

# **I.- Introducción**



## I.- Introducción.

### 1.- Fertilización: Consideraciones generales.

Los aspectos estructurales y funcionales del proceso de fertilización son continuamente ampliados; así, ninguna revisión en el tema es y será lo suficientemente extensa para abarcar la enorme productividad e información conseguida al respecto y que abarca:

- i) La calidad paradigmática de los gametos en si mismos.
- ii) La aplicación de tecnologías de la Biología Celular y Molecular en el estudio de los gametos.
- iii) La comprensión de los procesos de fertilización que se retroalimentan con los conocimientos en la concepción y contracepción.
- iv) El desarrollo de metodologías de fertilización *in-vitro* en humanos y otros mamíferos.
- v) La mejora de animales y plantas, especialmente de interés económico.

Cuando el espermatozoide y el ovocito maduro (huevo u óvulo) (-sin olvidar que se tratan de células especializadas-) se "combinan" para generar un nuevo organismo, conciertan una serie de cambios por medio de mecanismos celulares y moleculares -interactivos entre ellos-, los cuales culminan con éxito en un nuevo organismo o individuo. Todo este proceso constituye la biología celular y molecular de la fertilización.

La interacción del espermatozoide con el huevo involucra una serie de transformaciones nucleares y citoplasmáticas de ambos gametos. Estas transformaciones constituyen el proceso de fertilización, el cual se inicia con la interacción y subsecuente fusión de los gametos y culmina con la asociación de los correspondientes cromosomas derivados de los dos pronúcleos (uno de origen materno y el otro paterno). Así, los aspectos esenciales de la fertilización pueden ser agrupados en los siguientes puntos:

- i) La activación del huevo y el espermatozoide, involucran una serie de eventos, que alteran el metabolismo de ambos gametos.
- ii) La asociación de genomas (paterno y materno), que genera una herencia biparental.
- iii) El clivaje y diferenciación del huevo fertilizado o cigote.

Este modelo de reproducción sexual emerge durante la evolución biológica y es mantenido en la mayoría de metazoos, y evolutivamente, ofrece una tasa de adaptación acelerada y una disminución en la acumulación de mutaciones delétereas en un medio ambiente cambiante. El proceso de restauración del número diploide de los cromosomas durante la fertilización, fortalece la variación genética iniciada en la meiosis de la línea germinal y que finaliza con la producción de los gametos.

La reproducción por el tamaño y tipo de gametos se clasifica en:

- i) **Isogamia:** los gametos son de tamaño y estructura similar. Por ejemplo, algunos protozoos en particular.
- ii) **Heterogamia:** los gametos son de tamaño y estructura diferentes. Ejemplo, ocurre en la mayoría de animales. El dimorfismo de los gametos obedece a una presión de selección. Los gametos pequeños tienen la ventaja de ser producidos en mayor número (es el caso de los espermatozoides), mientras que los gametos grandes son seleccionados por su alta viabilidad (el caso de los ovocitos).

Alternativamente, a la reproducción sexual, la reproducción asexual tiene mecanismos

únicos para perpetuar las especies; algunos ejemplos son:

- Algunos géneros de lagartijas hembras se reproducen por partenogénesis.
- Las hembras de algunos peces se reproducen por ginogénesis. Ejemplo, el espermatozoide de un macho simpátrico activa el huevo pero no contribuye al genoma del embrión.
- En la hibridogénesis, el huevo de algunos peces y anuros eliminan un genoma entero, el cual es recuperado en la fertilización por el espermatozoide de una especie simpátrica.

La investigación en fertilización se realiza con preferencia en algunas especies (modelos), entre ellas, los invertebrados y particularmente los equinodermos, moluscos y ascidias, y algunos vertebrados no mamíferos como peces y anfibios son continuamente estudiados. La "popularidad" de estos modelos incluye su capacidad y requerimientos mínimos para ser mantenidos en el laboratorio, y porque ambos sexos ofrecen gran cantidad de gametos, que pueden fertilizar *in-vitro* y desarrollar de forma sincronizada permitiendo la aplicación de tecnologías para el análisis de algunos procesos específicos de la fertilización. De hecho, la investigación de la fertilización en los invertebrados ha generado claves y rutas para el avance en el conocimiento de la fertilización en mamíferos, ya que en estos el número de huevos que se consigue es reducido y la fertilización ocurre en forma interna.

En resumen, los cambios metabólicos y morfológicos de los gametos que ocurren durante la fertilización, pueden ser considerados en dos etapas:

- i) La interacción inicial y activación de los gametos.
- ii) Los eventos que son consecuencia de lo anterior, y que involucra el desarrollo y asociación de los pronúcleos, que eventualmente finaliza en el clivaje.

## **2.- Desarrollo del pronúcleo masculino.**

El pronúcleo masculino se forma en el citoplasma del huevo bajo tres procesos que son comunes a todas las especies estudiadas. Estos procesos involucran dramáticas transformaciones en la forma, volumen, conformación de la cromatina, contenido núcleoproteico, y actividad del núcleo incorporado. Los procesos son:

- i) Ruptura de la envoltura nuclear del espermatozoide.
- ii) Dispersión de la cromatina altamente condensada del núcleo del espermatozoide.
- iii) Formación de la envoltura nuclear del pronúcleo masculino.

En esta sección se describe en forma breve estos tres procesos con énfasis en su nivel morfológico, y en las secciones siguientes de esta introducción se describen aspectos bioquímicos relacionados al desarrollo del pronúcleo masculino.

### **2.1.- Ruptura de la membrana nuclear del espermatozoide.**

Cuando el espermatozoide penetra el huevo, el núcleo espermático entra en contacto directo con el citoplasma del huevo. Inmediatamente producida esta situación, las láminas interna y externa de la envoltura nuclear se fusionan en múltiples sitios y forman vesículas que inicialmente se mantienen adheridas a la cromatina espermática, pero luego se disgregan o esparcen en el

citoplasma de su entorno. Así, la cromatina es directamente expuesta al citoplasma del ovocito (Longo, 1973). La ruptura de la membrana puede no ser completa, y estas regiones remanentes de membrana pueden ser reincorporadas en la envoltura del pronúcleo, el ejemplo mejor estudiado es el erizo de mar *Arbacia* (Longo, 1973; Yanagimachi & Noda, 1970a). La envoltura del pronúcleo femenino no sufre estas modificaciones, por lo cual se piensa que este proceso es específicamente dirigido a la membrana del núcleo espermático.

Los ovocitos inmaduros de ratón y conejo son incapaces de producir ruptura de la membrana nuclear espermática (Berrios & Bedford, 1976; Szöllösi et al., 1990). Sugiriendo que el factor responsable de este proceso debe ser formado o activado durante la maduración y/o activación del ovocito; sin embargo, esto no puede ser generalizado a los mamíferos puesto que la membrana nuclear espermática sufre ruptura en el ovocito inmaduro de hamster y bovino (Yanagimachi, 1994).

Los factores que regulan la desaparición de la membrana del núcleo espermático no han sido identificados; sin embargo, se piensa que ellos podrían ser similares a los que producen la desaparición de la membrana nuclear durante la mitosis, o los que producen la ruptura de la vesícula germinal (núcleo) del ovocito. Un factor citoplasmático de ovocitos maduros de anfibios al ser inyectado en ovocitos inmaduros produce ruptura de la vesícula germinal (Masui & Clarke, 1979). Esta actividad se pierde después de la fertilización, pero reaparece con los clivajes (Wasserman & Smith, 1978). Lo cual sugiere que este factor, no sólo se restringe a la maduración del ovocito, sino que tendría un rol más general en la ruptura de la envoltura nuclear.

La desaparición de la membrana nuclear en la profase de la mitosis ocurre con fosforilación de las lamininas y otras proteínas de los filamentos intermedios (Gerace & Burke, 1988), aunque la envoltura puede fragmentarse sin que ocurra una total desaparición de la laminina (Heald & McKeon, 1990). El espermatozoide de *Xenopus* posee una laminina específica,  $L_v$  (Benavente & Krohne, 1985). En erizo de mar se ha reconocido lamininas nucleares A/C y B con sueros autoinmunes humanos (Schatten et al., 1985). Longo et al. (1987) no encontró lamininas en el espermatozoide humano, pero con adecuadas condiciones de preparación y fijación, el espermatozoide humano presenta una matriz nuclear (Bellvé et al., 1992), y lamininas nucleares (Maul et al., 1986; Moss et al., 1987; McPherson & Longo, 1993). El rol de las lamininas en la desaparición de la envoltura nuclear del espermatozoide es un tópico sin resolver.

El espermatozoide intacto de erizo de mar inyectado a un huevo mantiene sus membranas intactas y no dispersa su cromatina, y no forma pronúcleo (Hiramoto, 1962; ver Longo, 1997). Éste hecho puede ser debido a la integridad de la membrana plasmática y nuclear del espermatozoide, y podría funcionar como una barrera que impide el acceso de factores citoplasmáticos del huevo al núcleo espermático. Estas observaciones son similares a las obtenidas con espermatozoides de erizo cuando se inseminan ovocitos inmaduros (Longo, 1978).

La formación del pronúcleo masculino también ocurre en peces ginogenéticos, y también tiene como requisito la ruptura de la envoltura nuclear espermática (Yamashita et al., 1990). El huevo debe contener un factor de ruptura de la membrana nuclear espermática, éste factor es activado sólo durante la fertilización homóloga.

En humano, con la técnica del ICSI ("intracytoplasmic sperm injection") se indica que la ruptura de la membrana nuclear espermática no es requerida para la descondensación, la calidad de membrana nuclear del espermatozoide humano sería única en su clase (Lanzendorf et al., 1988; Palermo et al., 1992, 1993).

## 2.2.- Dispersión de la cromatina espermática.

Con algunas pocas excepciones (por ejemplo, los crustáceos decápodos) la cromatina del espermatozoide se encuentra altamente condensada o compactada. Se han sugerido varias razones de la estructuración de la cromatina en forma condensada en el espermatozoide, pero todas ellas siempre son deficientes de alguna u otra forma (Risley, 1990):

- i) La cromatina condensada confiere una forma hidrodinámica adecuada en algunos espermatozoides; sin embargo, la forma de los espermatozoides en mamíferos es deficiente para la natación.
- ii) La condensación protege al DNA de agentes mutagénicos; pero esta protección es relativamente débil.
- iii) La condensación es una forma o manifestación de un estado genético inactivo; sin embargo, existe evidencia de un "imprinting" (Groudine & Conkin, 1985).
- iv) La condensación del núcleo es un proceso necesario e indispensable para que haya anisogamia.

La descondensación es una alteración dramática que ocurre por transformación de la cromatina altamente condensada hacia una forma de cromatina dispersa en el pronúcleo masculino. Morfológicamente, estos cambios ocurren inicialmente en la periferia y gradualmente progresan hacia el centro del núcleo espermático. Una interpretación de este patrón morfológico es que los agentes responsables de la dispersión inician el proceso en la periferia (Longo, 1997).

En algunos casos, la dispersión de la cromatina se produce simultáneamente y en forma uniforme en todo el núcleo espermático, sin formar regiones de diferentes densidades y conformaciones. Como resultado de ésta dispersión de la cromatina espermática, el núcleo incrementa su volumen significativamente.

Durante el desarrollo del pronúcleo masculino, y antes de la fusión de los pronúcleos (femenino y masculino) deben ocurrir cambios bioquímicos en la cromatina espermática relacionados con la expansión. El espermatozoide de *Arbacia* expuesto al "egg-jelly" experimenta fosforilación de la histona H3, esto también ocurre con el espermatozoide de *Strongylocentrotus*, pero sobre la histona H1 (Vacquier et al., 1989). El "egg-jelly" induce degradación de histonas en espermatozoides de estrella de mar (Amano et al., 1992). Un producto derivado de la cubierta de jelly llamado ARIS es un potente inductor de la reacción acrosómica (Ikadai & Hoshi, 1981) y produce cambios estructurales en el núcleo espermático (Longo et al., 1995) que quizás sería manifestación de la degradación de las histonas demostrado por Amano et al. (1992).

El patrón de dispersión de la cromatina parece ser restringido a la estructura (forma) inicial del espermatozoide. En *Arbacia* ocurre una retención de la envoltura nuclear en la región apical y basal, y la dispersión es lateral, el núcleo descondensado adquiere una forma de "corazón", hasta que la nueva envoltura nuclear forma el pronúcleo en forma esférica (Longo, 1973). En los mamíferos la cromatina se dispersa con un pérfil elipsoidal y recuerda la forma del núcleo original.

La dispersión de la cromatina en mamíferos debe ocurrir bajo gobierno de fuerzas opuestas a la condensación durante la espermatogénesis (Szöllösi & Ris, 1961; Bedford, 1970). De aquí se puede suponer que la fertilización (formación del pronúcleo masculino) es un proceso reverso a la espermatogénesis. Sin embargo, las evidencias morfológicas y bioquímicas indican que esta suposición no es cierta.

La dispersión de la cromatina con extractos de huevo (ver más adelante) sugieren que el proceso ocurre en dos etapas (Lohka & Maller, 1985; Philpott et al., 1991):

- i) Una descondensación rápida y limitada, y
- ii) Una segunda descondensación lenta y dependiente de membrana.

La descondensación del núcleo espermático es en algunos casos independiente de la formación del pronúcleo femenino, de la síntesis de DNA nuclear y mitocondrial, y de síntesis de proteínas (Poccia, 1989). Durante la diferenciación de la espermatogonia hacia el espermatozoide, las histonas somáticas son remplazadas por proteínas nucleares más básicas. Existe la generalización que estos complejos de DNA con proteínas muy básicas permiten la condensación de la cromatina y represión del DNA (Bloch, 1969). Así, la descondensación de la cromatina es una manifestación morfológica de cambios en el contenido de las núcleo-proteínas. Sin embargo, el análisis del pronúcleo es difícil por su purificación debido a la alta tasa citoplasma/núcleo característica del cigote, y que interfiere durante su purificación.

El núcleo espermático en su metamorfosis hacia pronúcleo masculino citoquímicamente evidencia diferencias en la tinción de su cromatina, esto se explica por la adquisición de diferentes núcleo-proteínas básicas durante la descondensación (Bloch & Hew, 1960; Das et al., 1975). La demostración que las proteínas nucleares básicas del espermatozoide son removidas durante la formación del pronúcleo fue demostrada por autoradiografía con experimentos *in-situ*, donde se observó que conforme al avance del núcleo espermático hacia pronúcleo, la marca (granos) autoradiográfica se pierde (Ecklund & Levine, 1975). De forma similar, anticuerpos contra las proteínas básicas de ratón no reconocen lugares antigénicos en el huevo fertilizado (Rodman et al., 1981).

Estudios bioquímicos indican que las proteínas básicas del espermatozoide se pierden y el DNA se asocia con proteínas similares a las que se encuentran en el pronúcleo femenino (Carroll & Ozaki, 1979; Poccia et al., 1981; Poccia, 1989; Poccia & Green, 1992), y que esta transformación ocurra en ausencia de síntesis de proteínas significa que el huevo debe contener los componentes necesarios para la modificación, remoción y reemplazo (recambio) de las núcleo-proteínas espermáticas (Poccia, 1989; Poccia & Green, 1992).

Inmediatamente a la incorporación del núcleo espermático, las histonas H1 y H2B son fosforiladas (Poccia, 1986). En la descondensación toda la histona H1 espermática es fosforilada y recambiada por una variante de H1 (CSH1, "cleavage stage histone H1") (Green & Poccia, 1985). La fosforilación de la histona H2B espermática es más lenta, pero paulatinamente es recambiada por CSH2B. Lo propuesto es que, en la cromatina espermática las histonas H1 y H2B a través de sus extremos extendidos pueden estabilizar y condensar la cromatina espermática mediante la formación de entrecruzamientos entre las fibras de cromatina (Poccia, 1989). Durante la fertilización, la fosforilación puede neutralizar los extremos de las histonas H1 y H2B, y disminuir su afinidad al DNA. Sin embargo, puede ocurrir descondensación sin fosforilación; así, la fosforilación es sólo permisible a la descondensación (Poccia et al., 1990). Durante la espermatogénesis, las formas fosforiladas de las variantes específicas del espermatozoide aparecen en los últimos estados de diferenciación, cuando la cromatina se encuentra condensada (Poccia et al., 1987). Las proteínas espermáticas no-básicas también son reemplazadas aparentemente por unas similares a las encontradas en el pronúcleo femenino (Kunkle et al., 1978a).

Gurdon (1976) demostró que el núcleo del ovocito contiene factores de descondensación que se encuentran concentrados en el citoplasma luego de la ruptura de la vesícula germinal. De forma similar sucede en el ovocito de ratón (Thadani, 1979). Se observó que el núcleo espermático

no descondensa en el citoplasma de ovocitos anucleados (sin vesícula germinal) (Katagiri & Moriya, 1976; Skoblina, 1976; Lohka & Masui, 1983). La inyección del contenido soluble de la vesícula germinal en estos huevos anucleados induce la formación de pronúcleo (Lohka & Maller, 1987). En estos casos, la descondensación del núcleo espermático es dependiente de la formación del pronúcleo femenino (o de la ruptura de la vesícula germinal).

El uso de un sistema *in-vitro* empleando núcleos espermáticos permeabilizados e incubados con extracto de huevo fue usado para determinar los agentes activos involucrados en la descondensación de la cromatina espermática. La actividad descondensadora de los huevos fue examinada en erizo de mar, anfibios, almejas, y mosca de la fruta (Kunkle et al., 1978b; Eng & Metz, 1980; Lohka & Masui, 1983a,b; Ulitzer & Gruenbaum, 1989; Cameron & Poccia, 1994; Longo et al., 1994b). El sistema libre de células tiene la ventaja de desarrollar pronúcleos masculino para su análisis bioquímico sobre los procesos de descondensación de la cromatina, ensamblaje de la envoltura nuclear y regulación del ciclo celular (Murray & Hunt, 1993). También puede ser utilizado como un sistema heterólogo; por ejemplo, el extracto de huevo de *Xenopus laevis* induce descondensación del espermatozoide humano (Brown et al., 1987).

Cuando los núcleos espermáticos permeabilizados del anfibio *Bufo* son incubados con extracto de huevo, pierden la protamina y descondensan (Ohsumi & Katagiri, 1991a,b). Las actividades de remoción de la protamina y descondensación están presentes desde los ovocitos en crecimiento y maduros hasta embriones pregastrula. No existe evidencia de degradación enzimática de la protamina y la proteína ácida que se une a histonas, la nucleoplasmina, esta implicada en la remoción de la protamina (Laskey et al., 1978; Krohne & Franke, 1980a,b). Es importante notar, que la nucleoplasmina está localizada en la vesícula germinal durante la maduración del ovocito y luego a la ruptura de la vesícula germinal se distribuye a través del hemisferio animal. Se ha demostrado en el sistema libre de células de *Xenopus* que la nucleoplasmina es tanto necesaria y suficiente para el primer estado de descondensación (inicial y rápida) (Philpott et al., 1991; Philpott & Leno, 1992). La descondensación nuclear es producida por la remoción de las proteínas básicas y la adquisición de H2A y H2B y formación de nucleosomas. La inmunodepleción de los extractos con anticuerpos anti-nucleoplasmina, evita estos cambios; pero la adición de nucleoplasmina revierte esta inhibición de la descondensación (Philpott & Leno, 1992). No se sabe si esta proteína tiene algún otro rol en la cascada de eventos de la activación y ruptura de la vesícula germinal en el ovocito (Herlands & Maul, 1994). Es posible que proteínas tipo nucleoplasmina existan en el huevo de mamíferos y otros organismos y medien la descondensación nuclear.

El posible rol del MPF ("maturation promotor factor"),  $Ca^{2+}$  y fosforilación de proteínas en extractos libres de células que soportan el ensamblaje de la envoltura nuclear y descondensación de cromosomas por un lado, o la ruptura de la envoltura nuclear, y condensación de cromosomas y formación del huso mitótico por otro han sido revisados (Lohka & Maller, 1987). En resumen, los núcleos espermáticos permeabilizados de *Xenopus* incubados con extracto descondensan su cromatina, ensamblan membrana nuclear y forman pronúcleo. Los extractos preparados con EGTA forman cromosoma y huso mitótico. Los extractos preparados por centrifugación a 150,000g con EGTA no descondensan la cromatina espermática, pero inducen la formación de cromosomas y huso mitótico y producen la ruptura de la envoltura nuclear cuando estos extractos fueron añadidos a núcleos descondensados (pronúcleos) de células hepáticas y de cerebro. Similares cambios son producidos por MPF. Extractos que condensan cromosomas y forman huso suplementados con  $Ca^{2+}$ , inducen la disolución del huso y descondensación de los cromosomas y formación nuclear (Lohka & Maller, 1985). Estas observaciones son concordantes con lo propuesto por Masui (Masui et al., 1977; Masui, 1985), factores citoplasmáticos que retienen el huevo en metafase promueven la condensación de los cromosomas y son activados en baja concentración de  $Ca^{2+}$ . El incremento de

Ca<sup>2+</sup> en la fertilización promueve la descondensación de los cromosomas y formación nuclear. Estos resultados están de acuerdo con lo observado *in-vivo*, donde se demuestra incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular durante la fertilización de huevos de *Xenopus*, estos factores citoplasmáticos dependientes de Ca<sup>2+</sup> controlan el ciclo celular y la estructura de la cromatina espermática (Kline, 1988; ver Wilding, 1996). La descondensación de la cromatina espermática y formación del pronúcleo masculino es prevenida por microinyecciones de tampones que mantienen un nivel bajo de Ca<sup>2+</sup> interno.

La descondensación inicial de los núcleos espermáticos permeabilizados del erizo de mar incubados con extracto de huevo requiere ATP y es sensible a quinasas e inhibidores metabólicos (Cameron & Poccia, 1994; Luttmner & Longo, 1987). La progresión de la descondensación requiere la presencia de nueva envoltura nuclear y es estimulada por GTP.

La descondensación del núcleo espermático de *Spisula* está relacionada con el momento en el cual se preparan los extractos de huevo a partir de los ovocitos mantenidos en cultivo, y es concordante con la secuencia de eventos que ocurre *in-vivo* durante la fertilización (Longo et al., 1994b). Cerca del 30% de núcleos espermáticos incubados en extracto de huevos con vesícula germinal dispersan la cromatina, mientras que más del 90% descondensa cuando el extracto es de huevos con ruptura de vesícula germinal. El ensamblaje de la envoltura nuclear ocurre sólo cuando el extracto es preparado a partir de huevos cultivados durante 65 minutos post-activación, y que corresponde al período de tiempo en el cual se forman las envolturas pronucleares *in-vivo*. Estos resultados sugieren que la capacidad de los extractos de huevos de *Spisula* para soportar el desarrollo pronuclear es estado-dependiente y correlaciona con el ciclo celular (Longo, 1984, 1990).

En mamíferos, se demostró que los agentes como los ácidos fuertes, proteasas, DNAsa y detergentes tienen poco efecto sobre la integridad estructural del núcleo espermático. Sin embargo, la incubación de los núcleos espermáticos con agentes reductores como el 2-β-mercaptoetanol, o ditioneitol inducen expansión nuclear, indicando que el clivaje de puentes disulfuro es un requisito para la descondensación, al facilitar la disrupción de las núcleo-proteínas unidas al DNA (Calvin & Bedford, 1971). Una combinación de agentes reductores como el ditioneitol y la urea o la tripsina fueron usadas para inducir la dispersión de la cromatina *in-vitro*. Las condiciones extremas de la combinación de estos agentes pueden mimetizar, pero no refleja la descondensación de la cromatina *in-vivo*. Posteriormente, se verificó la necesidad de la reducción de los puentes disulfuro *in-vivo* para producir descondensación del núcleo espermático durante la fertilización, y el glutatión está involucrado en este proceso (Zirkin et al., 1989; Perreault, 1992). La importancia de la reducción de los puentes disulfuro fue demostrada inyectando en ovocitos de hamster, núcleos espermáticos purificados de espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones epididimales y del testículo (Perreault et al., 1987). Aunque la cromatina del espermatozoide testicular se encuentre condensada y presente protamina, estas moléculas no están entrecruzadas por puentes disulfuro. La formación de los puentes disulfuro ocurre progresivamente durante la maduración espermática en el epididimo. Perreault et al. (1987) demostró que el núcleo espermático testicular descondensa entre 5-10 minutos después de ser inyectado, mientras que los núcleos purificados de espermatozoides obtenidos de la cauda del epididimo descondensan entre 45-60 minutos.

En general, los ovocitos de mamíferos con vesícula germinal no permiten la descondensación del núcleo espermático (Balakier & Tarkowski, 1980; Zirkin et al., 1989; Yanagimachi, 1994). Esta incapacidad puede ser debida a la ausencia o deficiencia de moléculas tipo nucleoplasmina (Maleszewski, 1992) más que a niveles bajos de glutatión (Perreault et al., 1988; Perreault, 1990), puesto que, los niveles de glutatión entre huevos inmaduros y maduros son solo ligeramente diferentes (Wiesel & Schultz, 1981; Perreault et al., 1988).

Con la remoción de la protaminas de los núcleos descondensados aparecen las histonas (Nonchev & Tsanev, 1990). Este cambio ocurre en forma concordante, alrededor de la anafase-II, mientras que la descondensación de la cromatina es masiva entre la anafase-II y la telofase-II del ovocito (Garagna & Redi, 1988), esto es coincidente con el segundo estado de expansión de la cromatina espermática, la cual se produce durante y continúa al ensamblaje de la envoltura nuclear. La descondensación y el recambio de proteínas no es del todo claro en mamíferos (ver Yanagimachi, 1994).

Adicionalmente, al posible rol de una molécula tipo nucleoplasmina (Philpott et al., 1991) en el desplazamiento de la protamina de los núcleos espermáticos en mamíferos, se ha postulado que cambios en la carga de estas proteínas básicas por fosforilación y proteólisis también pueden estar involucradas (Zirkin et al., 1985). La fosforilación esta involucrada durante la espermatogénesis y en combinación con otras modificaciones enzimáticas podría ser instrumental en la dispersión de la cromatina espermática condensada. Durante la fertilización de huevos de ratón se observa altos niveles de fosforilación y el extracto de huevos es capaz de fosforilar las protaminas espermáticas, estas modificaciones pueden desestabilizar las interacciones protamina-DNA durante la formación del pronúcleo masculino (Young & Sweeney, 1978; Wiesel & Schultz, 1981). Esta situación puede ser similar a lo observado durante la fertilización del huevo de erizo de mar, donde las histonas H1 y H2B específicas del espermatozoide son fosforiladas (Green & Poccia, 1985; Poccia, 1989).

La actividad proteolítica del tipo sulfidril podría estar involucrada en la descondensación del núcleo espermático *in-vivo* (Zirkin & Chang, 1977; Zirkin et al., 1980). Una proteasa tipo acrosina asociada a los núcleos espermáticos purificados de conejo causa degradación de la nucleoproteína y descondensación de la cromatina *in-vitro*. Sin embargo, el rol normal de esta actividad proteolítica *in-vivo* es cuestionado, porque la actividad de descondensación es en este caso intrínseca al núcleo purificado y de origen acrosomal (Young, 1979). En adición a esto, actividades proteolíticas para el procesamiento de histonas están asociadas al núcleo de células somáticas.

La topoisomerasa-II, que ejecuta cambios topológicos de la estructura del DNA por quiebres y uniones transientes de ambas cadenas de la hélice de DNA, puede ser un factor importante durante los cambios de la cromatina en la fertilización (Wright & Schatten, 1990; Perreault, 1992). Esta enzima debe ser requerida para asistir la organización nucleosómica de la cromatina. La inhibición de la actividad topoisomerasa-II en *Spisula* y cigotes de hamster induce a la condensación de cromosomas en forma aberrante, retención de la formación del primer corpúsculo polar e inhibición de la síntesis de DNA. El tenipósido retiene el ensamblaje nuclear en núcleos espermáticos de *Xenopus* incubados con extractos de huevo (Newport, 1987), pero este agente no bloquea la descondensación de la cromatina, tampoco el desarrollo del pronúcleo masculino en huevos fertilizados de *Spisula* o hamster (Wright & Schatten, 1990; Perreault, 1992). El rol *in-vivo* de la topoisomerasa II en el desarrollo del pronúcleo masculino es una cuestión que aún permanece sin resolver.

Varios modelos de organización de la cromatina y genes en el núcleo espermático fueron propuestos (ver Koehler et al., 1983; Ward, 1993; Ward et al., 1996) para comprender mejor la función génica y en especial como debe ocurrir la dispersión de la cromatina en la fertilización. El modelo de más aceptación propuesto por Ward (1993) estructura la cromatina espermática en asas ("loops"), y estos dominios estarían anclados a una matriz nuclear. En anfibios estas asas tienen aproximadamente 25 kb de longitud (Risley et al., 1986), mientras que en hamster alcanzan las 47 kb, en una célula somática la longitud de la asa podría ser aproximadamente la mitad (Ward et al., 1989). La idea básica del modelo de Ward (1993) es que las asas serían una forma de transferencia del genoma paterno al cigote en forma organizada pero compacta, y el embrión durante su desarrollo puede acceder a la información genética paterna en forma rápida y eficiente. Este

modelo de organización también puede ser expandido a la descondensación, los dominios en asa pueden facilitar el intercambio núcleo-proteico durante la reorganización del núcleo espermático a pronúcleo masculino.

Los huevos de erizo de mar y anfibios concentran en su citoplasma proteínas no-histonas (Barry & Merriam, 1972; Kunkle et al., 1978b). Cuando los ovocitos de conejo fueron cultivados con [ $H^3$ ]-lisina y luego fertilizados, se observó que ambos pronúcleos incorporan proteínas contenidas en el citoplasma del huevo (Motlik et al., 1980). Las proteínas citoplasmáticas fueron reclutadas en el núcleo antes de producirse el hinchamiento nuclear y la síntesis de DNA, sugiriendo una relación causal (Merriam, 1969). El control génico por elementos citoplasmáticos del huevo presupone que el núcleo espermático durante la formación del pronúcleo masculino puede ser reprogramado genéticamente (Gurdon & Woodland, 1968; Johnson & Rao, 1971). Como indicó Newrock et al. (1977): "El huevo y el espermatozoide son células altamente especializadas con diferente empaquetamiento apreciable de su cromatina, y por ello debe ser necesario restaurar ambos genomas a un mismo estado durante el proceso de remodelaje y de desarrollo a fin de generar en los dos juegos de cromosomas (materno y paterno) idénticas calidades estructurales y funcionales".

### 2.3.- Formación de la envoltura pronuclear.

El desarrollo de la envoltura del pronúcleo masculino fue estudiado en diversos organismos, y es similar a la serie de eventos descrita para la formación de membrana nuclear durante la mitosis y meiosis (Longo, 1973; Franke, 1974). Lo que no se conoce es la extensión de remodelación que debe alcanzar la cromatina espermática antes que ocurra el ensamblaje de la membrana nuclear. El tiempo en el que ocurre la formación de la membrana del pronúcleo varía entre las especies. En el erizo de mar *Arbacia*, la formación de la envoltura se inicia durante la dispersión de la cromatina espermática. En la almeja *Spisula*, la formación de la membrana pronuclear ocurre luego de producirse la dispersión de la cromatina, y ocurre en forma concertada con la formación de la membrana del pronúcleo femenino. Morfológicamente, los eventos que se producen para formar las membranas nucleares son similares, las vesículas coalescen entre la periferia de la cromatina dispersada, y luego se fusionan para formar cisternas elongadas que desarrollan los poros nucleares.

La fusión de cisternas encierra a la cromatina descondensada, y en algunos casos porciones de la membrana nuclear del espermatozoide que se mantienen durante la descondensación se integran en la estructura de la nueva membrana nuclear. Estas porciones de origen espermático mantienen características morfológicas durante la fertilización (fusión de pronúcleos) y/o desarrollo embrionario. En el caso de *Arbacia*, la membrana del núcleo espermático sólo podría envolver el 20% de la cromatina descondensada. Así, el resto de membrana tiene su origen en el huevo, la principal fuente de membrana para formar las envolturas pronucleares debe ser el retículo endoplásmico, su prevalencia y continuidad con la envoltura pronuclear lo involucran en este proceso. La localización específica en regiones de huevos centrifugados establece que el tiempo de formación de la membrana del pronúcleo masculino es una función de la proximidad del retículo endoplásmico al pronúcleo masculino; la envoltura se ensambla rápidamente en pronúcleos localizados en áreas con abundante retículo, mientras que pronúcleos en áreas deficientes de retículo endoplásmico el tiempo de formación de la envoltura pronuclear se prologa (Longo, 1976). Sin duda, estos resultados sugieren que el retículo endoplásmico contribuye a la formación de la envoltura del pronúcleo.

La formación del pronúcleo en ausencia de síntesis de proteínas sugiere que no se requiere biosíntesis de nueva membrana para cubrir el requerimiento de la formación de la nueva envoltura nuclear y que la incorporación de las vesículas debe ocurrir de estructuras preformadas y almacenadas.

Usando el sistema libre de células para formar pronúcleos masculinos (Lohka & Masui, 1984; Lohka, 1988; Vigers & Lohka, 1991; Longo et al., 1994; Collas et al., 1995; Collas & Poccia, 1995a,b) dos modelos para la formación de membrana pronuclear fueron propuestos (Lohka, 1988):

- i) **Modelo del precursor vesicular**, donde las vesículas se agregan alrededor de la cromatina descondensada y se fusionan para formar cisternas, y estas luego se fusionan para formar la envoltura nuclear con poros.
- ii) **Modelo del preporo**, basado en experimentos de reconstitución (Sheehan et al., 1988). El ensamblaje nuclear requiere componentes solubles y particulados de los extractos de huevo (Lohka & Masui, 1984b). La tasa 25:1 (soluble:particulado) completa la envoltura nuclear, no la forma, y los poros nucleares se ensamblan en la perifería de la cromatina descondensada en presencia o ausencia de membrana. Sheehan et al. (1988) proponen que los poros nucleares se unen a la cromatina para formar preporos, y luego las vesículas de membrana se unen a los preporos y cuando se fusionan forman la envoltura nuclear.

La fracción particulada de extractos de huevos de *Xenopus* puede ser separada en dos fracciones, A y B. Estas fracciones tienen diferentes propiedades y funciones durante el ensamblaje del pronúcleo (Vigers & Lohka, 1991). Las vesículas en la fracción B se unen a la cromatina en forma independiente de ATP, y estarían involucradas en la formación del poro nuclear. Las vesículas de la fracción A llevan marcadores del retículo endoplasmático y serían el pool de cisternas que contribuyen a la expansión de la envoltura nuclear. En erizo de mar, la descondensación de la cromatina es sólo parcial en ausencia de envoltura nuclear, y la descondensación es completa cuando se ensambla la membrana y lámina nuclear (Collas & Poccia, 1995a, b; Collas et al., 1995). La unión de vesículas citoplasmáticas a sustancias lipofílicas en la región apical y basal del núcleo espermático requiere ATP, pero no hidrólisis de ATP, y es anulada por tripsina.

Seguidamente a la formación de la envoltura pronuclear, se forma la lámina nuclear, la cual es regulada por fosforilación de las lamininas (Gerace et al., 1984). Se demostró que la superficie de la cromatina tiene receptores para la membrana interna de la envoltura nuclear (Chaudhary & Courvalin, 1993), estos receptores no fueron identificados, pero las variantes de histonas y el esqueleto nuclear (matriz) son candidatos propuestos para esta función (Newport, 1987). La laminina tipo A puede mediar la unión de la cromatina a las vesículas precursoras de la envoltura nuclear (Höger et al., 1991; Glass & Gerace, 1990). El rol de las lamininas en la formación de la envoltura nuclear y sus relaciones funcionales (a la matriz nuclear, organización del DNA, transcripción y replicación) en el pronúcleo femenino y masculino se desconoce (ver Stricker et al., 1989; Prather & Schatten, 1992). La vesícula germinal de ovocitos de *Xenopus* posee laminina L<sub>III</sub>, la cual se solubiliza durante la ruptura de la vesícula (Stick & Hausen, 1985; Benavente et al., 1985), y sirve como pool durante el ensamblaje de la lámina nuclear del pronúcleo masculino y femenino (Stick & Hausen, 1985). Las lamininas A/C y B están asociadas al pronúcleo masculino y femenino en ratón y se encuentran en huevos fertilizados de erizo de mar (Stricker et al., 1989; Schatten et al., 1985). En cigotes de *Spisula*, los pronúcleos contienen una variante de laminina A/C, llamada laminina G (Maul & Schatten, 1986).

Los experimentos usando extractos libre de células de huevos de *Xenopus* demuestran que el reemplazo de las histonas es un prerequisite para formar el pronúcleo y sintetizar DNA (revisado en Perreault, 1992). La síntesis de DNA sólo ocurre luego que la formación de la envoltura nuclear finalice (Naish et al., 1987a,b; Leno & Laskey, 1991), y se requiere que la envoltura nuclear sea íntegra como mecanismo para evitar la reiniciación de la síntesis de DNA antes de la mitosis (Blow & Laskey, 1988; Leno et al., 1992).

Con la formación de la envoltura del pronúcleo, la transformación del núcleo espermático a pronúcleo es completa. Sin embargo, el pronúcleo masculino continúa sufriendo cambios morfogénicos, los cuales incluyen alargamiento, finalización de la descondensación, adquisición de estructuras intranucleares (nucleolo), agregación de lamelas anuladas, etc.

### **3.- El problema de la remodelación de la cromatina espermática.**

Las observaciones generales descritas en los apartados anteriores indican que la penetración del núcleo del espermatozoide en el citoplasma del ovocito maduro produce una serie compleja de acontecimientos moleculares que activan al ovocito. Algunos de estos acontecimientos se dirigen a modificar la estructura del núcleo espermático de forma que lo convierten en un núcleo que posee una estructura de tipo "somático", y además, es metabólicamente activo. Este núcleo se denomina pronúcleo masculino (o pronúcleo parental).

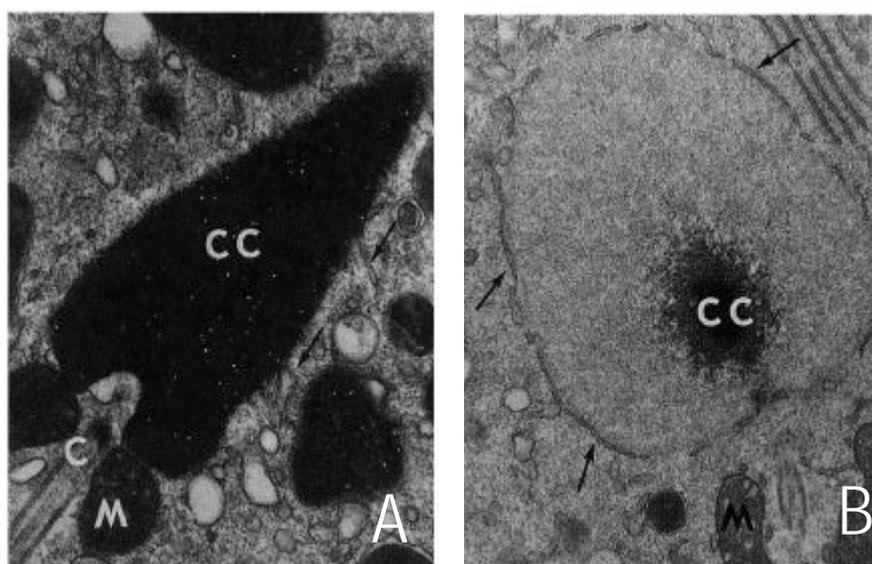
Observado a través del microscopio óptico, la transformación estructural del pronúcleo masculino es muy evidente y relativamente simple de interpretar, el núcleo compacto y denso del espermatozoide se descondensa, por factores que deben estar localizados en el citoplasma del ovocito, y se transforma en un núcleo de mayor tamaño, de aspecto "somático" (Fig.1). Este hecho es prácticamente universal, pero esto no indica necesariamente que los procesos moleculares involucrados en la transformación aludida sean universales (es decir, idénticos o muy similares en las distintas especies zoológicas), ni que actúen exactamente de la misma manera. La razón fundamental de la posible diversidad en los factores moleculares y mecanismos remodeladores radica principalmente en la propia diversificación interespecífica que ha sufrido la estructura de la cromatina espermática (observada al microscopio óptico cualquier espermiogénesis transforma el núcleo haploide de aspecto "somático" de la espermátida temprana en el núcleo compacto del espermatozoide, pero los procesos involucrados en este cambio son extraordinariamente diversos entre las especies y la estructura final también es diferente -ver más adelante-). Una segunda razón mucho menos importante es la posibilidad que existan diferencias menores interespecíficas en las estructuras de los pronúcleos.

#### **3.1.- Estructura del pronúcleo masculino y de los núcleos de las primeras fases embrionarias.**

Es un tema poco conocido debido a la dificultad experimental que presenta. A pesar que en la sección 5 de esta introducción profundizamos ligeramente sobre éste aspecto, es necesario indicar aquí que tanto el pronúcleo masculino como los núcleos de las primeras fases embrionarias poseen actividad transcripcional pero en un nivel muy bajo. Varios experimentos (Poccia et al., 1978; 1985) demuestran que una vez el ovocito ha sido fertilizado, o simplemente activado experimentalmente, es posible inhibir la actividad transcripcional sin que se impida que los óvulos prosperen en sus primeras fases embrionarias. Estos hechos indican que los principales factores que dirigen la progresión de las primeras fases embrionarias se encuentran almacenados en el ovocito, y que ni el pronúcleo masculino, ni los primeros núcleos embrionarios necesitan una estructuración especial que permita activar un gran número de genes.

Por lo contrario, el requisito fundamental y genérico que deben cumplir los pronúcleos y primeros núcleos embrionarios es poder replicarse muy rápidamente. Las células embrionarias poseen los ciclos celulares más rápidos que se conocen, de manera que entran en mitosis y se duplican en tiempos muy cortos (entre 20 minutos y 1 hora aproximadamente, según la especie) (e.g. Poccia et al., 1981, Poccia, 1985). Esta circunstancia hace suponer a diversos investigadores que la estructura de su cromatina debe ser simple, abierta y "débil" en el sentido de que debe presentar poca resistencia a la horquilla de replicación del DNA.

Los escasos estudios efectuados sobre este punto, indican que la cromatina de estos núcleos posee una composición proteica relativamente simple: histonas nucleosómicas, algunas de ellas acetiladas, poca H1 o bien una H1 especial, y en ocasiones HMG en las zonas "linker" en lugar de histona H1 (ver referencia en los apartados 5a y 5b de ésta introducción).



**Figura 1.- Cambios morfológicos durante la formación del pronúcleo masculino. A)** Núcleo del espermatozoide de erizo de mar (*Arbacia*) incorporado en el citoplasma del ovocito. Las flechas indican la vesiculación de la envoltura nuclear alrededor de la cromatina condensada (cc). La ruptura de la envoltura nuclear del núcleo espermático es un proceso inicial para la formación del pronúcleo masculino. M = mitocondria espermática, C = centriolo. **B)** Pronúcleo masculino dentro de un cigote de erizo de mar (*Arbacia*), la nueva envoltura nuclear se ensambla alrededor de la cromatina dispersa por fusión de vesículas (flechas). El pronúcleo aún mantiene restos de cromatina condensada (cc). Note la forma de corazón en que se desarrolla el pronúcleo en ésta especie. M = mitocondria espermática. (Tomado de F.J. Longo, 1997)

### 3.2.- La estructura del núcleo del espermatozoide.

La estructura del núcleo espermático es una área de continua investigación. Desde el punto de vista morfológico, molecular y evolutivo, la estructura de la cromatina del núcleo espermático es muy diversa. Recientemente, nosotros hemos revisado el tema (Del Valle et al., 1999), y en ésta sección hacemos una breve referencia de ésta revisión. En general, la cromatina de los núcleos espermáticos se organiza en nucleohistonas y/o nucleoprotamina para condensar el DNA espermático. Ésta función de compactación del DNA espermático también puede ser realizada por

polipéptidos especializados, que también son muy diversos, pero pueden ser agrupados en dos tipos: i) variantes muy especializadas de las histonas, y ii) proteínas específicas. Más adelante se citaran ejemplos concretos que pueden representar éstas categorías de proteínas asociadas a la compactación del DNA en el núcleo espermático.

El conocimiento de la estructura (de hecho, se trata de una estructura con gran variabilidad) del núcleo espermático es un aspecto muy importante, y representa el punto de partida para la remodelación nuclear que se efectuará luego de la fertilización. Es evidente que la estructura de la cromatina espermática definirá (o al menos tendrá una relación muy importante con) los mecanismos y procesos moleculares de remodelación.

De hecho, la gran diversificación en la composición y estructura de la cromatina espermática ha sido objeto de varias revisiones (Hecht, 1989; Kasinsky, 1989, 1995). Todos (o casi todos) los núcleos espermáticos se encuentran en un estado de compactación muy elevado, pero diferentes estudios demuestran que la subestructura nuclear puede ser muy diferente. En esta introducción distinguiremos las siguientes estructuras nucleares:

- i) Algunos núcleos espermáticos se pueden considerar como un conjunto de nucleosomas, compuestos por histonas de tipo somático, los cuales se han replegado y aproximado adoptando en conjunto un volumen reducido. Ejemplo, en el pez óseo *Carassius auratus* y en la carpa (Muñoz-Guerra et al., 1982).
- ii) Otros núcleos espermáticos conservan también los nucleosomas pero su plegamiento (aproximación y compactación física) se deben a péptidos específicos de naturaleza básica que interaccionan con el DNA. Ejemplo, *Holothuria tubulosa*: tiene un complemento normal de histonas más una proteína adicional (proteína  $\phi_0$ ) que se relaciona estructuralmente con la histona H1, también tiene algunas variantes específicas de la histona H1 (Subirana, 1970; Phelan et al., 1972; Cornudella & Rocha, 1979; Azorín et al., 1983, 1985).
- iii) En otros casos algunas histonas somáticas han sido sustituidas por variantes más básicas que permiten una mayor compactación de los nucleosomas. La sustitución de histonas somáticas por histonas específicas produce cambios paralelos en el tamaño y estabilidad de los nucleosomas. Ejemplo, el erizo de mar; donde el núcleo espermático contiene histonas H3, H4 y H2A idénticas a las somáticas, y las histonas H1 y H2B son reemplazadas por variantes específicas del espermatozoide denominadas SpH1 y SpH2B, respectivamente (rev. por Poccia, 1995).
- iv) En muchos casos, las histonas somáticas han sido sustituidas totalmente por péptidos muy básicos que condensan el DNA al máximo, pero de diferentes formas (el ejemplo más claro es el caso de las protaminas). Los péptidos específicos de diferentes especies comparten la característica de la basicidad química, pero son muy diferentes entre si (e.g. ver, Saperas et al., 1997). Excepcionalmente, diferentes especies pueden tener los mismos polipéptidos (Buesa et al., 1998).
- v) En algunos otros espermatozoides se encuentran variantes "intermedias", en las cuales parte de la cromatina esta estructurada en forma de nucleosomas y parte se encuentra empaquetada por péptidos o proteínas específicas; por ejemplo, algunos bivalvos (Ausió & van Holde, 1987). Otra variante muy especial "intermedia" es la que se encuentra en *Xenopus laevis*, y algunas especies de anuros. En este caso, la cromatina espermática conserva algunas histonas nucleosómicas somáticas

(principalmente el tetrámero H3-H4), mientras que la mayor parte de dímeros H2A-H2B y toda la histona H1 somáticas han sido sustituidos por péptidos específicos básicos que han de ser los principales responsables de la reducción del volumen nuclear (Kasinsky et al., 1978, 1985).

### 3.3.- Planteamiento del problema de la remodelación.

Los casos aludidos (y otros no considerados aquí) representan, tal y como se indicó anteriormente, el punto de partida sobre el cual deben actuar los factores remodeladores de la cromatina. Estos factores convertirán las estructuras mencionadas en el pronúcleo masculino organizado en forma de nucleosomas. De hecho es difícil imaginar un factor- o un complejo de factores- único y universal que sea válido para remodelar toda y cada una de las diferentes cromatinas espermáticas.

Un detalle adicional e importante es que el estado superhelicoidal del DNA no es idéntico en las diferentes estructuras espermáticas mencionadas. Los casos (ver sección anterior) i, ii, e iii en los cuales se puede hablar de nucleohistona espermática contienen DNA con una superhelicidad negativa muy importante, equivalente a la que presenta el DNA organizado en nucleosomas, mientras que los casos iv y v, el DNA está parcial o totalmente organizado en forma de nucleoprotamina y no presenta superhelicidad negativa (Risley et al., 1986; Barone et al., 1994). Este hecho ha de repercutir necesariamente en el tipo y actividad de los factores remodeladores:

“Los factores que transforman, **NUCLEOHISTONA ESPERMÁTICA**  $\rightarrow$  **NUCLEOHISTONA DEL PRONÚCLEO**, no tienen necesariamente que modificar la superhelicidad del DNA, mientras que aquellos factores que transforman **NUCLEOPROTAMINA ESPERMÁTICA**  $\rightarrow$  **NUCLEO-HISTONA DEL PRONÚCLEO**, tienen que recambiar las proteínas (es decir remover las protaminas fuertemente unidas al DNA e intercambiarlas por histonas que presentan una unión más débil), y al mismo tiempo introducir superhelicidad negativa en el DNA para reconstituir los nucleosomas”.

Las consideraciones anteriores nos conducen a pensar que los mecanismos de remodelación del DNA espermático pueden no ser constantes en las diferentes especies. Para orientar la búsqueda de una molécula o factor(es) remodelador(es) en una especie desconocida es importante hacer una revisión de los factores conocidos que están implicados en la remodelación de la cromatina. En la siguiente sección se revisa brevemente los factores remodeladores implicados en la transcripción y replicación del DNA (no consideramos los factores relacionados con la reparación puesto que son ajenos al propósito de este trabajo).

## 4.- Análisis de los factores remodeladores de la estructura de la cromatina durante la transcripción y replicación.

El término "remodelación" es utilizado frecuentemente, pero no tiene alguna definición adicional a su significado semántico. En esta introducción utilizamos el término "remodelación" como un proceso (fenómeno) que implique cualquier cambio estructural de la cromatina.

La remodelación de la cromatina es una situación indispensable en diferentes momentos del ciclo celular. Es necesaria para que se pueda desarrollar la actividad metabólica del DNA durante la transcripción, replicación, reparación y también para que se pueda efectuar adecuadamente la condensación-descondensación de los cromosomas mitóticos y la condensación-descondensación del núcleo espermático. Los factores que remodelan la cromatina

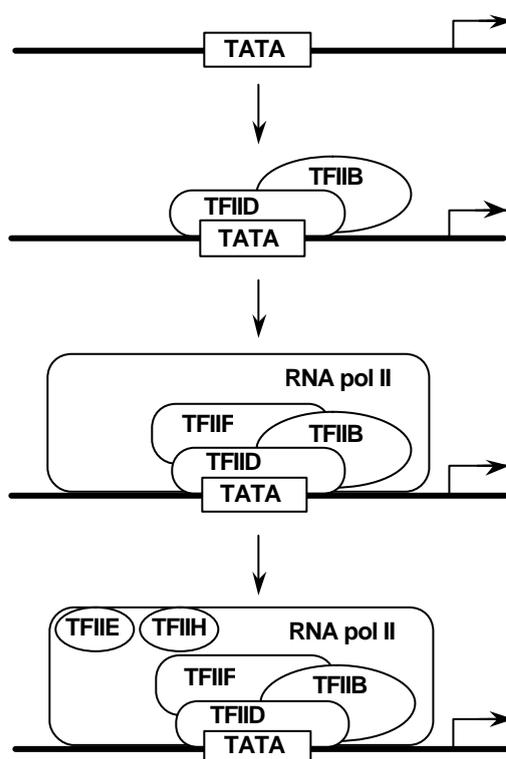
son múltiples, muy variables, y en muchos casos, específicos para cada uno de los procesos anteriores.

#### 4.1.- Transcripción: Factores de transcripción.

La transcripción de DNA a RNA es un proceso muy complejo que requiere el concurso y orquestación de muchos factores y la regulación de su interacción con la estructura de la cromatina. A efectos estructurales en la transcripción vamos a distinguir:

- Las regiones del DNA implicadas en la transcripción ("cis-acting").
- Los factores proteínicos adecuados ("trans-acting factors").

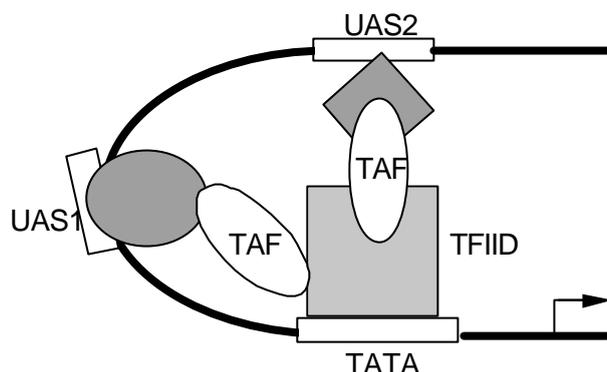
Por otro lado, vamos a distinguir la transcripción basal (a velocidad moderada) y la transcripción activada (es decir cuando un gen concreto posee una velocidad elevada de transcripción). La transcripción basal es dirigida parcialmente por regiones del DNA que se encuentran cerca de los lugares de inicio de la transcripción. Estas regiones son secuencias especiales del DNA y se denominan "regiones promotoras" o promotores. Los promotores (que serían sitios "cis-acting") atraen y reclutan los factores proteínicos "trans-acting" basales (o sea aquellas proteínas que permitiran una transcripción basal). Una de las secuencias promotoras de la transcripción importante es la "TATA-box". A esta secuencia se le une un factor trans (un complejo llamado TFII), el cual recluta "en cascada" toda una nueva serie de factores y la RNA polimerasa II (Fig. 2). Todo este gran complejo, llamado complejo de pre-iniciación, puede dirigir la transcripción basal de un gen (Zawel & Reinberg, 1992; 1993; Conaway & Conaway, 1993; Struhl, 1996; Edmondson & Roth, 1996).



**Figura 2.- Modelo esquemático de ensamblaje del complejo de preiniciación.** Ensamblaje por etapas del complejo de preiniciación sobre un promotor típico que contiene una TATAbox y es transcrito por una RNA polimerasa II. En el esquema se muestra el reclutamiento de la holoenzima pre-ensamblada, y no

incluye todos los componentes de la holoenzima, tampoco las interacciones de los factores con activadores y coactivadores (Wolffe, A., 1995).

Para que la transcripción basal de un gen se active (es decir incrementar su velocidad) se necesitan otras secuencias de DNA y otros factores proteicos adicionales. Las secuencias de DNA "activadoras" acostumbran a encontrarse antes ("up-stream") de los promotores y su función es permitir la unión de ciertos factores proteicos (principalmente los llamados TAFs) indispensables para incrementar la velocidad de transcripción (Kim et al., 1993; Nikolov & Burley, 1994; Nikolov et al., 1995; Guarente, 1995; Hansen & Tjian, 1995; Sauer et al., 1995a, 1995b; Verrijzer et al., 1995; Buratowski, 1995). La Fig. 3 muestra que los TAFs interaccionan con otros factores que entran en contacto con las secuencias activadoras. Un aspecto estructural muy interesante de los factores TAFs es su asociación formando estructuras similares a los octámeros de las histonas del core nucleosómico (Kokubo et al., 1993; Xie et al., 1996; Hoffman et al., 1996).



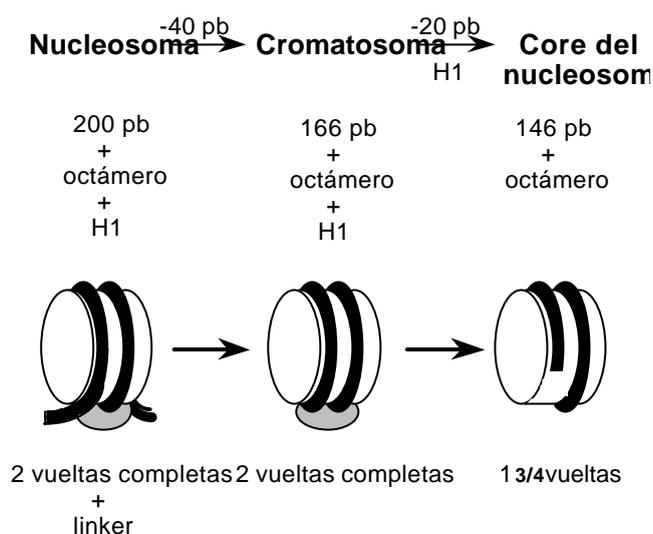
**Figura 3.- Las interacciones del activador TAF estabilizan la unión de TFIIID.** El TAFs específico interactúa con dominios particulares de activación en los transactivadores unidos para activar las secuencias "río arriba" (UAS1 y UAS2) o facilitar (lo cual puede ser "río abajo" o también en la región codificadora) para producir un "docks" del TFIIID. Múltiples interacciones TAF-activador incrementan sinérgicamente la tasa de transcripción (Edmonson & Roth, 1996).

#### 4.1.1.- El problema del nucleosoma.

Como se mencionó anteriormente, el DNA de las células eucariotas se encuentra empaquetado dentro de la cromatina en diversos niveles de organización. El primer nivel y más básico es el nucleosoma. Esta organización prácticamente involucra a todo el DNA nuclear. El nucleosoma consiste de la partícula "core" que contiene 140 pares de bases de DNA enrollado alrededor del octámero de histonas (H2A, H2B, H3, H4)<sub>2</sub>, y en una parte del DNA llamado "linker" de aproximadamente 60 pares de bases, el cual está preferentemente asociado a la histona H1 (Kornberg, 1974; Noll & Kornberg, 1977; Pruss et al., 1995; Wolffe & Pruss, 1996; ) (Fig. 4).

A pesar de que hay unas pocas excepciones descritas, es un hecho general que la presencia de la organización nucleosómica en las regiones promotoras y activadoras del DNA inhibe el proceso de la transcripción (Wallrath et al., 1994; Wu, 1980; Tsukiyama et al., 1994; Winston & Carlson, 1992; Peterson & Tamkun, 1995). La inhibición se produce porque el nucleosoma impide que los factores proteínicos ("trans-acting") accedan a las regiones (secuencias) promotoras y activadoras concretas del gen. En realidad, cuando la célula recibe estímulos adecuados, los genes pueden entrar en situación de transcripción basal o activado. Esto implica que hay otros factores (o situaciones) gracias a los cuales la acción inhibitoria de los nucleosomas se puede

revertir. Este hecho implica en algunos casos una "remodelación" de la estructura nucleosómica.



**Figura 4.- Esquema de las relaciones entre el nucleosoma, cromatosoma, y partícula core del nucleosoma.** Éstos componentes de la cromatina son generados luego de digerir la cromatina con nucleasa micrococcal.

Se han descrito tres mecanismos principales (no excluyentes entre sí) que pueden revertir la acción inhibitoria de los nucleosomas (revisado por Cairns, 1998):

- i) Los factores de transcripción ("trans-acting") se pueden unir al DNA naciente durante la replicación, antes de formar los nucleosomas (o cuando se acaban de formar).
- ii) Los propios factores de la transcripción ("trans-acting") pueden interactuar con la cromatina y "desestabilizar" el nucleosoma.
- iii) Pueden actuar proteínas o complejos proteínicos como "disruptores" de la estructura nucleosómica y permitir la unión del complejo de preiniciación a las regiones promotoras (y/o activadoras).

#### **Comentarios acerca de estos mecanismos:**

Con respecto al **primer mecanismo**; la cromatina acabada de replicar es muy sensible a la digestión con nucleasa (Kingston et al., 1996) y presenta una estructura muy "abierta". Tal como se verá más adelante, en la cromatina replicada (naciente), el ensamblaje de los nucleosomas se produce en dos pasos (Neigeborn & Carlson, 1984; Stern et al., 1984; Krude, 1995): El factor CAF-1 une el tetrámero (H3-H4)<sub>2</sub> al DNA, y posteriormente se unen los dos dímeros (H2A-H2B) [hasta el momento no está claro, si durante la replicación de la cromatina somática, los dímeros (H2A-H2B) son ayudados a depositarse con la participación de algún "chaperón molecular"]. Mientras, el nuevo "nucleosoma" esta constituido por el tetrámero, los factores de transcripción pueden reconocer las secuencias promotoras, unirse a ellas e iniciar la transcripción (Neigeborn & Carlson, 1984). También existen trabajos que muestran que la nucleoplasmina (ver más adelante) activaría la unión de los factores de transcripción al DNA (Wallrath et al., 1994). Esto indicaría que en estos casos la nucleoplasmina podría desestabilizar el nucleosoma, debilitando las interacciones de los dímeros (H2A-H2B) con el DNA.

¿Qué importancia puede tener éste mecanismo en la remodelación de la cromatina espermiática, en los pronúcleos, y en los núcleos embrionarios de los primeros estados de desarrollo?.-

Es evidente que en el aspecto concreto de la remodelación de la cromatina espermiática, este mecanismo queda fuera de contexto, pero podría jugar cierto papel en los pronúcleos y núcleos de los embriones tempranos debido a la gran velocidad de replicación del DNA. Al parecer, su importancia estaría cuantitativamente muy limitada, ya que en estos estados del desarrollo embrionario existe muy poca transcripción (Poccia et al., 1985). La posible importancia del factor CAF-1 es analizada en el apartado correspondiente a la replicación (Introducción; 4.2).

A cerca del **segundo mecanismo**; el punto anterior podría considerarse como un tipo de "remodelación" dependiente de la replicación del DNA (impidiendo que el nucleosoma se forme completamente y no enmascare los sitios de unión del DNA, por ejemplo la "TATA-box"). De toda manera, la inducción de la mayor parte de los genes (o al menos, de una gran cantidad), se efectúa durante la fase G1 del ciclo celular, cuando no hay replicación del DNA. Consecuentemente, la inducción de la transcripción debe ocurrir a través de la remoción o alteración de los nucleosomas que se encuentran en las secuencias promotoras (y/o activadoras).

Existen algunos casos donde se demostró claramente que la unión de los factores de transcripción afecta la estructura de la cromatina (Braunstein et al., 1993; Hecht et al., 1996; Owen-Hughes et al., 1996; Burns & Peterson, 1997). Aquí se resume el caso descrito para el gen MMTV de mamíferos (Owen-Hughes et al., 1996; Burns & Peterson, 1997). El MMTV ("mouse mammary tumor virus") es un gen que se activa por las hormonas esteroideas. Este gen tiene una región promotora con diversas secuencias que podrían unirse a los "trans-acting factors", es decir, a los factores basales y activadores de la transcripción (NFI, TBP, OTF, etc.). Sin embargo, los factores no tienen accesibilidad a las secuencias porque se encuentran enmascaradas en (y dentro de) 6 nucleosomas denominados A,...F, respectivamente. Cuando la célula responde a la acción del esteroide, éste forma un complejo con una proteína (complejo GR) que se une al nucleosoma B. Ésta unión provoca cambios estructurales que permiten el reclutamiento de los "trans-acting factors" y de la RNA polimerasa en los lugares en cis del DNA para formar el complejo de preiniciación (Workman & Kingston, 1992; Owen-Hughes et al., 1996; Burns & Peterson, 1997). Todo este proceso también provoca una depleción de la histona H1 en el territorio aludido.

Lo que muestra este caso, es que algunos factores pueden reconocer secuencias diana en los nucleosomas, unirse a ellos, y desestabilizar la estructura del propio nucleosoma o bien la estructura de los nucleosomas vecinos. Con respecto al cambio que sufren los nucleosomas, los detalles no se conocen con certeza, pero existen tres aspectos interesantes a comentar: a) la acción de los factores parece ser cooperativa (de manera que un factor puede abrir un poco el nucleosoma, lo cual permite la deposición de un segundo factor que potencia el cambio conformacional, etc.); b) las colas N-terminales de las histonas ayudan a unirse los factores (Brown et al., 1996; Georgel et al., 1997); c) algunos de los complejos que forman los factores pueden tener actividad acetiltransferasa para las histonas nucleosómicas (Farrants et al., 1997).

¿Qué repercusión puede tener el segundo mecanismo en la remodelación espermiática, pronúcleos y núcleos embrionarios tempranos?.-

De hecho, nos encontramos en un sistema diferente al descrito, pero es interesante considerar que en los casos en que el núcleo espermiático está constituido por nucleohistonas, la posibilidad de que el citoplasma del ovocito posea factores capaces de producir modificaciones post-transcripcionales de las histonas, y si en el caso de que se produzca un recambio de nucleosomas durante la remodelación, deben existir algunos mecanismos cooperativos. Otra cuestión que se puede plantear es sobre el papel que juegan las colas ("tails") transformadas de las histonas espermiáticas (Poccia & Green, 1992; Green et al., 1995)

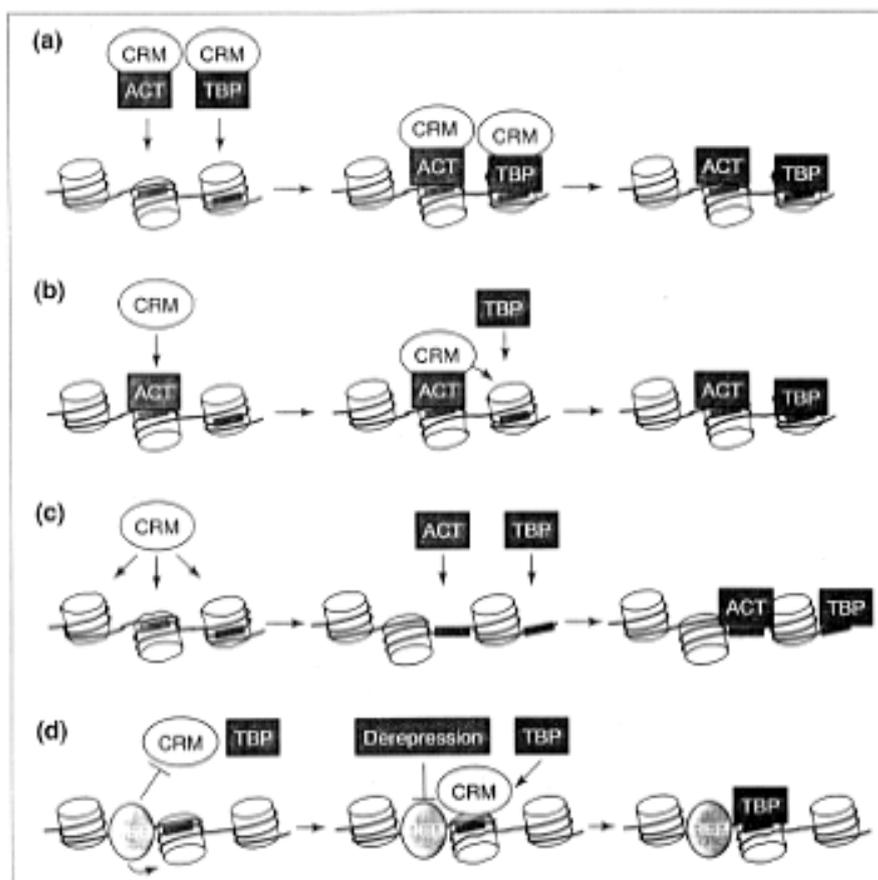
en favorecer el mecanismo de recambio.

Por último, en el **tercer mecanismo**; los "disruptores" de la cromatina son máquinas moleculares que alteran (o desmontan) la estructura nucleosómica, y esto permite que los "trans-acting factors" se unan a los lugares específicos del DNA de las regiones promotoras/activadoras. Estos "disruptores" fueron revisados por Cairns (1998), con la denominación de "máquinas de remodelación de la cromatina". Los "disruptores" son siempre complejos multiproteínicos que poseen actividad ATPasa. De manera resumida, se destacan los más importantes:

- 1.- NURF (nucleosome remodelling factor).
- 2.- CHRAC (chromatin accessibility complex).
- 3.- ACF (ATP dependent chromatin assembly and remodelling factor).
- 4.- SWI-SNF (y familia).
- 5.- SWI-SNF related (y familia).
- 6.- FACT (factor que "facilitates chromatin transcription") (Orphanis et al., 1998; posteriormente a la revisión de Cairns, 1998).

Se propusieron 4 modelos para explicar la "disrupción" del nucleosoma por acción de estos complejos. Los mecanismos de acción se encuentran esquematizados en la Fig. 5, y resumidamente serían los siguientes:

- i) En el primer modelo (Fig. 5A) (Owen-Hughes et al., 1996; Burns & Peterson, 1997), los factores transcripcionales basales y de activación (TBP y ACT respectivamente) no se pueden unir a sus lugares del DNA, si estos se encuentran formando parte del nucleosoma; en este caso los complejos remodeladores se unirían primero al TBP y ACT y en conjunto provocarían la disrupción de los contactos DNA-histona, lo cual favorece la unión al TBP y ACT.
- ii) En el segundo modelo (Fig. 5B) (Workman & Kingston, 1992; Brown et al., 1996), el activador (ACT) podría unirse al DNA, pero no los factores basales (TBP, los cuales son imprescindibles para poder formar el complejo de preiniciación). En este caso, el ACT reclutaría el disruptor el cual provocaría la alteración del propio nucleosoma y/o de otros nucleosomas más o menos adyacentes, que contienen la secuencia TATA. Esto permitiría la unión del TBP. Es importante recalcar que en estos dos modelos, cuando se habla de disrupción del nucleosoma, no se sabe hasta ahora que significado real tiene, es decir, si el nucleosoma cambia su conformación pero permanece en su lugar, o bien si el nucleosoma es retirado por la acción de los disruptores.
- iii) El tercer modelo (Fig. 5C) (Varga-Weisz et al., 1995, 1997), propone que el disruptor interaccionaría con los nucleosomas, y los desplazaría posicionándolos adecuadamente para dejar libre los lugares de unión a los TBP y ACT. El modelo propone que los disruptores pueden ser reclutados por represores (o estructuras cromatínicas represoras) y que esta unión, de alguna manera favorece la interacción de los lugares del DNA con el TBP y ACT.
- iv) El cuarto modelo (Fig. 5D), propone que un represor transcripcional (REP) unido al DNA estabiliza el nucleosoma y reprime la acción del activador hasta que se active una señal de represión para bloquear REP. Cuando ocurre la represión de REP, se facilita la unión de TBP (u otro factor) por el activador y debe ocurrir de acuerdo con algún modelo anterior (modelos 1-3).



**Figura 5.- Modelos de perturbación de los nucleosomas por máquinas que remodelan la cromatina (CRMs, "chromatin-remodeling machines) para facilitar la unión de los factores activadores.** Se supone un promotor hipotético en el DNA del nucleosoma que será el lugar de unión de activador transcripcional (ACT), y la secuencia TATA donde se unirá la proteína TBP, los nucleosomas están ordenados en "array". En éste esquema, los nucleosomas perturbados por CRM se muestran asociados al DNA, pero su separación es una posibilidad que ocurra. **A)** Modelo 1: CRMs facilitan la unión del ACT o de TBP. **B)** Modelo 2: los activadores se unen sin que las CRMs se involucren, pero luego reclutan CRM para remodelar los nucleosomas vecinos. **C)** Modelo 3: La acción de CRM facilita la movilidad del nucleosoma, sin ocupar los lugares de unión. **D)** Modelo 4: Un represor transcripcional unido al DNA (REP) estabiliza el nucleosoma y reprime la acción CRM hasta que la señal de depresión bloquee la función REP. La depresión ocurrida, facilita la unión de TBP (u otros factores) por CRM, y debe ocurrir por algún mecanismo descrito en los modelos 1-3. (Tomado de Cairns, 1998).

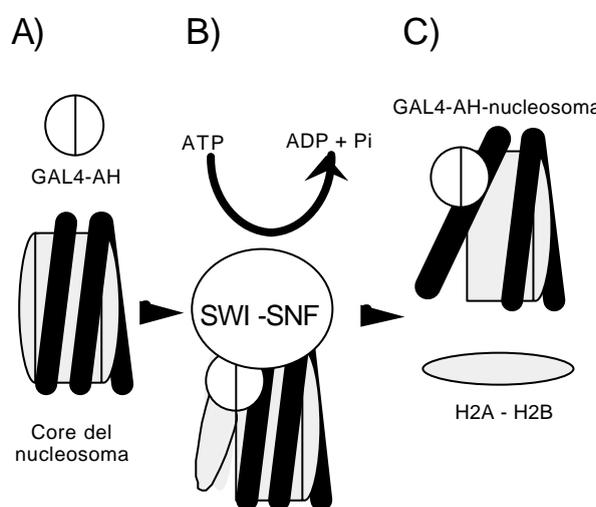
Para mostrar los mecanismos de acción concretos, posiblemente el más conocido sea el efectuado por el complejo Swi-Snf (revisado en Peterson & Tamkun, 1995). Como se muestra en la Fig. 6, este factor provocaría la remoción de un dímero (H2A-H2B) del nucleosoma.

Lo más importante que muestran estos modelos, es que las máquinas moleculares de remodelación de la cromatina (los "disruptores") actúan debilitando las interacciones histonas-DNA razón por la cual deben poseer un dominio adecuado, que puede desmontar - al menos parcialmente - el nucleosoma, o bien desplazarlos y hacerlos cambiar de posición. Un punto adicional, es que este tema se encuentra en plena expansión y que posiblemente se irá ampliando

la lista de disruptores o familias de disruptores.

¿Qué repercusión pueden tener los disruptores en el tema que nos ocupa -la remodelación de la cromatina espermática?- Cuando se considera la remodelación de los núcleos espermáticos que contienen nucleohistonas (ya sea similar o diferente de la somática), es interesante considerar la posibilidad de que en el citoplasma del ovocito puedan existir complejos que ayuden a "desmontar" los nucleosomas espermáticos. Esto es un aspecto que hasta ahora no ha sido estudiado en los procesos de remodelación espermática, donde los estudios principales se orientan con preferencia al estudio de la molécula denominada nucleoplasmina (ver más adelante).

Otro punto muy interesante, es que dejando de lado al complejo Swi/Snf y relacionados, todos los otros complejos fueron descubiertos en embriones de *Drosophila*, lo cual indica la gran importancia que pueden tener estas entidades en la regulación de la actividad de los ácidos nucleicos en las fases embrionarias.



**Figura 6.- Modelo de acción de SWI-SNF para disociar el dímero H2A-H2B.** (a) La GAL4-AH (un derivado de GAL4) tiene baja afinidad para unirse a los lugares de unión del GAL4 en el nucleosoma. (b) El complejo SWI-SNF usa la energía de la hidrólisis del ATP para facilitar la unión de GAL4-AH. (c) La acción de SWI-SNF involucra la remoción de uno o más dímeros de las histonas H2A-H2B; el resultado es un complejo terciario que contiene GAL4-AH, DNA y un subconjunto de histonas. (Tomado de Peterson et al., 1995).

### Resumen de los factores remodeladores durante la transcripción.

Existe la posibilidad que la transcripción se inicie antes de que el nucleosoma se encuentre totalmente formado (es decir, cuando falte el dímero H2A-H2B). Existe la posibilidad que una serie de complejos modifiquen el nucleosoma, ya sea conformacionalmente, o bien desplazando su posición. Los principales factores descritos hasta ahora son: complejos esteroide-receptor, NURF, CHRAC, ACF, Swi/Snf (familia), Swi/Snf-related (familia), FACT, otros.

En los casos más estudiados se aprecia que la ausencia del dímero (H2A-H2B) es un punto indispensable para que se pueda efectuar la transcripción. Por otro lado, no existen estudios sobre la presencia de estos tipos de factores en el citoplasma (o núcleo) de los ovocitos maduros.

### Resumen de la posibilidad de encontrar este mecanismo en ovocitos y

## primeros estados embrionarios.

Una premisa importante es que durante la remodelación de la cromatina espermática a pronúcleo masculino y durante los primeros estados embrionarios existe poca transcripción, o al menos puede efectuarse con la transcripción inhibida.

En el sistema del erizo de mar estudiado por Poccia (ver Introd., 6.1), el núcleo espermático presenta nucleosomas, y al parecer la H3 y H4 de los nucleosomas espermáticos no se acaban de separar del DNA y se van "diluyendo" a medida que avanzan las divisiones embrionarias (significa que proporcionalmente a cada división celular existe una proporción mayor de nucleosomas formados *de-novo*. No sabemos si éste sistema es aplicable a todos los espermatozoides con nucleohistona. En los sistemas donde el núcleo del espermatozoide se encuentra formado por núcleoprotamina, es indispensable la presencia de un disruptor de la estructura de la cromatina espermática, pero éste no necesariamente debe ser análogo a los que se han revisado durante la transcripción.

## 4.2.- Replicación: factores de replicación.

En esta sección nos interesa repasar los factores implicados en la remodelación de la cromatina durante la replicación del DNA en las células somáticas.

Durante la fase S del ciclo celular se replica toda la cromatina. La estructura nucleosómica es transitoriamente disrumpida en la horquilla de replicación y los nuevos nucleosomas son ensamblados en las dobles cadenas hermanas del DNA naciente. La reformación de la cromatina durante la fase de replicación se efectúa en dos pasos separados:

- a) En un primer paso, el nucleosoma parental se transfiere directamente a una de las dobles cadenas del DNA replicado (no parece haber preferencia sobre la doble cadena parental o la nueva). Este proceso es conocido con poco detalle, y parece que esta inducido pasivamente por la maquinaria molecular que actúa en la horquilla de replicación (Bonne-Andrea et al., 1990; Krude & Knippers, 1991; Randall & Kelly, 1992; Sugawara et al., 1992; Gruss et al., 1993).
- b) En un segundo paso, los nucleosomas nuevos se ensamblan en la otra doble cadena de DNA. Estos nucleosomas contendrán inicialmente histonas acetiladas (ver más adelante).

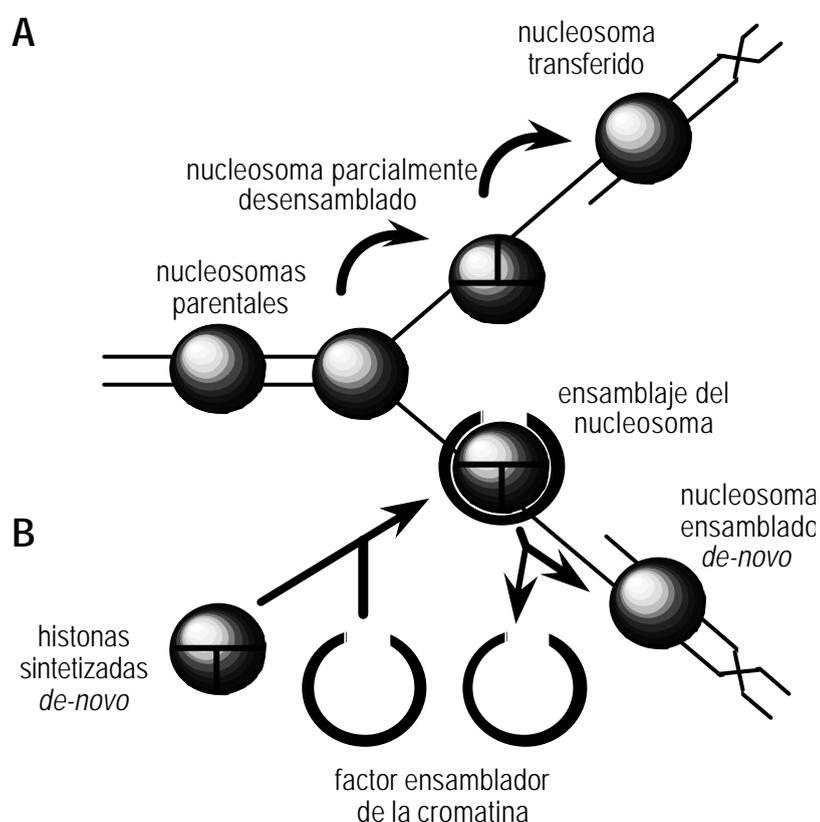
El segundo paso implica la formación de nuevos nucleosomas, y es un proceso que se efectúa a través de un "factor remodelador" o "chaperón molecular" denominado CAF-1 ("chromatin assembly factor") (Fig. 7). El CAF-1 es un complejo de 3 proteínas (p150, p60 y p50; esta última también se denomina p48), purificado a partir de extractos somáticos y es específico para el DNA que se encuentra en replicación, es decir, no puede reconstituir nucleosomas con DNA que no este realizando replicación (Smith & Stillman, 1989, 1991a; Krude & Knippers, 1993).

El ensamblaje de los nuevos nucleosomas, también se efectúa en dos pasos que se distinguen experimentalmente, y al parecer el CAF-1 sólo interviene en el primer paso. En éste primer paso, el factor CAF-1 deposita el tetrámero (H3-H4)<sub>2</sub> para formar el precursor del nucleosoma, mientras que en un segundo paso, se depositan los dímeros (H2A-H2B) sin la participación del CAF-1 (Fig. 8) (Kaufman & Botchan, 1994). Como se verá más adelante, existe una

cierta analogía funcional entre este factor y la proteína N1/N2 de los ovocitos de *Xenopus laevis*.

#### 4.2.1.- Características funcionales y moleculares del factor CAF-1.

En primer lugar, tal y como se dijo antes, el factor CAF-1 sólo actúa durante la replicación del DNA (para una última revisión ver, Kaufman, 1996). Utiliza exclusivamente histonas acetiladas (Smith & Stillman, 1991a). Cuando la histona H4 es sintetizada en la fase S, inmediatamente es acetilada en dos posiciones concretas y bien conservadas (Sobel et al., 1995); la histona H3 también es acetilada, pero los lugares concretos de acetilación no se encuentran bien conservados como en el caso de la histona H4. Parece que el factor CAF-1 sólo podría unirse a las histonas acetiladas en estos lugares específicos.



**Figura 7.- Esquema del ensamblaje de la cromatina durante la replicación del DNA. A)** Los nucleosomas parentales son parcialmente desensamblados durante la replicación del DNA y las histonas son directamente transferidas al DNA replicado, y se resamblan en nucleosomas. **B)** Se muestra el ensamblaje de los nuevos nucleosomas a partir de las histonas solubles sintetizadas *de-novo*, éste proceso es mediado por un factor de ensamblaje de la cromatina. (Krude, 1995).

En cuanto a su estructura, recordemos que el CAF-1 tiene 3 péptidos (p150, p60 y p48). Los péptidos p150 y p60 se encuentran caracterizados (Kaufman et al., 1995), ambos péptidos interaccionan entre si a través de dominios específicos formando un "dímero". Los dominios de interacción -y por lo tanto la estructura dimérica- son imprescindibles para la reconstitución del

nucleosoma. Existe otro dominio en p150 que es esencial para la actividad del CAF-1. Este dominio es una parte central que contiene aminoácidos ácidos, algunos de ellos agrupados en "clusters" (grupos consecutivos). Esta parte podría ser la responsable de la interacción con las histonas H3 y H4. Otra característica adicional es que p150 está fosforilado *in-vivo* (Smith & Stillman, 1991b).

Aunque, se desconocen las interacciones y detalles específicos de como puede funcionar el factor CAF-1, ultimamente se han acumulado resultados muy interesantes que involucran a la subfracción p48 con la acetilación de las histonas, con la función del CAF-1, y con la maduración de la cromatina formada *de-novo* (revisado por Roth & Allis, 1996a,b). Estos experimentos se resumen a continuación:

- i) En primer lugar, Verreault et al. (1996) demostraron que el factor CAF-1 (como se dijo antes) se encuentra en el núcleo, asociado sólo a las histonas acetiladas en lugares específicos (las lisinas K5 y K12 de la histona H4).
- ii) En segundo lugar, Parthun et al. (1996) identificaron una acetiltransferasa citoplasmática de histonas (HaT1P), que acetila precisamente las lisinas específicas de la histona H4 que se encuentra en la cromatina recién formada (es decir, las K5 y K12).
- iii) En tercer lugar, Taunton et al. (1996) describieron una deacetilasa de histonas en el núcleo celular, la cual se denomina RbAp48.

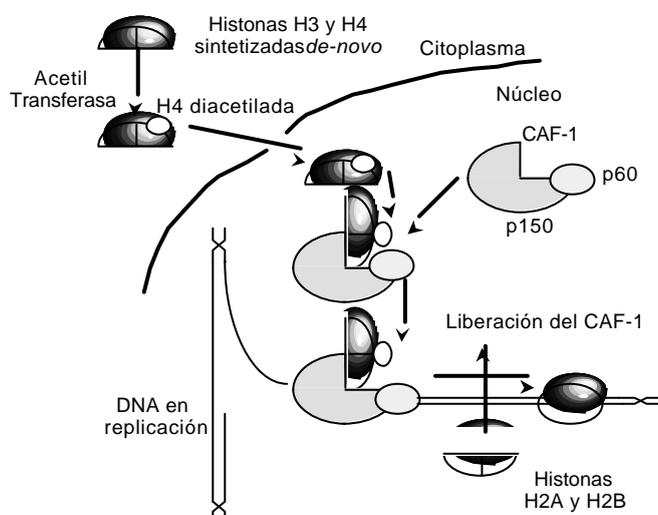


Figura 8.- El esquema resume el rol del CAF-1 en el ensamblaje de los nucleosomas durante la replicación del DNA. (Krude, 1995).

Un aspecto interesante es que estas tres "máquinas" (CAF-1, acetiltransferasa y desacetilasa) poseen en común la subunidad p48 (aunque difiere ligeramente en los tres sistemas estudiados). Éste hecho relaciona la acetilación específica de histonas, la formación de cromatina replicada y la desacetilación (maduración de la cromatina replicada). De hecho, Ruíz-Carrillo et al. (1975), y Jackson et al. (1976) demostraron que las histonas H3 y H4 sintetizadas *de-novo* eran

acetiladas en el citoplasma, transportadas al núcleo y ensambladas en estado acetilado, y posteriormente desacetiladas. Actualmente, parece también claro que el dominio globular de las histonas está comprometido en las interacciones histona-histona, mientras que sus extremos están implicados en la interacción histona-DNA e histona-otras proteínas no histonas. La regulación de la acetilación de las histonas sería un mecanismo adecuado tanto para regular su interacción con el DNA (es decir, regular la estructura de la cromatina), como para regular la captación y reclutamiento de factores de la transcripción, etc. (Brownell & Allis, 1996).

Lo que propone Roth & Allis (1996a,b) (Fig. 9) es que los miembros de la familia p48 funcionarían como integradores para coordinar los procesos bioquímicos de acetilación-ensamblaje-desacetilación (maduración): las histonas H3 y H4 recién formadas en el citoplasma se unirían a la p48 que reclutaría la acetiltransferasa específica (HaT1P), la cual acetilaría convenientemente las histonas; posteriormente, el complejo histonas acetiladas-p48 se encontraría en el núcleo donde la p48 reclutaría las subunidades p150 y p60 para formar el CAF-1 (entre los tres péptidos), el cual ensamblaría el nucleosoma. Finalmente, en el núcleo, el factor CAF (de hecho sólo las subunidades p150 y p60) sería desplazado por la desacetilasa la cual al unirse a la subunidad p48, podría desacetilar las histonas. Posteriormente, analizaremos una variante del CAF-1 (dCAF-4) estudiada en embriones de *Drosophila* (Introd., 5.2).

¿Qué se puede esperar de la presencia de los factores CAF (y subunidades) en el ovocito? A diferencia de la transcripción, en las primeras etapas embrionarias se produce una replicación muy activa (rápida) con lo cual también se debe producir un activo ensamblaje de la cromatina (formación de nucleosomas). También en los casos en los que la remodelación del núcleo espermático parte de nucleoprotamina para llegar a nucleohistona en el pronúcleo, es necesaria una formación rápida y masiva de nucleosomas (aunque en este caso nos encontramos con un ensamblaje de nucleosomas independiente de la replicación del DNA). Por lo tanto, parece razonable esperar en el citoplasma (o nucleoplasma) de los ovocitos, la presencia de:

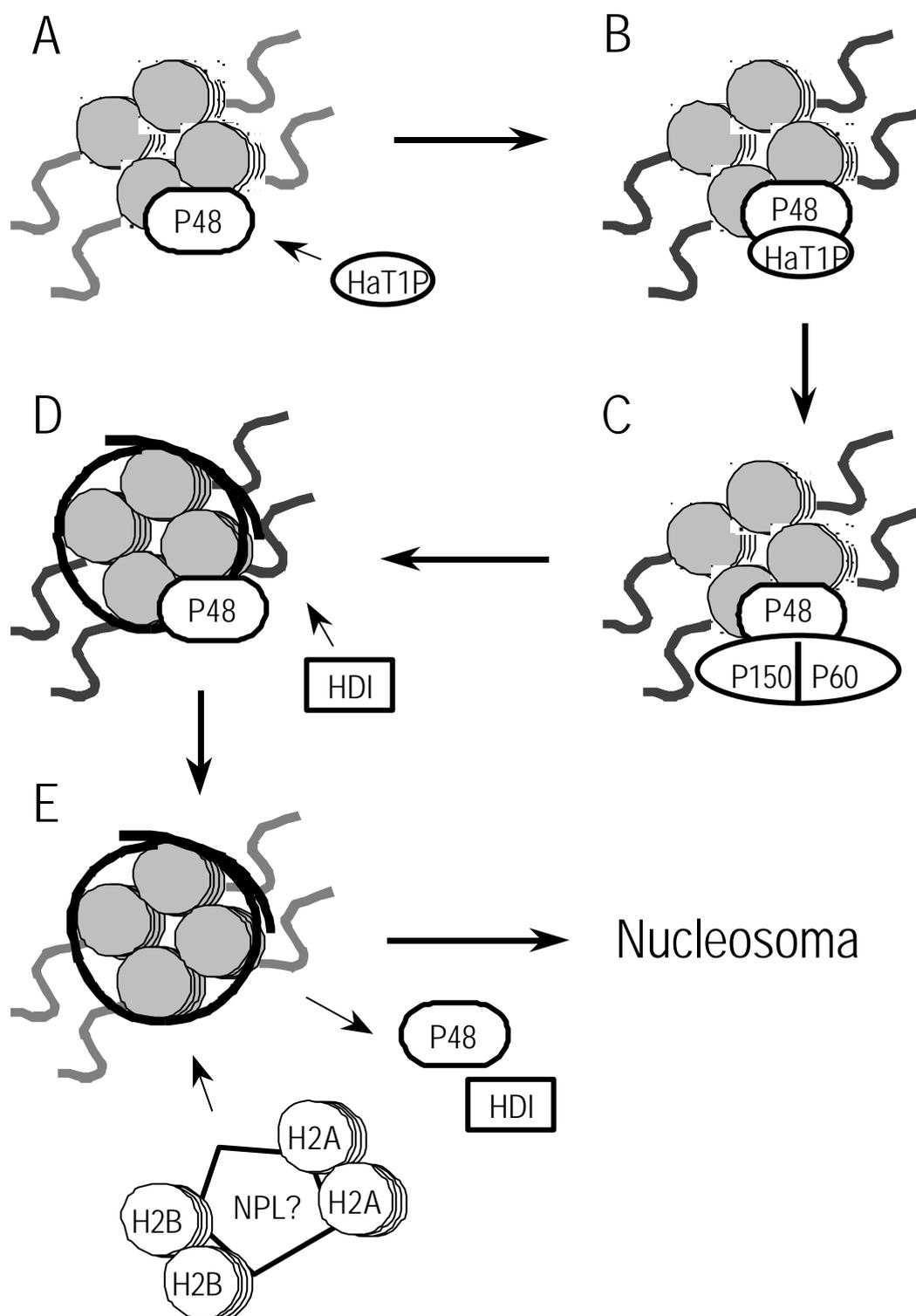
- i) Factores (elementos de los complejos) que formen nucleosomas (independientes y dependientes de la replicación).
- ii) Un depósito importante de histonas (acetiladas o no) y asimismo, de otras proteínas cromosómicas.

Aquí, debemos insistir en que los extractos de ovocitos pueden contener factores de reconstitución de nucleosomas independientes de la replicación, y coexistir con otros factores dependientes de la replicación, ya que como se menciona antes, los primeros estados de desarrollo embrionario ocurren aún en ausencia de transcripción del DNA. Esto puede ayudar a explicar en parte las diferencias encontradas entre algunos experimentos y/o la dificultad de reproducibilidad de otros cuando estos experimentos se efectúan con extractos crudos de ovocitos.

## **5.- Análisis de los factores remodeladores de la cromatina obtenidos a partir de ovocitos y embriones tempranos.**

### **5.1.- Nucleoplasmina de *Xenopus laevis*.**

La nucleoplasmina de los ovocitos de *Xenopus laevis* es una molécula que ha tenido una gran importancia para definir el concepto de "chaperón molecular", para estudiar los mecanismos de transporte y acumulación de moléculas en el núcleo celular y para profundizar sobre la remodelación de la cromatina espermática. En esta introducción, no se realizará una revisión exhaustiva de todos los



**Figura 9.- Esquema de la acción de CAF y de HaT1P para ensamblar el tetrámero H3-H4 asociado al DNA. A)** El tetrámero H3-H4 formado se une a p48. **B)** La acetil transferasa (HaT1P) se une al complejo y se ejecuta la acetilación de las colas de las histonas. **C)** Luego se unen las subunidades p150 y p60 para terminar de constituir el complejo CAF-1, que permite la unión del DNA alrededor del tetrámero. **D)** La desacetilasa (HDI) facilita la liberación de las subunidades del CAF-1. **E)** Con la desacetilación de las histonas se libera p48, y posiblemente la nucleoplasmina (NPL) deposita las histonas H2A y H2B para constituir el core del nucleosoma

estudios efectuados sobre la nucleoplasmina, sino que se dará una visión cronológica de una selección de los trabajos más importantes donde se analiza su efecto en la remodelación de la cromatina espermática.

Laskey et al. (1977) buscaban un sistema *in-vivo* de ensamblaje de nucleosomas para luego estudiar los procesos involucrados en éste evento, así como la relación entre la estructura de la cromatina y la regulación de las actividades transcripcionales y replicacionales del DNA. Ellos trabajaron con extractos de ovocitos de *Xenopus* y observaron que la fracción sobrenadante (después de centrifugar el extracto a 145,000 g durante 1 hora) era capaz de ensamblar la cromatina. Sus principales observaciones fueron:

- El extracto convierte el DNA del virus SV40 en nucleoproteína.
- La nucleoproteína reconstituída cosedimenta con la cromatina nativa del virus SV40.
- La digestión con nucleasa micrococcal produce un patrón de nucleosomas muy ordenado, similar al obtenido durante la digestión de la cromatina de las células hepáticas.
- El extracto también inserta vueltas superhelicoidales en el DNA relajado unido covalentemente (circular).

Según ellos, el proceso no es cooperativo y requiere 4 componentes: **i)** histonas, **ii)** DNA, **iii)** una actividad "nicking-closing" (topoisomerasa), **iv)** un factor presente en el sobrenadante (posteriormente éste factor fue identificado como la nucleoplasmina; curiosamente dijeron que este "factor" es termolábil, pero más adelante rectificaron este punto).

En 1978, Laskey et al. presentan un importante trabajo en el donde mostraron que los extractos de ovocitos de *Xenopus* contienen una proteína ácida (posteriormente, se denominó nucleoplasmina) que se une a las histonas, las transfiere al DNA y ensambla nucleosomas en un medio "fisiológico" (es decir, a fuerza iónica similar a la que se encuentra en la célula). En resumen, los procesos experimentales que presentan son:

- i)** Se sabe que los nucleosomas pueden ser reconstituídos a partir de DNA e histonas a través de diálisis extensivas en un medio con fuerzas iónicas muy elevadas (por ejemplo, 1M NaCl, 5M urea), pero a concentraciones iónicas bajas ("fisiológicas") el DNA y las histonas precipitan porque forman complejos inespecíficos por interacción electrostática. La adición de pequeñas cantidades de extracto de ovocitos de *Xenopus* evita la precipitación a fuerzas iónicas bajas y provoca la formación de nucleosomas (ref, 3-7).
- ii)** En el trabajo, tratan los extractos de ovocito con RNasa, DNasa y diversas proteasas, llegando a la conclusión de que el factor ensamblador es de naturaleza proteica.
- iii)** Fraccionando los extractos por sedimentación en gradiente de sacarosa. Una de las fracciones (aprox. 11S) presenta actividad ensambladora. Cuando tratan esta fracción con 80°C durante 10-15 minutos, demuestran que la actividad ensambladora se mantiene en el sobrenadante termoestable.
- iv)** Repurifican ésta actividad por cromatografía de intercambio aniónico usando DEAE y encuentran una proteína responsable de la actividad.
- v)** Esta proteína presenta un peso molecular aparente por electroforesis en SDS de aproximadamente 29 KDa; se resuelve en dos bandas electroforéticas. En

condiciones no desnaturalizantes se comporta con un peso molecular superior a 100 KDa.

Hasta este momento, parecía que la nucleoplasmina era la única actividad que había en los ovocitos de *Xenopus* para reconstituir la cromatina.

A partir de aquí, se realizaron estudios para localizar nucleoplasmina en ovocitos de otras especies, y en células somáticas. Tanto, Krohne & Franke (1980a,b) como posteriormente Cotten & Chalkley (1987) descubren diversas "nucleoplasminas" en diferentes líneas celulares, tanto germinales (femeninas) como somáticas. La hipótesis de estos autores es que la nucleoplasmina (o moléculas similares) podrían ser responsables en diferentes células de reconstituir los nucleosomas durante la transcripción y replicación. Debemos decir, que estos trabajos no han prosperado, puesto que las "nuevas nucleoplasminas" eran fundamentalmente identificadas a través de anticuerpos anti-nucleoplasmina que resultaron poco específicos para esta proteína. El hecho, después de estos trabajos, es que (tal y como se verá más adelante) sólo se ha encontrado claramente nucleoplasmina (como proteína) en ovocitos de anfibios.

En 1980, Earnshaw et al. analizaron la reacción de ensamblaje de nucleosomas por acción de la nucleoplasmina (NP) purificada. En este trabajo, se aportó la idea que la NP se encuentra en forma de pentámero, que la NP se uniría a las histonas y no al DNA, y que la velocidad de ensamblaje sería más o menos idéntica a la producida por el extracto. Otro resultado que aportaron, se refiere al hecho de no haber encontrado evidencia de que la NP posea una interacción específica con alguna histona en particular, pero dos años más tarde Kleinschmidt & Franke (1982) observaron que la NP se encuentra en el ovocito unida exclusivamente a las histonas H2A-H2B, mientras que la H3 y H4 se encuentran unidas a otro complejo denominado N1/N2, que posteriormente fue caracterizado molecularmente (Kleinschmidt et al., 1986).

La secuencia de aminoácidos de la NP de *Xenopus laevis* fue determinada a partir del clonaje de su gen (Dingwall et al., 1987; Bürglin et al., 1987). El gen de la NP clonado por Dingwall et al. (1987) expresa una NP con 200 residuos aminoacídicos; mientras que la NP expresada por el gen clonado por Bürglin et al. (1987) contiene 190 aminoácidos; sin embargo, en ambos casos la NP expresada tiene actividad funcional (Fig.10). Cuando se comparan las secuencias de NP obtenidas por ambos grupos, se puede observar dos diferencias:

- i) La secuencia de Bürglin contiene 10 aminoácidos menos; faltan 6 aminoácidos al inicio de la secuencia y un cluster de 4 aminoácidos que corresponden al grupo del 134-137 (Glu Ala Glu Gly) en la secuencia de Dingwall. Éste cluster está contenido en el dominio de poliglutámicos.
- ii) Al alinear las secuencias, se observa que la secuencia de Bürglin contiene 12 aminoácidos que son diferentes a los de Dingwall. Así, el porcentaje de identidades sería del 88%.

En la Fig. 10, se muestra la secuencia de aminoácidos determinada a partir del cDNA del gen clonado por Dingwall et al. (1987). Hacia el extremo carboxilo terminal, la molécula de NP es muy hidrofílica y contiene un dominio polianiónico rico en glutámicos más algunos residuos de Asp, y forman 3 clusters polianiónicos separados por residuos no cargados. Ésta región podría ser responsable de la interacción con las histonas y facilitar el ensamblaje de los nucleosomas. Por otro lado, los últimos 50 residuos de la secuencia tienen una composición de aminoácidos similar a las histonas H1 en abundancia de Lys y Ala (Dingwall & Allan, 1984). También es interesante el hecho que la HMG1 tiene una secuencia de 41 residuos ácidos en su carboxilo terminal (Walker et al., 1980), y de forma similar a la nucleoplasmina facilita el ensamblaje del core nucleosómico en fuerza

iónica fisiológica (Bonne-Andrea et al., 1984).

A:	1							8								16
B:					Phe	Arg					Val					
C:	Met	Ala	Ser	Thr	Val	Ser	Asn	Thr	Ser	Lys	Leu	Glu	Lys	Pro	Val	Ser
D:	ATG	GCC	TCT	ACA	GTG	AGC	AAC	ACC	AGC	AAA	CTT	GAG	AAA	CCT	GTG	TCC
A:								24								32
B:											Asn				Ala	
C:	Leu	Ile	Trp	Gly	Cys	Glu	Leu	Asn	Glu	Gln	Asp	Lys	Thr	Phe	Glu	Phe
D:	CTT	ATA	TGG	GGG	TGT	GAA	CTG	AAT	GAG	CAA	GAC	AAG	ACG	TTT	GAG	TTT
A:								40								48
B:		Ile			Glu											
C:	Lys	Val	Glu	Asp	Asp	Glu	Glu	Lys	Cys	Glu	His	Gln	Leu	Ala	Leu	Arg
D:	AAG	GTA	GAA	GAT	GAT	GAG	GAA	AAA	TGT	GAG	CAT	CAG	TTG	GCG	TTG	CGC
A:								56								64
B:												His				
C:	Thr	Val	Cys	Leu	Gly	Asp	Lys	Ala	Lys	Asp	Glu	Phe	Asn	Ile	Val	Glu
D:	ACG	GTG	TGT	CTG	GGG	GAC	AAG	GCA	AAG	GAT	GAG	TTC	AAC	ATT	GTA	GAA
A:								72								80
B:								Lys			Pro					Ser
C:	Ile	Val	Thr	Gln	Glu	Glu	Gly	Ala	Glu	Lys	Ser	Val	Pro	Ile	Ala	Thr
D:	ATC	GTT	ACA	CAA	GAG	GAG	GGA	GCG	GAA	AAA	TCT	GTT	CCA	ATT	GCC	ACT
A:								88								96
B:																
C:	Leu	Lys	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Met	Ala	Thr	Met	Val	Gly	Ile	Glu	Leu
D:	CTA	AAG	CCT	TCT	ATT	CTA	CCC	ATG	GCA	ACT	ATG	GTG	GGC	ATT	GAG	CTG
A:								104								112
B:															Val	
C:	Thr	Pro	Pro	Val	Thr	Phe	Arg	Leu	Lys	Ala	Gly	Ser	Gly	Pro	Leu	Tyr
D:	ACT	CCT	CCA	GTT	ACT	TTC	CGG	TTA	AAA	GCT	GGT	TCC	GGC	CCA	CTG	TAC
A:								120								128
B:																
C:	Ile	Ser	Gly	Gln	His	Val	Ala	Met	Glu	Glu	Asp	Tyr	Ser	Trp	Ala	Glu
D:	ATC	AGT	GGT	CAA	CAC	GTA	GCG	ATG	GAG	GAA	GAT	TAC	TCA	TGG	GCA	GAA
A:								136								144
B:																
C:	Glu	Glu	Asp	Glu	Gly	Glu	Ala	Glu	Gly	Glu						
D:	GAG	GAA	GAT	GAA	GGG	GAA	GCT	GAA	GGA	GAA	GAG	GAG	GAA	GAG	GAA	GAA
A:								153								161
B:																
C:	Asp	Pro	Gln	Glu	Ser	Pro	Pro	Lys	Ala	Val	Lys	Arg	Pro	Ala	Ala	Thr
D:	GAT	CAA	GAA	TCT	CCA	CCC	AAA	GCT	GTA	AAG	AGG	CCT	GCG	GCT	ACC	AAA
A:								170								178
B:																
C:	Ala	Gly	Gln	Ala	Lys	Lys	Lys	Lys	Leu	Asp	Lys	Glu	Asp	Glu	Ser	Ser
D:	GCA	GGC	CAG	GCA	AAG	AAG	AAG	AAA	CTT	GAC	AAA	GAG	GAC	GAG	AGC	TCC
A:								186								194
B:																
C:	Glu	Glu	Asp	Ser	Pro	Thr	Lys	Lys	Gly	Lys	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly	Arg
D:	GAG	GAA	GAC	AGT	CCA	ACC	AAA	AAG	GGC	AAA	GGA	GCC	GGA	AGA	GGA	AGA
A:								200								
B:																
C:	Lys	Pro	Ala	Ala	Lys	Lys										
D:	AAG	CCG	GCT	GCT	AAG	AAG										

**Figura 10.- Secuencia de aminoácidos de la nucleoplasmina de *Xenopus laevis*.** Se muestra la secuencia del cDNA clonado que codifica para la nucleoplasmina de *X. laevis* (D), y la secuencia de aminoácidos deducida a partir del clon (C), el número de orden de los aminoácidos se indica en A (Dingwall et al., 1987). En B se muestra la secuencia de aminoácidos deducida para la nucleoplasmina A (Bürglin et al., 1987), sólo se indican los aminoácidos diferentes y el cluster ausente en posición 135-138. En el extremo C-terminal la molécula es muy hidrofóbica y contiene un gran dominio ácido donde predominan las secuencias de poliglutámicos (resaltados por los bordes de las celdas).

Otra característica estructural interesante de la NP de *Xenopus laevis* es la presencia de una señal de localización nuclear (NLS), y su estudio ha contribuido al entendimiento del tráfico molecular desde el citoplasma al núcleo. Inicialmente, la presencia de la NLS se demostró por el clivaje proteolítico parcial del pentámero de NP con pepsina; de éste clivaje se obtiene dos dominios, uno denominado "core" y es residual al pentámero que permanece estable en el citoplasma y se encuentra ausente en el núcleo; el otro producto del clivaje fueron las "colas" (de los monómeros) que rápidamente fueron acumuladas en el núcleo. Éstos resultados indican que la NLS está contenida en las colas; y el core del pentámero conteniendo una sola cola puede ser dirigido al núcleo. Las múltiples NLS potenciarían la rápida incorporación nuclear de la molécula (Dreyer et al., 1986; Lanford et al., 1986). Por otro lado, si el core es directamente inyectado al núcleo permanece retenido, indicando que la NLS es sólo requerida para el ingreso de la molécula de NP al núcleo pero no para su retención en éste compartimento celular (Dingwall et al., 1982).

En base a la secuencia de la NP, Dingwall et al. (1987) determinó hasta 4 posibles dominios que podían ser considerados NLS, y que corresponden a los aminoácidos: 156-162, 166-172, 183-189, 195-199. La comparación de éstos clusters con la NLS del antígeno-T del SV40 estableció que el cluster de aminoácidos 166-172 era el mejor candidato para ser considerado la NLS, puesto que corresponden a 4 residuos básicos consecutivos que es la característica de la NLS del antígeno-T del SV40 (Smith et al., 1985). Posteriormente, la NLS fue identificada como un gran dominio de 16 aminoácidos (155-170), los extremos amino y carboxilo de éste dominio corresponden a residuos de Lys, y la sustitución de uno de ellos no afecta la localización nuclear de la NP (Dingwall et al., 1988), pero la delección de ambos residuos anula la NLS (Dingwall et al., 1989).

Probando un gran número de secuencias mutadas de la NP en la secuencia de aminoácidos que contiene la NLS, y que fueron fusionadas a la proteína piruvato quinasa para inducir su localización nuclear (Robbins et al., 1991) se demostró que la NP contiene 2 dominios básicos que funcionan en forma independiente entre ellos (las mutaciones puntuales en uno u otro dominio, no anulan la NLS). Éstos dominios son separados por una secuencia espaciadora de 10 aminoácidos, y ésta región tolera mutaciones puntuales y algunas inserciones de aminoácidos adicionales.

El motivo NLS de la NP tiene secuencias homólogas con las proteínas N1, funcionalmente relacionadas (Kleinschmidt & Seiter, 1988) y con la proteína nucleolar NO38 de *Xenopus* (Schmidt-Zachmann et al., 1987), y otras proteínas como la p53, receptores de glucocorticoides, esteroidales y androgénicos (ver Robbins et al., 1991; Figura 5). En general, éste tipo de NLS parece ser frecuente en algunas proteínas de localización nuclear y raramente se encuentra en proteínas citoplasmáticas que son señalizadas para localizarse al interior de alguna organela. De ésta forma, la NLS de la NP ha posibilitado establecer un nuevo modelo de localización nuclear denominado NLS bipartita.

Krohne & Fanke (1980a,b) describieron la NP como una fosfoproteína. Ésta modificación post-traducciona de la NP confiere a la molécula heterogeneidad estructural y diferencias funcionales dependiendo del nivel de fosforilación de la molécula. Sealy et al. (1986) observaron que la forma pentamérica de la NP obtenida de ovocitos maduros sin fertilizar migra en SDS-Page con un peso molecular aparente de 165 kDa, mientras que la NP pentámero obtenida de ovocitos lo hace con 150 kDa. En su forma de monómero, la NP de los ovocitos maduros tiene mayor heterogeneidad, y es más acídica, su peso molecular aparente corresponde a 33,5 y 31,2 kDa; y el monómero de NP obtenida de ovocitos es de 30,3 kDa. Las digestiones enzimáticas con tripsina y pepsina evidenciaron que la heterogeneidad estructural de la forma pentamérica y monomérica de la NP está contenida en la parte amino terminal de la molécula. Funcionalmente, la NP del ovocito maduro sin fertilizar es más eficiente que la nucleoplasmina de ovocito en la formación de

nucleosomas sobre DNA circular del plásmido pBR322 a fuerza iónica y tasa de histonas:DNA fisiológicas. El tratamiento con fosfatasa alcalina demostró que la hiperfosforilación de la NP del ovocito maduro fue la responsable de las diferentes características estructurales de la molécula en comparación a la NP del ovocito.

Posteriormente, en éste mismo sentido se demostró que la hiperfosforilación de la NP se mantiene desde el estado de ovocito maduro hasta el estado de media-blástula. Al menos, la NP hiperfosforilada es dos veces más potente en la remoción de las proteínas específicas del espermatozoide de *Xenopus laevis* en comparación a la NP del ovocito. En éste mismo sentido, Leno et al. (1996) demuestran que el extracto y NP hiperfosforilada del ovocito maduro de *Xenopus laevis* descondensa y remueve las proteínas básicas específicas de la cromatina espermática en forma más rápida que el extracto high-speed del ovocito o que la NP purificada a partir de éste, y que se caracteriza por su hipofosforilación.

Cuando el ovocito de *Xenopus* reinicia la meiosis (madura), se inicia la fosforilación de la NP, cada monómero adquiere entre 14-20 grupos fosfatos; así, una molécula de NP pentámero podría contener entre 70-100 fosfatos. Finalmente, el nivel de fosforilación de ésta proteína excede en cantidad de fosfatos al DNA del ovocito por un factor de  $10^4$  (Laskey, 1983). La adquisición de éste gran número de fosfatos podría modificar la molécula de NP transformándola en un potente competidor del DNA por las histonas durante la remodelación de la cromatina espermática.

La NP puede ser fosforilada *in-vitro* con la proteína quinasa cdc2, pero no se consigue el nivel de hiperfosforilación que presenta la NP purificada del ovocito maduro y aunque la actividad funcional aumenta, tampoco se consigue un nivel de remoción comparable a la NP obtenida del ovocito maduro. De ésta forma, es posible que la fosforilación de la NP se consiga por diversas quinasas (algunas inespecíficas) que actúan durante la maduración del ovocito (Ohsumi et al., 1995). Interesantemente, estos mismos autores (Ohsumi et al., 1995) observan que la fosforilación de las proteínas específicas del espermatozoide pueden ser fosforiladas por la quinasa cdc2, y como consecuencia de ésto, la actividad de remoción mediada por la NP fue mejorada. Similarmente, Dimitrov et al. (1994) observaron que la remodelación de la cromatina del núcleo espermático de *Xenopus* es acompañada por la fosforilación de las histonas core.

Al parecer la fosforilación de la NP no sólo es una característica asociada a la remodelación de la cromatina espermática. Vancurova et al.(1995) observaron que el grado de fosforilación afecta el transporte de la NP desde el citoplasma al núcleo. Éstos autores consiguen copurificar un complejo de NP con una quinasa identificada como una caseína quinasa II -like (CK-II like). La inhibición de ésta actividad quinasa, inhibe el transporte de la NP al núcleo. Ésta quinasa es capaz de fosforilar a la NP, y la actividad es inhibida por poli-lisina, histona H1 e histonas core, la protamina no tiene ningún efecto sobre la actividad quinasa; y tanto la histona H1 e histonas core estimulan la fosforilación de la CK-II. Desde el punto de vista que la nucleoplasmina actúa como parte de un complejo de remodelación es interesante suponer que ésta CK-II like podría formar parte de éste complejo. Asimismo, la NLS bipartita de la NP tiene en su lado carboxilo terminal una secuencia blanco para quinasas como la CK-II y p34<sup>cdc2</sup> (Robbins et al., 1991).

Hasta la actualidad, muchos esfuerzos han sido realizados para caracterizar molecularmente la NP de *Xenopus laevis*; sin embargo, el mecanismo molecular de su función no está totalmente claro. Luego, que la NP fuera descrita como un chaperon molecular que participa en la remodelación de la cromatina espermática, varios grupos de investigadores han dedicado esfuerzos para purificar y caracterizar moléculas tipo NP en diferentes especies (y en general corresponden a modelos de remodelación de la cromatina espermática diferentes al caso de *Xenopus laevis*).

De ésta forma, se han descrito moléculas NP-like en especies como: *Spisula solidissima* (Herlands & Maul, 1994), *Mytilus edulis* (Rice et al., 1995), *Drosophila melanogaster* (Ito et al., 1996a, Crevel et al., 1997), y *Bufo japonicus* (Ohsumi & Katagiri, 1991a). De estos estudios, los más extensos en cuanto a la caracterización molecular, son los realizados en NP-like de *Drosophila melanogaster*. Por su trascendencia, éstos trabajos son revisados más adelante (ver Introd. 5.2).

Por otro lado, la NP-like que fue purificada y caracterizada a partir de extractos de ovocitos de *Bufo japonicus* parece tener mayor relación con la NP de *Xenopus* al menos funcionalmente, y parcialmente a nivel molecular, puesto que se desconoce su estructura primaria (rev., Katagiri & Ohsumi, 1994). Una razón que podría explicar ésta similitud sería la estrecha relación filogenética que existe entre estas especies. En resumen, Ohsumi & Katagiri (1991) encontraron una actividad descondensadora *in-vitro* de los núcleos espermáticos de *Bufo japonicus*; ésta actividad se corresponde con la remoción de las proteínas básicas del núcleo espermático, que en ésta especie se trata de 2 moléculas de protamina denominadas P1 y P2 (Takamune et al., 1991). Luego, éstas protaminas son reemplazadas por histonas nucleosomales, donde la histona H2A es reemplazada por una histona H2A.X, y la histona H1 por un subtipo específico que en ambos casos son histonas específicas de los estados de clivaje de los embriones (Ohsumi & Katagiri, 1991b).

La actividad de remoción de las protaminas (denominada PRA, "protamine-removing activity") fue purificada de los extractos de ovocitos maduros de *Bufo japonicus*, y parcialmente caracterizada. La actividad PRA contiene una proteína termoestable (a 100°C durante 10 minutos) que electroforéticamente muestra un peso molecular aparente de 140 y 36 kDa en geles nativos y SDS-Page respectivamente. Su punto isoeléctrico varía entre 4.2-4.5, y posee una composición de aminoácidos muy similar a la NP de *Xenopus laevis*. En éste nivel de caracterización de PRA, Ohsumi & Katagiri (1991a) concluyen que ésta molécula es idéntica a la NP de *Xenopus*. Adicionalmente, ésta molécula tiene actividad descondensadora y de remoción de las protaminas del núcleo espermático humano (Itoh et al., 1993); de forma similar, una fracción de extracto de ovocito maduro de *Xenopus laevis* actúa sobre la cromatina del núcleo espermático humano, pero ésta fracción es termolábil (Brown et al., 1991). En éste sentido, se podría plantear que no existe aún una demostración inequívoca para afirmar que la actividad PRA de *Bufo japonicus* sea idéntica a la NP de *Xenopus*, aún es necesario una mayor caracterización de la actividad PRA.

## 5.2.- Estudios en *Drosophila*.

Hemos escogido para esta sección como punto de partida el trabajo de Berrios & Avilion (1990). Estos autores obtuvieron extractos de embriones de *Drosophila* de 0 a 5 horas (es decir, desde el óvulo fecundado hasta embriones tempranos). Incubando núcleos desmembrados de *Xenopus* con estos extractos, observaron que los extractos (tanto de óvulo fecundado como de embriones tempranos) indujeron primero la descondensación de la cromatina espermática, y posteriormente la formación del pronúcleo masculino "completo", el cual contiene membranas, complejos de poro, lamininas, topoisomerasa II, etc.

La principal consecuencia que se deriva de estos experimentos, es que los extractos de óvulos y embriones tempranos, contienen toda la maquinaria molecular para recambiar la estructura de la cromatina espermática y formar la cromatina embrionaria durante los primeros estadios del desarrollo embrionario.

Los procesos de recambio (remodelación) de la cromatina espermática por actividades remodeladoras contenidas en los extractos de embriones tempranos de *Drosophila* fueron analizados posteriormente por diversos grupos de investigadores.

Kawasaki et al. (1994), estudiando la actividad remodeladora de los extractos embrionarios de *Drosophila* encontraron dos actividades (dos sistemas implicados):

- p22 (una proteína termoestable de 22 KDa).
- Otra "actividad" termoestable con actividad descondensadora, luego de depletar la proteína p22 del extracto.

La p22 es una proteína que se obtuvo de optimizar (en su sistema) los métodos de purificación de la nucleoplasmina de *Xenopus*. Demostraron que la p22 es una proteína capaz de inducir la descondensación de la cromatina espermática de *Xenopus*, a través de la depleción selectiva de las proteínas X e Y de los núcleos espermáticos (X e Y corresponden a las SP descritas por Bols & Kasinsky, 1973). Además, la proteína p22 se localiza en el núcleo pero no en el nucléolo, y se la encuentra en todo el desarrollo (desde embrión temprano hasta adulto), a diferencia de la NP de *Xenopus* que desaparece en el estado de media-blástula (Bürglin et al., 1987).

En trabajos posteriores, Crevel et al. (1997) clonaron y estudiaron una proteína purificada de extractos embrionarios y que se denomina CPR-1. La secuencia de esta proteína corresponde exactamente a la p22 descrita por Kawasaki et al. (1994). Con la CPR-1 se demostró que:

- i) Presenta aproximadamente un 22% de identidades en su secuencia con la nucleoplasmina de *Xenopus laevis*, y contiene una NLS similar a la NP en su C terminal (Dingwall et al., 1987). Con la proteína del nucléolo denominada NO38 sólo tiene un 15% de identidades (Schmidt-Zachmann et al., 1987).
- ii) Está codificada por uno o pocos genes muy relacionados (similares) entre sí. Se ubica en la posición 99A del cromosoma 3.
- iii) Se expresa durante la oogénesis y se almacena como mRNA (poliadenilado). Se traduce durante la embriogénesis, en abundancia relativa durante la embriogénesis, relativamente en abundancia durante los primeros clivajes embrionarios.
- iv) Se asocia formando tetrameros o pentámeros.
- v) Descondensa la cromatina del espermatozoide de *Xenopus* y es capaz de sustituir el efecto de la nucleoplasmina en los extractos de *Xenopus*.
- vi) Se une a la cromatina.

Crevel & Cotteril (1995), también estudiaron la "actividad termoestable" descrita por Kawasaki et al. (1994). Esta actividad fue denominada DF-31 (proteína de 31 KDa), y en trabajos posteriores la denominaron CPR-2 (Crevel et al., 1997). La proteína CPR-2, al igual que CPR-1 descondensa la cromatina espermática de *Xenopus*, desplazando las proteínas específicas X e Y; es capaz de ensamblar nucleosomas en DNA espermático descondensado y también el DNA desnudo, además, se une a las histonas del core nucleosómico (ver Fig. 11).

<b>p22 = CPR-1:</b>	22% de identidades con la NP de <i>Xenopus</i> . Descondensa la cromatina espermática de <i>Xenopus</i> . Remueve específicamente X e Y.
<b>DF-31 = CPR-2:</b>	Descondensa la cromatina espermática de <i>Xenopus</i> . Remueve X e Y. Reconstituye nucleosomas en DNA no replicativo, pero no en "array" ordenados. Se encuentra unida a las histonas del core.
Las actividades coexisten en los extractos y seguramente actúan en conjunto (y conjuntamente con otras actividades, ver más adelante).	

**Figura 11.- Resumen de los resultados obtenidos al estudiar la nucleoplasmina-like de *Drosophila melanogaster***

Estos estudios sugieren que *Drosophila* tiene un mecanismo similar a la nucleoplasmina de *Xenopus* (o mejor, al sistema nucleoplasmina-N1/N2). Sin embargo, los estudios del grupo de Kadonaga demuestran que la situación es más complicada. Estos autores (Ito et al., 1996a) hacen notar que el mecanismo de ensamblaje de la cromatina (ya sea durante la remodelación del núcleo espermático, como durante las primeras fases embrionarias) es un proceso más complejo que la simple deposición al azar de las histonas en los nucleosomas catalizadas por factores remodeladores "histone-binding"; por ejemplo, se sabe que la actividad ensambladora de la cromatina producida por los extractos de ovocitos de *Xenopus* (Kamakaka et al., 1993), células HeLa (Banerjee & Cantor, 1990) o embriones de *Drosophila* (Becker & Wu, 1992; Kamakaka et al., 1993) es una actividad que deposita los nucleosomas en espaciados regulares y además es dependiente de la hidrólisis de ATP.

El grupo de Kadonaga (Kamakaka et al., 1993; Bulger et al., 1995; Ito et al., 1996a,b) demostró que en ovocitos y embriones tempranos de *Drosophila* existen dos variantes del factor CAF:

- dCAF-1 (similar al descrito en la sección anterior, 4.2).
- dCAF-4 (que también es una fracción de varias proteínas).

Los factores dCAF-1 y dCAF-4 serían capaces de ensamblar nucleosomas en "arrays" ("filas") ordenados, de manera dependiente de la hidrólisis de ATP. El factor CAF-1 fue analizado en la sección anterior (Introd. 4.2.1). La "fracción" dCAF-4 (Bulger et al., 1995) estaría compuesta por al menos tres proteínas diferentes:

- dNAP-1 (Ito et al., 1996b).
- dNLP (Ito et al., 1996a).
- Una actividad ATPásica (Ito et al., 1996a).

El factor dNAP-1 se encuentra sobretodo en el citoplasma, coloca nucleosomas por si solo, y colabora en forma cooperativa con el factor dCAF-1 para ensamblar nucleosomas en forma dependiente de la hidrólisis de ATP (Ito et al., 1996a).

El factor dNLP se encuentra preferentemente en el núcleo. Presenta una gran importancia para poder comenzar a interpretar las relaciones entre los diferentes factores: la dNLP fue secuenciada (Fig. 12), y resulta ser idéntica a la proteína p22 (CPR-1, Crevel et al., 1997). La proteína que describe Ito et al. (1996a) y la denomina dNLP no es exactamente idéntica a la CPR-1 (al menos funcionalmente), pero es indiscutible que las secuencias de las dos proteínas son

idénticas en un 100%. Según, Ito et al. (1996a,b), la dNLP:

- i) Se une a las histonas del core nucleosómico (pero con menor afinidad que la dNAP-1).
- ii) Puede ensamblar la cromatina en arreglos regulares ("arrays") siempre que sea incubada con histonas, DNA, ATP, y con una fracción adicional citoplasmática que también posee actividad descondensadora.
- iii) Por sí sola no es capaz de descondensar la cromatina del espermatozoide de *Xenopus* (en este punto los resultados difieren de los reportados por Crevel et al. (1997)).

En la Fig. 13, se intenta mostrar en un esquema la sinopsis sobre lo que se conoce de las fracciones CAF de *Drosophila melanogaster* relacionado a la remodelación de la cromatina.

Adicionalmente a éste panorama, en *Drosophila* se encontraron otras proteínas que tienen secuencias relacionadas con la proteína dNAP-1. Estas son conocidas como proteínas SET en humanos y *Drosophila* (von Lindern et al., 1992; Kellogg et al., 1995), y en levadura la proteína relacionada a NAP-1/SET denominada "ORF YNL246w"

	1					50
DNLP	+++++ +++ ++	++MAEESFYG	* VTLTA ESDSV	* TWDVDEYAR	* * +GQKLVI K Q I	
Nucleoplasmina	MASTVSNTSK	LEKPVSL IWG	CELNEQDKTF	EF K VEDDEEK	CEHQLALRTV	
	51					100
	* *	** ** *		*** *	* *	*
DNLP	* L LGAEAKEN E	FNVVEVNTPK	DSVQ++ I PI A	* VL KAGE+ TRA	VNPDV EFYES	
Nucleoplasmina	CLGDKAKD+ E	FN I VEI VTQE	EGAESVPI A	TL KPS I L PMA	TMVG I EL+ TP	
	101					150
DNLP	*** * **	** * * *	* + + KDDVEVVD	* * MEE DDEEDDV	* ** * AEDEEDE HPK	
Nucleoplasmina	KVTFKL I KGS	GPVY I HGHN I	AMEEDYSWAE	E EDEGEAEGE	EEEEEEE DOE	
	151			<u>Región Acídica</u>		
						200
	* *	* *	* *			
DNLP	KRAK+ I ENAA	DGKNA K NNKK	K++++ ++ ++ +	+++ +++++ ++	+ + + + +++++	
Nucleoplasmina	SPPKAV <u>KRPA</u>	<u>AT KKAGQAKK</u>	<u>KKLDKEDESS</u>	EEDSPTKKGK	GAGRGRKPAA	
	201		<u>NLS</u>			
DNLP	++					
Nucleoplasmina	KK					

**Figura 12.-** Secuencia de aminoácidos de la proteína dNLP de *Drosophila melanogaster*. La dNLP corresponde al core de la proteína de 22 kDa y que forma parte de la fracción dCAF-4 de *Drosophila melanogaster*. Se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos (en código de una letra) de la nucleoplasmina-like de *Drosophila* (dNLP) y de la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* (nucleoplasmina)

(Bürglin et al., 1987; Dingwall et al., 1987). La secuencia de aminoácidos de la dNLP fue obtenida a partir de la secuencia de su cDNA. Los asteriscos indican los aminoácidos que son idénticos en ambas proteínas, la región acídica se muestra con letras en negrita, y la señal de localización nuclear (NLS) se muestra en negritas cursivas. (Ito et al., 1996a)

Las principales ideas básicas que emergen de los estudios mencionados, son que hasta ahora nos encontramos en una fase enormemente inicial, para comprender como sucede realmente *in-vivo* el ensamblaje de la cromatina. Parece ser que existe un gran número de factores que pueden intervenir, pero muchos de ellos aún no han sido purificados ni caracterizados. La función específica de cada factor aún debe ser determinada e integrada con la función que realizan las demás moléculas. Más aún, parece que existe una gran redundancia funcional entre los factores de ensamblaje (Ito et al., 1996a), lo cual facilitaría la posibilidad de que se haya producido divergencias constitucionales y funcionales entre ellas (por ejemplo, en la Fig. 12 se muestra la secuencia de la dNLP y su similitud relativa con la nucleoplasmina de *Xenopus*).

<b>CAF</b>	p48 (se puede encontrar en el citoplasma; acetila histonas). p150, p60 (se encuentra en el núcleo, tiene actividad ATPásica, y reconstituye nucleosomas con histonas acetiladas)
<b>Fracción dCAF-4</b>	dNAP-1 (se puede encontrar en el citoplasma, coloca nucleosomas, actúa cooperativamente con el dCAF -1) dNLP (=p22 =CPR-1) (se encuentra sobre todo en el núcleo, se une a histonas; ensambla nucleosomas en arreglos ("arrays") ordenados -con la concurrencia de otros factores-; 31% de idéntidades con la nucleoplasmina de <i>Xenopus</i> . Actividad ATPásica (se encuentra en el núcleo).
La fracción dCAF -4 no necesita DNA replicado para ensamblar nucleosomas. No se sabe, si los tres factores forman un complejo. Tampoco se sabe, si la CPR-2 equivale a la dNAP-1	

Figura 13.- Resumen de los resultados obtenidos del estudio del ensamblaje de la cromatina en embriones de *Drosophila melanogaster*.

### Un comentario sobre la nucleoplasmina de *Xenopus* y su posible ubiquidad.

Los trabajos sobre la nucleoplasmina del anfibio *Xenopus laevis*, fueron pioneros y abrieron el camino en el estudio de los "chaperones moleculares", de las señales de acumulación de las proteínas en el núcleo, y de la remodelación de la cromatina espermática durante el proceso de la fertilización y también durante los primeros estados del desarrollo embrionario.

De todas formas, existen algunas aseveraciones que habrían de ser cuestionadas antes de plantearse qué es lo que se busca cuando se comienza a estudiar un sistema desconocido. Es fácil encontrar en las introducciones o discusiones de los artículos de investigación (ver por ejemplo, Crevel et al., 1997) la premisa que: "...en *Xenopus*, el primer paso de la descondensación

del núcleo espermático está mediatizado por una única proteína, la nucleoplasmina". Esto podría ser cierto, pero puede inducir a los siguientes errores:

- i) No existe ninguna otra proteína(s), o factor(es), o proceso(s) que intervengan (en este "primer paso).
- ii) Como el primer paso de la descondensación de la cromatina (a nivel microscópico) es universal, la nucleoplasmina, o una proteína equivalente, habría de ser un factor universal para todas las especies.

Respecto al primer punto debemos hacer las siguientes anotaciones:

- a) Las incubaciones con nucleoplasmina sola, tienen un rendimiento extraordinariamente bajo cuando se compara con las incubaciones con extracto de los ovocitos (este hecho fue reportado por diversos autores, y es independiente del estado de fosforilación de la molécula).
- b) Se han descrito otras proteínas en el propio *Xenopus* (por ejemplo, las proteínas N1/N2) que podrían efectuar una acción similar a la nucleoplasmina.
- c) No está claro si la nucleoplasmina forma parte de un complejo mayor, y que el método drástico de purificarla (calentando 15 minutos a 80°C) la puede separar de otros factores de este complejo.
- d) No existe estudios sobre la posible cooperatividad de la nucleoplasmina con otros factores remodeladores de la cromatina.

Con respecto al segundo punto se debe decir que dejando a parte los ovocitos de anfibios, existen muy pocos estudios, y muy poco concluyentes, de que se encuentre una molécula homóloga y análoga a la nucleoplasmina de *Xenopus* (es decir, una proteína de origen y función idéntica). En tal sentido, es muy posible que la nucleoplasmina forme parte de toda una "familia" de factores involucrados en la remodelación de algunas cromatinas espermáticas y en el ensamblaje de las primeras fases embrionarias para diversas especies. Debemos dejar constancia que diversos factores de este tipo fueron descubiertos a través de optimizar los métodos de purificación de la nucleoplasmina de *Xenopus*. Sin embargo, los sistemas estudiados con más profundidad (*Drosophila* y erizo de mar) no parecen contener una molécula exactamente equivalente a la nucleoplasmina descrita en *Xenopus laevis*.

## 6.- Resumen de casos conocidos.

### 6.1.- Erizo de mar.

Es un sistema bastante bien estudiado en diversos niveles debido a la gran facilidad para obtener en el laboratorio, ovocitos activados, luego fertilizarlos *in-vitro* y lograr embriones en diferentes estados de desarrollo embrionario hasta los estados larvales.

En este apartado intentamos presentar integralmente los cambios que sufre el núcleo espermático del erizo de mar durante la fertilización y durante las primeras fases embrionarias. Esta breve revisión proviene fundamentalmente de los estudios efectuados por Poccia y colaboradores.

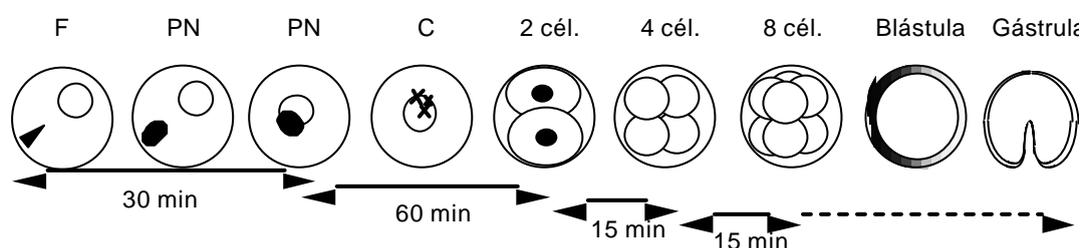
Recordaremos en primer lugar que durante la espermiogénesis, los núcleos de las espermátidas del erizo de mar van recambiando sus histonas H1, H2A y H2B por histonas específicas más básicas que se encuentran en el espermatozoide (SpH1, SpH2A, SpH2B). El núcleo espermático está compuesto exclusivamente por las histonas H3-H4, SpH2A, SpH2B y SpH1 (ver rev., Poccia, 1989, 1995; Poccia & Green, 1992; Green et al., 1995). Su nucleosoma contiene un

"repeat" anormalmente más extenso, de 240-260 pares de bases (Green & Poccia, 1988; Hill et al., 1990; ver rev., Poccia, 1995).

El ovocito del erizo de mar tiene un grupo de variantes de histonas acumulado que son utilizadas en el ensamblaje de la cromatina del cigote durante la formación del pronúcleo masculino y durante los estados de clivaje del desarrollo embrionario temprano. Éstas variantes de histonas son denominadas como, histonas específicas del clivaje ("cleavage-specific histone", CS) y corresponden a la CSH1, CSH2A, CSH2B (Salik et al., 1981).

El pronúcleo masculino de erizo de mar aislado de ovocitos fertilizados poliespermicamente *in-vitro* muestran una transición en el contenido de proteínas básicas asociadas al DNA con respecto al núcleo espermático. La cromatina espermática es uniforme y dispersa a los 15 minutos post-fertilización, en éste momento el pronúcleo contiene las histonas CSH1, SpH2A, una pequeña cantidad de SpH2B, las variantes O y P, dos formas de H3, H4 y una pequeña cantidad de CSH2A y CSH2B. Posteriormente, a los 30-90 minutos post-fertilización se reemplaza las formas O y P por CSH2B, y la SpH2A por la variante CSH2A, también se acumula otra variante de H3 (Poccia et al., 1981) (Fig. 14).

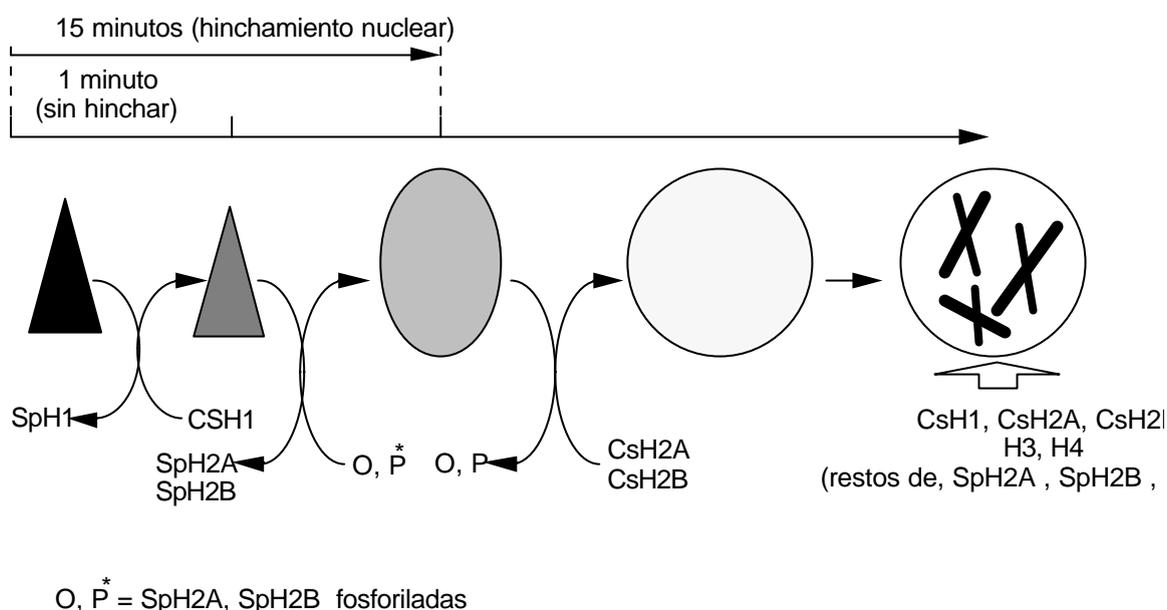
En realidad, el reemplazo de las histonas espermáticas ocurre a los 30-90 minutos; porque las variantes O y P son formas fosforiladas de SpH2B. De igual forma, la SpH1 es fosforilada y origina un derivado fosforilado que se denomina proteína N, antes de ser reemplazada por la CSH1. Así, existe evidencia que la SpH1 y SpH2B deben ser fosforiladas antes de ser recambiadas por sus respectivas variantes embrionarias (Green & Poccia, 1985, 1989).



**Figura 14.- Esquema del tiempo en curso del desarrollo temprano del embrión de erizo de mar. 1)** Durante los 30 primeros minutos existe hinchamiento del núcleo espermático y fusión de los pronúcleos. **2)** A partir de este punto comienza la síntesis de DNA; al cabo de aproximadamente 1 hora, más tarde se produce la primera división mitótica. **3)** Si bien el "primer ciclo celular" (primer clivaje) dura aproximadamente 90 minutos, a partir de este momento cada 12-15 minutos se produce un nuevo ciclo (nuevo clivaje). Estas divisiones rápidas conducen al embrión a los estados de mórula, blástula, y gástrula.

Luego que el ovocito de erizo de mar es fertilizado y alcanza a completar el primer clivaje (90 minutos post-fertilización), continúa progresivamente su desarrollo embrionario hasta alcanzar el estado de mórula, blástula y larva (larva pluteus). Durante desarrollo embrionario temprano, se producen cambios transicionales en las proteínas de la cromatina, de manera que la CSH1, CSH2A y CSH2B son reemplazadas en forma progresiva por variantes de histonas específicas del estado embrionario (Fig. 15).

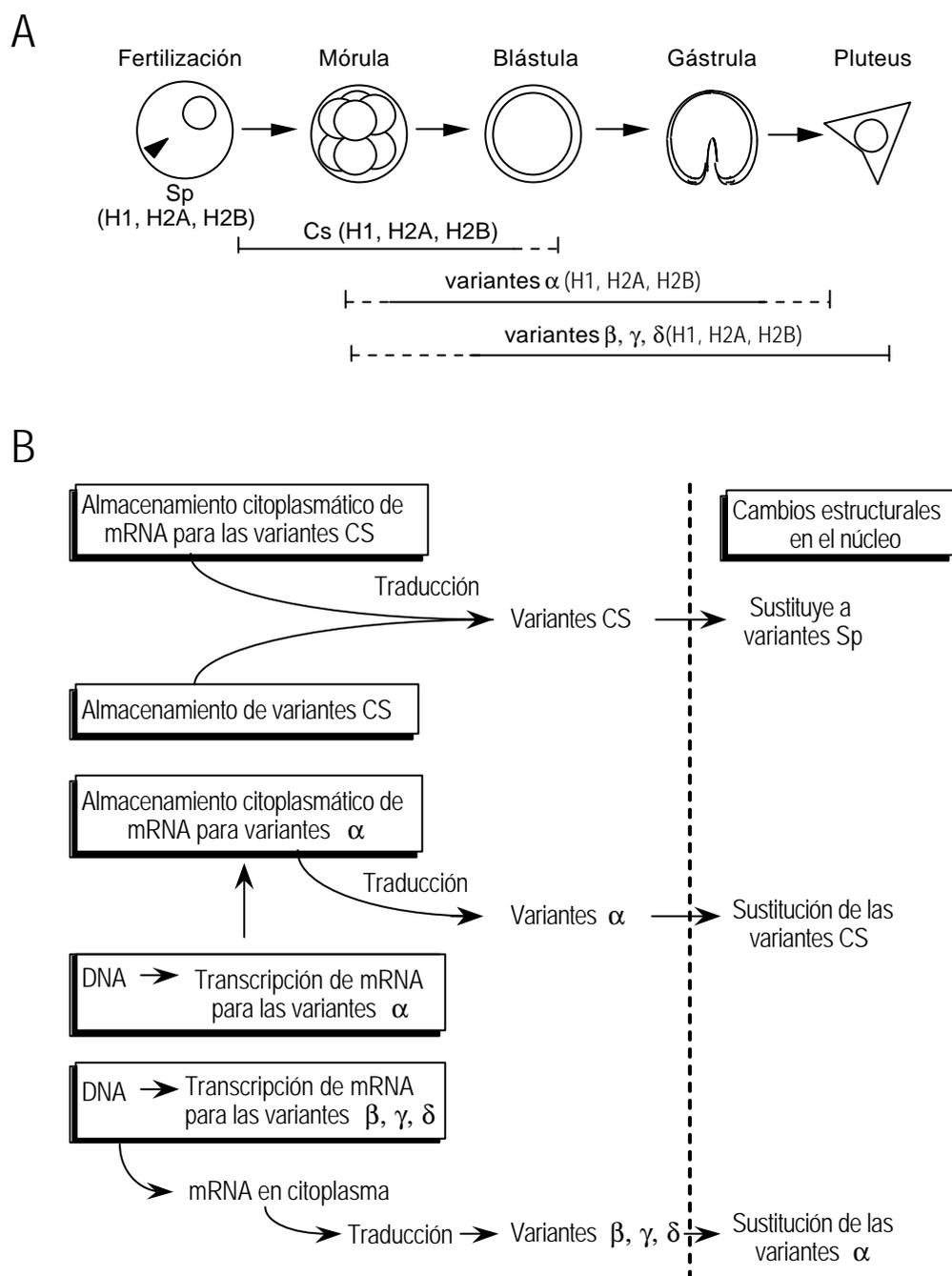
Es interesante mencionar, que los cambios de proteínas resumidos en la Fig. 15, se producen asociados al cambio de "repeat" del nucleosoma (Green & Poccia, 1988). Cuando la SpH1 es reemplazada por la CSH1 no se aprecia cambio del repeat. Sin embargo, cuando SpH2A y SpH2B son reemplazadas por sus variantes CS, el nucleosoma adquiere un tamaño similar al tipo somático (aprox. 200 pb); y cuando las CS son reemplazadas por la variante  $\alpha$ , el repeat vuelve a cambiar (Savic et al., 1981).



**Figura 15.- Recambio de las proteínas nucleares del espermatozoide de erizo de mar durante la transformación del núcleo espermático después de la fertilización.** Existe una continua renovación de variantes de histonas a lo largo del desarrollo embrionario hasta llegar al estado de larva pluteus. Las abreviaciones de las proteínas se explican de forma extensa en el texto.

Las histonas embrionarias son almacenadas en el ovocito, existe evidencia que el ovocito contiene mRNA de la variante- $\alpha$ , la cual aparece durante la transición del embrión de 8 células a blástula. No parece que exista almacenamiento de las variantes  $\beta$ ,  $\chi$  y  $\delta$ , las cuales aparecen en el estado de gástrula (Herlands et al., 1982). Los recambios de las histonas durante la fertilización y las primeras etapas embrionarias producidas por los procesos de sustitución y almacenaje se esquematizan en la Fig. 16.

A diferencia de la situación en *Xenopus laevis* (donde se encuentra nucleoplasmina y otras proteínas que se saben que efectúan los recambios de las proteínas asociadas al DNA); en el erizo de mar, no se han identificado moléculas similares. La formación del pronúcleo masculino inyectando núcleos espermáticos permeabilizados en ovocitos inmaduros, activados y fertilizados requiere dos etapas. La primera, involucra una descondensación nuclear parcial y se produce durante la maduración meiótica del ovocito, además, puede ser reversiblemente bloqueada por la inhibición de la fosforilación con 6-DMAP (inhibidor de la quinasa, 6-dimetilaminopurina). La segunda etapa, requiere la alcalinización citoplasmática del ovocito, pero no el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ni la activación de la vía del inositol trifosfato (ambos son inducidos por la fertilización) (Cothren & Poccia, 1993).



**Figura 16.-** **A)** Sustitución de las proteínas nucleares espermáticas durante las primeras etapas de diferenciación embrionaria en el erizo de mar. **B)** Esquema que muestra como la sustitución de las proteínas asociadas a la cromatina durante el desarrollo embrionario del erizo de mar involucra un proceso de almacenamiento: en el citoplasma hay depósito de las variantes CS y de sus mRNA para las variantes CS y  $\alpha$ ; por otro lado, ocurre la transcripción secuencial de los mensajeros para las variantes  $\alpha$  y luego  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ .

La formación del pronúcleo masculino en el erizo de mar fue estudiada en un sistema libre de células. Extractos "low-speed" de ovocitos fertilizados y sin fertilizar fueron probados para estudiar la descondensación del núcleo espermático *in-vitro*. Las principales observaciones de éste trabajo fueron:

- i) Los extractos de ovocitos fertilizados (activados) tienen actividad descondensadora de la cromatina espermática.
- ii) El pH ligeramente alcalino de los extractos de los ovocitos fertilizados facilita la descondensación del núcleo espermático, y no se requiere el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- iii) La descondensación requiere hidrólisis de ATP, y es bloqueada al inhibir las quinasas endógenas del extracto con 6DMAP y estaurosporina, en concentraciones efectivas *in-vivo*.
- iv) La descondensación requiere 40 minutos de incubación, luego se forma una envoltura nuclear durante 12 horas. Tanto la descondensación y la formación de la envoltura nuclear son procesos acelerados por la hidrólisis de GTP.

Posteriormente, se ha demostrado *in-vitro* que la formación completa del pronúcleo masculino ocurre en dos fases:

- i) La primera fase es una descondensación de la cromatina espermática independiente de membrana.
- ii) La segunda fase corresponde a la descondensación dependiente de membrana; es decir, de la formación de la envoltura nuclear del pronúcleo masculino.

En resumen, la primera fase corresponde a las observaciones realizadas por Cameron & Poccia (1994), y que se han detallado antes. La segunda fase ocurre después de la formación de la envoltura nuclear y es requerida para terminar de descondensar la cromatina espermática, éste proceso requiere hidrólisis de ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  y factores citosólicos, algunos de los cuales son sensibles al calor y a la N-acetilmaleimida (agente alquilante de los grupos sulfidrido) (Collas & Poccia, 1995a).

Por último, la pregunta que se plantea en el caso de la formación del pronúcleo masculino en el erizo de mar se refiere a, sí ¿la información necesaria para producir los cambios descritos está contenida en el citoplasma del ovocito antes de la fertilización, o bien es una información que se expresa progresivamente?. Los diferentes trabajos del grupo de Poccia y otros (ver rev. Poccia, 1989) evidencian que una buena parte de la información necesaria para el desarrollo de los primeros clivajes esta contenida en el ovocito, esto es demostrado cuando se observa que los procesos nucleares pueden ocurrir cuando se inhibe la traducción, transcripción y replicación. Sin duda, estos procesos nucleares son favorecidos porque el ovocito almacena una importante cantidad de aminoácidos (en forma de proteínas del vítelo), de DNA polimerasa, topoisomerasa, quinasas de los desoxinucleótidos, y RNAs suficientes para alcanzar el estado de blástula. Sin embargo, existe una parte de información epigenética que se produce luego de la fertilización, como es el incremento del pH (alcalinización intracelular), e incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, el ovocito contiene parte de información almacenada, y la fertilización debe promover que esta información sea optimizada durante el desarrollo del embrión.

## 6.2.- *Xenopus laevis*.

Núcleos somáticos de *Xenopus laevis* microinyectados en ovocitos y ovocitos fertilizados son rápidamente remodelados por la maquinaria citoplasmática de éstas células, con lo cual readquieren funciones de transcripción y replicación (Gurdon 1968, Merriam 1969, Wakefield & Gurdon 1983).

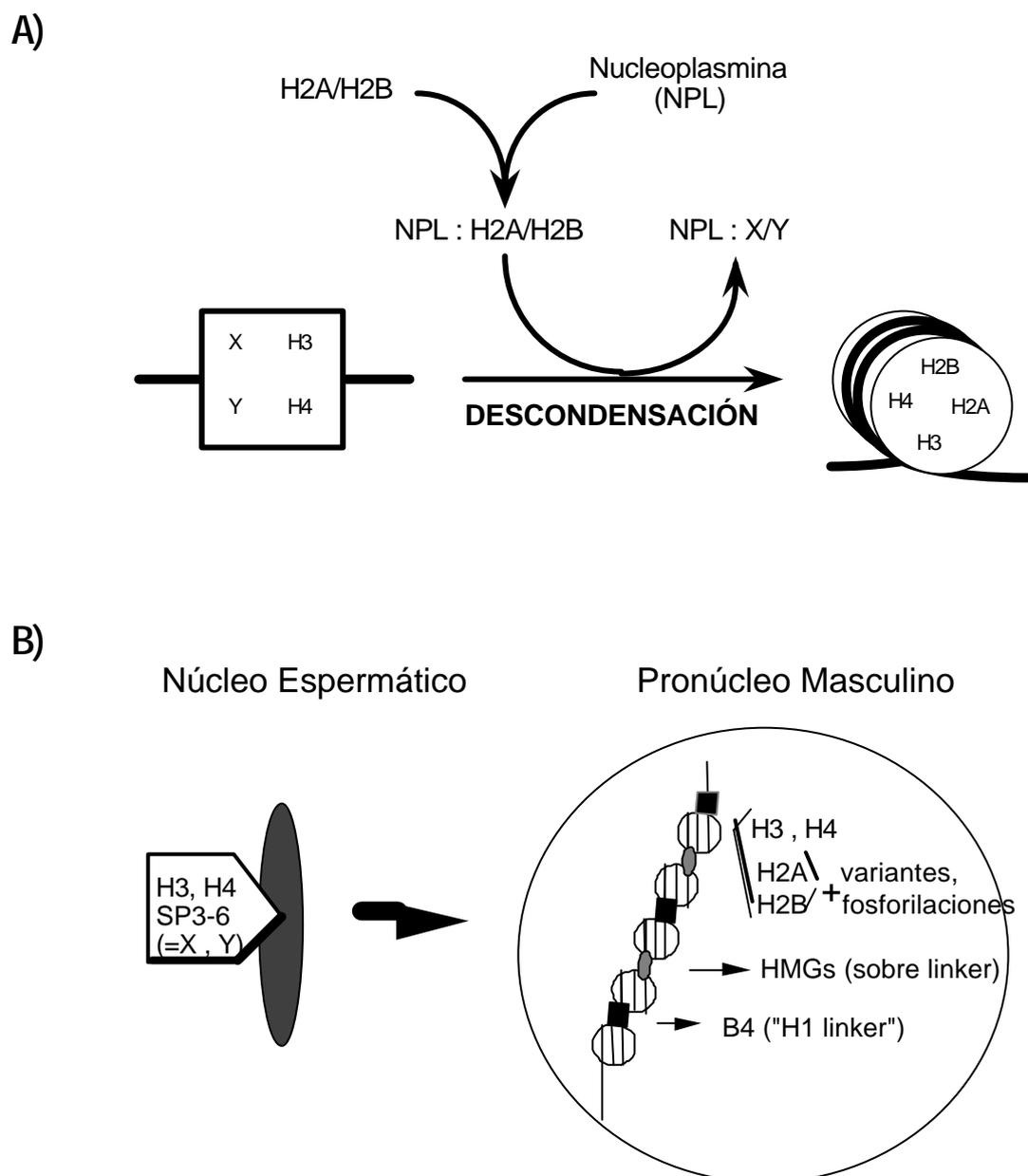
El núcleo espermático de *Xenopus laevis* contiene histonas H3-H4, y una pequeña cantidad de histonas H2A-H2B y no contiene H1. Las H2A, H2B y H1 están sustituidas por diversas proteínas específicas denominadas SP3-6 por Bols & Kasinsky (1973), o X, Y por otros autores. Estas proteínas específicas son las que mantienen el núcleo espermático en estado de compactación en ausencia de las histonas H2A, H2B y H1. En realidad existen estimaciones que proponen que solo se conserva la mitad de los nucleosomas en el núcleo espermático de *Xenopus*, con lo cual la dotación de H2A y H2B sería aproximadamente la mitad de la dotación somática (ref., buscarla).

Una parte del primer paso de la remodelación de la cromatina espermática de *Xenopus* es efecto de la nucleoplasmina (Laskey et al., 1978; para más detalles ver Introd. 5.1). La nucleoplasmina remueve las proteínas específicas (SP, X, Y) del núcleo espermático y las sustituye por las histonas H2A y H2B reconstituyendo los nucleosomas (Philpott & Leno, 1992). No se sabe si la proteína N1/N2 interviene aportando H3 y H4 en este primer paso (ya que las histonas H3 y H4 ya se encuentran en la cromatina espermática).

Diversos investigadores en muchas ocasiones han indicado que la nucleoplasmina podría explicar por sí sola el primer paso de la remodelación de la cromatina espermática de *Xenopus*, el proceso *in-vivo* no parece ser tan simple como el recambio estricto de las proteínas específicas por las H2A y H2B. Cuando la cromatina espermática es incubada en una solución con nucleoplasmina purificada e histonas, no adquiere ordenes superiores de estructura, mientras que la incubación con el extracto sí produce estas estructuras (Philpott & Leno, 1992). Adicionalmente, parece que la reconstitución es una actividad dependiente de la hidrólisis de ATP (Glikin et al., 1984) y que requiere la participación de la topoisomerasa-I (Almouzni & Méchali, 1998, Wolffe et al., 1987, Annunziato, 1989).

Otro hecho importante en la remodelación de la cromatina espermática de *Xenopus*, es que no sólo se incorporan las histonas H2A y H2B, sino que también se produce una importante incorporación de la proteína B4 (una variante embrionaria de la histona H1), y una gran cantidad de proteína HMG 1-2 (Dimitrov et al., 1994). La estequiometría aproximada efectuada por estos últimos autores indica que existe una molécula HMG 1/2 por cada 2 nucleosomas (y también una molécula B4 cada dos nucleosomas). La incorporación de HMG1/2 en la cromatina del pronúcleo masculino persiste durante las primeras fases embrionarias (Dimitrov et al., 1993), y es comparable al enriquecimiento en HMG-D encontrado en la cromatina de las primeras fases embrionarias de *Drosophila* (Ner & Travers, 1994). La abundancia de HMGs en estas etapas es un evento particular, ya que en la cromatina somática solo se encuentra una molécula de HMG 1/2 cada 20 nucleosomas (Goodwin et al., 1977, Isackson et al., 1980).

En síntesis, parece que gracias a la acción de la nucleoplasmina, y topoisomerasa-I y con la participación de las HMG 1/2, proteína B4 (y posiblemente otros factores), el núcleo espermático con sus proteínas se transformaría en una cromatina organizada en nucleosomas ordenados, en los cuales las HMGs y la B4 organizarían el DNA "linker" (Nightingale et al., 1996) (Fig.17).



**Figura 17.-** Esquema de los principales cambios en la composición de las proteínas asociadas a la cromatina durante la formación del pronúcleo masculino en *Xenopus laevis*. **A)** Remodelación de la cromatina mediada por nucleoplasmina para la reconstitución de la partícula del core nucleosómico. **B)** Esquema de la transformación del núcleo espermático a pronúcleo masculino, se muestran los cambios relacionados a las proteínas básicas que los constituyen.