

I-INTRODUCCIÓ

1. LES HISTONES I EL NUCLEOSOMA

Les histones són proteïnes relativament petites i amb una proporció elevada (> 20%) d'aminoàcids carregats positivament (lisines i arginines), la càrrega positiva ajuda les histones a unir-se fortament al DNA. Les histones tenen un paper primordial en l'empaquetament ordenat de les molècules de DNA a l'interior del nucli cel·lular i neutralitzen aproximadament el 50% de les càrregues del DNA. Les càrregues restants seran neutralitzades per cations de baix pes molecular (Subirana, 1985).

Existeixen 5 tipus principals d'histones: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Les histones H3 i H4 són riques en arginines, mentre que la resta ho són en lisines. Les histones solen tenir entre 102 i 135 aminoàcids, i la histona H1 és la més gran, amb aproximadament 200 aminoàcids. Totes les histones presenten una zona central hidrofòbica i els seus extrems o cues estan fortament carregats positivament (sobretot l'extrem amino terminal) (Subirana, 1985).

La seqüència de les histones no és idèntica en tots els organismes, però es pot dir que es troben entre les proteïnes evolutivament més conservades. La variabilitat de les histones es dona sobretot a la part no globular (les cues), tant en la longitud com en la composició aminoacídica. Les histones més conservades són l'H3 i l'H4. La histona que presenta més variabilitat és l'H1 (revisat a Kasinsky et al., 2001).

La comprensió de l'estructura de la cromatina va rebre un fort impuls amb la descripció de la unitat fonamental d'empaquetament: el nucleosoma (Kornberg, 1974; Kornberg i Thomas, 1974). El nucleosoma està constituït per 200 pb de DNA envoltant un octàmer d'histones, format per un tetràmer d'histones H3 i H4 i dos dímers d'histones H2A i H2B, i presència d'una histona H1. Mitjançant la digestió amb nucleasa micrococcal es pot fragmentar la cromatina en unitats discretes, les quals seran múltiples del nucleosoma. Aquest tipus de digestions permeten degradar el DNA internucleosòmic, mentre que la resta roman protegit de la digestió. Així, mitjançant digestions parcials podem obtenir cromatosomes (octàmer nucleosòmic + histona H1 + 166 pb de DNA). Digestions més intenses causen la pèrdua de la histona H1 i permeten obtenir la partícula nucli o nucli del nucleosoma (octàmer d'histones + 146

pb DNA) (v. fig. I.1). La longitud del DNA espaiador és variable tant entre organismes diferents com dins d'un mateix organisme.

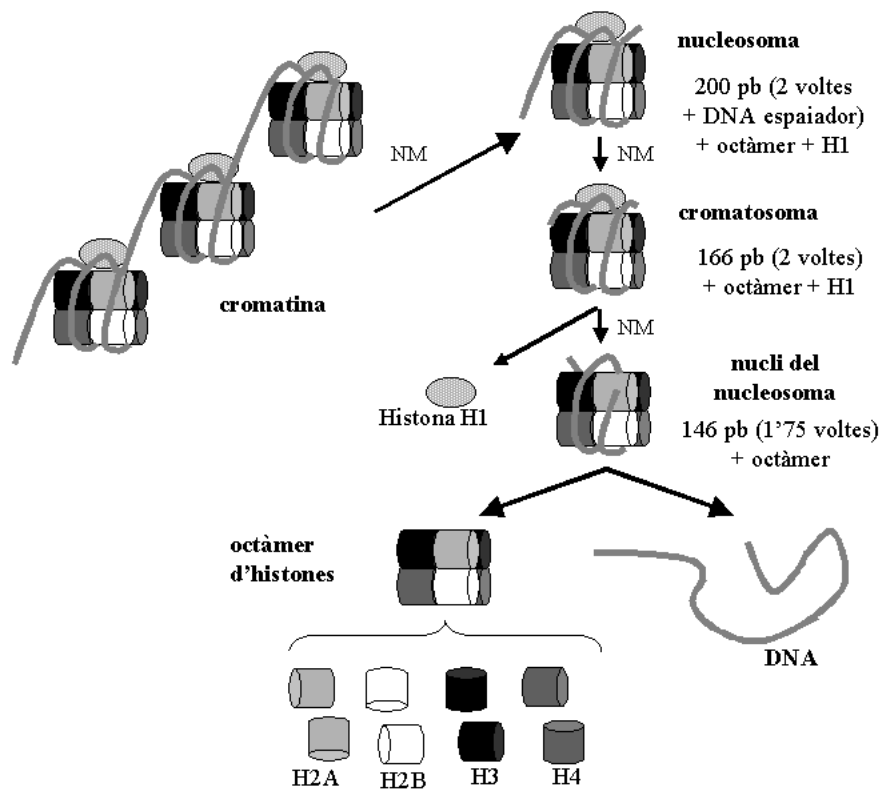


Fig. I.1 El nucleosoma. Esquema que il·lustra la relació entre el nucleosoma, el cromatosoma i el nucli del nucleosoma generats per digestió amb nucleasa micrococcal (NM). A elevada força iònica es poden separar el DNA i l'octàmer d'histones del nucli nucleosòmic. L'octàmer està constituït per 2 molècules de cada una de les histones H2A, H2B, H3 i H4. Figura modificada de Babu i Verma (1987) i Alberts et al. (1994).

La histona H1 no té un paper essencial en el manteniment de l'estructura del nucleosoma, però en canvi, s'uneix al DNA espaiador i és la responsable de l'empaquetament dels nucleosomes en fibres de 30 nm (Allan et al., 1982; van Holde, 1989). El domini carboxil terminal de la histona H1 és crític pel plegament de la cromatina (Allan et al. 1986). Les fibres de 30 nm es condensen finalment en superestructures més empaquetades (els cromosomes) durant la mitosi.

Els estudis per microscòpia electrònica van permetre observar que la cromatina en condicions de baixa força iònica presentava un aspecte en forma d'enfilall de granets (*collaret de perles*) d'aproximadament 11 nm de diàmetre (Olins i Olins, 1974). A l'augmentar la força iònica s'hi podia observar una estructura més empaquetada en forma de fibres de 30 nm de diàmetre. Encara avui en dia no queda

clar com s'organitzen els nucleosomes a les fibres de cromatina, tot i que se n'han plantejat diferents models, com el del solenoide i el model en ziga-zaga (v. fig. I.2).

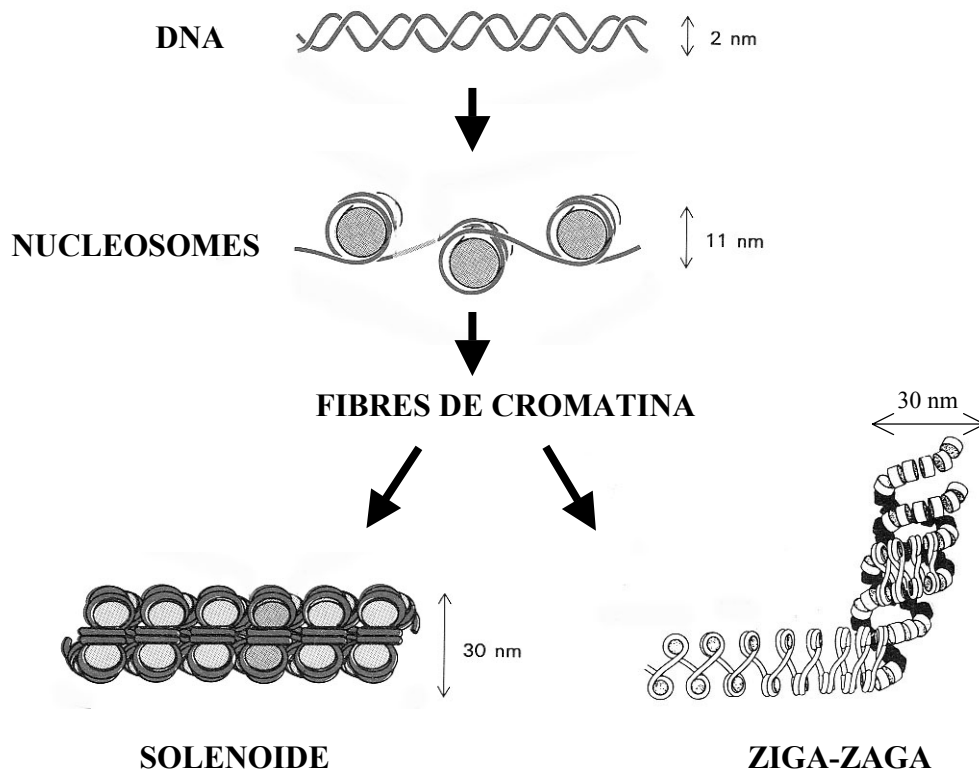


Fig. I.2 Models d'empaquetament de la cromatina. El DNA es troba empaquetat amb nucleosomes constituïts per dos dímers H2A-H2B, i un tetràmer (H3-H4)₂. En un estat més condensat i en presència d'histona H1 es formen les fibres de cromatina de 30 nm. Alguns dels models proposats per a la formació de fibres de cromatina són el model del solenoide i el model en ziga-zaga. Figura adaptada d'Alberts et al. (1994) i Woodcock et al. (1984).

En el model del solenoide les fibres de cromatina formarien una hèlix que suposaria una compactació del DNA entre 5 i 10 vegades més gran (Finch i Klug, 1976). En el segon model, els nucleosomes se situarien en ziga-zaga formant una cinta en la qual quedarien enfrontats i disposats en dues fileres paral·leles que s'anirien comprimint gradualment per enrotllar-se finalment en forma d'hèlix (Azorín et al., 1983; Worcel et al., 1981; Woodcock et al., 1984).

D'altra banda, alguns autors han descrit que la cromatina podria adoptar una forma particulada en forma de grànuls (*superbeads*) (Azorín et al., 1982). Els grànuls no són regulars i presenten un tamany mitjà de 34 nm. S'ha suggerit que aquestes estructures serien subunitats estructurals de la fibra de cromatina (Zentgraf i Franke, 1984). Una altra interpretació considera que aquests grànuls serien un estadi intermedi

en el procés d'agregació dels nucleosomes per formar les fibres de cromatina (Subirana, 1985).

Els estudis cristal·logràfics mitjançant difracció de raigs X van permetre obtenir l'estructura del nucleosoma a baixa resolució (7 Å), que va confirmar la seva estructura en forma de disc (Richmond et al., 1984). Posteriorment es va obtenir l'estructura de l'octàmer d'histones, la qual va mostrar que les histones adoptaven un plegament característic (*histone fold*), constituït per una estructura central en alfa hèlix flanquejada a banda i banda per hèlixs més curtes i llaços, mentre que la part amino-terminal o cua es trobaria desestructurada (Arents et al., 1991) (v. fig. I.3).

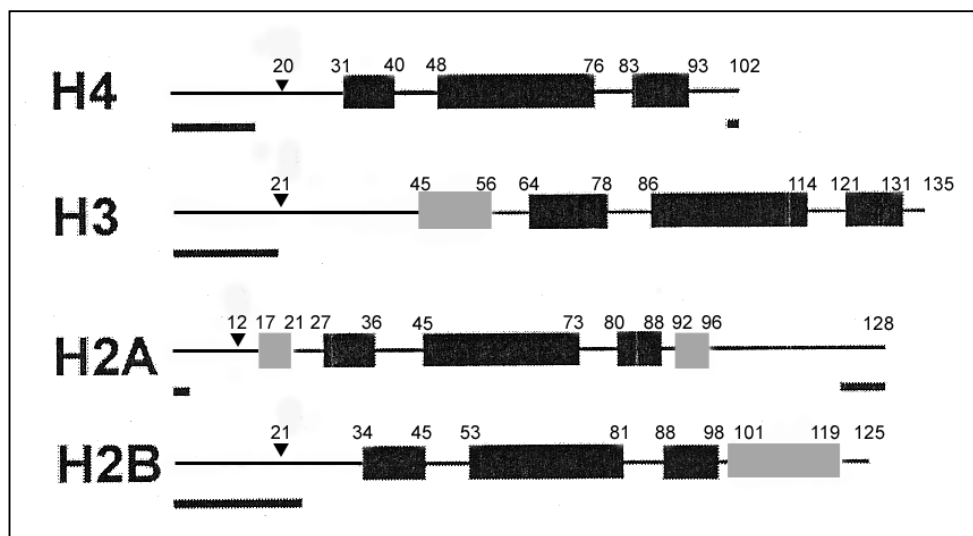


Fig. I.3 Estructura secundària de les histones nucleosòmiques. Representació de l'estructura secundària de les histones del nucli del nucleosoma a partir de la seva estructura cristal·logràfica (Arents et al., 1991; Luger et al., 1997). Els rectangles negres indiquen la regió típica en estructura alfa coneguda com a *histone fold* i en gris s'indiquen altres regions helicoïdals. La regió subratllada no ha pogut ser visualitzada a partir de la resolució cristal·logràfica de l'estructura. La punta de fletxa indica els llocs de tall per a la tripsina. Figura adaptada de Wang et al. (2000).

Finalment, l'estructura cristal·logràfica del nucleosoma va ser resolta a elevada resolució (2,8 Å) per Luger et al. (1997) i va mostrar l'estructura de l'octàmer d'histones i la seva interacció amb els 146 pb de DNA que giren en forma de superhèlix levogira al voltant d'aquest (v. fig. I.4). Els tetràmers d'histones H3 i H4 són a la part central del nucli del nucleosoma, mantenint un contacte més estret amb el DNA. Les cues de les histones es troben exposades i permeten la plasticitat estructural del conjunt.

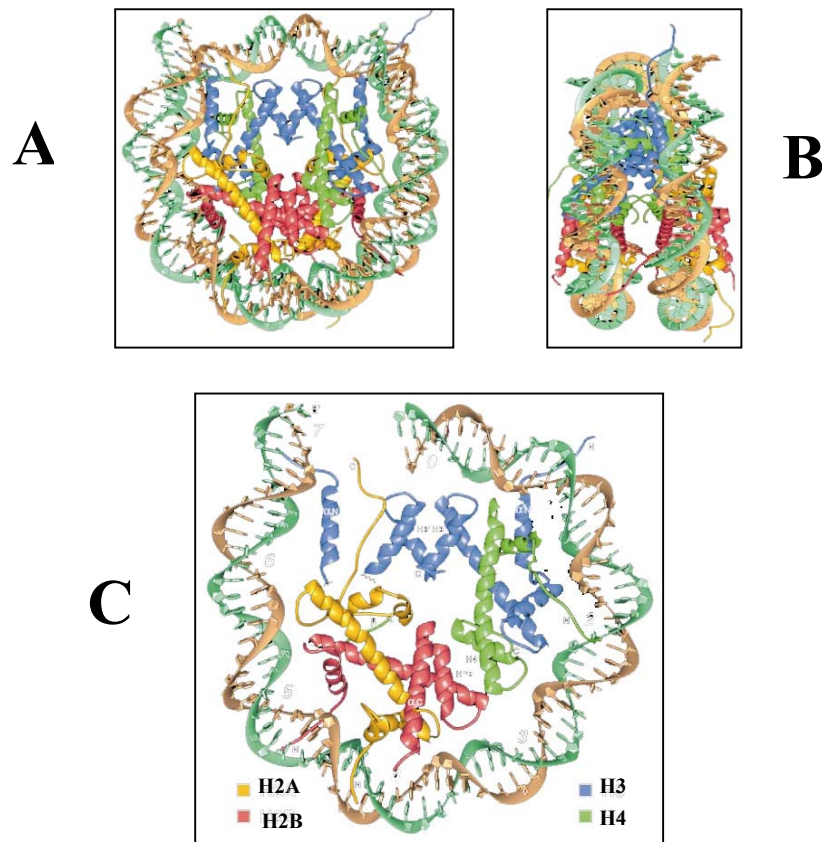


Fig. I.4 Estructura cristal·logràfica del nucli del nucleosoma. **A)** Vista frontal del nucleosoma amb els 146 pb de DNA envoltant un tetràmer d'histones (H3-H4)₂ i dos dímers d'histones H2A i H2B. **B)** Vista lateral del nucleosoma. **C)** Vista frontal de la meitat del nucleosoma. Figura adaptada de Luger et al. (1997).

Les histones poden patir diferents modificacions posttraduccionals, com acetilació, metilació, fosforilació, ADP-ribosilació i ubiquitinització, que regulen les seves funcions (van Holde, 1989). Les parts més susceptibles de modificacions són les cues amino-terminals, les quals podrien modular l'estabilitat del nucleosoma (Morales i Richard-Foy, 2000; Widlund et al., 2000). Sembla que hi hauria una relació directa entre l'acetilació de les histones nucleosòmiques i l'activació de la transcripció, mentre que la desacetilació causaria la repressió (Kornberg i Lorch, 1999). Tot i així, existeixen alguns estudis contradictoris sobre el paper de l'acetilació a les cues de les histones que posen de manifest la complexitat funcional d'aquesta part de la molècula.

Les cues de les histones es troben desestructurades però poden adoptar estructura en interaccionar amb proteïnes o amb el DNA (van Holde, 1989; Hansen et al., 1998). D'altra banda, s'ha demostrat que l'acetilació incrementa l'estructura en hèlix alfa de les cues de les histones (Wang et al., 2000) i podria alterar l'estructura i l'estabilitat de la cromatina. Les cues de les histones podrien estar implicades en les

interaccions entre nucleosomes i participar en la compactació de la fibra de cromatina (Carruthers i Hansen, 2000).

La síntesi d'histones té lloc durant la fase S del cicle cel·lular i va lligada amb la síntesi de DNA. En aquesta fase es dona una segregació dels nucleosomes parentals i la transferència de les histones preexistents cap al DNA naixent. L'altra meitat de les histones que es dipositaran seran de nova síntesi (Krude, 1999). Immediatament després de la seva síntesi, les histones H3 i H4 s'associen entre elles i són acetilades. L'acetilació és temporal i serà ràpidament revertida quan les histones s'uneixin al DNA (Verreault, 2000). Les histones es dipositen sobre el DNA de manera seqüencial començant per les histones H3 i H4, seguint per les histones H2A i H2B, i finalment la histona H1 (Worcel et al., 1978, Smith i Stillman, 1991).

Un dels factors que participa en l'acoblament de nucleosomes lligat a la replicació és CAF-1 (*chromatin assembly factor*) (Smith i Stillman, 1989). La seva habilitat per promoure la formació de nucleosomes en el DNA en replicació podria ser atribuïble a la capacitat de reconeixement del marcador del DNA PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Shibahara i Stillman, 1999; Moggs et al., 2000) (v. fig. I.5). CAF-1 s'uneix principalment a les histones H3 i H4, però recentment s'ha trobat que també pot interaccionar amb les histones H2A i H2B (Zhang et al., 2000), que podrien ser facilitades per altres factors com NAP-1 (*nucleosome assembly protein*) (Ito et al., 1996a; Chang et al., 1997).

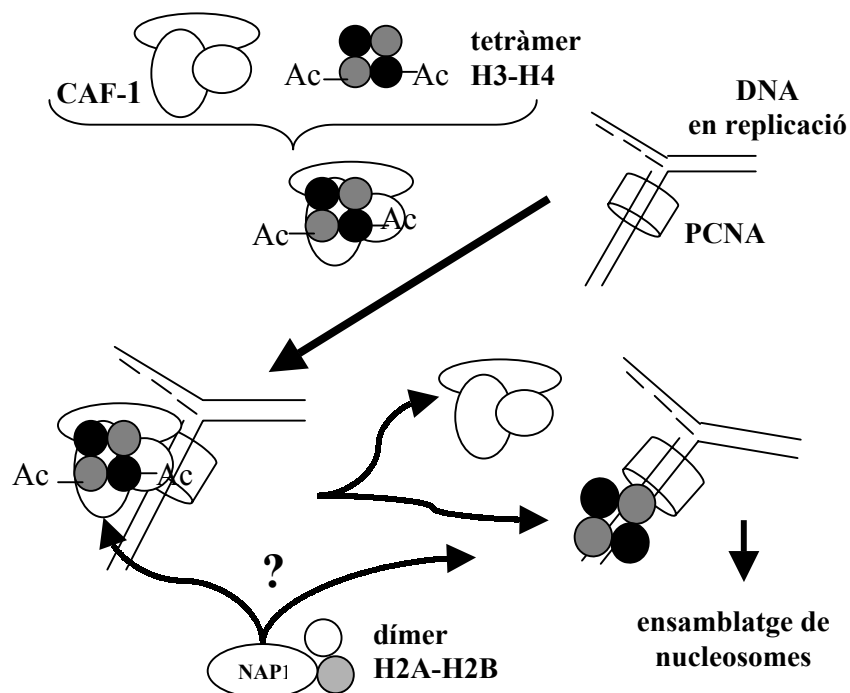


Fig. I.5 Acoblament de nucleosomes mitjançant CAF-1. El complex proteic CAF-1 uneix el tetràmer d'histones H3 i H4 de nova síntesi (acetilades) i és capaç de reconèixer el marcador PCNA associat al DNA en replicació. El tetràmer (H3-H4)₂ serà dipositat en el DNA seguit pels dímers H2A-H2B, que podrien ser facilitats per altres factors com NAP-1. Figura modificada de Mello i Allmouzni (2001) i Verreault (2000).

L'espaiament regular dels nucleosomes és un procés dependent d'ATP (Glikin et al., 1984; Kamakaka et al., 1993). S'han purificat diferents factors a *Drosophila* que podrien participar en aquest procés, com NURF (*nucleosome remodeling factor*) (Tsukiyama et al. 1994), ACF (*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*) i CHRAC (*chromatin accessibility complex*) (Ito et al., 1997; Varga-Weisz et al., 1997; Fyodorov i Kadonaga, 2002). Els complexos anteriors contenen una subunitat catalítica amb funció d'ATPasa dependent de nucleosoma (ISWI), que també s'ha relacionat amb el procés de transcripció (Vignali et al., 2000; Badenhorst et al., 2002). Un factor similar, denominat RSF (*remodeling and spacing factor*), s'ha trobat en humans (LeRoy et al., 1998).

2. PROTEÏNES ESPERMÀTIQUES BÀSIQUES

2.1 Les protamines

Les protamines són proteïnes petites i molt bàsiques amb un elevat contingut en arginina (60-80%) i presència de serina (10-15%) (Subirana, 1983). El complex de DNA i protamina s'anomena nucleoprotamina. En aquest complex les càrregues positives de les arginines afavoririen la neutralització de les càrregues negatives dels fosfats del DNA. Els estudis de difracció de raigs X indiquen que en alguns casos (cefalòpodes) la nucleoprotamina pot ser una estructura quasi cristal·lina (Subirana, 1983). Altres estudis han revelat estructures menys regulars: per exemple a mol·luscs bivalves (*Mytilus*) (Ausió i Subirana, 1982), aus (Chiva i Subirana, 1986) i mamífers (Balhorn, 1982).

No es coneix exactament com s'efectua la interacció DNA-protamina, però s'han proposat diferents models. En alguns d'aquests models les molècules del DNA es mantenen de manera paral·lela i pròximes gràcies a la seva interacció amb les protamines (Suau i Subirana, 1977). Balhorn i col·laboradors, basant-se en estudis sobre protamines de mamífers, van proposar que les protamines se situarien al solc estret del DNA (Balhorn, 1982; Balhorn et al., 1991). Altres autors han proposat que la interacció DNA-protamina es donaria en el solc ample del DNA (Fita et al. 1983; Puigjaner et al., 1986). D'altra banda, es va proposar un model basat en la comparació de protamines i l'extrem N-terminal de la histona H1, en el qual cada protamina establiria unions amb tres molècules de DNA i cada molècula de DNA estaria envoltada per 6 molècules de protamina (Subirana, 1990). El fet que no hi hagi un únic model representatiu que descriu l'estructura de la nucleoprotamina seria degut a la gran variabilitat de protamines existent en les diferents espècies.

La nucleoprotamina es forma en la transició que té lloc al nucli espermàtic en el decurs de l'espermioogènesi i comporta un empaquetament del DNA major que la nucleohistona (Subirana, 1985). Els processos de fosforilació són importants, ja que

modulen la capacitat d'unió de la protamina i el DNA. Algunes protamines, com les dels mamífers, contenen cisteïna i formen complexos altament estables i difícils de dissociar a causa dels ponts disulfur, tant intermoleculars com intramoleculars, que s'estableixen (Balhorn et al., 1991).

2.1.1 La protamina de *Dicentrarchus labrax*

Els peixos ossis presenten una considerable diversitat en el tipus de proteïnes espermàtiques bàsiques que posseeixen, que poden variar des de les protamines a les histones, però també existeixen alguns casos especials. Les protamines dels peixos solen ser molècules petites (27-34 aminoàcids), molt bàsiques i amb molt poca diversitat d'aminoàcids. Solen presentar del 50 al 80 % d'arginines, les quals solen trobar-se en grups de 4 o 6 residus. La serina és un altre aminoàcid important en la molècula (10-15%), susceptible de ser fosforilat. Concretament al peix ossi *Dicentrarchus labrax* (llobarro), existeix una protamina típica compactant el seu DNA. La protamina de *D. labrax* és una proteïna petita, de 34 aminoàcids, dels quals el 62,8% són Arg i el 10,6% són aminoàcids fosforilables (v. fig. I.6).

En el present treball s'han utilitzat nuclis espermàtics de *D. labrax* per a proves funcionals de descondensació de cromatina. L'ús d'aquesta espècie es pot justificar, d'una banda perquè la cromatina de *D. labrax* és un model simple en què la gran compactació del DNA ve donada per la presència d'una única protamina i per l'absència total d'histones. D'altra banda, la protamina de *D. labrax* presenta característiques que la relacionen amb les protamines P1 i P2 del gripau *Bufo japonicus* (v. fig. I.6), el qual presenta una nucleoplasmina similar a la de *Xenopus laevis*.

2.2 Proteïnes espermàtiques bàsiques d'amfibis (*Rana*, *Xenopus* i *Bufo*)

Els amfibis del gènere *Rana* presenten variants d'histones somàtiques empaquetant el DNA espermàtic i una variant específica d'histona H1 amb una taxa Lys/Arg més elevada que la de l'H1 somàtica (Kasinsky et al., 1985).

Algunes espècies del gènere *Xenopus*, concretament *X. tropicalis* i *X. epitropicalis*, presenten histones de tipus somàtic, segons revelen els estudis citoquímics (Mann et al., 1982). Altres espècies, com *X. laevis*, presenten proteïnes espermàtiques bàsiques intermèdies SP (SP1-SP6) també denominades X i Y (Philpott i Leno, 1992), H3 i H4 somàtiques, molt poca quantitat d'histones H2A i H2B (Katagiri i Ohsumi, 1994) i absència d'histona H1. Les proteïnes SP4 i SP5 s'han pogut seqüenciar a partir del seu cDNA (Hiyoshi et al., 1991; Ariyoshi et al., 1994). El seu contingut en arginina (36-37%) i la mida relativament gran (78-74 aminoàcids, respectivament) permeten classificar-les com a intermèdies entre les histones somàtiques i les protamines. La proteïna SP2 és similar a la histona H4 en la seva

composició aminoacídica (rica en Lys). En canvi, les proteïnes SP3-6 són més riques en arginina (33-41%) (Yokota et al, 1991).

Referent al gènere *Bufo*, *B. japonicus* presenta dues variants de protamina P1 i P2 de baix pes molecular (5.600 Da) que difereixen en un únic aminoàcid (àcid aspàrtic o àcid glutàmic a la posició 28, respectivament) i amb presència de clústers d'arginines (43%) (Takamune et al., 1991) (v. fig. I.6). Tant les protamines de *Bufo* com les provinents de peixos ossis presenten una mida i una mobilitat electroforètica similar, tenen les arginines agrupades i no presenten cisteïnes.

Ni la cromatina espermàtica de *Bufo* ni la de *X. laevis* estan organitzades en nucleosomes (Katagiri i Ohsumi, 1994).

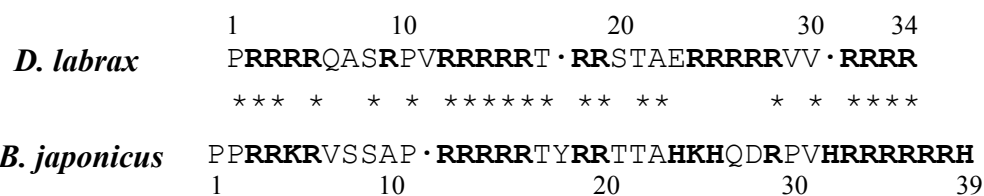


Fig. I.6 Les protamines de *D. labrax* i *B. japonicus*. Seqüència de la protamina de *Dicentrarchus labrax* (Saperas et al., 1993) alineada amb la seqüència de la protamina de *Bufo japonicus* (Takamune et al, 1991). La seqüència de la protamina de *B. japonicus* correspon a la protamina P1 (la protamina P2 tindria una E en posició 28 en comptes d'una D). S'indiquen amb negreta els aminoàcids bàsics i amb asteriscs els aminoàcids idèntics entre les dues seqüències.

2.3 Proteïnes espermàtiques bàsiques d'equinoderms

2.3.1 PEB a asteroïdeus, equinoïdeus i holoturoïdeus

Els equinoderms pertanyents al grup de les estrelles de mar (asteroïdeus) presenten histones de tipus somàtic a la cromatina espermàtica. Aquest és també el cas de l'estrella de mar mediterrània *Echinaster sepositus* (Subirana i Palau, 1968) estudiada en el present treball.

A les holotúries (holoturoïdeus) hi ha algun cas especial, com *H. tubulosa*, que a més a més de contenir les quatre histones somàtiques (H2A, H2B, H3 i H4) conté un tipus d'histona H1 específica, que presenta 7,9% d'Arg, i una petita proporció d'una proteïna específica denominada ϕ_0 (Kasinsky, 1989; Cornudella i Rocha, 1979) (v. I-2.3.2).

Els organismes més àmpliament estudiats dins els equinoderms són els eriçons de mar (equinoïdeus). La cromatina espermàtica dels eriçons de mar presenta histones espermàtiques específiques (Sp H1, Sp H2A i Sp H2B) i histones somàtiques (H3 i H4) (Poccia, 1986). Les histones específiques Sp difereixen de les somàtiques en el fet que són de mida més gran i presenten motius bàsics repetits de tipus SPKK (Von Holt et al., 1984) a les regions N-terminals que són susceptibles de fosforilació. L'efecte de la fosforilació causaria una disminució de la unió de les histones al DNA. A mesura que les histones Sp són fosforilades, el pronucli masculí adquireix histones CS (*cleavage-stage*) (CS H2A, CS H2B i CS H1) provinents del citoplasma de l'ou, que substituiran les histones Sp (Collas i Poccia, 1998).

2.3.2 La proteïna ϕ_0 d'*Holothuria tubulosa*

La ϕ_0 és una proteïna específica dels espermatozoides de l'equinoderm *Holothuria tubulosa* (cogombre de mar), on representa el 4% del total d'histones de l'espermatozoide madur. Es tracta d'una proteïna petita amb 77 residus aminoacídics, un pes molecular de 8.550 Da i un elevat contingut d'aminoàcids bàsics (44%), principalment arginines i lisines. Té característiques intermèdies entre les protamines i les histones i la seva seqüència aminoacídica està relacionada amb la regió carboxil-terminal de la histona H1 (Prats, 1989). La ϕ_0 presenta similitud en la seva mida i composició aminoacídica amb les proteïnes espermàtiques específiques (SP) de *Xenopus laevis* (Hiyoshi et al., 1991; Ariyoshi et al., 1994).

Estudis citoquímics d'immunolocalització de la proteïna ϕ_0 confirmen que es troba a l'interior del nucli, està correlacionada amb el procés d'espermioïgènesi i interacciona fortament amb la cromatina (Casas et al. 1989).

La seqüència proteica de la ϕ_0 va ser determinada per Jordan (1982) mitjançant seqüenciació de pèptids i posteriorment es va trobar la seqüència nucleotídica codificant per a la proteïna a partir de la clonació del seu cDNA (Prats, 1989; Prats et al., 1989) (v. fig. I.7A).

A través de mètodes de predicció d'estructures i dicroisme circular es va determinar que la proteïna podia formar hèlix alfa i que tindria quatre regions helicoidals interrompudes per voltes riques en serines (Verdaguer et al. 1993). (v. fig. I.7B).

Alguns estudis han demostrat que la distribució de la ϕ_0 al llarg de la fibra de cromatina no és uniforme (Azorín et al., 1983). S'uneix preferentment al DNA internucleosòmic actuant com a element estructural addicional i conferint una major estabilitat a determinades regions de la cromatina (Olivares et al., 1987). Per la seva estructura, longitud i basicitat facilitaria un major empaquetament del DNA promovent una organització regular del nucleosoma en fibres de 30 nm (Subirana, 1992). Els diferents estudis han contribuït a atribuir a la proteïna ϕ_0 un paper similar al de la histona H1, que afavoreix la condensació de la cromatina i confereix una major estabilitat a determinades regions d'aquesta.

Recentment s'ha descrit una proteïna, anomenada PR ϕ_0 , capaç d'extreure la proteïna ϕ_0 del nucli espermàtic i produir la descondensació de la cromatina espermàtica d'*H. tubulosa* (del Valle, 1999), tot i que, fins al moment, la proteïna PR ϕ_0 només ha estat parcialment caracteritzada (del Valle et al., 2003), en aquest treball es mostra com l'extracció de proteïna ϕ_0 i histona H1 seguirien mecanismes moleculars diferents. L'extracció de ϕ_0 seria suficient per permetre la descondensació espermàtica a *H. tubulosa*, cosa que confirmaria que aquesta proteïna seria el principal factor responsable de l'elevat empaquetament de la cromatina d'aquest organisme.

A

```

1  ATG  GTA  GCC  AGA  CGA  CAA  ACA  AAG  AAA  GCT  AGG  AAG  CCT  GCA  GCC  AGG  AGA
   M   V   A   R   R   Q   T   K   K   A   R   K   P   A   A   R   R
18  CGC  AGC  GCA  GCC  AAA  CGC  GCA  GCC  CCA  GCT  GCG  AAG  AAA  GCG  GCG  AGT  CGC
   R   S   A   A   K   R   A   A   P   A   A   K   K   A   A   S   R
35  CGT  CGT  CCA  AAG  AGT  GCT  AAG  AAG  GCT  AAG  CCC  GCA  GCA  AGG  AGA  CGC  AGC
   R   R   P   K   S   A   K   K   A   K   P   A   A   R   R   R   S
52  AGC  GTC  AAA  CCT  AAA  GCA  GCA  AAA  GCA  GCC  GCC  CAA  GTC  CGT  CGC  AGG  AGC
   S   V   K   P   K   A   A   K   A   A   A   Q   V   R   R   R   S
69  CGA  CGA  ATT  CGC  CGT  GCG  TCC  GTG  TCA  AAG  TAA
   R   R   I   R   R   A   S   V   S   K   Stop

```

B

VARROTKKARKPAARRRSAAKRAAPAAKKAASRRRPKSAKKAKPAARRRSSVKPKAAKAATQVRRRSRRIRRASVSK

Fig. I.7 Seqüència nucleotídica i aminoacídica de la proteïna ϕ_0 . A) Seqüències nucleotídica i aminoacídica deduïdes a partir del cDNA (Prats et al., 1989). La Met inicial no és present a la proteïna ϕ_0 , el triplet 62 que codifica l'Ala (en negreta) s'ha trobat canviat per Thr en alguns clons. B) Predicció de l'estructura secundària pel mètode de Chou i Fasman (1978). Els rectangles negres indiquen les regions amb hèlix alfa i els rectangles blancs indiquen els girs. Figura adaptada de Verdaguer et al. (1993).

3. REMODELACIÓ DE LA CROMATINA ESPERMÀTICA DESPRÉS DE LA FECUNDACIÓ

Durant l'espermatogènesi es dona una transformació de cromatina somàtica a cromatina espermàtica. Aquesta transformació comporta una sèrie de canvis tant moleculars com estructurals, en els quals destaquen una transició de proteïnes que empaqueten el DNA i la reducció del volum nuclear. Les proteïnes implicades en aquesta transició varien en funció de cada cas concret, però, en general, sempre impliquen una substitució de les histones somàtiques per algun tipus de proteïna més bàsica, capaç de compactar més fortament el DNA espermàtic. Segons les espècies, aquesta transició proteica pot ser directa o bé pot donar-se en més d'un pas. En qualsevol cas, el resultat és un nucli molt condensat i inactiu pel que fa a la transcripció que serà el responsable de la fecundació de l'òocit.

El nucli espermàtic facilita la transmissió del genoma patern cap al citoplasma de l'ou, on serà reactivat durant la fertilització. Els ous de diferents espècies són fertilitzats a diferents estadis de la meiosi; concretament en amfibis i mamífers, la fertilització es dona en l'estadi de metafase meiótica I, i durant la fertilització es completa la meiosi. En canvi, en els equinoderms la fecundació es dona en ous que ja han finalitzat la meiosi.

La fecundació comporta una reversió de cromatina espermàtica a cromatina somàtica activa en la transcripció. Un dels processos clau en la remodelació postfecundació de la cromatina és la descondensació de la cromatina espermàtica (Barros, 1987). El nucli dels oòcits d'amfibis i mamífers conté factors de descondensació que romanen a una concentració elevada al citoplasma de l'ou després del trencament de la vesícula germinal durant la maduració de l'òocit. D'altra banda, els ous de diferents espècies també poden contenir reserves d'histones que seran utilitzades per a la remodelació de la cromatina (Poccia i Collas, 1996; Wright, 1999).

L'habilitat del citoplasma de l'ou per descondensar el nucli espermàtic *in vitro* es pot examinar utilitzant extractes cel·lulars preparats a partir d'ous de *Xenopus* (Brown et al., 1991) i *Bufo* (Itoh et al., 1993) o embrions de *Drosophila* (Berrios i Avilion, 1990).

Gràcies al gran nombre d'estudis existents, sobretot en amfibis i equinoderms, s'han pogut determinar els mecanismes implicats en el pas del nucli espermàtic cap a un pronucli masculí actiu. Els principals passos que tenen lloc en aquest procés són: (1) desenganxament de la membrana nuclear espermàtica (sense porus) per permetre l'exposició de la cromatina directament als factors presents al citoplasma de l'ou, (2) descondensació i remodelació de la cromatina espermàtica mitjançant la substitució de les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) per proteïnes de l'ou, (3) formació de la nova membrana nuclear (amb porus), i (4) activació de la transcripció i replicació del DNA. Aquests processos comporten diferents canvis en la forma, el volum, la composició proteica i en l'activitat del nucli espermàtic (Longo, 1981; Poccia i Collas, 1996).

Tots aquests passos tenen lloc mentre la cromatina espermàtica migra, a través d'un mecanisme lligat als microtúbuls del citoesquelet, des de la perifèria de l'ou fins al centre, per trobar-se finalment amb la cromatina materna.

La cromatina espermàtica pot estar organitzada de manera diferent en diferents organismes. Per tant, els mecanismes moleculars implicats en la seva remodelació també poden ser variables.

3.1 Remodelació de la cromatina espermàtica en amfibis

Dins els amfibis, l'organisme més àmpliament estudiat ha estat la granota *Xenopus laevis*. Per tant, ens centrarem únicament en aquest model.

Durant la fecundació a *X. laevis* la cromatina espermàtica es descondensa en dos estadis, el primer dels quals comporta una descondensació ràpida i un augment de volum del pronucli, mentre que en el segon estadi es dona una descondensació més lenta dependent de membrana seguida d'un inflament del pronucli masculí (Longo, 1981).

Els nuclis espermàtics desmembranats de *Xenopus laevis* es descondensen ràpidament quan s'incuben amb extractes d'ous de *X. laevis*. Els nuclis passen d'una estructura en forma de tirabuixó cap a una estructura molt més allargada i finalment donen lloc al pronucli masculí, que es fusionarà amb el pronucli femení.

La immunodepleció de la nucleoplasmina en els extractes d'ou inhibeix l'estadi inicial de descondensació espermàtica (Philpott et al. 1991). D'aquest estudi es va deduir que la nucleoplasmina (v. I-5) seria necessària i suficient per al primer estadi de descondensació espermàtica a *X. laevis*. Aquesta proteïna tindria un paper similar en la descondensació de la cromatina espermàtica de *Bufo japonicus* (Ohsumi i Katagiri, 1991).

La descondensació espermàtica a *X. laevis* va acompanyada de la pèrdua de proteïnes específiques de l'esperma (SP, també denominades proteïnes X i Y) i el guany d'histones del tipus H2A (H2AX) i H2B provinents de l'ou per tal de permetre la formació del nucli dels nucleosomes (Ohsumi i Katagiri, 1991; Philpott i Leno., 1992). La nucleoplasmina seria la molècula intermediària clau en aquests processos actuant tant com a factor desacobrador com acobrador de la cromatina durant la fertilització (v. fig. I.8). Alguns autors han descrit que la unió de la nucleoplasmina i les histones H2A i H2B és feble *in vivo* (Zucher i Worcel, 1990). Es dona una major afinitat entre la NP i les SP que no pas entre la NP i les histones H2A i H2B, i també una major afinitat d'H2A i H2B pel DNA que no pas per la NP (Katagiri i Ohsumi, 1994).

La nucleoplasmina sofreix una hiperfosforilació en el transcurs de la transició d'oòcit a ou, la qual juga un paper important en la remodelació de la cromatina espermàtica (Sealy et al., 1986; Cotten et al., 1986). La nucleoplasmina provinent d'oòcits (hipofosforilada) és menys eficient que la provinent d'ous (hiperfosforilada)

en la descondensació de nuclis espermàtics de *X. laevis* (Ohsumi et al., 1995; Leno et al., 1996). La nucleoplasmina s'emmagatzema a la vesícula germinal i esdevé fosforilada durant l'activació i el trencament de la vesícula germinal, moment en què passarà al citoplasma, on podrà exercir les seves funcions (Leno et al., 1993).

A *X. laevis*, la remodelació de la cromatina espermàtica per formar el pronucli masculí en el si del citoplasma de l'ou implica la fosforilació de les histones H2A, H2AX i H4 i l'adquisició de la histona espaiadora B4 (H1X) i de proteïnes HMG (Smith et al., 1988; Dimitrov et al. 1994). El pronucli masculí s'enriqueix en histones del tipus H2AX i H1X (B4) (Smith et al., 1988), provinents del citoplasma de l'ou. Les histones H2AX i H1X persisteixen a l'embrió primerenc, però seran substituïdes per les corresponents variants somàtiques durant la fase de gastrulació (Dimitrov i Wolffe, 1995).

La cromatina espermàtica de *X. laevis* no presenta l'espaiament regular de la cromatina somàtica, ja que no està constituïda per nucleosomes (Dimitrov et al., 1994). En formar-se el pronucli masculí es generen repeticions de 180-200 pb i es reestableix el patró nucleosòmic típic.

Per aconseguir un espaiament correcte entre nucleosomes no n'hi ha prou d'afegir els components purificats, sinó que es requereix tot l'extracte de l'ou de *Xenopus*, fet que indica la implicació d'altres factors (Dilworth i Dingwall, 1988). Alguns dels factors implicats en aquesta funció serien la histona B4 i la proteïna HMG1 (Dimitrov i Wolffe, 1996).

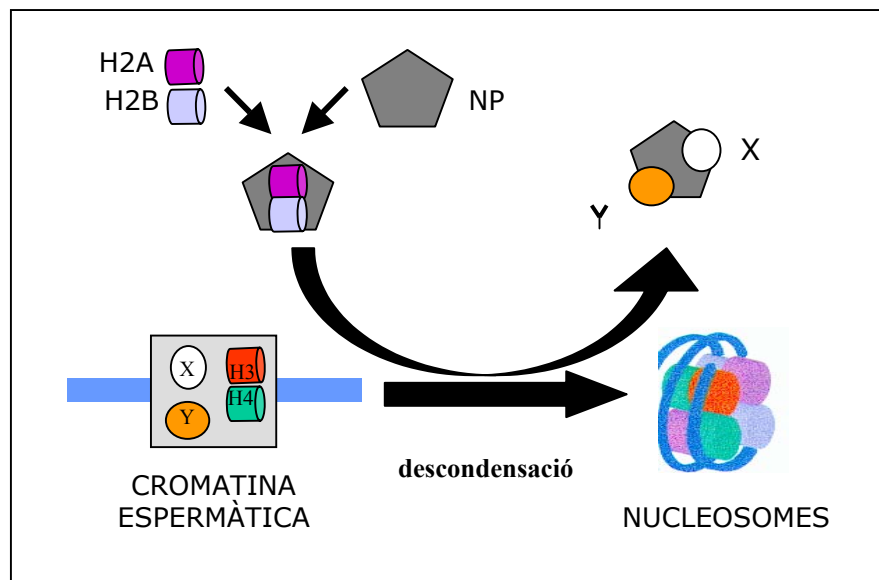


Fig. I.8 Remodelació de la cromatina espermàtica a *X. laevis*. La nucleoplasmina s'uneix a les proteïnes espermàtiques X i Y, cosa que provoca la descondensació de la cromatina, i les reemplaça per histones H2A i H2B per permetre la formació de nucleosomes. Figura adaptada de Philpott i Leno (1992).

Els estudis de Dimitrov i Wolffe (1996) mostren com la nucleoplasmina és capaç de remodelar nuclis somàtics i permetre la seva reactivació en la transcripció. Aquests autors van utilitzar nuclis d'eritròcits de *X. laevis* que van incubar amb extractes d'òcits de la mateixa espècie. Van observar un desplaçament selectiu de les histones espaiadores de la cromatina somàtica (H1 i H1°), les quals eren substituïdes per histona B4 i proteïna HMG1. Mitjançant estudis d'immunodepleció es va determinar que la nucleoplasmina estaria implicada en el procés de remodelació de nuclis d'eritròcits *in vitro* desplaçant de manera selectiva les histones espaiadores.

Malgrat que altres factors com l'àcid poliglutàmic (Stein et al., 1979), l'RNA (Nelson et al., 1981), l'heparina o la nucleolina (Barry i Merriam, 1972) són capaços de descondensar la cromatina espermàtica, només la nucleoplasmina és capaç de realitzar aquesta funció en condicions fisiològiques.

Descondensació en sistemes heteròlegs

Els mecanismes de remodelació de la cromatina no serien estrictament específics de cada espècie. Els nuclis espermàtics de *X. laevis* poden ser descondensats per extractes d'embrió de *Drosophila* (Kawasaky et al., 1994) i extractes d'ous de *R. pipiens* (Lohka i Masui, 1983) i de *B. japonicus* (Ohsumi i Katagiri, 1991). També, la cromatina espermàtica humana pot ser remodelada mitjançant extractes d'ou de *Xenopus* (Brown et al., 1987; Ohsumi et al., 1995) i de *Bufo* (Itoh et al., 1993).

D'altra banda, els extractes d'ous de *X. laevis* poden descondensar la cromatina espermàtica de *B. japonicus* (Ohsumi i Katagiri, 1991), *Spisula solidissima* i *Mytilus californianus* (Rice et al., 1995) i inflar nuclis d'eritròcits de gallina (Barry i Merriam, 1972). Així mateix, la nucleoplasmina purificada de *X. laevis* és capaç de descondensar la cromatina espermàtica d'altres amfibis: *B. japonicus* (Ohsumi i Katagiri, 1991), i *R. catesbeiana* (Itoh et al., 1997). I de peixos: *Scomber scombrus* (verat) (Saperas et al., 1999), salmó (Iwata et al., 1997, 1999), *Dicentrarchus labrax* (Prieto et al., 2002), i mol·luscs: *M. californianus* (Rice et al., 1995).

3.2 Remodelació de la cromatina espermàtica en equinoderms

Dins els equinoderms, els organismes que han estat més àmpliament estudiats han estat els eriçons de mar (equinoïdeus). Aquests organismes permeten obtenir un elevat nombre de pronuclis en un estat sincrònic a partir d'ous poliespèrmics (Poccia et al., 1981). Els eriçons de mar presenten una cromatina espermàtica amb presència de nucleosomes i empaquetada com a nucleohistona molt estable i resistent a la

degradació, amb un nivell d'empaquetament similar al dels cromosomes mitòtics (Green i Poccia, 1988).

Els ous de l'eriçó de mar estan envoltats d'un embolcall gruixut i gelatinós que ha de ser penetrat per l'espermatozoide. Amb el contacte s'activa una proteïna quinasa espermàtica dependent d'AMPc que desencadena una sèrie de canvis bioquímics a nivell de la cromatina espermàtica. L'alcalinització que té lloc durant la fertilització es requereix per promoure la descondensació espermàtica, i també hi seria important el paper de determinades quinases (Cameron i Poccia, 1994).

Després de la fertilització, el primer estadi de la remodelació de la cromatina espermàtica implica la fosforilació de les cues de les histones específiques Sp1, SpH2A i SpH2B i el seu intercanvi per les variants presents a l'ou CSH1, CSH2A i CSH2B (Green et al., 1995).

La cromatina espermàtica de l'eriçó de mar presenta la repetició més gran coneguda (240-250 pb) (Vodicka et al., 1990). El nucli espermàtic reestableix la repetició típica de la cromatina somàtica poc després de la fertilització. Als embrions primerencs la repetició és de 195-205 pb (Savic et al., 1981). Sembla que l'adquisició d'histones CS permetria el canvi en el patró de repetició de la cromatina (Poccia et al., 1984).

En els nombrosos estudis realitzats en eriçons de mar no s'ha trobat cap proteïna amb característiques similars a la nucleoplasmina capaç d'extreure les histones espermàtiques específiques Sp (Stephens et al., 2002). D'altra banda, la fosforilació seria un element crític per a l'activació i la descondensació de la cromatina als eriçons de mar. Els requeriments mínims necessaris per a l'inflament del pronucli masculí serien la fosforilació i l'extracció de la histona SpH1, i la fosforilació de SpH2A i SpH2B i algunes proteïnes de la matriu nuclear.

4. LA NUCLEOPLASMINA DE *Xenopus laevis*

La nucleoplasmina (NP) és una proteïna àcida (pI \approx 5) i termoestable present al nucli dels oòcits i ous no fecundats de la granota *Xenopus laevis* i altres amfibis on es va trobar que era la proteïna nuclear més abundant, perquè representava el 9-10% de les proteïnes nuclears (Krohne i Franke, 1980a, 1980b; Mills et al., 1980). Mitjançant transferència Northern es va determinar que la nucleoplasmina de *X. laevis* s'expressava durant l'oogènesi però no durant l'embriogènesi (Bürglin et al., 1987).

En el procés de transició d'oòcit a ou la nucleoplasmina esdevé fosforilada (Cotten et al., 1986; Leno et al., 1996). A partir de la utilització de fosfatases i del posterior estudi electroforètic es va concloure que la NP de l'oòcit tindria menys de 10 fosfats per monòmer mentre que la de l'ou en tindria al voltant de 20. En estudis posteriors mitjançant tècniques d'espectrometria de masses es va establir que la NP de l'oòcit tindria 3 grups fosfat i la NP de l'ou al voltant de 7-10 (Hierro et al., 2001).

A la figura I.10 es mostra la seqüència nucleotídica i aminoacídica de la nucleoplasmina provinent del clon de Bürklin. Existeixen tres trams acídics a la seqüència de la NP denominats A1, A2 i A3 i un senyal de localització nuclear bipartit entre els trams A2 i A3 (v. també I-5.3). El tram acídic A2 és el que presenta un major nombre d'aminoàcids àcids (15 en el cas de la seqüència de Bürklin i 17 en la seqüència de Dingwall).

La NP té dos dominis principals: un nucli (*core*) resistent a proteòlisi que conserva la termoestabilitat i la capacitat de pentamerització (residus 1-152 del clon de Dingwall o 1-142 del clon de Bürklin), i una cua C-terminal sensible a l'acció de proteases (Dingwall et al., 1987). La cua conté el senyal de localització nuclear i el tram acídic A3. A l'extrem C-terminal hi trobem una regió bàsica (aminoàcids 172-190) que presenta homologia amb l'extrem C-terminal de la histona H1 (Dingwall i Allan, 1984; Bürklin et al., 1987).

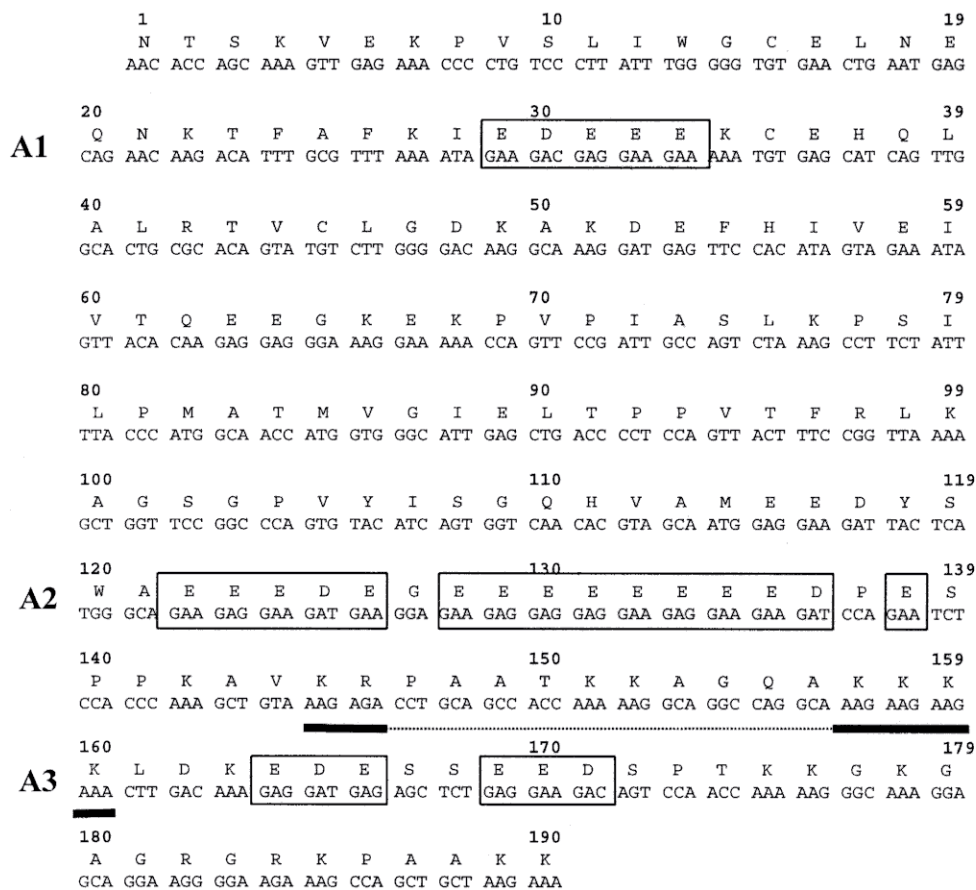


Fig. I.10 Seqüència nucleotídica i aminoacídica de la NP de Bürklin. Seqüència segons Bürklin et al.(1987). A1, A2 i A3 representen els trams acídics principals de la NP (requadrats). El senyal de localització nuclear (sln) bipartit s'indica subratllat, i la regió espaciadora, en puntejat.

4.2 Conformació de la nucleoplasmina

Els estudis pioners d'Earnshaw i col·laboradors (Earnshaw et al., 1980) van demostrar mitjançant tècniques d'entrecruament químic que la nucleoplasmina era una molècula pentamèrica. Els mateixos autors van obtenir imatges de la proteïna al microscopi electrònic de transmissió on es mostrava el pentàmer de nucleoplasmina en forma de disc de 75 Å de diàmetre amb un punt electrodens central. Estudis recents mitjançant ultracentrifugació analítica han confirmat la presència de pentàmers de nucleoplasmina en solució (Prieto et al., 2002). Els pentàmers de nucleoplasmina es formen per l'extrem N-terminal i es caracteritzen pel fet de ser molt resistents a la calor i a la presència d'SDS.

Recentment, el grup d'Akey i col·laboradors han aconseguit resoldre l'estructura cristal·logràfica de la regió denominada *core* o regió amino terminal resistent a quimotripsina (aminoàcids 10-124) de la nucleoplasmina del clon de Dingwall (Dingwall et al., 1987) a 2,3 Å de resolució (Dutta et al., 2001). L'estructura del monòmer correspon a 8 làmines β antiparal·leles en forma de barril beta (*jellyroll*) (v. fig. I.11). Cada làmina beta està connectada amb una altra mitjançant llaços o girs. Així, existeixen quatre girs curts (entre $\beta 1$ - $\beta 2$, $\beta 3$ - $\beta 4$, $\beta 5$ - $\beta 6$ i $\beta 7$ - $\beta 8$) situats a la regió de contacte entre pentàmers o regió proximal. Els girs més llargs (entre $\beta 2$ - $\beta 3$ i $\beta 6$ - $\beta 7$) i la forqueta beta (entre $\beta 4$ - $\beta 5$) es localitzen a la regió distal del monòmer i estarien menys ordenats. Els contactes entre monòmers formarien una mena de cinturó hidrofòbic que podria ser el responsable de la gran estabilitat del pentàmer.

Es van trobar diferents regions desordenades que no apareixien a l'estructura cristal·logràfica. La regió A1 estaria situada en una d'aquestes regions, concretament al llaç comprès entre les regions $\beta 2$ i $\beta 3$. També la forqueta β (entre $\beta 4$ i $\beta 5$) presenta un cert grau de desordre i podria ser una regió flexible en la molècula. La part lateral externa del pentàmer és predominantment acídica i podria estar implicada en la interacció amb histones i altres proteïnes bàsiques. En aquesta regió estarien situats el tram acídica A1, la forqueta β i els residus Glu121, Glu122 i Asp123.

En el cristall, la NP estaria formant un decàmer (v. fig. I.11) constituït per dos pentàmers desplaçats 15° entre ells, i essent el pentàmer la unitat asimètrica. A partir de les dades cristal·logràfiques es va determinar que el decàmer tindria una alçada de 80 Å i un diàmetre de 60 Å. En el treball presentat per Dutta (Dutta, 2000; Dutta et al., 2001) es mostren diverses evidències de l'existència del decàmer en solució entre les quals hi ha experiments de filtració en gel, entrecruament químic i PAGE nativa. Els resultats presentats no són gaire conclouents però sembla que el decàmer seria una estructura força inestable i es planteja l'existència d'un equilibri entre el pentàmer i el decàmer, amb un predomini del pentàmer en solució. D'altra banda, els experiments mitjançant ultracentrifugació analítica no han mostrat en cap cas la presència de decàmers (Dutta, 2000; Dutta et al., 2001; Saperas et al., 1999; Prieto et al., 2002). La NP presenta motius AKDE i GSGP que estan molt conservats dins la família de proteïnes classificades com a *NP-like* i que podrien estar implicats en la formació o estabilització del decàmer (v. fig. I.12).

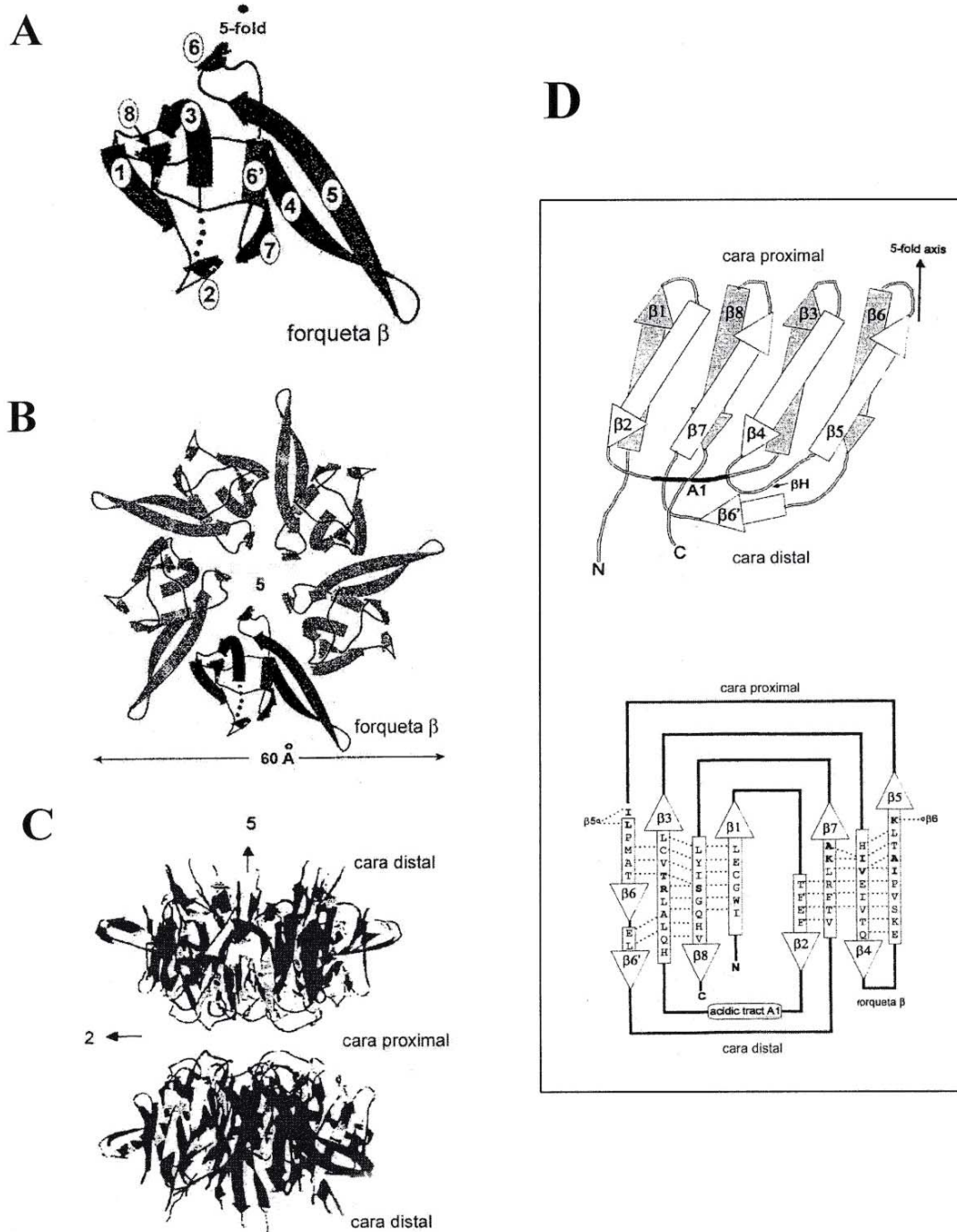


Fig. I.11 Estructura cristal·logràfica de la nucleoplasmina core. **A)** Monòmer on estan numerades les làmines β ; la regió puntejada correspon al tram àcidic A1. **B)** Vista frontal del pentàmer de r-NP-core des de la regió de contacte entre monòmers. **C)** Vista lateral del decàmer de r-NP-core, **D)** Representació esquemàtica del monòmer de NP en forma tridimensional (superior) o bidimensional (inferior) on es mostren les diferents làmines β . En el model bidimensional les línies discontinües corresponen a enllaços per punts d'hidrogen. Figura adaptada de Dutta, 2000 i Dutta et al., 2001.

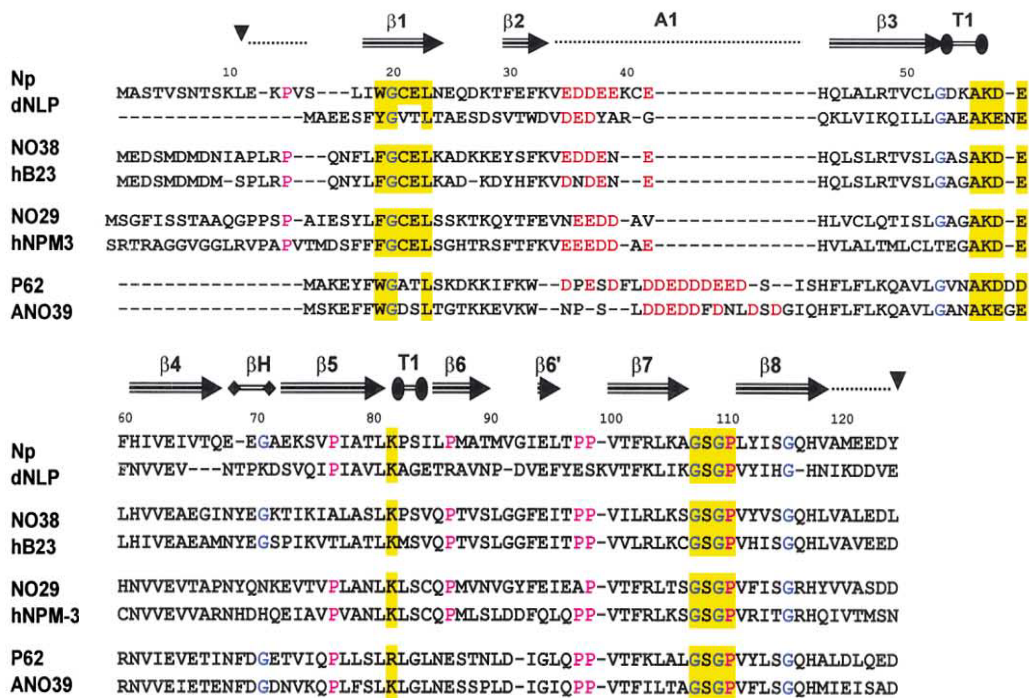


Fig. I.12 Estructura secundària de la NP core i comparació de seqüències aminoacídiques de proteïnes similars a la NP. Seqüència aminoacídica de la regió nucli (*core*) de la NP del clon de Dingwall (Dingwall et al., 1987) on s'indiquen els elements d'estructura secundària: 8 làmines beta ($\beta 1$ - $\beta 8$), girs (T1) i forqueta beta (βH). Els triangles marquen els punts de tall per a la quimotripsina. Les regions puntejades no es van poder observar a l'estructura cristal·logràfica i estarien desestructurades. Es compara la seqüència aminoacídica de la NP i proteïnes relacionades: Np (NP *core* del clon de Dingwall), dNLP (*Drosophila NP-like protein*), NO38 (nucleofosmina de *X. laevis*), hB23 (nucleofosmina humana), NO29 (proteïna nucleolar de *X. laevis*), hNPM3 (nucleofosmina/nucleoplasmina humana), p62 (proteïna mitòtica d'eriçó de mar), ANO39 (proteïna nucleolar d'estrella de mar). Per més detalls sobre aquestes proteïnes vegeu apartat I-6. Els motius comuns (AKDE i GSGP) i altres residus conservats es remarquen en gris. Figura adaptada de Dutta et al., 2001.

Durant la redacció d'aquesta memòria, el grup d'Akey i col·laboradors ha publicat l'estructura cristal·logràfica de la part nucli (*core*) de la dNLP de *Drosophila* (v. també apartat I.6) en forma de pentàmer, a 1,5 Å de resolució (Namboodiri et al., 2003). El monòmer d'aquesta proteïna presenta una topologia en forma de barril β similar a la de la nucleoplasmina de *X. laevis*.

5. FUNCIONS DE LA NUCLEOPLASMINA

5.1 Xaperones moleculars

Les xaperones moleculars són una família de proteïnes encarregades de mediatitzar el plegament d'altres proteïnes i/o facilitar la unió entre proteïnes que formen estructures oligomèriques, (revisat per Ellis et al., 1989). El terme xaperona molecular va ser utilitzat per primera vegada per Laskey (1978) per descriure les funcions de la nucleoplasmina relacionades amb l'acoblament de les histones i el DNA per formar els nucleosomes.

Taula I.1 Xaperones moleculars. Taula adaptada d'Ellis i van der Vies (1991).

XAPERONES MOLECULARS	
Nucleoplasmines/ nucleofosmines	nucleoplasmina, nucleoplasmina S, dNLP (CRP1) NO29, NO38 = nucleofosmina = B23, NPM3
Xaperonines	xaperonina 60 <u>bacterianes</u> : GroEL (<i>E. coli</i>) antigen 65 kDa (<i>micobacteri</i>) <u>plastidials</u> : subunitat d'unió a rubisco <u>mitocondrials</u> : hsp 60 mitonina HuCha60 <u>citosòlica (eucariota)</u> : TCP-1 xaperonina 10 GroES (<i>E. coli</i>)
Proteïnes hsp 70	hsp 68, hsp 72, hsp 73 DnaK hsc 70 BiP grp 75, grp 78, grp 80 SSA 1-4 SSB1, SSC1, SSD1
Altres	hsp 83, htp G SRP, Sec B, Pap D N1/N2, CAF-1, NAP-1

Anfinsen (Anfinsen, 1973) va postular el principi de l'autoacoblament. Aquest principi es basa en el fet que tota la informació necessària i suficient per determinar l'estructura i la funció d'una proteïna es troba en la seva estructura primària (la seqüència d'aminoàcids). Aquests treballs estaven basats en estudis *in vitro* i la possible implicació de proteïnes addicionals en els processos de plegament no s'havia tingut en compte. Les proteïnes es pleguen a l'interior de la cèl·lula, enmig d'un ambient amb una elevada presència proteica, fet que fa possible un plegament *in vivo* assistit (revisat per Ellis i Hemmingsen, 1989).

Les xaperones prevenen la formació d'estructures incorrectes, formades a causa de l'exposició transitòria de superfícies carregades o superfícies hidrofòbiques. Aquests fenòmens tenen lloc durant la síntesi de polipèptids; el plegament/replegament durant el transport a través de membranes, i la recuperació, davant de fenòmens d'estrès (per exemple en un xoc tèrmic), etc. Existeixen diferents famílies de xaperones (v. taula I.1), entre les quals cal destacar la família de la nucleoplasmina/nucleofosmina, la família de les xaperonines i la família de les hsp 70.

Xaperones nuclears

Algunes de les xaperones moleculars exerceixen la seva funció a l'interior del nucli cel·lular i s'anomenen xaperones nuclears. A diferència de les xaperones citoplasmàtiques, que regulen el correcte plegament de proteïnes, les xaperones nuclears s'uneixen a proteïnes correctament plegades i mediatitzen interaccions macromoleculares, particularment entre proteïnes i àcids nucleics (Philpott et al., 2000). Dins d'aquest grup trobaríem com a principals components els que pertanyen a la família de la nucleoplasmina/nucleofosmina, la proteïna N1/N2 i les proteïnes CAF-1 i NAP-1. Les xaperones nuclears es caracteritzen pel fet de tenir un senyal de localització nuclear (v. ap. I-5.3) i solen tenir una o més regions poliacídiques (v. fig. I.13).

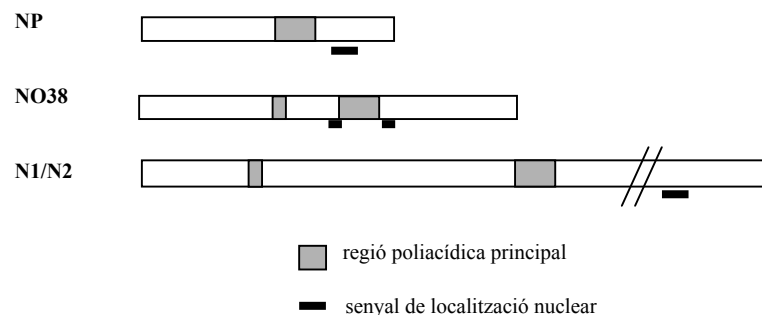


Fig. I.13 Xaperones nuclears. Es comparen tres xaperones nuclears de *Xenopus laevis*: la nucleoplasmina, la proteïna NO38 i la proteïna N1/N2, les quals tenen en comú la presència de regions acídiques i d'un sln. Figura adaptada de Dingwall i Laskey (1990).

La nucleoplasmina (Laskey et al., 1978) i la proteïna N1/N2 (Kleinschmidt et al., 1986) promouen les interaccions histona/histona, reduint la repulsió electrostàtica entre elles i minimitza la formació d'agregats inespecífics. D'altra banda, eviten les interaccions iòniques incorrectes entre les histones i el DNA. Tant la nucleoplasmina com la proteïna N1/N2 poden unir-se a les histones però no al DNA.

També dins la família de la nucleoplasmina s'inclouen les proteïnes de *Xenopus* pertanyents al grup de les nucleofosmines NO38 i les seves homòlogues (Schmidt-Zachmann et al., 1987; Chan et al., 1989), i la proteïna NO29 (Zirwes et al., 1997), que es troben en el component granular del nuclèol i participen en l'acoblament de ribosomes.

En mamífers, existeixen xaperones nuclears que participen en la remodelació de la cromatina durant la replicació: CAF-1 (*chromatin assembly factor*) (uneix histones H3 i H4) (Smith i Stillman, 1989), i NAP-1 (*nucleosome assembly protein*) (uneix histones H2A i H2B) (Ishimi i Kikuchi, 1991). També s'ha descrit la proteïna NPM3 (*mouse nucleophosmin/nucleoplasmin 3 protein*) en ratolins (MacArthur i Shackelford, 1997) i humans (Shackelford et al., 2001) que presenta homologia amb la NP i la nucleofosmina (NO38).

A *Drosophila* també s'han trobat proteïnes amb funció de xaperona, com la proteïna dNLP (CRP1) (*Drosophila nucleoplasmin-like protein*) (Ito et al., 1996; Crevel et al., 1997) i ASF-1 (*antisilencing function 1 protein*) (Munakata et al., 2000).

Les xaperonines i altres xaperones

Les xaperonines són una classe de xaperones presents en procariotes, mitocondris i plastidis. Dins d'aquesta família cal destacar la xaperonina 60 o GroEL i la xaperonina 10 o GroES, ambdues específiques d'*E. coli*. Aquestes proteïnes se solen trobar formant el complex GroEL/GroES (Chandrasekhar et al., 1986; Weber et al., 1998) que mediatitza el plegament correcte de proteïnes evitant la formació d'agregats.

El xoc tèrmic provoca la desnaturalització de les proteïnes i la formació d'agregats. Les *proteïnes de xoc per calor* (hsp) inhibeixen aquests processos, s'uneixen a les superfícies exposades a causa de les elevades temperatures. Mediatitzen processos tant d'acoblament com de desacoblament de proteïnes danyades com a resultat de l'estrès (revisat a Ellis i van der Vies, 1991).

Les xaperones moleculars tenen un paper important en els camps de la medicina i la biotecnologia. D'una banda, les proteïnes hsp estan implicades en algunes malalties neurodegeneratives i autoimmunes (Slavotinek i Biesecker, 2001) i alguns virus requereixen l'assistència de xaperones de l'hoste per poder replicar-se correctament. D'altra banda, la producció de proteïnes recombinants en bacteris es pot veure limitada per l'obtenció de proteïna insoluble. L'obtenció de proteïna recombinant es pot millorar mitjançant la coexpressió de les corresponents xaperones (revisat a Ellis, 1991).

5.2 Organització de la cromatina

5.2.1 Acoblament de nucleosomes

La formació de l'octàmer d'histones té lloc quan les histones s'uneixen al DNA, però aquest procés competeix amb un associació inespecífica entre ambdues molècules que en provoca la precipitació. La repulsió entre les histones es veu disminuïda per la presència d'elevada força iònica (2M NaCl) (Thomas i Butler, 1977) o per l'associació a polipèptids aniònics (Stein et al., 1979).

Existeixen diferents mètodes que permeten l'acoblament de nucleosomes *in vitro*. Es poden barrejar les histones i el DNA en condicions d'elevada força iònica i posteriorment mitjançant diàlisi gradual es va disminuint progressivament la força iònica. Amb aquesta aproximació s'afavoreix l'estabilització dels octàmers d'histones mitjançant la neutralització de les fortes interaccions electrostàtiques entre el DNA i les histones (Germond et al., 1975). L'acoblament de nucleosomes també es pot donar en condicions fisiològiques, però cal que les histones i el DNA es barregin de manera suficientment lenta per permetre una associació correcta (Ruiz-Carrillo et al., 1979). Una altra aproximació consistiria en la utilització d'extractes cel·lulars juntament amb el DNA i les histones en condicions fisiològiques. D'entre els extractes cel·lulars més utilitzats hi ha els provinents d'ous de *Xenopus* (Laskey et al., 1977), d'oòcits de *Xenopus* (Glikin et al., 1984) i d'embrions de *Drosophila* (Nelson et al., 1979). L'inconvenient d'aquests mètodes és la dificultat de determinar quins són els components implicats en una determinada funció.

L'any 1978 Laskey i col·laboradors (Laskey et al., 1978) en uns treballs amb el genoma del virus SV40, capaç de formar minicromosomes *in vitro*, van trobar el factor responsable de l'activitat acobladora de nucleosomes en extractes d'oòcits de *X. laevis*. Es tractava d'una proteïna termoestable, àcida i resistent a la tripsina: la nucleoplasmina. Ja en aquest treball es plantejava si l'activitat acobladora de nucleosomes trobada era un mecanisme universal o bé una adaptació a l'elevada taxa de replicació embriogènica a *X. laevis*.

Posteriorment, es van trobar altres factors capaços d'acoblar nucleosomes *in vitro* com l'àcid poliglutàmic (Stein et al., 1979), l'RNA (Nelson et al., 1981) i la proteïna HMG-1 (*high mobility group*) (Bonne-Andrea et al., 1984). Aquests polianions permeten la descondensació de la cromatina espermàtica i l'acoblament de nucleosomes, però tenen una eficiència molt menor a la de la nucleoplasmina

El nucli de *X. laevis* té una elevada capacitat d'emmagatzemar histones per permetre la ràpida formació de cromatina durant l'embriogènesi (Woodland i Adamson, 1977). Mitjançant diferents tècniques cromatogràfiques així com gradients de sacarosa es va trobar l'existència de dues proteïnes complexades amb histones no acoblades a síntesi de DNA. Per una banda la NP estava associada a les histones H2A i H2B (Kleinschmidt i Franke, 1982) i, per altra banda, les histones H3 i H4 formaven

complexos amb una altra proteïna que es va denominar N1/N2 (Bonner, 1975; De Robertis et al., 1978; Kleinschmidt i Franke, 1982).

La NP i la proteïna N1/N2 comparteixen característiques comunes tals com el fet de ser acídiques i termostables, però, a diferència de la NP que és pentamèrica, la proteïna N1/N2 seria constituïda per dos polipèptids d'un pes molecular aproximat de 105 kDa i 110 kDa, respectivament (Kleinschmidt et al., 1986). Ambdues proteïnes podrien tenir la funció de magatzem d'histones (Kleinschmidt et al., 1985; Kleinschmidt et al., 1990). Mitjançant estudis d'immunodepleció es va demostrar que, en extractes d'ous de *Xenopus*, tant el complex NP+H2A-H2B com el N1/N2+H3-H4 eren necessaris per a l'acoblament d'histones *in vitro* (Dilworth et al., 1987) (v. fig. I.14). Tot i que en altres estudis es va poder determinar que la NP era capaç d'unir els quatre tipus d'histones del nucli del nucleosoma *in vitro* (Laskey et al., 1978; Earnshaw et al., 1980).

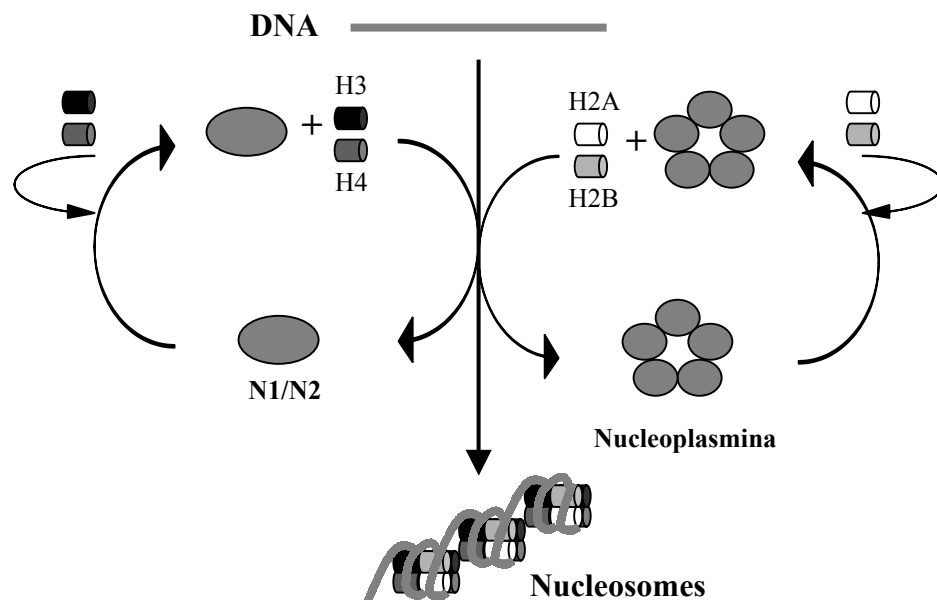


Fig. I.14 Acoblament de nucleosomes. La nucleoplasmina s'uneix a les histones H2A-H2B i la proteïna N1/N2 s'uneix a les histones H3-H4, la qual cosa facilita l'acoblament de nucleosomes. Figura adaptada de Dilworth et al. 1987.

L'ordre en la deposició d'histones als extractes de *Xenopus* no ha estat determinat, però sembla probable que sigui el mateix que per a les cèl·lules somàtiques, on primer es dipositen les histones H3 i H4, seguides de les histones H2A i H2B (Almouzni et al., 1990; Zucher i Worcel, 1990). No es va trobar presència d'histona H1 als extractes d'ous de *Xenopus*, la qual cosa es va associar amb el manteniment de la cromatina oberta, que facilitaria la ràpida replicació del DNA i l'accés de les molècules reguladores de la transcripció (Dilworth et al., 1987). Treballs posteriors van permetre identificar la presència de la histona espaciadora B4 (també

denominada H1X), menys bàsica que la corresponent histona somàtica H1 i que formaria complexos menys estables amb la cromatina (Nightingale et al., 1996).

Quant a la interacció establerta, alguns autors van postular que la nucleoplasmina uniria les histones a partir dels trams acídics principals de la molècula, és a dir la regió acídica A2 del monòmer (v. fig. I.10), actuant tots alhora com una mena d'*urpa de cinc dits* (Dingwall et al. 1987).

Recentment s'han presentat evidències que tant la NP recombinant com un mutant corresponent al nucli globular de la proteïna, sense el tram acídic principal A2, podien unir-se a octàmers d'histones *in vitro* (Dutta et al., 2001). Aquests autors van determinar l'estructura cristal·logràfica del nucli (*core*) de la NP en forma de decàmer i van proposar un model en el qual cinc octàmers d'histones s'unien a un decàmer de nucleoplasmina per la superfície lateral de la molècula (Dutta et al., 2001; Akey i Luger, 2003).

5.2.2 Remodelació de la cromatina espermàtica

La funció de la nucleoplasmina com a factor que promou la descondensació de la cromatina ja ha estat explicada a l'apartat corresponent a la remodelació de la cromatina espermàtica després de la fecundació en amfíbis (v. I.3.1).

Estudis recents han posat de manifest que tant la NP com un mutant corresponent al nucli globular de la mateixa, sense la cua C-terminal que inclou el tram acídic A2, són capaços de descondensar la cromatina espermàtica i extreure protamina del nucli espermàtic de *D. labrax*. Així mateix, es va poder establir que l'estequiometria de la interacció de la nucleoplasmina amb la protamina de *D. labrax* correspon a 2,5 mols de protamina per mol de pentàmer de nucleoplasmina. (Prieto, 2002; Prieto et al., 2002).

5.3 Transport nuclear

Va ser al voltant dels anys vuitanta quan es va descobrir que algunes proteïnes tenien un senyal específic que les dirigia cap al nucli, actualment anomenat senyal de localització nuclear (sln). El primer autor que va formular la hipòtesi d'un possible sln va ser De Robertis (De Robertis et al., 1978), hipòtesi que va ser confirmada amb diferents estudis realitzats amb una proteïna que tenia habilitat per acumular-se al nucli: la nucleoplasmina (Mills et al., 1980).

Van ser de gran importància els estudis fets per Dingwall et al. (1982), on es van obtenir diferents fragments de nucleoplasmina mitjançant proteòlisi amb tripsina i pepsina. Es va trobar que la nucleoplasmina tenia dues regions ben diferenciades: un nucli pentamèric resistent als enzims proteolítics i una cua C-terminal sensible a la proteòlisi. El nucli pentamèric (*core*) no era capaç d'entrar al nucli cel·lular, però si

s'hi microinjectava tenia la capacitat de quedar-hi retingut. La cua C-terminal era necessària i suficient per a l'entrada al nucli cel·lular. Així doncs, per primera vegada es va identificar un tram de proteïna que posseïa un senyal de localització nuclear (sln).

Posteriorment es van estudiar altres proteïnes amb capacitat per entrar a l'interior del nucli. Concretament la histona H1 presentava un extrem bàsic carboxil-terminal important per al seu transport nuclear (Dingwall i Allan, 1984). Una proteïna força estudiada en aquesta època va ser l'antigen T del virus SV40 (*Simian Virus 40*). Es va determinar que el seu senyal de localització nuclear tenia la seqüència: PKKKRKV i que la mutació en la Lys 128 (marcada en negreta) bloquejava l'entrada al nucli (Kalderon et al., 1984; Lanford i Butel, 1984).

A partir d'estudis amb complexos de nucleoplasmina i partícules d'or col·loïdal (Feldherr et al., 1984) es va mostrar que l'acumulació al nucli es feia a través dels porus nuclears. Altres estudis mostraven com proteïnes no nuclears complexades amb la NP, podien entrar a l'interior de nuclis de cèl·lules de mamífer gràcies al transport facilitat per la NP (Sugawa et al., 1985). També es va demostrar que el transport de la NP al nucli requeria energia en forma d'ATP (Newmeyer et al., 1986).

Els primers intents de mapatge de la regió corresponent a l'sln per a la nucleoplasmina van aconseguir mapar una regió (compresa entre la Gln 155 i el Glu 166 de la seqüència de Bürklin) necessària però no suficient per al transport (Bürklin i De Robertis, 1987). Finalment, es va atribuir l'sln a una regió de 16 aminoàcids flanquejada per dues Lys (Lys 155 i 170 segons el clon de Dingwall o Lys 145 i 160 segons el clon de Bürklin) (v. fig. I.10). Posteriors estudis van poder identificar que l'sln de la nucleoplasmina era bipartit (Robbins et al., 1991). Els sln bipartits estan constituïts per 2 aminoàcids bàsics seguits d'una regió espaïadora de 10 o més aminoàcids i un grup de 3-4 aminoàcids bàsics més (v. fig. I.15). S'ha trobat també un motiu sln bipartit en proteïnes de *Xenopus* funcionalment relacionades amb la nucleoplasmina, com la proteïna NO38 (Schmidt-Zachman et al., 1987), la proteïna N1/N2 (Kleinschmidt i Seiter, 1988) i també en altres proteïnes com ara receptors d'hormones esteroïdals, factors de transcripció, polimerases, topoisomereses i altres proteïnes nuclears (Dingwall i Laskey, 1991). Recentment s'ha descrit un tercer tipus d'sln, en aquest cas tripartit (Pokorska et al., 2000).

Es van trobar dos llocs susceptibles de fosforilació per cdc2 quinasa (amb motiu de reconeixement S/T-P-X-R/K) flanquejant l'sln de la nucleoplasmina i que podrien ser importants per modular el transport nuclear (Robbins et al., 1991). Estudis posteriors van permetre copurificar la NP i la caseïna quinasa II (CKII) (Vancurova et al., 1995) i van posar en evidència la interacció d'ambdues proteïnes. La NP estaria regulada per fosforilació i tindria 5 llocs potencialment fosforilables per aquesta quinasa (amb motiu de reconeixement S/T-X-X-E). S'ha demostrat que la NP defosforilada s'acumula més lentament al nucli. Compostos polibàsics com la poliLys o les mateixes histones són inhibidors de la CKII.

Alguns estudis han mostrat que el tram poliGlu A2, té una influència directa sobre el transport nuclear. Així, mutants per deleció del tram àcidic A2 però que conserven l'sln són ineficients per al transport a l'interior del nucli (Vancurova et al., 1997). Aquests autors plantegen com a possible hipòtesi la possibilitat que el tram

A2 fos essencial per mantenir l'sln en una determinada conformació que li permetés interaccionar amb proteïnes implicades en el transport nuclear; d'altra banda, el tram A2 podria interaccionar directament amb aquestes proteïnes.

SLN Monopartit	SV40 PKKKRKV
SLN Bipartit	NP KRpaatkkagqaKKKKI NO38 KRiapdsaskvpRKKtR N1/N2 KRkteesplkdKdaKK

Fig. I.15 Senyals de localització nuclear. Es mostra l'sln monopartit per l'antigen T del virus SV40 i els sln bipartits per la NP, NO38 i N1/N2.

Els estudis de la nucleoplasmina han estat de molta utilitat per al millor coneixement del porus nuclear. Akey (Akey,1990), mitjançant tècniques de microscòpia electrònica i la posterior reconstrucció d'imatges va proposar un model teòric del seu funcionament en forma de doble iris. Aquest autor va determinar que el porus nuclear tindria un diàmetre de 90 Å, tot i que està descrit que podria transportar molècules de fins a 200 Å (Feldherr et al., 1984). El transport podria ser bidireccional, cosa que permetria també la sortida de proteïnes cap al citoplasma.

Actualment es creu que hi hauria tres possibles mecanismes de transport nuclear: difusió lliure (per a molècules de menys de 50 kDa), difusió facilitada gràcies a proteïnes del porus, i entrada/sortida mediatitzada per proteïnes transportadores (Talcott i More, 1999). Recentment s'han descrit diferents proteïnes transportadores (importines) que podrien formar complexos amb proteïnes nuclears. S'han cristal·litzat complexos de l'sln tant de l'antigen T de SV40 (monopartit) com de la NP (bipartit) amb importines de llevats (Conti i Kuriyan, 2000) i de ratolí (Fontes et al., 2000).

5.4 Activació de la transcripció

La transcripció del DNA per donar lloc a l'RNA missatger és un procés complex que requereix un conjunt de factors tan basals com reguladors. Al nucli de les cèl·lules eucariotes aquest procés es complica a causa de l'existència dels nucleosomes que empaqueten el DNA i que poden constituir un obstacle per a l'avanç de l'RNA polimerasa.

El primer treball on es planteja una possible implicació de la NP en els processos de transcripció va ser dut a terme per Moreau (Moreau et al., 1986) a partir d'uns estudis d'immunolocalització amb la nucleoplasmina provinent de l'urodel *Pleurodeles waltii*. En aquest treball es va trobar nucleoplasmina als llaços actius en la transcripció dels cromosomes plomosos i associada a partícules de ribonucleoproteïna, malgrat que en treballs anteriors no s'havia trobat nucleoplasmina associada a aquest tipus d'estructures (Khroné i Franke, 1980a, 1980b; Mills et al., 1980).

Estudis de transport nuclear han permès observar l'acumulació de nucleoplasmina en àrees específiques del còrtex nucleolar. Aquests resultats podrien indicar una possible implicació de la NP en la transcripció de precursors ribosomals (Andrade et al., 2001).

Alguns autors defensen la hipòtesi que no caldria la dissociació dels nucleosomes per permetre la transcripció (Kornberg i Lorch, 1991). De totes maneres, durant la transcripció s'alterarien les interaccions entre el DNA i les histones (Clark i Fenselfeld, 1992), i es podria mantenir l'octàmer intacte (O'Neill et al., 1993), o bé s'alterarien els contactes que es donen entre histona i histona (Weintraub et al., 1976; van Holde, 1992) per permetre l'accessibilitat i el correcte funcionament del complex multiproteic que constitueix l'RNA polimerasa.

Altres autors defensen la idea que caldria la dissociació del nucleosoma per permetre la transcripció ja que els nucleosomes serien obstacles tant per l'inici com pel transcurs de la transcripció. En aquesta mateixa línia es van realitzar una sèrie d'estudis amb la nucleoplasmina per tal de determinar si tindria algun paper en el desplaçament de les histones nucleosòmiques durant la transcripció. Aquests estudis, malgrat que van ser desenvolupats en sistemes heteròlegs, van permetre plantejar un model en el qual la presència de NP estimularia la unió dels factors de transcripció com GAL4-AH, USF i Sp1 als nuclis dels nucleosomes *in vitro* i seria l'encarregada d'extreure les histones H2A i H2B (Chen et al., 1994). D'aquesta manera s'afavoriria la desestructuració dels nucleosomes i l'exposició de regions determinades del DNA on podria activar-se la transcripció. Altres estudis també van donar resultats similars amb la proteïna *NP-like* NAP-1 (Walter et al., 1995).

No obstant això, s'han presentat alguns estudis on es mostra que la nucleoplasmina no tindria cap paper en l'activació de la transcripció. Concretament Ausió i col·laboradors (Howe et al., 1998) van utilitzar un sistema homòleg per tal de determinar si la nucleoplasmina de *X. laevis* podria facilitar la unió del factor de transcripció TFIIA al gen 5S rRNA de *X. laevis*. Aquests autors van poder observar que la nucleoplasmina no facilitava ni la unió del TFIIA de al DNA nucleosòmic, ni la transcripció del gen 5S rRNA.

En resum, a partir dels diferents treballs, podem dir que no queda clar si la nucleoplasmina tindria algun paper durant l'inici de la transcripció a *X. laevis*.

6. PROTEÏNES NUCLEOPLASMIN-LIKE

Els ous de *X. laevis* es caracteritzen pel fet de tenir una taxa de divisió molt elevada i perquè acumulen grans quantitats d'histones (Woodland i Adamson, 1979). A partir del descobriment i caracterització de la nucleoplasmina (Laskey et al., 1978) es va plantejar si la funció d'aquesta proteïna era una adaptació a l'elevada taxa de replicació després de la fecundació a *X. laevis*, o bé si es tractava d'un mecanisme universal d'acoblament de nucleosomes. Aquest plantejament va despertar l'interès per buscar proteïnes funcionalment relacionades amb la nucleoplasmina. Les proteïnes amb característiques i funcions similars a la NP se les denomina proteïnes *nucleoplasmin-like* (*NP-like*).

Hem dividit aquestes proteïnes segons la seva presència en els vertebrats o els invertebrats (mol·luscs, insectes i equinoderms).

6.1 Proteïnes *NP-like* a vertebrats

Als anys vuitanta, Khroné i Franke (Khroné i Franke; 1980a i 1980b) van fer un seguit d'estudis d'immunolocalització i immunoprecipitació mitjançant anticossos policlonals contra la proteïna majoritària del nucli dels oòcits de *Xenopus laevis* (que van determinar per SDS-PAGE com a una proteïna de 30 kDa de pes molecular). Els anticossos obtinguts van reaccionar amb proteïnes presents al nucli d'oòcits de diferents espècies d'amfibis, entre els quals hi hauria tant anurs (*Bufo bufo*, *Bombina variegata*, *Rana pipiens*, *R. esculenta*) com urodels (*Pleurodeles waltii*, *Triturus cristatus* i *T. alpestris*), i també amb d'altres espècies de vertebrats, com aus (pollastre) i mamífers (rata, ratolí i home). Els resultats que van obtenir semblaven indicar que la nucleoplasmina s'hauria conservat durant l'evolució dels vertebrats. La gran quantitat d'estudis que s'han desenvolupat fins avui, però, semblen indicar que la nucleoplasmina seria més una especialització que no pas un factor universal.

Els assajos fets per Khroné i Franke amb cèl·lules somàtiques van donar reactivitat amb diferents tipus cel·lulars, però no hi va haver reacció ni amb eritròcits ni amb espermàtides, que són cèl·lules inactives des del punt de vista transcripcional. Aquests resultats semblaven indicar que la NP podria tenir alguna activitat en la transcripció. També van observar que la nucleoplasmina es trobava al citoplasma en determinats estadis del cicle cel·lular com la mitosi, però tenia una gran facilitat per entrar al nucli en fases posteriors.

A partir d'una línia cel·lular de ronyó de *Xenopus* es va poder aïllar una proteïna somàtica anomenada nucleoplasmina S (amb característiques físico-químiques i funcionals molt similars a la NP d'oòcits) (Cotten i Chalkley, 1987). La nucleoplasmina S és una proteïna àcida, fosforilable i oligomèrica, amb funcióacobladora de cromatina *in vitro* i que és reconeguda per anticossos anti-NP. Aquesta proteïna va poder ser immunolocalitzada en diferents cèl·lules somàtiques d'altres espècies com: pollastre (embrió), vedella (timus) i rata (fetge). La NP S no ha estat

encara seqüenciada, fet que posa en dubte que es tracti d'una autèntica *NP-like* somàtica.

Nucleofosmines i altres proteïnes relacionades

Mitjançant anticossos policlonals d'extractes d'oòcits de *Xenopus*, es va poder identificar una proteïna de 38 kDa que s'anomenà NO38 (Schmidt-Zachman et al., 1987). Aquesta proteïna presentava característiques similars a la nucleoplasmina, tals com el fet de ser àcida, fosforilable, i oligomèrica i tenir un senyal de localització nuclear bipartit. Estaria ubicada al nuclèol i podria tenir funcions relacionades amb l'acoblament de ribonucleoproteïnes. Així doncs, la proteïna es va poder aïllar juntament amb partícules pre-ribosomals mitjançant gradients de sacarosa. La proteïna NO38 també es va trobar en pollastre (Borer et al., 1989) i ratolí (Schmidt-Zachman i Franke, 1988). Altres denominacions de la proteïna NO38 són: proteïna B23, nucleofosmina i numatrina.

La proteïna NO38 seria homòloga a la proteïna hB23 o nucleofosmina humana (Chan et al., 1989), clonada en cèl·lules HeLa per Okuwaki et al. (2001), capaç d'unir histones nucleosòmiques amb preferència per les histones H3 i H4. La proteïna B23 és un oligòmer que estaria implicat en els canvis estructurals de la cromatina, regulant els processos de replicació i transcripció a la regió de DNA nucleosòmic i en el manteniment de l'estructura nucleolar. Recentment han aparegut un bon nombre de treballs relacionats amb la proteïna B23 que mostren la seva implicació en processos de proliferació i regulació del cicle cel·lular (Zeller et al., 2001; Takemura et al., 2002; Dergunova et al., 2002; Tarapore et al., 2002).

També es va identificar i clonar una altra proteïna nucleolar anomenada NO29 (Zirwes et al., 1997), localitzada al nuclèol d'oòcits de *X. laevis* i algunes cèl·lules somàtiques i relacionada amb la NP i la NO38. Aquesta proteïna, igual que NO38, tindria funcions relacionades amb l'acoblament de ribosomes. Recentment s'ha trobat en cèl·lules humanes una proteïna àcida i termoestable amb característiques similars a la NP i les proteïnes NO38 i NO29, anomenada hNPM3 (Shackelford et al., 2001), que va ser inicialment identificada en ratolí (MacArthur i Shackelford, 1997).

Altres proteïnes *NP-like* a mamífers

Estudis en cèl·lules somàtiques de mamífers van permetre detectar una proteïna de 53 kDa que posteriorment seria identificada com a proteïna NAP-1 (*nucleosome assembly protein*) (Ishimi et al., 1984; Ishimi et al., 1987) i de la qual s'han trobat homòlegs en llevat (Ishimi i Kikuchi, 1991), mosca del vinagre *Drosophila* (Ito et al., 1996) i humans (Simon et al., 1994). Mitjançant experiments de sedimentació en gradients de sacarosa, es va determinar que la proteïna NAP-1 era capaç de formar un complex amb els quatre tipus d'histones nucleosòmiques però s'unia preferentment a les histones H2A i H2B i en presència de DNA facilitava la formació de nucleosomes *in vitro* (Ishimi et al., 1984). La proteïna NAP-1 presenta 3 trams àcids, el més llarg dels quals es va veure que no era imprescindible per a l'acoblament de nucleosomes (Fuji-Nakata et al., 1992). Diferents resultats indicaven que la proteïna NAP-1 seria

multimèrica (probablement un dímer o un trímer). Aquesta proteïna estava relacionada amb la NP de *Xenopus* per la seva funcionalitat, però tenia característiques fisicoquímiques diferenciades. Recentment s'ha determinat que NAP-1 està implicada en el transport nuclear de les histones H2A i H2B (Mosammaparast et al., 2002).

Dins les proteïnes amb funcions semblants a la nucleoplasmina descrites en mamífers, una de les més importants ha estat la proteïna CAF-1 (*chromatin assembly factor*), inicialment identificada en nuclis de cèl·lules humanes (Smith i Stillman, 1989). Es troba amb molta menys quantitat que la NP de *Xenopus* i només representa el 0,1% de les proteïnes nuclears. Aquesta proteïna va ser inicialment identificada per Stillman (1986) durant uns estudis de replicació del virus SV40, on CAF-1 promovia l'acoblament de cromatina i facilitava la deposició d'histones H3 i H4 de nova síntesi sobre el DNA, en un procés acoblat a la replicació. La proteïna CAF-1 es troba constituint un complex proteic amb diferents subunitats (p150, p60 i p48). S'ha aïllat el cDNA per a les subunitats p150 i p60 (Kaufman et al., 1995) i p48 (Verreault et al., 1996).

Proteïna N1/N2

La proteïna N1/N2 de *X. laevis* (Kleinschmidt et al., 1986) està relacionada amb la nucleoplasmina pel fet de compartir característiques comunes amb aquesta, com el fet de ser àcida, tenir capacitat d'unir histones i presentar un senyal de localització nuclear. Malgrat aquestes característiques, la seqüència entre la NP i la proteïna N1/N2 no presenta un percentatge elevat d'homologia.

6.2 Proteïnes NP-like a invertebrats

Mol·luscs

En els mol·luscs, concretament a la cloïssa *Spisula solidissima*, es va aïllar una proteïna de 49 kDa, termoestable, àcida, resistent al 80% de saturació amb sulfat amònic, i que podia formar multímers (Herlands i Maul, 1994). Al músculo *Mytilus californianus* es va aïllar una proteïna similar de 58 kDa, àcida, termoestable i que descondensava cromatina espermàtica de *Mytilus* (Rice et al., 1995).

Insectes

En insectes, els primers estudis amb extractes d'embrions de *Drosophila* van permetre detectar l'existència d'una activitat remodeladora de la cromatina, però no es va poder aïllar cap proteïna responsable d'aquesta funció (Nelson et al., 1979). Posteriorment, se'n va poder aïllar una proteïna relacionada amb la nucleoplasmina

anomenada proteïna CRP-1 (*chromatin remodeling protein*), inicialment identificada per Ito et al. (1996), com a dNLP (*Drosophila nucleoplasmin-like protein*), i que va ser clonada per Crevel et al. (1997). Estudis per microscòpia electrònica van mostrar que aquesta proteïna presentava una estructura similar a la de la nucleoplasmina de *X. laevis*. Aquesta proteïna es troba durant tot el desenvolupament de *Drosophila* però sobretot durant l'oogènesi i facilita l'acoblament de nucleosomes *in vitro*. dNLP presenta un 22% d'homologia amb la NP i un 15% d'homologia amb la proteïna NO38. Recentment, s'ha pogut obtenir l'estructura cristal·logràfica de la regió nucli (*core*) de la proteïna dNLP en forma de pentàmer similar a l'obtingut per a la regió nucli (*core*) de la NP de *X. laevis* (Namboodiri et al., 2003) (v. fig. I.16).

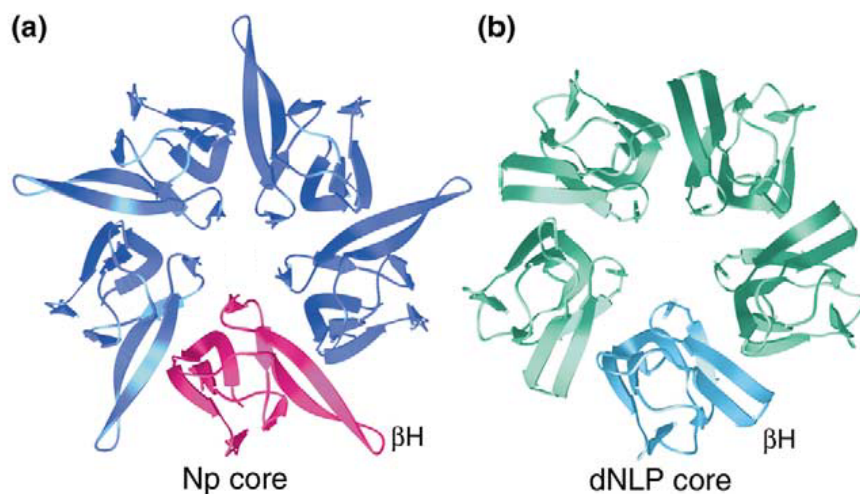


Fig. I.16 Comparació de l'estructura dels pentàmers de la NP i dNLP. Es compara l'estructura cristal·logràfica dels pentàmers de la regió nucli (*core*) de la NP de *X. laevis* (a) i la dNLP de *Drosophila* (b); β H forqueta beta. Figura adaptada d'Akey i Luger (2003).

També a *Drosophila*, es va trobar una proteïna homòloga a CAF-1 humana que, igual que la de mamífer, també podiaacoblar cromatina en el DNA de nova síntesi durant la replicació (Kamakaka et al., 1996). Una altra proteïna identificada ha estat ASF-1 (*anti-silencing factor*) a *Drosophila* i humans (Munakata et al., 2000; Tyler et al., 2001) amb activitat de xaperona i capacitat d'unir histones.

Equinoderms

En equinoderms, un bon nombre d'estudis detallats sobre la remodelació del nucli espermàtic als eriçons de mar, duts a terme pel grup de Poccia i col·laboradors, no han revelat l'existència de cap proteïna *NP-like* en extractes d'oòcits ni tampoc cap activitat descondensadora de la cromatina (Stephens et al., 2002). En el cas dels extractes termoestables d'oòcits d'*Holothuria tubulosa* s'ha detectat una activitat

descondensadora de nuclis espermàtics de la mateixa espècie (del Valle, 1999; del Valle et al., 2003). S'ha purificat posteriorment una proteïna àcida que mediatitza l'extracció de proteïna ϕ_0 i que s'anomena PR ϕ_0 . L'extracció de ϕ_0 és suficient per promoure la descondensació de la cromatina espermàtica a *H. tubulosa*. La proteïna PR ϕ_0 a diferència de la NP de *X. laevis* no és soluble al 55% de saturació amb sulfat amònic, té un pes molecular major que la NP i no és immunodetectada per anticossos anti-nucleoplasmina.

Altres autors han descrit la presència d'una proteïna àcida a l'eriçó de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, denominada p62, la qual s'expressa als ous i embrions primerencs i que s'ha relacionat amb processos mitòtics (Ye i Sloboda, 1997). De la seqüència d'aquesta proteïna es desprèn una certa similitud amb la nucleoplasmina i sobretot amb les nucleofosmines (v. fig. I.12).

A l'estrella de mar *Asterina pectinifera* es va descriure la proteïna ANO39 (Nakajima et al., 2000). Es tracta d'una proteïna nucleolar que es fosforila durant la meiosi i és present durant la maduració dels oòcits i les primeres etapes embriogèniques. La seva seqüència també presenta similitud amb la nucleoplasmina i les nucleofosmines (v. fig. I.12).

7. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS DE LA TESI

Una de les línies d'estudi més arrelades al nostre laboratori és la caracterització bioquímica i estructural de les protamines, proteïnes que condensen el DNA al nucli espermàtic. No obstant això, tot i que s'han dut a terme molts estudis provant diferents tipus de molècules com a contraions, no s'ha aconseguit la cristal·lització de cap protamina.

En els darrers anys, i relacionat amb la línia anterior, s'ha iniciat l'estudi de la nucleoplasmina (NP) de *Xenopus laevis*, proteïna implicada en la remodelació de la cromatina espermàtica que es dona després de la fecundació. Així, en treballs anteriors es va posar a punt l'obtenció de NP recombinant (r-NP) i es va iniciar la caracterització de diferents mutants d'aquesta. En paral·lel, s'han realitzat al nostre laboratori diferents estudis sobre la possible presència de proteïnes similars a la nucleoplasmina (proteïnes *NP-like*) en diverses espècies. En aquest sentit, cal destacar els treballs fets amb l'holoturoïdeu *Holothuria tubulosa* (equinoderm), on s'ha trobat una proteïna capaç d'extreure la proteïna espermàtica específica ϕ_0 i de provocar la descondensació de l'espermatozoide d'aquesta espècie.

Dins d'aquest marc, els objectius que s'han plantejat per aquesta tesi doctoral han estat els següents:

A) Caracterització bioquímica i estructural de nucleoplasmines recombinants

Amb aquesta finalitat s'ha continuat l'estudi dels diferents mutants de la NP de què disposem. Els aspectes concrets que es van plantejar van ser:

- estudi de l'estabilitat de la molècula en diferents condicions
- estudi de les Cys de la nucleoplasmina
- estudis de l'estructura tridimensional de la molècula

B) Caracterització de les interaccions de la NP amb histones

Estàvem especialment interessats a veure si la interacció NP-histones era fonamentalment de tipus electrostàtic, com s'havia pressuposat tradicionalment, o bé, tal i com semblaven indicar els experiments previs amb protamines, si podria tractar-se d'algun altre tipus d'interacció. Els objectius concrets que es van plantejar van ser els següents:

- Determinació de la importància del tram acídic A2 de la NP en la interacció amb histones.
- Determinació de la importància de les cues bàsiques de les histones en la unió amb la NP.
- Esbrinar l'estequiometria del complex NP-histones.

C) Determinació de la presència d'una possible NP-like a l'oòcit de l'estrella de mar Echinaster sepositus.

Es va proposar aplicar els mètodes clàssics d'obtenció i caracterització de nucleoplasmina al cas concret dels oòcits d'*E. sepositus*. D'altra banda, es va proposar l'obtenció d'anticossos policlonals antinucleoplasmina en ous de gallina per tal d'utilitzar-los en la cerca de proteïnes *NP-like*.

D) Estudi estructural de la proteïna ϕ_0 .

Un darrer objectiu del treball va ser intentar cristal·litzar la proteïna ϕ_0 específica del nucli espermàtic de l'equinoderm *Holothuria tubulosa*, que presenta propietats intermèdies entre les protamines i les histones. La cristal·lització d'una molècula d'aquestes característiques aportaria informació sobre l'estructura de les proteïnes que participen en la compactació de la cromatina i podria obrir un nou camí per a la cristal·lització de les protamines i dels complexos NP-protamina.