

Índice de Contenido

Índice General

Índice General.....	i
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tablas.....	ix
Símbolos y Abreviaturas.....	x
RESUMEN.	xi
SUMMARY.....	xiii
I.- Introducción.....	1
1.- Fertilización: Consideraciones generales.....	3
2.- Desarrollo del pronúcleo masculino.	4
2.1.- Ruptura de la membrana nuclear del espermatozoide.....	4
2.2.- Dispersión de la cromatina espermática.	6
2.3.- Formación de la envoltura pronuclear.	11
3.- El problema de la remodelación de la cromatina espermática.	13
3.1.- Estructura del pronúcleo masculino y de los núcleos de las primeras fases embrionarias... ..	13
3.2.- La estructura del núcleo del espermatozoide.....	14
3.3.- Planteamiento del problema de la remodelación.	16
4.- Análisis de los factores remodeladores de la estructura de la cromatina durante la transcripción y replicación.....	16
4.1.- Transcripción: Factores de transcripción.	17
4.1.1.- El problema del nucleosoma.	18
Resumen de los factores remodeladores durante la transcripción.....	23
Resumen de la posibilidad de encontrar este mecanismo en ovocitos y primeros estados embrionarios.....	24
4.2.- Replicación: Factores de replicación.....	24
4.2.1.- Características funcionales y moleculares del factor CAF-1.....	25
5.- Análisis de los factores remodeladores de la cromatina obtenidos a partir de ovocitos y embriones tempranos.....	27
5.1.- Nucleoplasmina de <i>Xenopus laevis</i>	27
5.2.- Estudios en <i>Drosophila</i>	34
Un comentario sobre la nucleoplasmina de <i>Xenopus</i> y su posible ubicuidad.....	38
6.- Resumen de casos conocidos.....	39
6.1.- Erizo de mar.....	39
6.2.- <i>Xenopus laevis</i>	44
II.- Planteamiento del Problema y Objetivos de la Tesis	47

III.- Materiales y Métodos.....	51
1.- Material biológico.....	53
1.1.- <i>Holothuria tubulosa</i> (Pepino de mar).....	53
2.- Obtención de gametos y preparación de extractos.....	53
2.1.- Obtención de núcleos espermáticos.....	53
2.2.- Permeabilización de núcleos espermáticos.....	54
2.3.- Obtención de ovocitos.....	55
2.3.1.- Tamaño de los ovocitos.....	55
2.4.- Inducción de la maduración de ovocitos.....	55
2.5.- Fertilización y clivaje in-vitro de ovocitos maduros.....	56
3.- Preparación de extractos.....	57
3.1.- Extracto de gonada femenina madura.....	57
3.2.- Extractos de ovocitos, ovocitos maduros, y embriones tempranos.....	57
3.3.- Preparación del "egg-jelly" de ovocitos.....	58
4.- Fraccionamiento de los extractos.....	58
4.1.- Fraccionamiento del extracto de gonada femenina.....	59
4.1.1.- Cromatografía de hidroxilapatita: elución isocrática.....	59
4.1.2.- Cromatografía de hidroxilapatita: elución en gradiente.....	60
4.1.3.- Cromatografía de intercambio aniónico.....	61
4.1.4.- Cromatografía protamina-agarosa.....	62
4.2.- Fraccionamiento de extractos de ovocito, ovocito maduro y embriones tempranos.....	63
4.2.1.- Cromatografía de hidroxilapatita: elución isocrática.....	63
5.- Análisis de proteínas.....	64
5.1.- Cuantificación de proteínas: método de Bradford.....	64
5.2.- Extracción de las proteínas básicas de los núcleos espermáticos.....	64
5.2.1.- Extracción con HCl 0.4N.....	65
5.2.2.- Extracción de la histona H1 y familia.....	65
5.2.3.- Extracción con protamina.....	66
5.2.4.- Extracción con SDS.....	66
5.3.- Electroforesis de proteínas.....	67
5.3.1.- Geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).....	67
5.3.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-ácido acético-urea (AU-PAGE).....	69
5.3.3.- Electroforesis de geles de poliacrilamida-tritón-urea (TAU-PAGE).....	70
5.3.4.- Electroforesis bidimensionales (ELFO-2D).....	71
5.4.- Tinción de geles.....	72
5.4.1.- Tinción de geles con azul de Coomassie.....	72
5.4.2.- Tinción con nitrato de plata.....	73
5.5.- Detección con anticuerpos ("western-blot").....	74
5.6.- Análisis de aminoácidos.....	75
5.7.- Determinación del pI: cromatografía de enfoque isoeléctrico.....	76
6.- Actividad funcional de extractos, fracciones de purificación o proteínas purificadas: incubación de núcleos espermáticos permeabilizados.....	77

6.1.- Evaluación de la actividad descondensadora.....	78
6.2.- Evaluación de las proteínas asociadas al DNA durante la descondensación.....	78
7.- Microscopía.....	79
7.1.- Microscopía de fluorescencia.....	79
7.2.- Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	79
IV.- Resultados y Discusión.....	81
1.- Aspectos previos: Caracterización electroforética de las proteínas nucleares básicas de los espermatozoides maduros usados como modelos.....	83
1.1.- Proteínas nucleares básicas del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i>	83
1.2.- Proteína nuclear básica del espermatozoide de <i>Dicentrarchus labrax</i>	86
2.- Madurez de la gonada femenina de <i>Holothuria tubulosa</i>	88
2.1.- Morfología de los ovocitos.....	89
2.2.- Tamaño de los ovocitos.....	93
2.3.- Inducción de la maduración del ovocito.....	94
2.3.1.- Ruptura de la vesícula germinal ("gvbd, germinal-vesicle breakdown").....	94
2.3.2.- Eventos meióticos en los ovocitos inducidos a maduración.....	98
2.3.3.- Cambios ultraestructurales durante la maduración.....	102
2.4.- Fertilización y clivaje in-vitro de ovocitos inducidos a la maduración.....	109
2.5.- Polaridad del ovocito de <i>Holothuria tubulosa</i>	114
3.- Incubaciones homólogas de núcleos espermáticos con extracto de gonada femenina de <i>Holothuria tubulosa</i>	116
3.1. Efecto del extracto crudo de gonada femenina de <i>Holothuria tubulosa</i>	116
3.2.- Actividad proteolítica del extracto de gonada femenina madura sobre las histonas espermáticas de <i>Holothuria tubulosa</i>	118
3.3.- Actividad proteolítica del "egg-jelly".....	122
3.3.1.- Efecto del tiempo de incubación.....	122
3.3.2.- Efecto de la concentración.....	122
3.3.3.- Efecto del pH y del ión Ca ²⁺	124
3.3.4.- Inhibición de la actividad proteolítica.....	126
4.- Efecto del extracto "high-speed" termoestable de gonada femenina de <i>Holothuria tubulosa</i> sobre núcleos espermáticos.....	129
4.1.- Efectos sobre los núcleos del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i>	129
4.1.1.- Actividad descondensadora.....	129
4.1.2.- Actividad removedora de las proteínas nucleares básicas del espermatozoide.....	130
4.2.- Actividades del extracto de gonada femenina madura cuando es suplementada con proteínas básicas solubles.....	133
5.- Fraccionamiento del extracto termoestable de gonada femenina madura de <i>Holothuria tubulosa</i>	138
5.1.- Fraccionamiento en Columna de Hidroxilapatita: Gradiente Isocrático (Mat.&Mét.,4.1.1).....	139
5.2.- Fraccionamiento en columna de intercambio aniónico: DEAE-52 (Mat.&Mét.,4.1.3).....	140
5.3.- Fraccionamiento en columna de hidroxilapatita: Gradiente continuo (Mat.&Mét.,4.1.2).....	140
5.4.- Cromatografía de afinidad: Agarosa-protamina (Mat.& Mét.,4.1.4).....	143

5.5.- Remoción de las proteínas básicas del núcleo espermático de <i>Holothuria tubulosa</i> por las actividades descondensadoras purificadas a partir del extracto de gonada femenina madura. ...	145
6.- Efecto de la nucleoplasmina sobre los núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i>	150
6.1.- Incubaciones de núcleos espermáticos de <i>Dicentrarchus labrax</i> con nucleoplasmina de <i>Xenopus laevis</i>	150
6.2.- Efecto de la nucleoplasmina de <i>Xenopus laevis</i> sobre los núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i>	151
7.- Fraccionamiento de la actividad de remodelación del núcleo espermático de <i>Holothuria tubulosa</i> a partir de extracto de ovocitos inducidos a la maduración.	153
7.1.- Fraccionamiento del extracto termoestable de ovocitos de <i>Holothuria tubulosa</i> inducidos a la maduración.	153
7.2.- Efecto del tiempo de incubación con PR ϕ_0 sobre la descondensación de los núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i>	158
7.3.- Efecto de la concentración de PR ϕ_0 sobre los núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i>	158
7.4.- Efecto de la PR ϕ_0 sobre los núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i> en comparación a la nucleoplasmina de <i>Xenopus laevis</i>	160
7.5.- Efecto de la PR ϕ_0 sobre los núcleos espermáticos de <i>Dicentrarchus labrax</i>	162
8.- Caracterización parcial de la PR ϕ_0	163
8.1.- Peso molecular.	163
8.2.- Composición de aminoácidos.	163
8.3.- Punto isoeléctrico.	165
V.- Discusión Final.	167
1.- El extracto crudo de los ovocitos de <i>Holothuria tubulosa</i> disuelven completamente los núcleos espermáticos.	169
2.- Propiedades del extracto "high-speed" termoestable.	170
3.- ¿Existe una actividad tipo nucleoplasmina en los extractos de ovocitos de <i>Holothuria tubulosa</i> ?	171
4.- Proteína removedora de ϕ_0 (PR ϕ_0): Posible rol funcional.	172
VI.- Conclusiones.	173
VII.- Anexos.	179
VIII.- Bibliografía.	183

Índice de Figuras

Figura 1.- Cambios morfológicos durante la formación del pronúcleo masculino.....	14
Figura 2.- Modelo esquemático de ensamblaje del complejo de preiniciación.....	17
Figura 3.- Las interacciones del activador TAF estabilizan la unión de TFIID.....	18
Figura 4.- Esquema de las relaciones entre el nucleosoma, cromosoma, y partícula core del nucleosoma.	19
Figura 5.- Modelos de perturbación de los nucleosomas por máquinas que remodelan la cromatina (CRMs, "chromatin-remodeling machines) para facilitar la unión de los factores activadores.	22
Figura 6.- Modelo de acción de SWI-SNF para disociar el dímero H2A-H2B.....	23
Figura 7.- Esquema del ensamblaje de la cromatina durante la replicación del DNA.....	25
Figura 8.- Rol del CAF-1 en el ensamblaje de los nucleosomas durante la replicación del DNA.....	26
Figura 9.- Esquema de la acción de CAF y de HaT1P para ensamblar el tetrámero H3-H4 asociado al DNA.....	28
Figura 10.- Secuencia de aminoácidos de la nucleoplasmina de <i>Xenopus laevis</i>	31
Figura 11.- Resumen de los resultados obtenidos al estudiar la nucleoplasmina-like de <i>Drosophila melanogaster</i>	36
Figura 12.- Secuencia de aminoácidos de la proteína dNLP de <i>Drosophila melanogaster</i>	37
Figura 13.- Resumen de los resultados obtenidos del estudio del ensamblaje de la cromatina en embriones de <i>Drosophila melanogaster</i>	38
Figura 14.- Esquema del tiempo en curso del desarrollo temprano del embrión de erizo de mar.....	40
Figura 15.- Recambio de las proteínas nucleares del espermatozoide de erizo de mar durante la transformación del núcleo espermático después de la fertilización.....	41
Figura 16.- Recambio de las proteínas básicas asociadas al DNA durante el desarrollo embrionario temprano del erizo de mar.....	42
Figura 17.- Esquema de los principales cambios en la composición de las proteínas asociadas a la cromatina durante la formación del pronúcleo masculino en <i>Xenopus laevis</i>	45
Figura 18.- Separación electroforética de las proteínas nucleares básicas del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i> extraídas con HCl 0.4 N.....	84
Figura 19.- Estructura primaria de la proteína espermática ϕ_0 de <i>Holothuria tubulosa</i>	86
Figura 20.- Movilidad electroforética de la protamina típica extraída con HCl 0.4N.....	87

Figura 21.- Estructura primaria de las protaminas típicas.....	87
Figura 22.- Morfología de la gonada de <i>Holothuria tubulosa</i>	90
Figura 23.- Morfología del ovocito gonadal de <i>Holothuria tubulosa</i>	91-92
Figura 24.- Tamaño de los ovocitos de <i>Holothuria tubulosa</i>	93
Figura 25.- Clasificación de los ovocitos de acuerdo al estado meiótico en el cual son inseminados (relación madurez-fertilización).....	95
Figura 26.- Inducción de la maduración de ovocitos gonadales de <i>Holothuria tubulosa</i>	96
Figura 27.- Morfología del ovocito gonadal inducido a maduración.....	97
Figura 28.- Eventos meióticos en los ovocitos inducidos a la maduración.....	99-101
Figura 29.- Cambios ultraestructurales de la envoltura nuclear durante la maduración.....	103
Figura 30.- Descondensación del nucléolo.....	104
Figura 31.- Etapa final del desensamblaje de la vesícula germinal del ovocito de <i>Holothuria tubulosa</i>	105
Figura 32.- Disposición de los cromosomas en la metafase-I.....	106
Figura 33.- Formación del pronúcleo femenino.....	107
Figura 34.- Desorganización del núcleo del vitelo.....	108
Figura 35.- Reacción cortical del ovocito fertilizado.....	110
Figura 36.- Formación del pronúcleo masculino.....	111
Figura 37.- Clivaje del ovocito fertilizado.....	112
Figura 38.- Uniones celulares entre los blastómeros de los embriones tempranos (2-4 células) de <i>Holothuria tubulosa</i>	113
Figura 39.- Polaridad del ovocito de <i>Holothuria tubulosa</i>	115
Figura 40.- Etapas de descondensación de los núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i> incubados con extracto "low-speed" de gonada femenina madura.....	117
Figura 41.- Contenido de proteínas nucleares básicas del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i> incubados con el extracto "low-speed".....	118
Figura 42.- Degradación en solución de las proteínas básicas del núcleo espermático de <i>Holothuria tubulosa</i> inducida por el extracto "low-speed" de la gonada femenina madura.....	119
Figura 43.- Esquema de la actividad proteolítica y descondensadora encontradas en el extracto de ovocitos sin "egg-jelly", y en el "egg-jelly" fraccionado con etanol al 70%.....	122

Figura 44.- Efecto del tiempo de incubación en la degradación de las proteínas básicas del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i> inducida por "egg-jelly" y su fracción macromolecular.....	123
Figura 45.- Degradación de las proteínas básicas del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i> en relación a la concentración del "egg-jelly" total o de la fracción macromolecular.	123
Figura 46.- Efecto del pH en la degradación de la histona H1 del espermatozoide <i>Holothuria tubulosa</i> inducida por la fracción macromolecular insoluble del "egg-jelly".	124
Figura 47.- Efecto de la concentración de Ca ²⁺ sobre la degradación de la histona H1 del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i> por la fracción macromolecular de "egg-jelly"	127
Figura 48.- Efecto de los inhibidores de proteólisis sobre la degradación de la histona H1 del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i> inducida por la fracción del "egg-jelly" insoluble en etanol.....	127
Figura 49.- Inhibición de la actividad proteolítica del extracto de ovocitos desjellificados y del "egg-jelly" sobre las proteínas nucleares básicas del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i>	128
Figura 50.- Descondensación del núcleo espermático de <i>Holothuria tubulosa</i>	129
Figura 51.- Remoción de la histona H1 y de la proteína específica del espermatozoide ϕ_0	131
Figura 52.- Efecto del tiempo de incubación y de la cantidad de extracto termoestable de gonada femenina madura de <i>Holothuria tubulosa</i> sobre la remoción de las proteínas nucleares específicas del núcleo espermático.....	131
Figura 53.- Efecto de las histonas totales (H1+octaméricas) suplementadas en el extracto de gonada femenina madura de <i>Holothuria tubulosa</i> sobre la remoción de las proteínas nucleares del espermatozoide de <i>H. tubulosa</i>	134
Figura 54.- Efecto de las proteínas del core nucleosomal adicionadas al extracto termoestable de gonada femenina madura de <i>Holothuria tubulosa</i> sobre la remoción de las proteínas espermáticas.....	136
Figura 55.- Incubaciones de núcleos de espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i> con extracto termoestable de gonada femenina madura suplementado con histonas linker.....	137
Figura 56.- Esquema de los métodos de purificación cromatográfica de una molécula tipo nucleoplasmina a partir de extractos de gonada femenina madura de <i>Holothuria tubulosa</i>	139
Figura 57.- Fraccionamiento del extracto de gonada femenina madura de <i>Holothuria tubulosa</i> en columna de hidroxilapatita con gradiente isocrático.....	141
Figura 58.- Purificación de la actividad descondensadora por cromatografía de intercambio aniónico...	142
Figura 59.- Comparación de las preparaciones de extracto "low-speed" termoestable de gonada femenina madura de <i>Holothuria tubulosa</i>	143
Figura 60.- Repurificación de la actividad descondensadora en columna de hidroxilapatita con gradiente continuo.....	144
Figura 61.- Purificación de la actividad descondensadora por cromatografía con resina agarosa-protamina.	145

Figura 62.- Proteínas básicas del núcleo espermático de <i>Holothuria tubulosa</i> extraídas de los núcleos luego de ser incubados en diferentes fracciones descondensadoras de su cromatina.....	147
Figura 63.- Efecto de la nucleoplasmina de <i>Xenopus laevis</i> sobre el núcleo espermático de <i>Dicentrarchus labrax</i>	151
Figura 64.- Efecto de la nucleoplasmina de <i>Xenopus laevis</i> sobre el núcleo espermático del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i>	152
Figura 65.- Fraccionamiento en columna de hidroxilapatita del extracto termoestable de ovocito maduro de <i>Holothuria tubulosa</i>	155
Figura 66.- Actividad de remoción de la proteína ϕ_0 del núcleo espermático de <i>Holothuria tubulosa</i> mediada por las fracciones del extracto de ovocito maduro.....	156
Figura 67.- Actividad de descondensación de la cromatina de los núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i> mediada por las fracciones del extracto de ovocito maduro.....	157
Figura 68.- Efecto del tiempo de incubación con la PR ϕ_0 sobre la descondensación del núcleo espermático de <i>Holothuria tubulosa</i>	159
Figura 69.- Efecto de la concentración de PR ϕ_0 sobre la remoción de la proteína ϕ_0 de los núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i>	159
Figura 70.- Cuantificación de la remoción de la proteína ϕ_0 del núcleo espermático mediado por diferentes concentraciones de la proteína PR ϕ_0 del ovocito maduro de <i>Holothuria tubulosa</i>	160
Figura 71.- Efecto de la PR ϕ_0 de ovocito maduro de <i>Holothuria tubulosa</i> y de la nucleoplasmina de ovocito de <i>Xenopus laevis</i> sobre la remoción de la proteína ϕ_0 del núcleo espermático de <i>Holothuria tubulosa</i>	161
Figura 72.- Efecto de la proteína PR ϕ_0 del ovocito maduro de <i>Holothuria tubulosa</i> sobre los núcleos espermáticos de <i>Dicentrarchus labrax</i>	162
Figura 73.- Determinación del punto isoelectrico de la proteína PR ϕ_0 del ovocito maduro de <i>Holothuria tubulosa</i>	165

Índice de Tablas

Tabla 1.- Composición de aminoácidos de las proteínas nucleares básicas del espermatozoide de <i>Holothuria tubulosa</i>	85
Tabla 2.- Estadística descriptiva del tamaño de los ovocitos de <i>Holothuria tubulosa</i>	94
Tabla 3.- Procesos en los huevos de erizo de mar afectados por el incremento de pH _i en la fertilización.	125
Tabla 4.- Composición de aminoácidos de las fracciones descondensadoras de núcleos espermáticos de <i>Holothuria tubulosa</i>	149
Tabla 5.- Composición de aminoácidos de la proteína PR ₀ del ovocito maduro de <i>Holothuria tubulosa</i> y de otras proteínas relacionadas a la remodelación de la cromatina espermática.....	164
Tabla 6.- Aminoácidos: Nomenclatura y características de sus radicales.....	181

Símbolos y Abreviaturas

ϕ_0	Proteína específica del espermatozoide de <i>H. tubulosa</i>
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro
2D-Page	Geles bidimensionales
A	Absorbancia
Anti- ϕ_0	Anticuerpo contra la proteína ϕ_0
ATP	Adenosin trifosfato
AU-Page	Geles de poliacrilamida-acético-urea
BME o β -ME	β -mercaptoetanol
bp	Pares de base
BSA	Seroalbúmina de bovino
cDNA	DNA complementario
DEAE	radical dietilaminoetil
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNPL	Nucleoplasmina de <i>Drosophila</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELFO-2D	Electroforesis bidimensional
g	Aceleración de gravedad
GV	Vesícula germinal o núcleo del ovocito
GVBD	Ruptura de la vesícula germinal
HTP	Hidroxilapatita o hidroxipatita
IEF	Enfoque isoeléctrico
kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
MET	Microscopía electrónica de transmisión
ml	Mililitro
MWap	Peso molecular aparente
N	Normal
nm	Nanómetro
NP o NPL	Nucleoplasmina
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
pb	Pares de bases
pHi	pH intracelular
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenil metilsulfonilo
PR ϕ_0	Proteína removedora de ϕ_0
PSA	Persulfato amónico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
SDS-Page	Geles de poliacrilamida-SDS
TAU-Page	Geles de poliacrilamida-tritón-acético-urea
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)-aminometano