

INTERACCION DEL COMPLEJO ^3H -ESTRADIOL-RECEPTOR CON LA CROMATINA DE PITUITARIAS DE OVEJAS Y CARNEROS

Por A. Fernández Martínez*

A. López Pérez*

J. Ventanas Barroso*

INTRODUCCION

Es un hecho reconocido y aceptado universalmente que las hormonas esteroides segregadas durante las etapas críticas fetal o perinatal, influyen en los modelos de comportamiento sexual y crecimiento. Las hormonas esteroides segregadas por las gónadas y la corteza de las glándulas adrenales, son transportadas vía sanguínea a todo el cuerpo, estimulando sólo a ciertos tejidos («tejidos blanco»), que poseen moléculas proteicas citosólicas denominadas «receptores». Una vez dentro de la célula «blanco», la hormona esteroide interacciona con los receptores específicos formando el complejo hormona esteroide-receptor; estos complejos son activados mediante un proceso temperatura dependiente, translocándose posteriormente al núcleo.

La interacción específica del complejo hormona esteroide-receptor con los componentes del núcleo es otra de las etapas dentro del mecanismo de acción de las hormonas esteroides^{1, 2, 3} apoyada por numerosos datos experimentales. No obstante la naturaleza del componente nuclear, denominado «ceptor», resulta difícil de determinar. Todos los trabajos realizados en este sentido sugieren que una fracción de proteínas ácidas de la cromatina es la responsable de la interacción de las hormonas esteroides a nivel nuclear⁴.

Son diversos los trabajos en los que se ha estudiado la interacción del complejo estradiol-receptor con cromatinas procedentes de tejidos blanco de diferentes especies animales^{5, 6, 7, 8, 9, 10}.

En el presente trabajo se estudia la interacción del complejo ^3H -estradiol-receptor con la cromatina de pituitarias de ovejas y carneros.

* Cátedra de Tecnología y Bioquímica de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León.
In: Fac. Vet. León, 1981, 30, 247-257.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico.—

Se emplearon pituitarias e hipotálamos procedentes de ovejas y carneros de raza churra, de aproximadamente seis meses de edad.

Radiosótopos.—

El ^3H -estradiol, 85-110 Ci/mmol (TRK 322) fue suministrado por Radiochemical Centre Amersham Bucks (Inglaterra).

Preparación de la cromatina.—

Se siguió el protocolo descrito por PERRY y LÓPEZ (1978)⁶, trabajando con hipotálamos de óvidos de la misma especie y edad que los nuestros.

Unión de la cromatina a la celulosa.—

Se realizó siguiendo el método propuesto por LITMAN (1968)¹¹.

Las cantidades de celulosa añadidas variaron con el número de pituitarias empleadas en cada cromatina (1 pituitaria/0,13 g de celulosa).

Preparación de los complejos ^3H -estradiol-receptor.—

La obtención de los complejos ^3H -estradiol-receptor se realizó siguiendo el método descrito por FERNÁNDEZ (1984)¹².

Análisis del complejo cromatina-celulosa.—

1.º) *Extracción de proteínas totales, proteínas ácidas e histonas.*

a) *Proteínas totales*

Las proteínas totales del complejo cromatina-celulosa fueron extraídas en presencia de NaOH 0,5N. El sobrenadante que las contenía se neutralizó con ClH 0,5N.

b) *Histonas*

Se extrajeron con ClH 0,2N, siguiendo la técnica de MARUSHIGE and BONNER (1966)¹³.

c) *Proteínas ácidas*

La extracción de proteínas ácidas se realizó a partir de los sedimentos deshistonizados sometiéndoles a un nuevo proceso de extracción con NaOH 0,1N (SPELSBERG y cols., 1976)¹⁴.

2.º) *Determinación de proteínas totales, ácidas, histonas y D.N.A.*

a) La determinación de proteínas totales, ácidas e histonas se realizó siguiendo el método de LOWRY y col. (1951)¹⁵, empleando como proteína standard seroalbúmina bovina (para proteínas totales y ácidas) o histonas procedentes de núcleos de timo de ternera (en el caso de la determinación de histonas).

b) La determinación del DNA se realizó según la técnica de GILES & MYERS (1965)¹⁶, modificación de la reacción de difenilamina de BURTON (1956)¹⁷.

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

Alícuotas de cromatina-celulosa una vez hidratada, se extrajeron con el buffer correspondiente que contenía clorhidrato de guanidina como agente caotrópico, a distintas concentraciones siguiendo el procedimiento descrito por FERNÁNDEZ (1984)¹².

Las cromatinas extraídas se incubaron con los complejos estradiol-receptor siguiendo la técnica de PERRY y LÓPEZ⁶.

Para el conteo de radiactividad se empleó como líquido de centelleo Instagel (Packard).

Análisis químico de las proteínas citosólicas.—

Las proteínas citosólicas se determinaron siguiendo el método de Lowry/D.O.C. modificado de BENSADOUN y WEINSTEIN (1976)¹⁸.

RESULTADOS

Caracterización de los componentes del ensayo «in vitro».—

En la tabla I se presentan los valores, en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de cromatina-celulosa, de proteína total, proteína ácida, histonas y DNA de las muestras de cromatina empleadas en la interacción con los complejos ^3H -estradiol-receptor. También se muestran las relaciones histonas/DNA y proteínas ácidas/DNA. Los datos obtenidos para estos valores, son similares a los de otros autores que han empleado sistemas de purificación de núcleos y preparación de cromatinas semejantes a las muestras.

Los complejos ^3H -estradiol-receptor, se obtuvieron a partir del sobrenadante

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	<i>μg/mg de cromatina-celulosa</i>					Proteínas ácidas-DNA
	Proteína total	Histonas	Proteínas ácidas	DNA	Histonas/DNA	
1-marzo-79	8,4	1,3	4,4	2,2	0,60	2
30-enero-79	15	2,4	6,66	2,23	1,07	2,98
20-febrero-79	21,8	5	11,8	4,63	1,07	2,54
MEDIA					(0,83)	(2,50)

resultante de la centrifugación a 105.000 xg durante 60 minutos, tras la homogenización del tejido hipotalámico y del tejido de pituitaria de ovejas y carneros (ver Material y Métodos), determinándose la radiactividad específica expresada en cpm/mg proteína (véase tabla II).

Condiciones óptimas para el ensayo «in vitro».—

Una vez obtenidos los dos componentes del ensayo «in vitro», se estudió la interacción entre cromatinas simplemente hidratadas con buffer EDTA 0,1 mM, SO₃HNa 1mH y 2-mercaptoetanol 20mM en tampón Tris/ClH (pH = 7,5), con los complejos ³H-estradiol-receptor. Tras un lavado para eliminar los complejos no unidos, se cuantificó la radiactividad ligada a la cromatina-celulosa (tabla II).

Posteriormente, se determinó el efecto de diferentes agentes caotrópicos sobre la acción desenmascarante de los lugares aceptores de la cromatina para el complejo ³H-estradiol-receptor:

A) Efecto de la extracción con ClNa y ClNa/Urea sobre la composición química de la cromatina y sobre su interacción con los complejos ³H-estradiol-receptor.

Muestras de cromatina-celulosa, después de hidratadas, se extrajeron en una primera etapa con ClNa 2M (pH = 6) con el fin de deshistonizar la cromatina. Una posterior extracción con ClNa 3M + Urea 5M (pH = 7,2) fue realizada para eliminar las proteínas ácidas enmascaradoras.

Una vez extraídas con los agentes caotrópicos anteriormente citados, se procedió a su incubación con el complejo ³H-estradiol-receptor con el objeto de analizar la influencia de la extracción sobre el grado de interacción. Los resultados se muestran en la figura 1, donde puede observarse que tras las extracciones no se observa un incremento de la capacidad aceptora de la cromatina extraída para el complejo ensayado.

La concentración de DNA permaneció estable tras la extracción, lo que demuestra que no hubo pérdidas de cromatina en la fase de extracción.

TABLA II
Interacción de los complejos ^3H -estradiol-receptor con la cromatina de hipófisis de óvulo
 Los valores expresados corresponden a la media de 3 réplicas.

Cromatina empleada	Receptor			Cromatina		
	Tejido	Radiactividad específica (cpm/ng proteína)	Hidratada	Extraída con CHCl ₃ 1M	Extraída con CHCl ₃ 5M	
1-marzo-79 (2,2 μg DNA)	Hipotálamo	$0,84 \times 10^5$	$0,047 \times 10^5$ (0,03)	$0,105 \times 10^5$ (0,12)	$0,26 \times 10^5$ (0,049)	
20-febrero-79 (1,63 μg DNA)	Pituitaria	$1,43 \times 10^5$	$0,18 \times 10^5$ (0,08)	$0,24 \times 10^5$ (0,046)	$0,38 \times 10^5$ (0,105)	
1-marzo-79 (2,2 μg DNA)	Pituitaria	$1,43 \times 10^5$	$0,15 \times 10^5$ (0,09)	$0,25 \times 10^5$ (0,065)	$0,37 \times 10^5$ (0,11)	

Los números entre paréntesis son los valores de la desviación standard.

Se determinó también el contenido en proteínas totales e histonas después de cada extracción (fig. 1).

B) Efecto de la extracción con ClHGu sobre la composición química de la cromatina y su reflejo sobre la interacción con los complejos ^3H -estradiol-receptor.

Al igual que en el caso de la extracción con ClNa y ClNa + Urea, alícuotas de cromatina-celulosa, tras ser hidratadas, se extrajeron con ClHGu 1M y 5M.

A diferencia con el agente caotrópico anterior, la deshistonización fue prácticamente total a la concentración 5M, y el descenso de proteína ácida fue considerablemente mayor.

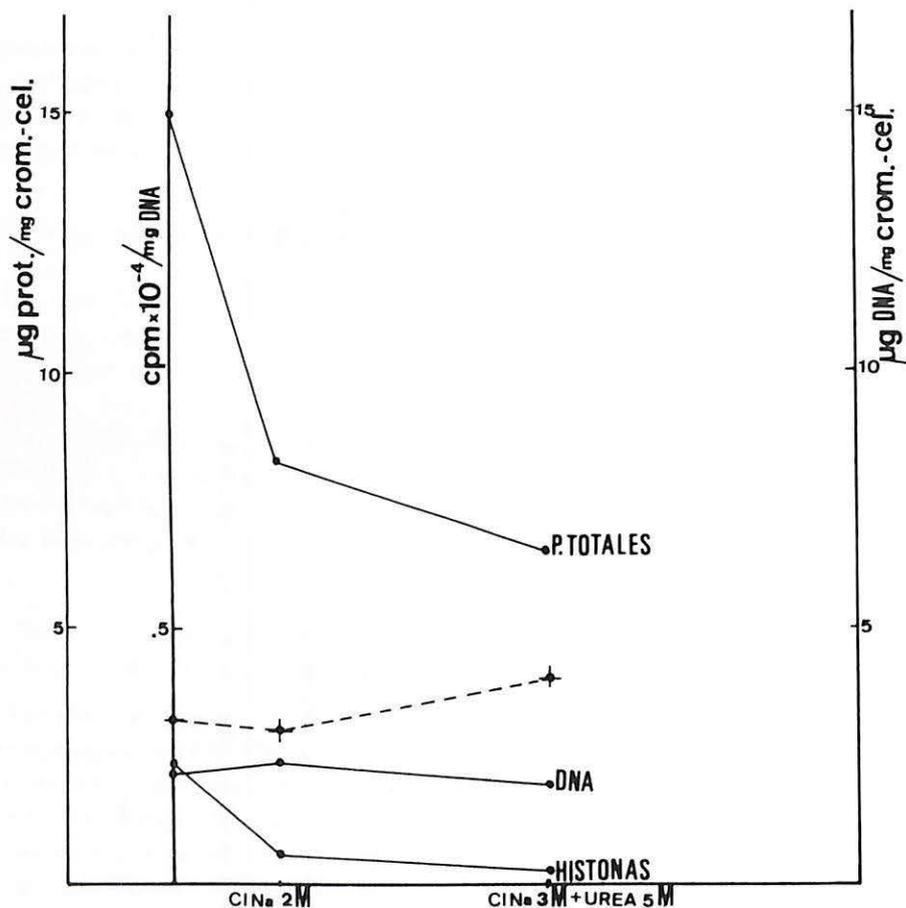


Figura 1.—Efecto de la extracción con ClNa 2M y ClNa 3M + Urea 5M sobre la interacción del receptor estradiol de pituitaria con el complejo cromatina-celulosa de pituitaria de oveja (muestra 30-marzo-79). Muestras de cromatina-celulosa después de hidratadas con el tampón correspondiente, fueron deshistonizadas con ClNa 2M. A otras réplicas después de la extracción con ClNa 2M se las sometió a un desenmascaramiento proteico con ClNa 3M + Urea 5 M.

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.

El reflejo de la composición química de las cromatinas, una vez extraídas sobre la interacción de las mismas con los complejos ^3H -estradiol-receptor se traduce, en este caso, en un incremento considerable del número de complejos retenidos (fig. 2).

En la figura 3 se muestra un histograma representativo de la efectividad del $\text{ClNa}/\text{ClNa} + \text{Urea}$ y ClHGu en el desenmascaramiento de los aceptores nucleares cromatínicos para los complejos ^3H -estradiol-receptor de origen hipotalámico.

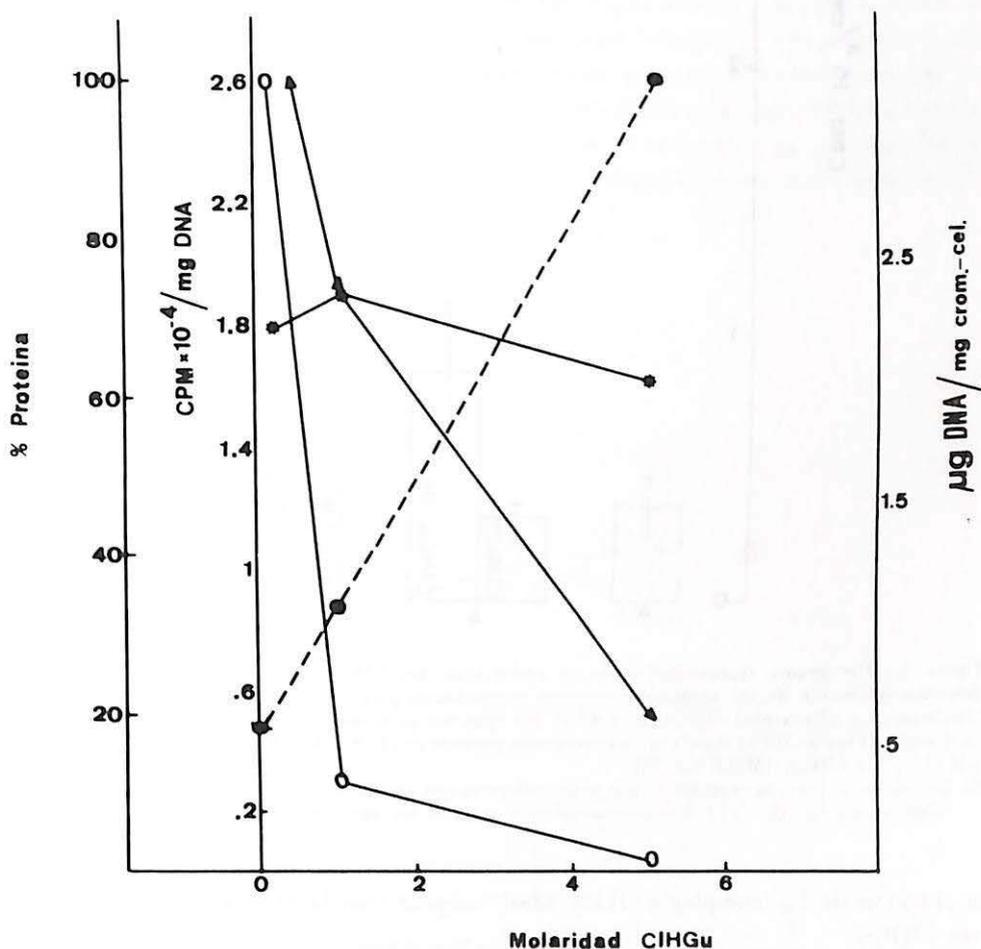


Figura 2.—Interacción del receptor hipotalámico de estradiol con el complejo cromatina-celulosa de pituitaria de carnero (muestra, 1-marzo-79) tratada con ClHGu (●—●). Tres réplicas de 10 mg cada una, después de hidratadas, se extrajeron con distintas molaridades de ClHGu (1M y 5M), a continuación se incubaron con 760 l de ^3H -estradiol-receptor (radiactividad específica: 0.84×10^5 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 1M y 5M.

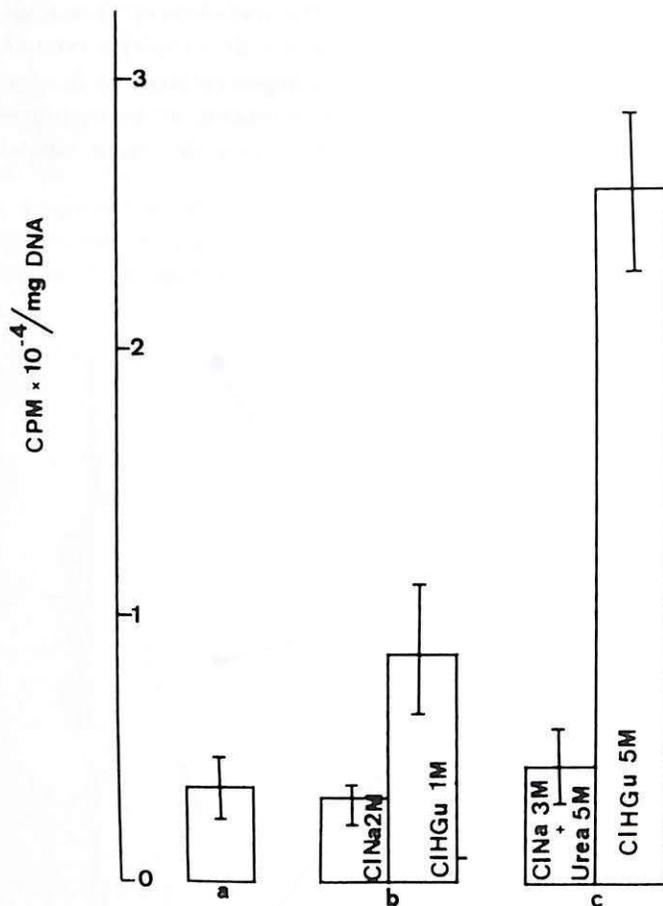


Figura 3.—Histograma representativo de la efectividad del ClNa/ClNa + Urea y ClHGü en el desenmascaramiento de los aceptores nucleares cromatínicos para los complejos ³H-estradiol-receptor hipotalámico (radiactividad específica: $0,84 \times 10^5$ cpm/mg proteína). La muestra (1-marzo-79) se sometió a una extracción paralela con ClNa 2M (pH = 6)/ClNa 3M + Urea 5M (pH = 7,2) y ClHGü 1M/ClHGü 5M. En la figura se expresa la cantidad de hormona radiactiva que permanece ligada tras la hidratación (a), la deshistonización (b), y el desenmascaramiento (c) con los agentes caotrópicos antes citados.

Interacción de los complejos ³H-estradiol-receptor con la cromatina extraída con ClHGü

Una vez conocidas las condiciones más eficaces de desproteización por los agentes caotrópicos ensayados y el efecto de esta extracción de la cromatina sobre la interacción con los complejos ³H-estradiol-receptor, se estudió el carácter saturable de esta interacción.

Para ello se evaluó el número de lugares aceptores para los complejos estradiol-receptor en la cromatina extraída con el clorhidrato de guanidina 5M, es decir,

cromatina en la que se han eluido progresivamente las proteínas cromosómicas enmascaradoras. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.

En la tabla II se muestran los resultados obtenidos a partir de los estudios de interacción de los complejos ^3H -estradiol-receptor con diferentes cromatinas extraídas con CHGu a diferentes concentraciones.

DISCUSION

Los resultados obtenidos a través de los experimentos realizados sobre la interacción del complejo estradiol-receptor de origen hipofisario e hipotalámico con la cromatina de pituitaria de ovejas y carneros de aproximadamente seis meses de edad preparadas por nosotros, confirman las conclusiones a las que han llegado otros autores empleando sistemas de ensayo «in vitro» semejante al nuestro. Estos investigadores^{6, 19, 20} responsabilizan, de manera preponderante, a la composición

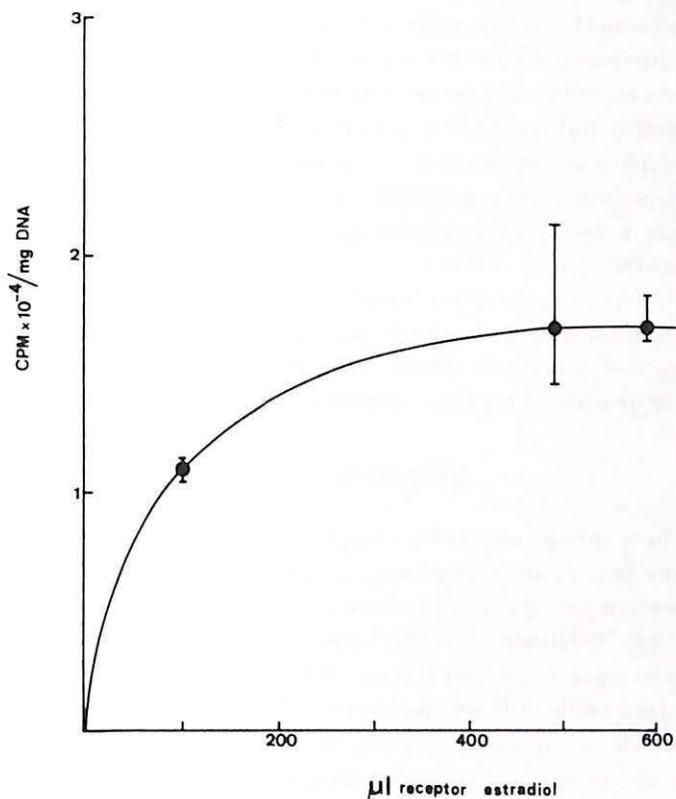


Figura 4.—Curva de saturación de la interacción entre el complejo ^3H -estradiol-receptor obtenido de pituitaria de óvulo con la cromatina del mismo origen.

Muestras de cromatina celulosa (hembras, 20-febrero-79) se hidrataron con el tampón correspondiente y se extrajeron: primero con CHGu 1M y después con CHGu 5M. Las muestras extraídas se incubaron con el complejo ^3H -estradiol-receptor (radiactividad específica $1,43 \times 10^5$ cpm/mg proteína).

Posteriormente se cuantificó la radiactividad ligada.

química de la cromatina en lo que a su capacidad de interacción con los complejos estradiol-receptor se refiere.

En el sistema libre de células empleado por nosotros, se han utilizado como agentes caotrópicos: ClNa y mezclas de ClNa/Urea, y por otra parte, clorhidrato de guanidina. Los resultados, referidos al número de complejos unidos a la cromatina una vez desenmascarada por los agentes de extracción antes citados son superiores en el caso del clorhidrato de guanidina. Estos resultados son opuestos a los obtenidos por PERRY y LÓPEZ (1978) trabajando con cromatinas de hipotálamos de óvidos que encuentran mayor eficacia, en lo que a su capacidad desproteinizante se refiere, en el ClNa y ClNa + Urea que en el ClHG_u. Sin embargo, sí son coincidentes con los de otros autores (SPELSBERG y col., 1976; LEVY y col., 1972).

Los valores obtenidos por nosotros, en lo que a radiactividad específica se refiere para el complejo estradiol-receptor, son similares a las presentadas por PERRY y LÓPEZ (1978) con cromatinas de óvidos y diez veces superiores a los obtenidos por VENTANAS (1982) con cromatinas de hipotálamos de ratones de siete días, atribuyéndose esta diferencia al estado inmaduro de los ratones empleados, dado que es un hecho bien conocido que el número disponible de receptores cambia con la edad y el estado fisiológico (WEBSTER y col., 1976)²³.

En lo que sí hay acuerdo unánime entre la mayoría de los investigadores en este campo, y que nuestro trabajo viene a corroborarlo, es en responsabilizar de la interacción del complejo estradiol-receptor con los aceptores de la cromatina, a una determinada fracción de proteínas cromosómicas (fracción AP₃) y que corresponden a aquellas proteínas de bajo peso molecular que permanecen tras la extracción con ClHG_u 5M (SPELSBERG y col., 1976)¹⁴.

El máximo de interacción entre los complejos estradiol-receptor y los aceptores de la cromatina, coincide con la elución de histonas y proteínas ácidas enmascaradoras (AP₁ y AP₂). Este proceso de interacción presenta carácter saturable como se demuestra en la representación gráfica al obtenerse una curva asintótica.

RESUMEN

Se ha estudiado la interacción de los complejos ³H-estradiol-receptor de origen hipofisario e hipotalámico con la cromatina de hipófisis de ovejas y carneros.

La desproteinización parcial con clorhidrato de Guanidina (ClHG_u) incrementa el número de complejos ³H-estradiol-receptor retenidos por la cromatina. El número máximo de complejos unidos a la cromatina se obtiene cuando la deshisonización es total y sólo permanece unido al DNA una fracción de proteínas ácidas (AP₃) a la que se le responsabiliza de la capacidad aceptora de la cromatina.

La interacción del complejo ³H-estradiol-receptor con la cromatina desproteinizada fue saturable.

SUMMARY

We have studied the binding of ³H-estradiol-receptor complexes from pituitary

and hypothalamus to pituitary chromatin of male and female sheep. Binding increased when the acceptor sites are unmasked with guanidine hydrochloride.

The higher binding was obtained after removal of histones and masking acidic proteins. The binding of ^3H -labelled oestradiol-receptor to unmasked chromatin was saturable.

BIBLIOGRAFIA

- 1) LIAO, S., y FANG, S. (1969).—*Vit. Horm. (N.Y.)*, **27**, 18-91.
- 2) O'MALLEY, B. W., y MEANS, A. R. (1974).—Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science*, **183**, 610-620.
- 3) GORSKI, J., y GANNON, F. (1976).—Current models of steroid hormone action: a critique. *Annu. Rev. Physiol.*, **38**, 425-450.
- 4) SPELSBERG, T. C.; THRALL, C.; MARTIN-DAMI, G.; WEBSTER, R. A., y BOYD, P. A. (1979).—Ontogeny of Receptors and reproductive hormone action (HAMILTON, T. H.; CLARCK, J. H., and SADLER, W. A. eds.), 31-63, Raven Press, New York.
- 5) KUYZEJKO-STEFANOWICZ, L.; CHU, J.; TSAY, Y., y HNILICA, L. S. (1976).—Acceptor proteins in rat androgenic tissue chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1954-1958.
- 6) PERRY, B., y LÓPEZ, A. (1978).—The binding of ^3H -labelled oestradiol-and-progesterone-receptor complexes to hypothalamic chromatin of male and female sheep. *Biochem. J.*, **176**, 873-883.
- 7) TAYLOR, R. N.; SWANECK, G. E., y SMITH, R. G. (1980).—Correlation of nuclear acceptor sites for oestrogen receptors with gene transcription in vitro. *Biochem. J.*, **192**, 385-393.
- 8) TSAI, Y.; SANBORN, B. M.; STEINBERGER, A., y STEINBERGER, E. (1980).—Sertoli cell chromatin acceptor sites for androgen-receptor complexes. *J. Steroid Biochem.*, **13**, 711-718.
- 9) RUI, T. S.; ROSS, P., Jr.; WOOD, D. M., y KEENE, J. L. (1981,a).—The binding of ^3H -oestradiol-receptor complexes to calf uterine chromatin. *Biochem. J.*, **200**, 133-142.
- 10) RUI, T. S.; WOOD, D. M.; ROSS, P., Jr., y KEENE, J. L. (1981,b).—In Non-Steroidal Antioestrogens: Molecular Pharmacology and Antitumour Activity (SUTHERLAND, R. L., and JORDAN, V. C., eds.), 231-248, Academic Press, London.
- 11) LITMAN, R. M. (1968).—A deoxyribonucleic acid polymerase from *Micrococcus luteus* (*Micrococcus lysodeikticus*) isolated on deoxyribonucleic acid-celulose. *J. Biol. Chem.*, **243**, 23.
- 12) FERNÁNDEZ, M. A. (1984).—Contribución al estudio de la interacción de los complejos ^3H -estradiol-receptor, ^3H -progesterona-receptor y ^3H -testosterona-receptor con la cromatina de la hipófisis de ovejas y carneros. *Tesis Doctoral. Fac. Vet. León*.
- 13) MARSHIGE, K., y BONNER, J. (1966).—*J. Mol. Biol.*, **15**, 160-174.
- 14) SPELSBERG, T. C.; WEBSTER, R. A.; PIKLER, G. M.; THRALL, C., y WELLS, D. (1976).—Role of nuclear proteins as high affinity sites («acceptors») for progesterone in then avian oviduct. *J. Steroid Biochem.*, **7**, n.º 11/12, 1091-1101.
- 15) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., y RANDALL, R. J. (1951).—Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 16) GILES, K. W., y MYERS, A. (1965).—An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature (London)*, **206**, 93.
- 17) BURTON, K. (1956).—A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, **62**, 315-323.
- 18) BENSADOUN, A., y WEINSTEIN, D. (1976).—Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, **70**, 241-250.
- 19) RUI, T. S., y SPELSBERG, T. C. (1983).—Acceptor sites for the oestrogen receptor in hen oviduct chromatin. *Biochem. J.*, **210**, 905-912.
- 20) VENANAS, J. (1982).—Contribución al estudio del papel desempeñado por el estradiol y la testosterona en la diferenciación sexual en tejidos «blanco» de ratón y rata. *Tesis Doctoral. Fac. Vet. León*.
- 21) LEVY, S.; SIMPSON, R. T., y SOBER, H. A. (1972).—*Biochemistry*, **11**, 1547-1554.
- 22) WEBSTER, R. A.; PIKLER, G. M., and SPELSBERG, T. C. (1976).—Role of acidic chromatin proteins in high-affinity binding. *Biochem. J.*, **156**, 409-418.