

Carencia de nucleoplasmina en los ovocitos de *Holothuria tubulosa*. Otra posible actividad que remodela la cromatina del espermatozoide

Resumen

Durante la fertilización el núcleo del espermatozoide queda inmerso en el citoplasma del ovocito, y seguidamente, se transforma en el pronúcleo masculino. La formación del pronúcleo masculino se refiere al proceso de recambio de las proteínas básicas (polipéptidos especializados) que compactan el DNA (cromatina espermática) por histonas de tipo somático y/o embrionarias. Éste recambio es un prerequisite para que la interacción (recombinación) entre ambos genomas parentales ocurra a fin de generar una cromatina potencialmente activa. De forma habitual, estos cambios bioquímicos que se producen durante la remodelación de la cromatina espermática son referidos al proceso de descondensación del núcleo espermático.

En particular, la remodelación de la cromatina del espermatozoide de *Xenopus laevis* ha sido ampliamente estudiada. En ovocitos y huevos de *Xenopus* se ha demostrado que la nucleoplasmina (NPL) es responsable de remover y recambiar las proteínas específicas (X e Y) del núcleo espermático por las histonas somáticas H2A y H2B siendo el resultado la reconstitución de una cromatina somática en el pronúcleo masculino. Por otro lado, la NPL es activa en remodelar la cromatina de los espermatozoides de diversas especies, tales como: *Drosophila*, algunos invertebrados marinos (es el caso de *Mytilus* y *Spisula*), peces (Salmón y Caballa), e incluso es capaz de remodelar la cromatina del espermatozoide humano. En *Drosophila*, *Mytilus* y *Spisula* se han identificado las proteínas responsables de la descondensación de la cromatina espermática de sus respectivas especies. La caracterización de éstas proteínas establece similitud con la NPL de *Xenopus* y por esta razón han sido referidas como NPL-like. Sobre estos antecedentes se ha planteado que la NPL de *Xenopus* tendría un rol funcional universal y sería el modelo de molécula responsable de la remodelación de la cromatina del espermatozoide.

Dependiendo de la naturaleza de las proteínas específicas o especializadas que se asocian al DNA para su compactación; la cromatina espermática puede organizarse entre dos tipos extremos: como nucleohistona (las proteínas especializadas son histonas o histonas modificadas) o como nucleoprotamina (las proteínas especializadas son del tipo de las protaminas). Entre estos dos tipos, la cromatina espermática puede organizarse en una amplia variedad de formas considerando que los polipéptidos especializados corresponde a un grupo de proteínas diversas; éstos tipos de cromatina podrían ser referidos a un amplio grupo intermedio. Considerando éste breve análisis sobre la organización de la cromatina espermática es evidente que el modelo de la remodelación de la cromatina espermática mediada por la NPL o NPL-like ha sido planteado sobre la remodelación de la cromatina espermática del tipo nucleoprotamina. Un antecedente adicional se refiere al hecho que la NPL es muy poco eficiente en remodelar la cromatina espermática de *Rana catesbeiana*, la cual corresponde a un tipo de cromatina organizada como nucleohistona.

En base a estas consideraciones, el objetivo de esta Tesis fue determinar la presencia de una molécula tipo NPL en los ovocitos de *Holothuria tubulosa* (Echinodermata), la cromatina espermática de ésta especie se organiza en forma de nucleohistona con la presencia adicional de una proteína específica denominada ϕ_0 . La hipótesis general que se plantea es que los mecanismos y las moléculas responsables de la remodelación de la cromatina espermática deben ser diferentes dependiendo del tipo de organización de la cromatina del espermatozoide.

Los resultados demuestran que los extractos de ovocitos de *Holothuria tubulosa* exhaustivamente fraccionados no contienen NPL o NPL-like. Pero alternativamente identificamos y caracterizamos en forma parcial una proteína que funcionalmente *in-vitro* es responsable de la remoción de la proteína específica ϕ_0 del núcleo espermático, y en ésta situación produce descondensación de la cromatina del espermatozoide. Ésta proteína ha sido denominada PR ϕ_0 por su actividad funcional como proteína que remueve la ϕ_0 espermática. Por otro lado, la NPL de *Xenopus* es incapaz de remodelar la cromatina del espermatozoide de *Holothuria tubulosa*, pero es capaz de remodelar la cromatina espermática que contiene protamina típica (núcleoprotamina). Por lo contrario, la PR ϕ_0 no remodela la cromatina de tipo núcleoprotamina.

La conclusión principal de la Tesis es que el ovocito de *Holothuria tubulosa* debe poseer un mecanismo de remodelación de su cromatina espermática diferente y alternativo al descrito en *Xenopus laevis*. Los mecanismos de remodelación de la cromatina espermática podrían estar relacionados con las proteínas especializadas que organizan la cromatina del núcleo del espermatozoide. Por último, la carencia de NPL o NPL-like en los ovocitos de *Holothuria tubulosa* cuestionan el rol universal asignado a la NPL como molécula responsable de la remodelación de la cromatina del espermatozoide.

Lack of nucleoplasmin in the *Holothuria tubulosa* oocyte. Other possible activity that remodels the sperm chromatin

Summary

The sperm nucleus following fertilization remains into the egg cytoplasm, and subsequently, it results in sperm nuclear decondensation and formation of a functional male pronucleus. This includes the replacement of sperm nuclear basic proteins (specialized polypeptides) involved in DNA condensation in sperm nuclei (spermatid chromatin) by somatic and/or embryonic histones. This event is a prerequisite so that the interaction (recombination) among both parental genomes occurs in order to generate a functional chromatin. In a customary way, these biochemical changes that are produced during the remodeling of the spermatid chromatin are associated to the process of decondensation of the spermatid nuclei.

In particular, the remodeling of the sperm chromatin of *Xenopus laevis* has been widely studied. In oocytes and eggs of *Xenopus* has been demonstrated that nucleoplasmin (NPL) is responsible for removal and replacement of the specific proteins (X and Y) of the spermatid nuclei by somatic H2A and H2B histones being the result the reconstitution of a somatic chromatin in the male pronuclei. On the other hand, NPL is active in remodeling the sperm chromatin of various kinds, such as: *Drosophila*, some marine invertebrates (as is the case of *Mytilus* and *Spisula*), fish (Salmon and Mackerel), and even it is able to remodel the human sperm chromatin. In *Drosophila*, *Mytilus* and *Spisula* have been identified the responsible proteins for the sperm chromatin decondensation of their respective kinds. The characterization of these proteins establishes similarity with the NPL of *Xenopus* and for this reason have been considered as NPL-like. On these precedents it has been suggested that the NPL of *Xenopus* would have a universal functional role and would be the responsible molecule for remodeling the sperm chromatin.

Depending on the nature of the specialized or specific proteins that are associated to the DNA packing; the sperm chromatin can be organized in two extreme types: as nucleohistone (the specialized proteins are histones or modified histones) or as nucleoprotamine (the specialized proteins are of the type of the protamines). Among these two types, the spermatid chromatin can be organized in a wide variety considering that the specialized polypeptides correspond to a group of diverse proteins; these types of chromatin could be referred to as a wide intermediate group. Taking into account this short analysis on the organization of the sperm chromatin is evident that the remodeling model of the sperm chromatin mediated by the NPL or NPL-like it has been based on the remodeling of the spermatid chromatin of the type nucleoprotamine. An additional precedent is referred to cause that the NPL is very little efficient in remodeling the sperm chromatin of *Rana catesbeiana*, the which one corresponds to a form of chromatin organized as nucleohistone.

By these considerations, the purpose of this Thesis was determined the presence of a molecule type NPL in the *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) oocytes, the spermatid chromatin of this kind is organized in the form of nucleohistone with the additional presence of a specific protein named ϕ_0 . The general hypothesis is that the mechanisms and the responsible molecules for the remodeling of the sperm chromatin should be different depending on the type on organization on the sperm chromatin.

The results demonstrate that the extracts of *Holothuria tubulosa* oocytes thoroughly fractionated do not contain NPL or NPL-like. But alternatively we identify and characterize in partial form a protein that functionally *in-vitro* is responsible for the removal of the specific protein ϕ_0 of the spermatid nuclei, and in this situation produces decondensation of the sperm chromatin. This protein has been termed PR ϕ_0 due to its functional activity as a protein that removes the spermatid ϕ_0 . On the other hand, the NPL of *Xenopus* is unable to remodel the sperm chromatin of *Holothuria tubulosa*, but it is able to remodel the sperm chromatin that contains typical protamine (nucleoprotamine). On the contrary, the PR ϕ_0 does not remodel the chromatin of the type nucleoprotamine.

The essential conclusion of the Thesis is that the *Holothuria tubulosa* oocyte must possess a remodeling mechanism of its sperm chromatin different and alternative that to described for *Xenopus laevis*. The remodeling mechanisms of the sperm chromatin could be related to the specialized proteins that organize the sperm chromatin. Finally, the lack of NPL or NPL-like in the *Holothuria tubulosa* questions the universal role assigned to the NPL as responsible molecule for the remodeling of the sperm chromatin.