

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) 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) 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) 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

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

R. 194.259

FACULTAD DE MEDICINA

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

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor
en Medicina y Cirugia por RAFAEL OLIVA VIRGILI,
Licenciado en Medicina y Cirugia.

El trabajo se ha realizado en el Departamento de
Fisiologia y Bioquimica, Facultad de Medicina, Universidad
de Barcelona, bajo la direcci3n del Profesor
CRISTOBAL MEZQUITA PLA.



V.P.



Rafael Oliva Virgili

Profesor Crist3bal Mezquita Pla

Barcelona 15 de Mayo de 1986

LAS CIENCIAS APLICADAS NO EXISTEN,
SOLO LAS APLICACIONES DE LA CIENCIA.

Louis Pasteur (1822-1895)

A mis PADRES
A José
A Isabel, mi esposa.

AGRADECIMIENTOS:

- MUY ESPECIALES:

- Al profesor Dr. Cristóbal Mezquita Pla, inspirador, director y crítico de esta tesis. Por su empeño, tenacidad y dedicación para conseguir formarme en el campo científico. Por haber sabido mantener en mí una fuerte motivación hacia la experimentación y trabajo científico, y por el constante interés, entusiasmo y apoyo que en todo momento me ha brindado.

- A la Dra. Jovita Mezquita Pla por su enorme interés y empeño en transmitirme todos los conocimientos del campo de la clonación, secuenciación y expresión génicas. Por su plena y desinteresada dedicación en todas las fases de clonaje secuenciación y expresión del gen de la protamina galina, y por haber sido una excelente compañera.

- Al Profesor Dr. José Carreras Barnés, al Dr. F. Climent y al Dr. J. Domingo por haber conseguido que siendo estudiante, la Bioquímica y la Biología Celular se convirtieran para mí en campos fascinantes y motivadores.

- A todos los compañeros del laboratorio de Fisiología del núcleo celular: M. Chiva, N. Rocamora, M. Pau, M. Reixach, J. Bernal, V. Ustrell, J. Boix, N. Agell, M. Corominas, J. Roca y J. Oristrell, porque de alguna forma han contribuido a la realización de esta tesis.

- A los miembros del departamento de Bioquímica, R. Bartrons, M. Carreras, A. Bassols, M. Ballarich, J. Gil, B. Pons, A. Taulé, J. Castellá, R. Cussó, N. Mahy, por su efectivo apoyo.

- A V. Stiefel y S. Prat por su valiosa ayuda en las etapas de selección de PolyA⁺ mRNA y por su constante disposición a colaborar y animar en el terreno experimental y moral.

- Al Profesor G.H. Dixon, R.J. Winkfein, P. Wiersma, S. Kra-
wetz, D. Lee, W. Connor y J. Wright del Departamento de Bio-
química Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad
de Calgary, Canadá, en donde se realizó parte del trabajo
presentado en esta tesis.

ABREVIACIONES:

ODC: Ornitin descarboxilasa (EC 4.1.1.17)

SAM-DC: S-adenosilmetionina descarboxilasa (EC 4.1.1.50)

SPM: Espermina

SPD: Espermidina

PUT: Putrescina

S1: Sobrenadante 1

S2: Sobrenadante 2

INDICE DE CONTENIDOS

<u>1.-INTRODUCCION</u>	Pag.
<u>1.1.- LA ESPERMATOGENESIS</u>	2
<u>1.2.- LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA</u>	8
1.2.1.- La nucleohistona; estructura típica de la cromatina eucariota	8
-COMPOSICION	8
-ESTRUCTURA	10
1.2.2.- La nucleoprotamina; estructura típica del núcleo del espermatozoide	17
-COMPOSICION	17
-ESTRUCTURA	20
1.2.3.- Factores que pueden modular la estructura de la cromatina	25
1.2.3.1.- Modificaciones químicas de las histonas	25
1.2.3.2.- Policationes y polianiones	28
1.2.3.2.1.- Protaminas	28
1.2.3.2.2.- Poliaminas	28
-Química	30
-Biosíntesis e interconversión	30
-Correlación con procesos celulares	36
-Mecanismos moleculares ...	41
1.2.3.2.3.- Polianiones	49
1.2.3.3.- Topología y modificaciones químicas del ADN	50
1.2.3.4.- Presencia de proteínas no histonas	51
1.2.4.- La transición nucleohistona-nucleoprotamina "in vivo" e "in vitro"	54
<u>1.3.- ESTRUCTURA, EVOLUCION, SECUENCIA Y EXPRESION DE LOS GENES DE PROTAMINAS</u>	59

2.- METODOLOGIA

	Pag.
<u>2.1.- PROTEINAS NUCLEARES Y ESTRUCTURA DE LA CROMATINA</u> ..	74
2.1.1.- Suspensiones celulares y nucleares	74
2.1.1.1.- Suspensiones celulares	74
-Preparación	74
-Separación	75
2.1.1.2.- Suspensiones nucleares	83
-Preparación	83
-Separación	88
2.1.2.- Proteinas nucleares	89
2.1.2.1.- Acetilación de las histonas	89
-"Steady state"	89
-Marcaje de acetilación	90
-Actividad específica de acetilación .	92
-Recambio de acetilación	92
2.1.2.2.- Extracción y purificación de proteinas nucleares	93
-Extracción con HCl	93
-Extracción con SO ₄ H ₂	94
2.1.2.3.- Electroforesis de proteinas	95
2.1.2.3.1.- Construcción de equipos de electroforesis	95
2.1.2.3.2.- Electroforesis en gel de acrilamida-SDS	98
-Acrilamida 18%	98
-Con gradiente	99
2.1.2.3.3.- Electroforesis en gel ácido ..	100
-Acrilamida-urea	100
-Acrilamida-tritón-urea	101
2.1.2.3.4.- Electroforesis bidimensional .	102
2.1.2.3.5.- Fijación, tinción, secado y cuantificación de los geles .	103
2.1.2.3.6.- Fluorografías	104
2.1.3.- Nucleosomas	105
2.1.3.1.- Obtención de partículas nucleosómicas	105
2.1.3.2.- Electroforesis preparativa de nucleosomas	106
2.1.3.3.- Tamaño del ADN resultante de las digestiones con nucleasa	106
2.1.3.4.- Desplazamiento por protaminas	107

	Pag.
2.1.4.- Poliaminas	109
2.1.4.1.- Extracción y cuantificación	109
2.1.4.2.- Actividad ornitín descarboxilasa	110
2.1.4.3.- Actividad S-adenosilmetionina descarboxilasa	110
2.1.5.- Métodos analíticos	111
2.1.5.1.- Determinación de proteína	111
2.1.5.2.- Determinación de ADN	111
2.1.5.3.- Determinación de argininas	113
<u>2.2.- ACIDOS NUCLEICOS</u>	114
2.2.1.- ARN	114
2.2.1.1.- Aislamiento	114
2.2.1.2.- Purificación	116
2.2.1.3.- Electroforesis	117
-Geles de Formaldehído-Agarosa ..	117
-Geles de metilmercurio-agarosa .	118
2.2.1.4.- "Northern blots"	119
2.2.2.- ADN	121
2.2.2.1.- Preparación de cDNA	121
2.2.2.2.- Clonaje	123
-Metilación de sitios de restricción EcoRI	123
-"End repair"	123
-Adición de "linkers"	123
-Digestión con EcoRI	123
-Separación de linkers del cDNA ..	124
-Ligación al vector	125
-Preparación de células competentes .	125
-Transformación con M13	126
-Transformación con PBR 322	127
-Minipreparaciones de ADN	127
2.2.2.3.- Preparación de sondas y filtros. .	128
-Sondas	128
-Filtros	130
-Hibridaciones: "Norther blot"	131
"Southern blot" ...	131
"Dot blot"	131

	Pag.
2.2.2.4.- Secuenciación	134
- Método de Sanger	134
-"Maxam and Gilbert"	137
2.2.2.5.- Electroforesis de ADN	141
- Geles para secuenciación	141
- Geles de TAE-Agarosa (no desnaturalizantes)	142
- Geles alcalinos para ADN (desnaturalizantes)	142
- Geles de Agarosa de baja tempera- tura de fusión	143
2.2.2.6.-"Southern blot"	144
2.2.2.7.- Procesos rutinarios	144
- Extracción fenólica	144
- Precipitación y lavado etanólico	144

3.- RESULTADOS

3.1.- LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA

<u>IN VIVO</u>	146
3.1.1.- Separación de células testiculares y cronología del incremento de protami- na y disminución de las histonas en la espermatogénesis	146
3.1.2.- Contenido celular y biosíntesis de po- liaminas durante la espermatogénesis ..	158
3.1.3.- Acetilación de las histonas durante la espermatogénesis	166
3.1.3.1.-"Steady State" de acetilación ..	166
3.1.3.2.- Incorporación de ³ H-Acetato ..	172
3.1.3.3.- Actividad específica de ace- tilación	179
3.1.3.4.- Recambio de grupos acetato ...	184
3.1.3.5.- Actividad desacetilasa	185
3.1.3.6.- Actividad histona acetiltrans- ferasa	186
3.1.3.7.- Control de la acetilación de las histonas por fosforila- ción-desfosforilación	186

	Pag.
3.2.- <u>LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA</u>	
<u>"IN VITRO"</u>	190
3.2.1.- Preparación de distintas poblaciones de nucleosomas	190
3.2.2.- Marcadas diferencias en la capacidad de distintas protaminas en el desen- samblaje de histonas de nucleosomas	194
3.2.3.- Efecto de acetilación de las histonas ..	201
3.2.4.- Efecto de las poliaminas	204
3.2.5.- Efecto de la SPM sobre el desensambla- je por protaminas	204
3.2.6.- Dependencia del tiempo	204
3.2.7.- Desensamblaje de histonas utilizando núcleos	208
3.2.8.- Extracción preferente de histonas H2A y H2B	215
3.2.9.- Unión de protaminas al ADN	215
3.3.- <u>CLONAJE, SECUENCIA Y EXPRESION DEL GEN DE LA</u>	
<u>PROTAMINA GALINA</u>	219
3.3.1.- Extrategia seguida	219
3.3.2.- Aislamiento del RNA y selección del poly A ⁺ mRNA	220
3.3.3.- Síntesis del cDNA, adición de "Lin- kers" y clonaje en H ₁₃	224
3.3.4.- Secuencias obtenidas y su identifica- ción	230
3.3.5.- Búsqueda de otros clones de la prota- mina	235
3.3.6.- Resumen secuencias obtenidas de la protamina gallina por "Sanger"	239
3.3.7.- Secuenciación por "Maxam y Gilbert"	242
3.3.8.- Estudio de la expresión del gen de la protamina gallina a lo largo de la es- permatogénesis.	247

4.- DISCUSION

	Pag.
<u>4.1.- LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA</u>	
<u>"IN VIVO"</u>	252
4.1.1.- Separación de células a gravedad unidad y cronología del incremento de Pro tamina y disminución de las Histonas ...	252
4.1.2.- Contenido celular y biosíntesis de po liaminas durante la espermatogénesis del gallo	260
4.1.3.- Hiperacetilación de las histonas coin cidiendo con la transición nucleohisto na-nucleoprotamina	266
<u>4.2.- DESENSAMBLAJE DEL NUCLEOSOMA IN VITRO:</u>	
La protamina gallina puede jugar un papel direc to en el desensamblaje de los nucleosomas que tiene lugar en la transición Nucleohistona-Nucleo protamina	269
<u>4.3.- SECUENCIA Y EXPRESION DEL GEN DE LA PROTAMINA</u>	
<u>GALLINA</u>	273

5.- CONCLUSIONES

6.- BIBLIOGRAFIA

INDICE DE FIGURAS

FIG. N°	pag.
1.- La espermatogénesis.....	3
2.- Estructura de la célula de sertoli y células germinales.....	5
3.- ADN e histonas.....	9
4.- Del octámero al nucleosoma.....	12
5.- Modelo de nucleosoma.....	13
6.- Estructura del nucleosoma metafásico.....	15
7.- Secuencias de protamina.....	19
8.- Estructura de la nucleoprotamina.....	23
9.- Modificaciones químicas de las histonas.....	26
10.- Químicas de las poliaminas.....	29
11.- Biosíntesis de poliaminas.....	31
12.- Exposición de sitios en la transición Nucleohistona-Nucleoprotamina.....	55
13.- Codones de los aminoácidos de las protaminas.....	62
14.- Distribución de las protaminas en la escala evolutiva.....	66
15.- Secuencia de distintas protaminas.....	67
16.- Divergencia en la secuencia de nucleótidos de las protaminas.....	69
17.- Separación de células a gravedad unidad.....	79
18.- Separación de células a gravedad unidad.....	82
19.- Equipo de electroforesis diseñado.....	96
20.- Equipo de electroforesis diseñado.....	97
21.- Equipo diseñado para electroforesis preparativa de nucleosomas.....	107
22.- Preparación de sondas con clones de M13.....	129
23.- Secuenciación por el método de Sanger.....	135
24.- Secuenciación por el método de Maxam and Gilbert..	138
25.- Preparación de suspensiones celulares.....	147
26.- Separación de células testiculares.....	148
27.- Separación de células testiculares.....	149
28.- Velocidad de sedimentación en función del tamaño de células testiculares.....	150
29.- Poblaciones de espermátidas alargadas.....	151
30.- Incorporación de ³ H-Timidina.....	152
31.- Aumento de protamina y disminución de las histonas en la espermatogénesis.....	153

	pag
32.- Aumento de protamina y disminución de la histonas en la espermatogénesis.....	154
33.- Variaciones de las histonas en la espermatogénesis.....	155
34.- Variaciones electroforéticas en la zona de la protamina galina en la espermatogénesis.....	157
35.- Cromatografía en capa fina de poliaminas.....	159
36.- Contenido celular o biosíntesis de poliaminas en la espermatogénesis.....	160
37.- Incorporación de ¹⁴ C- Putrescina a células testiculares.....	162
38.- Cinética de la ornitin descarboxilasa.....	163
39.- Efecto del vanádato sobre la actividad ornitin descarboxilasa "in vitro".....	164
40.- La espermina estimula la poli ADP-Ribosilación.....	165
41.- "Steady State" de la acetilación de la histona H4.....	167
42.- "Steady State" de la acetilación de la histona H4.....	168
43.- "Steady State" de acetilación de la histona H4.....	169
44.- Electroforesis bidimensional de las proteínas nucleares en distintas fases de la espermatogénesis.....	170
45.- "Steady State" de la histona H4 determinado por electroforesis bidimensional.....	171
46.- Distribución del ³ H-acetato incorporado a las histonas del testículo maduro y del testículo inmaduro.....	173
47.- Distribución del ³ H-acetato incorporado a las histonas.....	174
48.- Distribución del ³ H-acetato incorporado a las histonas.....	175
49.- Distribución del ³ H-acetato incorporado a las histonas.....	176
50.- Distribución del ³ H-acetato incorporado a las histonas.....	177

	pag
51.- Distribución del ³ H-acetato determinado por electroforesis bidimensional.....	178
52.- Actividad específica de acetilación.....	180
53.- Actividad específica de acetilación.....	181
54.- Actividad específica de acetilación.....	182
55.- Actividad específica de acetilación.....	183
56.- Recambio de grupos ³ H-acetato.....	185
57.- Actividad histona-acetiltransferasa.....	187
58.- Efecto de la fosfatasa alcalina y de la espermina sobre la actividad histona-acetiltransferasa.....	188
59.- Efecto del pirofosfato sobre sobre la acetilación de la cromatina "in vitro".....	189
60.- Digestiones con nucleasa micrococal.....	191
61.- Electroforesis analítica de nucleosomas.....	192
62.- Electroforésis preparativa de nucleosomas.....	193
63.- Estandarización de las disoluciones de protaminas.....	195
64.- Patrón electroforético de la galina y de la salmina.....	196
65.- Patrón electroforético sobrecargado de la galina y de la salmina.....	197
66.- Extracción de las histonas de nucleosomas por la salmina.....	198
67.- Extracción de las histonas de nucleosomas por la galina.....	199
68.- Desensamblaje de nucleosomas por protaminas.....	200
69.- Desensamblaje de nucleosomas por protaminas.....	202
70.- Desensamblaje de nucleosomas por protaminas.....	203
71.- Efecto de la espermina sobre partículas nucleosómicas "in vitro".....	205
72.- Efecto de la espermina sobre el desensamblaje de partículas nucleosómicas "in vitro" por la salmina.....	206
73.- Efecto del tiempo en el desensamblaje de nucleosomas.....	207
74.- Extracción de las histonas de núcleos por la protamina galina.....	209

	pag
75.- Extracción de las histonas de núcleos por protaminas.....	210
76.- Extracción de las histonas H1 y H5 de núcleos por la protamina galina.....	211
77.- Extracción de las histonas H1 y H5 de núcleos por protaminas.....	212
78.- Extracción de las histonas H1 y H5 de núcleos por protaminas.....	213
79.- Desensamblaje de las histonas de núcleos por protaminas.....	214
80.- Desensamblaje preferente de las histonas H2A y H2B por protaminas.....	216
81.- Unión de la protamina galina al ADN.....	217
82.- Unión de la protamina salmón al ADN.....	218
83.- Suspensión enriquecida en espermátidas.....	221
84.- Preparación del ARN.....	222
85.- Selección del ARN mensajero.....	223
86.- Síntesis del cDNA.....	225
87.- Adición de "Linkers EcoRI".....	226
88.- Separación de los "Linkers" libres de cDNA.....	227
89.- Ligaciones y transfecciones.....	229
90.- Preparación de sondas.....	236
91.- "Screening" de clones.....	237
92.- "Screening" de clones.....	238
93.- Secuencias del cDNA de la protamina galina obtenidas por el método de Sanger.....	240
94.- Secuencias del cDNA de la protamina galina obtenidas por el método de Sanger.....	241
95.- Determinación del tamaño de distintos "inserts"....	242
96.- Estrategia seguida para la secuenciación por el método de Maxam and Gilbert.....	244
97.- Estrategia seguida para la secuenciación por el método de Maxam and Gilbert.....	245
98.- Composición de testículos de gallo en distintas fases del desarrollo.....	248
99.- "Northern Blot"	
100.- "Northern Blot" de ARN procedente de testículos de gallo en distintas fases del desarrollo.....	250

INTRODUCCIÓN

1.1.-LA ESPERMATOGÉNESIS

El interés en el estudio de la espermatogénesis reside en el conocimiento de este proceso de diferenciación celular, y especialmente en que nos ofrece modelos únicos para investigar los mecanismos que gobiernan los cambios de actividad génica y de estructura de la cromatina en los eucariotas.

Este trabajo se centra fundamentalmente en los cambios que tienen lugar en la composición y estructura de la cromatina durante el proceso de espermiogénesis y en el estudio de un gen específico de este modelo, el de la protamina galina.

Durante la espermatogénesis, las espermatogonias diploides (células madre de la línea germinal) se dividen y diferencian para dar lugar a espermátocitos primarios tetraploides. Los espermátocitos primarios, tras dos ciclos meióticos darán lugar a espermátidas redondas haploides. Finalmente, la espermátida redonda experimentará un proceso de metamorfosis para dar lugar al espermatozoide (Mezquita, 1985)(Fig.1).

Durante la espermiogénesis la estructura nucleosómica típica del ADN de las células somáticas, resulta desensamblada y reemplazada por un compacto complejo nucleoprotamina (Mezquita and Teng, 1977)(Fig.1). Esta transición nucleohistona-nucleoprotamina tal vez nos muestre los cambios más marcados que se observan en la estructura de la cromatina eucariota. Nos ofrece pues un excelente modelo para el estudio de los mecanismos que controlan la estructura de la cromatina y el desensamblaje de los nucleosomas.

Las estrategias que pueden utilizarse para estudiar los cambios de composición y estructura de la cromatina durante este proceso de espermatogénesis son las siguientes:

a) Analizar la composición de la cromatina de testículos en distintas fases de desarrollo y correlacionarla con su composición celular. De esta forma pueden hallarse paralelismos entre la aparición o desaparición de tipos celulares concretos y la aparición o desaparición de proteínas, ácidos nucleicos o de cambios estructurales o funcionales en el núcleo celular.

ESPERMATOGENESIS

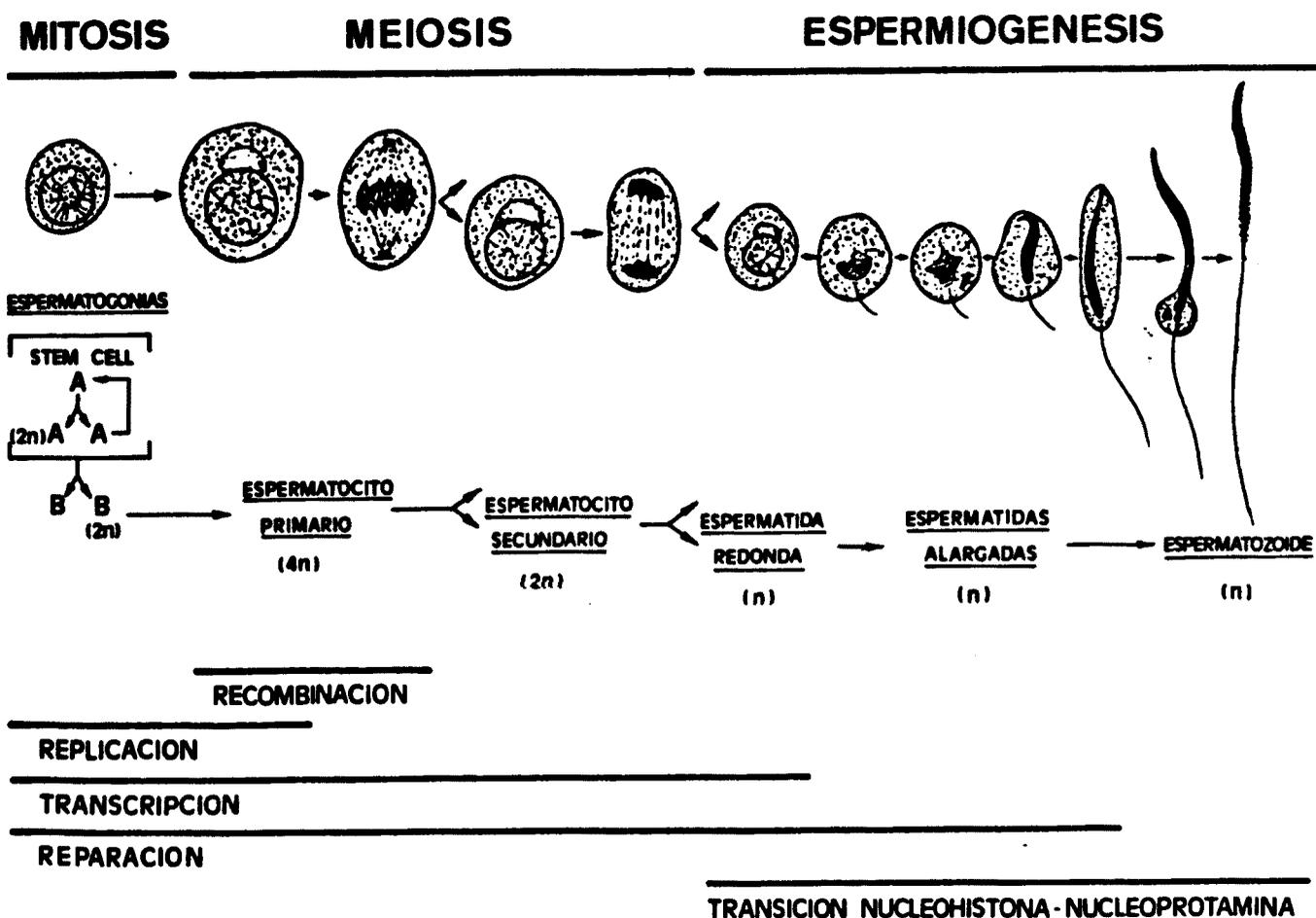


Figura 1.

Estadios de la espermatogénesis y su correlación con los cambios de actividad génica y de estructura de la cromatina. El contenido de la Fig.1, se ha obtenido con modificaciones de Zlotnik (1947), Mezquita (1985) y Louie and Dixon (1972).

b) Comparar la composición de la cromatina del testículo con la cromatina de otros órganos del mismo animal.

c) Separar las distintas células componentes del testículo maduro y analizar la composición de su cromatina.

d) Separar los distintos núcleos celulares del testículo adulto y analizar su composición.

e) Fraccionar la cromatina global de testículo para obtener distintas fracciones de cromatina correspondientes a estadios distintos de la espermatogénesis.

f) Bloquear con inhibidores específicos ciertos pasos que se consideren esenciales para este proceso de diferenciación y observar como resulta bloqueada la espermiogénesis.

g) Conseguir cultivos de células germinales que permitan sincronizar las distintas células en diferenciación y analizar su composición.

h) Estudios inmunocitoquímicos, de localización de genes específicos por hibridación con sondas sobre cortes testiculares y en general mediante técnicas histológicas.

i) experimentos "in vitro" de ensamblaje y desensamblaje de nucleosomas.

j) Experimentos "in vitro" de inducción de la transcripción de genes específicos.

De las distintas metodologías, las que hemos utilizado más habitualmente son las que se basan en obtener distintas poblaciones de células o núcleos y analizar su composición y estructura.

La espermatogénesis de algunas especies se da de una forma sincrónica, hallándose distintas poblaciones celulares en distintas regiones del testículo, lo que facilita los procesos de análisis. Este no es el caso del gallo, en donde los distintos componentes celulares de la línea germinal se hallan combinados más o menos uniformemente en todo el tejido testicular (Fig. 2 y 25).

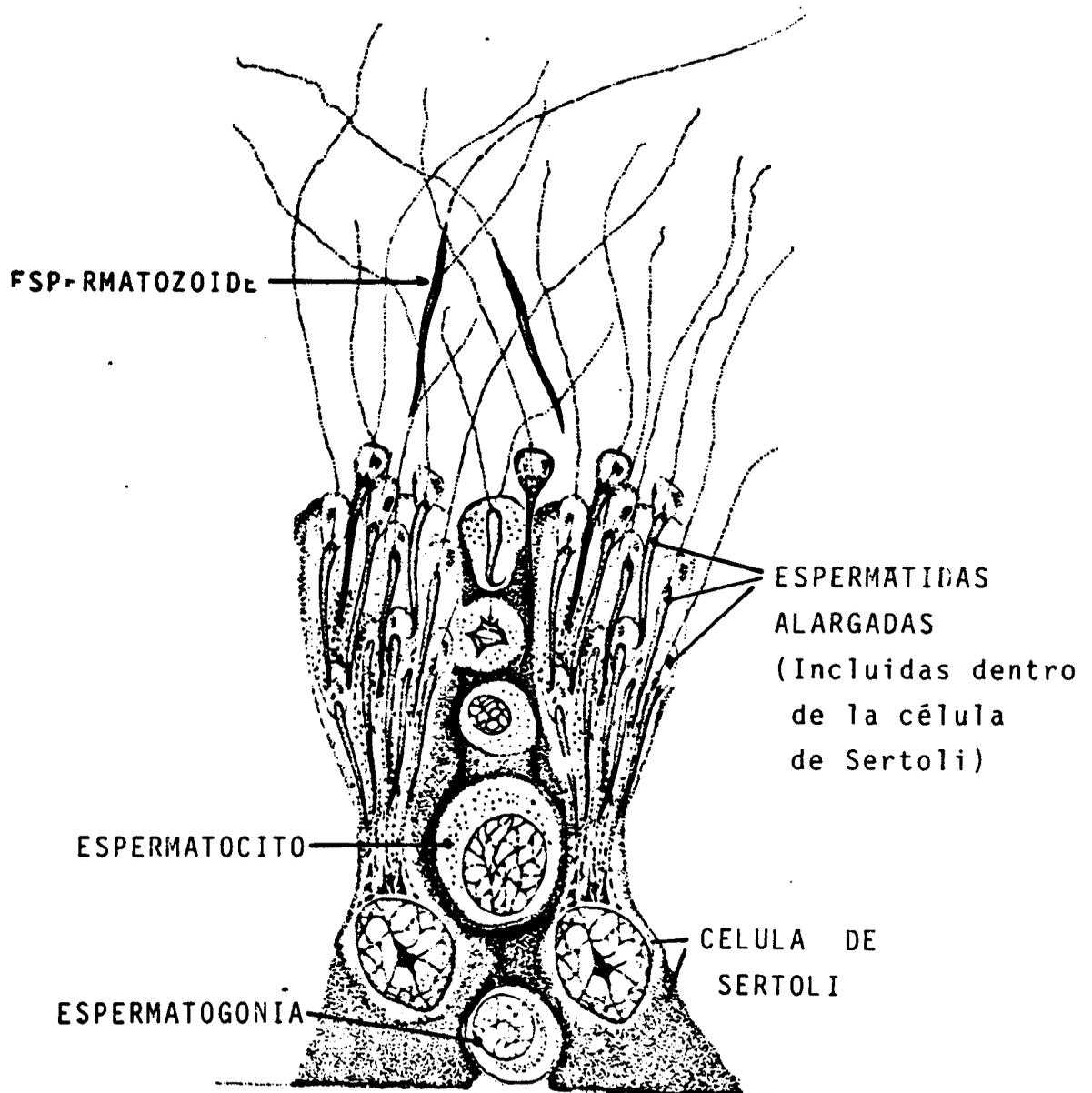


Figura 2.

Esquema de la estructuración de las distintas células que componen el testículo de gallo. Obtenido con modificaciones de Mezquita (1985).

Dada esta mezcla de elementos celulares dentro del testículo del gallo, resulta esencial disponer de una metodología adecuada que permita obtener suspensiones celulares o nucleares y su separación en sus diversos tipos celulares o nucleares. La preparación y separación de suspensiones nucleares a partir de testículos de gallo fue estandarizada por C.Mezquita y C.S.Teng (1977a) y permite la obtención rápida y eficaz de 4 tipos de poblaciones de núcleos de una pureza muy adecuada para los estudios moleculares:

- I.: Compuesta por núcleos de espermátocitos primarios.
- II.: Núcleos de espermátocitos primarios, secundarios y de espermátogonias.
- III.: Núcleos de espermátidas redondas y de espermátidas en elongación.
- IV.- Núcleos de espermátidas alargadas y de espermátoides testiculares.

A partir del semen del conducto deferente del animal, puede prepararse además una Vª población compuesta esencialmente en un 100% de núcleos de espermátoides del deferente.

Estas fracciones representan de algún modo las distintas fases de la espermatogénesis. Tiene no obstante el inconveniente de que no permite obtener poblaciones de núcleos correspondientes a espermátidas alargadas en distintas fases de elongación, ni tampoco permite discriminar entre núcleos de espermátidas alargadas y núcleos de espermátoides testiculares,

Dado que durante la espermiogénesis las células experimentan una reducción progresiva de su volumen celular(fig 1), una forma de poder discriminar entre estas últimas fases de la espermatogénesis consistiría en la separación de sus células en función de su volumen celular.

La preparación y separación de suspensiones celulares a partir de testículo de gallo, todavía no se había realizado. Uno de los objetivos de esta tesis ha consistido precisamente en desarrollar una metodología adecuada que permitiera la obtención de suspensiones de células y su separación en las distintas fases de la espermiogénesis.

El método utilizado consiste en la obtención de poblaciones celulares testiculares (Meistrich, 1977) y la separación de sus distintos tipos de células en base a su volumen utilizando el método de sedimentación a gravedad unidad (Mezquita and Teng, 1977a).

El principio físico de este tipo de separación de células (o núcleos) se basa en la ley de Stokes (Sanderson and Bird, 1977):

$$S = \frac{(e_c - e_o) v^{2/3} g}{n f}$$

S = Velocidad de sedimentación de las células respecto al fluido.

$e_c - e_o$ = Densidades de las células y del fluido respectivamente.

V = Volumen de la célula.

g = Aceleración de la gravedad.

n = Viscosidad del fluido.

f = Coeficiente friccional.

Existen además otros métodos que permiten la separación de distintas poblaciones celulares (algunos basados en la misma ley de Stokes) tales como la elutriación, la centrifugación en gradientes de densidad y la citofluorimetría. El método de separación de células a gravedad unidad estandarizado para el testículo de gallo, se complementa con los otros métodos de separación de núcleos o células y presenta ventajas e inconvenientes respecto a éstos (Ver discusión, pag. 252).

1.2.- LA TRANSICION NUCLEOHISTONA - NUCLEOPROTAMINA.

La composición y estructura nuclear de la espermátida redonda (célula que inicia el proceso de espermiogénesis) posee todas las características básicas de cualquier célula somática: Núcleo redondo, ADN organizado en nucleosomas por las histonas H2A, H2B, H3, H4 y H1 y es transcripcionalmente activa.

Tan pronto se inicia el proceso de espermiogénesis, cesa la transcripción y el contenido de proteínas nucleares decae. En el espermatozoide, el núcleo ha reducido 12 veces su volumen y la cromatina se halla altamente compactada por la única proteína nuclear mayoritaria detectable: la protamina galina.

1.2.1.- La Nucleohistona; Estructura típica de la cromatina Eucariota.

COMPOSICION:

Los componentes mayoritarios del núcleo eucariota son el ADN y las histonas, en una proporción aproximada w/w de 1/1 .

El ADN es un polímero formado por 4 nucleótidos distintos, complementarios dos a dos, combinados irregularmente (aunque no al azar), en cuya secuencia se halla almacenada la información genética (Watson and Crick, 1953).

Las histonas son proteínas básicas de tamaños que oscilan entre 102 y 225 aminoácidos y de los que se conocen fundamentalmente 5 tipos: H4, H3, H2A, H2B y H1. Son las proteínas más conservadas en la evolución que se conocen (entre la H4 humana y la del guisante varía tan solo 1 aminoácido). El orden desde la más conservada hasta la menos conservada es H4 > H3 >> H2A > H2B >> H1 (Isenberg, 1979). En la figura 3 se muestra la estructura básica del ADN y las histonas.

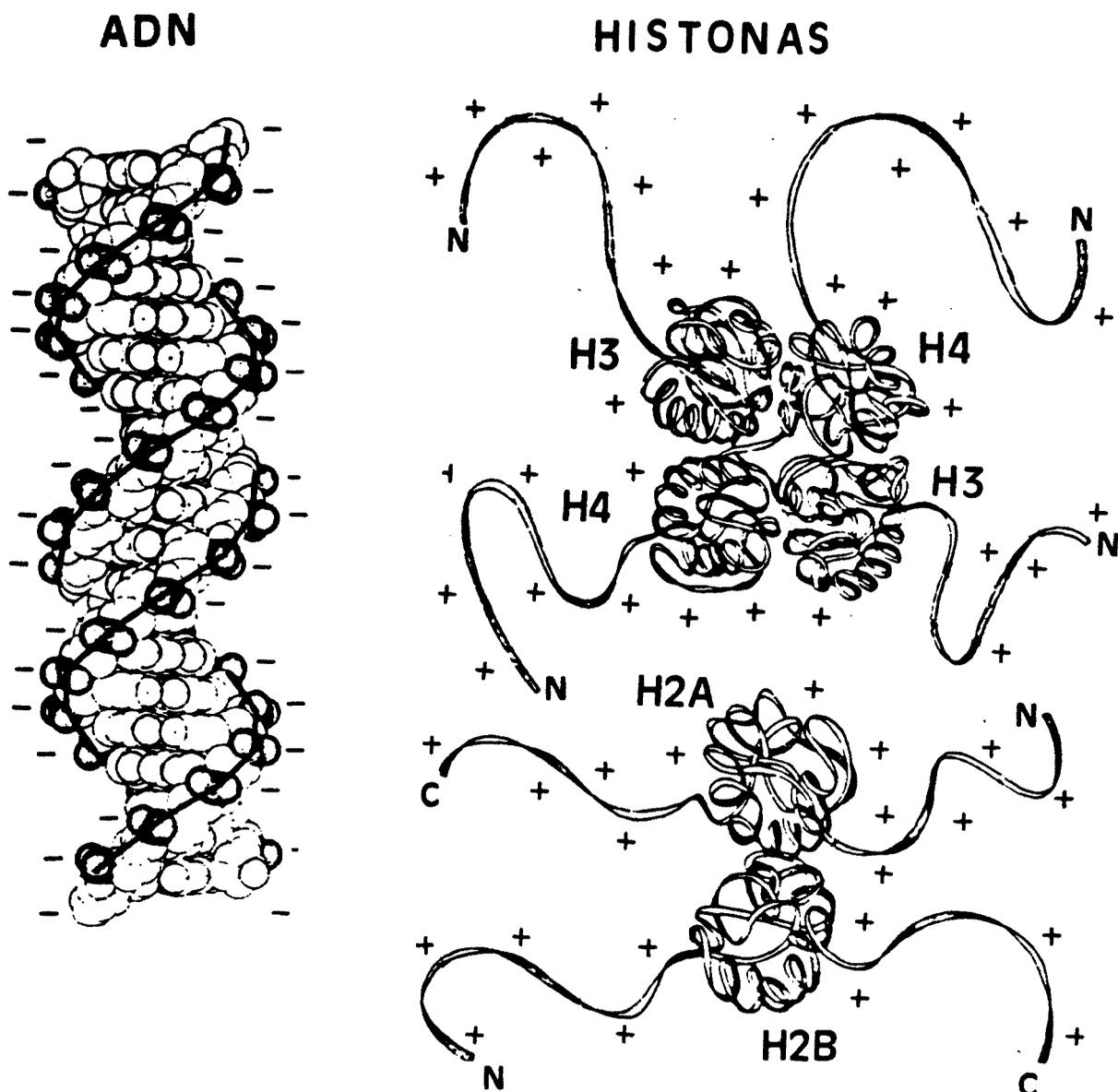


Fig 3.

Estructura básica del ADN y de las histonas. (ADN e histonas se han representado a escalas distintas).

En el ADN los grupos fosfato, cargados negativamente, se han representado en color oscuro.

Las histonas H3 y H4 se han representado formando un tetrámero, y las histonas H2A y H2B formando un dímero. Las regiones globulares de las histonas corresponden a las zonas hidrofóbicas de la cadena polipeptídica, mientras que los extremos N-terminales (y C-terminales) cargados positivamente se extienden en forma de brazos. En la histona H1, ambos extremos, C-terminal y N-terminal poseen una carga neta positiva (no representada).

ESTRUCTURA DE LA NUCLEOHISTONA:

La primera evidencia de que la cromatina eucariota poseía cierto grado de organización provino de estudios de difracción de RX cuando se mostró que con esta técnica se detectaba una periodicidad de unos 100 Å en la nucleohistona (Luzzate and Nicolaieff, 1963; Pardon et al., 1967).

En 1971, Crick et al. reconstituyen el diagrama de difracción de RX de 100 Å de periodicidad al mezclar histonas totales y ADN, pero no si se mezclaban histonas individuales con el ADN. Estos resultados indicaban que todas las histonas debían participar a la vez en la generación de la unidad repetitiva.

Independientemente de los estudios de difracción de RX, en 1973 Hewish y Burgoyne mostraron que al digerir cromatina con una nucleasa de hígado de rata, se generaban fragmentos que analizados por electroforesis se mostraba que eran múltiplos de una unidad básica.

La sugerencia de que las histonas H3 y H4 se asociaban formando un dímero se obtuvo al observar que al separar una mezcla de histonas por gel filtración, la histona H1 se eluía igual que la H3 y la H4, aún cuando el tamaño de estas era de aproximadamente la mitad del de la H1 (Westhuzen and von Holt, 1971). La prueba definitiva de que las histonas H3 y H4 se asociaban formando un tetrámero se obtuvo al conseguir entrecruzar químicamente a las histonas en disolución (Kornberg and Thomas, 1974).

Todo este conjunto de resultados permitía adelantar la hipótesis de que si el tetrámero 2(H3 H4) fuese la base del conjunto de unidades repetitivas de la cromatina, tocarían 2(H2A H2B) y 200 bp. de ADN por cada tetrámero 2(H3 H4). Una estructura así, justificaría además los resultados de Hewish y Burgoyne. La medición experimental del tamaño de los

fragmentos de ADN generados digiriendo cromatina con nucleasa, mostró que efectivamente eran múltiples de aproximadamente 200 bp. (Altenburger et al., 1976).

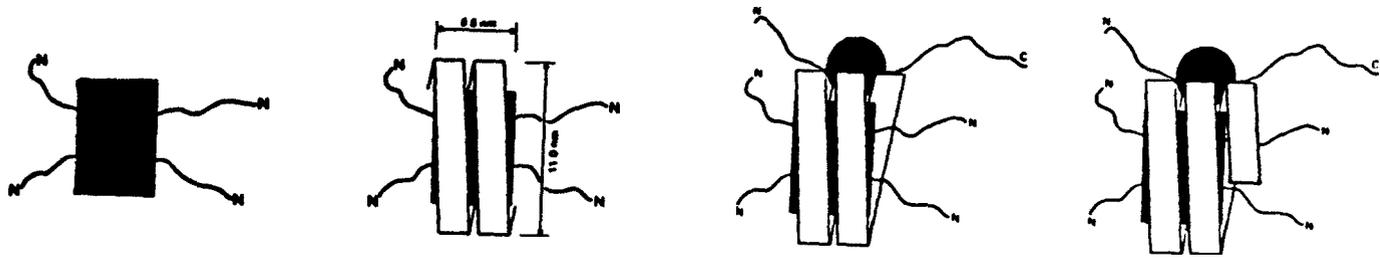
Por microscopía electrónica, los Olins (1974) mostraron que la cromatina poseía una estructura en "collar de perlas". La correlación entre los estudios bioquímicos y los de microscopía electrónica se obtuvo tras analizar a la vez, bioquímicamente y por microscopía electrónica, las distintas fracciones correspondientes a mono-oligonucleosomas obtenidas tras separar por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa el producto de la digestión de cromatina con nucleasa.

A esta partícula elemental observada por microscopía electrónica y por el análisis electroforético de las digestiones de cromatina con nucleasa se le denominó nucleosoma (Kornberg, 1977). La prueba definitiva de la relación existente entre el nucleosoma y las histonas la obtuvieron Thomas y Kornberg (1975a, b) al conseguir entrecruzar el octámero entero.

Quedaba por determinar cómo se disponía el ADN en el nucleosoma. Una prueba de que el ADN se disponía por fuera del nucleosoma se obtuvo al mostrar que la DNAsaI (que corta al ADN sólo si este se halla sobre un soporte sólido) generaba fragmentos múltiples de 10,4 nucleótidos (cada vuelta de hélice). La única forma en que se podrían generar estos fragmentos era si el ADN se disponía por fuera del octámero.

La prueba definitiva de que el ADN se disponía por fuera del octámero la obtuvo Suau et al. (1977) al demostrar por difracción de neutrones de partículas núcleo en disolución que el radio de giro del ADN era mucho mayor que el de la proteína.

En la fig 4 se muestra la estructura básica del nucleosoma y la nomenclatura de sus distintos componentes.



OCTAMERO

H2A-H2B
2(H4) - 2(H3)
H2A-H2B

PARTICULA NUCLEO

H2A-H2B
2(H4) - 2(H3)
H2A-H2B
+
146 bp. ADN

CROMATOSOMA

H2A-H2B
2(H4) - 2(H3)
H2A-H2B
+
166 bp. ADN
+
HISTONA H1

NUCLEOSOMA

H2A-H2B
2(H4) - 2(H3)
H2A-H2B
+
166 bp. ADN
+
HISTONA H1
+
ADN existente entre
2 cromatosomas vecinos
(0 - 80 bp.)

Fig 4.

Estructura básica del nucleosoma y nomenclatura de sus diversos componetes. (Obtenido con modificaciones de Bradbury et al., 1981).

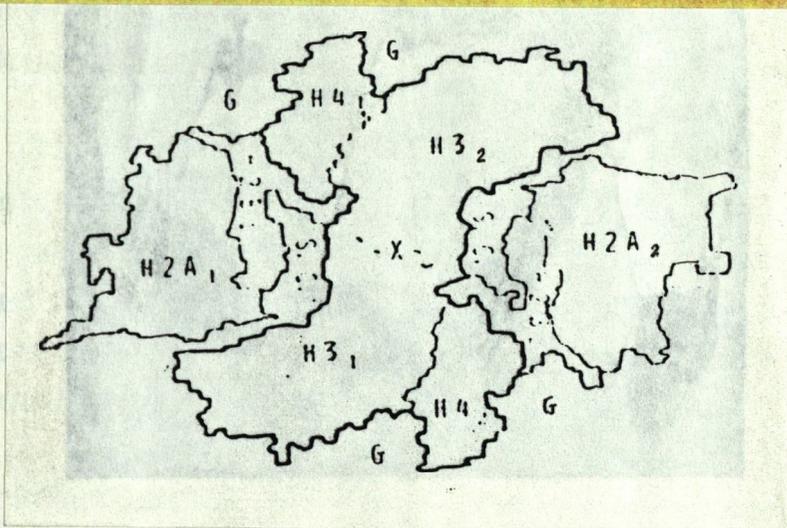


Fig 5.

Modelo del nucleosoma obtenido con una resolución de 3,3 Å (Burlingame et al., 1985).

En cuanto a la localización de la histona H1, una de las primeras indicaciones, provino de la observación de que al digerir exhaustivamente la cromatina con nucleasa micrococcal, se perdía esta histona. Esto indicaba que la histona H1 debía situarse en el linker (McGhee and Felsenfeld, 1980).

Al desarrollar la digestión exhaustiva de los nucleosomas se obtuvieron partículas elementales (partículas núcleo), todas ellas muy iguales, permitiendo la cristalización de la partícula núcleo. Los cristales obtenidos eran todos iguales independientemente del origen de los nucleosomas, lo que indicaba su universalidad. La cristalización de la partícula núcleo permitió su análisis por microscopía electrónica y difracción de RX, permitiendo ya un conocimiento muy preciso de su estructura y dimensiones (Finch et al., 1977; Klug et al., 1980; Richmond et al., 1984).

En la fig 5 se muestra un modelo de la partícula núcleo obtenido con una resolución de 3.3 Å.

El ADN de los eucariotas mide de centímetros a metros, y no obstante se halla en el interior de un núcleo de unos $25 \mu\text{m}^3$. La relación de empaquetamiento del cromosoma metafásico es de $1,2 \times 10^4$. ¿Cómo se consigue este empaquetamiento preservando al mismo tiempo un cierto orden en la cromatina?

La organización del ADN en nucleosomas consigue ya una relación de empaquetamiento de 6-7, generando lo que en microscopía electrónica se conoce como "estructura en collar de perlas" o fibra de 10 nm. Interviniendo la histona H1, esta fibra de 10 nm se repliega sobre si misma generando una fibra de 30 nm. En la fibra de 30nm se da ya una relación de empaquetamiento de 40. A su vez la fibra de 30nm se organiza en "loops" o asas unidas por sus extremos a la matriz nuclear, y el conjunto de asas formará el cromosoma metafásico con la relación de empaquetamiento de $1,2 \times 10^4$ (Pienta and Coffey, 1984) (fig. 6).

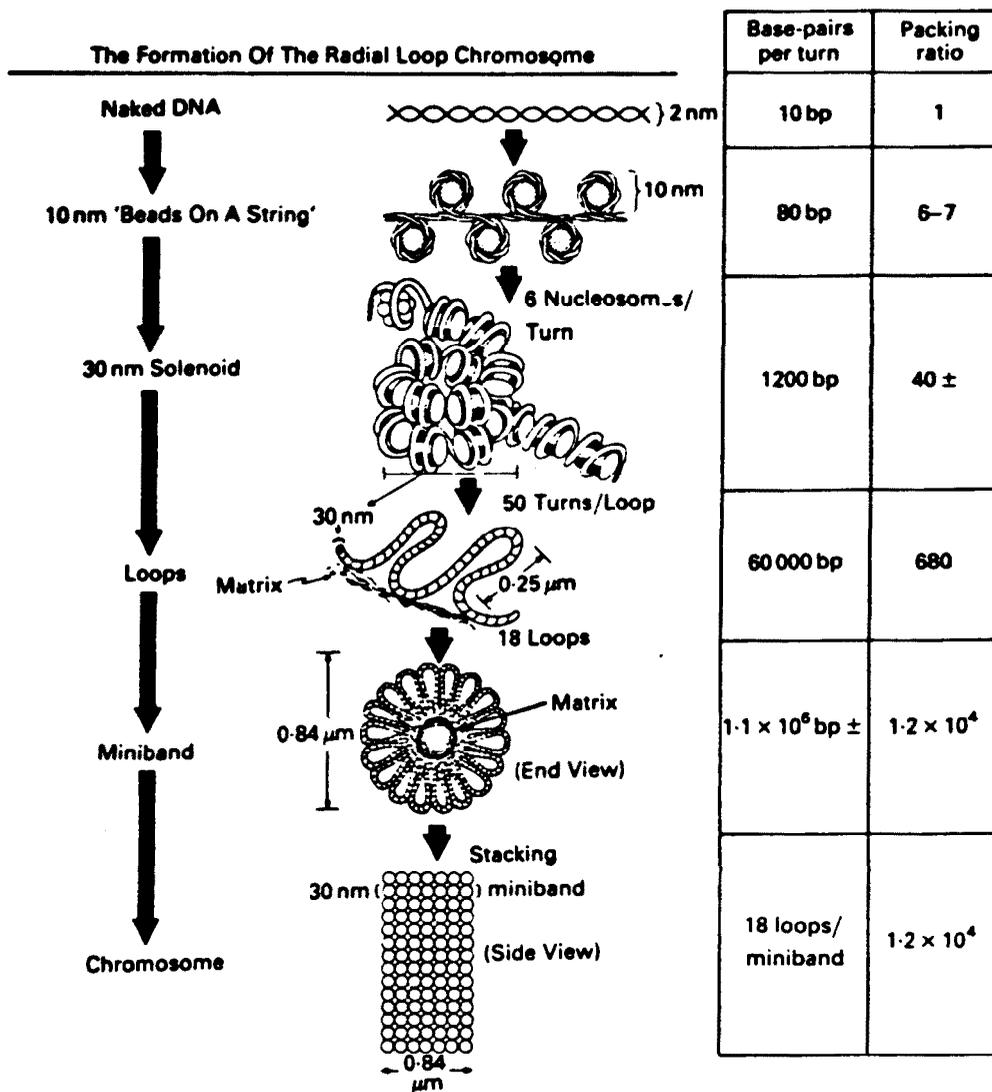


Fig 6.

Esquema que ilustra la organización del ADN sucesivas estructuras hasta la formación del cromosoma metafásico. (Pienta and Coffey, 1984).

Partiendo del ADN y las histonas, hemos llegado ya a una estructura altamente empaquetada como es el cromosoma metafásico. Ahora viene el proceso contrario. ¿Cómo puede una estructura de este tipo resultar accesible a toda la maquinaria encargada de ejecutar los diversos procesos de expresión génica?.

Se entiende en seguida la necesidad de mecanismos que de una forma precisa controlen la estructura de la cromatina en cualquiera de sus dominios y en relación con las necesidades de la célula. Estos mecanismos de control de la estructura de la cromatina se tratarán más adelante (pag.25 - 53) en el punto "1.2.3.-Factores que pueden modular la estructura de la cromatina".

Para concluir esta corta introducción sobre la nucleohistona, se podría decir que las modificaciones químicas del ADN y las histonas, la presencia de variantes de histonas, las proteínas no histonas, la secuencia de nucleótidos del ADN y la composición iónica y metabólica del núcleo celular, serán los responsables del tipo de información genética que resulte expresada en una célula determinada en cualquiera de sus etapas.

Esencialmente, en el núcleo de una célula típica en interfase, existirán zonas de ADN relativamente expuestas (fibras de 10 nm) correspondientes a los genes activos, y otras zonas correspondientes a los genes inactivos que han adoptado la estructura de la fibra de 30 nm .

Una estructura nucleohistona de este tipo, es pues el legado de la espermátida redonda, célula que tras el proceso de espermiogénesis, su cromatina habrá adoptado la estructura de un compacto complejo nucleoprotamina.

1.2.2.- La nucleoprotamina; Estructura típica del núcleo del espermatozoide.

COMPOSICION:

La nucleoprotamina tiene como componentes mayoritarios el ADN y unas proteínas muy básicas denominadas protaminas, en una proporción protamina/ADN de aproximadamente 0,55 (w/w) (Mezquita and Teng, 1977a).

En contraste con la altamente conservada secuencia de aminoácidos de las histonas, las protaminas constituyen uno de los grupos de proteínas con más variabilidad que se conocen. Incluso hay especies que ni tan siquiera poseen protaminas en el núcleo de su espermatozoide, limitándose a mantener una estructura nucleosómica relativamente inerte (Ruiz-Carillo and Palau, 1973). Otras especies, reemplazan parte de su estructura nucleosómica por proteínas semejantes a las histonas (Subirana, 1982). El resultado es que la composición nuclear de los espermatozoides es de lo más variada que existe (fig 14).

Bloch (1969) clasificó a las proteínas asociadas al DNA en el espermatozoide en 5 tipos distintos:

- Protaminas típicas: en las que predomina la arginina.
- "Mytilus type": Ricas en Lys y Arg.
- "Cysteine containing", "stable protamines" or "Basic queratines".
- Histonas
- Ausencia de proteínas nucleares básicas.

Esta clasificación hay que aceptarla con cautela, pues existen todo tipo de excepciones, desde especies que contienen a la vez varios de estos 5 tipos de componentes nucleares, hasta la existencia de proteínas nucleares que pueden clasificarse a la vez en dos de estos grupos.

Subirana (1982) ha propuesto como definición amplia de protamina, aquella proteína nuclear del espermatozoide que cumpla:

$$(\text{Lys} + \text{Arg}) = 45 - 80 \%$$

$$(\text{Ser} + \text{Thr}) = 10 - 25 \%$$

Si bien a esta definición se ajustan la mayoría de las protaminas, existen también excepciones que una vez más, son consecuencia de la variabilidad de las protaminas.

Entre las diferencias, cabe señalar la presencia de cisteínas en las protaminas de mamíferos (fundamentalmente). Las cisteínas pueden formar puentes disulfuro, actuando estos como potentes elementos condensantes de la nucleoprotamina.

Otra de las modificaciones químicas que pueden experimentar las protaminas, es la fosforilación de las serinas. Esta modificación puede jugar un papel importante en la unión de las protaminas al ADN (Wong and Marushige, 1975).

El aminoácido Tirosina, está presente en los mamíferos, aves y calamar, mientras que se halla ausente en los peces.

El tamaño de las protaminas es también un elemento importante de variabilidad (fig. 7). Va desde 30 aminoácidos las más pequeñas hasta unos 65 aminoácidos las más grandes.

Entre las características de las protaminas, podemos destacar la composición de aminoácidos típica propuesta por Subirana (1982) y la presencia de bloques de argininas separados por grupos de aminoácidos neutros (fig, 7). La disposición de estos bloques de arginina muestra una notable homología entre las diversas protaminas.

En las protaminas de mamíferos, es típico su extremo N-terminal. Este extremo N-terminal de las protaminas de mamíferos muestra también una gran similitud con la protamina galina.

Galina:

A R Y R S R G R S R S R R T R R R S P R S G R R R S P
R R R R S R R R R R Y G S A R R S R R S G G V R R R R Y
G S R R R R R Y

Protamina del Carnero:

A R Y R C C L T H S R S R C R R R R R R C R R R R R R
F G R R R R R R V C C R R Y T V V R C T R E

Protamina del Cerdo:

A R Y R C C R S H S R S R C R P R R R R C R R R R R R C
C P R R R R R A V C C R R Y T V I R C R R C

Iridina la:

P R R R R S S S R P V R R R R R P R V S R R R R R R G G
R R R R

Protamina del "Esox lucius":

P R R R R A S S S R P V R R R R R P Y M S R R R R R G G
R R R R

Clupeina Y-I:

A R R R R S S S R P I R R R R P R R R T T R R R R A G R
R R R

Fragmento de proteina del virus de la Hepatitis B:

V R R R G R S P R R R T P S P R R R R S Q S P R R R R S

Fig 7.

Secuencia de aminoácidos de diversas protaminas y de un fragmento de la proteína básica del virus de la hepatitis B (Mezquita et al., 1985; Dixon et al., 1985; Oliva and Mezquita, 1986; Sautiere et al., 1984; Speckert et al., 1983).

Curiosamente ciertas proteínas víricas que intervienen en la formación de la compacta partícula vírica, muestran una notable homología con las protaminas (Dixon et al., 1985) (Fig. 7).

Estas similitudes entre protaminas tan dispares, indica que aunque exista mucha diversificación entre las proteínas nucleares del espermatozoide, esta no se da enteramente al azar. A lo largo de la evolución, se habrían ido seleccionando aquellas proteínas con una eficiencia más elevada para compactar y proteger el mensaje genético vehiculizado por el espermatozoide en un pequeño núcleo hidrodinamicamente eficaz.

ESTRUCTURA:

En contraste con la bien caracterizada estructura de la nucleohistona, mas bien poco se conoce sobre la estructura de la nucleoprotamina. Las razones son varias:

- La diversidad de protaminas induce a la existencia de distintos tipos de organización del ADN en el núcleo de los espermatozoides, dificultando así el conocimiento de las estructuras nucleoprotamina básicas.
- Los estudios de caracterización con nucleasas, por lo general han fracasado, debido a la compactación de la nucleoprotamina. Este elevado grado de empaquetamiento, hace que estas estructuras resulten relativamente inaccesibles a la acción de las nucleasas (Tanphaichitr et al., 1982).
- Puede que no exista una unidad repetitiva semejante al nucleosoma en la estructura de la nucleoprotamina.

La mayor parte de la información de que se dispone en la actualidad acerca de la estructura de la nucleoprotamina, proviene de las técnicas de difracción de rayos X (Feughelman, 1955; Wilkins, 1956; Suwalsky and Traub, 1972; Subirana, 1982), espectroscópicas (Bradbury et al., 1962; Warrant and Kim, 1978), de microscopia electrónica (Inoue and Fuke, 1970) y de modificación química (Mirzabekov et al., 1977)

Al seguir la evolución por microscopia electrónica de las últimas fases de la espermiogénesis, se han descrito 3 tipos básicos de estructuras (Walker, 1971; Coelingh, 1975):

- Estructuras fibrilares (Loir and Lanneau, 1984; Loir and Courtens, 1979).
- Estructuras lamelares (Robinson and Halton, 1982; Henley, 1973).
- Estructuras granulares o corpusculares (Tanphaichitr et al., 1982; Tingari, 1973; Mcgregor and Walker, 1973).

Estas estructuras detectadas en las últimas fases de la espermiogénesis, irían progresivamente aproximándose hasta confluir y formar la altamente compacta estructura nucleoprotamina. Esta confluencia final, coincidiría con la reducción del volumen nuclear que experimenta el espermatozoide testicular para dar lugar al espermatozoide maduro del deferente (Zlotnik, 1947; Lake and Smiles, 1952; Tingari, 1973).

En el espermatozoide, la nucleoprotamina se halla en un estado de muy alta compactación (1,2 pg de ADN en un volumen de $2 \mu\text{m}^3$ ò 0,6 gr de ADN / cm^3 (Mezquita and Teng, 1977a). La estructura de la nucleoprotamina se ha comparado a la de un cristal an base a su elevada compactación, su relativa inaccesibilidad al agua "in vitro" (Shih and Bohner, 1970; Subirana, 1975) y por otros datos obtenidos por los estudios físicos (Subirana, 1982; Sipski and Wagner, 1977).

Los estudios de digestión con nucleasas indican que la nucleoprotamina es mucho más resistente a la digestión que la nucleohistona (Tanphaichitr et al., 1982; Young and Sweeney, 1979).

Al analizar los productos de la digestión de nucleoprotaminas con nucleasa micrococcal o DNAsaI por electroforesis, no se ha podido detectar ningún patrón que pueda indicar la existencia de una organización en forma de subunidades repetitivas. Solamente se detectan fragmentos con un tamaño mayoritario de 200 a 820 bp (Tanphaichitr et al., 1982), o bien tras digestiones realizadas en condiciones más exhaustivas, un fragmento de digestión límite de algo menos de 72 bp (Young and Sweeney, 1979).

Hay que tener en cuenta que en estos estudios de digestión con nucleasas existe la posibilidad de que la protamina resultara degradada durante la digestión con nucleasa, por proteasas contaminantes. En este caso el fragmento de digestión límite detectado de 72 bp indicaría el efecto protector que pudieran ejercer fragmentos de degradación de la protamina sobre el ADN.

La difracción de rayos X de núcleos de espermatozoides y de complejos nucleoprotamina reconstituidos a partir de ADN y protamina son muy similares (Feughelman et al., 1955; Suau and Subirana, 1977), indicando que ningún componente minoritario del núcleo del espermatozoide debe de ser fundamental en la determinación de la estructura de la nucleoprotamina (Subirana, 1982).

La conclusión más general que se puede sacar de los estudios de difracción de rayos X, es que las moléculas de ADN se ordenarían paralelamente unas con otras, y las moléculas de protamina actuarían neutralizando las cargas negativas de los grupos fosfato (Subirana, 1982; Warrant and Kim, 1978; Balhorn, 1982)(Fig. 8). Los bloques de arginina de la protamina adoptarían estructura en hélice α y encajarían en el surco ancho del ADN. Los residuos neutros de las protaminas, sobresaldrían del surco ancho y encajarían en el surco pequeño.

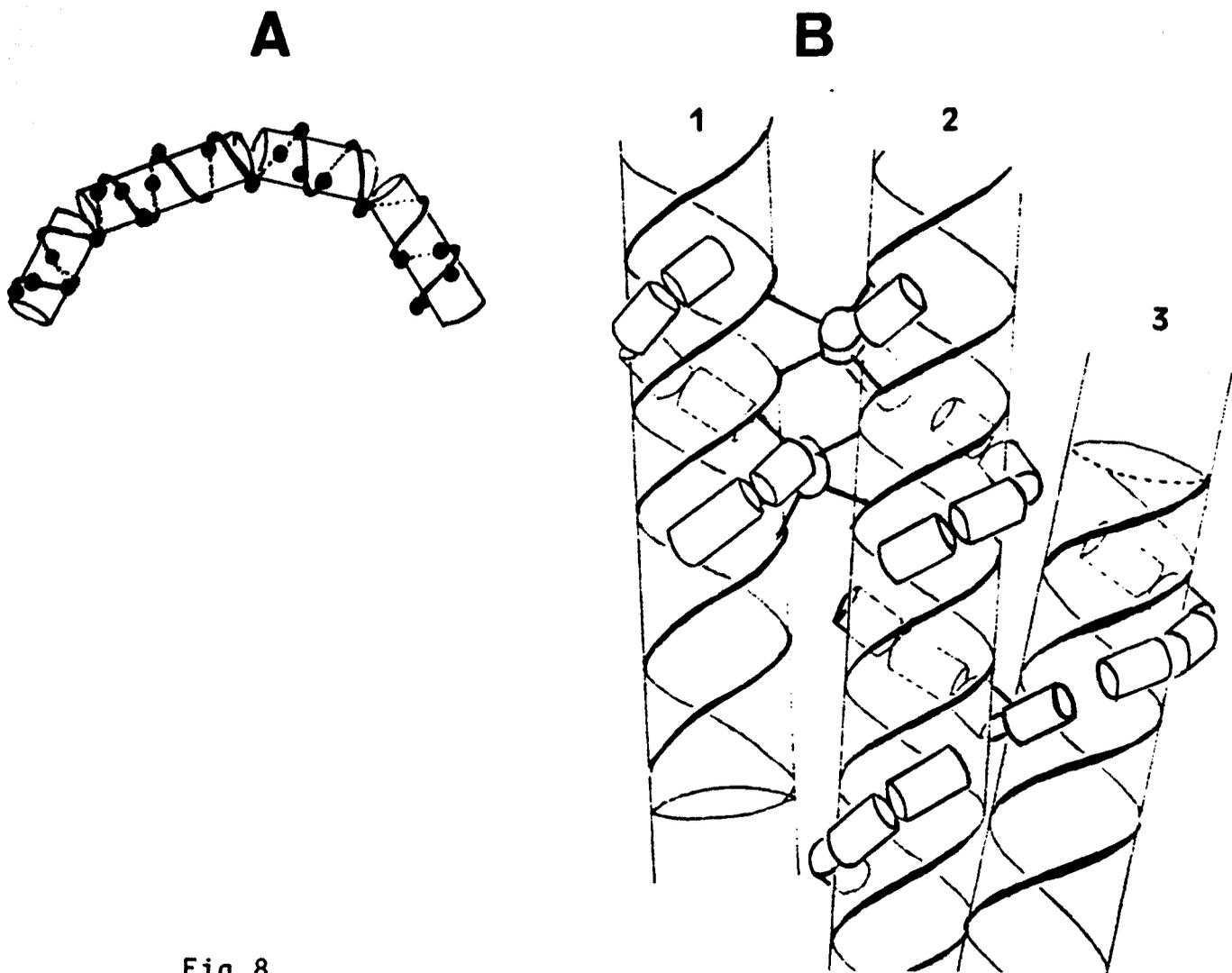


Fig 8.

Representación esquemática de uno de los modelos de estructura de la nucleoprotamina (Warrant and Kin, 1978).

A.- Representación básica de la estructura de la salmina AI. Según este modelo, esta protamina estaría compuesta de cuatro segmentos en hélice α unidos por 3 bisagras flexibles. Los residuos de arginina se muestran como puntos negros.

B.- Las moléculas de ADN se representan como varios cilindros interconectados que encajarían en el surco ancho del ADN.

En el esquema se muestran dos tipos de entrecruzamiento entre las moléculas de ADN: Entre las cadenas 1 y 2, las moléculas de salmina unidas a cada una de ellas, establecerían también enlaces con las cadenas de ADN adyacentes.

Entre las cadenas 2 y 3, una misma molécula de salmina tendría 3 bloques de arginina unidos a la cadena 2 y el cuarto bloque de arginina unido a la cadena 3. Existen todavía más posibilidades de entrecruzamiento entre cadenas de ADN contiguas.

Las moléculas de protamina recién sintetizadas resultan fosforiladas en los residuos serina (Sanders and Dixon, 1972; Marushige et al., 1969). La fosforilación, al introducir cargas negativas, evitaría que las protaminas actuaran formando enlaces entre cadenas adyacentes de ADN. De esta forma se preveniría una prematura condensación del ADN que solo serviría para complicar más el proceso (Bode et al., 1979; Louie and Dixon, 1972). Una vez el proceso de desplazamiento de histonas estuviese concluido, se iniciaría la defosforilación de la protamina y la concomitante condensación del ADN (Warrant and Kim, 1978).

Existen otros modelos en los que se propone que las moléculas de protamina se localizarían en el surco pequeño del ADN (Bälhorn, 1982).

En comparación con los conocimientos que se poseen acerca de la estructura de la nucleoprotamina de los peces, la estructura de la nucleoprotamina del gallo ha sido poco estudiada mediante difracción de RX (Chiva i Subirana, 1986).

Extender estos estudios sería una labor interesante, pues recientemente se ha puesto de manifiesto que aparte de poseer la protamina galina un tamaño mucho mayor, presenta una capacidad más elevada para desensamblar nucleosomas "in vitro" que las pequeñas protaminas de peces (Oliva and Mezquita, 1986).

1.2.3.- Factores que pueden modular la estructura de la cromatina.

1.2.3.1.- Modificaciones químicas de las histonas:

Las histonas pueden resultar modificadas postranscripcionalmente de diversas formas (acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinización) comportando cambios en su estructura y en consecuencia en la estructura del nucleosoma (Isenberg, 1979; Bradbury et al., 1981, Bode et al., 1980; Oliva and Mezquita, 1982)(Fig. 9).

De entre todas las modificaciones químicas posibles de las histonas, en esta Tesis se ha centrado la atención sobre la acetilación.

Las histonas pueden experimentar 2 tipos de acetilación; por un lado la acetilación N-terminal que se da en las histonas H1, H2A y H4, como proceso de maduración en la etapa inicial de síntesis (Ruiz-Carrillo et al., 1975; Pestaña and Petot, 1974; Liew et al., 1970) y por otro la acetilación de los grupos ϵ -amino de ciertas lisinas del extremo N-terminal de las histonas H4, H3, H2A y H2B (Allfrey, 1971; Louie and Dixon, 1973; Allfrey, 1980; Ruiz-Carrillo et al., 1975). La modificación N-terminal es irreversible, por lo que una vez establecida, presenta poco interés como mecanismo de modulación de la estructura de la cromatina. En contraste, la acetilación de los ϵ -amino de los residuos lisina de los brazos N-terminales de las histonas se halla perfectamente modulada y es por lo tanto la que presenta interés como mecanismo de control de la estructura de la cromatina.

Las cargas positivas de los residuos lisina susceptibles de acetilación, podrían establecer normalmente interacciones electrostáticas con las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN. Estas interacciones electrostáticas no podrían producirse en el caso de que los residuos ϵ -amino de las lisinas se hallaran neutralizados por acetilación.

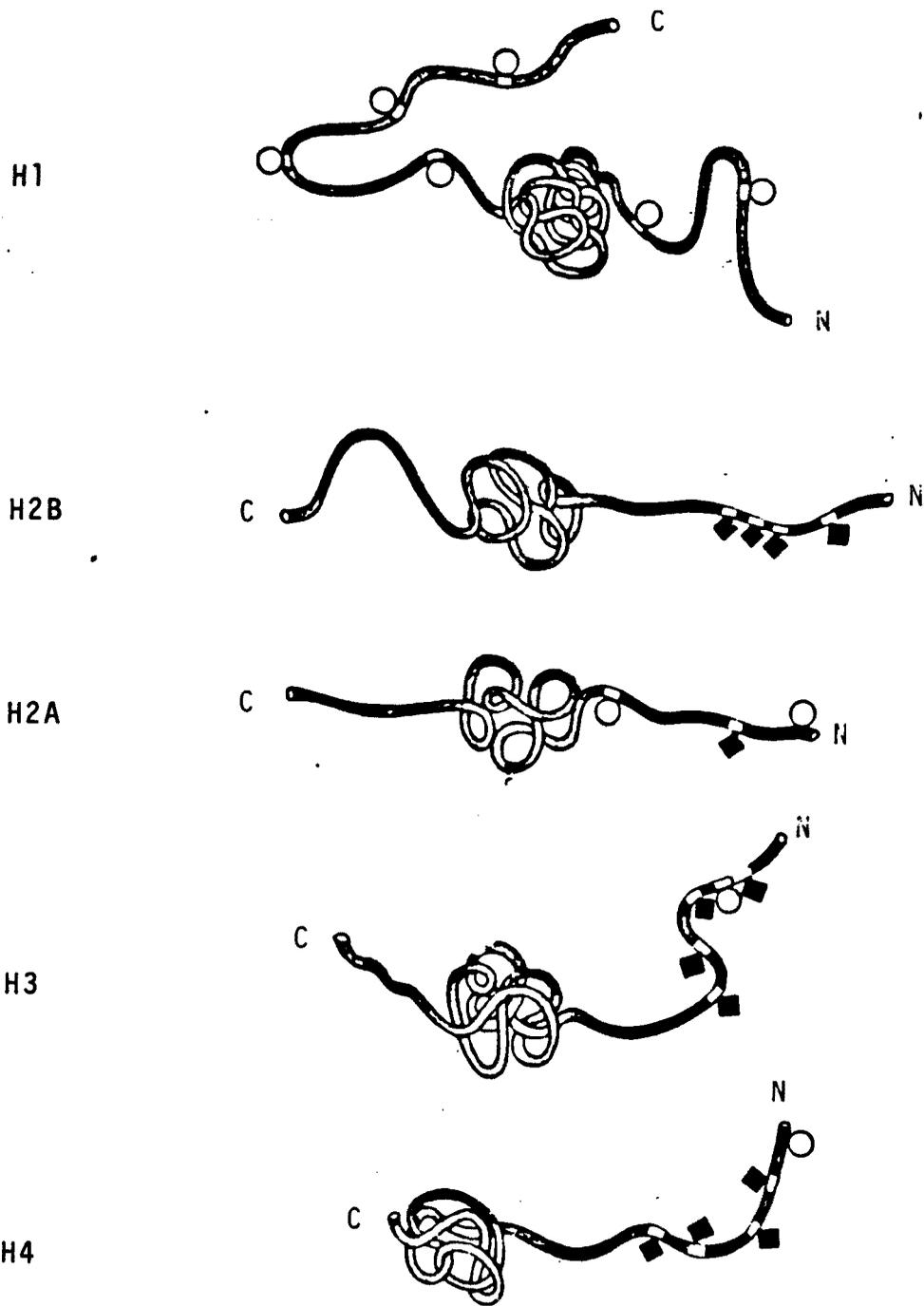


Fig 9.

Modificaciones químicas de las histonas por acetilación de los grupos ϵ -amino de las lisinas (◆) y por fosforilación (O).

De esta forma, las histonas presentarían menos afinidad hacia el ADN y en consecuencia la estructura de la cromatina podría ser más laxa. Los péptidos N-terminales de la histona H4 no pueden unirse al ADN si se hallan acetilados (Cary et al., 1982), e "in vitro" se ha demostrado que la acetilación de las histonas relajaría parcialmente la estructura del nucleosoma (Bode et al., 1980; Bode et al., 1983; Bertrand et al., 1984; Bode, 1984).

La importancia de este tipo de modificación química, viene apoyada por el hecho de estar sujeta a un control por parte de diversas enzimas con especificidad de sustrato (Acetiltransferasas y desacetilasas de histonas) (Gallwitz and Sures, 1972; Inoue and Fujimoto, 1970; Lopez-Rodas et al., 1985; Mezquita et al., 1982).

Entre las funciones propuestas para la acetilación, cabe destacar:

- 1.-Su función como mecanismo de exposición de la cromatina en los genes activos (Doenecke and Gallwitz, 1982; Hirose et al., 1985).
- 2.-Un papel en la unión de las histonas al ADN durante la replicación (Chambers and Shaw, 1984).
- 3.-Su intervención en los cambios estructurales que conducen al desensamblaje de los nucleosomas durante la espermiogénesis (Oliva and Mezquita, 1982; Grimes and Henderson, 1984a,b; Christensen et al., 1984; Oliva and Mezquita, 1986).

El estudio de la acetilación de las histonas "in vivo" durante la espermatogénesis del gallo y el efecto que presenta sobre el desensamblaje de los nucleosomas "in vitro", ha sido uno de los objetivos de esta tesis. En la discusión se realizará un análisis más exhaustivo de las implicaciones de los resultados obtenidos, así como su conexión con las otras funciones propuestas para la acetilación.

1.2.3.2.- Presencia de policationes y polianiones:

Dada la importancia de las interacciones electrostáticas en el mantenimiento de la estructura de la cromatina (ver fig. 3), la entrada de cualquier molécula policationica o polianiónica en el núcleo celular, deberá provocar desestabilizaciones de la cromatina por un simple mecanismo de competición. Entre las moléculas policationicas que puedan jugar un papel "in vivo" modulando la estructura de la cromatina, destacan las protaminas y las poliaminas. Como moléculas polianiónicas cabe destacar la nucleoplasmina, la tubulina y las HMG 1 y 2.

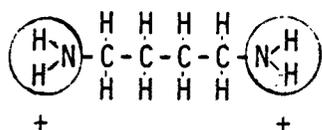
1.2.3.2.1.-Las protaminas:

El carácter altamente básico de las protaminas, y su tamaño (Peso molecular = 5.000 - 10.000) confieren a estas proteínas la capacidad de competir con las histonas por el ADN y actuar condensando al ADN en la forma de un compacto complejo nucleoprotamina.

La capacidad de las protaminas para desensamblar a los nucleosomas viene investigándose desde 1970 (Evans et al., 1970; Marushige and Dixon, 1971), y no estando concluida en la actualidad, ha sido precisamente uno de los objetivos fundamentales de esta tesis (Oliva and Mezquita, 1986).

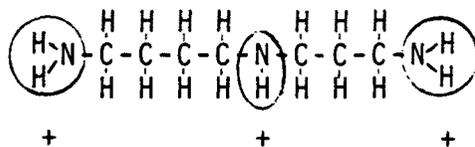
1.2.3.2.2.- Las poliaminas:

Las poliaminas (espermina, espermidina y putrescina), son policationes orgánicos sintetizados tanto por células procariotas como eucariotas (Cohen, 1978). La primera referencia histórica sobre las poliaminas se halla en una carta transmitida por Leewenhoek en el año 1677 a la Royal Society en la que se describían por primera vez los espermatozoides. En esta carta se señalaba que después de haber transcurrido cierto tiempo de haber puesto el semen sobre el portaobjetos, aparecían unos cristales característicos de los que hoy podemos suponer que se trataba de fosfato de espermina.



PUTRESCINA

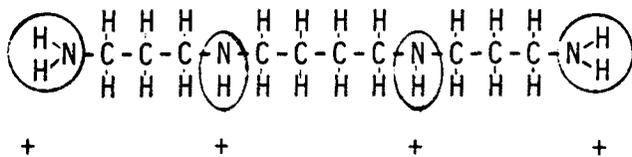
(1,4-diaminobutano)



ESPERMIDINA

(N-(3-aminopropil)

1,4-diaminobutano)



ESPERMINA

(N, N' bis(3-amino-
propil) 1,4-diamino-
butano

Fig 10.

Química de las poliaminas más frecuentes. Nótese la distribución espacial de los grupos amino.

A pesar de que la espermina fue aislada por primera vez de testículos y semen (Rosenheim, 1924) y de que las palabras espermina y espermidina recuerdan la función genital masculina, hasta la actualidad apenas se habían realizado estudios de poliaminas durante la espermatogénesis (McIndoe and Turkington, 1973). El estudio de los niveles de poliaminas y de su biosíntesis durante la espermatogénesis del gallo, ha sido otro de los objetivos de esta Tesis (Oliva et al., 1982).

Química de las poliaminas:

De su estructura química se puede destacar el número y disposición de los grupos amino (Fig. 10). La distancia entre los grupos amino no es indiferente, pues estudios realizados con análogos en los que variaba el número de átomos de carbono entre 2 grupos amino, indican que estos no conseguían suplir completamente las funciones deficitarias provocadas por un bloqueo en la biosíntesis de poliaminas (Oredsson et al., 1984; Linderoth and Morris, 1983).

Biosíntesis e interconversión de poliaminas:

En los mamíferos, la síntesis de las poliaminas se realiza a partir de los aminoácidos L-ornitina y L-metionina, mientras que en las bacterias se utiliza arginina en lugar de L-ornitina (Tabor and Tabor, 1976).

El paso limitante en la biosíntesis de poliaminas en los mamíferos es la conversión de L-ornitina en putrescina a través de la ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17) (Fig. 11). Otra enzima clave es la S-adenosilmetionina descarboxilasa (EC 4.1.1.50) que convierte la S-adenosilmetionina en S-metiladenosilhomocisteína. A partir de este último compuesto y de putrescina se sintetiza espermidina por la espermidina sintasa (EC 2.5.1.16). La espermina se sintetiza a partir de la espermidina y la

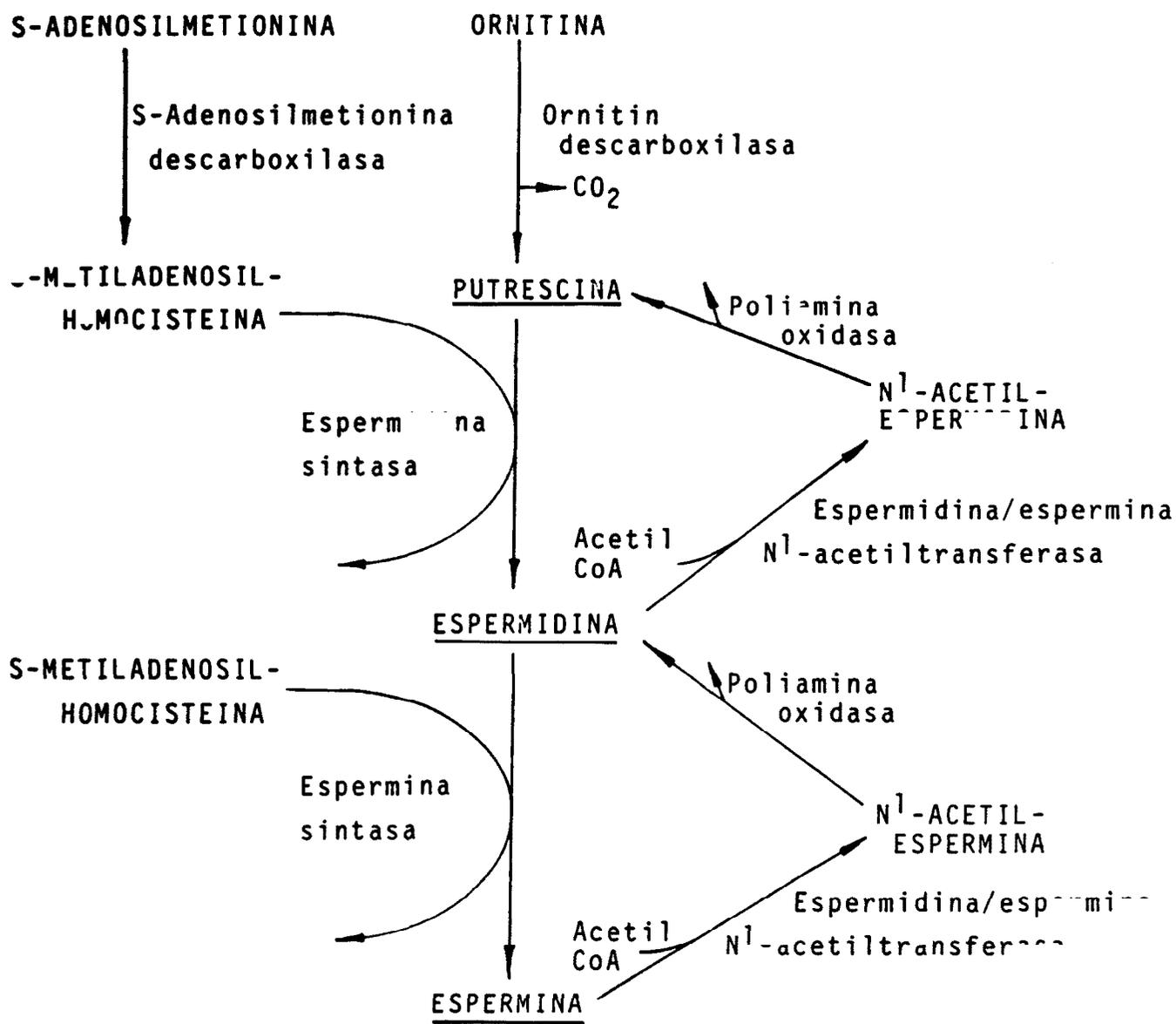


Fig 11.

Biosíntesis e interconversión de las poliaminas.

S-metiladenosilhomocisteina por la espermina sintetasa (EC 2.5.1.22).

La información publicada acerca de las poliaminas y su biosíntesis es importante y extensa (Pegg, 1986). Aun así, en la actualidad no se conocen con precisión las funciones que pueden ejercer las poliaminas, así como muchos de los aspectos de su biosíntesis e interconversión.

Dada la importancia que parecen tener las poliaminas en la mayoría de procesos celulares, a continuación se comentarán aquellos aspectos más destacables de su biosíntesis y función, aunque algunos de ellos no se limiten exclusivamente a la estructura de la cromatina.

-Ornitin descarboxilasa (EC 4.1.1.17):

La ornitina descarboxilasa, junto con la S-adenosil-metionina descarboxilasa y la espermidina-espermina-N¹-acetil-transferasa, son los enzimas que determinan la biosíntesis y niveles de poliaminas. Los otros enzimas que intervienen en la biosíntesis de poliaminas (Fig. 11) son regulados a través de la disponibilidad de los sustratos limitantes.

Estos 3 enzimas que determinan la producción e interconversión de poliaminas presentan vidas medias extremadamente cortas, lo cual permite un rápido ajuste de los nuevos niveles de enzima en respuesta a cualquier estímulo que module su actividad (Pegg et al., 1982).

La estimulación de la ornitina descarboxilasa se da de una forma universal en respuesta a la estimulación por hormonas, fármacos, estímulos regenerativos y promotores tumorales. Los mecanismos propuestos de control de esta enzima tan versátil son los siguientes:

- 1.-Control a nivel transcripcional: Sería responsable de una buena parte del incremento de actividad que se detecta en respuesta a estímulos activadores, ya que en estas condiciones se detecta también un incremento en la cantidad del ARN mensajero que codifica para la ornitina descarboxilasa (Berger

et al., 1984; Kontula et al., 1984).

2.-Control a nivel traduccional: Junto con la velocidad de degradación del enzima y el comentado control transcripcional, representan la mayor parte del control al que puede hallarse sujeta la ornitina descarboxilasa. Existe una correlación muy buena entre variaciones en la cantidad de enzima (cantidad de proteína) y la actividad enzimática (Seely and Pegg, 1983a,b; Isomaa et al., 1983; Erwin et al., 1983; Kahana and Nathans, 1985).

3.-Modificaciones postranscripcionales: Aunque en la actualidad parece ser que este tipo de control es cuantitativamente poco importante, existen diversas hipótesis que merece la pena mencionar:
Control por fosforilación-defosforilación, en donde la forma fosforilada de la ornitina descarboxilasa resultaría inactiva (Atmar and Khuen, 1981).

Control por unión con antienzimas (Berlin and Schimke, 1975).

Control por inhibición competitiva por el producto (Jane et al., 1978; Canellakis et al., 1985).

4.-Control por variación en la velocidad de degradación del enzima: (Ya comentado en el punto 2) Dado el elevado recambio de la ornitina descarboxilasa, pequeñas variaciones en la velocidad de degradación del enzima, pueden resultar en grandes fluctuaciones de la cantidad de enzima y en consecuencia en su actividad (Tabor and Tabor, 1984).

A pesar de su universalidad, el estudio de la ornitina descarboxilasa no ha resultado nada fácil, pues se halla en cantidades extremadamente pequeñas, pudiendo llegar a mínimos de unas 200 moléculas de enzima por célula (Pegg et al., 1982a). La obtención de un material de partida suficientemente abundante en el enzima como para poder purificarlo y estudiar sus características y obtener anticuerpos monoclonales, solo ha sido posible utilizando tejidos ya ricos de entrada en este enzima y estimulándolos con inductores.

Una herramienta que ha facilitado mucho la investigación en este campo de las poliaminas, es la disponibilidad de inhibidores competitivos específicos e irreversibles de estas enzimas. Uno de los más útiles ha sido la α -difluorometilornitina (DFMO). La reacción de la ornitina descarboxilasa con ^3H -DFMO ofrece la posibilidad de investigar la pureza de las preparaciones de ornitina descarboxilasa, de titular el número de moléculas de enzima activa en los extractos de tejidos, de identificar al enzima sobre electroforesis bidimensionales y de utilizarse como radioligando para radioinmunoensayo. La DFMO marcada radioactivamente, ha permitido también la localización autorradiográfica de esta enzima. De esta forma se ha detectado que se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (Zagon et al., 1983; Persson et al., 1983; Anehus et al., 1985; Zagon et al., 1984).

El peso molecular de la ornitina descarboxilasa es de 55.000 (Kaye, 1984).

En esta tesis se muestra como coincidiendo con el ensamblaje de los nucleosomas en la transición nucleohistona-nucleoprotamina, se da un marcado incremento en la biosíntesis y niveles de poliaminas (Oliva et al., 1982).

Dado que en estas células que están en pleno proceso de espermiogénesis no se da transcripción, este modelo parece adecuado para el estudio de los mecanismos de control traduccional y postraduccional de la ornitina descarboxilasa.

-S-adenosilmetionina descarboxilasa (EC 4.1.1.50):

Ultimamente se ha incrementado la atención sobre este enzima, no por su intervención directa en la síntesis de poliaminas, sino por tratarse de uno de los enzimas que utiliza S-adenosilmetionina. La S-adenosilmetionina se utiliza también como sustrato para las reacciones de transmetilación (Fig. 11). Dado que en ciertas situaciones, las reacciones de transmetilación pueden utilizar la mayoría de la S-adenosilmetionina (Eloranta and Kajander, 1984; Finkelstein and Martin, 1984, Guilidori et al., 1984) disponible,

parece lógico pensar que estos dos tipos de utilización puedan interferirse mutuamente.

La S-adenosilmetionina descarboxilasa tiene un peso molecular de 32.000, requiere piruvato como grupo prostético y resulta inhibida por el metilglioxal-bis-guanilhidrazona (MGBG). Este inhibidor se ha utilizado también como herramienta para bloquear la biosíntesis de poliaminas, aunque hay que tener en cuenta que presenta el grave inconveniente de alterar otras actividades celulares: Provoca daños mitocondriales (Nikula et al., 1985), inhibe a la diamina oxidasa (Jänne and Morris, 1984), interfiere con el transporte de poliaminas (Kramer et al., 1985) e induce a la espermidina-espermina-N¹-acetiltransferasa (Karvonen and Pösö, 1984).

-Acetilación e interconversión de poliaminas:

La acetilación de las poliaminas puede darse por dos enzimas distintos: La espermina-espermidina-N¹-acetiltransferasa ; que es un enzima citosólico, y una acetilasa de histonas (Libby, 1983). Se ha descrito la posibilidad de que las poliaminas puedan inhibir la acetilación de las histonas (o viceversa) "in vivo" ya que ambas son sustratos para la misma acetilasa nuclear (Dod et al., 1982). Durante la espermatogénesis del gallo se dan ambos, un incremento en los niveles de poliaminas y una hiperacetilación de las histonas (Oliva et al., 1982; Oliva and Mezquita, 1982). Estudios "in vitro" indican que las poliaminas estimulan a la acetiltransferasa de histonas (Mezquita et al., 1980).

El enzima nuclear, convertiría la espermidina en N⁸-acetilespermidina, mientras que el enzima citosólico produciría N¹-acetilespermidina y N¹-acetilespermina (Seiler et al., 1981; Erwin et al., 1984; Della Ragione and Pegg, 1983, 1984; Persson and Pegg, 1984). La N⁸-acetilespermidina podría volverse a desacetilar produciendo de nuevo espermidina (Blankenship and Marchant, 1984) y actualmente

este es el único destino conocido para este sustrato.

La N¹-acetilespermidina y la N¹-acetilespermina son un buen sustrato para la poliamina oxidasa (dependiente de FAD). La oxidación de la N¹-acetilespermidina da lugar a putrescina, y la oxidación de la N¹-acetilespermina da lugar a espermidina (Fig. 11). Dado que la actividad poliamina oxidasa se halla generalmente en exceso, los niveles de poliaminas acetiladas son normalmente bajos y suelen estar por debajo del límite de detección (Seiler et al., 1981; Pegg et al. 1982a; Pegg and McCann, 1982).

Las funciones de la acetilación de las poliaminas no están del todo esclarecidas, pero pueden resumirse en tres: 1.-Evitar un incremento excesivo en los niveles de poliaminas libres. La espermina-espermidina-N¹-acetiltransferasa se induce tras la administración de poliaminas (Persson and Pegg, 1984; Pegg et al., 1985b).

2.-Para favorecer la excreción de poliaminas de la célula (Wallace et al., 1985).

3.-Para remover poliaminas unidas a ciertos compartimentos intracelulares.

Correlación de las poliaminas con diversos procesos celulares:

"The function of the polyamines in mammalian cells remains obscure although there is general agreement from studies with inhibitors and mutants that polyamines are essential for cell growth". Así es como empieza la revisión más reciente de poliaminas realizada por uno de los pioneros en este campo (Pegg, 1986). Como quedará reflejado en esta introducción, las poliaminas seguramente ejercen muchas otras funciones que la del crecimiento celular.

-Crecimiento celular:

Una de las primeras observaciones acerca de su función fué realizada en 1965 por Dykstra y Hebs cuando demostraron que había una correlación entre regeneración hepática y aumento en los niveles de poliaminas en el hepatocito. (Raina, 1963).

Desde entonces se han publicado numerosos trabajos que muestran que en general, los niveles de poliaminas aumentan al incrementarse la división celular(Pegg, 1986).

En 1970 (Morriss et al 1970) se aislaron mutantes de *E. Coli* deficientes en la biosíntesis de poliaminas que no podían crecer en un medio sin poliaminas. Si en el medio de cultivo se añadían análogos de las poliaminas en los que variaba el número de átomos de carbono entre grupos amino, estos no conseguían devolver el crecimiento a la normalidad. Estos experimentos indicaban que el efecto de las poliaminas no era simplemente debido a las variaciones en la fuerza iónica que puedan generar. (Morriss and Harada, 1980).

En eucariotas, se han encontrado mutantes de levadura deficitarios en la síntesis de poliaminas llegando a los mismos resultados (Hosaka and Yamashita, 1981). En cuanto a células animales se conoce uno solo de este tipo de mutantes deficitarios: Células CHO que presentan un requerimiento absoluto de poliaminas para crecer (Steglich and Scheffler, 1982; Pohjanpelto et al., 1985b).

Si a un cultivo de células se le añade el inhibidor específico e irreversible de la ornitín descarboxilasa α -DFMO, resulta detenida la síntesis de ADN y disminuyen la transcripción y la traducción(Heby and Anderson, 1980)

La relación existente entre crecimiento celular y aumentos en los niveles de poliaminas, junto con la observación de que los niveles séricos y en la orina de poliaminas estaban aumentados en enfermos neoplásicos, hizo plantearse si estos compuestos podrían utilizarse como marcadores tumorales, y si el bloqueo de síntesis con α -DFMO podía suponer una forma de tratamiento antitumoral (Sjoerdsma et al., 1984; Chayen, 1984).

El problema de la utilización de los niveles séricos y upinarios de poliaminas como marcador tumoral era que existían muchas otras situaciones aparte de la existencia de neoplasia que cursaban también con incrementos en los niveles de poliaminas (Womble et al., 1984; Palés et al., 1984; Moulinoux et al., 1985; Nagatsu et al., 1984).

Un experimento que demuestra una gran correlación entre carcinogénesis y poliaminas (Taquigawa et al., 1982) consistió en aplicar TPA (un potente promotor tumoral) a la piel de un ratón. Podía entonces detectarse en la piel tratada, un aumento en los niveles de putrescina y la aparición de papilomas. Lo interesante es que si conjuntamente con la aplicación de TPA se administraba oralmente al ratón α -DFMO, entonces se evitaba la aparición de los tumores.

Un experimento análogo consistió en inocular a dos poblaciones de ratones con células de melanoma. Conjuntamente con la inoculación, se administró α -DFMO a uno de ellos, y se observó que este bloqueo de la biosíntesis de poliaminas había evitado la producción de cáncer cutáneo en un 84% de ellos (Sunkara et al., 1983).

La utilización de los inhibidores de la síntesis de poliaminas como agentes anticancerígenos ha sido revisada por Schechter (1984) y Jänne et al. (1983). La α -DFMO presenta una rápida excreción urinaria y una cierta lentitud en entrar en las células. Esta dificultad para mantener niveles elevados del inhibidor, junto con su falta de efectos citotóxicos, hace que por sí solo no haya resultado eficiente en el tratamiento del cáncer (Grove et al., 1981; Erwin and Pegg, 1982; Bitonti et al., 1985a; Marton et al., 1983; Jänne et al., 1983).

Parece ser que nuevos inhibidores de la ornitina descarboxilasa que presentan una mayor facilidad para entrar en las células, están dando mejores resultados como agentes antitumorales que la α -DFMO (Sjoerdsma and Schechter, 1984; Bartholeyns et al., 1984; Mamont et al., 1984a).

En algunos casos, se puede obtener efectos beneficiosos al utilizar conjuntamente inhibidores de la biosíntesis de poliaminas y otros tipos de agentes antitumorales. Tal es el caso de su utilización en combinación con ciertos interferones (Sunkara et al., 1984; Heston et al., 1984, Rosenblum and Gutterman, 1984) y especialmente cuando se utilizan en combinación con agentes antineoplásicos que se unen al ADN. La depleción de poliaminas producida por α -DFMO sensibiliza a las células al tratamiento por la nitrosourea BCNU (Sano et al., 1984a; Marton et al., 1983). Este sinergismo puede ser el resultado de un aumento en la generación de entrecruzamientos en el ADN por el BCNU en ausencia de poliaminas (Tofilon et al., 1983). De una forma similar, la depleción de poliaminas por α -DFMO incrementa las roturas a nivel del ADN mediatizadas por la Topoisomerasa II que tienen lugar con el tratamiento de las células con m-AMSA (Zwelling et al., 1985). Estos resultados pueden reflejar tanto un incremento en la intercalación del m-AMSA al ADN, como un incremento en el número de sitios de unión de la topoisomerasa al ADN en ausencia de poliaminas.

-Diferenciación celular:

La diferenciación de mioblastos L6 por la somatomedina cursa con un incremento en la actividad ornitina descarboxilasa. El bloqueo de la biosíntesis de poliaminas con α -DFMO bloquea también la diferenciación de los mioblastos L6 por la somatomedina. Los efectos inhibitorios de la α -DFMO resultan inhibidos si se añaden poliaminas exógenas (Ewton et al., 1984; Erwin et al., 1983).

La diferenciación de células eritroleucémicas de Friend, se halla también relacionada con la biosíntesis y niveles de poliaminas (Morioka et al., 1983; Watanabe et al., 1985).

La diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a células adiposas resulta bloqueada por el inhibidor de la biosíntesis de poliaminas α -DFMO. Esta inhibición puede revertirse completamente tras la administración de poliaminas exógenas (Erwin et al., 1984).

La diferenciación de células de neuroblastoma de ratón NB-15 y la diferenciación de cultivos primarios de neurona se hallan también relacionados con la biosíntesis y niveles de poliaminas (Seiler et al., 1984; Chen et al., 1982).

La respuesta de los macrófagos a inmunoadyuvantes, se halla relacionada con las poliaminas (Prosser et al., 1984).

Variaciones en la biosíntesis y niveles de poliaminas acompañan a la hipertrofia muscular (Russell, 1980).

Durante la espermatogénesis del gallo se da un incremento en la biosíntesis y niveles de poliaminas que claramente no se halla relacionado con los procesos de crecimiento y división celular (Oliva et al., 1982).

En los dos apartados anteriores (crecimiento celular y diferenciación celular) se han puesto de relieve toda una serie de correlaciones "in vivo" entre biosíntesis y niveles de poliaminas y distintas respuestas celulares.

Cabe preguntarse ahora cuáles son los mecanismos moleculares subyacentes a todas estas correlaciones encontradas "in vivo".

¿Existe una única función de las poliaminas a nivel molecular, relacionada con todos estos procesos de crecimiento y diferenciación celular?, ¿o bien son varios los niveles moleculares en donde podrían actuar las poliaminas?.

Probablemente sean varios los niveles moleculares en los que se hallan implicadas las poliaminas. A continuación se exponen algunos de los mecanismos moleculares a través de los cuales las poliaminas pueden presentar efectos más relevantes:

- ADN y estructura de la cromatina.
- ARN, Transcripción y síntesis proteica.
- Microtúbulos y microfilamentos
- Modificación de multitud de actividades enzimáticas.
- Fenómenos de membrana.
- Unión covalente a proteínas.

Mecanismos moleculares:

-ADN y estructura de la cromatina:

La relación existente entre el crecimiento celular y variaciones en los niveles de poliaminas hace plantearse ya si ambos pueden estar relacionados a través del ADN como nexo común. Estudios sobre el ciclo celular utilizando células sincronizadas, indican que los niveles de poliaminas aumentan coincidiendo con la preparación y el inicio de la síntesis de ADN (Heby, 1981; Heby et al., 1976; Caldadera

et al., 1981; Geiger and Morris, 1978; Lundquist et al., 1983). Las poliaminas también afectarían el movimiento de las horquillas de replicación del ADN (Geiger and Morris, 1980).

Otros estudios "in vivo" correlacionan la presencia de poliaminas con bacteriófagos y virus (Ames and Dubin, 1966; Fout et al., 1984). Las poliaminas facilitarían el empaquetamiento del ácido nucleico vírico en la nucleocápside (Gosule and Schellman, 1976). El bacteriófago λ no puede formarse en huéspedes mutantes deficitarios en la biosíntesis de poliaminas (Gottesman and Gottesman, 1975). El bacteriófago ϕ W-14 une covalentemente putrescina a su ADN. Un mutante del fago ϕ W-14 que carece de dicha capacidad, presenta una nucleocápside significativamente mayor, indicando que su ácido nucleico se halla en un estado de menor compactación (Scraba et al., 1983).

Las primeras evidencia "in vitro" de la asociación entre poliaminas y ADN fueron la habilidad de la espermina y la espermidina para precipitar al ADN y su capacidad para proteger al ADN de su desnaturalización por el calor, fuerzas de cizallamiento o por rayos X (Tabor and Tabor, 1984).

Esta habilidad para condensar al ADN ha sido revisada y estudiada últimamente (Market et al., 1985; Baase et al., 1984; Thomas and Bloomfield, 1984; Porschke, 1984; Wilson and Bloomfield, 1979) y es consistente con la teoría de condensación por contraiones de Maning (1978). Según esta teoría, la condensación del ADN ocurre de una forma brusca cuando el 90% de las cargas del ADN han sido neutralizadas, y ocurriría fundamentalmente por colapsamiento de moléculas individuales de ADN y no tanto por entrecruzamiento de cadenas de ADN próximas.

La observación por microscopía electrónica de estructuras de ADN condensadas por poliaminas muestra elementos toroidales, esféricos o lineales muy definidos (Widom and Baldwin, 1980, Gosule and Schellman, 1978; Chatteraj et al., 1978; Marx and Ruben, 1983).

Tales estructuras podrían ser similares a las encontradas en ciertos virus (Gosule and Schellman, 1976).

Además de actuar condensando al ADN a través de este mecanismo, las poliaminas facilitan la conversión de la forma B del ADN a la forma Z (Behe and Felsenfeld, 1981). Las secuencias ricas en d(C-G) presentan una tendencia superior en adoptar la conformación Z, y las poliaminas se unirían preferencialmente a las regiones ricas en d(C-G) (Igarishi et al., 1982). El ADN en conformación Z presentaría una tendencia mayor a autoagregarse (Rich et al., 1984).

La transición B-Z del ADN resulta además facilitada si el ADN presenta superhelicidad negativa (Singleton et al., 1982). ADN con superhelicidad negativa tiene que estar presente durante la espermiogénesis del gallo como consecuencia del desensamblaje de los nucleosomas (Mezquita, 1985). El incremento en los niveles de poliaminas detectado durante la espermatogénesis (esta tesis) podría actuar favoreciendo que en la transición nucleohistona-nucleoprotamina el ADN adoptara la conformación Z.

En adición a estas acciones sobre la condensación y conformación del ADN, las poliaminas pueden además actuar modificando el funcionalismo de muchos de los enzimas que actúan sobre el ADN.

Las concentraciones de poliaminas requeridas para precipitar al ADN son similares a las necesarias para la acción de encadenamiento del ADN por las topoisomerasas (Krasnow and Cozzarelli, 1982).

Las poliaminas inhiben la acción de las endonucleasas de restricción (Pingoud et al., 1984; Kuosmanen and Pösö, 1985) y nucleasas (Shalitin and Vishlizky, 1984; Vanderbilt et al., 1982; Rowlatt and Smith, 1981), probablemente a través de interferir con la accesibilidad del ADN. Por este mecanismo las poliaminas podrían actuar como agentes protectores del ADN frente a la acción de nucleasas y agentes mutágenos. La espermina muestra tener propiedades antimutágenas en sistemas procariotas y eucaritas (Clarke and Shankel, 1975; Rajalakshmi et al., 1978).

La privación de poliaminas a mutantes deficitarios en su biosíntesis, provoca la aparición de aberraciones cromosómicas y alteraciones en la morfología nuclear (Pohjanpelto and Knuutila, 1982, 1984; Pohjanpelto et al., 1985; Tofilon and Oredson, 1982).

Durante la transición nucleohistona-nucleoprotamina en la espermiogénesis del gallo, tiene lugar una marcada exposición de sitios a nivel del ADN (Mezquita and Teng, 1977b). En esta tesis se muestra que coincidiendo con estos cambios estructurales de la cromatina, se da un incremento en la biosíntesis y niveles de poliaminas (Oliva et al., 1982) que podría actuar ejerciendo las mencionadas funciones de protección y condensación, especialmente en estas células que son las encargadas de transmitir el mensaje genético.

A nivel del nucleosoma y en relación con la estructura de la cromatina, se ha mostrado que a concentraciones elevadas las poliaminas actúan compitiendo con las histonas por el ADN (Agrell and Heby, 1971). Concentraciones de espermina del orden de 5 mM. actúan precipitando a los nucleosomas (Baer and Rhodes, 1983). La espermina facilita el ensamblaje de los nucleosomas "in vitro" a concentraciones del orden 0.01 - 0.1 mM. (Bogdanova, 1984). La adición de poliaminas exógenas a líneas celulares ha mostrado que estas poliaminas actúan provocando una condensación de la cromatina y una reducción del volumen nuclear (Nagl et al., 1984).

Varios de los experimentos realizados en esta tesis consisten precisamente en determinar cuáles son los efectos de las poliaminas sobre la estabilidad de los nucleosomas y si estos pueden ejercer alguna función en el desensamblaje de los nucleosomas que se da durante la transición nucleohistona-nucleoprotamina.

-ARN, transcripción y síntesis proteica:

Los niveles intracelulares de ornitín descarboxilasa y poliaminas aumentan cuando se estimula la síntesis de ARN (Caldarera et al., 1975). Las poliaminas se unen a sitios específicos de las moléculas de ARN de transferencia (Pochon and Cohen, 1972; Russell, 1973). Las poliaminas estimulan la síntesis proteica "in vitro" (Tabor and Tabor, 1976) y diferentes poliaminas presentan efectos distintos en la asociación y disociación de subunidades ribosómicas (Igarashi et al., 1979, 1981; Sperrazza and Spremulli, 1983). Estas serían relacionadas también con los fenómenos de traslación y terminación "In vivo" e "in vitro" (Igarashi et al., 1982; Thompson and Karim, 1982; Thompson et al., 1981).

-Microtúbulos y microfilamentos (citoesqueleto):

Una de las primeras evidencias que relacionaron a las poliaminas con el citoesqueleto provino de la observación de que al bloquear la biosíntesis de poliaminas con α -DFMO se alteraba la organización de microfilamentos y disminuía la citoquinesis (Sunkara et al., 1979). La administración de α -DFMO a mutantes ya deficitarios en la biosíntesis de poliaminas, produce alteraciones en la morfología nuclear y la pérdida de los microtúbulos y microfilamentos (Pohjanpelto et al., 1985; Tofilon and Oredson, 1982).

"In vitro" se muestra que la polimerización de la G-actina resulta inducida por la espermina y la espermidina (Grant et al., 1983).

La microinyección de espermina a amebas (Gawlitta et al., 1981) o a huevos de *Xenopus LAevis* (Grant and Oriol-Audit, 1985) induce cambios que afectan a los filamentos corticales involucrados en la citoquinesis.

La formación de microtúbulos puede hallarse controlada por variaciones cuantitativas y cualitativas de los niveles de poliaminas (Anderson et al., 1985). A concentraciones

-ARN, transcripción y síntesis proteica:

Los niveles intracelulares de ornitín descarboxilasa y poliaminas aumentan cuando se estimula la síntesis de ARN (Caldarera et al., 1975). Las poliaminas se unen a sitios específicos de las moléculas de ARN de transferencia (Pochon and Cohen, 1972; Russell, 1973). Las poliaminas estimulan la síntesis proteica "in vitro" (Tabor and Tabor, 1976) y diferentes poliaminas presentan efectos distintos en la asociación y disociación de subunidades ribosómicas (Igarashi et al., 1979, 1981; Sperrazza and Spremulli, 1983). Estarían relacionadas también con los fenómenos de traslación y terminación "In vivo" e "in vitro" (Igarashi et al., 1982; Thompson and Karin, 1982; Thompson et al., 1981).

-Microtúbulos y microfilamentos (citoesqueleto):

Una de las primeras evidencias que relacionaron a las poliaminas con el citoesqueleto provino de la observación de que al bloquear la biosíntesis de poliaminas con α -DFMO se alteraba la organización de microfilamentos y disminuía la citoquinesis (Sunkara et al., 1979). La administración de α -DFMO a mutantes ya deficitarios en la biosíntesis de poliaminas, produce alteraciones en la morfología nuclear y la pérdida de los microtúbulos y microfilamentos (Pohjanpelto et al., 1985; Tofilon and Oredson, 1982).

"In vitro" se muestra que la polimerización de la G-actina resulta inducida por la espermina y la espermidina (Grant et al., 1983).

La microinyección de espermina a amebas (Gawlitta et al., 1981) o a huevos de *Xenopus LAevis* (Grant and Oriol-Audit, 1985) induce cambios que afectan a los filamentos corticales involucrados en la citoquinesis.

La formación de microtúbulos puede hallarse controlada por variaciones cuantitativas y cualitativas de los niveles de poliaminas (Anderson et al., 1985). A concentraciones

fisiológicas, la espermina actúa facilitando el ensamblaje de la tubulina "in vitro".

Durante la espermiogénesis se dan marcados cambios en la morfología celular y nuclear (ver fig.1), incluyendo el ensamblaje del enorme flajelo de la cola de los espermatozoides. Tal vez las variaciones halladas en los niveles de poliaminas durante la espermatogénesis (Oliva et al.,1982), puedan también guardar relación con estos fenómenos de metamorfosis celular.

-Modificación de multitud de actividades enzimáticas:

La biosíntesis y niveles de poliaminas resultan modificados por la mayoría de hormonas y estímulos regenerativos (Pegg et al., 1982). A su vez las poliaminas actúan modificando un gran número de actividades enzimáticas "in vitro". Tal vez muchas de estas modificaciones tengan poca relevancia, pero a través de este mecanismo las poliaminas podrían en ciertos casos actuar como verdaderos mensajeros intracelulares.

A continuación se citan aquellas actividades enzimáticas que hallándose modificadas por las poliaminas han sido objeto de estudio en nuestro laboratorio, en relación con la espermatogénesis:

- Topoisomerasas (Krasnow and Cozzarelli, 1982; Roca y Mezquita, 1985).
- Acetiltransferasas y desacetilasas de histonas (Mezquita et al., 1980; Oliva and Mezquita, 1982).
- RNA polimerasa (Kleczkowska et al., 1981; Mezquita and Teng, 1977b).
- ADP-ribosilación de histonas (Corominas and Mezquita, 198 ; Ver esta tesis, pag.165).
- Metilación del ADN (Cox, 1979; Rocamora and Mezquita, 1984).
- Metilación de las histonas (Duerre et al., 1982).
- Fosforilación de proteínas (Auberger et al., 1984; Ahmed et al., 1983; Hathaway and Traugh, 1984;

Kinohara et al., 1984; Kuehn and Atmar, 1982; Shibayama et al., 1983; Lough, 1984; Hara et al., 1982; Oliva and Mezquita, 1985).

-Fenómenos de membrana:

Existen evidencias de que las poliaminas pueden ejercer ciertas funciones en relación con los fenómenos de permeabilidad de membrana (Koenig et al., 1983a,b ; Oyanagui, 1984; Young and Kauss, 1983) y especialmente en relación con el ión Ca^{++} (Nicchita and Williamson, 1984; Koenig et al., 1983,b).

El agonista adrenérgico 1-isoproterenol evoca una rápida (5 min.) respuesta de estimulación de endocitosis, transporte de hexosas y aminoácidos dependiente de Ca^{++} y receptor (Koenig et al., 1983b).

El 1-Isoproterenol evoca también en el mismo modelo un rápido y transitorio incremento en la actividad ornitina descarboxilasa y niveles de poliaminas. La aplicación de α -DFMO conjuntamente con la administración del agonista adrenérgico, bloquea el incremento en la actividad ornitina descarboxilasa y niveles de poliaminas, así como la entrada intracelular de calcio y la estimulación de la endocitosis transporte de exosas y de aminoácidos (Koenig et al., 1983c). La activación de la ornitina descarboxilasa estaría mediada por Ca^{++} , prostaglandinas y AMP cíclico.

Estos autores postulan que la apertura de los canales de calcio involucraría en ellos un cambio conformacional que resultaría del desplazamiento del calcio unido intracelularmente a las moléculas del canal, por parte de las poliaminas.

El calcio estimula a la ornitina descarboxilasa (Langdon et al., 1984).

En adición de mediatizar la apertura de los canales de calcio, las poliaminas podrían contribuir al incremento de calcio intracelular a través de movilizar las reservas intracelulares de este ión (Nicchita and Williamson, 1984).

-Unión covalente a proteínas:

El factor de iniciación en la traducción eIF-4D contiene el aminoácido hipusina, el cual se forma a partir de lisina y espermidina (Cooper et al., 1983; Park et al., 1984). Existe una molécula de hipusina por molécula de eIF-4D, y el sitio de incorporación parece estar muy conservado en las distintas especies, lo que sugiere una importante función para esta modificación (Torrellio et al., 1984).

La incorporación de poliaminas a proteínas nucleares experimenta un incremento durante la regeneración hepática. El núcleo celular contiene una transglutaminasa (EC. 2.3.2.13) capaz de conjugar poliaminas. Poliaminas marcadas radioactivamente efectivamente resultan incorporadas a proteínas (Haddox and Russel, 1981). Beninati et al. (1985) muestran que la unión covalente de poliaminas mediada por transglutaminasa, se da en el hígado, riñones y testículos de rata.

Se ha descrito también la incorporación covalente de poliaminas a proteínas de la superficie de la membrana celular:

En células de neuroblastoma (Chen, 1984), la transglutaminasa cataliza la incorporación de putrescina a la superficie de las células.

La espermidina resulta unida por la transglutaminasa a ciertas proteínas del líquido seminal que estarían en relación con las funciones del espermatozoide (Paonessa et al., 1984).

Los niveles de poliaminas en el semen son elevados, y se especula una función para las poliaminas como agentes de enmascaramiento inmunológico de la superficie del espermatozoide (Paonessa et al., 1984). Las poliaminas se han involucrado también en la regulación de la coagulación del líquido seminal actuando como sustratos competitivos de las transglutaminasas que ejercerían esta función. (Williams-Ashman et al., 1980; Williams-Ashman, 1984).

1.2.3.2.3.- Polianiones:

De forma análoga a como los policationes a través de su unión con el ADN pueden actuar modulando la estructura de la cromatina, los polianiones, a través de interaccionar con las histonas podrán también producir cambios en la estructura nuclear.

Entre los compuestos policationicos que podrían modular la estructura de la cromatina eucariota, cabe destacar la nucleoplasmina (Laskey et al., 1978), proteína que ha demostrado ser un eficiente factor de ensamblaje de los nucleosomas "in vitro".

Las proteínas HMG 1 y 2, contienen también una secuencia polianiónica de ácido poliglutámico en el extremo carboxi-terminal de la molécula. La HMG 1 se considera un factor de ensamblaje en el hígado de rata (Bonne-Andrea et al., 1984). Asimismo, polianiones tales como el poliglutámico y el poliaspártico (Stein et al., 1979) y el ARN (Nelson et al., 1981) facilitan el ensamblaje de cromatina "in vitro".

La tubulina, aunque no exclusivamente nuclear, es también un polianión que podría ejercer ciertas acciones sobre la estructura de la cromatina. Dado que la tubulina se ha hallado asociada a la cromatina (Douvas et al., 1975; Farr et al., 1979; Menko and Tan, 1980) y que no interacciona con el ADN (Corces et al., 1980), parece razonable pensar que pueda actuar asociándose a las histonas. Mithieux et al. (1984) ha descrito que la tubulina interaccionaría con las histonas en el orden $H4=H3 > H2A=H2B > H1$. En un estudio similar Stros et al. (1984) encuentran que la afinidad del compuesto polianiónico polipentosulfato hacia las histonas sería $H4=H3 > H2A > H2B > H1$, similar a la de la tubulina. Este orden de afinidad es semejante al que el ADN muestra hacia las histonas.

Todavía no hay estudios sobre el efecto que la tubulina ejercería sobre la estabilidad de los nucleosomas.

1.2.3.3.- Topología y modificaciones químicas del ADN:

-Topología del ADN:

Tan pronto se describió el modelo de Watson y Crick (1953) del ADN, se planteó cómo podría desnaturalizarse una doble hélice (para permitir los procesos de transferencia de la información genética) sin crear un superenrollamiento y estrés torsional (Crick, 1976).

La disposición circular del ADN en los procariotas y en loops en los eucariotas, y la presencia de topoisomerasas (enzimas que modifican el número de enlace del ADN) indica la importancia que la topología del ADN debe de tener sobre la estructura de la cromatina.

En los eucariotas, el papel de las topoisomerasas se ha intentado relacionar con la replicación, transcripción, recombinación, reparación, ensamblaje nucleosómico y condensación y segregación nucleosómica (Ryoji and Worcel, 1984; Glikin et al., 1984; Di Nardo et al., 1984; Halligan et al., 1982).

Una tensión superhelicoidal negativa podría favorecer el ensamblaje de nucleosomas y también que el ADN adoptara la conformación Z (Singleton et al., 1982). Y al revés, una tensión superhelicoidal positiva podría favorecer el desensamblaje de los nucleosomas y evitar que el ADN adoptara la conformación Z.

-Metilación del ADN:

La metilación del ADN es una modificación covalente post-replicativa que consiste en la introducción de un grupo -CH₃ en el carbono 5 de las citosinas.

Existen evidencias de una correlación entre hipometi-

lación y transcripción (Bird et al., 1981; Ott et al., 1982) y entre metilación y diferenciación celular (Konieczny and Emerson, 1984; Taylor, 1984; Jahner et al., 1982).

"In vitro" la metilación del ADN favorece la adopción de la conformación Z (Rich et al., 1984). Si bien a través de este mecanismo la metilación podría presentar ciertas acciones biológicas, existen otras hipótesis acerca de su significado. La desmetilación selectiva de ciertos genes podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales una célula totipotente se convertiría en diferenciada.

En la espermatogénesis del gallo se da una hipometilación del ADN (Rocamora and Mezquita, 1984) en las células meióticas y postmeióticas.

-Unión covalente de putrescina al ADN : Ver pag. 42.

1.2.3.4.-Presencia de proteínas no histonas:

Por definición, proteína no histona, sería cualquier proteína nuclear eucariótica que no fuese una histona (Bradbury et al., 1981). Estas incluyen los enzimas para la replicación, transcripción, modificaciones químicas de las histonas y del ADN, Topoisomerasas, HMG, proteínas de la matriz nuclear, proteínas reguladoras, y cualquier otra proteína relacionada con la fisiología del núcleo eucariota.

En cada núcleo existirían un grupo muy reducido de proteínas (proteínas reguladoras) que serían las que junto con otras señales (Metilación, translocaciones) serían las responsables del tipo de información que se expresa en una célula particular. En cambio, la mayoría de proteínas no histonas de una célula serían comunes a todas

las células (Enzimas, HMG y proteínas que controlan la estructura nuclear) variando su actividad o niveles en relación con las necesidades de actividad génica de la célula.

Entre las proteínas no histonas que pueden tener papeles estructurales mas bien estudiadas están las HMG.

Inicialmente las HMG (High Mobility Group: proteínas de alta movilidad electroforética) fueron aisladas como impurezas de la fracción de histona H1 extraída con ácido perclórico (Johns et al., 1964) siendo su número 16. Más tarde se vió que la mayoría de estas correspondían a productos de degradación de otras HMG a de histonas, y actualmente han quedado reducidas a 4 proteínas: HMG1 (P.M.29.900), HMG2 (P.M. 28.800), HMG14 (P.M.10.700) y HMG17 (P.M.9.240).

Aparte de estas 4 HMG clásicas, también existen otras proteínas que se suelen nombrar con el prefijo "HMG": La HMG 20 (Conocida actualmente como ubicuitina), HMG X (Strauss and Varshavsky, 1984), HMG G (Bakayev et al., 1978), HMG E (Marekov et al., 1984), HMG T (Watson et al. 1977). La histona H6 es la equivalente a las HMG 14 y HMG 17 en el testículo de trucha.

HMG 1 y HMG 2:

La mitad C-terminal de estas proteínas está formada por 40 residuos aniónicos (ácido poliglutámico y ácido poliaspártico). El extremo N-terminal tendría en cambio un carácter básico.

Se ha descrito que la HMG 1 podría actuar como un factor coadyudante en la formación de nucleosomas (Bonne-Andrea et al., 1984), tendría un efecto decondensador de la cromatina por desestabilización de DNA (Marekov and Beltchev, 1982) y modificaría la superhelicidad del ADN.

El dominio polianiónico de las HMG 1 y 2 podría interactuar con los dominios básicos de las histonas (extremo C-terminal de la H1), y el extremo N-terminal con el ADN.

Coincidiendo con la transición nucleohistona-nucleoprotamina en la espermatogénesis del gallo, se da un incremento

de la relación HMG 1 / histonas nucleosómicas y de la relación HMG 2 / histonas nucleosómicas (Chiva and Mezquita, 1983).

HMG 14 y HMG 17:

Su extremo C-terminal es ácido. La topología del ADN no resulta modificada por ellas, aunque influyen sobre las topoisomerasas.

Estudios de digestión con nucleasas indican que las HMG 14 y 17 se hallarían asociadas a la partícula núcleo, mientras que las HMG 1 y 2 se hallarían preferentemente en la región internucleosomal.

Ubiquitina:

La ubiquitina es un polipéptido de 76 residuos (P.M. 8.565) presente en todas las células eucariotas. Puede hallarse en forma libre o bien unida covalentemente a proteínas, siendo el conjugado más abundante el que forma con la H2A : Proteína A24.

La ubiquitina puede estar involucrada en un sistema proteolítico dependiente de ATP (Hershko et al., 1980), en la modulación de la desacetilasa de histonas (Mezquita et al., 1982) y a través de su unión con la H2A como un mecanismo de relajación de la estructura de la cromatina (Matsui et al., 1979; Levinger and Varshavsky, 1982).

El contenido de A24 aumenta durante la espermatogénesis del gallo, alcanzando su máximo al final de la espermiogénesis cuando los nucleosomas resultan desensamblados y sustituidos por el complejo nucleoprotamina (Agell et al., 1983).

1.2.4.- La transición nucleohistona-nucleoprotamina "in vivo" e "in vitro".

La relación entre proteínas básicas nucleares y el ADN es de aproximadamente 1.1 (w./w.) en las células premeióticas, meióticas y espermáticas redondas. Esta relación disminuye a aproximadamente 0.55 (w./w.) en el espermatozoide (Mezquita and Teng, 1977a; Loir and Lanneau, 1978; Louie and Dixon, 1972).

A pesar del menor contenido de proteínas respecto al ADN, el núcleo del espermatozoide presenta una estructura mucho más compacta que la nucleohistona (Mezquita and Teng 1977a; Shih and Bohner, 1970; Subirana, 1975). Ello es debido al carácter altamente básico de las protaminas (48-80% (w./w.) de (Lys.+ Arg.)). (Ver estructura de la nucleohistona y estructura de la nucleoprotamina; introducción pag. 10-24).

En contra de lo que pudiera en principio intuirse de que a medida que progresa la espermiogénesis, la cromatina va resultando progresivamente compactada por la protamina durante la transición nucleohistona-nucleoprotamina se da una marcada exposición de sitios a nivel del ADN (Mezquita and Teng, 1977a,b; Loir and Lanneau, 1978; Grimes and Smart, 1985).

En el gallo, esta exposición de sitios ha sido demostrada a través de medir la unión de actinomicina D y la síntesis de ARN "in vitro" en la cromatina procedente de distintas fases de la espermiogénesis (Mezquita and Teng 1977b). La actinomicina D se une con más eficiencia al ADN cuanto más accesible resulta este. Los núcleos de espermáticas alargadas (que están en plena transición nucleohistona-nucleoprotamina) son los que muestran una unión más elevada de actinomicina D (Fig. 12).

De forma similar, el número de sitios de iniciación y la velocidad de elongación en la síntesis de cadenas de ARN

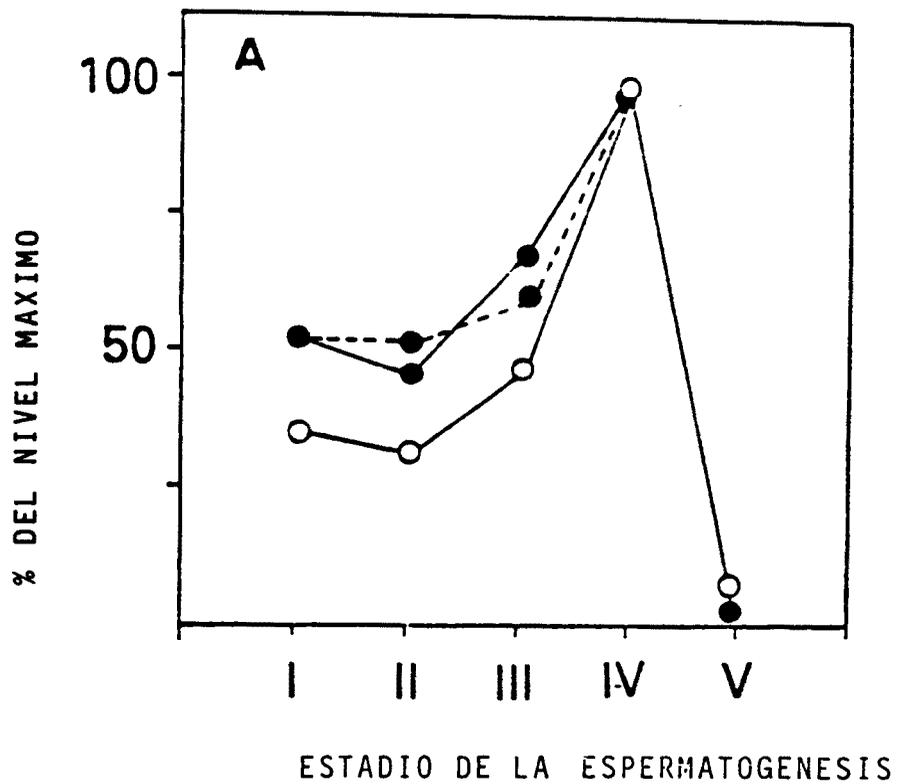


Fig 12.

Exposición de sitios a nivel del ADN en la transición nucleohistona-nucleoprotamina. Obtenido de Mezquita (1985).

"in vitro" es tanto más elevado cuanto más expuesto está el ADN. Ambos alcanzan su máximo en los núcleos de espermátidas alargadas (Fig. 12).

Esta exposición de sitios tiene su lógica, pues para que la nucleohistona tenga accesibilidad a las proteínas y maquinaria que van a reemplazarla, primero es preciso que relaje su estructura. Asimismo, esta exposición de sitios puede ser consecuencia de las modificaciones de la cromatina que conduzcan al desensamblaje de los nucleosomas

¿Cuáles son pues los cambios que experimenta la nucleohistona que conducen a la exposición de sitios en el ADN?

La acetilación de las histonas podría actuar relajando la estructura de la cromatina y favorecer el desensamblaje de los nucleosomas (introducción pag. 25-27).

El estudio de la acetilación de las histonas durante la espermatogénesis del gallo y de su efecto sobre la estabilidad de los nucleosomas, ha sido uno de los objetivos de esta tesis. Se muestra cómo coincidiendo con la transición nucleohistona-nucleoprotamina las histonas resultan hiperacetiladas (Oliva and Mezquita, 1982, 1986).

Esta hiperacetilación se da también en otras especies que reemplazan las histonas por protaminas; en la trucha (Christensen et al., 1984) y en la rata (Grimes and Henderson, 1984a,b), y no se da en especies que no reemplazan las histonas en el núcleo de su espermatozoide (Ruiz-Carrillo and Palau, 1973; Kennedy and Davies, 1980).

El conjugado covalente ubicuitina-H2A (uH2A ò A24) aumenta a medida que progresa la espermiogénesis (Agell et al., 1983). Esta modificación ejercería poco efecto sobre la estabilidad de nucleosomas individuales, aunque sí que podría modificar las interacciones internucleosómicas evitando la formación de superestructuras y por lo tanto contribuir al relajamiento de la cromatina.

El contenido en HMG 1 y HMG 2 respecto a las histonas aumenta también a lo largo de la espermatogénesis (Chiva and Mezquita, 1983). La presencia de estas proteínas decondensadoras de la cromatina, resulta congruente con los cambios estructurales de la transición nucleohistona-nucleoprotamina.

La exposición de sitios a nivel del ADN en la transición nucleohistona-nucleoprotamina plantea dudas adicionales: ¿Cuáles son los mecanismos que actúan protegiendo frente a la acción de nucleasas y agentes mutágenos a este ADN expuesto, precisamente en estas células que son las responsables de vehiculizar la información genética?

Las poliaminas poseen propiedades antimutágenas, inhiben a las nucleasas y pueden actuar condensando al ADN (ver introducción pag. 41-44). En esta tesis se muestra que coincidiendo con la exposición de sitios a nivel del ADN y el desensamblaje de los nucleosomas, se da un aumento en la síntesis y niveles de poliaminas que podría ejercer las mencionadas funciones de condensación y protección del ADN (Oliva et al., 1982).

La acetilación de las histonas y la presencia de no histonas puede explicar la relajación de la cromatina y la exposición de sitios a nivel del ADN, pero, ¿Cuáles son los factores que determinan el desensamblaje de los nucleosomas?

Si bien la hiperacetilación de las histonas y la presencia de ciertas proteínas no histonas pueden desestabilizar la estructura nucleosómica, por si solas no bastan para explicar el desensamblaje de los nucleosomas (Bode et al., 1983; McGhee et al., 1983).

En otras especies, proteínas de transición podrían jugar un papel importante en la transición nucleohistona-nucleoprotamina (Loir and Lanneau, 1978). Tales proteínas no se han detectado en las espermátidas del gallo.

Dado el carácter altamente policationico de las protaminas, estas pueden actuar compitiendo con las histonas por el ADN, especialmente si las cargas positivas de los brazos de las histonas se hallan neutralizados por acetilación. De esta forma las protaminas podrían por si mismas ser capaces de desensamblar a los nucleosomas.

Los experimentos clásicos de desensamblaje de nucleosomas por las pequeñas protaminas de peces (P.M. aprox.=5.000) muestran que estas son relativamente ineficientes en el desensamblaje incluso a relaciones protamina / ADN varias veces superiores a las fisiológicas (Bode et al., 1977). Utilizando nucleosomas hiperacetilados con butirato, las mismas protaminas consiguen desplazar tan sólo 30% de las partículas nucleosómicas con una relación arginina / nucleótido = 0.4-4 (Bode et al., 1983).

Esta ineficiencia por parte de las protaminas de peces para desensamblar a las histonas de nucleosomas, hizo proponer que el desensamblaje podría tener lugar gracias a la acción de proteasas asociadas a la cromatina (Wong and Marushige, 1975; Marushige and Marushige, 1983).

En esta tesis se muestra cómo la protamina galina, con un tamaño de casi el doble del de las protaminas de peces, es capaz de desensamblar completamente a nucleosomas "in vitro" a una relación arginina / nucleótido = 0.6 - 1.2 próxima a la fisiológica (Oliva and Mezquita, 1986) (Relación arginina / nucleótido en el nucleo del espermatozoide = 0.8).

Los resultados obtenidos indican que ambos, la hiperacetilación de las histonas, y el número de residuos de arginina unidos a un segmento de ADN, pueden actuar modulando el desensamblaje de los nucleosomas en la transición nucleohistona nucleoprotamina.

1.3.- ESTRUCTURA, EVOLUCION, SECUENCIA Y EXPRESION DE LOS GENES DE PROTAMINAS

Expresión génica durante la espermatogénesis:

En las espermatogonias y las fases tempranas de la mitosis tiene lugar una intensa síntesis de ADN y una rápida transcripción de los genes de histonas. Esta síntesis de ADN e histonas probablemente continúan en los espermátocitos primarios, aunque en menor grado, según se desprende de la caída en los niveles de ARN mensajero que se detecta mediante "Northern blot" (Dixon et al., 1985).

Coincidiendo con la inhibición de la transcripción de los genes de histonas, se produce en estas células la activación de la transcripción de los genes específicos de la espermatogénesis.

Los genes candidatos a ser transcritos durante la espermatogénesis, son por lo menos aquellos que codifican para proteínas típicas del espermatozoide. En el gallo:

- Protamina: proteína del núcleo del espermatozoide.
- Acrosina: Proteasa mayoritaria del acrosoma.
- Tubulina: Proteína del flagelo de la cola y los microtúbulos perinucleares de las espermátidas.

Expresión de los genes de protaminas:

En la trucha, la síntesis del mensajero de la protamina es detectable por primera vez en los espermatoцитos primarios (Iatrou et al., 1978), y cesa con el inicio de la espermatogénesis (con la aparición de células haploides).

Los ARN mensajeros de la protamina quedarán inicialmente secuestrados en la forma de "mRNP" inactivas para la traducción (Gedamu et al., 1977; Sinclair and Dixon, 1982). Solo más tarde, en las espermátidas, estas partículas "mRNP" pasarán a polisomas siendo traduccionalmente activas (Sinclair and Dixon, 1982). La protamina así recién sintetizada es monofosforilada en el citoplasma y transportada rápidamente al núcleo (Trevithick et al., 1969; Louie and Dixon, 1972), donde experimenta fosforilaciones ulteriores.

Esta síntesis meiótica de los mensajeros que se traducirán más tarde durante la gametogénesis, se da también en otras especies (Davidson, 1976).

En la rata y en el ratón, a diferencia de lo que ocurre en la trucha, la síntesis del mensajero de la protamina se inicia en células haploides que inician la espermiogénesis (Kleene et al., 1983; Hecht et al., 1985; Stern et al., 1983; Fujimoto et al., 1984; Erickson et al., 1980).

En esta tesis se muestra cómo en el gallo, al igual que en los mamíferos, la síntesis del mensajero de la protamina es postmeiótica (Oliva et al., 1986).

La transcripción de ARN mensajeros en células haploides espermatogénicas debe de tener efectos sobre la diferenciación del espermatozoide, dado que conduce a la expresión de alelos recesivos resultantes de la transmisión desigual de alelos a la progenia. El efecto de la expresión génica haploide en mamíferos es rara, estando restringida a distorsiones en las relaciones de transmisión en el locus "t" por

los machos en el ratón (Erickson et al., 1981; Bennet, 1975) y la falta por parte de los ratones transgénicos machos de transmitir un gen de fusión (metallothionein-thymidine kinase) a la progenia.

Estructura de los genes de protaminas:

En la trucha, a diferencia de lo que ocurre con los genes de las histonas, los genes de las protaminas están representados en el genoma individualmente y no en forma de "cluster" (Connor et al., 1984; Sakai et al., 1978).

En uno de los clones estudiados existen 7 Kb. a cada lado de un gen de protamina que no contienen ningún otro gen (Dixon et al., 1985).

A pesar de esta disposición aislada de los genes de protaminas dentro de una pequeña región del genoma, se ha detectado en otras especies que los genes que se expresarían en la espermatogénesis se hallarían reunidos en un cromosoma (Fellous M., comunicación personal, 1986).

Los genes de las protaminas no contienen intrones, un hecho poco frecuente que solo comparten algunos genes como los de las histonas, el interferón humano y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Lipman and Maizel, 1982). Tampoco se expresan en forma de precursor del péptido final (Dixon et al., 1985).

Región codificante de los genes de protaminas:

El estudio de las variaciones en la secuencia de nucleótidos entre los distintos genes de protaminas tiene un evidente interés evolutivo y se comentará junto con la evolución de los genes de protaminas (Introducción pag. 66).

La frecuencia de los distintos codones que codifican para los aminoácidos de las protaminas se representa en la figura 13.

UUU Phe 0	UCU Ser 0	UAU Tyr 0	UGU Cys 0
UUC Phe 0	UCC Ser 16	UAC Tyr 0	UGC Cys 0
UUA Leu 0	UCA Ser 0	UAA Term 0	UGA Term 0
UUG Leu 0	UCG Ser 0	UAG Term 8	UGG Trp 0
CUU Leu 0	CCU Pro 4	CAU His 0	CGU Arg 27
CUC Leu 0	CCC Pro 11	CAC His 0	CCG Arg 52
CUA Leu 0	CCA Pro 0	CAA Gln 0	CGA Arg 8
CUG Leu 0	CCG Pro 0	CAG Gln 0	CGG Arg 5
AUU Ile 0	ACU Thr 0	AAU Asn 0	AGU Ser 0
AUC Ile 3	ACC Thr 0	AAC Asn 0	AGC Ser 6
AUA Met 0	ACA Thr 0	AAA Lys 0	AGA Arg 18
AUG Met 3	ACG Thr 0	AAG Lys 0	AGG Arg 40
GUU Val 1	GCU Ala 0	GAU Asp 0	GGU Gly 0
GUC Val 4	GCC Ala 4	GAC Asp 0	GGC Gly 8
GUA Val 0	GCA Ala 0	GAA Glu 0	GGA Gly 8
GUG Val 8	GCG Ala 0	GAG Glu 0	GGG Gly 0

Fig 13.

Frecuencia de los distintos codones que codifican para los aminoácidos de las protaminas (Gedamú et al., 1981).

Dada la riqueza en arginina de las protaminas, y siendo el codón más frecuente que codifica para la arginina el "CGC", la secuencia codificante resulta ser muy rica en "CG":

62 % de C+G en el ratón (Kleene et al., 1985).

70 % de C+G en la trucha (Dixon et al., 1985).

Esta riqueza en "CG" se da también el cDNA de la protamina del gallo (Oliva et al., 1986).

Región flanqueante 5´:

A nivel de ARN mensajero, las secuencias 5´no codificantes difieren notablemente en su longitud entre las distintas protaminas secuenciadas a nivel de CDNA: 14-19 bases en la trucha (Dixon et al., 1985) y 113 en el ratón (Kleene et al., 1985).

En la trucha, los 25 primeros nucleótidos hacia arriba del codón de iniciación de la traducción están muy conservados. La "TATA box" se halla localizada de -29 a -34 bp. hacia arriba. Se encuentra también en esta región una secuencia de 11 bp. (TATAAAAGGGA) muy conservada en todos los clones de protamina estudiados, y que resulta idéntica a la secuencia del promotor principal tardío del Adenovirus (Ziff and Evans, 1978) y con el promotor de la conalbúmina gallina (Corden et al., 1980).

El reemplazamiento del TATA box del gen de la protamina en la trucha, por el gen de la timidin kinasa del herpes virus, provoca una "down regulation" por un factor de 10, indicando que el promotor natural de la protamina es muy potente (Wagner et al., 1981).

Además de este potente promotor eucariota, se ha encontrado otro promotor que puede controlar la transcripción de un gen procariótico, el de la cloramfenicol acetiltransferasa, casi tan eficientemente como lo haría su promotor natural (Dixon et al., 1985).

Otras regiones conservadas en los distintos clones de protamina en la trucha (-92 a -71, y-165 a -141 desde el inicio de traducción), puedan probablemente ejercer funciones en la coordinación de la expresión de los aparentemente aislados y dispersos genes de protaminas.

En el ratón se encuentra también la secuencia consenso (GCACCAUGG) para la iniciación de la síntesis proteica en los eucariotas (Kozak, 1984).

Región flanqueante 3´:

En la trucha, la región flanqueante 3´ del ARN mensajero de la protamina, se mantiene también bastante conservada en las distintas variantes estudiadas del mismo (Dixon et al., 1985).

En las 3 especies, la trucha, el ratón y el gallo (esta tesis), contienen en esta región la señal canónica de poliadenilación AAUAAA, supesta necesaria para la poliadenilación y/o la terminación del transcrito (Fitzgerald and Shenk, 1981; Montell et al., 1983). Los ARN mensajeros de la protamina en el ratón y en la trucha son poliadenilados cuando se almacenan en forma de ribonucleoprotaminas, y resultan deadenilados cuando son traducidos (Iatrou and Dixon, 1977; Kleene et al., 1984).

En la trucha, esta región contiene el punto en el que termina el ARN mensajero (posiciones 211-219)(AACTAAAA), de tal forma que las 4 primeras adeninas de la cola de poliadenilación están codificadas por el genoma. Al igual que la región codificante, esta región es muy rica en "CG".

Aproximadamente 1 kb. abajo del gen de la protamina en la trucha, aparece una secuencia rica en "AC" constituida por duplicaciones de 46 bp. "repeats" separados por "spacers" de 20 bp. Se ha descrito que esta secuencia rica en "AC" puede adoptar la conformación Z bajo condiciones de fuerza

iónica fisiológica, si se halla incorporada a un plásmido con superhelicidad negativa (Connor et al., 1984).

Número de genes de protamina por genoma:

En la trucha existirían entre 15 y 20 copias del gen de la protamina por genoma diploide. Estas 15-20 copias corresponderían a unas 2-3 copias de 6 genes de protamina distintos (Dixon et al., 1985).

Origen y evolución de los genes de protaminas:

Al analizar el tipo de protaminas que aparecen en las distintas ramas del árbol evolutivo, da la impresión de que existe poca correlación entre los determinados tipos de protaminas y los diversos grupos de animales de la escala evolutiva (Figura 14).

La hipótesis que actualmente explica de una forma más satisfactoria esta distribución aparentemente esporádica, sostiene que los genes de las protaminas habrían divergido más rápidamente que, por ejemplo, los genes de las histonas. Esta divergencia más rápida sería debido a que las proteínas específicas básicas del núcleo del espermatozoide se hallarían bajo unas fuerzas selectivas menos estrictas que las de otros genes mucho más conservados, en donde pequeños cambios podrían resultar fatales para ejercer su función celular (Isenberg, 1979).

Al comparar la secuencia de distintas protaminas resultan evidentes un gran número de similitudes, sugiriendo estas la existencia de precursores comunes en la escala evolutiva (fig 15). Uno de los motivos bien conservados en las distintas protaminas, es la presencia de bloques de 4 argininas (fig. 15). Por la distribución de estos bloques, y por poseer la protamina galina un tamaño de casi el doble del de las protaminas de peces, Dixon et al.(1985) han sugerido

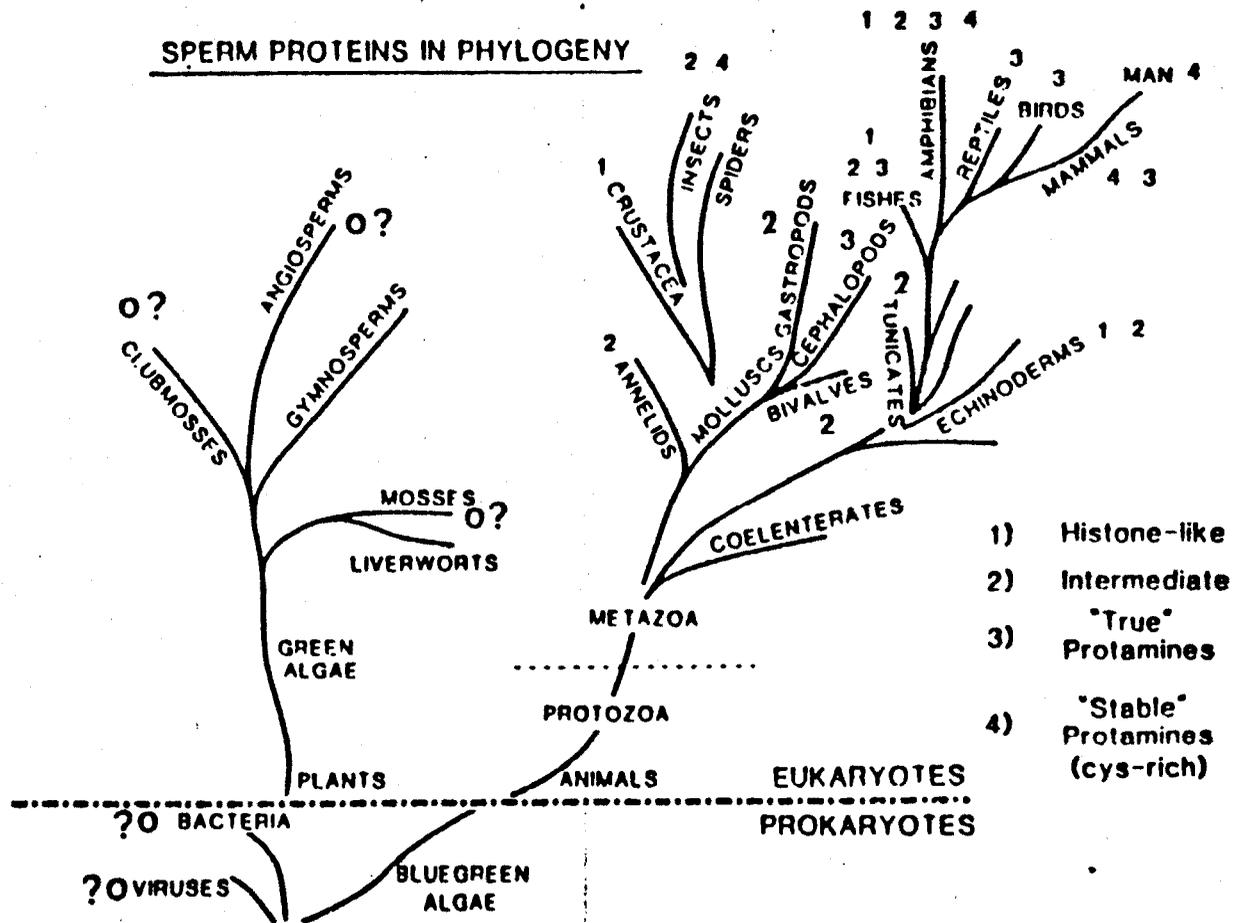


Fig 14.

Distribución de los distintos tipos de proteínas nucleares del espermatozoide en las distintas ramas del árbol evolutivo (Dixon et al., 1985).

que ésta tal vez se trate de una duplicación de las protaminas de peces (Dixon et al., 1985).

Una diferencia radical entre las protaminas de aves y peces, y las de mamíferos, es que estos últimos poseen cisteínas. Se especula que las cisteínas podrían haber aparecido como mutaciones puntuales de los codones de la arginina "CGU" y "CGC" o de las serinas "AGU" y "AGC" para convertirse en codones de la cisteína "UGU" y "UGC".

A pesar de que el análisis de las secuencias a nivel de proteína pueden sugerir ya algunas analogías, para reflejar mejor los cambios evolutivos, el estudio de las rutas específicas de divergencia debe realizarse a través del estudio de la secuencia de nucleótidos de los distintos genes.

Dixon et al. (1985) han establecido un esquema para explicar las divergencias evolutivas de distintas truchas basada en el análisis de los nucleótidos de los respectivos genes (Fig. 16).

Una hipótesis que explicaría la aparición esporádica de protaminas "verdaderas" entre peces, reptiles y aves sostiene que los genes de éstas pueden haber aparecido por transmisión horizontal, por ejemplo por un virus, y no como normalmente ocurriría en la evolución por una transmisión vertical. Los puntos que apoyarían esta hipótesis son los siguientes (Dixon et al., 1985):

1.-La falta de intrones en los genes de las protaminas sería más característico de los genes procariotas que de los genes eucariotas.

2.-El promotor de la protamina idéntico al promotor procariótico del adenovirus, con un solapamiento de 11 bp.

3.-Existen notables homologías entre las proteínas ricas en arginina del virus de la hepatitis B y la protamina galina (Pasek et al., 1979).

4.-Ciertas proteínas básicas de E.Coli, son muy similares a las protaminas de peces.

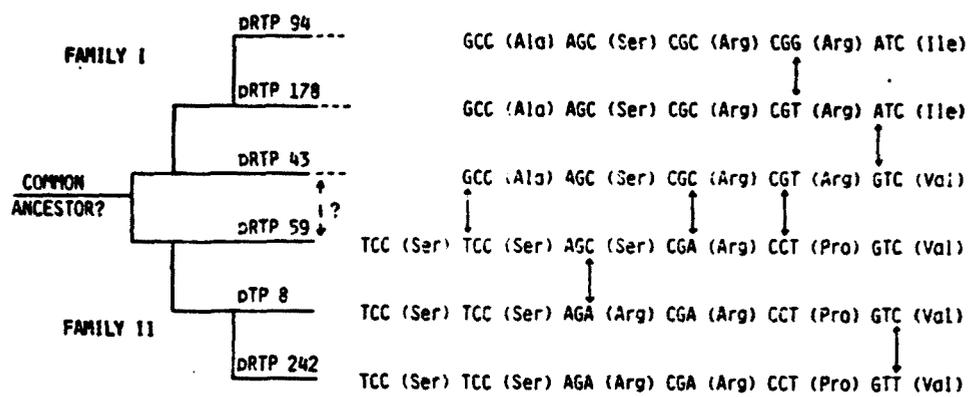


Fig 16.

Divergencias evolutivas en la secuencia de nucleótidos de distintas protaminas de trucha (Dixon, 1985).

5.-Un potente promotor procariota existe en la región 5' del gen de la protamina en la trucha.

6.-En la región flanqueante del gen de la protamina existen secuencias muy similares a los "long terminal Repeats" característicos de los genes de retrovirus insertados en ADN genómico.

La secuencia de aminoácidos de las protaminas galina y de peces, y de la proteína del "core" del virus de la hepatitis B son extremadamente ricas en arginina y ejercen aparentemente la misma función de empaquetamiento y condensación del ADN. Si un gen primordial rico en argininas se hubiese introducido en la línea germinal de los vertebrados primitivos, su habilidad para condensar el ADN hubiera conferido suficientes ventajas en la maduración del espermatozoide como para que se hubiese conservado en la evolución (Dixon et al. 1985).

:

MATERIAL Y METODOS

MATERIALES:

Gallos "Hubbard White Mountain" de 8-50 semanas de edad, fueron obtenidos de la granja "Las Planas", Manresa, Barcelona.

Los siguientes productos químicos se obtuvieron de los proveedores indicados:

Isótopos:

DL - (1 - ^{14}C) - ornitina (Radioactividad esp. 50 Ci/mol)
S-Adenosyl-L-(1- ^{14}C)metionina (61 Ci/mol)
(1,4- ^{14}C) - Putrescina (Radioactividad esp. 116 Ci/mol)
(^3H) - Acetato (Radioactividad específica 300 Ci/mol)
 ^{14}C - Acetil CoA
Citidina 5' - (α - ^{32}P) trifosfato
Adenosina 5' - (γ - ^{32}P) trifosfato
Adenosina 5' - (α - ^{35}S) trifosfato
 ^3H - Timidina
 ^{14}C - NAD

Fueron suministrados por Amersham (Reino Unido).

Enzimas de Restricción:

Hind III
Pvu I
EcoRI
Bam H I.

Fueron suministrados por Biolabs.

Nucleasa Minococal, Proteínasa K, DNA Polimerasa I, Klenow y Fosfatasa alcalina fueron suministrados por Boehringer.

DNA Ligasa, "DNA Blunt end Ligase" transcriptasa inversa, polinucleótido kinasa y RNAasa H fueron suministrados por PL-Farmacia.

Albúmina de suero bovino, inhibidor de la tripsina y DNasa I obtenidos de Calbiochem (San Diego, CA, USA). "Minimum essential medium" y tripsina fueron suministrados por "Grand Island Biological Co." (Grand Island, NY, USA). Espermina, espermidina, putrescina, cloruro de dansilo y salmina hidrocioruro fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, USA). Placas para cromatografía en capa fina de gel de sílice 60, tris, EDTA, Difetilamina, glicerol, prolina, ditiotritol, L-ornitina, Piridoxal 5'-trifosfato, sulfato de salmina. El resto de los productos fueron de grado analítico.

Como norma, el agua utilizada en los diversos experimentos fué previamente destilada, y desionizada con un equipo miliQ. Para la tinción y destinción de geles se utilizó simplemente H₂O destilada (excepto cuando se realizó tinción argéntica). Para lavar el material volumétrico se utilizó simplemente H₂O destilada, excepto en las fases de clonaje y secuenciación de genes en los que además el material se enjuagó finalmente con H₂O desionizada.

Método:

Los gallos se anestesian con éter, sacrifican por dislocación cervical, y sangran para remover la mayor parte de sangre del testículo.



Rápidamente se extraen los testículos, se remueve la albugínea con la ayuda de pinzas y tijeras quirúrgicas, y los testículos son finamente troceados en un vaso de precipitados de 50 ml. con unas tijeras quirúrgicas curvas (que corten bien) durante 2 min.



20 g de tejido así finamente troceado se suspenden cuidadosamente en 10 volúmenes (200 ml.) de 0.1% tripsina, 2ug/ml DNAasaI en MEM. La suspensión se incuba a 31°C durante 30 min con agitación muy suave (o bien sin agitación y agitando entonces manualmente cada 5 min. con suavidad) en un erlenmeyer de 500 ml.



Después de la incubación, la suspensión se filtra con 4 capas de gasa quirúrgica y el filtrado se centrifuga durante 10 min a 1.500 g. en un rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman).



Desechar sobrenadante

El pellet se resuspende cuidadosamente en 50 ml. de 0.02% (w/v) de inhibidor de la tripsina, 0.1% (w/v) de BSA en MEM. Sedimentar 10 min a 1.500 g. en un rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman).



Desechar sobrenadante

El pellet así obtenido consta de células individualizadas con motilidad conservada y una vitalidad superior al 99% (Determinada mediante tinción con "Trypan blue").

2.1.1.1.2.- Separación de células a gravedad unitaria:

<u>Disoluciones:</u>	<u>-10x PBS</u>	<u>1 litro</u>	<u>5 litros</u>
	ClNa	80 g	400 g
	ClK	2 g	10 g
	PO ₄ HNa ₂ ·2H ₂ O	11.5 g	57.5 g
	PO ₄ H ₂ K	2 g	10 g
	H ₂ O hasta	1000 ml.	5000 ml.

(Puede guardarse congelado)

-100 ml de 1x PBS:

10x PBS	10 ml.
H ₂ O hasta	100 ml.

(Comprobar que el pH sea de 7.35 ± 0.05
y la osmolaridad de 280 mOsmoles/litro.
No es necesario si se ha preparado a
conciencia)

-PMSF 100 mM. en isopropanol:

PMSF:	172 mg	(Preparar al
2-propanol hasta:	10 ml.	momento)

-composición del medio "A":

Glucosa 0.1% (w/v)
Butirato sódico 10 mM.
PMSF 0.1 mM.
1x PBS

-500 ml. de 0.75% (w/v) glicerol en "A":

10x PBS	50 ml.
Glicerol	3.75 g
Glucosa	0.5 g
Butirato sódico	0.55 g
H ₂ O hasta	500 ml.
PMSF 100 mM.	0.5 ml.

-250 ml. de 1.5% glicerol en "A":

10x PBS	25	ml.
glicerol	3.75	g
glucosa	0.25	g
butirato sódico	0.27	g
H ₂ O hasta	250	ml
PMSF 100 mM.	0.25	ml

-2000 ml. de 3% glicerol en "A":

10x PBS	200	ml.
glicerol	60	g
glucosa	2	g
butirato sódico	2.2	g
H ₂ O hasta	2000	ml.
PMSF 100 mM.	2	ml.

-2000 ml. de 6% glicerol en "A":

10x PBS	200	ml.
glicerol	120	g
glucosa	2	g
butirato sódico	2.2	g
H ₂ O hasta	2000	ml.
PMSF 100 mM.	2	ml.

Notas: -Al añadir el PMSF es mejor que las disoluciones estén a temperatura ambiente, ya que si están a 4°C suele precipitar el PMSF. Una vez añadido el PMSF mezclar rápidamente.

-El butirato sódico (inhibidor de la desacetilasa) se añade para evitar la desacetilación de las histonas. Puede prescindirse de él si este no es un parámetro que interese.

-El glicerol puede sustituirse por BSA o por Percol. Una de las ventajas del glicerol es que es más económico.

-Puede prescindirse también del PMSF.

Método:

-Poner a enfriar todas las disoluciones en la cámara fría por lo menos durante 90 min.

-Realizar el montaje de fig. 17.

-Llenar el vaso de precipitados "1" con los 2000 ml. de 6% glicerol en "A" y el vaso de precipitados "2" con los 2000 ml. de 3% glicerol en "A".

-Llenar el erlenmeyer "3" con los 250 ml. de 1.5% glicerol en "A".

-Con unos "coggers" introducir el tubo "a" en la disolución del vaso de precipitados "1". Llenar el tubo completamente. Obturar con el "cogger" uno de sus extremos y llevarlo al vaso de precipitados "2", de tal forma que ambos vasos de precipitados "1" y "2" queden comunicados por el tubo "a".

-Asegurarse de que las conexiones del tapón del erlenmeyer "3" sean perfectamente estancas.

-En el vaso de precipitados "2" y en el erlenmeyer "3" tiene que haber agitación mediante un agitador magnético o bien otro dispositivo.

-Cubrir con papel de aluminio los vasos de precipitados "1" y "2" para evitar que se deposite polvo.

-Es importante que el montaje esté sobre una base sólida y que a partir de este punto no se de ningún golpe a la cámara de separación. Asimismo hay que evitar las vibraciones, por lo que es desaconsejable realizar el montaje dentro de una cámara fría.

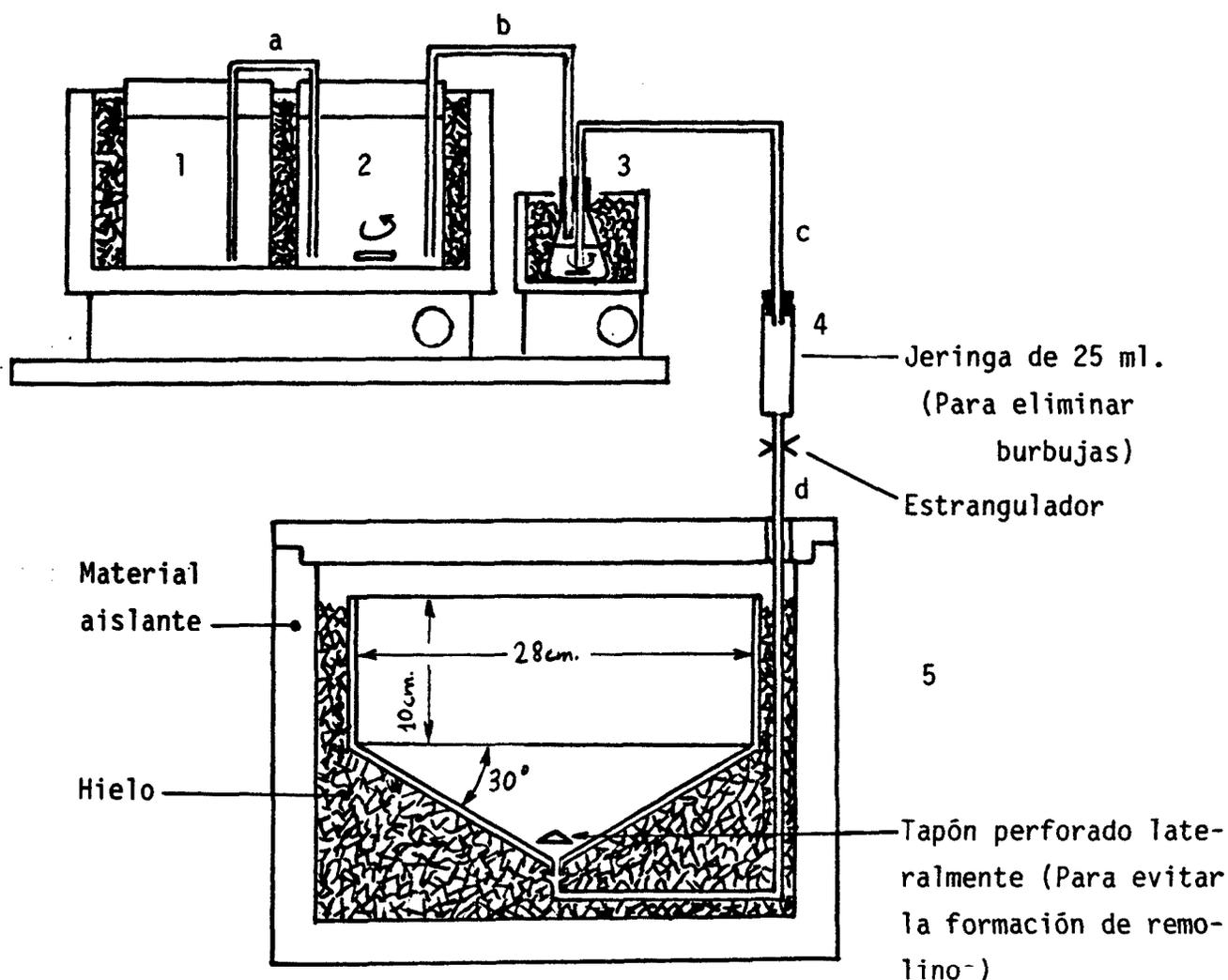


Fig 17.

Montaje para la separación de células por el método de sedimentación a gravedad unitaria.

"1" y "2": Vasos de precipitados de 2.000 ml.

"3": Erlenmeyer de 250 ml.

"4": Jeringa de 20-25 ml.

"5": Cámara para la separación de células

El material de la cámara de separación de células puede ser de vidrio o de metacrilato. Si se utiliza vidrio, conviene entonces siliconizar la parte interna de la cámara.

Un molde para la construcción de cámaras de metacrilato se halla a disposición en el Laboratorio de Fisiología del Nucleo Celular, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.

El procedimiento para la separación de células mediante el método de sedimentación a gravedad unitaria es en esencia el mismo que para la separación de núcleos (Mezquita and Teng, 1975). Consiste en poner las células a separar encima de un gradiente de densidad (para evitar corrientes de convección y el mezclado de las células) y esperar unas horas para que sedimenten lo suficiente como para que puedan discriminarse varias poblaciones celulares. Las células se separan esencialmente según su volumen celular atendiendo a la ley de Stokes (ver pag. 7). Las células más grandes sedimentan más rápido que las más pequeñas.

-Suspender el pellet de células (pag.75) en 80 ml. de 0.75% (w/v) glicerol en "A" (Suspender suavemente para que no se rompan o lesionen las células)(A 4°C).

-Diluir las células con 0.75% glicerol en "A" hasta una densidad de 16×10^6 células/cm³ (o bien una densidad óptica a 260 nm. de 1.25).

-Introducir 100 ml. de 1x PBS por la jeringa de carga. Parar la entrada antes de que entren burbujas por el tubo "d" hacia la cámara de separación.

-Introducir 80 ml. de suspensión de células por la jeringa de carga. Parar la entrada antes de que entren burbujas por el tubo "d" hacia la cámara de separación "5".

-Succionar con una jeringa de 50 ml. por el tubo "c" de tal forma que el contenido del erlenmeyer "3" empiece a bajar por sifón. Conectar entonces rápidamente el tapón del tubo "c" a la jeringa "4".

-Abrir la válvula del tubo "d" para que vaya entrando todo el gradiente. Regularla de tal forma que el gradiente entre lentamente en el plazo de 20 - 30 min.

-Cerrar la válvula del tubo "d" y esperar 5.5 horas, a contar desde la introducción de las células en la cámara.

-Realizar el montaje de fig. 18

-Succionar con una jeringa de 50 ml. por el tubo "d" hasta que empiece a bajar el contenido de la cámara por sifón.

-Desechar los primeros 1500-2000 ml.

-Colectar en fracciones de 20 ml. el resto del contenido de la cámara. Ajustar el estrangulador del tubo "d" para que el tiempo de colección sea aproximadamente 20-30 min.

-Leer la densidad óptica a 600 nm. de cada una de las fracciones de 20 ml. Representar gráficamente la densidad óptica respecto al N° de fracción. Agrupar las fracciones de 20 ml. en un número más reducido de fracciones, según interese.

-Sedimentar en botellones de 250 ml. a 4000 rpm en un rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 15 min a 4°C.

-Desechar la mayor parte del sobrenadante. Resuspender suavemente el sedimento en el sobrenadante que queda, transferir a tubos de 15 ml. y sedimentar a 4500 rpm (Rotor J-20 de la Beckman) durante 15 min. a 4°C.



-El pellet así obtenido consta de células con motilidad todavía conservada y una vitalidad superior al 99% (determinada por tinción con "trypan Blue").

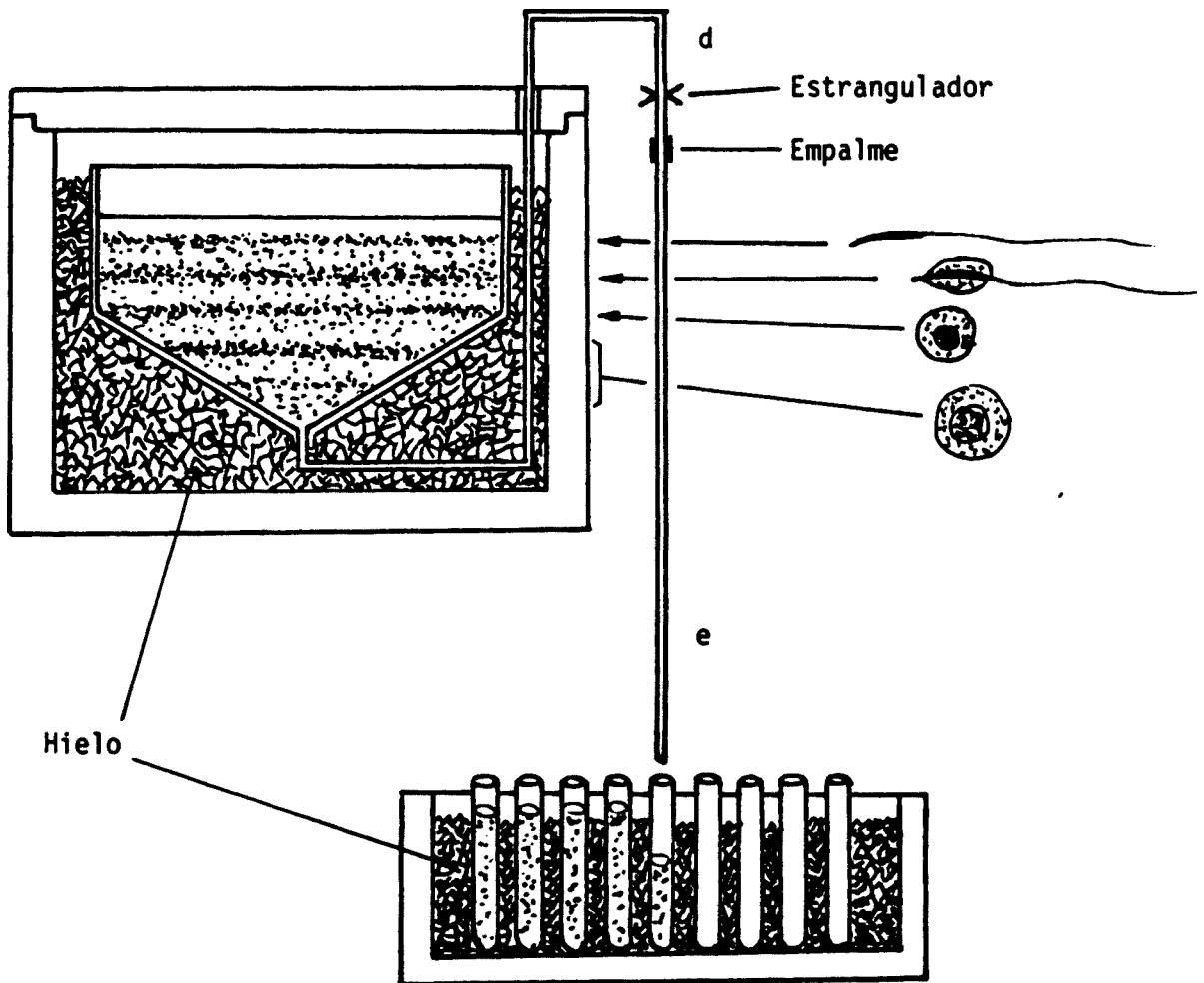


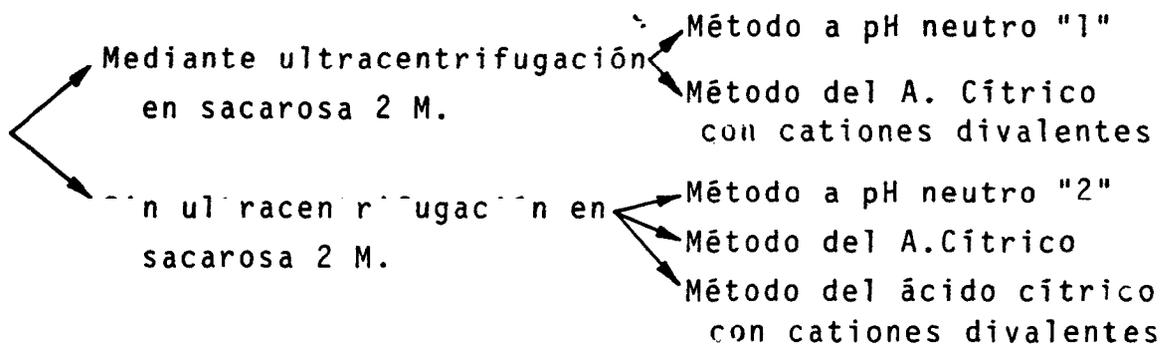
Fig 18.

Recolección de células separadas por el método de sedimentación a gravedad unitaria.

2.1.1.2.- Preparación y separación de suspensiones nucleares.

La preparación y separación de suspensiones nucleares se ha realizado esencialmente tal como está descrito (Mezquita and Teng, 1977a) con variantes respecto a los tampones utilizados (Krause, 1978).

2.1.1.2.1.-Preparación de núcleos:



-Método mediante ultracentrifugación en Sac. 2 M. a pH neutro "1".

Extracción de los testículos y eliminación de la albúmina tal como se describe en los dos primeros pasos de pag. 75.

↓
Homogeneizar en 5 volúmenes de 3 mM. MgCl₂, 1 mM. Acetato cálcico, 25 mM. KCl, 0.12 mM. espermidina, 1 mM. PMSF, 50 mM. butirato sódico, 0.05% nonidet, Sacarosa 0.25% con Dounce "Vidra Foc" E-5772 (20 pases) a 0-4°C.

↓
Filtrar con una capa de tela de nylon

↓
Sedimentar el filtrado a 4.000 rpm con un rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 15 min. a 4°C.

↓
→ Sobrenadante

↓
Resuspender el pellet en 10 vol. del medio anterior sin contener Nonidet. Homogeneizar 20 pases con Dounce "Vidra Foc" E-5772 a 0-4°C.

↓

Sedimentar a 4.000 rpm con un rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 15 min. a 4°C.

↓

→ Sobrenadante

Suspender el pellet en el medio anterior conteniendo Sac. 2 M. en lugar de 0.25 M. Homogeneizar 20 pases con Dounce "Vidra Foc" E-5772 a 0-4 °C. Filtrar con una capa de tela de Nailon.

↓

Ultracentrifugar a 22.000 rpm con un rotor SW-27 de la Beckman a 4°C durante 60 min.

↓

→ Desechar sobrenadante y la capa lípidos que flota

El pellet consta de nucleos morfológicamente limpios.

-Método mediante ultracentrifugación en Sac. 2 M. con ácido cítrico y cationes divalentes:

Disoluciones:

<u>-Composición del medio "B":</u>	CaCl ₂	10 mM.	pH 2.4 ajustado con HCl
	MgCl ₂	10 mM.	
	NaHSO ₃	50 mM.	
	A. Cítrico	25 mM.	
	Butirato Na	15 mM.	

<u>-100 ml. de 10x medio "B":</u>	CaCl ₂	1.47 g
	MgCl ₂	2.03 g
	NaHSO ₃	9.5 g
	A. Cítrico	5.25 g
	Butirato Na	1.65 g
	H ₂ O hasta	100 ml.

-500 ml. de sacarosa 0.1 M., 1mM. PMSF en 1x medio "B":

Sacarosa	17.1	g
10x medio "B"	50	ml
H ₂ O hasta	500	ml
100 mM. PMSF	1	ml

Ajustar pH a 2.4 con HCl concentrado

-200 ml. de sacarosa 0.1 M., 1mM. PMSF, 0.1% tritón X-100,
en 1x medio "B":

Sacarosa	6.84	g
10x medio "B"	20	ml
Tritón X-100	0.2	g
H ₂ O hasta	200	ml
100 mM. PMSF	2	ml

Ajustar a pH 2.4 con HCl concentrado

-240 ml de sacarosa 2 M., 1mM. PMSF en 1x medio "B":

Sacarosa	164.3	g
10x medio "B"	24	ml
H ₂ O hasta	238	ml
100 mM. PMSF	2.4	ml

Ajustar a pH 2.4 con HCl concentrado

Método:

Extracción de los testículos y eliminación de la albúmina tal como se describe en los dos primeros pasos de pag. 75. Todas las disoluciones tienen que estar a 4°C.



Homogeneizar en 10 volúmenes de 0.1 M. Sac., 1mM. PMSF, en 1x medio "B" con dounce "Vidra Foc" E-5772, 20 pases a 0-4 °C. Filtrar con 1 capa de tela de nylon (ò 4 de gasa).



Sedimentar a 4.000 rpm con un rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 10 min a 4°C.



→ Desechar sobrenadante

Resuspender el pellet en 200 ml. del medio anterior conteniendo 0.1% de tritón X-100. Homogeneizar con dounce "Vidra Foc" E-5772, 20 pases a 0-4°C.



Sedimentar a 4.000 rpm con un rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 15 min a 4°C.



→ Desechar sobrenadante

Suspender y homogeneizar el pellet en 200 ml de 0.1 M. sacarosa, 0.1 mM. PMSF en lx medio "B" con dounce "Vidra Foc" E-5772 20 pases a 0-4°C.



Sedimentar a 4.000 rpm con un rator basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 15 min a 4°C.



→ Desechar sobrenadante

Suspender y homogeneizar el pellet en los 240 ml. de sacarosa 2 M., 1 mM. PMSF en lx medio "B" a 0-4°C. Filtrar con 1 capa de tela de nylon



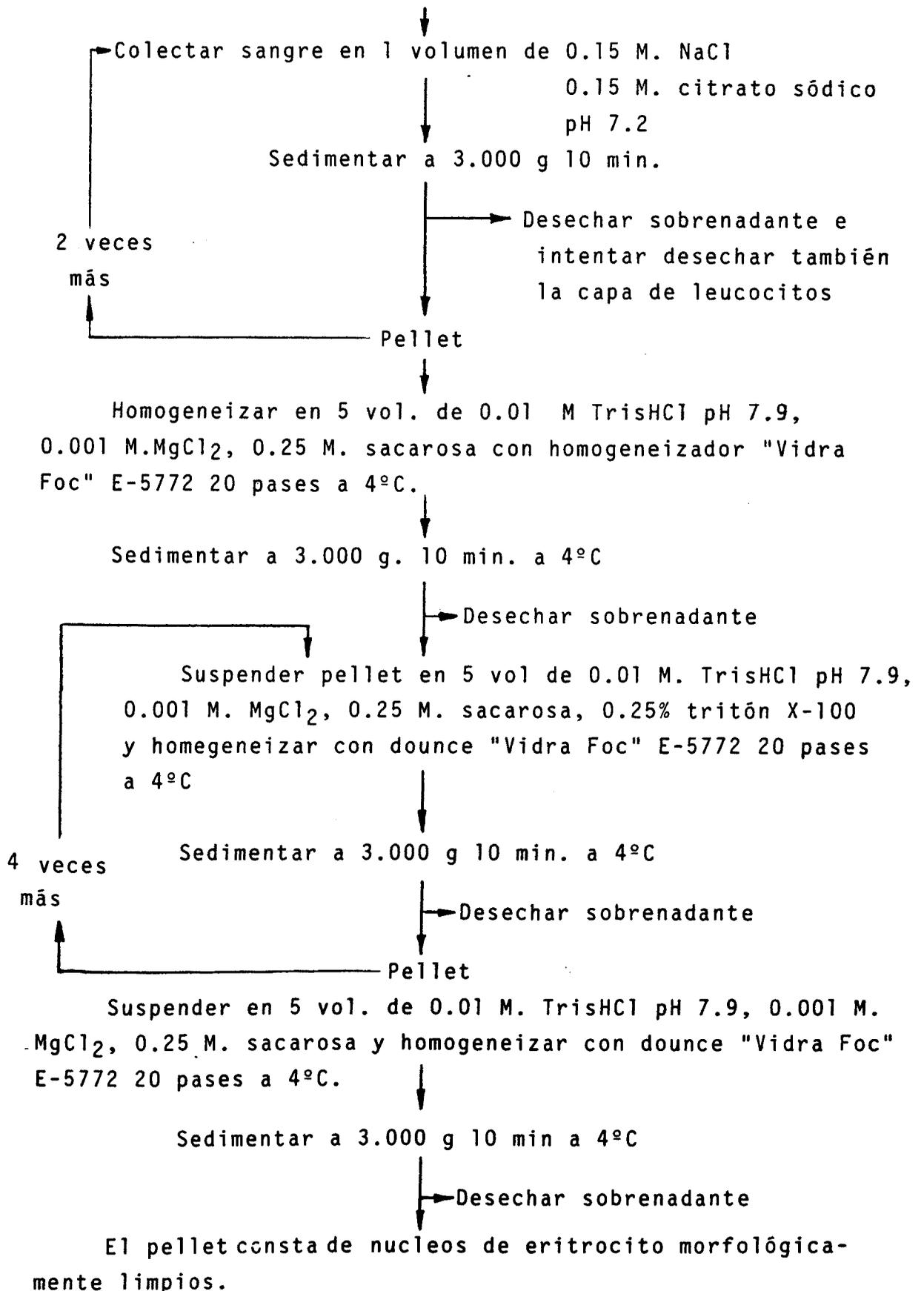
Ultracentrifugar a 22.000 rpm con un rotor basculante (SW-27 de la Beckman) a 4°C.



→ Desechar sobrenadante y la capa de lípidos que flota.

El pellet consta de nucleos morfológicamente limpios. Es un método excelente para evitar los fenómenos de proteólisis, especialmente si en los pasos siguientes deben de realizarse incubaciones a 37°C a un pH de 8.0 (por ejemplo porque haya que hacer una digestión con nucleasa micrococcal).

-Método a pH neutro "2" (utilizado para la preparación de núcleos de eritrocito de pollo)(Axel, 1978).



-Método del ácido cítrico (utilizado para preparar núcleos de espermatozoides a partir de semen, con la finalidad de extraer y purificar la protamina galina):

Este método está descrito extensamente en (Mezquita and Teng, 1977a). Consiste en hacer lavados repetidos con A. cítrico 10 mM. pH 3.0.

La variante realizada consiste en coleccionar el semen en A. cítrico 10 mM., Benzamidina 10 mM. pH 3.0 y realizar 2 lavados en este medio antes de realizar los lavados sólo con A. cítrico (5 lavados) a 0°C.

-Método del ácido cítrico con cationes divalentes (utilizado para preparar nucleos a partir de las distintas fracciones provenientes de una separación de células (por gravedad unitaria)).

Disoluciones: Las mismas de pag. 84-85 a excepción de la de sacarosa 2 M. (Preparar menos cantidad)

Método: El mismo que de pag. 85-86 a excepción de la ultracentrifugación. (Para el número de células que normalmente se obtienen de dos cámaras de 28 cm., suspender los sucesivos pellets en un volumen de 2 ml. utilizando un homogeneizador más pequeño. Sedimentar en tubos de 15 ml. a 5.000 rpm 5 min. a 4°C con rotor de ángulo fijo (J-20 de la Beckman).

2.1.1.2.2.- Separación de núcleos:

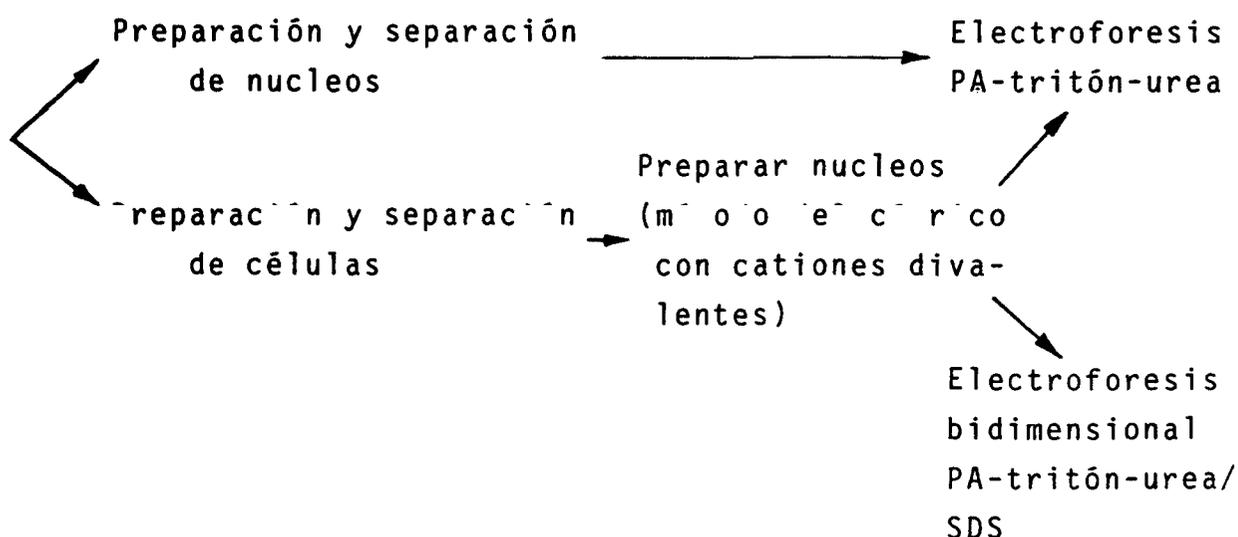
El método para la separación de nucleos está descrito extensamente en (Mezquita and Teng, 1977a). Cambian no obstante la composición de las disoluciones empleadas. La mecánica de llenado, separación y vaciado de la cámara en las preparaciones de núcleos es la misma que para las células (pag. 78-82). El gradiente se crea con sacarosa en lugar de glicerol: Sac 8%-4%-2%-1%-0%. El tampón para la separación de núcleos es el mismo que el utilizado en las fases previas de preparación de núcleos.

2.1.2.- Proteínas nucleares.

2.1.2.1.- Acetilación de las histonas:

2.1.2.1.1.- "Steady state" de acetilación:

Se han utilizado varios métodos para determinar el "steady state" de acetilación en las distintas fases de la espermatogénesis:



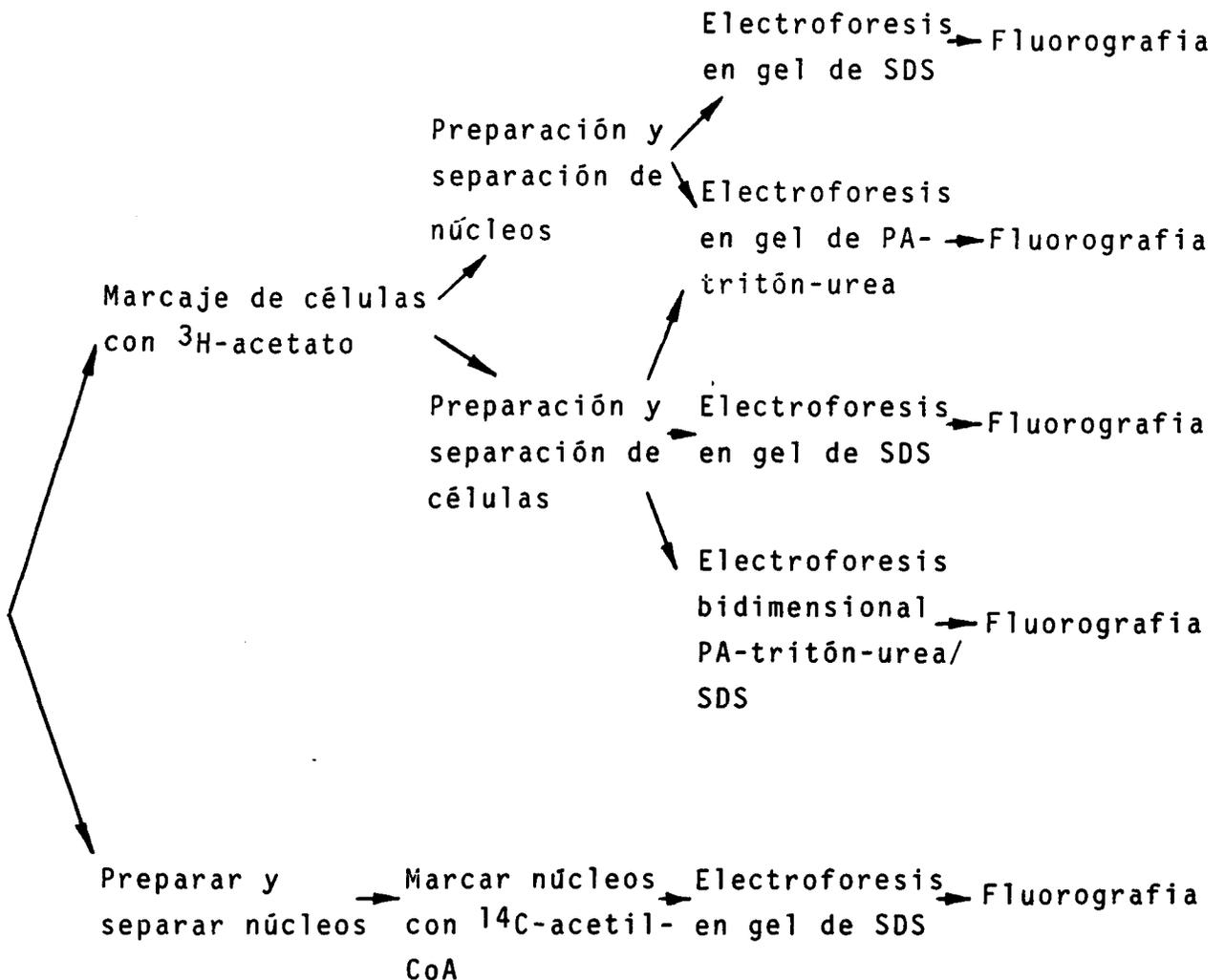
La electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea (Zweidler, 1978) permite discriminar diferencias de tan sólo una carga entre proteínas. De esta forma la histona H4 se resuelve en 5 bandas correspondientes a las formas AC0-H4, AC1-H4, AC2-H4, AC3-H4 y AC4-H4. Tiene no obstante el inconveniente de que a la altura de estas bandas, se solapan otras proteínas, con lo cual se hace difícil la cuantificación del "steady state" de acetilación.

La electroforesis bidimensional (Poliacrilamida-tritón-urea/SDS) presenta la ventaja de que la zona de la H4 se halla exenta de otras proteínas que pudiesen interferir con la cuantificación del "steady state" de acetilación. En este caso las diferentes formas de acetilación de la H4 se detectan como 5 puntos.

La comprobación de que las bandas que se supone que corresponden a las formas de acetilación de las histonas efectivamente los son, se hace a través de marcar células con ^3H -acetato, procesando estas para determinar el "steady state" y además haciendo una fluorografía. De esta forma el ^3H -acetato se incorpora en las distintas bandas de acetilación.

2.1.2.1.2.- Marcaje de acetilación:

Se han utilizado diversas estrategias para determinar el marcaje de acetilación en las distintas fases de la espermatogénesis:



-Marcaje de células con ^3H -acetato:

Se prepararon células por disociación triptica controlada del tejido (pag. 74-75) y la suspensión celular se incubó con 1-5 mCi de ^3H -acetato a 31-37°C durante 30-60 min.

Terminado el marcaje se añadió 50 mM. butirato sódico para evitar la desacetilación y las células procesadas para su separación o análisis.

-Marcaje de nucleos con ^{14}C -acetil CoA:

Se prepararon nucleos mediante ultracentrifugación en sacarosa 2M. en un medio que contenía 60mM. KCl, 15mM. NaCl, 0.5mM SPD, 0.15mM. SPM, 15mM 2-mercaptoetanol, 2mM. EDTA, 0.5mM. EGTA y Tris-HCl pH 7.4. Los núcleos se separaron en el mismo medio según el procedimiento de pag.88. Los núcleos (correspondientes a 1 fracción de la separación de nucleos) se suspendieron en 62mM. PO_4K pH 6.8, 0.4mM. SPM, 1mM. PMSF, 7.5 μl de ^{14}C -acetil CoA e incubaron a 37°C durante distintos tiempos (0, 5, 10, 15 y 30 min.).

El marcaje se paró mediante la adición de 0.1 vol. de 4 N. H_2SO_4 y las histonas extraídas procesadas para su análisis en geles de SDS y fluorografía.

2.1.2.1.3.- Actividad específica de acetilación:

Se determinó realizando el cociente entre la incorporación de ^3H -acetato o ^{14}C -acetil-CoA y el "steady state" de acetilación.

2.1.2.1.4.- Recambio de acetilación:

Se prepararon células por disociación triptica controlada del tejido (pag. 74-75), se marcaron con ^3H -acetato (pag. 90-91), enfriaron a 0°C y centrifugaron a 1.500 g 10 min. Las células se resuspendieron cuidadosamente en 200 ml. de MEM conteniendo 1mM. Acetato, se tomó una alícuota de tiempo cero, y alícuotas de la suspensión celular se incubaron a 37°C durante 5, 15 y 60 min. respectivamente.

Se prepararon núcleos en presencia de butirato sódico 50 mM. mediante ultracentrifugación en Sac. 2M. a pH neutro "1" (pag. 83-84). Los núcleos fueron separados por el método de sedimentación a gravedad unitaria (Mezquita and Teng, 1977a) en presencia de 50 mM. butirato sódico (pag. 88). Las histonas fueron extraídas con SO_4H_2 0.4 N., precipitadas y lavadas con etanol, dializadas en frente de acético 0.1 M., liofilizadas y analizadas mediante electroforesis en gel de SDS. Los geles fueron procesados para fluorografía y la actividad específica de acetilación calculada para los distintos tipos de núcleos en los distintos tiempos.

2.1.2.2.- Extracción y purificación de proteínas nucleares:

2.1.2.2.1.- Extracción con 0.3 M. HCl y procesado:

El método se describe para una cantidad de núcleos, cromatina o nucleosomas correspondiente a unos 50-1000 ug de ADN:



Añadir al pellet de núcleos, cromatina o nucleosomas 2 ml. de 0.3 M. HCl. O bien llevar la suspensión de núcleos, disolución de cromatina o de nucleosomas a la concentración final de 0.3 M. HCL. en un volumen de 2 ml.

(Para preparar 100 ml. de 0.3 M. HCl tomar 2.9 ml de HCl concentrado Merck () y añadirle H₂O hasta 100 ml.)



Dejar extraer las proteínas a 0-4°C durante 30 min. vortexeando cada 5-10 min.



Sedimentar a 14.000 rpm en tubos corex de 15 ml. durante 10 min. a 4°C en un rotor de ángulo fijo (J-20 de la Beckman).



→ Guardar el sedimento para la cuantificación de ADN

Trasvasar el sobrenadante a un tubo Corex de 15 ml. Precipitar las proteínas nucleares añadiendo 0.22 ml de A. tricloroacético al 100%. Vortexear unos segundos y dejar precipitar a 0-4°C durante 30 min.



Sedimentar a 14.000 rpm en tubos corex de 15 ml. durante 10 min. a 4°C en un rotor de ángulo fijo (J-20 de la Beckman).



→ Desechar sobrenadante

Añadir 5 ml. de acetona acidificada al sedimento y vortexear 2 seg. (Para preparar 200 ml. de acetona acidificada añadir 100 ul de HCl concentrado (Merck Art. 317) a 200 ml. de acetona.).



↓

Sedimentar a 14.000 rpm en un rotor de ángulo fijo (J-20 de la Beckman) a 4°C durante 10 min

↓ → Desechar sobrenadante

Añadir 5 ml. de acetona al sedimento, vortexear 2 seg y poner a centrifugar a 14.000 rpm (rotor J-20 de la Beckman) a 4°C durante 10 min.

↓ → Desechar sobrenadante

Añadir 5 ml. de acetona al sedimento, vortexear 2 seg y poner a centrifugar a 14.000 rpm (rotor J-20 de la Beckman) a 4°C durante 10 min.

↓ → Desechar sobrenadante

Secar el pellet con la ayuda de una trompa de vacío durante 10 min. Las proteínas así preparadas están listas para ser analizadas por cualquier procedimiento analítico o electroforético usual.

2.1.2.2.2.-Mediante extracción con 0.4 N. H₂SO₄:

Llevar los núcleos a 0.4 N. H₂SO₄ de concentración final. Dejar extraer durante 60 min. vortexeando cada 10 min. Sedimentar a 14.000 rpm durante 15 min. a 4°C (rotor J-20 de la Beckman)

↓ → Guardar pellet para cuantificar DNA

Añadir 6 volúmenes de Etanol, mezclar, y dejar precipitar toda la noche a -70°C.

↓

Sedimentar en corex de 15 ml. a 15.000 rpm 15 min. a 4°C en un rotor de ángulo fijo (J-20 de la Beckman).

↓ → Desechar sobrenadante

Lavar con etanol, secar con el liofilizador y disolver en 2ml de ácido acético 0.1 M. Poner a dializar 1 hora frente a 10 litros de acético 0.1 M. a 4°C. Liofilizar.

2.1.2.3.- Electroforesis de proteínas

2.1.2.3.1.-Construcción de equipos de electroforesis:

Debido al precio relativamente elevado de los equipos de electroforesis comerciales y a la necesidad de realizar a veces incluso 6 electroforesis a la vez a fin de trabajar mas eficientemente, se decidió diseñar y construir un sencillo y económico equipo de electroforesis.

Este equipo (Fig. 19 y 20) se ha estado experimentando durante 2 años y se han construido unas 7 unidades.

En cada equipo pueden realizarse 2 electroforesis a la vez. Presenta una versatilidad muy elevada en cuanto a las dimensiones de los geles a realizar; sirve tanto para pequeños geles de 10 cm de altura como para los geles de secuenciación de ADN de 1 merto de largos.

Puede construirse en unas horas a un precio total de unas 15.000 pst. (Mayo de 1986). Información y asesoramiento sobre su construcción y manejo se puede ofrecer en el laboratorio de Fisiología del núcleo celular, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.

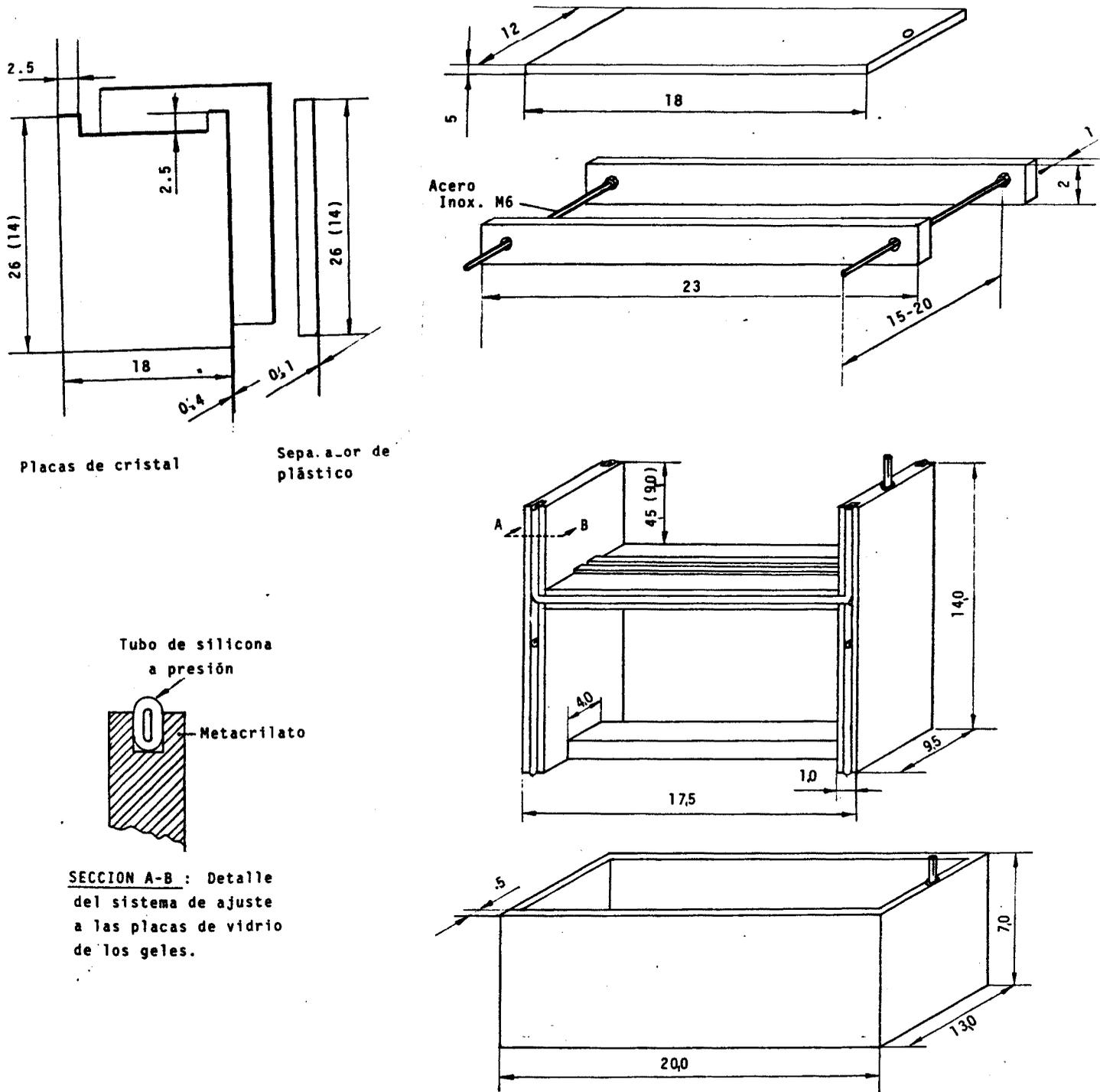


Fig 19.

Dimensiones del equipo de electroforesis diseñado para la electroforesis de proteínas y ácidos nucleicos en geles de acrilamida (y en ciertos casos de agarosa). El material empleado es metacrilato (si no se especifica lo contrario), y los electrodos son de platino. Las dimensiones se expresan en cm.

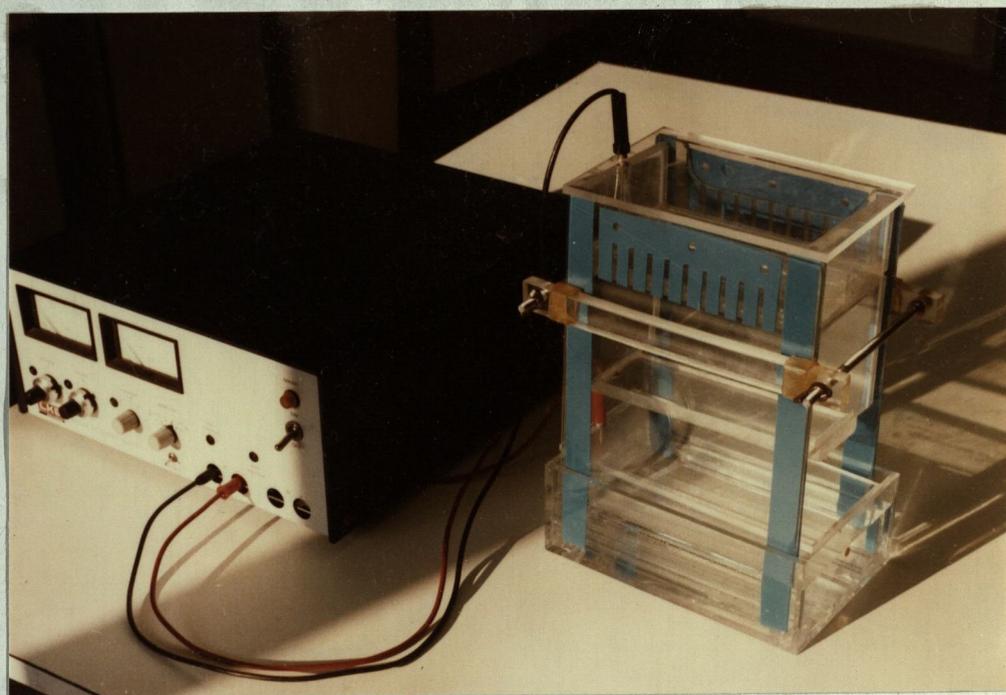
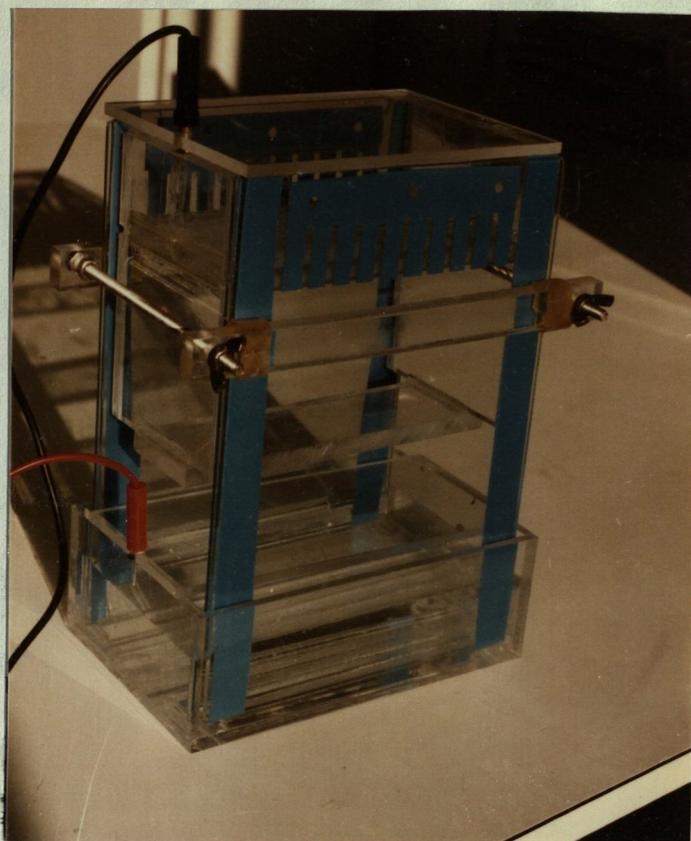
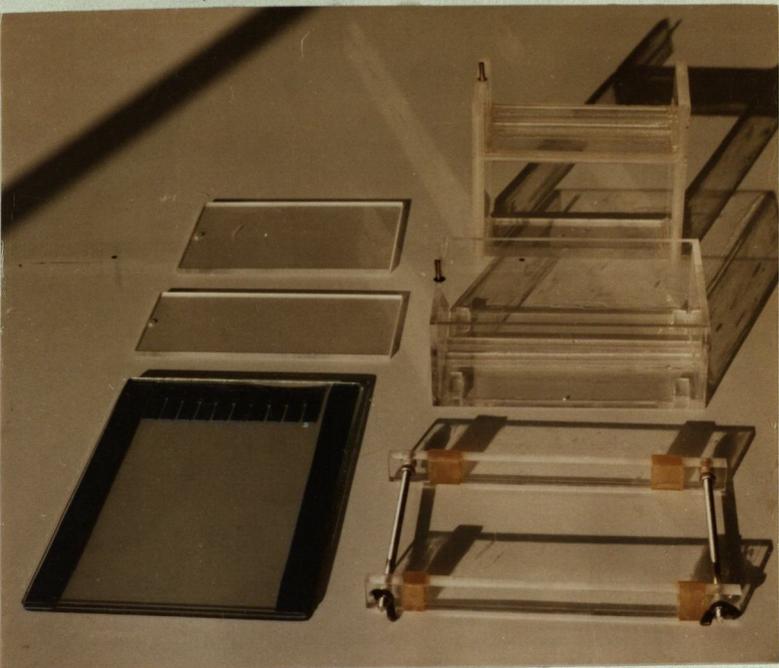


Fig 20.

Equipo de electroforesis montado con los geles.

2.1.2.3.2.-Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS:

2.1.2.3.2.1.-Electroforesis en gel de Acrilamida 18%-SDS:

Se realizo segun esta descrito por Thomas and Kornberg, (1978).

<u>Gel separador:</u>	1 gel	2 geles	4 geles
Acrilamida 30%(w/v) Bisacrilamida 0.15%	30 ml	60 ml	120 ml
Tris-HCl 3M pH 8.8	12.5 ml	25 ml	50 ml
H ₂ O	6.2 ml	12.5 ml	25 ml
Filtrar			
TEMED	10 ul	20 ul	40 ul
Desgasificar 20 min. con vacio de trompa de agua.			
SDS 10% (w/v)	0.5 ml	1 ml	2 ml
Persulfato amónico 10% (w/v)	0.5 ml	1 ml	2 ml
Verter acrilamida antes de 2 min., y esperar a que ge- lifique (dependiendo de la temperatura ambiente puede tardar entre 15 y 30 min.)			

Gel de stacking:

Acrilamida 10%(w/v) Bisacrilamida 0.5%	3 ml	6 ml	12 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	2.4 ml	4.8 ml	9.6 ml
H ₂ O	4.4 ml	8.8 ml	17.6 ml
Filtrar			
TEMED	5 ul	10 ul	20 ul
Vacio 20 min			
SDS 10% (w/v)	0.1 ml	0.2 ml	0.4 ml
PSA 10% (w/v)	0.1 ml	0.2 ml	0.4 ml

Una vez gelificado, es conveniente dejar estabilizar el gel durante un mínimo de 6 horas a temperatura ambiente (con los laterales cubiertos por papel de aluminio para que no se sequen los pozos).

<u>Tampón de cubeta:</u>	1 litro	2 litros	3 litros	4 litros
Glicina	14.4 g	28.8 g	43.2 g	57.6 g
Tris	3.0 g	6.05 g	9.05 g	12.1 g
SDS	1.0 g	2.0 g	3.0 g	4.0 g
H ₂ O hasta	1.0 l	2.0 l	3.0 l	4.0 l

Tampón de muestras: 2.3 % SDS
5% (w/v) 2-mercaptoetanol
10% glicerol
62.5 mM. Tris-HCl, pH 6.8

Colorante para los geles de PA-SDS:

Azul de bromofenol disuelto en tampón de muestras. Es mejor no poner muestras en los pozos laterales, ya que si el gel se calienta o la gelificación no ha sido perfecta suelen distorsionarse. En estos pozos laterales va muy bien poner colorante solo, ya que aunque se distorsione sigue cumpliendo su función de infromarnos acerca de la marcha de la electroforesis.

Voltaje: 200 voltios

Parar la electroforesis: Para resolver las histonas parar cuando falten unos 2 cm. para que salga el colorante (Azul de bromofenol).

2.1.2.3.2.2.-Electroforesis en geles de PA-SDS con
gradiente

Se realizaron según se ha descrito por O'Farrell (1977).

2.1.2.3.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida ácido:

2.1.2.3.3.1.-Electroforesis en gel de PA-tritón-urea:

Se realizó tal como está descrito por Zweidler (1978).

<u>Gel separador:</u>	1 gel	2 geles
Acrilamida 60% (w/v)	10 ml	20 ml
Bisacrilamida 0.4 %		
Urea 10 M, acético 6.67% (v/v)	37.5 ml	75 ml
Filtrar (Milipore RWP04700)		
Tritón X-100 0.3 M	1 ml	2 ml
Hacer el vacío 10 min.		
TEMED	250 u1	500 u1
Persulfato amónico 40 mg/ml	850 u1	1700 u1
Verter la acrilamida y esperar a que gelifique (entre 20 min y 1 hora dependiendo de la temperatura ambiente).		

Gel de stacking:

Acrilamida 60% (w/v)	1 ml	2 ml
Bisacrilamida 0.4%		
Urea 10M acético 6.67% (v/v)	3.75 ml	7.5 ml
Tritón X-100 0.3 M	0.2 ml	0.4 ml
Filtrar (Milipore RWP04700)		
Tritón X-100 0.3 M	0.2 ml	0.4 ml
Hacer el vacío 10 min.		
TEMED	50 u1	100 u1
Persulfato amónico 40 mg/ml	170 u1	340 u1

Es conveniente dejar estabilizar el gel durante durante unas 6 horas a temperatura ambiente (con tampón de cubeta en los pozos para que no se sequen.

<u>Tampón de cubeta (acético 0.9 N):</u>	2 litros	4 litros
Acido acético glacial	103 ml	207 ml
H ₂ O hasta	2000 ml	4000 ml

Preelectroforesis: 100 voltios 12 horas (polo positivo arriba)

Poner en los pozos 100 ul de 7.5 M urea, 6 mM. tritón, 0.9 N acético, 0.5 M cisteamina.

Conectar a 120 voltios 30 min (polo positivo arriba)

Reemplazar el tampón de cubeta y limpiar bien los pozos para eliminar la cisteamina.

Tampón de muestras 5.5 M urea
 20 % 2-mercaptoetanol (w/v).
 5 % a. acético (w/v)

Colorante para los geles de PA-tritón -urea:

Verde de metilo disuelto en tampón de muestras. Es conveniente reservar los pozos laterales para el colorante, pues aunque se distorsionen el colorante seguirá cumpliendo su función de informarnos acerca de la marcha de la electroforesis.

Voltaje: 200 voltios

Parar la electroforesis: Para resolver las histonas cuando al 2º componente del colorante le falten unos 3 cm. para salir. Para poder ver las protaminas (galina y salmina) parar antes de que salga el 1º componente del colorante.

2.1.2.3.3.2.- Electroforesis en gel de PA-urea:

Se realizó tal como está descrito por Panyim and Chalkley (1969).

2.1.2.3.4.- Electroforesis bidimensionales:

Efectuar una primera dimensión en el gel de acrilamida ácido (PA-tritón-urea, o simplemente PA-urea). La preparación del gel, preelectroforesis, cargado de muestras y voltaje son los mismos que para un gel normal (pag.100-101).

Sin teñir el gel, recortar la tira vertical en donde está la muestra que nos interesa. Esta operación se realiza con más facilidad si a ambos lados del pozo donde se halla la muestra se pone colorante. El colorante nos sirve de guía para saber por donde tenemos que cortar.

Dejar equilibrar a 20°C durante 20 min en tampón tris-HCl 3 M pH 8.8.

Montar la tira de gel de la primera dimensión entre dos placas limpias. La tira tiene que quedar horizontal a unos 2 cm de la parte superior de la placa en forma de "U".

Llenar el gel en posición vertical con "gel separador" SDS hasta que falten 1-2 cm para llegar a la tira del gel de la primera dimensión. Llenar con H₂O para que la interfase quede recta. Esperar a que gelifique.

Desechar el H₂O. Llenar todo el resto con "gel stacking" SDS hasta que cubra a la tira de la primera dimensión 1-2 cm. Esperar a que gelifique.

En los laterales puede construirse un pequeño pozo a fin de poner en el colorante y un marcador de peso molecular. En estos pozos podrá también ponerse la misma muestra de la que se está haciendo bidimensional. Esperar a que gelifique.

Montar el gel en el equipo de electroforesis y utilizar el tampón de cubeta correspondiente al gel de PA-SDS realizado. Poner colorante y marcadores de peso molecular.

Conectar a 200 voltios y parar cuando falten unos 2 cm para que salga el colorante (para resolver la zona de las histonas).

2.1.2.3.5.- Fijación, tinción, secado y cuantificación de los geles:

Se han utilizado 3 métodos distintos de fijación y tinción. El secado y la cuantificación es común a todos ellos.

Método 1:

Poner el gel a teñir en Amido Black 0.2% (w/v) disuelto en (1000ml de metanol + 1000ml de H₂O + 200ml de A.acético) toda la noche. 200ml de líquido de teñir por gel.

Desteñir con (1000ml de metanol+ 1000ml de H₂O + 200ml de ácido acético) cambiando el desteñidor cada 2 horas. 200ml de líquido de desteñir por gel en cada cambio. Desteñir hasta que apenas quede "background".

Método 2:

Igual que el método "1" exceto utilizar "coomasie blue" R-250 en lugar de amido black.

Método 3: (Irie and Sezaki, 1983)

Teñir durante 1 hora con 200 ml /gel de 5% formaldehido, 25% (w/v) etanol, 10% (w/v) a.acético y 0.05% (w/v) coomasie blue r-250.

Teñir un mínimo de 3 horas (mejor overnight) con 0.5% (w/v) de formaldehido, 25% (w/v) etanol, 10% (w/v) a.acético 0.05% (w/v) coomasie blue R-250. 200 ml / gel.

Desteñir 5 min con (200 ml / gel) 50% (w/v) metanol, 10% (w/v) a.acético

Desteñir con (200 ml/gel) 10% (w/v) metanol, 10% (w/v) a.acético, cambiando el desteñidor cada 2 horas hasta que apenas quede background.

Secado de los geles: Mojar 2 hojas ce papel de "celofan" con

líquido de desteñir (las hojas de celofán tienen que ser 20 cm. más grandes que el gel). Cuidadosamente colocar el gel entre las dos hojas y el conjunto encima de una placa de electroforesis de aproximadamente las mismas dimensiones que el gel. Quitar las burbujas de aire que puedan haber entre las hojas de celofán y el gel. Doblar los bordes del celofán que sobresale por la placa de electroforesis hacia abajo. Dejar encima de la poyata sin mover y sin que le toque el sol durante 48 horas.

Hay que tener en cuenta que este método no funciona para los geles de baja concentración de acrilamida. Tampoco sirve para geles gruesos (de más de 1 mm.). Va muy bien para secar los geles descritos en pag.98-102.

Cuantificación de los geles:

El scan de los geles se realizó en un espectrofotómetro Guilford Modelo 2410 con transporte lineal a una longitud de onda de 600 nm.

2.1.2.3.6.-Fluorografías:

Para el procesado de los geles para fluorografía se utilizaron los métodos de Bonner and Laskey (1974) y Laskey and Mills (1975).

Método:

- Sumergir el gel en dimetilsulfóxido (suficiente como para que cubra el gel) durante 30 min.
- Reemplazar el dimetilsulfóxido.
- Sumergir el gel 3 horas en 100 ml de dimetilsulfóxido conteniendo 22.2 g de PPO.
- Sumergir el gel 1 hora en H₂O
- Secar el gel sobre un papel "Whatmann" durante 3 horas con vacío a 65°C.
- Exponer 15 días a -70°C con película de rayos X Fuji presensibilizada.

2.1.3.- Nucleosomas

2.1.3.1.- Obtención de partículas nucleosómicas:

Las partículas nucleosómicas fueron preparadas como está descrito por Bode et al. (1983):

Núcleos de células teticulares de gallo (38 mg de ADN) se lavaron 2 veces en 50 ml de un tampón compuesto por 0.25 M sacarosa, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 15 mM butirato sódico, 0.2 mM PMSF y 5 mM Tris-HCl pH 8.0. Para suspender los núcleos se homogeneizaron 5 pases con un dounce "Vidra Foc" E-5772. La sedimentación de las células se realizó a 2000 g 10 min. Todo el proceso se realizó a 0-4°C.

↓

Después de la sedimentación a 2000 g 10 min, los núcleos se suspendieron en 18 ml de 0.25 M sacarosa, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM butirato, 0.2 mM PMSF y 5 mM Tris-HCl pH 8.0. Los núcleos se dejaron equilibrar 15 min a 0-4°C.

↓

Los núcleos se preincubaron 2 min. a 37°C y seguidamente se les añadió 1800 unidades de nucleasa micrococcal. Después de 2 min de incubación a 37°C, se enfriaron en hielo y rápidamente se les añadió NaCl a la concentración final de 0.15 M. Sedimentar a 2000 g 5 min a 0°C.

↓

→ SOBRENADANTE 1 (S1)
(Partículas nucleosómicas enriquecidas en proteínas no histonas)

Suspender el pellet en 18 ml del medio anterior, dejar equilibrar 5 min a 0-4°C, preincubar 2 min a 37°C, añadir 1800 unidades de nucleasa micrococcal e incubar 5 min a 37°C. Enfriar en hielo, añadir NaCl a la concentración final 0.15 M. y sedimentar a 2000 g 5 min.

↓

→ SOBRENADANTE 2 (S2)
(Partículas nucleosómicas enriquecidas en histonas acetiladas)

↓

Desechar pellet

2.1.3.2.- Electroforesis preparativa de nucleosomas:

Se realizó esencialmente como está descrito por Bode (1984) aunque con modificaciones encaminadas a obtener más nucleosomas en cada electroforesis y a hacer que el método sea más rápido y simple. Las modificaciones son las siguientes:

Un gel preparativo de poliacrilamida 4% no desnaturalizante (5 cm de alto, 2 cm. de grosor y 14 cm de ancho) se dispuso encima de una cámara de elución de 0.6 mm. de alto. A través de la cámara de elución fluía constantemente un tampón (44.5 mM Tris-borato, 44.5 mM ácido bórico, 4 mM EDTA (pH 8.3) que a su vez era constantemente monitorizado a la salida de la cámara midiendo la absorbancia a 260 nm. Después de monitorizarse a 260 nm , el material eluido era colectado en fracciones de 1 ml.

En la figura 21 se muestra la composición y dimensiones del equipo diseñado para electroforesis preparativa de nucleosomas.

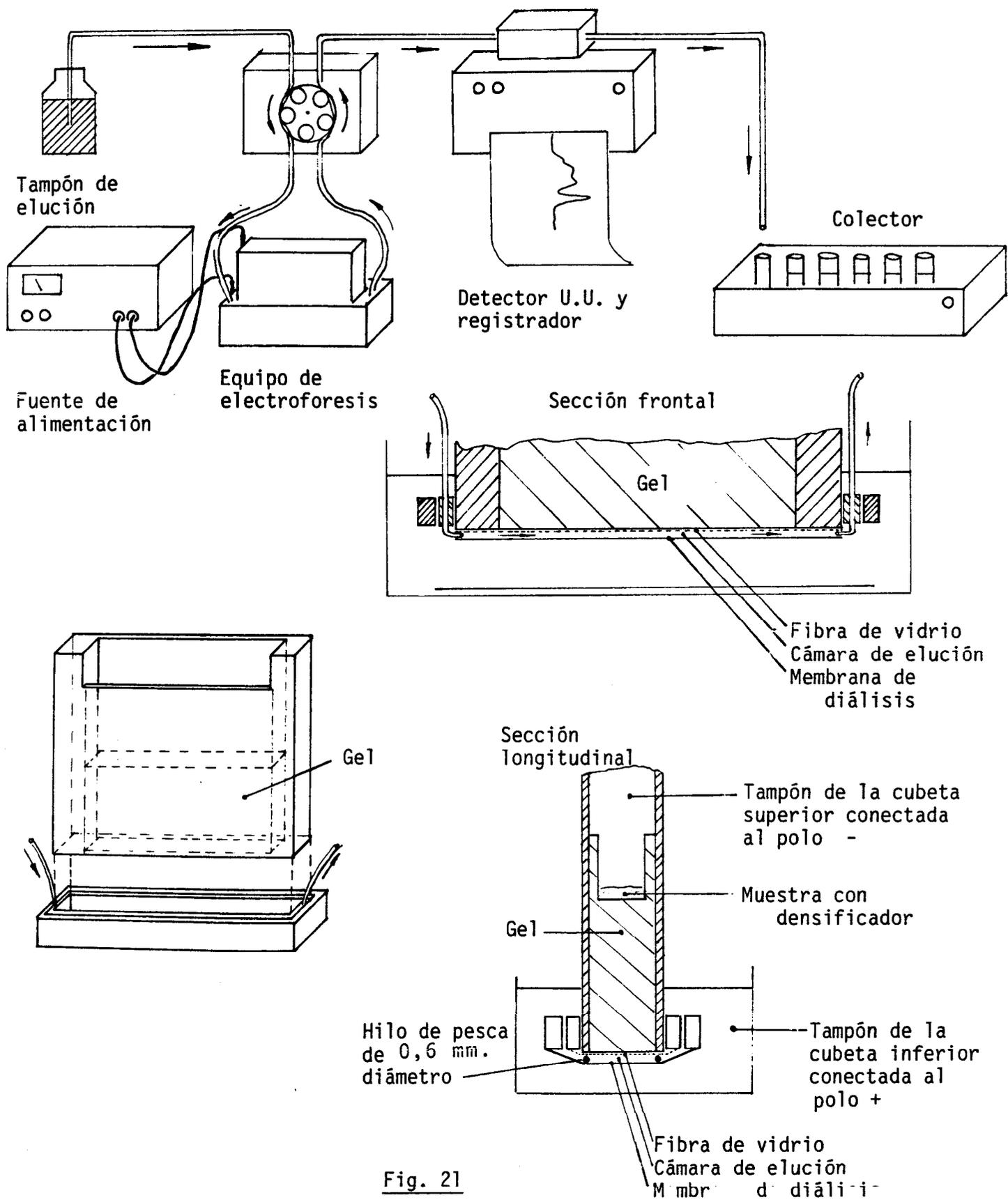
El método permite la obtención de distintas fracciones de mononucleosomas que difieren en el contenido de proteínas no histonas y en el grado de acetilación.

2.1.3.3.-Determinación del tamaño de los fragmentos de ADN resultantes de la digestión con nucleasa micrococcal.

Llevar las alícuotas de nucleosomas a una concentración final de 0.2 M NaCl, 10 mM EDTA y 2% SDS. Añadir 3 ug de proteinasa K por cada 100 ug de ADN. Incubar a 37°C 4 horas.

↓
Realizar extracción mediante fenol/cloroformo, precipitar y lavar con etanol, secar.

↓
Analizar en un gel de agarosa 1.8%-TAE (ver pag 142).



Equipo de electroforesis preparativa de nucleosomas en gel no desnaturizante de acrilamina 4%.

Arriba: Montaje general del equipo. Izquierda: Piezas clave del equipo de electroforesis diseñado. Derecha: Secciones del equipo de electroforesis para mostrar en detalle la cámara de elución. Es fundamental que el volumen de la cámara de elución sea pequeño y que el flujo del tampón de elución sea el adecuado.

2.1.3.4.- Desplazamiento de las histonas de nucleosomas
por protaminas:

Partículas nucleosómicas (20-70 ug de ADN) se trataron con concentraciones crecientes de protamina en 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl pH 8.0. e incubaron a 0°C durante 4 horas, agitando 1 seg. con el vortex cada 30 min.



Sedimentar a 24.000xg durante 10 min a 4°C.

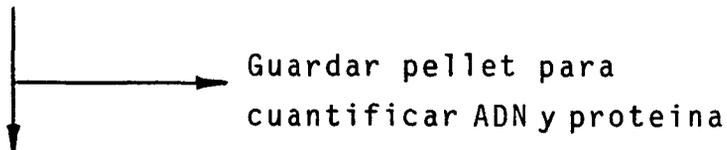


Analizar el contenido de proteínas (electroforesis) y de ADN del pellet y del sobrenadante.

2.1.4.- Poliaminas:

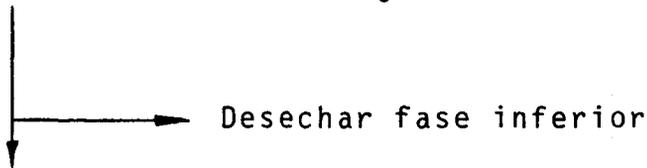
2.1.4.1.- Extracción y cuantificación (Dion and Cohen, 1972):

Llevar la muestra de células a una concentración final de a.perclórico 6% (w/v). Sonicar 40 seg a 70 W . Sedimentar a 2500 rpm con un rotor basculante (MSE de Pacisa).



Por cada 0.2 ml de sobrenadante añadir 50 mg de $\text{NaHCO}_3 \pm$ 10 mg. A continuación añadir 0.4 ml de cloruro de dansilo (100 mg/ml en acetona). Tapar y agitar 16 horas en la oscuridad a temperatura ambiente.

Reaccionar el exceso de cloruro de dansilo con 0.1 ml de prolina (100 mg/ml en H_2O) agitando durante 30 min. Extraer los derivados dansilados de las aminas con 10 μl de benceno agitando durante 45 seg con el vórtex. Centrifugar con la microfuga durante 2 min.



Tomar la fase superior (Benceno + parte de la acetona) (unos 140 μl) y evaporarla con un chorro de N_2 hasta concentrarla en unos 20 μl .

Poner los 20 μl sobre una placa de cromatografía en capa fina de gel de sílice (Merck 5721), que previamente se ha mantenido a 1 hora a 100°C . Dejar secar 5 min a 20°C .

Eluir 1 hora con etilacetato:ciclohexano (2:3). Dejar secar 5 min en el ambiente (campana extractora).

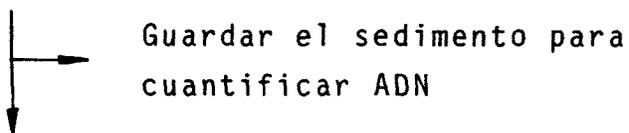
Eluir 30 min con etilacetato:ciclohexano (2:3). Dejar secar 5min en la campana extractora.

Estabilizar la fluorescencia pulverizando la placa con Trietanolamina:isopropanol (1:1) 20 seg a 40 cm. Desechar la placa 1 hora bajo vacío en presencia de "sicapent". Dejar 30 min en el ambiente. Leer la fluorescencia haciendo un scan "in situ" de las manchas correspondiente a los derivados dansilados (densitómetro "Vitatron") estimulando con luz ultravioleta y leyendo la fluorescencia emitida a 542nm. Comparar con estándar de poliaminas.

2.1.4.2.- Actividad ornitin descarboxilasa:

Se determinó tal como está descrito por Jänne and Williams-Ashman (1971a,b).

Homogeneizar las células en 3 ml de TED (Tris 25 mM, EDTA 0.1 mM, Ditiotritol 1 mM, pH 7.4 ajustado con HCl) 20 pases con un homegeneizador vidrio-teflón de 5ml (Sorvall). Sedimentar a 25.000 rpm 10 min.



A 500 u1 del sobrenadante añadirles 5 u1 de (1840 uM ornitina, 50 uM fosfato de piridoxal en TED) y 10 u1 de ^{14}C -ornitina 50 mCi/mmol. Recoger el CO_2 liberado mediante 200 u1 de NCS dispuestos en un receptáculo dentro del frasco de reacción (cerrado herméticamente) durante 60 min. Parar la reacción con 500 u1 de SO_4H_2 1 N. Leer la radioactividad recogida por el NCS en 10 ml de "supersolve".

2.1.4.3.- Actividad S-adenosil metionina descarboxilasa:

Se determinó tal como está descrito por Jänne and Williams-Ashman (1971a,b).

El procedimiento es el mismo que para determinar la actividad ornitin descarboxilasa, excepto en que el medio de reacción está compuesto por (55 nmoles de S-adenosil-L-(1- ^{14}C)metionina (7.3 mCi/mM), 5 umoles de putrescina, 0.1 mmoles de tris-HCl, 300 u1 del extracto de enzima en un volumen final de 500 u1.

2.1.5.- Métodos analíticos:

2.1.5.1.- Determinación de proteína:

Se realizó mediante el método de Lowry et al., 1951.

Disoluciones: Disolución B: $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 % (w/v)
Tartrato NaK 1 % (w/v)
Disolución D CO_3Na_2 2 % (w/v)

Reactivo 1: disolución B 1 ml
(50 tubos) disolución D 50 ml
(preparar justo antes de su uso)

Reactivo 2: 5.56 ml de FOLIN comercial
+ H_2O hasta 10 ml
(preparado antes de su uso)

Procedimiento:

- Tomar muestra o estándar (BSA) (500 μl) en NaOH 1 N.
- Añadir 3 ml del reactivo 1, agitar y esperar 10 min.
- Añadir 0.3 ml del reactivo 2, agitar rápidamente (antes de 10 seg.)
- Leer después de 30 min (y antes de 1 hora) a 750 nm.

2.1.5.2.- Determinación de ADN:

Se realizó mediante la reacción de la difenilamina (Burton, 1956). Una estimación de la cantidad de ADN se obtuvo también midiendo la densidad óptica a 260 nm de los hidrolizados en ácido perclórico.

Mediante la OD a 260 nm.:

Lavar la muestra 3 veces en ácido perclórico 0.5 N (85,8 ml de ácido perclórico comercial Merck (70%) Art.519 + H_2O hasta 2000 ml) a 0-4°C. Hidrolizar la muestra en ácido perclórico 0.5 N a 90°C durante 20 min. Sedimentar a 6000 rpm 10 min (rotor J-20 de la Beckman) a 4°C. Leer la OD.600 nm. del sobrenadante. (1 mg/ml = OD.a 600 nm de 26).

2.1.5.2.- Cuantificación de ADN (reacción de la difenilamina):

Disoluciones: Disolución A: 500 ml de ácido acético gacial
(preservar de la luz) 7.5 ml de SO_4H_2 concentrado

Disolución B: Acetaldehído 16 mg/ml
(preparar y guardar a 4°C.
Es volátil y muy tóxico)

Reactivo(50 tubos): 1.5 g de difenilamina
100 ml de disolución A
500 μl de disolución B
(preparar justo antes
de su uso)

Método:

Lavar e hidrolizar la muestra con ácido perclórico 0.5 N tal como se describe para la medición de la absorbancia a 260 nm (pag. 111). Sedimentar a 6.000 rpm 10 min (rotor J-20 de la Beckman) a 4°C. (3 ml de PCA 0.5 N es óptimo para 30-800 μg de ADN)

↓ → Desechar pellet

Ajustar muestras con ácido perclórico 0.5 N hasta 1 ml. (La cantidad de ADN en cada tubo tiene que estar comprendida entre 5 y 150 μg . Lo óptimo son unos 25-100 μg). Paralelamente preparar estándares conteniendo 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 μg de ADN hidrolizado en las mismas condiciones que las muestras problema. Muestras y estándares por duplicado.

↓

Añadir 2 ml de reactivo. Vortexear 3 veces 1 seg cada vez. Dejar que la reacción transcurre durante 17 horas en la oscuridad a temperatura ambiente.

↓

Leer la absorbancia a 595 nm. Representar gráficamente la cantidad de ADN estándar respecto a la absorbancia. Trazar la recta que se ajuste mejor a los puntos y extrapolar la cantidad de ADN problema.

2.1.5.3.- Determinación de las argininas:

La determinación de las argininas se realizó para determinar con precisión la cantidad de protamina utilizada en los ensayos de desplazamiento. Al ser esta una proteína muy rica en argininas, se comporta anómalamente al utilizar los métodos habituales para su cuantificación (Lowry).

La cuantificación de las argininas de las protaminas se realizó tras su hidrólisis en HCl 6 N por el método de Sakaguchi (Dubnoff, 1941).

Disoluciones: HCl 12 N.

5% (w/v) en H₂O

10% (w/v) urea en H₂O

0.2% (w/v) naphтол en etanol absoluto

NAPHTOL-UREA: 1 volumen de 0.2% naphтол
4 volúmenes de 10% urea

(preparado antes de su uso. Para 10 tubos se necesitan 10 ml) (Naphтол es tóxico)

HIPOBROMITO SODICO: 0.66 ml de bromo líquido
100 ml de 5% NaOH a 0°C

(Dura una semana a 4°C. Para 10 tubos se necesitan 2 ml.) (Manejar el bromo con mucho cuidado. Provoca quemaduras graves por contacto y es tóxico por inhalación).

Procedimiento:

Hidrolizar la muestra en un recipiente de vidrio (herméticamente cerrado por fuego) con HCl 6 N a 110°C durante 24-36 horas. Desechar la muestra mediante calor (60°C) y vacío (un rotavapor es ideal). Disolver en un volumen de 2ml de H₂O. Enfriar todas las muestras, reactivos y material volumétrico a 0°C. A partir de aquí trabajar en la cámara fría. Añadir 0.5 ml de NAPHTOL-UREA y agitar con el vortex inmediatamente. Esperar 2 min. Añadir 0.2 ml de HIPOBROMITO SODICO y agitar inmediatamente con el vortex. Mantener 20 min. a 0°C. Calentar 2 min a 20°C en un baño. Vortexear 1 seg. Leer la absorbancia a 525 nm. Comparar con estándar de arginina.

2.2.- ACIDOS NUCLEICOS

2.2.1.- ARN:

2.2.1.1.- Aislamiento:

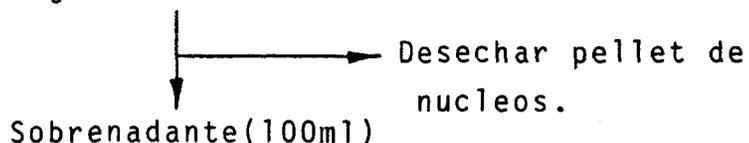
El aislamiento del ARN se realizó utilizando el método del Tiocianato de guanidina, uno de los mejores para evitar la degradación del ARN (Chirgwin et al., 1979; Przybyla et al., 1979).

Aislamiento del RNA para construir la mini-libreria de CDNA:

Preparación de una suspensión de células enriquecida en espermátidas: Para ello se preparó una suspensión de células tal como está descrito en pag. 74 y 75. El pellet de células se suspende en 200 ml de MEM y centrifuga a 1.000 rpm 1 min (rotor basculante JS-7.5 de la Beckman). El sobrenadante está enriquecido en espermátidas alargadas y espermátidas redondas. Sedimentar el sobrenadante a 2500 rpm 10 min con un rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman).



Suspender (espermátidas obtenidas de 175 g de testículo) en 100 ml de TMK (Tris 50 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 140 mM, 2-mercaptoetanol 100 mM pH 7.2) conteniendo 1% de ácido iodoacético. Homogeneizar 20 pases a 0°C con dounce "Vidra Foc" E-5772. Filtrar con 8 capas de gasa quirúrgica estéril. Sedimentar a 1160xg. 5 min a 0-4°C.



Añadir 70 gr de tiocianato de guanidina. Mezclar a 0°C durante 1 min. Sumergir en un baño maria a 65°C agitando constantemente hasta que la suspensión se vuelva transparente. Dejar enfriar a 4°C. Añadir 200 ul de ácido acético glacial. Añadir 75 ml de etanol. Precipitar 12 h a -20°C.

Sedimentar a 6.000 rpm con rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 10 min a -10°C .

↓ ————— Desechar sobrenadante
↓

Suspender el pellet en 50 ml de 7.5 M Guanidina, 25 mM citrato sódico, 100 mM 2-mercaptoetanol. Calentar en un baño a 60°C hasta que la suspensión se vuelva transparente. Dejar enfriar a 4°C . Añadir 100 μl de ácido acético glacial. Añadir 37.5 ml de etanol. Dejar precipitar a -20°C overnight. Sedimentar a 6.000 rpm con rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 10 min a -10°C .

↓ ————— Desechar sobrenadante
↓

Suspender el pellet en 25 ml de la disolución anterior y calentar a 60°C hasta que la suspensión se vuelva transparente. Añadir 50 μl de ácido acético glacial. Añadir 0.75 vol de etanol. Precipitar a -20°C overnight. Sedimentar a 6.000 rpm con rotor basculante (JS-7.5 de la Beckman) durante 10 min a -10°C .

↓ ————— Desechar sobrenadante
↓

Suspender en 8ml de 1 mM EDTA pH 7.0 agitando vigorosamente con la mano durante 15 seg. Añadir 0.8 ml de 2 M CH_3COOK pH 5.0. Añadir 17.6 ml de etanol. Precipitar overnight a -20°C . Sedimentar a 7.000 rpm (Rotor JS-7.5 Beckman) 20 min a -10°C .

↓ ————— Desechar sobrenadante
↓

Lavar con 2 ml de etanol 95%. Secar. Disolver en 2 ml de EDTA 1 mM pH 7.0. Hacer espectro, electroforesis para determinar su integridad y guardar congelado a -80°C .

Aislamiento del RNA a partir de testículos en diferentes fases de desarrollo para estudiar la expresión génica.

Homogeneizar los testículos directamente en 10 vol. de 4 M tiocianato de guanidina, 0.5% (w/v) N-lauroylsarcosina

sódica, 25 mM citrato sódico y 100 mM 2-mercaptoetanol con un homogeneizador "TRI-R" de 22 mm. de diámetro con vástago de teflón acoplado a un taladrin 20 pases a 10°C. Añadir 0.025 vol de acético 1 M y 0.75 vol de etanol. precipitar a -20°C overnight. Resto de pasos idénticos a los de pag. 115.

2.2.1.2.- Selección del poli A⁺ ARN mensajero:

El poli-A⁺ ARN mensajero fue seleccionado por cromatografía en oligo dT-celulosa. (Aviv and Leder, 1972)

Disoluciones: Tampón de carga: 0.5 M NaCl
(Preparar también 2x concentrado) 1 mM EDTA
0.1 % (w/v) SDS
10 mM Tris-HCl pH 7.5

Tampón de elución: 1 mM EDTA
0.05 % (w/v) SDS
10 mM Tris-HCl pH 7.5

Regenerador de columna: 0.1 M NaOH
5 mM EDTA

Método:

-Preparación de la columna: Lavar con 500 ul de H₂O. Pasar 500 ul de regenerador de columna. Lavar 5 veces con un volumen igual al de la columna de H₂O. El pH del eluido del último lavado tiene que ser inferior a 8. Lavar 5 veces con tampón de carga. El pH del eluido del último lavado tiene que ser aproximadamente de 7.8 o menos.

-Preparación de la muestra: Calentar el ARN a 65°C durante 5 min. Enfriar rápidamente en hielo. Añadir 1 volumen de 2x tampón de carga. La concentración del ARN tiene que ser de unos 5-10 ug/ul.

-Cargado del ARN y elución del poli-A⁺ ARN: Cargar unos

500 u1 de Disolución de ARN a un flujo de 10-15 ml/h. Lavar con 5-10 veces el volumen de la columna con tampón de carga. De esta forma resulta eluido el poly A⁻ ARN (poly A⁻ ARN mensajero, tRNA y rRNA).

-Elución del poli-A⁺ ARN mensajero: Añadir 3 volúmenes (respecto al volumen de la columna) de tampón de elución y empezar a recoger el eluido en un ependorf en hielo (las primeras gotas pueden desecharse). Añadir al eluido 0.1 vol de Acetato sódico 3 M (pH 5.2) y 2.5 vol de etanol. Precipitar a -20°C toda la noche. Sedimentar con la microfuga (HERME) 15 min. a 4°C. Añadir 1 ml de etanol al pellet (ARN) agitar un poco manualmente y volver a centrifugar 15 min a 4°C. Desechar el sobrenadante. Guardar el ARN mensajero empapado en etanol a -20°C.

2.2.1.3.- Electroforesis de ARN:

2.2.1.3.1.- Geles para ARN de formaldehido-agarosa 1%:

(Lehrach et al., 1977 ; Golberg, 1980)

<u>Disoluciones:</u>	10x MOPS	MOPS	20.9 g
		Acetato Na ⁺ anhidro	2.06 g(3.4 si tri- hidrato)
		EDTA 0.5 M	20 ml
		H ₂ O hasta	500 ml
		Ajustar a pH 7 con NaOH o a.acético	

Formamida desionizada

Formaldehido (Merck 3999) filtrado con papel
Whatmann 3MM.

50% glicerol, 0.1% azul de bromofenol.

Es muy importante que todo el material sea estéril. El formaldehido y la formamida no pueden autoclavarse, por lo que procurar que no estén contaminados. Al autoclavarse, el 10x MOPS toma un color amarillento que es normal y no interfiere. El equipo de electroforesis limpiarlo con etanol.

Método (geles para ARN de Formaldehido-Agarosa 1%):

Pesar 0.5 g de agarosa en un erlenmeyer de 100 ml. Añadir 37 ml de H₂O estéril. Autoclavar 30 min. Enfriar hasta 60-65°C. Añadir 5ml de 10x MOPS. Añadir 8 ml de formaldehido 37%. Remover suavemente y verter sobre la placa. Poner peine. Esperar entre 30 min y 1 hora para que gelifique. Retirar peine. Tampón de cubeta: 1x MOPS.

Muestras: Secar las muestras (empapadas en etanol) con el "speed-vacum" 5 min. Añadir 12 ul de H₂O autoclavada y disolver. Añadir 5 ul de 10x MOPS. Añadir 8 ul de 37% formaldehido. Añadir 25 ul de formamida. Calentar 5 min a 65°C. Enfriar rápidamente en hielo. Añadir 5 ul de 50% glicerol, 0.1% azul de bromofenol. Cargar las muestras.

Conectar a 80 voltios 2 horas (cada 30 min mezclar el tampón de la cubeta).

Tinción: Lavar el gel en 0.5% glicina (500 ml) 4 veces 15 min cada vez en la cámara fría. Teñir 1 hora con bromuro de etidio 10 ug/ml a oscuras a temperatura ambiente. Lavar con 50 mM Acetato amónico (7.7 g + H₂O hasta 2000 ml) hasta que sobresalgan las bandas (generalmente es mejor dejarlo toda la noche en la cámara fría con agitación suave). (suelen ser necesarios varios cambios de tampón de lavado).

Observar con un transiluminador ultravioleta (mejor no teñir si el gel se tiene que transferir).

2.2.1.3.2.- Geles para ARN de metilmercurio-Agarosa 2%

(Bailey and Davidson, 1976)

Disoluciones: Tampón 10xE:

Acido bórico	30.9	g
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	19.1	g
Sulfato sódico	14.2	g
EDTA disódico	3.72	g
H ₂ O hasta	1000	ml
Autoclavar		

1 M Metilmercurio (CH₃Hg) (MUY TOXICO Y VOLATIL)

Tampón 2xD:

Ficoll 400	0.5	g
10xE	1	ml
Azul de bromofenol	1	mg
H ₂ O hasta	10	ml

Método (geles para ARN de metilmercurio-agarosa 2%):

Preparación del gel: Pesár 2 g de agarosa y disolver en 100 ml de H₂O. Autoclavar. Enfriar ligeramente y añadir 0.1 vol de 10xE (11.1 ml). Enfriar a 65°C y añadir 0.01 vol (1.1 ml) de 1 M CH₃Hg. Verter en el gel y poner el peine. Esperar a que gelifique unos 30-45 min. Retirar el peine. Tampón de electroforesis: 1xE.

Preparación de las muestras: Secar las muestras (empapadas en etanol) con el "speed vacuum" 5 min. Añadir 20 ul de H₂O autoclavada y disolver. Añadir 25 ul de 2xD. Añadir 5 ul de 100 mM CH₃Hg (en la campana extractora debido a su toxicidad). Calentar a 65°C 10 min. Enfriar rápidamente en hielo. Cargar las muestras.

Tinción: (mejor no transferir el gel si hay que transferirlo a papel de nailon o nitrocelulosa) Sumergir el gel en 0.5 M acetato amónico, 1 ug/ml bromuro de etidio, 0.4 ul/ml de 2-mercaptoetanol (para neutralizar el metilmercurio) durante 30 min.

2.2.1.4.- "Northern blot":

En una cubeta resistente (15x20x5cm(altura) poner 4 tapones de silicona (de unos 4cm de altura). Encima de ellos poner un cristal (10x15x0.5cm). Encima del cristal poner 2 hojas de papel Whatman 3MM de tal forma que sobresalgan por dos de los lados y lleguen a la base de la cubeta. Llenar la cubeta hasta 3-4cm de 20xSSC(175.3 g de NaCl + 88.2 g de citrato sódico + 800 ml H₂O y ajustar a pH 8.0 con NaOH). Empapar también el papel Whatman con 20xSSC. Encima del papel Whatman poner el fragmento del gel a transferir (dándole la vuelta si el gel se ha hecho horizontal). Poner la membrana (nitrocelulosa o mejor nailon (Pall-Biodyne o Gene Screen)) encima del gel (dimensiones idénticas a las del gel). Poner 2 trozos de papel whatman 3MM de las mismas dimensiones que el gel encima de la membrana cuando esta se haya empapado completamente por capilaridad. Pasar una pipeta pasteur por encima del papel whatman para quitar posibles burbujas atrapadas entre las diversas capas. Poner un grueso de 3-5cm

de altura (según sea el tamaño del gel) de toallas de papel cortadas a las mismas dimensiones que el gel. Encima de las toallas de papel poner un vidrio (de aproximadamente las dimensiones del gel) y encima de este un peso 1-2 Kg según sean las dimensiones del gel. Poner tiras de parafilm (1x 10 cm) adosadas a los laterales del gel y sobre la primera hoja de papel 3MM. Cubrir el conjunto con "Saran Wrap" para evitar que se seque excesivamente el conjunto y dejar transferir toda la noche.

La transferencia aumenta si el día siguiente se cambian las toallas de papel y se deja transferir unas 8 horas más.

Desmontar el conjunto cuidadosamente y con unas pinzas poner el filtro de nailon sobre una hoja de papel whatman 3 MM (El filtro con la cara en donde está el ARN hacia arriba). y dejar secar 30 min en el ambiente. Incubar el filtro a 80°C durante 2 horas. Guardar entre dos hojas de papel 3MM dentro de una bolsa de plástico a temperatura ambiente hasta que sea utilizado.

2.2.2.1.- Preparación de cDNA (Okayama and Berg, 1982):

Síntesis de la primera cadena de cDNA:

7.5 ug de poli-A⁺ ARN mensajero se suspenden en 5 ul de CH₃Hg 4 mM y se incuban 10 min a temperatura ambiente. Añadir 5 ul de (100mM Ditiotritol, 100mM MgCl₂, 500mM Tris-HCl pH 8.3 a 43°C) e incubar 10 min a temperatura ambiente. Añadir 5 ul de oligo(dT) 12-18 1 mg/ml, 5 ul de 40 mM pirofosfato sódico, 2.5 ul de (0.025M dATP, 0.025M dCTP, 0.025M dGTP y 0.025M dTTP), 150 unidades de transcriptasa inversa (8 ul 20 u/ul) y 19.5 ul de H₂O (para que el volumen final sea de 50 ul).

10 uCi de ³²P-α-dCTP
de e-d-s por vacío

Dividir en 2 alicuotas

5 ul

45 ul

+

Incubar a
43°C 30 min

+ 0.2 ul de
0.5 M EDTA pH 8

+ 1.2 ul de
5x tampón de muestra
para gel alcalino

Control electroforético en gel alcalino de agarosa 1.5%

Autorradiografía para ver el tamaño de la 1ª cadena de cDNA

Incubar a
43°C 30 min

+ 1.2 ul de
0.5 M EDTA pH 8

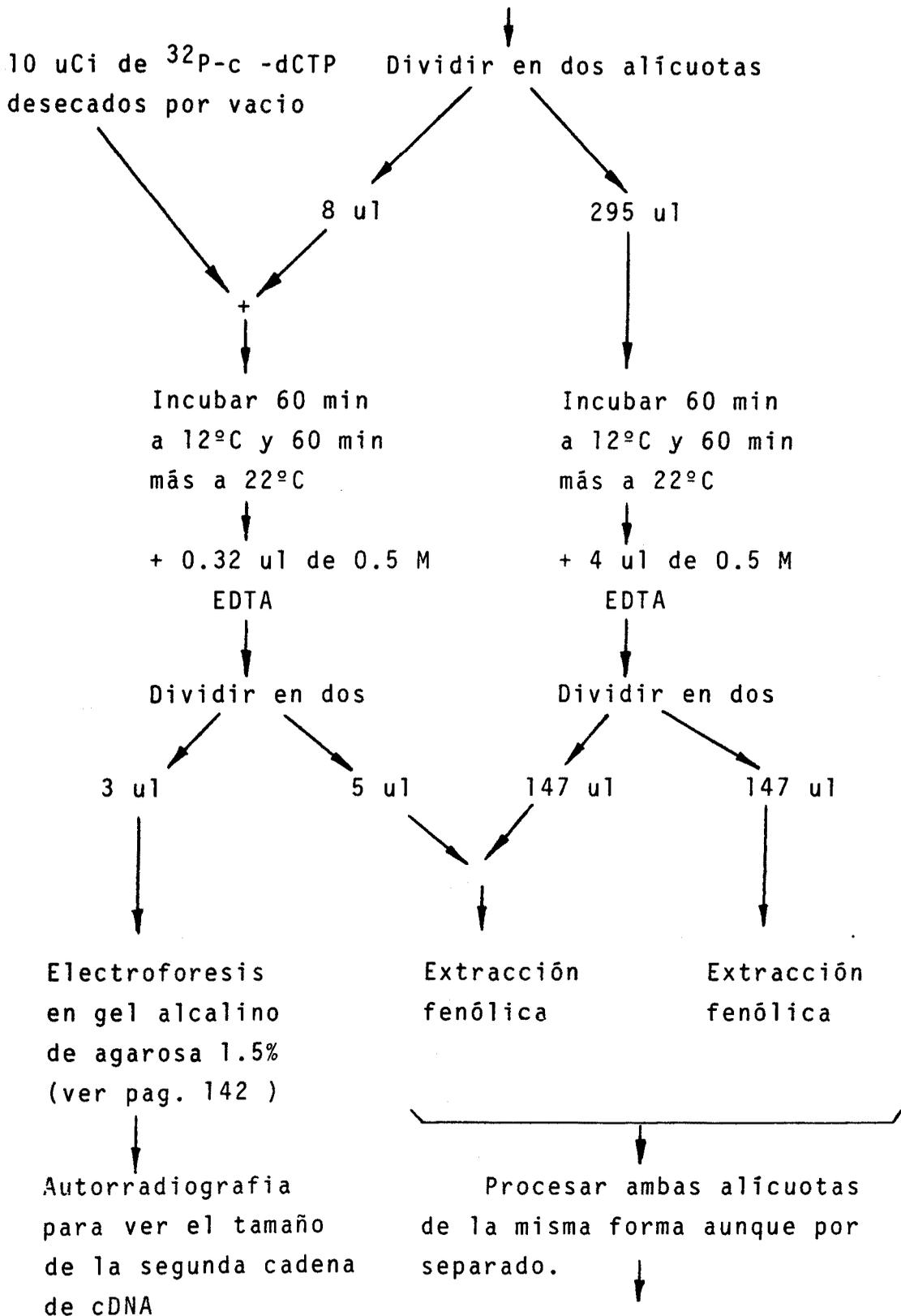
+ 55 ul de TE
(10mM Tris pH 8
1mM EDTA)

Extracción fenólica. precipitación con 0.4 M Acetato NH₄ y 2 vol. de etanol.

lavar con etanol.
(ver pag. 144)
Secar por vacío

Síntesis de la segunda cadena de cDNA:

3 ug de híbrido se disuelven en 200ul de H₂O y se les añade 30 ul de (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl), 7.5 ul de 2mg/ml de BSA, 48 ul de (0.025 M dATP, 0.025 M dCTP, 0.025M dGTP y 0.025 M dTTP), 4.2 ul de E.Coli RNAasa H (15 u/25ul de BRL) y 13.8 ul de Polimerasa I (Boheringer 5 u/ul).



2.2.2.2.- Clonaje en el vector M13mp9:

2.2.2.2.1.-Metilación de los sitios de restricción para EcoRI:

Disolver el cDNA en 6.4 ul de H₂O, añadir 10 ul de (200 mM Tris-HCl pH8, 20 mM EDTA), 1.6 ul de 1 mM S-adenosilmetionina y 2 ul de EcoR I metilasa (40 unidades Biolabs). Incubar 1 hora a 37°C. Inactivar la enzima 10 min a 65°C. Hacer precipitación etanólica (ver pag.144)

2.2.2.2.2.- Reparación de los extremos del cDNA:

Disolver en 15.7 ul de H₂O, añadir 2 ul de (0.5 M Tris-HCl pH 7.4, 70 mM MgCl₂, 10 mM Ditiotritol), 1.25 ul de (1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP y 1mM dTTP) y 1 ul de Klenow (5 Unidades de PL-Pharmacia). Incubar 2 horas a temperatura ambiente. Hacer extracción fenólica, precipitación etanólica y secar (ver pag.144).

2.2.2.2.3.- Adición de "linkers" EcoRI al cDNA:

Disolver en 20 ul de H₂O, añadir 25 ul de (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM espermidina, 2 mM ATP, 2.5 mM Hexaamin cobalt chloride, 20 ug/ml BSA), 3 ul de linkers EcoRI 0.5 ug/ul y 2 ul de T4 DNA ligasa. Incubar 4 horas a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C. Hacer extracción fenólica, precipitación etanólica y secar.

2.2.2.2.4.-Digestión del CDNA+linkers con EcoR I:

Disolver en 26 ul de H₂O, añadir 4 ul de (0.5 M Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.1 M MgCl₂), 4 ul de 10 mM Ditiotritol, 2 ul de 2 ug/ul BSA y 4 ul de EcoR I (10 u/ul BRL). Incubar 6 horas a 37°C. Hacer precipitación etanólica y secar.(ver pag.144).

2.2.2.2.5.- Separación del cDNA+linkers de los linkers libres:

Para ello se han utilizado dos métodos: A.-Electroforesis en gel de 1% agarosa low melt seguida de extracción fenólica de la zona del gel que contiene el cDNA+linkers. B.- Cromatografía en una columna de sepharosa 4B. Ambos métodos han dado buenos resultados.

Mediante electroforesis en gel de Agarosa de baja temperatura de fusión:

Construir un gel de TAE-agarosa 1% de baja temperatura de fusión (ver pag. 143). Poner muestras y conectar a 30 mA 2 horas. Recortar con un bisturí las zonas correspondientes a 500-1000 y 1000-4000 bases, ponerlas en tubos ependorf y extraer la agarosa mediante extracción fenólica. Precipitar con etanol y secar.

Mediante cromatografía en sepharosa 4B:

Disolver el cDNA con algunas cadenas marcadas con ^{32}P en 50 ul de tampón de columna. Añadir 5 ul de (50% glicerol, 0.6 M NaCl, 0.05% (w/v) azul de bromofenol en TE) y cargar a una columna de sepharosa 4B. Tampón de la columna: 0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA. Preparación de la columna: empaquetar 1 ml de sepharosa 4B disueltos en 3-4 ml de tampón de columna en una pipeta de cristal de 2ml cortada por la mitad y con un poco de fibra de vidrio en la punta (la pipeta tiene que estar siliconizada), lavar con 5 vol. de tampón de columna, saturar con tRNA y lavar de nuevo con 10 vol. de tampón de columna.

Recolectar 2 gotas en cada tubo ependorf (seguir la radioactividad con un geiger) y parar cuando se hayan recogido 3 fracciones coloreadas.

Tomar alícuotas de cada ependorf y hacer control electroforético y autorradiográfico para determinar el tamaño del cDNA eluido en cada fracción.

El resto de muestra precipitarlo con etanol y secarlo (ver pag. 144).

2.2.2.2.6.- Preparación del vector (digestión con EcoRI de M13mp9 y defosforilación de sus extremos):

Tomar 20 μ l de M13mp9 0.1 μ g/ μ l (P-L Biochemicals) y añadir 3 μ l de (0.5 M Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.1 M $MgCl_2$), 3 μ l de 10 mM ditionitrol, 1.5 μ l de 2 μ g/ μ l BSA, y 1.5 μ l de EcoRI 10 unidades/ μ l (BRL). Incubar 8 horas a 37°C. Inactivar EcoRI calentando 5 min a 70°C. Precipitación etanólica, lavar con etanol y secar.

Disolver en 44 μ l de H_2O y añadir 5 μ l de (0.5 M Tris-HCl pH 9, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnCl_2$, 10 mM espermidina), y 1 μ l de fosfatasa alcalina (Boehringer 20 u/ μ l). Incubar 2 horas a 37°C. Hacer extracción fenólica, precipitar y lavar con etanol y secar. Disolver en 100 μ l de (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA) para que la concentración final sea de 20 ng/ μ l.

2.2.2.2.7.- Ligación del CDNA+linkers con el vector:

1 μ l de vector M13mp9 (digerido con EcoRI y con los extremos defosforilados)(20 ng/ μ l) se incuban con 5 μ l de cDNA con linkers de EcoRI (100 pg-2ng) en presencia de 1 μ l de(0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M $MgCl_2$, 0.1 M ditionitrol, 10 mM espermidina y 1mg/ml BSA), 1 μ l de 10 mM rATP y 1 μ l de T4 DNA ligasa (4 unidades Weiss). Incubar toda la noche a 4°C.

2.2.2.2.8.- Preparación de células competentes (Hanahan, 1983):

Infectar 10 ml de 2xYT (10 g bactotripton, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en 1 litro de H_2O y autoclavar) con E.Coli TG1 e incubar toda la noche con agitación a 37°C.

A 30 ml de 2xYT añadir 0.3 ml de 1 M SO_4Mg y 0.3 ml de 1 M $MgCl_2$ estériles. Infectar con 0.3 ml del cultivo fresco

de E.Coli TG1 y crecer con agitación hasta una densidad óptica de 0.6 (unas 1½ - 2 horas).

Sedimentar a 2000 rpm (rotor J-20 de la Beckman) 10 min a 4°C.



Suspender en 10 ml de TFB (0.6 ml de MES 1M, 604.5 mg de RbCl, 445.3 mg de MnCl₂, 73.5 mg de CaCl₂, 40,12 mg de Hexaamin cobalt chloride, ajustar con H₂O hasta 50 ml y esterilizar por filtrado) a 4°C y dejar 15 min en hielo. Sedimentar a 2000 rpm (rotor J-20 de la Beckman) 5 min a 4°C



Suspender en 2.5 ml de TFB a 4°C con cuidado de no romper las células. Añadir 100 ul de Dimetilsulfóxido y dejar 5 min en hielo. Añadir 100 ul de 2.25 M DTT, 40 mM Acetato K pH 6. y dejar 5 min en hielo. Añadir 100 ul de DMSO y dejar 5 min en hielo. Utilizar el mismo día de la preparación.

2.2.2.2.9.- Transformación de E.Coli TG1 con M13mp9:

En un tubo estéril (Falcon 2063 o 2069 (12x75mm)) poner 250 ul de células competentes y los 10 ul de la ligación (M13mp9+insert). Incubar 45 min a 0°C (enhielo). "Heat shock" durante 90 segundos a 43°C. Dejar 2 min en hielo. Añadir 3ml de "top agar" (1 g de bactotripton + 0.8 g de NaCl + 0.8 g de bactoagar + H₂O hasta 100 ml y autoclavar) a 45°C conteniendo 60 ul de 2% 5-bromo 4-cloro 3 indolyl B-D-galactopiranosido en dimetilformamida y 25 ul de 2.5% isopropil B d-thiogalactopiranosido en H₂O. Rápidamente mezclar mediante inversión del tubo 2 veces y verter sobre la placa de petri con medio de cultivo sólido "TYE plate" (1.5% bactoagar en 2xYT y autoclavar). Añadir MgSO₄ a la concentración final de 10 mM). Ladear un poco la placa de Petri para distribuir la agarosa uniformemente. Esperar 15-30 min para que solidifique. Incubar invertida a 37°C toda la noche.

2.2.2.2.10.- Transformación de E.Coli HB 100-1 con PBR 322:

Preparar células competentes igual que para la cepa E.Coli TG1.

En un tubo estéril (Falcon 2063 o 2069 (12x75mm)) poner 200 ul de células competentes y 10 ul de la ligación (PBR+ insert). Incubar a 0°C (en hielo) 40 min mezclando suave y ocasionalmente. "Heat shock" 90 segundos a 42°C. Añadir 3 ml de 2xYT conteniendo 10 mM SO_4Mg , 10 mM MgCl_2 y 20 mM glucosa. Incubar 1 hora a 37°C. Sedimentar 3 min a 1000 rpm (rotor JS-7.5 de la Beckman). Resuspender el pellet en 250 ml del medio anterior. Sembrar sobre una placa de Petri con medio de cultivo sólido "TYE plate" conteniendo 35 ug/ul de ampicilina (sembrar con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril con la punta doblada en ángulo recto). Esperar unos 15-30 min para que se fijen las bacterias sobre la placa. Incubar invertidas a 37°C toda la noche.

2.2.2.2.11.- Minipreparaciones de M13mp9+insert partiendo de los clones de M13mp9+insert en E.Coli TG1:

Infectar con una placa individual de color blanco (E.Coli TG1 infectado por un solo tipo de partículas M13mp9+insert) 1.5 ml de (0.3 ml de cultivo fresco de E.Coli TG1 en 2xYT) y crecer con agitación (superior a 300 rpm) a 37°C durante 4½-5½ horas.

Transferir a un ependorf y centrifugar 5 min.



Transferir a un tubo ependorf y añadir 200 ul de solución de polietilenglicol (20 g de polietilenglicol (6000 de peso molecular), 14.6 g de NaCl y H_2O hasta 100 ml). Vortexear bien y dejar 1 hora a temperatura ambiente. Centrifugar 10 min, desechar el sobrenadante y centrifugar 1 min. Eliminar los restos de sobrenadante mediante aspiración. Hacer una extracción fenólica, precipitar y lavar con etanol, secar (ver pag. 144) y disolver en 30 ul de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). Guardar congelado a -20°C.

2.2.2.3.- Preparación de sondas y filtros. Hibridaciones:

2.2.2.3.1.- Sondas: A partir de los clones de cadena sencilla M13mp9+insert, se prepararon dos tipos distintos de sonda (Fig 22):

Con la sonda tipo "1" es posible detectar aquellas secuencias complementarias a la secuencia del "insert". Para utilizar este tipo de sondas es importante que NO se desnaturalice la parte de doble cadena que se ha sintetizado. Esta sonda presenta la ventaja de que puede utilizarse en hibridaciones frente clones de M13 de cadena simple.

Con la sonda tipo "2" es posible detectar aquellas secuencias que sean iguales a la secuencia del insert. Esta sonda debe desnaturalizarse previo uso. Esta sonda no puede utilizarse para detectar ácidos nucleicos que contengan secuencias de M13. Se ha utilizado en los "Northern blots".

Preparación de sondas tipo "1" (Hu and Messing, 1982):

Tomar 2 ul de "M13 hybridization probe primer" (4 ng Pharmacia) y calentar 2 min en un baño a ebullición. Enfriar en hielo. Añadir 4 ul de H₂O, 1 ul de 0.1 M ditiotritol, 1 ul de (0.1 M Tris-HCl pH 7.9, 0.6 M NaCl, 66 mM MgCl₂) y 2 ul de ADN de cadena sencilla del clon a partir del cual queremos preparar la sonda (100 ng). Incubar a 65°C 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Añadir a 10uCi de ³²P-c -dCTP secados por vacio. Añadir 1 ul de (0.5 M dGTP, 0.5 M dATP, 0.5 M dTTP) y 1 ul (5 unidades) de Klenow (PL-biochemicals). Incubar 90 min a 15°C. Parar añadiendo 1 ul de 250 mM EDTA pH 8.3. Guardar en hielo hasta que tenga que utilizarse.

Preparación de sondas tipo "2":

Tomar 1 ug de ADN se cadena sencilla del clon a partir del cual queremos preparar la sonda (6ul) y añadirles 1 ul de "M13 17mer sequencing primer"(0.2 pmoles), 1 ul de TM (0.1 M Tris-HCl pH 8, 50 mM MgCl₂) y 3 ul de H₂O. Incubar 50 min a 55°C. Añadir 4 ul de (0.5 M Tris-HCl pH 7.2,

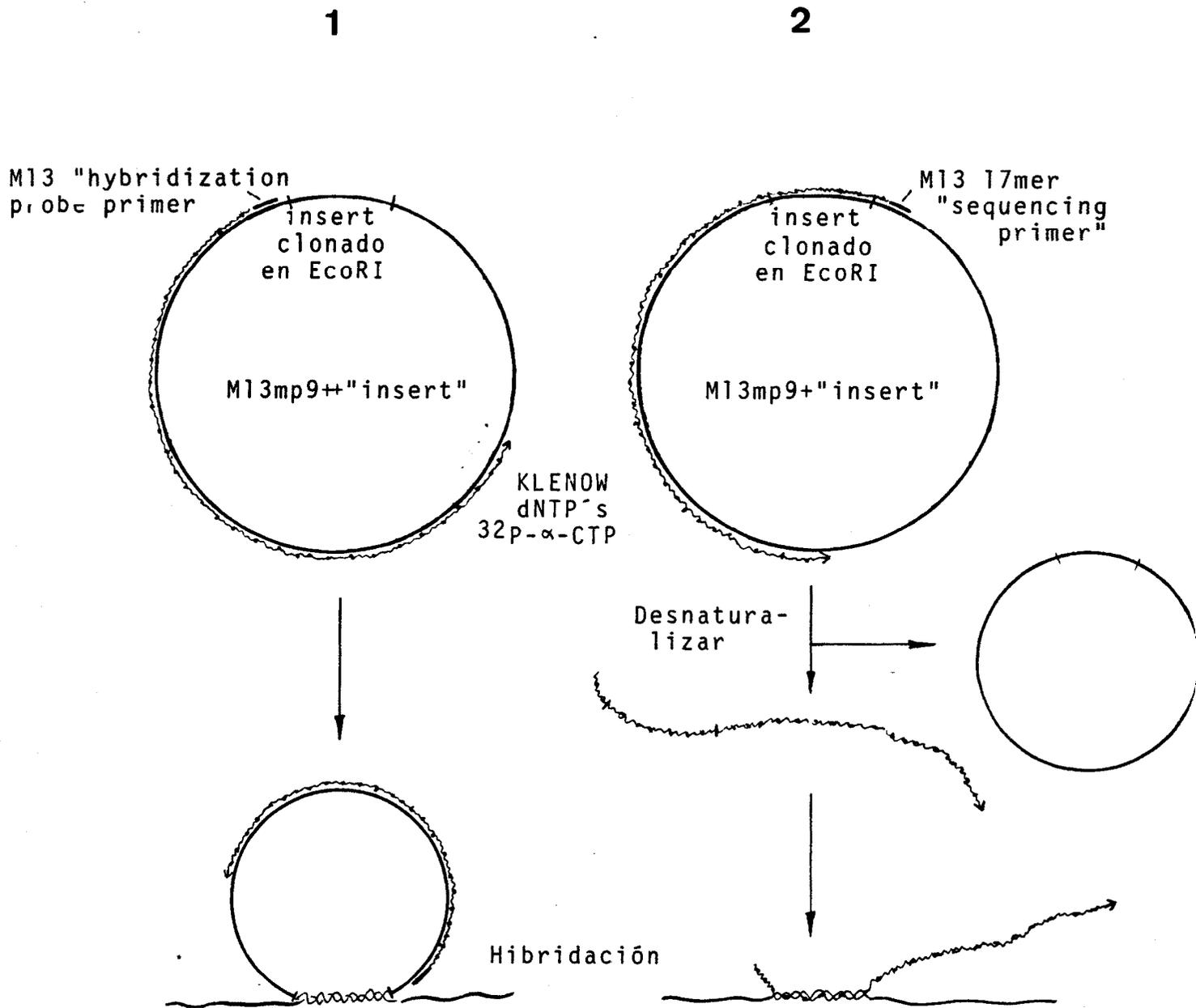


Fig 22.

Diferentes tipos de sondas preparados a partir de clones de cadena simple de M13mp9+insert.

0.1 M MgSO₄, 1 mM ditiotritol, 500 ug/ml de BSA), 3 ul de (0.33 mM dATP, 0.33 mM dCTP, 0.33 mM dTTP, 0.33 mM dGTP), 5 ul de ³²P-c -CTP (50 uCi), 1 ul de Klenow (Boehringer) y 16 ul de H₂O. Incubar 30 min a temperatura ambiente. Añadir 5 ul de (0.25 mM dATP, 0.25 mM dTTP, 0.25 mM dGTP, 0.25 mM dCTP) e incubar 30 min más a temperatura ambiente. Añadir 2 ul de 0.5 M EDTA y 7 ul de (60% glicerol, 0.2% azul de bromofenol, azul dextrano a saturación en tampón de columna) (tampón de columna: 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.1% SDS). Cargar en una columna (18x1cm) de sepharosa G 75. Eluir con tampón de columna. La radioactividad libre migra con el azul de bromofenol. La sonda se eluye primero con el azul dextrano (color azul claro). Seguir el proceso de separación con un geiger. Recoger tan proto como empieze a salir radioactividad. Guardar la sonda congelada hasta su utilización. Acordarse de desnaturalizar la sonda antes de utilizarla.

2.2.2.3.2.- Preparación de filtros para "screening":

Preparación de filtros conteniendo clones de M13mp9+insert obtenidos por minipreparación de ADN:

Con una punta de micropipeta amarilla (200 ul) cortada por la mitad, señalar de una forma ordenada 100 círculos sobre un filtro de nailon (Colony/Plaque screen de NEN). Añadir (anotándose el número de clon) 1 ul (0.166 ug) de M13mp9+insert correspondiente al ADN de cadena sencilla de una minipreparación de M13, a el primer círculo señalado sobre el filtro. Hacer lo mismo con el resto de clones. Dejar secar 1 hora a temperatura ambiente. Poner 1 ml de solución desnaturalizante en una placa de petri (Solución desnaturalizante: 2.5 M Na Cl, 0.5 M Na OH). Poner el filtro en la placa de petri y esperar que se empa- pe de solución desnaturalizante(5 min.). Sacar el filtro de la placa de petri y dejarlo secar 2-5 min a temperatura ambiente. Sumergir en 1 ml de solución de neutralizante (3 M Acetato sódico, pH 5.5) Durante 5 min.

Dejar secar 2 horas a temperatura ambiente y guardar entre 2 hojas de papel Whatman 3MM dentro de una bolsa de plástico.

2.2.2.3.3.- Hibridaciones:

"Northern blot":

Preparar el filtro tal como está descrito en pag 119-120. Con el clon de M13mp9+insert que interese preparar una sonda del tipo "2" (Pag. 128-130). Desnaturalizar la sonda calentándola 10 min a 95°C.

Disoluciones:

-Solución de prehibridación:

Formamida	6	ml
100x Denhardt's	0.6	ml
20x SSPE	3	ml
10% SDS	360	ul
80 ug/ul tRNA	37.5	ul
H ₂ O	2	ml

-100x Denhardt's:

Ficol 400 (Pharmacia) (400.000 de peso mol.)	2	g
Polivinilpirrolidona (sigma 360.000 de peso molecular)	2	g
BSA (Calbiochem 12659)	2	g
H ₂ O hasta	100	ml

-20xSSPE:

NaCl	174	g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	27.6	g
EDTA	7.4	g
H ₂ O	800	ml

Ajustar a pH 7.4 con NaOH

-Solución de hibridación: 2 ml de solución de prehibridación conteniendo 100 ul de la sonda desnaturalizada .

-20xSSC:

NaCl	175.3	g
Citrato sódico	88.2	g
H ₂ O	800	ml

Ajustar a pH 8.0 con NaOH

Método:

Poner el filtro dentro de una bolsa de plástico sellable. Añadir 4 ml de solución de hibridación. Quitar el aire de la bolsa. Sellar la bolsa. Incubar 5 horas a 42°C (o bien toda la noche). Cortar una esquina de la bolsa, desechar la solución de su interior e introducir la solución de hibridación conteniendo la sonda desnaturalizada (2 ml por cada 100 cm² de membrana). Quitar las burbujas de aire y sellar la bolsa. Incubar a 42°C más de 12 horas.

Lavar el filtro 2 veces con 250 ml de 2xSSC 5 min cada vez a temperatura ambiente. Lavar el filtro 2 veces con 400 ml de 2xSSC conteniendo 1%SDS 30 min cada vez a 50°C. Lavar 2 veces con 200 ml de 0.1xSSC 30 min cada vez a temperatura ambiente. Escurrir el exceso de líquido. Poner encima de una placa de rayos X usada y cubrir con "Saran Wrap". Poner dentro de un chasis y exponer la placa de autorradiografía (1 hora-1semana).

"Screenig" de filtros conteniendo clones de M13mp9+insert:

Disoluciones:

<u>-Solución de prehibridación:</u>	50x Denhardt's	2 ml
	20x SSC	5 ml
	Formamida	10 ml
	0.625 M PO ₄ Na ₂ pH6.5	1.6 ml
	glicina	0.2 g
	80 ug/ul tRNA	63 ul
	10% SDS	0.2 g

<u>-Solución de hibridación:</u>	50x denhat's	0.4 ml
	20x SSC	5 ml
	Formamida	10 ml
	0.625 M PO ₄ Na ₂ pH6.5	0.64 ml
	80 ug/ ul tRNA	25 ul
	10% SDS	0.2 ml
	sonda radioactiva (tipo "1" pag 129)	

-20x SSC (ver pag 131)

Método:

El procedimiento es esencialmente el mismo que el descrito en pag. 132. La prehibridación dura 2 horas a 43°C y la hibridación 12 horas a 43°C. Los lavados hacerlos iguales que en pag 132 excepto que la temperatura sea de 65°C en lugar de 50°C.

2.2.2.4.- Secuenciación de ADN

2.2.2.4.1.- Método de Sanger et al. (1980)(ver fig. 23):

El protocolo se describe para 1 secuencia:

-En un tubo ependorf poner: 1 ul de M13 sequencing primer

1 ul de "M13 sequencing primer" (0.2 pmoles)
1 ul de TM (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM MgCl₂)
3 ul de H₂O
5 ul de M13mp9+insert obtenido con una mini
preparación. (0.83 ug)

-Mezclar, centrifugar e incubar 50 min a 55°C

-Microfuga 1 seg. para concentrar el H₂O de condensación.

-distribuir en alícuotas de 2 ul a 4 tubos ependorf de 1.5 ml sin tapón marcados "T","C","G" y "A" respectivamente. Poner los tubos en una microfuga que pueda accionarse con la tapa abierta. Poner sobre el rotor identificaciones de tal forma que se sepa donde está cada tubo sin necesidad de sacarlos.

-Añadir 2 ul de la mezcla dideoxy-deoxinucleótidos adecuada para cada tubo. Dar un pulso a la microfuga para que los 2 ul vayan al fondo.

-Añadir 2 ul de (8.25 ul H₂O + 1 ul 0.1 M Ditiotritol + 0.5 ul (4 uCi) de ³⁵S-ATP + 0.25 ul (1.25 u) de Klenow). Dar un pulso de microfuga. Incubar 20 min a temperatura ambiente (dejar dentro de la microfuga).

-Añadir 2 ul de (0.25 mM ATP, 0.25 M TTP, 0.25 M CTP, 0.25 M GTP) a cada tubo. Dar un pulso de microfuga. Incubar 20 min más a temperatura ambiente.

-Añadir 2 ul de la disolución de colorante-formamida. Dar un pulso de microfuga.

-Desnaturalizar las muestras calentando 2 min en un baño a ebullición. Enfriar a hielo.

-Cargar las muestras y conectar a 2.000 voltios. Parar cuando el azul de bromofenol esté a punto de salir.

-Fijar el gel 30 min en 10%(w/v) ácido acético.

-Transferir el gel a papel Whatman 3MM, cubrir con "Saran wrap", secar a 80°C con vacío 40 min. Sacar el "saran wrap" y poner a autorradiografía toda la noche.

Clon de M13mp9 + "insert" de cadena simple.

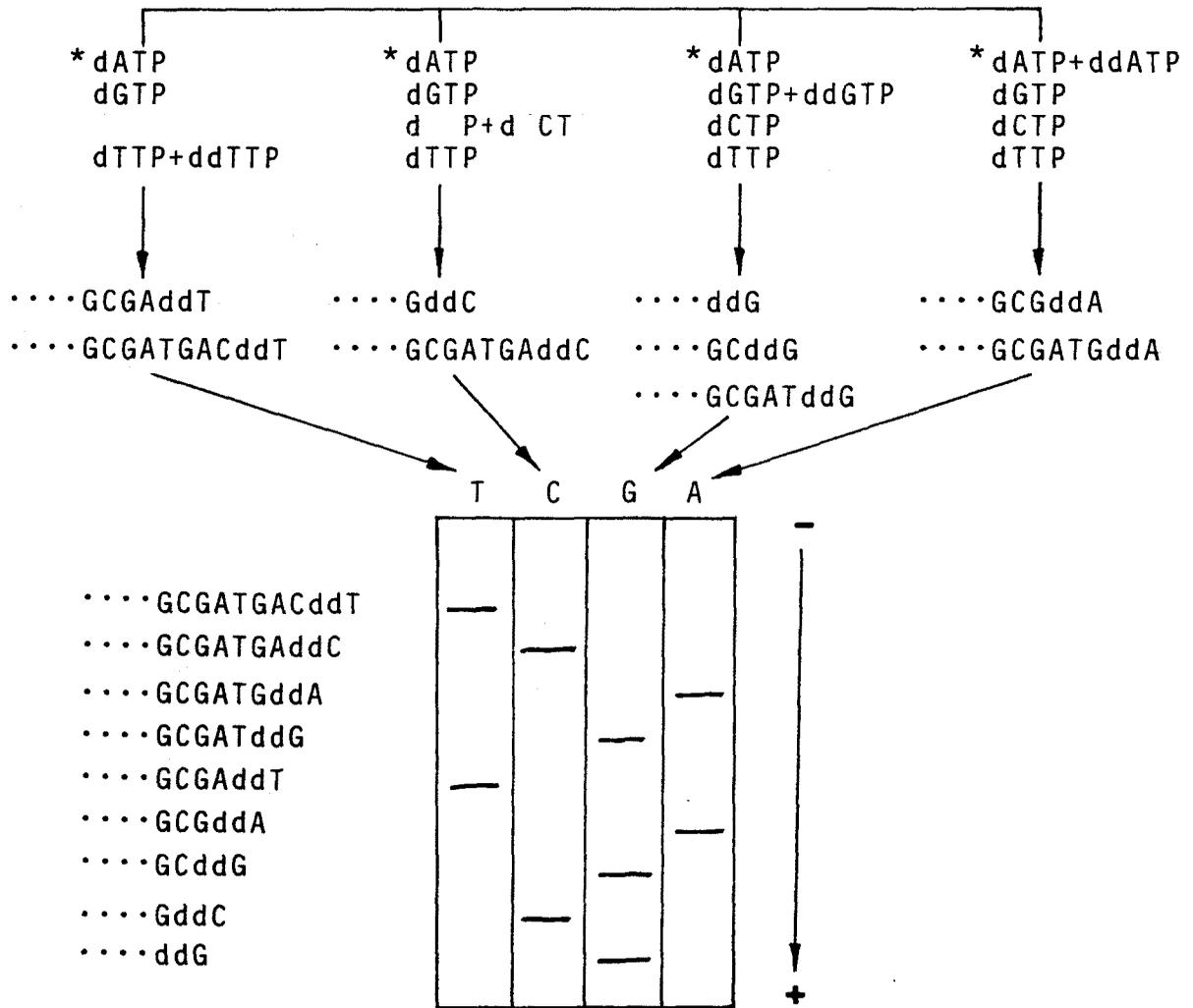
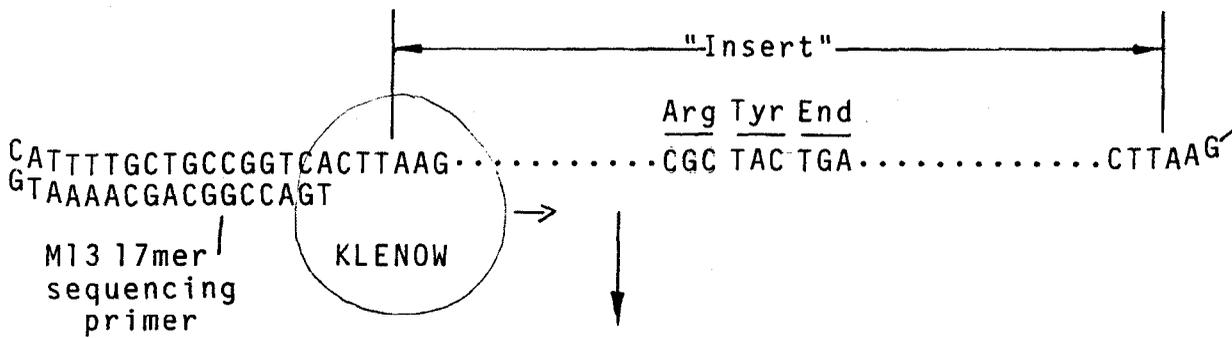


Fig 23.

Representación esquemática del método de secuenciación de Sanger et al.(1980), de los dideoxynucleótidos o enzimático.

Disoluciones para la secuenciación por el método de Sanger:

-TM: 100 mM Tris-HCl pH 8.0 y 50 mM MgCl₂

-"dNTP chase": 0.25 mM dTTP, 0.25 mM dCTP, 0.25 mM dGTP y 0.25 mM dATP.

-Mezclas dideoxi-deoxinucleotidos:

	<u>Mezcla "T"</u>	<u>Mezcla "C"</u>	<u>Mezcla "G"</u>	<u>Mezcla "A"</u>
0.5 mM dTTP	25 u1	500 u1	500 u1	500 u1
0.5 mM dCTP	500 u1	25 u1	500 u1	500 u1
0.5 mM dGTP	500 u1	500 u1	25 u1	500 u1
10 mM ddTTP	50 u1			
10 mM ddCTP		8 u1		
10 mM ddGTP			16 u1	
10 mM ddATP				1 u1
TE	1000 u1	1000 u1	1000 u1	500 u1

-disolución de colorante-formamida:

Formamida desionizada	100 ml
"Xylene cyanol F.F."	0.1 g
azul de bromofenol	0.1 g
0.5 M EDTA pH 8.0	2 ml

-10x TBE:

Tris base	108 g
Acido bórico	55 g
EDTA	9.3 g
H ₂ O hasta	1000 ml

2.2.2.4.2.- Método de Maxam and Gilbert (1980) (ver fig 24):

El método se describe para secuenciar un insert de 500 bases clonado en EcoRI del vector M13mp9.

Cortar con Bam HI:

Tomar 80 ul (10 ug) de M13mp9+insert (forma de doble cadena) y añadirle 12 ul de RE-6, 12 ul de 60 mM 2-mercaptoetanol, 12 ul de 1mg/ml BSA, 12 ul de 1M NaCl y 4 ul de BamHI (20.000u/ml Biolabs). Incubar 2 horas a 37°C.

Tratar con fosfatasa alcalina:

Añadir 3 ul de fosfatasa alcalina (Boehringer 713 023). Incubar 1 hora a 37°C. Incubar 30 min a 45°C. Incubar 10 min a 65°C para inactivar la fosfatasa. Hacer una extracción fenólica, precipitar y lavar con etanol y secar.

Marcaje con ^{32}P -ATP:

Disolver en 43 ul de H₂O y añadir 5 ul de 10x tampón para la kinasa. Mezclar y añadirlo a un ependorf que contiene 0.5 mCi de ^{32}P - γ -ATP secos por vacio. Añadir 1 ul de T4 polinucleótido kinasa e incubar 1 hora a 37°C. Calentar 10 min a 65-70°C para inactivar la kinasa. Precipitar y lavar con etanol. Secar por vacio.

Cortar con Pvu I:

Disolver en 17 ul de H₂O y añadir 3 ul de 1M NaCl, 3 ul de 60 mM 2-mercaptoetanol, 3 ul de RE 60-60 pH 7.5, 3 ul de 1 mg/ml de BSA y 1 ul de Pvu I (biolabs). Incubar 1 hora a 37°C.

Electroforesis en gel de TAE-agarosa 1% y aislar el fragmento a secuenciar mediante agarosa de baja temperatura de fusión y extracción fenólica: Ver pag. 143

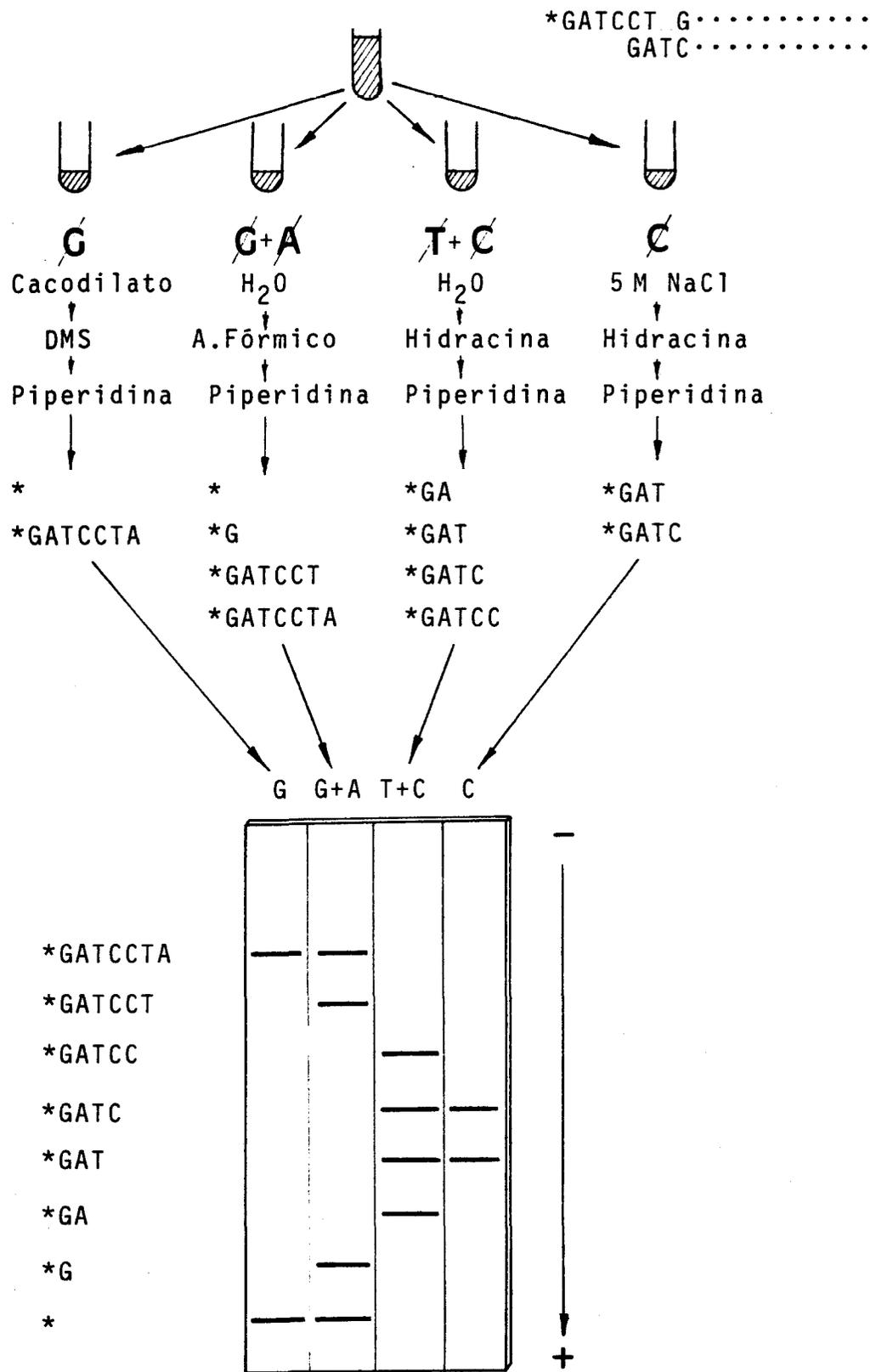


Fig 24.

Reacciones de secuenciación de Maxam and Gilbert y electroforesis (ver pag 242-245 para la preparación del ADN).

Reacciones de secuenciación:

Disolver en 2l ul de H₂O y distribuir en 4 tubos ependorf (5 ul a cada tubo excepto al tubo "C+T" 6 ul).

	G	G+A	C	T+C
En hielo	+200 ul de tampón DMS	+15 ul de H ₂ O	+15 ul de 5 M NaCl	+14 ul de H ₂ O
A 20°C	+ 1 ul de DMS	+50 ul de A. fórmico a 4°C	+30 ul de hidracina	+30 ul de hidracina
	4 min	5 min	5 min	5 min
En hielo	+50 ul de DMS stop	+200 ul de HZ stop	+200 ul de HZ stop	+200 ul de HZ stop

+
850 ul de etanol a -30°C
mezclar y sumergir en N₂ líquido

↓
Centrifugar 15 min a 4°C con la microfuga. Añadir 0.7ml de etanol al pellet y centrifugar 5 min más. Secar el pellet con el "Speed vaccum" 5 min. Disolver en 250 ul de Acetato amónico 0.3 M y precipitar añadiendo 1 ml de etanol. Sumergir en N₂ líquido o nieve carbónica+etanol. Centrifugar 15 min a 4°C con la microfuga. Añadir 1 ml de etanol 95% al pellet y centrifugar 10 min más. Secar con el "speed vaccum" 5 min. Añadir 110 ul de Piperidina 1M (diluida 10x). Calentar a 90°C 30 min. Sumergir en hielo. Microfuga un segundo para concentrar líquido de condensación. Secar con el "speed vacuum" toda la noche. Disolver en 20 ul de H₂O y secar con el "Speed vacuum". Disolver en 10 ul de H₂O y secar con el "Speed vacuum". Añadir disolución de formamida-colorante para que la muestra quede con unas 50.000 cpm/ul. Calentar 2 min a 90°C. Cargar 1 ul. Conectar a 2000 voltios y correr muestras 7 y 17 horas en geles de 6% acrilamida. Cubrir gel con "saran wrap" y exponer toda la noche a -70°C.

Disoluciones:

RE 60-60: 60 mM MgCl₂ y 60 mM Tris-HCl pH 7.5.

<u>HZ stop:</u>	3 M acetato sódico pH 9	100	u1
	10 mM EDTA	10	u1
	tRNA	3	mg
	H ₂ O	884	u1

<u>DMS stop:</u>	3 M acetato sódico pH 7	0.5	ml
	2-mercaptoetanol	71	u1
	40 ug/u1 tRNA	2.5	u1
	H ₂ O	425	u1

<u>Tampón DMS:</u>	Cacodilato sódico	53	mg
	NaOH 1 M	10	u1
	0.5 M EDTA	20	u1
	H ₂ O hasta	10	ml
	pH tiene que ser 8.0		

Piperidina 1M: Piperidina diluida 10 veces.

Disolución colorante-formamida: pag. 136

10x TBE: Pag. 136

Acido fórmico: Guardar a 4°C

Dimetilsulfato (DMS): Muy tóxico. Manajar el la campana.

Hidracina:

NaCl 5 M

Acetato amónico 0.3 M ò Acetato sódico 0.3 M pH 5.2

2.2.2.5.- Electroforesis de ADN

2.2.2.5.1.- Geles para secuenciación:

Geles con gradiente (50x20 cm):

	<u>Solución ligera</u>		<u>Solución densa</u>	
	<u>1 gel</u>	<u>10 geles</u>	<u>1 gel</u>	<u>10 geles</u>
Acrilamida 38%	7.5 ml	75 ml	1.05 ml	10.5 ml
Bisacrilamida 2%				
10x TBE	2.5 ml	25 ml	3.5 ml	35 ml
Urea	23 g	230 g	3.22 g	32.2 g
H ₂ O hasta	50 ml	500 ml	7 ml	70 ml

↓
50 ml de la disolución ligera

↓
+90 u1 de 25% PSA
+90 u1 de TEMED

↓
mezclar

↓
7 ml de la disolución densa

↓
+14 u1 de 25% PSA
+14 u1 de TEMED

↓
mezclar

Con una pipeta de 10 ml tomar 6 ml de la disolución ligera y seguidamente 6 ml de la disolución densa. Hacer entrar 3 burbujas de aire en la pipeta para que se mezcle la interfase solución ligera-solución densa. Introducir en los platos (uno de ellos tiene que estar previamente silicizado) con una inclinación de unos 45°. A continuación verter el resto de disolución ligera. Poner el peine y dejar gelificar por lo menos 30 min.

<u>Geles de TBE-acrilamida 6%:</u>	10x TBE	10 ml
	Acril.38%-Bis.2%	15 ml
	H ₂ O	37 ml
	urea	50 g

Mezclar bien, hacer vacío 2 min, añadir 1 ml de 10% PSA, 25 u1 de TEMED y llenar a unos 5-20° sin prisa. Poner peine y dejar gelificar por lo menos 30 min.

2.2.2.5.2.- Geles de TAE-agarosa (no desnaturalizantes):

<u>Disoluciones:</u> 50x TAE	Tris base	242	g
	H ₂ O hasta	500	ml
	EDTA 0.5 M (pH 8)	100	ml
	A. acético glacial	57.1	ml
	H ₂ O hasta	1000	ml

10 mg/ml bromuro de etidio

1x TAE conteniendo 0.3 ug/ml bromuro de etidio

50x TAE	50	ml
H ₂ O hasta	2500	ml
Bromuro de etidio 10mg/ml	75	ul

10%(w/v) glicerol, 0.025% azul de bromofenol, 0.025: "xylene cyanol".

Método (geles TAE-agarosa 1% en un mini-gel "Bio-Rad")

Pesar 0.5 g de agarosa en un erlenmeyer de 100 ml y añadir 50 ml de 1x TAE conteniendo 0.3 ug/ml de bromuro de etidio. Autoclavar 10 min. Enfriar a 55°C y verter sobre la plataforma del gel. Poner peine. Dejar gelificar 30 min. Retirar peine.

Poner muestras (a las que se les ha añadido 0.1 vol. de colorante-densificador)

Conectar a 80 voltios. Observar directamente con transiluminador ultravioleta.

2.2.2.5.3.- Geles para ADN alcalinos (desnaturalizantes):

<u>Disoluciones:</u>	10 M NaOH		
	0.5 M EDTA		
	Tampón de electroforesis:	10 M NaOH	0.9 ml
		0.5 M EDTA	0.6 ml
	5x	H ₂ O hasta	300 ml
	Colorante-densificador:	250 mM NaOH, 5 mM EDTA,	
		12.5% ficol y 0.125% verde bromocresol	

Método (geles para ADN alcalinos 6.5x10 cm 1.5%)

Pesar 0.45 g de agarosa suspender en 30 ml de H₂O y autoclavar 10 min. Enfriar a 50°C. Añadir 90 ul de 10 M NaOH y 60 ul de 0.5 M EDTA. Verter la agarosa y esperar 30 min para que gelifique.

Añadir 0.2 vol de 5X colorante densificador a las muestras. Mezclar y cargar muestras.

Conectar a 25 voltios (50 mA) 3 horas. Secar 1 hora a temperatura ambiente bajo vacío (antes se puede fijar con TCA 7% 30 min, aunque no es necesario). Poner a autorradiografía.

2.2.2.5.4.- Geles de agarosa de baja temperatura de fusión:

Este tipo de geles permite recortar la banda que interese y recuperar el ADN eliminando la agarosa mediante extracciones fenólicas. Puede construirse el gel entero con este tipo de agarosa de baja temperatura de fusión, pero presenta los inconvenientes de que resulta excesivamente caro y no queda con tanta resolución como un gel normal. Lo óptimo es hacer un gel de TAE-agarosa normal y bajo control ultravioleta recortar un pozo por delante de la banda que interese recuperar, llenar este pozo con agarosa de baja temperatura de fusión a la misma concentración y en el mismo tampón que el gel, esperar a que gelifique y conectar entonces de nuevo para que la banda entre en este tipo de agarosa.

Recuperación del ADN de un trozo de agarosa de baja temperatura de fusión:

Poner la banda de agarosa en un ependorf y fundir a 70°C 10 min. Centrifugar 1 s. Incubar 2 min a 70°C. Añadir 1 vol. de fenol saturado. Incubar 1 min a 70°C. Vortexear. Incubar 5 min a 65-70°C. Vortexear. Centrifugar 10 min a 20°C. Reextraer la fase inferior con 50 ul de Tris 10 mM pH8, 1mM EDTA. Combinar las dos fases acuosas (superiores) y efectuarles otra extracción fenólica. Precipitar y lavar con etanol.

2.2.2.6.- Southern Blot:

Si se parte de un gel TAE-agarosa, sumergirlo en 2.5 M NaCl, 0.5 M NaOH (solución desnaturalizante) 30 min a temperatura ambiente con ligera agitación. Neutralizar el gel sumergiéndolo 30 min en 3 M acetato sódico pH 5.5. Transferir igual que los geles de ARN (pag. 119-120).

2.2.2.7.- Procesos rutinarios:

Extracción fenólica:

-Partiendo de ADN en 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA.

↓
Añadir 1 vol de fenol saturado
↓
Vortex 5 segundos
↓
Dejar reposar 5 min a 20°C
↓
Vortex 5 segundos
↓
Centrifugar 10 min con la microfuga
↓
El ADN está en la fase acuosa superior (no coger interfase)

Precipitación etanólica:

↓
Añadir 0.1 volumen de 3 M acetato sódico, mezclar.
↓
Añadir 3 volúmenes de etanol a -30°C. Mezclar
↓
Precipitar sumergiendo 1 min en N₂ líquido, o bien 10 min en nieve carbónica, o bien 30 min en el congelador de -70°C, o bien toda la noche a -20°C.
↓
Centrifugar 15 min con la microfuga a 4°C. Desechar sobrenadante.
Añadir 1 ml de etanol 95%
↓
Centrifugar 10 min con la microfuga a 4°C. Desechar sobrenadante.
El pellet puede secarse mediante vacío ("Speed-Vacuum") 5 min.