

TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

*Proteïnes que estructurèn i remodelen
la cromatina espermàtica.
Alguns casos especials*

Novembre, 1999

Fig.III.A.26. Espermàtida molt avançada del tipus VIb. A- Presència de gotes d'aparença lipídica (g.l) en la zona de destrucció i dissolució dels microtúbuls i complex periacrosomal. B- Detall de dues gotes lipídiques (GL) envoltades del material desorganitzat (fletxes).

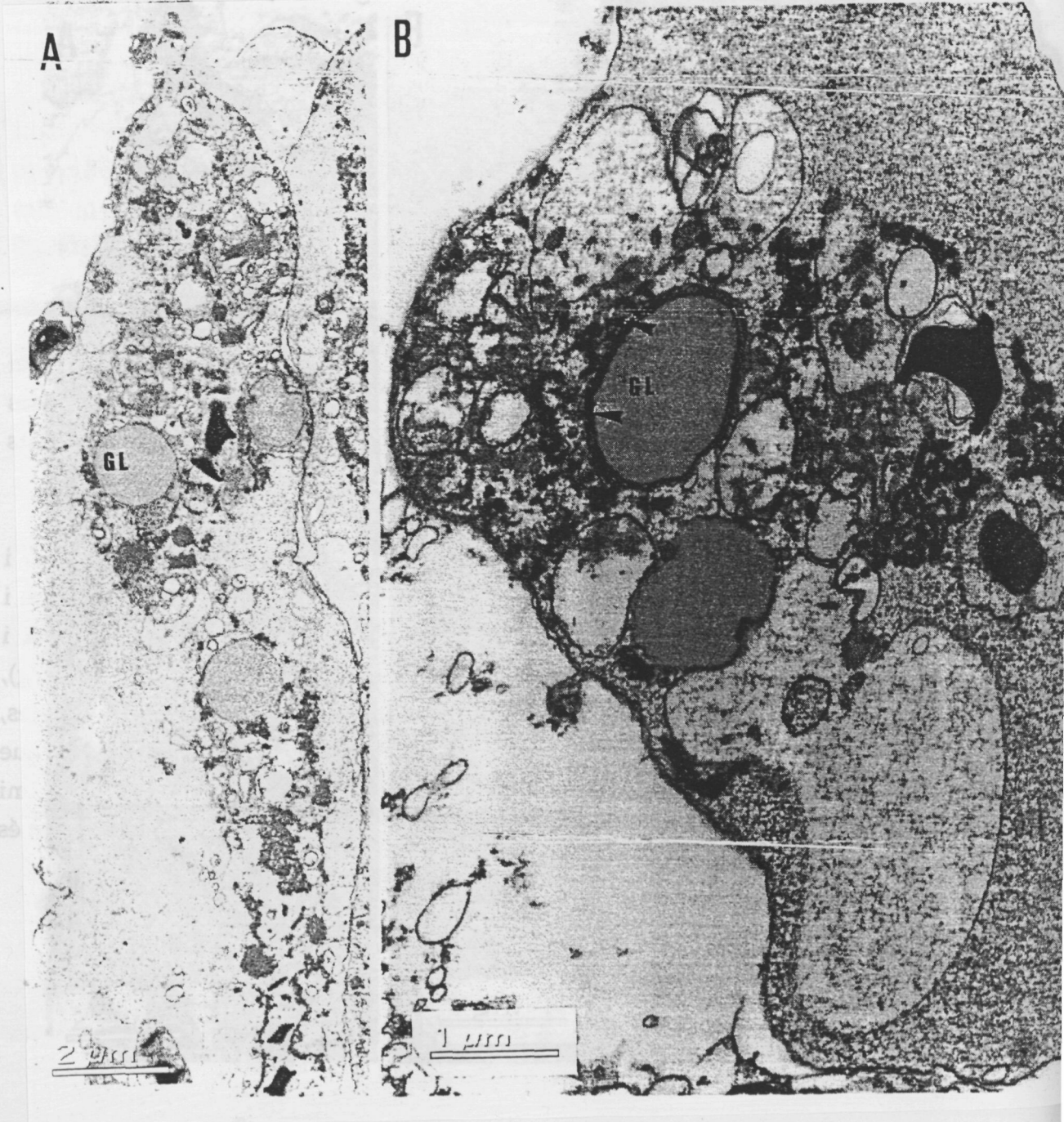
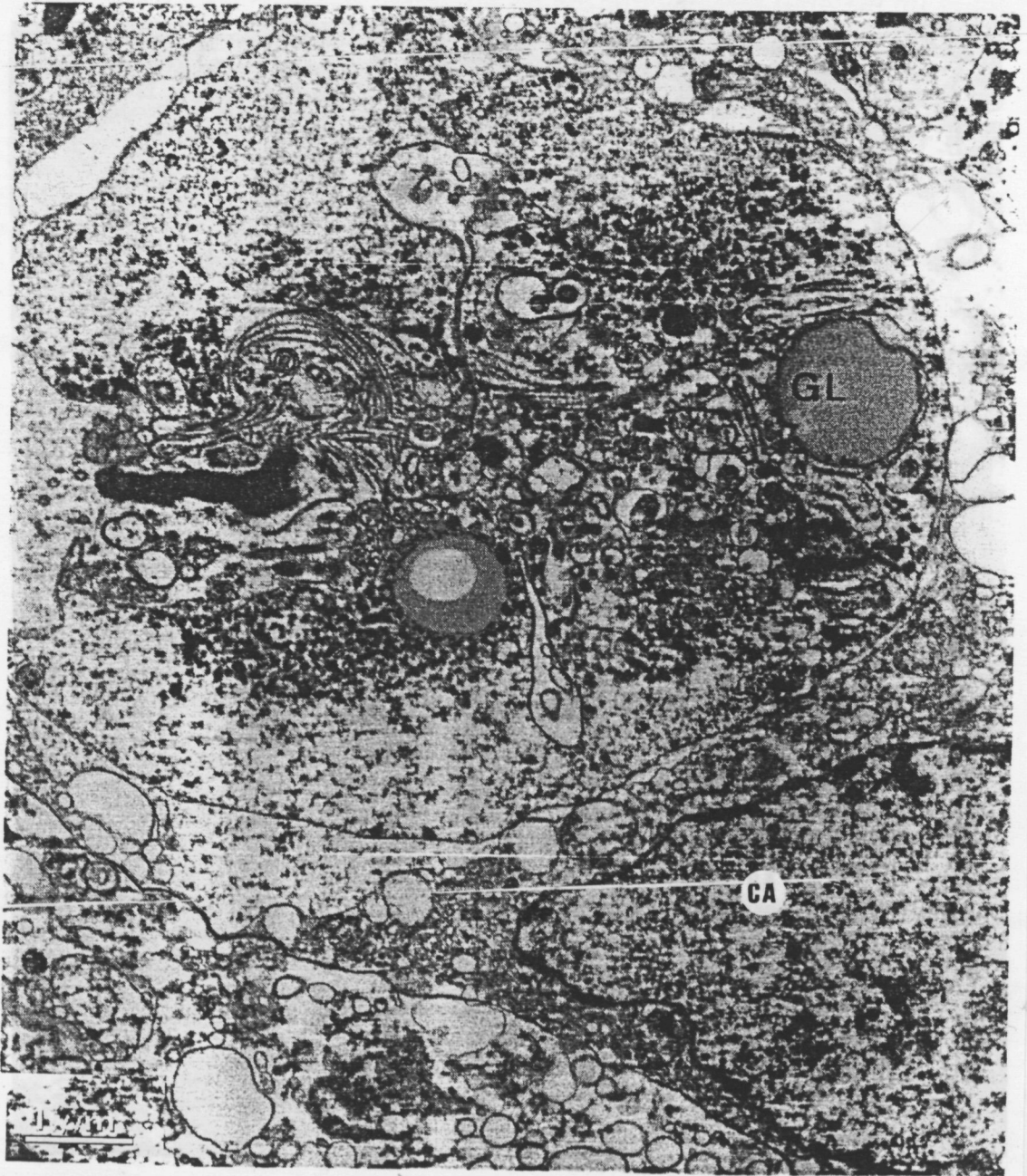
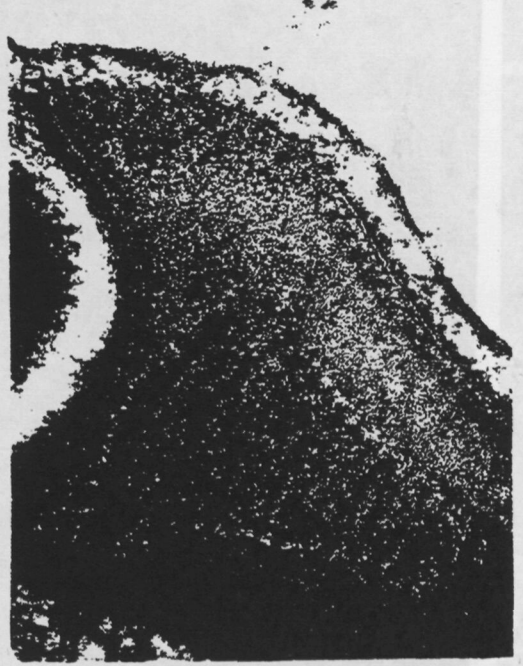


Fig.III.A.27. Possible procés d'englobació dels citoplasmes residuals de les espermàtides tipus VIb per les cèl.lules acompanyants. CA- nucli cèl.lula acompanyant; GL- gotes lipídiques envoltades de material desorganitzat.



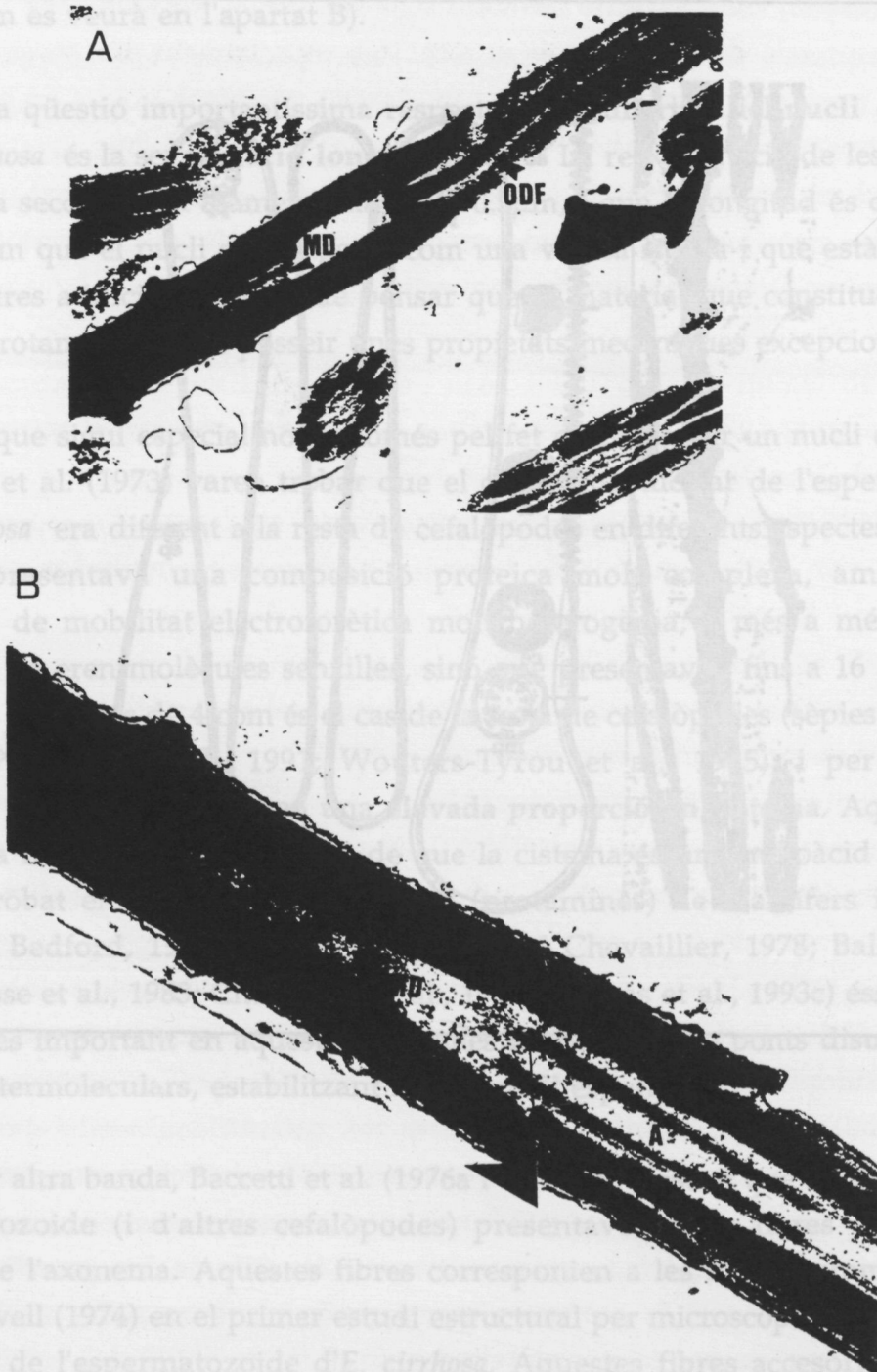
A la Fig.III.A.29 es veu que el material que penetra a la base del nucli, en la invaginació **nuclear**, no està del tot desorganitzat; en aquesta figura es mostren detalls de les **ODF's** (fibres denses, que igual que als mamífers, envolten l'axonema, i de les quals es parlarà amb més detall en el proper apartat), i també l'origen dels microtúbuls que donaran lloc a l'axonema. Aquesta invaginació conté un material semielectrodens no totalment desorganitzat i que podria ser un remanent, també trobat en altres cefalòpodes, del centriol proximal que s'ha perdut.

Fig.III.A.28. Acrosoma del nucli espermàtic madur. En A s'aprecia les 3 voltes d'espiral que experimenta l'acrosoma, i en B, un detall de l'estructura cònica present en la base de l'acrosoma. A- 20.000x; B- 100.000x.



2. Caracterització química de les cisteïnes de l'espermatozoide

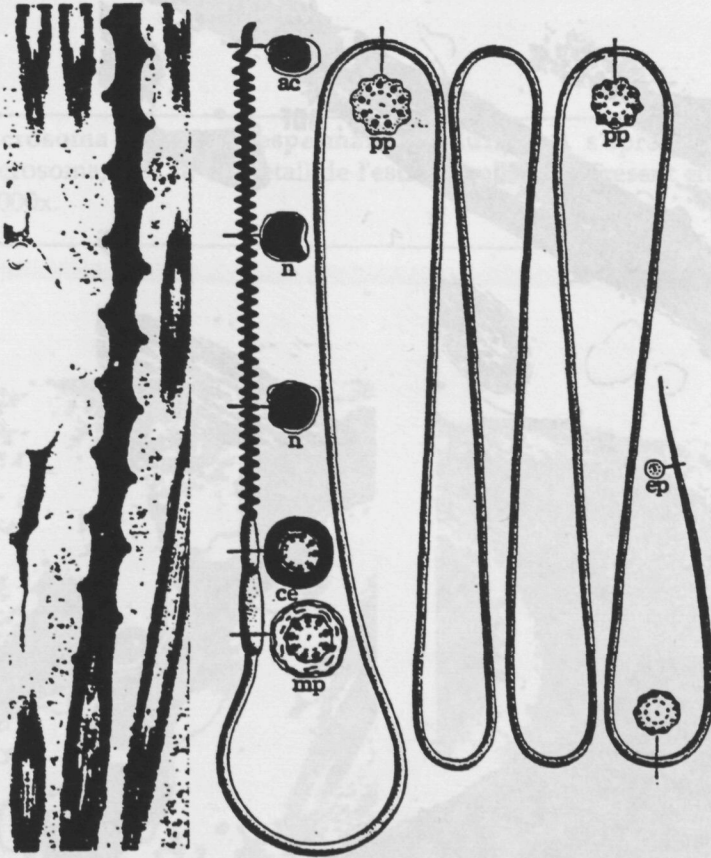
Fig.III.A.29. Base del nucli de l'espermatozoide madur. A- Invaginació nuclear: material dens (MD), fibres denses (ODF's). B- Detall de la invaginació nuclear; axonema (A). A- 20.000x; B- 40.000x.



Per altra banda, Bacchetti et al (1976) han estudiat les propietats d'aquest axonema de l'espermatozoide (i d'altres cefalòpodes) presentant una estructura similar a les fibres esòries al voltant de l'axonema. Aquestes fibres corresponien a les fibres esòries descrites per Maxwell (1974) en el primer estudi estructural per microscòpia electrònica que es va fer de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa*. Aquestes fibres accionades també es troben molt desenvolupades en els espermatozoides dels mamífers, on

La Fig.III.A.30 mostra una representació esquemàtica del que seria l'espermatozoide d'*Eledone cirrhosa* sencer, segons Maxwell (1974).

Fig.III.A.30. Representació esquemàtica de l'espermatozoide madur al complet, segons Maxwell, 1974. ac- acrosoma, n- nucli, ce- centriol, mp- peça mitja, pp- peça principal, ep- peça final.



2. Caracterització química de les cisteïnes de l'espermatozoide

Tal i com s'ha vist en l'apartat de l'espermioogènesi, l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* resulta ser un cas especial, i especialment complexe dintre dels cefalòpodes, i també dins de l'ordre dels octòpodes, com s'ha pogut observar al comparar certs aspectes de la seva espermioogènesi amb la d'*Octopus vulgaris*, (i també com es veurà en l'apartat B).

Una qüestió importantíssima respecte la peculiaritat del nucli espermàtic en *E. cirrhosa* és la seva **relació longitud/secció**. La reexaminació de les mides ens diu que la secció té un diàmetre major de $0.5\mu\text{m}$, i que la longitud és de $42\mu\text{m}$. Si considerem que el nucli es comporta com una vareta rígida i que està desposseït d'estructures addicionals, hem de pensar que el material que constitueix el nucli (la nucliprotamina) ha de posseir unes propietats mecàniques excepcionals.

El que sigui especial no és només pel fet de presentar un nucli espiralitzat. Subirana et al. (1973) varen trobar que el contingut nuclear de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* era diferent a la resta de cefalòpodes en diferents aspectes: el primer és que presentava una composició proteica molt complexa, amb diverses proteïnes de mobilitat electroforètica molt heterogènia; a més a més, aquestes proteïnes no eren molècules senzilles, sinó que presentaven fins a 16 aminoàcids diferents, en comptes de 4 com és el cas de la resta de cefalòpodes (sèpies i calamars) (Martin-Ponthieu et al., 1991; Wouters-Tyrou et al., 1995); i per últim, les proteïnes nuclears presentaven una elevada proporció en cisteïna. Aquest darrer fet resulta molt interessant pel fet de que la cisteïna és un aminoàcid que només s'havia trobat en les proteïnes nuclears (protamines) de mamífers i condrictis (Calvin i Bedford, 1971; Calvin, 1975; Gusse i Chevaillier, 1978; Balhorn, 1982, 1989; Gusse et al., 1983; Chevaillier et al., 1987; Saperas et al., 1993c) ésent la seva funció més important en aquestes proteïnes la formació de ponts disulfur (cys-S-S-cys-) intermoleculars, estabilitzant així el nucli espermàtic.

Per altra banda, Baccetti et al. (1976a i b) varen mostrar que les cues d'aquest espermatozoide (i d'altres cefalòpodes) presentaven unes fibres accesorïes al voltant de l'axonema. Aquestes fibres corresponien a les fibres gamma descrites per Maxwell (1974) en el primer estudi estructural per microscòpia electrònica que es va fer de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa*. Aquestes fibres accesorïes també es troben molt desenvolupades en els espermatozoides dels mamífers, on

s'anomenen ODF's (*outer dense fibers*, fibres denses) (Fawcett, 1975), i es poden veure a la Fig.III.A.29. Baccetti et al. (1976a i b) també varen mostrar que les ODF's d'*E. cirrhosa* presentaven proteïnes bàsiques molt riques en cisteïna, que curiosament compartien moltes semblances en quant a la composició aminoacídica amb les proteïnes nuclears descrites per Subirana et al. (1973).

Agafant els estudis esmentats en bloc, sembla ser doncs que l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* és una cèl.lula especialment rica en cisteïna. Degut al fet de que en cap cefalòpode s'havia descrit proteïnes riques en cisteïna en el nucli espermàtic, i també a l'importància funcional que presenta aquest aminoàcid, en aquest capítol ens dediquem a estudiar el **contingut, distribució i estat de les cisteïnes** (si es troben formant ponts disulfur, o bé presenten els grups tiol lliures) en l'espermatozoide d'aquesta espècie.

a. *Composició de les proteïnes totals de l'espermatozoide*

Per obtenir espermatozoides es va partir d'epidídims i/o espermatozòfors, els quals es van agitar enfront de tampó A1, que conté inhibidor proteolític, de manera que les cèl.lules espermàtiques s'anaven desprenent.

En primer lloc vàrem fer un experiment per veure quina era la proporció de proteïnes que aconseguíem extreure sense la necessitat de reduir. Es va partir d'una mostra rica en espermatozoides i es van fer dues alíqüotes; una de les alíqüotes es va extreure amb HCl 0.4N, i el sobrenadant amb les proteïnes solubilitzades es va quantificar pel mètode de Bradford. El sediment resultant d'aquesta extracció es va reduir amb β -mercaptoetanol (segons el mètode explicat a II.B.5.a), es va alquilar amb β -bromoetilamina, i es va extreure amb HCl 0.4N. El sobrenadant resultant, després d'haver estat dialitzat enfront d'HCl 0.25N (clorhídric que dóna un punt d'acidesa permetent que les proteïnes que s'estan dialitzant es mantinguin solubles), es va quantificar també pel mètode de Bradford. D'aquesta manera estem quantificant les proteïnes que s'extreuen sense necessitat de reducció i les proteïnes que necessiten ser reduïdes per la seva extracció. El resultat va ser que, només un 3% de les proteïnes totals de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* s'aconseguien extreure sense necessitat de ser reduïdes, mentre que es necessita reducció química per poder solubilitzar el 97% restant. Aquestes dades es confirmen quan es duu a terme el mateix experiment

però fent la primera extracció amb SDS al 0.02% (detergent que solubilitza proteïnes i DNA): els resultats són els mateixos, el 97% de les proteïnes totals necessita de la reducció del nucli per poder ser extretes. És interessant insistir en la gran desproporció entre les proteïnes que es poden solubilitzar directament (3%) i les que només es solubilitzen quan es redueix la mostra (97%).

Així doncs, per a poder extreure totes les proteïnes de l'espermatozoide, aquests varen ser incubats amb l'agent reductor, β -mercaptoetanol, i posteriorment, per evitar de nou l'oxidació de les Cys, es va procedir a l'alquilació dels grups tiols amb β -bromoetilamina. En altres ocasions, la reducció es feia amb DTT i l'alquilació amb iodacetamida (v. II.B.5.b). En qualsevol dels casos, tant si s'aminoetilava (amb β -bromoetilamina) com si es carboximetilava (amb iodacetamida), es procedia a la posterior extracció. Les proteïnes es van extreure amb HCl 0.4N. Degut a que ara les proteïnes es troben solubilitzades en un medi que no només conté HCl sinó també urea i EDTA (provinents de la solució reductora), les proteïnes no es van precipitar amb acetona ja que d'aquesta manera ens podia precipitar parcialment també la urea o qualsevol altre compost. De manera que es va fer una diàlisi extensiva enfront de HCl 5mM, i posteriorment les proteïnes es liofilitzaren .

Un cop es té la fracció proteica espermàtica global, es determina el contingut aminoacídic fent una hidròlisi de les proteïnes i posterior identificació dels aminoàcids alliberats. La Taula III.A.I mostra la mitja entre 5 diferents anàlisis composicionals dels extractes (on les proteïnes s'han aminoetilad o carboximetilat indistintament): la Pro (24.3%) i la Cys (19.6%) es troben en quantitats unusualment elevades, i en conjunt representen més del 43% dels residus aminoacídics globals. És interessant comparar aquesta composició amb la freqüència en que els diferents tipus d'aminoàcids apareixen en les proteïnes. Les proteïnes de tots els éssers vius presenten una distribució similar dels aminoàcids (Doolittle, 1986). La Taula III.A.I mostra també l'estimació de Doolittle sobre les proporcions d'aminoàcids en les proteïnes, recollides de 300,000 residus aminoacídics, en la qual la cisteïna és un dels aminoàcids que apareix en menor proporció. El fet de que l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* sigui tant ric en Pro i Cys indicaria, doncs, que aquesta cèl.lula presenta una gran especialització.

Es van fer GPTU (gel de poliacrilamida/tritó/urea) tant de proteïnes aminoetilades, reduïdes i carboximetilades, com de les proteïnes

carboximetilades, reduïdes i aminoetilades (no mostrat), i es va veure com la mobilitat electroforètica variava d'un cas respecte a l'altre. Les proteïnes aminoetilades adquireixen més càrregues positives que les carboximetilades, degut a l'addició d'un grup amino (v. Fig.II.B.8), de manera que en un GPTU (i el mateix en un GPAU (gel de poliacrilamida/acètic/urea)) migren més que no pas les proteïnes carboximetilades.

Taula III.A.I Composició aminoacídica de les proteïnes espermàtiques totals d'*E. cirrhosa* (donada en percentatges, mols %) i proporcions dels aminoàcids presents en les proteïnes de tots els éssers vius (tret de Doolittle, 1986)

	<i>E. cirrhosa</i>	prot. éssers vius
Lys	5.4 ± 1.0	5.9
His	7.4 ± 0.5	2.3
Arg	4.5 ± 0.5	5.1
Asx	2.4 ± 0.4	4.3
Thr	4.1 ± 0.1	5.9
Ser	3.7 ± 0.7	6.8
Glx	5.1 ± 0.8	7.2
Pro	24.3 ± 5.1	5.2
Gly	5.7 ± 0.7	7.2
Ala	4.3 ± 0.5	7.7
Cys	19.6 ± 0.9	1.9
Val	4.0 ± 0.4	6.6
Met	0.8 ± 0.0	2.2
Ile	3.5 ± 0.9	5.2
Leu	3.2 ± 0.8	9.1
Tyr	1.6 ± 0.4	3.2
Phe	1.0 ± 0.2	3.8

b. Localització cel·lular de les proteïnes riques en cisteïna

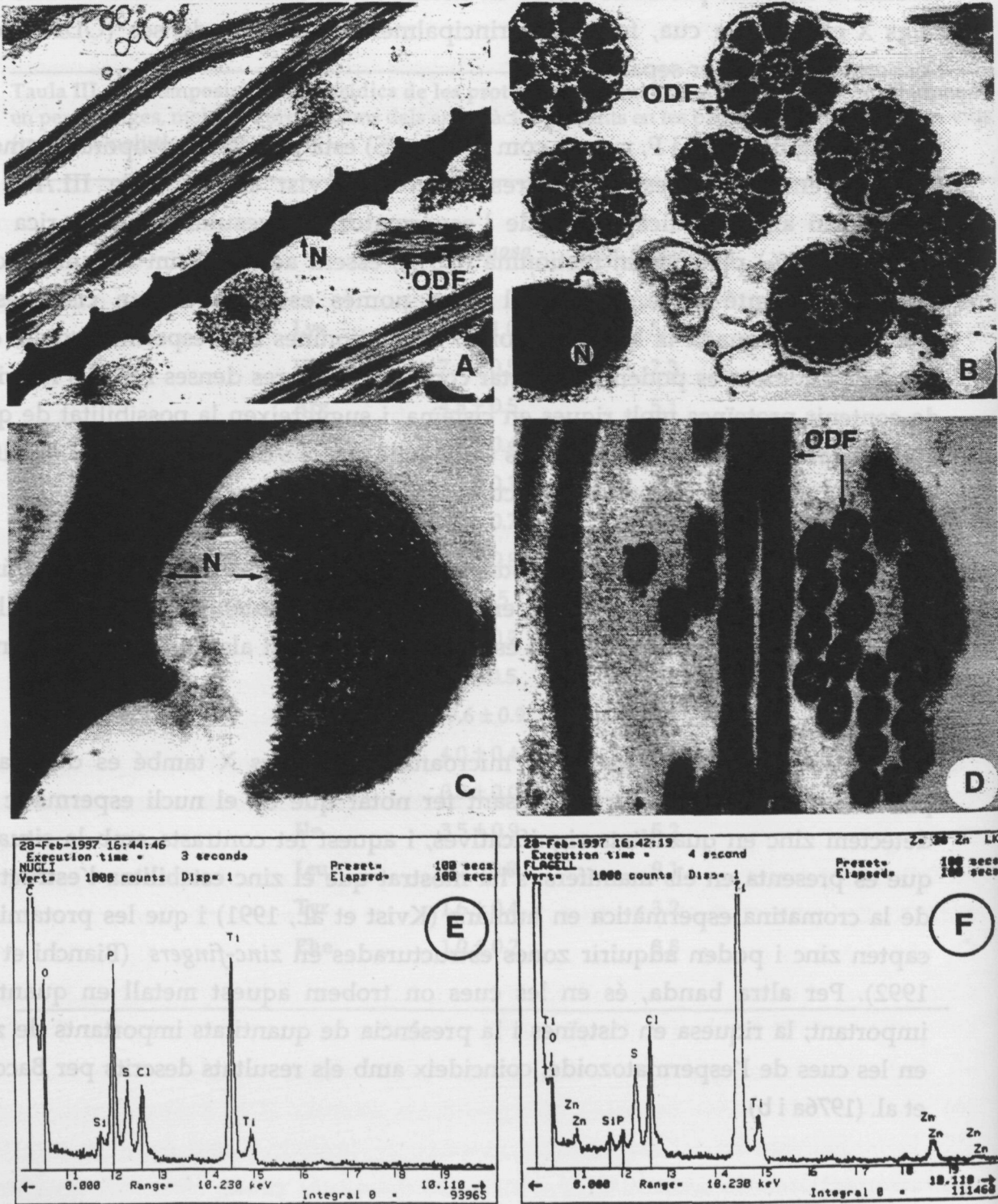
Com hem vist fins al moment, per extreure les proteïnes espermàtiques és necessari reduir l'espermatozoide degut a l'elevada presència de proteïnes riques en cisteïna que formen ponts disulfur. Com assaig indicatiu de la localització cel·lular d'aquestes proteïnes riques en cisteïna, hem sotmès a la **microanàlisi de raigs X** el cap i la cua, formada principalment per fibres denses (ODF's), de l'espermatozoide, per separat.

La Fig.III.A.31E i F, mostra com el sofre (S) està present en proporcions molt elevades en totes dues estructures. Com hem vist en la Taula III.A.I, la composició aminoacídica global de l'espermatozoide resulta ser molt rica en cisteïna (19.6%) però no en metionina (0.8%), éssent aquest últim un aminoàcid que també conté sofre. Ja que el sofre només està present en cisteïnes i metionines, i donada la baixa proporció de metionines en l'espermatozoide, els resultats anteriors es poden interpretar com que les fibres denses i nuclis haurien de contenir proteïnes molt riques en cisteïna, i suggereixen la possibilitat de que l'estabilitat de totes dues estructures és deguda a que s'estableixen ponts disulfur entre les cisteïnes de diferents molècules.

Diferent a la resta de cefalòpodes coneguts, *E. cirrhosa* destaca per ser l'únic espermatozoide amb un nucli ric en proteïnes que contenen cisteïna. Un altre component que destaca en el nucli és el fòsfor (P), degut als fosfats presents en el DNA.

Mitjançant la tècnica de la microanàlisi de raigs X també es detecta la presència de zinc (Zn). És interessant fer notar que en el nucli espermàtic no detectem zinc en quantitats significatives, i aquest fet contrasta amb la situació que es presenta en els mamífers: s'ha mostrat que el zinc estabilitza l'estructura de la cromatina espermàtica en humans (Kvist et al., 1991) i que les protamines capten zinc i poden adquirir zones estructurades en *zinc-fingers* (Bianchi et al., 1992). Per altra banda, és en les cues on trobem aquest metall en quantitat important; la riquesa en cisteïnes i la presència de quantitats importants de zinc en les cues de l'espermatozoide, coincideix amb els resultats descrits per Baccetti et al. (1976a i b).

Fig.III.A.31. A i B.- Seccions d'espermatozoides d'*E. cirrhosa* mostrant les estructures majoritàries: N- nucli, ODF's- fibres denses; C i D.- Seccions d'espermatozoides després de ser **homogeneïtzats amb SDS**: la cèl.lula es desestructura o es dissol, excepte els nuclis (C) i les ODF's (D). Augments: A- 14,000x; B- 40,000x; C- 50,000x; D- 50,000x; E i F.- **Microanàlisi de raigs X** per detectar la presència de S, P i Zn en nuclis (E) i ODF's (F). La quantitat de S és en tots dos casos molt elevada.



c. Estabilitat de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa*

Per demostrar l'estabilitat que presenta l'espermatozoide d'aquest cefalòpode, aquest es va tractar amb SDS, detergent que és molt competent en solubilitzar proteïnes i DNA, i es va observar al microscopi electrònic de transmissió el que li ocorria.

A partir d'espermatòfors es va obtenir una mostra rica en espermatozoides, i aquests es van fixar, deshidratar i incloure en reïna Spurr (segons la metodologia explicada a l'apartat II.C.7.a.ii) per fer un estudi morfològic a nivell ultraestructural. Paral·lelament, es va realitzar el mateix procediment però sobre espermatozoides que havien estat prèviament homogeneïtzats enfront d' SDS al 0.02%. La Fig.III.A.31A-D mostra el resultat.

Les figures A i B mostren el nucli i la cua de l'espermatozoide tal i com es troben normalment. El nucli (N), helicoidal, és el principal constituent del cap, mentre que la cua espermàtica està formada sobretot per 9 fibres denses (ODF's) que envolten l'axonema (amb estructura típica 9+2), constituint així el citoesquelet, i disposant-se tot el conjunt d'una forma organitzada.

Quan els espermatozoides s'homogeneïtzen enfront d' SDS, el resultat és que la cua perd al complert l'axonema, i encara que es desestabilitza l'estructura general del flagell, les ODF's romanen més o menys intactes (D), i el nucli presenta una cromatina amb una estructura com de malla (C), però sense perdre la seva identitat morfològica. Aquests experiments es confirmen amb els realitzats per Selmi (1996). No obstant, hem comprovat que si les cèl·lules espermàtiques són prèviament tractades amb un agent reductor, l' SDS desfà i solubilitza totalment l'espermatozoide.

Així doncs, tant nuclis com fibres denses (ODF's) conserven la seva identitat morfològica. Aquests fets suggereixen que les proteïnes dels nuclis i fibres denses estan interaccionant entre elles per enllaços covalents i no poden ser solubilitzades per l' SDS. Sabem que l'espermatozoide és ric en proteïnes riques en cisteïna, i que aquestes molècules es troben estabilitzant les dues estructures majoritàries, ODF's i nuclis. Malgrat que la química de les cisteïnes pot ser molt complexa, en les proteïnes espermàtiques aquests aminoàcids s'hi acostumen a trobar principalment en dues formes: parcialment en forma reactiva (és a dir, en

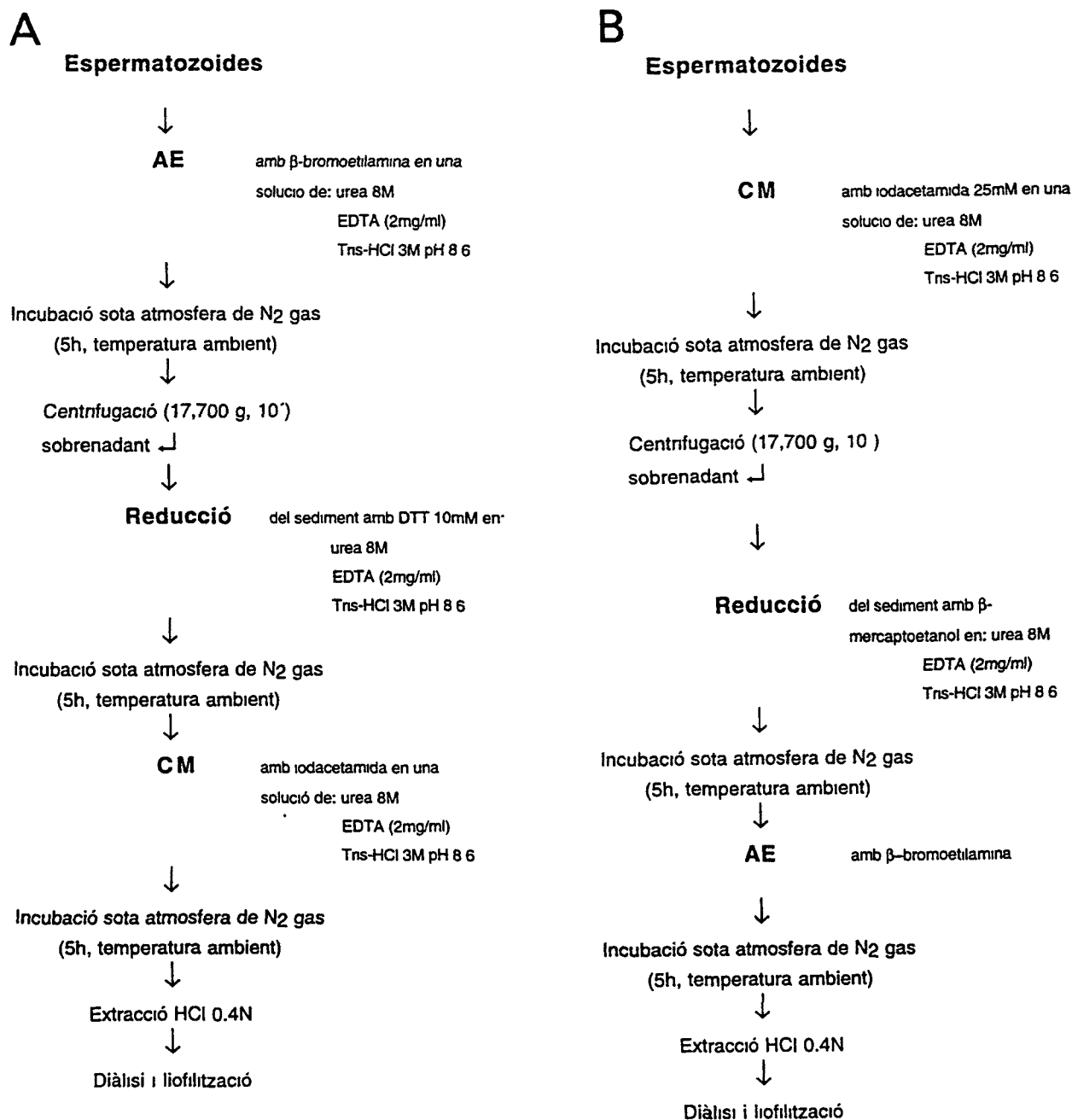
forma de grup tiol, -SH) i parcialment oxidades formant enllaços disulfur (cys-S-S-cys).

Sabem que un 3% de les proteïnes de l'espermatzoide s'extreuen sense necessitat de reduir-se, i que la resta (97%) s'ha de reduir per poder ser extretes. Aquests resultats, però, no ens diuen quina és la proporció de Cys que estan formant els ponts disulfur.

Per conèixer la **proporció de cisteïnes que estan formant ponts disulfur**, es van fer dos experiments en paral·lel (Fig.III.A.32). Per una banda, els espermatzoides es van aminoetilar (AE) sense reduir, i posteriorment es van reduir i carboximetilar (CM); d'aquesta forma, les cisteïnes que estaven en la forma de tiol lliure, s'aminoetilaran, i les que estaven formant ponts disulfur no s'aminoetilaran, sinó que en ser reduïdes, posteriorment es carboximetilaran. Si es fa una anàlisi d'aminoàcids, sabrem la proporció d'aminoetilcisteïnes (AE-cys) i carboximetilcisteïnes (CM-cys), que representaran el percentatge de cisteïnes que no formaven ponts disulfur (AE-cys) i el percentatge de cisteïnes que han necessitat reduir-se per estar en la forma carboximetilada i que, pertant, formaven ponts disulfur (CM-cys). Per altra banda, es va fer el mateix experiment però a l'inversa: primer es va carboximetilar, i després reduir i aminoetilar. Així doncs, al fer una anàlisi d'aminoàcids, el percentatge de cisteïnes en la forma carboximetilada indicaria les cisteïnes que no formen ponts disulfur, i el percentatge de cisteïnes en la forma aminoetilada, les cisteïnes que formaven ponts disulfur.

Els resultats de les anàlisis d'aminoàcids ens van donar que la proporció de Cys que estan formant ponts disulfur és només d'un 55% del total de Cys presents en les proteïnes de l'espermatzoide. Ara bé, hem de tenir present que estem treballant amb l'espermatzoide *senser*, per tant, el pas següent és identificar si la proporció de cisteïnes que formen ponts disulfur és la mateixa en els nuclis que en les ODF's. De fet, l'experiència prèvia de que quan escalfem l'espermatzoide a 80°C durant 2-3 minuts provoca la "dissolució" de les ODF's però no dels nuclis, ens suggereix que la major part de cisteïnes presents en el nucli formen ponts disulfur, conferint una major estabilitat al nucli front la temperatura.

Fig.III.A.32. Estadi de les Cys de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa*. A- AE-reducció-CM; B.- CM-reducció-AE. AE= aminoetilació, CM= carboximetilació.



d. Localització microscòpica dels ponts disulfur en l'espermatozoide

En aquest apartat es pretén determinar la localització dels ponts disulfur en nucli i ODF's. Per això es va utilitzar un agent que s'uneix específicament als grups tiol (-SH), el monomaleimido-nanogold (MMNA).

La idea es basa en marcar els ponts disulfur d'una forma indirecta. Sabem que el MMNA és una molècula formada per un grup maleimido unit a una partícula d'or (v. II.C.7.b) que presenta afinitat pels grups tiol (-SH), proporcionant un marcatge específic dels mateixos; així doncs, el MMNA s'unirà a les cisteïnes que es trobin en la forma reduïda (cys-SH). L'espermatozoide d'*E. cirrhosa* presenta cisteïnes tant en la forma oxidada (cys-S-S-cys) com en la forma reduïda: si s'incuben com a tal amb MMNA, quedaran marcades les cisteïnes que no formen ponts disulfur, i si l'espermatozoide es redueix, es marcaran les cisteïnes que han passat de formar ponts disulfur a estar en forma de grup tiol lliure. De manera que la idea d'aquest experiment és la d'observar al microscopi electrònic un augment en el marcatge dels grups tiol quan es fan incubacions amb un agent reductor, localitzant així els ponts disulfur.

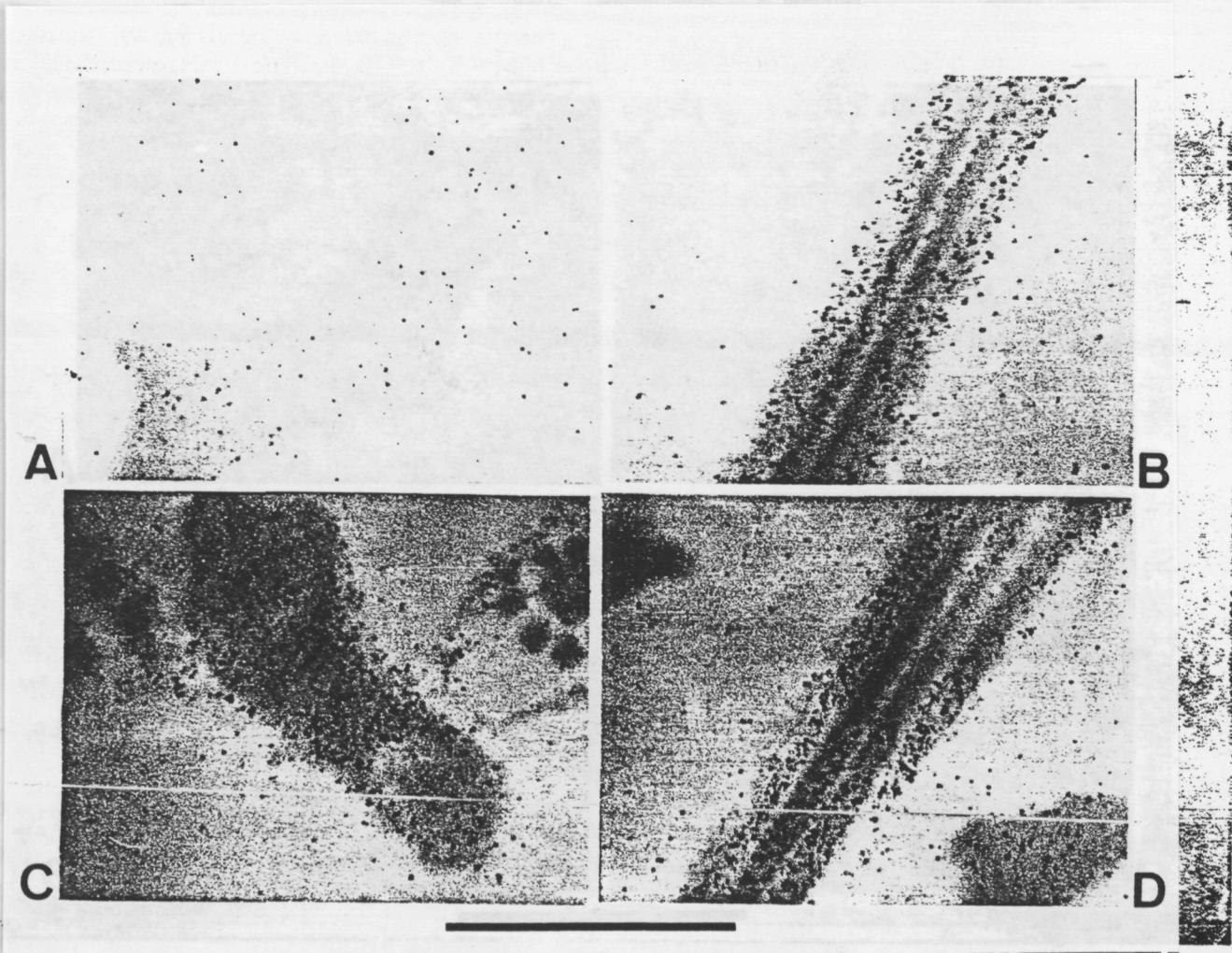
Es van incubar espermatozoides amb 0 i 25 mg/ml d'agent reductor (MEA), i així es van reduir els ponts disulfur, i posteriorment es van incubar amb MMNA, incubació que es va fer quan la mostra estava ja tallada i sobre la raixeta.

La Fig.III.A.33 mostra que quan els espermatozoides no han estat sotmesos a l'acció reductora del MEA, el MMNA s'uneix amb certa densitat a les fibres denses, i no s'observa un marcatge específic en el nucli (A i B) (el marcatge observat en el nucli és pràcticament igual al del soroll de fons). La reducció amb MEA provoca l'augment de l'afinitat del nucli i un augment relativament menor de les fibres denses al MMNA (C i D).

Aquests fets signifiquen que la gran majoria de cisteïnes nuclears es troben en forma de ponts disulfur (al veure que queden poc marcades quan no estan reduïdes i el marcatge augmenta quan es redueixen), mentre que la cua té una certa proporció de ponts disulfur (que queden marcats a mida que l'espermatozoide es redueix) i una proporció important de cisteïnes amb grups

tiol reactius (R-cys-SH, que queden marcats quan l'espermatozoide encara no s'ha reduït) .

Fig.III.A.33. Marcatge dels grups -SH pel MMNA. A i B- Nuclis i ODF's sense reduir, respectivament. C i D- Nuclis i ODF's reduïts amb 25 mg/ml de MEA, respectivament. Barra= 1µm.

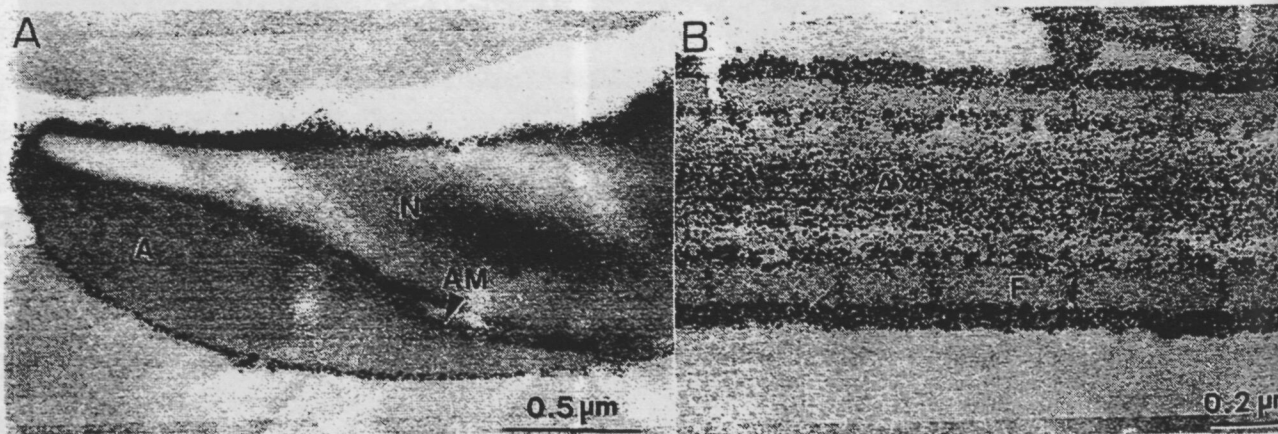


NOTA METODOLOGICA

Els experiments efectuats amb la tècnica del monomaleimido-nanogold (MMNA) s'han basat en principi en el treball descrit per Lin i col.laboradors. (Lin et al, 1995), en el qual, els autors incuben espermatozoides del mamífer no

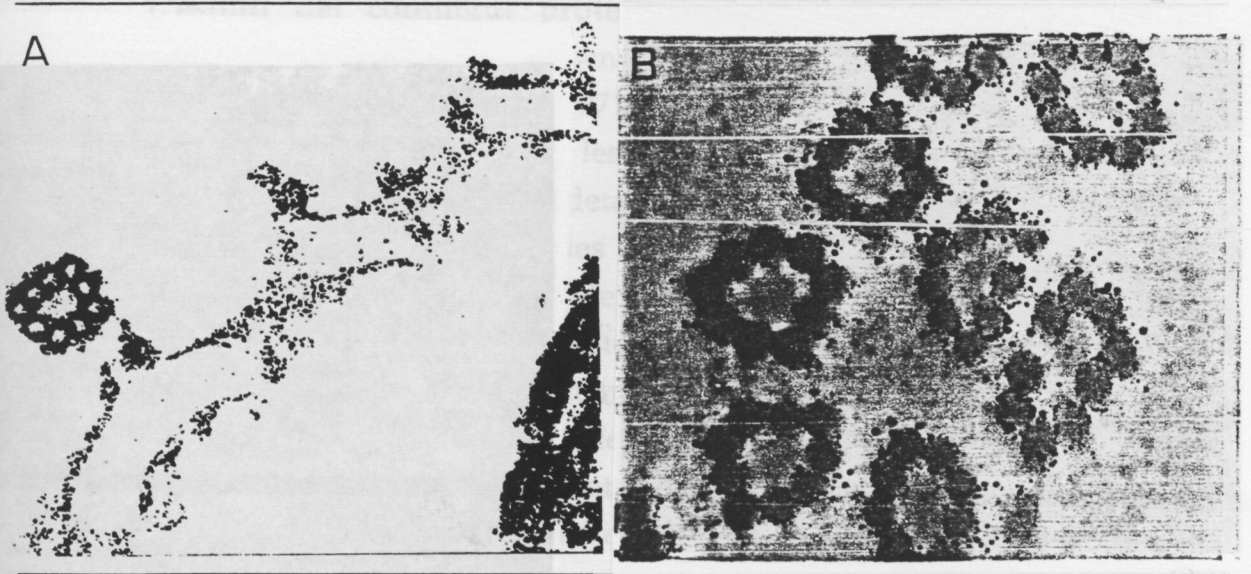
placentari *Macropus eugenii* amb diferents concentracions d'agent reductor (MEA), i posteriorment incuben amb el MMNA; en aquest treball s'interpreta que el nucli de l'espermatozoide de *M. eugenii* no conté cisteïnes (al no quedar marcat pel MMNA) mentre que les ODF's, contenen cisteïnes que formen ponts disulfur en la perifèria d'aquestes fibres (-SH marcats pel MMNA), Fig.III.A.34.

Fig.III.A.34. Marcatge dels ponts disulfur presents en el nucli i en les ODF's del mamífer no placentari *Macropus eugenii* per la tècnica del MMNA, fent la incubació directament sobre els espermatozoides. A- Nuclis incubats amb 1 mg/ml MEA; N- nucli, A- acrosoma, AM- membrana acrosomal. B- Cues incubades amb 10 mg/ml MEA; Ax- axonema, F- ODF's. (Extret de Lin et al., 1995).



Els primers experiments que vàrem realitzar van ser utilitzant la tècnica descrita per Lin et al., i els resultats foren els mateixos: es va partir d'espermatozoides d'*E. cirrhosa*, els quals es van reduir amb MEA, i posteriorment incubar amb MMNA. Aquesta incubació es va fer repetides vegades, i en tots els casos obteníem un resultat similar al descrit per Lin et al.: el marcatge dels grups tiol provinents de la reducció de les cisteïnes (cisteïnes que han reduït els ponts disulfur al ser tractades amb l'agent reductor MEA) es produïa exclusivament a la perifèria de les estructures, tant del nucli com de les ODF's, Fig.III.A.35, de manera que el MMNA marcava la silueta externa del nucli i ODF's.

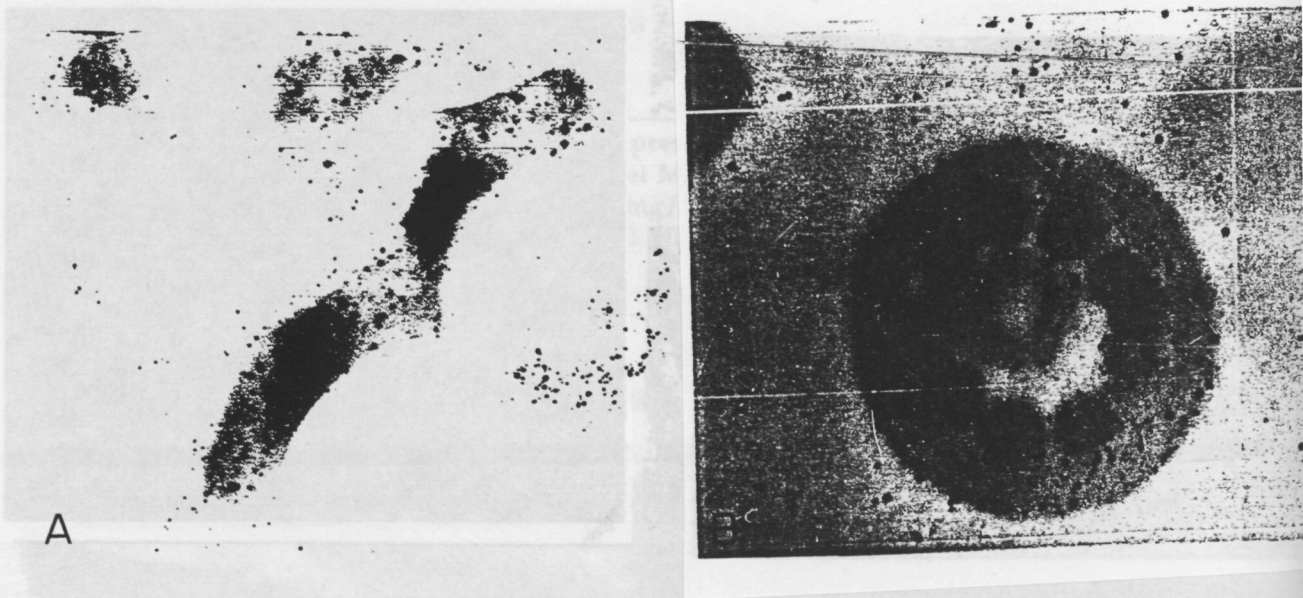
Fig.III.A.35. Marcatge dels ponts disulfur presents en el nucli i ODF's del cefalòpode *E. cirrhosa* per la tècnica del MMNA, fent la incubació directament sobre els espermatozoides. A i B- Nuclis i ODF's, respectivament, prèviament incubats amb 20 mg/ml MEA. A- 27.000x; B- 40.000x.



De tota manera, el gran contingut en cisteïnes que presentava l'espermatozoide suggeria que les cisteïnes que quedaven marcades amb el MMNA eren molt menys de les que realment existien. Conseqüentment, vàrem pensar que, degut al tamany del reactiu emprat (en particular al grànul d'or d'1.4 nm de diàmetre que està unit al grup maleimido del MMNA), i a la densitat molecular tan elevada que presenten tant nuclis com ODF's (sugerit per l'elevada electrodensitat que presenten en les observacions al microscopi electrònic), el MMNA potser no podia difondre/penetrar cap a dins de les estructures cel·lulars i marcar les cisteïnes que es troben en el seu interior.

Per poder comprovar aquesta possibilitat, vàrem variar lleugerament la tècnica original dels autors, de manera que, en primer lloc, els espermatozoides es van reduir amb concentracions creixents de MEA (0, 20 i 25 mg/ml), i després es va fer la inclusió dels mateixos amb Spurr. Els blocs es tallaren i, sobre els talls en la raixeta, es va fer l'incubació amb el MMNA. Tal i com indica la Fig.III.A.36, aquest procediment va permetre que el reactiu arribés a les cisteïnes que quedaven en l'interior dels nuclis i ODF's, unint-se als grups tiol que no apareixien marcats en les incubacions anteriors.

Fig.III.A.36. Marcatge dels ponts disulfur presents en el nucli i ODF's del cefalòpode *E. cirrhosa* per la tècnica del MMNA, fent l'incubació del MMNA sobre la raixeta, un cop tallada la mostra reduïda. A i B- Nuclis i ODF's respectivament, incubats amb 20 mg/ml MEA. A- 40.000x; B- 60.000x.



La conseqüència que treiem d'aquestes proves és, en primer lloc, que les cisteïnes amb el grup tiol lliure i els ponts disulfur es reparteixen per tot el nucli i per les ODF's, i en segon lloc, que el mètode descrit per Lin i col.laboradors ha de ser modificat quan es volen detectar cisteïnes a l'interior d'estructures cel.lulars molt compactes.

Fins aquest punt, en aquest apartat hem observat per diferents mètodes que l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* és una cèl.lula molt rica en cisteïna. Una elevada proporció d'aquestes cisteïnes es troba formant part de ponts disulfur (-cys-S-S-cys-), que confereixen una gran estabilitat química al nucli i a les ODF's (fibres denses), tots dos components majoritaris de l'espermatozoide, i que la major part dels ponts disulfur es troben en el nucli espermàtic.

3. Contingut proteic de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa*. Caracterització de la Protamina nuclear

L'estudi del contingut proteic nuclear dels cefalòpodes resulta interessant degut al fet de que presenten una biologia de la reproducció molt especialitzada (v. Mangold et al., 1971; Boyle, 1983; Mangold, 1987; Boletzky, 1989), la qual es correlaciona amb les modificacions que hi puguin haver en l'espermatozoide. Es coneixen en detall les proteïnes espermàtiques nuclears (protamines) dels decàpodes (sèpies i calamars) (Kadura i Krapunov, 1988; Martin-Ponthieu et al., 1991; Wouters-Tyrou et al., 1991 i 1995) els quals presenten una protamina microheterogènia com a principal component nuclear. Aquestes proteïnes contenen de 56 a 58 aminoàcids, i només estan formades per 4 tipus d'aminoàcids diferents: Arg, Ser, Pro i Tyr; si es comparen les seves seqüències es veu clarament com les protamines dels decàpodes són homòlogues i han divergit d'una mateixa proteïna ancestral, Fig.III.A.37.

Fig.III.A.37. Seqüència de les protamines dels decàpodes. A- Protamina Sp1 de *Sepia officinalis* (sèpia); B- Protamina T1 de *Loligo pealeii* (calamar). (Extret de Martin-Ponthieu et al., 1991, i Wouters-Tyrou et al., 1995, respectivament).

A- RRRRR RSRRR RRRSR RRSRS PYRRR YRRRR RRRRR RSRRR RYRRR
RSYSR RRRYR RRR

B- RRRRR RSRRR RRRSR RRRSR SPYRR RYRRR RRRRR RRSRR RRYRR
RRSYS RRRYR RRR

Per altra banda, les protamines dels octòpodes no són conegudes. L'única informació que es té prové de treballs pioners de Subirana et al. (1973), on es fa un estudi general de les protamines de mol.luscs. En aquests estudis es mostra que el nucli espermàtic d'*E. cirrhosa*, a diferència dels decàpodes, no conté una sola protamina, sinó que està compactat per diverses proteïnes, les quals presenten una elevada variabilitat aminoacídica (fins a 16 aminoàcids diferents), i un elevat contingut en cisteïna. En canvi, en el mateix treball descriuen una única protamina pel nucli espermàtic d'*Octopus vulgaris*, que

presenta característiques relativament similars a les dels decàpodes; cal a dir que dintre dels cefalòpodes, els octòpodes (pops) es consideren formes més evolucionades i especialitzades que els decàpodes (sèpies i calamars), degut a característiques en la seva biologia de la reproducció que han anat adquirint al llarg de l'evolució (Altaba, 1991).

En l'apartat 2 hem vist que l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* és una cèl.lula rica en cisteïna, i que aquest aminoàcid es troba estabilitzant al nucli espermàtic formant ponts disulfur. A continuació, el que ens vàrem proposar va ser reexaminar quines eren les proteïnes (o proteïna) que condensaven i empaquetaven el nucli espermàtic, i veure les diferències que presentaven respecte les protamines de la resta de cefalòpodes (decàpodes).

Per saber específicament quin era el contingut de proteïnes nuclears de l'espermatozoide, es van purificar nuclis d'una manera molt acurada, intentant tenir el mínim possible de contaminació per part de cues. L'obtenció de nuclis en aquesta espècie resulta ser molt complicada degut a que nucli i cua presenten un diàmetre i densitat molt semblant, i també una similar composició en cisteïna, de manera que costa molt separar totes dues estructures. Quan reproduïm la metodologia de purificació de nuclis descrita per Subirana et al. (1973), obtenim una mostra tal i com es veu a la Fig.III.A.38, en la qual la preparació de nuclis està molt contaminada de cues. Si es fa una extracció de proteïnes d'aquesta preparació (prèvia reducció i alquilació) i una posterior anàlisi d'aminoàcids, trobem la mateixa composició en proteïnes descrita originalment pels autors (Subirana et al., 1973), del que deduïm que no estem obtenint una composició de proteïnes nuclears, sinó una barreja de proteïnes nuclears i de la cua (majoritàriament de les ODF's). Així doncs, vàrem modificar la metodologia per a l'obtenció de nuclis i evitar així el més mínim possible la contaminació de cues.