

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACOLOGICAS

Profesor Patrocinante

Dr. Eduardo Bustos-Obregón

Depto. Química Biológica

Fac. de Ciencias Químicas

y Farmacológicas

Universidad de Chile

Director de Tesis

Dr. Jorge E. Allende

Depto. de Bioquímica

Fac. de Medicina Sede Norte

Universidad de Chile

ESTABILIDAD DE GRUPOS FOSFORILOS Y METILOS DE
HISTONAS EN OOCITOS DE *XENOPUS LAEVIS*

Tesis para optar al título de
BIOQUIMICO

DANIELA J. SELENFREUND HIRSCH

UNIVERSIDAD DE CHILE

FAC. DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACOLOGICAS

DEPTO. DE QUIMICA BIOLOGICA

Profesor Patrocinante
Dr. Eduardo Bustos-Obregón
Depto. Química Biológica
Fac. de Ciencias Químicas
y Farmacológicas
Universidad de Chile

Director de Tesis
Dr. Jorge E. Allende
Depto. de Bioquímica
Fac. de Medicina Norte
Universidad de Chile

ESTABILIDAD DE GRUPOS FOSFORILOS
Y METILOS DE HISTONAS EN OOCITOS
DE *XENOPUS LAEVIS*

Tesis para optar al
título de

BIOQUIMICO

DANIELA J. SEELLENFREUND HIRSCH

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Jorge E. Allende y a la Dra. Catherine Connelly por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis en el laboratorio que ellos dirigen y la valiosa ayuda y formación que recibí de ellos.

Agradezco a mi profesor patrocinante, Dr. Eduardo Bustos O. por sus sugerencias y por haber puesto a mi disposición todas las facilidades de su laboratorio.

En forma especial quiero agradecer a la Dra. Adela Tarragó por su interés y sus oportunos consejos y cuyo apoyo moral fue fundamental para el desarrollo de este trabajo.

Deseo agradecer también a todos mis amigos y compañeros del laboratorio, el apoyo que recibí de ellos en el plano personal y de trabajo y por los gratos momentos compartidos.

Quiero expresar mi gratitud a Alejandro Guadarrama por su apoyo y paciencia, quien me enseñó las técnicas histológicas y de radioautografía utilizadas en esta tesis. Igualmente agradezco sinceramente a todos los integrantes del Depto. de Biología Celular y Genética de la Fac. de Medicina Norte, U. de Chile, por su estímulo e interés.

Deseo expresar también mi aprecio a María Elena Ortiz del Depto. de Endocrinología de la Universidad Católica de Chile, por su eficaz ayuda en tomar las fotografías que se presentan en este trabajo y al Dr. Jorge Arrau y Luis Roblero, ambos del Depto. de Fisiología de la Universidad Católica de Chile, por la colaboración prestada.

Extiendo igualmente mis agradecimientos a los integrantes del Depto. de Bioquímica de la Fac. de Medicina Norte, Universidad de Chile, por su colaboración e interés.

Deseo agradecer también la cooperación de José Mondaca por la confección de las figuras.

Finalmente quiero expresar mi gratitud y aprecio a mi amiga Vera Weinstein por haber despertado en mí el interés por la bioquímica.

RESUMEN

La modificación enzimática de proteínas es uno de los mecanismos que utiliza la célula para regular la actividad biológica de proteínas que juegan un importante papel en la fisiología celular. Para investigar este fenómeno desde el punto de vista bioquímico no sólo es de interés estudiar las enzimas que incorporan nuevos residuos unidos covalentemente a las proteínas sino estudiar también las enzimas responsables de revertir tal efecto, hidrolizando los residuos incorporados.

En el trabajo presentado se analizó la estabilidad in vivo e in vitro de los grupos modificados de las histonas en oocitos de Xenopus laevis. Los ensayos realizados in vivo mediante la técnica de microinyección de los oocitos de anfibio, complementados con resultados obtenidos in vitro, permiten sacar conclusiones más fundamentadas sobre el papel que podrían cumplir las modificaciones proteicas en la célula.

Con este fin se preparó histona H2b e histona H1 modificada covalentemente en residuos de serina mediante proteína quinasa dependiente de cAMP. Se determinó que la fosfohistona es desfosforilada activamente en el oocito; esta actividad hidrolítica también está presente en homogeneizados de estas mismas células. Esta desfosforilación ocurre a una velocidad considerablemente mayor in vivo que in vitro, encontrándose que las histonas son casi totalmente desfosforiladas in vivo, mientras que in vitro la reacción se detiene al haberse hidrolizado sólo un 40 % de los grupos fosforilo. Cabe hacer notar que esta actividad desfosforilante se encontró tanto en el núcleo como en el citoplasma de estos folículos.

Los oocitos aislados de ovario de Xenopus laevis completan su maduración meiótica in vitro en presencia de progesterona. La disolución de la vesícula germinal que ocurre 5 o 6 horas después de iniciarse la maduración es un proceso complejo precedido por un aumento de la fosforilación de proteínas. Por este motivo se estudió también la estabilidad de los grupos fosforilos de las histonas durante la maduración de los oocitos.

El tratamiento hormonal de los oocitos por sí solo no altera la velocidad de la hidrólisis de los grupos fosforilos como se evidencia al microinyectar la fosfohistona en oocitos que habían sido tratados con progesterona $1 \mu\text{M}$ durante 3 horas. Sin embargo, si el tratamiento hormonal se prolonga por 6 horas o más, permitiendo que ocurra la ruptura de la vesícula germinal o núcleo, se observa que la desfosforilación de las fosfohistonas inyectadas aumenta notoriamente, reduciendo el tiempo requerido para hidrolizar el 50 % de los fosfatos de la histona H2b inyectada de 90 a 30 minutos. Inhibidores de la maduración meiótica como cicloheximida y papaverina, que impiden la ruptura de la vesícula germinal, también inhiben el aumento de la actividad fosfatásica observada en oocitos tratados por tiempos prolongados con progesterona. La papaverina reduce la velocidad de desfosforilación a niveles inferiores a los basales.

Se analizó también la estabilidad en el oocito de Xenopus laevis de los grupos metilo unidos covalentemente a la histona H2b mediante una arginina-metiltransferasa parcialmente purificada de oocitos de la misma especie. Los resultados obtenidos indican que la histona metilada es estable in vivo. La estabilidad de los grupos metilo que contrasta con la rápida desfosforilación de las histonas H2b podría reflejar las diferentes funciones que cumplirían estas modifi-

caciones enzimáticas de las histonas.

Los estudios de estabilidad de los grupos fosforilos de las histonas después de la ruptura de la vesícula germinal hicieron necesario determinar también la localización celular de las histonas en las etapas tardías de la maduración. Con este fin se preparó histona H2b marcada con ^{125}I , se microinyectó en oocitos crecidos y se analizó su localización mediante radioautografía en cortes histológicos de estas células.

Como ya estaba descrito, se observó que en oocitos no tratados con hormona ocurre una rápida migración al núcleo de las histonas microinyectadas en el citoplasma. La ruptura de la vesícula germinal durante la maduración gatillada por hormonas involucra una redistribución del material nuclear. Al completarse la maduración, la histona que estaba en el núcleo continúa unida a material basófilo que originalmente se encontraba en el núcleo. Histonas inyectadas en oocitos maduros migran para unirse preferencialmente al material basófilo de origen nuclear.

Los estudios realizados podrían proyectarse hacia un conocimiento más profundo del papel de la modificación de histonas y otras proteínas en la regulación de procesos fisiológicos que involucran la activación génica y transcripción.

SUMMARY

Enzymatic modification of proteins is one of the mechanisms which regulate the biological activity of proteins that play an important role in cell physiology. From a biochemical point of view research into this field requires not only the study of the enzymes that introduce modifications into proteins, but also to study the enzymes which reverse these reactions by catalyzing the removal of the chemical groups that have been incorporated.

In this work we analyzed the in vivo and in vitro stability of some residues incorporated in histones in Xenopus laevis oocytes. By using the microinjection technique the role of protein modification can be studied in a nearly normal physiological environment. Histones H2b and H1 were phosphorylated by a cAMP-dependent protein kinase. These phosphorylated histones were actively dephosphorylated when injected into oocytes. Hydrolysis of phosphate residues was also detected when modified histones were incubated with homogenates of these amphibian follicles. However, the dephosphorylation reaction occurred at much greater rates in the in vivo conditions than in vitro. Dephosphorylation of microinjected histones proceeded until there was only close to 20 % of the original phosphohistone. On the other hand, homogenates only were able to hydrolyze less than 50 % of the phosphoryl groups. Dephosphorylation activity was detected in cytoplasm as well as in the extracts of nuclei of these oocytes.

Incubations with progesterone of isolated follicles of this species triggers maturation of full-grown oocytes. 5 or 6 hours after the induction of maturation with hormone germinal vesicle

breakdown (GVBD) occurs. A burst of phosphorylation of cytoplasmic phosphoproteins is detected slightly before GVBD. For this reason it seemed important to study as well the stability of the histone phosphoryl groups during the maturation process.

Homonal treatment does not by itself change the rate of hydrolysis of the phosphoryl groups. This was shown by microinjecting phosphorylated histones into oocytes which had been preincubated for only 3 hours with progesterone and in which GVBD had not yet occurred. However, after 6 hours' preincubation with progesterone which allows GVBD to occur, a substantial increase of the dephosphorylation reaction was observed. The time required to dephosphorylate 50 % of a given amount of modified histone injected into mature oocytes is only 30 minutes compared to 90 minutes required in control oocytes. Inhibitors of maturation like cycloheximide and papaverine which block GVBD, will also inhibit the increase of the dephosphorylating activity detected in mature oocytes. Papaverine will produce a decrease of the dephosphorylation reaction to levels that are below those found in control oocytes.

The stability in oocytes of methyl groups covalently bound to histone H2b by an S-adenosylmethionine-arginine-methyltransferase partially purified from Xenopus laevis ovary was also examined. Microinjection experiments showed that methylated histones are stable in vivo. This pronounced stability of methyl groups as opposed to the quick hydrolysis of phosphate groups possibly reflects different functions of these two enzymatic modifications of histones. The studies that demonstrated the increment in the dephosphorylation of injected histones after GVBD raised the question as to the localization of histones during the late stages of maturation

when there is no nuclear membrane. For this reason, histone H2b was labeled with ^{125}I , microinjected into full-grown oocytes and prepared for radioautography.

As described before, histones microinjected into the cytoplasm of oocytes are quickly transferred into the nucleus. Maturation, however, triggered by hormones involves a redistribution of all nuclear components. After GVBD, the labeled histone which was initially localized in the nucleus remains associated to basophile material which was originally in the nucleus but is now present in different areas of the follicle. Histones injected into mature oocytes associate mainly to basophile components which were localized in the nucleus before GVBD.

The studies carried out in this thesis could be extended to attain a clearer understanding of the role of modification of histones and other proteins in the regulation of the physiological processes involved in gene activation and transcription.

INDICE:

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Agradecimientos | |
| Resumen | i |
| Summary | iy |
| Indice | 1 |
| Abreviaturas | 4 |
| Introducción | 5 |
| 1.- El uso de oocitos para el estudio de la función fisiológica de la modificación de proteínas | 5 |
| 2.- La participación de la fosforilación de proteínas en la maduración meiótica | 6 |
| a) Participación del cAMP y Ca ⁺² en la maduración meiótica | 6 |
| b) Participación de la proteína quinasa en la maduración meiótica | 7 |
| c) Fosforilación de proteínas durante la maduración .. | 8 |
| 3.- Estudios sobre las histonas de oocitos | 10 |
| a) Breve descripción de las histonas, su función y las modificaciones enzimáticas que sufren | 10 |
| b) Metilación de histonas | 11 |
| c) Biosíntesis de histonas en oocitos de <i>Xenopus</i> laevis | 12 |
| 4.- Estudios sobre el recambio de grupos fosforilo de las proteínas | 14 |
| 5.- Objetivos del trabajo de investigación de esta tesis . | 17 |
| Métodos | 18 |
| 1.- Obtención de oocitos de <i>Xenopus laevis</i> | 18 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.- Obtención manual de núcleos de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> | 18 |
| 3.- Microinyección de oocitos | 19 |
| 4.- Maduración de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> | 20 |
| 5.- Iodación de histona H2b con ¹²⁵ I | 20 |
| 6.- Fosforilación de histonas con proteína quinasa de corazón de bovino | 21 |
| 7.- Determinación de actividad de proteína quinasa de corazón de bovino | 22 |
| 8.- Metilación de histonas con metiltransferasas de ovario de <u>Xenopus laevis</u> | 22 |
| 9.- Purificación parcial de metiltransferasas de ovario de <u>Xenopus laevis</u> | 23 |
| 10.- Ensayo de metiltransferasas de ovario de <u>Xenopus laevis</u> | 24 |
| 11.- Geles de poliacrilamida para analizar histonas | 25 |
| 12.- Radioautografía de moléculas marcadas en cortes de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> | 26 |
| Materiales | 29 |
| Resultados | 32 |
| Localización de las histonas inyectadas en oocitos de <u>Xenopus laevis</u> | 32 |
| 1.- Localización de la histona H2b iodada después de su microinyección en oocitos crecidos y en oocitos tratados con hormona | 32 |
| 2.- Inyección de la histona H2b iodada en oocitos no pigmentados provenientes de animales albinos | 34 |
| 3.- Inyección de histonas H2b iodadas en el núcleo de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> | 36 |
| II) Desfosforilación de histonas | 38 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.- Desfosforilación de histonas microinyectadas | 39 |
| 2.- Desfosforilación <u>in vitro</u> de las histonas fosforiladas | 41 |
| 3.- Efecto de la progesterona | 44 |
| III) Desmetilación de las histonas <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u> ... | 47 |
| 1.- Estabilidad de la histona H2b metilada al incubar con homogeneizados de oocitos de <u>Xenopus laevis</u> | 47 |
| 2.- Estabilidad <u>in vivo</u> de la histona H2b metilada .. | 49 |
| Discusión | 50 |
| Bibliografía | 59 |

* * *

Abreviaturas

| | | |
|----------------------|---|-------------------------------------------------|
| ADP | : | adenosín 5'- difosfato |
| A.E. | : | actividad específica |
| AMP | : | adenosín 5'-monofosfato |
| APS | : | persulfato de amonio |
| ATP | : | adenosín 5'- trifosfato |
| bisacrilamida | : | N,N' metilén bisacrilamida |
| BSA | : | seroalbúmina de bovino |
| cAMP | : | adenosín 3',5' - monofosfato cíclico |
| Ci | : | Curie |
| cloramina T | : | N-cloro-p-toluensulfonamida de sodio |
| cpm | : | cuentas por minuto |
| DEAE-celulosa | : | dietilamino etil celulosa |
| DTT | : | ditiotreitól |
| EDTA | : | ácido etilendiamino tetraacético |
| g | : | campo gravitacional |
| PBS | : | solución salina de fosfato |
| PMSF | : | fenil metil sulfonil fluoruro |
| rpm | : | revoluciones por minuto |
| SAM | : | adenosil-1-metionina |
| [³ H]SAM | : | adenosil-1-metionina, S-[metil- ³ H] |
| SDS | : | dodecilsulfato de sodio |
| TCA | : | ácido tricloroacético |
| TEMED | : | N,N,N',N'-tetrametilén diamina |
| Tris | : | tris-(hidroximetil)-amino metano |

INTRODUCCION

1) El uso de oocitos para el estudio de la función fisiológica de la modificación de proteínas

La modificación enzimática de proteínas es uno de los mecanismos que utiliza la célula para regular la actividad biológica de proteínas que juegan un importante papel en la fisiología celular. Para investigar este fenómeno desde el punto de vista bioquímico no sólo es de interés estudiar las enzimas que incorporan nuevos residuos unidos covalentemente a las proteínas sino también estudiar las enzimas responsables de revertir tal efecto, hidrolizando los residuos incorporados.

Sin embargo, es necesario completar los estudios realizados en el tubo de ensayo sobre estas enzimas con estudios realizados in vivo que permitan extrapolar con mayor fundamento el papel que las modificaciones proteicas pueden cumplir en la célula.

Para este fin el uso de la técnica de microinyección en oocitos de anfibios presenta ventajas evidentes. Por su tamaño (1 a 1,3 mm de diámetro) y la disponibilidad de gran número de células, se pueden inyectar cantidades de material que son fácilmente detectables por ensayos bioquímicos e isotópicos.

El oocito es, además, un tipo de célula que puede ser cultivado en un simple medio salino y en esas condiciones es capaz de responder a un estímulo hormonal que induce el proceso de maduración meiótica. La fosforilación reversible de proteínas ha sido claramente implicada en el mecanismo por medio del cual las hormonas sexuales

gatillan la maduración meiótica de los oocitos de anfibio (1, 2).

2) La participación de la fosforilación de proteínas en la maduración meiótica

Al completarse la oogénesis la actividad metabólica del oocito disminuye notoriamente y se reinicia mediante un estímulo hormonal que induce la maduración meiótica, convirtiendo al oocito en un huevo capaz de ser fecundado (3). Durante este proceso la meiosis que se encontraba detenida en la profase de la primera división continúa hasta la metafase de la segunda división meiótica (4).

Se ha descrito que en el gatillamiento de la maduración las gonadotrofinas actuarían sobre las células foliculares para producir o liberar progesterona que a su vez actuaría directamente sobre la membrana del oocito (5, 6). Para inducir la maduración es necesaria la presencia continua de la gonadotrofina en el medio de incubación que provoca un aumento lineal de la progesterona endógena en el oocito (6). A diferencia de estas hormonas, la acción de la progesterona no precisa de las células foliculares (7). Brachet y colaboradores (8) postulan que la progesterona se une principalmente a un receptor que se encuentra en la membrana del oocito, y es inactiva al ser microinyectada en el folículo (7).

a) Participación del cAMP y Ca^{+2} en la maduración meiótica.

Numerosas evidencias experimentales indican que el Ca^{+2} y cAMP cumplen un papel fundamental en la iniciación de la maduración inducida por progesterona (9). Durante las etapas tempranas de la maduración se observa un aumento transiente de la concentración intracelular de Ca^{+2} y una disminución de cAMP dentro del oocito (8 - 10).

La disminución de cAMP es un evento temprano de la maduración y se detecta 30 a 60 minutos después de iniciarse la incubación con progesterona (9, 10). En experimentos realizados en nuestro laboratorio se ha observado una inhibición de la maduración mediante teofilina y papaverina que inhiben específicamente a la fosfodiesterasa de cAMP (10). La maduración del oocito es inhibida también por 3-isobutil-1-metilxantina (11) y la toxina del cólera que provocan un aumento de la concentración de cAMP en el oocito (9, 11). Ozon y colaboradores (9) encuentran una estrecha correlación entre la concentración de progesterona, la disminución de cAMP y el porcentaje de maduración. La progesterona podría causar un cambio en la actividad de la adenilciclase o en la cantidad de cAMP disponible para ser degradado por la fosfodiesterasa. Puesto que se requiere de una baja de cAMP para inducir la maduración y debido a que ésta es bloqueada por inhibidores de la fosfodiesterasa, se ha involucrado esta enzima en la regulación de la maduración meiótica (12).

La fosfodiesterasa de cAMP es regulada además por calmodulina y Ca^{+2} (13). Para la maduración es indispensable un flujo de Ca^{+2} intracelular, en el cual probablemente se libera Ca^{+2} que se encontraba unido a la membrana celular (9, 14). Se produce entonces un aumento transiente de Ca^{+2} durante las etapas iniciales de la maduración (8). En etapas posteriores los requerimientos de Ca^{+2} son diferentes, puesto que se ha detectado una inhibición de la maduración al aumentar la concentración de este ión durante el período de la dispersión de la vesícula germinal (9).

b) Participación de la proteína quinasa en la maduración meiótica.

La disminución del nivel de cAMP observado produciría una alteración de la actividad de la proteína quinasa dependiente de

este nucleótido cíclico que modula los niveles de fosforilación de diferentes proteínas en el oocito (15). Este hecho explica la inhibición de la maduración observada al incubar los oocitos en presencia de altas concentraciones de cAMP (10), o al inyectar la subunidad catalítica de la proteína quinasa en los oocitos (4); al microinyectar la subunidad regulatoria de la proteína quinasa o un inhibidor de esta enzima se induce la maduración en ausencia de hormonas porque de este modo disminuye la fosforilación de las proteínas del oocito (4).

Los oocitos de Xenopus laevis poseen proteínas quinasas dependientes de cAMP (16, 17) que pueden ser inhibidas mediante la microinyección del inhibidor de estas enzimas (16). Sin embargo, este inhibidor no bloquea el aumento de fosforilación de proteínas observado en las etapas tardías de la maduración. Esta fosforilación está asociada a la ruptura de la vesícula germinal (15, 16) y es independiente de cAMP. J. Boyer y colaboradores (16) postulan que la proteína quinasa dependiente de cAMP participaría en las etapas tempranas del proceso de maduración.

c) Fosforilación de proteínas durante la maduración.

Se han descrito cambios en los niveles de fosforilación de proteínas en etapas tempranas y tardías de la maduración de oocitos de Xenopus laevis. Estos efectores fisiológicos podrían afectar el sistema de fosforilación de proteínas alterando la actividad de la proteína quinasa o de la fosfoproteína fosfatasa que desfosforila al sustrato fosforilado (18). Maller y Krebs (4) demuestran que la inhibición de la proteína quinasa es condición suficiente para inducir la maduración meiótica; en consecuencia, parece ser imprescindible que ciertos sustratos presenten un bajo nivel de fosforilación para que se complete la maduración. Por otra parte después de 3 horas de trata-

miento hormonal se ha observado un aumento de proteínas fosforiladas en oocitos inducidos a madurar in vivo (19) e in vitro (20).

Durante las etapas tardías de la maduración se observan cambios muy marcados en los niveles de fosforilación de proteínas que preceden la dispersión de la vesícula germinal. Ambos eventos están íntimamente ligados (2, 15). Maller y colaboradores (15) postulan que el aumento explosivo de fosforilación proteica descrito ocurriría en un período no mayor de 50 minutos previo a la ruptura de la vesícula germinal.

La progesterona induce un aumento de la síntesis proteica (21) que da lugar a la síntesis de una proteína citoplasmática denominada MPF (= "Maturation Promoting Factor") indispensable para la dispersión de la vesícula germinal (22). Al bloquear la maduración inducida con progesterona mediante cicloheximida no se observa un aumento de la fosforilación de proteínas. Las metilxantinas y la toxina del cólera que actúan como inhibidores de la maduración también bloquean este súbito aumento de fosforilación asociado a la dispersión nuclear (2). Sin embargo al inyectar MPF en oocitos preincubados con cicloheximida, se induce inmediatamente el incremento de la fosforilación de proteínas seguido de la dispersión de la vesícula germinal (15). Este aumento de fosforilación, al igual que la producción de MPF, son eventos citoplasmáticos puesto que también ocurren en oocitos anucleados inducidos a madurar in vitro mediante progesterona (15).

3) Estudios sobre las histonas en oocitos.

a) Breve descripción de las histonas, su función y las modificaciones enzimáticas que sufren.

Las histonas son proteínas de carácter básico que se encuentran asociadas al DNA de organismos superiores y que cumplen un rol importante en la organización y estructura de la cromatina. Se distinguen 5 clases principales de histonas denominadas H1, H2a, H2b, H3 y H4. Dímeros de las histonas H2a, H2b, H3 y H4 forman parte de los nucleosomas, en tanto que la histona H1 se encuentra en las regiones de la cromatina que unen las estructuras nucleosómicas. El extremo NH_2 -terminal de estas proteínas es de carácter marcadamente básico y se postula que esta región del polipéptido interactúa con el DNA (23).

Las histonas sufren modificaciones postsintéticas tales como fosforilaciones, acetilaciones, ADP-ribosilaciones y metilaciones (24); estas modificaciones afectan a las cadenas laterales de residuos aminoacídicos del extremo NH_2 -terminal de las histonas y posiblemente influyen en el tipo de interacciones existentes entre el DNA y dichas proteínas (24, 25). Aún no ha sido posible establecer en forma concluyente el rol que cumplen estas modificaciones, pero es muy probable que estén involucradas en cambios estructurales de la cromatina que podrían modular la activación y transcripción de genes (24). La correlación entre la modificación de las histonas y la activación de la cromatina no sólo permite postular un rol estructural sino también regulatorio para las histonas. Sin embargo, sólo es posible asignar una función regulatoria a una modificación covalente de proteínas si ésta es reversible (26).

b) Metilación de histonas.

La metilación de histonas fue descrita por primera vez por Murray en 1964 que encontró ϵ -N-metil lisina en preparaciones de histonas de conejo (27). Estudios posteriores demostraron que se metilan principalmente las histonas H3, H4 (28) y H2b (29). Los residuos metilados encontrados en las zonas polares de estas proteínas son ϵ -N-mono-, di- y tri-metil lisina, ϵ -N-metil arginina y una pequeña proporción de 3-metil histidina (3). Paik y Kim purificaron parcialmente y caracterizaron tres metiltransferasas diferentes con especificidad para arginina (31), lisina (32), y grupos carboxilo (33).

En *E. coli* se ha correlacionado la metilación de diversas proteínas con la adaptación mediante quimiotaxis de este organismo a estímulos químicos (34). Sin embargo no ha sido posible determinar el rol biológico de la metilación de histonas (35).

Byvoet y Baxter (35) postulan que la metilación de los residuos de lisina tiende a exacerbar el carácter hidrofóbico y la basicidad de la histona resultando en una unión más estrecha y estable entre la histona modificada y las macromoléculas que la rodean. Por esta razón la metilación aumentaría la estabilidad de la cromatina (35). Se ha demostrado que diversos agentes intercalantes, polilisininas y otros compuestos que distorsionan la estructura del DNA producen incrementos notorios en los niveles de metilación de las histonas (35). Estos resultados pueden interpretarse como evidencias de la proximidad en que se encuentran el DNA, las histonas y la metiltransferasas en la cromatina (35).

Aún no se ha establecido en forma concluyente si los

grupos metilo sufren un recambio más rápido que la estructura proteica que los sostiene y los resultados de distintos investigadores algunas veces no son concordantes. De acuerdo a algunas evidencias experimentales la metilación de las histonas parece ser estable y aparentemente irreversible in vivo, lo cual hace difícil asignar una función regulatoria a esta modificación (35). Algunos autores postulan que la velocidad de recambio de los grupos metilo es similar a la velocidad de recambio de la histona misma (35). A pesar de lo descrito, Shepherd y colaboradores (36) describen cambios en los niveles de metilación de las histonas H2a, H2b y H3 durante el ciclo de las células de ovario de Hamster. Las histonas H2b se metilarían al iniciarse el período S, en cambio las histonas H2a y H3 alcanzarían un nivel máximo de metilación después de completarse la síntesis de DNA (36). Estos experimentos constituyen una de las escasas evidencias publicadas sobre la desmetilación de histonas metiladas. Experimentos realizados en nuestro laboratorio por V. Hinrichsen (37) han demostrado la presencia en oocitos de Xenopus laevis de dos formas moleculares de una metiltransferasa que modifica a la histona H2b en residuos de arginina.

c) Biosíntesis de histonas en oocitos de Xenopus laevis.

Estudios de Smith y Ecker (38) han demostrado que los oocitos de anfibio poseen una activa síntesis proteica durante las etapas iniciales de la oogénesis, durante la maduración y en las etapas tempranas de la embriogénesis. Por otra parte se sabe que el oocito no sintetiza DNA y que la síntesis de DNA comienza recién en el embrión, siendo muy activa en el estado de blástula (39). En el estado 9 de la blástula la cantidad de este ácido nucleico sintetizada es considerable, y sobrepasa claramente a la cantidad de histona sintetizada desde el momento de la fertilización (39).

Diferentes autores (39, 40) determinaron que gran parte de las proteínas sintetizadas durante la oogénesis son histonas, lo cual indica que no hay sincronía entre la síntesis de DNA y de histonas en el oocito y embrión de anfibio. El hecho que las histonas se sinteticen en etapas más tempranas del desarrollo que el DNA sugiere que existe un almacenamiento de histonas en estas células. Burzio y Koide (41) efectivamente encuentran una proporción de histonas y DNA de 100 : 1 en la vesícula germinal del oocito. Adamson y Woodland (39) postulan que las histonas se sintetizan antes que ocurra la fertilización, almacenándose para su utilización posterior durante las etapas de la embriogénesis de activa síntesis de DNA. Durante la oogénesis se detecta síntesis de histonas, pero ésta sólo constituye alrededor de un 0,3 a 1 % del total de proteínas sintetizadas (39). Con la maduración la síntesis es activada y procede a una velocidad mucho mayor, constituyendo aproximadamente el 9 % del total de proteínas sintetizadas (39). Este aumento de la velocidad de síntesis de histonas no depende de la ruptura de la vesícula germinal (42). La velocidad de síntesis de estas proteínas aumenta de 40 a 50 pg/hr en la oogénesis a 2500 pg/hr durante la maduración (43); en consecuencia se producirían alrededor de 20 ng de histona durante las 8 horas que dura la maduración.

Según los cálculos de Adamson y Woodland (39) esta cantidad no sería suficiente para cubrir la cantidad de histonas requerida en etapas posteriores. Durante la oogénesis deben sintetizarse aproximadamente 100 ng adicionales de histona que se requieren para alcanzar el estado 9 de la blástula. Si se considera que la oogénesis ocurre en un período de aproximadamente 3 meses, la cantidad de proteína producida alcanzaría a cubrir los requerimientos del oocito (39). Las histonas sintetizadas no son degradadas y se almacenan en el núcleo (44).

Mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida y digestiones con tripsina se determinó que en el oocito se sintetizan las histonas H2a, H2b, H3 y H4 (39, 43). Se demostró también que estas proteínas recién sintetizadas se acumulan en el núcleo (43). La síntesis de la histona H1 se detecta en etapas tardías de la blástula (45).

Las histonas que se sintetizan durante la ovogénesis son iguales a aquellas sintetizadas durante las etapas embrionarias tempranas (43) y no difieren cualitativamente de las histonas encontradas en tejidos adultos de Xenopus laevis (45). Experimentos realizados en nuestro laboratorio demuestran que en el oocito existen proteínas quinasas dependientes de cAMP que fosforilan histonas (17).

4) Estudios sobre el recambio de grupos fosforilo de las proteínas.

La importancia de la fosforilación de proteínas como mecanismo de regulación ha sido reconocida y estudiada en muchos sistemas enzimáticos (26) y también en proteínas no enzimáticas (46). La fosforilación y desfosforilación de histonas podrían regular ciertas funciones nucleares; se han descrito alteraciones en los niveles de fosforilación de estas proteínas asociados a cambios de condensación de la cromatina durante el ciclo celular, regeneración de tejido y otros procesos metabólicos (46).

Se han encontrado fosfoproteína fosfatasas que desfosforilan numerosas proteínas fosforiladas, incluyendo las histonas (46 - 48). Algunas de estas fosfatasas presentan ciertas propiedades comunes: se ha encontrado una forma enzimática de PM = 35.000 que aparentemente proviene de una holoenzima de mayor peso molecular (26, 47).

Esta holoenzima estaría formada por 2 subunidades catalíticas de $PM = 35.000$ y una subunidad inhibitoria de $PM = 65.000$ (26). Estas enzimas actuarían en forma poco selectiva y desfosforilarían diferentes proteínas fosforiladas (26). También se ha descrito una enzima más selectiva proveniente de hígado que desfosforila sólo las fosfohistonas y protaminas fosforiladas (26).

Las proteínas quinasas que catalizan la fosforilación de diversos sustratos son reguladas por efectores como el cAMP, cGMP, Ca^{+2} y otros (26). Investigadores del laboratorio de O.M. Rosen (49) han publicado evidencias experimentales que la proteína quinasa a su vez puede ser regulada por fosforilación y desfosforilación. Estos autores encontraron una fosfoproteína-fosfatasa que cataliza específicamente la desfosforilación de la quinasa fosforilada, y a su vez esta fosfatasa es activada por cAMP. Al igual que otras fosfatasa (26), ésta es activada por etanol. Esta estimulación va acompañada de una reducción de peso molecular (26, 49).

Las fosfatasa que aseguran la reversibilidad de las reacciones de fosforilación son reguladas por interacciones de tipo proteína-proteína (26): competencia de distintos sustratos fosforilados por la enzima e interacciones entre ligandos del sustrato y la enzima (26).

Se han purificado también dos tipos de inhibidores termestables (26). Uno de estos inhibidores (inhibidor 1) es activado por fosforilación mediante una proteína quinasa dependiente de cAMP e inhibe a la enzima en forma no competitiva con respecto al sustrato fosforilado (26). El inhibidor 2 es una proteína ácida de PM aproximado de 15.000 (50). Este inhibidor es muy específico y solo actúa sobre la enzima en presencia de fosforilasa a como sustrato (50).

También se ha encontrado un activador termoestable de la fosfatasa de fosfoproteínas (50).

Hay evidencias experimentales que indican que las histonas son fosforiladas en etapas previas al ensamblaje de las histonas a la cromatina (51), puesto que se detecta fosforilación de las histonas en el citoplasma (24) y en las histonas recién sintetizadas (52). Se ha visto que las histonas en solución son excelentes sustratos para diferentes proteínas quinasas, pero estas mismas histonas no son fosforiladas cuando se encuentran unidas a DNA (51). Sin embargo, histonas fosforiladas se unen al DNA en forma semejante a las histonas no modificadas (51). Estos resultados sugieren una posible relación entre la estructura de la cromatina y los niveles de modificación de la histona.

La fosforilación de la histona H1 es reversible y ocurre en forma cíclica (53). La histona alcanza un nivel máximo de fosforilación al finalizar G_2 y coincide con la condensación de los cromosomas que precede la mitosis (53, 54). Bradbury y colaboradores (53) han postulado que la fosforilación de la histona rica en lisina causa la condensación cromosómica. Estos autores describen cambios en la actividad fosforilante de la histona H1 estrechamente correlacionados con el inicio de la mitosis, y postulan que esta modificación de H1 gatilla el inicio de la mitosis (54, 55).

Se han descrito también variaciones en los niveles de fosforilación de las histonas nucleosómicas en células de ovario de Hamster (46) y eritrocitos de ave (25), pero no se ha encontrado una relación entre estas variaciones y etapas específicas del ciclo celular como la síntesis de histonas o de DNA.

5) Objetivos del trabajo de investigación de esta tesis.

En base a los antecedentes presentados previamente, es evidente que el estudio sobre la desfosforilación de las histonas inyectadas en oocitos tiene interés desde dos puntos de vista. En primer lugar, dada la importancia de la fosforilación de proteínas en el proceso de maduración, parece de interés determinar si la reacción que hidroliza dichos grupos fosfato también estaría afectada durante la maduración meiótica. En segundo término, debido a la importancia de los grupos fosforilados en la función de las histonas, parece importante determinar el recambio de los fosfatos en estas proteínas, que se sintetizan y almacenan en grandes cantidades en el oocito.

El estudio de la estabilidad de los grupos metilo de las histonas en oocitos podría complementar los estudios realizados sobre la desfosforilación de esta misma proteína.

MÉTODOS

1) Obtención de oocitos de *Xenopus laevis*

Se anestesian hembras adultas de *Xenopus laevis* por hipotermia y se extrae el ovario o trozos de él mediante una incisión en el abdomen. El ovario completo de *Xenopus laevis* tiene un peso húmedo de aproximadamente 20 gramos.

Los trozos de ovario se conservan en una solución de Barth de la siguiente composición : Tris-HCl 10 mM pH 7,6 , MgSO₄ 0,82 mM, CaCl₂ 0,41 mM, KCl 1,0 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM, NaCl 88 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, penicilina 0,1 mM y sulfato de estreptomicina 0,1 mM.

Renovando todos los días la solución de Barth que baña los trozos de ovario, es posible conservar éstos en buen estado durante 5 a 8 días. Los trozos de ovario se guardan a 4°.

Los oocitos o folículos se separan manualmente del tejido ovárico mediante el uso de pinzas de Dumont N°5.

2) Obtención manual de núcleos de oocitos de *Xenopus laevis*

Para extraer los núcleos de los oocitos es conveniente colocar los folículos sobre una superficie áspera que permita una buena adherencia a ésta y se les orienta de manera que el polo animal (zona pigmentada) quede hacia arriba. Con la punta de una pinza se perfora ligeramente el vértice del polo animal bajo el cual se encuentra el núcleo o vesícula germinal. Al presionar suavemente al oocito

en la zona ecuatorial emerge el núcleo intacto.

Los núcleos aislados en la forma descrita se pueden limpiar de contaminación citoplasmática mediante un lavado cuidadoso con una pipeta Pasteur en solución de Barth.

3) Microinyección de oocitos

Los oocitos separados pueden ser microinyectados en el citoplasma o en el núcleo mediante una aguja capilar previamente calibrada. Esta aguja está inserta en una jeringa con vaselina que permite regular el flujo de la solución a inyectar y entregar volúmenes con cierta precisión.

Para inyectar en el citoplasma se introduce la aguja en la zona ecuatorial del oocito, con el objeto de no dañar el núcleo. Las cantidades que se inyectan fluctúan entre los 35 y 100 nl por oocito, dependiendo en parte de las propiedades del oocito.

Para inyectar el núcleo, la aguja se introduce desde el vértice del polo animal. Los volúmenes entregados no deben sobrepasar los 15 a 20 nl. La inyección debe hacerse muy lentamente; sin embargo, la probabilidad de acertar el núcleo sin dañarlo es de aproximadamente un 50 %.

4) Maduración de oocitos de *Xenopus laevis*.

Se incuban oocitos de estado 6 (según la clasificación de Dumont) (56) recién separados del ovario, por un período de 8 a 15 horas en solución de Barth con progesterona $1 \mu\text{M}$ a 21° para producir su maduración. Al término de la incubación se detecta la maduración por la aparición de una mancha blanca en el polo animal.

Otro fenómeno asociado a la maduración es la dispersión de la vesícula germinal; en algunos oocitos esta dispersión comienza ya después de 3 horas de incubación con hormona. Para utilizar este hecho como criterio de maduración se fija el oocito con TCA al 10 % y con la ayuda de pinzas se abre cuidadosamente el folículo. De esta manera se observa directamente la ausencia de núcleo en los oocitos madurados.

5) Iodación de histona H2b con ^{125}I

La técnica empleada se basa en la marcación de proteínas con ^{125}I mediante cloramina T (57). Para ello se incuban $400 \mu\text{Ci}$ de ^{125}I en presencia de $100 \mu\text{g}$ de histona H2b, $40 \mu\text{l}$ de tampón fosfato 0.3 M pH 7,3, $10 \mu\text{l}$ de solución salina de fosfato (PBS : $8,77 \text{ g}$ de NaCl, $0,226 \text{ g}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $2,898 \text{ g}$ de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ por 1000 ml de agua) y $20 \mu\text{g}$ de cloramina T, durante 2 minutos a 25° . La reacción se detiene agregando $25 \mu\text{l}$ de una solución saturada de tirosina en tampón fosfato $0,3 \text{ M}$ pH 7,3 y $200 \mu\text{l}$ de la solución de PBS. La histona iodada se separa del exceso de ^{125}I mediante una columna de Sechadex fino, de 5 ml de volumen,

eluida con PBS. El volumen de elución de la histona yodada se determina por la radiactividad que precipita con TCA 10 % y que queda retenida en filtros de fibra de vidrio.

En los ensayos se utilizó directamente la histona H2b eluida de la columna de Sephadex G-50 fino.

6) Fosforilación de histonas H2b con proteína quinasa de corazón bovino.

Para fosforilar histonas H2b se incubaba 1mg de esta proteína en presencia de tampón fosfato 50 mM pH 7,1, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM, cAMP 2 μ M, 200 μ g de proteína quinasa dependiente de cAMP y [γ - ^{32}P] ATP de una concentración aproximada de 100 μ M en un volumen final de 400 μ l durante 30 minutos a 37°. La reacción se detiene en frío se precipita la proteína quinasa con TCA al 2 % y luego se separa el exceso de [γ - ^{32}P] ATP de la histona fosforilada mediante una diálisis en frío en membranas Spectrapor contra agua o mediante una filtración en Sephadex G-25 o Sephadex G-50. La muestra se eluye con agua y se recogen fracciones de 0,8 ml. Se mide la radiactividad precipitable con TCA al 10 % que queda retenida en filtros de fibra de vidrio, tomando alícuotas de 20 μ l de cada fracción. Las fracciones que contienen la histona fosforilada se juntan y liofilizan hasta una concentración final aproximada de 0,5 mg de histona H2b por ml.

Inicialmente se intentó separar la histona H2b fosforilada del exceso de [γ - ^{32}P] ATP mediante la adición de 2 ml de H_2SO_4 0,4 N frío después de detener la incubación y extraer la histona mediante una precipitación con etanol al 80 % frío. Este método no se siguió usando por ser demasiado lento.

7) Determinación de actividad de proteína quinasa de corazón de bovino.

Para ensayar la proteína quinasa se siguió la técnica de J. Ehrlichman (58) con algunas modificaciones. La enzima se incubaba en presencia de tampón fosfato 50 mM pH 7,1, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 10 mM, cAMP $2\mu M$, $100\mu g$ de histona H2b y [γ - ^{32}P] ATP en una concentración aproximada de $120\mu M$, durante 30 minutos a 37° . Para minimizar la autofosforilación de la proteína quinasa se diluye a una concentración final de 0,1 mg/ml (59).

La reacción se detiene agregando TCA al 10 % frío. Para disminuir la radiactividad adsorbida en forma inespecífica, se calienta la preparación a 90° durante 10 minutos, se centrifuga a $1500 \times g$ durante 5 minutos y se separa el sobrenadante. Al precipitado se agrega 0,1 ml de NaOH 1 N frío, se homogeneiza e inmediatamente se vuelve a agregar 1 ml de TCA al 10 % frío. Finalmente se determina la radiactividad precipitable con TCA al 10 % que es retenida en filtros de fibra de vidrio.

8) Metilación de histonas con metiltransferasas de ovario de *Xenopus laevis*.

Para obtener histona H2b metilada se incubaba 1 mg de histona en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 9,0, DTT 4 mM, EDTA 10 mM, 0,5 ml de una preparación parcialmente purificada que contiene la enzima metilante A (E.C. metiltransferasa I 2.1.1.23) y [3H] SAM $20\mu M$ de A.E. = 1000 mCi / mmol a 37° durante 40 minutos.

Al metilar la histona con la fracción que contiene la actividad metilante B se incubaba la proteína en las mismas condiciones, pero con Mg^{+2} 3 mM y en ausencia de EDTA.

Al finalizar la incubación, se coloca en frío durante 15 minutos y luego la preparación se dializa en membranas Spectrapor en frío contra agua para extraer la $[^3H]SAM$ que no reaccionó hasta obtener la misma radiactividad total y precipitable con TCA al 10 %, se centrifuga a $20.000 \times g$ durante 20 minutos y en seguida se liofiliza el sobrenadante. En todos los ensayos descritos en este trabajo se utilizó la histona metilada liofilizada resuspendida en un volumen adecuado de agua, con una concentración final de 2 mg/ml. Al detener la incubación por calentamiento a 100° durante 90 segundos se obtienen los mismos resultados.

9) Purificación parcial de metiltransferasas de ovario de *Xenopus laevis*.

Se homogeneizan 20 g de ovario de *Xenopus laevis* en 30 ml de tampón de homogeneización de la siguiente composición : Tris-HCl 50 mM pH 8,0 , EDTA 0,5 mM , β -mercaptoetanol 2 mM y $MgCl_2$ 3 mM. La homogeneización y las etapas posteriores de purificación se realizan a 4° . El homogeneizado se centrifuga a $20.000 \times g$ durante 30 minutos. El sobrenadante se filtra a través de lana de vidrio y se centrifuga a $105.000 \times g$ durante 150 minutos. El sobrenadante obtenido se dializa durante toda la noche contra 3 l de tampón de diálisis cuya composición es : Tris-HCl 20 mM pH 8,0 , EDTA 0,5 mM, β -mercaptoetanol 2 mM y $MgCl_2$ 3 mM. El dializado se centrifuga a $20.000 \times g$ durante 30 minutos y el sobrenadante se carga en una columna de DEAE-celulosa de un volumen de 10 ml, equilibrada con

tampón de diálisis. Una vez colocada la muestra, la columna se lava nuevamente con el mismo tampón hasta obtener fracciones de baja densidad óptica y luego se eluyen las metiltransferasas mediante un gradiente de KCl de 0 a 0,4 M. Se recogen fracciones de 40 gotas por tubo. Las fracciones con actividad de cada metiltransferasa se dializan nuevamente contra tampón de diálisis que contiene además glicerol al 10 % durante toda la noche. La medición de actividad se describe más adelante. Las preparaciones dializadas se centrifugan a 20.000 x g durante 30 minutos y los sobrenadantes obtenidos en esta centrifugación corresponden a las metiltransferasas semipurificadas. Las fracciones eluidas a baja concentración de KCl corresponden a la actividad metilante A y aquellas eluidas a alta concentración de KCl corresponden a la actividad metilante B (37).

10) Ensayo de metiltransferasas de ovario de *Xenopus laevis*.

Las dos actividades metilantes obtenidas de ovario de *Xenopus laevis* presentan diferente sensibilidad frente a sus requerimientos de Mg^{+2} (37). La actividad de la enzima metilante I es independiente de Mg^{+2} , en cambio la enzima metilante II requiere concentraciones bajas de Mg^{+2} para su actividad.

Para medir la actividad de las metiltransferasas en presencia de bajas concentraciones de Mg^{+2} se incuban 100 μ l de una preparación semipurificada de enzima en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 9,0, DTT 4 mM, 80 μ g de histona H2b y [3 H] SAM 8 μ M de A.E. = 50 mCi / mmol a 37° durante 15 minutos. La reacción se detiene agregando TCA al 10 % frío y luego se mide la radiactividad precipitable con TCA al 10 % que queda retenida en filtros de fibra de vidrio.

La actividad de las metiltransferasas en ausencia de Mg^{+2} se determina incubando $100 \mu l$ de una preparación semipurificada de enzima en presencia de Tris-HCl 50 mM pH $9,0$, EDTA 10 mM , DTT 4 mM , $80 \mu g$ de histona H2b y $[^3H]SAM$ $8 \mu M$ de A.E. = $50 \text{ mCi} / \text{mmol}$ a 37° durante 15 minutos. La reacción se detiene y se mide en la forma descrita más arriba.

11) Geles de poliacrilamida para analizar histonas.

Se prepararon geles ácido-urea para histonas según la técnica descrita por Panyim y Chalkley (60) con algunas modificaciones detalladas a continuación :

Se hacen geles de $20 \times 20 \text{ cm} \times 1,5 \text{ mm}$ en placa, los que se precorren con una intensidad de corriente de 10 a 12 mAmp durante 15 horas y después se realiza la electroforesis de las histonas suspendidas en ácido acético 0.9% y sacarosa al 20% con 12 mAmp durante $3 \frac{1}{2}$ a 4 horas utilizando pironina Y como indicador. En estas condiciones las histonas migran hacia el polo negativo.

Como solución de bandeja se utiliza ácido acético al $2,5 \%$. Se aplican al gel alrededor de $25 \mu g$ de proteína por muestra.

Para cuantificar la radiactividad de una muestra en el gel, éste se corta en bandas de $0,5 \text{ cm}$. Las bandas se solubilizan en 1 ml de agua oxigenada al 30% a 60° durante 12 horas, después de lo cual se agrega líquido de centelleo para muestras líquidas y se mide la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

12) Radioautografía de moléculas marcadas en cortes de oocitos
de *Xenopus laevis*.

La primera etapa consiste en fijar durante una hora los oocitos incubados o inyectados con una muestra marcada con ^3H o ^{125}I , mediante el fijador Alfac (metanol 85 %, formaldehído 10 % y ácido acético 5 %).

El tejido fijado se deshidrata mediante lavados sucesivos en soluciones de etanol de concentración creciente (70 % a 100 %) y luego se impregna con aceite de cedro; este aceite favorece la penetración del paraplast durante el proceso de inclusión que se realiza a presión reducida y a 58°. El paraplast es un compuesto de polímeros y de parafina de un determinado rango de pesos moleculares y que contiene dimetilsulfóxido para favorecer la infiltración del tejido.

El tejido incluido en bloques de paraplast en la forma descrita se corta mediante un micrótopo. En todos los experimentos descritos en este trabajo se obtuvieron cortes seriados de 5 micrones de espesor.

Los cortes se montan por flotación sobre portaobjetos limpios y secos, previamente bañados en gelatina de cromoalumbre (0,5 g de gelatina y 0,05 g de cromoalumbre por cada 100 ml de agua).

Una vez secos, los cortes montados sobre portaobjetos se desparafinan e hidratan mediante 3 lavados en xilol y lavados sucesivos en soluciones de etanol de concentración decreciente (100 % a 70 %) y finalmente en agua destilada.

Los cortes hidratados se colocan en agua destilada y luego se procede a cubrir los portaobjetos con la emulsión radioautográfica. En los ensayos descritos se utilizaron las emulsiones NTB-2 o NTB-3 diluídas en proporción 1 : 1 en agua destilada (técnica modificada de Kopriva y Leblond (61)).

Transcurrido el tiempo de exposición los portaobjetos cubiertos con la emulsión se revelan con una solución de la siguiente composición: 2,2 g de sulfato de p-metilaminofenol (metol), 72,2 g de Na_2SO_3 , 8,8 g de hidroquinona, 48 g de Na_2CO_3 y 4 g de KBr por cada litro de agua. El fijador utilizado es el Fixer General Purpose Cat 197 1746 de Kodak o una solución de 200 g de hiposulfito de sodio, 50 g de NH_4Cl y 5 g de bisulfito de sodio por litro de agua.

Los cortes revelados se tiñen durante 40 segundos con hematoxilina y un minuto con eosina y se deshidratan mediante lavados sucesivos en soluciones de etanol de concentración creciente (70 % a 100 %) y finalmente dos lavados en xilol.

Cuantificación de marca radioautográfica en cortes de oocitos de *Xenopus laevis*.

Los granos radioautográficos se cuentan utilizando el lente de inmersión del microscopio y un lente ocular con un retículo de 10 por 10 subdivisiones por campo. Para cada condición experimental se cuantifica la marca radioautográfica de 3 cortes diferentes. En cada corte se cuentan los granos de 5 secciones del retículo en cada una de las zonas del folículo obteniéndose un promedio para cada zona del oocito. En cada condición experimental se cuantifica además el nivel basal (background) de la radiactividad en los portaobjetos en las

zonas cercanas a los cortes de oocitos. El promedio del número de granos contados en estas áreas vecinas a los cortes de tejido se considera como nivel basal y se resta al promedio de los valores obtenidos al cuantificar la marca radioautográfica de los cortes de los diferentes oocitos. Los resultados obtenidos se expresaron en %, de manera que la suma de los promedios de los granos contados en cada zona del oocito equivale al 100 %.

MATERIALES

J.T. Chemical Co., Phillipsburg, N.J., USA.

- cromoalumbre
- sales inorgánicas de uso común
- TCA

Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, Ca., USA.

- BSA
- progesterona

Eastman-Kodak Co., Rochester, N.Y., USA.

- Amido Black
- emulsión radioautográfica NTB-2 y NTB-3
- fijador Fixer General Purpose Cat 197 1746

Fisher Scientific Co., Fair Lawn, N.J., USA.

- pironina Y

Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, Mo., USA.

- metol

Matheson, Coleman & Bell, Norwood (Cincinnati), Ohio, USA.

- cloramina T
- hidroquinona

E. Merck AG Darmstadt, R.F.A.

- eosina C.I. Nr. 45380
- hematoxilina C.I. Nr. 4305

New England Nuclear, Boston, Mass., USA.

- ^{125}I
- ^{32}P
- [^3H] SAM

Pharmacia Fine Chemicals Inc., N.J., USA.

- DEAE-Sephadex

Riedel de Haen, Seelze, Hannover, R.F.A.

- aceite de cedro
- gelatina

Sherwood Medical Industries, St. Louis, Mo., USA.

- Paraplast

Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA.

- acrilamida
- bisacrilamida
- cAMP
- cicloheximida
- DEAE celulosa
- Dowex 1 X-4
- Dowex 50 X-4
- Histonas H2b y H1
- NADH, NAD^+
- penicilina
- persulfato de amonio
- PMSF
- proteína quinasa de corazón de bovino
- sales inorgánicas de uso común
- SAM
- Sephadex G-50
- TEMED
- l-tirosina
- Tritón X-100

Spectrum Medical Industries Inc., Los Angeles, Ca., USA.

- membranas de diálisis Spectrapor

The Radiochemical Center, Amersham, England.

- $^{32}_{\text{P}}$

Whatman & R. Balston Ltd., England.

- filtros de fibra de vidrio

$^{125}_{\text{I}}$ y cloramina T fueron gentilmente donados por la Srta. Carmen Campino. (Depto. de Endocrinología, Hospital J.J. Aguirre, Universidad de Chile).

RESULTADOS

I) Localización de las histonas inyectadas en oocitos de *Xenopus laevis*.

Para el objetivo de esta tesis pareció importante establecer el locus celular de las histonas microinyectadas en oocitos de *Xenopus laevis*. Estudios radioautográficos previos de Gurdon y varios de sus colaboradores (44) habían establecido que las histonas iodadas con ^{125}I y microinyectadas en oocitos de *Xenopus laevis* se concentran en la vesícula germinal o núcleo de dicha célula. Para nuestros fines fue importante determinar también el destino de estas proteínas en oocitos que han sido inducidos a madurar por tratamiento hormonal y que por lo tanto han perdido la membrana nuclear.

1) Localización de la histona H2b iodada después de su microinyección en oocitos crecidos y en oocitos tratados con hormona.

Para determinar el comportamiento de algunas de las proteínas nucleares durante y después de la maduración en que se produce una redistribución del material de la vesícula germinal, se preparó histona H2b marcada con ^{125}I según la técnica descrita en los Métodos. Con la histona H2b iodada se estudió el destino de esta proteína durante la maduración mediante radioautografía. Se cuantificaron los resultados obtenidos en estos ensayos mediante un conteo sistemático de los gránulos de Ag reducida en los cortes de los experimentos descritos.

Se microinyectaron los oocitos en el citoplasma con una solución de histona H2b (0,3 mg/ml) y en seguida se incubaron a 20° en solución de Barth con progesterona 1 μ M o en solución de Barth sin adición de la hormona (oocitos controles). Al cabo de 0, 3, 6 y 13 horas de incubación los oocitos se fijaron y procesaron para radioautografía como se describe en los Métodos. En los oocitos controles se observó abundante marca sobre el núcleo y muy pocos granos sobre el citoplasma del folículo (fotos N° 1 - 3). Incluso en el tiempo de incubación más corto (tiempo cero, foto N° 1) se encontró una densidad de gránulos de Ag reducida sobre el núcleo. El tiempo requerido para la inyección, manipulación y fijación del oocito del orden de los 20 minutos fue suficientemente largo para permitir la migración al núcleo de una cantidad considerable de la histona H2b. Al cabo de 13 horas de incubación (foto N° 3) los oocitos presentaban núcleos intactos y la cantidad de marca que permanecía en el núcleo era muy alta. Al cuantificar los gránulos de Ag reducida se encontró que un 93 a 97 % de la radiactividad se encontraba en el núcleo y sólo un 3 a 7 % de ella se localizaba en el citoplasma. Para ilustrar el procedimiento utilizado en el conteo de los granos de Ag reducida se detallan los datos obtenidos para una condición experimental (Tabla I). Las plaquetas vitelinas del animal son de un tamaño mucho menor que las del polo vegetativo del folículo.

Los oocitos incubados en presencia de progesterona 1 μ M después de ser microinyectadas con 125 I-histona presentan una dispersión de la vesícula germinal a partir de las 3 horas de incubación. Este proceso comienza con la desaparición de los nucléolos y es seguido de la dispersión de la membrana y el material nuclear. A las 6 horas de incubación con progesterona se completa la maduración y el material de origen nuclear (basófilo) se encuentra repartido en el citoplasma, predominando inicialmente en el polo animal del folículo. Se

observa una distribución del material basófilo y de las plaquetas vitelinas en todo el folículo, de manera que en el oocito maduro se encuentran mezcladas las plaquetas de mayor y menor tamaño provenientes del polo vegetativo y animal respectivamente y que tienden a formar una zona más compacta en la periferia del oocito (Fotos N° 4, 5).

En aquellos cortes provenientes de oocitos incubados durante un tiempo muy breve con la hormona (tiempo cero, foto N° 6) se encontró (al igual que en los controles) una cantidad considerable de marca en el núcleo y una marcación escasa en el citoplasma. Los folículos que fueron incubados durante 3 horas con progesterona y que presentaban signos de maduración tenían menos marca en el núcleo que otros oocitos en que aún no se iniciaba el proceso de la disolución nuclear. Al cabo de 6 y 13 horas de incubación (fotos 7 y 8) los oocitos completaron su maduración y la marca se encontraba asociada predominantemente a las zonas basófilas. En general se observó una disminución gradual de la radiactividad en los oocitos tratados con hormona al prolongarse el tiempo de incubación. La cuantificación de la marca radioautográfica muestra que sólo se encuentra entre un 4 y un 20 % de la radiactividad en el citoplasma de estos folículos.

2) Inyección de histona H2b iodada en oocitos no pigmentados provenientes de animales albinos.

Los gránulos de pigmento que se encuentran en la membrana del polo animal del oocito son de un tamaño similar al de los granos de la marca radioautográfica. Con el objeto de descartar la posibilidad de confundir la marca radioautográfica con los pigmentos que se encuentran en la membrana del folículo, se repitieron algunos ensayos ya descritos microinyectando la histona H2b iodada en oocitos que

no contienen pigmentación en la membrana, provenientes de animales albinos.

Para este efecto se inyectaron 35 nl de una solución que contenía la histona H2b iodada (0,1 mg/ml) en el citoplasma de cada folículo. Los oocitos inyectados se incubaron durante 0, 6 y 14 horas en solución de Barth con progesterona 1 μ M. El resultado de este experimento muestra claramente que la radiactividad se concentra en el núcleo de los oocitos crecidos y se encuentra asociada al material basófilo en los oocitos maduros y no hay radiactividad localizada en la membrana del polo animal del oocito. La cuantificación de los granos radioautográficos en estos cortes indican que más del 90 % de la histona iodada ha migrado al núcleo y sólo el 3 - 6 % de la radiactividad permanece en el citoplasma. (No mostrado).

En los oocitos inyectados con histona H2b iodada e incubados con progesterona observamos que durante las primeras horas de incubación la proteína marcada migra al núcleo; sin embargo cuando la progesterona comienza a estimular la maduración y el núcleo comienza a dispersarse, la histona ya se encuentra acumulada en dicho compartimento y asociada al material de características basófilas. Al completarse la maduración después de 6 horas de incubación con progesterona la histona continúa unida a material basófilo que estaba originalmente en el núcleo. En los tiempos iniciales, en que aún parte de la histona no ha migrado al núcleo se encuentra un 37 % de la marca radioautográfica localizada en la zona citoplasmática. Al cabo de 14 horas de incubación un 80 % de los granos radioautográficos se encuentran asociados al material basófilo.

Para determinar si se requiere de un reconocimiento entre la histona exógena y el material nuclear en la vesícula germinal

intacta para esta asociación, se inyectó la histona H2b iodada en el citoplasma de oocitos que ya habían completado su maduración.

Al cabo de 6 horas de incubación en solución de Barth se encuentra que la histona iodada nuevamente está asociada al material basófilo (Fotos N° 9, 10). Solamente el 8 % de la marca radioautográfica está localizada en el citosol que no contiene tinción basófila. Este resultado indica que la asociación descrita entre la histona H2b exógena y el material de origen nuclear no requiere de la presencia inicial del núcleo intacto.

3) Inyección de histonas H2b iodadas al núcleo de oocitos de *Xenopus laevis*.

Con el objeto de determinar si la interacción entre la histona H2b exógena y el material nuclear es independiente de la migración de la histona desde el citoplasma al núcleo se inyectó la histona H2b iodada directamente en el núcleo.

Se microinyectaron 15 nl de una solución de histona H2b iodada (0,3 mg/ml) en el núcleo de cada oocito y en seguida se incubaron los oocitos a 21° en 50 µl de solución de Barth en presencia y ausencia de progesterona 1 µM, durante 0, 3 y 6 horas; posteriormente se fijaron y procesaron para realizar la radioautografía según está descrito en los Métodos.

En las radioautografías de los cortes de estos oocitos se observa que un 86 a 93 % de la marca radiactiva permanece en el núcleo de los oocitos crecidos durante los tiempos de incubación ensayados (Foto N° 11).

En los folículos incubados con progesterona la marca se encuentra localizada inicialmente en el núcleo; en cambio cuando los oocitos están maduros, la histona H2b iodada se encuentra asociada a las zonas basófilas de origen nuclear (foto N° 12), abarcando el 77 a 90 % de la radiactividad total.

A grandes rasgos se observa el mismo fenómeno descrito en los ensayos anteriores, lo cual indica que aparentemente no es necesario un procesamiento previo a la interacción de la histona H2b y el material basófilo de la vesícula germinal del oocito.

Tabla I

Cuantificación de gránulos de Ag reducida en cortes de oocitos de Xenopus laevis.

Condiciones experimentales : Inyección de histona H2b en el citoplasma de oocitos y posterior incubación en solución de Barth a 21° durante 6 horas.

| Zona del folículo | Núcleo | | | Citoplasma | | | Background | | |
|---------------------------------|-----------|----|------|------------|-----|-----|------------|----------------|-----|
| | Nº oocito | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | I | II |
| Secc. del retículo : | a) | 35 | 42 | 32 | 1 | 4 | 2 | 1 | 1 |
| | b) | 21 | 26 | 21 | 2 | 2 | 3 | 0 | 1 |
| | c) | 28 | 25 | 45 | 2 | 5 | 4 | 3 | 1 |
| | d) | 46 | 40 | 51 | 1 | 6 | 4 | 1 | 2 |
| | e) | 40 | 40 | 47 | 1 | 3 | 5 | 0 | 2 |
| Promedio | | 34 | 34,6 | 39,2 | 1,4 | 4 | 1 | 1 | 1,2 |
| Promedio total | | | 35,9 | | | 2,1 | | 1,1 | |
| Promedio total menos background | | | 34,8 | | | 1,0 | | | |
| % aprox. | | | 97 % | | | 3 % | | (100 % = 35,8) | |

La tabla muestra los datos experimentales obtenidos al cuantificar los granos visualizados en un retículo cuadrado de 10 mm dividido en secciones de $1,0 \text{ mm}^2$, denominadas a, b, c, d y e. En cada uno de los tres oocitos se estimó la radiactividad existente en la zona citoplasmática. Se obtuvo un promedio para cada zona del folículo, al cual se restó el nivel basal de radiactividad. Se asignó un valor de 100 % a la suma de los promedios calculados para los núcleos y citoplasmas de los tres oocitos.

Microinyección de la histona H2b en el citoplasma de oocitos.

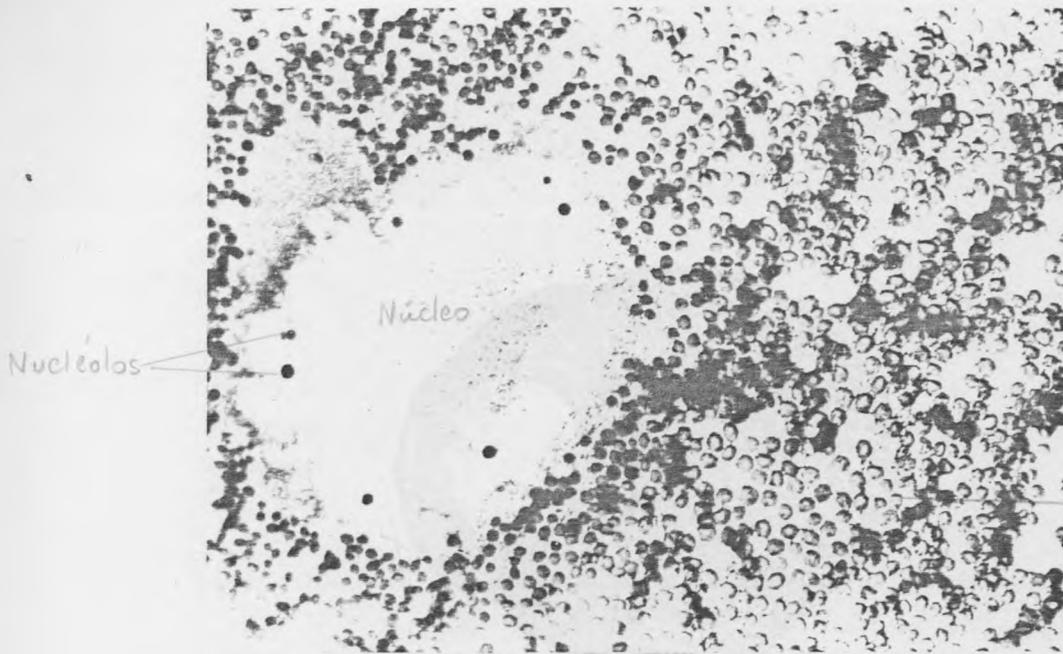


Foto N° 1
Tiempo de inc.:
0 hrs.
x 573

Foto N° 2
Oocito ovulador
x 581
Citoplasma

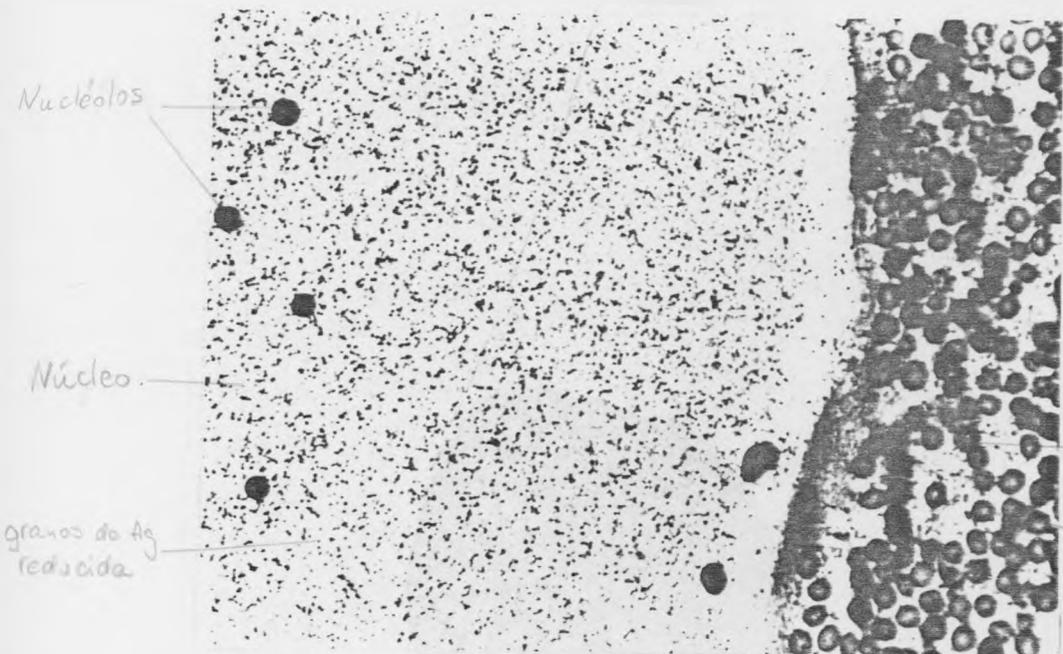


Foto N° 2
Tiempo de inc.:
6 hrs.
x 581

Citoplasma
plaqueta vitelina

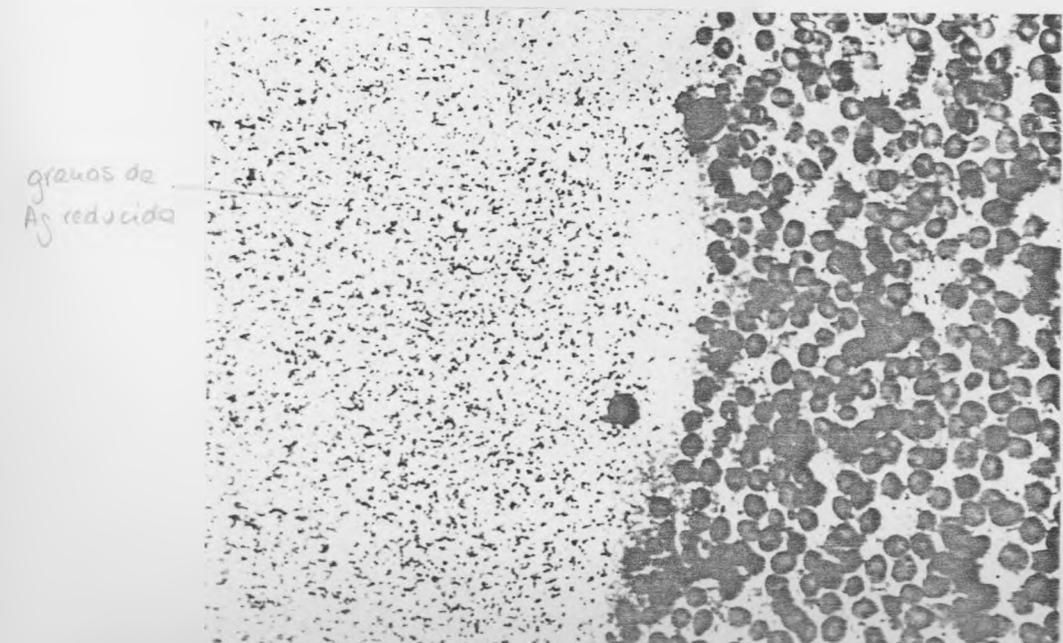
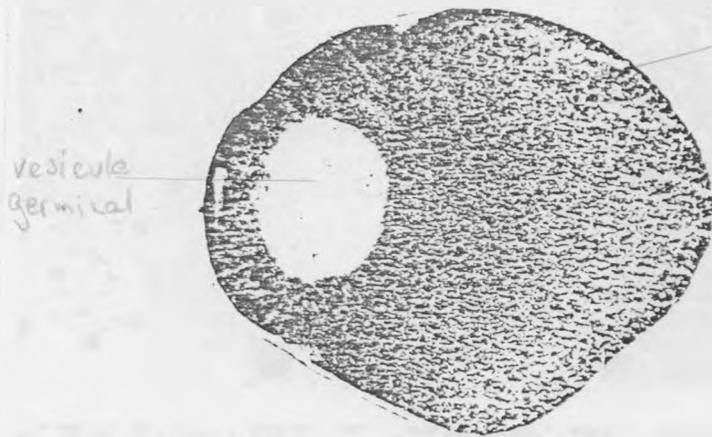


Foto N° 3
Tiempo de inc.:
13 hrs.
x 544

granos de
Ag redscida



vesicula
germinal

citoplasma

Foto N° 4
Oocito crecido
x 64

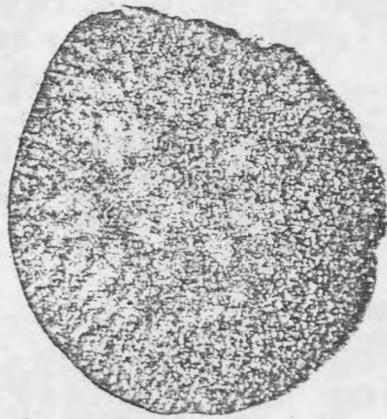


Foto N° 5
Oocito maduro
x 78

Microinyección de histona H2b en oocitos incubados con progesterona 1 μ M.

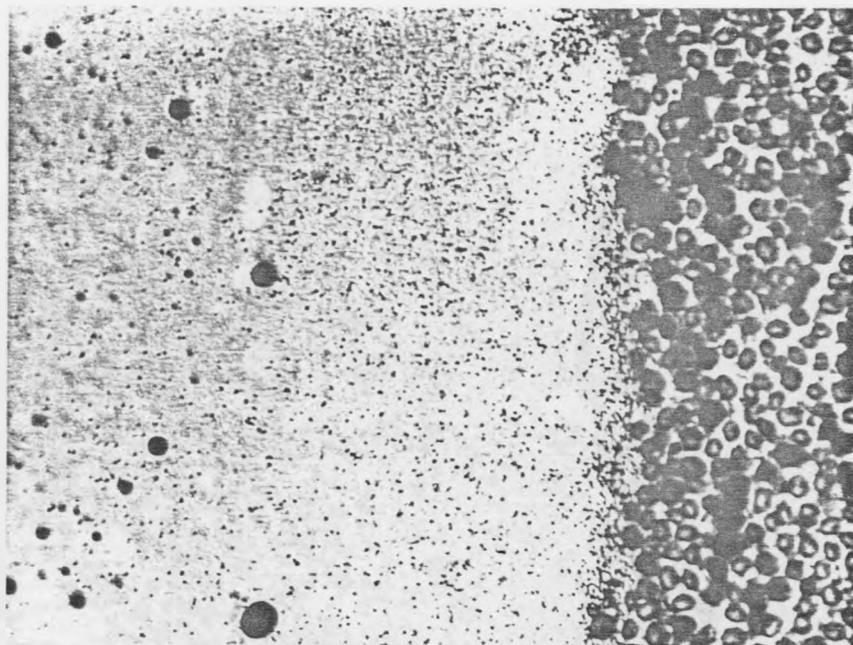
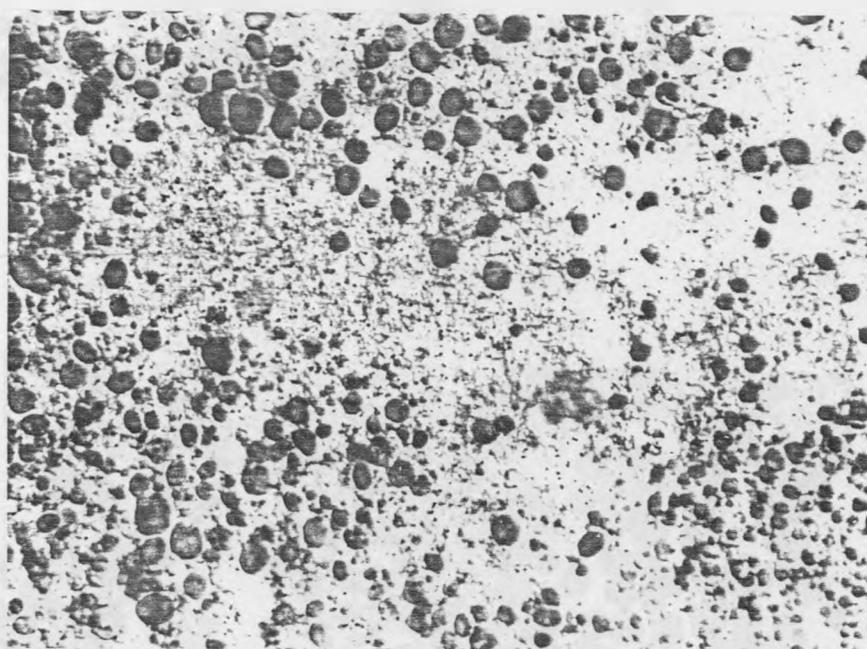
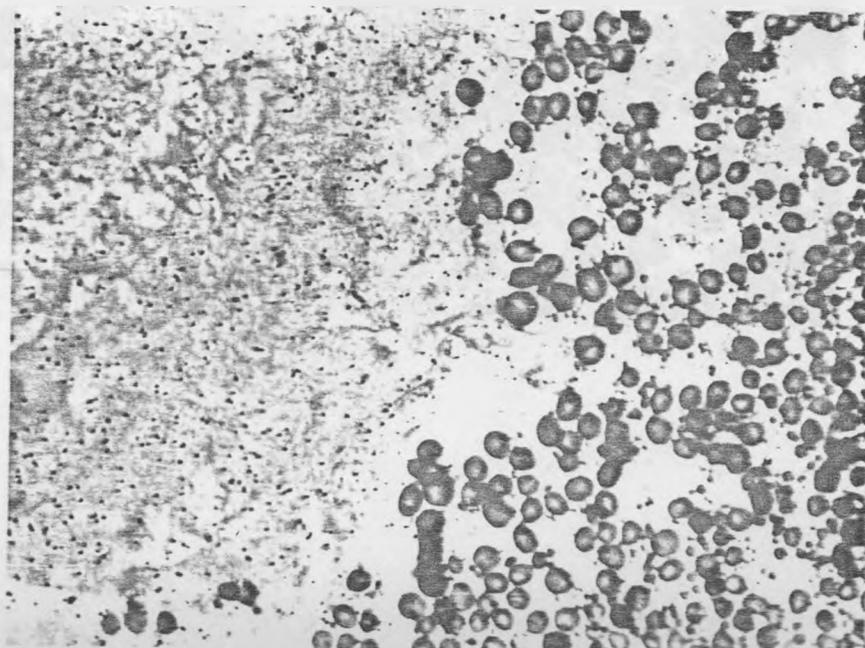


Foto N° 6
Tiempo de inc.:
0 hrs.
x 591



material
basófilo

Foto N° 7
Tiempo de inc.:
6 hrs.
x 584



material
basófilo

Foto N° 8
Tiempo de inc.:
13 hrs.
x 581

Citoplasma

Microinyección de histonas H2b en oocitos maduros.

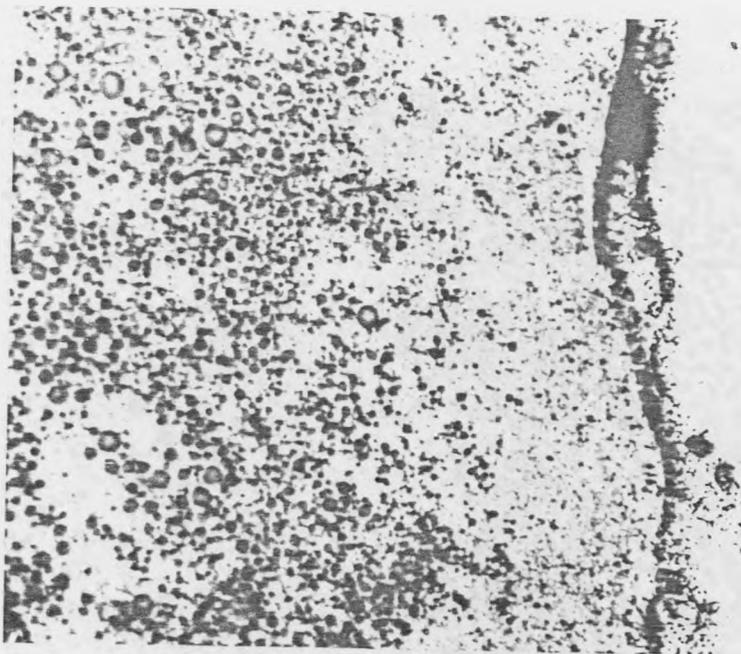


Foto N° 9
Tiempo de inc.:
0 hrs.
x 556

material basófilo

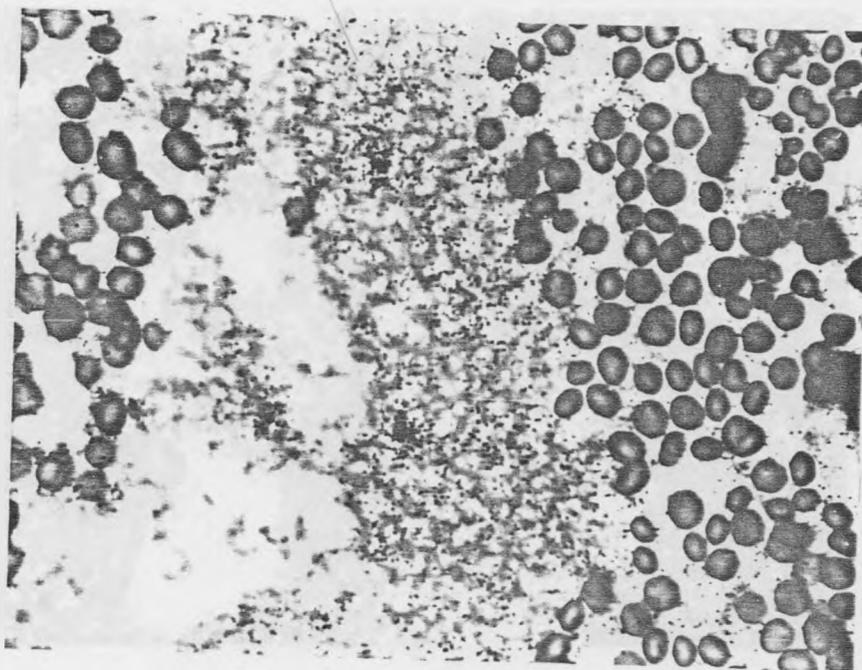


Foto N° 10
Tiempo de inc.:
6 hrs.
x 589

Microinyección de histona H2b al núcleo de oocitos incubados con
progesterona 1 μ M y oocitos controles.

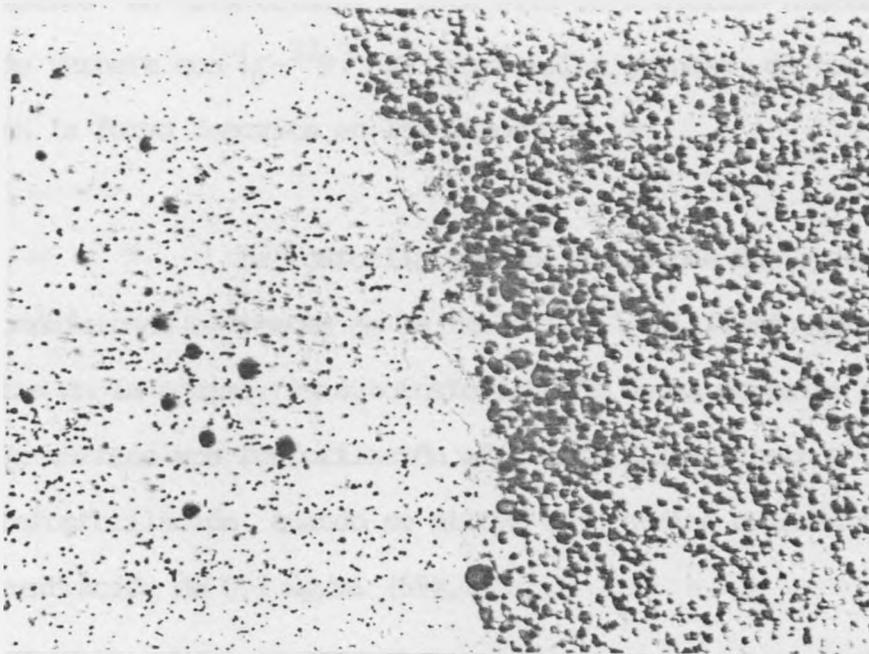


Foto N° 11
Oocito control
Tiempo de inc.:
6 hrs.
x 600

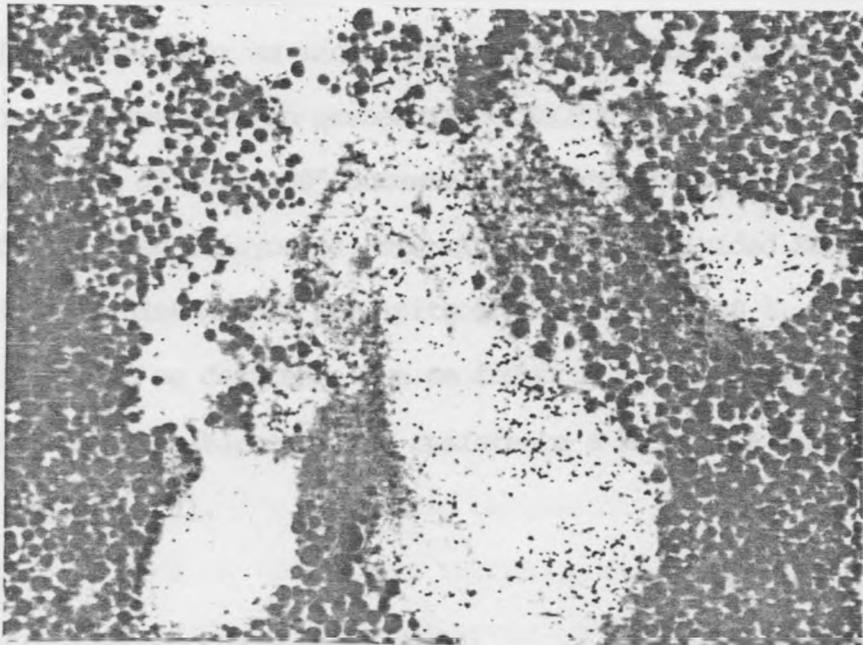


Foto N° 12
Oocito maduro
Tiempo de inc.:
6 hrs.
x 589

II) Desfosforilación de histonas.

Se estudió la desfosforilación de histonas fosforiladas en el oocito con el objeto de determinar si existe tal actividad enzimática en esta célula. Para ello se fosforila histona H2b de timo de ternera con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP y proteína quinasa de corazón de bovino en la forma descrita en los Métodos.

La fosforilación de la histona H2b obtenida en estas condiciones se resume en la tabla II. Utilizando concentraciones altas de la enzima, la autofosforilación de la proteína es considerable. Se obtiene una fosforilación eficiente del sustrato y un mínimo de autofosforilación cuando se diluye la proteína quinasa hasta una concentración de 0,1 mg/ml (59).

La histona H2b se fosforila principalmente en los residuos de serina (62). Para comprobar si efectivamente se formó un enlace fosfoéster se incubó la histona H2b fosforilada en tres condiciones diferentes: en presencia de NaOH 0,5 N a 100°, de HCl 0,1 N a 20° y de TCA al 5 % a 90° durante 15 minutos respectivamente. En cada uno de los tres ensayos se determinó la radiactividad remanente de ^{32}P unido a la histona por precipitación con TCA al 10 %. De los resultados obtenidos se desprende que se formó un enlace fosfoéster, puesto que éste es sensible a NaOH y resistente a HCl y TCA en estas condiciones (Figura N° 1).

1) Desfosforilación de histonas microinyectadas.

Se estudió la desfosforilación in vivo de la histona fosforilada. Para ello se microinyectó la histona H2b fosforilada en oocitos de Xenopus laevis. Se inyectaron alrededor de 80 nl histona (3 mg/ml) en la zona ecuatorial de cada folículo y se incubaron grupos de 5 oocitos en 200 μ l de solución de Barth a 21° durante distintos tiempos. La incubación se detuvo en frío, se homogeneizaron los oocitos en TCA al 10 % para luego determinar la radiactividad que queda retenida en filtros de fibra de vidrio. Al graficar los resultados de este ensayo se observa una disminución de la radiactividad precipitable con TCA al 10 % (Figura N° 2).

Se inyectó igualmente histona H2b marcada con ^{125}I en la zona ecuatorial de los oocitos y se midió la radiactividad precipitable con TCA al 10%; en este caso no hay una disminución de la radiactividad unida a la proteína (Figura N° 2). Esto indica que el grupo fosfato es sacado de la histona por alguna actividad enzimática en el oocito, a diferencia del ^{125}I que permanece unido a la histona. La mantención de la marca de ^{125}I precipitable comprueba que la disminución de ^{32}P precipitable descrita más arriba corresponde a una desfosforilación de la histona y no a una degradación por proteólisis de la histona. Estos resultados confirman los obtenidos por Woodland y Adamson (43).

Fue de interés determinar si la actividad desfosforilante observada en los oocitos hidroliza específicamente el fosfato de la histona H2b o si esta actividad saca los grupos fosfato de otras histonas modificadas.

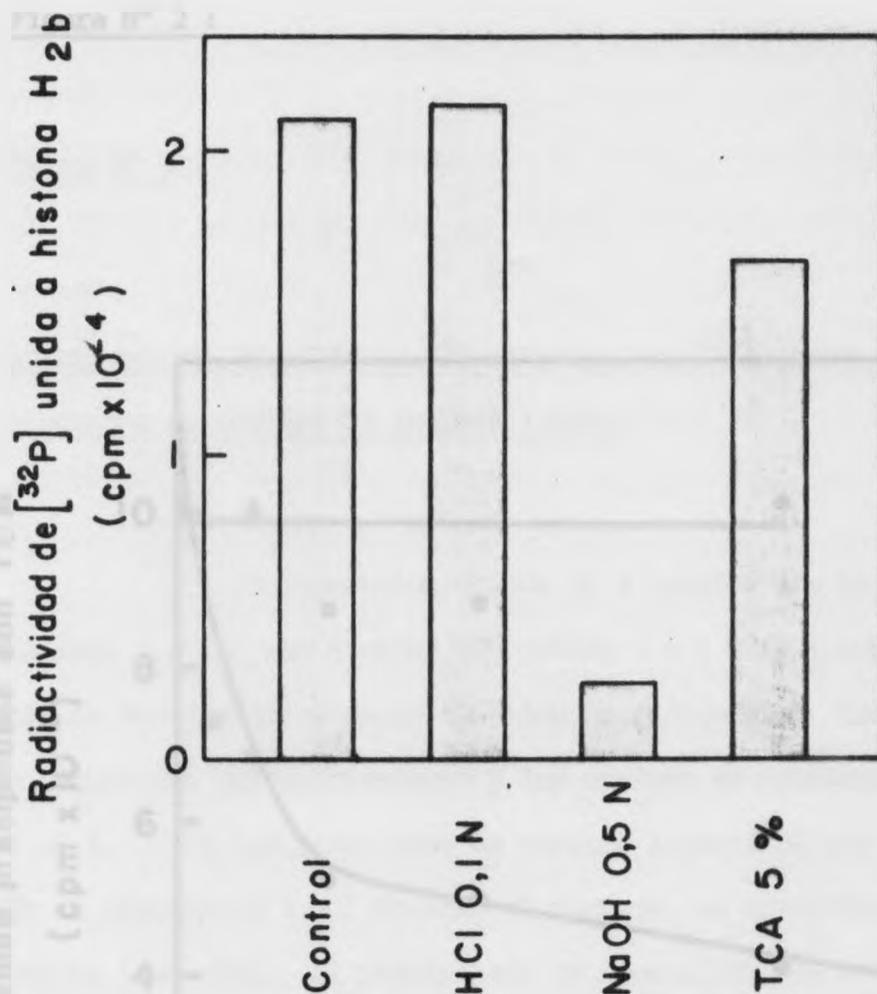
Tabla II.

Fosforilación de la histona H2b con proteína quinasa de corazón de bovino.

| Adición | Radiactividad precipitable con TCA al 10 % |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Proteína quinasa (0,1 mg/ml) + histona H2b (2,5 mg/ml) | 638.245 cpm |
| Proteína quinasa (0,1 mg/ml) | 6.733 cpm |
| Histona H2b (2,5 mg/ml) | 664 cpm |

Se incubó la proteína quinasa en presencia de tampón fosfato 50 mM pH 7,1 , $MgCl_2$ 10 mM, DIT 10 mM, cAMP 2 μM y $[\gamma-^{32}P]$ ATP de una concentración aproximada de 100 μM a 37° durante 30 minutos. La reacción se detuvo por adición de TCA al 10 % frío, se calentó a 90° durante 10 minutos y se centrifugó a 1500 x g durante 5 minutos. El precipitado se neutralizó con 0,1 ml de NaOH 1 N frío, se reprecipitó con TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

Figura N° 1 :



Análisis del carácter fosfoéster del enlace fosforil-serina de las histonas fosforiladas.

Se incubaron alícuotas de 5 μl de la histona H2b fosforilada (2 mg/ml) con 0,2 ml de HCl, NaOH o TCA durante 10 minutos a distintas temperaturas: las incubaciones se realizaron con HCl 0,1 N a 25°, con NaOH 0,5 N a 100° y con TCA al 5 % a 90°. Las reacciones se detuvieron agregando TCA al 10 % frío, se calentaron a 90° durante 10 minutos y se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos. Los precipitados se neutralizaron con 0,1 ml de NaOH 1 N frío, se agregó TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

Figura N° 2 :

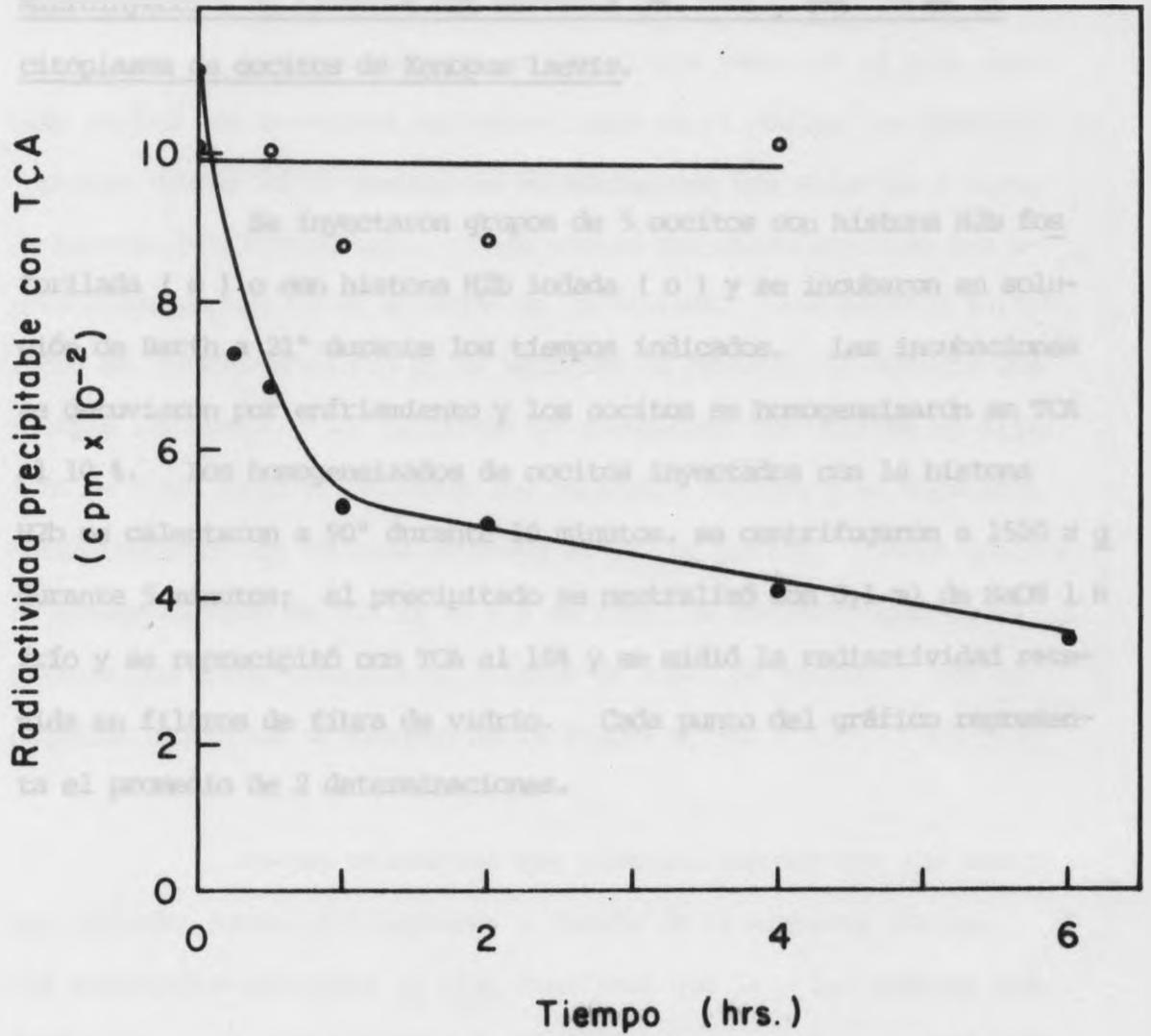


Figura N° 2 :

Microinyección de histonas H2b marcadas con ^{125}I y con ^{32}P en el citoplasma de oocitos de *Xenopus laevis*.

Se inyectaron grupos de 5 oocitos con histona H2b fosforilada (●) o con histona H2b iodada (○) y se incubaron en solución de Barth a 21° durante los tiempos indicados. Las incubaciones se detuvieron por enfriamiento y los oocitos se homogeneizaron en TCA al 10 %. Los homogeneizados de oocitos inyectados con la histona H2b se calentaron a 90° durante 10 minutos, se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos; el precipitado se neutralizó con 0,1 ml de NaOH 1 N frío y se reprecipitó con TCA al 10% y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio. Cada punto del gráfico representa el promedio de 2 determinaciones.

Se eligió la histona H1 puesto que ésta no forma parte del nucleosoma y probablemente cumple una función diferente dentro de la cromatina (53). Se preparó histona H1 fosforilada y se estudió la desfosforilación in vivo de esta proteína. Como se observa en la figura N° 3 la actividad desfosforilante de fosfoproteínas presente en el oocito también escinde los grupos fosfato de la histona H1 fosforilada.

Considerando que es importante saber si in vivo también existe una actividad desfosforilante en el núcleo, se microinyectaron grupos de 10 oocitos en el núcleo con una solución 6 mg/ml de histona H2b fosforilada. Cada oocito fue microinyectado con aproximadamente 20 nl de solución de la histona. Los oocitos inyectados se incubaron en 120 µl de solución de Barth a 21° durante los tiempos indicados. Al finalizar la incubación los oocitos se fijaron con TCA, luego se abrieron los folículos fijados y se separaron cuidadosamente los núcleos mediante el uso de pinzas. Estos núcleos se homogeneizaron en TCA al 10 % y se midió la radiactividad precipitable que queda retenida en filtros de fibra de vidrio. Los resultados obtenidos se resumen en la figura N° 4.

No hay evidencias que permitan suponer que las histonas difunden hacia el citoplasma a través de la membrana nuclear. Los resultados obtenidos in vivo confirman que la o las enzimas desfosforilantes de las histonas fosforiladas se encuentran también en el núcleo.

Figura N° 3 :

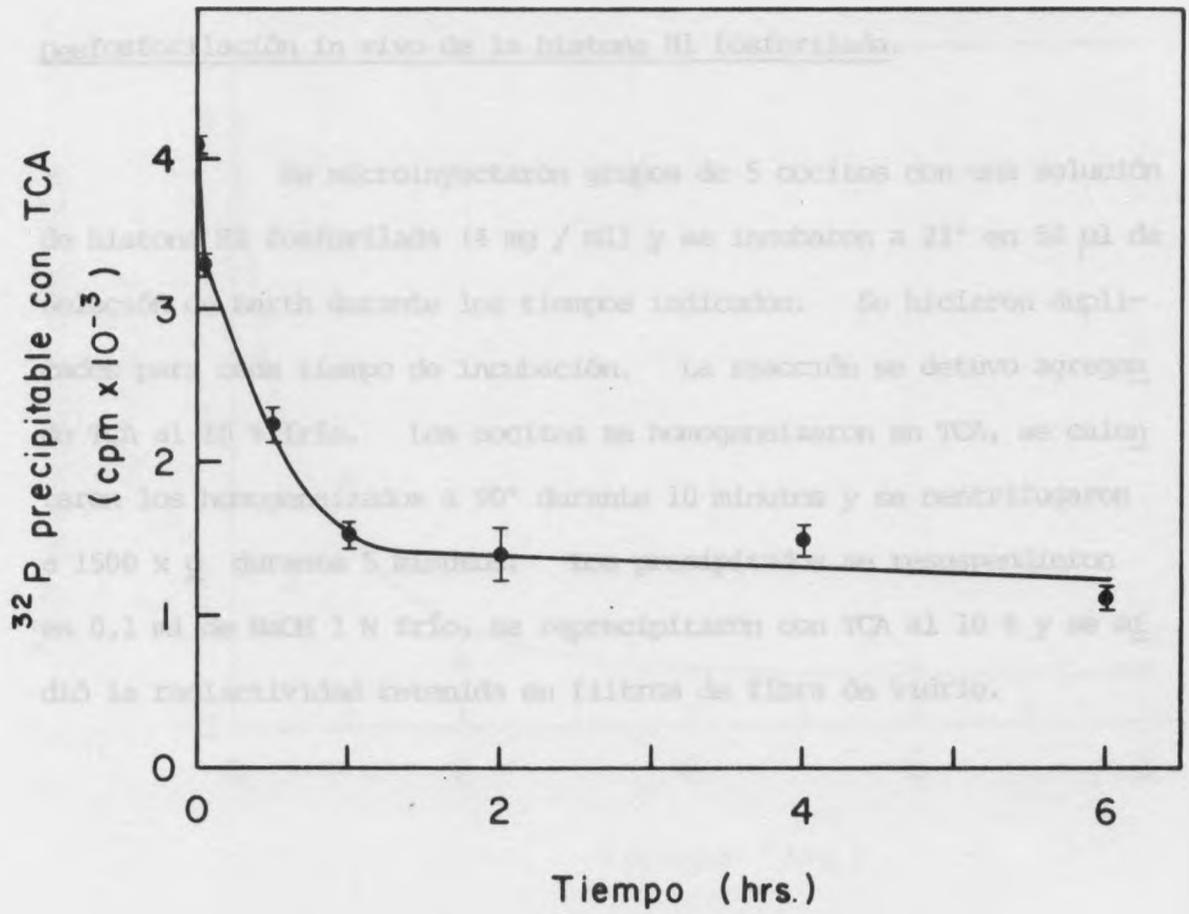


Figura N° 3 :

Desfosforilación in vivo de la histona H1 fosforilada.

Se microinyectaron grupos de 5 oocitos con una solución de histona H1 fosforilada (4 mg / ml) y se incubaron a 21° en 50 µl de solución de Barth durante los tiempos indicados. Se hicieron duplicados para cada tiempo de incubación. La reacción se detuvo agregando TCA al 10 % frío. Los oocitos se homogeneizaron en TCA, se calentaron los homogeneizados a 90° durante 10 minutos y se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos. Los precipitados se resuspendieron en 0,1 ml de NaOH 1 N frío, se reprecipitaron con TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

Tiempo (hrs)

Figura N° 4 :

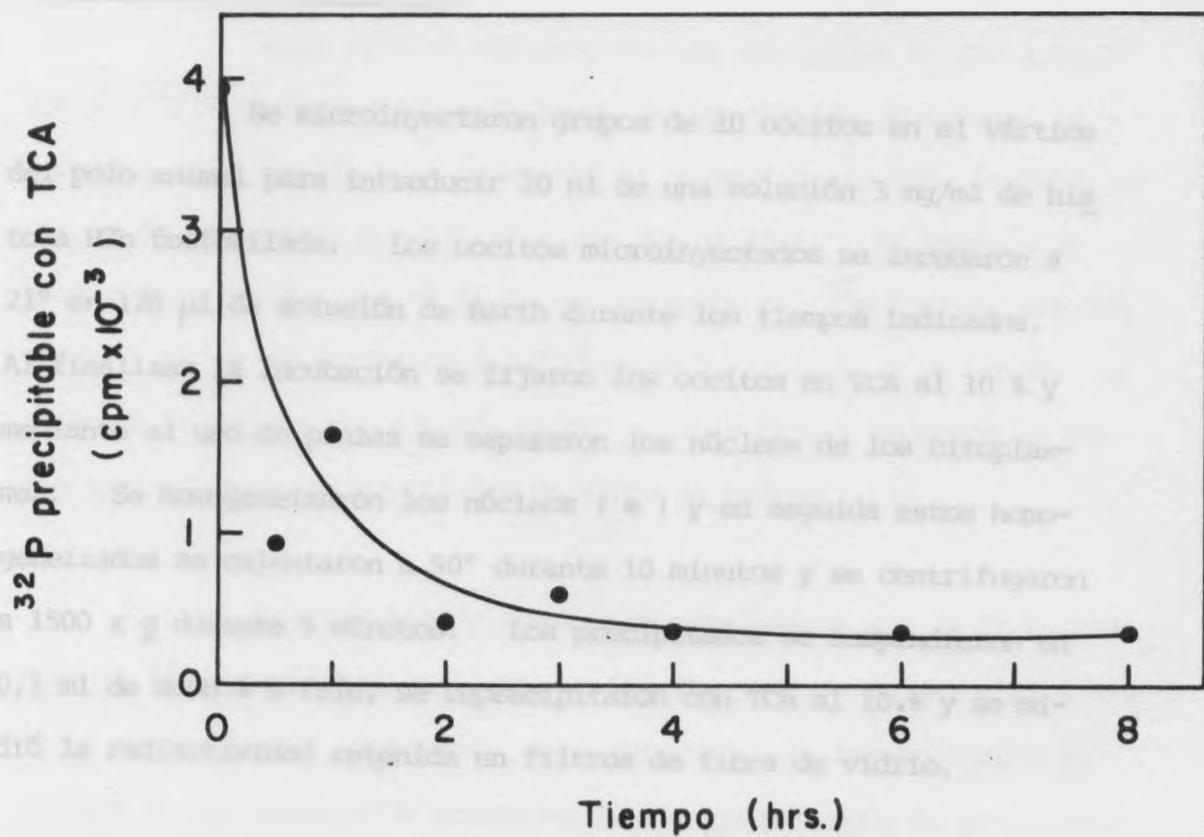


Figura N° 4 :

Desfosforilación in vivo de histonas H2b fosforiladas en núcleos de oocitos de Xenopus laevis.

Se microinyectaron grupos de 10 oocitos en el vértice del polo animal para introducir 20 nl de una solución 3 mg/ml de histona H2b fosforilada. Los oocitos microinyectados se incubaron a 21° en 120 µl de solución de Barth durante los tiempos indicados. Al finalizar la incubación se fijaron los oocitos en TCA al 10 % y mediante el uso de pinzas se separaron los núcleos de los citoplasmas. Se homogeneizaron los núcleos (●) y en seguida estos homogeneizados se calentaron a 90° durante 10 minutos y se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos. Los precipitados se suspendieron en 0,1 ml de NaOH 1 N frío, se reprecipitaron con TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

1. Preparación de la solución de histona fosforilada.

El fosfato radiactivo escindido de la histona fosforilada se incorpora al pool de fosfato presente en el oocito y participa nuevamente en reacciones de fosforilación, incorporándose a diferentes sustratos, que pueden ser proteínas o lípidos. Se realizó un control para comprobar que el fosfato hidrolizado no altera los valores de desfosforilación obtenidos al microinyectar la histona fosforilada en los folículos.

Para ello se microinyectaron cantidades de radiactividad de [^{32}P]- fosfato diez veces mayor de los niveles usualmente inyectados en el oocito y se determinó el porcentaje de este fosfato incorporado a material precipitable con TCA al 10 %. Se inyectaron grupos de 8 oocitos con 60 nl de una solución de ^{32}P -fosfato (75.000 cpm / μl) y se incubaron a 22° durante 0, 1, 2, 4 y 6 horas. La reacción se detuvo por adición de TCA al 10 % frío y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

Los resultados de este ensayo indican que la incorporación de ^{32}P a material insoluble en TCA fue siempre inferior al 2,5 % de la radiactividad inyectada; este porcentaje de incorporación no influye en los resultados obtenidos en los experimentos de desfosforilación de las histonas fosforiladas.

2) Desfosforilación in vitro de las histonas fosforiladas.

Para determinar si la actividad de proteína fosfatasa determinada in vivo se podría observar también in vitro, se incubó la histona H2b fosforilada en presencia de un homogeneizado de oocitos de Xenopus laevis durante distintos tiempos. Como control se incubó la histona fosforilada en presencia de un homogeneizado de oocitos

previamente calentado a 100° durante 15 minutos. Como se ve en la figura N° 5A durante la incubación de la histona fosforilada con un homogeneizado de oocitos disminuye la radiactividad de ^{32}P unido a ella; en cambio la incubación con un homogeneizado precalentado no produce desfosforilación de la histona. La actividad desfosforilante de histonas fosforiladas detectada en cada ensayo corresponde a un homogeneizado obtenido a partir de 5 oocitos.

Para comprobar que la disminución de la radiactividad precipitable con TCA que se observa corresponde a una desfosforilación de la histona H2b fosforilada y no a una degradación de la histona por efecto de las proteasas se incubó la histona fosforilada en presencia de un homogeneizado que contenía PMSF, un inhibidor de proteasas. En la gráfica se observa que aún en presencia de PMSF se produce la misma disminución de la radiactividad de ^{32}P unido a la histona (figura N° 5A).

En forma paralela se realizaron ensayos con histonas H2b marcada con ^{125}I . Al incubar la histona H2b iodada en presencia de homogeneizados de oocitos de Xenopus laevis no se observa una disminución de la radiactividad de ^{125}I unido a la histona (figura N° 5B).

Otro criterio empleado para verificar la desfosforilación de histonas fue analizar la histona H2b que había sido incubada con homogeneizados de oocitos por electroforesis en geles de poli-acrilamida ácido-urea. Para ello se incubó la histona H2b fosforilada con un homogeneizado de oocitos durante un tiempo corto (2 minutos) y un tiempo prolongado (6 horas) en que se observa una disminución marcada de la radiactividad precipitable con TCA al 10 %. El objetivo de este ensayo es verificar una disminución de la radiactividad

Figura N° 5 :

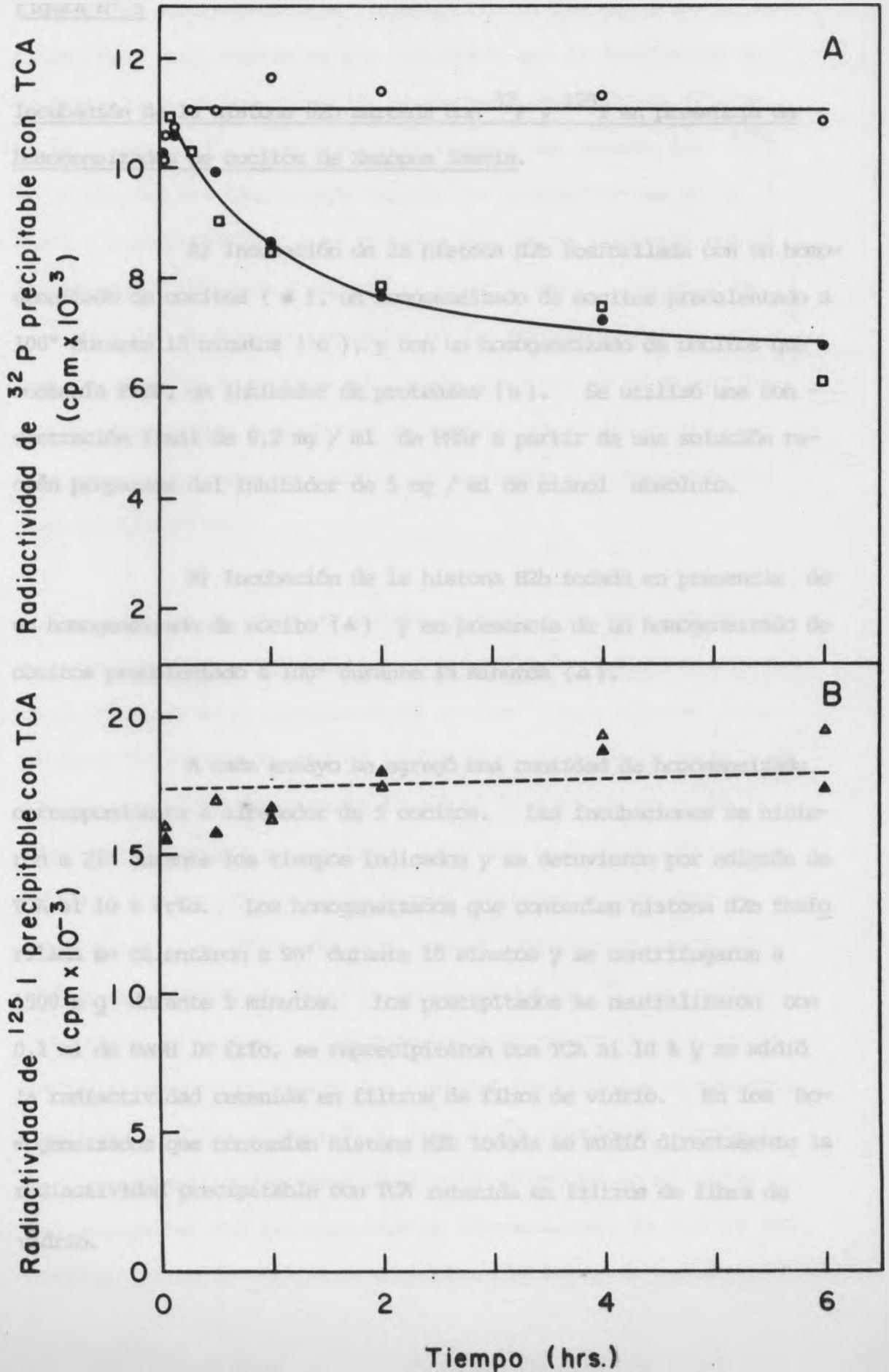


Figura N° 5 :

Incubación de la histona H2b marcada con ^{32}P y ^{125}I en presencia de homogeneizados de oocitos de *Xenopus laevis*.

A) Incubación de la histona H2b fosforilada con un homogeneizado de oocitos (●), un homogeneizado de oocitos precalentado a 100° durante 15 minutos (○), y con un homogeneizado de oocitos que contenía PMSF, un inhibidor de proteasas (□). Se utilizó una concentración final de 0,2 mg / ml de PMSF a partir de una solución recién preparada del inhibidor de 5 mg / ml de etanol absoluto.

B) Incubación de la histona H2b iodada en presencia de un homogeneizado de oocito (▲) y en presencia de un homogeneizado de oocitos precalentado a 100° durante 15 minutos (△).

A cada ensayo se agregó una cantidad de homogeneizado correspondiente a alrededor de 5 oocitos. Las incubaciones se hicieron a 21° durante los tiempos indicados y se detuvieron por adición de TCA al 10 % frío. Los homogeneizados que contenían histona H2b fosforilada se calentaron a 90° durante 10 minutos y se centrifugaron a $1500 \times g$ durante 5 minutos. Los precipitados se neutralizaron con 0,1 ml de NaOH 1N frío, se reprecipitaron con TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio. En los homogeneizados que contenían histona H2b iodada se midió directamente la radiactividad precipitable con TCA retenida en filtros de fibra de vidrio.

en la zona correspondiente a la migración de la histona H2b. Al cabo de una incubación de 6 horas la intensidad de la banda (observada por tinción) es comparable a la intensidad de la banda de la histona H2b incubada durante 2 minutos con el homogeneizado de oocitos; ésto posiblemente es una indicación que la disminución de la marca no se debe a la acción de enzimas proteolíticas (figura N° 6). Al repetir este ensayo con histona H2b marcada con ^{125}I no se observa una disminución similar de la radiactividad en la banda correspondiente a esta proteína después de incubarla con un homogeneizado de oocitos durante el mismo tiempo. Debido a la alta cantidad de lípidos presentes en los homogeneizados de oocitos, la cantidad de histona H2b iodada que entró en el gel no fue pareja. En ensayos posteriores se tuvo la precaución de colocar en el gel un extracto de oocitos con una menor contaminación lipídica (figura N° 7).

Se hicieron ensayos in vitro para averiguar si la actividad desfosforilante de las histonas fosforiladas se encuentra en el núcleo o en el citoplasma del oocito. Para ello se homogeneizaron 60 núcleos de oocitos en 200 μl de solución de Barth v 25 oocitos anucleados, igualmente en 200 μl de solución de Barth. Ambos homogeneizados se incubaron a 21° con la histona H2b fosforilada. En los intervalos de tiempo indicados se retiraron en forma sucesiva alícuotas de 15 μl que se precipitaron con TCA al 10 % y se determinó en ellas la radiactividad de ^{32}P que permanecía unida a la histona. Los resultados obtenidos indican que la actividad desfosforilante de las histonas fosforiladas se encuentra tanto en el núcleo (figura N° 8) como en el citoplasma (figura N° 9). Los resultados de desfosforilación obtenidos en el núcleo no son comparables con los obtenidos en homogeneizados de oocitos anucleados, porque se utilizaron distintas cantidades de tejido; pero si

Figura N° 6 :

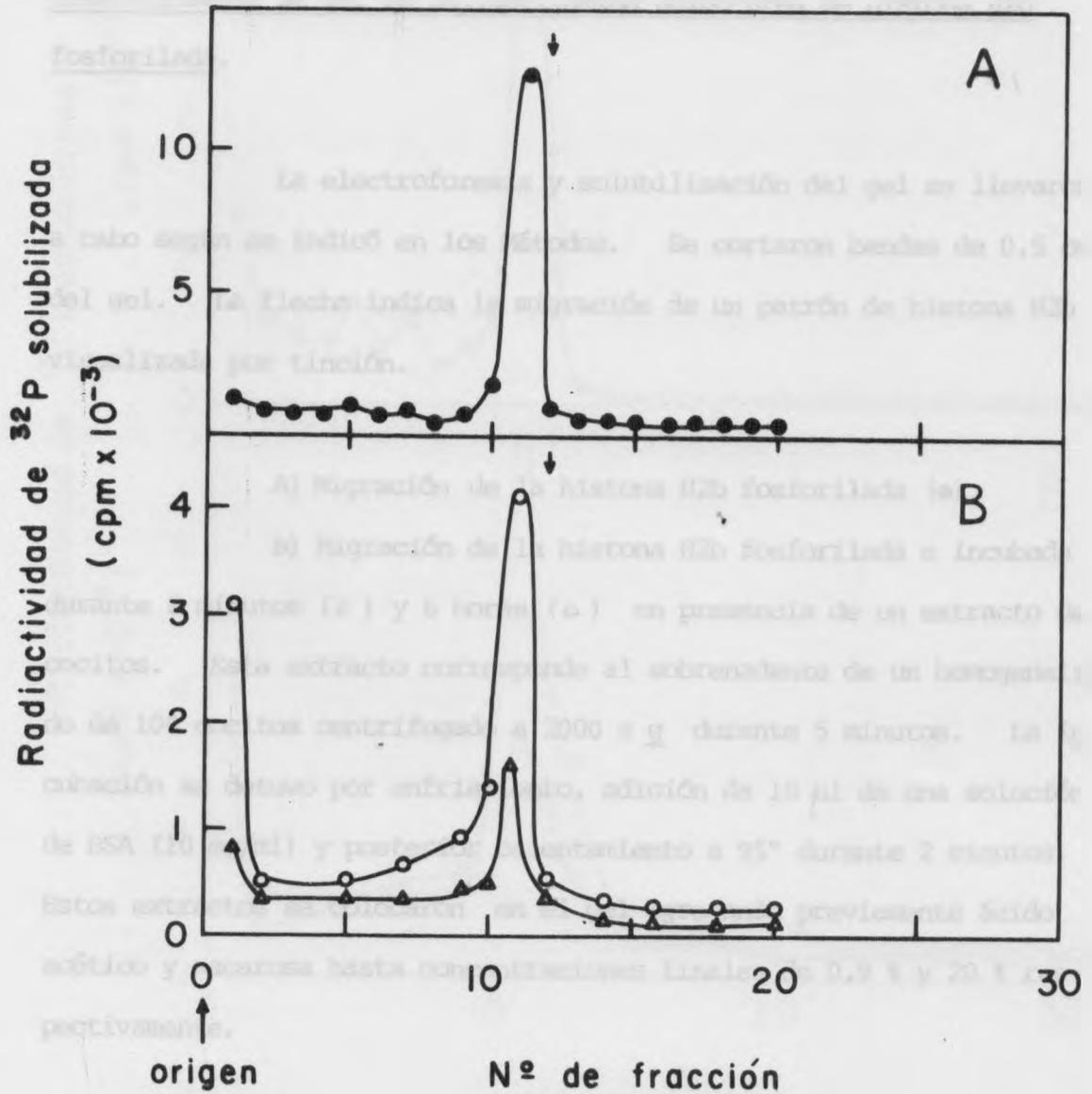


Figura N° 6 :

Electroforesis en gel de poliacrilamida ácido-urea de histona H2b fosforilada.

La electroforesis y solubilización del gel se llevaron a cabo según se indicó en los Métodos. Se cortaron bandas de 0,5 cm del gel. La flecha indica la migración de un patrón de histona H2b visualizada por tinción.

A) Migración de la histona H2b fosforilada (●).

B) Migración de la histona H2b fosforilada e incubada durante 2 minutos (c) y 6 horas (Δ) en presencia de un extracto de oocitos. Este extracto corresponde al sobrenadante de un homogeneizado de 100 oocitos centrifugado a 2000 x g durante 5 minutos. La incubación se detuvo por enfriamiento, adición de 10 μl de una solución de BSA (10 mg/ml) y posterior calentamiento a 95° durante 2 minutos. Estos extractos se colocaron en el gel agregando previamente ácido acético y sacarosa hasta concentraciones finales de 0,9 % y 20 % respectivamente.

Figura N° 7 :

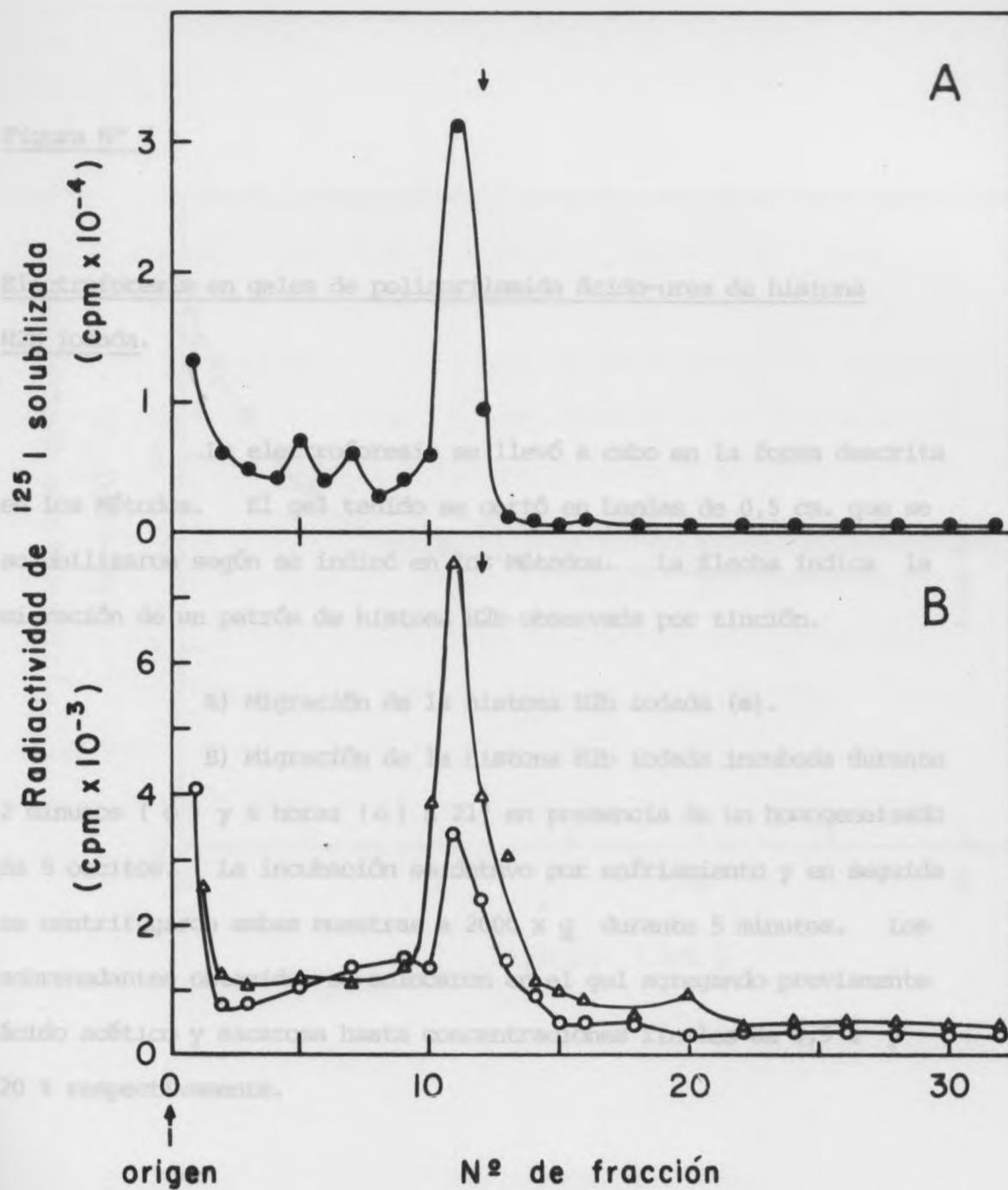


Figura N° 7 :

Electroforesis en geles de poliacrilamida ácido-urea de histona H2b iodada.

La electroforesis se llevó a cabo en la forma descrita en los Métodos. El gel teñido se cortó en bandas de 0,5 cm. que se solubilizaron según se indicó en los Métodos. La flecha indica la migración de un patrón de histona H2b observada por tinción.

A) Migración de la histona H2b iodada (●).

B) Migración de la histona H2b iodada incubada durante 2 minutos (○) y 6 horas (△) a 21° en presencia de un homogeneizado de 5 oocitos. La incubación se detuvo por enfriamiento y en seguida se centrifugaron ambas muestras a 2000 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se colocaron en el gel agregando previamente ácido acético y sacarosa hasta concentraciones finales de 0,9 % y 20 % respectivamente.

Figura N° 8 :

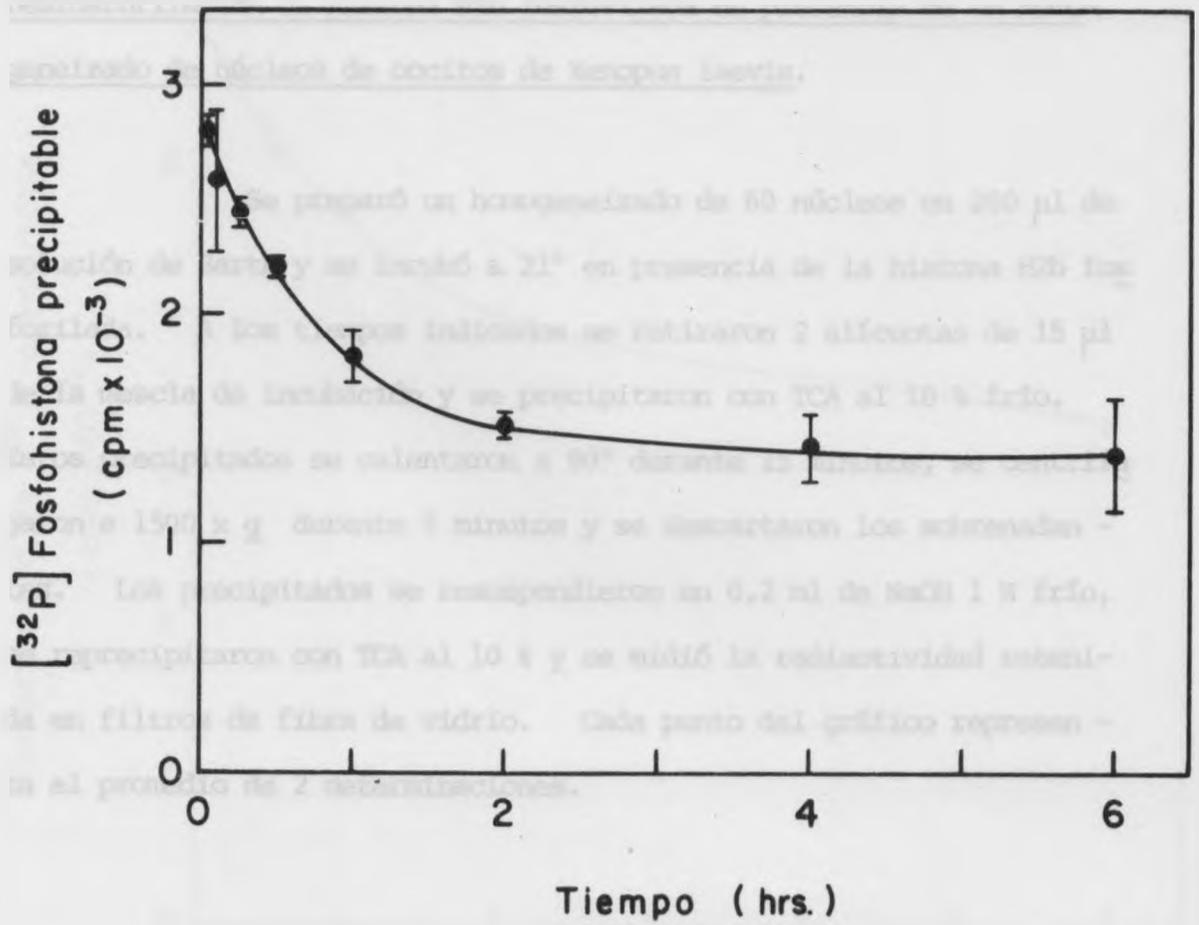


Figura N° 8 :

Desfosforilación de histona H2b fosforilada en presencia de un homogeneizado de núcleos de oocitos de *Xenopus laevis*.

Se preparó un homogeneizado de 60 núcleos en 200 μ l de solución de Barth y se incubó a 21° en presencia de la histona H2b fosforilada. A los tiempos indicados se retiraron 2 alícuotas de 15 μ l de la mezcla de incubación y se precipitaron con TCA al 10 % frío. Estos precipitados se calentaron a 90° durante 15 minutos, se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados se resuspendieron en 0,2 ml de NaOH 1 N frío, se reprecipitaron con TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio. Cada punto del gráfico representa el promedio de 2 determinaciones.

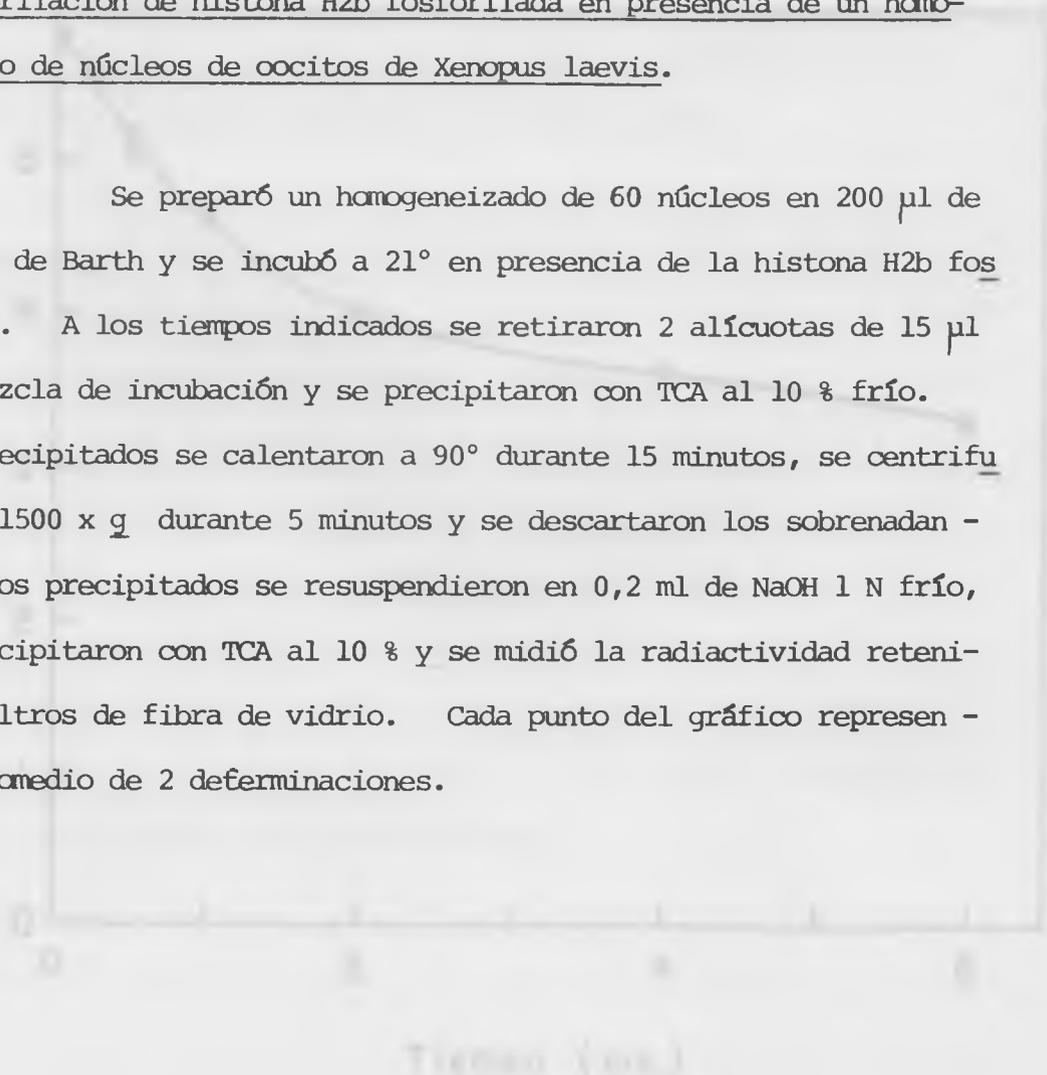


Figura N° 9 :

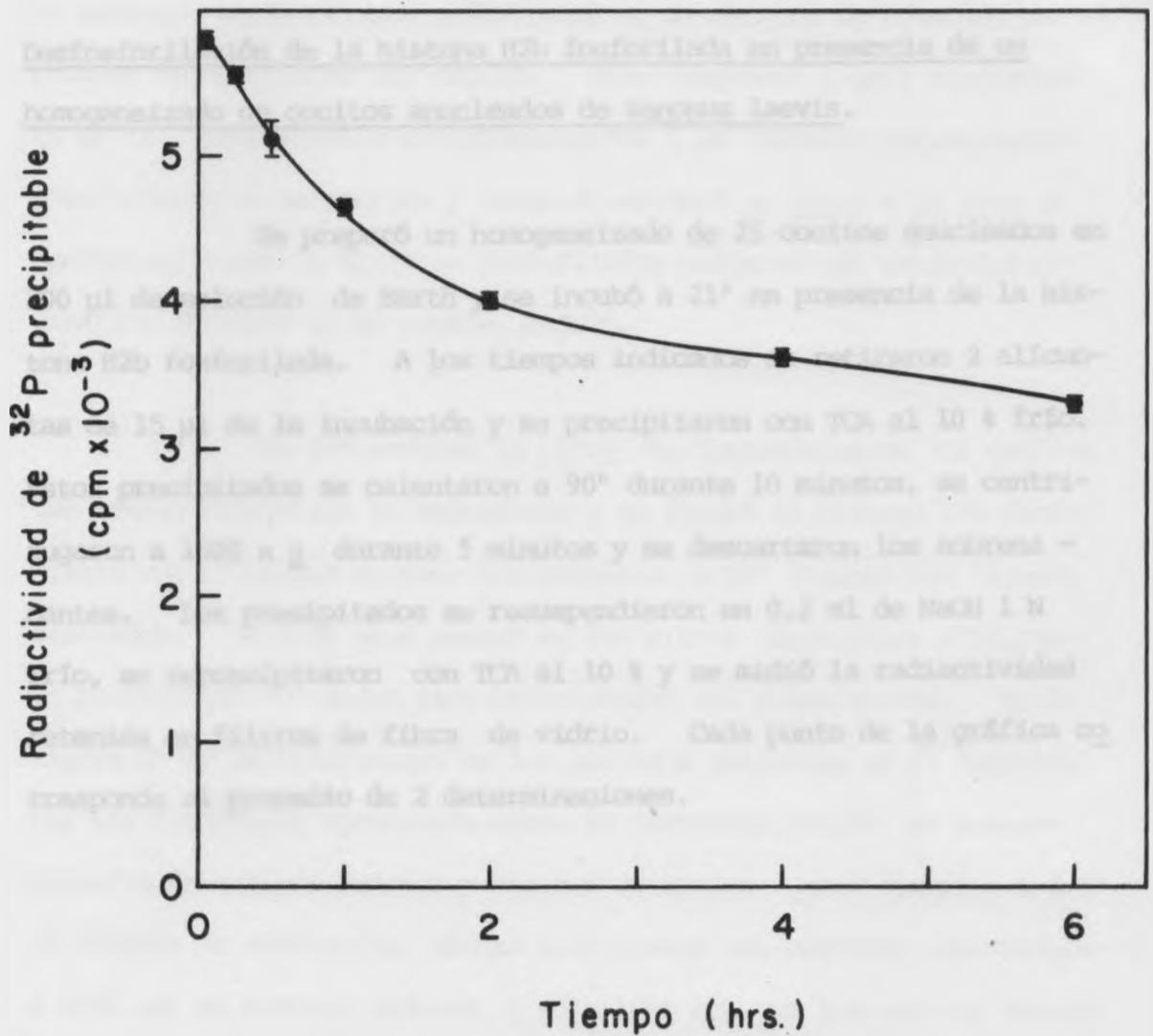


Figura N° 9 :

Desfosforilación de la histona H2b fosforilada en presencia de un
homogeneizado de oocitos anucleados de *Xenopus laevis*.

Se preparó un homogeneizado de 25 oocitos anucleados en 200 μ l de solución de Barth y se incubó a 21° en presencia de la histona H2b fosforilada. A los tiempos indicados se retiraron 2 alícuotas de 15 μ l de la incubación y se precipitaron con TCA al 10 % frío. Estos precipitados se calentaron a 90° durante 10 minutos, se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados se resuspendieron en 0,2 ml de NaOH 1 N frío, se reprecipitaron con TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio. Cada punto de la gráfica corresponde al promedio de 2 determinaciones.

se pudieran expresar los resultados en actividad por mg de tejido se obtendrían seguramente valores más altos de desfosforilación para el extracto de núcleos de oocito.

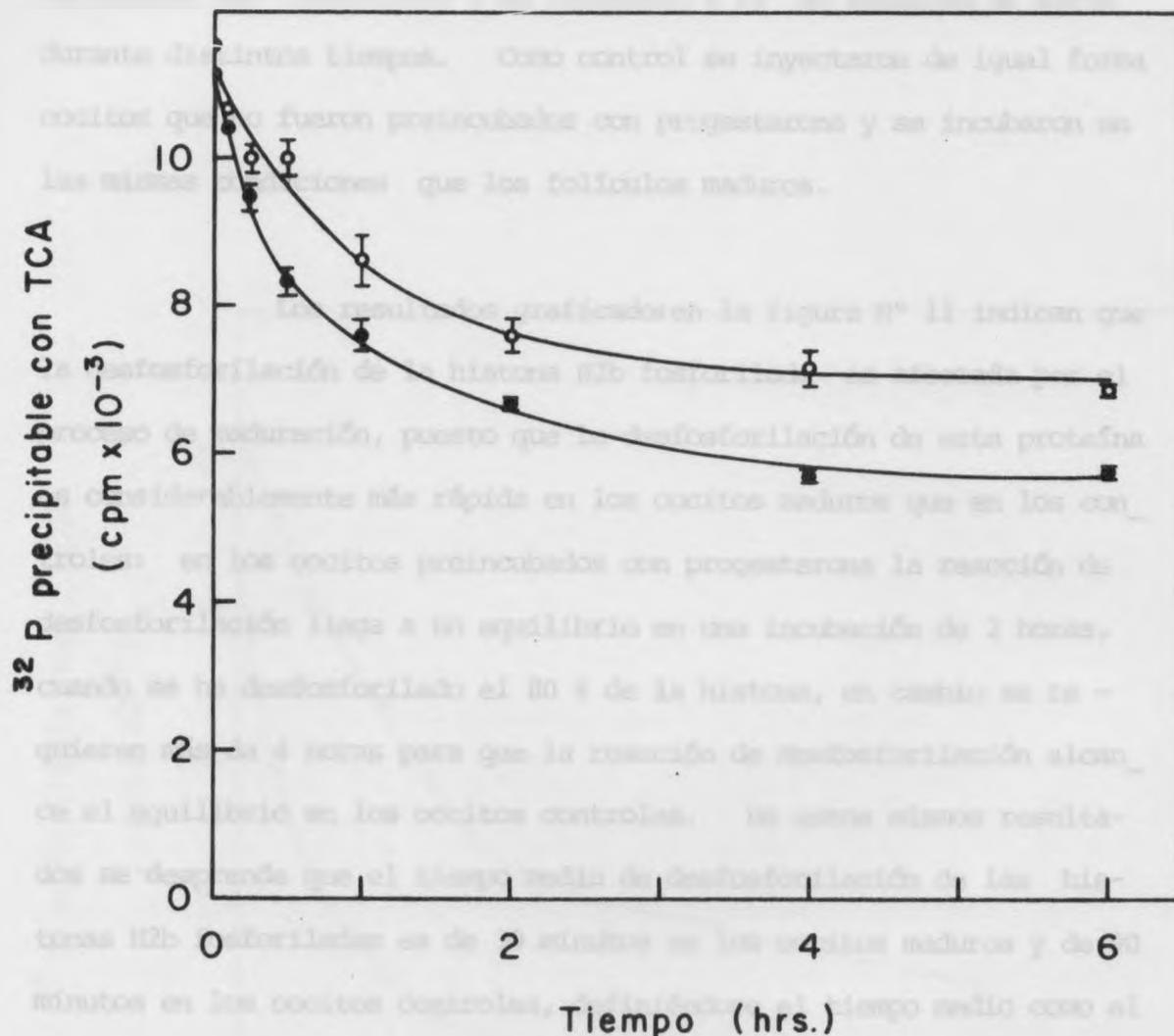
3) Efecto de la progesterona.

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si el recambio de los grupos modificados de la histona es afectado por el proceso de maduración del oocito. Para responder a esta interrogante se incubaron oocitos con progesterona $1 \mu\text{M}$ durante varias horas para inducir su maduración y luego se estudió in vitro e in vivo la desfosforilación de histonas fosforiladas mediante una actividad enzimática presente en el oocito maduro.

En los ensayos in vitro se homogeneizaron 100 oocitos que habían completado su maduración y se incubó la histona H2b fosforilada con alícuotas de este homogeneizado a 21° durante los tiempos indicados. Se hizo otro ensayo en las mismas condiciones utilizando oocitos que no habían sido preincubados con progesterona. En la figura N° 10 se observa que en los períodos iniciales de la reacción hay una diferencia apreciable entre la desfosforilación en homogeneizados de oocitos maduros y oocitos controles. Por ejemplo, a los 30 minutos de incubación se han hidrolizado una cantidad equivalente a 3000 cpm en oocitos maduros y sólo 1000 cpm en los oocitos controles. A tiempos más largos de incubación esta diferencia es menor.

Para determinar in vivo si la actividad desfosforilante de histonas fosforiladas es afectada por el proceso de maduración, se preincubaron oocitos en solución de Barth con progesterona $1 \mu\text{M}$ a 21° hasta la aparición de una mancha blanca en el centro del polo animal

Figura N° 10 :



Incubación de histona H2b fosforilada con homogeneizados de oocitos preincubados con progesterona.

La histona H2b fosforilada se incubó con un homogeneizado de oocitos maduros (preincubados con progesterona $1 \mu\text{M}$ a 21° durante 15 horas) (●) y con oocitos que no habían sido tratados con hormona (○). La incubación se detuvo con TCA al 10 % frío, se calentó a 90° durante 10 minutos y se centrifugó a $1500 \times g$ durante 5 minutos. El precipitado se neutralizó con NaOH 0,1 N frío, se agregó TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de vidrio en un contador de centelleo líquido.

lo cual es índice de la maduración del folículo. Estos oocitos maduros se inyectaron en el citoplasma con 40 nl de una solución 3 mg/ml de histona H2b fosforilada y se incubaron a 21° en solución de Barth durante distintos tiempos. Como control se inyectaron de igual forma oocitos que no fueron preincubados con progesterona y se incubaron en las mismas condiciones que los folículos maduros.

Los resultados graficados en la figura N° 11 indican que la desfosforilación de la histona H2b fosforilada es afectada por el proceso de maduración, puesto que la desfosforilación de esta proteína es considerablemente más rápida en los oocitos maduros que en los controles: en los oocitos preincubados con progesterona la reacción de desfosforilación llega a un equilibrio en una incubación de 2 horas, cuando se ha desfosforilado el 80 % de la histona, en cambio se requieren más de 4 horas para que la reacción de desfosforilación alcance el equilibrio en los oocitos controles. De estos mismos resultados se desprende que el tiempo medio de desfosforilación de las histonas H2b fosforiladas es de 30 minutos en los oocitos maduros y de 90 minutos en los oocitos controles, definiéndose el tiempo medio como el tiempo necesario para que la radiactividad precipitable disminuya al 50 % de la inicial.

Para determinar si el aumento de la actividad fosforilante observado en oocitos maduros ocurre desde el inicio de la maduración o si este estímulo requiere de la ruptura de la vesícula germinal, se preincubaron oocitos durante 3 horas a 21° en solución de Barth que contenía progesterona 1 μ M. Al cabo de esta preincubación en que aún se conserva la vesícula germinal, se microinyectaron los oocitos con una solución de histona H2b fosforilada (de 2 mg/ml) y se incubaron a 21° durante distintos tiempos. En la figura 12 A se

Figura N° 11 :

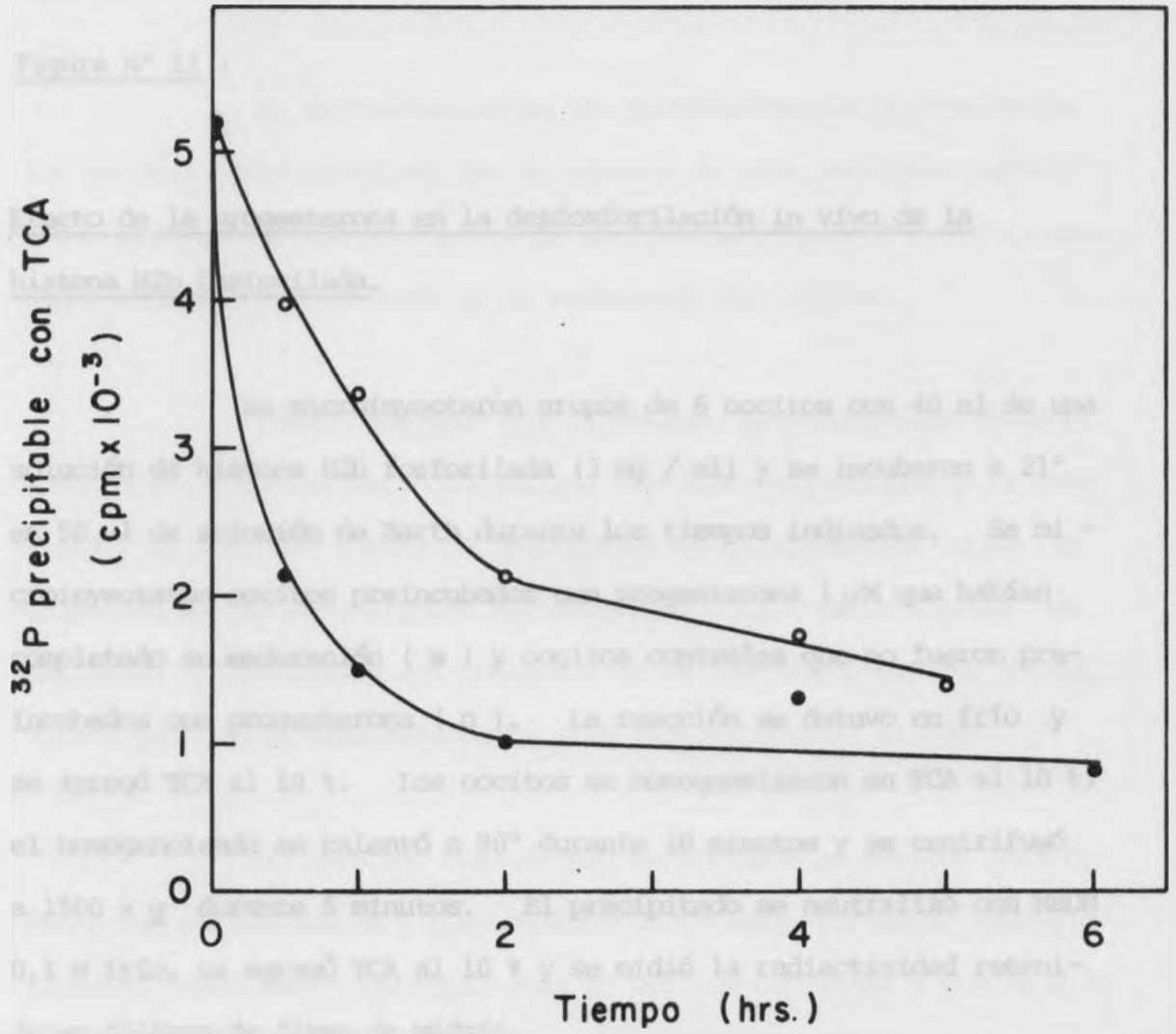


Figura N° 11 :

Efecto de la progesterona en la desfosforilación in vivo de la histona H2b fosforilada.

Se microinyectaron grupos de 6 oocitos con 40 nl de una solución de histona H2b fosforilada (3 mg / ml) y se incubaron a 21° en 50 μ l de solución de Barth durante los tiempos indicados. Se microinyectaron oocitos preincubados con progesterona 1 μ M que habían completado su maduración (●) y oocitos controles que no fueron preincubados con progesterona (o). La reacción se detuvo en frío y se agregó TCA al 10 %. Los oocitos se homogeneizaron en TCA al 10 %, el homogeneizado se calentó a 90° durante 10 minutos y se centrifugó a 1500 x g durante 5 minutos. El precipitado se neutralizó con NaOH 0,1 N frío, se agregó TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

observa que al cabo de 3 horas de incubación con hormona se produce el mismo grado de desfosforilación de la fosfohistona que en los oocitos controles que no fueron preincubados con hormona.

Al hacer este mismo experimento microinyectando histona H1 fosforilada después de una preincubación de 3 horas con progesterona $1 \mu\text{M}$ también se obtiene una curva que coincide con la desfosforilación de la histona H1 en los oocitos controles (figura N° 12 B).

La desfosforilación más pronunciada que se observa en los oocitos maduros sugiere que el aumento de esta actividad podría estar relacionado con la ruptura de la vesícula germinal o con alguna etapa avanzada del fenómeno de la maduración del oocito.

Para establecer más firmemente la correlación entre el aumento de la desfosforilación de las histonas fosforiladas y la maduración, se probó el efecto de inhibidores de la maduración sobre la velocidad de desfosforilación del sustrato. Para estos ensayos se emplearon cicloheximida (un inhibidor de la síntesis proteica) y papaverina que inhibe específicamente a la fosfodiesterasa de cAMP.

Al inyectar histona H2b fosforilada en oocitos preincubados con cicloheximida y progesterona se obtienen curvas de desfosforilación similares a las observadas en oocitos controles y que no coinciden con aquellas observadas en oocitos del mismo ovario que presentan una maduración normal (figura N° 13). Los oocitos tratados con el inhibidor de fosfodiesterasa de cAMP y progesterona presentan una desfosforilación de la histona H2b apreciablemente más lenta que la detectada en oocitos controles.

Figura N° 12 :

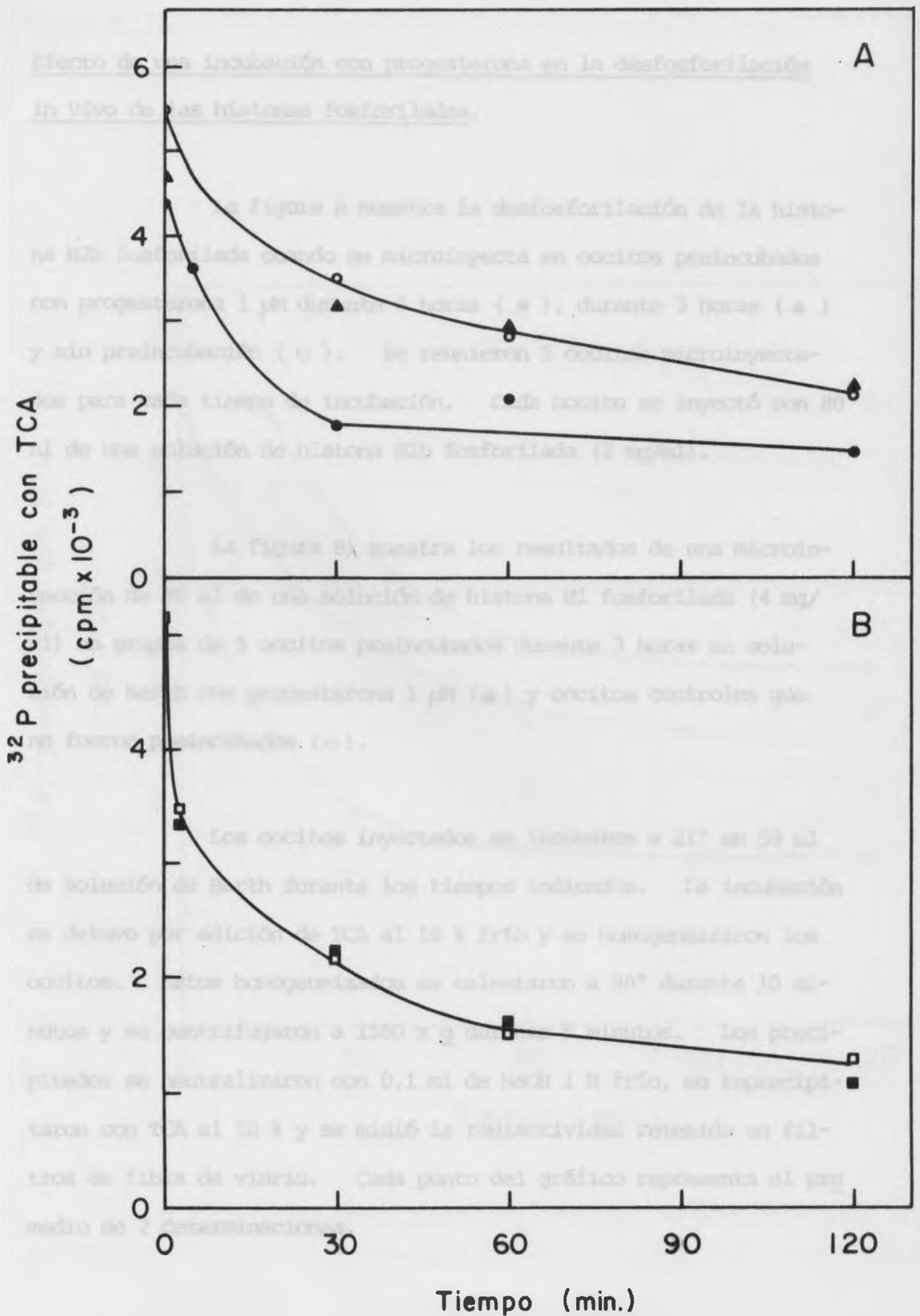


Figura N° 12 :

Efecto de una incubación con progesterona en la desfosforilación in vivo de las histonas fosforiladas.

La figura A muestra la desfosforilación de la histona H2b fosforilada cuando se microinyecta en oocitos preincubados con progesterona 1 μ M durante 6 horas (●), durante 3 horas (▲) y sin preincubación (○). Se reunieron 5 oocitos microinyectados para cada tiempo de incubación. Cada oocito se inyectó con 80 nl de una solución de histona H2b fosforilada (2 mg/ml).

La figura B) muestra los resultados de una microinyección de 80 nl de una solución de histona H1 fosforilada (4 mg/ml) en grupos de 5 oocitos preincubados durante 3 horas en solución de Barth con progesterona 1 μ M (■) y oocitos controles que no fueron preincubados (□).

Los oocitos inyectados se incubaron a 21° en 50 μ l de solución de Barth durante los tiempos indicados. La incubación se detuvo por adición de TCA al 10 % frío y se homogeneizaron los oocitos. Estos homogeneizados se calentaron a 90° durante 10 minutos y se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos. Los precipitados se neutralizaron con 0,1 ml de NaOH 1 N frío, se reprecipitaron con TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio. Cada punto del gráfico representa el promedio de 2 determinaciones.

Figura N° 13 :

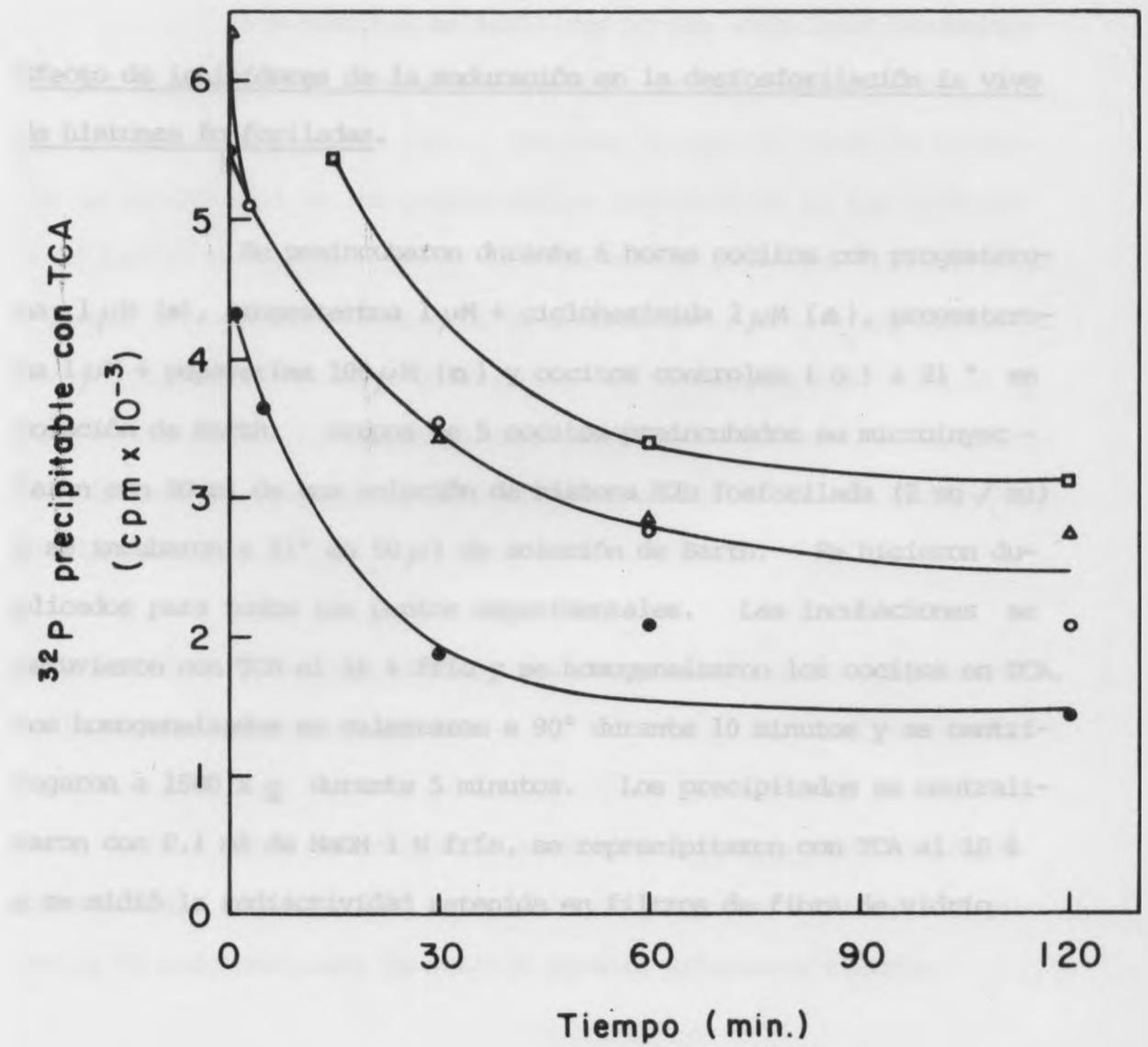


Figura N° 13 :

Efecto de inhibidores de la maduración en la desfosforilación in vivo de histonas fosforiladas.

Se preincubaron durante 6 horas oocitos con progesterona $1 \mu\text{M}$ (●), progesterona $1 \mu\text{M}$ + cicloheximida $2 \mu\text{M}$ (▲), progesterona $1 \mu\text{M}$ + papaverina $100 \mu\text{M}$ (■) y oocitos controles (○) a 21° en solución de Barth. Grupos de 5 oocitos preincubados se microinyectaron con 80 nl de una solución de histona H2b fosforilada ($2 \text{ mg} / \text{ml}$) y se incubaron a 21° en $50 \mu\text{l}$ de solución de Barth. Se hicieron duplicados para todos los puntos experimentales. Las incubaciones se detuvieron con TCA al 10 % frío y se homogeneizaron los oocitos en TCA. Los homogeneizados se calentaron a 90° durante 10 minutos y se centrifugaron a $1500 \times g$ durante 5 minutos. Los precipitados se neutralizaron con 0,1 ml de NaOH 1 N frío, se reprecipitaron con TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

Este experimento corrobora los resultados anteriores en que se establece una relación entre el fenómeno de maduración y un aumento de la actividad desfosforilante de las histonas H2b fosforiladas.

III) Desmetilación de histonas in vivo e in vitro.

Las histonas se modifican en una etapa post-traduccional por metilación de algunos aminoácidos, principalmente en los residuos de arginina y lisina (30). En este trabajo se trató de dilucidar la estabilidad de los grupos metilo introducidos en las histonas en el oocito de Xenopus laevis por una enzima parcialmente purificada a partir de extractos de oocitos de esta misma especie y que metila específicamente los residuos de arginina de la histona H2b. En la figura N° 14 se muestra el perfil de elución de la preparación de metiltransferasas de una columna de DEAE-celulosa de la cual se obtiene la metiltransferasa A.

- 1) Estabilidad de histona H2b metilada al incubar con homogeneizados de oocitos de Xenopus laevis.

Para determinar la estabilidad in vitro de los grupos metilo unidos a histona H2b se incubó esta proteína modificada en presencia de homogeneizados de oocitos durante diferentes tiempos.

Se homogeneizaron 100 oocitos en un volumen mínimo de solución de Barth y luego se incubaron alícuotas de este homogeneizado (equivalente a aproximadamente 5 oocitos) a 21° en presencia de la histona H2b metilada durante los tiempos indicados en la figura N° 15. Como control se hicieron incubaciones con un homogeneizado de oocitos

Figura N° 14 :

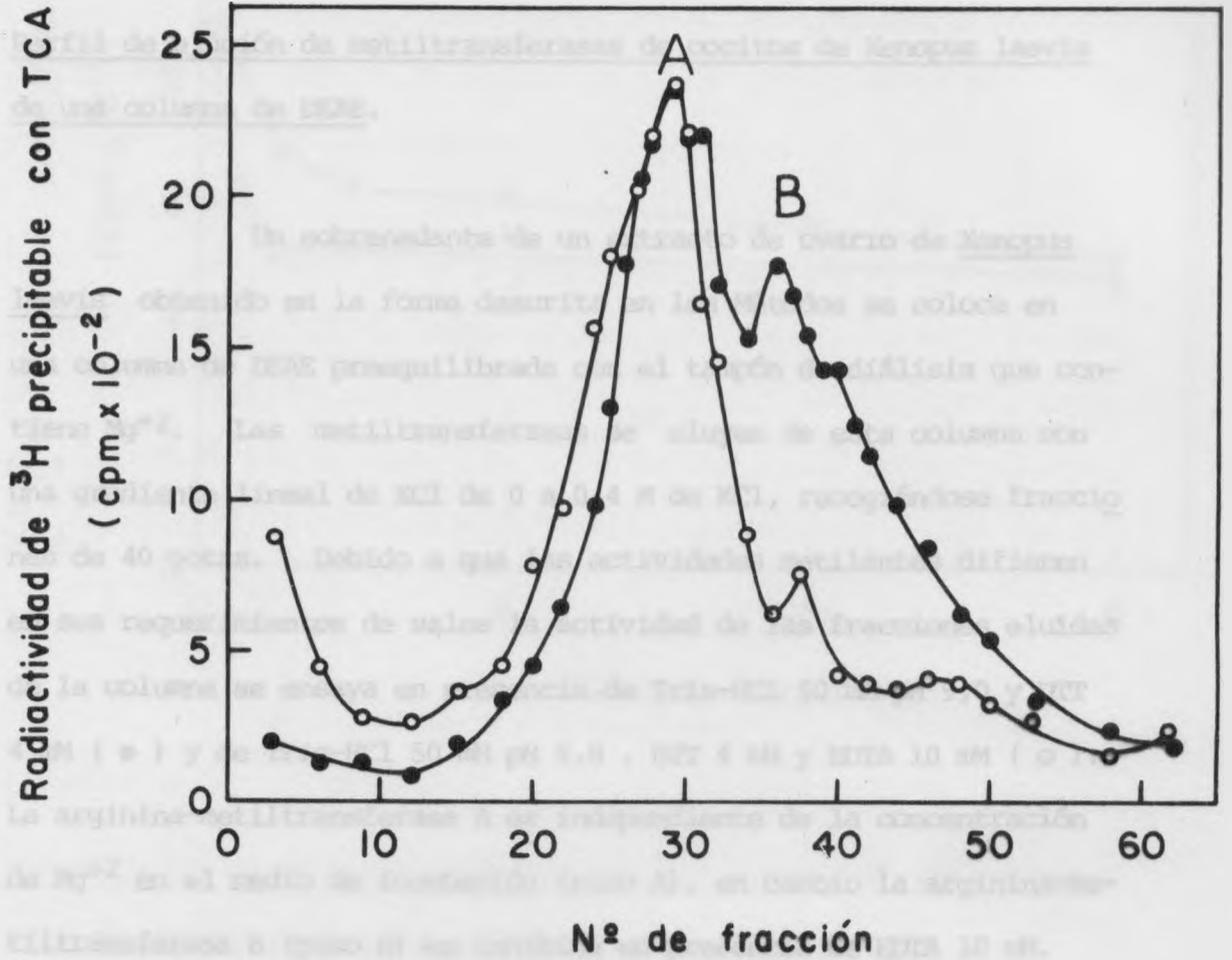
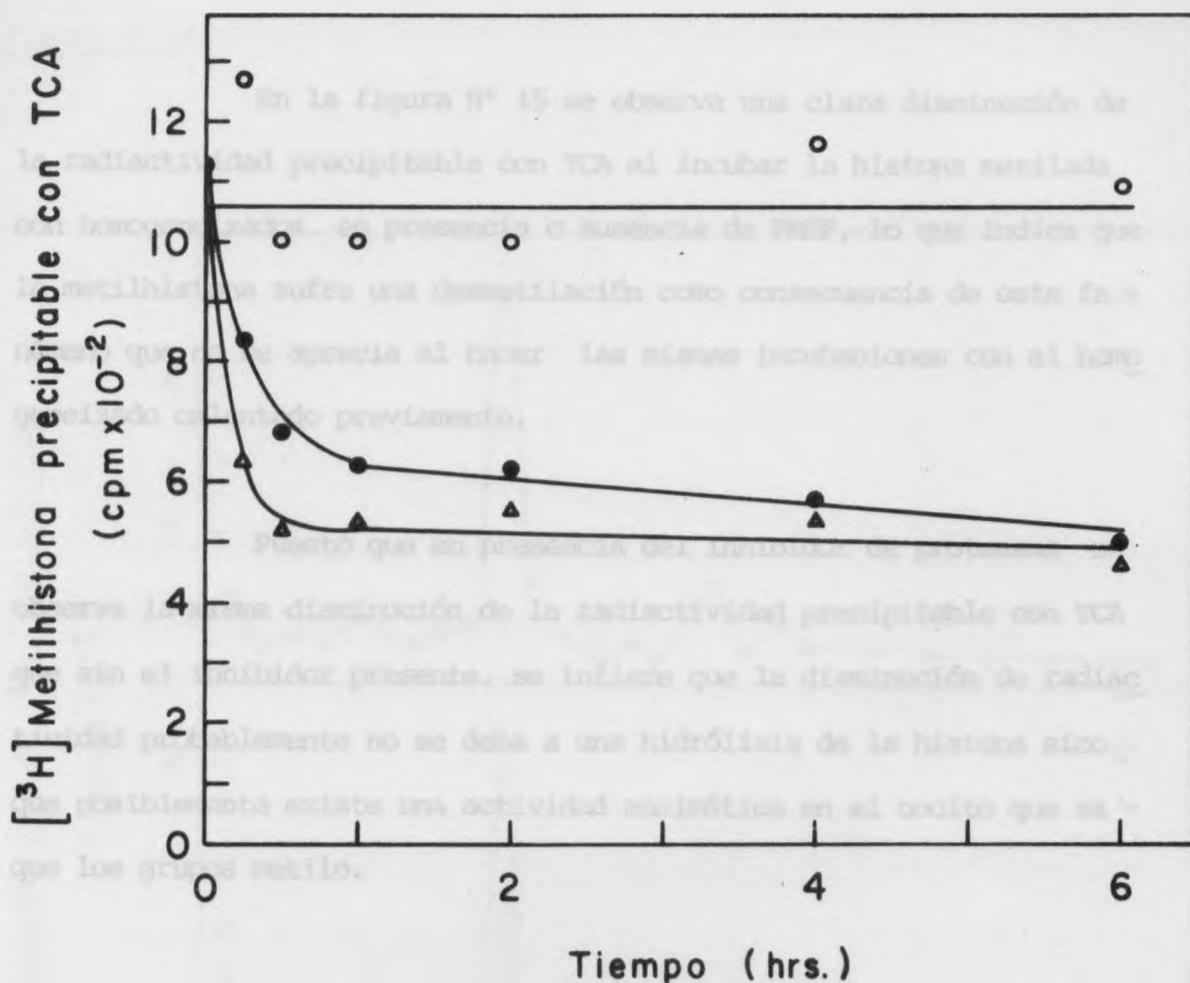


Figura N° 14 :

Perfil de elución de metiltransferasas de oocitos de *Xenopus laevis* de una columna de DEAE.

Un sobrenadante de un extracto de ovario de *Xenopus laevis* obtenido en la forma descrita en los Métodos se coloca en una columna de DEAE preequilibrada con el tampón de diálisis que contiene Mg^{+2} . Las metiltransferasas se eluyen de esta columna con una gradiente lineal de KCl de 0 a 0,4 M de KCl, recogiendo fracciones de 40 gotas. Debido a que las actividades metilantes difieren en sus requerimientos de sales la actividad de las fracciones eluidas de la columna se ensaya en presencia de Tris-HCl 50 mM pH 9,0 y DTT 4 mM (●) y de Tris-HCl 50 mM pH 9,0, DTT 4 mM y EDTA 10 mM (○). La arginina-metiltransferasa A es independiente de la concentración de Mg^{+2} en el medio de incubación (pico A), en cambio la arginina-metiltransferasa B (pico B) es inhibida en presencia de EDTA 10 mM.

Figura N° 15 :



Desmetilación de la histona H2b metilada por incubación con homogeneizados de oocitos de *Xenopus laevis*.

Alícuotas de un homogeneizado de oocitos (●), de un homogeneizado calentado a 90° durante 10 minutos (○) y un homogeneizado sin calentar que contenía una solución recién preparada de PMSF (0,2 mg / ml) (Δ) se incubaron en presencia de histona metilada (concentración final 0,03 mg / ml) a 21° durante los tiempos indicados. Las incubaciones se detuvieron por adición de TCA al 10 % y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio. Cada punto de la gráfica corresponde al promedio de dos determinaciones.

previamente calentado a 90° durante 10 minutos y con un homogeneizado que contenía 0,2 mg/ml de PMSF, un inhibidor de proteasas.

En la figura N° 15 se observa una clara disminución de la radiactividad precipitable con TCA al incubar la histona metilada con homogeneizados en presencia o ausencia de PMSF, lo que indica que la metilhistona sufre una desmetilación como consecuencia de este fenómeno que no se aprecia al hacer las mismas incubaciones con el homogeneizado calentado previamente.

Puesto que en presencia del inhibidor de proteasas se observa la misma disminución de la radiactividad precipitable con TCA que sin el inhibidor presente, se infiere que la disminución de radiactividad probablemente no se deba a una hidrólisis de la histona sino que posiblemente existe una actividad enzimática en el oocito que sa - que los grupos metilo.

Para confirmar que la disminución de radiactividad precipitable detectada corresponde a una posible desmetilación de la histona modificada y no a la degradación de la proteína, se analizó la histona H2b metilada después de incubarla con extractos de oocitos, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida ácido-urea (figura N° 16). Para ello se incubaron 25 µl de la solución de histona metilada (2 mg/ml) a 20° en presencia de extractos de oocito durante 2 minutos, 1 hora y 6 horas.

En este ensayo se observa que se produce una disminución de la radiactividad en la zona correspondiente a la migración de la histona H2b.

Figura N° 16 :

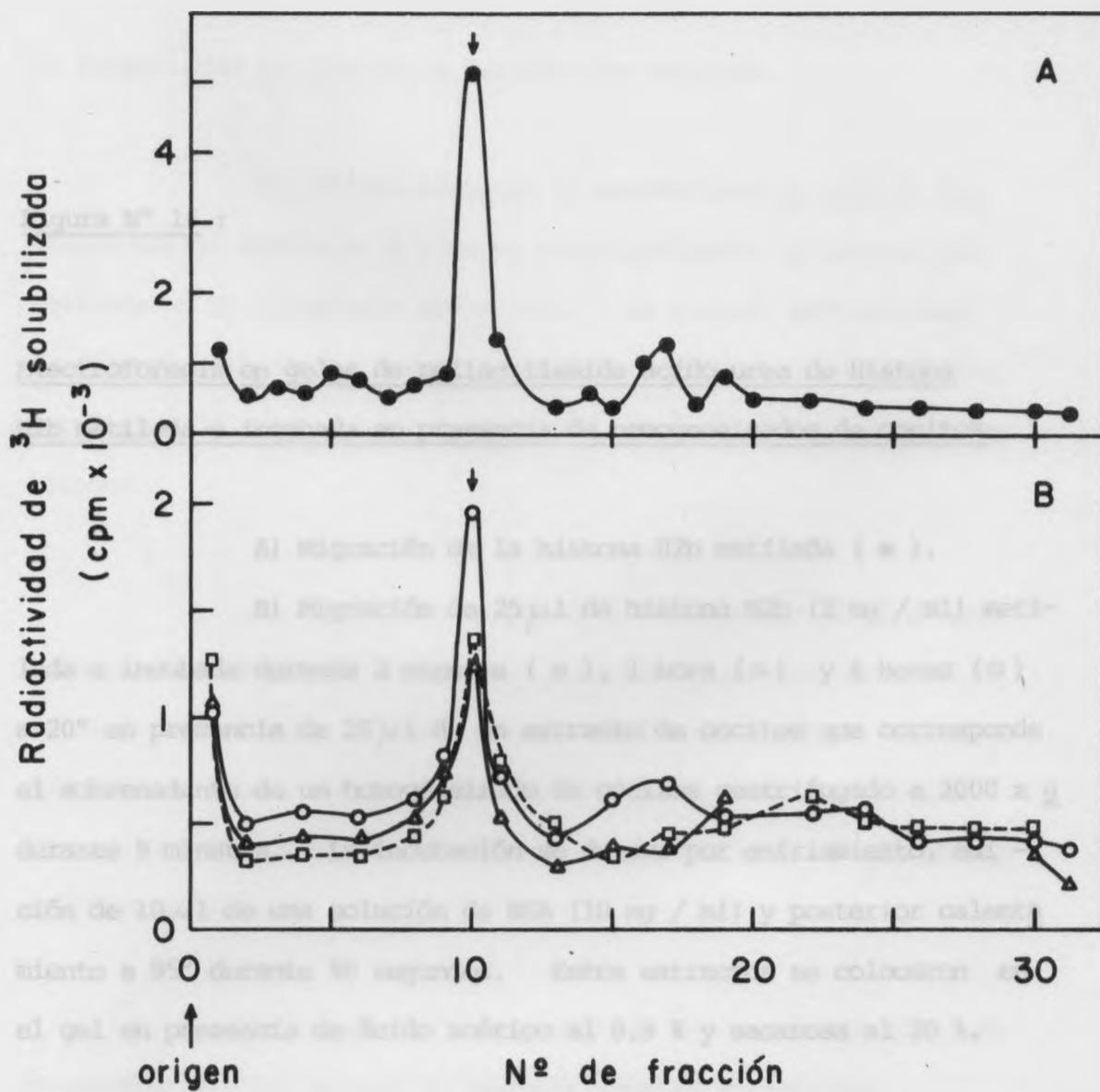


Figura N° 16 :

Electroforesis en geles de poliacrilamida ácido-urea de Histona H2b metilada e incubada en presencia de homogeneizados de oocitos.

A) Migración de la histona H2b metilada (●).

B) Migración de 25 μ l de histona H2b (2 mg / ml) metilada e incubada durante 2 minutos (o), 1 hora (Δ) y 6 horas (\square) a 20° en presencia de 25 μ l de un extracto de oocitos que corresponde al sobrenadante de un homogeneizado de oocitos centrifugado a 2000 x g durante 5 minutos. La incubación se detuvo por enfriamiento, adición de 10 μ l de una solución de BSA (10 mg / ml) y posterior calentamiento a 95° durante 90 segundos. Estos extractos se colocaron en el gel en presencia de ácido acético al 0,9 % y sacarosa al 20 %.

La electroforesis y la solubilización de bandas de 0,5 cm del gel se realizó según está indicado en los Métodos. La flecha indica la migración de un patrón de histona H2b observada por tinción.

La desmetilación máxima se alcanza al incubar la histona H2b metilada durante 1 hora con los homogeneizados de oocitos, lo que está de acuerdo con los resultados mostrados en la figura N° 15.

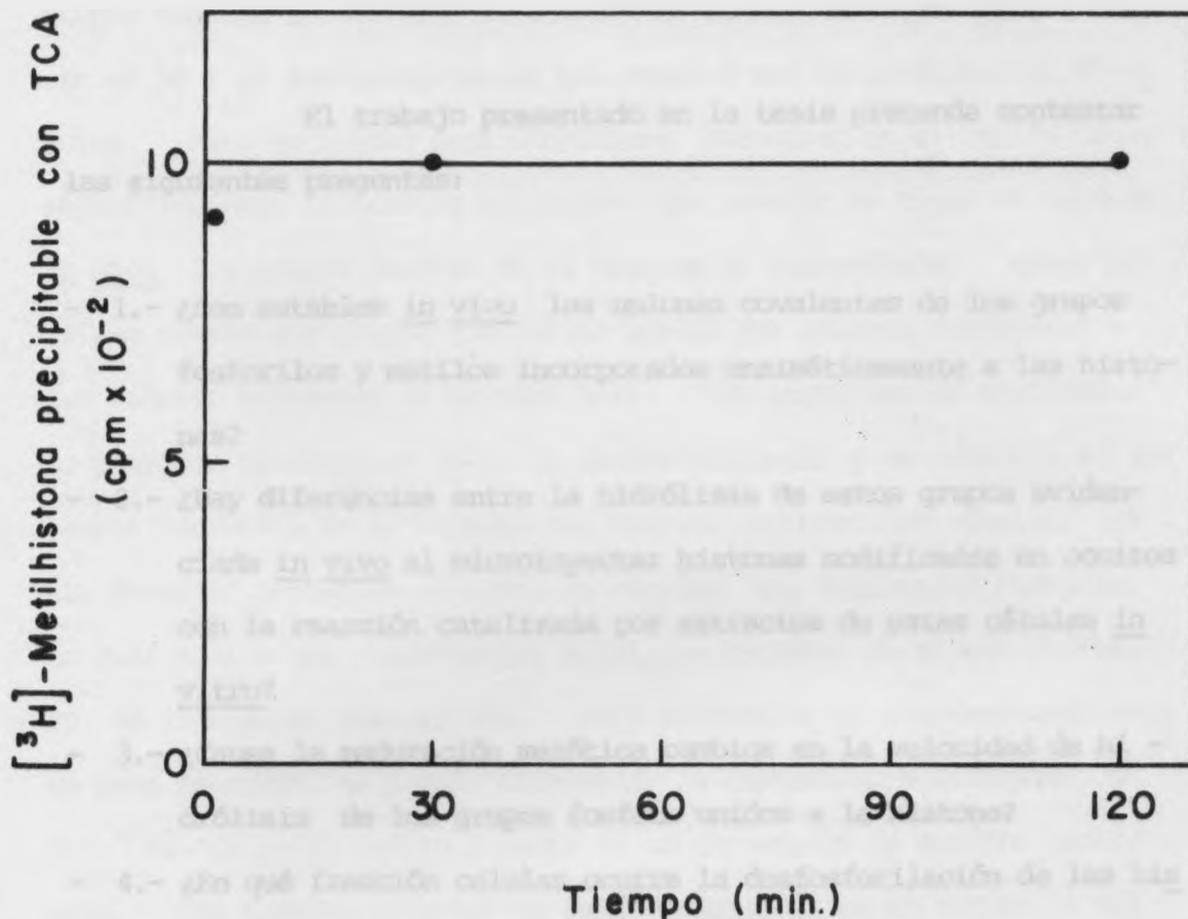
2) Estabilidad in vivo de la histona H2b metilada.

Se intentó estudiar la estabilidad in vivo de los grupos metilo unidos a la histona microinyectando la histona H2b metilada en el citoplasma de oocitos. La histona H2b metilada se preparó utilizando la arginina metiltransferasa A parcialmente purificada de ovario de Xenopus laevis, según está descrito en los Métodos.

Se inyectaron grupos de 5 oocitos con 40 nl de una solución de histona H2b metilada (2 mg/ml) y se incubaron a 21° en 50 µl de solución de Barth durante distintos tiempos. La incubación se detuvo agregando TCA al 10 % frío, se homogeneizaron los oocitos en TCA y se midió la radiactividad retenida en filtros de fibra de vidrio.

La figura N° 17 muestra que la histona H2b metilada es estable in vivo durante al menos 2 horas de incubación.

Figura N° 17 :



Estabilidad in vivo de la histona H2b metilada.

Grupos de 5 oocitos se microinyectaron en el citoplasma con 40 nl de una solución de histona H2b metilada (2 mg / ml) y se incubaron a 21° en 50 μ l de solución de Barth durante los tiempos indicados. La incubación se detuvo agregando TCA frío al 10 %, se homogeneizaron los oocitos en TCA y se midió la radiactividad precipitable retenida en filtros de fibra de vidrio. Cada punto del gráfico representa el promedio de 2 determinaciones.

DISCUSION

El trabajo presentado en la tesis pretende contestar las siguientes preguntas:

- 1.- ¿Son estables in vivo las uniones covalentes de los grupos fosforilos y metilos incorporados enzimáticamente a las histonas?
- 2.- ¿Hay diferencias entre la hidrólisis de estos grupos evidenciada in vivo al microinyectar histonas modificadas en oocitos con la reacción catalizada por extractos de estas células in vitro?
- 3.- ¿Causa la maduración meiótica cambios en la velocidad de hidrólisis de los grupos fosfato unidos a la histona?
- 4.- ¿En qué fracción celular ocurre la desfosforilación de las histonas?
- 5.- ¿Dónde se localizan las histonas después de la ruptura del núcleo del oocito durante la maduración meiótica?

Con respecto a la primera pregunta las evidencias obtenidas indican que la unión covalente del fosfato a la histona es inestable en el oocito. Esto se demostró utilizando una preparación de histona modificada con fosfato radiactivo. La estabilidad de la histona iodada con ^{125}I que contrasta con la pérdida de radiactividad precipitable con TCA al 10 % al inyectar [^{32}P]-fosfohistona, comprueban la existencia de una actividad que escinde los grupos fosfato de la histona, en tanto que la histona misma es estable durante los tiempos de incubación ensayados. Los resultados de Woodland y Adamson (43) también habían demostrado la estabilidad de las histonas inyec-

tadas en citoplasmas de oocitos. Mediante la microinyección de la histona fosforilada se determinó que la hidrólisis in vivo de estos grupos fosfato es rápida y se calculó el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de desfosforilación que resultó ser de alrededor de 90 minutos. Esta actividad desfosforilante detectada en el oocito no es específica para la histona H2b, puesto que también es capaz de escindir in vivo los grupos fosfato de la histona H1 fosforilada. Ambas proteínas tienen sus grupos fosforilos unidos por enlaces fosfoéster a las cadenas laterales de serinas (61). Los experimentos realizados no permiten discriminar entre la desfosforilación y un recambio de los grupos fosforilo de la histona con fosfato endógeno del oocito. Se han descrito proteínas quinasas en oocitos que fosforilan histonas, lo cual indica que posiblemente existe un recambio de grupos fosforilo de la histona fosforilada. Para determinar si efectivamente existe este recambio, se podría coinyectar la histona no modificada y [γ - ^{32}P] ATP en el oocito y medir la incorporación de fosfato radiactivo. Una posible alternativa sería coinyectar en el oocito la histona fosforilada con fosfato frío y [γ - ^{32}P] ATP y determinar la aparición de radiactividad precipitable con TCA al 10 %.

Se efectuaron también diversos ensayos para determinar la estabilidad en oocitos de Xenopus laevis de los grupos metilos unidos a la histona mediante una S-adenosil metionina-arginina-metiltransferasa parcialmente purificada de oocitos de la misma especie (37). Nuestros resultados indican que las histonas metiladas no sufren desmetilación in vivo, lo cual concuerda con datos publicados en la literatura (35) que postulan que la metilación es una modificación estable de estas proteínas. Desgraciadamente no fue posible obtener resultados experimentales más detallados de esta reacción debido a la dificultad de obtener una cantidad de histona H2b metilada suficientemente radiactiva para ser microinyectada en los oocitos.

La segunda pregunta se refiere a las posibles diferencias existentes entre las reacciones observadas en células intactas y aquellas que se obtienen al incubar la histona modificada con extractos de estos oocitos. Contrariamente a lo observado in vivo, se encontró que la histona metilada pierde sus grupos metilo al ser incubada en presencia de extractos crudos de oocitos. Esta actividad es termolábil y no es inhibida por PMSF, un inhibidor general de proteasas. Esta diferencia podría atribuirse a la existencia en el oocito de compartimentos que contengan la actividad enzimática que hidroliza los metilos e impiden el contacto entre la actividad enzimática y la histona modificada inyectada en la célula prácticamente intacta; en el homogeneizado en cambio no existirían estas restricciones que imposibilitan el contacto entre los distintos componentes de la célula.

Del mismo modo fue necesario determinar si existen diferencias entre la hidrólisis de los grupos fosfato evidenciada in vivo al microinyectar la histona fosforilada en oocitos y la reacción in vitro catalizada por extractos de oocitos.

En los extractos de oocitos se detectó también la actividad desfosforilante de las histonas fosforiladas, aunque in vitro esta reacción procede a una velocidad considerablemente menor. La actividad fosfatásica in vitro es también termolábil y resistente a PMSF. No sólo se encuentran diferencias con respecto a la velocidad de reacción, sino también las hay en cuanto al porcentaje de fosfatos hidrolizados: en los extractos sólo se hidrolizan un 30 a 40 % de los fosfatos unidos covalentemente a la histona, en cambio en la reacción in vivo, sólo un 10 a 20 % de la histona fosforilada parece ser resistente a la acción de la actividad fosfatásica. Estas diferencias posiblemente se deben a que en la célula intacta las condiciones

de pH y fuerza iónica existentes en el microambiente donde se localizan las histonas podrían resultar en una conformación que exponga a los grupos fosforilo a la acción de fosfatasa. In vitro esos mismos grupos fosforilos podrían estar enterrados dentro de la estructura de la histona, posiblemente debido al estado de agregación de estas proteínas. Otra posible explicación para la menor actividad detectada en los homogeneizados sería la liberación de sustancias inhibitorias de las proteínas fosfatasa durante la ruptura del oocito. Como se menciona en la introducción, se han descrito varios inhibidores proteicos de la actividad fosfatásica (26, 50).

En todos los ensayos de microinyección y también de hidrólisis in vitro se obtiene una curva de desfosforilación que presenta 2 pendientes: a tiempos cortos de incubación hay una caída muy pronunciada y a tiempos más largos de incubación la pendiente es más leve. Este resultado sugiere la existencia de dos tipos de fosfato que presentan distintas características de disponibilidad como sustrato frente a la actividad desfosforilante de fosfohistonas. Dada la inespecificidad de las proteínas fosfatasa de otros sistemas se considera poco probable que existan en el oocito enzimas hidrolizantes con diferente especificidad frente a los grupos fosforilo en distintas zonas de la secuencia aminoacídica de la histona. Sin embargo, su existencia podría también explicar estos resultados.

En el citoplasma de los oocitos existen cantidades considerables de otras fosfoproteínas, tales como vitelogenina y fosvitina. Sin embargo, estas proteínas no son desfosforiladas activamente en el oocito en períodos comparables a los tiempos de incubación utilizados en los ensayos descritos en este trabajo (63). Al incubar los oocitos con [³²P]-fosfato no se detecta material radiactivo que se asemeje a la fosvitina (63).

Uno de los objetivos de este trabajo, resumido en la tercera pregunta fue determinar si la maduración meiótica es causa de alteraciones en la hidrólisis de los grupos fosfato unidos a histonas, puesto que se han descrito incrementos importantes de la actividad de las proteínas quinasas durante este proceso. Al comparar la actividad desfosforilante presente en homogeneizados de oocitos maduros con aquella encontrada en oocitos que no fueron tratados con hormona, se detecta que esta actividad es mayor en los oocitos que han sufrido la maduración meiótica. En los períodos iniciales de la reacción hay una diferencia apreciable entre la desfosforilación en homogeneizados de oocitos maduros y oocitos controles. A tiempos más largos de incubación esta diferencia es menor.

Al hacer la medición correspondiente in vivo mediante la microinyección del sustrato fosforilado se descubre que este efecto es mucho más marcado en el oocito intacto que en el tubo de ensayo: en los oocitos maduros el tiempo requerido para desfosforilar el 50 % de una misma cantidad de fosfohistona inyectada es de sólo 30 minutos con respecto a los 90 minutos necesarios para desfosforilar el mismo porcentaje de sustrato modificado en los oocitos controles.

En la introducción de este trabajo se mencionó el estallido de fosforilación de proteínas ligado a la dispersión de la vesícula germinal que ocurre en las etapas tardías de la maduración. Por este motivo nos interesó determinar si el aumento de desfosforilación detectado en los oocitos maduros se asocia también a las etapas tardías de la maduración o si este incremento se detecta desde el inicio del proceso de la maduración meiótica. Se ensayó la desfosforilación de las histonas H2b y H1 fosforiladas en el oocito inducido a madurar, pero incubado solamente durante 3 horas, período que es insuficiente para que ocurra la dispersión nuclear. En estos folículos

se detectó una desfosforilación de las fosfohistonas coincidente con aquella existente en los oocitos controles, lo cual indica que el aumento de la actividad fosfatásica es también un evento tardío en la maduración del folículo.

La correlación entre el aumento de la desfosforilación de histonas fosforiladas y el proceso de maduración se estudió mediante el uso de inhibidores de la maduración. En presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, se observó una inhibición de la maduración acompañada de un nivel de desfosforilación igual al de los oocitos no tratados con hormona. Al inhibir la maduración con papaverina, un potente inhibidor de la fosfodiesterasa de cAMP, no sólo se observa la ausencia del estímulo de desfosforilación causado por la maduración, sino que esta actividad es incluso menor que aquella encontrada en los oocitos controles. Estos resultados sugieren una posible inhibición de la actividad desfosforilante por efecto de la papaverina. Se podría pensar que la papaverina causaría un aumento del cAMP celular lo que podría resultar en una activación de inhibidores de la actividad de las proteínas fosfatasas de la célula. Algunos inhibidores de proteína fosfatasas son activados por una fosforilación catalizada por proteína quinasas dependientes de cAMP (26).

El trabajo presentado también aporta información con respecto a la cuarta pregunta planteada referente a la localización celular de la actividad desfosforilante de las fosfohistonas. Esta actividad se detectó en la vesícula germinal mediante la microinyección directa de la histona H2b fosforilada en el núcleo de los oocitos. Por medio de los ensayos in vitro se encontró actividad de proteína fosfatasa en homogeneizados de núcleos y de oocitos anucleados.

Por último se pretendió contestar la interrogante referente a la distribución de las histonas en la célula después de la dispersión de la vesícula germinal. Esta pregunta es especialmente pertinente debido al hallazgo del incremento en la actividad desfosforilante en oocitos maduros. El procedimiento experimental utilizado consistió en microinyectar las histonas H2b iodadas y analizarlas posteriormente mediante radioautografía en cortes histológicos de estos oocitos. En estos ensayos se constató una rápida acumulación en el núcleo de la histona inyectada en el citoplasma de los folículos. Estos resultados concuerdan plenamente con las observaciones de Gurdon y colaboradores (44). En los oocitos incubados con progesterona se observa inicialmente una migración de la histona marcada al núcleo; luego, al romperse la membrana nuclear, las histonas marcadas se localizan en las regiones basófilas que denotan material de origen nuclear. Inicialmente las histonas se distribuyen preferencialmente en el polo animal de esta célula. Para los fines de estos estudios, nuestra innovación de utilizar oocitos de Xenopus laevis albinos demostró ser de gran utilidad. Es particularmente interesante el hecho que las histonas microinyectadas en oocitos maduros también se localizan en las regiones basófilas del oocito, demostrando que la estructura nuclear no es indispensable para concentrar a las histonas introducidas en estas células.

Para completar los estudios realizados sería de gran interés determinar en forma detallada la naturaleza y función del incremento de la actividad desfosforilante de las histonas fosforiladas durante el proceso de la maduración meiótica de los oocitos. Estos experimentos podrían complementarse con una caracterización de la(s) enzima(s) responsable(s) de esta actividad presente en los oocitos de Xenopus laevis, enfatizando especialmente el estudio de los

inhibidores o activadores de dichas enzimas. Desde un punto de vista más general sería de importancia determinar el mecanismo por el cual la fosforilación de histonas y de otras proteínas puede participar en la regulación de procesos como la activación génica y la transcripción. Resultados recientes implican a la fosforilación y desfosforilación de factores de iniciación de la síntesis proteica en la regulación de este proceso por el interferón en células infectadas por virus y por la hemina en reticulocitos de mamífero (64). La transformación de células en cultivo causada por virus oncogénicos también tendría como componente importante una proteína quinasa de novedosa especificidad ya que fosforilaría proteínas del citoesqueleto en los hidroxilos de sus tirosinas (65). Estos hallazgos dan especial interés al estudio de las actividades celulares capaces de hidrolizar los grupos fosforilo de las proteínas.

Conclusiones

Los resultados experimentales presentados en este trabajo permiten concluir:

- 1.- Los grupos fosforilo unidos covalentemente a la histona son inestables en el oocito y en presencia de homogeneizados de éstos.
- 2.- Los grupos metilo unidos covalentemente a la histona son estables in vivo, pero no lo son al ser incubados in vitro en presencia de homogeneizados de oocitos de Xenopus laevis.
- 3.- La(s) actividad(es) fosfatásica(s) de histonas fosforiladas se encuentra(n) en el citoplasma y en el compartimento nuclear de oocitos de Xenopus laevis.

4.- Se detecta un incremento de la actividad fosfatásica de las histonas fosforiladas en las etapas tardías de maduración meiótica de los oocitos.

5.- Las histonas microinyectadas en oocitos incubados con progesterona migran inicialmente al núcleo. Al romperse la membrana nuclear, las histonas se localizan en regiones basófilas que denotan material de origen nuclear.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Maller, J., Wu, M., Gerhart, J.C.; (1977) Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of Xenopus laevis oocytes. Dev. Biol. 58, 295 - 312.
- 2.- Bellé, R., Boyer, J., Ozon, R.; (1979) Endogenous phosphorylated proteins during maturation of Xenopus laevis oocytes. Gamete Research 2, 137 - 145.
- 3.- Ecker, R.E., Smith, L.D.; (1968) Protein synthesis in amphibian oocytes and early embryos. Dev. Biol. 18, 232 - 249.
- 4.- Maller, J.E., Krebs, E.G.; (1977) Progesterone-stimulated meiotic cell division in Xenopus laevis oocytes. J. Biol. Chem. 252, 1712 - 1718.
- 5.- Shatz, F., Morrill, G.A.; (1979) Studies on the relative roles of pituitary hormones and progesterone in the induction of meiotic maturation in the amphibian oocyte. Diff. 13, 88 - 99.
- 6.- Ozon, R., Bellé, R., Cartaud, A., Mulner, O., Thibier-Fouchet, C.; (1976) Mechanism of action of progesterone in amphibian oocytes. Proc. V Intl. Congress of Endocr., Hamburg 1, 18 - 24.
- 7.- Masui, Y., Markert, C.L.; (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool. 177, 129 - 147.
- 8.- Brachet, J., Baltus, E., de Schutter, A., Hanocq, F., Hanocq-Quertier, J., Hubert, E., Iacobelli, S., Steinert, G.; (1974) Biochemical changes in progesterone-induced maturation in Xenopus laevis oocytes. Mol. Cell. Biochem. 3, 189 - 205.
- 9.- Ozon, R., Bellé, R., Huchon, D., Mulner, O.; (1979) Roles of cAMP and calcium in maturation of Xenopus laevis oocytes. J. Steroid Biochem. 11, 709 - 713.

- 10.- Bravo, R., Otero, C., Connelly-Allende, C., Allende, J.E.; (1978) Maturation and protein synthesis: related inhibition by cAMP, theophylline and papaverine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1242 - 1246.
- 11.- Huchon, D., Ozon, R.; (1979) Effects of 3-Isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX) and cholera toxin on maturation induced by injection of Maturation Promoting Factor (MPF) in Xenopus laevis oocytes. Biologie Cellulaire 35, 15 - 20.
- 12.- Mulner, O., Cartaud, A., Ozon, R.; (1980) Cyclic AMP phosphodiesterase activities in Xenopus laevis oocytes. Diff. 16, 31 - 39.
- 13.- Echeverría, M.; (1980) Tesis de Licenciatura, Fac. de Medicina Norte, Universidad de Chile.
- 14.- Baulieu, E.E., Godeau, F., Schorderet, M., Schorderet-Slatkine, S.; (1978) Steroid-induced meiotic division in Xenopus laevis oocytes: surface and calcium. Nature 275, 593 - 598.
- 15.- Maller, J., Wu, M., Gerhart, J.C.; (1977) Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of Xenopus laevis oocytes. Dev. Biol. 58, 295 - 312.
- 16.- Boyer, J., Bellé, R., Huchon, D., Ozon, R.; (1980) In ovo protein kinase activity during progesterone-induced maturation of Xenopus laevis oocytes. Steroids and their Mechanism of Action in Nonmammalian Vertebrates, 85 - 92.
- 17.- González, C.; (1980) Arch. de la XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile.
- 18.- Greengard, P.; (1978) Phosphorylated proteins as physiological effectors. Science 199, 146 - 152.
- 19.- Morrill, G.A., Murphy, J.B.; (1972) Role for protein phosphorylation in meiosis and in the early cleavage phase of amphibian embryonic development. Nature 238, 282 - 284.

- 20.- Wallace, R.A.; (1974) Protein phosphorylation during oocyte maturation. *Nature* 252, 510 - 511.
- 21.- Brachet, J., Malpoix, P.; (1971) Macromolecular synthesis and Nucleoplasmic interactions in early development. *Adv. Morphogenesis* 9, 263 - 282.
- 22.- Schorderet-Slatkine, S., Baulieu, E.E.; (1977) Induction of progesterone and a "Maturation Promoting Factor" of soluble proteins in *Xenopus laevis* oocytes in vitro. *Ann. of the N. Y. Acad. Sci.* 286, 421 - 433.
- 23.- Adler, A.J., Ross, D.G., Chen, K., Stafford, P.A., Woiszwilllo, M.J., Fasman, G.D.; (1974) Interaction of deoxyribonucleic acid with histone f_{2b} and its half molecules (A circular dichroism studies). *Biochemistry* 13, 616 - 623.
- 24.- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L. J., Allfrey, V.G.; (1975) Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190, 117 - 128.
- 25.- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J., Allfrey, V.G.; (1976) Selective synthesis and modification of nuclear proteins during maturation of avian erythroid cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 174, 273 - 290.
- 26.- Krebs, E.G., Beavo, J.A.; (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 923 - 960.
- 27.- Murray, K.; (1964) The occurrence of ϵ -N-methyl lysine in histones. *Biochemistry* 3, 10.
- 28.- Duerre, J.A., Chaherabarty, S.; (1975) Methylated basic amino acid composition of histones from various organs from the rat. *J. Biol. Chem.* 250, 8457 - 8461.
- 29.- Patterson, B.D., Davies, D.D.; (1969) Specificity of the enzymatic methylation of pea histone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 34, 791 - 794.

- 30.- Byvoet, P.; (1971) Uptake of label into methylated aminoacids from rat tissue histone after in vivo administration of [$Me-^{14}C$] methionine. *Biochim. Biophys. Acta* 238, 375a - 376a.
- 31.- Paik, W.K., Kim, S.; (1968) Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 243, 2108 - 2114.
- 32.- Kim, S., Paik, W.K.; (1970) Purification and properties of protein methylase II. *J. Biol. Chem.* 245, 1806 - 1813.
- 33.- Paik, W.K., Kim, S.; (1970) Solubilization and partial purification of protein methylase II from calf thymus nuclei. *J. Biol. Chem.* 245, 6010 - 6015.
- 34.- Engstrom, P., Hazelbauer, G.L.; (1980) Multiple methylation of methyl-accepting chemotaxis proteins during adaptation of E. coli to chemical stimuli. *Cell* 20, 165 - 174.
- 35.- Byvoet, P., Baxter, C.S.; (1975) Histone Methylation, a functional enigma. en Chromosomal Proteins and their Role in the Regulation of Gene Expression. Eds. G.S. Stein & J. Kleinsmith. Acad. Press. N.Y., 127 - 151.
- 36.- Shepherd, G.R., Hardin, J.M., Noland, B.J.; (1971) Methylation of lysine residues of histone fractions in synchronized mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 1 - 5.
- 37.- Hinrichsen, V.; (1980) Tesis para optar al título de Bioquímico, Fac. de Medicina Norte, Universidad de Chile.
- 38.- Smith, L.D., Eker, R.E.; (1970) Regulatory processes in the maturation and early cleavage of amphibian eggs. *Current Topics in Dev. Biology* 5, 1 - 39.
- 39.- Adamson, E.D., Woodland, H.R.; (1974) Histone synthesis in early amphibian development. Histone and DNA synthesis are not coordinated. *J. Mol. Biol.* 88, 263 - 285.

- 40.- Malacinski, G.M.; (1974) Histone synthesis in amphibian oocytes and early embryos. *Experientia* 30, 610 - 613.
- 41.- Burzio, L.O., Koide, S.S.; (1976) Isolation and characterization of Xenopus laevis oocyte nucleus. *Arch. Biol. y Med. Exper.* 10, 22 - 27.
- 42.- Adamson, E.D., Woodland, H.R.; (1977) Changes in the rate of histone synthesis during oocyte maturation and very early development of Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 57, 136 - 149.
- 43.- Woodland, H.R., Adamson, E.D.; (1977) The synthesis and storage of histones during the oogenesis of Xenopus laevis. *Dev. Biol.* 57, 118 - 135.
- 44.- Gurdon, J.; (1970) Nuclear transplantation and the control of gene activity in animal development. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 176, 303 - 314.
- 45.- Byrd, E.W., Kasinsky, H.E.; (1973) Histone synthesis during early embryogenesis in Xenopus laevis. *Biochemistry* 12, 246 - 253.
- 46.- Rubin, C.S., Rosen, O.M.; (1975) Protein phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 831 - 887.
- 47.- Lee, E.Y.C., Silberman, S.R., Ganaphati, M., Paris, H., Petrovic, S.; (1980) Properties of protein phosphatase C and its derivation from a larger holoenzyme. *Fed. Proc.* 39, 1826 (Abstract N° 1145).
48. Heng-Chun Li; (1980) Properties of phosphoprotein phosphatase isoenzymes from cardiac muscle. *Fed. Proc.* 39, 1826 (Abstract N° 1147).
- 49.- Chou, C.K., Alfano, J., Rosen, O.M.; (1977) Purification of phosphoprotein phosphatase from bovine cardiac muscle that catalyzes dephosphorylation of cyclic AMP-binding protein component of protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252, 2855 - 2859.

- 50.- Khandewal, R.L., Sloan, S.K., Craw, D.J.; (1980) Characterization and interaction of heat-stable inhibitor-2 and an activator with phosphoprotein phosphatase from liver. Eight Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, 30.
- 51.- Knipper, R., Boehme, R.; (1978) DNA-bound histones are not phosphorylated by protein kinases. FEBS-Letters 89, 253 - 256.
- 52.- Sealy, L., Chalkley, R.; (1979) Modification of histones immediately following synthesis. Arch. Biochem. Biophys. 197, 78 - 82.
- 53.- Bradbury, E.M., Inglis, R.J., Matthews, H.R.; (1980) Control of cell division by very lysine rich histone (H1) phosphorylation. Nature 247, 257 - 261.
- 54.- Chahal, S.S., Matthews, H.R., Bradbury, E.M.; (1980) Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure. Nature 287, 76.
- 55.- Bradbury, E.M.; (1979) Histone conformations, histone modifications and chromatin structure. Diff. 13, 37 - 39.
- 56.- Dumont, J.; (1972) Oogenesis in Xenopus laevis. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morphology 136, 153 - 178.
- 57.- Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.; (1963) The preparation of ^{131}I -labeled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89, 114 - 123.
- 58.- Ehrlichman, J., Hirsch, A.H., Rosen, O.M.; (1971) Interconversion of cyclic nucleotide-activator and cyclic nucleotide-independent form of a protein kinase from beef heart. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 731 - 735.
- 59.- Rojas, C.; Comunicación personal.

- 60.- Panyim, S., Chalkley, R.; (1969) High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Arch. Biochem. Biophys. 130, 337 - 346.
- 61.- Kopriwa, B.M., Leblond, C.P.; (1962) Improvement in the coating technique of radioautography. J. Histochem. Cytochem. 10, 269.
- 62.- Faragó, A., Romhányi, T., Antoni, F., Tákáts, A., Fábíán, F.; (1975) The phosphorylation site of calf thymus F2b histone by cyclic AMP-dependent protein kinase. Nature 254, 88.
- 63.- Wallace, R.A., Nickol, J.M., Ho, T., Jared, D.W.; (1972) Studies on amphibian yolk. Dev. Biol. 29, 255 - 272.
- 64.- Ochoa, S., de Haro, C.; (1979) Regulation of protein synthesis in eukaryotes. Ann. Rev. Biochem. 48, 549 - 580.
- 65.- Sefton, B.M., Hunter, T., Beemon, K., Eckhart, W.; (1980) Evidence that the phosphorylation of tyrosine is essential for cellular transformation by Rous Sarcoma Virus. Cell 20, 807 - 816.

