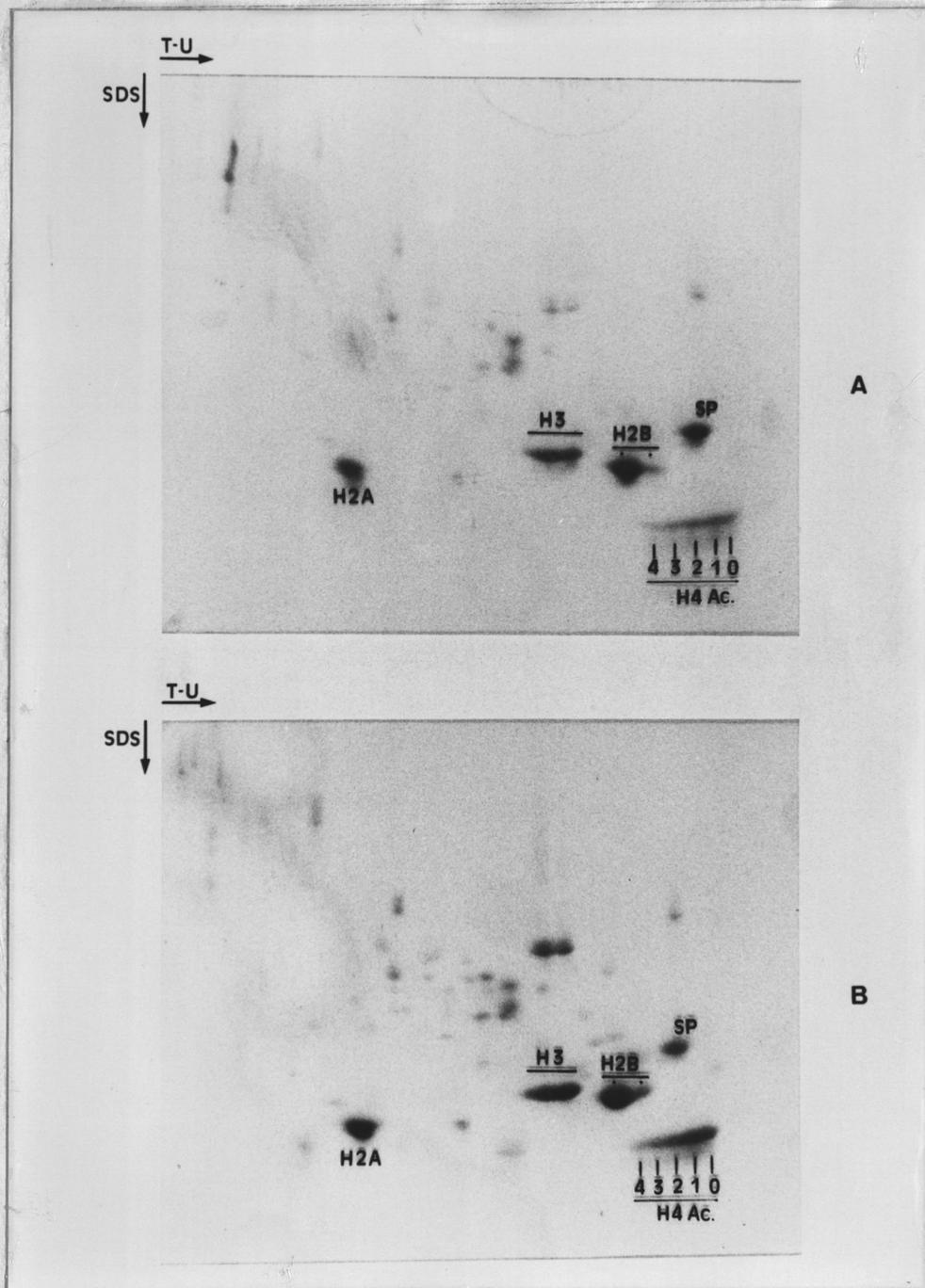


Fig 44.

Electroforesis bidimensional de las proteínas extraídas de núcleos preparados a partir de células testiculares de gallo separadas a gravedad unidad (pag. 74-82). A.-Fracción celular con una velocidad de sedimentación comprendida entre 1.9 y 2.1 mm/h. B.-Fracción celular con una velocidad de sedimentación comprendida entre 3 y 4 mm/h. La fracción celular más avanzada en la espermiogénesis (A), presenta un mayor grado de acetilación (Fig. 45). Nótese también la presencia de una proteína (SP) que se solapa con las bandas de di-triacetilación de la histona H4 en la dimensión de tritón urea y que aumenta a medida que progresa la espermiogénesis. Veáse también la proteína que migra a nivel de la H2B en geles de SDS y que se solapa con la banda de tetraacetilación de la H4 en la dimensión de PA-tritón-urea.

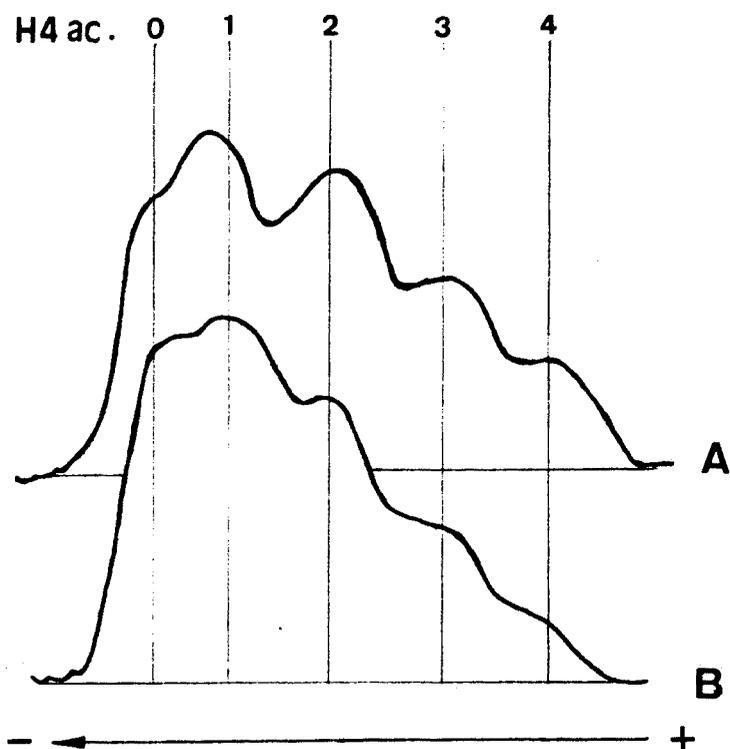


Fig 45.

Scan de la zona de la histona H4 analizada mediante electroforesis bidimensional (Fig 44). El trazado "A" corresponde al gel "A" de fig. 44, y el trazado "B" al gel "B".

Nótese que en "A" existe un grado de acetilación superior que en "B". La fracción celular correspondiente a "A" presenta una velocidad de sedimentación comprendida entre 1.9 y 2.1 mm/h y representa un estadio más avanzado de la espermatogénesis que la fracción correspondiente a "B", con una velocidad de sedimentación comprendida entre 3 y 4 mm/h. Los scans se han representado a distinta escala.

Las proteínas que en la dimensión de PA-tritón-urea migran a nivel de la forma tetraacetilada de la H4, en la dimensión de PA-SDS migran a nivel de la histona H2B (fig. 44). El "steady state" de acetilación de la histona H4 determinado mediante electroforesis bidimensional (fig. 44) aumenta a medida que progresa la espermiogénesis (fig 45).

Estos resultados indican que en la población de espermátidas alargadas, el número de residuos lisina neutralizados por acetilación en cada nucleosoma, debidos a la acetilación de la histona H4, sería de 4 (estos resultados representarían la media de la acetilación de todos los nucleosomas de la cromatina de las espermátidas alargadas).

### 3.1.3.2.- Incorporación de $^3\text{H}$ -acetato:

La incorporación de  $^3\text{H}$ -acetato a las histonas depende de las actividades de acetilación y desacetilación presentes en el momento del marcaje, y también del "steady state" de acetilación en este mismo momento. La incorporación de  $^3\text{H}$ -acetato permite además confirmar que las bandas de acetilación de las histonas de los geles de poliacrilamida-tritón-urea, efectivamente se correlacionan con una incorporación de radioactividad.

La incorporación de  $^3\text{H}$ -acetato a las formas di tri y tetraacetiladas de la histona H4, es superior en el testículo maduro que en el testículo inmaduro (fig. 46). El proceso de espermiogénesis se da exclusivamente en el testículo maduro.

La distribución del  $^3\text{H}$ -acetato incorporado a las formas de acetilación de la histona H4 de núcleos de testículo maduro, separados en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unidad indica también que la incorporación de  $^3\text{H}$ -acetato aumenta a medida que progresa la espermatogénesis (fig. 47 y 48). La incorporación de  $^3\text{H}$ -acetato a las formas tri y tertaacetiladas aumenta a medida que progresa la espermatogénesis, y son máximos en la fracción de núcleos correspondiente a las espermátidas alargadas (IV), en donde tiene lugar la transición nucleohistona-nucleoprotamina. Las fracciones nucleares "I" y "II", activas en replicación del ADN, presentan unos niveles muy marcados de diacetilación.

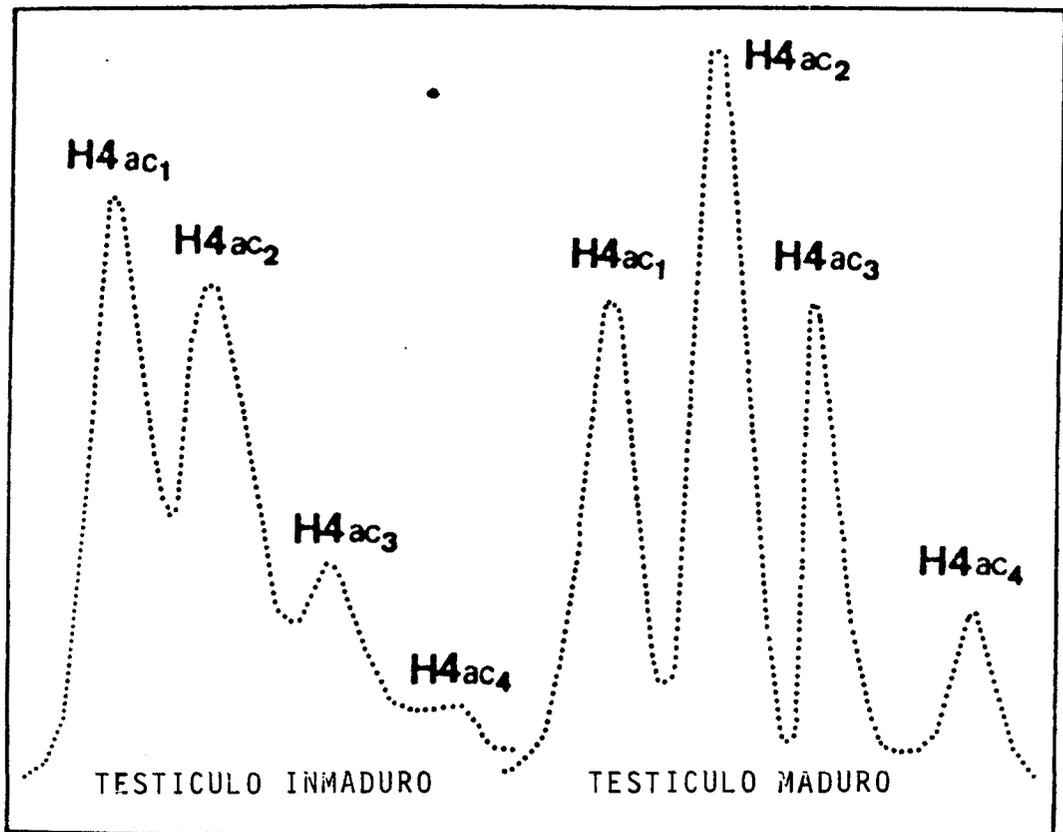


Fig 46.

Distribución del  $^3\text{H}$ -acetato incorporado a las formas de acetilación de la histona H4 de testículo inmaduro y de testículo maduro.

El tejido testicular se troceó finamente e incubó en presencia de 0.2 mCi de  $^3\text{H}$ -acetato (para 2 g de tejido) en un volumen final de 20 ml de MEM durante 1 hora a 37°C. Se añadió butirato a la concentración final 50 mM y se prepararon nucleos mediante ultracentrifugación en sacarosa 2M (pag. 83). Las histonas fueron extraídas con 0.4 N  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , precipitadas con 6 vol. de etanol, dializadas frente ácido acético 0.1 M, liofilizadas, analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea (pag. 100) y los geles procesados para fluorografía (pag. 104).

Nótese que la incorporación de  $^3\text{H}$ -acetato a las formas di, tri y tetraacetiladas de la H4, es superior en el testículo maduro, en donde tiene lugar el proceso de espermiogénesis.