

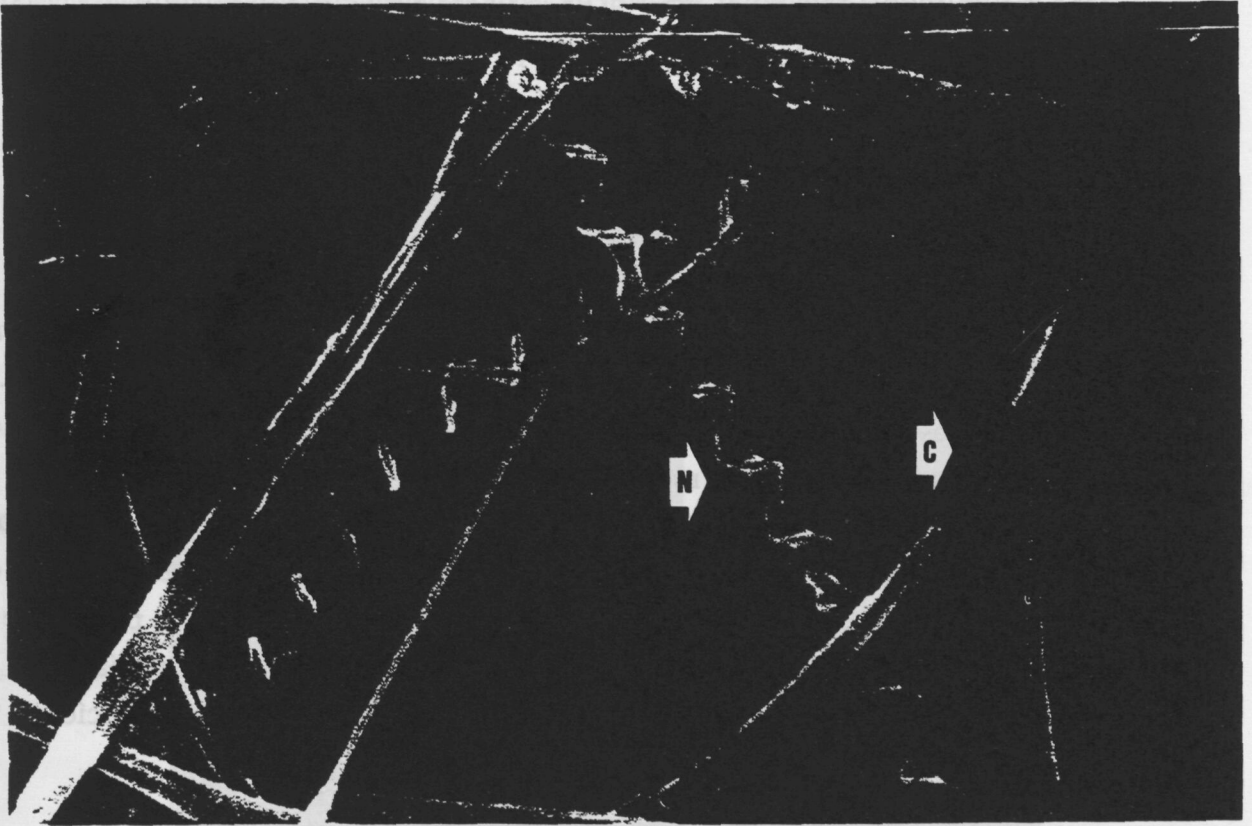
TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

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

Novembre, 1999

Fig.III.A.38. Nuclis d'espermatozoides d'*E. cirrhosa* obtinguts segons la metodologia de Subirana et al., 1973. N- nuclis; C- cua. 14,700x.



Es varen provar diferents mètodes per arribar a obtenir una mostra enriquida en nuclis: partint d'epidídims o espermatòfors, es van alliberar espermatozoides i aquests es van tractar amb CTAB al 10%, homogeneïtzant amb un dounce (per així separar les cues dels nuclis) i filtrant amb tela empesa (per atrapar les cues), però com a resultat vam obtenir un agrumollament dels espermatozoides. Es varen fer homogeneïtzacions enfront de NaCl 0.4N, sense escalfar i escalfant (80°C) la mostra, amb posterior filtració, però no vam obtenir un enriquiment en nuclis. També es van fer reduccions dels espermatozoides amb DTT 10 mM, realitzant diverses homogeneïtzacions, filtracions i centrifugacions, i en cap cas aconseguírem separar les cues dels nuclis.

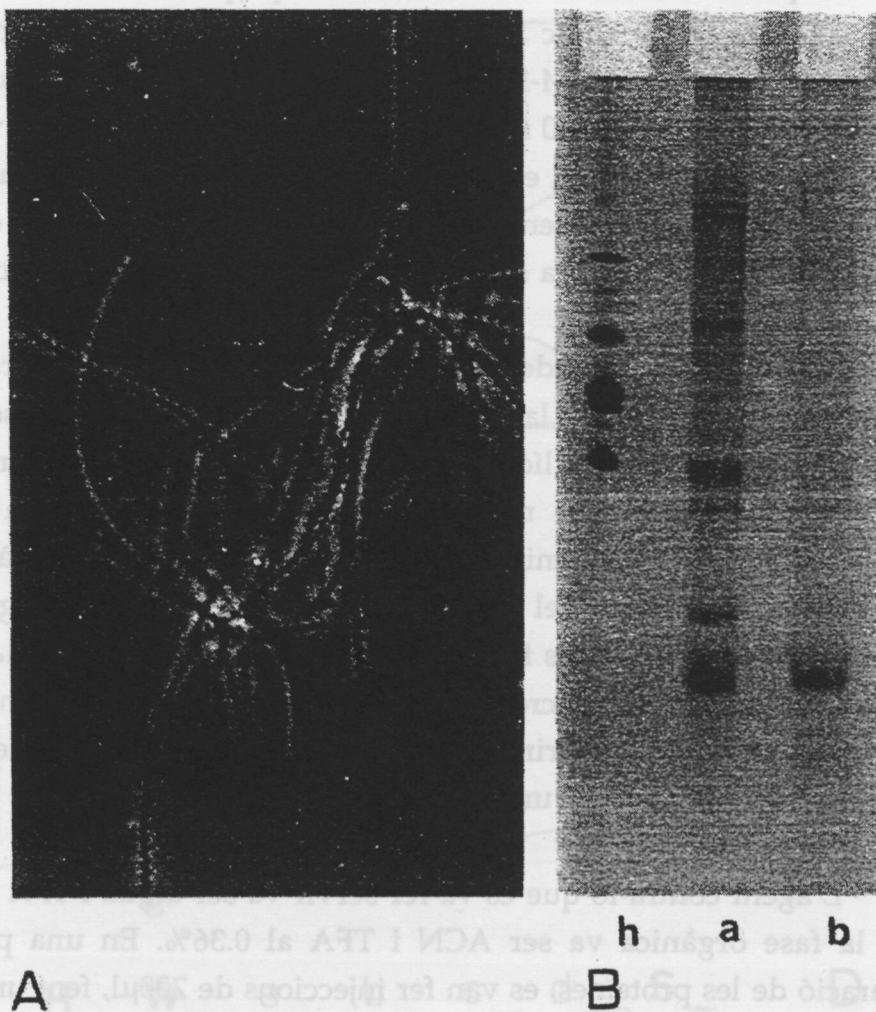
Després de molts experiments vàrem arribar a la conclusió de que per separar els nuclis de les cues, els espermatozoides s'havien d'escalfar a 80°C en

presència de NaCl 0.4N i sota atmosfera de nitrogen, durant un temps mínim de 10 minuts; posteriorment, aquesta suspensió s'havia d'incubar amb una solució que desestabilitza les cues (DTT 10mM, Tris-HCl 10mM pH8.5 i urea 2M), i finalment, per aïllar els nuclis, s'havia de centrifugar amb un coixí de sacarosa 2.6M, a 17,000 g durant 1h. Aquest mètode ens permetia obtenir una mostra rica en nuclis a petita escala.

La mostra enriquida en nuclis es pot veure a la Fig.III.A.39A. Per identificar les proteïnes presents en el nucli espermàtic, els nuclis es van reduir i alquilar amb bromoetilamina (aminoetilació), i posteriorment les proteïnes bàsiques es van extreure amb HCl 0.4N. Després de dialitzar i liofilitzar-les, es va fer un GPAU per la seva identificació. La Fig.III.A.39B mostra el resultat: en el carril *a* hi ha representades les proteïnes totals que es poden extreure aplicant el mètode de Subirana et al. (1973), el qual hem vist que no tant sols aïllava nuclis, sinó també cues; en el carril *b* hi ha les proteïnes extretes d'una mostra rica en nuclis (segons el mètode explicat), com indica la fotografia de microscòpia òptica de la mateixa figura. Es pot veure que **el nucli espermàtic conté una única proteïna**, almenys majoritàriament, que presenta un migració corresponent a uns 70-80 residus aminoacídics (per comparació amb les histones estàndard).

Un cop sabíem que el nucli estava format fonamentalment per una única protamina, es va procedir a la purificació a l'engròs de la mateixa. Aquest cop es va partir de més quantitat d'espermatozoides, els quals es van agitar enfront de tampó A1 i posteriorment es van centrifugar (17,700 g, 10 min); el sediment resultant es va homogeneïtzar amb un dounce en solució salina (NaCl 0.4N, DTT 10 mM i clorur de benzamidina 10 mM), i la suspensió es va bombollejar amb nitrogen gas (per evitar possibles reaccions oxidants) i escalfar a 80°C durant 2-3 min per aconseguir dissoldre les cues (les proteïnes de les cues no presenten tants ponts disulfur com les del nucli, per tant no són tant resistents, i queden solubilitzades pel NaCl en presència de DTT en baixa concentració, i la temperatura). El següent pas va ser homogeneïtzar de nou la mostra i centrifugar-la durant 1 segon a 2,500 g, per eliminar restes d'agregats; el sobrenadant es tornà a centrifugar (17,700 g, 5 min) i el sediment que resulta és ric en nuclis. Tot i això, cal a dir que la purificació de nuclis no va ser al cent per cent, ja que hi havia contaminació de cues.

Fig.III.A.39. Purificació de nuclis d'espermatozoides d'*E. cirrhosa* i identificació de les proteïnes nuclears. A- Nuclis obtinguts segons la metodologia descrita a l'apartat II.B.1.a.iii; **B-** GPAU 6.25M urea/15% acrilamida de les proteïnes presents en l'espermatozoide: h- estàndard d'histones, a- proteïnes espermàtiques totals, b- proteïnes presents en el nucli. A- 1200x



La mostra es va reduir i aminoetilar, es van extreure les proteïnes i es van dialitzar i liofilitzar. Posteriorment es va fer un GPAU per veure quines proteïnes hi trobàvem. La Fig.II.A.40D (carril w) mostra el patró electroforètic de les proteïnes totals presents en l'espermatozoide (patró que coincideix amb el de la Fig.III.A.39B, pou a); en ell trobem un grup de proteïnes amb molt baixa mobilitat electroforètica (migrant abans que les histones) (A), un grup de mobilitat electroforètica intermitja (B i C), i una proteïna que exhibeix una major mobilitat electroforètica, i que correspon a la protamina nuclear

obtinguda quan es parteix d'una mostra enriquida en nuclis, tal i com hem vist a la Fig.III.A.39A.

Per purificar la protamina i identificar les altres proteïnes, la barreja de proteïnes espermàtiques es va separar mitjançant **cromatografia de bescanvi iònic**. Les proteïnes totals liofilitzades es van preparar amb el tampó de càrrega (NaCl 0.1N en acetat sòdic 50mM pH 6.5), es van aplicar a una columna de carboximetil-cel.lulosa (CM-52), i es van eluir al llarg d'un gradient de NaCl 0.1N a 2N en acetat sòdic 50 mM pH 6.5. Les fraccions eluïdes es van llegir a 225 nm en l'espectrofotòmetre, i els valors es van representar. El resultat es veu a la Fig.III.A.40A, on hi apareixen 4 pics. Les proteïnes pertanyents a cada pic es van dialitzar i liofilitzar, i per la seva identificació es van córrer en un GPAU.

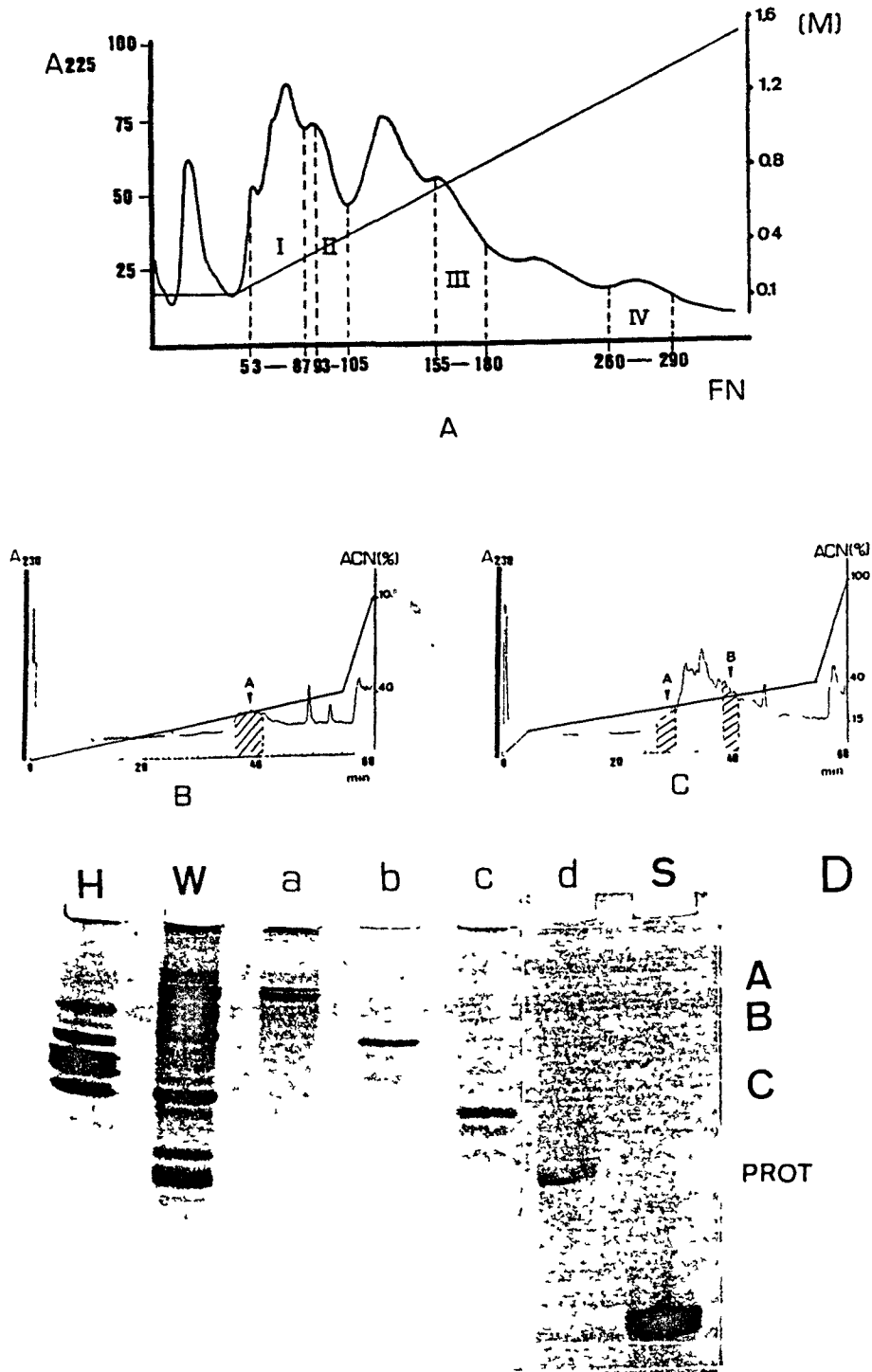
Amb cromatografia de bescanvi iònic només vàrem separar els grups de proteïnes A i B (pics I i II), la resta no quedava ben separat. Un segon pas va ser utilitzar la cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa, **HPLC**, per purificar la protamina i millorar la separació de la resta de proteïnes, Fig.III.A.40B i C. La protamina que compacta el nucli és molt bàsica, ja que per poder interaccionar amb el DNA ha de contrarrestar la càrrega negativa que aquest presenta deguda als fosfats, de manera que resulta ser la primera fracció eluïda en aquest tipus de cromatografia, on la columna és de matriu no polar i el que es desenganxa primer són les proteïnes hidrofíliques. El tipus de columna utilitzada va ser una C-18 (Spherisorb).

L'agent contra-ió que es va fer servir va ser aigua i TFA al 0.5%, mentre que la fase orgànica va ser ACN i TFA al 0.36%. En una primera fase de separació de les proteïnes, es van fer injeccions de 200µl, fent un gradient:

0-20%	0-5'
20-60%	5'-55'
60-100%	55'-60'

de fase orgànica, obtenint els pics a 800 mV de sensibilitat.

Fig.III.A.40. Separació dels diferents grups de proteïnes de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa*. A- Cromatografia de bescanvi iònic CM-52; B- HPLC del pic IV de la cromatografia anterior; C- HPLC del pic III; D- GPAU 6.25M urea/15% acrilamida de les fraccions: H- estàndard d'histones, S- estàndard de salmina, W- proteïnes totals de l'espermatozoide, proteïnes de partida (A, B, C i Protamina), a- pic I (fig. A), b- pic II (fig. A), c- pic B (fig. C), i d- pic A (fig. B). A₂₂₅₋₂₃₀- absorció a 225 i 230 nm (%), FN- número de fracció recollida, [M]- concentració molar de NaCl, ACN- % d'acetonitril, min- minuts.



En una segona fase de purificació, les injeccions varen ser de 150 µl, treballant a una sensibilitat de 100 mV, i utilitzant un gradient de fase orgànica de:

0-40%	0-55'
40-100%	55'-60'

En aquest segon cas es treballava a una sensibilitat menor degut a que les mostres s'havien concentrat amb centrífons.

Les diferents fraccions eluïdes es van assecar mitjançant corrents de nitrogen gas.

La Fig.III.A.40D mostra el GPAU de les diferents fraccions obtingudes tant per cromatografia de bescanvi iònic (grups de proteïnes A i B), com per HPLC (grup de proteïnes C i Protamina).

En alguns casos hem treballat amb petites quantitats de proteïna, especialment quan hem fet un control electroforètic de les proteïnes existents en els diferents pics, abans d'ajuntar les fraccions de cadascún d'ells, precipitant amb TCA una alíquota de cada pic per veure les proteïnes presents; s'ha fet un GPAU de les diferents alíquotes, però hi ha hagut casos en que les quantitats de proteïna carregada en el gel han estat massa petites per ser detectades pel blau de Coomassie, de manera que s'ha hagut de tenyir segons el mètode de la tinció en plata. En aquest apartat, però, no es mostra cap gel tenyit per aquest mètode.

Un cop vàrem tenir separades les diferents fraccions proteiques que formen part de l'espermatozoide, es va fer una hidròlisi de les mateixes per analitzar la seva composició aminoacídica. La Taula III.A.II mostra la composició aminoacídica dels grups de proteïnes A, B, C i de la Protamina, purificades per cromatografia de bescanvi iònic i HPLC.

El grup de proteïnes amb baixa mobilitat electroforètica (A) destaca per ser extraordinàriament ric en prolina (44.5%), aminoàcid que s'ha trobat present en les parets d'alguns espermatòfors. Per altra banda, les proteïnes de mobilitat electroforètica intermitja (B i C) tenen una composició molt similar a proteïnes descrites per Baccetti et al. (1976b) en les ODF's de la cua de

l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* ; en aquest treball es descriu que en les ODF's hi ha dos tipus de proteïnes, unes proteïnes d'elevat pes molecular (90 KDa) riques en Asp, Glu i Leu (que podrien correspondre al grup de proteïnes C nostre), i unes de baix pes molecular (36 KDa) riques en Pro, His i Cys (que podrien correspondre al que nosaltres anomenem proteïnes B).

Taula II.A.II Composició aminoacídica de les diferents fraccions proteiques de l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* obtingudes mitjançant cromatografia de bescanvi iònic i HPLC: A, B, C i Protamina. Decàpode: protamina de l'espermatozoide de *Sepia officinalis* (sèpia) (extret de Martin-Ponthieu et al., 1991). Valors expressats en nmols.

	A	B	C	Protamina	Decàpode
Lys	2.6	6.9	10.1	16.0	-
His	3.0	4.2	2.9	1.9	-
Arg	2.4	3.5	7.5	25.9	77.1
Asx	2.1	7.4	10.1	1.7	-
Thr	1.8	5.2	6.4	1.5	-
Ser	1.7	4.5	6.8	6.8	11.5
Glx	4.7	8.3	9.7	2.5	-
Pro	44.5	15.6	8.3	7.3	2.2
Gly	1.4	7.0	6.4	4.6	-
Ala	1.7	4.3	5.1	2.7	-
Cys (CM)	29.5	15.4	7.1	21.8	-
Val	2.6	4.3	2.8	2.1	-
Met	-	0.8	traces	0.8	-
Ile	0.7	3.0	4.1	1.2	-
Leu	0.9	3.8	5.3	1.8	-
Tyr	0.2	3.8	3.3	0.5	9.1
Phe	0.3	2.0	3.9	0.8	-

Així doncs, part del contingut proteic de les ODF's (principal component de la cua) és ric en cisteïna. Aquest fet queda constatat per les anàlisi d'aminoàcids i pels experiments realitzats en l'apartat anterior: per una banda, en la microanàlisi de raigs X (apartat III.A.2) hem vist com les ODF's presentaven sofre pertanyent a les cisteïnes; a més a més, se sap que les

proteïnes riques en histidina (com és el cas de les proteïnes de baix pes molecular descrites per les ODF's) acomplexen Zinc (Baccetti et al., 1976b), Zinc que també hem trobat present en aquestes estructures. Un altre fet que confirma la riquesa en cisteïnes de les ODF's és la resistència que presenten enfront del detergent SDS (apartat III.A.2.c). I per últim, la tècnica de marcatge dels grups tiol per part del MMNA, marcatge positiu que resulta de la incubació del MMNA amb les cues, agent que s'unirà als grups -SH presents en les proteïnes de baix pes molecular de les ODF's que són les riques en cisteïna.

La protamina d'*E. cirrhosa* és molt diferent a la que es troba en els decàpodes (Taula III.A.II). Destaca en primer instant, tal i com s'ha dit abans, per ser molt rica en cisteïna, aminoàcid que fins al moment només s'havia trobat en protamines de mamífers i condrictis (Gusse i Chevaillier, 1978; Bellvé et al., 1988; Balhorn, 1989; Oliva i Dixon, 1991) i per presentar una elevada variabilitat aminoacídica. Addicionalment resulta ser una proteïna menys bàsica: 43.8% d'aminoàcids bàsics enfront d'un 77% present en els decàpodes.

El següent pas a abordar va ser el de caracteritzar l'estructura primària de la proteïna nuclear. La Taula III.A.II presenta la composició aminoacídica de la protamina d'*E. cirrhosa* purificada per tècniques de cromatografia de bescanvi iònic i HPLC. Tot i que la proteïna es veu força pura (Fig.III.A.40D, d), no ho estava prou per fer la seva seqüència, així és que es va partir de nou material per a la seva purificació, i aquest cop l'alquilació no va ser amb β -bromoetilamina (aminoetilació) sinó amb iodacetamida, per tant es va carboximetilar.

El procés d'obtenció de la protamina d'*E. cirrhosa* per la seva seqüència es va realitzar al laboratori del Dr. Pierre Sautière, a l'Institut Pasteur de Lille, França. Es va partir de nuclis d'espermatozoides provinents d'epidídims i espermatozòfors, amb la pertinent presència de cues. Els nuclis no purs es van reduir amb DTT i alquilar amb iodacetamida, i posteriorment es van extreure amb HCl 0.4N (v. II.B.5.c). El resultat es pot veure a la Fig.III.A.41A, on la protamina resulta contaminada per les proteïnes de les cues (A,B i C). El següent pas va ser el de la purificació per HPLC de la protamina.

El primer pas de purificació de la protamina es pot veure a la Fig.III.A.41B, on la protamina surt en un pic conjuntament amb d'altres, i és a partir d'aquest pic que s'arriba a obtenir la proteïna totalment pura mitjançant un altre pas per HPLC, Fig.III.A.41C. En la Fig.III.A.41B, en el gel d'electroforèsi, es pot apreciar com la protamina presenta una doble banda, degut a que, tal i com es veurà més endavant, es troba en diferents estadis de fosforilació i dona lloc a diferents formes que presenten diferent migració electroforètica.

Fig.III.A.41. Purificació de la protamina d'*E. cirrhosa* mitjançant tècniques d'HPLC. A- Obtenció de les proteïnes de l'espermatozoide. Perfils cromatogràfics amb els respectius GPAU 6.25M urea/15% d'acrilamida de: B- Primera fase de purificació de la protamina nuclear (fletxa) a partir de la barreja de proteïnes espermàtiques inicials; w- proteïnes totals. C- Segona fase de purificació, a partir del pic de la primera fase que conté la protamina (a), on s'obté la protamina pura en un sol pic (p). (Gradient aplicat: 0-30% de B en 60 min, éssent B= ACN 80%).

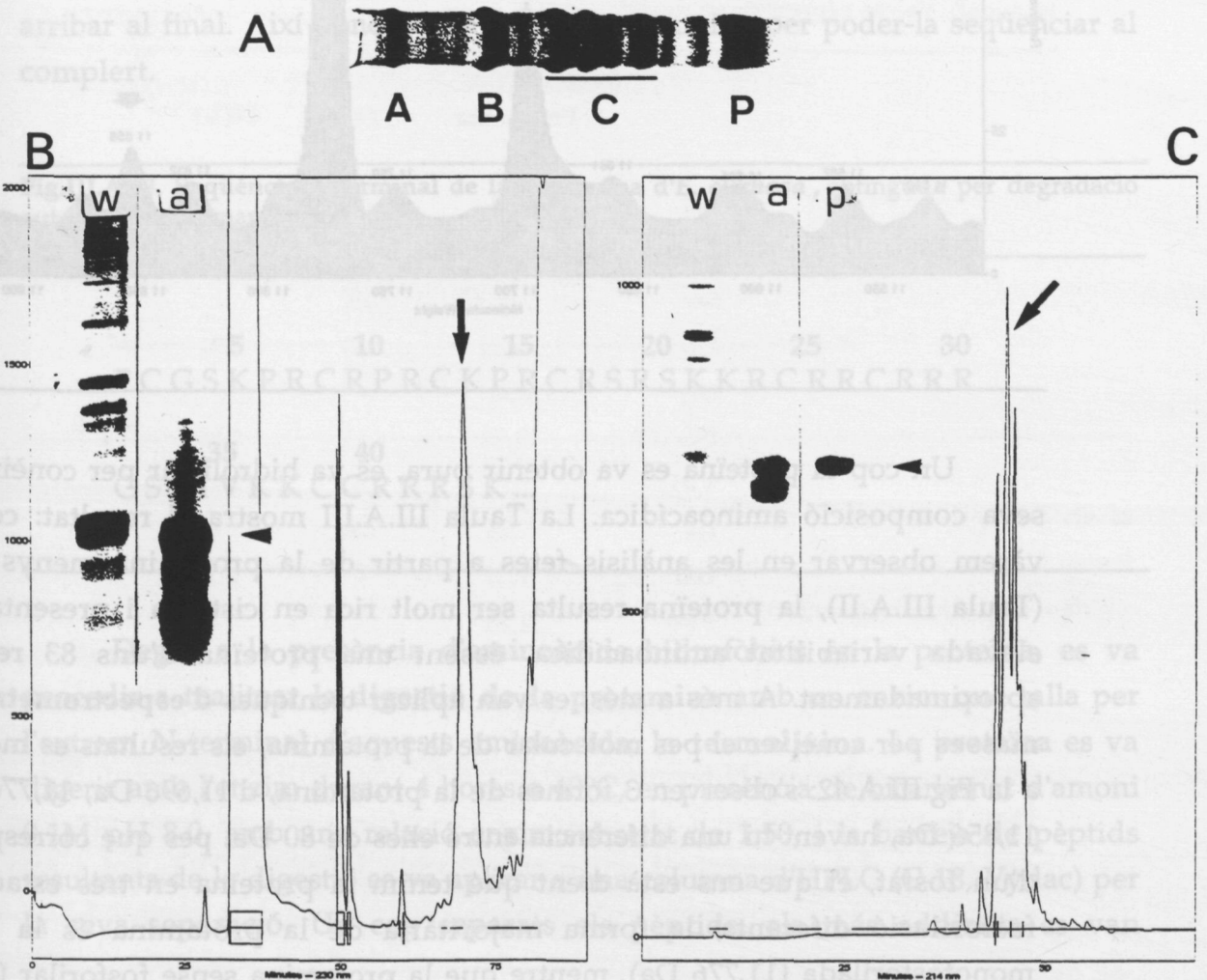
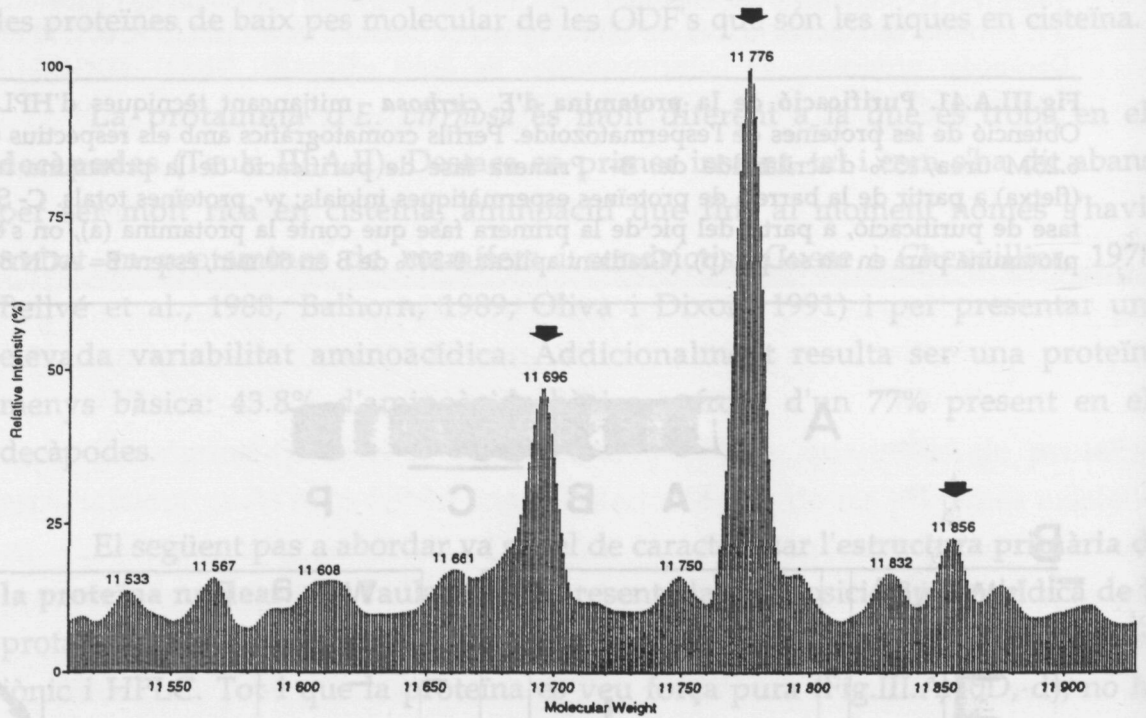


Fig.III.A.42. Espectrometria de masses de la protamina d'*E. cirrhosa* carboximetilada. Destaquen tres pics que corresponen a les tres formes en que es troba la protamina: la majoritària és la forma monofosforilada (11,776 Da), i li segueixen la no fosforilada (11,696 Da) i la difosforilada (11,856 Da).



Un cop la proteïna es va obtenir pura, es va hidrolitzar per conèixer la seva composició aminoacídica. La Taula III.A.III mostra el resultat: com ja vàrem observar en les anàlisis fetes a partir de la protamina menys pura (Taula III.A.II), la proteïna resulta ser molt rica en cisteïna i presenta una elevada variabilitat aminoacídica, éssent una proteïna d'uns 83 residus aproximadament. A més a més, es van aplicar tècniques d'**espectrometria de masses** per conèixer el pes molecular de la protamina; els resultats es mostren a la Fig.III.A.42: s'observen 3 formes de la protamina, d'11,696 Da, 11,776 Da i 11,856 Da, havent-hi una diferència entre elles de 80 Da, pes que correspon al d'un fosfat, el que ens està dient que tenim la proteïna en tres estadis de fosforilació diferents; la forma majoritària de la protamina és la forma monofosforilada (11,776 Da), mentre que la protamina sense fosforilar (11,696

Da) i la difosforilada (11,856 Da) constitueixen formes minoritàries. Aquesta anàlisi d'espectrometria de masses s'ha realitzat sobre la proteïna carboximetilada, el que significa que a la massa de la proteïna se li han addicionat les càrregues pertanyents a la iodacetamida que es troba unida als residus de cisteïna (v. Fig.II.B.8); si les iodacetamides no les tenim en compte, la massa de la protamina nativa (ara sense carboximetilar) resulta ser d'11,013 Da, ja que al pes molecular de la protamina (11,696 Da) se li resta el pes molecular equivalent a 19 iodacetamides (la protamina presenta 19 cisteïnes, com veurem més endavant).

Un cop es coneixen els aminoàcids presents en la proteïna i el seu pes molecular, es va fer la seqüència N-terminal de la protamina, mitjançant degradació automàtica d'Edman. Seqüenciant la proteïna sencera es va arribar a conèixer la seqüència fins al residu 44 aproximadament (Fig.III.A.43); a partir d'aquest residu, la seqüència era dubtosa en moltes posicions, i no es va poder arribar al final. Així doncs, calia tallar la protamina per poder-la seqüenciar al complet.

Fig.III.A.43. Seqüència N-terminal de la Protamina d'*E. cirrhosa*, obtinguda per degradació automàtica d'Edman.

```

      5      10      15      20      25      30
FCGSKPRCRPRCKPRCRSRSKKRCRRCRRR
      35      40
CSRIVKKCCR RRSK ...

```

Degut a la presència d'aminoàcids hidrofòbics en la proteïna, es va procedir a realitzar la **digestió de la protamina** amb un enzim que talla per l'extrem N-terminal d'aquests aminoàcids, la **termolisina**. La proteïna es va digerir amb l'enzim durant 4 hores a 40°C, en presència de bicarbonat d'amoni 0.1M pH 8.0, amb una relació enzim:substrat de 1:50, i la barreja de pèptids resultants de la digestió es va aplicar a una columna d'HPLC (C-18, Vydac) per la seva separació. Un cop separats els pèptids, els més addients es van

seqüenciar (per a la seva elecció ens vàrem basar en la seva composició aminoacídica, v. Taula III.A.III).

La protamina digerida amb termolisina va ser tallada majoritàriament en tres fragments, tal i com la Fig.III.A.44 mostra: un fragment N-terminal (I-Th1) que arriba al residu 33, un fragment intermig (I-Th2) que abarca de la posició 34 a la 60, i el fragment C-terminal (I-Th3) que va del residu 61 al 84. La regió de solapament entre el fragment N-terminal i el fragment mig queda confirmada pel fet de que ja es tenia la seqüència N-terminal de la protamina que confirmava fins al residu 44 (Fig.III.A.43), i perquè es van seqüenciar repetidament pèptids que inclouïen aquesta regió, tornant a verificar la seqüència (no mostrat).

Taula III.A.III. Composició aminoacídica de la protamina d'*E. cirrhosa* sencera, i de dos dels pèptids generats en la digestió amb termolisina: I-Th2 (fragment intermig) i I-Th3 (fragment C-terminal). Valors expressats en nmols.

	Protamina	I-Th2	I-Th3
Lys	24.53	5.01	1.62
Arg	40.50	9.60	2.07
Ser	5.86	1.08	-
Pro	10.50	2.93	0.51
Gly	1.50	-	-
Cys (CM)	19.82	6.11	0.84
Val	1.11	0.67	-
Ile	1.24	0.64	-
Leu	1.54	-	0.24
Phe	1.54	-	-

La seqüència N-terminal assegura la contigüïtat dels pèptids I-Th1 i I-Th2, ja que parcialment els solapa. El problema que es tenia era que no es disposava del solapament entre els pèptids I-Th2 i I-Th3. Tot i així, si es considera que la protamina està formada per la suma dels pèptids I-Th1, I-Th2 i I-Th3, el pes molecular de la protamina a partir de la seqüència coincideix a la

60, amb una massa de 3,777.7 Da (Fig.III.A.46), i un tercer pèptid (II-Th3) que correspon al fragment C-terminal que abarca les posicions 61-84, i que té una massa de 3,430 Da (Fig.III.A.47), resultat clau ja que ens determina la posició en la que la seqüència de la protamina acaba. La massa calculada per espectrometria de masses de la protamina és de 11,696 Da, i resulta ser idèntica a la calculada a partir de la seqüència (Taula III.A.VI). Així doncs, la seqüència sencera de la protamina d'*E. cirrhosa* es dona com a correcta, i és la que es presenta a la Fig.III.A.44. El que destaca de les anàlisis d'espectrometria de masses dels pèptids és que, tant el fragment II-Th1 com II-Th2 presenten dos pics, un corresponent al pèptid no fosforilat, i l'altre amb una addició de 80 Da que correspon al pèptid monofosforilat (massa addicional corresponent a la càrrega d'un fosfat). Aquestes fosforilacions ens poden indicar quines són les serines que estan fosforilades en la protamina (tal i com es veurà més endavant).

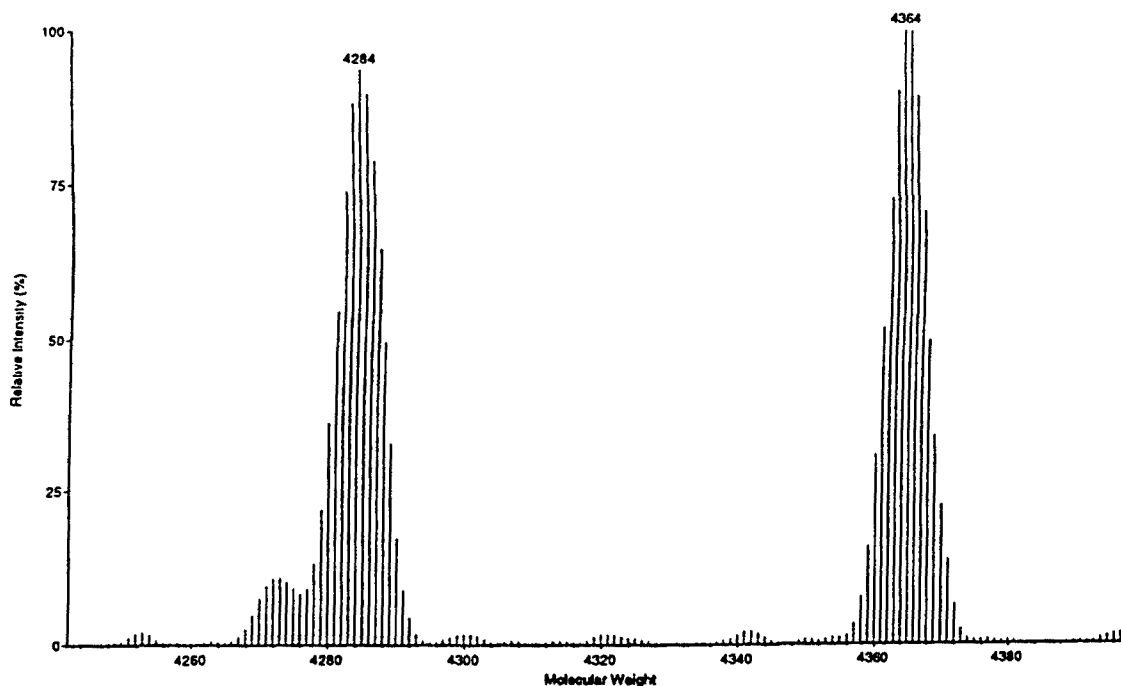
Taula III.A.IV. Pes molecular dels diferents pèptids generats en la digestió de la protamina d' *E. cirrhosa* amb Termolisina. Tant els pèptids com la protamina sencera estan carboximetilats. (PM=pes molecular).

		<u>PM calculat</u> <u>a partir de la seqüència</u>	<u>PM calculat</u> <u>per espectrometria masses</u>
I-Th1	(1-33)	4,526.3 Da	-
I-Th2	(34-60)	3,776.5 Da	3,776.5 Da
I-Th3	(61-84)	3,429.2 Da	-
I-Th1+I-Th2+I-Th3		11,696.1 Da	-
Protamina sencera		11,696.1Da	11,696.0 Da

La protamina d'*E. cirrhosa* presenta tant arginines com lisines com aminoàcids bàsics. Les arginines, en nombre de 31, es troben en alternància amb aminoàcids no bàsics en l'extrem N-terminal de la molècula, fins el residu 20, i a partir d'aquí, es troben agrupades generalment en grups de residus bàsics, grups que poden ser indiferentment homogenis (RR, RRR, RRRRR), com heterogenis (KKR, RKK, KRKKR, RRK). Les lisines, en

nombre de 16, es troben bé aïllades (K), bé en grups de dos (KK) o tres (KKK), i en l'extrem C-terminal es troba formant part d'un grup de 6 aminoàcids bàsics (KRKKKR); si es mira la seva distribució al llarg de la molècula, trobem que de la posició 1-58 hi ha 7 lisines, mentre que de la 59-84 en trobem 9, del que es pot deduir que sembla que hi hagi una lleugera tendència a que s'acumulin en l'extrem C-terminal de la molècula, però és un efecte que no és molt clar.

Fig.III.A.45. Espectrometria de masses del pèptid II-Th1 (1-31) generat en la digestió de la protamina d'*E. cirrhosa* amb termolisina. El pèptid es troba en dues formes diferents de fosforilació, una forma no fosforilada, 4,284 Da, i una monofosforilada, 4,364 Da.

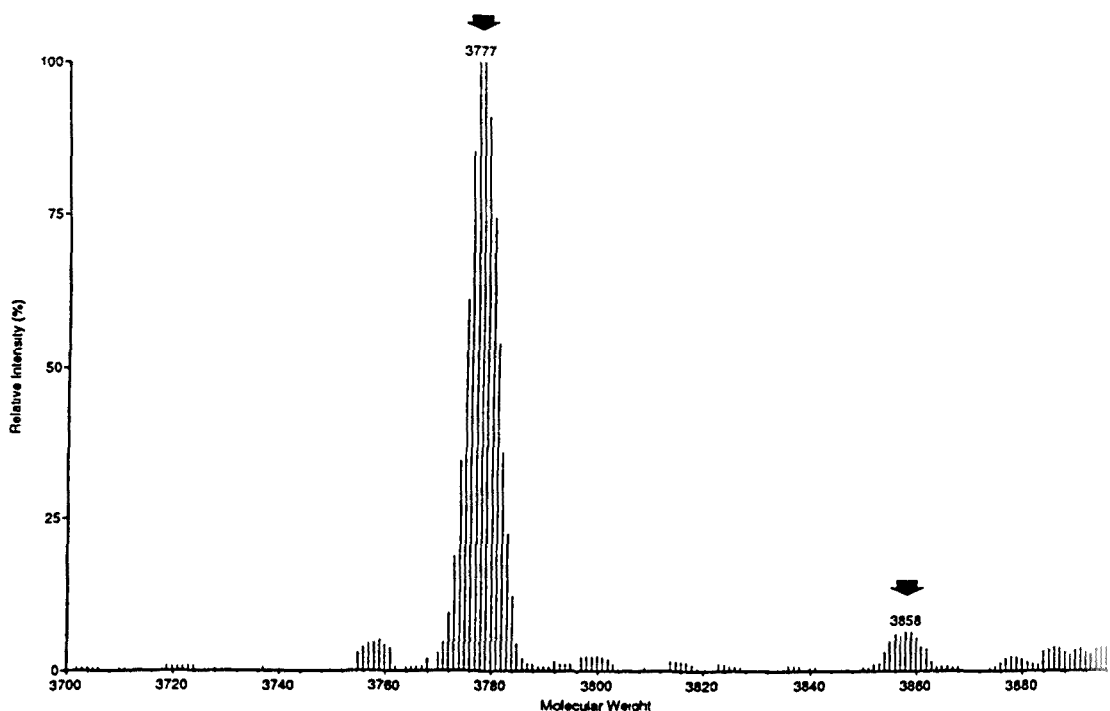


Taula III.A.V. Pes molecular dels pèptids obtinguts en la segona digestió de la protamina d' *E. cirrhosa* amb termolisina. (PM=pes molecular).

		<u>PM calculat</u> <u>a partir de la seqüència</u>	<u>PM calculat</u> <u>per espectrometria masses</u>
II-Th1	(1-31)	4,283.0 Da	4,283.1 Da
II-Th2	(34-60)	3,776.5 Da	3,777.7 Da
II-Th3	(61-84)	3,429.2 Da	3,430.0 Da

Pel que fa referència al **global d'aminoàcids bàsics** presents en la molècula (R+K), la protamina d'*E. cirrhosa* presenta un 56% d'aminoàcids bàsics, percentatge que resulta ser baix si es compara amb el que presenten els decàpodes, com per exemple en la sèpia, on el 77% de la protamina està format només per arginines (Martin-Ponthieu et al., 1991). La distribució d'aquests aminoàcids es podria dividir en dues regions: una primera regió que abarca les posicions 5-21, on tant arginines (R) com lisines (K) es troben alternant amb aminoàcids no bàsics, i una segona regió, que comprèn dels residus 22-84, on tots dos aminoàcids formen part de grups d'aminoàcids bàsics (KKR, RRR, RKK, KRKKKR, entre d'altres). Es de destacar la regió d'alternància *bàsic-no bàsic* prop de l'extrem N-terminal, trobada també en altres protamines, com és el cas de la protamina del gall (Oliva et al., 1991), o la protamina de l'arqueogastròpode *Monodonta turbinata* (Daban et al., 1995), Fig.III.A.48; en aquesta regió es podrien reconèixer possibles motius diversos, com per exemple el motiu (PBCB)₃ (on B és una arginina o lisina), motiu que podria tenir una estructura especial degut a la presència de la prolina (aminoàcid que no permet l'estructura d'alfa hèlix).

Fig.III.A.46. Espectrometria de masses del pèptid II-Th2 (34-60) generat en la digestió amb termolisina de la protamina d'*E. cirrhosa*. Es detecten dues formes del pèptid, una forma majoritària no fosforilada, de 3,777 Da, i una minoritària monofosforilada, de 3,858 Da.



Taula III.A.VI. Composició aminoacídica de la protamina d'*E. cirrhosa* i de dos dels fragments principals generats en la segona digestió amb termolisina. Fragment mig=II-Th2, fragment C-terminal=II-Th3. Valors en nmols. (Entre parèntesi, nombre de residus).

	Protam. sencera	fragment mig (posicions 34-60)	fragment C-terminal (posicions 61-84)
Lys	15.7 (16)	5.1 (5)	6.8 (7)
Arg	30.3 (31)	9.7 (9)	8.6 (9)
Ser	4.3 (5)	1.1 (1)	-
Pro	7.8 (8)	3.0 (3)	2.1 (2)
Gly	1.2 (1)	-	-
Cys (CM)	14.6 (19)	6.2 (7)	3.5 (5)
Val	0.8 (1)	0.7 (1)	-
Ile	0.8 (1)	0.7 (1)	-
Leu	1.1 (1)	-	1.0
Phe	0.9 (1)	-	-
TOTAL	84	27	24
PM espect.	11,696.0	3,777.7±0.9	3,430±0.2
PM seq.	11,696.1	3,776.7	3,429.3

En tota la proteïna hi ha presents 5 serines (representant un 6% del total d'aminoàcids), les quals es troben distribuïdes en la meitat N-terminal de la molècula que, considerant els motius anteriors, coincidirà amb la zona on es regularan les interaccions protamina-DNA. Les 5 Ser es troben dintre d'acúmul d'aminoàcids bàsics, on la fosforilació de les mateixes podria neutralitzar la càrrega d'aquests motius. El fet d'aplicar tècniques d'espectrometria de masses sobre els fragments generats en la segona digestió amb termolisina ens ha permès poder aproximar-nos a saber quines serines estan fosforilades :

El pèptid II-Th1 (1-31) conté tres Ser (Ser4, Ser18 i Ser20); quan es fa espectrometria sobre aquest pèptid es detecten dos pics (Fig.III.A.45), amb una diferència entre ells de 80 Da, el que està indicant que és una d'aquestes tres serines la que està fosforilada.

L'espectrometria de masses de la proteïna sencera ens ha mostrat com la protamina estava en tres estats de fosforilació diferents, una forma no fosforilada, una monofosforilada i una tercera difosforilada (Fig.III.A.42), per tant hi ha dues Ser que són les que estan fosforilades. Els anàlisi d'espectrometria de masses del pèptid II-Th2 (34-60) ens han donat dos pics, també amb una diferència de 80 Da, i aquest fragment té una sola serina, la Ser43, per tant, aquesta és la segona serina que està fosforilada, ja que en el pèptid II-Th3 (61-84) només hi ha un pic que correspon al pèptid no fosforilat (Fig.III.A.47) (es pot comparar la massa a partir de la seqüència i es veu que és la mateixa, v. Taula III.A.V). A més a més, aquesta Ser43 es troba en posició Bàsic-X-Ser, domini que és susceptible a ser fosforilat per part de la quinasa (Shlyapnikov S.V. et al., 1975).

Fig.III.A.47. Espectrometria de masses del pèptid II-Th3 (61-84) generat en la digestió amb termolisina de la protamina d'*E. cirrhosa*.

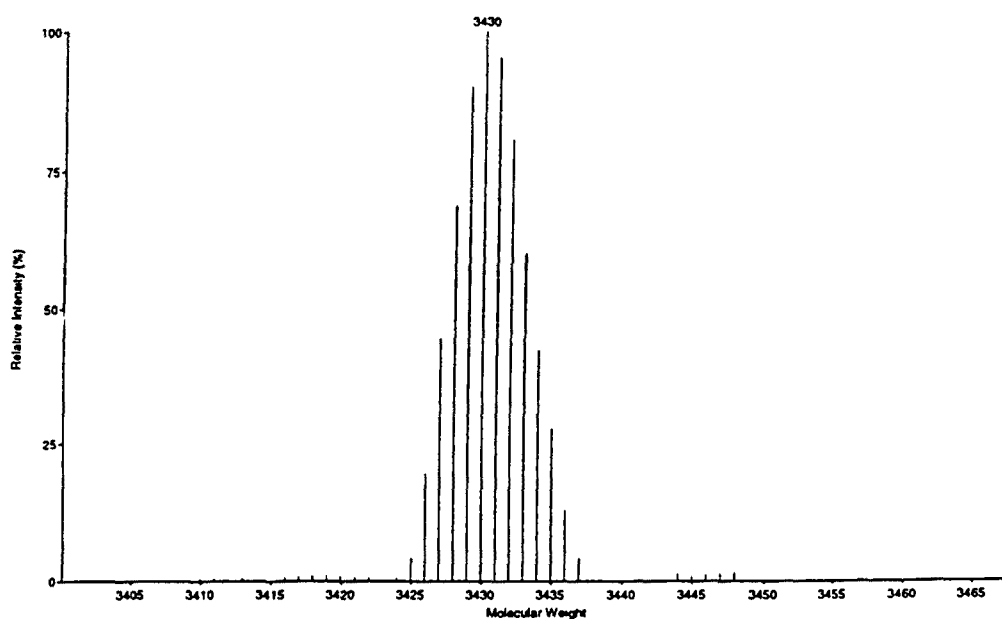


Fig.III.A.48. Seqüència de les protamines del gall, i de l'arqueogastròpode *Monodonta turbinata*. (M.t), on es pot observar l'alternància d'aminoàcids bàsics-no bàsics present en la regió N-terminal. (Extret d'Oliva i Dixon, 1989 i, Daban et al., 1995, respectivament).

Gall

ARYRRSRTRSRSRSPRRRRRRSGRRRSPRRRRRYGSARRSRRSVGGRRRRRYGSRRRRR
RRY

M. t

ARAVRRRRRARSRSRSRKSRSRSRSAKRSASRRRRRSAGRRRRRRRTASRRRRRSASRRR
SVSRRRRRRSRKSRGRRRRGRKVRRRRVKRAGRKGRRRTRRRRRRRARR

Així doncs, a partir de les anàlisi d'espectrometria de masses, sabem que les dues serines que es troben fosforilades són la Ser43 per una banda (tal i com mostra la Fig.III.A.46 complementada amb la Fig.III.A.42), i una de les Ser4-18 o 20 (v. Fig.III.A.45 i Fig.III.A.42). Segons el servidor de proteïnes *PredictProtein*, la Ser43 és una possible diana de fosforilació per part d'una proteïn quinasa depenent de AMPc i GMPc, mentre que la Ser20 ho seria de la proteïn quinasa C.

La cisteïna representa el 22.6% de la protamina (19 cisteïnes en total), valor que resulta ser molt elevat si el comparem amb el de les protamines de mamífers, també riques en cisteïna (per ex. en la P1 de l'home representa un 12%). En la primera part de la molècula (residus 8-31) es troben espaiades de forma més o menys regular (cada 4 aminoàcids aproximadament), més endavant hi ha dos grups CC, i li continua l'hexapèptid CPCPCP, un altre duplet CC, i tres C que les tornem a trobar de forma espaiada al final de la proteïna.

Un altre aminoàcid que es troba en la protamina d'*E. cirrhosa* i que no és molt corrent en les protamines en general, és la **prolina**. Hi ha un total de 7 prolines, de les quals només una (residu 68) es troba enmig d'un grup d'aminoàcids bàsics (KRRPKRR), la resta semblen estar relacionades amb la cisteïna, trobant-les formant part dels motius PRC (3 grups), (CP)₃ (1 grup) i CP

(1 grup). Com s'acaba de dir, és interessant la repetició del motiu (CP)₃ (residus 52-57).

I finalment, apareixen de forma esporàdica els aminoàcids hidrofòbics fenilalanina (F), isoleucina (I), leucina (L) i valina (V), i l'aminoàcid polar glicina (G).

Cal a dir que, els motius d'aminoàcids o possibles relacions discutides en aquesta part, són purament elucubratius, encara que és notable el fet que, en proteïnes que arriben a cert tamany (com és el cas d'*E. cirrhosa*), a prop de l'extrem N-terminal poden aparèixer regions alternants d'aminoàcids bàsic-no bàsic, les quals acostumen a contenir serines. Pensem que és molt possible que aquestes regions puguin estar especialitzades en el control de la interacció protamina-DNA, ja que, en general, les regions C-terminals apareixen molt més desorganitzades presentant una important acumulació de residus bàsics.

La comparació d'aquesta molècula amb les proteïnes dels decàpodes, es farà conjuntament amb la protamina de l'altre octòpode *Octopus vulgaris*, en l'apartat III.B.3.

Un cop es coneix l'estructura primària d'una proteïna, el següent pas que es pot fer és una **predicció de l'estructura secundària** de la mateixa. Per aquesta, també es va utilitzar el servidor *PredictProtein*, utilitzant la metodologia descrita a Rost i Sander (1993 i 1994).

Segons aquesta predicció, la protamina d'*E. cirrhosa* no presenta cap estructura definida per sí mateixa, i no té cap zona que "s'amagui" de l'entorn aquós (v. Annex VI). Això vol dir que la conformació que adoptarà *in vivo* dependrà de la interacció amb el DNA i de la fosforilació. Generalment, una proteïna primer es plega, i després es formen els ponts disulfur intermoleculars que estabilitzaran el plegament i l'estructura de la molècula; en *E. cirrhosa*, sembla ser que la seva protamina no està constituïda per plegar-se per sí mateixa, sinó com un tot interaccionant amb el DNA, de manera que tindriem un sistema en el que protamines i DNA en conjunt, donarien l'estructura concreta del nucli espermàtic.

Aquest servidor ens ha permès veure si hi havia alguna **homologia** entre la protamina d'*E. cirrhosa* i altres proteïnes (v. Annex V). La principal conclusió que s'obté d'aquest estudi és que no es pot parlar clarament d'homologia amb cap proteïna coneguda (almenys enregistrada en el banc de dades), però sí que està molt clar que aquesta protamina posseeix més identitats de seqüència amb les protamines P1 de mamífers que amb cap altra proteïna.

Arribats en aquest nivell, es podria parlar d'una certa convergència entre algunes parts de l'estructura de la protamina d'*E. cirrhosa* i les protamines més simples dels mamífers (concretament les protamines P1). Aquest és un fet curiós, ja que a nivell d'espermatozoide es troba que altres estructures com les ODF's també apareixen esporàdicament en mamífers i cefalòpodes.

4. Convergència parcial de l' espermatozoide d'*Eledone cirrhosa* i dels Mamífers

Els Cefalòpodes es consideren un grup evolucionat dintre dels Mol·luscs. Això significa que han adquirit tota una sèrie d'òrgans més complexes i elaborats per comparació als seus ancestres, i que han desenvolupat un comportament diferent; un exemple és que una de les seves extremitats l'han especialitzat com a òrgan copulador (hectocòtil) amb funció de transferir els espermatòfors des del sac de Needham del propi mascle (on s'emmagatzemen) cap a la cavitat del mantell de la femella.

Sense voler interpretar el significat (o el perquè, si és que existeix), val la pena considerar que alguns trets de l'espermatozoide dels cefalòpodes, i en concret d'*E. cirrhosa*, també presenten una sèrie d'analogies amb els espermatozoides dels mamífers, i que en aquest aspecte, es pot interpretar una **evolució parcial convergent**: en primer lloc, *E. cirrhosa* té fertilització interna, i presenta una cèl.lula espermàtica molt estable, amb uns filaments densos (ODF's) que envolten l'axonema (en els que hi ha una quantitat important de cisteïnes, algunes d'elles estabilitzades per ponts disulfur), i a la vegada ha adquirit una protamina amb una notable proporció de cisteïnes, la major part de les quals, al igual com en els mamífers, es troben unides mitjançant enllaços covalents formant els esmentats ponts disulfur. Totes tres característiques són compartides pels espermatozoides dels mamífers.

És evident que les estructures reproductives, els oòcits i el comportament reproductor d'*E. cirrhosa* són molt diferents als dels mamífers, però aquests punts de convergència que es donen a nivell d'espermatozoide indiquen que, almenys en aquest subjecte (i encara que les cèl.lules espermàtiques i les protamines puguin variar molt entre diferents espècies) hi ha un **nombre limitat d'organitzacions vàlides** que es poden assolir a través de diverses vies evolutives. A més a més, cal tenir en compte que l'evolució actua sobre l'organisme que és un conjunt de gens, i no sobre un gen concret, per tant els canvis es donen simultàniament a diferents nivells.

B. Octopus vulgaris

B- *Octopus vulgaris*

1. Proteïnes nuclears en l'espermatogènesi

a. Breu introducció a l'espermatozoide d'*O. vulgaris*

El primer apartat d'aquest capítol (III.A) ha estat dedicat a l'estudi, tant a nivell cel·lular com a nivell bioquímic, de l'octòpode *Eledone cirrhosa*. Hem pogut veure que aquest cefalòpode presenta característiques molt diferents a les trobades en l'altre grup de cefalòpodes, els decàpodes: un nucli espermàtic espiralitzat i estabilitzat per ponts disulfur deguts a les cisteïnes presents en la protamina que condensa el DNA, protamina que resulta ser molt diferent a les que fins al moment s'havia descrit per les sèpies i calamars, tant pel que es refereix al seu tamany (84 aminoàcids enfront dels 57-58 presents en les sèpies i calamars), com l'elevada variabilitat aminoacídica, i finalment, com ja s'ha mencionat, la riquesa en cisteïnes.

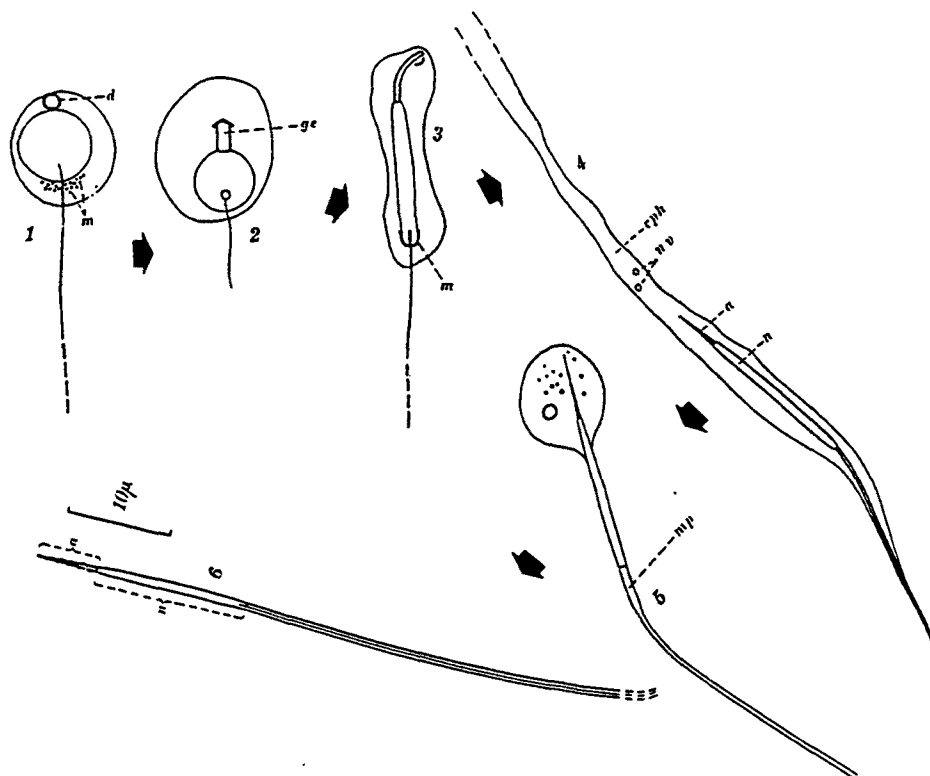
El següent pas a estudiar era veure si aquestes característiques es generalitzaven a nivell d'octòpodes, o bé eren exclusives de l'espècie *E. cirrhosa*, i per això ens decidírem a estudiar un altre octòpode de la mateixa família (*Octopodidae*), *Octopus vulgaris*.

Treballs anteriors indiquen que la biologia de la reproducció d'*O. vulgaris* és diferent a la d'*E. cirrhosa* (Von Orelli, 1962). Se sap que els cefalòpodes presenten un dels braços locomotors modificats com a òrgan copulador (anomenat hectocòtil) que té com a funció la de transferir els espermatòfors (estructures plenes d'espermatozoides) des del sac de Needham on s'emmagatzemen, o bé el sífó, fins a la femella: en el cas d'*E. cirrhosa*, els espermatòfors atravesen l'oviducte i arriben a l'ovari, i és aquí on els espermatozoides es van alliberant/desprenent dels espermatòfors (degut als moviments peristàltics de l'ovari), donant-se la fecundació en la mateixa gònada; la fecundació es dona només quan la gònada femenina està prou madura, els espermatozoides es queden guardats en la mateixa durant relativament llargs períodes de temps (fins a sis setmanes) donant-se la fecundació quan els òvuls maduren. En el cas d'*O. vulgaris*, els espermatòfors resten en l'oviducte, el qual presenta uns replegaments i diverticles, i aquí queden guardats fins que

l'espermatòfor es dissol i allibera a poc a poc els espermatozoides els quals fecundaran als òvuls que arribin a l'oviducte. Així doncs, tot i que la fecundació és interna (a diferència del que ocorre en els decàpodes, on els espermatòfors són alliberats en la cavitat del mantell i immediacions, i per tant fecundació externa), es produeix de diferent manera en totes dues espècies.

L'espermiogènesi d'*O. vulgaris* ha estat estudiada per molts autors (Franzén (1956, 1967, 1970); Galangau i Tuzet (1968a, 1968b), Galangau (1969), Martin et al. (1970), Healy (1989), Koehler (1970), Leik (1970), Longo i Anderson (1970)). Franzén (1967) va estudiar a nivell de microscòpia electrònica l'espermiogènesi d'*O. vulgaris* : les espermàtides tempranes són unes cèl.lules rodones amb un nucli també rodó, que presenten un complex de Golgi format per 2 o 3 dictiosomes i un vacuol, disposats en un pol de la cèl.lula, i en el pol oposat hi ha els mitocondris i un filament que surt de dintre del nucli i que dóna lloc a la cua, Fig.III.B.1.

Fig.III.B.1. Espermiogènesi del cefalòpode *O. vulgaris* tret de Franzén (1967). 1, 2- Espermàtides tempranes; 3, 5- Espermàtides avançades; 6- Espermatozoide madur. d- dictiosoma; m- mitocondris; ge- complex de Golgi; cph- citofor; nv- vacuols; a- acrosoma; n- nucli; mp- peça mitja.



En un estadi més avançat els dictiosomes es fusionen entre ells, i més tard al vacuol, formant un vacuol major que donarà lloc a l'acrosoma (esfèric en un principi, més tard cònic i finalment espiralitzat), i al mateix temps sofrirà un procés d'elongació juntament amb el nucli; mentre el nucli s'allarga, el DNA es condensa, i com a conseqüència hi ha una disminució del volum nuclear; a la base del nucli, els mitocondris, en número de 6, es disposen paral·lels a ell. L'elongació tant de l'acrosoma com del nucli fa que tot el conjunt adquireixi una forma com de vareta, al igual que succeïa a *E. cirrhosa*. La diferència important que hi ha és que aquí no hi ha cap procés de torsió, ni tampoc de posterior espiralització nuclear, i que la longitud de la vareta és més limitada (8 µm).

Durant el procés d'elongació i condensació del nucli, el citoplasma va éssent expulsat cap a l'exterior, en la part apical de la cèl.lula (igual com ocorre a *E. cirrhosa*), de tal manera que les espermatides queden en contacte les unes amb les altres mitjançant aquest citoplasma comú residual, tenint orientats els acrosomes cap al centre del mateix, disposant-se totes elles de forma radial. Aquest citoplasma residual és ric en grànuls densos, uns punts marronosos, cosos refractants i vesícules neutres.

L'espermatozoide madur queda com indica la mateixa Fig.III.B.1: el nucli té forma de vareta cilíndrica, i l'acrosoma està espiralitzat (presentant de 5 a 5.5 voltes en direcció horària) i conté una estructura interna cònica amb una periodicitat de bandes (Selmi 1996). El citoplasma recobreix en una fina capa al filament (cua), capa que resulta ser més translúcida que la present en la peça mitja; al mateix temps, la peça mitja conté els microtúbuls disposats en forma de veina que envolta la base del nucli, mitocondris que també es troben en *E. cirrhosa*.

Franzén (1967) va dir en el seu moment que els primers estadis de l'espermioogènesi d'*O. vulgaris* i *E. cirrhosa* eren similars (això queda corroborat amb els nostres estudis), i va proposar que era molt probable que l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* provingués de l'espermatozoide d'*Octopus*, éssent l'espermatozoide d'*E. cirrhosa* un espermatozoide més evolucionat. En aquest primer apartat estudiem el contingut proteic nuclear de l'espermatozoide d'*O. vulgaris* al llarg de l'espermatogènesi, i comparem el contingut present en l'espermatozoide madur amb el contingut en *E. cirrhosa*, així com en la resta de cefalòpodes, en especial els decàpodes.

Per veure còm es donava el recanvi proteic en l'octòpode *O. vulgaris* al llarg de l'espermatogènesi, varem decidir obtenir nuclis amb diferents estadis de maduresa i estudiar el seu contingut proteic, agafant des de les fases més immadures (nuclis de cèl.lules gonadals), fins a nuclis d'espermatozoides madurs presents en els espermatòfors.

Es va partir de **gònades immadures** per obtenir el conjunt de nuclis de diferents tipus cel.lulars que es troben durant l'espermatogènesi. Les gònades s'homogeneïtzen enfront de tampó A1 (sacarosa 0.25M, CaCl₂ 5mM, Tris-HCl 10mM pH 7.0, i clorur de benzamidina 10mM com a inhibidor proteolític), que proporciona un medi isosmòtic degut a la presència de la sacarosa. Un cop les cèl.lules han quedat disgregades, la solució es filtra per eliminar restes, i es procedeix a l'obtenció dels nuclis cel.lulars tal i com s'explica a l'apartat II.B.1.b.ii.

Un cop es té el conjunt de **nuclis de les diferents fases de l'espermatogènesi** aïllats, es procedeix a l'extracció de les seves proteïnes. El que es vol obtenir és la dotació global de proteïnes nuclears, així que es farà una extracció global amb HCl 0.4N. Les proteïnes solubles, es precipiten amb acetona i s'assequen. Aquestes es preparen amb tampó de mostres per un GPAU i es corren en electroforèsi. La Fig.III.B.3, pou *a*, mostra les proteïnes totals extretes dels nuclis gonadals. Com es pot veure, trobem majoritàriament una elevada quantitat d'histones, i una sèrie de proteïnes minoritàries que presenten una mobilitat electroforètica major en aquest tipus de gel.

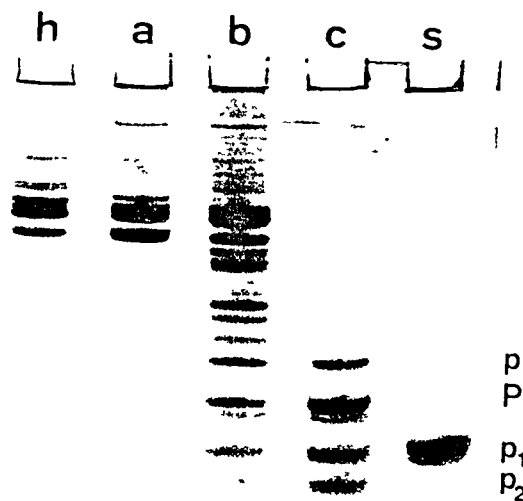
Aquesta és la dotació proteica nuclear present en una barreja tant de fases madures com immadures (amb preferència) de l'espermatogènesi. El següent pas va ser aïllar les **fases més madures (espermàtides avançades i espermatozoides gonadals)**, per purificar els seus nuclis i veure l'evolució del seu contingut proteic.

Vàrem partir de gònades de les que es van aïllar els nuclis i es van separar els nuclis immadurs dels nuclis de les espermàtides avançades i espermatozoides gonadals, basant-nos en el fet de que aquests últims són resistents a tractaments mecànics (al presentar un nucli més compacte degut a la presència de proteïnes bàsiques especials, diferents a les histones presents en les fases poc avançades), de manera que si es sotmet la mostra a un xoc hipotònic i a una sonicació enèrgica, els nuclis de cèl.lules poc avançades es trenquen completament, quedant dissolts,

mentre que els nuclis de les cèl·lules més avançades es recuperen per centrifugació a baixa velocitat (Platz i Mestrich, 1977). A partir dels nuclis d'espermàtides avançades i espermatozoides gonadals, obtinguts després de varies homogeneïtzacions enèrgiques, curtes centrifugacions (1,900 g, 5 min), sonicació i una centrifugació amb un coixí de sacarosa 2.0M (17,700 g, 25 min), es van solubilitzar les seves proteïnes amb HCl 0.4N, es van precipitar amb acetona i assecar per fer una anàlisi electroforètica; el resultat es veu en la Fig.III.B.3, pou *b*.

Les espermàtides avançades i espermatozoides gonadals presenten histones i una sèrie de proteïnes de major mobilitat electroforètica. El fet de que aquestes últimes proteïnes es trobin en baixa quantitat en els nuclis gonadals totals i la seva proporció incrementi considerablement en els nuclis espermiogènics més avançats significa que són proteïnes específiques d'aquests nuclis, i que per tant representen molècules que progressivament van substituint les histones.

Fig.III.B.3. Proteïnes nuclears d'*Octopus vulgaris* durant l'espermatogènesi. Obtenció de les proteïnes a partir de gònades (a), d'espermàtides avançades i espermatozoides gonadals (b), i d'espermatozoides madurs (epidídims) (c). El carril h i s són estàndards d'histones i salmina, respectivament. El gel és un GPAU 6.25M d'urea/15 % d'acrilamida.

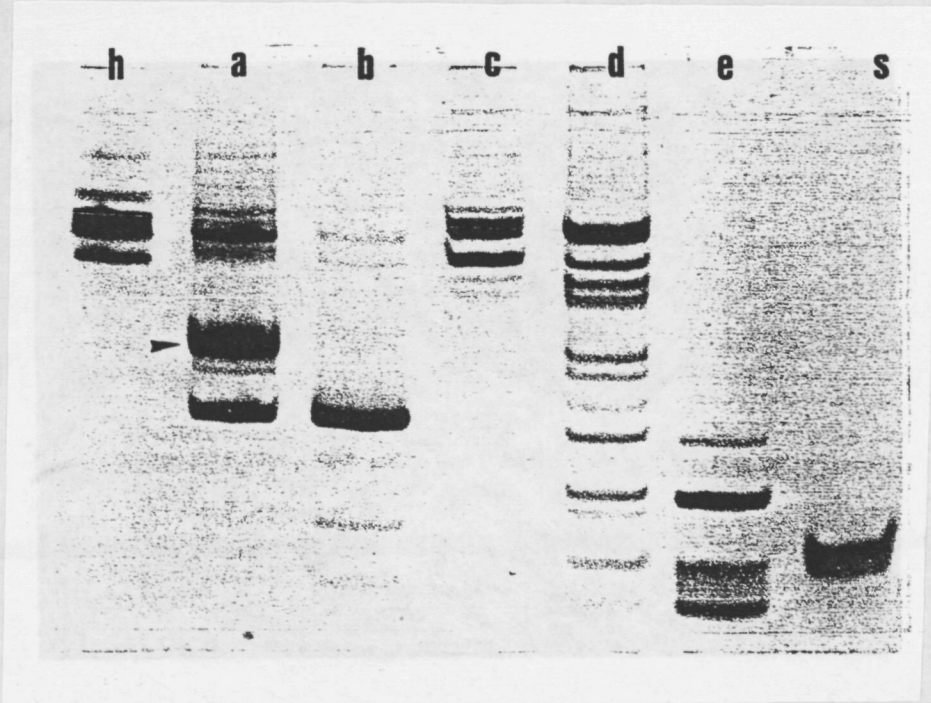


Per últim, es van obtenir les proteïnes presents en el nucli de l'**espermatozoide madur**, purificant nuclis d'espermatozoides a partir d'epidídims. Aquests espermatozoides es van homogeneïtzar amb tampó A1, filtrant i centrifugant diverses vegades; un cop obtingut un sediment ric en nuclis on hi ha la presència de cues (contaminació), es va tornar a homogeneïtzar per eliminar part de les cues, però aquest cop amb NaCl 0.4N (en Tris-HCl 10mM pH8.8 i clorur de benzamidina 25mM) i centrifugar (4,400 g, 5 min), obtenint un sediment que es va reduir amb β -mercaptoetanol 1M (en NaCl 0.4N, Tris-HCl 10mM pH 8.8 i clorur de benzamidina 25mM), de manera que així aconseguíem reduir i eliminar les restes de cues. Un cop els espermatozoides s'han incubat dos cops amb aquesta solució reductora, es centrifuguen (1,900 g, 5 min), i s'obté un sediment ric en nuclis.

Els **nuclis** es van extreure amb HCl 0.4N, i les proteïnes solubles es van precipitar amb acetona, i posteriorment assecar. Per conèixer la dotació proteica dels espermatozoides madurs, les proteïnes es van córrer en un GPAU, el resultat del qual es veu a la Fig.III.B.3, *pou c*. En aquest cas els nuclis no tenen histones, i les proteïnes que presentaven una elevada mobilitat electroforètica han donat pas a només **4 proteïnes**, una de menor mobilitat i quantitat (*p*), i tres de major mobilitat (**P, p1 i p2**) que migren aproximadament com la salmina (protamina típica).

En els nuclis gonadals totals hem trobat histones, i a mida que hem avançat en l'espermioogènesi les histones han estat substituïdes per un conjunt de proteïnes amb migració electroforètica intermèdia entre les histones i les protamines típiques (salmina) les quals, en l'espermatozoide madur han donat lloc a 4 proteïnes, de les que destaquen 3 (per trobar-se en major quantitat, **P, p1 i p2**). Tot aquest procés ens està suggerint que el recanvi proteic durant l'espermioogènesi d'*O. vulgaris* es dona d'una manera gradual: de formes immadures cap a més madures tenim que Histones \rightarrow proteïnes intermèdies \rightarrow Protamines (proteïnes finals que migren com les protamines típiques), procés equivalent al trobat en els decàpodes (Fig.III.B.4), on les proteïnes intermèdies són les formes precursoras de l'única protamina final trobada en els espermatozoides (la qual presenta dues variants) (Wouters-Tyrou et al., 1995); en el cas d'*O. vulgaris*, la situació sembla ser més complexa, ja que hi ha moltes proteïnes intermèdies i no només una proteïna final.

Fig.III.B.4. Canvis en la composició proteica nuclear durant l'espermioogènesi del calamar *Loligo* sp. GPAU 6.25M urea/15% acrilamida de les proteïnes pertanyents a gònades madures (a) (la fletxa assenyalada al precursor de la protamina), i espermatozoides (b). Comparació amb el que ocorre amb *Octopus vulgaris*: gònades immadures (c), gònades madures (d), i espermatozoides (e). h- estàndard d'histones; s- salmina (estàndard de protamina).



Fins aquí hem vist que el nucli de l'espermatozoide madur presenta 4 proteïnes, una minoritària (p), i tres majoritàries, éssent la protamina P més abundant que les protamines p_1 i p_2 . Hem fet més obtencions de proteïnes espermàtiques a partir de nuclis d'espermatozoides madurs i no sempre s'han reproduït els resultats en quan a la presència de la proteïna p : aquesta proteïna no surt en quantitats reproduïbles en les diferents mostres observades i fins i tot, en algunes d'elles pràcticament no apareix.

La proteïna p , tal i com veurem més endavant, correspon a una molècula precursora i diem això *a priori* pel fet de que és relativament comú trobar restes de precursors de protamines en els espermatozoides madurs (Debarle et al., 1995). Així doncs, considerarem que el nucli espermàtic presenta 3 protamines, una protamina P que és la principal, i dues protamines minoritàries, p_1 i p_2 .

Per obtenir més informació de les proteïnes presents en l'espermatozoide, es van separar mitjançant diferents tècniques de cromatografia, per fer una posterior anàlisi i veure si existia alguna relació entre elles.

2. Caracterització de les Protamines

a. Purificació de les proteïnes del nucli espermàtic

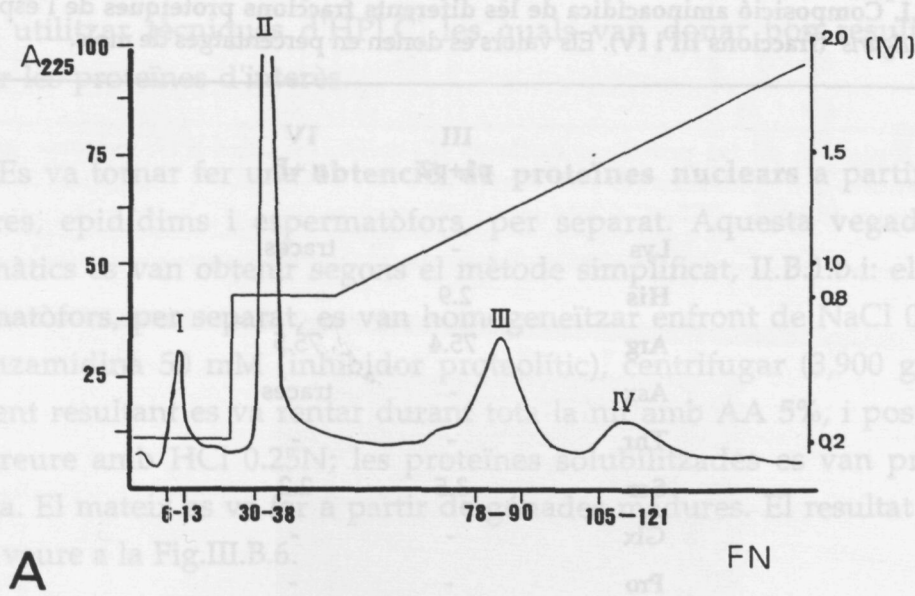
Un primer mètode utilitzat per purificar les proteïnes nuclears de l'espermatozoide d'*O. vulgaris* va ser la cromatografia de bescanvi iònic.

A partir d'epidídims i espermatòfors es van purificar nuclis espermàtics per extreure les seves proteïnes. Aquestes es van preparar per ser carregades en una columna de bescanvi iònic de carboximetilcel·lulosa (CM-52); les proteïnes liofilitzades es van dissoldre en tampó acetat sòdic 50 mM i NaCl 0.2N a pH 6.0, i es van carregar en la columna, treballant a un flux de 35 ml/h; es va fer un primer rentat amb el mateix tampó, continuat d'un segon de major força iònica (NaCl 0.8N), de manera que així aconseguíem desenganxar de la matriu les proteïnes contaminants. Posteriorment es va aplicar un gradient de NaCl de 0.8N a 2.2N, per eluir les proteïnes unides amb major força a la columna. En tot moment les fraccions recollides eren aproximadament d'1 ml.

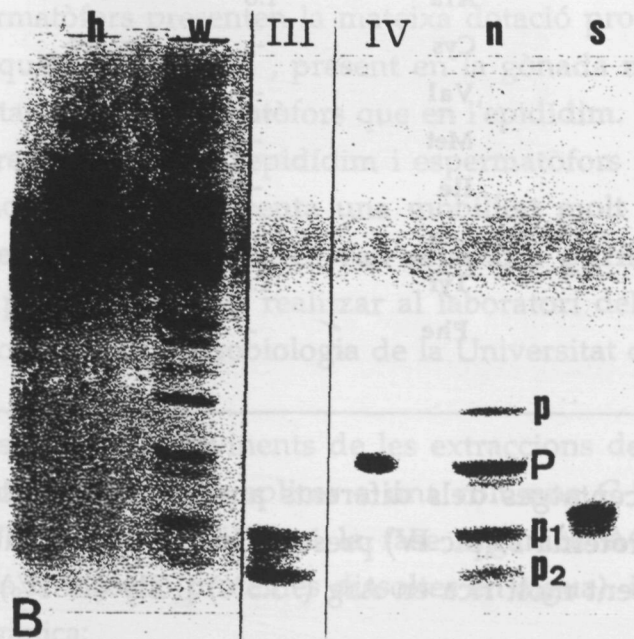
Es van obtenir un total de 4 pics (Fig.III.B.5A). De cadascun es va prendre una alíquota, i es va precipitar amb TCA per veure el contingut proteic. Les proteïnes precipitades i assecades al buit van ser carregades en un GPAU (Fig.III.B.5B). Va ser durant el gradient de NaCl 0.8N → 2.2N que varen sortir les proteïnes espermàtiques bàsiques: primer es van eluir les proteïnes p1 i p2 juntes (pic III), i després la proteïna P també conjuntament amb la proteïna p (encara que al gel es veu poc) (pic IV). El que les proteïnes p1 i p2 s'elueixin abans en aquest tipus de cromatografia ens està indicant que aquestes proteïnes són una mica menys bàsiques que la protamina P.

El fet de que la proteïna p i la P no s'hagin separat en la columna es deu a que totes dues proteïnes han de ser similars en quant a composició bàsica d'aminoàcids, pel que queden enganxades amb la mateixa força a la columna, i per tant s'elueixen juntes, i el que es separin en el GPAU es deu a que tenen diferent pes molecular, éssent la proteïna p de major tamany. I el mateix es podria dir pel cas de p1 i p2, totes dues han de ser semblants en quan a càrrega però diferents en quan a tamany, éssent la p2 més petita que la p1.

Fig.III.B.5. Separació de les proteïnes nuclears d'*O. vulgaris* per cromatografia de bescanvi iònic (CM-52). A- Representació dels pics eluïts en els rentats i en el gradient de NaCl aplicat (veure text); A₂₂₅- absorció a 225 nm (%), [M]- concentració molar, FN- número de fracció recollida. B- GPAU 6.25M urea/15% acrilamida dels pics de la cromatografia III i IV; h- estàndard d'histones, w- estàndard de les proteïnes presents en les fases avançades de l'espermioquèsi (espermatides avançades i espermatozoides gonadals), n- estàndard de les proteïnes presents en nuclis espermàtics madurs, s- estàndard de protamina típica (salmina).



A



B

Les fraccions corresponents a les protamines es van dialitzar enfront d'aigua, i liofilitzar, per la seva posterior conservació. Un estudi complementari a aquests resultats va ser el de fer la seva **composició aminoacídica**.

Les proteïnes dels pics III i IV liofilitzades es van hidrolitzar i els aminoàcids resultants es van detectar i quantificar. Els resultats es presenten en la Taula III.B.I.

Taula III.B.I. Composició aminoacídica de les diferents fraccions proteiques de l'espermatozoide d'*Octopus vulgaris* (fraccions III i IV). Els valors es donen en percentatges de mols.

	III p1+p2	IV p+P
Lys	-	traces
His	2.9	-
Arg	75.4	75.5
Asx	-	traces
Thr	-	-
Ser	3.5	2.2
Glx	-	-
Pro	-	-
Gly	15.2	17.1
Ala	1.6	-
Cys	-	traces
Val	-	traces
Met	-	-
Ile	-	traces
Leu	-	traces
Tyr	1.5	5.2
Phe	-	traces

Els percentatges dels diferents aminoàcids en els pics III i IV són molt similars. La **proteïna P** (pic IV) presenta baixa variabilitat aminoacídica (Arg, Gly, Tyr i Ser), éssent molt rica en Arg (75.5%) i Gly (17.1%) (aquí estem considerant

que la major part del pic IV està format per la protamina P). Les proteïnes p1 i p2 (pic III) també són proteïnes molt bàsiques, amb un elevat contingut en Arg (75.4%) i Gly (15.2%), també presenten Ser com la protamina P, i a diferència d'aquesta, tenen menys Tyr (1.5% enfront d'un 5.2% de la protamina P) i presenten un aminoàcid addicional, l'Ala, aminoàcid hidrofòbic.

La cromatografia de bescanvi iònic ens va permetre tenir una idea aproximada de com eren les proteïnes presents en el nucli espermàtic, però no ens va permetre obtenir pures totes quatre proteïnes. Amb aquesta finalitat vàrem utilitzar tècniques d'HPLC, les quals van donar bon resultat alhora de separar les proteïnes d'interès.

Es va tornar fer una **obtenció de proteïnes nuclears** a partir de gònades madures, epidídims i espermatozòfons, per separat. Aquesta vegada, els nuclis espermàtics es van obtenir segons el mètode simplificat, II.B.1.b.i: els epidídims i espermatozòfons, per separat, es van homogeneïtzar enfront de NaCl 0.15N i clorur de benzamidina 50 mM (inhibidor proteolític), centrifugar (3,900 g, 5 min), i el sediment resultant es va rentar durant tota la nit amb AA 5%, i posteriorment es va extreure amb HCl 0.25N; les proteïnes solubilitzades es van precipitar amb acetona. El mateix es va fer a partir de gònades madures. El resultat de l'obtenció es pot veure a la Fig.III.B.6.

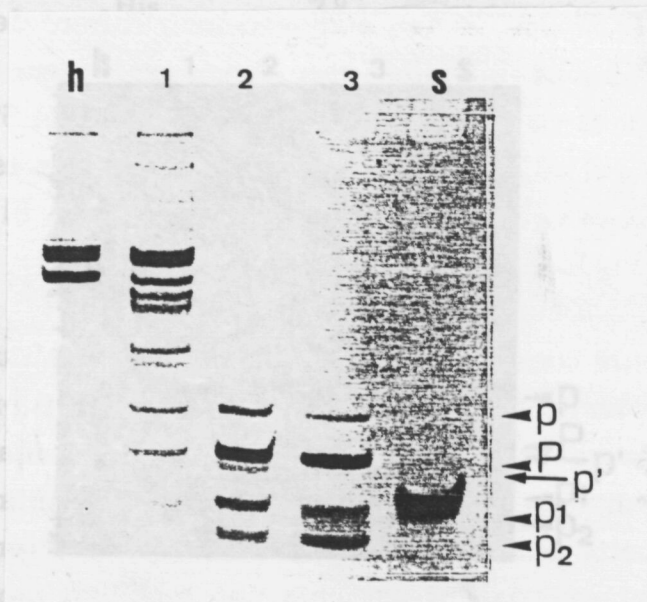
Podem veure com les obtencions de les proteïnes nuclears espermàtiques d'epidídims i espermatozòfons presenten la mateixa dotació proteica (p , P, p1 i p2), amb la diferència que la proteïna p , present en la gònada madura, es troba en molt menys quantitat en els espermatozòfons que en l'epidídim. Les proteïnes de les gònades i les quatre proteïnes de l'epidídim i espermatozòfons juntament amb una proteïna molt minoritària que presenta una mobilitat molt propera a la de la protamina P (i que anomenarem p'), es van **separar i purificar per tècniques d'HPLC**. Aquesta purificació es va realitzar al laboratori del Dr. Joan Ausió, al Departament de Bioquímica i Microbiologia de la Universitat de Victoria, Canadà.

Les proteïnes nuclears provinents de les extraccions de gònades madures, epidídims i espermatozòfons es van aplicar a una columna C-18 (Vydac). L'agent contra-ió va ser TFA 0.1% en aigua, i la fase orgànica ACN 100%. Es feien injeccions d'1 ml de la mostra (proteïnes dissoltes en aigua), i s'eluen aplicant el gradient de fase orgànica:

0-0%	0-5'
0-60%	5-95'
60-80%	95-105'
80-0%	105-115'

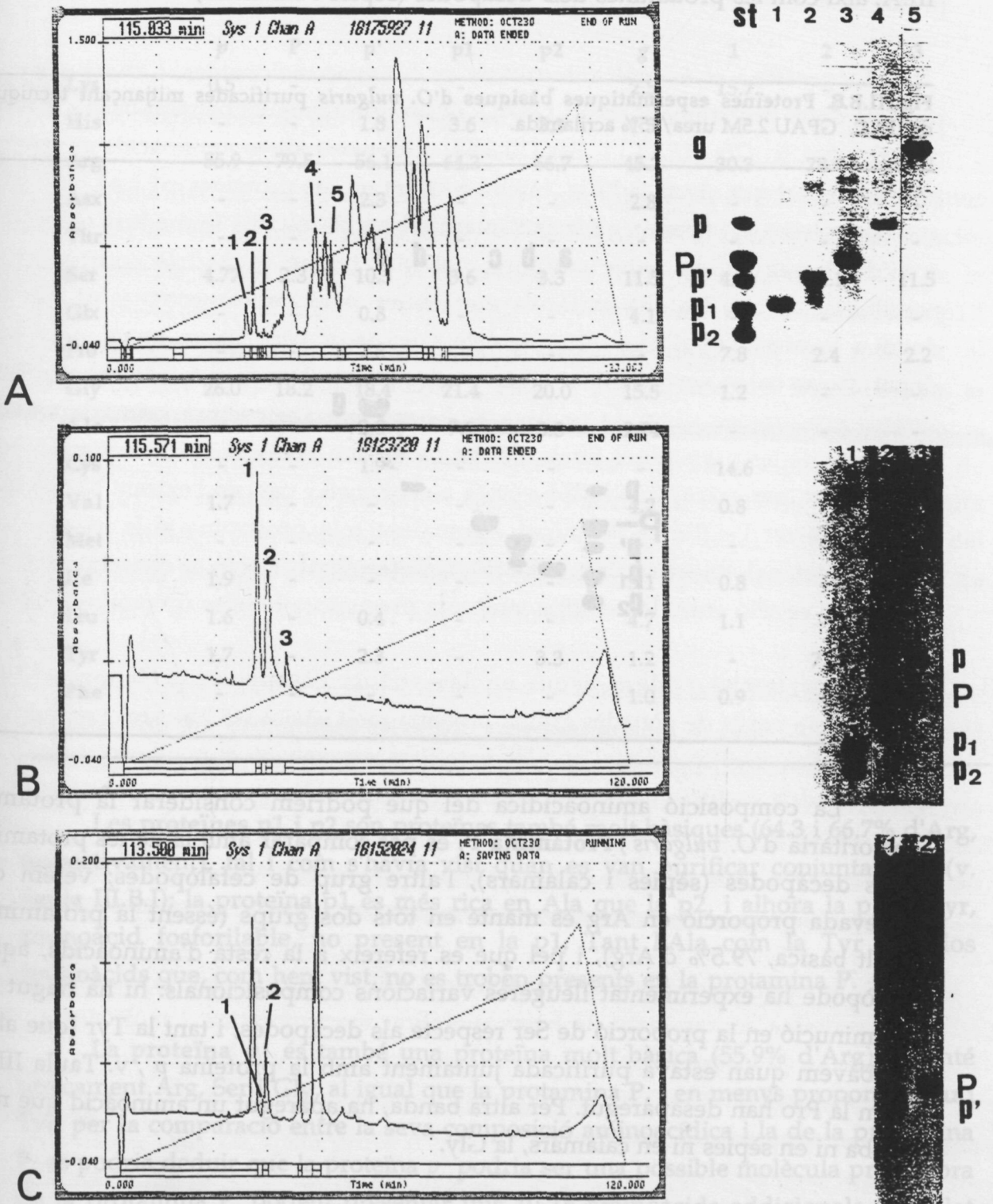
treballant amb una sensibilitat de 0.1 V (podent-la variar en funció de la concentració de la mostra, oscil·lant de 0.1 a 1 de menys a més concentrada), detectant els pics a una absorbància de 230 nm, i col·lectant-los manualment. Una petita quantitat de cada pic es va preparar per córrer en un GPAU. El resultat es pot veure a la Fig.III.B.7.

Fig.III.B.6. Obtenció de les proteïnes nuclears d'espermatozoides d'*O. vulgaris* provinents de gònades madures (1), epidídims (2) i espermatòfors (3). h- estàndard d'histones; S- estàndard de protamina típica (salmina). GPAU 6.25M urea/15% acrilamida.



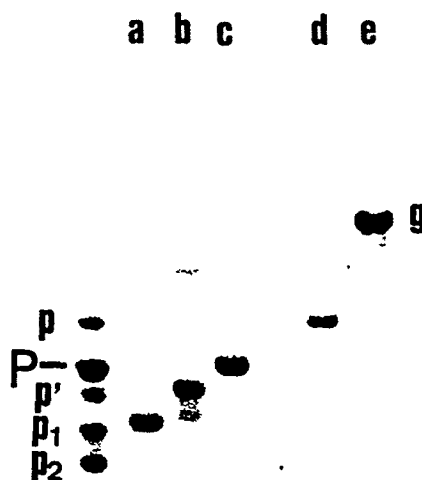
D'aquesta manera vàrem arribar a purificar les 4 proteïnes majoritàries presents en el nucli espermàtic, la proteïna p', i una proteïna de molt baixa mobilitat electroforètica obtinguda a partir de les gònades i que anomenarem g, (v. també Fig.III.B.8).

Fig.III.B.7. HPLC de les protamines d'*O. vulgaris* presents en la gònada madura (A), epidídim (B) i espermatòfors (C) amb els respectius GPAU 2.5M urea/15% acrilamida dels pics. st- estàndard de protamines d'*O. vulgaris*.



El següent pas va ser l'anàlisi d'aminoàcids de cadascuna de les proteïnes, per conèixer *a priori* la seva composició aminoacídica abans de la seva seqüenciació. En la Taula III.B.II podem comparar els resultats obtinguts en *O. vulgaris* amb la protamina d'*E. cirrhosa*, l'altre octòpode estudiat en l'apartat III.A, així com les protamines dels decàpodes (sèpies i calamars).

Fig.III.B.8. Proteïnes espermàtiques bàsiques d'*O. vulgaris* purificades mitjançant tècniques d'HPLC. GPAU 2.5M urea/15% acrilamida.



La composició aminoacídica del que podríem considerar la protamina majoritària d'*O. vulgaris*, **Protamina P**, es pot comparar amb la de les protamines dels decàpodes (sèpies i calamars), l'altre grup de cefalòpodes; veiem com l'elevada proporció en Arg es manté en tots dos grups (éssent la protamina P molt bàsica, 79.5% d'Arg), i pel que es refereix a la resta d'aminoàcids, aquest octòpode ha experimentat lleugeres variacions composicionals: hi ha hagut una disminució en la proporció de Ser respecte als decàpodes, i tant la Tyr (que abans trobàvem quan estava purificada juntament amb la proteïna *p*, v. Taula III.B.I) com la Pro han desaparegut. Per altra banda, ha aparegut un aminoàcid que no es troba ni en sèpies ni en calamars, la Gly.

Taula III.B.II. Composició aminoacídica de les diferents proteïnes pures de l'espermatozoide d'*O. vulgaris* (*p*, *P*, *p'*, *p1*, *p2* i *g*), de la protamina d'*E. cirrhosa* (1), i de les protamines de dos decàpodes, el calamar *Loligo pealii* (2) i la sèpia *Sepia officinalis* (3). Els valors es donen en percentatge de nmols.

	<i>p</i>	<i>P</i>	<i>p'</i>	<i>p1</i>	<i>p2</i>	<i>g</i>	1	2	3
Lys	0.5	-	-	-	-	2.5	15.7	-	-
His	-	-	1.8	3.6	3.3	1.5	-	-	-
Arg	55.9	79.5	56.1	64.3	66.7	45.2	30.3	78.0	77.1
Asx	-	-	2.3	-	-	2.8	-	-	-
Thr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	4.77	2.3	10.3	3.6	3.3	11.5	4.3	12.1	11.5
Glx	-	-	0.8	-	-	4.1	-	-	-
Pro	-	-	2.8	-	-	-	7.8	2.4	2.2
Gly	26.0	18.2	18.4	21.4	20.0	15.5	1.2	-	-
Ala	-	-	2.8	7.1	3.3	2.74	-	-	-
Cys	-	-	1.9	-	-	-	14.6	-	-
Val	1.7	-	-	-	-	4.2	0.8	-	-
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	1.9	-	-	-	-	3.1	0.8	-	-
Leu	1.6	-	0.4	-	-	4.7	1.1	-	-
Tyr	1.7	-	2.3	-	3.3	1.2	-	7.3	9.1
Phe	-	-	-	-	-	1.0	0.9	-	-

Les proteïnes *p1* i *p2* són proteïnes també molt bàsiques (64.3 i 66.7% d'Arg, respectivament), tal i com s'havia vist quan es van purificar conjuntament (v. Taula III.B.I); la proteïna *p1* és més rica en Ala que la *p2*, i alhora la *p2* té Tyr, aminoàcid fosforilable, no present en la *p1*. Tant l'Ala com la Tyr són dos aminoàcids que, com hem vist, no es troben presents en la protamina P.

La proteïna *p* és també una proteïna molt bàsica (55.9% d'Arg), i conté bàsicament Arg, Ser i Gly, al igual que la protamina P, i en menys proporció Leu i Tyr; per la comparació entre la seva composició aminoacídica i la de la protamina P, es podria deduir que la proteïna *p* podria ser una possible molècula precursora de la protamina P, podent presentar uns 10-15 aminoàcids addicionals (calculat

segons la diferent mobilitat electroforètica); aquesta hipòtesi quedaria recolçada pel fet de que aquesta proteïna *p* està present en la gònada madura i en l'epidídim, i desapareix (o millor dit, es troba en molt baixa quantitat) en l'espermatòfor. Aquest aspecte, però, es veurà en l'apartat de seqüenciació de les protamines.

La proteïna *p'* és molt minoritària en els espermatozoides, i migra sempre per sota de la protamina P en els GPAU; és una proteïna també molt bàsica (56.1% d'Arg) i rica en Gly (18.4%) i Ser (10.3%), presentant altres aminoàcids en menor proporció, del que destaca l'Ala, també present en les proteïnes *p1* i *p2*. Al igual que la proteïna *p*, apareix en major quantitat en els estadis immadurs (gònada i epidídim) que en els espermatòfors, pel que també es podria considerar la possibilitat de que fós una molècula precursora, però de les proteïnes *p1* i/o *p2*, degut a la presència d'Ala. (El tema dels precursors però, és un tema complicat, degut a que solen ser proteïnes d'elevat pes molecular i per tal de saber si són formes precursoras s'han de seqüenciar i comparar l'estructura primària amb la seqüència de les protamines finals, i el fet de ser tan grans fa difícil seqüenciar-les; de vegades, per exemple, s'arriba només a seqüenciar part de l'extrem N-terminal sense conèixer l'extrem C-terminal, equivalent a la protamina si la modificació postraduccional ha estat una delecció amioterminal, i com a conseqüència no s'obté cap relació entre la possible molècula precursora i la/les protamina final).

Com també podem veure en les anàlisi d'aminoàcids, la proteïna *g* purificada a partir de gònades és una proteïna molt bàsica (45.2% Arg) i rica en Gly (15.5%) i Ser (11.5%) al igual que les proteïnes presents en el nucli espermàtic, del que es podria deduir que possiblement sigui una molècula precursora d'alguna de les protamines finals trobades en l'espermatozoide madur, hipòtesi que quedaria recolçada pel fet de que només apareix en la gònada i no en epidídim i espermatòfors.

En algunes obtencions realitzades d'SNBP's d'espermatòfors hem obtingut una proteïna contaminant de baixa mobilitat electroforètica, i molt rica en Asp, Glu, Lys i Gly, éssent molt pobre en Arg, i per tant molt poc bàsica (no mostrat). Desconeixem la causa per la qual surt i si pertany a l'espermatozoide o bé és un contaminant dels espermatòfors.

Un cop se sap la composició aminoacídica de cadascuna de les proteïnes presents en el nucli espermàtic, i per tant es tenen les proteïnes pures, es va procedir a conèixer i estudiar l'estructura primària de les mateixes, la seva seqüència.

b. Seqüència de les Protamines

Considerant la Protamina P i les Protamines p1 i p2 les protamines majoritàries en el nucli espermàtic, es va abordar a la seva seqüenciació, sotmetent-les a tota una sèrie d'etapes per la seva caracterització. Part de la seqüenciació de la protamina P i les seqüències complertes de les protamines p1 i p2, així com una part de les espectrometries de massa, es van realitzar al laboratori del Dr. J. Vandekerckhove, amb la participació del Dr. C. Buesa, al Departament de Bioquímica de la Facultat de Medicina, Universitat de Gante (Bèlgica). La seqüenciació dels precursors i tota la resta d'espectrometries de massa, es va realitzar al laboratori del Dr. Pierre-Eric Sautière, al Laboratoire d'Endocrinologie des Annélides, a Villeneuve d'Ascq (França), i al laboratori del Dr. Mostafa Kouach, al Laboratoire d'application de spectrometrie de masse de l'Université de Lille II (França), respectivament.

Per degradació recurrent d'Edman es va començar a seqüenciar l'extrem N-terminal de les protamines p1 i p2, i es van arribar a seqüenciar totes dues proteïnes senceres, sense necessitat de digerir-les. La Fig.III.B.9 mostra totes dues estructures primàries. Al mateix temps es van aplicar tècniques d'espectrometria de masses sobre les proteïnes p1 i p2 provinents tant de gònades com d'epidídim. La Protamina p1 resulta ser una proteïna de 28 residus, molt bàsica (18 Arg), i amb un pes molecular de 3,536 Da segons l'espectrometria de masses tant quan prové de gònada com d'epidídim (Fig.III.B.10), i de 3,538 Da si el calculem a partir de la seqüència (v. Taula III.B.III).

La Protamina p2 té dos aminoàcids més, és una proteïna de 30 residus, més bàsica que l'anterior (20 Arg) i amb un pes molecular segons l'espectrometria de masses de 3,941 Da, quan prové d'epidídim, i quan prové de gònada es troba una segona forma de 4,021 Da (v. Fig.III.B.10), on la diferència entre totes dues formes és de 80 Da, massa corresponent a la d'un fosfat; així doncs, la protamina p2 es

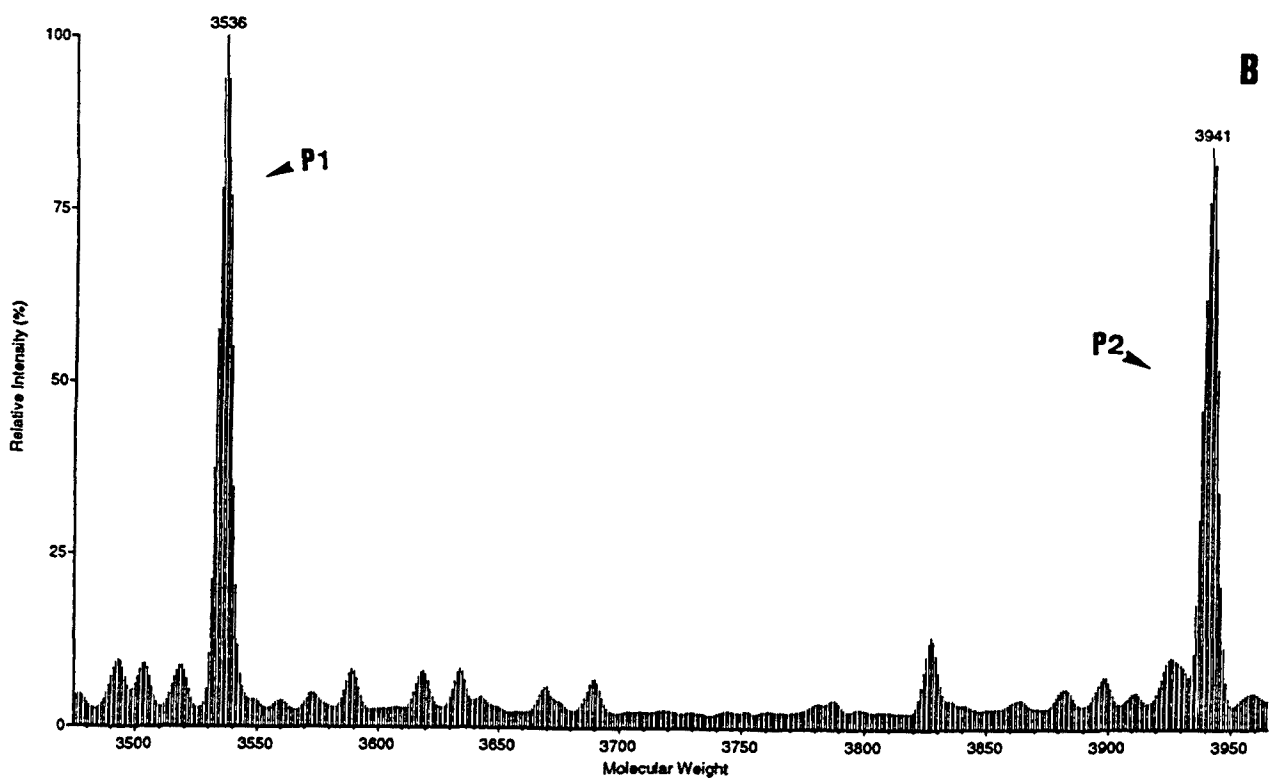
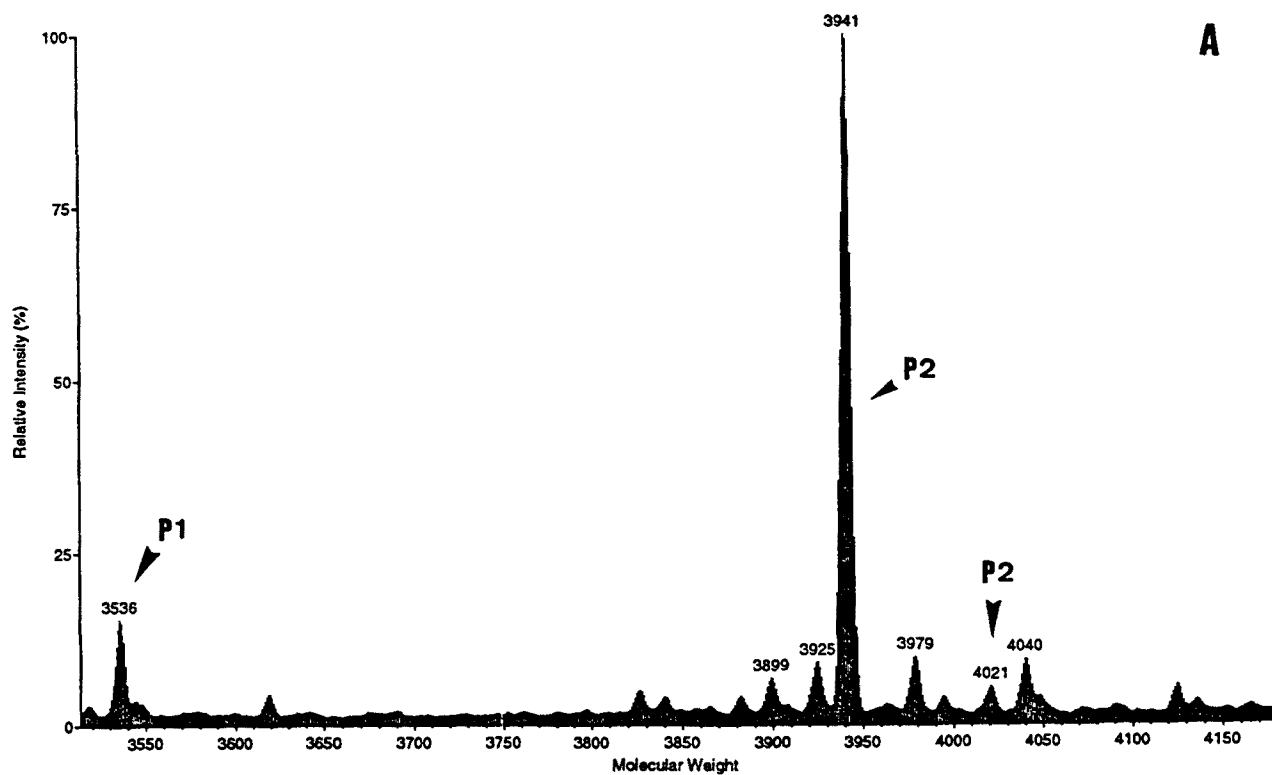
troba fosforilada en gònada (4,021 Da) i es defosforila a l'arribar a l'epidídim (3,941 Da). Segurament la protamina p1 també es troba fosforilada en la gònada, i el fet de no haver trobat aquesta forma a l'espectrometria de masses pot ser degut a que vàrem treballar amb gònades molt madures (en el cas de la p2, trobem un petit pic pertanyent a la forma fosforilada). El pes molecular de la protamina p2 a partir de la seqüència està conforme amb l'observat, éssent de 3,942.5 Da (v. Taula III.B.III). A diferència de la p1, la p2 té una Tyr (absent en la p1) i només 1 Ala (i no dues). L'alineament de les dues protamines (Fig.III.B.9) mostra que aquestes proteïnes són homòlogues.

Fig.III.B.9. Seqüència de les protamines p1 i p2 presents en l'espermatozoide d'*O. vulgaris*, obtinguda mitjançant degradació recurrent d'Edman, i alineades per a obtenir el màxim d'identitats.

p1	R RRRRRRG H RGRR G RG G RR SRGRRR RA A
p2	Y RRRRRRG R RGRR R RG R RR RSRGRRR A HGG

Pel que fa referència a la Protamina P, el procediment va ser més llarg. Partint de la protamina sencera es van arribar a seqüenciar els primers 40 residus, obtenint algunes posicions dubtoses (Fig.III.B.12); com a conseqüència es va procedir a la digestió de la proteïna per obtenir pèptids i així seqüenciar-los. Es van fer unes primeres digestions de la proteïna amb **quimotripsina**, endopeptidasa que talla per residus hidrofòbics situats en l'extrem carboxi terminal, treballant amb diferents proporcions d'enzim:proteïna (1:2000, 1:1000, 1:500, 1:300 i 1:100), i a temperatura ambient.

Fig.III.B.10. Espectrometria de massa de les protamines p1 i p2 provinents de gònada (A) i epidídim (B).



Les proporcions de quimotripsina:proteïna 1:2000 i 1:1000 no van digerir la protamina, i la 1:100 la va digerir al complet, donant una llapissada (*smear*); la proporció 1:300 no va donar cap resultat concret, i la 1:500 va donar dos pèptids (dues bandes molt tènues en un GPAU per pèptids) resultants de la digestió de la protamina, però no eren gaire clares (no mostrat). Així que es va optar per fer una digestió amb un altre enzim, l'elastasa.

Taula III.B.III. Pes molecular de les protamines P, p1 i p2 presents en el nucli espermatòc d'*Octopus vulgaris*, calculat a partir de la seqüència, i a partir de tècniques d'espectrometria de masses.

	<u>PM calculat</u> <u>a partir de la seqüència</u>	<u>PM calculat</u> <u>per espectrometria de masses</u>	
		<u>epidídim</u>	<u>gònada</u>
Protamina p1	3,538.0 Da	3,536.0 Da	3,536.0 Da
Protamina p2	3,942.5 Da	3,941.0 Da	3,941.0 i 4,021.0 Da
Protamina P	6,029.6 Da	6,031.0 Da (Maldi-TOF)	
		6,028.0 Da*	6,027.0 i 6,107.0 Da

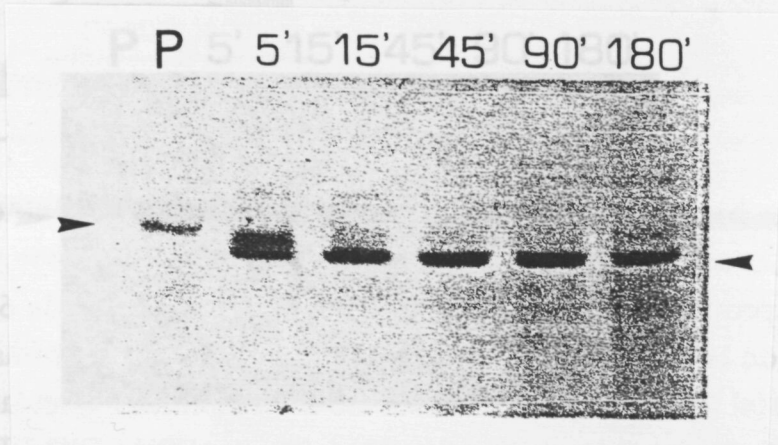
*a partir d'espermatòfors

Les condicions de treball de l'elastasa van ser les mateixes que les de la quimotripsina. Es va partir de proteïna dissolta en aigua procedent de la seva recuperació un cop liofilitzada (en haver poca quantitat de proteïna en pols enganxada en el baló de liofilització, aquesta es va recuperar dissolent-la en aigua, evitant així qualsevol mínima pèrdua) i per saber la quantitat de proteïna amb la que treballàvem, es van fer diferents dilucions i es van llegir a 230 nm, per deduir la seva concentració, tenint en compte que 1 mg/ml de protamina llegint a 230 nm dona una absorbància de 2 (v. II.C.2.a).

Es va començar per fer una digestió a nivell analític, digerint 15 µg de proteïna amb elastasa (0.15 mg/ml) en bicarbonat d'amoni 0.1M pH 8.0, amb la proporció 1:100 (enzim:substrat), tenint com a concentració final 2 mg proteïna/ml de medi d'incubació. La proteïna va ser incubada amb l'enzim a diferents temps (5', 15', 45', 90' i 180'), i les digestions resultants es van aturar acidificant el medi d'incubació amb el tampó de mostres de l'electroforèsi, i així es

van carregar en un GPAU d'elevada concentració d'acrilamida (30%). La Fig.III.B.11 mostra com, a partir dels 5 min d'incubació, l'elastasa digereix la protamina P (fletxa esquerra) donant lloc majoritàriament a un pèptid (El-I, fletxa de la dreta de la figura) de menor tamany (el qual es veu millor als 45 min d'incubació). Aquest pèptid seria un bon candidat per ser seqüenciat.

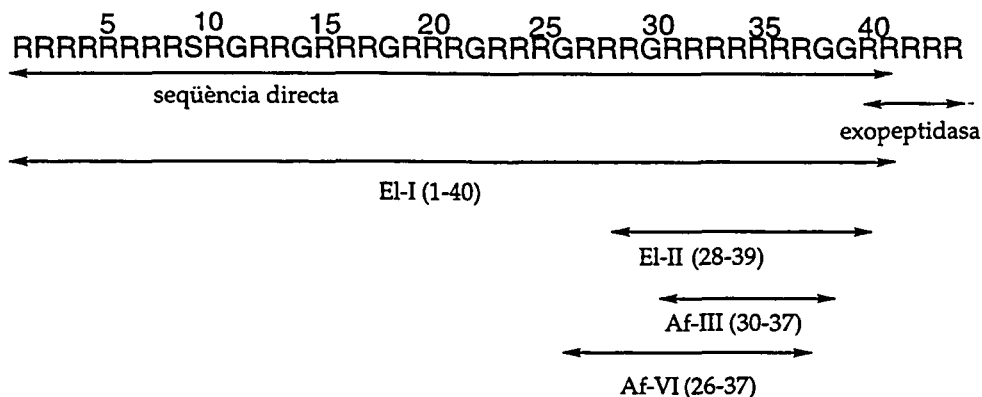
Fig.III.B.11. Digestió analítica de la protamina d'*Octopus vulgaris* amb elastasa, relació 1:100 (enzim:proteïna); P.- protamina sencera (fletxa esquerra); diferents temps d'incubació: 5', 15', 45', 90' i 180'. Fletxa dreta- pèptid generat en la digestió. GPAU 2.5M urea/30% acrilamida.



Un cop conegudes les condicions de treball idònies per la digestió de la protamina, el següent pas va ser fer una **digestió preparativa** de la mateixa, amb la finalitat de seqüenciar els pèptids resultants. Es va utilitzar la proporció d'enzim:substrat 1:100 ; fent una digestió de 45 min, i aquest cop la reacció es va aturar disminuint de cop la temperatura del medi d'incubació, i posteriorment liofilitzant la barreja de pèptids. El resultat va ser l'obtenció de dos pèptids, el pèptid que vàrem veure en la digestió analítica (**El-I**), i un segon pèptid molt petit (**El-II**), els quals es van purificar i seqüenciar. Les seqüències de tots dos pèptids es poden veure a la Fig.III.B.12.

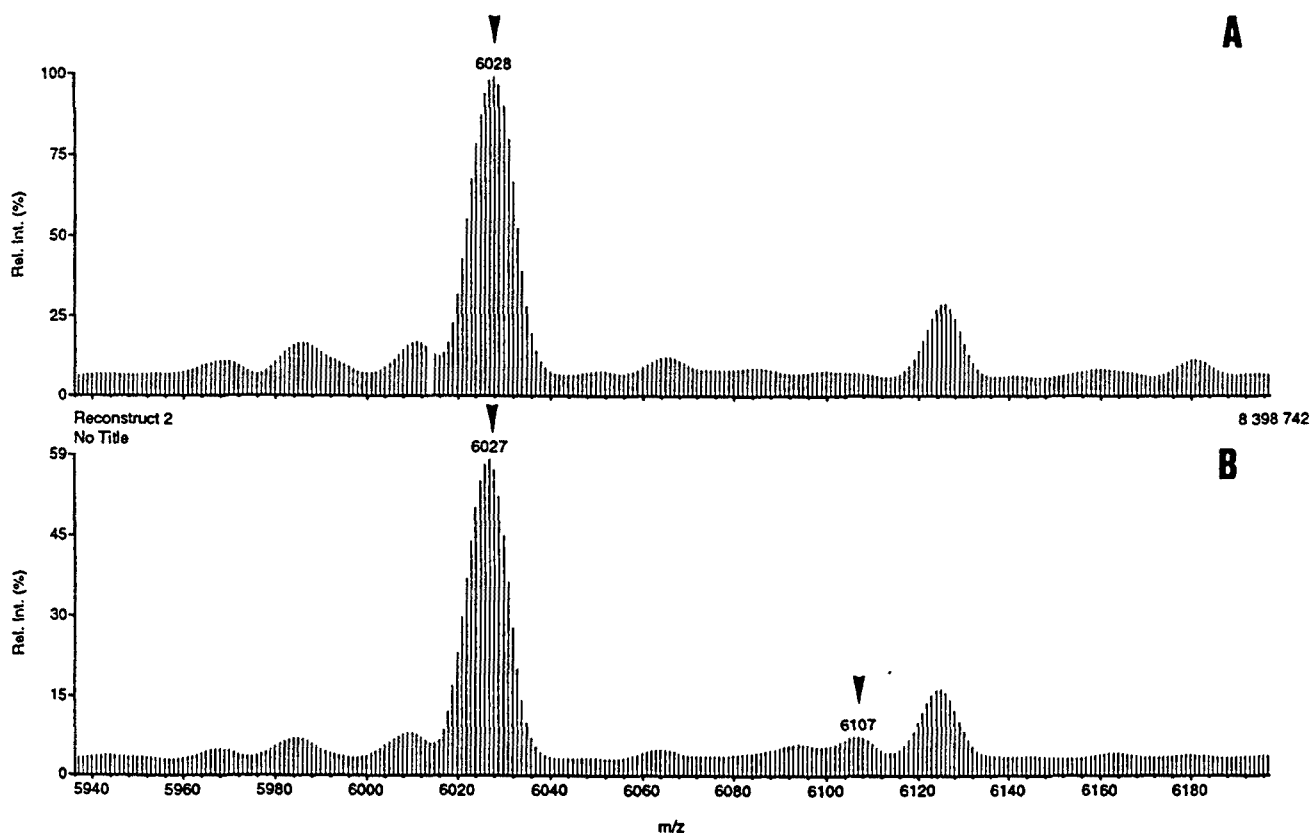
El pèptid El-I corroborava la seqüència N-terminal que coneixiem fins al moment, i eliminava els dubtes que teníem en algunes posicions, i el pèptid El-II, de menor tamany, ens tornava a confirmar part de la seqüència, però cap a l'extrem C-terminal (de la posició 28 a la 39). Així doncs, ens quedava per resoldre l'extrem C-terminal.

Fig.III.B.12. Seqüència de la protamina P d'*O. vulgaris* mitjançant degradació automàtica d'Edman. Seqüenciació directa de l'extrem N-terminal (residus 1→40); seqüenciació des de l'extrem C-terminal en direcció aminoterminal (exopectidasa); i seqüenciació dels diferents pèptids generats amb l'Elastasa (El-I i El-II), i la proteïnasa d'*Astacus fluviatilis* (Af-III i Af-VI).



Per altra banda, es van aplicar tècniques d'espectrometria de massa sobre la protamina P, provinent tant d'espermatòfors com de gònada, Fig.III.B.13. La protamina P provinent d'espermatòfors té un pes molecular de 6,028 Da, mentre que si prové de la gònada trobem un segon pic de 6,107 Da, forma que resulta ser la fosforilada (al haver una diferència de 80 Da). La massa calculada a partir de la seqüència corroborava els resultats (6,029.6 Da) (v. Taula III.B.III). Així doncs, la protamina P en gònada es troba fosforilada (6,107 Da) mentre que en l'espermatòfor es defosforila (6,027-6,028 Da). Si s'aplica espectrometria de massa Maldi-TOF, el pes molecular de la protamina P provinent d'espermatòfors és de 6,031 Da (valor molt proper als 6,027-6,028 Da observats).

Fig.III.B.13. Espectrometria de masses de la protamina P provinent d'espermatozòs (A) i de gònada (B). La protamina (6,027 Da) en la gònada es troba fosforilada (6,107 Da). (El segon pic que s'observa en tots dos espectres correspon a la proteïna contaminada d'un fosfòric, àcid que es troba en els detergents utilitzats en el tractament del vidre usat).



Així doncs, coneixiem la composició aminoacídica de la protamina pura (Taula III.B.II), i el seu pes molecular; coneixent el pes molecular dels aminoàcids, el pes molecular total, i la seqüència N-terminal, vàrem deduir que gairebé teníem la seqüència de la protamina completa, i que possiblement faltaven 4 arginines situades en posició C-terminal, ja que afegint aquestes 4 arginines, el pes molecular de la proteïna calculat a partir de la seqüència coincidia a la perfecció amb el pes calculat per espectrometria de masses.

Per poder corroborar la seqüència C-terminal de la protamina, vàrem decidir aplicar un nou mètode de seqüenciació (*PerSeptive Biosystems Inc.*) basat en la digestió de la proteïna amb una exopeptidasa que comença a digerir la

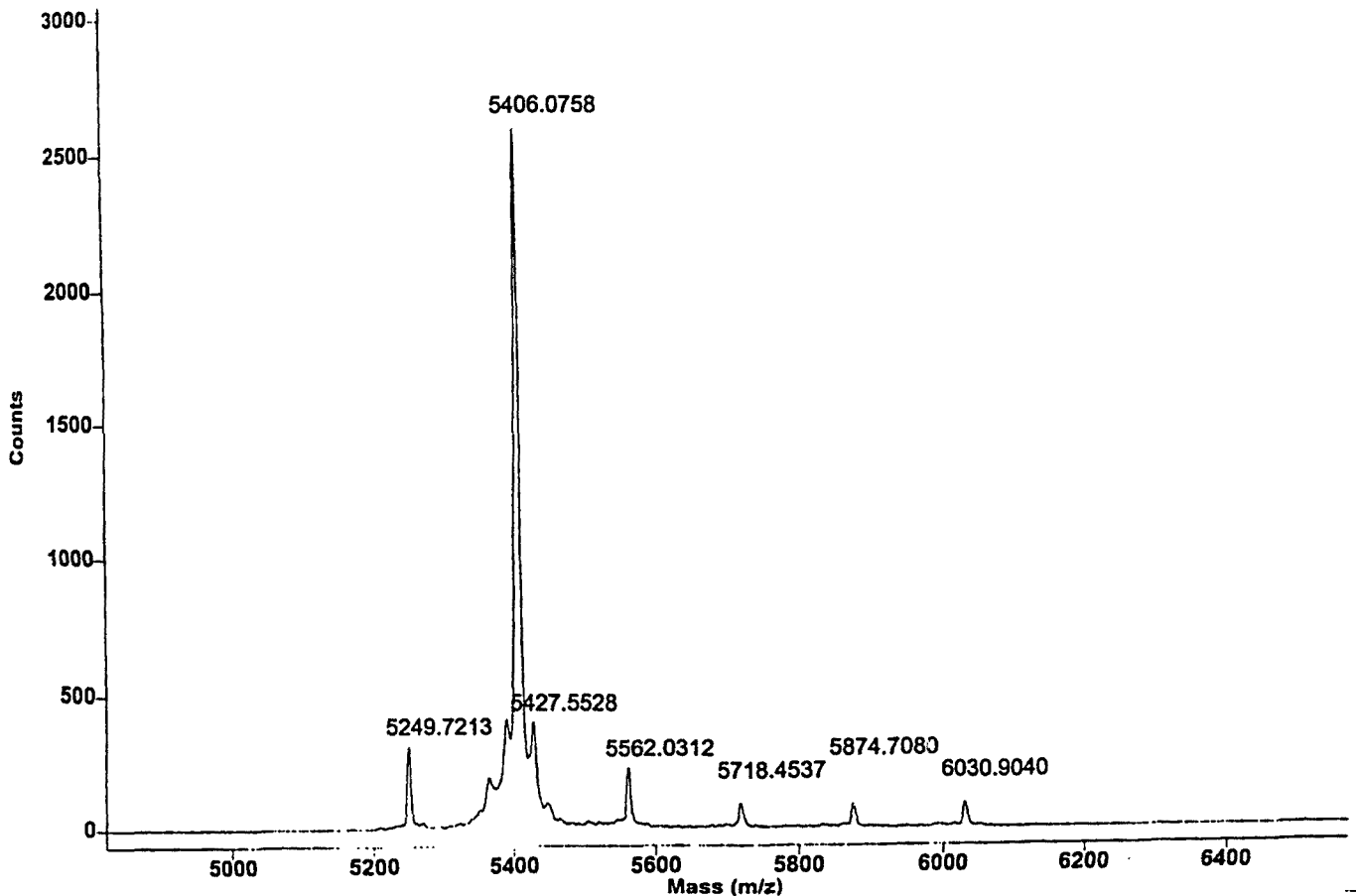
proteïna per l'extrem carboxiterminal dirigint-se en direcció aminoterminal, podent-se així identificar els aminoàcids alliberats, tal i com s'explica a continuació.

Un cop es va verificar la puresa de la proteïna i es va saber la seva concentració, es va digerir usant un enzim pertanyent a un kit (*PE Biosystems CPP enzyme kit*). La digestió es va realitzar fent diverses dilucions de l'enzim i aplicant la barreja de digestió a un aparell d'espectrometria de masses (MALDI). Així doncs, el que es detecta és un pic amb un pes molecular de partida (protamina sense digerir), i tota una sèrie de pics consecutius on el pes molecular va disminuint progressivament a mida que avança l'enzim, degut a la pèrdua d'un aminoàcid (resultat de la digestió); coneixent el pes molecular dels aminoàcids i calculant la diferència de pes molecular entre un pic i el del costat, es podrà identificar l'aminoàcid alliberat.

Gràcies a aquest mètode vàrem aconseguir detectar 5 Arginines situades en posició carboxiterminal, tal i com indica la Fig.III.B.14, que era el que ens esperàvem. Com es pot veure en aquesta figura, el primer pic de la dreta representa la protamina sense digerir (amb un pes molecular de 6,031 Da), i de dreta a esquerra apareixen una sèrie de pics consecutius que van disminuint de l'ordre de 156.2 Da en pes molecular, massa que correspon a la d'una Arg, arribant-se a perdre 5 Arg, aminoàcids que són els que l'enzim allibera durant la seva digestió en direcció aminoterminal. Aquest mètode (que s'està començant a posar a punt per la casa comercial pertinent), no ens va permetre anar més enllà en la seqüència, degut a la dificultat que presentava la proteïna al presentar tants aminoàcids bàsics, tantes arginines juntes (problema que sempre han presentat les protamines quan s'han hagut de seqüenciar inclús amb el mètode tradicional de degradació recurrent d'Edman).

Paral·lelament a la seqüència de l'extrem C-terminal mitjançant la exopeptidasa del kit, es va fer una altra digestió de la protamina P, aquest cop amb la proteïnasa d'*Astacus fluviatilis*, enzim que respecta els aminoàcids bàsics, tallant pels que no ho són. Totes les digestions que es van fer, així com les seqüències dels pèptids generats, es van realitzar al laboratori del Dr. Joan Ausió, al Departament de Bioquímica i Microbiologia de la Universitat de Victoria, Canadà.

Fig.III.B.14. Identificació dels aminoàcids de l'extrem C-terminal de la protamina P d'*O. vulgaris* mitjançant l'acció d'una exopeptidasa que allibera els aminoàcids en direcció N-terminal (per més detalls, v. texte).

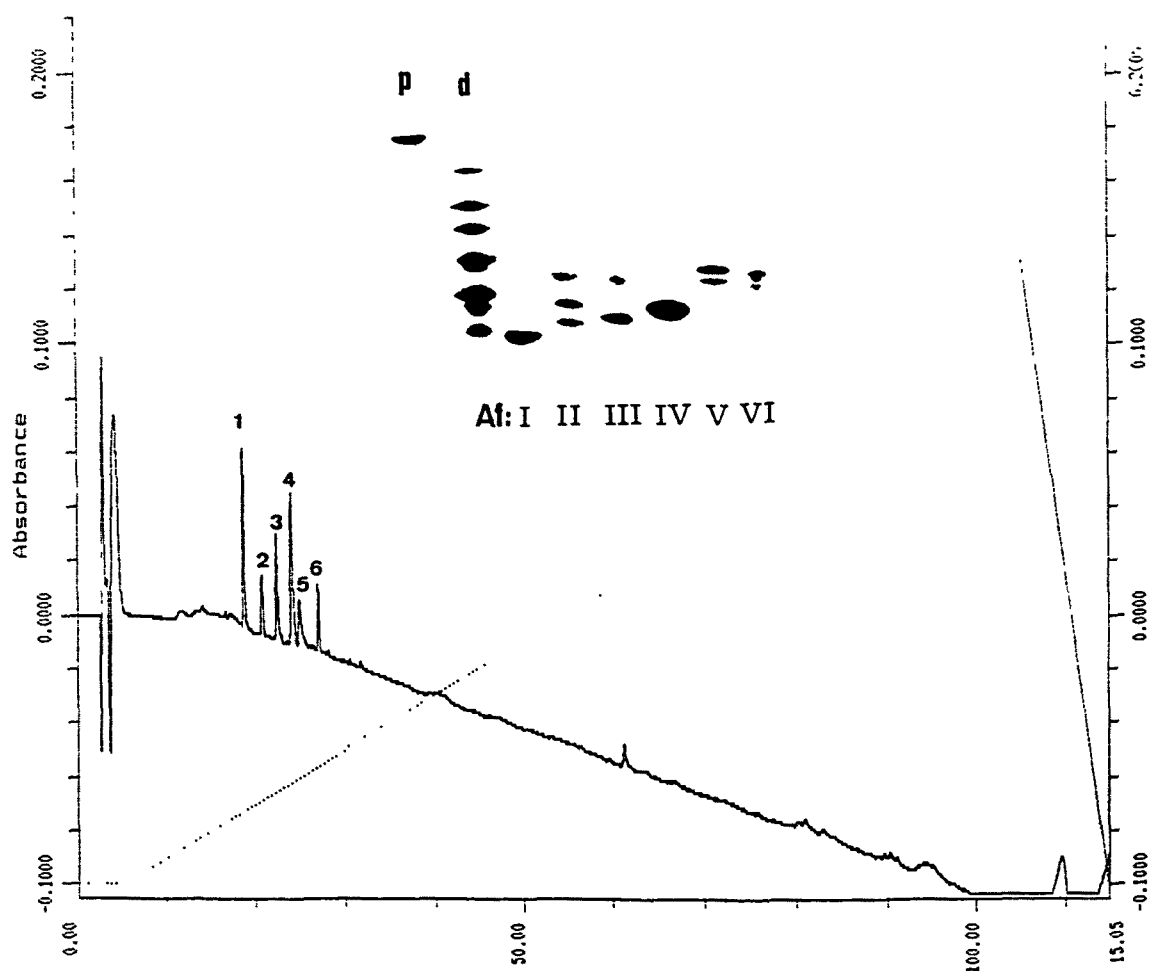


Es va fer una digestió a nivell analític per conèixer les condicions adequades per la digestió de la protamina amb aquest enzim, i es va arribar a la conclusió que la relació d'enzim:substrat havia de ser de 1:500, i la incubació havia de durar 1 hora a temperatura ambient. Així doncs, es van digerir 87 µg de proteïna, tenint una concentració de proteïna de 2 mg/ml en el medi incubació. Aquest cop la reacció es va aturar afegint TFA 0.1%, per poder ser immediatament injectada a una columna d'HPLC i així separar els pèptids resultants. Les condicions de treball van ser les mateixes que les utilitzades quan es van purificar les diferents protamines de l'espermatozoide (v. II.B.8.f).

El resultat de la digestió, així com l'obtenció dels diferents pèptids es pot veure en la Fig.III.B.15. La protamina va ser tallada bàsicament en 7 fragments

que no es van separar del tot molt bé mitjançant les tècniques d'HPLC (Af-I-VI). Es va fer una anàlisi d'aminoàcids de les fraccions, Taula III.B.IV, i es varen escollir les fraccions Af-III i Af-VI per seqüenciar. Com es pot veure a la Fig.III.B.12, cap dels pèptids era l'últim fragment de la protamina, sinó que tornaven a confirmar la seqüència del residu 26 al 37 (Af-VI), i del 30 al també 37 (Af-III).

Fig.III.B.15. Digestió de la protamina P amb la proteïnasa d'*Astacus fluviatilis*. Separació mitjançant HPLC dels diferents fragments generats en la digestió, i GPAU 2.5M urea/30%acrilamida dels diferents pics; p- protamina; d- digestió.



L'anàlisi d'aminoàcids del pèptid Af-I ens mostrava que aquest pèptid estava format per dues Gly i 5 Arg, fragment que resultaria ser l'extrem C-

terminal, i que coincidiria amb el resultat obtingut segons la digestió amb l'exopeptidasa. Si es considerava que el que faltava a la seqüència que teniem fins al moment eren 4 Arg a partir de l'Arg en posició 40 (tal i com vàrem suposar abans de fer la digestió amb l'exopeptidasa), la massa de la protamina calculada a partir de la seqüència (6,029.6 Da) resultava ser molt semblant a la calculada per espectrometria (v. Taula III.B.III). Així doncs, vàrem donar per acabada la seqüència de la Protamina P d'*O. vulgaris*.

Taula III.B.IV. Anàlisi d'aminoàcids dels pèptids generats en la digestió de la protamina P amb la proteïnasa d'*Astacus fluviatilis*, relació 1:500 (enzim:substrat). Valors expressats en % mols.

	Af-I	Af-II	Af-III	Af-IV	Af-V	Af-VI
Lys	-	-	-	0.3	-	1.3
His	-	-	-	-	-	-
Arg	68.7	67.7	79.5	94.9	64.9	31.0
Asp	-	-	-	-	-	2.6
Ser	1.0	5.8	-	-	6.2	5.1
Glu	-	-	1.8	-	1.6	5.5
Pro	-	-	-	-	-	1.4
Gly	30.3	26.5	18.6	2.5	27.3	22.3
Ala	-	-	-	0.6	-	3.2
Cys	-	-	-	-	-	-
Val	-	-	-	-	-	1.3
Met	-	-	-	1.7	-	-
Ile	-	-	-	-	-	1.2
Leu	-	-	-	-	-	1.6
Tyr	-	-	-	-	-	1.8
Phe	-	-	-	-	-	21.6

A la Fig.III.B.16 es poden comparar les seqüències de les tres protamines majoritàries de l'espermatozoide d'*O. vulgaris*: P, p1 i p2.

Fig.III.B.16. Estructura primària de les 3 proteïnes majoritàries presents en el nucli espermàtic d'*O. vulgaris*.

P RRRRRRRRSRGRRGRRRGRRRGRRRGRRRRRRRGGRRRRR
 p1 RRRRRRRGHRGRRGRGGRRSRGRRRAA
 p2 YRRRRRRGRRGRRRRGRRRRSRGRRRAHGG

Per un cantó podem veure que la **protamina P** és una proteïna formada per tan sols 3 tipus d'aminoàcids (Arg, Ser i Gly), tal i com es va veure en els resultats d'anàlisi d'aminoàcids (Taula III.B.II), éssent una proteïna molt simple, al igual com ocorre amb les protamines dels decàpodes. És una proteïna molt bàsica, presentant 35 **arginines** (d'un total de 44 residus), les quals es troben formant grups entre elles mateixes, o bé formant grups amb les glicines: en posició 11 hi ha un grup GRR al que li continuen quatre grups consecutius GRRR, i un grup GRRRRRRR; la molècula acaba amb dues glicines juntes (en posició 38) seguides d'una cua de 5 arginines.

Així doncs, les **glicines** es troben associades a les arginines, amb l'excepció del doblet GG present en l'extrem C-terminal. Per altra banda, els decàpodes no presenten glicines, però les arginines es continuen agrupant entre elles, formant dominis extremadament bàsics, que seran els que interaccionaran amb més força amb el DNA.

L'única **serina** present es troba a l'inici de la molècula, i com a conseqüència, la regulació de la unió de la protamina amb el DNA en part tindrà lloc en l'extrem N-terminal. En la sèpia, la Ser també es troba en el domini N-terminal (com es veurà més endavant).

Les **protamines p1 i p2** són molt semblants entre elles mateixes, i presenten posicions on hi ha variacions. La protamina p1 comença per un aminoàcid bàsic i acaba en dos aminoàcids hidrofòbics (2 Ala), mentre que la p2 comença i acaba amb aminoàcids polars (1 Tyr i 2 Gly respectivament).

En totes dues protamines, al primer residu li segueix un grup de 6 arginines amb una glicina final; les glicines també es troben associades amb les arginines en grups GR_n, on n=1-4, i també la trobem associada a una histidina (com ocorre en la protamina p1, posició 8, GHR), o bé amb ella mateixa (posició 16 en la p1, i posició 29 en la p2).

Les protamines p1 i p2 només presenten una serina (al igual que la protamina P), la qual es troba dintre de l'entorn RRSRGRRR, un domini molt bàsic, i que es troba en l'extrem C-terminal, per tant en aquestes proteïnes, la regulació de la unió al DNA es donarà pel domini C-terminal.

En quan a la resta d'aminoàcids poc s'ha de comentar, ja que són minoritaris. Les alanines, aminoàcid hidrofòbic, es troben concentrades en l'extrem C-terminal; i cada proteïna només presenta una histidina, i cap d'elles ocupa la mateixa posició respecte l'altra, en la p1 és el residu 9, i en la mateixa posició però en la proteïna p2 és substituïda per una arginina.

Tal i com es pot veure segons la seqüència de la p1 i p2 amb respecte la P, no podem dir que les dues primeres siguin possibles molècules precursors de la P, o bé un producte resultant d'una modificació postraduccional de la protamina P, o un producte de la seva degradació.

Tot i que les protamines d'*O. vulgaris* presenten certes característiques similars a les protamines de les sèpies i calamars (com s'ha comentat en diverses ocasions), val la pena fer un estudi més aprofundit per veure les relacions evolutives que puguin existir entre tots dos grups (octòpodes i decàpodes) (apartat 3).

Tal i com la Fig.III.B.7 mostra, també es van purificar les proteïnes *p* i *p'* a partir de gònada i epidídim (*p*), i gònada i espermatòfors (*p'*), totes dues proteïnes presents en forma minoritària en els nuclis d'espermatozoides madurs (provinents d'espermatòfors), tal i com hem vist a la Fig.III.B.6.

Les anàlisis d'aminoàcids de la proteïna *p* (Taula III.B.II) ens feien pensar que aquesta proteïna podria ser una molècula precursora de la protamina majoritària P. Per poder confirmar aquesta hipòtesi es va fer la seqüència N-terminal de la proteïna. Tal i com la Fig.III.B.17 mostra, aquesta proteïna és,

efectivament, el precursor de la protamina P, molècula que presenta 12 aminoàcids addicionals en l'extrem N-terminal i que es perden (processament postraduccion) per donar lloc a la protamina P final.

Fig.III.B.17. Seqüència de l'extrem N-terminal de la proteïna *p*, molècula precursora de la protamina P.

p RLSRRRVYSIGGRRRRRRRRSRGRRGR ...
 P RRRRRRRRSRGRRGRRRGRRRGRRRGRRRRRRRGGRRRRR

Es va realitzar espectrometria de masses sobre la proteïna *p* provinent de gònada i d'epidídim (Fig.III.B.18), i es va veure que la proteïna tenia un pes molecular de 7,427 Da, i que al igual com passava amb la protamina P (i les protamines *p1* i *p2*), en la gònada es troba en forma fosforilada (7,507 Da) (v. Taula III.B.V). En la Fig.III.B.18A trobem un pic de 7,526 Da que que no és res més que la protamina amb un fosfòric enganxat (amb una massa de 98 Da) (fosfòric que prové dels detergents emprats en la neteja del material de vidre, i que molt sovint contamina les proteïnes).

Taula III.B.V. Pes molecular de les proteïnes *p* i *p'*, molècula precursora de la protamina P i variant de la proamina *p1* respectivament. Els càlculs del pes molecular de la proteïna *p* realitzats a partir de la seqüència s'han fet assumint com a extrem C-terminal la protamina P.

	<u>PM calculat</u> <u>a partir de la seqüència</u>	<u>PM calculat</u> <u>per espectrometria de masses</u>		
		<u>espermatòfors</u>	<u>epidídim</u>	<u>gònada</u>
Proteïna <i>p</i>	7,429.0 Da	-	7,428.0 Da	7,427.0 i 7,507.0 Da
Proteïna <i>p'</i>	3,362.98+1,007.02‡	4,388.7 Da	-	4,388.0 i 4,468.0 Da

‡ veure text

Al veure els resultats d'espectrometria de masses de la proteïna *p* podem deduir que, d'entre les tres serines que presenta aquesta molècula la Ser que està fosforilada és la Ser present en la protamina P, ja que és una serina que es manté fosforilada quan la protamina P es troba en gònada (tal i com hem vist a la Fig.III.B.13B). De manera que, de les serines Ser3, Ser9 i Ser21 de la proteïna *p*, l'última és la fosforilada. El precursor *p* estaria fosforilat, es procesaria (pèrdua de l'extrem N-terminal) i donaria lloc a la protamina P fosforilada, que en l'espermatozoide madur es defosforilaria.

I per últim, es va seqüenciar l'extrem N-terminal de la proteïna *p'*, el que es pensava que era un precursor de la protamina p1 o p2 (segons els resultats de les anàlisi d'aminoàcids, Taula III.B.II). Com es pot veure a la Fig.III.B.19, aquesta proteïna no és cap molècula precursora, sinó una variant de la protamina p1 que es troba en l'epidídim i pràcticament deixa de fer-ho en l'espermatòfor, tal i com la Fig.III.B.6 mostra.

La proteïna *p'* presenta, en principi, tres mutacions que són conservatives en quan a càrrega bàsica (Gly → Arg, posicions 8, 11 i 16), i és una proteïna de major tamany, amb un pes molecular de 4,388.7 Da (Taula III.B.V): mitjançant espectrometria de masses s'ha vist que aquesta molècula també es troba fosforilada en gònada, i es defosforila en arribar a l'espermatòfor (Fig.III.B.20). Si es calcula el pes molecular de l'extrem N-terminal seqüenciat, s'obté una massa de 3,362.98 Da, a la qual si se li sumen 1,007.02 Da dóna lloc al pes molecular obtingut per espectrometria de masses (4,388.7 Da).