

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

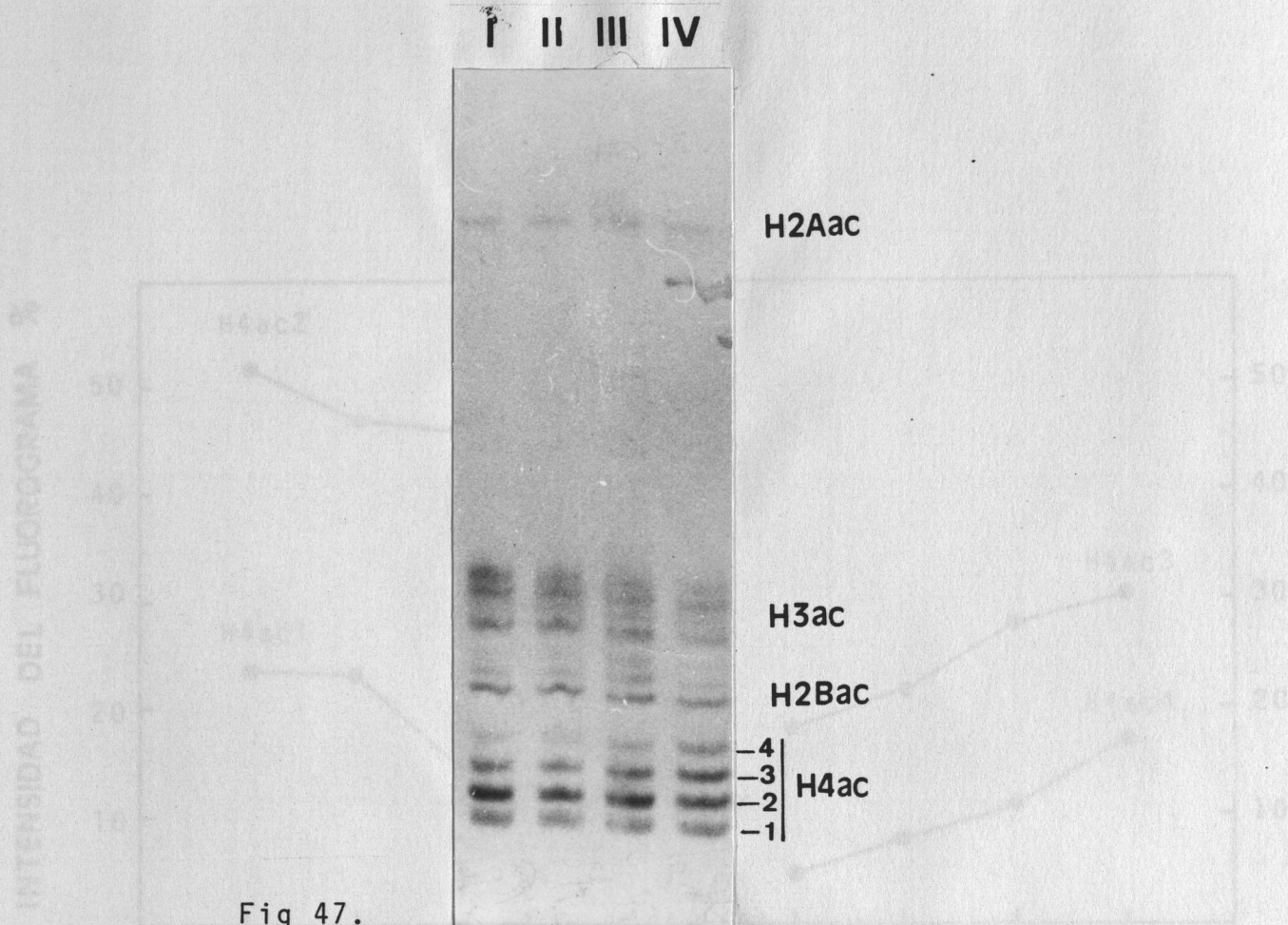


Fig 47.

Distribución del ^3H -acetato incorporado a las formas de acetilación de la histona H4 de nucleos de testículo maduro, separados en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unidad.

El tejido testicular se troceó finamente e incubó en presencia de 2 mCi de ^3H -acetato (por cada 5 g de tejido) en MEM en un volumen final de 10 ml durante 1 hora a 37°C . Se añadió butirato a la concentración final 50 mM y se prepararon nucleos mediante ultracentrifugación en sacarosa 2M (pag. 83). Las histonas fueron extraídas con 0.4 N SO_4H_2 , precipitadas con 6 vol. de etanol, dializadas frente ácido acético 0.1 M, liofilizadas, analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea (pag.100) y los geles procesados para fluorografía (pag. 104).

La incorporación de ^3H -acetato a las formas tri y tetraacetiladas aumenta a medida que progresa la espermiogénesis, y son máximos en la fracción de nucleos correspondiente a las espermátidas alargadas (IV), en donde tiene lugar la transición nucleohistona-nucleoprotamina. La fracción nuclear "I" correspondiente a nucleos de espermátocitos primarios, presenta unos niveles muy marcados de diacetilación.

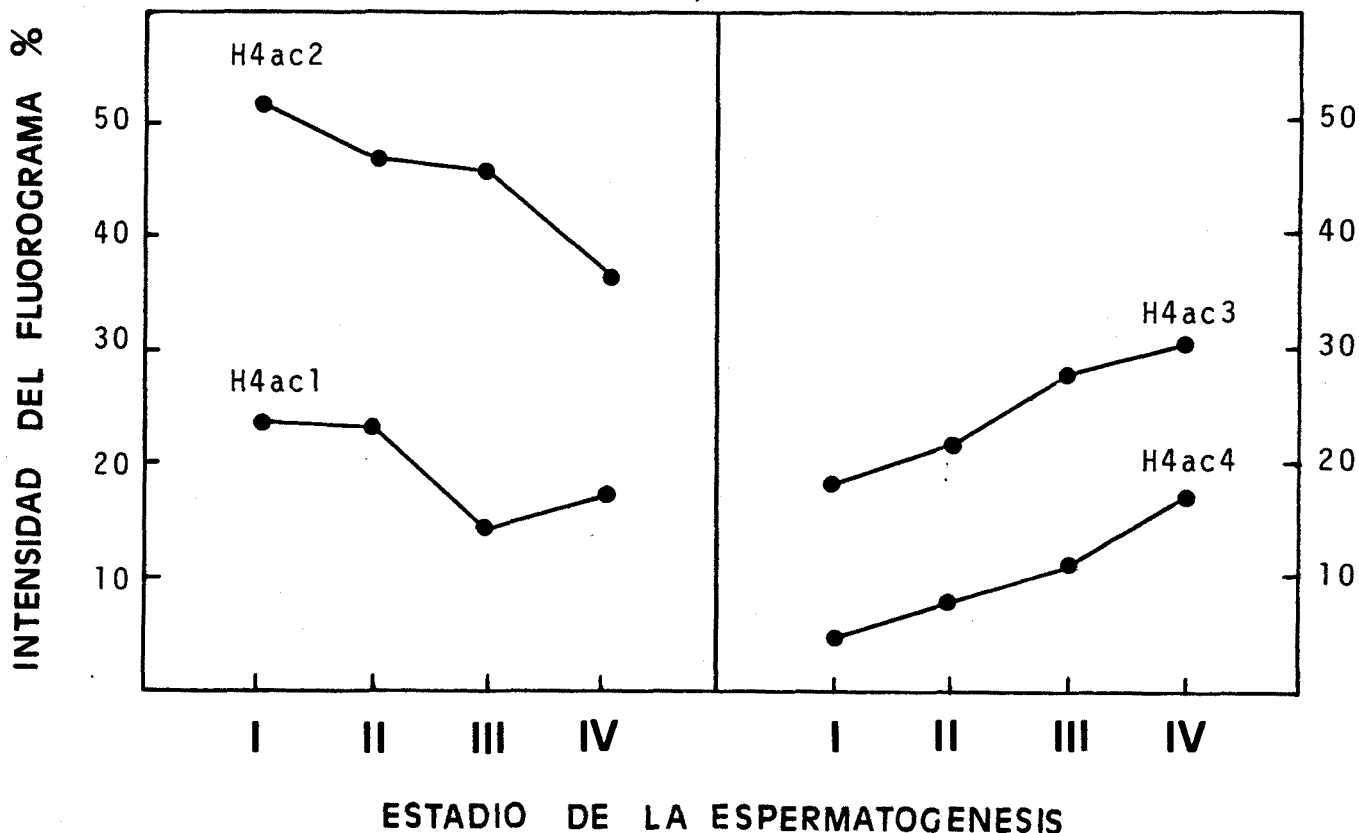


Fig 48.

Distribución del ^3H -acetato incorporado a las formas de acetilación de la histona H4 de nucleos de testículo maduro, separados en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unidad.

La gráfica corresponde a la cuantificación del fluorograma de fig 47.

La incorporación de ^3H -acetato a las formas tri y tetraacetiladas aumenta a medida que progresa la espermiogénesis, y son máximos en la fracción de núcleos correspondiente a las espermátidas alargadas (IV), en donde tiene lugar la transición nucleohistona-nucleoprotamina. La fracción nuclear "I" correspondiente a núcleos de espermátocitos primarios, presenta unos niveles muy marcados de diacetilación.

Velocidad de sedimentación mm/h : 6.0 4.7 3.7 2.7 2.3 1.6 1.1 0.8

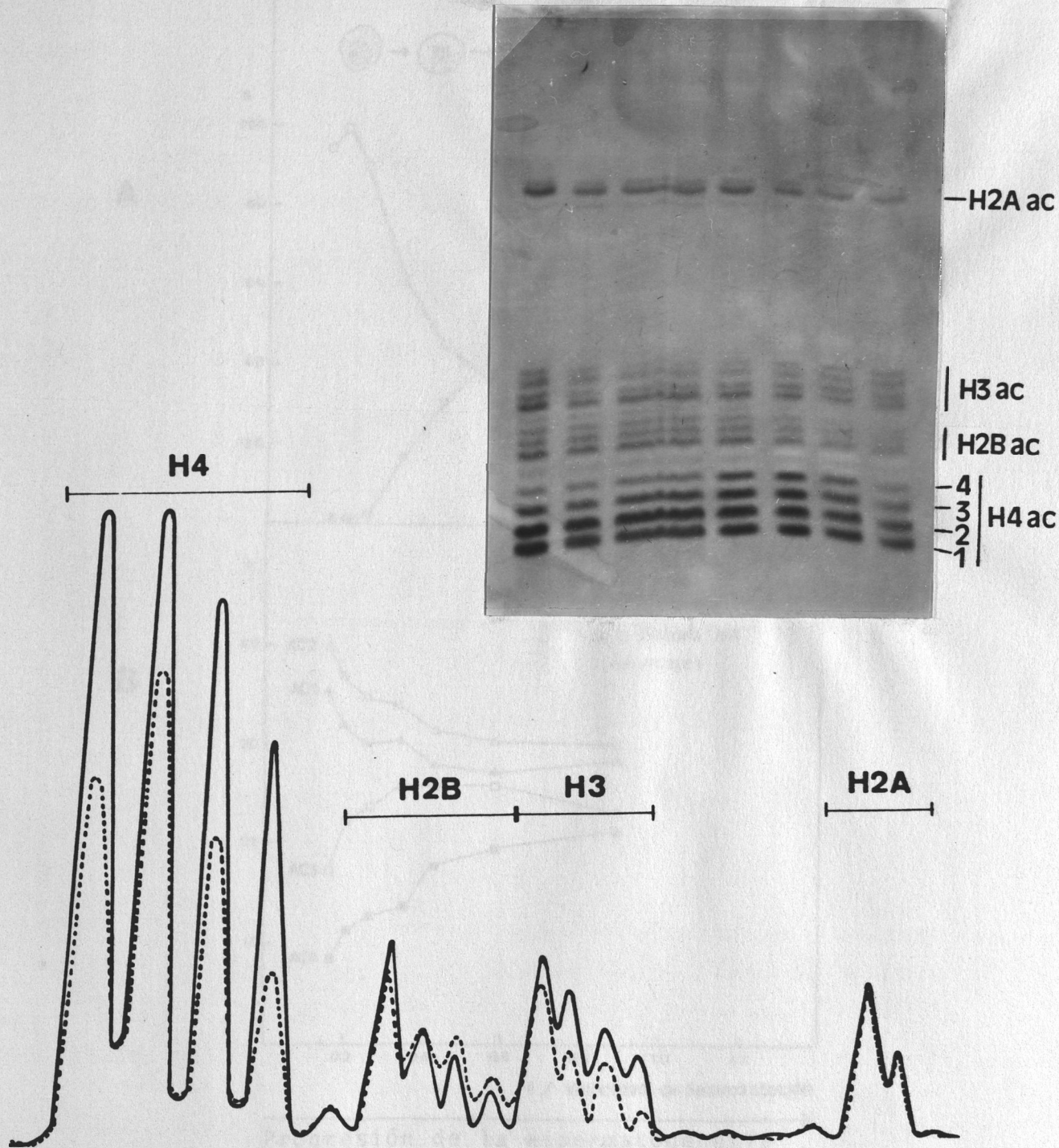


Fig 49.

Distribución del ^3H -acetato incorporado a las proteínas nucleares de células de testículo maduro, separadas en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unidad (pag. 75-82)(pag.91). Los núcleos fueron preparados por el método del ácido cítrico en presencia de cationes divalentes, bisulfito y PMSF a un pH de 2.4 (pag. 88), y las histonas extraídas con 0.3 M HCl, precipitadas con 20% TCA y lavadas con acetona (pag. 93-94). Espermátidas redondas (-----) y espermátidas alargadas (—).

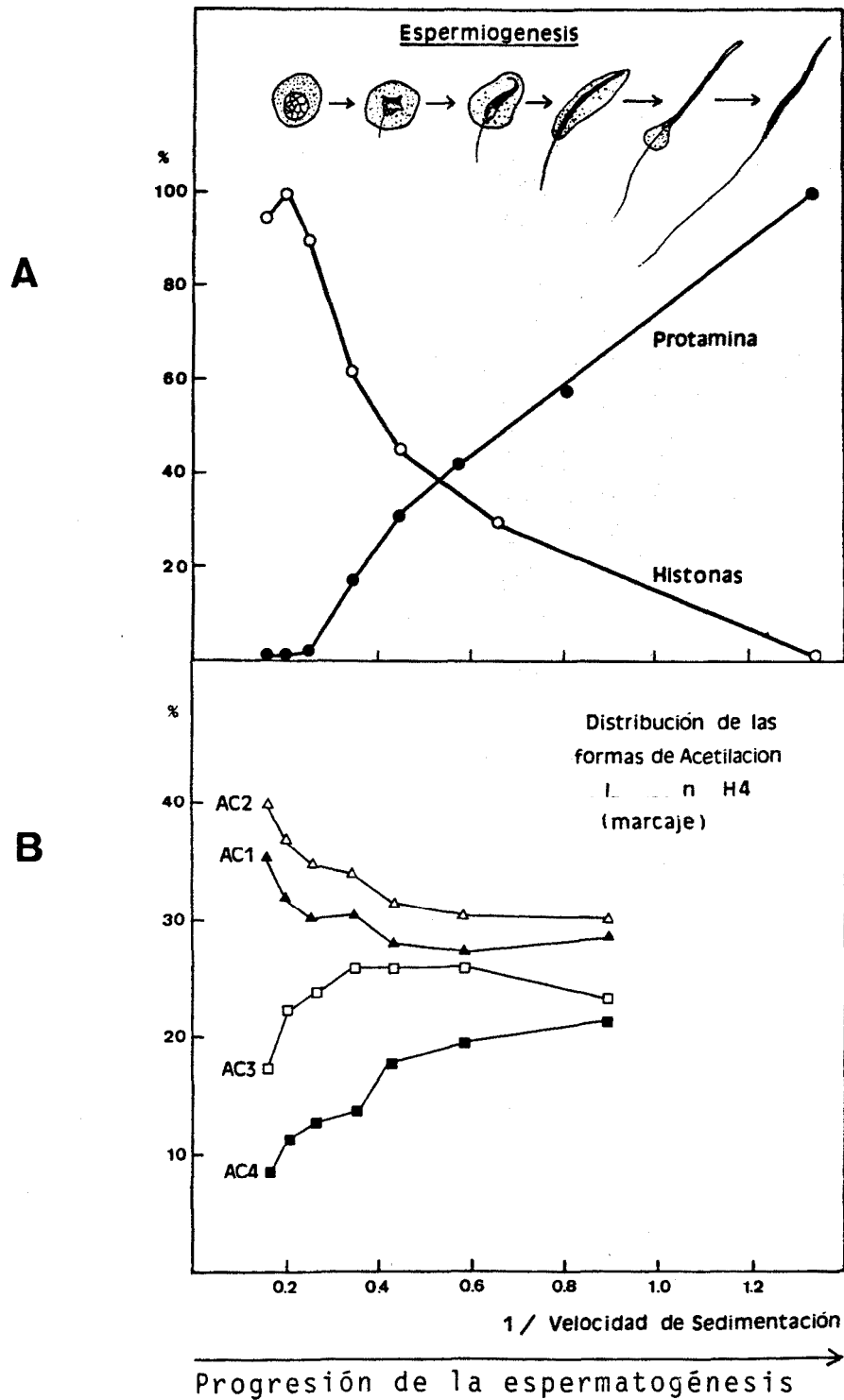


Fig 50.

Distribución del ^3H -acetato incorporado a las proteínas nucleares de células de testículo maduro, separadas en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unidad.

A.- Las variaciones de protamina (●) e histonas (○) se han representado para facilitar su correlación con la acetilación.

B.- La gráfica corresponde a la cuantificación del fluorograma de fig 47. La incorporación de ^3H -acetato a las formas tri y tetraacetiladas aumenta a medida que progresa la espermiogénesis.

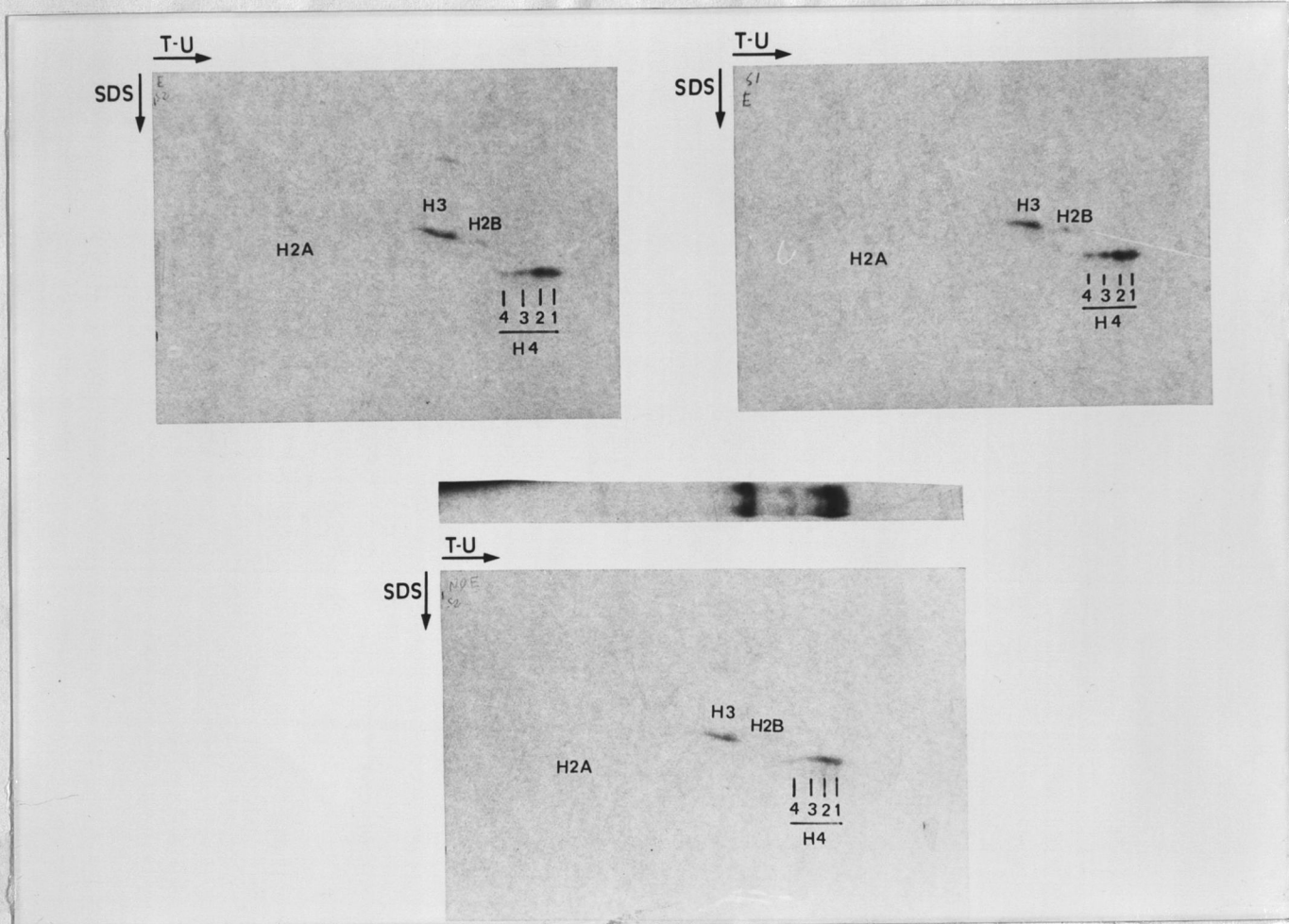


Fig 51.

Distribución del ^3H -acetato incorporado a proteínas nucleares determinado por electroforesis bidimensional. 1ª dimensión: Poliacrilamida-tritón-urea. 2ª dimensión: Poli- acrilamida-SDS (pag. 102).

El material corresponde a partículas nucleosómicas tratadas con salmina; Arriba derecha: Material extraído utilizando partículas nucleosómicas (S1) tratadas con salmina (arginina/nucleótido= 4), arriba izquierda: Material extraído utilizando partículas nucleosómicas (S2) tratadas con salmina (arginina/nucleótido= 4), abajo: Material no extraído utilizando partículas nucleosómicas (S2) tratadas con salmina (arginina/nucleótido= 4).

Estas bidimensionales se realizaron para descartar que otras proteínas susceptibles de acetilación que migraran a nivel de la H4 en los geles de Poliacrilamida-tritón-urea, pudieran interferir con la determinación de la acetilación de la H4.

En congruencia con los resultados obtenidos separando núcleos (pag 173), la distribución del ^3H -acetato incorporado a las proteínas nucleares de células de testículo maduro, separadas en función de su velocidad de sedimentación a gravedad unidad, indica que la acetilación de las histonas aumenta a medida que progresa la espermiogénesis (fig. 49 y 50). La incorporación de ^3H -acetato a las formas di y triacetiladas aumenta a medida que progresa la espermatogénesis, mientras que disminuye en las formas mono y diacetiladas. Las fracciones celulares con una velocidad de sedimentación alrededor de 6 mm/h, activas en replicación del ADN (ver fig. 30), presentan niveles muy marcados de diacetilación de la histona H4 (fig. 49 y 50).

La distribución del ^3H -acetato incorporado a proteínas nucleares determinado por electroforesis bidimensional (PA-tritón-urea y PA-SDS) indica que la incorporación de ^3H -acetato a nivel de la H4 en los geles de PA-tritón-urea, es debida exclusivamente a la acetilación de ésta.

3.1.3.3.- Actividad específica de acetilación:

La actividad específica de acetilación de la histona H4 es muy superior en el testículo maduro, en donde tiene lugar el proceso de espermiogénesis, que en el testículo inmaduro (fig. 53).

La actividad específica de acetilación de la histona H4 determinada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea y fluorografía de las histonas extraídas a partir de núcleos separados por sedimentación a gravedad unidad, se muestra en fig. 52. La actividad específica de acetilación de las formas mono y diacetiladas de la histona H4 decaen, mientras que la de la forma tetraacetilada aumenta a medida que progresa la espermatogénesis.

La actividad específica de acetilación de las histonas extraídas de núcleos separados por sedimentación a gravedad unitaria y analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y fluorografía se muestra en fig. 54.

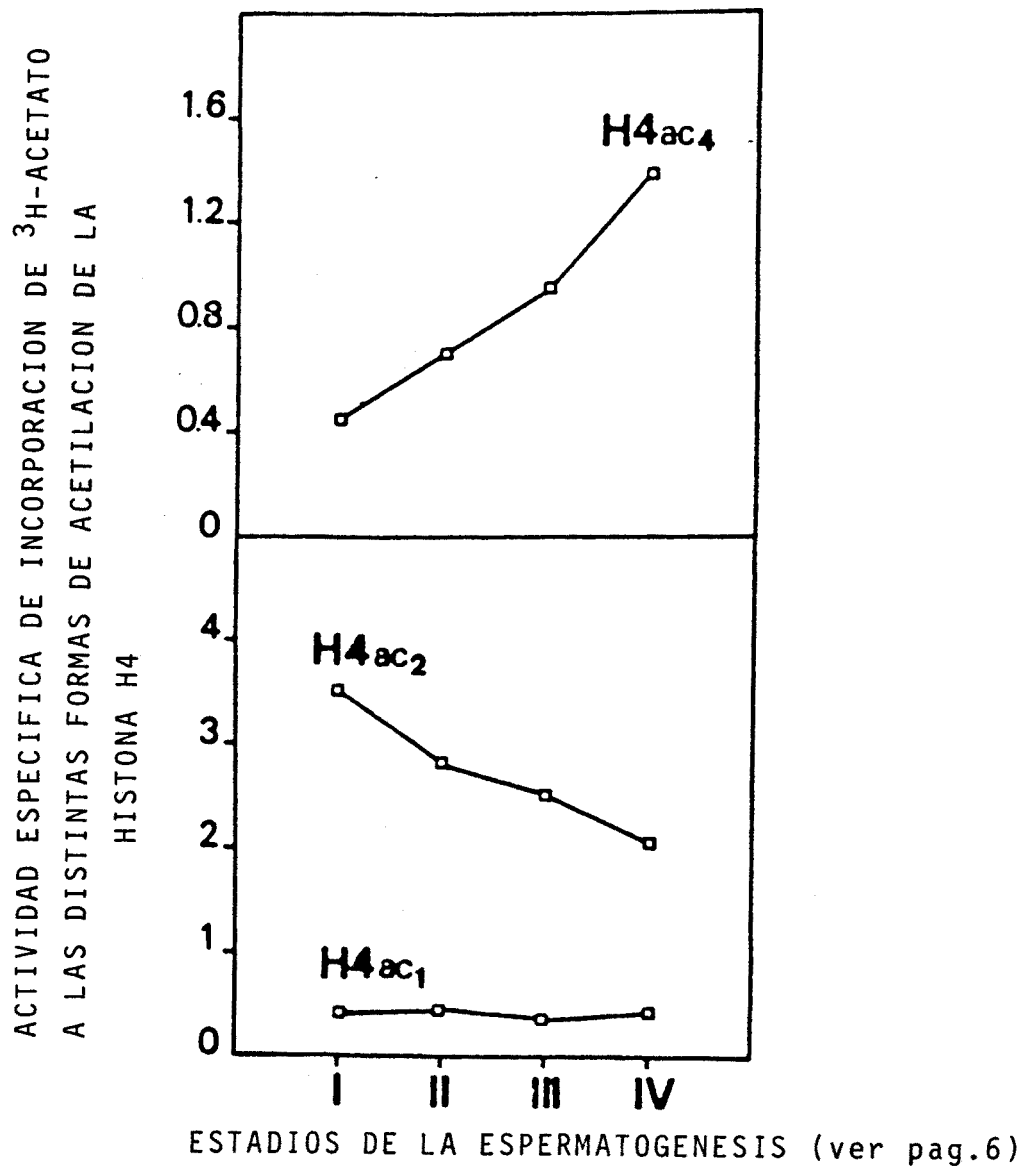


Fig 52.

Actividad específica de acetilación de la histona H4 determinada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea y fluorografía de las histonas extraídas a partir de núcleos separados por sedimentación a gravedad unidad (pag. 83-88). Los datos de la gráfica se calcularon a partir de las densitometrias de las figuras 41 y 47. La actividad específica de la forma triacetilada de la histona H4, no pudo ser calculada debido a la presencia de una proteína (SP) que migraba a este nivel(Fig 41).

La actividad específica de acetilación de las formas mono y diacetiladas, decaen, mientras que la de la forma tetraacetilada aumenta a medida que progresa la espermatogénesis. Los niveles de diacetilación son máximos en los núcleos del estadio "I".

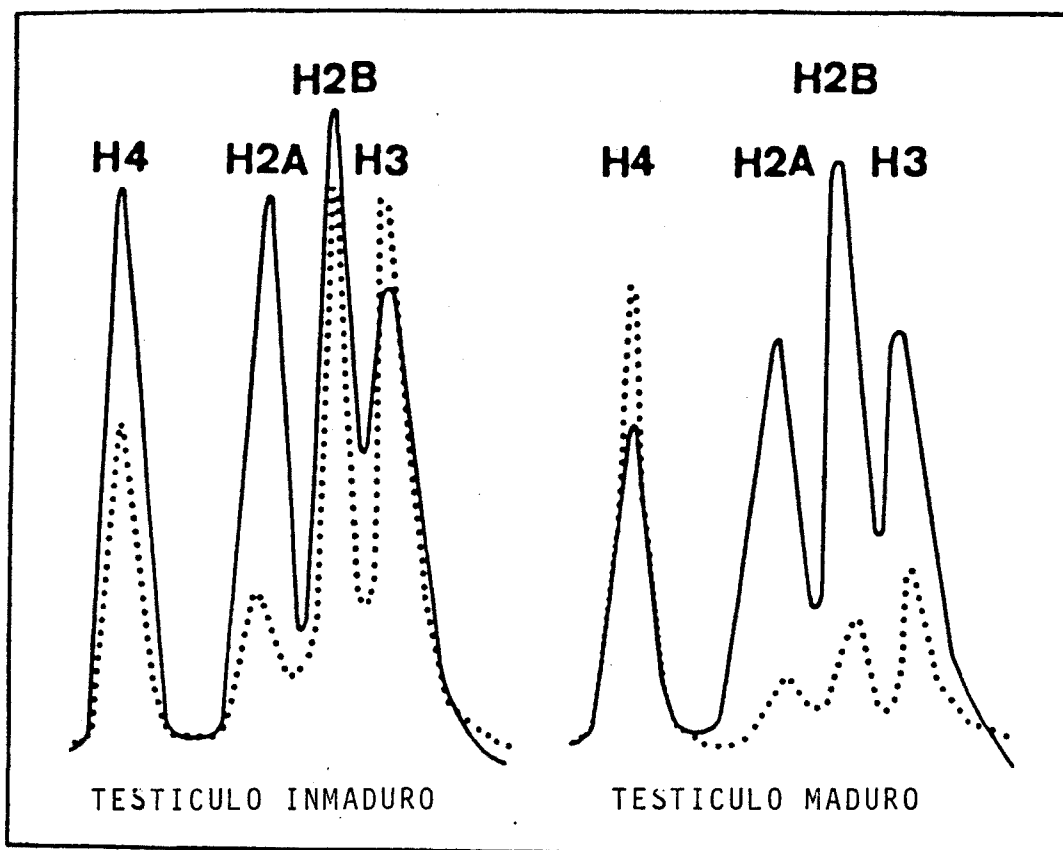


Fig 53.

Actividad específica de incorporación de ^3H -acetato a las histonas de testículo maduro y de testículo inmaduro.

Las histonas preparadas como está descrito en fig. 46, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (O'Farrel, 1977) y fluorografía (pag. 104).

Densitometria de los geles teñidos con Amido-Black (—) y densitometria de los fluorogramas (.....).

En el testículo maduro, la principal histona en experimentar acetilación es la H4. La actividad específica de acetilación de la H4 aumenta a medida que se produce la maduración del testículo, coincidiendo con el inicio de la espermiogénesis. Las densitometrias se han representado con distinta escala.

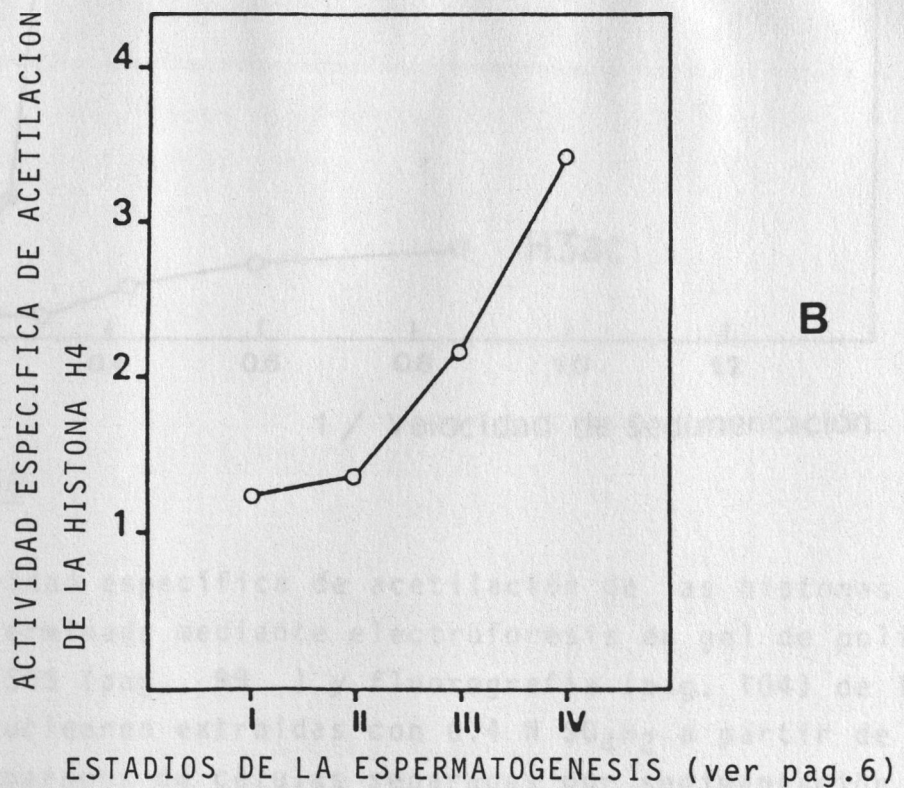
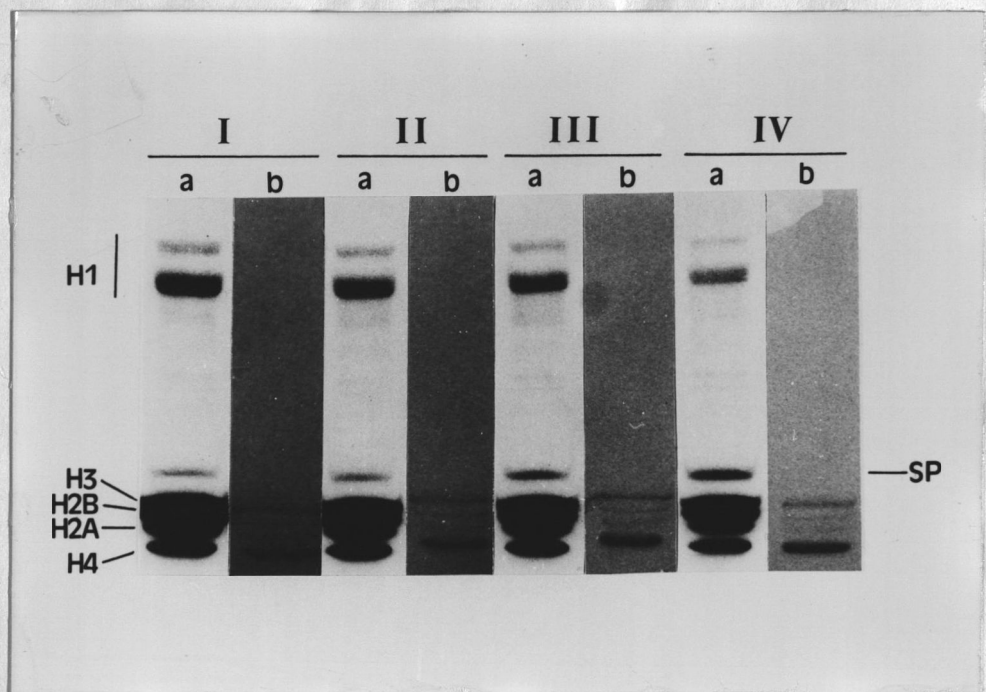


Fig 54.

Actividad específica de acetilación de la histona H4 extraída de núcleos separados por sedimentación a gravedad unidad y analizada mediante electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS (O'Farrel, 1977) y fluorografía (pag.104).

A.- Fotografía de los geles teñidos con Amido Black (a) y de los fluorogramas (b) en distintas fracciones de núcleos.

B.- Actividad específica de acetilación de la histona H4 en distintas poblaciones de núcleos separados por sedimentación a gravedad unitaria.

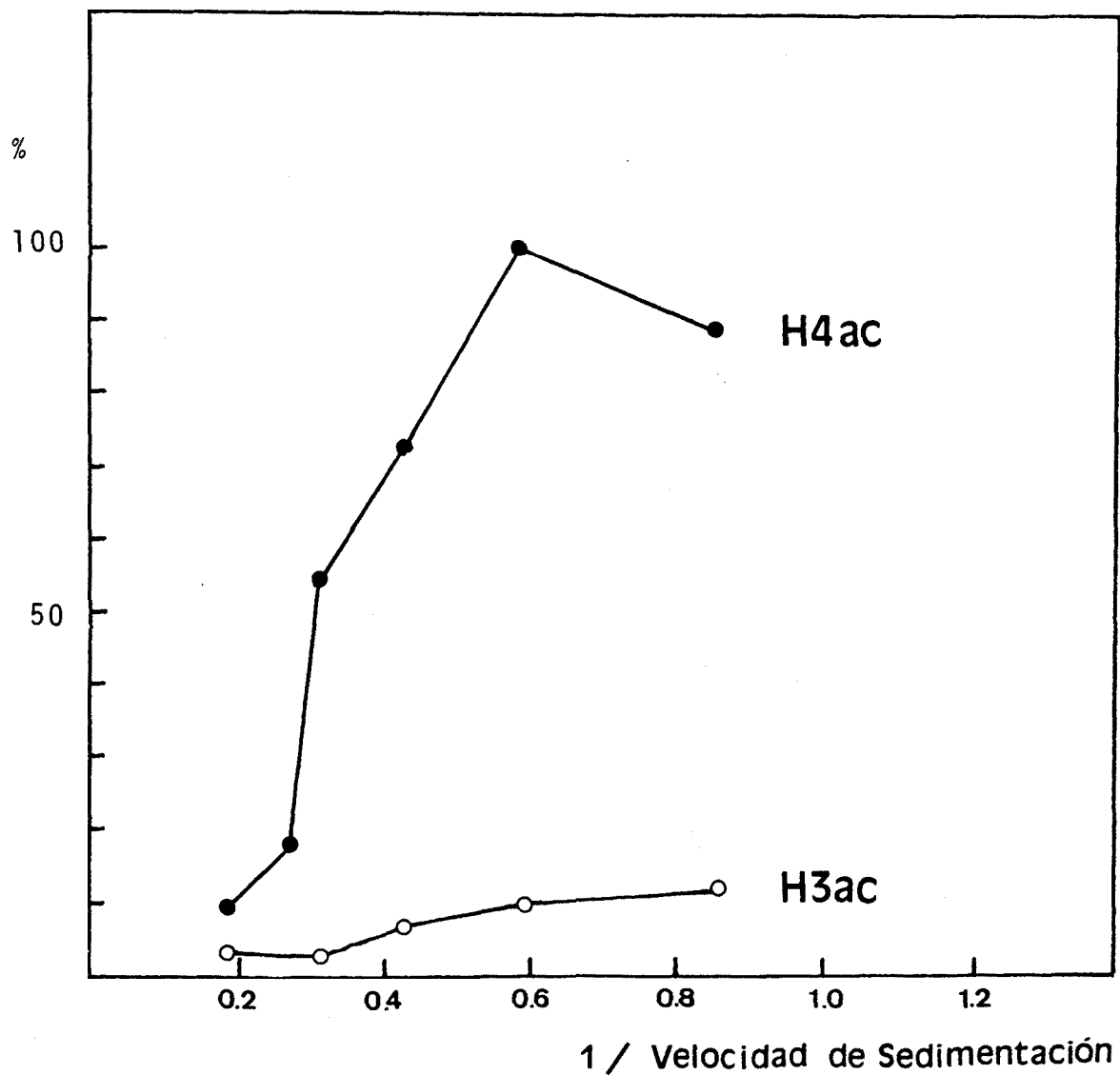


Fig 55.

Actividad específica de acetilación de las histonas H4 y H3 determinada mediante electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS (pag. 99) y fluorografía (pag. 104) de las proteínas nucleares extraídas con 0.4 N SO_4H_2 a partir de núcleos preparados de células separadas por sedimentación a gravedad unidad.

La actividad específica de acetilación de la histona H4 aumenta progresivamente a medida que progresa la espermatogénesis, y decae ligeramente en la población de células con velocidades de sedimentación comprendidas entre 1.1 y 0.84 mm/h. La actividad específica de la histona H3, aunque mucho más baja que la de la H4, aumenta progresivamente hasta las últimas fases de la espermiogénesis. Estos resultados son congruentes con con el resto de resultados de acetilación de las histonas (Fig. 41-54).

La fig. 54 muestra que la actividad específica de acetilación de la histona H4 aumenta a medida que progresa la espermatogénesis, y es máxima en la fracción nuclear "I", correspondiente a núcleos de espermátidas alargadas.

La actividad específica de acetilación de las histonas H4 y H3 determinada mediante electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS y fluorografía de las proteínas nucleares extraídas a partir de núcleos preparados de células separadas por sedimentación a gravedad unidad se muestra en fig. 55. La actividad específica de acetilación de la histona H4 aumenta progresivamente a medida que progresa la espermatogénesis, y decae ligeramente en la población de células con velocidades de sedimentación comprendidas entre 1.1 y 0.84 mm/h. La actividad específica de la histona H3, aunque mucho más baja que la de la histona H4, aumenta progresivamente hasta las últimas fases de la espermiogénesis (fig. 55). Esta ligera disminución en la acetilación de la H4 en las células que presentan una velocidad de sedimentación comprendida entre 0.84 y 1.1 mm/h se observa también en fig. 50.

3.1.3.4.- Recambio de grupos acetilo en los distintos estadios de la espermatogénesis:

Los resultados indican que la hiperacetilación de las histonas que se da en las espermátidas alargadas durante la espermiogénesis, tiene lugar en presencia de un elevado recambio de acetilación (fig. 56), comparable con el que se da en las células genéticamente activas.

3.1.3.5.- Actividad histona desacetilasa determinada en núcleos separados en distintos estadios de la espermatogénesis:

Para explorar si el elevado recambio de grupos acetilo se correlacionaba con una elevada actividad desacetilasa, esta actividad enzimática se determinó en núcleos de testículo de gallo separados en diferentes estadios de la espermatogénesis.

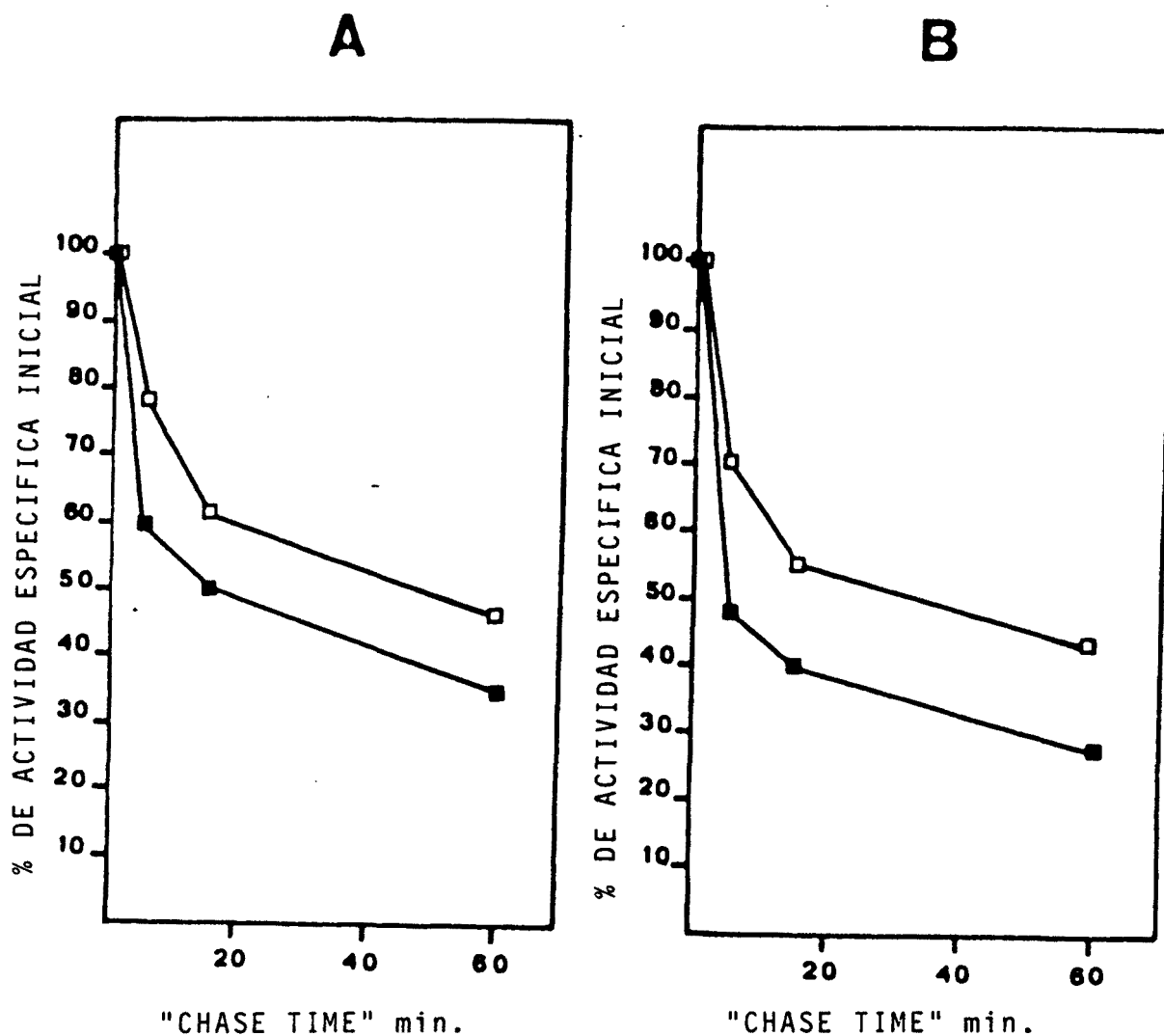


Fig 56.

Recambio de grupos ^3H -acetato asociados con las histonas nucleares (A) y a la histona H4 (B) en distintos estadios de la espermatogénesis: Núcleos transcripcionalmente activos (estadios nucleares I y II (ver pag. 6))(□—□) y núcleos transcripcionalmente inactivos (estadio nuclear IV (ver pag. 6))(■—■).

La metodología está descrita en pag. 92.

Los resultados indican que la hiperacetilación de las histonas que se da en la espermatogénesis, tiene lugar en presencia de un elevado recambio de acetilación.

Los núcleos fueron preparados mediante ultracentrifugación en sacarosa 2M en un medio que contenía 25 mM ClK, 3 mM Cl₂Mg, 1 mM acetato cálcico, 0.14 mM espermidina y 1 mM PMSF. Tras separar los núcleos en el mismo medio a gravedad unidad, se lavaron en ausencia de PMSF y suspendieron en un medio que contenía Cl₂Mg, ClK y Tris y suplementaron con 25 ul de histonas marcadas con ³H-acetato (25 ul = 45.000 cpm.) e incubaron 30 min a 37°C.

La actividad histona desacetilasa (expresada en ³H-acetato liberado / 30 min / contenido de H4, utilizando 100 ug de ADN por ensayo) es de 3150 para la fracción conteniendo núcleos transcripcionalmente activos (estadios I y II) y de 4047 para los núcleos transcripcionalmente inactivos (estadio IV). Estos resultados guardan una buena correlación con el recambio de acetilación determinado en ambos tipos de poblaciones celulares (fig. 56).

3.1.3.6.- Actividad histona acetiltransferasa:

La actividad histona acetiltransferasa determinada "in vitro" a partir de núcleos separados por el método de sedimentación a gravedad unidad indica que esta actividad es ligeramente más elevada en la fracción correspondiente a espermátidas alargadas (fracción IV) que en el resto de núcleos testiculares (fig. 57).

3.1.3.7.- Exploración del posible control de la acetilación de las histonas por mecanismos de fosforilación-defosforilación:

El tratamiento con fosfatasa alcalina de cromatina, resultó ser inhibidor de la acetilación de las histonas "in vitro" determinada mediante la utilización de ¹⁴C-aceti CoA (fig. 58). Por otra parte, el tratamiento con pirofosfato, inhibidor de las fosfatasas, mostro un efecto activador en el rango 0-15 mM. (fig. 59). Estos resultados sugieren que mecanismos de fosforilación-defosforilación pueden estar implicados en el control de la acetilación de las histonas durante la espermatogénesis del gallo.

ACTIVIDAD
ESPECIFICA DE
ACETILACION
DE LA HISTONA
H3

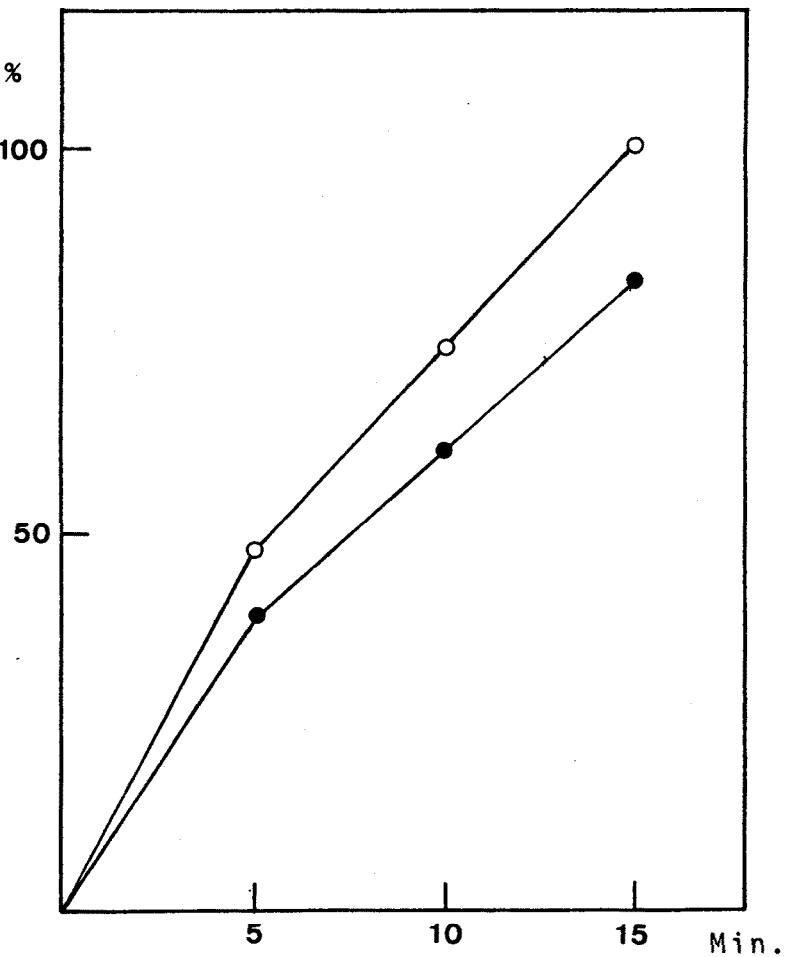


Fig 57.

Actividad histona acetiltransferasa determinada "in vitro" a partir de núcleos separados por el método de sedimentación a gravedad unidad.

Los métodos están descritos en pag. 91.

Fracción de núcleos correspondiente a las espermátidas alargadas (IV) (○—○) y resto de fracciones de núcleos testiculares (I, II y III) (●—●). Los resultados se expresan en % del valor máximo alcanzado a los 15 min.

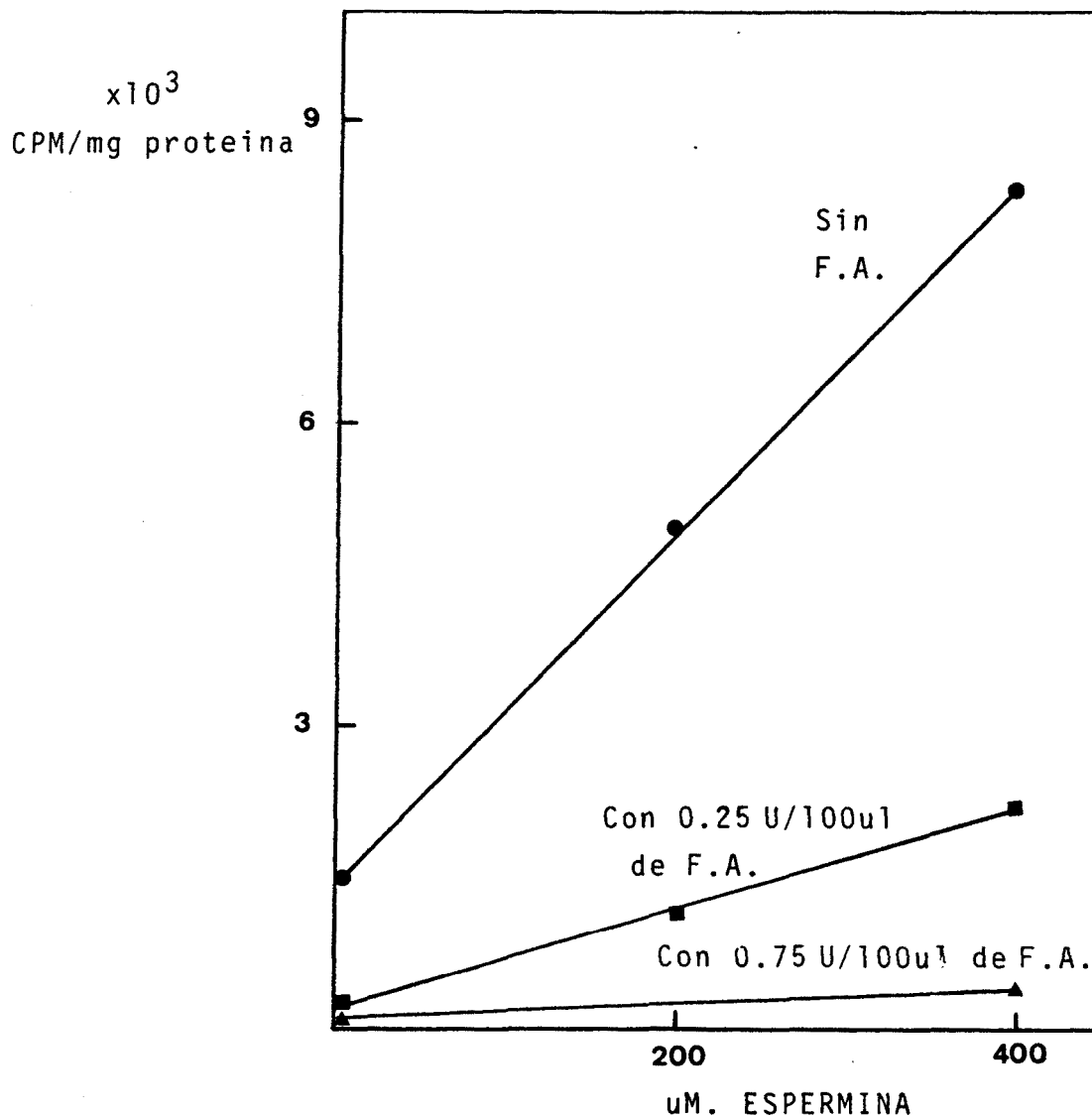


Fig 58.

Efecto del tratamiento con fosfatasa alcalina y efecto de la espermina sobre la acetilación de cromatina "in vitro".

Alicuotas de cromatina preparada según Mezquita and Teng (1977a) fueron tratadas en presencia de distintas concentraciones de fosfatasa alcalina (Tipo III de E.Coli) 5 min a 37°C y seguidamente se les añadió distintas cantidades de espermina y 30 nCi (por cada 35 ug de proteína) de ¹⁴C-acetil CoA. Después de incubar 20 min a 37°C, se paró la reacción mediante la adición de 2.5 ml de 20% TCA y precipitó la cromatina 40 min a 4°C. La radioactividad retenida en un filtro de fibra de vidrio después de lavar con 20% TCA y acetona, se leyó en 5 ml de supersolve.

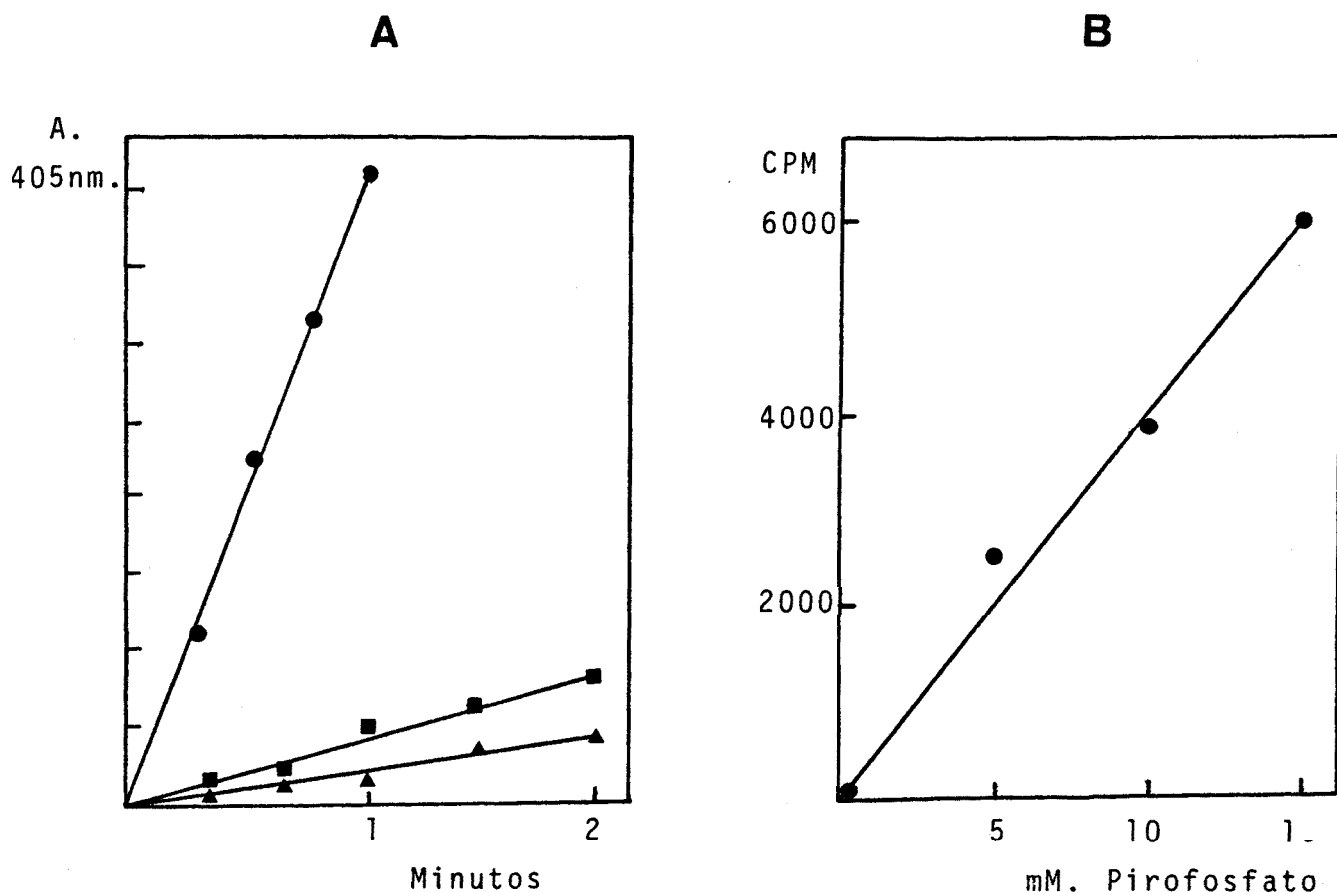


Fig 59.

Efecto del pirofosfato (inhibidor de las fosfatasa) sobre la acetilación de cromatina "in vitro".

A.- Concentraciones de 3mM pirofosfato son suficientes para producir un 95% de inhibición de la actividad fosfatasa. La actividad fosfatasa se ensayó midiendo la conversión del p-nitrofenilfosfato en presencia de 10 mM. MgCl₂ y 3 mg/ml de glicina pH 10. 1 unidad de fosfatasa alcalina (grado I Boehringer) (●—●), 0.1 unidad de fosfatasa alcalina (■—■) y 1 unidad de fosfatasa alcalina en presencia de 3 mM pirofosfato sódico (▲—▲).

B.- Efecto del pirofosfato sódico sobre la acetilación de cromatina "in vitro". Alícuotas de cromatina preparadas según Mezquita and Teng (1977a) fueron tratadas por concentraciones crecientes de pirofosfato sódico en presencia de 400 uM espermina y 30 nCi de ¹⁴C-acetil CoA (por cada 50 ug de proteína) durante 20 min a 37°C. La cromatina se precipitó 40 min con 20% TCA a 4°C, filtró con filtros de fibra de vidrio lavó con 20% TCA y con acetona. La radioactividad retenida en los filtros se leyó en 5 ml de supersolve.

3.2.- LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA IN VITRO.

3.2.1.- Preparación de distintas poblaciones de nucleosomas:

La digestión con nucleasa micrococcal (pag 105) de nucleos de testículo o de eritrocito de gallo preparados mediante diversos métodos (pag 84-87), seguida de la adición de NaCl a la concentración final de 0.15 M y de centrifugación (pag 105), permite la obtención de un sobrenadante (S1) constituido fundamentalmente por partículas nucleosómicas monoméricas deplecionadas de histona H1 (pag 198) y enriquecidas en proteínas no histonas (Bode et al., 1983). El pellet, sometido a una segunda digestión similar, permite la obtención de un sobrenadante (S2) constituido fundamentalmente por partículas nucleosómicas monoméricas deplecionadas en la histona H1 y enriquecidas en nucleosomas conteniendo histonas acetiladas (Bode et al., 1983).

La electroforesis en gel no desnaturizante de 4% acrilamida, 0.2% bisacrilamida en 0.5xTBE (Bode, 1984) de las partículas nucleosómicas (S1 o S2) generadas por digestión con nucleasa micrococcal, permite su purificación adicional y su separación en distintas subpoblaciones nucleosómicas (fig 61). Tras separar mediante este tipo de electroforesis las partículas S1, las poblaciones de menor movilidad electroforética se hallan enriquecidas en proteínas no histonas. Tras separar por este sistema las partículas S2, las poblaciones de menor movilidad electroforética se hallan enriquecidas en nucleosomas conteniendo histonas acetiladas (Bode, 1984).

Para conseguir suficiente cantidad de nucleosomas para los experimentos de desplazamiento, se diseñó un equipo de electroforesis preparativa de nucleosomas que permitiera la elución de las distintas poblaciones de partículas monoméricas durante la electroforesis (fig 106, 107 y 193). Las partículas eluidas fueron identificadas en su composición de ADN y de proteína (mediante electroforesis en geles de PA-SDS y PA-tritón-urea), siendo los resultados congruentes con los descritos con el sistema de electroforesis analítica descrita por Bode (1984)(fig 61).

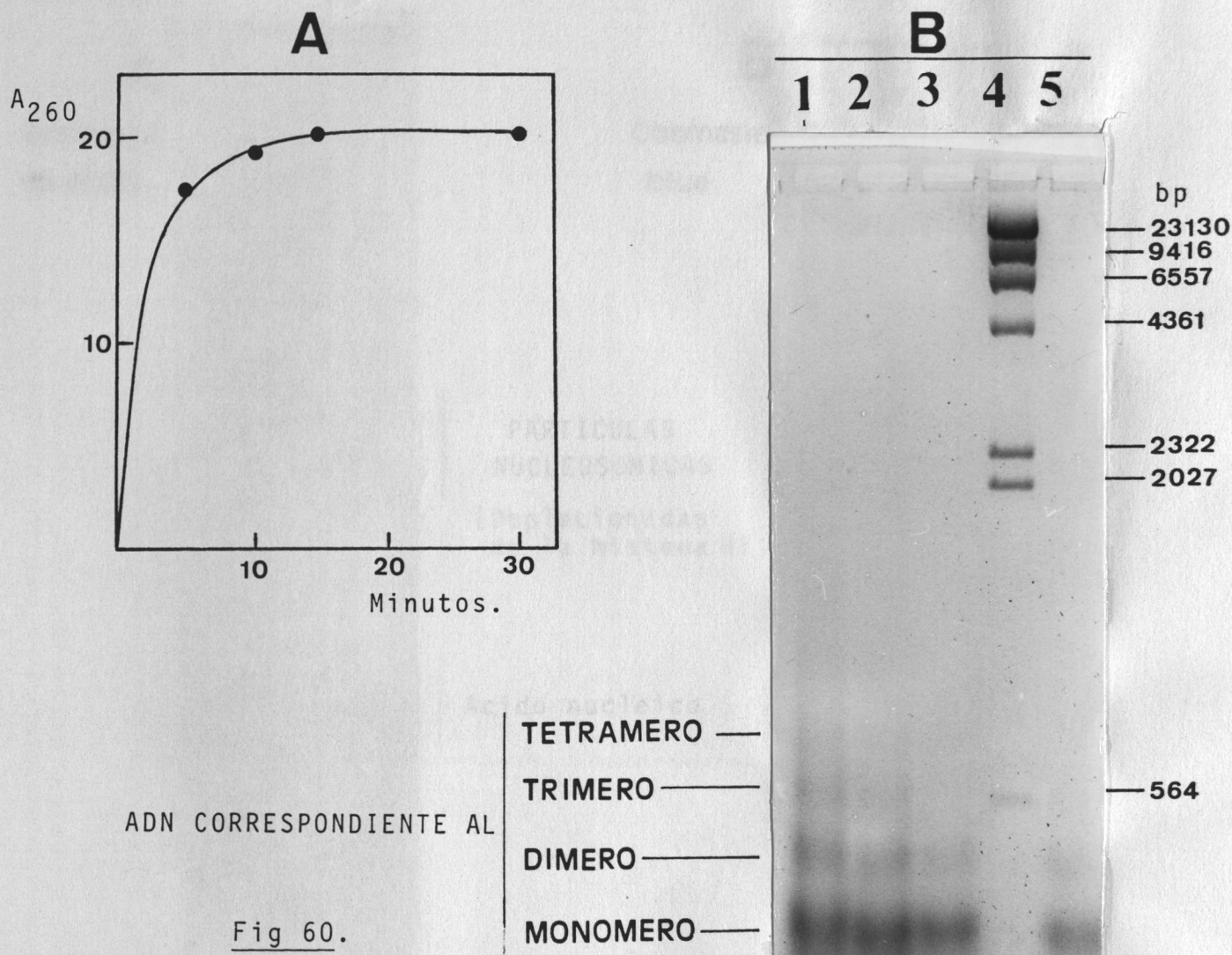


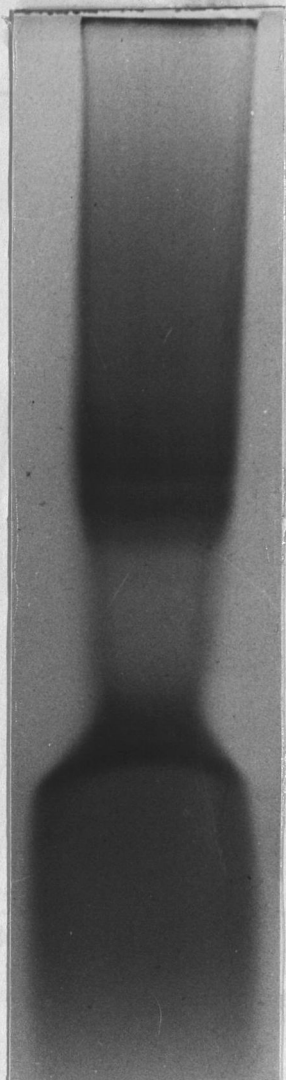
Fig 60.

Análisis de los fragmentos liberados mediante digestión con nucleasa micrococcal de núcleos de testículo de gallo.

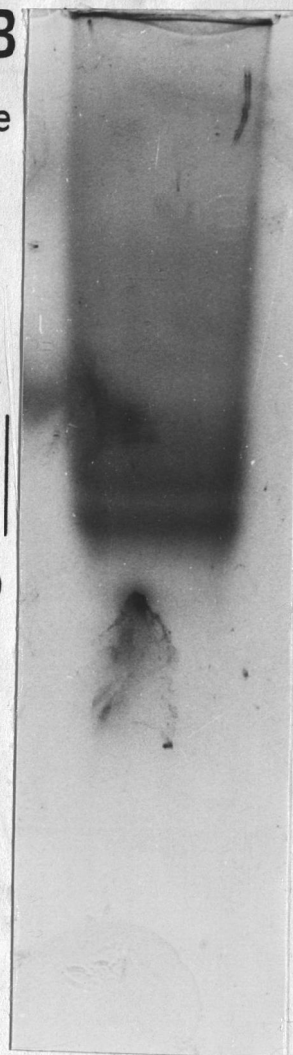
A.- A partir de testículo de gallo se prepararon nucleos mediante ultracentrifugación en sacarosa 2M en presencia de a.cítrico, cationes divalentes, bisulfito y PMSF a un pH de 2.4 (pag. 84). Los núcleos se lavaron 2 veces en un medio que contenía 0.25 M sacarosa, 15 mM Tris HCl pH 7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 25 mM butirato sódico y 0.1 mM PMSF, y se suspendieron en 1.3 ml (partiendo de 3 g de tejido testicular) del mismo medio. Tras preincubar 5 min a 37°C, se añadió 600 unidades de nucleasa micrococcal (Boehringer 107921) e incubó durante distintos tiempos a 37°C. Se añadió EDTA a la concentración final 15 mM, dializó 1 hora frente 3000 ml de Tris 10 mM pH 7.5, 25 mM butirato, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF y 2.5 mM benzamidina a 0°C y sedimentó a 10.000 rpm 10 min. En "A" se representa la A₂₆₀ del sobrenadante.

B.- Electroforesis en gel de 1.8% agarosa-TAE de los fragmentos liberados mediante digestión con nucleasa micrococcal en "A" (previa digestión con proteinasa K y extracción fenólica). 1: 5 min, 2: 10 min, 3: 15 min y 5: 30 min. 4: λ HindIII.

A
Bromuro
de etidio



B
Coomasie
blue



PARTICULAS
NUCLEOSOMICAS
(Deplecionadas
de la histona H1)

Acido nucleico

Fig 61.- Electroforesis en gel no desnaturizante de 4% acrilamida, 0.2% bisacrilamida en 0.5xTEB (Bode, 1984) de las partículas nucleosómicas (S2) generadas por digestión con nucleasa micrococcal (pag. 105) de núcleos de testículo de gallo preparados mediante ultracentrifugación en sacarosa 2M en presencia de a.cítrico, cationes divalentes, bisulfito y PMSF a un pH de 2.4 (pag.84). Dimensiones del gel: 26x14x0.3 cm.

A.- Foto del gel teñido con bromuro de etidio 1ug/ml en 0.5xTEB durante 1 hora.

B.- Foto del gel de "A" después de teñirlo con Coomasie Blue R-250 (método 3 de pag. 103).

Este tipo de digestión con nucleasa micrococcal y extracción del material soluble en 0.15 M NaCl permite la obtención de dos poblaciones compuestas esencialmente por partículas mononucleosómicas (S1 y S2, ver pag. 105)(Bode et al., 1983) que difieren en el contenido de no histonas y acetilación de las histonas. La electroforesis en gel no desnaturizante de 4% acrilamida-0.2% bisacrilamida-0.5xTEB de estas poblaciones nucleosómicas, permite discriminar distintos tipos de subpoblaciones nucleosómicas con diferentes movilidades electroforéticas que difieren en el contenido de no histonas y grado de acetilación de las histonas (Bode, 1984).

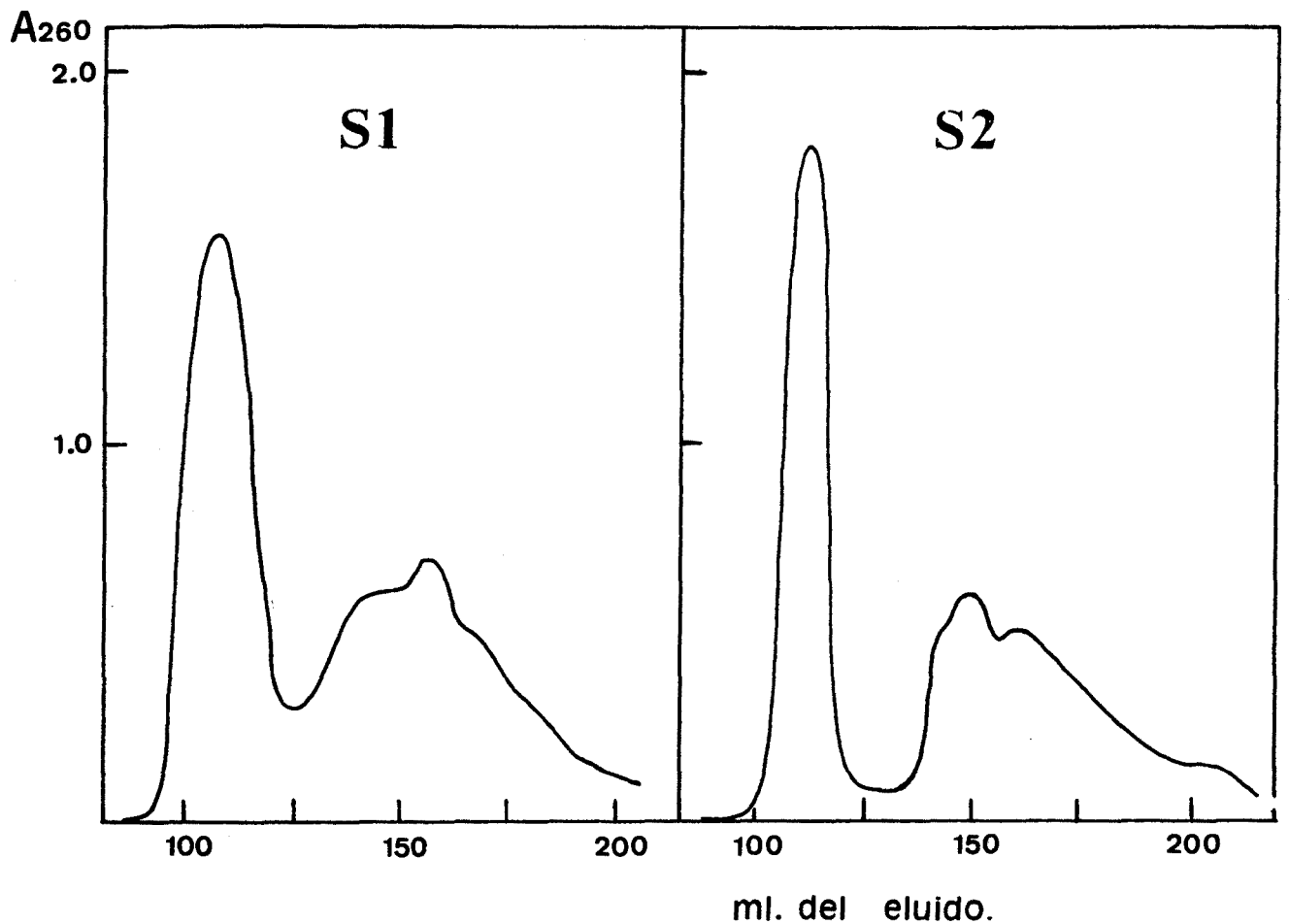


Fig 62.

Electroforesis preparativa de nucleosomas .

En la gráfica se muestra la absorbancia a 260 nm. del material eluido de electroforesis preparativa de nucleosomas utilizando el equipo diseñado de pag. 106-107, en función del volumen de eluido. El flujo de elución fué de 0.87 ml/min, y se recogió una fracción cada 5 min. El volumen eluido empezó a contarse en el momento de la conexión del gel a 150 voltios (80-100 mA). El material eluido fue identificado determinando la composición proteica y de ADN de cada fracción.

El material eluido entre los 100 y los 125 ml consta de pequeños fragmentos de ácido nucleico sin proteínas mayoritarias (fig 61). El material eluido entre los 125 y los 200 ml consta de partículas mononucleosómicas (fig 61)(Bode, 1984) separadas en función de su fricción con el gel. Separando el sobrenadante 1, el material eluido entre los 160 y 200 ml posee un mayor contenido en proteínas no histonas que el material eluido entre los 125 y 160 ml. Separando el sobrenadante 2, las histonas del material eluido entre los 160 y 200 ml, poseen un mayor grado de acetilación que las del material eluido entre los 125 y 160 ml.

3.2.2.- Marcadas diferencias en la capacidad de distintas protaminas para desensamblar nucleosomas "in vitro":

El aislamiento de la protamina galina a partir de espermatozoides del conducto deferente (fig 63,64 y 65) permitió su utilización en los experimentos de desensamblaje de histonas de nucleosomas, cromatina o nucleos "in vitro" (fig 66-82). Con el mismo fin se utilizaron distintos tipos de la protamina salmina comercial (Salmina "free base" de la Sigma, Salmina-HCl y sulfato de salmina de la Merck)(fig 64).

En congruencia con los resultados clásicos realizados "in vitro" con cromatina de timo de ternera y la protamina salmina, nuestros resultados indican que esta protamina, altamente básica y de pequeño tamaño, no puede causar un desplazamiento mayoritario de las histonas de nucleosomas a relaciones arginina/nucleotido= 1-8, varias veces superiores a las fisiológicas (fig 66 y 68). La protamina salmina contiene 32 residuos, de los cuales 20 son argininas (fig 7).

Utilizando la protamina galina, con un tamaño (peso molecular de 9.829 (Nakano et al., 1976) y 65 aminoácidos de los cuales 38 son argininas) que presenta casi el doble del de las protaminas de peces (fig 7), se muestra que esta protamina es capaz de producir un desplazamiento prácticamente total de las histonas de partículas nononucleosómicas deplecionadas en la histona H1, en un rango arginina/nucleótido = 0.6-1.2, próximo al fisiológico (relación arginina/nucleotido en el espermatozoide = 0.8)(fig 67 y 68).

Estas diferencias en la habilidad de distintas protaminas para desensamblar nucleosomas "in vitro" (fig 68), guarda una buena correlación con la duración de la espermiogénesis en ambas especies: La espermiogénesis en la trucha dura varias semanas, mientras que es mucho más rápida en el gallo, 6 días.

Aparte de las diferencias en el tamaño y en el contenido en argininas, la protamina galina contiene 4 residuos de tirosina, aminoácido ausente en las pequeñas protaminas de peces (fig 7).

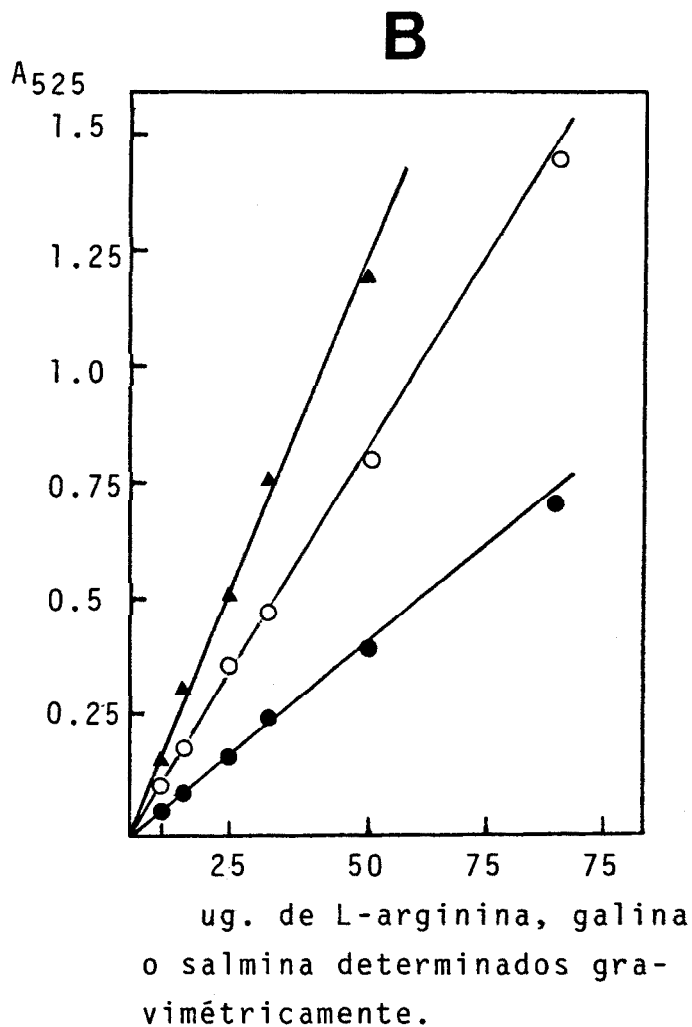
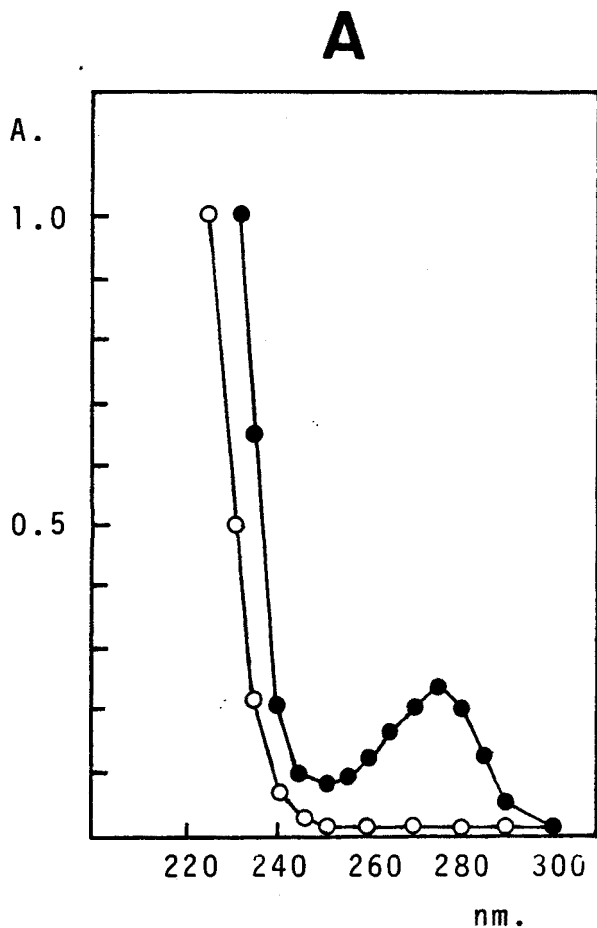


Fig 63.

Aislamiento y estandarización de las disoluciones de protamina gallina y salmina. Determinación de las argininas.

Núcleos de espermatozoides del conducto deferente fueron aislados como está descrito en pag. 88, y las proteínas nucleares extraídas con 0.3 M HCl 30 min a 0-4°C, precipitadas con ácido tricloroacético al 20% (w/v) a 0-4°C 30 min, sedimentadas a 14.000 rpm (rotor J-20 de la Beckman) 10 min a 4°C, lavadas con acetona acidificada (pag. 93) y 4 veces con acetona. El pellet de proteína se secó primero a presión atmosférica y finalmente 30 min bajo vacío. La proteína se pesó con una balanza analítica, disolvió en H₂O y el pH se ajustó a 7.0. La composición proteica de la proteína se analizó mediante electroforesis (Fig. 64) mostrando la presencia de una única proteína mayoritaria cuya movilidad electroforética coincide con la descrita para la protamina gallina. La determinación de la concentración exacta se realizó mediante la determinación de las argininas (pag. 113)(B) y la realización del espectro ultravioleta(A). Arginina (▲—▲), salmina (○—○) y galina (●—●).

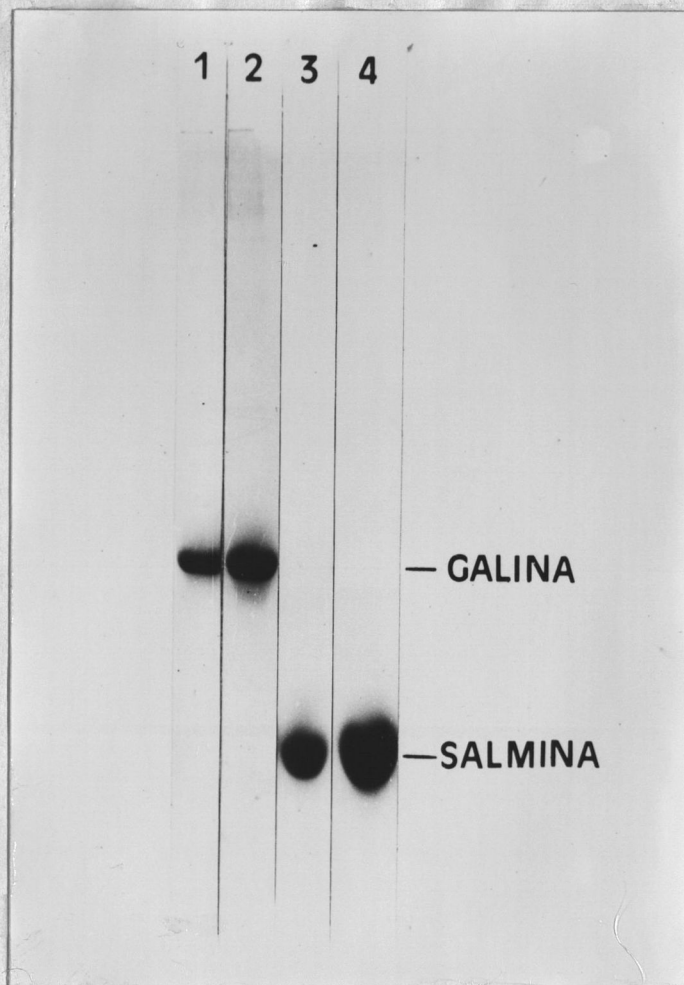


Fig 64.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-urea (pag. 101) de la salmina y de la galina.

1: 10 ug de galina, 2: 20 ug de galina, 3: 10 ug de salmina y 4: 50 ug de sulfato de salmina (Merck).

Con estas cantidades, las protaminas galina y salmina aparecen como la única proteína claramente detectable en los geles.

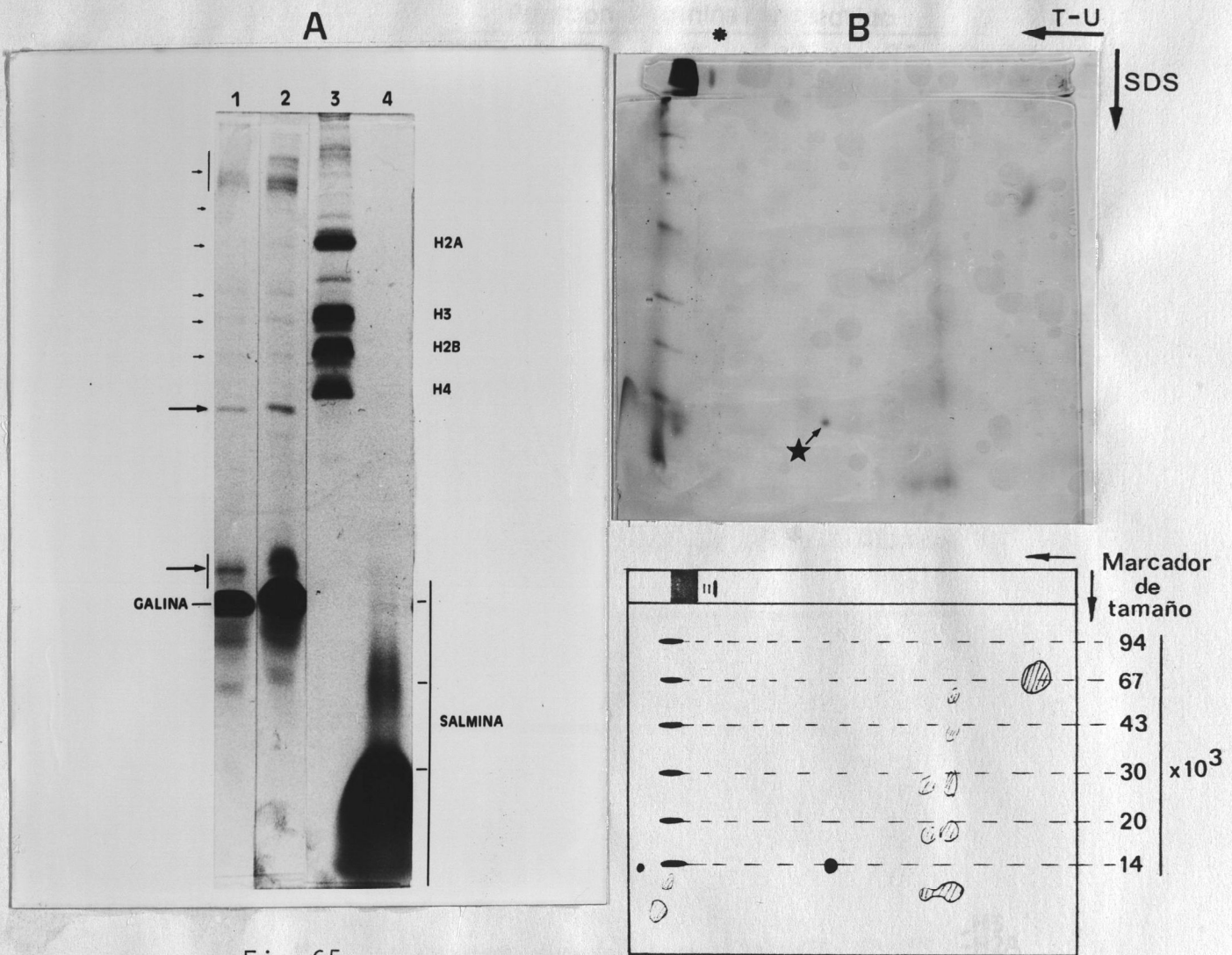


Fig 65.

A.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-tritón-urea (pag. 100) de la galina y de la salmina sobrecargando los geles para que se hagan visibles las proteínas minoritarias (→) que acompañan a estas protaminas. Pozo- Pozo N°1: 60 ug de galina, pozo N°2: 120 ug de galina, pozo N°3: histonas de eritrocito de pollo y pozo N°4: 210 ug de salmina (salmina "free base" de la Sigma). Las bandas que migran justo por encima de la galina pueden tratarse de formas modificadas químicamente de esta (pag. 155 y 158). Las bandas que migran por debajo de la galina, seguramente se traten de productos de degradación de esta, y solo aparecen en estas condiciones de sobrecarga de proteína (fig.64). Nótese la presencia de dos componentes muy minoritarios que migran por encima de la salmina.

B.- Electroforesis bidimensional para dilucidar el posible origen de los componentes proteicos minoritarios que acompañan a la protamina galina. La protamina galina y sus componentes de menor movilidad electroforética (*), insolubles en SDS, no entran en la segunda dimensión.