

# «INTERACCION DEL COMPLEJO <sup>3</sup>H-PROGESTERONA-RECEPTOR CON LA CROMATINA DE PITUITARIAS DE OVEJAS Y CARNEROS»

Por A. Fernández Martínez\*

J. Ventanas Barroso\*

A. López Pérez\*

## INTRODUCCION

Las hormonas esteroideas modulan las funciones celulares de los tejidos «blanco», interaccionando directamente con el material genético. De acuerdo con los estudios realizados hasta el momento presente<sup>1, 2, 3</sup>, la clave reside en el número de moléculas que, previamente unidas a su receptor citoplasmático, son capaces de activar los lugares aceptores específicos de la cromatina. Esta asociación de los complejos hormona-receptor con la cromatina precede siempre a los cambios en la síntesis de RNA y proteína que se observan tras la exposición de los tejidos «blanco» a los esteroides<sup>4, 5, 6</sup>.

En 1972, O'MALLEY y cols.<sup>7</sup> demostraron la capacidad de los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor del oviducto de pollo, de unirse «in vitro» a la cromatina del mismo origen. Dicha cromatina, al incubarla con el esteroide-receptor se saturaba a un nivel 3 a 9 veces superior al de la cromatina de otros tejidos que no son «blanco» de la progesterona, como eritrocito, bazo, corazón o pulmón<sup>2</sup>. Otros investigadores<sup>1</sup>, trabajando en el mismo laboratorio, han puesto de manifiesto que esta distinta sensibilidad a la progesterona se debe a que en la cromatina nuclear de los tejidos «no blanco», los aceptores se encuentran bloqueados, enmascarados con proteínas cromosómicas cuya extracción secuencial se traduce en un incremento del número de complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor retenidos por la misma. En estas condiciones, la especificidad tisular de la interacción <sup>3</sup>-H-progesterona-receptor con la cromatina se reduce. Esta aparente paradoja se resuelve si consideramos la existencia de dos tipos de aceptores, cuya presencia ha sido ya puesta en evidencia «in vivo» por WEBSTER y SPELSBERG<sup>2</sup>, unos de baja afinidad —que se encuentran tanto en los tejidos «blanco» como «no blanco»— y otros de alta afinidad —exclusivamente de los tejidos— «blanco».

Existe una correlación entre ambos tipos de aceptores y el enmascaramiento por

---

\* Cátedra de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León.  
*An. Fac. Vet. León*, 1984, 30, 233-246.

distintos grupos de proteínas cromosómicas<sup>8</sup>. Cuando se extraen las histonas se obtiene un aumento de lugares aceptores disponibles para la interacción, pero tanto en los tejidos «blanco» como «no blanco». Un nuevo incremento se logra cuando se eluyen dos grupos de proteínas ácidas, las fracciones denominadas AP<sup>1</sup> y AP<sup>2</sup>, siendo en este caso, específico de los tejidos «blanco» y es que en esta cromatina residual, donde las proteínas son reducidas hasta apenas un 5% del original permanece otra fracción de proteínas ácidas, la AP<sup>3</sup>, que contiene la mayor parte de los aceptores de alta afinidad. La identificación de la fracción AP<sup>3</sup> como verdaderos aceptores de alta afinidad ha sido posible mediante el empleo de cromatinas híbridas. Al transplantar dicha fracción procedente de un tejido «blanco» (oviducto) a la cromatina de uno «no blanco» (bazo), esta última adquiere la capacidad de interacción de los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor propia del oviducto<sup>1, 7</sup>.

En el trabajo que se presenta se estudia la interacción de los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor con la hipófisis, uno de sus tejidos «blanco» más característicos, ya que en ella se modula la secreción de gonadotropinas. También se aportan los resultados obtenidos empleando complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor de origen hipotalámico.

## MATERIAL Y METODOS

### *Material biológico*

Se emplearon pituitarias e hipotálamos de ovejas y carneros de raza churra de seis meses de edad, obtenidas a partir de animales en el matadero.

Los tejidos se extrajeron inmediatamente tras el sacrificio (máx. 30' después). Tras la decapitación se practicó un corte transversal en la zona occipital y se extrajo la masa encefálica a partir de la cual se diseccionó el área correspondiente al hipotálamo de acuerdo con el protocolo descrito por BARRACLOUGH, 1973<sup>9</sup>. Posteriormente se procedió a la extracción de la pituitaria, alojada en la silla turca del esfenoides.

Los tejidos se mantuvieron a 0-4<sup>o</sup> C cuando se procesaron en fresco y congelados a -30<sup>o</sup> C si se almacenaban hasta su uso.

### *Radiosiótopos*

El <sup>3</sup>H-progesterona, 80-110 Ci/mmol (TRK 413) fue suministrado por The Radiochemical Centre, Amersham, Bucks (Inglaterra).

### *Preparación de la cromatina*

Para la preparación de la cromatina de pituitarias se siguió el procedimiento previamente descrito por PERRY y cols.<sup>10</sup>. Previamente a su homogenización, las



pituitarias se distribuyeron en grupos de 8-18 unidades (0,3-0,5 g cada una) de acuerdo con el sexo.

#### *Unión de la cromatina a la celulosa, según Litman<sup>11</sup>*

La cromatina se suspendió en tampón Tris/ClH 6mM, pH = 7,5, conteniendo EDTA 0,1 mM, SO<sub>3</sub>HNa 1mM y 2-mercaptoetanol 20 mM; y se homogenizó lentamente con 0,5-2 g de celulosa (Whatman CC-41), tratada previamente con ClH 1N, lavada con agua destilada y liofilizada. A continuación se centrifugó (estas operaciones se realizaron en cámara fría, a 4<sup>o</sup> C), y el sedimento obtenido se liofilizó de nuevo.

El liofilizado se suspendió en 30-50 ml de etanol absoluto, manteniéndose en agitación durante 30', tras lo cual fue expuesto a la luz ultravioleta durante 10' a una distancia de 10 cm, manteniéndose siempre en agitación lenta.

El etanol se separó por filtración y la cromatina-celulosa fue lavada con 300 ml de buffer Tris/ClH 2 mM, pH = 7,5, conteniendo EDTA 0,1 mM, SO<sub>3</sub>HNa 1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM. Tras la eliminación del buffer la cromatina-celulosa se liofilizó y se almacenó en seco a temperatura ambiente.

#### *Preparación de los complejos receptor de alta afinidad (HAR)-<sup>3</sup>H-progesterona*

Las hipófisis y los hipotálamos, se homogenizaron en buffer Tris/ClH 10 mM, pH = 7,4, conteniendo sacarosa 0,32 M y 2-mercaptoetanol 100 mM con la ayuda de un homogenizador de Potter. El homogenizado obtenido se centrifugó a 105.000 xg durante 90'. El sobrenadante de esta última centrifugación constituye el citosol.

Al <sup>3</sup>H-progesterona, una vez evaporado el disolvente que lo contenía con N<sub>2</sub>, se añadió el citosol, manteniéndose 90' en lenta agitación, tiempo necesario para la formación de los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor.

Los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor se precipitaron con SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> saturado, pH = 7,2 al 35 % de saturación, que se añadió lentamente por un espacio de 15'. Tras mantener 30' en agitación la mezcla, se centrifugó a 10.000 xg durante 15-20', y los sedimentos se almacenaron a -30<sup>o</sup> C.

Previamente a su utilización, los sedimentos se disolvieron en tampón Tris/ClH 5 mM de pH = 7,5 conteniendo ClK 0,15 M, EDTA 0,5 mM y 2-mercaptoetanol 50 mM; y se dializaron contra 300 ml del mismo buffer durante tres horas a 4<sup>o</sup> C, cambiando tres veces el tampón. El dializado se centrifugó a 10.000 xg durante cinco minutos, y se tomaron alícuotas (50 µl) para la determinación de la radiactividad específica (cpm/mg de proteína).

#### *Extracción de la cromatina-celulosa, incubación de los complejos hormona-receptor con la cromatina y recuento de radiactividad*

Alícuotas de cromatina-celulosa, tres réplicas de 10 mg cada una, se hidrataron con una disolución de EDTA 0,1 mM, SO<sub>3</sub>HNa 1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM en

tampón Tris/ClH 2 mM, pH = 7,5, durante 30 minutos a 0-4° C. A continuación fueron extraídas con al menos 20 volúmenes del buffer de extracción correspondiente y lavadas con tampón Tris/ClH 2 mM, pH = 7,5, con EDTA 0,1 mM (para la extracción de clorhidrato de guanidina) o con tampón Tris/ClH 10 mM, pH = 7,5 (para la extracción con ClNa y ClNa + Urea).

Los complejos hormona-receptor se incubaron durante 90 minutos con las cromatinas extraídas, y los complejos radiactivos no unidos se eliminaron lavando tres veces con tampón Tris/ClH 2mM, pH = 7,5, EDTA 0,1 mM. Al sedimento se le añadió 1 ml de NCS (solubilizador tisular) y se mantuvo a 37° C durante una hora, tras lo cual se añadieron 110  $\mu$ l de ClH 6N. La mezcla se transfirió cuantitativamente a viales de centelleo con tres lavados de 4 ml de Instagel. Las muestras se contaron durante 10 minutos una vez que la temperatura se hubo estabilizado. Para el recuento se empleó un espectrómetro líquido de centelleo, modelo Intertechnique SL-30.

#### *Análisis químico de la cromatina-celulosa*

En las muestras de cromatina-celulosa, tal como fueron preparadas o extraídas con ClNa/Urea o con ClHGu, se determinó su contenido en DNA proteína total, proteínas ácidas e histonas.

La proteína se cuantificó por el método de LOWRY<sup>12</sup>, empleando seroalbúmina bovina (Sigma) como patrón para las proteínas ácidas y totales e histonas de timo de ternera (Sigma, tipo II-S) para las histonas. Las proteínas totales se extrajeron con NaOH 0,5 M a 37° C durante 60 minutos. Las histonas fueron extraídas con ClH 0,2 M a 2° C durante 30 minutos, y a continuación se extrajeron las proteínas ácidas con NaOH 0,1 M a 37° C durante 60 minutos.

El DNA se determinó por el método de GILES & MYERS<sup>13</sup>, modificación del método de BURTON<sup>14</sup>, utilizando DNA de timo de ternera (Sigma) como patrón.

## RESULTADOS

#### *Caracterización de los componentes del ensayo «in vitro»*

La tabla I muestra los resultados del análisis químico de las cromatinas empleadas en la interacción con los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor. Se expresa el

**TABLA I**

#### **Composición química de las cromatinas empleadas en el ensayo «in vitro»**

Los datos abajo expresados corresponden a la media de tres réplicas de 15-30 mg cada una.

Fecha de preparación	ug/mg de cromatina-celulosa					
	Proteína total	Histonas	Proteínas ácidas	DNA	Histonas/DNA	Proteínas ácidas/DNA
20-febrero-79	21,80	5,00	11,80	4,63	1,07	2,54
27-febrero-79	20,20	2,90	8,00	3,56	0,81	2,24
20-enero-80	18,10	6,90	10,10	5,46	1,25	1,83
MEDIA .....					(1,04)	(2,20)



contenido en DNA, proteína total, histonas y proteínas ácidas, así como los cocientes histonas/DNA y proteínas ácidas/DNA.

Los datos obtenidos concuerdan con las determinaciones efectuadas por otros autores, STEIN<sup>15</sup>, PERRY y LÓPEZ (1978), que encuentran valores en torno a la unidad para la relación histonas/DNA y de 0,5-2,5/1 para la de proteínas ácidas/DNA, similares a los aportados por nosotros (1,04 para histonas/DNA y 2,20 para proteínas/DNA).

En cuanto al otro componente del ensayo «in vitro», los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor, dichos complejos se prepararon a partir de hipófisis e hipotálamos de ovejas de seis meses de edad (véase tabla II).

#### *Interacción de los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor con la cromatina nativa*

Los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor de hipófisis e hipotálamo se incubaron con las cromatinas preparadas, previamente hidratadas con una disolución de EDTA 0,1 mM, SO<sub>3</sub>HNa 1 mM y 2-mercaptoetanol 20 mM en tampón Tris/ClH (pH = 7,5). Tras el lavado para eliminar los complejos no unidos, se cuantificó la radiactividad ligada a la cromatina-celulosa. Los resultados obtenidos (tabla II) muestran que la capacidad aceptora de la cromatina de pituitaria simplemente hidratada para los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor es baja.

Estos resultados nos movieron a someter, en los experimentos subsiguientes, a la acción de diferentes agentes desproteinizantes con objeto de desenmascarar los lugares aceptores.

#### *Efecto de la extracción con ClNa y ClNa/Urea sobre la composición química de la cromatina y su capacidad de interacción con los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor*

Alícuotas apropiadas de cromatina-celulosa se extrajeron con ClNa 2M y con ClNa 2M seguido de ClNa 3M + Urea 5M. En ambos casos el pH del buffer de extracción se ajustó a 6,0, 7,2 y 8,3.

La extracción con ClNa 2M (fig. 1), que tiene por objeto deshistonizar la cromatina, demostró ser más efectiva a pH = 6,0 tanto en lo que a cantidad de histonas remanente se refiere, como en lo que hace relación al cociente proteína/DNA, que es el más bajo de los pH estudiados.

Respecto al procedimiento de extracción en dos etapas, primero con ClNa 2M seguido de ClNa 3M + Urea 5M (fig. 2), cuya finalidad es eluir las proteínas ácidas enmascaradoras (fracciones AP<sub>1</sub> y AP<sub>2</sub>), muestra ser más eficiente a pH = 7,2. De acuerdo con estos resultados, en los subsiguientes experimentos de interacción, la extracción con ClNa 2M se efectuó a pH = 6,0 y la correspondiente a ClNa 3M + Urea 5M a pH = 7,2.

Al analizar la influencia de la extracción de la cromatina con ClNa 2M y ClNa 3M + Urea 5M sobre su capacidad de interacción con los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor, no se reprodujeron los resultados de WEBSTER y col. (1976), quienes

**TABLA II**  
**Interacción de los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor con la cromatina de hipófisis de óvulo**

Los valores expresados en la tabla corresponden a la media de tres réplicas. Los datos entre paréntesis corresponden al % de incremento con respecto a la cromatina hidratada.

Cromatina empleada	Receptor			Extraída con CHGu IM (DNA+AP <sub>1</sub> +AP <sub>2</sub> +AP <sub>3</sub> )	Extraída CHGu 5M (DNA+AP <sub>3</sub> )
	Tejido	Radiactividad específica (cpm/mg proteína)	Cromatina hidratada (DNA+H+AP <sub>1</sub> +AP <sub>2</sub> +AP <sub>3</sub> )		
20-enero-80 (5,46 g DNA)	Hipófisis	0,48 × 10 <sup>5</sup>	0,11 × 10 <sup>5</sup> (0,003)	0,12 × 10 <sup>5</sup> (0,021)	0,18 × 10 <sup>5</sup> (0,031)
20-febrero-70 (4,64 g DNA)	Hipófisis	1,10 × 10 <sup>5</sup>	0,27 × 10 <sup>5</sup> (0,085)	0,47 × 10 <sup>5</sup> (0,092)	0,67 × 10 <sup>5</sup> (0,074)
20-enero-80 (5,46 g DNA)	Hipotálamo	2,3 × 10 <sup>5</sup>	0,79 × 10 <sup>5</sup> (0,073)	0,91 × 10 <sup>5</sup> (0,072)	1,20 × 10 <sup>5</sup> (0,031)
20-enero-80 (5,46 g DNA)	Hipotálamo	1,23 × 10 <sup>5</sup>	0,18 × 10 <sup>5</sup> (0,069)	0,35 × 10 <sup>5</sup> (0,033)	0,74 × 10 <sup>5</sup> (0,080)
27-febrero-79 (3,56 g DNA)	Hipotálamo	1,17 × 10 <sup>5</sup>	0,33 × 10 <sup>5</sup> (0,18)	0,70 × 10 <sup>5</sup> (0,057)	1,18 × 10 <sup>5</sup> (0,076)
MEDIA .....			0,33 × 10 <sup>5</sup>	0,51 × 10 <sup>5</sup> (155%)	0,80 × 10 <sup>5</sup> (240%)

\* Las tres últimas preparaciones provienen de hipotálamos almacenados a -30° C durante dos semanas. Las cifras entre paréntesis son los valores correspondientes a las desviaciones standard.

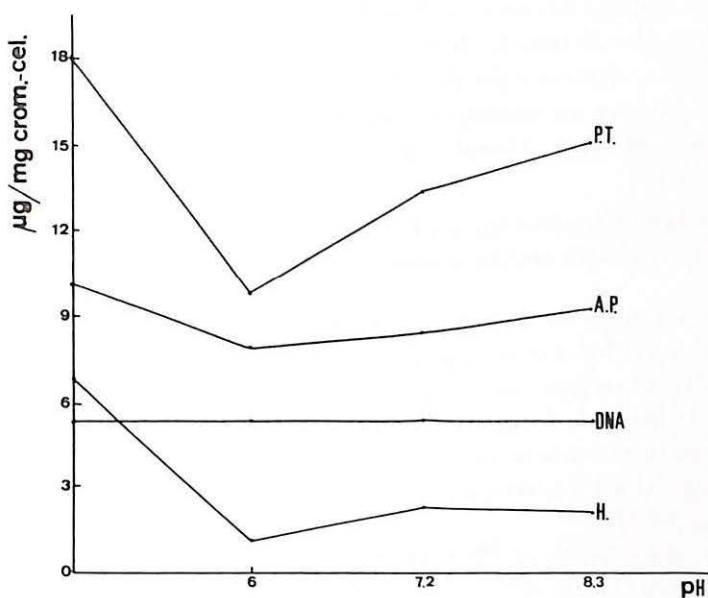


Figura 1.—Efecto del pH sobre la composición química del complejo cromatina celulosa (muestra: machos, 20-enero-80) extraída con el solvente ClNa 2M.

P.T.—proteínas totales.  
H.—histonas.  
A.P.—proteínas ácidas.

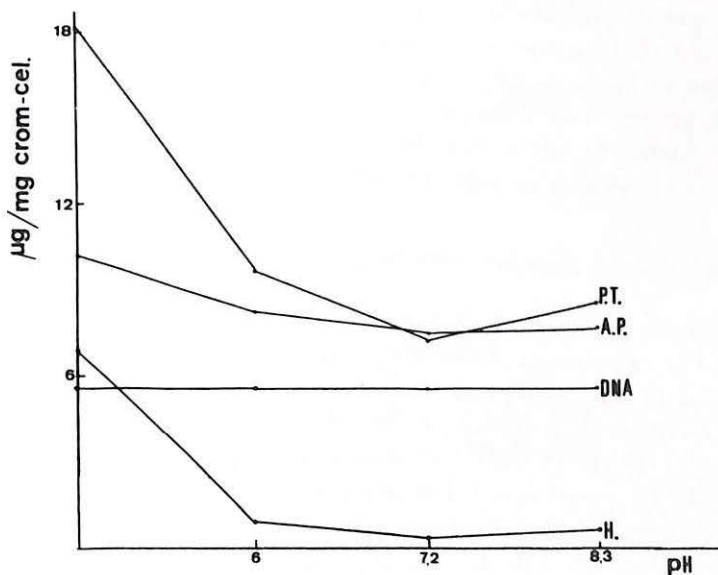


Figura 2.—Efecto del pH sobre la composición química del complejo cromatina celulosa (muestra: machos, 20-enero-80) extraída con el solvente ClNa 3M + Urea 5M.

P.T.—proteínas totales.  
H.—histonas.  
A.P.—proteínas ácidas.



empleando cromatinas de oviducto de pollo logran un incremento en el número de complejos retenidos al eluir las histonas y proteínas ácidas sucesivamente. En los experimentos por nosotros realizados, cuyos resultados se muestran en la figura 3, no conseguimos exponer un número de aceptores para la interacción con el esteroide-receptor, adicional al ya existente en la cromatina hidratada.

*Efectos de la extracción con ClHGü sobre la composición química de la cromatina y su capacidad de interacción con los complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor*

Al igual que en el caso del ClNa y ClNa + Urea, las cromatinas se extrajeron con molaridades de clorhidrato de guanidina (ClHGü) de concentración creciente (0M, 1M, 3M y 5M). La composición química de la cromatina residual tras la extracción se muestra en la figura 4. Se observa un descenso de las proteínas ácidas y totales a medida que se incrementa la molaridad de la disolución de ClHGü. Las histonas por su parte, son extraídas prácticamente por completo a concentraciones de ClHGü superiores a 3-4 M.

Respecto al contenido en DNA, no se observa descenso alguno con relación a la cromatina inicial, hecho que es extensible también a la extracción con ClNa y ClNa + Urea. Ello demuestra que no hubo pérdidas de cromatina durante la extracción y el lavado, y que la unión del DNA a la matriz de celulosa fue satisfactoria en todos los casos.

Al analizar la capacidad aceptora de la cromatina, mediante la extracción secuencial de las proteínas cromosómicas con ClHGü, hemos podido comprobar (figura 4) que el número de complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor unidos, se incrementa correlativamente con el descenso de las histonas y proteínas ácidas enmascaradoras (fracciones AP<sub>1</sub> y AP<sub>2</sub> de Spelsberg). En la cromatina extraída con ClHGü 5M persiste una fracción de proteínas ácidas (AP<sub>3</sub>), siendo en estas condiciones cuando la interacción  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor con la cromatina de hipófisis de oveja alcanza su valor más alto.

*Influencia del tejido de procedencia del receptor sobre su interacción con la cromatina*

Aunque en los experimentos de interacción, cuyos resultados se muestran en las figuras 3 y 4 se emplearon indistintamente complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor de origen hipofisario o hipotalámico, nos pareció conveniente evaluar si el tejido de origen del receptor podía influir en los niveles de interacción. Los resultados expuestos en las figuras 5 y 6 permiten afirmar que no existen diferencias atribuibles a que el tejido de procedencia del receptor sea hipófisis o hipotálamo de oveja.

Otro hecho que puede deducirse de las figuras 5 y 6 es que la interacción  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor con la cromatina, es un proceso saturable, como lo demuestra el que al añadir cantidades crecientes de complejos hormona-receptor aumenta paralelamente el número de complejos unidos, hasta que alcanzada una determinada concentración de proteína receptora (2,73 mg) resulta imposible lograr un incremento adicional de  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor ligada.



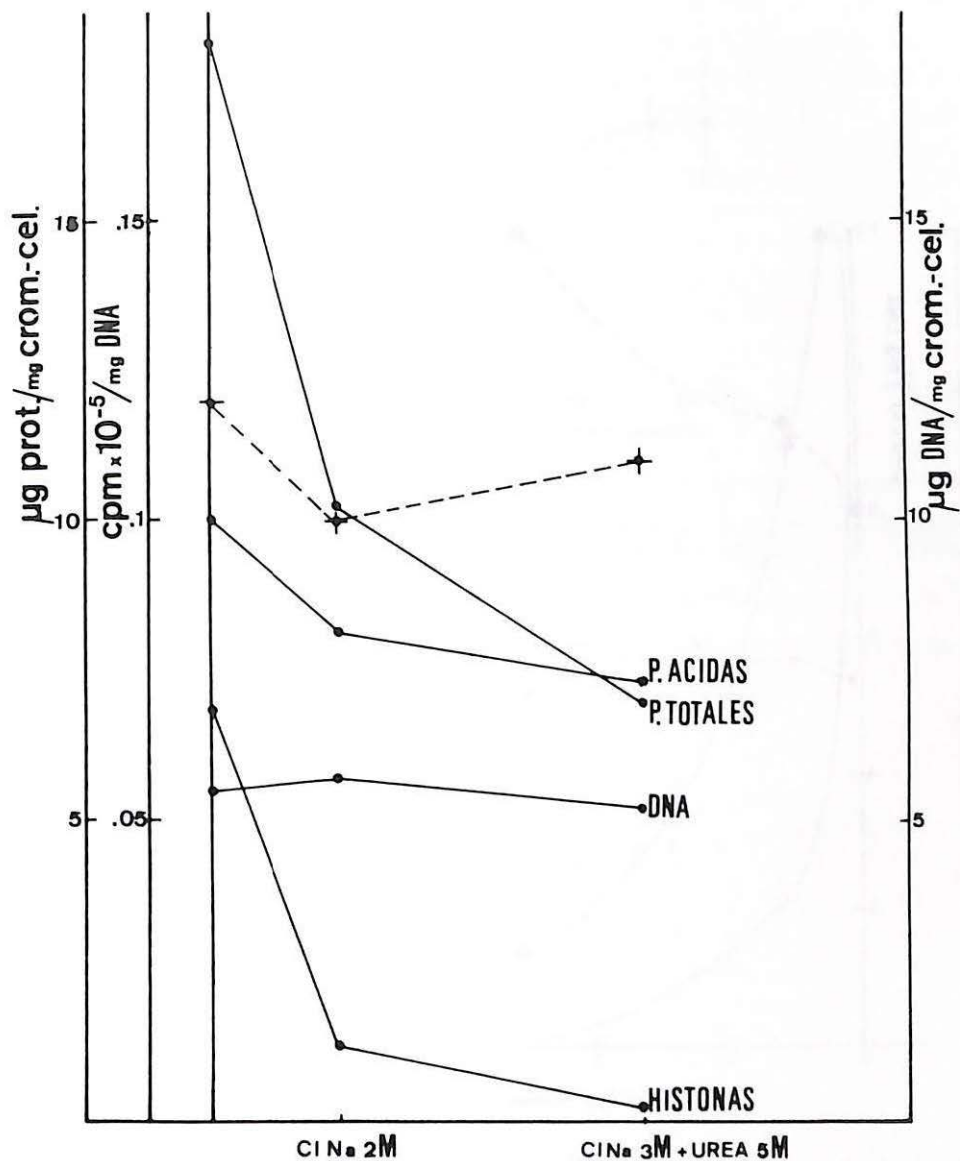


Figura 3.—Efecto de la extracción con ClNa 2M y ClNa 3M + Urea 5M sobre la interacción del receptor progesterona de hipotálamo con el complejo cromatina-celulosa de pituitaria de óvulo (muestra, 20-enero-80).

Muestras de cromatina-celulosa después de hidratadas con el tampón correspondiente, fueron deshistonizadas con ClNa 2M. Otras réplicas después de extraerlas con ClNa 2M se les sometió a un desenmascaramiento proteico con ClNa 3M + Urea 5M.

La línea + ———+ representa el nivel de interacción antes citado. Los valores de DNA y proteína/mg de cromatina-celulosa que permanecen ligados a la matriz de cromatina-celulosa tras la extracción, también quedan reflejados en la gráfica.

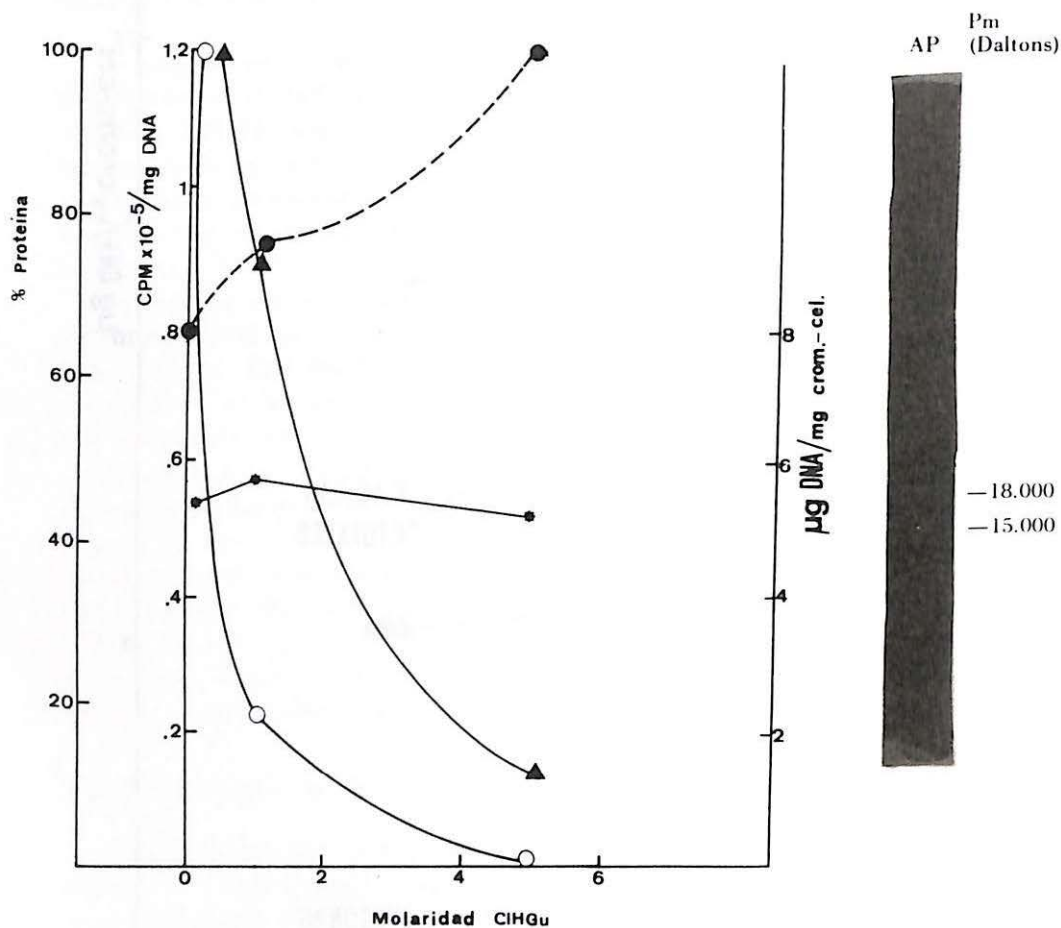


Figura 4.—Interacción del receptor hipotalámico de progesterona con el complejo cromatina-celulosa de pituitaria de carnero (muestra, 20-enero-80) tratada con CIHG (●—●).

Tres réplicas de 10 mg cada una, después de hidratadas, se extrajeron con distintas molaridades de CIHG (1M y 5M), a continuación se incubaron con 800  $\mu$ l de <sup>3</sup>H-progesterona-receptor (radiactividad específica:  $2,3 \times 10^5$  cpm/mg proteína) preparados a partir de hipotálamos de ovejas y carneros, cuantificándose después la radiactividad ligada.

En esta gráfica se representa también el contenido en histonas (○—○), proteínas ácidas (▲—▲) y DNA (\*—\*) de la cromatina-celulosa residual después de la extracción con CIHG 1 y 5M. A la izquierda de la gráfica se muestra una electroforesis en gel de acrilamida (10%) de proteínas ácidas extraídas de la cromatina. La electroforesis de proteínas ácidas se realizó siguiendo el método descrito por WEBER y OSBORN (1969).

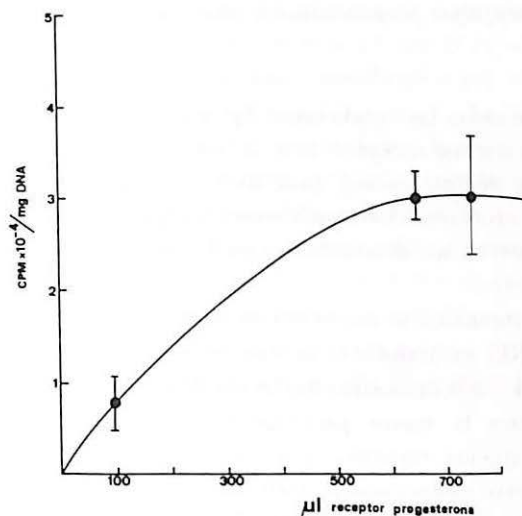


Figura 5.—Curva de saturación de la cromatina de pituitaria de óvido con los complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor del mismo origen.

En ensayo se realizó empleando muestras de cromatina-celulosa (macho, 1-marzo-79) extraídas primero con  $\text{ClNa}$  2M ( $\text{pH} = 6$ ) y posteriormente con  $\text{ClNa}$  3M + Urea 5M ( $\text{pH} = 7,2$ ). El contenido en DNA de cada muestra fue de  $22 \mu\text{g}$ .

La radioactividad específica del complejo  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor empleado en este experimento fue de  $2,4 \times 10^5$  cpm/mg proteína.

Las barras verticales representan el rango de valores obtenidos en los ensayos efectuados por triplicado.

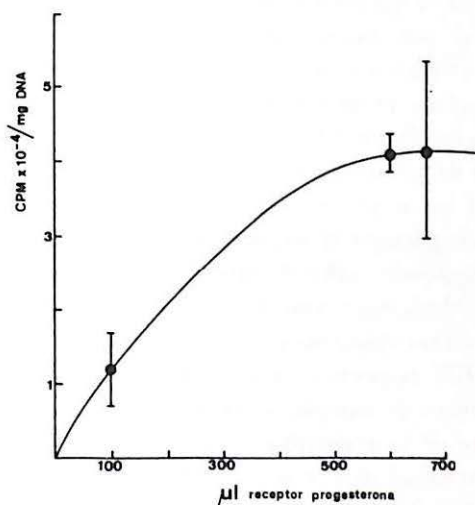


Figura 6.—Curva de saturación de la cromatina de pituitaria de óvido con los complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor, procedentes de hipotálamos.

El complejo  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor empleado en esta curva de saturación, se obtuvo de hipotálamos de animales de la misma edad y especie.

Muestras de cromatina-celulosa (macho, 1-marzo-79) después de hidratadas con el tampón correspondiente, se extrajeron primero con  $\text{ClHGu}$  1M y posteriormente con  $\text{ClHGu}$  5M. Las muestras extraídas se incubaron con el complejo  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor (radioactividad específica:  $0,55 \times 10^5$  cpm/mg de proteína).

La radioactividad ligada, tras la incubación y el lavado, se cuantificó en un contador de centelleo.



### *Interacción de los complejos progesterona-receptor con la cromatina nativa y extraída con ClHGu*

Una vez determinadas las condiciones óptimas de interacción «in vitro» de los complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor con la cromatina, procedimos a evaluar el número de lugares de interacción para dichos complejos, tanto los disponibles directamente en la cromatina hidratada como los que se encuentran enmascarados por proteínas cromosómicas, demostrables mediante la elución progresiva de dichas proteínas bloqueadoras.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla II, donde encontramos que la extracción con ClHGu ya permite el acceso de un número de receptores 1,6 veces superior al observado en la cromatina hidratada. Pero es la extracción con ClHGu 5M la que logra exponer la mayor parte de los aceptores, como lo demuestra el incremento de complejos retenidos por la cromatina (2,4 veces superior a la hidratada). De nuevo comprobamos (tabla II) que el tejido de procedencia del receptor no influye sobre la interacción, lo cual corrobora los datos obtenidos anteriormente.

## DISCUSION

Los resultados del estudio de la interacción de los complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor con la cromatina de hipófisis de oveja obtenidos por nosotros, confirman las conclusiones alcanzadas por otros autores, responsabilizando de una manera preponderante a la composición de la cromatina de los distintos niveles de interacción con los complejos progesterona-receptor (2,10). WEBSTER y cols. (1976), estudiando «in vitro» la interacción de los complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor con la cromatina de oviducto de pollo, encuentran que mientras en la cromatina nativa únicamente el 30% de los aceptores se hallan disponibles para la interacción, la elución de las histonas permite la exposición de casi un 40%, en ambos casos referido al total de lugares observables al extraer las proteínas ácidas enmascaradoras (100% de sitios disponibles). Estos resultados son equiparables a los obtenidos por nosotros, donde la cromatina hidratada presenta un 40% de lugares de interacción y la deshistonizada un 60% respecto a la extraída con ClHGu 5M.

No obstante, el número de complejos  $^3\text{H}$ -progesterona-receptor unidos después del desenmascaramiento de la cromatina, es inferior a los descritos por PERRY y LÓPEZ (1978) para hipotálamos de ovejas y por WEBSTER y cols. (1976) con oviducto de pollo, en ambos casos se utilizaron los mismos sistemas libres de células empleados por nosotros.

Resulta imposible argumentar, en este sentido, que la cromatina de pituitaria de óvulo se comporta como un tejido «no blanco» por las siguientes razones: 1) La cromatina hidratada presenta un alto porcentaje (cerca del 40%) de aceptores expuestos, lo cual contrasta con los datos aportados por WEBSTER para la cromatina de bazo (sólo el 6%), 2) al extraer las proteínas ácidas enmascaradoras ( $\text{AP}_1$  y  $\text{AP}_2$ )

se obtiene un incremento sustancial del número de aceptores titulables, y 3) la interacción cromatina de hipófisis/progesterona-receptor es un proceso saturable, hecho que demuestra que los aceptores cuantificados por nosotros son de alta afinidad, específicos de los tejidos «blanco».

Pensamos que más bien estas diferencias deben ser de tipo fisiológico, cuya influencia en la interacción esteroide-receptor con la cromatina ha sido reconocida<sup>2</sup>.

En lo que sí hay una plena coincidencia entre la mayoría de los grupos de investigadores mencionados, y en este sentido nuestros experimentos vienen a corroborarlo, es atribuir a un grupo de proteínas ácidas de la cromatina (concretamente a la fracción AP<sub>3</sub>) la responsabilidad de la interacción esteroide-receptor con la cromatina. Esta fracción estaría constituida por proteínas de bajo peso molecular y serían por tanto las responsables del anclaje del receptor a la cromatina con alta afinidad.

## RESUMEN

Se ha estudiado la interacción de los complejos <sup>3</sup>H-progesterona-receptor con la cromatina de hipófisis de óvulo. La capacidad aceptora de dicha cromatina en estado nativo es baja, ya que aproximadamente el 60% de los lugares de interacción se encuentran bloqueados por histonas y proteínas ácidas enmascaradoras. La desproteínización parcial de la cromatina permite el acceso de un número adicional de complejos progesterona-receptor.

El número máximo de complejos unidos a la cromatina se obtiene cuando en ésta sólo permanece unido al DNA una fracción de proteínas ácidas (AP<sub>3</sub>), a la que se atribuye dicha capacidad aceptora.

## THE BINDING OF <sup>3</sup>H-PROGESTERONE-RECEPTOR COMPLEXES FROM SHEEP PITUITARY AND HYPOTHALAMUS TO SHEEP PITUITARY CHROMATIN

### SUMMARY

Chromatin isolated from nuclei of sheep was linked to cellulose in u.v. light. The saturation binding of <sup>3</sup>-labelled progesterone-receptor complexes, prepared by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation from the 105.000 xg supernatant of pituitary and hypothalamic cytosol, was then measured. The binding of labelled receptor complexes to chromatin increased after removal of histones and masking acidic proteins. The progesterone-receptor complex acceptor sites appeared to be associated with a fraction of chromosomal nonhistone proteins, termed AP<sub>3</sub>.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) SPELBERG, T. C.; STEGGLES, A. W., y O'MALLEY, B. W. (1971).—Progesterone binding components of chick oviduct. III. Chromatin acceptor sites. *J. Biol. Chem.*, **216**, 1188-1197.
- 2) WEBSTER, R. A.; PIKLER, G. M., y SPESBERG, T. C. (1976).—Nuclear binding of progesterone in hen oviduct. *Biochem. J.*, **156**, 409-418.
- 3) GORSKI, J., y GANNON, F. (1976).—Current models of steroid hormone action: a critique. *Ann. Rev. Physiol.*, **38**, 425-450.
- 4) O'MALLEY, B. W., y MEANS, A. R. (1974).—Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science*, **183**, 610.
- 5) McLUSKY, N. J., y NAFTOLIN, F. (1981).—Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, **211**, 1294.
- 6) DE ANGELO, A. B., y GORSKI, J. (1970).—Role of RNA synthesis in the estrogen induction of a specific uterine protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 693.
- 7) O'MALLEY, B. W. y cols. (1972).—Mechanisms of interaction of a hormone-receptor complex with the genome of a eukaryotic target cell. *Nature*, **235**, 141-144.
- 8) SPELBERG, T. C.; STEGGLES, A. W.; CHYTI, F., y O'MALLEY, B. W. (1972).—Progesterone binding components of chick oviduct. V. Exchange of progesterone binding capacity from target to nontarget tissue chromatin. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1368-1374.
- 9) BARRACLOUGH, C. A. (1973).—Handbook *Physiol. Sect.*, **72**, 29-56.
- 10) PERRY, B. N., y LÓPEZ, A. (1978).—The binding of <sup>3</sup>H-labelled oestradiol and progesterone-receptor complexes to hypothalamic chromatin of male and female sheep. *Biochem. J.*, **200**, 133-142.
- 11) LITMAN, R. M. (1968).—*J. Biol. Chem.*, **243**, 6222-6233.
- 12) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J., y cols. (1951).—Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 13) GILES, K. W., y MYERS, A. (1965).—A improved dephenylamine method for the estimation of DNA. *Nature*, **206**, 93.
- 14) BURTON, K. (1956).—A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem. J.*, **62**, 315-323.
- 15) STEIN, G. S. y cols. (1975).—Chromosomal proteins and gene regulation. *Sci. American*, **232**, 46-61.
- 16) WEBER, K., and OSBORN, M. (1969).—The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal Biol. Chem.*, **244**, Vol. **16**, 4406-4412.