

RESUMEN

Post-fecundación el núcleo masculino sufre una descondensación de su cromatina. Esta reestructuración involucra un recambio de las proteínas histónicas que la conforman, produciéndose una pérdida de las histonas espermatozoide específicas (SpH) y su reemplazo por variantes de histonas CS de origen materno. En un estado intermedio de la remodelación del pronúcleo masculino de erizo de mar *Tetrapygus niger* se reportó la presencia de partículas nucleoproteicas híbridas, conformadas por sets incompletos de proteínas SpH y de variantes CS de origen materno. Sin embargo, no se conocía exactamente cómo se produce este recambio ni la composición de los nucleosomas de la cromatina espermática parcialmente remodelada. En consecuencia, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral fue definir la naturaleza bioquímica de las nucleopartículas de composición mixta y poder postular un modelo de cómo ocurriría este recambio de proteínas histónicas.

Con este propósito, nucleopartículas derivadas de la digestión de núcleos de cigotos en un estado intermedio de la remodelación, con nucleasa micrococcal, fueron fraccionadas en un gradiente continuo de sacarosa. Los nucleosomas de origen paterno fueron separados por inmunoabsorción con Sefarosa 4B unida a anticuerpos policlonales anti SpH y las proteínas contenidas en ellos analizadas por Western blot. Los resultados obtenidos demuestran que en un estado intermedio de la remodelación del pronúcleo masculino, los nucleosomas paternos están conformados por las SpH2A, SpH2B y dos fracciones mayoritarias de variantes CS, interactuando con un fragmento de ADN de aproximadamente 100 pb. Estos resultados permiten postular que la pérdida del

tetrámero SpH H3-H4 ocurre simultáneamente con la adquisición de las variantes CS maternas, que vienen en su reemplazo para conformar el core nucleosomal de composición mixta. Además, se determinó que en este estado intermedio de la remodelación de la cromatina espermática, las variantes CS que conforman los nucleosomas híbridos se encuentran poliADPribosiladas y postulamos que la SpH2B se encontraría en su forma fosforilada.

Una vez concluida la remodelación del pronúcleo masculino ocurre la fusión de ambos pronúcleos, fenómeno denominado amfimixis. Las SpH han desaparecido y la cromatina está conformada sólo por las variantes CS, en lo que a proteínas básicas se refiere. Esta estructuración persiste durante las tres primeras etapas de segmentación del embrión. Luego dos grupos de genes para histonas son secuencialmente expresados durante el desarrollo embrionario: las variantes de histonas tempranas hasta la eclosión de las larvas y, posteriormente, las variantes de histonas tardías. Las variantes CS persisten en la cromatina hasta estados tardíos del desarrollo, sin embargo, se desconoce su distribución espacial y temporal. Consecuentemente, el segundo objetivo planteado en esta Tesis Doctoral fue determinar la localización de las variantes CS en los distintos territorios embrionarios del erizo de mar y determinar si esta distribución se relaciona con el ADN con el cual fueron expresadas en los primeros ciclos replicativos.

Con el fin de definir el destino de las variantes CS, se realizó la inmunodetección en larvas plutei observándose que estas variantes se localizan en territorios específicos de la larva. Paralelamente se marcó el ADN replicado *in vivo* durante la segunda fase S, concordante con la expresión de las variantes CS, con bromodeoxiuridina (BrdU). Este

ADN fue posteriormente inmunolocalizado en territorios específicos de la larva plutei. Al confrontar esta localización con la obtenida para las variantes CS por doble marcaje y por microscopía confocal se constató que ambas señales colocalizan, es decir, que la segregación de las variantes CS a territorios definidos de la larva pluteus se realiza asociada al ADN replicado en su presencia. Consecuentemente, se postula que la segregación de las variantes CS a territorios específicos del embrión constituye una señal temprana de diferenciación.

Por otra parte, estas variantes CS se encuentran poliADPribosiladas y se ha descrito que esta modificación post-traducciona es ciclo celular dependiente y su inhibición se correlaciona con el alargamiento de las fases de replicación del ADN. Por ello se planteó como tercer objetivo de esta Tesis Doctoral estudiar el efecto directo de la inhibición de la poliADPribosilación sobre la replicación durante los primeros ciclos replicativos. Los resultados demuestran que el efecto de la inhibición de la poliADPribosilación post-fecundación es un enlentecimiento real de las fases replicativas y no el bloqueo de la replicación. Adicionalmente, se estudió el efecto de esta inhibición en otra especie de erizo de mar *Sphaerichinus granularis*. Los resultados obtenidos indican que el efecto de la inhibición de la poliADPribosilación es un efecto directo sobre el proceso de replicación y que desacoplaría este proceso de los eventos de citoquinesis, sin alterar la distribución de tubulina.