

CARACTERÍSTICAS DE LA HISTONA H1 EN ESPERMATOZOIDES DEL ERIZO ROJO *Loxechinus albus* MOLINA, 1782

Richard Ponce Cusi¹ Roberto Castellanos Cabrera^{1a}

RESUMEN

El aislamiento, purificación y caracterización de la histona H1 del espermatozoide del erizo rojo se describe en el presente trabajo, que consiste en la purificación y caracterización de la histona H1 de los espermatozoides del erizo rojo *Loxechinus albus*, Molina 1782. Esta especie representa un recurso económico muy importante de la costa central y sur del Estado Peruano. Los pasos fundamentales del presente estudio fueron la obtención de células espermáticas maduras, extracción de las histonas totales y H1, cuantificación de histonas y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS y PAGE-AU), determinación del peso molecular de la histona H1, mediante el uso de *softwares* específicos (GelAnalyzer) y por último, la composición de aminoácidos de la histona H1, por cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Se estimó que el peso molecular de la histona H1 es aproximadamente 22 kD y constituida por alrededor de 200 residuos de aminoácidos. Se puede evidenciar que la histona H1 presenta una mayor variabilidad debido a que presenta un par de aminoácidos resaltantes dentro de su constitución: lisina y arginina, son estos los que brindan variabilidad a nivel del nucleosoma de estas células, que también se puede evidenciar la movilidad electroforética de las demás histonas (histonas core), en ambos geles de electroforesis.

Palabras clave: Histona H1; Nucleosoma; Equinodermo; Electroforesis y HPLC.

CHARACTERISTICS OF HISTONE H1 IN RED HEDGEHOG SPERM *Loxechinus albus* MOLINA, 1782

ABSTRACT

Isolation, purification and characterization of histone H1 red sea urchin sperm *Loxechinus albus* described in this paper, which consists in the purification and characterization of histone H1 in red sea urchin sperm *Loxechinus albus*, Molina 1782. This species is a very important economic resource for the central coast and south of the Peruvian state. The fundamental steps of this study were to obtain mature sperm cells, total extract and histone H1, histone and quantification of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE-SDS-PAGE and AU), molecular weight determination of histone H1, by using specific software (GelAnalyzer) and finally the amino acid composition of histone H1, by high performance liquid chromatography (HPLC). It was estimated that the molecular weight of histone H1 is approximately 22 kD and approximately 200 amino acid residues. It may show that histone H1, exhibits greater variability due to having a pair of amino acids within its constitution highlights: lysine and arginine, is these that provide the nucleosome level variability of these cells, which can also demonstrate the electrophoretic mobility of other histones (histone core) in both gel electrophoresis.

Keywords: Histone H1; Nucleosome; Echinoderm; Electrophoresis and HPLC.

¹ Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman, Tacna, Perú

^a Investigador Concytec

INTRODUCCIÓN

El enrollado o plegado nucleosomal induce a la formación de una fibra de diámetro de aproximadamente 20-35 nm⁽¹⁻³⁾ y, en general, se supone que la histona H1 es responsable de la formación y mantenimiento de esta estructura *in vivo*^(2, 4- 6).

La histona H1 se compone de tres dominios estructurales. El dominio central de aproximadamente de 80 residuos de aminoácidos es fuertemente conservado y sirve para localizar las moléculas, mientras que los dominios que la flanquean (colas) muestran mucho más baja secuencia de conservación⁽⁷⁾.

El presente trabajo describe la preparación y purificación de histona H1 desde el espermatozoide del erizo rojo *Loxechinus albus* que no se ha estudiado antes.

El objetivo de la presente investigación es aislar, purificar y caracterizar la histona H1 en espermatozoides del erizo rojo *Loxechinus albus*, Molina 1782.

Se determinan las características de la histona H1 en espermatozoides del erizo rojo *Loxechinus albus* por ser constituyente estructural del cromosoma nuclear. Por lo tanto, es posible aislar, purificar y caracterizar la histona H1 en espermatozoides maduros del erizo rojo *Loxechinus albus*, Molina 1782.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Esperma del erizo rojo, *Loxechinus albus*, miembro del Phylum Echinodermata.

Material de laboratorio

Además del material de uso común en un laboratorio de bioquímica, se utilizaron los siguientes materiales adicionales: Papel de filtro Whatmann # 1, peines modeladores de 0,75 mm de espesor, separadores de geles de 0,75 mm de espesor, separadores de geles de 1,50 mm de espesor, placas de vidrio de 13 x 12 cm.

Reactivos

Los reactivos empleados en la realización del presente trabajo fueron aquellos de uso común, otros reactivos específicos para el desarrollo del presente estudio se tuvieron que adquirir, tales como la acrilamida, bis-acrilamida, TEMED, Trizma base, PSA, PCA, SDS, β-mercaptoetanol, feniliso-tiocianato (PITC), Coomassie Blue R-250 y G-250, PMSF, cloruro de benzamidina, urea de grado ultra pura, tiourea, verde de metilo, acetonitrilo, acetona y tritón X-100 Sigma Chemical Co.

Equipos

Entre los principales equipos utilizados en el presente estudio fueron: espectrofotómetro UV-visible UNICO 212, microcentrífuga de mesa Eppendorf, balanza analítica Sartorius, cámara electroforética Sigma, fuente de poder de 250 V Sigma, cámara fotográfica Canon, micropipetas de 5-40 μL Eppendorf, micropipetas de 100-1000 μL Brand, vortex Boeco, homogeneizador de Potter Sigma, SpeedVac Sigma, bomba de vacío LKB-2150, detector Biosystem Modelo 100

Metodología

Obtención de esperma del erizo rojo: se colectaron adultos de erizo rojo *Loxechinus albus* en forma regular en la costa rocosa de la caleta de Vila, Tacna, durante los meses de julio a septiembre de 2011. La obtención del esperma fue realizada por el método del desove inducido, mediante la inyección de solución de KCl que estimula el desove de esperma; se procedió a realizar la inyección de 2,5 mL de la solución de KCl 0,55 M en la parte oral del erizo introduciendo la aguja entre la mandíbula y la testa.

Extracción y purificación de histonas: las proteínas del núcleo espermático por su naturaleza básica son extraídas con ácidos (débiles y fuertes). Las histonas pueden ser extraídas con ácido acético al 35%⁽⁸⁾, y las proteínas más básicas como las protaminas pueden ser extraídas con HCl 0,4 N⁽⁸⁾ o H₂SO₄ 0,4 N⁽⁹⁾. Algunas de estas proteínas, como en el caso de la histona H1 y familia, muestran solubilidad diferencial en ácido perclórico (PCA) al 5%⁽¹⁰⁾.

Extracción y purificación de histonas totales de eritrocito de pollo: a partir de los núcleos de eritrocito de pollo se extraen tanto histonas internas como histonas totales (histonas internas más H1 y H5). Para obtener histonas totales, los núcleos se resuspendieron en HCl 0,25 M y se agitaron enérgicamente durante 12 h a 4 °C. Tras recuperar el sobrenadante por centrifugación a 14 000 × g durante 15 min, el sedimento se reextrae de igual forma con HCl 0,25 M, durante 4 h más. Se reúnen los dos sobrenadantes y, una vez filtrados a través de una placa de vidrio poroso número 4, se precipitan las histonas por adición de ocho volúmenes de acetona, dejando la mezcla a -20 °C durante una noche. Las histonas se recogen por centrifugación a 14 000 × g durante 15 min y, después de dos lavados con acetona anhidra, se secan a vacío. La calidad de las histonas se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

Análisis cuantitativo de las histonas: con el objeto de obtener concentraciones cuantitativas de las histonas H1 y totales para la electroforesis en gel de poliacrilamida, la determinación de la concentración de proteínas se realizó por medio del método espectrofotométrico de Bradford. Dicha metodología se basa en la diferencia de cambio de color de un colorante como respuesta a la concentración de proteínas. El colorante utilizado fue el Coomassie Blue G-250 en solución ácida, y que además posee un máximo de absorbancia a 465 nm, éste máximo cambia a 595 nm cuando se une a la proteína.

Alternativamente, el método puede ser utilizado bajo dos procedimientos dependientes de la concentración de proteínas a determinar. La curva estándar tiene un rango lineal (donde se cumple la ley de Beer) entre 200–1400 µg/mL. El procedimiento del microensayo tiene su linealidad para concentraciones de proteínas entre 1 µg/ml a ≤ 25 µg/mL.

Caracterización de la histona H1: el método de separación electroforética se basa en la migración diferencial de las moléculas en solución a través de un campo eléctrico. Este método es de amplia aplicación en la biología molecular, especialmente en la purificación y caracterización de proteínas y estudios de ácidos nucleicos. En breve, la velocidad de migración o movilidad electroforética de las moléculas en el campo eléctrico depende de su intensidad, del tamaño, forma y carga neta de las moléculas, y también de la fuerza iónica y temperatura del medio que se desplazan.

Electroforesis en PAGE-AU: la electroforesis en geles de poliacrilamida-ácido acético-urea (PAGE-AU) fue desarrollada por Panyim & Chalkley en 1969 para el análisis de las histonas y proteínas con un alto contenido de aminoácidos básicos ⁽¹¹⁾.

Electroforesis en PAGE-SDS: inicialmente, el sistema fue desarrollado por Laemmli en 1970 y modificado por Thomas y Komberg en 1978. En este tipo de electroforesis tanto el soporte (gel) como el *buffer* de corrida tienen entre otros componentes SDS como agente tensioactivo. Por otro lado, las proteínas se mezclan con un *buffer* de muestra, uniéndose al detergente aniónico SDS ⁽¹²⁾.

Determinación del peso molecular: el proceso para la determinación del peso molecular de la histona H1 consistió en el diseño de una curva estándar utilizando el peso molecular de proteínas conocidas, en este caso las histonas de eritrocitos de pollo, para luego poder así proyectar valores de Rf de las histonas H1 e histonas core de *Loxechinus albus* y encontrar así sus pesos moleculares.

Análisis de aminoácidos de la histona H1

Para realizar el análisis composicional de las proteínas se realizaron hidrólisis ácidas. El HCl es ampliamente utilizado para hidrolizar proteínas, en un procedimiento simple que involucra la hidrólisis de la proteína en sus aminoácidos constituyentes con exceso de HCl, luego el exceso de HCl es removido al vacío ⁽¹³⁾. Los materiales que se utilizaron fueron: tubos de hidrólisis (Pyrex) 13 x 200 mm, HCl 6 N o 12 N, mechero de acetileno, bomba de vacío, rotavapor, hielo seco y acetona.

Rf	Log Mc	Mc (kD)	Histonas
0,230	1,3428	22,0191	H1
0,405	1,1846	15,2968	H2a
0,433	1,1593	14,4311	H2b
0,478	1,1186	13,1401	H3
0,533	1,0689	11,7193	H4

Composición de aminoácidos de la histona H1: realizado el procedimiento del aislamiento de la histona H1 en estado purificado, se procede a determinar su composición. El procedimiento de

caracterizar la histona H1 consta de tres pasos: hidrólisis de la histona H1, derivatización de aminoácidos con PITC y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

RESULTADOS

Aislamiento y purificación de la histona H1

Se aisló y purificó la histona H1 del erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina, 1782) a través del aislamiento y purificación de núcleos espermáticos y su tratamiento con ácido clorhídrico 0,4 N para extraer las histonas totales (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y, posteriormente, con una alícuota de esta, tratada con ácido perclórico al 5%, se obtuvo la histona H1 específica del erizo rojo.

Electroforesis de histonas en PAGE-AU

Rf	Log Mc	Mc (kD)	Histonas
0,233	1,3408	21,9180	H1
0,544	1,1902	15,4950	H3
0,611	1,1577	14,3781	H2b
0,678	1,1253	13,3444	H2a
0,789	1,0933	11,7896	H4

En la electroforesis en gel de poliacrilamida con ácido acético y urea (PAGE- AU), de las histonas totales extraídas con HCl 0,4 N y las histonas H1 extraídas con ácido perclórico 5%, realizadas conjuntamente, tal como se aprecia en la Figura 1 podemos observar en el carril St las histonas totales de los eritrocitos de pollo, que en esta oportunidad lo estamos utilizando como un marcador de pesos moleculares en Daltons (D) o en Kilodaltons (kD) y cuyos pesos moleculares son en el orden de H5 (22,000 kD), H1 (18,400 kD), H2a (15,324 kD), H2b (14,500 kD), H3 (13,774 kD), H4 (11,282 kD) y la comparación de la histona H1 del erizo rojo *Loxechinus albus* se ha realizado específicamente con las histonas H1 de otras especies de erizos de mar, estos valores también se ajustan a la electroforesis en el gel de poliacrilamida en SDS (PAGE-SDS).

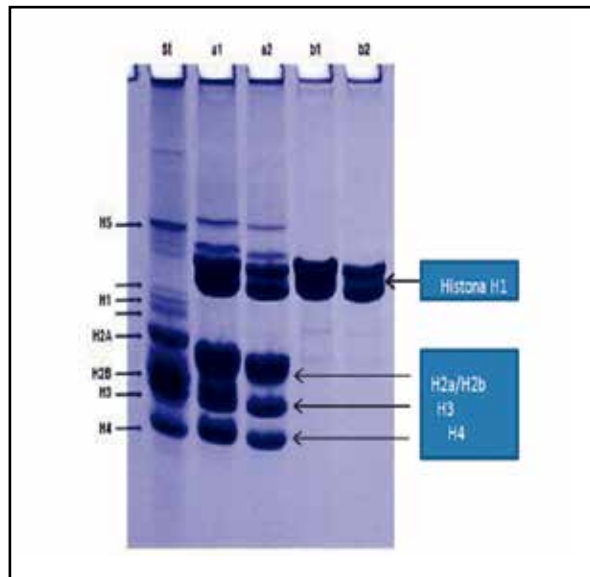
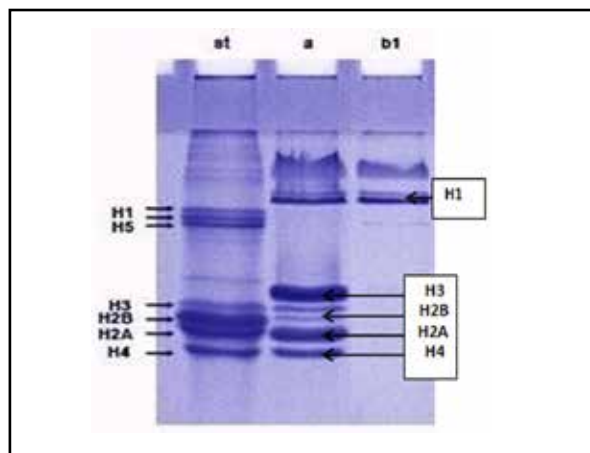


Figura 1. Pesos moleculares en kD de las histonas de *Loxechinus albus*

Leyenda:

- Carril # 1 (st): Histonas totales de eritrocito de pollo (15 µL) (HCl 0,4 N)
- Carril # 2 (a1): Histonas totales de erizo rojo L. albus (15 µL) (HCl 0.4N)
- Carril # 3 (a2): Histonas totales de erizo rojo L. albus (10 µL) (HCl 0,4N)
- Carril # 4 (b1): Histonas H1 de erizo rojo L. albus (5 µL) (HClO4 5%)
- Carril # 5 (b2): Histonas H1 de erizo rojo L. albus (5 µL) (HClO4 5%)

Electroforesis de histonas en PAGE- SDS



Electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE-SDS de las histonas de eritrocito de pollo y *Loxechinus albus*.

Leyenda:

Carril st:	Histonas totales de eritrocito de pollo (10 μ L)
Carril a:	Histonas totales de <i>Loxechinus albus</i> (10 μ L)
Carril b1:	Histonas H1 de <i>Loxechinus albus</i> (10 μ L)

Composición de aminoácidos de la histona H1

El peso molecular mínimo, calculado a partir de la composición de aminoácidos, es de aproximadamente 18 400 Daltons. La acetilación, la metilación y la fosforilación, de ciertos aminoácidos se detectaron en las fracciones de histonas (Anexos 1 y 2).

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Obtención de espermatozoides

En el presente trabajo se realizó la recolección del material biológico, el que consistió en esperma de erizo de mar. La época de desove para el litoral sur peruano y el norte chileno difieren un poco a lo reportado por la bibliografía (Vásquez, 2000), debido a que según esta, los meses en los cuales se produciría una abundante obtención de esperma, y por lo tanto el desove, sería entre los meses de junio a noviembre; pero se ha encontrado que para el trabajo realizado, se pudo comprobar que existió una alta producción de esperma maduro, hasta finales del mes de febrero, evidenciado mediante la observación al microscopio.

Extracción de histonas totales e histona H1

Se utilizaron espermatozoides conservados en etanol al 90% para obtener las histonas por extracción global en HCl 0,4 N. Se han reportado trabajos anteriores^(8, 14); que bajo estas condiciones se obtienen proteínas básicas ricas en lisina y arginina. Los patrones electroforéticos de las proteínas básicas específicas del núcleo de las células espermáticas de *Loxechinus albus* fueron obtenidas por solubilización secuencial. Existen grupos de proteínas básicas que pueden ser diferencialmente extraídas del núcleo tomando en cuenta su solubilidad en diversos solventes ácidos, así, las histonas H1, denominadas histonas muy ricas en lisina, tanto en vertebrados como en invertebrados, son solubles en ácido perclórico al 5%.

Para la cuantificación de proteínas en el análisis electroforético se utilizó el método de Bradford a una longitud de onda de 550 nm. Aunque en las células

somáticas o espermatogénicas específicas están presentes siempre los componentes denominados histonas, no es posible afirmar que los datos obtenidos en el presente trabajo sean exactos, pero podría ser notado que ellos están siempre presentes en su total complemento (H2A, H2B, H3, H4 y H1).

Purificación de la histona H1

Después de haber extraído las proteínas básicas espermio-específicas, debe establecerse su homogeneidad. La homogeneidad puede lograrse por cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de intercambio iónico, electroforesis sobre geles de poliacrilamida y enfoque isoelectrico, los cuales poseen mucha mayor capacidad de resolución y pueden detectar fácilmente la presencia de impurezas proteicas de menor cuantía.

La separación de proteínas por electroforesis se basa en la capacidad que tienen las proteínas de migrar en un campo eléctrico, estas contienen grupos iónicos que atendiendo a su relación carga/masa presentarán una migración diferencial en una disolución gelificada al someterlas a un campo eléctrico. Este tipo de geles permiten separar proteínas básicas como las histonas y protaminas. La poliacrilamida actúa como medio de soporte (fibras de acrilamida con puentes de bisacrilamida); la urea es una agente desnaturizador que elimina las interacciones entre proteínas, el ácido acético crea un medio ácido impidiendo que las proteínas permanezcan neutras. El TEMED y H₂O₂ actúan como catalizadores de la polimerización.

El método de Hurley (1977) constituye una variante que permite eliminar la preelectroforesis y disminuir el tiempo de polimerización sustituyendo el TEMED y PSA por tiourea hasta 0,09% y agua oxigenada hasta 0,002%. Las muestras se disuelven a una concentración de 1 mg/mL en el tampón muestra. El *buffer* muestra está constituido por 2-mercaptoetanol 20 mM, urea 8M, ácido acético 5% y verde de metilo 1%.

Caracterización de la histona H1

En la presente investigación se utilizaron los métodos de análisis cualitativo de la migración de proteínas por electroforesis para la determinación del peso molecular de la proteína purificada H1 y por HPLC su

composición cualitativa y cuantitativa de aminoácidos. El sistema utilizado consiste en geles de poliacrilamida al 15 % con los que se separan las histonas observadas en resultados con los cuales se separan las histonas. Como se muestra resultados se evidencian la presencia de bandas de proteínas histónicas extraídas del núcleo espermático. La presencia de la histona H1 es notoria como una doble (hasta triple) banda de menor velocidad de migración.

CONCLUSIONES

Se ha logrado aislar, purificar y caracterizar molecularmente la histona H1 del espermatozoide del erizo rojo *Loxechinus albus*, Molina 1782 de la zona sur del Perú (Tacna).

Se ha purificado y caracterizado la histona H1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida,

estableciéndose su peso molecular en aproximadamente 22 kDaltons, con un número aproximado de 200 aminoácidos y conteniendo una predominancia de los aminoácidos lisina (21,1 %) y arginina (20,2 %).

RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar los estudios en el área de modificaciones transcripcionales de la histona H1 y de las demás histonas, para poder así entender mejor las vías encargadas de la transcripción en estas especies. Realizar estudios de espectroscopía de masas con HPLC para determinar la existencia de proteínas isofórmicas que constituyen esta histona H1 y obtener anticuerpos antihistona H1 para utilizarlo y aplicarlo en investigaciones posteriores. Es importante dilucidar sobre el origen y función de esta histona.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ris, H. and Kubai, D.F. *Chromosome structure*. Annu Rev Genet. 1970. 4:263-294.
2. Finch, J.T., and Klug, A. *Solenoidal model for superstructure in chromatin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. 73, 1897-1901.
3. Suau, P., Bradbury, E.M., and Baldwin, J.P. *Higher order structures of chromatin in solution*. Eur. J. Biochem. 1979. 97, 593-602.
4. Littau, U.C., Burdick, C.L., Allfrey, U.G. and Mirsky, A.E. *The rol of histones in the maintenance of chromatin structure*. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). 54: 1204 – 1214. 1965
5. Bradbury, J. H. *The structure and chemistry of keratin fibers*. Adv. Protein Chem. 1973. 27: 111-211.
6. Renz, M., Nehls, P. & Hozier, J. *Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fibre*. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 1977. 74, 1879-1883.
7. Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C. and Aviles, F.X. *The structure of histone H1 and its location in chromatin*. Nature. 1980. 288: 675-679.
8. Subirana, J.A., Cozcolluela, C., Palau, J. and Unzeta, M. *Biochim. Biophys Acta* . 1973. 317, 364-379.
9. Hoffmann, P. and Chalkley, R. *Procedures for minizing protease activity during isolation of nuclei, chromatin and the histones*. In: Methods in Cell Biology, Vol. XVII, Chromatin and chromosomal proteins research. Ed. G. Stein; J. Stein, and L.J. Kleinsmith. Academic Press, New York, USA 1978. pp1-12.
10. Goodwin, G.H., Walker, J.M. and Johns, E.W. *The high movility group (HMG) non-histone chromosomal proteins*. In: The Cell Nucleus. Vol. VI, Chromatin, part C. Ed. H. Busch. Academic Press, New York, USA. 1978.
11. Panyim, S. and Chalkley, R. *Arch. Biochem Biophys*. 1969. 130, 337-346.
12. Laemmli, U.K. *Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227: 680 – 685.
13. Moore, S. and Stein, W.H. *Chromatographic determination of aminoacids by the use automatic recording equipment*. Methods Enzymol., 1963. 6: 819- 831.
14. Chiva, M., Saperas, N., Cáceres, C., and Ausió, J. in *Advances in Spermatozoal Taxonomy and Phylogeny* (Jamieson, B. G. M., Ausio', J., and Justine, J. L., eds), Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle, Paris. 1995. Vol. 166, pp. 501-514

Correspondencia

Richard Ponce Cusi.

Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman, Ciudad Universitaria Av. Miraflores s/n. Tacna 23000 - Perú
bio.richard.ponce@gmail.com